

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Nadměrná exprese proteinu SAMK fúzovaného
s fluorescenčním proteinem
a lokalizační studie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jiří Sojka
Studijní program:	N1406, Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Navazující, Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen 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

.....

Bc. Jiří Sojka

Poděkování:

„Rád bych poděkoval v první řadě svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Ivanu Luptovčiakovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Chtěl bych poděkovat také prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. a v neposlední řadě děkuji celému kolektivu Oddělení Buněčné Biologie za přátelské prostředí a ochotu pomoci a poradit.

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. Tato práce taky vznikla za podpory projektu „Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje“, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827 financovaného z EFRR.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jiří Sojka
Název práce	Nadměrná exprese proteinu SAMK fúzovaného s fluorescenčním proteinem a lokalizační studie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení Buněčné Biologie
Vedoucí práce	Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Rostliny jsou neustále vystavovány nepříznivým stimulům z vnějšího prostředí, které negativně ovlivňují jejich růst a vývoj. Jako určitá obrana proti těmto stresovým faktorům jim slouží MAP kinasová kaskáda. V této diplomové práci byly připraveny pomocí molekulárně biologických technik konstrukty SAMK ve fúzi s fluorescenčním proteinem a transformovány do *Nicotiana benthamiana* pro zjištění lokalizace za použití mikroskopie. Dále vytvořeny konstrukty Crispr/Cas9 *SAMK* gRNA a otestovány v *Medicago sativa*. Byly úspěšně vytvořené konstrukty *35S::SAMK:mRFP* a *35S::mRFP::SAMK*. Lokalizace SAMK-mRFP a mRFP-SAMK v buňkách listu *N. benthamiana* je v jádru nikoliv v jadérku a při cytoplasmatické membráně. Za pomoci metody Western blot byla ověřena produkce SAMK-mRFP a mRFP-SAMK v listech *N. benthamiana*. Rostliny *M. sativa* transformované konstrukty *SAMK* gRNA byly ověřeny pomocí PCR se specifickými primery a na transgen pozitivní byly dále analyzovány za použití Western blot. V *M. sativa* *SAMK* gRNA však docházelo napříč očekávání ke zvýšené tvorbě SAMK i dalších MAP kinas. Proto lze očekávat, že byl transgen pravděpodobně umlčen.

Klíčová slova	MAP kinasa, SAMK, Crispr/Cas9, mikroskopie
Počet stran	118
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jiří Sojka
Title	Overexpression of SAMK protein in fusion with fluorescence protein and localization study
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Cell Biology
Supervisor	Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Plants are constantly exposed to adverse stimuli from the external environment, which negatively affect their growth and development. The MAP kinase cascade serves as a defense against these stressors. In this diploma thesis, constructs SAMK in fusion with a fluorescent protein were prepared using molecular biological techniques and transformed into *Nicotiana benthamiana* to determine the location using microscopy. Furthermore, the creation of Crispr/Cas9 *SAMK* gRNA constructs and their testing in *Medicago sativa* were performed. The *35S::SAMK:mRFP* and *35S::mRFP:SAMK* constructs were successfully generated. The localization of SAMK-mRFP and mRFP-SAMK in *N. benthamiana* leaf cells is in the nucleus and not in the nucleolus and also near to the cytoplasmic membrane. The production of SAMK-mRFP and mRFP-SAMK in *N. benthamiana* leaves was verified by Western blotting. Plants *M. sativa* transformed *SAMK* gRNA constructs were verified by PCR with specific primers and further transgene positive plants analyzed using Western blot. However, in *M. sativa* *SAMK* gRNA, the production of SAMK and other MAP kinases increased. Therefore, it can be expected that the transgene was probably silenced.

Keywords	MAP kinase, SAMK, Crispr/Cas9, microscopy
Number of pages	118
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1 Obecná charakteristika vojtěšky seté (<i>Medicago sativa</i> L.)	3
2.2 Mitogen aktivované protein kinasy	5
2.2.1 Obecná charakteristika a rozdělení rostlinných MAPK	5
2.2.1.1 MAPK kaskády a vznik modulů	7
2.2.1.2 MAPK u <i>Arabidopsis thaliana</i> a jejich ortology	9
2.2.1.3 Funkce MAP kinas při buněčném dělení a buněčném cyklu	11
2.2.1.4 Buněčná lokalizace MAP kinas a metody zjištění	12
2.3. Charakteristika Stresem aktivované MAP kinasy u vojtěšky seté	13
2.3.1 Regulace signalační dráhy SAMK na molekulární úrovni	14
2.3.2 Zapojení SAMK do signalizace biotického stresu a symbiózy	14
2.3.3 Zapojení SAMK do signalizace abiotického stresu	16
2.3.3.1 Signalizace stresu z těžkých kovů	16
2.3.3.2 Signalizace stresu z poranění	17
2.3.3.3 Signalizace stresu z nízkých teplot	18
2.3.4 MAPKK aktivující SAMK a jejich ortologní MAPKK	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Materiál	22
3.1.1 Chemikálie	22
3.1.2 Přístroje a zařízení	24
3.1.3 Roztoky a média	26
3.1.4 Rostlinný materiál	30
3.2 Metody	31
3.2.1 MultiSite Gateway klonování	31
3.2.1.1 PCR pro přípravu a molekulární klonování genu <i>SAMK</i>	32
3.2.1.2 BP reakce	33

3.2.1.3 LR reakce.....	33
3.2.2 Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> kmene TOP10.....	34
3.2.2.1 Příprava chemokompetatních buněk <i>E. coli</i>	34
3.2.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i>	36
3.2.2.3 Transformace elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i>	37
3.2.2.4 Transformace chemokompetentních buněk <i>E. coli</i>	38
3.2.3 PCR kolonií.....	38
3.2.4 Izolace plasmidové DNA.....	40
3.2.4.1 Izolace plasmidu pomocí miniprep P1P2P3.....	40
3.2.4.2 Izolace plasmidu pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit.....	41
3.2.5 Restrikční štěpení plasmidů.....	42
3.2.6 Příprava <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pro další použití.....	43
3.2.6.1 Příprava chemokompetentních <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
3.2.6.2 Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> teplotním šokem.....	44
3.2.7 Transientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	45
3.2.8 Konfokální laserová skenovací mikroskopie.....	47
3.2.9 Příprava konstruktů SAMK gRNA.....	48
3.2.10 Genotypizace transgenních rostlin <i>Medicago sativa</i>	50
3.2.11 Agarosová gelová elektroforéza.....	52
3.2.12 Stabilní transformace <i>Medicago sativa</i> a somatická embryogeneze.....	53
3.2.12.1 Sterilizace rostlinného materiálu <i>Medicago sativa</i>	53
3.2.12.2 Kultivace <i>M. sativa</i> na B5H médiu.....	54
3.2.12.3 Kultivace <i>M. sativa</i> na B50 médiu.....	54
3.2.12.4 Kultivace <i>M. sativa</i> na MMS médiu.....	55
3.2.12.5 Kultivace <i>M. sativa</i> na MS médiu.....	55
3.2.13 Western blot analýza.....	56
3.2.13.1 Extrakce proteinů.....	56

3.2.13.2 Stanovení koncentrace izolovaných proteinů	56
3.2.13.3 SDS-PAGE	57
3.2.13.4 Western blot.....	58
4 VÝSLEDKY	60
4.1 Klonování SAMK ve fúzi s fluorescenčním proteinem	60
4.1.1 Příprava konstruktů SAMK ve fúzi s fluorescenčním proteinem	60
4.1.2 Detekce buněčné lokalizace SAMK v listech <i>Nicotiana benthamiana</i>	68
4.1.3 Imunodetekce fúzního proteinu SAMK-mRFP/mRFP-SAMK	70
4.1.4 Nadprodukce SIMKK a SAMK v <i>Nicotiana benthamiana</i>	72
4.2 Příprava SAMK gRNA testovacích linií vojtěšky seté (<i>M. sativa</i>)	76
4.2.1 Klonování konstruktů SAMK gRNA	76
4.2.2 Genotypizace rostlin <i>Medicago sativa</i> SAMK gRNA.....	78
4.2.3 Imunodetekce SAMK v <i>Medicago sativa</i> SAMK gRNA.....	81
5 DISKUZE	93
5.1 Klonování SAMK za účelem detekce lokalizace.....	93
5.2 Nadprodukce SIMKK a SAMK v listech <i>Nicotiana benthamiana</i>	94
5.3 Testování konstruktů SAMK gRNA v <i>Medicago sativa</i>	95
6 ZÁVĚR.....	98
7 LITERATURA.....	100
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	107

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

1. Vypracování literární rešerše týkající se problematiky mitogen aktivovaných protein kinázách v *Medicago sativa* a jejich ortologů v *Arabidopsis thaliana* a jiných rostlinných druzích.
2. Zpracování kapitoly pojednávající o signálních drahách v *M. sativa* se zaměřením na SAMK při vývinu a odpovědi na stres.

Praktická část:

1. Hlavním cílem je realizace experimentů molekulárního klonování konstruktů pro expresi SAMK proteinu ve fúzi s fluorescenčním proteinem a následné ověření konstruktů za pomoci transientní transformace *Nicotiana benthamiana* získanými expresními konstrukty za účelem lokalizace pomocí pokročilých mikroskopických metod.
2. Otestování konstruktů SAMK gRNA v *M. sativa* RSY za pomoci *A. tumefaciens* řízené transformace, zjištění abundance SAMK a dalších MAPK pomocí Western blot.
3. Propagace transgenního a kontrolního rostlinného materiálu pomocí somatické embryogeneze.

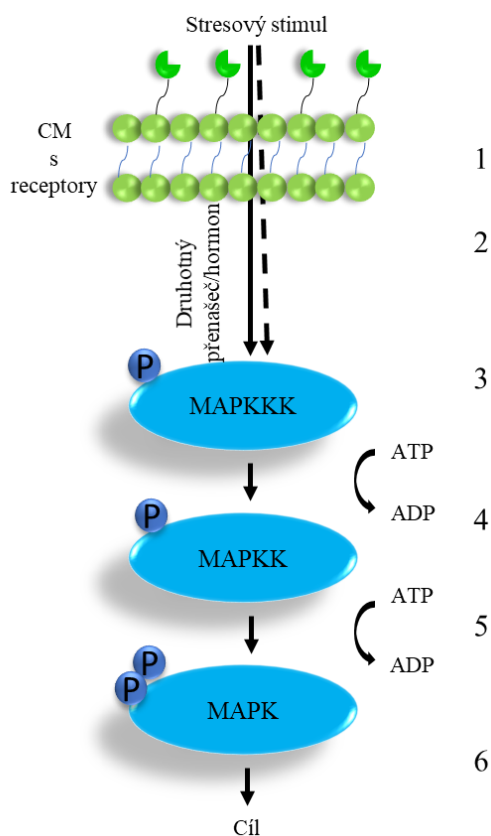
1 ÚVOD

Rostliny si v průběhu evoluce vyvinuly řady mechanismů, kterými přijímají signály z vnějšího prostředí a přenášejí je ve svých buňkách, pletivech i orgánech. Jsou tak schopné reagovat na změny ve svém okolí, což je velice důležité s ohledem na jejich sesilný způsob života. Nejen rostliny, ale i živočichové a houby používají k přenosům signálu kaskádovitý mechanismus enzymatických reakcí, které jsou mezi sebou propojené (Zanke *et al.*, 1996; Ligterink a Hirt, 2001; Xu *et al.*, 2017). Vedou tak k co nejefektivnějšímu a nejrychlejšímu předání signálu z receptorů na povrchu či uvnitř buňky do efektorových organel, expresi specifických proteinů, a tedy odpovědi na určitý signál z vnějšího nebo vnitřního prostředí (Kiegerl *et al.*, 2000).

Jedním z nejčastějších typů enzymů sloužících k přenosu signálu u rostlin jsou MAPK (Mitogenem Aktivované Proteinové Kinasy). Jsou uspořádané do třístupňové kaskády (Obr. 1). Nadřazená MAPKKK (Mitogen Aktivovaná Protein Kinasa Kinasa Kinasa) fosforyluje MAPKK (Mitogen Aktivovanou Protein Kinasu Kinasu), ta následně předává signál dvojitou fosforylací na MAPK (Mitogen Aktivovanou Protein Kinasu) (Colcombet a Hirt, 2008; Raja *et al.*, 2017). K fosforylaci dochází na serin/threoninovém nebo threonin/tyrosinovém motivu. S ohledem na místo fosforylace se MAPK rozdělují do čtyř podskupin (Ichimura *et al.*, 2002). Navázáním mitogenu, to jest (dále již tj.) hormon, peptid nebo chemická sloučenina se spouští enzymatická kaskáda. Může docházet k aktivování více podobných drah jedním z mitogenů (Smékalová *et al.*, 2013). Rostlina tak může rychle reagovat na biotický a abiotický stres. MAPK jsou důležité nejen pro vnímání stresu, ale i při vývoji a růstu rostliny (Seguí-Simarro *et al.*, 2005; Gupta a Chakrabarty, 2013; Danquah *et al.*, 2015).

Nejvíce jsou MAPK kaskády prozkoumány u modelové dvouděložné rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Zde je známo a popsáno 60 MAPKKK, 10 MAPKK a 20 MAPK proteinů (Ichimura *et al.*, 2002). Výzkum MAPK kaskád probíhá i u jiných rostlinných druhů např. rýže seté (*Oryza sativa*) (Wankhede *et al.*, 2013), kukuřice (*Zea mays*) (Kong *et al.*, 2013) či vojtěšky seté (*Medicago sativa*) (Chen *et al.*, 2016) z důvodů jejich přímé využitelnosti v zemědělství. Sekvence genů kódující MAP kinasy a jejich funkce v buňce jsou evolučně vysoce konzervované napříč druhy vyšších rostlin (Danquah *et al.*, 2015).

Jednou z důležitých MAPK u vojtěšky seté (*M. sativa*) je Stresem Aktivovaná MAP Kinasa (SAMK). Bylo zjištěno, že se podílí na signalizaci biotického a abiotického stresu. Je zapojena do odpovědi rostliny na chlad, poranění a těžké kovy (Zwerger a Hirt, 2001; Jonak *et al.*, 2004). SAMK může mít vliv na přenos více druhů stresových signálů v buňkách popřípadě (dále již popř.) i na reorganizaci cytoskeletu. Je důležité si uvědomit, že MAP kinasové kaskády spolu navzájem komunikují, integrují se a kompenzují. SAMK může mít významnou roli na zvýšení odolnosti vůči rozličným typům stresů. Pochopení její funkce může vést ke zlepšení pěstování významné krmné plodiny, kterou je vojtěška setá (*Medicago sativa*). Za použití nových metod molekulární biologie, biochemie a vysokorozlišovací mikroskopie je nyní možné docílit velice precizního a přesného pochopení funkce a biologické aktivity SAMK.



Obr. 1 MAPKs kaskáda (Bc. Jiří Sojka, 2020 upraveno dle bakalářské práce Bc. Jiří Sojka, 2018).
 1. příjem stresového stimulu z vnějšího prostředí pomocí receptorů na cytoplazmatické membráně (CM) 2. přenos signálu pomocí druhotných přenašečů nebo hormonů 3. aktivace MAPKKK fosforylací 4. aktivace MAPKK fosforylací 5. aktivace MAPK dvojitou fosforylací a 6. přenos stimulu a ovlivnění aktivity transkripčních faktorů, proteinových kinas nebo reorganizace cytoskeletu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Obecná charakteristika vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.)

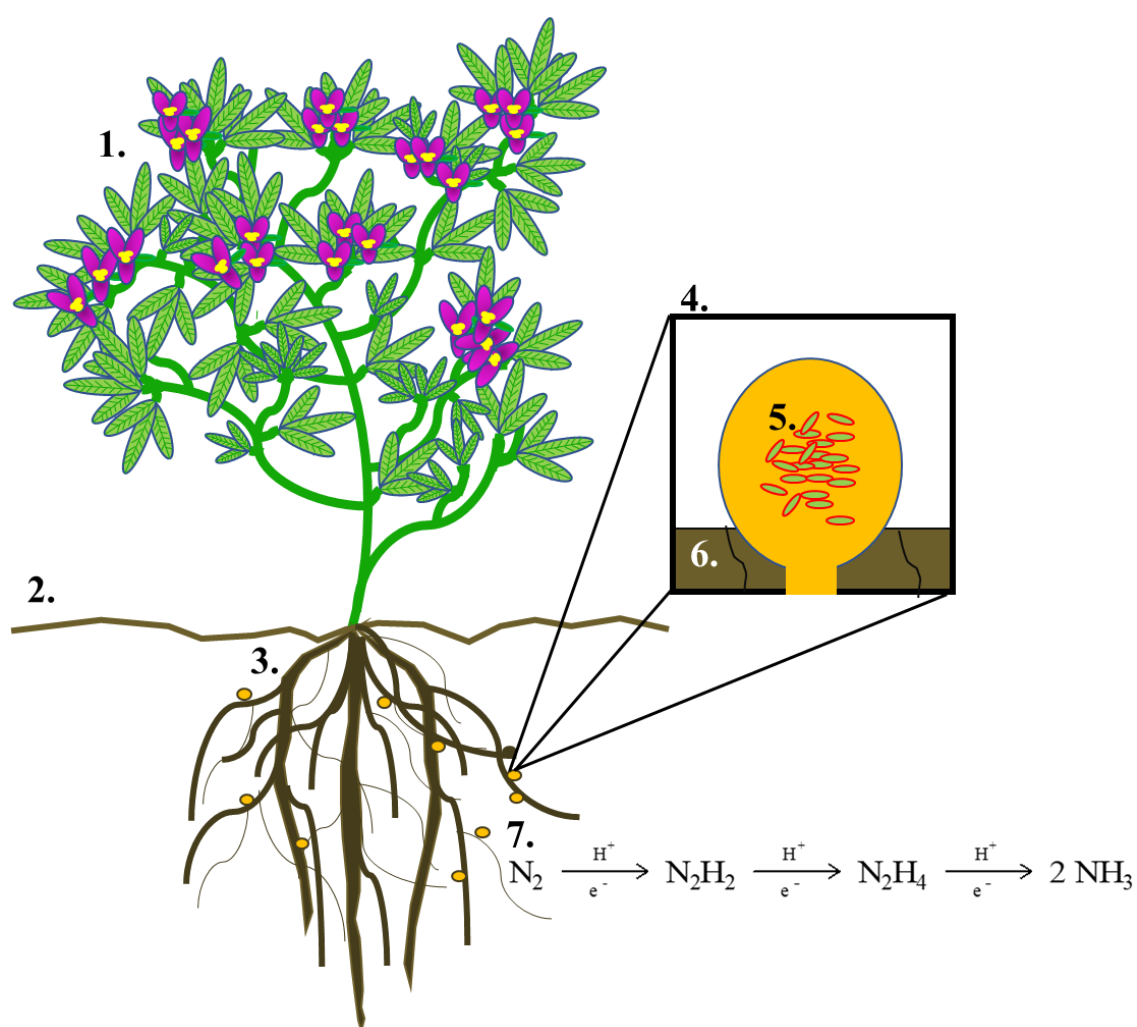
Vojtěška setá (*M. sativa*) je víceletá dvouděložná rostlina. Patří do rodu *Medicago*, čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Čeleď *Fabaceae* skýtá 12 000 druhů, a je tak jednou z nejrozšířenějších čeledí dvouděložných rostlin. Jsou zde zařazeny i jedny z nejvýznamnějších hospodářských plodin například (dále již např.) hrách setý (*Pisum sativum*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*) a snad nejdůležitější sója luštinatá (*Glycine max*) (Slavík, 2000). Rostliny čeledi *Fabaceae* se od ostatních liší tím, že za pomoci symbiotických půdních bakterií rodu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* a *Sinorhizobium* jsou schopné v orgánech zvaných hlízky (Obr. 2) fixovat vzdušný dusík (Ogden *et al.*, 2017; Benito *et al.*, 2017). K tomu, aby bakterie vnikly do rostliny, slouží SYMRK (SYMBiosis Receptor-like Kinase), objevené právě ve vojtěšce seté (*M. sativa*) (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002).

Vojtěška setá (*Medicago sativa*), taktéž zvaná jako „královna pícnin“ byla první pěstovanou krmnou rostlinou na světě. Využívala se již před vynálezem písma. Původní prapředci této plodiny byli pěstováni na území úrodného půlměsíce, nynějších států Iráku, Sýrie, Libanonu, Izraele a Egypta (Bolton, 1962). Odtud se v letech okolo 2400 př.n.l. (před naším letopočtem) rozšířila vojtěška do bývalého Řecka a Říma. Dle písemnosti Gaia Plinia Secunda *Naturalis historia* byla vojtěška setá (*M. sativa*) významnou krmnou plodinou využívanou v Římské říši. Rozsah působení Římské říše pomohl k rozšíření vojtěšky do celé Evropy včetně Ruska a severní Afriky. V roce 1736 byla první písemná zmínka o pěstování vojtěšky seté (*M. sativa*) na území Georgie ve Spojených Státech Amerických. V Jižní Americe ji rozšířili Španělé (Gunn *et al.*, 1978).

Jedním z morfologických znaků pomáhající rozpoznat vojtěšku setou (*M. sativa*) jsou trojčetné řapíkaté listy o velikosti od 1-3 cm obvejčitého tvaru. Lodyha má v rozmezí od 30 do 100 cm s výjimečným výskytem řídkého ochlupení v závislosti na lokalitě výskytu. Rostlina má bohatě větvený kořenový systém. Z hlavního kořene vystupují postranní, které se dále větví (Valíček, 2002). Květy vojtěšky seté (*M. sativa*) jsou eliptického tvaru, složeny z kalichu a koruny. Na rostlině se jich vyskytuje pár desítek. Po opylení a oplození rostlina tvoří žlutohnědá semena ledvinovitého tvaru (Slavík, 2000).

Tato luskovina se vyskytuje přirozeně v teplejších oblastech, kde je půda s neutrálním pH bohatá na živiny. Může se však vyskytovat i ve vyšších polohách a často ji můžeme pozorovat i v blízkosti silničních a železničních komunikací (Slavík, 2000).

Vojtěška setá (*M. sativa*) se využívá díky vysokému obsahu bílkovin v dužině, snadnému pěstování a více sklizním do roka jako krmivo pro dobytek. Stala se jednou z nejvýznamnějších píceň, a to již v dobách Římské říše. Nyní je osevní plocha 30 milionů hektarů. Ačkoliv se dá pěstovat díky své odolnosti vůči stresu z nedostatku vody a nízkých teplot skoro všude na světě, většina produkce pochází ze Severní Ameriky (Valíček, 2002).



Obr. 2 Nákres vojtěšky seté (*Medicago sativa*) se specializovanými orgány k fixaci vzdušného dusíku za pomoci symbiotické bakterie z rodu *Rhizobium* v útvarcích - hlízkách (Bc. Jiří Sojka, 2020 dle originálu Valentine *et al.*, 2017). 1. Nadzemní část vojtěšky seté (*M. sativa*), 2. Půda, 3. Podzemní/kořenová část rostliny s hlízkami, 4. Detail hlízkky, 5. Hlízka a uvnitř ní symbiotické bakterie rodu *Rhizobium* fixující vzdušný N_2 , 6. Buňky rhizodermis, 7. rovnice fixace vzdušného N_2 za využití enzymu nitrogenasa z *Rhizobií*.

2.2 Mitogen aktivované protein kinasy

2.2.1 Obecná charakteristika a rozdělení rostlinných MAPK

MAP kinasy jsou obecně enzymy nacházející se ve všech eukaryotických buňkách, ať už savčích, rostlinných tak i hub. Spadají do třídy fosfotransferas. Přenášejí signály na základě fosforylace a defosforylace konzervovaných serin/threoninových či threonin/tyrosinových motivů v rámci třístupňové kaskády. K aktivaci fosforylací využívají MAP kinasy ATP. K fosforylaci může dojít pouze pokud není přítomná regulační doména. Mohou sloužit pro ostatní enzymy i jako takzvané (dále již tzv.) proteiny lešení, z angl. „scaffold“. Poté co jsou MAP kinasy fosforylovány, mohou vytvářet dokovací místo pro další proteiny zapojené v signální kaskádě (Alexa *et al.*, 2010). Slouží především k přenosu extracelulárního signálu k výkonným organelám, které reagují na změnu ve vnějším prostředí. MAP kinasy jsou stimulovány nejčastěji hormony, mitogeny a dalšími látkami vyvolávající stres a podněcující změnu exprese genů zapojených v odpovědi na něj (Kiegerl *et al.*, 2000).

Cíli většiny MAP kinas jsou rozličné transkripční faktory především z rodiny WRKY, myeloblastosy, zinkových prstů a další (Nguyen *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017; Ueda *et al.*, 2017). Fosforylace transkripčních faktorů není vázána na nukleární lokalizaci MAP kinas. K fosforylaci transkripčního faktoru může dojít v cytoplazmě a následně je aktivovaný transkripční faktor relokován do jádra. To bylo potvrzené u aktivace transkripčního faktoru VIP1 (VirE2 Interacting Protein 1) pomocí MPK3 (MAP Kinase 3; AT3G45640.1) (Djamei *et al.*, 2007). Přímé interakce mezi MAP kinasami a transkripčními faktory byly potvrzeny na základě použití metody BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) např. u tabákové SIPK (Salicylic-acid Induced Protein Kinase) a WRKY8 (Ishihama *et al.*, 2011). Cíli MAP kinas jsou také proteinové kinasy a cytoskelet (Whitmarsh a Davis, 1998). Uplatňují se potom především při signalizaci abiotického stresu ze sucha, tepla, chladu, záření a zasolení (Jonak *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 2011) a biotického stresu, vývoji, proliferaci, diferenciaci buněk a organismu i apoptóze (Robinson a Cobb, 1997; Ichimura *et al.*, 2002).

MAP kinasy jsou dle fylogenetického členění rozděleny do čtyř tříd A, B, C a D a několika podtříd na základě motivů fosforylace. MAP kinasy ze tříd A, B, C jsou fosforylovány na T-E-Y konzervovaném motivu. To znamená, že je motiv skládající se z threoninu (T), glutamátu (E) a tyrosinu (Y) rozpoznán určitým mechanismem a následně fosforylován. MAP kinasy z třídy D sdílí motiv T-D-Y, značící threonin (T), kyselinu aspartátovou (D) a tyrosin (Y). Takto jsou MAP kinasy rozděleny v rámci druhů rostlin na základě podobnosti a umístění míst pro fosforylaci (Ichimura *et al.*, 2002). Přesná krystalická struktura tohoto místa byla vymodelována a popsána na atomární úrovni. To je naprosto stěžejní pro pochopení mechanismu regulace a funkce MAP kinas (Zhang *et al.*, 1994).

Doménové složení MAP kinas je až na malé odlišnosti konzervované v rámci všech eukaryotických organismů. Všechny obsahují serin/threoninovou nebo threonin/tyrosinovou kinasovou doménu různé délky umístěnou mezi N a C koncem proteinu. Kinasová část vykonává stěžejní funkci, dle které jsou tyto enzymy pojmenovány. Dále se vyskytují u některých MAP kinas transaktivační domény podílející se na jejich aktivitě. Nukleární lokalizační signál je důležitý pro schopnost kinasy překonat bariéru v podobě jaderné membrány a dostat se do a z jádra buňky. U jedné ze zástupců rostlinných MAP kinas SIMK (Stress-Induced MAP Kinase) z vojtěšky seté (*M. sativa*) byla pozorována jaderná lokalizace v kontrolních podmínkách a následná relokace z jádra do cytoplazmy po působení solného stresu (Kiegerl *et al.*, 2000). To naznačuje přítomnost nukleárního lokalizačního signálu. Atypickou doménou, která je bohatá na alanin, histidin a glutamin, je AHQr. Vyskytuje se u některých živočišných MAP kinas a její funkce není příliš prozkoumána. Pro funkčnost proteinu je důležité dokovací místo, které je vytvářeno fosforylací kinasové části. Některé z kinas v kaskádě mohou mít dokovací místa pro ostatní enzymy zapojené v MAP kinasové kaskádě a vytvářet tzv. modul (Robbins *et al.*, 1993; Cargnello a Roux, 2011). MAP kinasy ze třídy B obsahují dvě specifické domény na C a N konci. Doména NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) na C konci umožňuje import RAN-GDP do jádra (Tanoue *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2002).

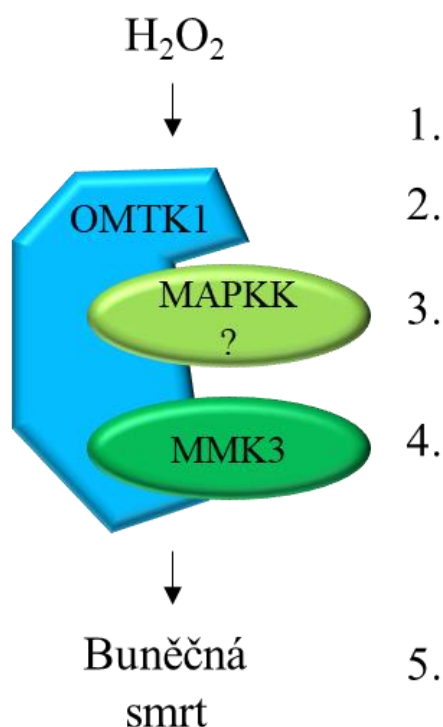
2.2.1.1 MAPK kaskády a vznik modulů

MAP kinasy jsou uspořádané do funkčních celků skládajících se zpravidla ze tří hierarchicky uspořádaných komponent. V kaskádě nejvýše umístěné jsou MAP kinasy kinasy (MAPKKK), které aktivují fosforylací MAP kinasy kinasy (MAPKK), a ty nakonec aktivují dvojitou fosforylací MAP kinasy (MAPK). Na MAPKKK je přenášen signál zachycený z vnějšího prostředí. Ten je zachycen pomocí membránových receptorových proteinů s transmembránovou doménou nebo k nim přidruženým receptorovým proteinům s touto doménou. Jednou z možností aktivace MAP kinasové kaskády, v případě zachycení elicitoru transmembránovým PRR (Pattern Recognition Receptors), je na něj vázaná cytoplazmatická RLC kinasa (Receptor-Like Cytosolic Kinase). RLC kinasa dále fosforyluje a přenáší signál na MAP kinasovou kaskádu (Yamada *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2018). Receptorový protein společně s MAPKKK, MAPKK a MAPK působí na rozličné buněčné cíle (Morrison a Davis, 2003).

MAP kinasové kaskády jsou velice komplexní, větví se a kříží mezi sebou. V závislosti na stimulu mohou MAPKK aktivovat více MAPK. Stejně tak MAPKKK interagují s více MAPKK. Příkladem je MEKK1 (MAPK/ERK Kinase Kinase 1) z huseníčku rolního (*A. thaliana*) aktivující MKK4 a MKK5 (MAP Kinase Kinase 4/5) při biotickém stresu a obraně vůči patogenům (Asai *et al.*, 2002). Navíc aktivuje i MKK2 při stresu z chladu a soli (Teige *et al.*, 2004).

Některé z MAPK kaskád jsou spojené do modulů, kdy může jedna z její části nebo zcela jiný protein fungovat jako „lešení“ a pevně pojit celou kaskádu dohromady. To usnadňuje přemísťování kaskády v rámci buněčných struktur a buňky samotné. Proteinové „lešení“ může nabízet výhodu rychlé výměny, či povolání MAP kinas zapojených do signalizace různých buněčných dějů a vnějších stimulů (Dhanasekaran *et al.*, 2007). Tvorba kaskádových modulů vede k zabránění chybné aktivace v důsledku křížení signalizačních drah (Nishimura *et al.*, 2016). Více než u rostlin jsou proteinová „lešení“ popsána u kvasinek (Posas a Saito, 1997). Prozatím jediným pravým proteinem „lešení“ u rostlin je RACK1 (Receptor of Activated C Kinase 1) z huseníčku rolního (*A. thaliana*), který se vyskytuje ve třech izoformách RACK1A, B a C (Guo a Chen, 2008).

RACK1 splňuje všechna tři popsaná pravidla pro proteiny „lešení“, tj. interaguje se všemi členy MAP kinasového modulu a udává jim správnou orientaci umožňující jejich interakci při přenosu signálu v kaskádě. Dopravuje MAP kinasový modul k jeho nadřazeným regulátorům. Zprostředkovává předání signálu na specifické substráty (Dhanasekaran *et al.*, 2007). Někdy mohou být označovány přímo členové MAP kinasové kaskády za proteiny „lešení“, ale nesplňují všechna výše popsaná kritéria. Kupříkladu MAPKKK z vojtěšky seté (*M. sativa*) OMTK1 (putative mitogen-activated protein kinase 1) při působení oxidativního stresu vytváří dokovací místa pro ostatní členy kaskády a spojuje je (Obr. 3). To vede při působení H₂O₂ k rychlému spuštění programované buněčné smrti řízené neznámou MAP kinasou kinasou a MMK3 (*Medicago sativa* MAP Kinase 3). Zabraňuje se tak v poškozování dalších buněk (Nakagami *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2012).



Obr. 3 Schéma kaskády aktivované H₂O₂ u vojtěšky seté (*M. sativa*) zahrnující OMTK1 jako protein „lešení“ (Bc. Jirí Sojka, 2020 dle originálu Nakagami *et al.*, 2004). 1. Příjem H₂O₂ receptorovým proteinem s transmembránovou doménou 2. Aktivace fosforylací OMTK1 MAPKKK sloužící i jako protein „lešení“ 3. Neznámá MAPKK je aktivována fosforylací pomocí OMTK1 4. Dvojitá fosforylace a aktivace MMK3 pomocí neznámé MAPKK 5. spuštění programované buněčné smrti aktivovanou formou MMK3.

2.2.1.2 MAPK u *Arabidopsis thaliana* a jejich ortology

Nejvíce jsou MAPK kaskády prozkoumány u modelových rostlin, jako je např. huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Tato dvouděložná rostlina se ke genetickým a molekulárně biologickým studiím využívá díky svému krátkému životnímu cyklu, malému a osekvenovanému genomu a dobré křížitelnosti (Meinke *et al.*, 1998). Popsání a identifikace MAP kinas u huseníčku rolního (*A. thaliana*) přispívá k lepšímu porozumění funkce ortologních kinas u jiných druhů dvouděložných i jednoděložných rostlin.

U huseníčku rolního (*A. thaliana*) bylo doposud popsáno 20 MAPK. Jsou očíslovány 1-20. Dle fylogenetického členění jsou rozděleny do všech čtyřech tříd spolu s jejich ortology z jiných rostlinných druhů. S těmi sdílí sekvenční, funkční a doménovou podobnost (Ichimura *et al.*, 2002). Jsou označovány např. AtMPK3 (Arabidopsis thaliana Mitogen-Activated Protein Kinase 3).

Do třídy A MAPK z huseníčku rolního (*A. thaliana*) mající T-E-Y motiv fosforylace v kinasové doméně a obecnou dokovací doménu patří AtMPK3, AtMPK6 a AtMPK10. Ortolog AtMPK3 u vojtěšky seté (*M. sativa*) je MsSAMK (Medicago sativa Stress-Activated MAP Kinase). MsSIMK (Medicago sativa Stress-Induced MAP Kinase) je ortologem AtMPK6. Tyto MAP kinasy se podílejí na odpovědi rostliny na vnější stresové podmínky a percepci hormonů. Exprese *AtMPK3* je indukována změnami v prostředí rostliny a působením stresu (Mizoguchi *et al.*, 1996). AtMPK3 je aktivována např. při působení oxidativního stresu (Kovtun *et al.*, 2000). Kinasa AtMPK6 je aktivována reaktivními formami kyslíku. Reaktivní formy kyslíku často slouží jako sekundární přenašeči signálu (Yuasa *et al.*, 2001; Jalmi a Sinha, 2015). Další funkcí MAPK u huseníčku rolního (*A. thaliana*) je signalizace tvorby květu a vývoj květního meristému. Mutantní rostliny *atmpk10* vykazují sníženou tvorbu květů, nebo květy chybí úplně (Stanko *et al.*, 2014).

Ve třídě B jsou popsány MAP kinasy s T-E-Y motivem. Účastní se v huseníčku rolním (*A. thaliana*) odpovědi na stres a buněčného dělení. Inaktivace genu *AtMPK4* vedla k systémově získané rezistenci na stres (Petersen *et al.*, 2000). *AtMPK4* je aktivována při podmínkách biotického i abiotického stresu (Ichimura *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001). Nachází podobnosti s dalšími MAPK z huseníčku rolního (*A. thaliana*) tj. *AtMPK5*, *AtMPK11* a *AtMPK12*. Do této třídy spadá i ortologní *MsMMK2* (*Medicago sativa* Medicago MAP Kinase 2). V druhé větvi třídy B se nachází *AtMPK13* společně s jejím ortologem z vojtěšky seté (*M. sativa*) *MsMMK3* a tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) *NtNTF6* (*Nicotiana tabacum* Nuclear Translation Factor 6).

Další jsou MAPK náležející do třídy C obsahující v kinasové doméně opět T-E-Y motiv. Zástupci první větve třídy C jsou *AtMPK1* a *AtMPK2*. Tyto dvě kinasy se podílejí mimo jiné na odpovědi rostliny na rostlinný hormon auxin (Mizoguchi *et al.*, 1994). V druhé větvi se nachází *AtMPK7*. Exprese *AtMPK7* je regulována cirkadiálními rytmy (Schaffer *et al.*, 2001). Posledním členem této skupiny v huseníčku rolním (*A. thaliana*) je *AtMPK14*. MAPK z třídy C nejsou doposud plně prozkoumány a ortology z vojtěšky seté (*M. sativa*) nebyly doposud objeveny.

V poslední třídě D bylo popsáno celkem 8 MAP kinas z huseníčku rolního (*A. thaliana*). Tato třída se vyznačuje jiným doménovým složením a motivem fosforylace v kinasové doméně T-D- Y. Postrádají obecnou dokovací doménu typickou pro ostatní tři třídy MAPK. V první větvi třídy D je 5 MAP kinas, tj. *AtMPK8*, *AtMPK9*, *AtMPK15*, *AtMPK16* a *AtMPK17*. V druhé větvi jsou to *AtMPK18*, *AtMPK19*, *AtMPK20*. Jejich ortologní kinasa z vojtěšky seté (*M. sativa*) je *MsTDY1* (Putative activation motif in MAPK gene TDY1) a rýže seté (*Oryza sativa*) *OsBWMK1* (*Oryza sativa* Blast- and Wound-induced MAP Kinase 1), které jsou indukovány poraněním a napadením houbovými organismy (He *et al.*, 1999; Schoenbeck *et al.*, 1999). Stejně tak jako MAP kinasy v třídě C nejsou i ty ve třídě D kompletně prozkoumány.

2.2.1.3 Funkce MAP kinas při buněčném dělení a buněčném cyklu

Buněčné dělení je složitý děj, při kterém dochází k vytvoření dvou dceřiných buněk z buňky mateřské. Do průběhu dělení je zapojeno spousta buněčných komponent, které pomáhají a umožňují se buňce rozdělit rovnoměrně, daným směrem a v jistý okamžik. Regulace buněčného dělení je extrémně důležitá pro výsledný tvar a funkčnost buňky potažmo celého orgánu. Proto jsou povolávané signální proteiny, které celý tento orchestr dějů řídí. Mezi signální proteiny patří CDPKs (Cyclin-DeProtein Kinases), které jsou klíčové pro regulaci buněčného cyklu a přechodu z fáze do fáze (Hirt a Heberle-Bors, 1994). Prostorovou kontrolu dělení zajišťují cytoskeletální sktruktury, jako je před-profázní svazek. Ten řídí orientaci a formuje se před samým začátkem mitózy. Dále fragmoplast, který se podílí na vzniku buněčné přepážky a cytokinesi (Wick, 1991). To, jakým způsobem jsou řízeny cytoskeletální struktury, je méně známé. Avšak bylo zjištěno, že důležitou reakcí při řízení celého buněčného dělení je fosforylace. Tu zprostředkovávají mimo jiné také MAP kinas (Wolniak a Larsen, 1995).

Nejlépe prozkoumaná kaskáda zapojená do buněčného dělení a cyklu u huseníčku rolního (*A. thaliana*) je ANPs-MKK6-MPK4 (Arabidopsis Nucleus- and Phragmoplast-localized protein Kinase 1-related Protein Kinase; MAP Kinasa Kinasa 6; Mitogen-activated Protein Kinase 4). Řídí tvorbu fragmoplastu. Je do místa povolána a aktivována pomocí HINKEL/STUD, na plus konec mikrotubulů vázaného kinesinu. Pokud je jedna z komponent signalizační kaskády vyřazena z funkce, dochází k aborci buněčného dělení vyúsťující ve vytvoření více jaderné buňky (Krysan *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2010; Kosetsu *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011). Kaskáda má vliv i na dynamiku fosfolipidů buněčných membrán během cytokinese (Suzuki *et al.*, 2016). Další zapojenou MAP kinasou do buněčného dělení u huseníčku rolního (*A. thaliana*) je MPK6. Ta fosforyluje EB1c (End Binding Protein 1c) a MAP65-1 (Microtubule Associated Protein 65-1) podílející se na dynamice mikrotubulů při dělení (Smertenko *et al.*, 2006; Smékalová *et al.*, 2014; Kohoutová *et al.*, 2015). Stejně jako MPK6, tak i MPK3 je řízena YODA MAPKKK. Tato kaskáda se významně podílí na asymetrickém dělení zygoty a průduchů (Bergmann *et al.*, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004).

Do procesu buněčného dělení u vojtěšky seté (*M. sativa*) je zapojená SIMK. V epidermálních buňkách je lokalizována především v jádře. Během formování kořenového vlásku z trichoblastu se z jádra relokuje do formujícího se růstového vrcholu nově vznikajícího kořenového vlásku a určuje polaritu a směr jeho dělení. Aktivita SIMK je spojená s F-aktinovými vlákny. Zvýšená exprese genu *SIMK* vede ke zvýšení počtu kořenových vlásků a rychlosti růstu (Šamaj *et al.*, 2002). Další z MAPK účastníků se signalizace buněčného dělení je MMK3. Ta je abundantní v průběhu celého buněčného cyklu, ale její kinásová aktivita je nejvyšší po metafázi. Hraje zřejmě roli při cytokinesi (Calderini *et al.*, 1998; Bögre *et al.*, 1999). U SAMK z vojtěšky seté (*M. sativa*) zatím nebyla potvrzena jakákoli funkce při buněčném dělení.

2.2.1.4 Buněčná lokalizace MAP kinas a metody zjištění

Ke studiu lokalizace MAPKKK, MAPKK a MAPK u rostlin se využívá především mikroskopických metod. Za pomoci molekulárních technik se fúzuje MAPK s fluorescenčním proteinem, jako je například GFP (Green Fluorescent Protein). Poté se dají lokalizovat tyto fúzní proteiny až na úrovni buněčných organel. Sekvence kódující tento protein může být pod kontrolou svého nativního promotoru nebo pod kontrolou konstitutivního promotoru např. pro ubikvitin. Další možností je použití reportérového systému, jako je β -glukuronidasa (GUS). Funkčnost daného konstruktů nesoucího sekvenci k přepisu fúzního proteinu se často zkouší transienční transformací. K tomuto účelu je vhodný systém infiltrace listů rostliny *Nicotiana benthamiana* bakteriálním organismem *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí T-DNA kazetu se sekvencí kódující fúzní protein. Pozorování produkce a lokalizace fúzního proteinu je možné již 2. až 3. den od provedení transienční transformace (Stephenson *et al.*, 2018). Transformace rostlin pomocí *A. tumefaciens* byla již dříve provedena u rýže (*Oryza sativa*), ječmene (*Hordeum vulgare*) či huseníčku rolního (*A. thaliana*) (Valvekens *et al.*, 1988; Hiei *et al.*, 1997; Tingay *et al.*, 1997). Využití transienční transformace *N. benthamiana* je rychlé a užitečné pro zjištění funkčnosti molekulárního konstruktů, tak pro lokalizaci heterologních MAP kinas fúzovaných s fluorescenčním proteinem.

Pomocí výše popsaných metod byla v huseníčku rolním (*A. thaliana*) lokalizovaná MPK3 na buněčné úrovni v jádře, cytoplazmě a v okolí plasmatické membrány. To souvisí s její funkcí v řízení růstu pylové láčky (Guan *et al.*, 2014), asymetrickém buněčném dělení (Zhang *et al.*, 2015), odpovědi na stres a regulaci abundance proteinů přenášejících lipidy (Pitzschke *et al.*, 2014). Spolu s MPK3 bylo u huseníčku rolního (*A. thaliana*) lokalizováno i několik dalších MAPKKK (Yamada *et al.*, 2016), MAPKK (Lampard *et al.*, 2014) a MAPK (Guan *et al.*, 2014).

U vojtěšky seté (*M. sativa*) byla potvrzená lokalizace SIMKK (Stress-Induced MAP Kinase Kinase) v jádře, cytoplazmě a vezikulách při podmínkách solného stresu a růstu kořenových vlásků (Berson *et al.*, 2014; Ovečka *et al.*, 2014). V kaskádě SIMKK a její podřazená MAP kinasa SIMK byly lokalizovány v průběhu vrcholového růstu kořenových vlásků v jádře, cytoplazmě a podél aktinových filament (Šamaj *et al.*, 2002). MMK3, účastníci se regulace cytokinise, je lokalizována ve střední rovině dělení buňky (Bögge *et al.*, 1999).

2.3. Charakteristika Stresem aktivované MAP kinasy u vojtěšky seté

SAMK (Stress-Activated MAP Kinase) je středně velkým proteinem o relativní molekulové hmotnosti $M_w = 43$ kDa. Kinasa byla popsána a studována ve vojtěšce seté (*Medicago sativa*). Dle fylogenetického členění patří do první větve třídy A. Sdílí se svými ortology v kinasové doméně T-E-Y motiv fosforylace a všeobecnou dokovací doménu. V třístupňové MAP kinasové kaskádě je umístěna na posledním místě a je aktivována svými nadřazenými MAP kinasami kinasami. Uplatňuje se především při signalizaci vnějších stresových podmínek a vývoji rostliny (Ichimura *et al.*, 2002).

Sekvence cDNA (Coding Deoxyribo Nucleic Acid) SAMK není přesně známa a pro studie se používají často kódující sekvence příbuzné modelové rostliny pro čeled' bobovitých, tj. *Medicago truncatula*. Sekvence však nejsou totožné. Práci s vojtěškou setou (*M. sativa*) dále ztěžuje skutečnost, že se jedná a tetraploidní 4 n rostlinu mající v jedné sádce $n = 8$ chromosomů, celkově 32 (Barnes *et al.*, 1988).

2.3.1 Regulace signalační dráhy SAMK na molekulární úrovni

Je třeba si uvědomit, že signalační dráhy jsou velice komplexní a různé části se mezi sebou větví a sdružují se. Dochází ke kompenzačním jevům nebo vícenásobné aktivaci různých MAP kinas níže postavených v kaskádě. I proto je velmi složité s určitostí popsat celou jednu signalační dráhu. SAMK je zapojena do signalizace biotického i abiotického stresu, které z vnějšku na vojtěšku setou (*M. sativa*) působí.

Dráha SAMK je aktivována posttranslačními mechanismy, ale její inaktivace vyžaduje expresi pro to určených genů. Jedním z takových je např. *MP2C* kódující proteinovou fosfatasu typu 2C, která je schopná defosforylací inaktivovat SAMK. Avšak samotná tvorba *MP2C* (*Medicago sativa* Protein Phosphatase 2C) je řízena SAMK, což vytváří negativní zpětnou vazebnou smyčku regulující tuto kaskádu (Meskiene *et al.*, 1998).

2.3.2 Zapojení SAMK do signalizace biotického stresu a symbiózy

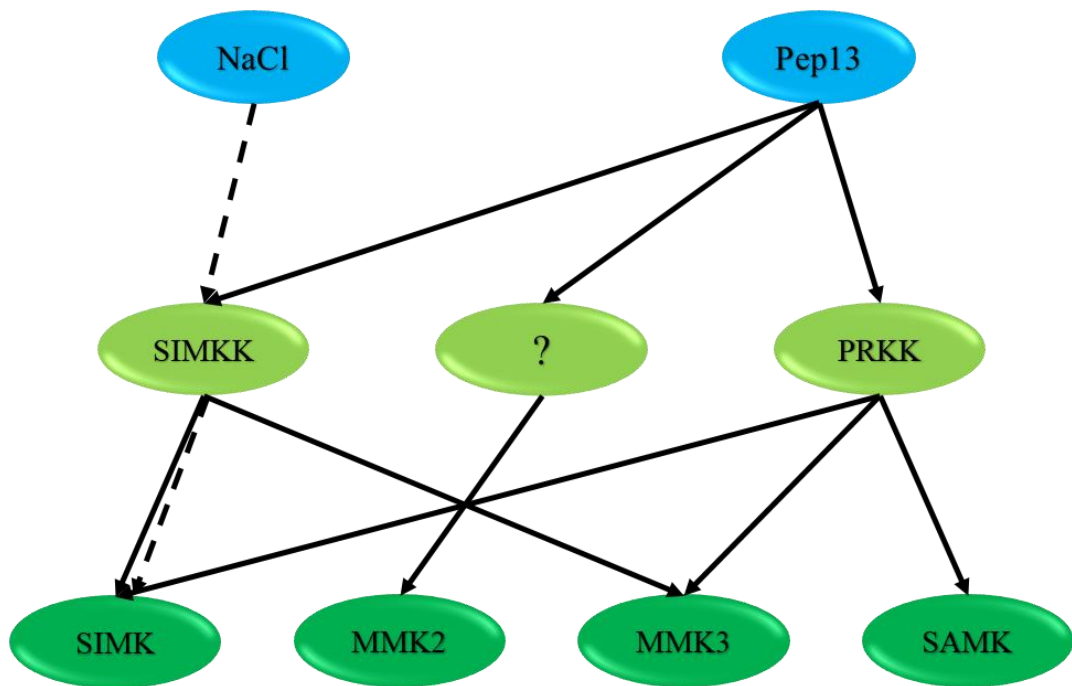
Jednou z drah, kde se SAMK uplatňuje, je signalizace biotického stresu vyvolaného patogenem *Phytophthora spp.* patřící do oomycet (Brasier, 2009). Oomyceta uvolňuje rozpadem glykoproteinu ($M_w = 42$ kDa) oligopeptidový fragment o délce 13 aminokyselin zvaný Pep13. Ten funguje jako elicitor spouštějící signalační kaskádu.

Pep13 specificky interaguje s receptory na plazmatické membráně dvouděložných rostlin a spouští přechodný přepis genů nutných k obraně a akumulaci fytoalexinů. Navíc může docházet ke změně fosforylace proteinových kinas účastnících se při aktivaci transkripce genů obrany v závislosti na gradientu Ca^{2+} iontů (Dietrich *et al.*, 1990; Nürnberger *et al.*, 1994; Sacks *et al.*, 1995).

Signál po zachycení elicitoru Pep13 postupuje v kaskádě níže a aktivuje PRKK (Pathogen-Responsive MAPKK) MAP kinasu kinasu. PRKK následně fosforyluje v kaskádě podřízenou SAMK (Obr. 4). K podobné aktivaci pomocí PRKK dochází také u SIMK a MMK3.

Pep13 společně s NaCl spouští i signální dráhu, do které je zapojena SIMKK. Ta však aktivuje jen SIMK a MMK3, nikoliv SAMK. U MAP kinasy MMK2 (*Medicago sativa* MAP Kinase 2) dochází také ke zvýšené aktivitě po přidání Pep13, ale její nadřazená MAP kinasa kinasa je zatím neznámá (Cardinale *et al.*, 2002).

V příbuzné lupině bílé (*Lupinus albus*) hrají MAP kinasy LaSAMK a LaSIMK roli nejen u signalizace biotického stresu, ale také při symbiotické interakci mezi bakterií a rostlinou. Inokulace lupiny bílé (*L. albus*) živou bakteriální kulturou *Bradyrhizobium* vedla k aktivaci LaSAMK a LaSIMK a vytvoření hlízek na kořenovém systému rostliny. Pokud byla lupina bílá (*L. albus*) inokulována usmrcenou kulturou k aktivaci LaSAMK ani LaSIMK nedocházelo (Fernandez-Pascual *et al.*, 2006).



Obr. 4 Spojení dvou signálních drah na úrovni MAPKK a MAPK biotického a abiotického stresu u volečky seté (*M. sativa*) (Bc. Jiří Sojka, 2020 dle originálu Cardinale *et al.*, 2002). Elicitor oomycety *Phytophthora spp.* Pep13 aktivuje SIMKK, PRKK i zatím neznámou MAPKK. SIMKK následně aktivuje dvojí fosforylací tři MAPK, SIMK a MMK3, PRKK aktivuje jak SIMK, tak MMK3 a SAMK. Neznámou MAPKK je aktivována MMK2. V případě solného stresu navozeného přidáním NaCl (chlorid sodný) je aktivována SIMKK a ta dále aktivuje SIMK (přerušovaná čára). Dráhy zapojené do signalizace houbového elicitoru z *Phytophthora spp.* Pep13 jsou označeny nepřerušovanými šipkami.

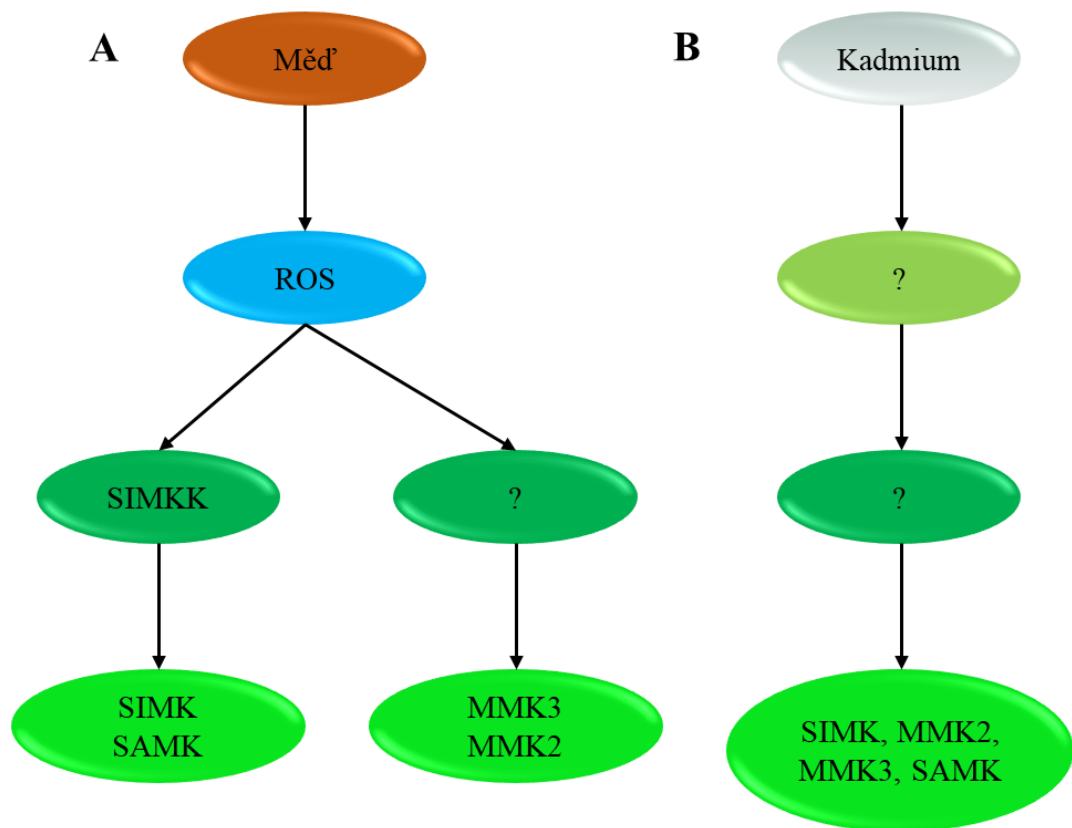
2.3.3 Zapojení SAMK do signalizace abiotického stresu

2.3.3.1 Signalizace stresu z těžkých kovů

SAMK, jak už bylo výše zmíněno, je zapojená také do signalizace abiotického stresu. V této oblasti je nejlépe prozkoumána její aktivace těžkými kovy, především mědí a kadmiiem. Oba kovy byly podávány v podobě svých chlorných solí (Jonak *et al.*, 2004). V případě uvolnění Cu^{2+} iontů dochází ke změně redoxního potenciálu a tvorbě ROS (Reactive-Oxygen Species). ROS sloužící jako druhotní přenašeči (Bae *et al.*, 2011) aktivují SIMKK a ta následně SIMK a SAMK. Měďnaté ionty aktivují také MMK2 a MMK3 přes tvorbu ROS, ale jejich nadřazená MAP kinasa kinasa je neznámá (Obr. 5).

Kadmium v podobě svých dvojmocných iontů Cd^{2+} aktivuje SAMK společně se SIMK, MMK2 a MMK3. V této signalizační dráze není známá ani jedna z nadřazených MAPKK a MAPKKK (Obr. 5). Bylo zjištěno, že aktivita MAP kinas SAMK, SIMK, MMK2 a MMK3 vzrůstá se zvyšující se koncentrací CuCl_2 a CdCl_2 , avšak abundance těchto kinas zůstává téměř konstantní.

K největší aktivitě dochází u všech zmíněných při použití CuCl_2 po 10 min od aplikace. Po 60 min následně aktivita klesá. V případě CdCl_2 aktivita MAP kinas začíná při 10 min a následně klesá po 180 min od aplikace. Největší aktivity z výše zmíněných vykazuje SIMK (Jonak *et al.*, 2004).



Obr. 5 Signalizační kaskáda stresu z těžkých kovů (mědi a kadmia) ve vojtěšce seté (*M. sativa*) (Bc. Jiří Sojka, 2019 dle originálu Jonak *et al.*, 2004). A – signalizační kaskáda stresu z těžkých kovů způsobeného mědí. Při zachycení zvýšené koncentrace mědi v prostředí se tvoří uvnitř buňky reaktivní formy kyslíku (ROS). Ty aktivují MAPKK SIMKK společně s neznámou MAPKK. SIMKK dvojitou fosforylací aktivuje SIMK a SAMK. Neznámá MAPKK poté MMK3 a MMK2. B – signalizační kaskáda stresu z těžkých kovů způsobeného kadmiiem. Při zachycení zvýšené koncentrace kadmia v prostředí se spouští MAPK kaskáda vedoucí k aktivaci SIMK, SAMK, MMK2 a MMK3. Avšak jaké MAPKK a MAPKKK jsou zapojené do této signalizační dráhy zatím není známo.

2.3.3.2 Signalizace stresu z poranění

Poranění listů vojtěšky seté (*M. sativa*) je další stimul vedoucí k aktivaci SAMK společně se SIMK (Bögre *et al.*, 1997). Množství transkriptu mRNA obou kinas však zůstává zachováno. Na aktivitu kinas má vliv MP2C fosfatasa, která má funkci defosforylovat fosforylovanou aktivní formu kinas. Slouží tak jako negativní regulátor SAMK a SIMK v podmínkách stresu způsobeného poraněním. V případě SIMK, má vliv již nepatrné množství regulátoru. SAMK je méně citlivá k defosforylaci pomocí MP2C. Obě MAP kinas jsou aktivovány SIMKK.

K největší aktivitě, bez změny množství kinas ve vzorcích, dochází v intervalu od 2-10 min po působení stresu. Následně se zapojuje MP2C a aktivní formu defosforyluje. V dalších intervalech aktivita klesá (Rodriguez *et al.*, 1998; Meskiene *et al.*, 2003). K aktivaci SAMK v listech vojtěšky seté (*M. sativa*) dochází také při mechanickém stimulu, jako je např. dotek. SAMK je aktivována již 1 min po stimulu a po 10 min se aktivita ztrácí. Při pokusech s buněčnou suspenzní kulturou buněk listů vojtěšky byla SAMK konstantně aktivována díky míchání a kolizím buněk. Pokud byly buňky suspenze ponechány stát 1 h v médiu bez míchání, aktivita se opět zmenšila. Po 2 sekundách opětovného míchání se aktivita SAMK opět zvýšila (Bögre *et al.*, 1997). Stejnou funkci vykazuje vysoce sekvenčně homologní AtMPK3, která je také posttranslačně aktivována v odpovědi na mechanický stres (Mizoguchi *et al.*, 1996).

2.3.3.3 Signalizace stresu z nízkých teplot

Při signalizaci snížené a zvýšené teploty se v buňkách vojtěšky seté (*M. sativa*) uplatňuje SAMK a HAMK (Heat-shock Activated MAP kinase). SAMK vykazuje zvýšenou aktivitu již po 10 min od vystavení rostlin teplotě 4 °C se svým maximem po 60 min. Poté aktivita zpětně klesá. Aktivita HAMK při teplotách 37 °C roste již po 10 min, na rozdíl od SAMK poté neklesá. Zatímco SAMK je při nízkých teplotách aktivována „ztvrdnutím“ cytoplazmatické membrány, HAMK je aktivována změnami v její fluiditě (Jonak *et al.*, 1996; Sangwan *et al.*, 2002).

Pro aktivaci SAMK v případě stresu z nízkých teplot je důležitý také cytoskelet. Po přidavku jasplakinolidu, který stabilizuje mikrofilamenta nedochází k aktivaci. Stejný případ nastane po přidavku taxolu, tj. stabilizátor mikrotubulů. Naopak po přidavku destabilizátoru mikrofilament nebo mikrotubulů latrunkulinu B nebo oryzalinu, docházelo k aktivaci SAMK (Sangwan *et al.*, 2002).

Důležitý vliv nemá jen reorganizace cytoskeletu v buňce, ale také v signální kaskádě níže postavený tok Ca^{2+} iontů společně s funkcí CDPK (Ca^{2+} Dependent Protein Kinase). CDPK po navázání Ca^{2+} iontů mohou aktivovat SAMK, a tak přispět k přenosu signálu a expresi genů nutných k aklimatizaci vojtěšky seté (*M. sativa*) na chlad (Levitt, 1980; Monroy a Dhindsa, 1995).

2.3.4 MAPKK aktivující SAMK a jejich ortologní MAPKK

Ke specifické aktivaci v kaskádě podřízených MAPK jsou potřeba jim nadřazené MAPKK. MAPKK je dvojitě fosforylují a tím spouštějí jejich činnost a předání signálu dále. Aktivace umožňuje MAPK ovlivňovat v případě stresu buněčné pochody a metabolismus. U vojtěšky seté (*M. sativa*) je prozkoumána aktivace SAMK a dalších MAP kinas pomocí SIMKK a PRKK (Cardinale *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2004).

SIMKK a PRKK jsou rozdílné MAPKK, které sdílí jen 30% homologii ve své primární sekvenci. Řadí se do odlišných MAPKK podrodin mající jinou substrátovou specifitu a regulační vlastnosti. Obě jsou aktivovány bakteriálním elicitorem, avšak jen SIMKK je také aktivována zvýšenou koncentrací NaCl v okolí buněk. Po příjmu signálu od neznámých nadřazených MAPKKK nebo autoaktivaci jej SIMKK předává za pomoci fosforylace na SIMK a MMK3. PRKK předává signál níže na SIMK, MMK3 a SAMK (Cardinale *et al.*, 2002).

Ortologem MsPRKK (MsMKK2) je NtSIPKK (NtMKK2) z tabáku (*Nicotiana tabacum*) a AtMKK2 z huseníčku rolního (*A. thaliana*) patřící do podrodiny A1 MAPKK (Ichimura *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 2000). MsSIMKK, náležející do C1 podrodiny, je ortologní k NtMEK2 (NtMKK4) z tabáku (*N. tabacum*) a AtMKK4/5 z huseníčku rolního (*A. thaliana*) (Ichimura *et al.*, 2002).

Funkce ortologních MAPKK je dobře prozkoumána. Je známá signalizační kaskáda sestávající se z AtMEKK1 (MAPKKK), AtMKK2 (MAPKK) a AtMPK4/AtMPK6 (Ichimura *et al.*, 1998). Transgenní rostliny huseníčku rolního (*A. thaliana*) s nadexpresí genu *AtMKK2* vykazovaly konstitutivní aktivaci AtMPK4/AtMPK6. Díky tomu měly rostliny vyšší rezistenci na solný stres a stres z nízkých teplot. Rostliny s vyřazeným genem *AtMKK2* spouštěly hypersensitivní reakci vedoucí k programované buněčné smrti (Teige *et al.*, 2004).

AtMKK4 hraje významnou roli při embryogenezi, buněčném dělení, imunitě, osmotickém stresu a vývoji průduchů (Zhang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011; Back a Lee, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Embryogeneze je u huseníčku rolního (*A. thaliana*) řízena mimo jiné signalizační kaskádou AtMKK4/5 - AtMPK6. U mutantních rostlin v genu *AtMPK6* se netvoří správně embrya.

Stejný fenotyp byl pozorován taktéž u mutantů *AtMKK4/5*, které fungují jako nadřazené MAPKK pro *AtMPK6* (Zhang *et al.*, 2017). *AtMPK6* má funkci při buněčném dělení a relokuje v metafázi z jaderné oblasti do cytoplazmatické a při vystavení rostliny solnému stresu (Baluška *et al.*, 2000). *AtMKK4* je také zapojená do signalizace melatoninem spouštěné imunity vůči patogenům. Stejně jako ve výše zmíněné kaskádě, tak i tu společně s *AtMKK5/7/9* MAPKK aktivuje *AtMPK6* a *AtMPK3*. Rostliny s vyřazenými geny pro komponenty kaskády jsou náchylnější k patogenům (Back a Lee, 2016). *AtMPK3* má taktéž funkci v signalizaci stresu způsobeného patogenem (Cardinale *et al.*, 2002).

AtMKK4 fosforylací aktivuje *AtMPK3* také při solí navozeném osmotickém stresu. Transgenní rostliny huseníčku rolního (*A. thaliana*) nadprodukcující *AtMKK4* vykazují zvýšenou toleranci na solný stres (Kim *et al.*, 2011). Při osmotickém stresu roste obsah kyslíkových radikálů (ROS), které spouštějí tuto kaskádu. Obdobná signalizační kaskáda, kdy ROS aktivuje MAPKK a následně MAPK, je známá i v případě vojtěšky seté (*M. sativa*). ROS, sloužící jako druhotní posli, aktivují *MsSIMKK* a *MsSAMK* společně s dalšími MAPKK a MAPK (Jonak *et al.*, 2004).

Ve vývoji průduchů huseníčku rolního (*A. thaliana*) pak vedlo utlumení *AtMKK4* pomocí RNAi (RiboNucleic Acid Interference) ke zvýšení frekvence asymetrického buněčného dělení a větší tvorbě průduchů (Wang *et al.*, 2007). Tato funkce zatím nebyla potvrzena u ortologních MAP kinasových modulů u vojtěšky seté (*M. sativa*).

NtSIPKK z tabáku je aktivována napadením rostlin virem tabákové mosaiky a poraněním. V případě této signalizační kaskády spouští podřízenou *NtSIPK*. *NtSIPK* společně s *NtWIPK* (*Nicotiana tabacum* Wounding-Induced Protein Kinase) je taktéž spuštěna druhou MAPKK z tabáku (*N. tabacum*) *NtMEK2* v případě stresu z patogenu. Zapnutí kaskády vede k regulaci programované buněčné smrti (Liu *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2003).

NtSIPK se mimo jiné uplatňuje i v hypersensitivní reakci spuštěné kyslíkovými radikály. Při nadprodukci NtSIPK dochází ke zvýšené produkci ethylenu a blokování produkce kyseliny salicylové (Samuel *et al.*, 2005). To naznačuje obrovskou komplexnost a propojenost MAPK kaskád v rámci signalizace rozličných pochodů a stresů v buňce. NtSIPK je ortologní MAPK k MsSIMK, respektive k AtMPK6. NtWIPK je poté ortologní k MsSAMK v případě vojtěšky seté (*M. sativa*) a AtMPK3 huseníčku rolního (*A. thaliana*).

PRKK a SIMKK mají odlišný mechanismus aktivace. Zatímco PRKK vyžaduje ke své aktivaci nadřazenou MAPKKK, SIMKK může být aktivována bez přítomnosti své nadřazené MAPKKK. Důvodem odlišného způsobu aktivace PRKK a SIMKK je v aktivační smyčce obou MAP kinas kinas. U kvasinek a živočichů byl zjištěn motiv, kde probíhá aktivace fosforylací. Jedná se o serin/threoninová residua v motivu SXXXS/T (S – serin, X – jakákoli aminokyselina, T – threonin), nacházející se mezi sedmou a osmou subdoménou kinasy (Robinson a Cobb, 1997). U rostlinných MAPKK, PRKK nevyjímaje, je motiv mírně odlišný. Mezi serin/threoninovými residui je pět aminokyselin a motiv pak vypadá následovně S/TXXXXXS/T.

SIMKK a některé jiné MAPKK patřící do stejné třídy, mají aktivační motiv mírně pozměněný. Mezi prvním threoninem má SIMKK v poloze tři negativně nabitou kyselinu asparagovou (D). Motiv se poté mění na SXDXXXS (S – serin, X – jakákoli aminokyselina, D – kyselina asparagová, T – threonin) a umožňuje autoaktivaci této třídy MAPKK (Ligterink a Hirt, 2001; Cardinale *et al.*, 2002).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Bio-Rad

4x Laemmli Sample Buffer (USA), akrylamid/bis-akrylamid (USA), Clarity™ Western ECL Substrate (USA), iProof™ HF Buffer (USA), iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (USA), Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (USA), Protein Assay Dye Reagent Concentrate (USA), TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions (USA)

Duchefa Biochemie

Gamborg's B5 basal salt mixture (Nizozemí), Gamborg's B5 vitamin mixture (Nizozemí), Murashige Skoog's salt mixture (Nizozemí), Nitsch and Nitsch vitamin mixture (Nizozemí), 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES; Nizozemí), Schenk and Hildebrandt basal salt mixture (Nizozemí), Schenk and Hildebrandt 100x vitamin solution (Nizozemí)

GE Healthcare

Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF BlottigMembrane (Německo)

Invitrogen by ThermoFisher Scientific

10 mmol·l⁻¹ dNTPs (Lotyšsko), 10x Fast Digest Green Buffer (USA), 6x DNA Loading Dye (USA), DNase I (Lotyšsko), 10x T4 DNA ligase buffer (USA), DreamTaq DNA polymerase (Lotyšsko), DreamTaq 10x buffer (Lotyšsko), Fast Digest PstI (USA), Gateway® BP Clonase® II (USA), GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (USA), Goat anti-rabbit IgG F(ab')₂ sekundární protilátka HRP (USA), LR Clonase™ II Plus enzyme (USA), Phire Plant Direct PCR Kit (USA), T4 DNA ligase (USA), Proteinase K (USA), ROX reference dye (USA)

New England BioLabs®

10x CutSmart Buffer (UK), BsmAI (UK), RNAsa H (UK)

Roche

Complete™ EDTA free (USA), PhoSTOP™ (Švýcarsko)

Sigma

Adenin (Čína), dithiotreitol (DTT; Kanada), Anti-AtMPK3 (rabbit antibody), dodecylsírán sodný (SDS; USA), dusičnan draselný (KNO₃; Japonsko), ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina (EGTA, USA), ethanol 96% (Německo), ethanol 70% (Německo), fluorid sodný (NaF; USA), glutamin (USA), glycerol (USA), hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin, BSA, USA), hydroxid sodný (NaOH; Švýcarsko), hypochlorid sodný (Německo), chlorid hořečnatý (MgCl₂; Německo), chlorid sodný (NaCl; Dánsko), Lauria Bertani Broth (USA), Lauria Bertani Broth with agar (USA), L-glutation (Japonsko), L-prolin (Francie), 2-propanol (C₃H₇OH), L-serin (Čína), methanol (Francie), sacharosa (Německo), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Tris (USA), Tween 20 (USA), 2-merkapt ethanol (C₂H₆SO; Německo), persíran amonný (APS), sacharosa (C₁₂H₂₂O₁₁), Ponceau S, kyselina octová (CH₃COOH), peroxid vodíku (H₂O₂), Tris-base, fenol, chloroformisoamylalkohol:fenol, chloroformisoamylalkohol

Ostatní:

AntiSAMK protilátka ID: 581896-8, Lot No: A415040356 (GenScript, USA), Midori Green (Nippon Genetics, Japonsko), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology®, USA), QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo)

3.1.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy (XA 110/2X, Radwag, Polsko)

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

Aparatura pro elektroforézu nukleových kyselin Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA)

Aparatura pro transfer proteinů Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA)

ApE – A plasmid Editor v2.0.37 (M.W. Davis, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Binokulární mikroskop (Leica, Německo)

Dokumentační zařízení ChemiDoc™ MP Imaging system (Bio-Rad, USA)

Dokumentační zařízení ChemiDoc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA)

Elektroporátor BTX™ ECM™ 399 Exponential Decay Wave
(ThermoFisher Scientific, USA)

Centrifuga Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA)

Centrifuga MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific, USA)

Centrifuga ScanSpeed 1730R Refrigerated microcentrifuge (Beckman Coulter®, USA)

Centrifuga Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA)

Crispr-P v2.0 (Huazhong Agricultural University, Čína)

Čtecí zařízení Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader (Tecan, USA)

Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA)

Inkubátor ES-20 (Biosan, Lotyšsko)

Inkubátor IN55 (Mettler, Německo)

Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 (Zeiss, Německo)

Kultivační místnost (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)

Kývačka Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan, Lotyšsko)

Laboratorní digestoř M 1200 (Merci, Brno)

Laminární box (Merci, Brno)

Magnetická míchačka MSH-420 (Boeco, Německo)

Mikrobiologický filtr (Millex® Merck, Německo)

pH metr PC 2700 (Eutech Instruments, USA)

Předvážky S1502 (BEL Engineering, Itálie)

SnapGene® Viewer v4.2.11 (GSL Biotech LLC, USA)

Spektrofotometr SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA)

Teplotní sterilizátor (Schuett-biotec.de solaris, Německo)

Termoblok ThermoCell Cooling & Heating Block (Bioer, Čína)

Termocycler StepOnePlus Real Time PCR systém (Applied Biosystems™, USA)

Termocycler T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA)

Třepačka (Labnet, USA)

Vortex-Genie 1 (Scientific Industries, USA)

ZEN (black edition) v3.0 (Zeiss, Německo)

ZEN (blue edition) v3.0 (Zeiss, Německo)

Zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA)

Zdroj napětí PowerPac™ Basic (Bio-Rad, USA)

3.1.3 Roztoky a média

1% agarosový gel

1 g agarosa; 100 ml 1x TAE pufr; 1,5 µl Midori green

10x elektroforetický pufr (zásobní roztok)

3,0 g Tris-base; 14,4 g glycin; 10 ml SDS (10%); 990 ml dH₂O; pH 8,3

1x elektroforetický pufr

100 ml 10x elektroforetický pufr; 900 ml dH₂O

1000x Gamborg vitamíny

1 g Gamborg's B5 vitamin mixture; 1 ml dH₂O; sterilizace filtrací; uloženo (-20 °C)

0,5 mol·l⁻¹ NaOH

20 g NaOH; 1000 ml dH₂O

1000x Nitsch a Nitsch vitamíny

1 g Nitsch and Nitsch vitamin mixture; 1 ml dH₂O; sterilizace filtrací; uloženo (-20 °C)

50x TAE pufr

121 g Tris; 28,55 ml kyselina octová; 50 ml EDTA (0,5 mol·l⁻¹); 421,45 ml dH₂O; pH 8,0

1x TAE pufr

10 ml 50x TAE pufr; 490 ml dH₂O

10x transferový pufr (zásobní roztok)

3,0 g Tris-base; 14,4 g glycin; 200 ml methanol; 800 ml dH₂O; pH 8,3

1x transferový pufr

100 ml 10x transfer pufr; 50 ml methanol; 850 ml dH₂O

0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8)

6,05 g Tris-base; 100 ml dH₂O; pH 6,8 (1 mol·l⁻¹ HCl)

1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,8)

18,16 g Tris-base; 100 ml dH₂O; pH 8,8 (1 mol·l⁻¹ HCl)

10% rozdělovací gel

6,25 ml akrylamid (40%); 6,25 ml 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,8); 12,125 ml dH₂O;
0,25 ml SDS (10%), 0,0125 ml TEMED; 0,125 ml persulfát amonný (c= 1 mg·10 μl⁻¹)

10% zaostřovací gel

2,5 ml akrylamid (40%); 6,3 ml 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl; HCl (pH 6,8); 15,9 ml dH₂O;
0,25 ml SDS (10%); 0,025 ml TEMED; 0,125 ml persulfát amonný (c= 1 mg·10 μl⁻¹)

Extrakční pufr E

1,19 g HEPES (pH 7,5); 0,43 g NaCl; 0,038 g EGTA; 100 μl MgCl₂ (1 mol·l⁻¹); 0,004 g
NaF; 10 ml glycerol; 89,9 ml dH₂O

Inokulační médium

45 ml MiliQ H₂O; 0,5 g MES (1 mol·l⁻¹); 0,5 ml MgCl₂ (1 mol·l⁻¹); pH 5,6 (1 mol·l⁻¹
KOH); 50 μl acetosyringon (150 mmol·l⁻¹)

Lauria Bertani tekuté médium

25 g LB Broth; 1 l dH₂O; pH 7,2 (1 mol·l⁻¹ KOH); autokláv, zchlazení na 22 °C

Lauria Bertani tuhé médium

40 g LB Broth with agar; 1 l dH₂O; autokláv, zchlazení na 55 °C

Médium B5H

3,1 g Gamborg B5 basal salt mixture; 0,5 g KNO₃; 0,25 g MgSO₄·7 H₂O; 0,5 g prolin;
4,5 g Gellam Gum; do objemu 1000 ml dH₂O; pH 5,7 (1 mol·l⁻¹ KOH); autokláv,
zchlazení na 55 °C; 30 ml roztok aminokyselin; 1 ml roztok 2,4-D; 1 ml roztok kinetin;
1 ml 1000x Gamborg vitamíny

Médium B50

3,1 g Gamborg B5 basal salt mixture; 0,5 g KNO₃; 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O; 0,5 g prolin;
4,5 g Gellam Gum; do objemu 1000 ml dH₂O; pH 5,7 (1 mol·l⁻¹ KOH); autokláv,
zchlazení na 55 °C; 30 ml roztok aminokyselin; 1 ml 1000x Gamborg vitamíny

Médium MMS

4,3 g Murashige a Skoog basal salt mixture; 0,1 g myo-inositol; 30 g sacharóza; 4,5 g
Gellam Gum; do objemu 1000 ml dH₂O; pH 5,7 (1 mol·l⁻¹ KOH); autokláv, zchlazení na
55 °C; 1 ml 1000x Nitsch a Nitsch vitamíny

Médium MS

4,3 g Murashige a Skoog basal salt mixture; 30 g sacharóza; 4,5 g Gellam Gum;
do objemu 1000 ml dH₂O; pH 5,7 (1 mol·l⁻¹ KOH); autokláv, zchlazení na 55 °C

Ponceau S

0,5 g Ponceau S; 25 ml kyselina octová; 475 ml dH₂O

SH médium

3,2 g Schenk a Hildebrandt basal salt mixture; 30 g sacharóza; 0,5 g MES; pH 5,7
(1 mol·l⁻¹ KOH); autokláv, zchlazení na 22 °C; 10 ml 100x Schenk a Hildebrandt vitamíny

SH vitamíny

1,0105 g Schenk a Hildebrandt vitamin mixture; 10 ml dH₂O; sterilizovat filtrací

S.O.C. médium

0,2 g trypton; 0,005 g kvasničný extrakt; 0,1 mg NaCl; 0,1 mg MgCl₂; 0,1 mg MgSO₄;
0,025 mg KCl; 0,2 mg glukosa

Sterilizační roztok na listy

1.) 30 ml ethanol (70%); 2.) 2 ml hypochlorid sodný (10%), 18 ml sterilní dH₂O;
0,1 ml Tween-20

TBS (zásobní roztok)

2,42 g Tris-base; 8,78 g NaCl; do objemu 1000 ml dH₂O; pH 7,4

TBS-T

100 ml TBS; 899 ml dH₂O; 1 ml Tween-20

Roztok 2,4-D (zásobní)

0,01 g 2,4-D; 50 µl ethanol; 800 µl dH₂O; 150 µl NaOH (1 mol·l⁻¹); 9 ml dH₂O;
uloženo (-20 °C)

Roztok aminokyselin (zásobní)

6,65 g glutamin; 0,83 g serin; 0,004 g adenin; 0,083 g L-glutathion; do objemu 250 ml
dH₂O; uloženo (4 °C)

Roztok kinetinu (zásobní)

0,001 g kinetin; 20 µl NaOH (1 mol·l⁻¹); 9,98 ml dH₂O; uloženo (-20 °C)

3.1.4 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly v experimentální části práce použity rostliny vojtěšky seté (*Medicago sativa*) kultivaru Regen SY (RSY). Rostliny *M. sativa* kultivaru RSY určené pro stabilní transformaci pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty (pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T1; pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T2; pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T5) byly připraveny prostřednictvím somatické embryogeneze a pěstovány do velikosti vhodné na přesazení do půdy v kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) s konstantními hodnotami teploty, fotoperiody, intenzity osvětlení a vlhkosti (21 °C, 16/8, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 70 %). Z této rostliny byly odebrány středně staré listy nepoškozené a nenapadené patogeny pro účely otestování funkčnosti molekulárních konstruktů. Z následně připravených transgenních rostlin *M. sativa* linií *SAMK* gRNA pomocí somatické embryogeneze byl odebrán materiál pro genotypizaci a Western blot analýzu.

Pro účely otestování molekulárních konstruktů transientní transformací pomocí *A. tumefaciens* byly použity 6 týdnů staré listy rostlin tabáku (*Nicotiana benthamiana*). Rostliny *N. benthamiana* byly pěstovány v půdním substrátu v květináčích v kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) s konstantními hodnotami teploty, fotoperiody, intenzity osvětlení a vlhkosti (21 °C, 16/8, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 70 %). Pro následné pozorování na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu byly použity trojúhelníkové výseče listů 4 dny po transformaci a ve stejném čase odebrán materiál pro následnou Western blot analýzu.

3.2 Metody

3.2.1 MultiSite Gateway klonování

Pro klonování vektorů byla použita metoda „MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit Using Gateway® Technology to simultaneously clone multiple DNA fragments“ verze D (Invitrogen, 2007).

První krokem po amplifikaci PCR produktů byla BP reakce v MultiSite Gateway klonování. BP reakce slouží k vytvoření tzv. „entry“ klonu. Celkem tři „entry“ klony byly označeny dle své pozice na výsledném expresním klonu A, B a C. Alternativně se používá B fragment „entry“ klon pro jednokomponentovou LR reakci podle destinačního vektoru. Do BP reakce (*attB* x *attP* rekombinace) vstupoval PCR produkt vytvořený s primery se specifickými místy *attB* tak, aby mohl být rekombinován s odpovídajícími donorovými vektory nesoucími *attP* místa, a to donorové vektory pro A fragment pDONR-P4-P1R (pro promotor), B fragment pDONR221 a C fragment pDONR-P2R-P3 (pro C- N-terminální fúzi). V našem případě byly vytvořeny „entry“ klony s *attL* místy po rekombinaci a to konkrétně B fragment s cDNA/gDNA sekvencí genu *SAMK* a C fragment s cDNA/gDNA sekvencí genu *SAMK* pro následnou LR reakci a vytvoření *35S::cSAMK:mRFP* a *35S::mRFP:cSAMK* použitím pGWB454 a pGWB455.

Za účasti enzymu Gateway® BP Clonase® II (Invitrogen, USA) dochází k tvorbě tří „entry“ klonů pro každý fragment zvlášť a bočního produktu. Následuje druhá reakce, označovaná jako LR- reakce (*attL* x *attR* rekombinace), sloužící k vytvoření expresního klonu, který vzniká z destinačního vektoru s *attR* místy. Za účasti enzymu LR Clonase™ II Plus enzyme (Invitrogen, USA), který rekombinuje „entry“ klony do destinačního vektoru a tvoří expresní vektor se seřazenými komponenty A, B a C v řadě za sebou na kruhovém expresním vektoru.

3.2.1.1 PCR pro přípravu a molekulární klonování genu *SAMK*

Pro klonování genu zájmu a jeho následné použití do MultiSite Gateway klonovacího systému bylo potřeba navrhnout primery o velikosti 18-25 bp vůči genu zájmu s 22-25 bp dlouhými *attB* místy odpovídajícími „entry“ klonu, do kterého byl gen zájmu vnášen. Pro účely klonování *SAMK* byly navrženy dvě sady specifických primerů. Pro B „entry“ klon přední primer s *attB1* místem a zadním primerem s *attB2* místem. Pro C „entry“ klon přední primer s *attB2* místem a zadním primerem s *attB3* místem (Tab. 1).

Primery byly naředěny PCR H₂O na koncentraci 10 mmol·l⁻¹. Následně byla do PCR zkumavek připravena reakční směs o výsledném objemu 25 µl. Reakční směs byla složena: z 15,75 µl PCR H₂O, 5 µl 5x iProof™ HF Buffer (Bio-Rad, USA), 0,5 µl dNTPs (10 mmol·l⁻¹), 1,25 µl přední/zadní primerů (10 mmol·l⁻¹), 0,25 µl iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad, USA) a 1 µl templátové cDNA nebo gDNA izolované z vojtěšky seté (*M. sativa*) RSY.

Následně byly PCR zkumavky s reakční směsí umístěny do termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) nastaveného na teplotní program (1x 98 °C – 30 s; 35x – (98 °C – 10 s; 60 °C – 30 s; 72 °C – 3 min); 1x 72 °C – 10 min; 1x 4 °C - ∞). Po ukončení PCR reakce byly vzorky připraveny na agarosovou gelovou elektroforézu v prostředí 1x TAE pufru (viz. kapitola 3.2.11). Byly očekávány pásy o velikosti 1116 bp v případě *SAMK* cDNA a 3001 bp *SAMK* gDNA. Vzorky s odpovídající velikostí pásu byly následně použity do BP reakce k tvorbě odpovídajících „entry“ klonů.

Tab. 1 Sekvence primerů pro klonování *SAMK* do B a C „entry“ klonů

Název primeru	Sekvence
SAMK Bfr_Fw1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGCCAGAGTTAACCAAAAC-3'
SAMK Bfr_Rev1	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA AGCATACTCAGGATTGAGTGC-3'
SAMK Cfr_Fw1	5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGA ATGGCCAGAGTTAACCAAAA-3'
SAMK Cfr_Rev1	5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTTTAAGCATACTCAGGATTGAGTG-3'

3.2.1.2 BP reakce

Gen zájmu se vkládá do plasmidového vektoru (donorový vektor) pomocí enzymu Gateway® BP Clonase® II (Invitrogen, USA). Do PCR zkumavek byla připravena reakční směs o výsledném objemu 10 µl. Směs byla složena: z 6 µl TE pufru (pH 8), 2 µl Gateway® BP Clonase® II (Invitrogen, USA), 1 µl naředěného plasmidového vektoru (150 ng·µl⁻¹) a 1 µl naředěného a přečištěného (60-150 ng·µl⁻¹) genu zájmu připraveného pomocí PCR se specifickými primery. PCR zkumavky s touto směsí byly umístěny přes noc do přednastaveného termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) na 25 °C tak, aby proběhla správně rekombinační reakce.

Další den bylo pro ukončení rekombinační reakce a deaktivaci enzymu Gateway® BP Clonase® II (Invitrogen, USA) přidáno do 10 µl reakce 1 µl proteinasy K a vzorky byly umístěny do termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) nastaveného na teplotu 37 °C na 10 min. Následně byly rekombinované plasmidy transformovány do *E. coli* TOP10 (viz kapitola 3.2.2.3; 3.2.2.4). Bakterie byly selektovány na médiu se selekčními antibiotiky a byla ověřena přítomnost plasmidu pomocí PCR kolonií (viz kapitola 3.2.3) nebo restrikčním štěpením (viz kapitola 3.2.5) po izolaci a přečištění plasmidů (viz kapitola 3.2.4). Poté byla provedena agarosová gelová elektroforéza PCR produktů nebo produktů vzniklých restrikčním štěpením (viz kapitola 3.2.11).

3.2.1.3 LR reakce

Pro vytvoření expresního klonu slouží LR reakce. Pro vložení genů zájmu z „entry“ klonu B fragmentu do destinačního vektoru a vytvoření expresního klonu byly všechny komponenty reakce naředěny PCR H₂O na vhodnou koncentraci. Do PCR zkumavek byla připravena rekombinační reakční směs o výsledném objemu 10 µl. Reakční směs byla složena: z 4 µl TE pufru (pH 8), 1 µl jednoho z naředěných destinačních vektorů pB7m34GW,0; pGWB454; pGWB455 (60 ng·µl⁻¹) a 1 µl od každého ze tří, tj. A, B a C „entry“ klonů (30 ng·µl⁻¹) v případě tříkomponentové LR reakce nebo B či C v případě jednokomponentové reakce a nakonec 2 µl enzymu LR Clonase™ II Plus enzyme (Invitrogen, USA). PCR zkumavky s touto směsí byly umístěny přes noc do přednastaveného termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) na 25 °C.

Tříkomponentová LR reakce se však opakovaně nezdařila. Pro další práci byly využity vektory připravené jednokomponentovou reakcí. Další den bylo pro ukončení rekombinační reakce a deaktivaci enzymu LR Clonase™ II Plus enzyme (Invitrogen, USA) přidáno do 10 µl reakce 1 µl proteinasy K a vzorky byly umístěny do termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) nastaveného na teplotu 37 °C na 10 min. Následně byly rekombinované plasmidy transformovány do *E. coli* TOP10 (viz kapitola 3.2.2.3; 3.2.2.4).

Bakterie byly selektovány na médiu se selekčními antibiotiky a byla ověřena přítomnost plasmidu pomocí PCR kolonií (viz kapitola 3.2.3) nebo restričním štěpením (viz kapitola 3.2.5) po izolaci a přečistění plasmidů (viz kapitola 3.2.4). Poté byla provedena agarosová gelová elektroforéza PCR produktů nebo produktů vzniklých restričním štěpením (viz kapitola 3.2.11).

3.2.2 Transformace buněk *Escherichia coli* kmene TOP10

3.2.2.1 Příprava chemokompetatních buněk *E. coli*

Pro přípravu chemokompetatních buněk *E. coli* byla použita kryokonzerva buněk *E. coli* kmene TOP10. Ze zmrazené kryokonzervy na - 80 °C buněk *E. coli* Top10 byl sterilně za pomoci špachtle odškrábnut v laminárním boxu (Merci, Brno) kousek kultury do plastové kultivační tuby o objemu 15 ml s obsahem 3 ml tekutého LB média bez antibiotik. Kultivační tuby s tekutým LB médiem bez antibiotik a buňkami *E. coli* TOP10 z kryokonzervy byly umístěné do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) přes noc, při třepání 140 až 230 rpm (Rotation Per Minute) a 37 °C.

Další den byly připraveny tři roztoky (A, B a C). Roztok A byl složen z Tris-HCl pH 7,6 (10 mmol·l⁻¹), MgCl₂ (100 mmol·l⁻¹) a sterilní destilované H₂O. Roztok A slouží k rozrušení buněčných stěn gram negativních buněk *E. coli*. Roztok B byl složen z Tris-HCl pH 7,6 (10 mmol·l⁻¹), CaCl₂ (100 mmol·l⁻¹) a sterilní destilované H₂O. Roztokem B se vyplachují zbytky MgCl₂.

Nakonec roztok C byl složen z Tris-HCl pH 7,6 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), CaCl_2 ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glycerolu o výsledné koncentraci 15% a sterilní destilované H_2O . Roztok C slouží pro uchování chemokompetentních kultur *E. coli* TOP10 v mrazáku při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Všechny roztoky bylo nutné sterilizovat pomocí filtrace přes mikrobiologický filtr (Millex® Merck, Německo) a vychladit na $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Kultura buněk *E. coli* TOP10 ve 3 ml LB média, která rostla přes noc v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko), byla sterilně v laminárním boxu (Merci, Brno) přelita do čistých Erlenmeyerových baněk s obsahem 100 ml tekutého LB média bez antibiotik. Takto připravené baňky byly překryty sterilním alobalem a ponechány třepat v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 140 až 230 rpm do naměření $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4 - 0,6$. Parametr $\text{OD}_{600\text{nm}}$ byl průběžně měřen na spektrofotometru SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA). Po dosažení potřebné hodnoty $\text{OD}_{600\text{nm}}$, byla kultura buněk sterilně přelita do dvou 50 ml plastových tub, dána chladit na 10 min na led a stočena v centrifuze Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) na 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ na 3220 g.

Po centrifugaci byly 50 ml plastové tuby vyjmuty a supernatanty odlity. Pelety byly rozpuštěny v 1250 μl na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ vychlazeném roztoku A v laminárním boxu (Merci, Brno) a ponechány 30 min na ledě. Poté byly kultury buněk *E. coli* TOP10 v roztoku A stočena v centrifuze Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) při stejných parametrech, supernatanty odlity a pelety rozpuštěny v 1250 μl vychlazeného roztoku B ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) a ponechány 30 min na ledě. Následně byly kultury v roztoku B stočeny v centrifuze Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) při stejných parametrech, supernatanty byly odlity a pelety rozpuštěny v 2-4 ml na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ vychlazeného roztoku C.

Takto připravené kultury chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 byly pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) za stálého chlazení na ledu přeneseny po 100 μl do sterilních, vychlazených, plastových, uzavíratelných zkumavek o objemu 2 ml. Následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v mrazáku při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Veškerá práce s kulturami probíhala za dodržení pravidel aseptické práce v laminárním boxu (Merci, Brno).

3.2.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk *E. coli*

K přípravě kultury *E. coli* kmene TOP10 kompetentních k elektrotransformaci bylo zapotřebí sterilně očkovat kulturu bakteriálních buněk ze zásobního roztoku uchovaného při - 80 °C do 5 ml LB média ve sterilní 50 ml plastové zkumavce. K 5 ml LB média bylo pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) přidáno 15 µl ze zásobního roztoku kultury bakteriálních buněk. Zkumavky s LB médiem a bakteriální kulturou byly kultivovány v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) přes noc, při třepání 150 rpm a 37 °C.

Druhý den bylo 5 ml kultury rostlé přes noc přeneseno do 50 ml LB média ve sterilních Erlenmayerových baňkách o objemu 250 ml a ponechány kultivovat v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) 1-2 hod, při třepání 150 rpm a 37 °C do hodnoty $OD_{600} = 0,5-0,6$. Hodnota OD_{600} byla stanovována v průběhu kultivace na spektrofotometru SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA). Následně byla bakteriální kultura sterilně přelita po 50 ml do plastových zkumavek a ponechána stát na ledu po dobu 15 min. Kultura ve zkumavkách byla stočena v centrifuze Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) předchlazené na 4 °C, po dobu 10 min při 3500 g.

Po stočení byl supernatant odlit a k peletu byla přidána sterilní na ledu vychlazená voda (50 ml na 50 ml původní kultury). Pelet byl resuspendován za použití vortexu Genie 1 (Scientific Industries, USA). Následně byly zkumavky s kulturou ve vodě stočeny v centrifuze Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) vychlazené na 4 °C po dobu 10 min při 3500 g. Tento krok byl zopakován ještě jednou. Supernatant z předcházejícího kroku byl odlit a k peletu byl přidán 10% glycerol (4 ml na 50 ml původní kultury) a pelet byl resuspendován na vortexu Genie 1 (Scientific Industries, USA). Zkumavky s resuspendovaným peletem v 10% glycerolu byly stočeny v centrifuze Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) vychlazené na 4 °C po dobu 10 min při 3500 g. Tento krok byl zopakován ještě jednou.

Nakonec byl supernatant odlit a bakteriální kultura byla naředěna 10% glycerolem tak, aby koncentrace bakterií byla přibližně 2×10^{11} buněk/ml. Bakteriální kultura byla za stálého chlazení na ledu rozdělena po 100 μ l pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) do sterilních předchlazených 1,5 ml uzavíratelných zkumavek v laminárním boxu (Merci, Brno). Zkumavky s kulturou elektrokompetentních buněk *E. coli* kmene TOP10 byly vloženy na 3 min do tekutého dusíku a uchovávány k dalšímu použití v mrazáku při - 80 °C.

3.2.2.3 Transformace elektrokompetentních buněk *E. coli*

K 100 μ l neúplně rozmrznutých elektrokompetentních buněk *E. coli* kmene TOP10 v 1,5 ml uzavíratelných zkumavkách bylo za pomoci automatické pipety (Eppendorf, Německo) sterilně přidáno 1 μ l plasmidu po rekombinační reakci a inhibici klonasy pomocí proteinasy K. Zkumavky s elektrokompetentními buňkami *E. coli* a plasmidem byly řádně promíchány a krátce stočeny na malé stolní centrifuze. Pomocí plastové kapilární pipety byla kultura buněk *E. coli* a příslušného plasmidu přenesena do kyvet určených pro elektroporaci. Do zapnutého a nastaveného přístroje pro elektroporaci BTX™ ECM™ 399 Exponential Decay Wave Electroporator (ThermoFisher Scientific, USA) byla vložena kultura buněk s plasmidem. Po zmáčknutí tlačítka „START“ proběhla elektroporace. Podmínky byly nastaveny na 1800 V po dobu 5 ms.

Po elektrickém pulzu bylo nutné pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) přidat ke kultuře buněk *E. coli* s příslušným elektroporovaným plasmidem 150 μ l S.O.C. média. Roztok byl přenesen do 1,5 ml uzavíratelných zkumavek, vršky oblepeny parafilmem a kultivovány v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) při 37 °C, 200 rpm po dobu 2 hod. Poté byla kultura ze zkumavek sterilně přenesena pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) se sterilní špičkou v laminárním boxu (Merci, Brno) na předem připravené Petriho misky s tuhým LB médiem s obsahem specifických selekčních antibiotik dle transformovaného plasmidu a rozetřena jednorázovou plastovou bakteriologickou kličkou po povrchu média. Po kompletním rozetření kultury po povrchu tuhého LB média s obsahem antibiotik, byly takto připravené Petriho misky s transformovanou kulturou dány přes noc do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na 37 °C dnem vzhůru.

3.2.2.4 Transformace chemokompetentních buněk *E. coli*

K 100 μ l neplně rozmrzlých chemokompetentních buněk *Escherichia coli* kmene TOP10 bylo pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) přidáno 3 μ l plasmidů po rekombinační reakci a inhibici klonasy pomocí proteinasy K. Zkumavky s chemokompetentními buňkami a plasmidem byly mírně protřepány a dány na 30 min do nádoby s ledem. Každých 10 min byly opakovaně mírně protřepány pro lepší účinnost. Po 30 minutách byly zkumavky s kulturou a plasmidy vloženy do termobloku ThermoCell Cooling & Heating Block (Bioer, Čína) předeřátého na 42 °C a ponechány zde 60 s. Po teplotním šoku byly zkumavky s kulturou a plasmidem přeneseny na led kde byly 60 s.

Poté bylo v aseptickém prostředí laminárního boxu (Merci, Brno) přidáno do každé zkumavky s kulturou 150 μ l S.O.C. média. Vršky zkumavek s kulturou byly přelepeny parafilmem, připevněny k podložce a ponechány kultivovat v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) při 37 °C na 200 rpm po dobu 90 min. Poté byla kultura ze zkumavek sterilně přenesena pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) se sterilní špičkou na předem připravené Petriho misky s tuhým LB médiem s obsahem specifických selekčních antibiotik dle transformovaného plasmidu a rozetřena jednorázovou plastovou bakteriologickou kličkou po povrchu média.

Po kompletním rozetření kultury v S.O.C. médiu po povrchu tuhého LB média s obsahem antibiotik byly Petriho misky s transformovanou kulturou dány přes noc do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na 37 °C dnem vzhůru.

3.2.3 PCR kolonií

Kolonie bakterií *E. coli*, které rostly na tuhém LB médiu s přidavkem selekčního antibiotika specifického pro daný plasmid byly sterilně, pomocí špiček od pipety, přeneseny do 10 μ l sterilní PCR H₂O v PCR zkumavkách. Pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) byla špička párkrát propláchnuta v PCR H₂O, aby byla jistota, že byla přenesena celá kolonie. Zkumavky s PCR H₂O a koloniemi byly řádně promíchány a krátce stočeny na centrifuze MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific, USA).

Poté byla připravena reakční směs o celkovém objemu 10 μl . Složení reakční směsi je následující: 6,75 μl PCR H_2O , 0,2 μl dNTPs ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 0,5 μl primerů přední/zadní ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 1 μl DreamTaq 10x buffer (Invitrogen, Lotyšsko) a 0,05 μl DreamTaq DNA polymerasy (Invitrogen, Lotyšsko). Reakční směs byla přenesena pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) do PCR zkumavek po 9 μl do každé zkumavky, a nakonec bylo přidáno 1 μl vzorku.

Zkumavky s reakční směsí byly řádně promíchány opakovaným nabíráním a vypouštěním směsi pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo), krátce stočeny na centrifuze MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific, USA) a dány do termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA). Byl nastaven program pro průběh PCR (Tab. 2). Po průběhu PCR bylo nutné provést agarosovou gelovou elektroforézu (viz kapitola 3.2.11).

Tab. 2 Teplotní program pro průběh PCR kolonií

Fáze	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet opakování fáze
Úvodní denaturace	95 °C	2'	
Denaturace	95 °C	0,5'	1
Nasednutí primerů	58 °C	0,5'	
Extenze	72 °C	3'	35
Závěrečná extenze	72 °C	10'	
Zchlazení	4 °C	∞	1

3.2.4 Izolace plasmidové DNA

3.2.4.1 Izolace plasmidu pomocí miniprep P1P2P3

Na získání plasmidové DNA byla použita přes noc narostlá kultura *E. coli* transformovaná příslušným plasmidem v LB médiu s obsahem selekčního antibiotika. Obsah antibiotika zajišťoval, že narostou jen buňky *E. coli*, které jsou správně transformované příslušným plasmidem. Do uzavíratelných zkumavek o objemu 2 ml bylo pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) přeneseno 2 ml kultury. Zkumavky s kulturou se následně centrifugovaly v centrifuze Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) při pokojové teplotě, po dobu 3 min, na 3000 g. Po centrifugaci byl odlit supernatant a bylo přidáno 250 µl P1 pufru. P1 pufr byl před použitím smíchán s 1 µl RNAsy H (New England's BioLabs®, UK) na 1 ml P1 pufru. Pelet s P1 pufrem byl resuspendován za využití vortexu Genie 1 (Scientific Industries, USA).

Poté bylo k resuspendovanému peletu dodáno 250 µl P2 pufru. P2 pufr zajišťuje lýzi buněk a nesmí působit déle než 5 minut. Nakonec bylo přidáno 250 µl P3 pufru. P3 pufr zajišťuje neutralizaci a vysrážení buněčných stěn. Zkumavky s pufrů a resuspendovaným peletem byly vloženy do centrifugy Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) a stočeny při pokojové teplotě, po dobu 10 min, na 15 600 g. Po centrifugaci bylo přidáno 750 µl isopropanolu pro vysrážení DNA.

Zkumavky se vzorky byly ponechány stát při pokojové teplotě 5 min. Následně byly vzorky přeneseny do centrifugy Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) a stočeny při pokojové teplotě na 15 600 g, 10 min. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 1 ml na ledě předchlazeného 75% ethanolu a dány opět centrifugovat při pokojové teplotě, po dobu 5 min, na 5 200 g.

Následně byl supernatant odlit a jeho zbytky opatrně odstraněny automatickou pipetou. Zkumavky se vzorky byly pro odpaření zbytků ethanolu ponechány otevřené na ledu. Nakonec bylo ke každému vzorku přidáno 50 µl H₂O bez obsahu DNase/RNase a vzorky byly uloženy do mrazáku na - 20 °C.

3.2.4.2 Izolace plasmidu pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit

Na získání plasmidové DNA byla použita přes noc narostlá kultura *E. coli* transformovaná příslušným plasmidem v LB médiu s obsahem selekčního antibiotika. Obsah antibiotika zajišťoval, že narostou jen buňky *E. coli*, které jsou správně transformované příslušným plasmidem. Do uzavíratelných zkumavek o objemu 2 ml bylo pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) přeneseno 2 ml kultury.

Zkumavky s kulturou se následně stočily v centrifuze Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) při pokojové teplotě, po dobu 3 min, na 3000 g. Po centrifugaci byl odlit supernatant a k přidáno 250 μ l P1 pufru. P1 pufr byl před použitím smíchán s 1 μ l RNAsy H (New England's BioLabs®, UK) na 1 ml P1 pufru. Pelet s P1 pufrem byl resuspendován za využití vortexu Genie 1 (Scientific Industries, USA). Poté bylo k resuspendovanému peletu přidáno 250 μ l P2 pufru. Nakonec bylo přidáno 250 μ l P3 pufru. Zkumavky s pufrů a resuspendovaným peletem byly vloženy do centrifugy Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) a stočeny při pokojové teplotě, po dobu 10 min, na 15 600 g.

Supernatant byl po centrifugaci přenesen pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) do kolonek určených k záchytu plasmidové DNA (Qiagen, Německo) a kolonky se supernatantem byly vloženy do centrifugy Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) a stočeny při pokojové teplotě, po dobu 1 min, na 5600 g. Protečená tekutina byla jímána do spodní části kolonek a po stočení odlita.

Následně bylo pipetou (Eppendorf, Německo) přidáno 750 μ l pufru PE na povrch kolonky. Kolonky s navázanou plasmidovou DNA byly přečištěny tímto pufrem stočením v centrifuze Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) při pokojové teplotě, po dobu 1 min, na 5600 g. Zbytky protečeného PE pufru byly odlity a kolonky, pro odstranění zbytků PE pufru, stočeny ještě jednou.

Nakonec bylo na povrch kolonek aplikováno pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) 50 μ l čisté sterilní H₂O určené pro PCR. Voda zde sloužila pro uvolnění DNA z kolonky a její eluci. Kolonky s nanesenou H₂O se ponechaly stát při pokojové teplotě 1 min a následně byly stočeny na centrifuze Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA) při pokojové teplotě, po dobu 1 min, na 5600 g. Po stočení byla kolonka vyjmuta ze zkumavky pod ní a H₂O s plasmidovou DNA byla uložena do mrazáku na - 20 °C pro další použití.

3.2.5 Restrikční štěpení plasmidů

K ověření správného průběhu BP a LR reakce je potřeba vzniklý plasmidový vektor ověřit pomocí štěpení specifickou restrikční endonukleasou. Štěpení poskytuje následně fragmenty určité velikosti, které se dají predikovat za použití softwaru ApE – A plasmid Editor v2.0.37 (M.W. Davis, USA). Fragmenty poté detekujeme pomocí gelové elektroforézy a porovnáme s predikovanou verzí.

Pro otestování „entry“ klonů pDONR221 *SAMK* cDNA a gDNA a pDONR-P2R-P3 *SAMK* cDNA a gDNA byl použit enzym BsmAI (New England BioLabs®, UK). Reakční směs o výsledném objemu 10 μ l byla složena: z 6,9 μ l PCR H₂O, 1 μ l 10x CutSmart Buffer (New England BioLabs®, UK), 0,1 μ l restrikčního enzymu BsmAI (New England BioLabs®, UK) a 2 μ l „entry“ klonů po BP reakci rozpuštěných v PCR H₂O. Po přidání všech složek směsi byly PCR zkumavky vloženy do termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) nastaveného na konstantní teplotu 37 °C na 1 h nebo do inkubátoru (37 °C).

Pro ověření expresních klonů pGWB454 a pGWB455 *SAMK* cDNA a gDNA po LR reakci byl použit enzym PstI Fast Digest (ThermoFisher Scientific, USA). Reakční směs o výsledném objemu 10 μ l byla složena: z 6,9 μ l PCR H₂O, 1 μ l 10x FastDigest Buffer (ThermoFisher Scientific, USA), 0,1 μ l restrikčního enzymu PstI Fast Digest (ThermoFisher Scientific, USA) a 2 μ l jednotlivých expresních klonů po LR reakci rozpuštěných v PCR H₂O. Po přidání všech složek směsi byly PCR zkumavky vloženy do termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) nastaveného na konstantní teplotu 37 °C na 1 h nebo do inkubátoru (37 °C).

Po ukončení restrikčního štěpení byly vzorky připraveny na agarosovou gelovou elektroforézu. Vzorky expresních vektorů štěpených PstI byly rovnou připravené na elektroforézu díky obsahu kontrastní látky v pufru 10x FastDigest Buffer (ThermoFisher Scientific, USA). Do jamek v 1% agarosovém gelu bylo naneseno pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) 6 μ l. V případě použití restrikčního enzymu BsmAI bylo odebráno pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) 5 μ l z reakční směsi a přidáno 1 μ l 6x DNA Loading Dye (Invitrogen, USA), následně naneseno do jamek v 1% agarosovém gelu a provedena elektroforéza (viz kapitola 3.2.11).

3.2.6 Příprava *Agrobacterium tumefaciens* pro další použití

3.2.6.1 Příprava chemokompetentních *Agrobacterium tumefaciens*

Pro přípravu chemokompetentních buněk *A. tumefaciens* kmene GW3101 bylo potřeba mít připravenou kryokonzervu, která se skladuje při - 80 °C v mrazáku. Pro přípravu chemokompetentních buněk *A. tumefaciens* je třeba pracovat asepticky v laminárním boxu (Merci, Brno) se sterilními nástroji.

Kryokonzervy *A. tumefaciens* kmen GW3101 byly ponechány rozmraznout na ledu a následně pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) naneseny na povrch tuhého LB média s obsahem antibiotika rifampicin a rozetřeny pomocí bakteriologické kličky po LB médiu. Na rifampicin je tento kmen *A. tumefaciens* rezistentní. Takto připravené Petriho misky s bakteriemi byly dány do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na 28 °C přes noc. Druhý den byly narostlé kolonie *A. tumefaciens* naočkovány pomocí sterilního dřevěného párátka do plastových kultivačních tub o objemu 50 ml s 5 ml tekutého LB média s obsahem rifampicinu. Naočkované LB médium v plastových kultivačních tubách bylo umístěno do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) a kultura kultivována při 28 °C, 160 rpm přes noc.

Následující den bylo naočkováno 0,5 ml kultury kultivované přes noc do Erlenmeyerovy baňky s 50 ml tekutého LB média s obsahem rifampicinu. Baňky s kulturou v LB médiu byly dány do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na 28 °C, 160 rpm a průběžně bylo v kyvetách měřeno OD_{600nm} ve spektrofotometru SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA) do naměření hodnoty OD_{600nm} = 0,5-1,0.

Po naměření hodnoty OD_{600nm} byla kultura *A. tumefaciens* kmene GW3101 sterilně přelita do 50 ml plastových tub a ponechána stát 15–30 min na ledu. Následně byly plastové tuby s kulturou dány do centrifugy Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) předchlazené na 4 °C a stočeny při 3000 g po dobu 5 min. Po stočení byly supernatanty odlity a pelety rozpuštěny ve 2 ml roztoku $CaCl_2$ ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) vychlazeného na 4 °C a inkubovány na ledu 1–6 hodin.

Po inkubaci byl přidán ke kultuře chemokompetentních buněk *A. tumefaciens* kmene GW3101 glycerol, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 20 %. Poté bylo do sterilních předchlazených, uzavíratelných, plastových zkumavek o objemu 2 ml přeneseno 100 μl kultury chemokompetentních buněk. Nakonec byly zkumavky s kulturou zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v mrazáku při - 80 °C.

3.2.6.2 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* teplotním šokem

Konzervy chemokompetentních buněk *A. tumefaciens* kmene GW3101 v 2 ml uzavíratelných zkumavkách, umístěných v mrazáku na - 80 °C, byly vytaženy a ponechány na ledu rozmraznout. Následně bylo sterilně v laminárním boxu (Merci, Brno) přidáno pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) k rozmrznutým kulturám 1 μl plasmidové DNA po izolaci a čištění pomocí miniprep P1P2P3 nebo QIAprep Spin Miniprep Kit.

Bakteriální kultura *A. tumefaciens* byla společně s plasmidovou DNA ponechána na ledu 30 min. Co 10 min byla zkumavka s kulturou a plasmidovou DNA jemně protřepána. Po uplynutí 30 min byly zkumavky s bakteriální kulturou a plasmidovou DNA vloženy do tekutého dusíku na 5 min. Po teplotním šoku byly zkumavky s bakteriální kulturou a plasmidovou DNA vytaženy z tekutého dusíku a ponechány 15 min na ledě k rozmrznutí. Po rozmrznutí bylo do zkumavek přidáno pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) 150 μl S.O.C. média, zkumavky byly oblepeny parafilmem a dány do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) 28 °C, 200-220 rpm na 2-4 hod.

Poté byla kultura ze zkumavek sterilně přenesena v laminárním boxu (Merci, Brno) pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) se sterilní špičkou na předem připravené Petriho misky s tuhým LB médiem s obsahem specifických selekčních antibiotik dle transformovaného plasmidu a rifampicinu a rozetřena jednorázovou plastovou bakteriologickou kličkou po povrchu média. Po kompletním rozetření kultury v S.O.C. médiu po povrchu tuhého LB média s obsahem antibiotik, byly takto připravené Petriho misky s transformovanou kulturou dány na 48 hod do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na 28 °C dnem vzhůru.

3.2.7 Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*

K rychlému zjištění, zda se správně tvoří proteinový produkt kódovaný navrženou plasmidovou DNA slouží heterologní transientní transformace listů *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* nesoucí rekombinovaný plasmid. Výhodou této metody je rychlé zjištění funkčnosti celého systému pro další použití.

Kultura *A. tumefaciens* nesoucí plasmid s konstruktem a udávající rezistenci k určitému antibiotiku byla očkována do tekutého LB média. K 20 ml LB média ve sterilních plastových zkumavkách o objemu 50 ml s příslušným antibiotikem o určité koncentraci (Tab. 3) bylo pomocí automatické pipety sterilně přidáno 15 µl zásobního roztoku kultury *A. tumefaciens* nesoucí daný plasmid. Společně s tím bylo připraveno 1 ml tekutého LB média bez bakteriální kultury pouze s antibiotiky sloužící jako referenční roztok. Zkumavky s LB médiem a kulturami byly vloženy do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) a kultivovány přes noc při 150 rpm a 28 °C.

Tab. 3 Antibiotika pro selekci *A. tumefaciens* nesoucí daný plasmid

Plasmid	Antibiotikum	Finální koncentrace
p19	Kanamycin	25 µg·ml ⁻¹
	Rifampicin	100 µg·ml ⁻¹
pGWB454 a pGWB455	Spektinomycin	100 µg·ml ⁻¹
	Rifampicin	100 µg·ml ⁻¹

Druhý den bylo změřeno OD_{600} v 1 ml přes noc rostlé kultury *A. tumefaciens* pomocí spektrofotometru SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA) oproti referenčnímu roztoku. Následně byly zkumavky s bakteriální kulturou vloženy do centrifugy Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) vychlazené na 4 °C a stočeny po dobu 10 min při 3000 g. Po stočení byl odlit supernatant a pelet resuspendován na vortexu Genie 1 (Scientific Industries, USA) v 1 ml sterilního inokulačního média přidaného pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo).

Z resuspendovaného roztoku bakteriální kultury v inokulačním médiu bylo sterilně odebráno 50 μ l pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo), přidáno do kyvety s 450 μ l čistého inokulačního média a promícháno. Následně bylo změřeno OD_{600} na spektrofotometru SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA) oproti 0,5 ml referenčního roztoku tvořeného čistým inokulačním médiem. Výsledná hodnota OD_{600} byla vynásobena 10x a roztok s bakteriální kulturou byl naředěn čistým inokulačním médiem do hodnoty $OD_{600} = 0,7$ v 1 ml. Při kombinování různých bakteriálních kultur do jednoho inokulačního média byla potřeba přepočíst jednotlivé bakteriální kultury tak, aby hodnota OD_{600} pro jednotlivé kultury byla 0,7 v 1 ml inokulačního média. Takto naředěné kultury v inokulačním médiu byly dány do tmy na 2-4 hod při pokojové teplotě.

Do spodní strany listů ráno zalitých rostlin *N. benthamiana* byly pomocí čisté plastové stříkačky opatrně vtlačeny kultury *A. tumefaciens* v inokulačním médiu. Zalité rostliny *N. benthamiana* otevírají své průduchy. Pro snadnější vtlačení kultury je tento krok nutný. Zóny inokulace byly vyznačeny z vrchní strany listů pomocí fixu.

3.2.8 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Pro účely lokalizace tvorby SAMK a jiných proteinů ve fúzi s fluorescenčními proteiny v *N. benthamiana* byl použit konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 (Zeiss, Německo). Snímky byly pořizovány za použití objektivu Plan APOCHROMAT 20x/0,8 M27 (Zeiss, Německo).

Pro pozorování živého materiálu v konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu (Zeiss, Německo) byl potřeba zhotovit preparát. Za použití čistých laboratorních nůžek byla z listu transientně transformovaného listu *N. benthamiana* vystřižena oblast od místa aplikace inokula až po hranici, kam roztok inokula doputoval.

Posléze byla tato část listu přenesena pomocí čisté pinzety na podložní sklo tak, aby byla spodní (abaxiální) strana listu směrem nahoru. Na podložním sklu byla po stranách nalepena oboustranná lepicí páska. Následně byla pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) nanesa kapka destilované H₂O na abaxiální stranu listu a byl překryt sklem krycím. Nakonec byly okraje krycího skla překryty úzkým pásem parafilmu tak, aby se H₂O neodpařovala. Připravený preparát byl vložen do vlhké komůrky.

Snímky buněk listů *N. benthamiana* byly pořizovány 3-6 den po transientní transformaci za použití výše zmíněného mikroskopu a objektivu. Pro snímání byly použity různé softwarové aplikace programu ZEN (black edition) v3.0 (Zeiss, Německo) např. pro snímání více optických rovin jedné buňky byla použita aplikace „Z-stack“. Pro zjištění, zda je buňka živá „Time Series“. Nakonec byly snímky upraveny v softwaru ZEN (blue edition) v3.0 (Zeiss, Německo).

3.2.9 Příprava konstruktů SAMK gRNA

Pro přípravu linií *M. sativa* SAMK gRNA a otestování účinnosti konstruktů bylo potřeba navrhnout několik sad specifických primerů s PAM sekvencí, které byly komplementární vůči exonu 1 genu SAMK. Pro tento účel byl použit software Crispr-P v2.0 (Huazhong Agricultural University, Čína) dle práce Yang *et al.*, z roku 2014.

V prvním kroku bylo potřeba sekvenci SAMK gRNA vložit do „entry“ klonu pro následnou LR rekombinační reakci do destinačního vektoru pDe-Cas9. Pro vytvoření „entry“ klonu byl použit linearizovaný přečištěný plasmidový vektor pEn-Chimera (5 ng·μl⁻¹). Následně byla sekvence SAMK gRNA do plasmidového vektoru pEn-Chimera vložena pomocí T4 DNA ligasy (ThermoFisher Scientific, USA). Reakční směs o výsledném objemu 20 μl byla složena: z 4 μl pEn-Chimera, 8 μl SAMK gRNA, 2 μl pufru 10x T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific, USA), 2 μl T4 DNA ligasy (ThermoFisher Scientific, USA) a 4 μl PCR H₂O. PCR zkumavky s reakční směsí byly inkubovány 10 min při 22 °C v termocyleru T100™ Thermal cyler (Bio-Rad, USA). Po ukončení ligace byly vzniklé „entry“ klony transformovány elektrošokem do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 (viz. kapitola 3.2.2.3).

Tab. 4 Sekvence primerů pro tvorbu SAMK gRNA

Název primeru	Sekvence
SAMK gRNA T1_Fw1	5'-ATTGCCGGCGGTTCAAACCTCACGG-3'
SAMK gRNA T1_Rev1	5'-AAACCCGTGAGTTTGAACCGCCGG-3'
SAMK gRNA T2_Fw1	5'-ATTGCGTCCTCCGATCATGCCGAT-3'
SAMK gRNA T2_Rev1	5'-AAACATCGGCATGATCGGAGGACG-3'
SAMK gRNA T3_Fw1	5'-ATTGCCGCCGTGAGTTTGAACCGC-3'
SAMK gRNA T3_Rev1	5'-AAACGCG GTTCAAACCTCACGGCGG-3'
SAMK gRNA T5_Fw1	5'-ATTGCGGCGTCGCTGAGTTTCCGG-3'
SAMK gRNA T5_Rev1	5'-AAACCGTCGCTGAGTTTCCGGCGG-3'

Následně byly transformované buňky *E. coli* TOP10 nesoucí jednotlivé „entry“ klony pEn-Chimera + *SAMK* gRNA sterilně přeneseny v laminárním boxu (Merci, Brno) na pevné LB médium se selekčním antibiotikem a rozetřeny bakteriologickou kličkou po jeho povrchu. Takto připravené Petriho misky s kulturou transformovaných bakterií byly vloženy přes noc do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na 37 °C dnem vzhůru.

Další den byly pozitivní kolonie naočkovány do zkumavek se 3 ml tekutého LB média a kultivovány (přes noc, 37 °C, 180 rpm) v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko). Posléze byly z bakterií izolovány a přečištěny pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo) jednotlivé plasmidové vektory pEn-Chimera + *SAMK* gRNA a použity do LR reakce. Pro vytvoření expresního klonu byla připravena reakční směs do PCR zkumavek o výsledném objemu 5 µl skládající se: z 1 µl přečištěného „entry“ klonu pEn-Chimera + *SAMK* gRNA, 1 µl plasmidového vektoru pDe-Cas9, 2 µl TE pufru (pH 8) a 1 µl LR Clonase™ II Plus enzyme (Invitrogen, USA). PCR zkumavky se směsí byly krátce stočeny na centrifuze MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific, USA) a dány do termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) přes noc na 25 °C. Další den bylo přidáno 0,5 µl Proteinasy K (ThermoFisher Scientific, USA) a proběhla inkubace v termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) nebo inkubátoru na 10 min při 37 °C pro deaktivaci klonasy.

Po ukončení reakce byly vzniklé expresní klony transformovány elektrošokem do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 (viz. kapitola 3.2.2.3). Následně byly transformované buňky *E. coli* TOP10 nesoucí jednotlivé expresní klony pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA sterilně v laminárním boxu (Merci, Brno) přeneseny na pevné LB médium se selekčním antibiotikem a rozetřeny bakteriologickou kličkou po jeho povrchu. Takto připravené Petriho misky s kulturou transformovaných bakterií byly vloženy přes noc do inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) na 37 °C dnem vzhůru. Další den byl pozorován nárůst bakteriálních kolonií.

Buňky *E. coli* TOP10 nesoucí jednotlivé expresní klony byly testovány na jejich přítomnost pomocí PCR kolonií se specifickými primery SS42/SS43 (Tab. 5) s očekávanou velikostí pásu viditelného na 1% agarosovém gelu po elektroforéze 1100 bp (viz kapitola 3.2.11). Následně byly pozitivně testované kolonie očkované do tekutého LB média a inkubovány přes noc v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) při 37 °C, 180 rpm. Z bakteriální kultury byly odebrány 2 ml a z nich izolovány a přečištěny expresní klony pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo).

Přečištěné expresní klony byly transformovány pomocí teplotního šoku do *A. tumefaciens* kmene GW3101 (viz. kapitola 3.2.6.2) a kultury byly selektované 48 hod v Petriho miskách s pevným LB médiem s obsahem antibiotik v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) při 28 °C. Následně byla provedena PCR selektovaných kolonií za použití specifických primerů SS42/SS43. Na následné 1% agarosové gelové elektroforéze byly očekávány pásy o velikosti 1100 bp (viz kapitola 3.2.11). Pozitivní kolonie *A. tumefaciens* nesoucí expresní klony pDe-Cas9 + SAMK gRNA T1, T2 a T5 byly posléze použity k otestování funkčnosti pomocí stabilní transformaci *M. sativa* RSY (viz kapitola 3.2.12).

3.2.10 Genotypizace transgenních rostlin *Medicago sativa*

Pro ověření přítomnosti námi připraveného konstruktů v rostlině *M. sativa* slouží metoda genotypizace. Tato metoda je založena na klasické PCR se specifickými primery (Tab. 5) nasedajícími na lemující sekvenci námi přidaného konstruktů a amplifikující tento segment nacházející se v rostlině.

Do plastových zkumavek určených na PCR bylo automatickou pipetou (Eppendorf, Německo) přidáno 20 µl rozředovacího pufru F-130 Phire Plant Direct PCR Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Následně pomocí sterilních nůžek byly odštířeny kousky listů (2x2 mm) rostlin *M. sativa* transformovaných konstrukty SAMK gRNA T1, T2 a T5, 35S::*SAMK:mRFP* a 35S::*mRFP:SAMK* a vloženy do PCR zkumavek s rozředovacím pufrem. Pomocí sterilní plastové špičky byly kousky listů v rozředovacím pufru rozdrobeny a promíchány. PCR zkumavky se vzorky byly dány na led na 1 hod a krátce stočeny na centrifuze MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific, USA). Čistý supernatant byl pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) přenesen do nové plastové PCR zkumavky.

Následně byla připravena reakční směs pro genotypizaci vzorků. Ke genotypizaci vzorků listů rostlin *M. sativa* transformovaných konstrukty *35S::SAMK:mRFP* a *35S::mRFP::SAMK* byl použit přední primer CaMV35S a zpětný SS129. K vzorkům listů rostlin *M. sativa* transformovaných konstrukty *SAMK* gRNA T1, T2 a T5 byl použit přední primer SS42 a zpětný SS43 nasedající na vektor pDeCAS9. Jako pozitivní kontroly obsahu genomové DNA ve vzorcích byly použity v obou případech specifické primer páry na úsek intronu 3 genu *MMK3* *M. sativa* (Tab. 5).

Po namíchání PCR reakční směsi o výsledném objemu 10 μ l skládající se z: 5,6 μ l PCR H₂O, 2 μ l 5x Phire pufru, 0,2 μ l dNTP (10 mmol·l⁻¹), 0,5 μ l předního a zpětného primeru (10 mmol·l⁻¹), 0,2 μ l Phire DNA polymerasy a 1 μ l templátové DNA ze vzorků listů rostlin *M. sativa* transformovaných konstrukty *35S::SAMK:mRFP*, *35S::mRFP::SAMK* a *SAMK* gRNA byl spuštěn PCR cyklus (Tab. 6) v termocycleru T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA). Po dokončení PCR byly vzorky připraveny na agarosovou gelovou elektroforézu (viz kapitola 3.2.11).

Tab. 5 Sekvence primerů použitých pro genotypizaci transgenních rostlin *M. sativa*

Název primeru	Sekvence
SS42	5'-TCCCAGGATTAGAATGATTAGG-3'
SS43	5'-CGACTAAGGGTTTCTTATATGC-3'
CaMV35S	5'-CTCCTCGGATTCCATTG-3'
SS129 (M13)	5'-CACAGGAAACAGCTATGAC-3'
MMK3 I3_Fw1	5'-TGGGGAGCTTACTGATATAG-3'
MMK3 I3_Rev1	5'-AGATCTCGGTGCAAAAC-3'

Tab. 6 Teplotní program PCR určeného ke genotypizaci transgenních rostlin *M. sativa*

Fáze	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet opakování fáze
Úvodní denaturace	98 °C	0,5'	1
Denaturace	98 °C	0,5'	
Nasednutí primerů	60 °C	0,5'	35
Extenze	72 °C	1'	
Závěrečná extenze	72 °C	10'	1
Zchlazení	12 °C	∞	1

3.2.11 Agarosová gelová elektroforéza

Po průběhu PCR, genotypizace, štěpení plasmidů nebo rekombinačních reakcí bylo nutné provést pro ověření správnosti vzniklých produktů agarosovou gelovou elektroforézou. Pro vizualizaci vzniklých DNA produktů bylo třeba vzorky připravit. Pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) byla vytvořena směs. K 1 µl produktu bylo přidáno 4 µl PCR H₂O a 1 µl 6x DNA Loading Dye (Invitrogen, USA). Do jamek předem připraveného a ztuhlého 1% agarosového gelu bylo pomocí automatické pipety (Eppendorf, Německo) nanášeno 6 µl takto připravených vzorků. Zleva i zprava bylo nanášeno do jamek 1,5 µl standardu GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA). Gel byl při nanášení vzorků a následné elektroforéze umístěn v aparatuře s 1x TAE pufrem.

Elektroforéza probíhala v aparatuře Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA) připojené ke zdroji napětí PowerPac™ Basic (Bio-Rad, USA) při 90 V, 400 mA po dobu 30-50 min. Čas elektroforézy se lišil v závislosti na potřebě vizualizace a separace produktů. Gel se separovanými vzorky po elektroforéze byl vyjmut a vyhodnocen v záznamovém zařízení Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA) programem Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA).

3.2.12 Stabilní transformace *Medicago sativa* a somatická embryogeneze

Pro přípravu kontrolního i transgenního rostlinného materiálu *Medicago sativa* somatickou embryogenezí byl využit protokol popsany podle Samac a Austin-Phillips (2006). Veškerá práce v průběhu somatické embryogeneze probíhala v aseptických podmínkách v laminárním boxu (Merci, Brno).

Nástroje pro práci byly v průběhu opětovně sterilizovány 96% ethanolem a teplotním sterilizátorem (Schuett-biotec.de solaris, Německo). Kultivace kontrolních i transgenních explantátů, kalusů, embryí i nově vzniklých rostlin probíhala v kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) za konstantních podmínek (21 °C, fotoperioda 16/8, vlhkost 70 %, intenzita světla 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3.2.12.1 Sterilizace rostlinného materiálu *Medicago sativa*

Nepoškozené listy ze 3-4 týdnů starých rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*) kultivar RSY byly odebrány a sterilizovány v 70% ethanolu po dobu 10 s. Následně za pomoci sterilní pinzety přesunuty do roztoku 10% hypochloridu sodného s přísávkem Tween 20 (0,05% w/v) a míchány po dobu 1,5 min. Nakonec byly 3x promyty ve sterilní H₂O.

Pro následnou transformaci byly jednotlivé sterilní lístky rozděleny na polovinu a vloženy do 50 ml uzavíratelné zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno 12 ml SH média s 3 ml kultury *A. tumefaciens* nesoucí dané vektory pro transformaci. Kultura *A. tumefaciens* byla kultivována v inkubátoru ES-20 (Biosan, Lotyšsko) při 180 rpm, 28 °C, před přidáním přes noc v tekutém LB médiu s obsahem selekčních antibiotik. Následně byla stočena na centrifuze Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA) na 3 000 g 5 min a pelet byl suspendován v čistém tekutém LB médiu. Následně bylo změřeno OD₆₀₀ spektrometrem SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA), které má mít kultura bakterií pro transformaci 0,6-0,8. Ve zkumavce s SH médiem a bakteriální kulturou byly lístky ponechány za jemného míchání 30 min a poté přeneseny na sterilní filtrační papír k osušení a na čisté B5H médium.

3.2.12.2 Kultivace *M. sativa* na B5H médiu

Dediferenciační B5H kultivační médium bylo připraveno dle návodu v protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Médium obsahuje zejména růstové regulátory, auxiny a cytokininy, které iniciují tvorbu kalusu. Od kapaliny zbavené půlky listů po transformaci *A. tumefaciens* byly přeloženy na Petriho misku s dediferenciačním B5H kultivačním médiem tak, aby byly celou svou plochou ve styku s médiem. Misky s rostlinným materiálem byly popsány a sterilně zaizolovány páskou k zabránění cizí kontaminace. Kultivace na tomto médiu probíhala po dobu 7 dní v kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) za konstantních podmínek (21 °C, fotoperioda 16/8, vlhkost 70 %, intenzita světla 30-40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Po uplynutí 7 dní a nárůstu kultury *A. tumefaciens* okolo a na listech vojtěšky seté (*M. sativa*) byly listy sterilně odebrány z Petriho misek s čistým B5H médiem do 50 ml sterilní uzavíratelné zkumavky a 5x propláchnuty 25 ml sterilní H_2O . Následně byly listy osušeny od zbytků H_2O na sterilním filtračním papíře a dány na B5H médium s obsahem selekčních antibiotik určených vnášeným konstruktem. Petriho misky s B5H médiem s antibiotiky a listy byly zaizolovány páskou a dány kultivovat do kultivační místnosti H220 (Weiss Gallenkamp, Velká Británie) za konstantních podmínek (21 °C, fotoperioda 16/8, vlhkost 70 %, intenzita světla 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) na 2-3 týdny.

3.2.12.3 Kultivace *M. sativa* na B50 médiu

Médium B50, podporující vznik somatických embryí bylo připraveno dle návodu v protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Vzniklé kalusy byly přeloženy na B50 médium se selekčními antibiotiky za účelem tvorby somatických embryí, která se začala formovat po 2–3 týdnech kultivace.

3.2.12.4 Kultivace *M. sativa* na MMS médiu

MMS médium indukující růst kořenového systému ze somatických embryí bylo připraveno dle protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Vzniklá somatická embrya byla jednotlivě přenesena a zanořena do MMS média ze 2/3 jejich délky. V MMS médiu s obsahem příslušných selekčních antibiotik byla somatická embrya kultivována 1–3 týdny v závislosti na rychlosti kořenění embryí. Následně byla sterilně přeložena na MMS médium bez selekčních antibiotik.

3.2.12.5 Kultivace *M. sativa* na MS médiu

MS médium, vhodné pro následnou kultivaci nově vzniklých rostlin, bylo připraveno dle protokolu (Samac a Austin-Phillips, 2006). Dle velikosti byly nově vzniklé transgenní i kontrolní rostliny *M. sativa* postupně umisťovány do větších Petriho misek s 45 ml MS média, následně do čtvercových boxů po 4–9 rostlinách, a nakonec jednotlivě do plastových kbelíků.

3.2.13 Western blot analýza

3.2.13.1 Extrakce proteinů

Pro extrakci proteinů z transgenních a kontrolních rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*), huseníčku rolního (*A. thaliana*) a *N. benthamiana* byl použit pufr E. Těsně před jeho použitím do něho byly přidány inhibitory proteas Complete Tablets EDTA-free, fosfatas – PhosSTOP a redukční činidlo ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) DTT ($1 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$). Takto připravený na ledu chlazený extrakční pufr E byl přidán ke každému předem v tekutém N_2 zhomogenizovanému vzorku, který byl chlazen na ledu. Objem přidaného extrakčního pufru E byl přibližně $100 \text{ } \mu\text{l}$ na 100 mg vzorku. Následně byly vzorky intenzivně promíchány na vortexu Genie 1 (Scientific Industries, USA) a inkubovány na ledu za občasného protřepání po dobu 30 min . Poté byly vzorky stočeny v předem předchlazené centrifuze ScanSpeed 1730R Refrigerated microcentrifuge (Beckman Coulter®, USA; 8000 g , 20 min , $4 \text{ } ^\circ\text{C}$) Vzniklý supernatant, který obsahoval izolované proteiny byl přenesen do nových zkumavek a skladován v mrazicím boxu při $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$.

3.2.13.2 Stanovení koncentrace izolovaných proteinů

Výsledná absorbance izolovaných proteinů z transgenních a kontrolních rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*), huseníčku rolního (*A. thaliana*) a *N. benthamiana* byla měřena pomocí „micro-assay“ metody. Do každé jamky v mikrodestičce určené k měření absorbance bylo automatickou pipetou (Eppendorf, Německo) přidáno $1 \text{ } \mu\text{l}$ vzorku, $239 \text{ } \mu\text{l}$ dH_2O a $60 \text{ } \mu\text{l}$ Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA). V referenčním vzorku byl vzorek jednotlivých izolovaných proteinů nahrazen $1 \text{ } \mu\text{l}$ extrakčního pufru E. Vzorky byly promíchány pipetou a inkubovány po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Mikrodestička se vzorky byla poté vložena do čtecího zařízení Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader (Tecan, USA). Výsledná absorbance byla změřena při vlnové délce $\lambda = 595 \text{ nm}$.

Zároveň byla sestavena kalibrační křivka, která byla zhotovena na základě měření absorbancí roztoků albuminu (BSA) o známých koncentracích (0 ; $0,5$; $1,0$; $1,5$; $2,0$; $2,5$; $3,0$; $3,5$; $4,0$; $4,5$; $5,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Podle rovnice grafu byla poté vypočtená výsledná koncentrace izolovaných proteinů.

3.2.13.3 SDS-PAGE

Ke vzorkům extrahovaných proteinů z transgenních a kontrolních rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*), huseníčku rolního (*A. thaliana*) a *N. benthamiana* o celkovém obsahu proteinů 20 µg na 1 jamku bylo přidáno činidlo 4x Laemmli Sample Buffer (BioRad, USA) v poměru 3:1 (vzorek proteinu: 4x Laemmli Sample Buffer).

Následně byl ke vzorkům s puftrem 4x Laemmli Sample Buffer (BioRad, USA) přidán 2-merkaptoethanol tak, aby jeho finální koncentrace byla 5 %. Takto připravené vzorky byly zahřáty v termobloku CHB-202 (Bioer, Čína) na 95 °C po dobu 5 min, aby proběhla denaturace obsažených proteinů. Mezitím byla sestavena aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA) na provedení SDS-PAGE. Do elektroforetické vany byly umístěny předem připravené 10% polyakrylamidové Stain free gely TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions (Bio-Rad, USA) a vana byla doplněna 1x elektroforetickým puftrem po rysku.

Do první jamky v gelu bylo automatickou pipetou (Eppendorf, Německo) nanášeno 5 µl standardu Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad, USA), do ostatních jamek potom jednotlivé vzorky proteinů. Aparatura byla napojena na zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA). Separace proteinů probíhala při konstantním proudu (10 mA na 1 gel) po dobu 1–3 h a při teplotě 4 °C.

3.2.13.4 Western blot

Poté co byly proteiny rozděleny na základě své molekulové hmotnosti byl gel přenesen a promyt po dobu 10 min v 1x transferovém pufru (bez methanolu). Následně byly 10% polyakrylamidové Stain free gely TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions (Bio-Rad, USA) s rozdělenými proteiny nasnímány na dokumentačním zařízení ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA).

Polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána Amersham™ Hybond™-P (GE Healthcare, Německo) o velikosti 6 x 9 cm byla nejdříve aktivována 30 s v methanolu. Poté byl sestaven „sandwich“. V průběhu jeho skládání byly pomocí válečku vytlačovány vzduchové bubliny a jeho jednotlivé komponenty byly vždy předem vlhčeny 10 min v 1x transferovém pufru s methanolem. Seskládaný „sandwich“ byl poté vložen do blotovací aparatury Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA) napojené na zdroj napětí PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA).

Transfer proteinů z gelu na PVDF membránu probíhal přes noc při konstantním napětí 24 V při teplotě 4°C. Po ukončení transferu byla membrána obarvená pomocí Ponceau S 1 min, propláchnuta krátce v dH₂O a vyfocena pro zjištění úspěšnosti přenosu proteinů z gelu na membránu. Barvivo bylo z membrány důkladně vymyto dH₂O a TBS-T.

Pro imunologické stanovení obsahu proteinů bylo použito několik králíčích primárních protilátek, tj. AntiSAMK (GenScript, USA), Anti-AtMPK3 (Sigma, USA), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology®, USA) a myší monoklonální primární protilátky Anti-mCherry. Před aplikací bylo nutné membránu s přenesenými proteiny blokovat tak, aby bylo zamezeno nespecifické vazbě primárních protilátek. V případě použití primárních protilátek AntiSAMK, Anti-AtMPK3 a Anti-mCherry bylo použito 15 ml blokační směsi skládající se z 4% BSA a 4% sušeného odtučněného mléka rozpuštěného v TBS-T.

V případě použití Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) protilátky pak bylo použito 15 ml blokační směsi 5% BSA rozpuštěného v TBS-T. Membrány s proteiny byly blokovány 1 h při pokojové teplotě na kývačce Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan, Lotyšsko). Po blokování membrán v blokační směsi byly membrány s proteiny krátce promyty v TBS-T.

Následně byla k membránám přidána směs primární protilátky. Membrány určené pro detekci pomocí králičí AntiSAMK primární protilátky byly vloženy do 15 ml směsi (TBS-T, 3% BSA, protilátka ředěna v poměru 1:1000). Při použití králičí AntiMPK3 primární protilátky byla protilátka ředěna do TBS-T s 1% BSA v poměru 1:2000. Při použití myší Anti-mCherry byla protilátka ředěna do TBS-T s 3% BSA v poměru 1:2000. Ve všech případech byly membrány s proteiny inkubovány v 15 ml směsi protilátky po dobu 1,5 h na kývačce Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan, Lotyšsko) při pokojové teplotě. Králičí Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátka byla ředěna do TBS-T v 3% BSA v poměru 1:1000 a byla inkubována přes noc na kývačce Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan, Lotyšsko) při 4 °C. Po inkubaci s primárními protilátkami byla směs odlita a membrány s proteiny promyty 3 x 10 min v TBS-T.

Po promytí byla k membránám s proteiny přidána sekundární Goat anti-rabbit IgG F(ab')₂ protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (Invitrogen, USA) naředěná do 15 ml směsi TBS-T s 1% BSA v poměru 1:5000 pro primární králičí primární protilátky a Goat anti-mouse IgG o stejném ředění proti myší primární protilátce Anti-mCherry. Membrány ve směsi sekundární protilátky byly inkubovány 1,5 h na kývačce Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan, Lotyšsko) při pokojové teplotě. Následně byla směs odlita a membrány promyty 5 x 10 min v TBS-T.

Pro detekci proteinů byl na membránu aplikován detekční roztok Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA) v poměru 1:1 pro aktivaci signálu. Po 2 min inkubace byl roztok odstraněn a membrána byla vložena do dokumentačního zařízení ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA), kde byl luminiscenční produkt reakce substrátu s křenovou peroxidasou detekován a využit tak i pro detekci hledaných proteinů. Pro následné zpracování a měření intenzity abundance proteinů byl použit program Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA).

4 VÝSLEDKY

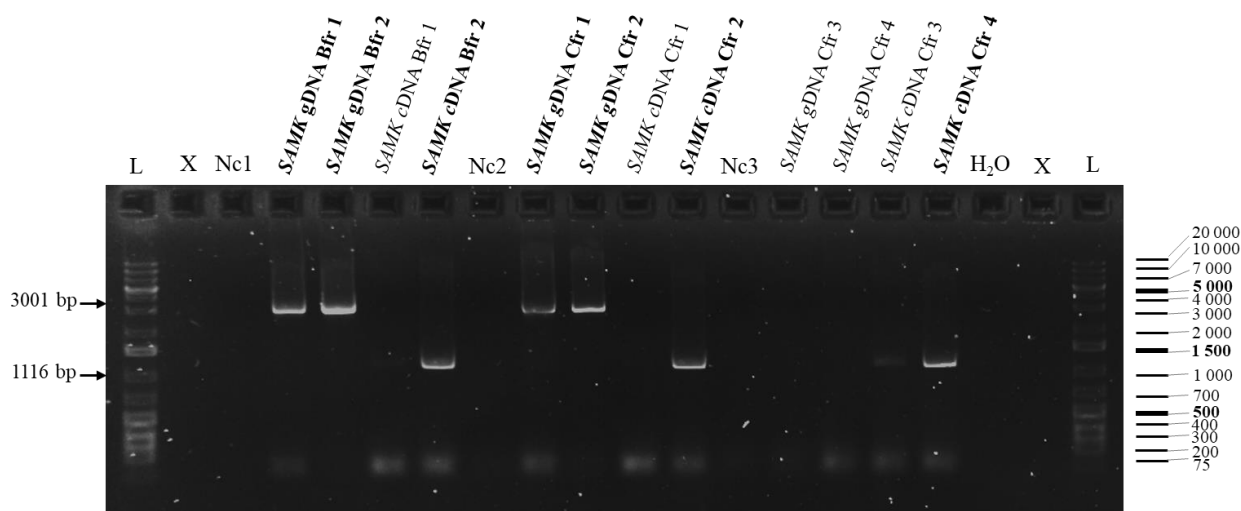
4.1 Klonování *SAMK* ve fúzi s fluorescenčním proteinem

4.1.1 Příprava konstruktů *SAMK* ve fúzi s fluorescenčním proteinem

Gen *SAMK* z vojtěšky seté (*M. sativa*) byl amplifikován za pomoci PCR se specifickými primery vůči *SAMK*. Primery obsahovaly *attB1* a *attB2* místa pro následnou BP rekombinaci a tvorbu „entry“ klonu pDONR221 + *SAMK* cDNA/gDNA (Bfr) a *attB2* a *attB3* místy pro tvorbu „entry“ klonu pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA/gDNA (Cfr). Jako templátová DNA byla použita gDNA a cDNA z vojtěšky seté (*M. sativa*) RSY. K PCR reakce byla použita DNA polymerasa iProof™.

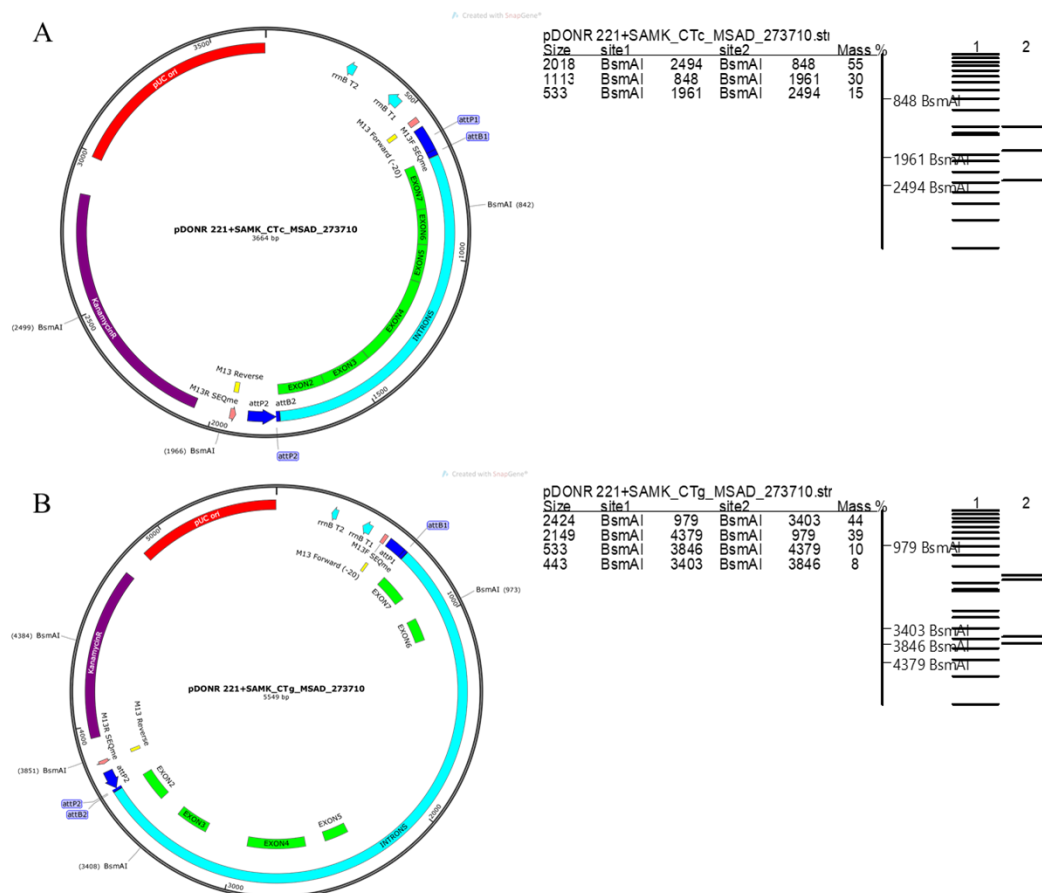
Za pomoci specifické PCR reakce byla amplifikována *SAMK* gDNA o velikosti 3001 bp i *SAMK* cDNA o velikosti 1116 bp. Tyto fragmenty byly použity na BP rekombinaci a vytvoření „entry“ klonu pDONR221 + *SAMK* cDNA/gDNA, tj. vzorky *SAMK* gDNA Bfr1,2 a *SAMK* cDNA Bfr2 tučným písmem (Obr. 6). Za použití amplifikovaných fragmentů *SAMK* gDNA i *SAMK* cDNA byly vytvořeny i „entry“ klonu pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA/gDNA, tj. vzorky *SAMK* gDNA Cfr1,2 a *SAMK* cDNA Cfr2,4 tučným písmem (Obr. 6).

Po vytvoření „entry“ klonů pDONR221 + *SAMK* cDNA i pDONR221 + *SAMK* gDNA (označení Bfr), a taky pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA i pDONR-P2R-P3 + *SAMK* gDNA, bylo potřeba ověřit správnost rekombinační reakce. K tomuto účelu byla vytypována restriční endonukleasa BsmAI. První byla provedena predikce štěpení v programu A-plasmid Editor v2.0.37 (M.W. Davis, 2003-2009). Štěpením pDONR221 + *SAMK* cDNA pomocí BsmAI by teoreticky vznikaly fragmenty o velikostech 2018 bp, 1113 bp a 533 bp (Obr. 7; A). Při štěpení pDONR221 + *SAMK* gDNA by vznikaly fragmenty o velikostech 2424 bp, 2149 bp, 533 bp a 533 bp (Obr. 7; B). Schémata plasmidových vektorů (Obr. 7) byla designována v programu SnapGene® Viewer v4.2.11 (GSL Biotech LLC, USA).



Obr. 6 Elektroforeogram po PCR amplifikaci genu *SAMK* z vojtěšky seté (*M. sativa*) RSY. Za použití *SAMK* specifických primerů pro MultiSite Gateway byla naklonována *SAMK* cDNA (1116 bp) a *SAMK* gDNA (3001 bp). K PCR byla použita DNA polymerasa iProof™ a gDNA, cDNA izolována z vojtěšky seté (*M. sativa*) RSY. *SAMK* cDNA a gDNA byla připravena jak s primery s *attB1* a *attB2* místy pro následnou BP rekombinaci do plasmidového vektoru pDONR221 a tvorbu „entry“ klonu (označení Bfr), tak i s *attB2* a *attB3* místy pro BP rekombinaci do plasmidového vektoru pDONR-P2R-P3 a tvorbu „entry“ klonu (označení Cfr). Na snímku 1% agarosového gelu po elektroforéze (90V x 30 min) byly detekovány pásy o specifické velikosti *SAMK* cDNA (1116 bp) a *SAMK* gDNA (3001 bp) (sloupce s tučným písmem); L – standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; Nc1-3 – negativní kontrola; X – prázdné místo; H₂O – PCR H₂O.

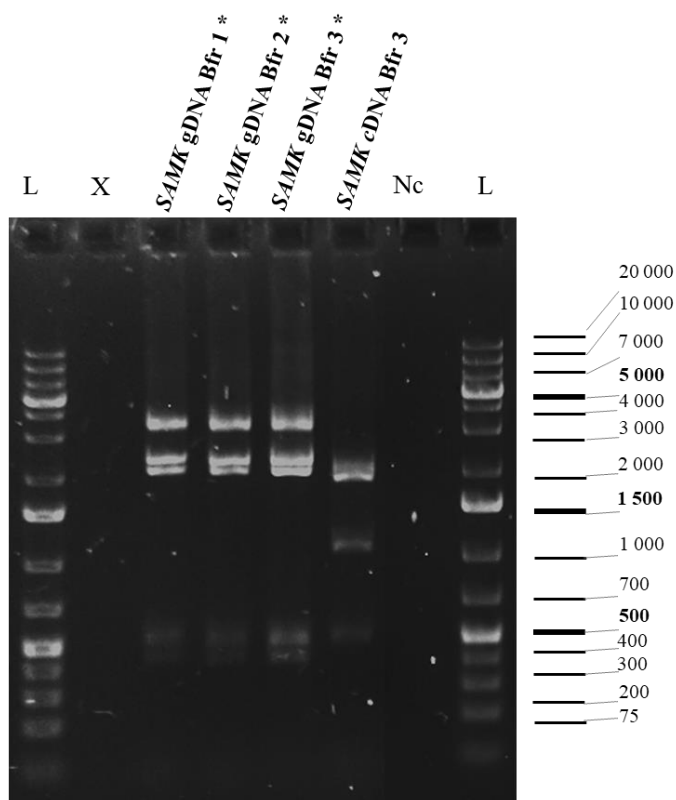
Teoretické predikované štěpení restričním enzymem BsmAI „entry“ klonů pDONR221 + *SAMK* cDNA a pDONR221 + *SAMK* gDNA bylo poté potvrzeno i experimentálně. Štěpením pDONR221 + *SAMK* cDNA vznikly fragmenty očekávané velikosti 2018 bp, 1113 bp a 533 bp (Obr. 8; vzorek *SAMK* cDNA Bfr3). U pDONR221 + *SAMK* gDNA vznikly fragmenty dle očekávání o velikostech 2424 bp, 2149 bp, 533 bp a 443 bp, ale také fragment o velikosti 4573 bp. Ten indikuje neúplné rozštěpení a je složen z fragmentů 2424 bp a 2149 bp (Obr. 8; vzorky *SAMK* gDNA Bfr1*, 2* a 3*). Takto ověřené „entry“ klony byly pro získání většího počtu jejich kopií transformovány do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 a selektovány na pevném LB médiu s obsahem antibiotik.



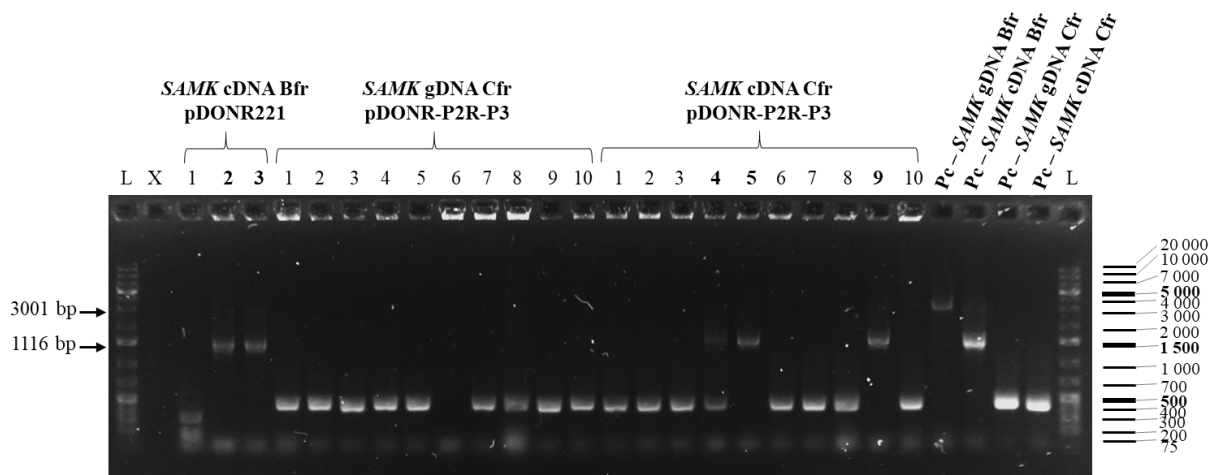
Obr. 7 Teoretické štěpení plasmidového vektoru pDONR221 + *SAMK* cDNA nebo *SAMK* gDNA restričním enzymem BsmAI. Při štěpení pDONR221 + *SAMK* cDNA (označení A) pomocí BsmAI by teoreticky vznikaly fragmenty o velikosti 2018 bp, 1113 bp a 533 bp. U plasmidového vektoru pDONR221 + *SAMK* gDNA (označení B) by vznikly fragmenty o velikosti 2424 bp, 2149 bp, 533 bp a 443 bp. Mapa plasmidového vektoru pDONR221 + *SAMK* cDNA se štěpnými místy (A); Mapa plasmidového vektoru pDONR221 + *SAMK* gDNA se štěpnými místy (B). Teoretické štěpení bylo vyhotoveno v programu ApE – A plasmid Editor v2.0.37 (M.W. Davis, USA), plasmidové vektory byly designovány v programu SnapGene® Viewer v4.2.11 (GSL Biotech LLC, USA).

Pro zjištění úspěšnosti transformace byly některé z kolonií *E. coli* TOP10 transformované plasmidovými vektory pDONR211 + *SAMK* cDNA a pDONR-P2R-P3 podrobeny PCR kolonií s primery specifickými vůči *SAMK*. Byly identifikovány 2 pozitivní kolonie *E. coli* TOP10 nesoucí plasmidový vektor pDONR221 + *SAMK* cDNA. Pásky o velikosti 1116 bp odpovídají úseku *SAMK* cDNA ve vzorcích 2 a 3 *SAMK* cDNA Bfr pDONR221 (Obr. 9).

Dále byly identifikovány 3 pozitivní kolonie nesoucí plasmidový vektor pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA. Pásky o velikosti 1116 bp odpovídají úseku *SAMK* cDNA ve vzorcích 4, 5 a 9 *SAMK* cDNA pDONR-P2R-P3 (Obr. 9). Jako pozitivní kontroly byly použity samotné izolované plasmidové vektory pDONR221 + *SAMK* gDNA (Obr. 9; Pc – *SAMK* gDNA Bfr) pás o specifické velikosti 3001 bp a pDONR + *SAMK* cDNA (Obr. 9; Pc – *SAMK* cDNA Bfr) pás o specifické velikosti 1116 bp. V případě použití kontrolních plasmidových vektorů pDONR-P2R-P3 + *SAMK* gDNA (Obr. 9; Pc – *SAMK* gDNA Cfr) a pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA (Obr. 9; Pc – *SAMK* cDNA Cfr) však nebyly detekovány pásky o specifické velikosti 3001 bp pro *SAMK* gDNA, respektive 1116 bp pro *SAMK* cDNA.



Obr. 8 Elektroforeogram po štěpení plasmidového vektoru pDONR221 pomocí restričního enzymu BsmAI. Do plasmidového vektoru pDONR221 byla BP reakcí vnesena *SAMK* cDNA a *SAMK* gDNA a byl vytvořen „entry“ klon B (označení Bfr). Tyto „entry“ klony byly následně štěpeny restričním enzymem BsmAI (37 °C, 1 h). Štěpením pDONR221 + *SAMK* gDNA (označení *SAMK* gDNA Bfr1,2,3 *) vznikly fragmenty o velikosti 2424 bp, 2149 bp, 533 bp, 443 bp. Tyto vzorky (označení *SAMK* gDNA Bfr1,2,3 *) obsahují fragment neplně rozštěpeného plasmidového vektoru o velikosti 4573 bp, spojeného z dvou fragmentů 2424 bp a 2149 bp. V případě pDONR221 + *SAMK* cDNA (označení *SAMK* cDNA Bfr 3) byl „entry“ klon rozštěpen dle očekávání. Vznikly fragmenty o velikosti 2018 bp, 1113 bp a 533 bp. Na snímku 1% agarosového gelu po elektroforéze (90V x 50 min) byly detekovány pásky o predikované velikosti. L – standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; Nc – negativní kontrola (PCR H₂O); X – prázdné místo; * - neplně rozštěpené vzorky.

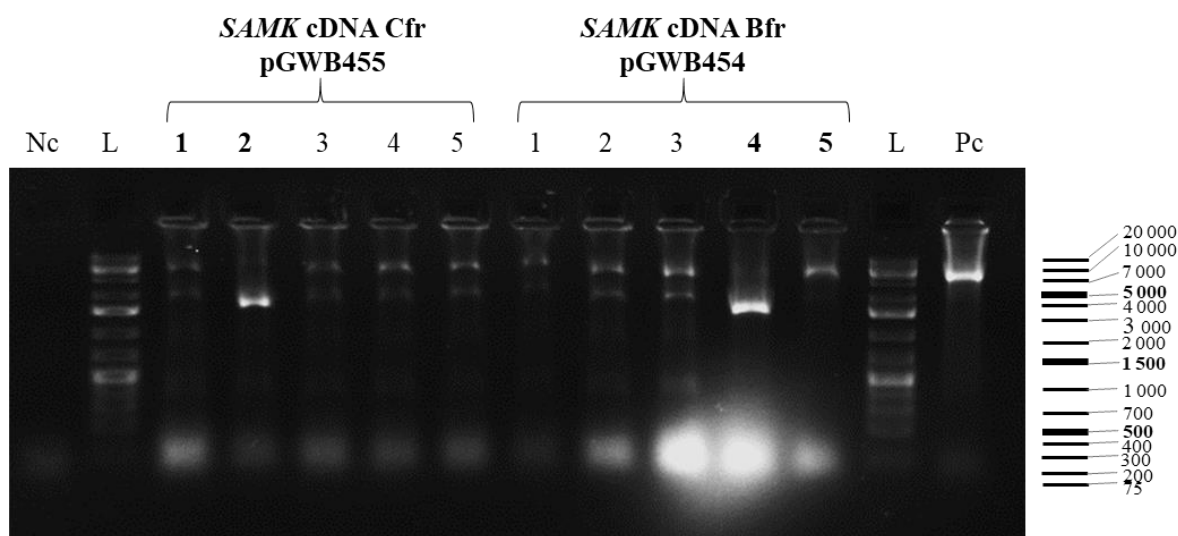


Obr. 9 Elektroforeogram po PCR vyselektovaných kolonií *Escherichia coli* transformovaných plasmidovými vektory pDONR221 *SAMK* cDNA; pDONR-P2R-P3 + *SAMK* gDNA a pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA za použití na M13 místa specifických primerů. Po PCR amplifikaci byly detekovány pásy specifické velikosti (1116 bp) ve 2 koloniích *E. coli* transformovanými plasmidovým vektorem pDONR221 + *SAMK* cDNA (vzorek 2 a 3 tučně); žádné pásy o velikosti (3001 bp) v koloniích *E. coli* transformovaných plasmidovým vektorem pDONR-P2R-P3 + *SAMK* gDNA; pásy specifické velikosti (1116 bp) ve 3 koloniích *E. coli* transformovaných plasmidovým vektorem pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA (vzorek 4, 5 a 9 tučně). Na snímku 1% agarosového gelu po elektroforéze (90V x 30 min) byly detekovány specifické pásy kolonií obsahujících daný plasmidový vektor. L – standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; X – prázdné místo; Pc – *SAMK* gDNA Bfr (izolovaný plasmidový vektor pDONR221 + *SAMK* gDNA); Pc – *SAMK* cDNA Bfr (izolovaný plasmidový vektor pDONR221 + *SAMK* cDNA); Pc – *SAMK* gDNA Cfr (izolovaný plasmidový vektor pDONR-P2R-P3 + *SAMK* gDNA) - nevyšla; Pc – *SAMK* cDNA Cfr (izolovaný plasmidový vektor pDONR-P2R-P3 + *SAMK* cDNA) – nevyšla.

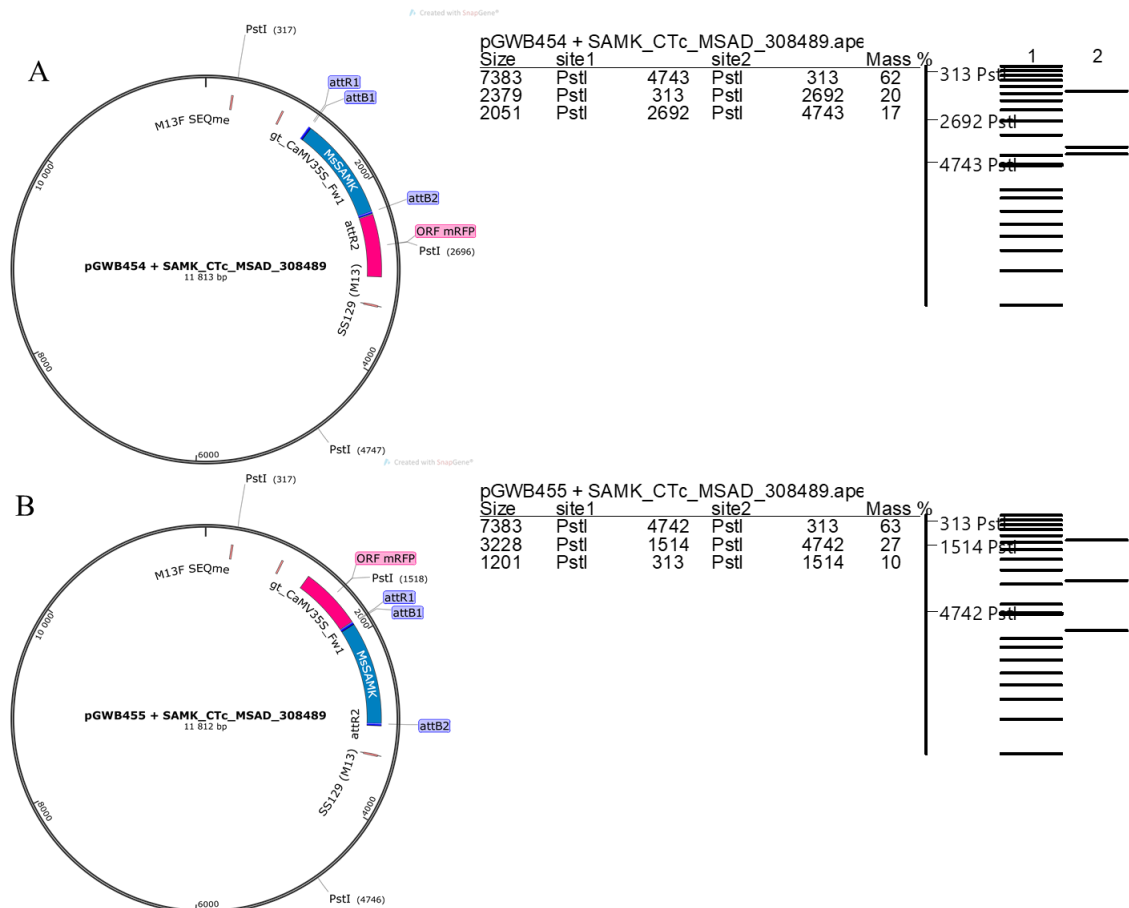
Ověřené pozitivní kolonie *E. coli* TOP10 nesoucí požadované „entry“ klony byly očkované do tekutého LB média pro namnožení buněk obsahujících „entry“ klony. Následně byly z bakterií izolovány a přečištěny pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit nebo Miniprep P1P2P3. Takto připravené „entry“ klony byly použity ve stanovené koncentraci do LR rekombinační reakce. Část nesla *SAMK* cDNA mezi *attL1* a *attL2* (Bfr) a část mezi *attR2* a *attL3* místy (Cfr). Ty pak byly rekombinovány do plasmidových vektorů pGWB454, respektive pGWB455 za vytvoření expresních klonů. Expresní klon pGWB454 má *SAMK* cDNA C-terminálně fúzovanou s *mRFP* sekvencí a pGWB455 N-terminálně fúzovanou *SAMK* cDNA s *mRFP* sekvencí. Po proběhnutí LR rekombinační reakce byly expresní klony pGWB454 + *SAMK* cDNA a pGWB455 + *SAMK* cDNA transformovány do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 za pomoci elektrošoku.

Následně byly transformované bakterie kultivované na tuhém LB médiu s přidavkem selekčních antibiotik a pozitivní kolonie testovány na přítomnost expresních klonu pomocí PCR kolonií. Za pomoci PCR se specifickými primery CaMV35S a SS129 byly detekovány pozitivní kolonie. Velikost specifických páسů *SAMK* cDNA + *mRFP* je přibližně 1880 bp. Těmto velikostem odpovídá vzorek 2 *SAMK* cDNA Cfr pGWB455 a vzorek 4 *SAMK* cDNA Bfr pBWB454 (Obr. 10). Společně s těmito pozitivními koloniemi byly použity i kolonie vzorek 1 *SAMK* cDNA Cfr pGWB455 a kolonie vzorek 5 *SAMK* cDNA Bfr pGWB454 (Obr. 10). Jako pozitivní kontrola funkčnosti primerů byl použit samotný izolovaný plasmid pGWB454 + *SAMK* gDNA. Vznikl tak pás o specifické velikosti odpovídající *SAMK* gDNA + *mRFP*.

Ověřené pozitivní kolonie *E. coli* byly očkovány do tekutého LB média pro namnožení buněk obsahujících plasmidové vektory. Následně byly plasmidy z bakterií izolovány a přečištěny pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit nebo Miniprep P1P2P3 a podrobeny restričnímu štěpení s restriční endonukleasou PstI.



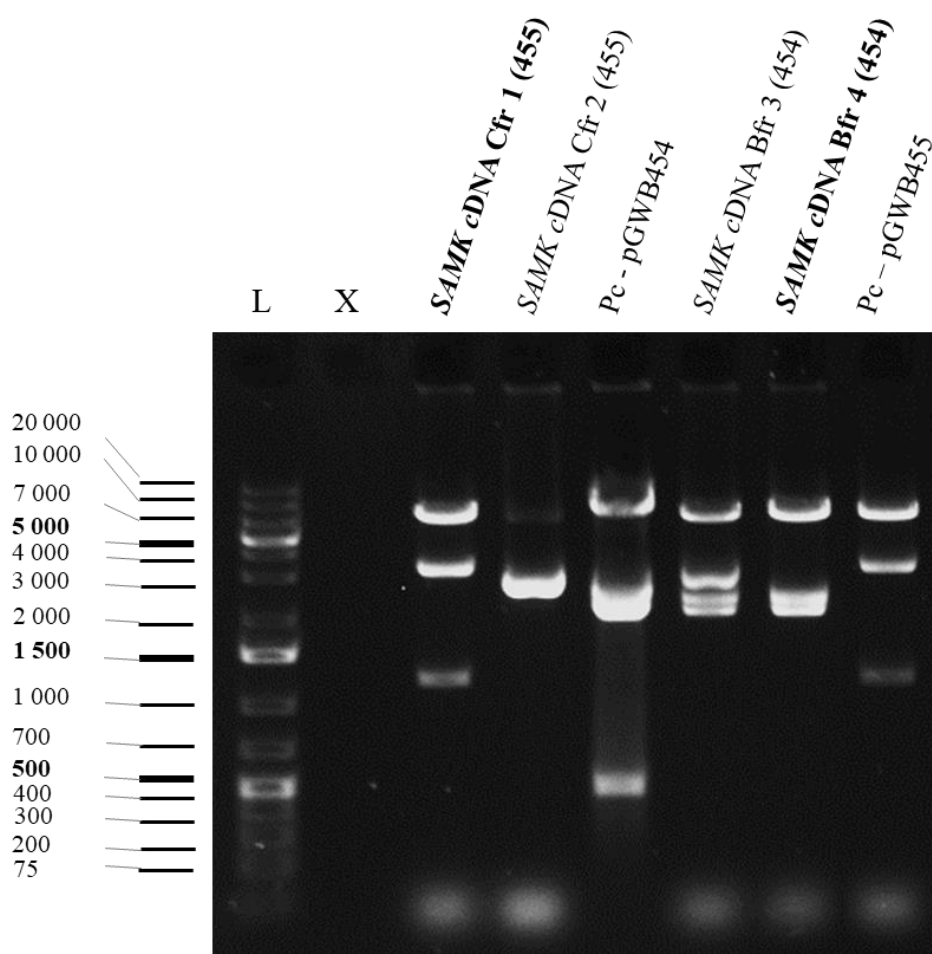
Obr. 10 Elektroforeogram po PCR vyselektovaných kolonií *Escherichia coli* transformovaných vektory pGWB455 + *SAMK* cDNA (Cfr) a pGWB454 + *SAMK* cDNA (Bfr) po LR reakci. PCR amplifikace se specifickými primery CaMV35S/SS129. Na 1% agarosovém gelu po elektroforéze (90V x 30 min) byly detekovány pásy o odpovídající velikosti (1880 bp) v případě vzorku pGWB455 + *SAMK* cDNA Cfr (vzorek č. 2) a pGWB454 + *SAMK* cDNA Bfr (vzorek č. 4). Pro následnou transformaci do *A. tumefaciens* však byly použity i vzorky pGWB455 + *SAMK* cDNA Cfr (vzorek č. 1) a pGWB454 + *SAMK* cDNA Bfr (vzorek č. 5). L – standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; Pc – pozitivní kontrola (izolovaný plasmid pGWB454 + *SAMK* gDNA); Nc – negativní kontrola (PCR H₂O).



Obr. 11 Teoretické štěpení vektoru pGWB454 + *SAMK* cDNA a pGWB455 + *SAMK* cDNA restričním enzymem PstI. Teoretické štěpení plasmidového vektoru pGWB454 + *SAMK* cDNA (označení A) poskytuje specifické fragmenty o velikostech 7383 bp, 2379 bp a 2051 bp (vpravo A). Teoretické štěpení plasmidového vektoru pGWB455 + *SAMK* cDNA (označení B) poskytuje specifické fragmenty o velikostech 7383 bp, 3228 bp a 1201 bp (vpravo B). Mapa plasmidového vektoru pGWB454 + *SAMK* cDNA (A); mapa plasmidového vektoru pGWB455 + *SAMK* cDNA (B). Teoretické štěpení bylo vyhotoveno v programu ApE – A plasmid Editor v2.0.37 (M.W. Davis, USA), plasmidové vektory byly designovány v programu SnapGene® Viewer v4.2.11 (GSL Biotech LLC, USA).

První byla provedena teoretická predikce štěpení PstI restriční endonukleasou v programu A-plasmid Editor v2.0.37 (M.W. Davis, 2003-2009). Při štěpení plasmidového vektoru pGWB454 + *SAMK* cDNA (Obr. 11; A) predikoval program vznik fragmentů o velikostech 7383 bp, 2379 bp a 2051 bp (Obr. 11; A-vpravo). Při štěpení pGWB455 + *SAMK* cDNA (Obr. 11; B) by poté fragmenty měly velikosti 7383 bp, 3228 bp a 1201 bp. Schémata plasmidových vektorů (Obr. 11) byla designována v programu SnapGene® Viewer v4.2.11 (GSL Biotech LLC, USA).

Po teoretické predikci bylo štěpení plasmidových vektorů ověřeno i experimentálně. V případě štěpení pGWB455 + *SAMK* cDNA byly detekovány fragmenty o velikostech přibližně 7383 bp, 3228 bp a 1201 bp ve vzorku *SAMK* cDNA Cfr 1 (455) (Obr. 12; tučně). Při štěpení pGWB454 + *SAMK* cDNA vznikaly fragmenty o velikostech přibližně 7383 bp, 2379 bp a 2051 bp ve vzorku *SAMK* cDNA Bfr 4 (454) (Obr. 12; tučně).

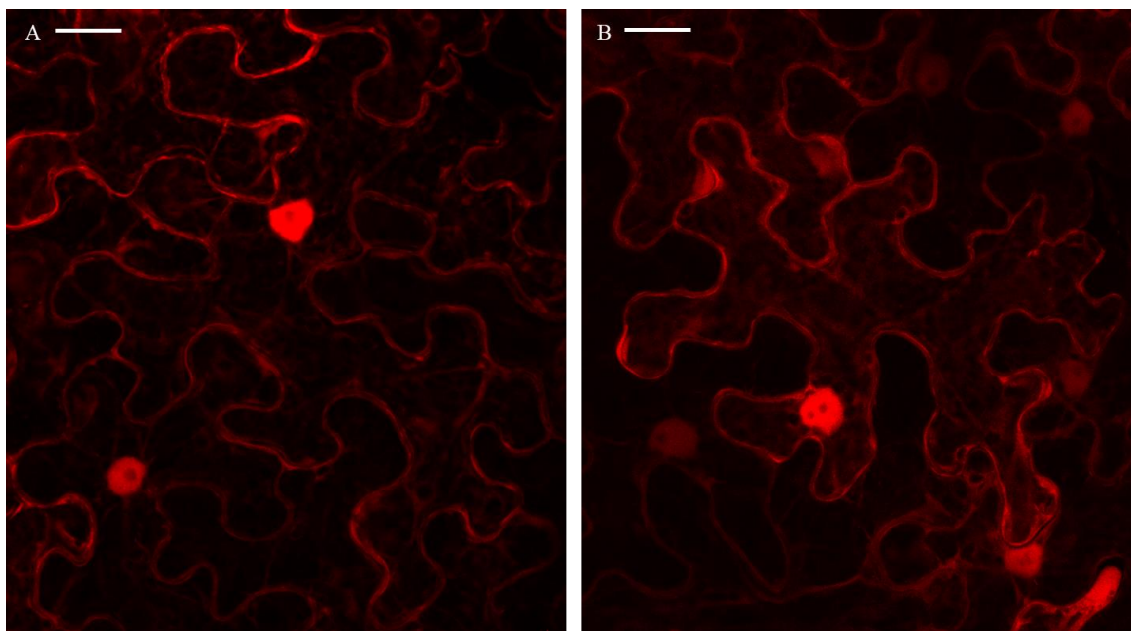


Obr. 12 Elektroforeogram po štěpení izolovaných plasmidových vektorů pGWB454 + *SAMK* cDNA a pGWB455 + *SAMK* cDNA restričním enzymem *Pst*I. Tyto expresní vektory byly štěpeny restričním enzymem *Pst*I (37 °C, 1 hod). V případě pGWB455 + *SAMK* cDNA byly po štěpení detekovány fragmenty o specifické velikosti 7383 bp, 3228 bp a 1201 bp u vzorku s označením *SAMK* cDNA Cfr 1 (455); v případě pGWB454 + *SAMK* cDNA byly po štěpení detekovány fragmenty o specifické velikosti 7383 bp, 2379 bp a 2051 bp u vzorku s označením *SAMK* cDNA Bfr 4 (454). Na 1% agarosovém gelu po elektroforéze (90V x 50 min) došlo při použití Pc – pGWB454 k odštěpení nespecifického fragmentu o velikosti +/- 500 bp. L – standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; X - prázdné místo; Pc – pozitivní kontrola (pGWB454, pGWB455).

4.1.2 Detekce buněčné lokalizace SAMK v listech *Nicotiana benthamiana*

K transientní transformaci byly použity bakterie *A. tumefaciens* nesoucí plasmidový expresní vektor pGWB454 + *SAMK* cDNA a pGWB455 + *SAMK* cDNA. Do buněk listů byl přenesen konstrukt *35S::SAMK:mRFP*, respektive *35S::mRFP:SAMK* pomocí *A. tumefaciens*. Čtvrtý den od transformace byla pozorovatelná lokalizace vzniklých proteinů SAMK-mRFP a mRFP-SAMK na buněčné úrovni za použití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM).

Na obrázku 13, představující projekci maximální intenzity poskládanou z více rovin optických řezů, je patrné, že se fúzní proteiny SAMK-mRFP (Obr. 13; A) a mRFP-SAMK (Obr. 13; B) nacházejí především v okolí cytoplasmatické membrány a jádře, nikoli v jadérku.

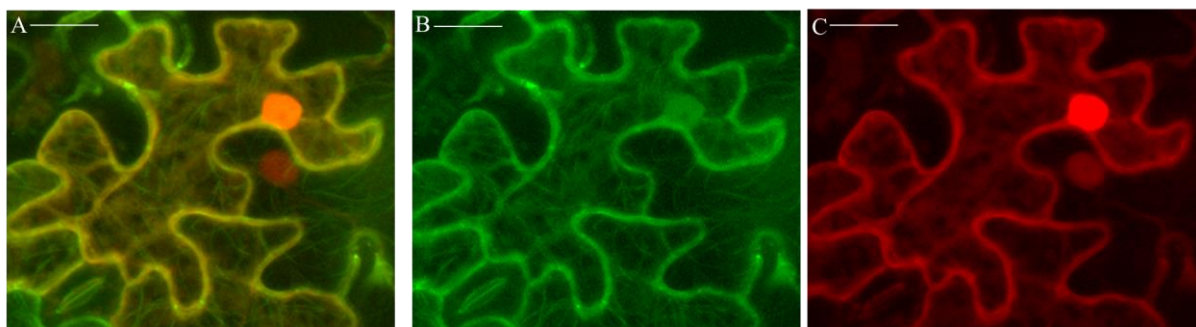


Obr. 13 Snímek z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu buněk listu *Nicotiana benthamiana* transientně transformovaných *A. tumefaciens* nesoucí vektory A- *35S::SAMK:mRFP* (C- terminální fúze) a B- *35S::mRFP:SAMK* (N- terminální fúze) 4. den po transformaci. Fúzní proteiny SAMK-mRFP a mRFP-SAMK jsou lokalizované u cytoplasmatické membrány a jádře. Snímek A, B (kanál mRFP). (Projekce maximální intenzity; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27; měřítko vlevo nahoře 20 μ m).

Zaznamenaný signál byl 4. den po transientní transformaci dobře pozorovatelný. To se potvrdilo i v následujících experimentech. Úroveň signálu odpovídá relativně tvorbě proteinů a potvrzuje správnost klonování konstruktů *35S::SAMK:mRFP* (pGWB454 + *SAMK* cDNA) a *35S::mRFP:SAMK* (pGWB455 + *SAMK* cDNA), jelikož dochází k tvorbě SAMK-mRFP a mRFP-SAMK v buňkách listů *N. benthamiana* po transientní transformaci.

V dalším experimentu byla provedena transientní ko-transformace *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* nesoucí námi klonované konstrukty *35S::SAMK:mRFP* nebo *35S::mRFP:SAMK* společně s *35S::eGFP:TUB6*, který umožňuje mikroskopické pozorování mikrotubulů, konkrétně části mikrotubulu tubulin- β -6 řetězce.

Buňky *N. benthamiana* byly pozorovány v konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu 4. den po transformaci. Protein SAMK-mRFP, pozorovaný v mRFP kanálu, je lokalizován v jádře a v okolí cytoplazmatické membrány (Obr. 14; C). Protein eGFP-TUB6, pozorovaný v eGFP kanálu, zvýrazňuje cytoskelet mikrotubulů v kortikální části buněk (Obr. 14; B). Z překryvu kanálu pro mRFP a eGFP je patrné, že signály pocházející z SAMK-mRFP a eGFP-TUB6 částečně splývají v okolí cytoplazmatické membrány a částečně v okolí kortikálních mikrotubulů (Obr. 14; A).



Obr. 14 Snímek z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu buněk listu *Nicotiana benthamiana* transientně transformovaných *A. tumefaciens* nesoucí vektory *35S::eGFP:TUB6* a *35S::SAMK:mRFP* 4. den po transformaci. Ze snímků B a C je patrné, že dochází k tvorbě GFP-TUB6 a SAMK-mRFP v buňkách listu *N. benthamiana*. Snímek A (průnik kanálu B a C); B (eGFP kanál); C (mRFP kanál). (Snímek jedné optické roviny; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27; měřítko vlevo nahoře 20 μ m).

V buňkách *N. benthamiana* transformovaných *35S::eGFP:TUB6* docházelo pravděpodobně také k tvorbě volného eGFP, který je lokalizován v jádře (Obr. 14; B). Je možné, že fúzní protein tvořený přepisem z konstruktu *35S::eGFP:TUB6* v buňkách listů *N. benthamiana* může být částečně rozštěpený na eGFP a TUB6.

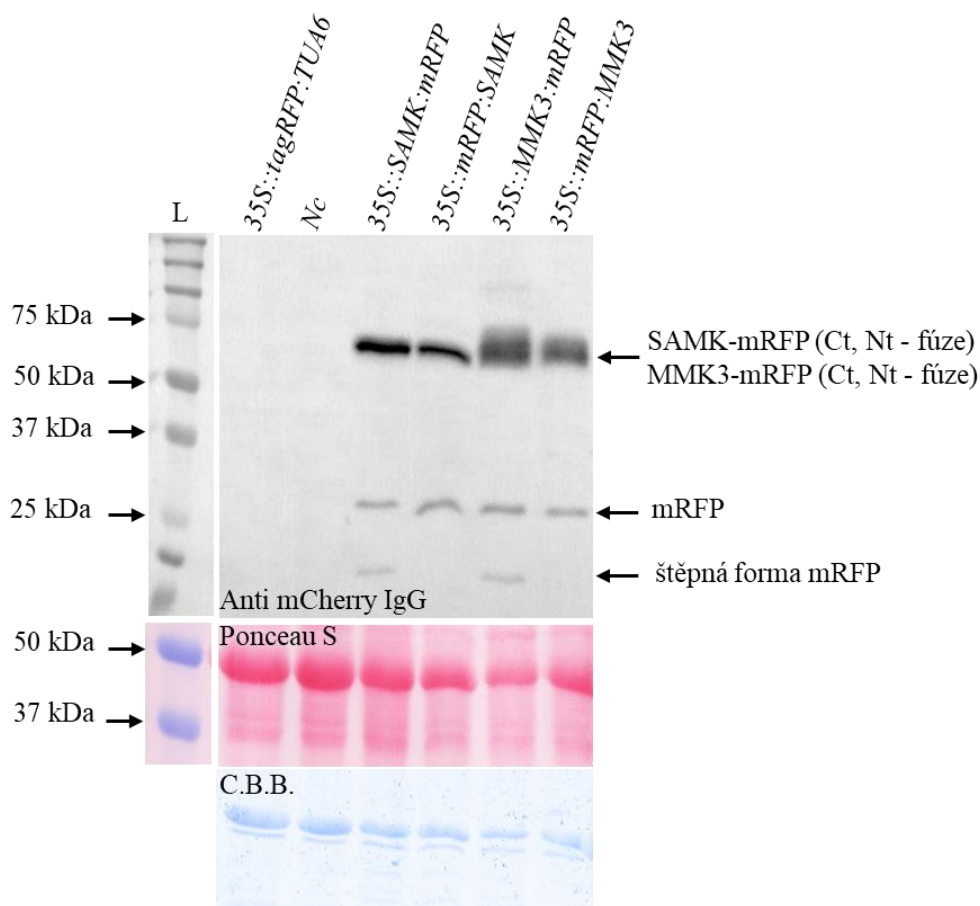
4.1.3 Imunodetekce fúzního proteinu SAMK-mRFP/mRFP-SAMK

Z listů *N. benthamiana* byly 4. den po jednoduché transformaci *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty *35S::SAMK:mRFP*, *35S::mRFP:SAMK*, *35S::MMK3:mRFP* nebo *35S::mRFP:MMK3* (*A. tumefaciens* s konstrukty pro MMK3 byly poskytnuty školitelem) odebrány vzorky pro extrakci proteinů. Byla provedena imunodetekce za použití metody Western blot pro zjištění, zda byly konstrukty správně naklonované a tvoří se fúzní proteiny.

Po provedení SDS-PAGE a transferu proteinů z gelu na membránu byly detekovány, za pomoci myši monoklonální protilátky vůči fluorescenčnímu proteinu mCherry, fúzní formy proteinů. Tato protilátka se díky podobnosti proteinů mCherry a mRFP váže na oba zmíněné. Po vyvolání signálu na PVDF membráně byly viditelné pásy odpovídající specifické relativní molekulové hmotnosti ($M_w = 67$ kDa) fúzním proteinům SAMK-mRFP ve vzorku s označením *35S::SAMK:mRFP* a mRFP-SAMK ve vzorku *35S::mRFP:SAMK* (Obr. 15). Relativní molekulová hmotnost samotného proteinu SAMK je přibližně $M_w = 43$ kDa a mRFP $M_w = 24$ kDa. Stejně tak byly viditelné pásy o stejné relativní molekulové hmotnosti odpovídající MMK3-mRFP ve vzorku s označením *35S::MMK3:mRFP* a mRFP-MMK3 ve vzorku *35S::mRFP:MMK3* (Obr. 15).

U všech čtyř výše zmíněných vzorků fúzních proteinů se v odpovídajících sloupcích nachází i samotný mRFP o $M_w = 24$ kDa (Obr. 15; vzorky s označením *35S::SAMK:mRFP*, *35S::mRFP:SAMK*, *35S::MMK3:mRFP*, *35S::mRFP:MMK3*). Ten se nejspíše v buňkách listů *N. benthamiana* tvořil tak, že se po dokončení tvorby fúzního proteinu odštěpil a vznikl tak samotný protein SAMK/MMK3 a mRFP. U dvou vzorků *35S::SAMK:mRFP* a *35S::MMK3:mRFP* (Obr. 15) docházelo navíc ke štěpení proteinu mRFP na menší části o přibližné relativní molekulové hmotnosti $M_w = 10$ kDa.

Dále bylo zjištěno, že protilátka vůči mCherry se neváže na fúzní protein tagRFP-TUA6 tvořeného v *A. thaliana* stabilně transformované *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt $35S::tagRFP:TUA6$. Vhodné pozitivní kontroly by byly proteiny mRFP nebo mCherry. Imunodetekcí byla prokázána správnost klonování konstruktů pro tvorbu fúzních proteinů SAMK-mRFP a mRFP-SAMK. Jako negativní kontrola byl použit proteinový extrakt z listů *N. benthamiana* inokulovaných čistým inokulačním médiem.



Obr. 15 Imunodetekce SAMK-mRFP a mRFP-SAMK v tranzientně transformovaných listech *Nicotiana benthamiana*. Na PVDF membráně byly pomocí myší monoklonální Anti-mCherry protilátky detekovány proteinové pásy odpovídající specifické $M_w = 67$ kDa fúzního proteinu SAMK-mRFP (označení $35S::SAMK:mRFP$) a mRFP-SAMK (označení $35S::mRFP:SAMK$). Stejně tak byly detekovány proteinové pásy o $M_w = 67$ kDa odpovídající fúznímu proteinu MMK3-mRFP (označení $35S::MMK3:mRFP$) a mRFP-MMK3 (označení $35S::mRFP:MMK3$). Touto protilátkou byl detekován taktéž samotný mRFP protein ($M_w = 24$ kDa). Samotné formy SAMK a MMK3 ($M_w = 43$ kDa) detekovány dle očekávání nebyly. V případě C-terminální fúze (označení $35S::SAMK:mRFP$ a $35S::MMK3:mRFP$) docházelo k částečnému rozštěpení mRFP proteinu. L – standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards; Nc – negativní kontrola (*N. benthamiana* + čisté inokulační médium); $35S::tagRFP:TUA6$ – vzorek *A. thaliana* transformované tímto konstruktem (nerozpoznána Anti-mCherry protilátkou); Ponceau S – kontrola nanášky proteinů na PVDF membráně po transferu; C.B.B. – kontrola nanášky proteinů barvením Coomassie Brilliant Blue po SDS-PAGE.

4.1.4 Nadprodukce SIMKK a SAMK v *Nicotiana benthamiana*

Pro další experiment transienční transformace listů *N. benthamiana* více konstrukty byly vybrány klony *A. tumefaciens* nesoucí *35S::SIMKK:eGFP*, *35S::SAMK:mRFP*, *35S::mRFP:SAMK*, *35S::MMK3:mRFP* a *35S::mRFP:MMK3*. Listy *N. benthamiana* byly transformovány buď kombinací konstruktů *SIMKK* společně s *SAMK* nebo *MMK3*, a nebo konstrukty samostatně. *SIMKK* je nadřazenou MAP2K pro *SAMK* i *MMK3*. Rostliny byly po transformaci pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu a byla pořizována fotodokumentace.

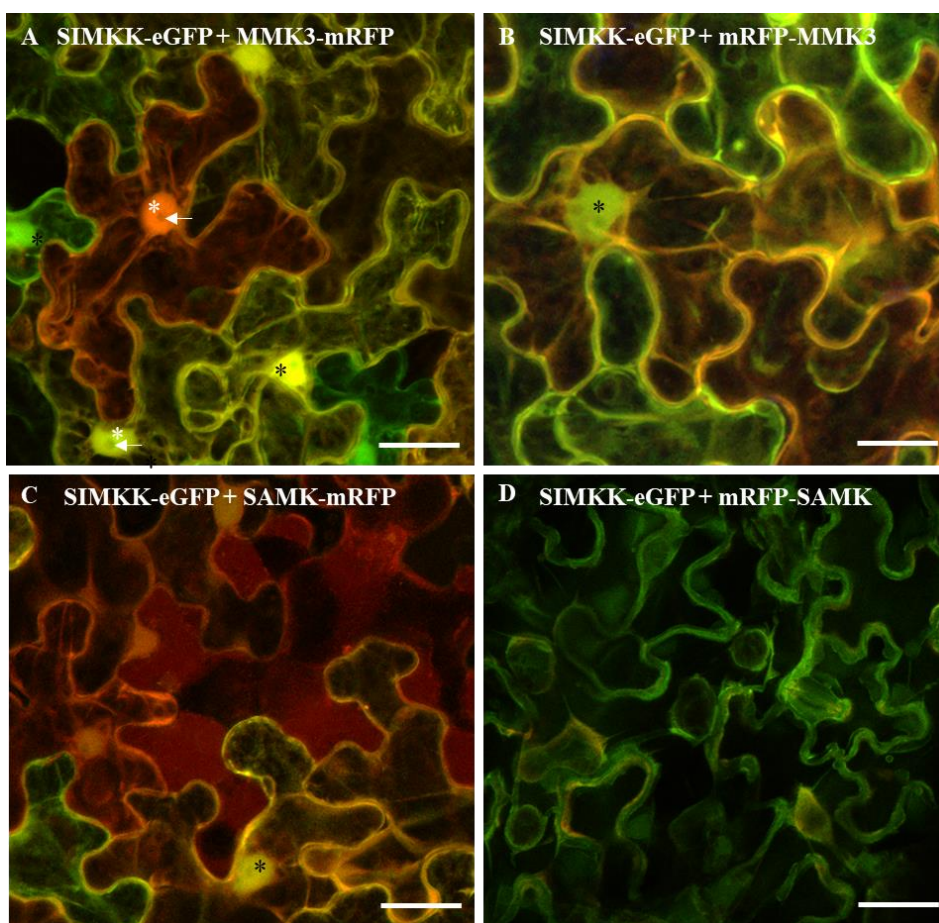
Z obrázku 16 je patrné, že v případě společné produkce proteinů *SIMKK-eGFP* a *SAMK-mRFP* nebo *SIMKK-eGFP* a *mRFP-SAMK* (Obr. 16; snímky C a D) docházelo u některých buněk ke změně morfologie rezultující v dalších dnech k programované buněčné smrti. To je viditelné např. u jedné z buněk (Obr. 16; C). *SAMK-mRFP* je lokalizovaná především v cytoplasmě, nikoliv však v jádře. U buněk (Obr 16; D) je pravděpodobně zelený signál způsobený autofluorescencí. Společná produkce *SIMKK-eGFP* a *MMK3-mRFP* nebo *SIMKK-eGFP* a *mRFP-MMK3* však vedla k normální morfologii buněk a buňky byly živé (Obr. 16; snímky A a B).

Buňky transienčně transformovaných listů *N. benthamiana* byly pozorovány pro zjištění buněčné lokalizace a abundance fúzních proteinů, morfologii a vitality za pomoci konfokálního laserového skenovacího mikroskopu 4 dny po transformaci. V případě transformace jednotlivými konstrukty zvláště nedocházelo ke změnám v morfologii, buňky byly živé a tvořily fúzní proteiny s očekávanou lokalizací (Obr. 17).

Je patrné, že po nadprodukcí proteinu *SIMKK-eGFP* společně s *SAMK-mRFP* (Obr. 18; snímky C1*, C2*, C3*; červený rámeček) nebo *mRFP-SAMK* (Obr. 18; snímky D1*, D2*, D3*; červený rámeček) dochází po 6 dnech od transienční transformace listů *N. benthamiana* k programované buněčné smrti buněk všech transformovaných listů.

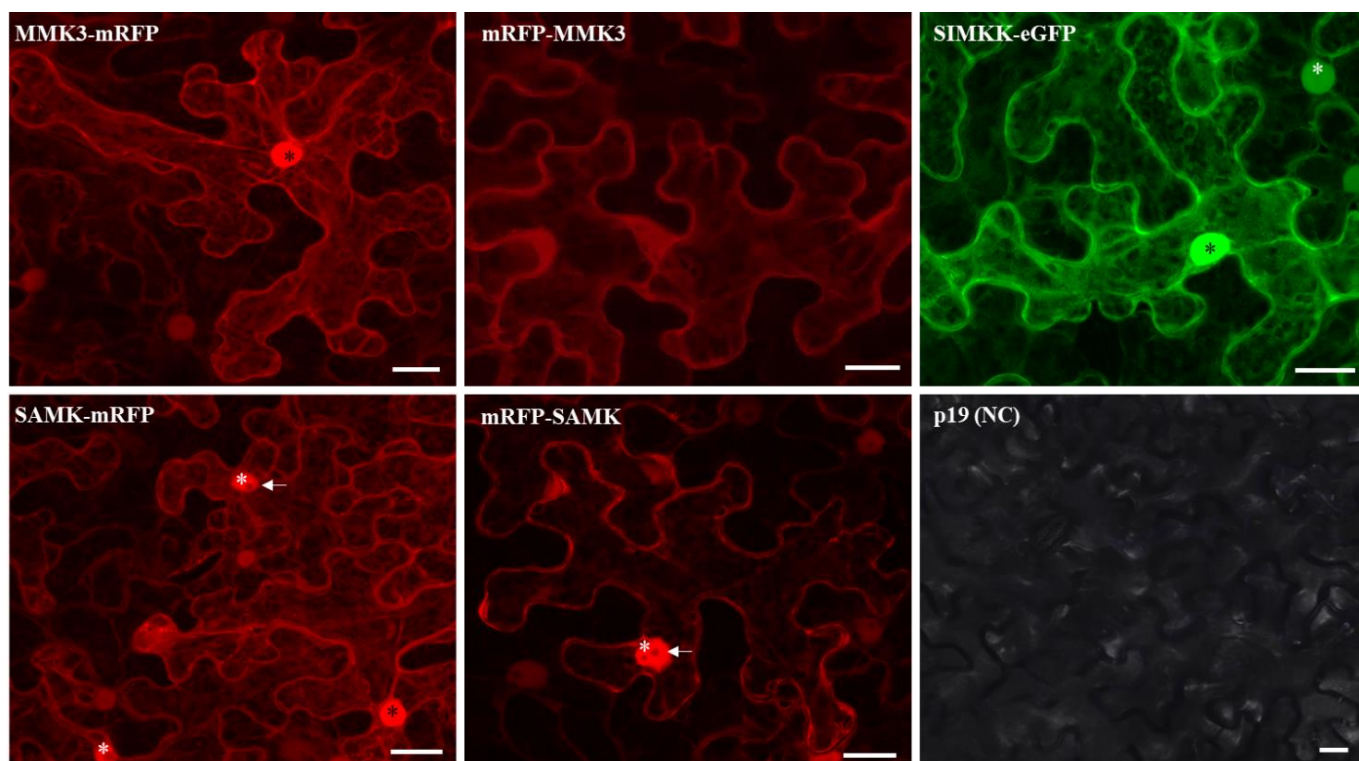
Při nadprodukcí *SIMKK-eGFP* s *MMK3-mRFP* (Obr. 18; snímky A1, A2, A3) nebo *mRFP-MMK3* (Obr. 18; snímky B1*, B2, B3) dochází k programované buněčné smrti jen zcela výjimečně (Obr. 18; snímek B1*). Stejně tak nadprodukce samotné *SIMKK-eGFP* (Obr. 18; snímky I1*, I2, I3) dochází k programované buněčné smrti jen výjimečně (Obr. 18; snímek I1*).

Nadprodukce samotných fúzních proteinů MMK3-mRFP (Obr. 18; snímky E1, E2, E3), mRFP-MMK3 (Obr. 18; snímky F1, F2, F3), SAMK-mRFP (Obr. 18; snímky G1, G2, G3) a mRFP-SAMK (Obr. 18; snímky H1, H2, H3) vede stejně tak jako v případě negativní kontroly (Obr. 18; snímky J1, J2, J3) k typickému projevu chlorózy po transformaci listů *N. benthamiana* za pomoci *A. tumefaciens*.



Obr. 16 Snímky buněk listů *N. benthamiana* z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu 4 dny po transienční transformaci. Transienční transformace listů proběhla za pomoci *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty *35S::SIMKK:eGFP* + *35S::SAMK:mRFP*, *35S::mRFP:SAMK*, *35S::MMK3:mRFP* a *35S::mRFP:MMK3*. Je patrné, že došlo k úspěšné transformaci oběma konstrukty zároveň a tvorbě obou fúzních proteinů SIMKK-eGFP a SAMK-mRFP, mRFP-SAMK, MMK3-mRFP a mRFP-MMK3. Ve snímcích A a B jsou buňky listů živé a mají typický tvar, zatímco ve snímcích C a D začínají jejich morfologické změny rezultující v dalších dnech v programovanou buněčnou smrt. Na obrázku C je patrná změna lokalizace SAMK-mRFP z jádra do cytoplasmy značící programovanou buněčnou smrt * - jádra, → - jádřka. (Snímek jedné optické roviny; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27; měřítko vpravo dole 20 μ m).

Společná nadprodukce SIMKK-eGFP a SAMK-mRFP nebo mRFP-SAMK řízená silným konstitutivním 35S CaMV promotorem z viru kvěťákové mozaiky spouští v ortologním systému *N. benthamiana* jistý typ programované buněčné smrti. Není známo, zda se jedná o apoptózu nebo nekrózu. Programovaná buněčná smrt však nebyla v takové míře pozorována u buněk listů *N. benthamiana* transformovaných společně SIMKK-eGFP a MMK3-mRFP nebo mRFP-MMK3, nebo samotné SIMKK-eGFP. Stejně tak při nadprodukci samotných MAP kinas fúzovaných s fluorescenčním proteinem mRFP. V těchto případech byla programovaná buněčná smrt pozorována až v pozdějším čase.



Obr. 17 Snímky buněk listů *N. benthamiana* z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu 4 dny po transientní transformaci. Transientní transformace listů proběhla za pomoci *A. tumefaciens* nesoucí jednotlivé konstrukty pro tvorbu fúzních proteinů $35S::MMK3:mRFP$, $35S::mRFP:MMK3$, $35S::SIMKK:eGFP$, $35S::SAMK:mRFP$, $35S::mRFP:SAMK$ a p19 sloužící jako negativní kontrola. Ze snímků je patrné, že došlo k úspěšné transformaci a tvorbě fúzních proteinů. Buňky listů *N. benthamiana* transformované jednotlivými konstrukty zvláště mají normální morfologii a jsou živé a nejvíce žádné známky programované buněčné smrti a to ani v případě konstruktů $35S::SAMK:mRFP$ a $35S::mRFP:SAMK$ (označení SAMK-mRFP, mRFP-SAMK). * - jádra, → - jádérka. (Snímek projekce maximální intenzity; mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 Zeiss; objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27; měřítko vpravo dole 20 μ m).



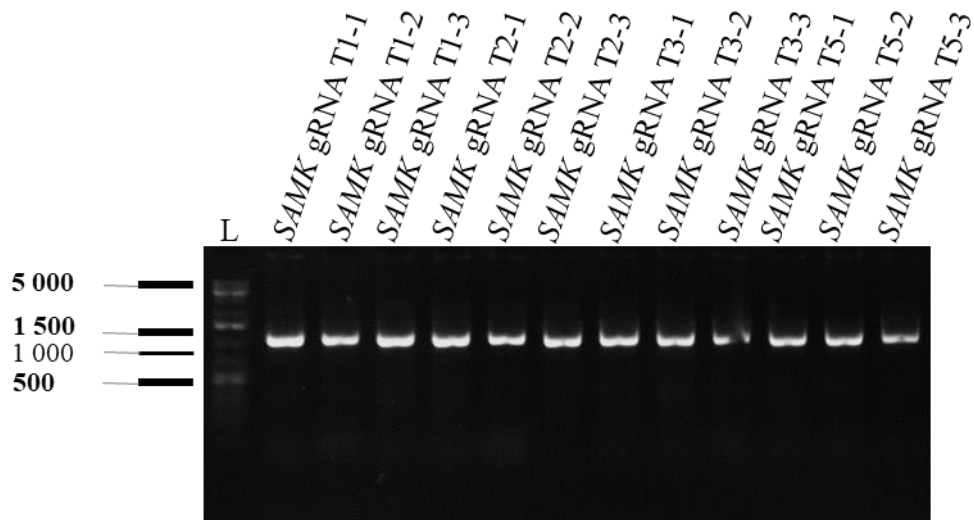
Obr. 18 Transientní transformace listů *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty $35S::SIMKK:eGFP + 35S::SAMK:mRFP / 35S::mRFP:SAMK$ nebo $35S::MMK3:mRFP / 35S::mRFP:MMK3$. Ze snímku je patrné, že dochází k programované buněčné smrti (označení *) po 6 dnech od transientní transformace listů *N. benthamiana* v případě transformace *A. tumefaciens* nesoucí konstrukty $35S::SIMKK:eGFP$ a $35S::SAMK:mRFP$ (označení červeně C1*-C3*) a také $35S::SIMKK:eGFP$ a $35S::mRFP:SAMK$ (označení červeně D1*-D3*). Výjimečně také došlo k programované buněčné smrti v případě transformace $35S::SIMKK:eGFP$ a $35S::mRFP:MMK3$ (označení B1*) a $35S::SIMKK:eGFP$ (označení H*), zbylé případy jsou chlorózy. Jako pomocný plasmid pro všechny kombinace byl použit p19. A – $35S::SIMKK:eGFP + 35S::MMK3:mRFP$; B – $35S::SIMKK:eGFP + 35S::mRFP:MMK3$; C – $35S::SIMKK:eGFP + 35S::SAMK:mRFP$; D – $35S::SIMKK:eGFP + 35S::mRFP:SAMK$; E – $35S::MMK3:mRFP$; F – $35S::mRFP:MMK3$; G – $35S::SAMK:mRFP$; H – $35S::mRFP:SAMK$; I – $35S::SIMKK:eGFP$; J – Negativní kontrola p19.

4.2 Příprava *SAMK* gRNA testovacích linií vojtěšky seté (*M. sativa*)

4.2.1 Klonování konstruktů *SAMK* gRNA

Pro účely vytvoření molekulárních konstruktů pro vyřazení genu *SAMK* byly vytvořeny čtyři varianty tzv. *SAMK* „guide“ RNA (gRNA) cílících na exon 1 *SAMK* mRNA pomocí metody Crispr/Cas9. Tyto konstrukty byly vytvořeny za pomoci Gateway klonovacího systému. Nejprve byly vloženy do štěpeného „entry“ klonu pEn-Chimera pomocí T4 DNA ligasy a následně do expresního klonu pDe-Cas9 pomocí LR reakce.

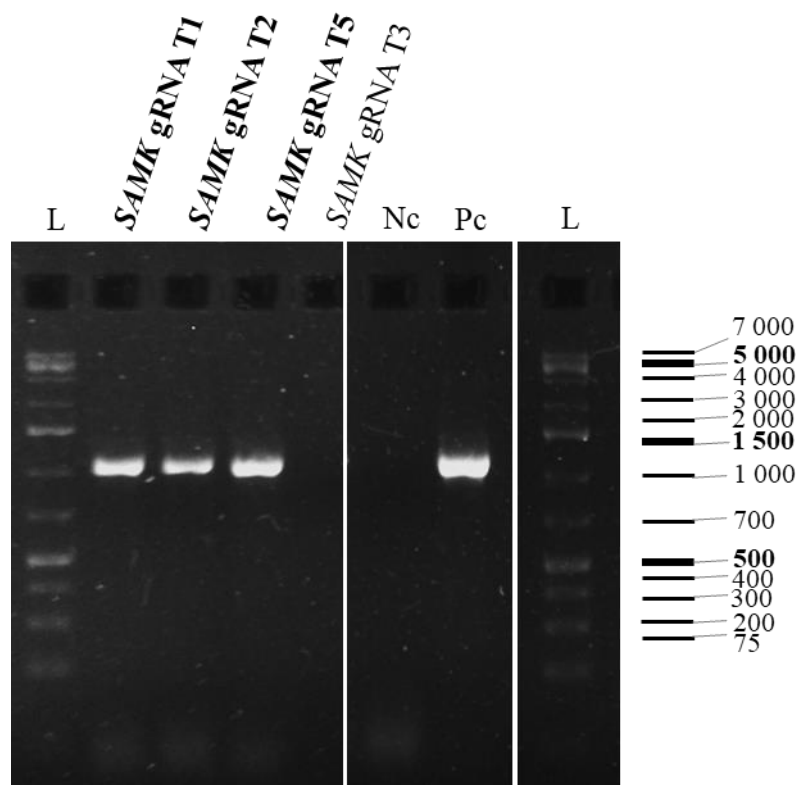
Po transformaci pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA do bakteriálních buněk *E. coli* TOP10 byly vyselektované kolonie podrobeny PCR se specifickými primery SS42/SS43. Po PCR amplifikaci měly vznikat pásy o velikosti přibližně 1100 bp. Z obrázku 19 je patrné, že všechny testované kolonie *E. coli* TOP10 transformované čtyřmi variantami pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA tj. *SAMK* gRNA T1 (1-3), T2 (1-3), T3 (1-3) a T5 (1-3) jsou pozitivní na přítomnost těchto plasmidových vektorů.



Obr. 19 Elektroforeogram po PCR vyselektovaných kolonií *Escherichia coli* transformovaných vektorem pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T1,2,3,5 po LR reakci. Na snímku 1% agarosového gelu po elektroforéze (90V x 30 min) jsou patrné pásy odpovídající velikosti (1100 bp) detekované SS42/SS43 primery náležející *SAMK* gRNA T1,2,3,5 v plasmidovém vektoru pDe-Cas9 vneseného úspěšně do *E. coli* TOP10. Všechny testované kolonie *E. coli* TOP10 tj. *SAMK* gRNA T1,2,3,5 (1-3) byly pozitivní na přítomnost *SAMK* gRNA. L - standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

V dalším kroku byly ověřené bakteriální kultury *E. coli* TOP10 nesoucí plasmidový vektor očkované do tekutého LB média, aby se jejich počet a zároveň celkový počet plasmidových vektorů zvýšil. Následně byly všechny čtyři varianty izolovány a přečištěny pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit nebo Miniprep P1P2P3 a transformovány do bakteriálních buněk *A. tumefaciens* GW3101. Poté byly selektovány pozitivní kolonie na tuhém LB médiu s obsahem selekčních antibiotik.

Pro ověření přítomnosti plasmidových vektorů pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA byla vyhotovena PCR vyselektovaných kolonií *A. tumefaciens* za pomoci SS42/SS43 primerů. Byla potvrzena přítomnost plasmidových vektorů u tří ze čtyř kolonií. Každá zodpovídala za jednu variantu *SAMK* gRNA. Pás o specifické velikosti 1100 bp byl pozorován u vzorků s označením *SAMK* gRNA T1, T2 a T5 označených tučně (Obr. 20).



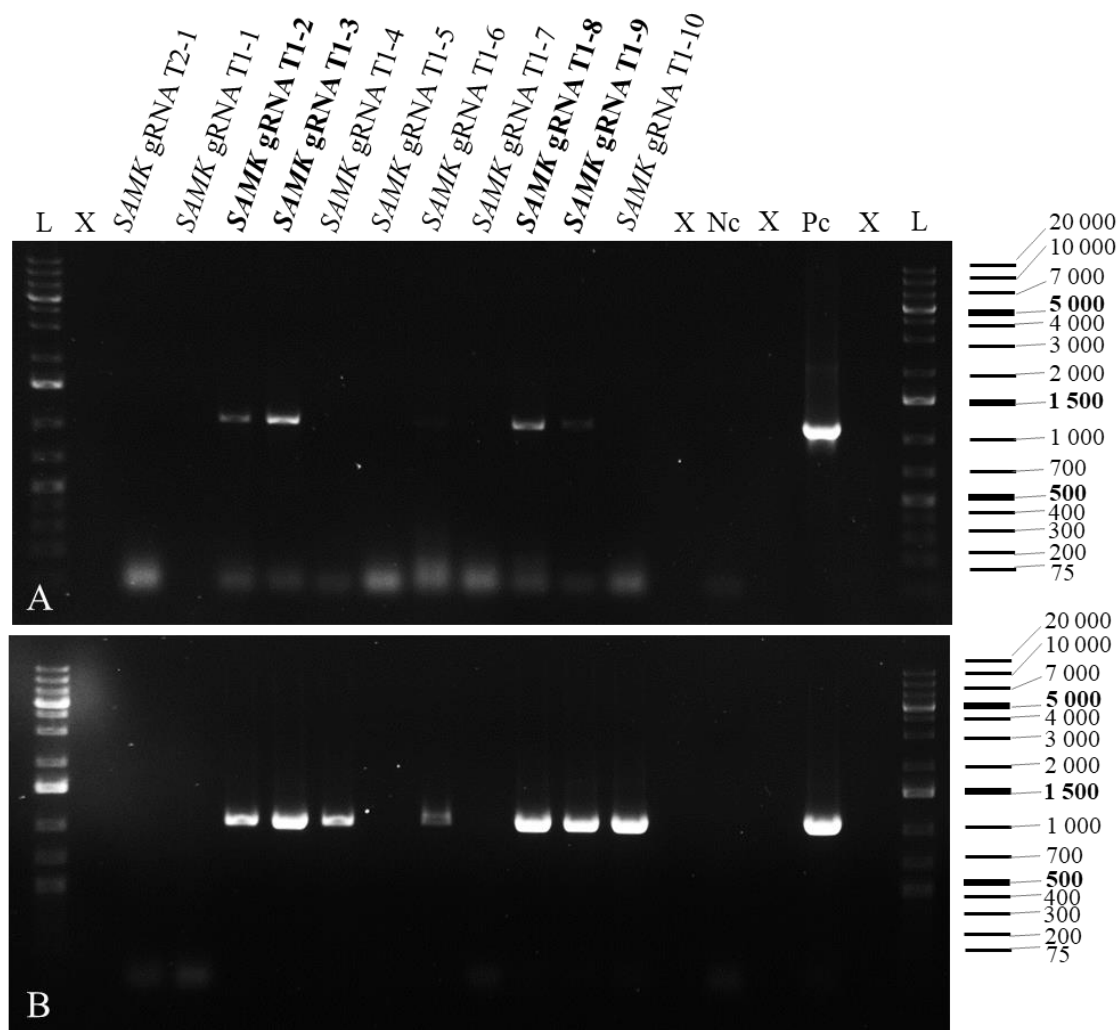
Obr. 20 Elektroforeogram po PCR vyselektovaných kolonií *Agrobacterium tumefaciens* transformovaných vektorem pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T1,2,3,5 po LR reakci. Ze snímku 1% agarosového gelu po elektroforéze (90V x 40 min) je patrné, že pásy o specifické velikosti (1100 bp) detekované PCR s SS42/SS43 primery indikující přítomnost pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA se vyskytují ve vzorcích *SAMK* gRNA T1,T2,T5 (označení tučně), L - standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; Pc – pozitivní kontrola (samotný izolovaný plasmid pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA); Nc – negativní kontrola (PCR H₂O).

Po ověření pozitivních *A. tumefaciens* nesoucích plasmidový vektor pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T1, T2 a T5 byly rostliny vojtěšky seté (*M. sativa*) RSY transformovány pomocí těchto *A. tumefaciens* a propagovány pomocí somatické embryogeneze do vzniku rostlin *M. sativa* linií *SAMK* gRNA T1, T2 a T5 vhodných pro ověření na přítomnost konstruktů pomocí genotypizace.

4.2.2 Genotypizace rostlin *Medicago sativa* *SAMK* gRNA

Pro genotypizaci rostlin propagovaných somatickou embryogenezí *M. sativa* transformovaných *A. tumefaciens* nesoucí plasmidové vektory pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T1, T2 a T5 byly použity specifické primery SS42/SS43 stejně tak jako pro PCR kolonií (Obr. 21, 22 A) a vznikaly pásy o velikosti přibližně 1100 bp (Obr. 21, 22 A). Pro kontrolu obsahu gDNA ve vzorcích izolovaných z rostlin byly použity primery specifické na intron 3 genu *MMK3* I3F/I3R. Vznikaly pásy o velikosti přibližně 1100 bp (Obr. 21, 22 B).

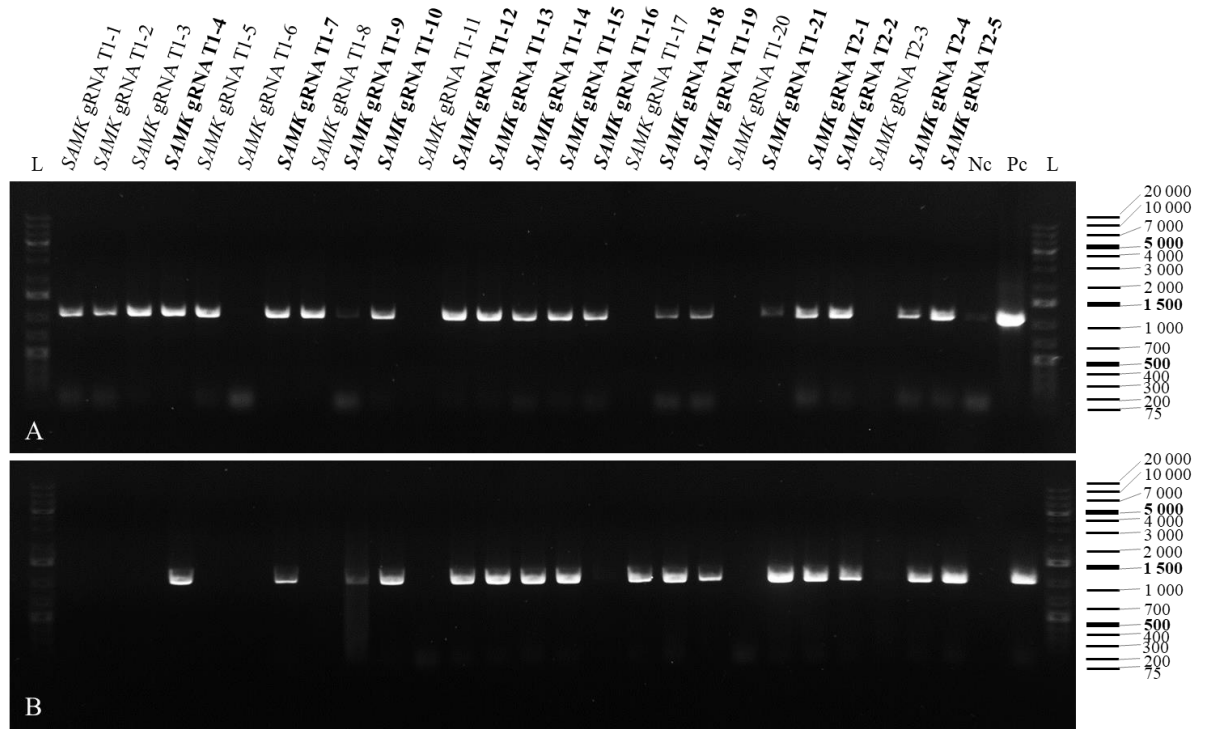
Kontrola obsahu gDNA ve vzorcích je nutná z důvodu následného přesného vyhodnocení pozitivních a negativních vzorků. Pokud vzorek DNA izolovaný z rostlin *M. sativa* obsahoval přirozeně se vyskytující *MMK3* sekvenci, zjištěnou PCR s *MMK3* I3F/I3R primery, byla DNA izolována správně. Pokud současně obsahoval i PCR produkt za použití SS42/SS43 primerů, můžeme tvrdit, že rostlina pravděpodobně obsahovala námi klonovaný a transformovaný konstrukt *SAMK* gRNA. Avšak není-li PCR produkt v kontrolní I3F/I3R reakci detekován např. z důvodů obsahu kontaminantu, mohou být produkty vzniklé v reakci SS42/SS43 falešně pozitivní (Obr. 22; označení *SAMK* gRNA T1-5). Tudíž specifické pásy by měly být nejlépe obsaženy v obou reakcích, kontrolní i testovací.



Obr. 21 Elektroforeogram po PCR genotypizaci na přítomnosti vektoru pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA ve stabilně transformovaných rostlinách *M. sativa*. Ze snímku 1% agarosového gelu po elektroforéze (90V x 40 min) je patrné, že byly detekované pomocí SS42/SS43 primerů (obr. A) pásy odpovídající velikosti (1100 bp) *SAMK* gRNA ve 4 případech tj. *SAMK* gRNA T1-2; *SAMK* gRNA T1-3; *SAMK* gRNA T1-8, *SAMK* gRNA T1-9 (označení tučně). Tyto vzorky zároveň obsahují templátovou DNA z rostlin *M. sativa*, což bylo ověřeno kontrolou obsahu gDNA za použití primerů specifických na intron 3 genu *MMK3* I3F/I3R (obr. B). L – standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; X - prázdné místo; Pc – pozitivní kontrola (samotný izolovaný plasmid pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA); Nc – negativní kontrola (místo templátu PCR H₂O).

Genotypizací *M. sativa* byla potvrzena přítomnost pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T1 u celkem 4 rostlin, které obsahovaly zároveň i *MMK3* kontrolní pás. Jedná se o vzorky označené *SAMK* gRNA T1- 2, 3, 8 a 9 tučným písmem (Obr. 21). Následně u dalších regenerovaných rostlin *M. sativa* byla potvrzena přítomnost pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T1 u celkem 12 rostlin, které obsahovaly zároveň *MMK3* kontrolní pás.

Jedná se o vzorky označené *SAMK* gRNA T1- 4, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19 a 21 tučným písmem (Obr. 22). Přítomnost pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T2 byla potvrzena u 4 rostlin nesoucích označení *SAMK* gRNA T2- 1, 2, 4 a 5 tučným písmem (Obr. 22).



Obr. 22 Elektroforeogram po PCR genotypizaci na přítomnosti vektoru pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA ve stabilně transformovaných rostlinách *M. sativa*. Ze snímku 1% agarosového gelu po elektroforéze (90V x 40 min) je patrné, že byly detekované pomocí SS42/SS43 primerů (obr. A) pásy odpovídající velikosti (1100 bp) *SAMK* gRNA T1 ve 12 případech tj. *SAMK* gRNA T1 4,7,9,10,12,13,14,15,16,18,19,21 (označení tučně) a *SAMK* gRNA T2 ve 4 případech tj. *SAMK* gRNA T2 1,2,4,5 (označení tučně). Tyto vzorky zároveň obsahují templátovou DNA z rostlin *M. sativa*, což bylo ověřeno kontrolou obsahu gDNA za použití primerů specifických na intron 3 genu *MMK3* I3F/I3R (obr. B). L – standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder; Pc – pozitivní kontrola (samotný izolovaný plasmid pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA); Nc – negativní kontrola (místo templátu PCR H₂O)

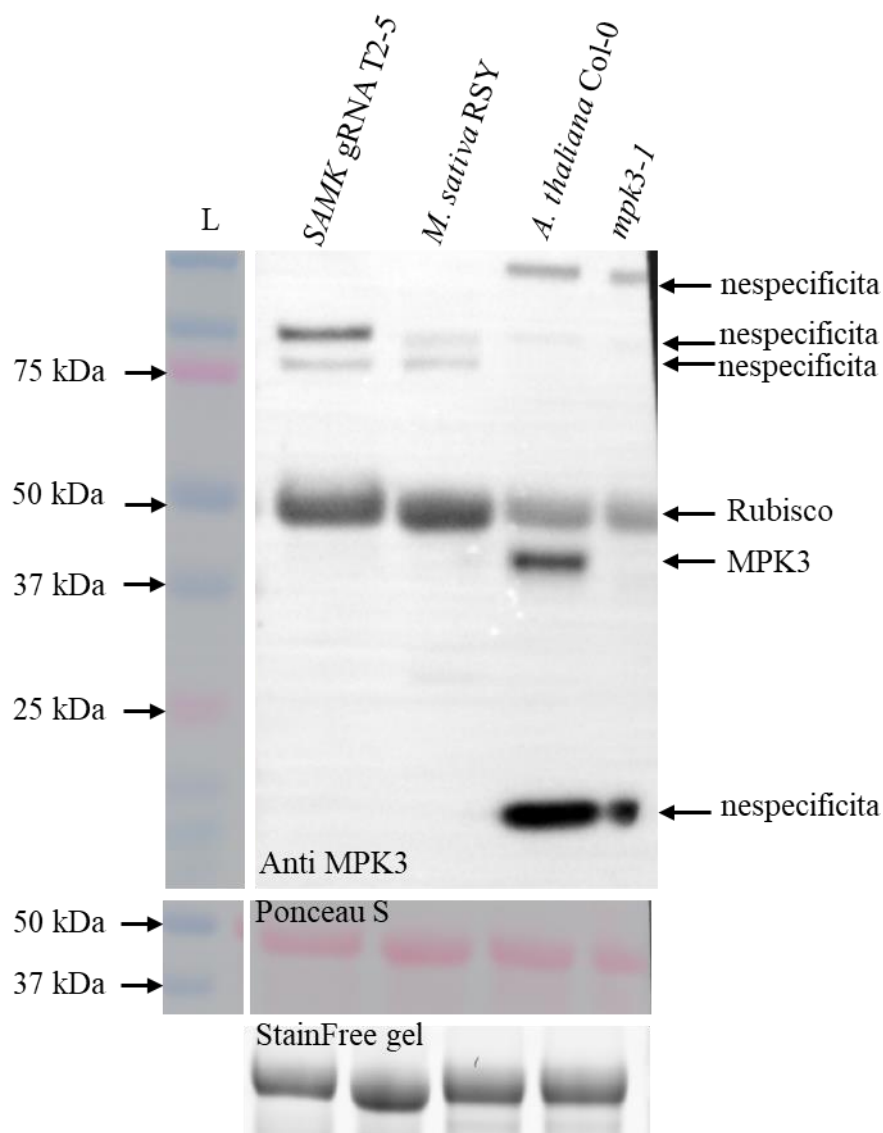
4.2.3 Imunodetekce SAMK v *Medicago sativa* SAMK gRNA

Z rostlin *M. sativa* linií SAMK gRNA T1 a T2, propagovaných pomocí somatické embryogeneze (Samac a Austin-Phillips, 2006), byl odebrán materiál pro extrakci proteinů a následnou imunodetekci pomocí několika protilátek za pomoci metody Western blot. Tento experiment byl vyhotoven ve dvou technických opakováních, a proto výsledky z něj jsou jenom předběžné. Byly naplánovány další opakování se zahrnutím biologických replik (také kontrol) a doplňující analýzy, jako je např. qPCR. Ty však z důvodů karanténních opatření nebyly vyhotoveny. Z těchto důvodů není uvedena statistika v předběžných grafech vzniklých z měření proteinové abundance nebo fosforylace.

Jako první byla pro detekci použita primární protilátka Anti-AtMPK3. Tato protilátka byla zvolena díky tomu, že MPK3 z huseníčku rolního (*A. thaliana*) a SAMK z vojtěšky seté (*M. sativa*) jsou ortologní proteiny. Bylo předpokládáno, že protilátka Anti-AtMPK3 bude detekovat také SAMK z vojtěšky seté (*M. sativa*). Při pohledu na snímek PVDF membrány po imunodetekci (Obr. 23) bylo patrné, že se protilátka Anti-AtMPK3 vázala mimo MPK3 také nespecificky (Obr. 23; označení nespecificita) i na jiné proteiny včetně Ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa (Rubisco).

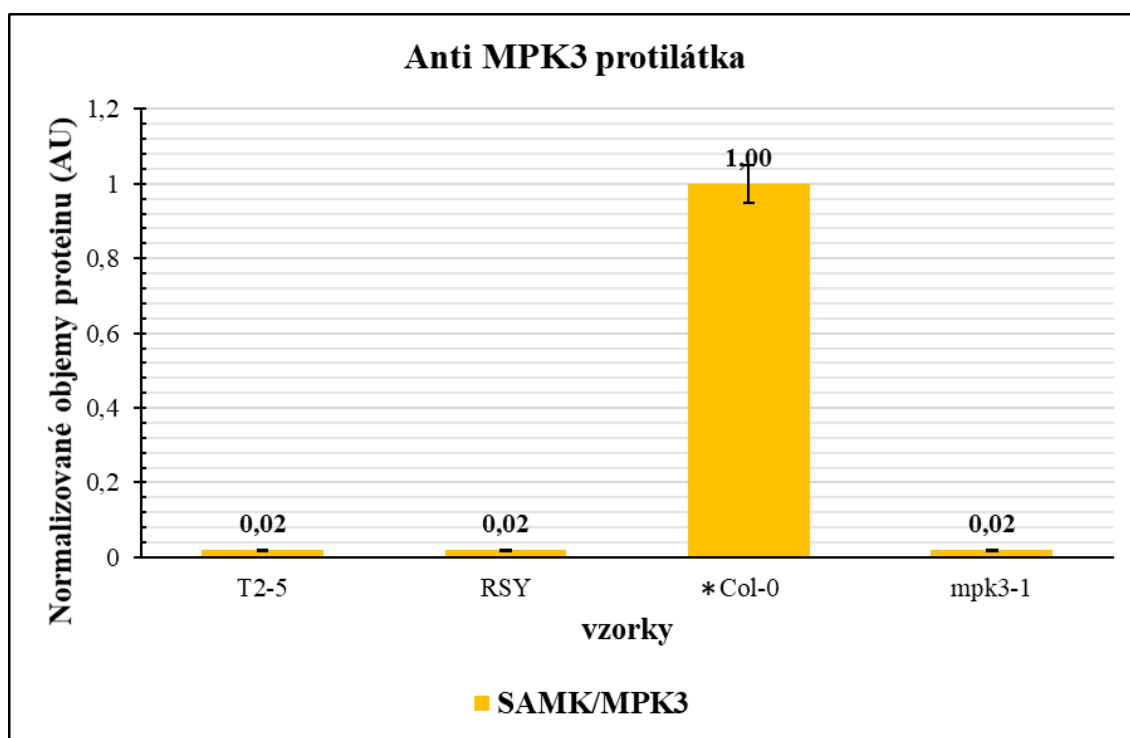
Protilátka se specificky vázala na MPK3 protein ($M_w = 43$ kDa) ve sloupci s proteiny z kontrolní *A. thaliana* Col-0, nikoliv však na *A. thaliana mpk3-1*. To potvrdilo správné vyřazení a absenci MPK3 v linii *A. thaliana mpk3-1*. Ve sloupcích s proteiny z vojtěšky seté (*M. sativa*) RSY a SAMK gRNA T2-5 nebyl detekován žádný specifický pás odpovídající SAMK v oblasti $M_w = 43$ kDa (Obr. 23).

Pozorování bylo potvrzeno měřením a grafickým vyhodnocením. Objemy jednotlivých proteinových páسů na PVDF membráně (Obr. 23) byly detekovány a vypočteny v programu Image LabTM Software (Bio-Rad, USA). Následně byly normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu (Obr. 23; označení „StainFree“ gel). Byl vytvořen graf ze dvou nezávislých opakování. Normalizované hodnoty objemů proteinu ve vzorcích byly relativně porovnány vůči hodnotě 1 označené „*“ v tomto případě vůči vzorku *A. thaliana* Col-0 (Obr. 24; označení *Col-0).



Obr. 23 Imunodetekce SAMK/MPK3 pomocí metody Western blot za použití Anti-AtMPK3 primární protilátky. Ze snímku PVDF membrány (označení Anti MPK3) je patrné, že protilátka Anti-AtMPK3 se mimo jiné váže i nespecificky (označení nespecificita) i na proteinový pás odpovídající enzymu Ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa (označení Rubisco). Byl detekován specifický pás odpovídající velikosti MPK3 ($M_w = 43$ kDa) ve vzorku s označením *A. thaliana* Col-0. Ve vzorku mutantní rostliny *A. thaliana mpk3-1* (označení *mpk3-1*) tento pás detekován dle očekávání nebyl. Bylo zjištěno, že protilátka Anti-AtMPK3 nedetekovala specifické pásy odpovídající proteinu SAMK ($M_w = 43$ kDa) ve vzorcích z vojtěšky seté (označení *SAMK* gRNA T2-5; *M. sativa* RSY). L – standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (USA); *SAMK* gRNA T2-5 – vzorek proteinu z rostliny *M. sativa* stabilně transformované a potvrzené na přítomnost konstruktů pDe-Cas9 + *SAMK* gRNA T2; *M. sativa* RSY – vzorky proteinu z rostliny *M. sativa* RSY; *A. thaliana* Col-0 – vzorky proteinu z *A. thaliana* Col-0; *mpk3-1* – vzorky proteinu z rostliny *A. thaliana mpk3-1*; Ponceau S – kontrola nanášky proteinů na PVDF membráně po transferu; StainFree gel – kontrola nanášky proteinů na gelu po SDS-PAGE.

Z grafu na obrázku 24 je patrné, že objemy proteinu SAMK detekovaných Anti-AtMPK3 protilátkou ve sloupci s označením *SAMK* gRNA T2-5 a *M. sativa* RSY společně s proteinem MPK3 ve vzorku s označením *mpk3-1* jsou téměř nulové v porovnání s *A. thaliana* Col-0. Z toho plyne závěr, že protilátka Anti-AtMPK3 nebyla pravděpodobně vhodná pro detekci SAMK. Dále, že v rostlině *A. thaliana mpk3-1* došlo k vyřazení MPK3.



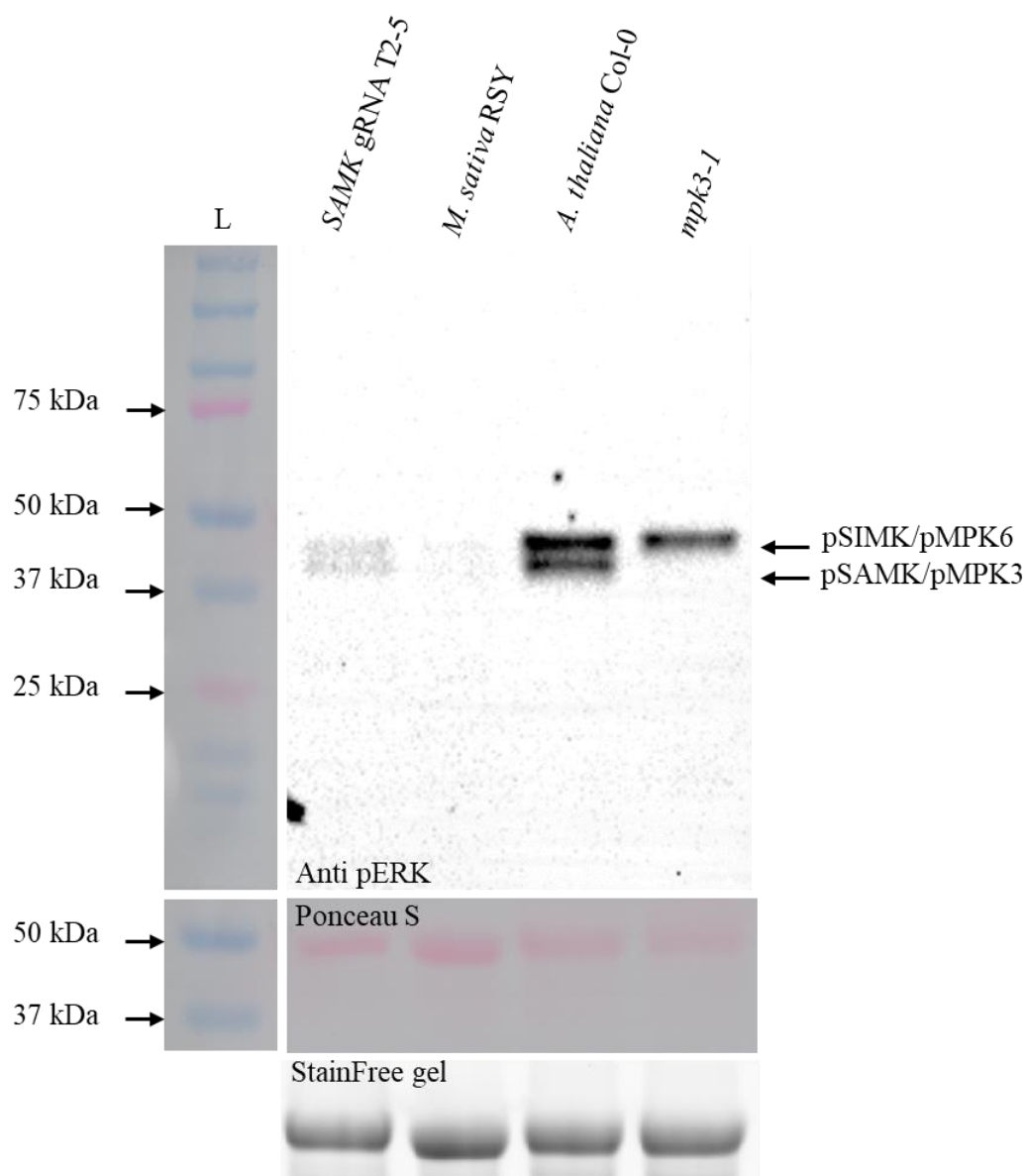
Obr. 24 Graf normalizovaných objemů proteinu SAMK/MPK3 detekovaných metodou Western blot za použití Anti-AtMPK3 primární protilátky. Objemy jednotlivých proteinových pásů na PVDF membráně (Obr. 23) byly detekovány a vypočteny v programu Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA) a následně normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu. Byl vytvořen graf ze dvou opakování, kdy se normalizované hodnoty objemů proteinu (AU – „arbitrary units“) ve vzorcích relativně porovnávaly vůči *A. thaliana* Col-0 o hodnotě 1 (označení *Col-0). Z grafu je patrné, že byla dle očekávání detekována téměř nulová hladina proteinu MPK3 ve vzorcích *A. thaliana mpk3-1* (označení *mpk3-1*). V *M. sativa* *SAMK* gRNA T2-5 (označení T2-5) a *M. sativa* RSY (označení RSY) byla detekována taktéž téměř nulová hladina proteinu SAMK v porovnání s *A. thaliana* Col-0 (označení Col-0) a je tedy patrné, že Anti-AtMPK3 primární protilátka nedetekuje SAMK protein.

Při použití primární protilátky Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), která se váže na fosforylovanou aktivní formu MAP kinas, byl detekován pás o specifické $M_w = 46$ kDa odpovídající pSIMK ve vzorku z *M. sativa* SAMK gRNA T2-5, přičemž ve vzorku *M. sativa* RSY byla abundance pSIMK menší. Stejně tak pás o specifické $M_w = 43$ kDa odpovídající abundanci pSAMK byl větší u vzorku *M. sativa* SAMK gRNA T2-5 v porovnání s *M. sativa* RSY (Obr. 25).

Ve vzorku *A. thaliana* Col-0 byly Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátkou detekovány pásy o $M_w = 46$ kDa odpovídající pMPK6 a $M_w = 43$ kDa odpovídající pMPK3 s výrazně vyšší abundancí oproti vzorkům z *M. sativa* i *A. thaliana mpk3-1*. Ve vzorku *A. thaliana mpk3-1* dle očekávání pás odpovídající pMPK3 zcela chyběl (Obr. 25).

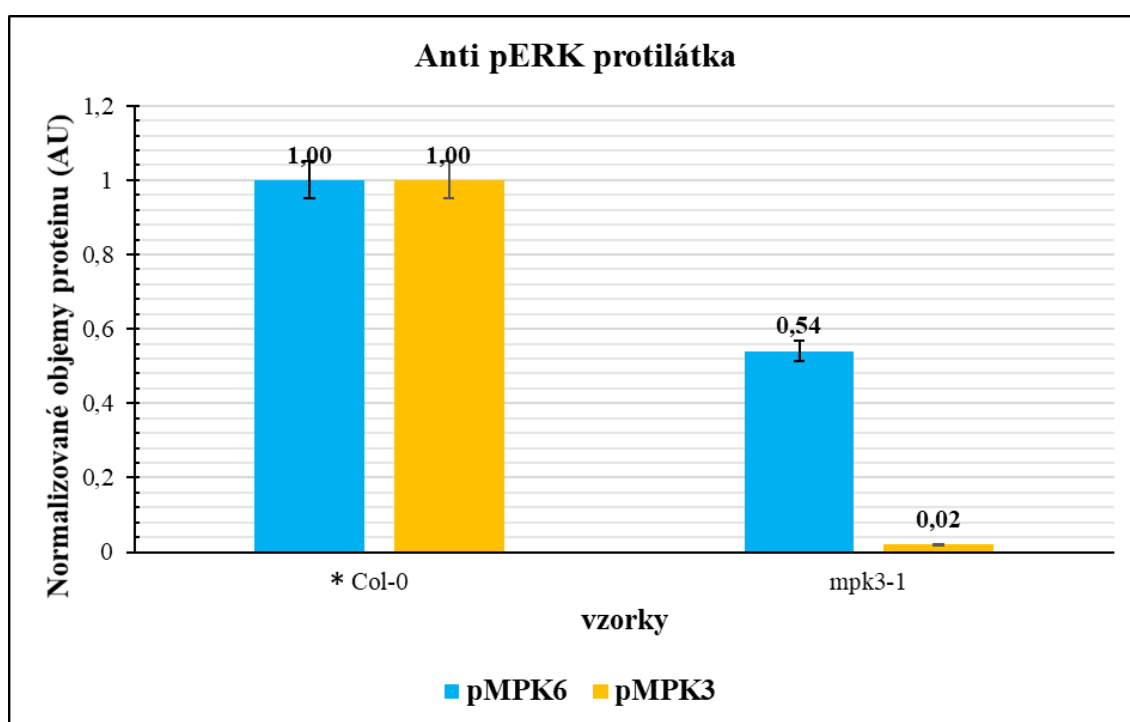
Pozorování bylo potvrzeno grafickým vyhodnocením měřených hladin fosfoproteinů. Objemy jednotlivých proteinových pásů na PVDF membráně (Obr. 25) byly detekovány a vypočteny v programu Image LabTM Software (Bio-Rad, USA). Následně byly normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu (Obr. 25; označení „StainFree“ gel) a byl vytvořen graf ze dvou nezávislých opakování.

Normalizované hodnoty objemů proteinů pMPK6 (modrý sloupec) a pMPK3 (oranžový sloupec) ve vzorcích byly relativně porovnány vůči hodnotě 1 označené „*“¹. V případě vzorků proteinů z *A. thaliana* byly porovnány vůči *A. thaliana* Col-0 (Obr. 26; označení *Col-0). Proteiny pSIMK (modrý sloupec) a pSAMK (oranžový sloupec) byly ve vzorcích *M. sativa* relativně porovnány vůči hodnotě 1 označené „*“¹ vzorek *M. sativa* RSY (Obr. 27; označení *RSY).

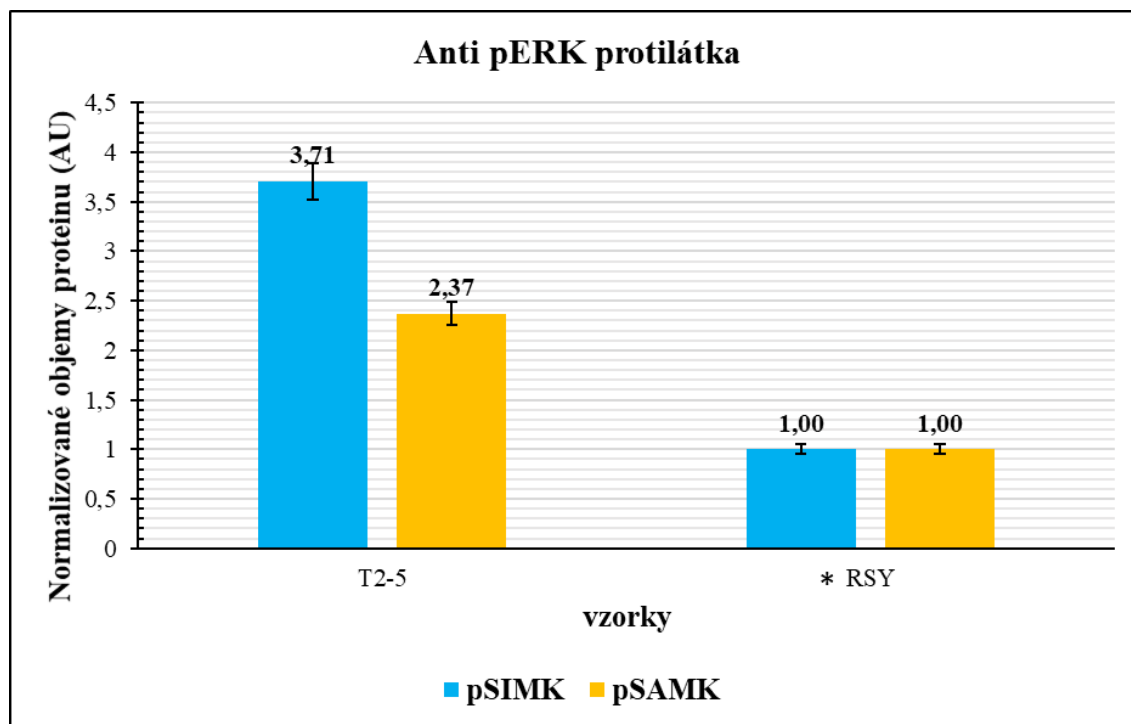


Obr. 25 Imunodetekce pSAMK/pMPK3 a pSIMK/pMPK6 pomocí metody Western blot za použití Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátky. Na snímku PVDF membrány (označení Anti pERK) byly detekovány Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátkou fosforylované formy MAP kinas u vojtěšky seté (*M. sativa*) označené jako pSAMK/pSIMK a huseníčku rolního (*A. thaliana*) pMPK3/pMPK6. Je patrné, že byla vyšší abundance pMPK3 ($M_w = 43$ kDa) a pMPK6 ($M_w = 46$ kDa) ve vzorku divokého typu *A. thaliana* Col-0 (označení *A. thaliana* Col-0) v porovnání s *A. thaliana* mpk3-1 (označení mpk3-1). Naopak při porovnání *M. sativa* RSY (označení *M. sativa* RSY) a *M. sativa* SAMK gRNA T2-5 (označení SAMK gRNA T2-5) se zdá, že množství fosforylované formy pSAMK ($M_w = 43$ kDa) a pSIMK ($M_w = 46$ kDa) bylo vyšší u SAMK gRNA T2-5. L – standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (USA); SAMK gRNA T2-5 – vzorek proteinu z rostliny *M. sativa* stabilně transformované a potvrzené na přítomnost konstruktů pDe-Cas9 + SAMK gRNA T2; *M. sativa* RSY – vzorky proteinu z rostliny *M. sativa* RSY; *A. thaliana* Col-0 – vzorky proteinu z *A. thaliana* Col-0; mpk3-1 – vzorky proteinu z rostliny *A. thaliana* mpk3-1; Ponceau S – kontrola nanášky proteinů na PVDF membráně po transferu; StainFree gel – kontrola nanášky proteinů na gelu po SDS-PAGE.

Z grafu je patrné, že v *A. thaliana mpk3-1* (Obr. 26; označení *mpk3-1*) s vyřazenou tvorbou MPK3 proteinu nedocházelo skutečně k jeho tvorbě, a nebyla tak detekována ani fosforylovaná forma pMPK3. Abundance pMPK6 byla v rostlině *mpk3-1* v porovnání s kontrolní *A. thaliana Col-0* přibližně o polovinu nižší (Obr. 26). Oproti tomu v rostlině *M. sativa SAMK* gRNA T2-5 (Obr. 27; označení T2-5) docházelo k pravděpodobně k vyšší aktivaci SIMK a SAMK, a tedy vyšší abundance pSIMK a pSAMK v porovnání s *M. sativa RSY*. V případě pSIMK byla abundance vyšší 3,71x a pSAMK 2,37x (Obr. 27).

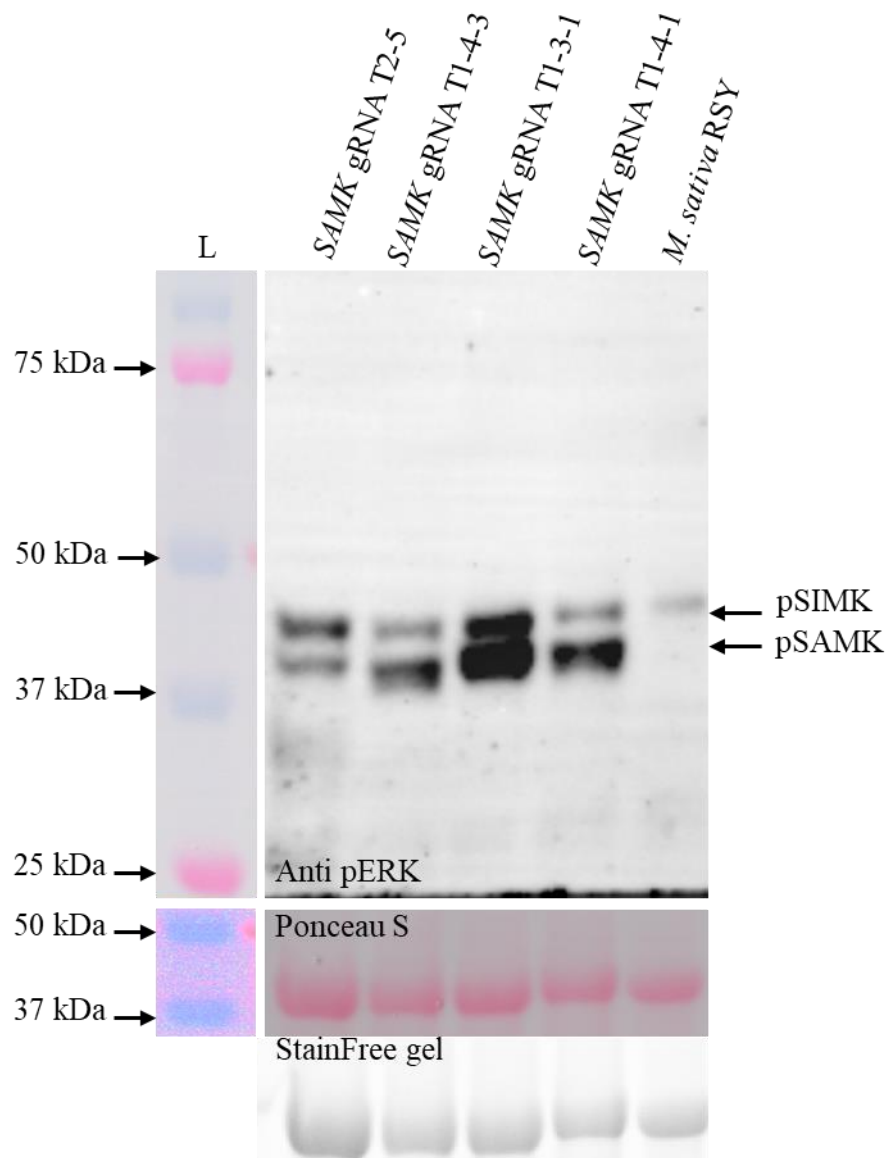


Obr. 26 Graf normalizovaných objemů proteinu pMPK3/pMPK6 detekovaných metodou Western blot za použití Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátky. Objemy jednotlivých proteinových pásů na PVDF membráně (Obr. 25) byly detekovány a vypočteny v programu Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA) a následně normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu. Byl vytvořen graf ze dvou opakování, kdy se normalizované hodnoty objemů proteinu (AU – „arbitrary units“) ve vzorcích relativně porovnávaly vůči *A. thaliana Col-0* pMPK6 a pMPK3 o hodnotách 1 (označení *Col-0). Z grafu je patrné, že v porovnání vůči *A. thaliana Col-0* (označení *Col-0) bylo množství fosforylované formy pMPK6 (modrý sloupec) a pMPK3 (žlutý sloupec) nižší u vzorku *A. thaliana mpk3-1* (označení *mpk3-1*). V případě pMPK6 bylo snížení množství o polovinu a pMPK3 téměř na nulovou hladinu proteinu.



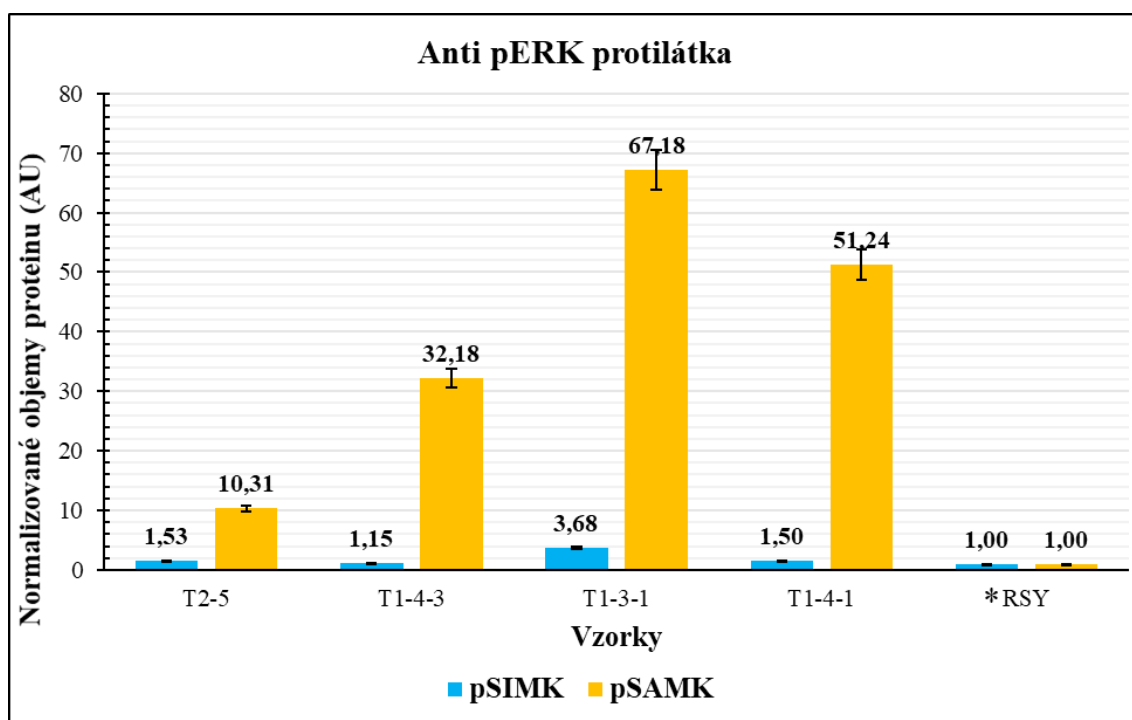
Obr. 27 Graf normalizovaných objemů proteinu pSAMK/pSIMK detekovaných metodou Western blot za použití Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátky. Objemy jednotlivých proteinových pásů na PVDF membráně (Obr. 25) byly detekovány a vypočteny v programu Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA) a následně normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu. Byl vytvořen graf ze dvou opakování, kdy se normalizované hodnoty objemů proteinu (AU – „arbitrary units“) ve vzorcích relativně porovnávaly vůči *M. sativa* RSY pSIMK a pSAMK o hodnotách 1 (označení *RSY). Z grafu je patrné, že napříč očekávání bylo v porovnání s *M. sativa* RSY (označení *RSY) množství pSIMK (modrý sloupec) i pSAMK (oranžový sloupec) vyšší ve vzorku *M. sativa* SAMK gRNA T2 (označení T2-5). V případě pSIMK (modrý sloupec) na 3,71násobek a pSAMK (oranžový sloupec) na 2,37násobek v porovnání s *M. sativa* RSY.

Při opakovaném použití Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátky a detekci fosforylovaných forem MAP kinas u více rostlin *M. sativa* SAMK gRNA linií T2 a T1 byl pozorován podobný trend. Ve vzorcích z rostlin *M. sativa* SAMK gRNA (Obr. 28; označení SAMK gRNA T2-5; T1-4-3; T1-3-1; T1-4-1) byla detekována vyšší abundance proteinů pSIMK a pSAMK v porovnání s *M. sativa* RSY. Ve vzorku proteinů extrahovaných z *M. sativa* RSY nebyla v porovnání se vzorky proteinů z rostlin *M. sativa* SAMK gRNA linií T2 a T1, téměř detekována pSAMK a abundance pSIMK byla nižší (Obr. 28). Všechny rostliny SAMK gRNA použity pro imunodetekci byly pozitivní na obsah transgenu SAMK gRNA.



Obr. 28 Imunodetekce pSAMK/pSIMK pomocí metody Western blot za použití Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátky. Na snímku PVDF membrány (označení Anti pERK) byly detekovány Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátkou fosforylované formy MAP kinas u vojtešky seté (*M. sativa*) označené jako pSAMK ($M_w = 43$ kDa) a pSIMK ($M_w = 46$ kDa). V porovnání s kontrolním vzorkem *M. sativa* RSY je patrné, že množství pSAMK a pSIMK bylo vyšší u vzorků *M. sativa* označených SAMK gRNA T2-5; T1-4-3; T1-4-1 a zdaleka nejvyšší u T1-3-1. Dále, že ve vzorku *M. sativa* RSY téměř zcela chyběl pás odpovídající pSAMK. L – standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (USA); SAMK gRNA T2-5 – vzorek proteinu z rostliny *M. sativa* stabilně transformované a potvrzené na přítomnost konstruktů pDe-Cas9 + SAMK gRNA T2; SAMK gRNA T1-4-3; T1-3-1; T1-4-1 - vzorky proteinů z rostliny *M. sativa* stabilně transformované a potvrzené na přítomnost konstruktů pDe-Cas9 + SAMK gRNA T1; Ponceau S – kontrola nanášky proteinů na PVDF membráně po transferu; StainFree gel – kontrola nanášky proteinů na gelu po SDS-PAGE.

Pro grafické vyhodnocení, byly objemy jednotlivých proteinových pásů odpovídající pSIMK a pSAMK na PVDF membráně (Obr. 28) detekovány a vypočteny v programu Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA). Následně byly normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu (Obr. 28; označení „StainFree“ gel). Byl vytvořen graf ze dvou nezávislých opakování. Normalizované hodnoty objemů proteinů pSIMK (modrý sloupec) a pSAMK (oranžový sloupec) ve vzorcích byly relativně porovnány vůči hodnotě 1 označené „*“ vzorku proteinu *M. sativa* RSY (Obr. 29; označení *RSY).



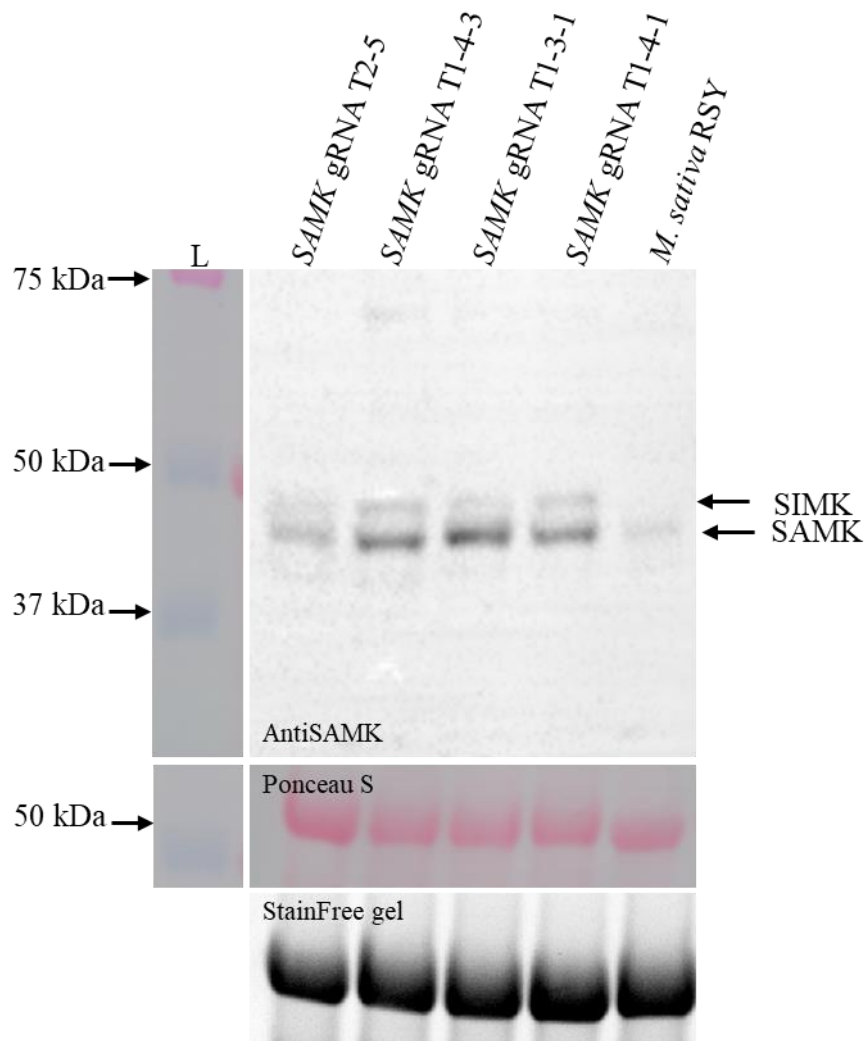
Obr. 29 Graf normalizovaných objemů proteinu pSAMK/pSIMK detekovaných metodou Western blot za použití Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) primární protilátky. Objemy jednotlivých proteinových pásů na PVDF membráně (Obr. 28) byly detekovány a vypočteny v programu Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA) a následně normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu. Byl vytvořen graf ze dvou opakování, kdy se normalizované hodnoty objemů proteinu (AU – „arbitrary units“) ve vzorcích relativně porovnávaly vůči *M. sativa* RSY pSIMK a pSAMK o hodnotách 1 (označení *RSY). Z grafu je patrné, že napříč očekávání bylo v porovnání s *M. sativa* RSY (označení *RSY) množství pSIMK (modrý sloupec) i pSAMK (oranžový sloupec) vyšší ve vzorcích *M. sativa* SAMK gRNA T1 a T2 (označení T2-5; T1-4-3; T1-3-1 a T1-4-1). V případě pSIMK (modrý sloupec) o jednotky a pSAMK (oranžový sloupec) dokonce o desítky v porovnání s *M. sativa* RSY.

Byla detekována vyšší abundance fosforylované aktivní formy pSIMK ve vzorcích proteinů z *M. sativa* SAMK gRNA (Obr. 29; označení T2-5; T1-4-3; T1-3-1; T1-4-1) oproti kontrolní rostlině *M. sativa* RSY (Obr. 29; označení *RSY). Navíc v transgenních rostlinách byla mnohonásobně vyšší abundance pSAMK a to v rozmezí od 10,31x u rostliny SAMK gRNA T2-5 až po 67,18x u rostliny SAMK gRNA T1-3-1 (Obr. 29).

Při použití primární protilátky anti-SAMK pro detekci proteinu SAMK ($M_w = 43$ kDa) ve vzorcích z *M. sativa* RSY a SAMK gRNA T2 a T1 linií bylo zjištěno, že se protilátka nespecificky váže i na SIMK o $M_w = 46$ kDa (Obr. 30). Vzorky proteinů z rostlin *M. sativa* SAMK gRNA T2 a T1 linií (Obr. 30; označení SAMK gRNA T2-5; T1-4-3; T1-3-1; T1-4-1) vykazovaly vyšší abundanci proteinu SAMK i SIMK v porovnání s *M. sativa* RSY (Obr. 30).

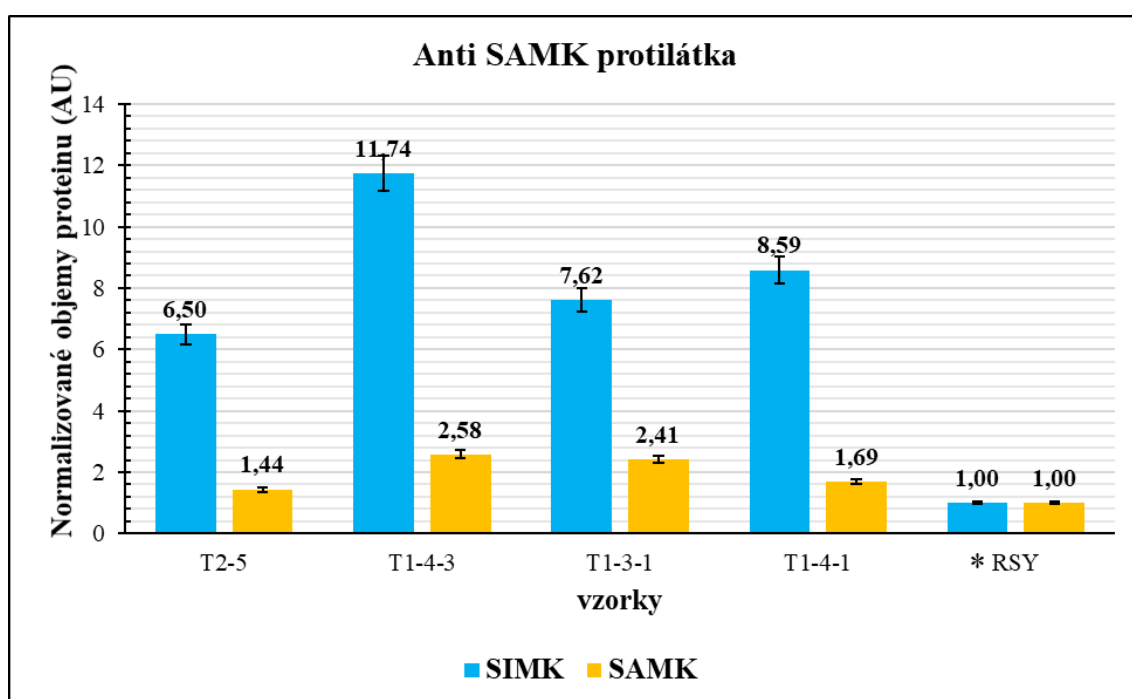
Po grafickém vyhodnocení, kdy byly objemy jednotlivých proteinových pásů odpovídající SAMK a SIMK na PVDF membráně (Obr. 30) detekovány a vypočteny v programu Image LabTM Software (Bio-Rad, USA). Následně byly normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu (Obr. 30; označení „StainFree“ gel).

Byl vytvořen graf ze dvou nezávislých opakování Western blot analýzy. Normalizované hodnoty objemů proteinů SIMK (modrý sloupec) a SAMK (oranžový sloupec) ve vzorcích byly relativně porovnány vůči hodnotě 1 označené „*“ vzorku *M. sativa* RSY (Obr. 31; označení *RSY).



Obr. 30 Imunodetekce SAMK pomocí metody Western blot za použití anti-SAMK primární protilátky. Na snímky PVDF membrány (označení AntiSAMK) byla detekována u rostliny vojtěšky seté (*M. sativa*) MAP kinasa SAMK. Zároveň však byla společně s SAMK ($M_w = 43$ kDa) detekována pravděpodobně MAP kinasa SIMK ($M_w = 46$ kDa). V porovnání s kontrolním vzorkem *M. sativa* RSY je patrné, že bylo přes očekávání množství SAMK a SIMK vyšší u vzorků *M. sativa* označených SAMK gRNA T2-5; T1-4-3; T1-3-1; T1-4-1L – standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (USA); SAMK gRNA T2-5 – vzorek proteinu z rostliny *M. sativa* stabilně transformované a potvrzené na přítomnost konstruktů pDe-Cas9 + SAMK gRNA T2; SAMK gRNA T1-4-3; T1-3-1; T1-4-1 - vzorky proteinů z rostliny *M. sativa* stabilně transformované a potvrzené na přítomnost konstruktů pDe-Cas9 + SAMK gRNA T1; Ponceau S – kontrola nanášky proteinů na PVDF membráně po transferu; StainFree gel – kontrola nanášky proteinů na gelu po SDS-PAGE.

Po grafickém vyhodnocení a normalizaci bylo zjištěno, že ve vzorcích proteinů extrahovaných z *M. sativa* SAMK gRNA T2 a T1 linií (Obr. 31; označení T2-5; T1-4-3; T1-3-1; T1-4-1) byla abundance proteinu SAMK vyšší v porovnání s *M. sativa* RSY (Obr. 31; označení *RSY). Zvýšení abundance SAMK bylo v rozmezí od 1,44x u SAMK gRNA T2-5 až po 2,58x v případě SAMK gRNA T1-4-3. Taktéž abundance SIMK byla u transgenních rostlin několikanásobně vyšší v porovnání s *M. sativa* RSY. Zvýšení abundance SIMK bylo v rozmezí od 6,50x u SAMK gRNA T2-5 až po 11,74x v případě SAMK gRNA T1-4-3 (Obr. 31).



Obr. 31 Graf normalizovaných objemů proteinu SAMK/SIMK detekovaných metodou Western blot za použití Anti SAMK primární protilátky. Objemy jednotlivých proteinových pásů na PVDF membráně (Obr. 30) byly detekovány a vypočteny v programu Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA) a následně normalizované na zprůměrované nanášky proteinů detekované v polyakrylamidovém gelu. Byl vytvořen graf ze dvou opakování, kdy se normalizované hodnoty objemů proteinu (AU – „arbitrary units“) ve vzorcích relativně porovnávaly vůči *M. sativa* RSY SAMK a SIMK o hodnotách 1 (označení *RSY). Z grafu je patrné, že napříč očekávání bylo v porovnání s *M. sativa* RSY (označení *RSY) množství SIMK (modrý sloupec) i SAMK (oranžový sloupec) vyšší ve vzorcích *M. sativa* SAMK gRNA T1 a T2 (označení T2-5; T1-4-3; T1-3-1 a T1-4-1). V případě SIMK (modrý sloupec) o 6,5-11,74násobek a SAMK (oranžový sloupec) 1,44-2,58násobek v porovnání s *M. sativa* RSY.

5 DISKUZE

5.1 Klonování SAMK za účelem detekce lokalizace

Gen *SAMK*, původem z vojtěšky seté (*M. sativa*), je součástí signalizačních kaskád odpovídajících na rozličné vnější stimuly, vedoucí ke změně metabolismu buňky. Jedním z cílů práce bylo naklonovat konstrukty pro následnou lokalizaci SAMK v transientně transformovaných listových buňkách *N. benthamiana*. K tvorbě SAMK-mRFP a mRFP-SAMK dochází již 2. den od provedení transienční transformace se svým maximem ve 3.-4. dni. Poté je fúzní protein buněčnými mechanismy degradován v proteasomu.

Za pomoci konfokální laserové skenovací mikroskopie bylo zjištěno, že SAMK fúzovaný s mRFP v C-terminální i v N-terminální orientaci je lokalizován v buňkách *N. benthamiana* transientně transformovaných konstrukty *35S::SAMK:mRFP* a *35S::mRFP:SAMK* především v jádře, nikoli v jadérku a v okolí cytoplazmatické membrány. Tento výsledek plně koreluje s již dříve pozorovaným vzorem distribuce značených SIMK a SIMKK v protoplastech huseníčku rolního (*A. thaliana*) a kořenových buňkách vojtěšky seté (*M. sativa*). Po navození stresových podmínek se signál relokuje z jádra do cytoplazmy (Baluška *et al.* 2000; Ovečka *et al.*, 2014).

Ačkoliv buněčná lokalizace v heterologním rostlinném systému *N. benthamiana* odpovídá očekávání, bylo by pro lepší zjištění přirozené lokalizace SAMK třeba vytvořit stabilně transformovanou linii rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*) a pozorovat přirozený homologický rostlinný systém. SAMK by po působení vnějších stresových stimulů mohla, stejně jako SIMK, měnit lokalizaci z jádra do cytoplazmy (Ovečka *et al.*, 2014).

5.2 Nadprodukce SIMKK a SAMK v listech *Nicotiana benthamiana*

Listy *N. benthamiana* byly transientně transformovány dvěma konstrukty zároveň $35S::SIMKK:eGFP$ a $35S::SAMK:mRFP$ nebo $35S::mRFP:SAMK$. Jako kontrola byly použity kombinace $35S::SIMKK:eGFP$ s konstrukty $35S::MMK3:mRFP$ a $35S::mRFP:MMK3$ a každý konstrukt zvlášť. SIMKK je nadřazenou MAPKK pro SAMK i MMK3. Jejich společná zvýšená tvorba však zatím nebyla studována.

Konstitutivní tvorba SIMKK-eGFP společně se SAMK-mRFP a mRFP-SAMK vedla k projevům programované buněčné smrti. První známky byly pozorované za pomoci mikroskopu již 4. den po transientní transformaci a plně se projevila 6. den po transformaci. Projevy programované buněčné smrti však nebyly 4. ani 6. den po transformaci v takové míře nebo vůbec pozorovány u rostlin *N. benthamiana* transformovaných $35S::SIMKK:eGFP$ společně s $35S::MMK3:mRFP$ nebo $35S::mRFP:MMK3$ ani konstrukty samotnými.

Již dříve bylo zjištěno, že zvýšená produkce NtSIPK, což je ortolog MsSIMK, a NtWIPK, ortolog MsSAMK (Ichimura *et al.*, 2002), v buňkách *N. benthamiana* vede k hypersenzitivní reakci, aktivaci jaderných transkripčních faktorů a produkci markerů hypersenzitivní reakce v odpovědi rostliny na napadení patogenem. Fosforylace NtSIPK/NtWIPK je řízena NtMEK2 (Yang *et al.*, 2001). NtMEK2 je ortologem MsSIMKK (Ichimura *et al.*, 2002). Snížená tvorba NtMEK2 a NtSIPK/NtWIPK vedla ke snížené rezistenci vůči TMV (Tobacco Mosaic Virus). Oproti tomu konstitutivní tvorba NtMEK2-NtSIPK/NtWIPK vedla k projevům hypersenzitivní reakce a programované buněčné smrti i bez působení vnějšího stresového stimulu (Zhang a Liu, 2001; Takahashi *et al.*, 2004).

Pozorování toho, že konstitutivní tvorba ortologních MsSIMKK společně s MsSAMK v *N. benthamiana* navozuje hypersenzitivní reakci, ačkoliv se jedná o heterologní rostlinný systém, může vést k pochopení této kaskády reakcí u vojtěšky seté (*M. sativa*). Pro potvrzení, že konstitutivní tvorba MsSIMKK společně s MsSAMK spouští kaskádu reakcí vedoucí k hypersenzitivní reakci u vojtěšky seté (*M. sativa*) by však bylo potřeba vytvořit linii rostlin vojtěšky se zvýšenou tvorbou MsSIMKK společně s MsSAMK.

To však může být za předpokladu, že konstitutivní tvorba MsSIMKK společně s MsSAMK vede k hypersenzitivní reakci problematické. Každopádně tento experiment nepřímo potvrzuje funkčnost konstruktů v heterologním systému *N. benthamiana*, jelikož jsou schopny navodit hypersenzitivní reakci a buněčnou smrt.

5.3 Testování konstruktů SAMK gRNA v *Medicago sativa*

Ve studiích funkce genů se často používá jejich vyřazení, které je následováno pozorováním fenotypu v porovnání s rostlinou divokého typu. K těmto účelům se dá využít několika odlišných typů technologií, tj. ZFN (Zinc Finger Nucleases) (Kim *et al.*, 1996), TALEN (Transcription Activation Like Effector Nucleases) (Bedell *et al.*, 2012) nebo nejnovější metoda Crispr/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Cas9 nuclease). Jmenované technologie jsou seřazeny v historickém kontextu. V práci byly naklonovány konstrukty k poslední ze zmíněných, Crispr/Cas9. Má své výhody, jakou jsou jednoduchost a nízké náklady na přípravu, ale také nevýhody např. vyšší pravděpodobnost na nezacílení na správnou sekvenci (Cong *et al.*, 2013).

Za pomoci molekulárního klonování bylo vytvořeno několik SAMK gRNA konstruktů cílících na exon 1 SAMK. Pro ověření funkčnosti konstruktů byla zvolena transformace vojtěšky seté (*M. sativa*) za pomoci *A. tumefaciens* a propagace rostlinného materiálu somatickou embryogenezí. Následně byly vzniklé rostliny analyzovány pomocí PCR a Western blot analýzy. Bylo ověřeno, že některé z transformovaných rostlin nesou transgen v podobě SAMK gRNA, ale ten je pravděpodobně buněčnými mechanismy buď utlumen nebo zcela degradován.

Na prvních, předběžných analýzách za pomoci Western blot analýzy ze vzorků z transgenních rostlin byly detekovány pásy odpovídající SAMK. Za pomoci softwarových a grafických nástrojů bylo z předběžných výsledků zjištěno, že SAMK je dokonce v SAMK gRNA transformovaných rostlinách *M. sativa* více abundantní v porovnání s námi použitou kontrolní rostlinou *M. sativa* RSY. Abundance fosforylované formy pSAMK je nad očekávání mnohonásobně vyšší v SAMK gRNA transformovaných rostlinách oproti kontrolním.

To, že byly u vzorků z *SAMK* gRNA linií *M. sativa* vyšší hodnoty abundance proteinů oproti *M. sativa* RSY mohlo být způsobeno také použitím nepříliš vhodné kontrolní rostliny. Výsledky z této části Western blot analýzy jsou spíše informativní. Pro vyvození závěrů by bylo potřeba provést Western blot analýzu znovu s využitím více technických i biologických replik i u kontrolních rostlin a doplnit o qPCR analýzu. To však z důvodů karanténních opatření nebylo možné.

Jedním z možných vysvětlení je, že eukaryotické rostlinné buňky mají mechanismy, kterými se brání před cizorodou začleňovanou DNA. Pomocí *A. tumefaciens* je T-DNA obsahující klonovaný konstrukt vnášena do buňky a jádra začleněna do genomu hostitelské buňky (Garfinkel a Nester, 1980). Transgen tak může být vnesen do míst, které jsou silně metylované a transkripčně inaktivní (Bennetzen *et al.*, 1994). Ačkoliv je pak transgen v rostlině přítomen, nedochází k jeho transkripci a translaci a je nefunkční.

Další možností, kdy je transgen umlčen, je *de novo* methylace promotorové oblasti (Mette *et al.*, 2000). Tento jev se nazývá RNA řízená DNA methylace (Wassenegger *et al.*, 1994) a byl popsán u několika druhů rostlin po transformaci (Matzke *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1991). Methylace promotorové oblasti je jedním z mechanismů transkripčního genetického umlčení (TGS), který může způsobovat problémy při transkripci transgenu či jej úplně utlumit. Například konstitutivní promotor 35S CaMV bývá u velkého procenta regenerovaných rostlin ve vegetativním stádiu růstu metylován a nespouští tak přepis transgenu (Weinhold *et al.*, 2013). To bylo pozorováno u transgenních rostlin připravených z pletivových kultur (Stroud *et al.*, 2013).

Umlčení tvorby produktu může probíhat i na úrovni již vzniklého transkriptu DNA. To se pak označuje jako post-transkripční genové umlčení (PTGS). Úsek řetězce DNA je přepsán do sekvence RNA a následně pomocí RNA interference je částečně či plně utlumen (Sijen *et al.*, 2001). K tomu, aby buňka provedla PTGS, jí slouží malé interferující RNA miRNA, siRNA a další. Ty tvoří komplexy RISC (RNA-Induced Silencing Complex) společně s ribonukleoproteinovými částicemi a štěpí, či vytváří komplexy se vzniklými RNA (Pratt a MacRae, 2009), např. *SAMK* gRNA, v buňce.

Samotný transgen *SAMK* gRNA v testovacích rostlinách vojtěšky seté (*M. sativa*) tak nezaručuje, že dojde k vyřazení genu *SAMK* pomocí Crispr/Cas9. Výše zmíněnými mechanismy byl konstrukt *SAMK* gRNA nejspíše umlčen. Signalizace přítomnosti transgenu je zatím velkou neznámou.

Je také možné, že rostlina spouští signalizační kaskádu po jeho rozpoznání a vnímá jej jako jistou formu stresového stimulu, vůči kterému se brání pomocí jeho umlčení (Matzke a Matzke, 1998). To může vysvětlovat zvýšenou abundanci fosforylovaných forem MAPK a MAPK celkově. Pro potvrzení této hypotézy by však bylo potřeba dalšího výzkumu a robustnější opakování experiment s doplňujícími analýzami.

Existuje také určitá pravděpodobnost, že došlo k vyřazení jenom jedné kopie genu *SAMK* v tetraploidním organismu *M. sativa*, kde je gen *SAMK* duplicitní, a jeho formy nejsou 100 % totožné. V takovém případě by mohla druhá kopie genu kompenzovat svou aktivitou nepřítomnou formu, případně by mohla zvýšit svou abundanci prostřednictvím zpětnovazebné z angl. „feed back“ regulace. Pro potvrzení či vyvrácení této hypotézy však potřebujeme další experimentální data.

6 ZÁVĚR

V úvodní kapitole experimentální části byly za pomoci molekulárně biologických metod úspěšně naklonovány a ověřeny konstrukty *35S::SAMK:mRFP* a *35S::mRFP:SAMK*. Ty byly transformovány do *E. coli* TOP10, *A. tumefaciens*, transientně do *N. benthamiana* a stabilně do *M. sativa*. V *M. sativa* však tyto konstrukty netvořily fúzní proteiny.

Buňky transientně transformovaných listů *N. benthamiana* byly pozorovány za použití pokročilých mikroskopických metod, především konfokální laserové skenovací mikroskopie, a byla lokalizována tvorba fúzních proteinů SAMK-mRFP a mRFP-SAMK. Proteiny se dle očekávání nacházely především v jádře, nikoliv v jadérku a oblasti okolo cytoplazmatické membrány. Z odebraného materiálu listů transformovaných *N. benthamiana* byla provedena imunodetekce za použití Anti-mCherry primární protilátky. Po vyvolání signálu na membráně byly detekovány pásy odpovídající fúzním proteinům SAMK-mRFP, mRFP-SAMK ($M_w = 67$ kDa) i samotný mRFP ($M_w = 24$ kDa).

V další části byl proveden robustní experiment ko-transformace listů *N. benthamiana* dvěma konstrukty současně. Byly použity *35S::SAMK:mRFP*, *35S::mRFP:SAMK*, *35S::MMK3:mRFP*, *35S::mRFP:MMK3* vždy v kombinaci s *35S::SIMKK:eGFP* pro tvorbu jim nadřazené SIMKK. Bylo zjištěno, že kombinace konstitutivní tvorby SIMKK-eGFP s SAMK-mRFP nebo mRFP-SAMK vede u heterologního rostlinného systému k indukci programované buněčné smrti již 4. den po transientní transformaci. Vznik programované buněčné smrti však nebyl v takové míře nebo vůbec pozorován u listů *N. benthamiana* tvořících SIMKK-eGFP s MMK3-mRFP nebo mRFP-MMK3 ani u nadprodukce jednotlivých fúzních proteinů samostatně. Konstitutivní tvorba SIMKK společně se SAMK by mohla vést i u vojtěšky seté k programované buněčné smrti. Pro potvrzení by však bylo třeba vytvořit linii vojtěšky seté nesoucí oba konstrukty, což může být za předpokladu, že mohou způsobovat programovanou buněčnou smrt obtížné.

Následně byly klonovány konstrukty *SAMK* gRNA a transformovány do vojtěšky seté (*M. sativa*) za účelem otestování. Bylo navrženo několik *SAMK* gRNA a pomocí technik molekulární biologie byly klonovány do vektorů potřebných pro přenos transgenů do cílové rostlinné buňky.

Byla provedena *A. tumefaciens* řízená transformace vojtěšky seté (*M. sativa*) a propagace transgenního materiálu pomocí somatické embryogeneze. Následně byl odebrán rostlinný materiál a pomocí PCR s primery specifickými vůči části přenášeného vektoru s *SAMK* gRNA potvrzena přítomnost transgenu u několika rostlin vojtěšky seté (*M. sativa*) *SAMK* gRNA.

Pro testování, jestli je konstrukt *SAMK* gRNA v rostlinách *M. sativa* funkční, byl z transgenních rostlin odebrán materiál pro imunodetekci za pomoci specifických protilátek a metody Western blot. Z předběžných výsledků prvního opakování experimentu vyplývá, že oproti námi použité kontrolní rostlině vojtěšky seté (*M. sativa*) RSY byla abundance *SAMK* i *SIMK* v rostlinách *SAMK* gRNA linií vyšší, a dokonce vykazovaly mnohem vyšší abundanci fosforylovaných forem MAPK. Je možné, že došlo k utlumení transgenu a ten byl poté nefunkční nebo přítomnost transgenu způsobovala spolu s dalšími vlivy stres. Tento a další experimenty však nebyly z důvodů neočekávaných karanténních opatření v důsledku šíření viru SARS-CoV-2 zopakovány a dokončeny. Pro finální statistické vyhodnocení a potvrzení trendu by bylo potřeba provést několik nezávislých opakování za použití více biologických i technických replik a více kontrolních rostlin, a také změřit hladinu transkriptu pomocí qPCR.

7 LITERATURA

- Alexa A., Varga J., Reményi A. (2010): "Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules". *The FEBS Journal* **277**(21), 4376–4382.
- 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.
- Bae Y.S., Oh H., Rhee S.G., Yoo Y.D. (2011): Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and Cells* **32**(6), 491–509.
- Baluška F., Ovečka M., Hirt H. (2000): Salt stress induces changes in amounts and localization of the mitogen-activated protein kinase SIMK in alfalfa roots. *Protoplasma* **212**, 262–267.
- Barnes D.K., Goplen B.P., Baylor J.E. (1988): Highlights in the USA and Canada. In: *Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy Monographs*. Vol. 29, (A.A. Hanson, D.K. Barnes, R.R. Cary, N.C. Hill eds.), ASA, CSSA, and SSSA, Madison, U.S.A., 1-24.
- Beck M., Komis G., Muller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant Cell* **22**, 755–771.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **189**, 1069–1083.
- Bedell V.M., Wang Y., Campbell J.M., Poshusta T.L., Starker C.G., Krug R.G., Tan W., Penheiter S.G., Ma A.C., Leung A.Y.H., Fahrenkrug S.C., Carlson D.F., Voytas D.F., Clark K.J., Essner J.J., Ekker S.C. (2012): *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**, 114–118.
- Benito P., Alonso-Vega P., Aguado C., Luján R., Anzai Y., Hirsch A. M., Trujillo M. E. (2017): Monitoring the colonization and infection of legume nodules by *Micromonospora* in co-inoculation experiments with rhizobia. *Scientific reports* **7**(1), 11051.
- Bennetzen J.L., Schrick K., Springer P.S., Brown W.E., SanMiguel P. (1994): Active maize genes are unmodified and flanked by diverse classes of modified, highly repetitive DNA. *Genome* **37**, 565–576.
- Bergmann D. C., Lukowitz W., Somerville C. R. (2004): Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**, 1494–1497.
- Berson T., von Wangenheim D., Takáč T., Šamajová O., Rosero A., Ovečka M., Komis G., Stelzer H.K.E., Šamaj J. (2014): Trans-Golgi network localized small GTPase RabA1d is involved in cell plate formation and oscillatory root hair growth. *BMC Plant Biology* **14**, 252.
- Bi G., Zhou Z., Wang W., Li L., Rao S., Wu Y., Zhang X., Menke F.L.H., Chen S., Zhou J.M. (2018): Receptor-like cytoplasmic kinases directly link diverse pattern recognition receptors to the activation of mitogen-activated protein kinase cascades in Arabidopsis. *The Plant Cell* **30**(7), 1543–1561.
- Bolton J.L. (1962): *Alfalfa Botany, Cultivation and Utilization*. Leonard Hill, Londýn, UK, 474 stran.
- Bögre L., Ligterink W., Meskiene I., Baker P., Heberle-Bors E., Huskisson N.S., Hirt H. (1997): Wounding Induces the Rapid and Transient Activation of a Specific MAP Kinase Pathway. *The Plant Cell* **9**, 75–83.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *The Plant Cell* **11**(1), 101–113.
- Brasier C.M. (2009): *Phytophthora* biodiversity: How many *Phytophthora* species are there?. In: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. (Goheen E.M., Frankel S.J., eds.), USDA Forest Service General Technical Report PSW-GTR-221, Albany, U.S.A., 101–115.
- Calderini O., Bögre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. (1998): A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science* **111**, 3091–3100.

- 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.
- Cargnello M. a Roux P.P. (2011): Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**(1), 50-83.
- Colcombet, J. a Hirt, H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs, a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217–226.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823.
- Danquah A., Zélicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2015): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* **32**, 40–52.
- Desikan R., Hancock J.T., Ichimura K., Shinozaki K., Neill S.J. (2001): Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *The Plant Physiology* **126**(4), 1579–1587.
- Dhanasekaran D.N., Kashef K., Lee C.M., Xu H., Reddy E.P. (2007): Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**, 3185–3202.
- Dietrich A., Mayer J.E. a Hahlbrock K. (1990): Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 6360-6368.
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H. (2007): Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**, 453–456.
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G. B. (2002): A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962–966.
- Fernandez-Pascual M., Lucas M.M., Felipe M.R., Bosca L., Hirt H., Golvano M.P. (2006): Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2735-2742.
- Garfinkel D. J. a Nester E.W. (1980): *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology* **144**, 732-743.
- 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.
- Gunn Ch.R., Skrdla W.H., Spencer H.C. (1978): *Classification of Medicago Sativa L. Using Legume Characters and Flower Colors*. Agricultural Research Service US Department of Agriculture, Washington D.C., U.S.A., 84 stran.
- Guo J. a Chen J.G. (2008): RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **8**, 108.
- Gupta R., a Chakrabarty S. K. (2013): Gibberellic acid in plant, still a mystery unresolved. *Plant Signaling & Behavior* **8**(9), <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.25504>.
- Hashimoto M., Komatsu K., Maejima K., Okano Y., Shiraiishi T., Ishikawa K., Takinami Y., Yamaji Y., Namba S. (2012): Identification of three MAPKKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in. *BMC Plant Biology* **12**(1), 103.
- He C., Tien Fong S.H., Yang D., Wang G.L. (1999): BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **12**, 1064–1073.
- Hiei Y., Komari T., Kubo T. (1997): Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* **35**, 205–218.
- Hirt H. a Heberle-Bors E. (1994): Cell cycle regulation in higher plants. *Seminars in Developmental Biology* **5**, 147–154.
- Chen L., Chen Q., Zhu Y., Hou L., Mao P. (2016): Proteomic Identification of Differentially Expressed Proteins during Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flower Development. *Frontiers in Plant Science* **7**, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01502/full>.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Hayashida N., Seki M., Shinozaki K. (1998a): Molecular cloning and characterization of three cDNAs encoding putative mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs) in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* **5**, 341–348.

- 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**(2), 532-543.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases AtMPK4 and AtMPK6. *The Plant Journal* **24**(5), 655–665.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002): Mitogen activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Ishihama N., Yamada R., Yoshioka M., Katou S., Yoshioka H. (2011): Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *The Plant Cell* **23**, 1153–1170.
- Jalmi S. K., Sinha A. K. (2015): ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences. *Frontiers in Plant Science* **6**(769), <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00769>.
- Jin H., Liu Y., Yang K.Y., Kim C.Y., Baker B., Zhang S. (2003): Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *The Plant Journal* **33**, 719–731.
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Baker P. J., Huskisson N.S., Hirt H. (1996): Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **93**, 11274-11279.
- 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.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., 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**(11), 2247–2258.
- Kim S.H., Kim H.S., Bahk S., An J., Yoo Y., Kim J.Y., Chung W.S. (2017): Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **45**(11), 6613–6627.
- 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**(1), 150-154.
- Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996): Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 1156-1160.
- Kohoutová L., Kourová H., Nagy S.K., Volc J., Halada P., Mészáros T., Meskiene I., Bögre L., Binarová P. (2015): The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase 6 is associated with-tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytologist* **207**, 1061–1074.
- Kong X., Pan J., Zhang D., Jiang S., Cai G., Wang, L. (2013): Identification of mitogen-activated protein kinase kinase gene family and MKK-MAPK interaction network in maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **441**, 964–969.
- 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 U.S.A.* **97**(6), 2940–2945.
- 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.
- Lampard G.R., Wengier D.L., Bergmann D.C. (2014): Manipulation of mitogen-activated protein kinase kinase signaling in the *Arabidopsis* stomatal lineage reveals motifs that contribute to protein localization and signaling specificity. *The Plant Cell* **26**, 3358–3371.

- Lee H. Y. a Back K. (2016): Mitogen-activated protein kinase pathway are required for melatonin-mediated defense responses in plants. *Journal of Peneal Research* **60**(3), 327-335.
- Levitt J. (1980): *Responses of Plants to Environmental Stresses: Vol. I. Chilling Freezing and High Temperature Stresses*. 2nd ed., Academic Press, New York, U.S.A., 407-414.
- Ligterink W. a Hirt H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: Versatile signaling tools. *Internal Review of Cytology* **201**, 209–215.
- Liu Y., Zhang S., Klessig D.F. (2000): Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase kinase that interacts with SIPK. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **13**(1), 118-124.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. (2004): A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *The Cell* **116**, 109–119.
- Matzke M.A. a Matzke A.J.M. (1998): Epigenetic silencing of plant transgene as a consequence of diverse cellular defense responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 94-103.
- Matzke M.A., Primig M., Trnovsky J., Matzke A.J. (1989): Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *The EMBO Journal* **8**, 643–649.
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662–668.
- Meskiene I., Baudouin E., Schweighofer A., Liwosz A., Jonak C., Rodriguez P.L., Jelinek H., Hirt H. (2003): Stress-induced Protein Phosphatase 2C Is a Negative Regulator of a Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **278**(21), 18945-18952.
- Meskiene I., Ligterink W., Bögre L. Jonak C., Kiegerl S., Balog J., Eklof S., Ammerer G., Hirt H. (1998): The SAM kinase pathway: An integrated circuit for stress signaling in plants. *Journal of Plant Research* **111**(2), 339–344.
- Mette M.F., Aufsatz W., Van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J. (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by doublestranded RNA. *The EMBO Journal* **19**, 5194–5201.
- 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* **5**(1), 111-122.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for amitogen-activated protein kinase and anS6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **93**(2), 765–769.
- Monroy A.F. a Dhindsa R.S. (1995): Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *The Plant Cell* **7**, 321-331.
- Morrison D.K. a Davis R.J. (2003): Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual Review of Cell Developmental Biology* **19**, 91–118.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(26), 26959–26966.
- Nguyen X.C., Hoang M.H., Kim H.S., Lee K., Liu X.M., Kim S.H., Bahk S., Park H.C., Chung W.S. (2012): Phosphorylation of the transcriptional regulator MYB44 by mitogen activated protein kinase regulates *Arabidopsis* seed germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **423**(4), 703–708.
- Nishimura A., Yamamoto K., Oyama M., Kozuka-Hata H., Saito H., Tatebayashi K. (2016): Scaffold protein Ahk1, which associates with Hkr1, Sho1, Ste11, and Pbs2, inhibits cross talk signaling from the Hkr1 osmosensor to the Kss1 mitogen-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* **36**, 1109–1123.
- Nürnberg T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W.R., Hahlbrock K., Scheel D. (1994): High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**(3), 449-460.
- Ogden A. J., Gargouri M., Park J., Gang D. R., Kahn M. L. (2017): Integrated analysis of zone-specific protein and metabolite profiles within nitrogen-fixing *Medicago truncatula-Sinorhizobium medicae* nodules. *PloS One* **12**(7), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180894>.

- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Šamajová V., Luptovčiak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichstscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seeding susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2335–2350.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. (2000): Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *The Cell* **103**(7), 1111–1120.
- 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.
- Posas F. a Saito H. (1997): Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**, 1702–1705.
- Pratt A.J. a MacRae I.J. (2009): The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Journal of Biological Chemistry* **284**(27), 17897-17901.
- Raja V., Majeed U., Kang H., Andrabi K. I., John R. (2017): Abiotic stress: interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany* **137**, 142–157.
- Robbins D. J., Zhen E., Owaki H., Vanderbilt C.A., Ebert D., Geppert T.D., Cobb M.H. (1993): Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **268**(7), 5097-5106.
- Robinson M.J., Cobb M. H. (1997): Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 180–186.
- Rodriguez P.L. (1998): Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology* **38**(6), 919-927.
- Samac D.A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.) In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 343, *Agrobacterium Protocols*, 2/e, Vol 1, (Wang K. ed.), Humana Press Inc., Totowa, U.S.A., 301-311.
- Sacks W., Nürnberger T., Hahlbrock K., Scheel D. (1995): Molecular characterization of nucleotide sequences encoding the extracellular glycoprotein elicitor from *Phytophthora megasperma*. *Molecular and General Genetics* **246**, 45-55.
- Samuel M.A., Walia A., Mansfield S.D., Ellis B.E. (2005): Overexpression of SIPK in tobacco enhances ozone-induced ethylene formation and blocks ozone-induced SA accumulation. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2195-2201.
- 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* **31**(5), 629-638.
- Seguí-Simarro J. M., Testillano P. S., Jouannic S., Henry Y., Risueño M. C. (2005): Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Histochemistry and Cell Biology* **123**, 541–551.
- 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.
- Schoenbeck M.A., Samac D.A., Fedorova M., Gregerson R.G., Gantt J.S., Vance C.P. (1999): The alfalfa (*Medicago sativa*) TDY1 gene encodes a mitogen-activated protein kinase homolog. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **12**(10), 882–893.
- Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J.N., Kooter J.M. (2001): Transcription and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* **11**(6), 436-440.
- Sinha A.K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, **6**(2), 196-203.
- Slavík B. (2000): *Květena České republiky*. 6th ed., Academia, Praha, Česká republika, 770 stran.
- Smékalová V., Luptovčiak I., Komis G., Šamajová O, Ovečka M., Doskočilová A., Takáč T., Vadovič P., Novák O., Pechan T., Ziemann A., Košútová P., Šamaj J. (2014): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryogenic root development through auxin up regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* **203**, 1175–1193.

- Smékalová V., Daskocilova A., Komis G., Samaj J. (2013): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2–11.
- Smertenko A.P., Chang H.Y., Sonobe S., Fenyk S.I., Weingartner M., Bögre L., Hussey P.J. (2006): Control of the AtMAP65–1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of Cell Science* **119**, 3227–3237.
- Sojka J. (2018): *Měření abundance a aktivity MAP kinas v transgenních rostlinách Medicago sativa*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika.
- Stanko V., Giuliani C., Retzer K., Djamei A., Wahl V., Wurzinge, B., Kragler, F. (2014): Timing is everything: highly specific and transient expression of a MAP kinase determines auxin-induced leaf venation patterns in *Arabidopsis*. *Molecular plant* **7**(11), 1637–1652.
- Stephenson M. J., Reed J., Brouwer B., Osbourn A. (2018): Transient Expression in *Nicotiana Benthamiana* Leaves for Triterpene Production at a Preparative Scale. *Journal of Visualized Experiments* **138**, <https://doi.org/10.3791/58169>.
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T. (2002): A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959–962.
- Stroud H., Ding B., Simon S.A., Feng S., Bellizzi M., Pellegrini M., Wang G.L., Meyers B.C., Jacobsen S.E. (2013): Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. *eLife* **2**, <https://elifesciences.org/articles/00354>.
- Suzuki T., Matsushima C., Nishimura S., Higashiyama T., Sasabe M., Machida Y. (2016): Identification of phosphoinositide-binding protein PATELLIN2 as a substrate of *Arabidopsis* MPK4 MAP kinase during septum formation in cytokinesis. *The Plant Cell Physiology* **57**, 1744–1755.
- Šamaj J., Ovecka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal* **21**, 3296–3306.
- Takahashi Y., Uehara Y., Berberich T., Ito A., Saitoh H., Miyazaki A., Terauchi R., Kusano T. (2004): A subset of hypersensitive response marker genes, including *HSR203Jm* is the downstream target of a spermin signal transduction pathway in tobacco. *The Plant Journal* **40**(4), 586–595.
- Tanoue T., Adachi M., Moriguchi T., Nishida E. (2000): A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* **2**, 110–116.
- Teige M., Scheinkl 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**(1), 141–152.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barely transformation. *The Plant Journal* **11**(6), 1369–1376.
- Ueda M., Aichinger E., Gong W., Groot E., Verstraeten I., Vu L.D., De Smet I., Higashiyama T., Umeda M., Laux T. (2017): Transcriptional integration of paternal and maternal factors in the *Arabidopsis* zygote. *Genes and Development* **31**(6), 617–627.
- Valentine A. J., Kleinert A., Benedito V. A. (2017): Adaptive strategies for nitrogen metabolism in phosphate deficient legume nodules. *The Plant Science* **256**, 46–52.
- Valíček P. (2002): *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. 2nd ed., Academia, Praha, Česká republika, 486 stran.
- Valvekens D., Montagu M.V., Lijsebettens M.V. (1988): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**(15), 5536–5540.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**(1), 63–73.
- Wankhede D. P., Misra M., Singh P., Sinha A. K. (2013): Rice mitogen activated protein kinase kinase and mitogen activated protein kinase interaction network revealed by in-silico docking and yeast two-hybrid approaches. *PLoS One* **8**(5), <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065011>.

- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H.L. (1994): RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *The Cell* **76**, 567–576.
- Weinhold A., Kallenbach M., Baldwin I.T. (2013): Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuata* plants. *BMC Plant Biology* **13**, <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-99>.
- Whitmarsh A.J. a Davis R.J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(12), 481-485.
- Wick S.M. (1991): Spatial aspects of cytokinesis in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology* **3**, 253–260.
- Wolniak S.M., Larsen P.M. (1995): The timing of protein kinase activation events in the cascade that regulates mitotic progression in *Tradescantia* stamen hair cells. *The Plant Cell* **7**, 431–445.
- Xu C., Liu R., Zhang Q., Chen X., Qian Y., Fang W. (2017): The diversification of evolutionarily conserved MAPK cascades correlates with the evolution of fungal species and development of lifestyles. *Genome Biology and Evolution* **9**, 311–322.
- Yamada K., Yamaguchi K., Shirakawa T., Nakagami H., Mine A., Ishikawa K., Fujiwara M., Narusaka M., Narusaka Y., Ichimura K., Kobayashi Y., Matsui H., Nomura Y., Nomoto M., Tada Y., Fukamizo T., Tsuda K., Shirasu K., Shibuya N., Kawasaki T. (2016): The *Arabidopsis* CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *The EMBO Journal* **35**, 2468–2483.
- Yang K.Y., Liu Y., Zhang S. (2001): Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 741-746.
- Yang L., Li L., Liu H.Y., Sen L., Xing F., Chen L.L. (2014): CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular Plant* **7**(9), 1494-1496.
- Yuasa T., Ichimura K., Mizoguchi T., Shinozaki K. (2001): Oxidative Stress Activates ATMPK6, an *Arabidopsis* Homologue of MAP Kinase, *Plant and Cell Physiology* **42**(9), 1012–1016.
- Zanke B. W., Boudreau K., Rubie E., Winnett E., Tibbles L. A., Zon L. (1996): The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Current Biology* **6**, 606–613.
- Zhang F., Strand A., Robbins D., Cobb M.H., Goldsmith E.J. (1994): Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**, 704–711.
- 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 MKK4/5 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **92**(6), 1005-1019.
- Zhang S., Liu Y. (2001): Activation of Salicylic-Induced Protein Kinase, a Mitogen-Activated protein Kines, Induces Multiple Defense Responses in Tobacco. *The Plant Cell* **13**(8), 1877-1890.
- 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. *Plant Journal* **52**, 1066–1079.
- 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.
- Zhu Z., Hughes K.W., Huang L (1991): Effects of 5-azacytidine on transformation and gene expression in *Nicotiana tabacum*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* **27**, 77–83.
- Zwerger K. a Hirt H. (2001): Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Journal of Biological Chemistry* **382**, 1123–1131.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctová
35S CaMV	promotor 35S z viru kvěťákové mozaiky
A	absorbance
ANP1	protein kinasa 1 lokalizovaná v jádře a fragmoplastu
BiFC	bimolekulární fluorescentní komplementace
BSA	hovězí sérový albumin
BWMK	poraněním indukovaná MAP kinasa
CDP kinasa	Ca ²⁺ závislá protein kinasa
CDPK	cyclin závislá protein kinasa
CM	cytoplazmatická membrána
DHPT	kyselina 1,3-diamino-2-hydroxypropan-tetraoctová
DTT	dithiotreitol
EB1c	konec vázající protein 1c
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctovou
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová
HAMK	teplem aktivovaná MAP kinasa
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina
HRP	křenová peroxidasa
IAA	kyselina indol-3-octová
MAP65	na mikrotubul asociovaný protein 65
MAPK	mitogen-aktivované protein kinasy
MAPKK	mitogen-aktivované protein kinasy kinasy

MAPKKK	mitogen-aktivované protein kinasy kinasy kinasy
MMK	<i>Medicago</i> MAP kinasa
MKK	MAP kinasa kinasa
MP2C	proteinová fosfatasa 2C z vojtěšky seté
MPK	mitogen proteinová kinasa
MS médium	Murashige & Skoog médium
NTF	jaderný transportní faktor
OMTK1	domnělá mitogenem aktivovaná proteinová kinasa 1
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PRKK	patogen responsibilní MAPKK
PRR	vzor rozpoznávající receptor
PTGS	post-transkripční genové umlčení
PVDF	polyvinylidendifluorid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RACK1	receptor aktivované C kinasy 1
RB	elektroforetický pufr
RCF	relativní centrifugační síla
RLCK	receptoru podobná cytosolická kinasa
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčka za minutu
RT PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SAMK	stresem aktivovaná MAP kinasa
SDS	dodecylsulfát sodný

SIMK	stresem indukovaná MAP kinasa
SIMKK	stresem indukovaná MAP kinasa kinasa
SIPK	protein kinasa indukovaná kyselinou salicylovou
SIPKK	protein kinasa kinasa indukovaná kyselinou salicylovou
SYMRK	symbiotická receptoru podobná kinasa
TAE	Pufř s Tris-bází, octovou kyselinou a EDTA
TB	transferový pufř
TBS	Tris-HCl solný pufř
TBS-T	Tris-HCl solný pufř s přídavkem Tween 20
TDY1	Domnělý aktivační motiv v MAPK genu <i>TDY1</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGS	Transkripční genové umlčení
VIP1	Vir E2 interagující protein
WIPK	Poraněním indukovaná protein kinasa