

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie



**Selekce mutantních linií mitogen-aktivované  
proteinkinasy 3 z *A. thaliana* připravených pomocí  
technologie CRISPR/Cas9**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Markéta Kořistková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.</b>
Rok:	2018

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

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala své vedoucí Mgr. Veronice Zapletalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala při zpracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Pavlu Křenkovi, Ph.D. za doplňující konzultace. Děkuji také kolektivu z laboratoře za vstřícnost a příjemnou atmosféru při vypracovávání experimentální práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svojí rodině a přátelům, především rodičům a příteli, za jejich podporu během studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Kořistková
Název práce	Selekce mutantních linií mitogen-aktivované proteinkinasy 3 z <i>A. thaliana</i> připravených pomocí technologie CRISPR/Cas9
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF UP
Vedoucí práce	Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

## Abstrakt

Mitogen-aktivované proteinkinasy se nachází ve všech eukaryotických buňkách, kde tvoří signální dráhy důležité pro reakci na abiotické a biotické stresy, buněčné dělení, diferenciaci nebo vývoj. Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3) se zapojuje do odpovědi rostlin především na abiotický stres, a to hlavně na stres oxidativní, osmotický, z těžkých kovů nebo z nízkých teplot. Metoda CRISPR/Cas9 patří mezi nejnovější technologie úpravy genomu pomocí programovatelných nukleas. Nukleasa Cas9 je přesně naváděna na místo budoucí mutace ve dvoušroubovici DNA, kde tvoří tzv. dvojité zlomy. Tyto zlomy jsou následně opravovány buněčnými procesy, při kterých může dojít ke vzniku mutace. Hlavními cíli této práce byla selekce mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-5* připravených právě technologií CRISPR/Cas9, dále určení typu mutace pomocí sekvencování a potvrzení nepřítomnosti proteinu MPK3 u této mutantní linie. Při genotypizaci byl identifikován jeden homozygotní mutant, jeden transheterozygotní mutant a velké množství heterozygotních mutantů. U mutantních linií byla dále testována přítomnost transkriptu genu *MPK3*. Ten byl však nalezen i u homozygotní a transheterozygotní rostliny. Dalším krokem bylo testování přítomnosti proteinu MPK3 u linií mutantů *mpk3-5*. Bylo ověřeno, že protein MPK3 se u homozygotních a transheterozygotních mutantů nevytváří. Další generace homozygotních a transheterozygotních mutantů byla použita pro zjištění adaptace těchto mutantních linií na působení oxidativního stresu, který byl aplikován ve formě přídatku peroxidu vodíku do kultivačního média. Významné rozdíly mezi rostlinami Col-0 a *mpk3-5* v odpovědi na stres však nebyly pozorovány. Jedním z možných důvodů je nízká koncentrace stresoru v médiu.

Klíčová slova	mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK), MPK3, <i>Arabidopsis thaliana</i> , CRISPR/Cas9, oxidativní stres
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Markéta Kořistková
Title	Selection of <i>Arabidopsis</i> mitogen-activated protein kinase 3 mutant lines prepared by CRISPR/Cas9 technology
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, UP
Supervisor	Mgr. Veronika Zapletalová, Ph.D.
The year of presentation	2018

### Abstract

Mitogen-activated protein kinases are found in all eukaryotic cells, where they form signaling pathways important for response to abiotic and biotic stresses, cell division, differentiation, or development. Mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3) is primarily involved in the response of the plant to abiotic stress, mainly to stress oxidative, osmotic, heavy metal stress or stress from low temperatures. The CRISPR/Cas9 method is one of the latest genome manipulation technologies using programmable nucleases. Cas9 nuclease is accurately directed to the site of a future mutation in the double helix of DNA, where it forms so-called double strand breaks (DSBs). These breaks are subsequently repaired by cell processes creating possible mutations. The main goals of this work were selection of *Arabidopsis thaliana* mutants called *mpk3-5* prepared by CRISPR/Cas9 technology, then determining the type of mutation by sequencing and confirmation of absence of MPK3 protein. One homozygous mutant, one transheterozygous mutant and a large number of heterozygous mutants were identified by genotyping. The presence of *MPK3* transcript was tested in identified mutant lines. However, the transcript was present in all mutant plants including homozygous and transheterozygous mutants. The next step was to test the presence of the MPK3 protein in the *mpk3-5* mutant lines. It has been verified that MPK3 is not produced in homozygous and transheterozygous mutants. A next generation of homozygous and transheterozygous mutants was used to determine the adaptation of these mutant lines to oxidative stress, which was applied as hydrogen peroxide addition to the culture medium. However, significant differences between Col-0 and *mpk3-5* plants in response to stress were not observed. One possible reason may be the low concentration of the stressor in the medium.

Keywords	mitogen-activated protein kinases (MAPK), MPK3, <i>Arabidopsis thaliana</i> , CRISPR/Cas9, oxidative stress
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	<b>2</b>
2.1	Mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs)	2
2.1.1	Kaskáda mitogen-aktivovaných proteinkinás	2
2.1.2	Regulace kaskády mitogen-aktivovaných proteinkinás	3
2.1.3	Mitogen aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (MAP3Ks)	5
2.1.4	Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy (MAP2Ks)	5
2.1.5	Mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs)	6
2.1.6	Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3)	7
2.1.6.1	Úloha MPK3 při oxidativním stresu	7
2.2	Programovatelné nukleasy a úprava genomu	10
2.2.1	Technologie ZFNs	11
2.2.1.1	Využití technologie ZFNs	12
2.2.2	Technologie TALENs	13
2.2.2.1	Využití technologie TALENs	14
2.2.3	Technologie CRISPR/Cas9	15
2.2.3.1	Historie CRISPR/Cas technologie	17
2.2.3.2	Využití CRISPR/Cas9 technologie	18
2.3	Modelový organismus <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>21</b>
3.1	Materiál	21
3.1.1	Použité přístroje	21
3.1.2	Software pro zpracování výsledků	21
3.1.3	Enzymy a chemikálie	22
3.1.4	Složení médií a roztoků	23
3.1.4.1	Kultivační média	23
3.1.4.2	Roztoky a gely	24
3.1.5	Rostlinný materiál	26
3.2	Metody	27
3.2.1	Povrchová sterilizace semen <i>A. thaliana</i>	27
3.2.2	Výsev semen na Petriho misku	27
3.2.3	Selekce mutantů <i>Arabidopsis mpk3-5</i>	27
3.2.4	Genotypizace vyselektovaných mutantů <i>mpk3-5</i>	28
3.2.4.1	Extrakce gDNA	28
3.2.4.2	Polymerasová řetězová reakce (PCR)	28
3.2.4.3	Agarosová elektroforéza	29
3.2.4.4	Purifikace PCR produktů	29
3.2.4.5	Příprava vzorků na sekvenaci	29
3.2.5	PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)	29
3.2.5.1	Izolace RNA a její ošetření DNase I	29
3.2.5.2	Reverzní transkripce	30
3.2.5.3	PCR	30
3.2.6	Extrakce proteinů	31
3.2.7	SDS-PAGE elektroforéza	31
3.2.8	Western blot	32
3.2.9	Aplikace oxidativního stresu na mutanty <i>mpk3-5</i>	33

<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>34</b>
4.1	Selekce mutantních rostlin <i>A. thaliana mpk3-5</i>	35
4.2	Určení mutantních rostlin <i>A. thaliana mpk3-5</i> pomocí genotypizace	37
4.3	Přítomnost transkriptu <i>MPK3</i> v mutantních rostlinách <i>mpk3-5</i>	42
4.4	Nepřítomnost proteinu <i>MPK3</i> v mutantních rostlinách <i>mpk3-5</i>	44
4.5	Působení oxidativního stresu na mutantní rostliny <i>mpk3-5</i>	47
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Použitá literatura</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>59</b>

## CÍLE

### TEORETICKÁ ČÁST

Zpracování literární rešerše na téma mitogen-aktivované proteinkinasy a editace genomu pomocí technologie CRISPR/Cas9

### PRAKTICKÁ ČÁST

Selekce transformovaných semen mutanta *A. thaliana mpk3-5* generace T2 připravených technologií CRISPR/Cas9

Amplifikace mutované části genu mitogen-aktivované proteinkinasy 3 (*MPK3*) metodou PCR

Ověření přítomnosti mutace v genu *MPK3* prostřednictvím sekvencování DNA

Potvrzení absence proteinu MPK3 v mutantních rostlinách *A. thaliana mpk3-5*



# 1 ÚVOD

U rostlin, jakožto sesilných organismů, existují různé mechanismy adaptace na vnější podmínky zahrnující rychlé regulace enzymové aktivity a expresi genů. Jeden z takových mechanismů jsou kaskády mitogen-aktivovaných proteinkinás (MAPK), které jsou přítomny ve všech eukaryotických organismech. MAPK se u rostlin zapojují do regulace vývoje, růstu, programovatelné buněčné smrti a účastní se odpovědí na různé podněty z okolního prostředí jako změny teplot, UV záření, sucho nebo přítomnost patogenů. Každá MAPK kaskáda se skládá minimálně ze 3 kinás: mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa (MAP3K), mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa (MAP2K) a mitogen-aktivovaná proteinkinasa (MAPK). Signál z receptoru je přenášen aktivací jednotlivých kinás pomocí fosforylace až na konečný substrát. Deaktivace přenosu signálu je zprostředkována pomocí MAPK fosfatas (MKPs), které kinasy defosforylují, a tím ukončují signalizaci (Jonak *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Colcombet a Hirt, 2008). Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3) patří mezi nejstudovanější MAPK, která se zapojuje především při působení abiotických stresů, a to oxidativního, osmotického, stresu z těžkých kovů nebo z nízkých teplot, ale také při stresu biotickém způsobeném patogeny (Colcombet a Hirt, 2008; Smékalová *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Technologie CRISPR/Cas9 patří mezi nejnovější metody úpravy genomu pomocí programovatelných nukleas. Využívá komplexu nukleasy Cas9 a naváděcí RNA (single guide RNA), která navádí nukleasu na základě komplementarity bází na požadovaný úsek DNA. Cas9 nukleasa vytváří v DNA tzv. dvojité zlomy, které jsou následně opravované mechanismy buňky. Při těchto opravách může dojít ke vzniku mutace v sekvenci DNA. Výhodou této technologie oproti starším metodám je relativně snadná příprava konstruktů pro komplex Cas9/sgRNA (Jinek *et al.*, 2012; Gaj *et al.*, 2013). Tato technologie má velký aplikační potenciál především v medicíně jako nástroj pro genovou terapii nebo v zemědělství pro přípravu kvalitnějších a odolnějších plodin (Doudna a Charpentier, 2014).

Tato bakalářská práce pojednává o charakterizaci mutanta mitogen-aktivované proteinkinasy 3 z *A. thaliana* s označením *mpk3-5*, který byl připraven technologií CRISPR/Cas9.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs)

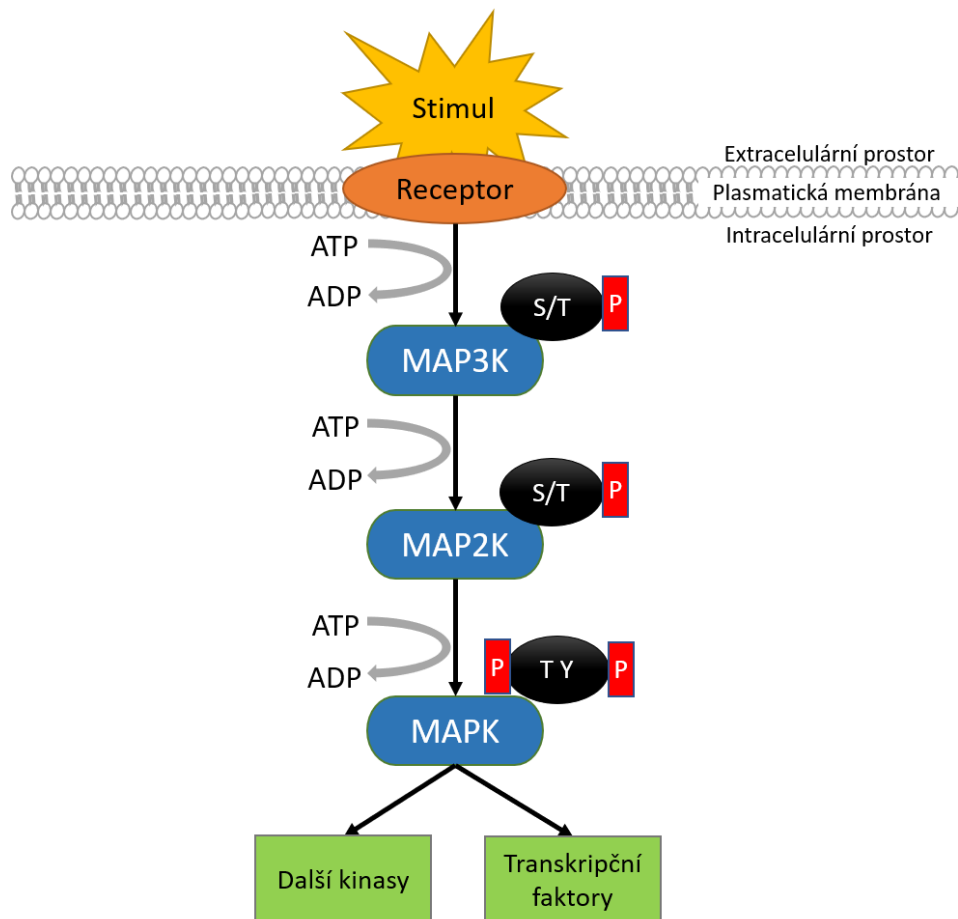
Jelikož rostliny nemohou uniknout před nepříznivými podmínkami prostředí, ve kterém žijí, vyvinuly se u nich obranné mechanismy k reakci a adaptaci na měnící se podmínky. Tyto adaptace zahrnují rychlou a dynamickou regulaci v enzymatické aktivitě a modifikaci v expresi genů. Jedním z těchto mechanismů je signální dráha mitogen-aktivovaných proteinkinasy (MAPKs). MAPKs jsou komplexy přítomné ve všech eukaryotických buňkách, tedy u všech rostlinných, živočišných a houbových organismů. Pomocí MAPKs je rostlina schopna reagovat na vnější stimuly z prostředí, např. biotické a abiotické stresy (Colcombet a Hirt, 2008).

#### 2.1.1 Kaskáda mitogen-aktivovaných proteinkinasy

Fosforylace a defosforylace je nejběžnější posttranslační úprava proteinů. Celkem 30 % proteinů v buňce je fosforylováno a je známo, že 5 % genomu zelených rostlin kóduje proteinkinasy (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Z toho přibližně 10 % všech proteinkinasy je zahrnuto v MAPK signální dráze. MAPKs vytváří kaskády, pomocí nichž jsou jednotlivé MAPKs fosforylovány, a tím aktivovány (Colcombet a Hirt, 2008).

MAPK kaskády se skládají minimálně ze tří kinasy (Obr. 1): mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (MAP3K, MAPKKK nebo MEKK), mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy (MAP2K, MAPKK nebo MKK) a mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK nebo MPK) (Jonak *et al.*, 2002) (Obr. 1). MAPK kaskáda začíná fosforylací MAP3K (serin-threonin kinasa), která fosforyluje buď serin nebo threonin v motivu S/T-X<sub>3-5</sub>-S/T MAP2K. Ta dále specificky fosforyluje aminokyseliny threonin a tyrosin konzervovaného motivu T-X-Y nacházející se u MAPK. MAPK může pokračovat ve fosforylaci substrátů, jako jsou další kinasy nebo transkripční faktory (Colcombet a Hirt, 2008) (Obr. 1).

Rostlina může MAPK signální dráhou regulovat mnoho buněčných pochodů, mezi které patří diferenciace, buněčné dělení nebo genová exprese, a tím se adaptovat na měnící se vnější podmínky životního prostředí (Zhang *et al.*, 2006; Colcombet a Hirt, 2008).

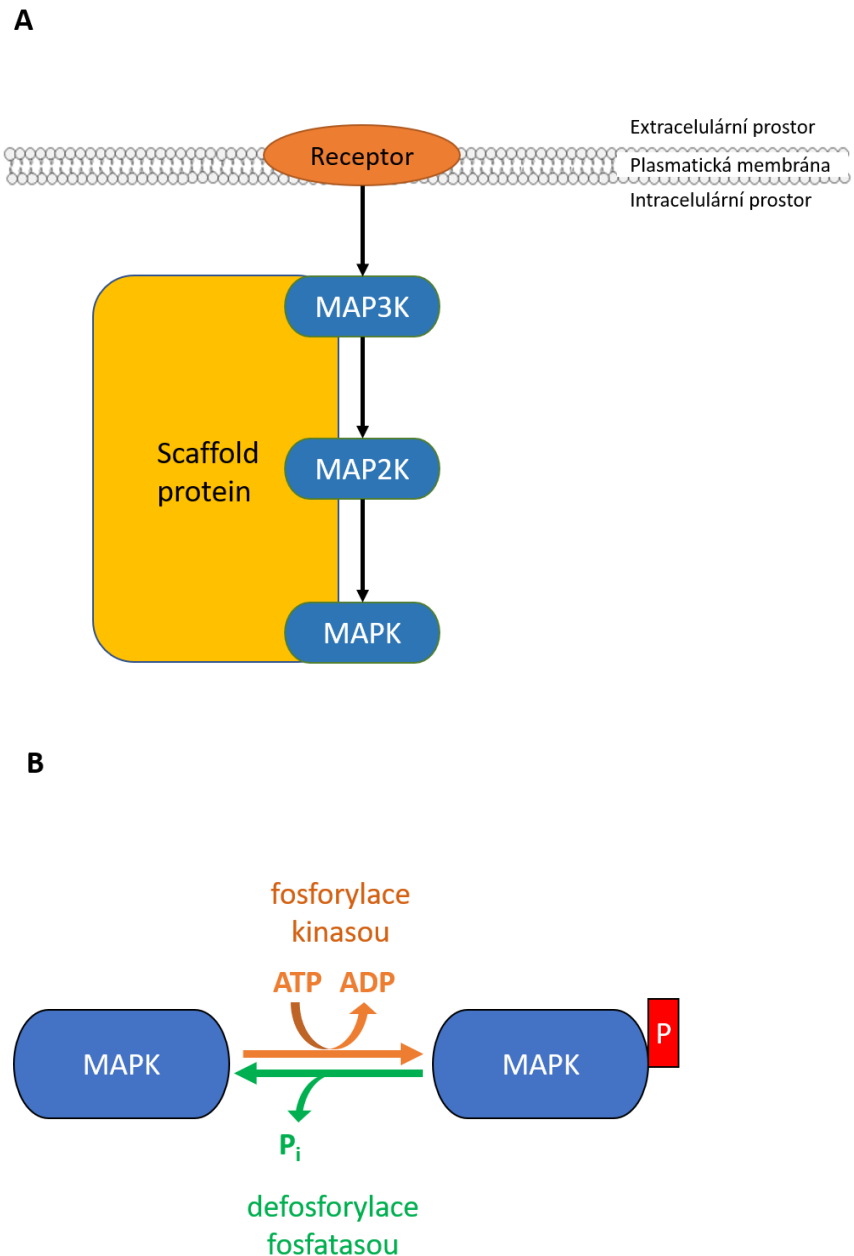


Obr. 1 Přenos signálu pomocí MAPK kaskády. Receptor zachytí stimul z vnějšího prostředí a předá signál fosforylací serinu nebo threoninu na MAP3K. Ta dále fosforyluje serin nebo threonin v motivu MAP2K, která fosforyluje threonin a tyrosin nacházející se v motivu MAPK. Signál je dále přenášen fosforylací z MAPK na konečné substráty, kterými mohou být další kinasy nebo transkripční faktory.

### 2.1.2 Regulace kaskády mitogen-aktivovaných proteinkinas

Mezi kinasami v MAPK kaskádě existují interakce, které jsou zprostředkované pomocí tzv. scaffold proteinů (Obr. 2A). Scaffold proteiny jsou proteiny schopné interagovat se všemi komponenty MAPK dráhy, a tím je regulovat. Mohou dané části přiblížit a naorientovat k sobě nebo se přímo účastnit přenosu signálu informace (Brown a Sacks, 2009). Scaffold proteiny mohou působit jako pozitivní nebo jako negativní regulátory MAPK signální dráhy (Garrington a Johnson, 1999).

Ukončení MAPK signalizace je zajištěno MAPK fosfatasou (MKP) (Colcombet a Hirt, 2008) (Obr. 2B). MAPK fosfatasy zajišťují defosforylaci aktivovaných (fosforylovaných) MAPKs a slouží tak jako negativní regulátory přenosu signálu pomocí MAPK kaskády. Je známo, že faktory aktivující MAPK kaskádu mohou aktivovat i MKPs (Kondoh a Nishida, 2007; Patterson *et al.*, 2009).



Obr. 2 Regulační mechanismy kaskády mitogen-aktivovaných proteinkinas. (A) Scaffold proteiny mohou interagovat se všemi komponenty MAPK kaskády. Mohou přibližovat dané kinasy k sobě, a tím usnadnit přenos signálu, nebo se přímo zapojit do přenosu signálu jako jedna z komponent MAPK kaskády. Scaffold proteiny mohou působit jako pozitivní, ale i jako negativní regulátory MAPK kaskády. (B) MAPK fosfatasy deaktivují MAPKs pomocí defosforylace, což způsobí ukončení přenosu signálu MAPK dráhou. MAPK fosfatasy slouží jako negativní regulátory MAPK kaskády.

### 2.1.3 Mitogen aktivované proteinkinasy kinasy kinasy (MAP3Ks)

Genom *Arabidopsis* kóduje 80 MAP3Ks (Ichimura *et al.*, 2002), což je mnohem více v porovnání s počtem MAP2Ks a MAPKs. Jedna MAP2K tak může být fosforylována i několika různými MAP3Ks. Je zde mnohem větší variabilita v jednotlivých skupinách (Champion *et al.*, 2004).

Mitogen aktivované proteinkinasy kinasy kinasy můžeme dělit na tři hlavní skupiny: MEKK-like kinasy, Raf-like kinasy a ZIK-like kinasy. MEKK-like kinasy spolu s Raf-like kinasami fungují jako MAP3Ks u rostlin, kdežto ZIK-like kinasy se u rostlin nevyskytují. Struktura MAP3K je specifická dlouhou terminální oblastí N- nebo C-konce, patrně kvůli regulaci a připojení MAP2K a MAPK (Colcombet a Hirt, 2008).

MEKK-like kinasy můžeme dále dělit na 4 podskupiny (A1-A4). Skupina A1 zahrnuje MAP3K1-4, která je aktivována například suchem, vysokou salinitou a dotykem (Mizoguchi *et al.*, 1996). Do skupiny A2 řadíme MAP3K $\alpha$  a MAP3K $\gamma$ , o jejichž funkci však nebyly doposud zjištěny bližší informace (Ichimura *et al.*, 2002). Do skupiny A3 patří ANP1-3 (*Arabidopsis* NPK1-related protein kinase 1-3), které obsahují regulační místo na C-konci a hrají důležitou roli při cytokinezi, oxidativním stresu a auxinové odpovědi (Kovtun *et al.*, 1998, 2000; Nishihama *et al.*, 2001). Skupina A4 obsahuje MAP3K $\epsilon$ 1 a MAP3K $\epsilon$ 2, které jsou specifické mnohonásobně delším C koncem a účastní se regulace dělení buněk (Jouannic *et al.*, 1999).

Raf-like kinasy se dělí do dvou skupin (B-C). Skupina B obsahuje 8 kinas. Mezi nejznámější patří CTR1 (Constitutive Triple Response 1) a EDR1 (Enhanced Disease Resistance 1), které se účastní signalizace vyvolané ethylenem nebo obrannou reakcí proti onemocnění (Kieber *et al.*, 1993; Frye *et al.*, 2001). Skupina C obsahuje pouze dvě proteinkinasy přítomné u *Arabidopsis*: ATN1-like (Atropin1-like) a MRK1 (*Arabidopsis* MLK/Raf-related protein kinase 1) (Ichimura *et al.*, 2002).

### 2.1.4 Mitogen-aktivované proteinkinasy kinasy (MAP2Ks)

V genomu *Arabidopsis* je kódováno pouze 10 MAP2Ks, z čehož vyplývá, že jedna MAP2K může aktivovat více MAPKs. Tato skutečnost má za následek aktivaci různých MAPKs a jejich propojení během přenosu informace. Sekvence fosforylačního místa u rostlinných MAP2Ks je S/TxxxxxS/T. Výjimku tvoří sekvence MKK10 u *Arabidopsis* zapříčiněná delecí tří aminokyselin v tomto motivu (Ichimura *et al.*, 2002). Na N-konci MAP2K se nachází připojovací místo pro odpovídající MAPKs (Bardwell a Thorner, 1996). MAP2Ks můžeme rozdělit do čtyř skupin (A-D) podle sekvence a struktury

(Ichimura *et al.*, 2002). V genech pro MAP2Ks skupin C a D nejsou obsaženy introny (Bardwell a Thorner, 1996).

Skupina A MAP2Ks zahrnuje MKK1 a MKK2, které aktivují MPK4. MKK1 je aktivována různými abiotickými stresy (Matsuoka *et al.*, 2002). Dále zde patří MKK6, která se účastní regulace buněčného dělení (Calderini *et al.*, 2001).

Do skupiny B řadíme MKK3, která navíc obsahuje na C-konci doménu nukleárního transportního faktoru 2. Jedná se o malý protein, který je nezbytný pro přenos makromolekul z jádra a do jádra. (Quimby *et al.*, 2000).

Skupina C se zapojuje do odpovědi na různé stresy a aktivují MAPKs ze skupiny A (Kiegerl *et al.*, 2000). Řadíme sem pouze dvě MAP2Ks: MKK4 a MKK5 (Ichimura *et al.*, 2002).

Poslední skupina D obsahuje čtyři MAP2Ks: MKK7, MKK8, MKK9, MKK10 (Ichimura *et al.*, 2002). Tyto MAP2Ks se zapojují do různých buněčných dějů, např. transportu auxinu, senescence listů, biosyntézy ethylenu a odpovědi na zasolení (Dai *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009).

### **2.1.5 Mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs)**

V genomu *Arabidopsis* je kódováno 20 MAPKs, které můžeme rozdělit do skupin A-D podle sekvence a aminokyselinového motivu TxY dané kinasy. Skupiny A, B a C obsahují aminokyselinový motiv TEY, zatímco skupina D obsahuje motiv TDY (Ichimura *et al.*, 2002).

Skupina A zahrnuje MPK3, MPK6 a MPK10. Tato skupina je nejvíce zapojena do enviromentální a hormonální odpovědi na biotický a abiotický stres. Například exprese genu *MPK3* je vyvolaná enviromentálním stresem a protein MPK3 je aktivován oxidativním stresem (Mizoguchi *et al.*, 1996).

Skupina B se zapojuje do odpovědi na enviromentální stres a buněčné dělení. Do této skupiny patří MPK4, MPK5, MPK11, MPK12 a MPK13 (Petersen *et al.*, 2000).

O skupině C zatím nejsou známe dostatečné informace. Z této třídy je nejznámější MPK7, která má vliv na cirkadiální rytmus u rostlin. Dále jsou zde zařazené MPK1, MPK2 a MPK14 (Bögre *et al.*, 1999).

Poslední skupina D obsahuje osm MPKs: MPK8, MPK9, MPK15, MPK16, MPK17, MPK18, MPK19 a MPK20 (Ichimura *et al.*, 2002). Na rozdíl od skupin A, B a C nemá tato skupina CD doménu (common docking domain) na C-konci (He *et al.*, 1999; Schoenbeck *et al.*, 1999). CD doména slouží jako připojovací místo pro MAPKK,

fosfatasy a proteinové substráty (Tanoue *et al.*, 2000). Obsahuje kyselá a hydrofobní residua, která jsou důležitá například při vzniku interakce s pozitivně nabitou D doménou MAPKK (Tanoue *et al.*, 2000; Enslen a Davis, 2001). Dalším rozdílem je, že mitogen aktivované proteinkinasy skupiny D mají výrazně delší N-konce (60-80 aminokyselin). Navíc u MPK8 a MPK9 se na N-koncích vyskytují regiony bohaté na serin (MPK8) a kyselinu glutamovou (MPK9) (He *et al.*, 1999; Schoenbeck *et al.*, 1999).

### **2.1.6 Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 (MPK3)**

Jak již bylo zmíněno, MPK3 je MAPK patřící do skupiny A a v aktivační smyčce je přítomen motiv TEY, který je fosforylován při aktivaci MPK3 (Ichimura *et al.*, 2002). MPK3 je jedna z nejvíce zapojených proteinkinás v abiotickém stresu u *Arabidopsis thaliana* (Colcombet a Hirt, 2008). MPK3 hraje důležitou roli při stresu osmotickém, oxidativním, chladovém a v přítomnosti těžkých kovů (Smékalová *et al.*, 2014), a reaguje také na přítomnost bakteriálního flagellinu (Wang *et al.*, 2014).

Studie z roku 2005 identifikovala 48 látek aktivovaných MPK3, z toho 26 substrátů je společných i pro MPK6 (Feilner *et al.*, 2005). Obě tyto MAPKs jsou zapojené do odpovědi na stres osmotický, oxidativní, z nízkých nebo vysokých teplot a při napadení rostliny patogenem (Smékalová *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). Jsou také zapojeny do vývoje pylu, pylové láčky a biosyntézy ethylenu (Hahn a Harter, 2009; Guan *et al.*, 2014a, 2014b). MPK3 i MPK6 je aktivována MKK4, MKK5, MKK7 a MKK9 (Hahn a Harter, 2009; Smékalová *et al.*, 2014).

Defosforylovaná (deaktivovaná) MPK3 se nachází volně v cytoplasmě, ale po fosforylaci (aktivaci) přechází do jádra, kde dále fosforyluje např. transkripční faktory (Ahlfors *et al.*, 2004; Colcombet a Hirt, 2008).

#### **2.1.6.1 Úloha MPK3 při oxidativním stresu**

Oxidativní stres vzniká při nadbytku reaktivních kyslíkových radikálů (Reactive Oxygen Species, ROS) v buňce, které se tvoří jako meziprodukty při aerobním metabolismu a vznikají při různých abiotických stresech (Suzuki *et al.*, 2011, 2012).

Mezi ROS zahrnujeme superoxidový radikál ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydroxilové radikály ( $\cdot\text{OH}$ ) a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sice není volný radikál a je slabším oxidačním činidlem než volný superoxidový radikál ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), ale v přítomnosti přechodných kovů (např. železo a měď) může být oxidován na extrémně reaktivní a toxický hydroxilový radikál ( $\cdot\text{OH}$ ) pomocí Fentonové reakce (Son *et al.*, 2011).

ROS jsou v buněčném systému za normálních podmínek deaktivovány antioxidačními proteiny, jako je superoxiddismutasa (SOD), katalasa, glutathionperoxidasa, thioredoxin a glutathion (GSH) (Son *et al.*, 2011). Při nízké koncentraci hrají ROS důležitou funkci jako sekundární poslové při buněčné signalizaci a regulaci a jejich hladiny jsou kontrolovány právě antioxidačními enzymy (Stoner *et al.*, 2008). Při zvýšené koncentraci ROS v buňce dochází ke zmiňovanému oxidativnímu stresu, při kterém se tvoří více oxidantů, než je buňka schopna pomocí antioxidačních enzymů odstranit a postupem času může být daná buňka poškozena (Thannickal a Fanburg, 2000; Valko *et al.*, 2007).

Oxidativní stres vzniká v rostlině hlavně při osmotickém stresu a intoxikací těžkými kovy a ozonem (Miles *et al.*, 2005, 2009; Liu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Ve většině případů ROS aktivují kaskádu, jejíž součástí je MPK3 a MPK6, ale i MPK4 (Pitzschke *et al.*, 2009; Lumberras *et al.*, 2010).

Studie z roku 2004 odhalila gen *OXII* (Oxidative signal-inducible1) (Obr. 3), který je zapojen do aktivace MPK3/MPK6 při oxidativním stresu. Tento gen kóduje serin/threonin kinasu, která je esenciální při aktivaci MPK3/MPK6 při hromadění ROS (Rentel *et al.*, 2004). Aktivace MPK3/MPK6 přes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> byla ověřena testováním *oxi1* mutantů. Z výsledků vyšlo najevo, že gen *OXII* je nezbytný pro aktivaci těchto dvou MAPKs. Protein OXII se zapojuje i do rezistence proti virulentním patogenům a je důležitý při kontrole růstu kořenových vlásků (Rentel *et al.*, 2004).

Jak již bylo řečeno, akumulace ROS vyvolávající oxidativní stres může být spuštěna působením těžkých kovů, např. kadmíem (Cd) (Obr. 3). Pomocí měření kinasové aktivity a koncentrace vznikajících ROS byly identifikovány dvě MPKs aktivované Cd, konkrétně MPK3 a MPK6 (Liu *et al.*, 2010).

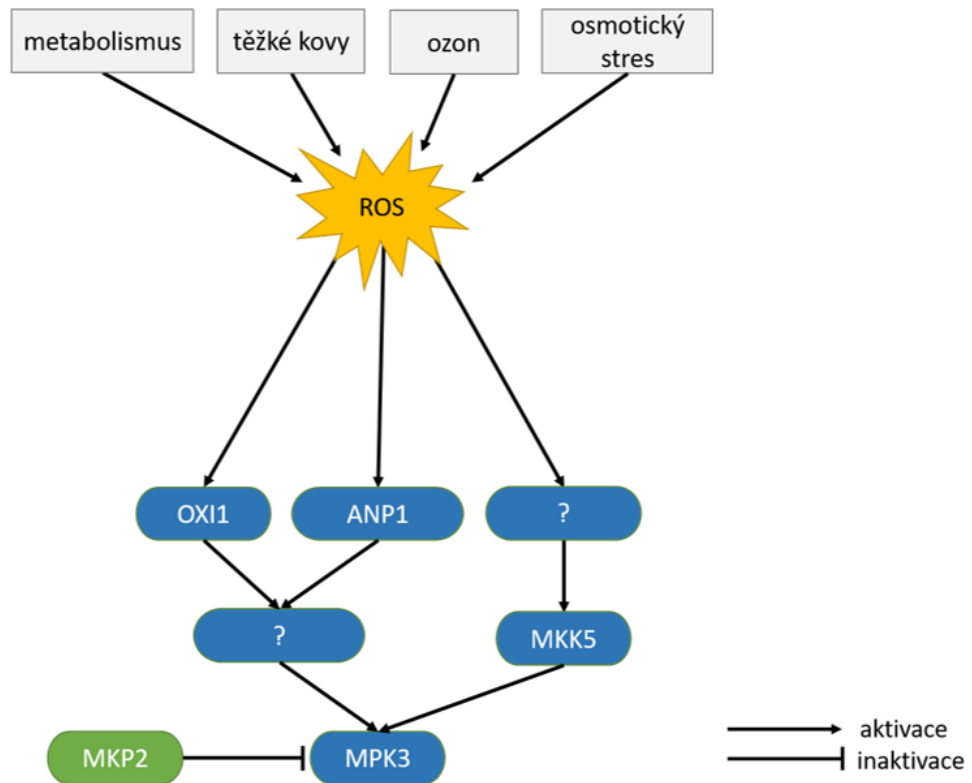
Důležitým proteinem regulujícím aktivitu MAPKs při oxidativním stresu je fosfatasa MKP2 (Obr. 3). MKP2 patří mezi dvojité-specifické fosfatasy, které deaktivují MPK3 a MPK6 defosforylací fosfothreoninových a fosfotyrosinových residuí (Camps *et al.*, 2000). Účinek této fosfatasy byl zkoumán ve studii z roku 2007, ve které bylo potvrzeno, že inaktivace MPK3 a MPK6 fosfatou MKP2 vede k větší toleranci k oxidativnímu stresu (Lee a Ellis, 2007).

Dalším regulátorem aktivity MPK3 při oxidativním stresu u *Arabidopsis* je MKK5 (Obr. 3), která reguluje aktivitu superoxiddismutasy (SOD) při tvorbě ROS (Miles *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2013).

Další protein ovlivňující MPK3 při oxidativním stresu je již zmíněná MAP3K nazývaná ANP1 (*Arabidopsis* NPK1-related protein kinase 1) (Obr. 3), která je



aktivovaná pomocí  $H_2O_2$  a dále fosforyluje MPK3 a MPK6. Výsledkem této kaskády je exprese tzv. genů reagujících na stres chránících rostlinu při stresových podmínkách. Aktivovaná ANP1 také inhibuje promotor reagující na přítomnost auxinu, čímž zpomaluje buněčný cyklus (Kovtun *et al.*, 2000).



Obr. 3 Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů a jejich funkce při aktivaci MAPKs. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) se tvoří jako meziprodukty metabolismu, při intoxikaci těžkými kovy nebo ozonem a při osmotickém stresu. Hromadící se ROS aktivují MAP3Ks OXI1 (Oxidative signal-inducible1) a ANP1 (*Arabidopsis* NPK1-related protein kinase 1). Kinasy OXI1 a ANP1 fosforylují MPK3 přes danou MAP2K, která nebyla doposud identifikována. MPK3 je při oxidativním stresu fosforylována i MKK5. Defosforylace MPK3 probíhá pomocí fosfatasy MKP2, která deaktivuje MPK3, a tím dochází k ukončení přenosu signálu.

## 2.2 Programovatelné nukleasy a úprava genomu

Změny genomu v organismech, které není možné provést přímou manipulací přes homologní rekombinaci, mohou být dosaženy zavedením dvojitých zlomů (double-strand breaks, DSBs) v požadovaném místě (Puchta *et al.*, 1996). Tyto zlomy jsou poté opravovány buněčnými procesy, při kterých může dojít ke vzniku mutace, jako je například inserce nebo delece části genu (Symington a Gautier, 2011). Pro indukci dvojitých zlomů v požadovaném místě DNA je potřeba programovatelná nukleasa, která štěpí DNA pouze specificky (Voytas, 2013; Puchta a Fauser, 2014). Jsou známy čtyři druhy programovatelných nukleas: modifikované meganukleasy, nukleasy zinkových prstů (zinc-finger nucleases, ZFNs), transcription activator-like nukleasy (TALENs) a nukleasy typu CRISPR/Cas (Colleaux *et al.*, 1986; Carroll, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

ZFNs a TALENs obsahují tandemové repetice v DNA-vazebných doménách, které mohou být naprogramovány k rozpoznání specifické sekvence DNA. Výsledkem je tak navádění chimerické nukleasy na místo zájmu, kde dojde ke vzniku DSBs, a tím k možné požadované mutaci. Nevýhodou těchto dvou typů programovatelných nukleas je nutnost připravit chimerický protein ke každé cílové sekvenci DNA, což představuje relativně zdlouhavý a obtížný proces. Z tohoto důvodu mají TALENs a ZFNs pouze omezenou využitelnost (Jinek *et al.*, 2012).

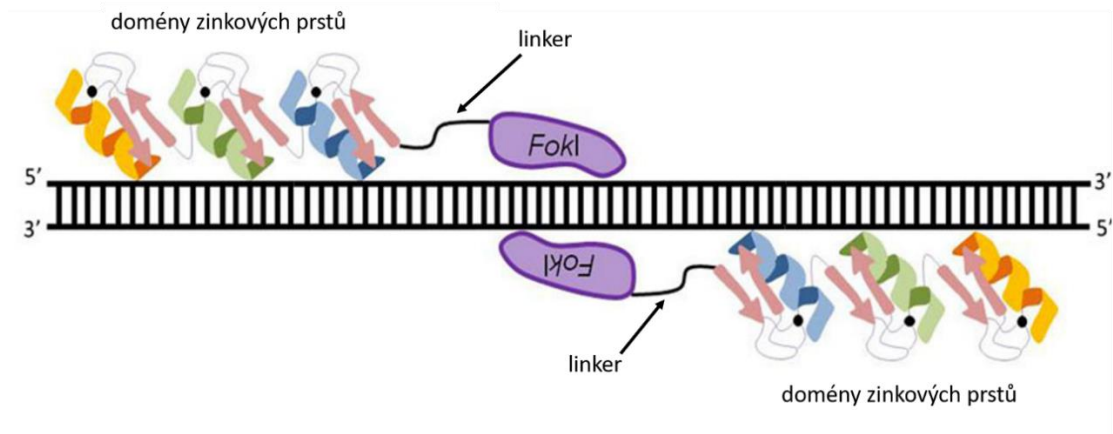
Technologie CRISPR/Cas je nejnovější z výše zmíněných technologií. Systém využívá krátké tzv. single guide RNA (sgRNA) k navádění endonukleasy Cas9 k určitému komplementárnímu místu v sekvenci DNA. Při této technice je výhodou širší specifita nukleasy a příprava pouze sgRNA na rozdíl od přípravy celého proteinu u technologií TALENs a ZFNs (Jinek *et al.*, 2012; Gaj *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Technologie ZFNs

Nukleasy zinkových prstů (Zinc-finger nucleases, ZFNs) byly první synteticky připravené programovatelné nukleasy odvozené od transkripčních faktorů s motivem zinkových prstů (Kim *et al.*, 1996). ZFNs se skládají ze dvou domén, z nichž jedna slouží pro navázání na DNA a druhá pro štěpení DNA za vzniku DSBs. Při konstrukci nukleas zinkových prstů se využívá restriční enzym typu IIS *FokI*, u kterého jsou přítomny domény pro vazbu na DNA a její štěpení (Li *et al.*, 1992). Doména pro štěpení nevykazuje žádnou sekvencovou specifitu, ale samotné štěpení může být naprogramováno nahrazením domény pro navázání (Kim a Chandrasegaran, 1994; Kim *et al.*, 1996, 1998).

Nejčastěji se využívají ZFNs s Cys2-His2 doménou, což jsou běžné typy vazebných motivů nalezených v eukaryotech, a zastupují druhou nejrozšířenější kódující proteinovou doménu v lidském genomu (Beerli a Barbas, 2002). Struktura zinkového prstu je tvořena  $\alpha$ -helixem a  $\beta$ -skládaným listem, mezi kterými se nachází vazebné místo pro atom zinku. Tento  $\alpha$ -helix je tvořen 30 aminokyselinami (Pavletich a Pabo, 1991) a pomocí aminokyselin na povrchu  $\alpha$ -helixu se vazebná doména nukleasy váže na triplet bází ve velkém žlábků DNA (Liu *et al.*, 1997) (Obr. 4).

Důležitá pro vznik DSBs je štěpicí doména *FokI* (Obr. 4), která musí dimerizovat ještě před štěpením DNA (Bitinaite *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Dimerizace je nezbytná, protože samotný monomer není aktivní a pokud se naváže na DNA, nedochází ke stříhu (Carroll, 2011). Jelikož samotný dimer tvořen *FokI* doménami je spojen pouze slabou interakcí, k docílení stříhu je potřeba vytvoření dvou setů zinkových prstů (Obr. 4). Každý set se připojí linkerem k monomerní stříhací doméně *FokI* a pokud se oba sety prstů navážou do sousedící sekvence DNA, vysoká koncentrace *FokI* domény v jednom místě ulehčí dimerizaci a následně i stříh. Několik studií prokázalo, že optimálním uspořádáním je použití krátkého linkeru o velikosti 5-6 bp mezi doménou *FokI* a doménou zinkových prstů (Bibikova *et al.*, 2001; Händel *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2009).



Obr. 4 Ilustrace nukleasy typu zinkového prstu (ZFN) po navázání na vlákno DNA a dimerizaci. ZFNs se skládá z DNA-vazebné domény a štěpící domény. Vazebná doména je tvořena motivy zinkových prstů, které jsou spojené do tandemu za sebou. Každý zinkový prst reaguje se třemi nukleotidy a specificky se tak váže na DNA vlákno. Štěpící doména je tvořena endonukleasou *FokI*. Při dimerizaci dochází ke spojení dvou endonukleas *FokI*, teprve poté může dojít ke štěpení DNA za vzniku DSBs. Po štěpení dojde k uvolnění ZFN z vlákna DNA (převzato z Mahfouz *et al.*, 2014).

### 2.2.1.1 Využití technologie ZFNs

Obecně jakýkoliv gen může být upraven pomocí správně navržených ZFNs. Rozpoznání určité sekvence pomocí nukleasy zinkových prstů závisí pouze na kompatibilitě s DNA a mechanismy opravy DNA. ZFN může být do živočišných buněk vnesena například injekčně přímo do embrya ve formě mRNA. Tímto způsobem byli připraveni knock-out mutanti zebřičky (*Danio rerio*) a také tak byl upraven genom krys (Geurts *et al.*, 2009; Mashimo *et al.*, 2010) a myši (Carbery *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2010).

Výzkumy pro klinické využití ZFNs se zaměřují především na terapeutické aplikace. Jednou z takových aplikací je knock-out mutace genu *CCR5*, který tvoří protein fungující jako kofaktor viru HIV-1. Bylo zjištěno, že pacienti bez tohoto proteinu vykazují rezistenci k onemocnění AIDS po infekci virem HIV. Metoda zahrnuje izolaci prekurzorů T-buněk, efektivní mutagenезi *CCR5* genů pomocí ZFN, expanzi buněk a reimplantaci takto upravených buněk zpět do donora. Tato metoda je považována za první možnou aplikaci ZFNs k terapeutickým účelům (Urnov *et al.*, 2010; Carroll, 2011).

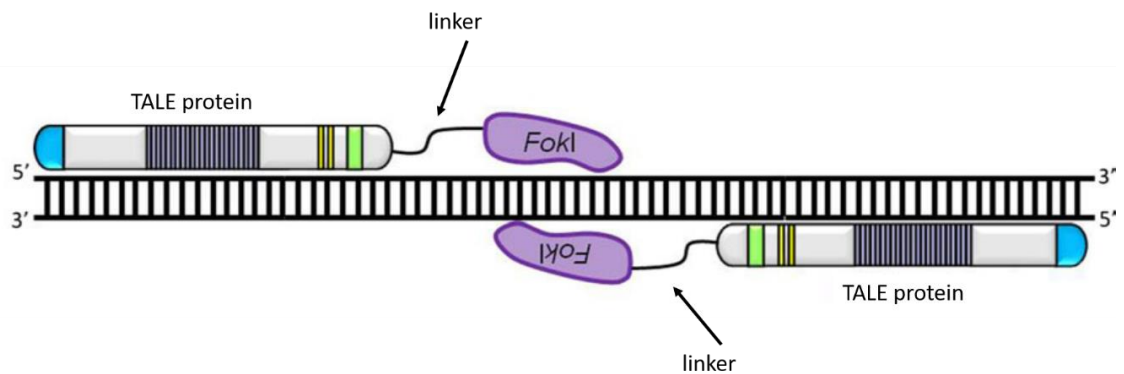
Aplikace ZFNs na hospodářské plodiny je prozatím ve fázi vývoje. Pomocí modelového organismu *Arabidopsis thaliana* se zkoumají různé možnosti využití ZFNs u dalších rostlinných druhů (Carroll, 2011). Prozatím byla technologie ZFNs využita u tabáku a kukuřice, kde byly modifikovány buňky kalusu, ze kterých následně regeneruje celá rostlina (Shukla *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2009).

## 2.2.2 Technologie TALENs

Nukleasy typu TALEN jsou vytvářeny spojením transkripčních aktivačních efektorů (transcription activator-like effectors, TALEs) se štěpící doménou tvořenou endonukleasou *FokI* stejně jako v případě ZFNs (Christian *et al.*, 2010; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011) (Obr. 5). TALEs jsou přirozeně tvořeny fytopatogenní bakterií rodu *Xanthomonas*. TALEs jsou sekretovány bakterií do rostlinných buněk, kde jsou schopny přeprogramovat transkripční mechanismus hostitele (Boch a Bonas, 2010). Účinkují v buněčném jádře, kde se váží na promotory genů rezistence nebo citlivosti na danou bakterii a upravují jejich expresi (Römer *et al.*, 2009).

TALEs proteiny jsou tvořeny doménou pro sekreční signál typu III vázanou na N-konci, dále doménou obsahující jaderný rozpoznávací signál na C-konci a acidickou aktivační doménou (acidic activation domain, AAD) a doménou vázající se na DNA (DNA-binding domain, DBD) (Bogdanove a Voytas, 2011). Centrální DBD je složena z aminokyselinových repetitiv o délce 33-35 AMK, které se liší v závislosti na typu TALE. V každé repetitivě jsou na pozici 12 a 13 obsaženy tzv. hypervariabilní dvojité zbytky (repeat variable diresidues, RVDs), které určují vazebnou specifitu k jednomu nukleotidu v cílené sekvenci DNA (Boch *et al.*, 2009). Vazebná specifita TALE na DNA může být upravena přizpůsobením repetitiv využívajících RVD specifitu, jejich počtem a pořadím (Cermak *et al.*, 2011). Syntetické TALEs mohou být použity pro přípravu chimérických nukleas, transkripčních aktivátorů a represorů a mají prokázané využití jak v rostlinných, tak i v živočišných buňkách (Cermak *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011, 2012; Hickey *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

Pro správnou funkci TALEN je opět důležitá dimerizace *FokI* domén, aby mohlo dojít ke štěpení obou vláken DNA. Proto se používají zároveň dvě nukleasy typu TALEN (Obr. 5), které se musí navázat na protilehlá vlákna DNA ve správné orientaci a s dostatečnou vzdáleností (Li *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011). Velikost mezery mezi jednotlivými monomery homodimeru (monomery se stejnými TALE proteiny) nebo heterodimeru (monomery s různými TALE proteiny) záleží na délce linkeru, který spojuje štěpící doménu s TALE proteinem (Obr. 5). Bylo prokázáno, že nejvhodnější z hlediska efektivity je délka linkeru v rozmezí 12-30 párů bází (Christian *et al.*, 2010; Bedell *et al.*, 2012).



Obr. 5 Ilustrace nukleasy typu TALEN po navázání na vlákno DNA a dimerizaci. TALEN (transcription activator-like effector nuclease) se skládá z TALE DNA-vazebné domény a *FokI* štěpící domény. Specificita vazby je určena hypervariabilními zbytky (repeat variable diresidues, RVDs) na 12. a 13. AMK, každý RVD určuje specificitu k jednomu nukleotidu. TALE protein a *FokI* nukleasa je spojena pomocí linkerové sekvence, která určuje velikost mezery mezi jednotlivými monomery tvořící homodimer (monomery se stejnými TALE proteiny) nebo heterodimery (monomery s různými TALE proteiny). Pro štěpení obou vláken DNA je důležitá dimerizace *FokI* domén, proto se využívá pár TALENs vázajících se na protilehlá vlákna DNA. Po vytvoření dimeru kolem cílové sekvence *FokI* nukleasa štěpí obě vlákna DNA za vzniku dvojitých zlomů (double-strand breaks, DSBs) a poté se odpojí (převzato z Mahfouz *et al.*, 2014).

### 2.2.2.1 Využití technologie TALENs

Technologie TALENs byla nejprve zkoušena na živočišných modelových organismech jako je octomilka, zebříčka, škrkavka (Wood *et al.*, 2011), žába, myš, krysa a prase (Sander *et al.*, 2011; Tesson *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2011; Carlson *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Dále byla tato technologie využita na úpravu genomu krav, cvrčků a bource morušového (Carlson *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2012). Díky této technologii vznikly nové modely organismů, které mohly být využity pro studium lidských onemocnění. Například inaktivace LDL (Low Density Lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou) receptorového genu u prasat umožnila studium familiární hypercholesterolemie (Carlson *et al.*, 2012).

Kromě živočišných organismů byla technologie nukleas typu TALEN použita k přípravě knock-out mutantů *Arabidopsis* a dále k získání sazenic rýže rezistentních k infekci bakterií *Xanthomonas* (Cermak *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

Mezi medicínské aplikace technologie TALEN patří příprava modifikovaných buněk pro výzkum především geneticky podmíněných chorob (Joung a Sander, 2013). Jedna z možných aplikací této technologie je příprava geneticky upravených T-buněk imunitního systému. Takto upravené buňky vytváří chimérický receptor (Chimeric Antigen Receptor, CAR) rozpoznávající specifický antigen přítomný na B-buňkách při onemocnění akutní lymfoblastickou leukémií (B-ALL buňky). Tato možná aplikace

byla schválena v USA Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) v roce 2017 (FDA, 2017; Qasim *et al.*, 2017).

### 2.2.3 Technologie CRISPR/Cas9

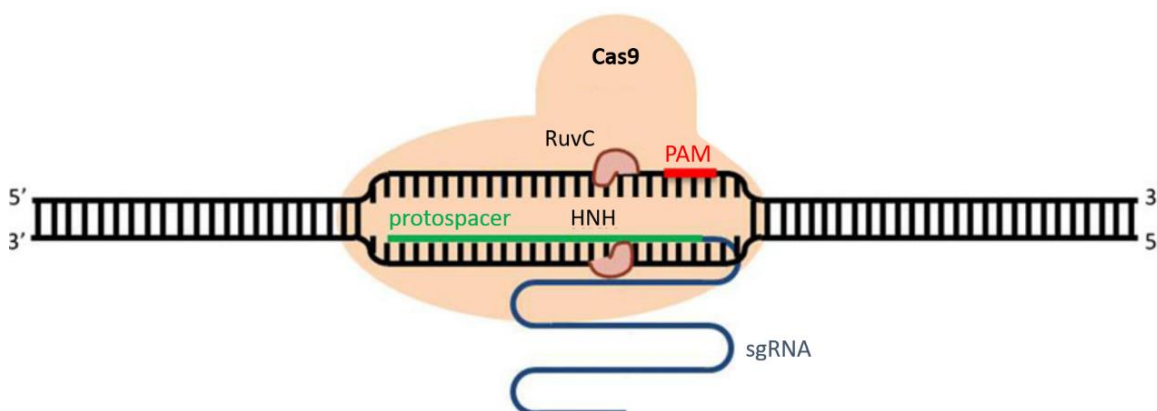
CRISPR/Cas9 technologie je odvozena od bakteriálního imunitního systému nazývaného CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (Jinek *et al.*, 2012). Jsou známy tři fáze adaptivní imunity bakterií. V první fázi po napadení buňky virem dochází k inserci krátké invazní DNA zvané spacer sekvence (spacer DNA) do CRISPR oblastí vlastního genomu. V druhé fázi dochází k transkripci těchto regionů za vzniku crRNA (CRISPR RNA), která tvoří komplex s tracrRNA (transactivating crRNA) za vzniku sgRNA (single guide RNA). Tato sgRNA poté vytváří komplex s Cas9 nukleasou, kterou navádí do místa určení na základě komplementarity bází. V poslední fázi dochází k přímému štěpení invazivní nukleové kyseliny pomocí Cas nukleasy v místě komplementárním k sgRNA (Makarova *et al.*, 2011a, 2011b). Funkční CRISPR-Cas lokus tedy obsahuje spacer DNA pocházející z invazivní DNA, který kóduje crRNA, a operony CAS genů kódující komponenty pro Cas nukleasu. Podle spacer DNA přítomné v CRISPR lokusu je potom možné určit, který virus napadl danou bakterii (Andersson a Banfield, 2008; Sun *et al.*, 2013).

Jak již bylo řečeno, technologie CRISPR/Cas9 využívá nukleasu Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Jedná se o multifunkční protein skládající se ze dvou domén nazývaných HNH a RuvC (Makarova *et al.*, 2002; Bolotin *et al.*, 2005; Haft *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006) (Obr. 6). Doména HNH štěpí vlákno DNA, které je komplementární k 20 nukleotidové sekvenci sgRNA a doména RuvC naopak štěpí protějšší vlákno DNA (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012). Jak už bylo zmíněno, Cas9 nukleasa je naváděna na požadované místo pomocí sgRNA, která je tvořena podjednotkami crRNA a tracrRNA. Podjednotka tracrRNA je důležitá pro maturaci crRNA. Naváděcí sgRNA zajišťuje dvě důležité funkce: obsahuje 20 nt dlouhou sekvenci na 5' konci (součást crRNA), která se napojuje na DNA vlákno, a dvouvláknovou strukturu na 3' konci (součást tracrRNA), která se váže na Cas9 nukleasu (Jinek *et al.*, 2012) (Obr. 6). Pro správné navázání Cas9 nukleasy na cílovou DNA je důležitá přítomnost tzv. motivu přiléhajícího k protospaceru (protospacer adjacent motif, PAM) o velikosti 3 bp v cílové sekvenci DNA. Tento motiv hraje důležitou roli v rozpoznání DNA pomocí komplexu Cas9/sgRNA (Obr. 6). PAM motiv se sekvencí NGG se nachází na vlákně se stejnou sekvencí, jakou má sgRNA. Pokud není přítomen, nedojde k navázání Cas9 nukleasy na

příslušnou sgRNA, dokonce ani v případě úplné komplementarity sgRNA s vláknem DNA (Anders *et al.*, 2014; Sternberg *et al.*, 2014).

Celý proces tvorby dvojitých zlomů začíná navázáním 20 bp sgRNA na komplementární místo v sekvenci DNA. Poté dojde k připojení Cas9 nukleasy na sgRNA. Cas9 nukleasa rozštěpí obě vlákna DNA pomocí svých podjednotek, čímž dojde k tvorbě DSBs. Celý proces je ukončen odpojením komplexu Cas9/sgRNA a jeho rozpadem. Dvojitě zlomy v DNA jsou následně opravovány buněčnými mechanismy, čímž mohou vznikat různé typy mutací v sekvenci DNA (Cong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

Existují specifické metody pro vložení Cas9 a její sgRNA do živočišných buněk a tkání. Jednou z nich je přímé vložení Cas9/sgRNA komplexu do buněk pomocí nukleofekce nebo přes penetrační peptidy (Kim *et al.*, 2014; Ramakrishna *et al.*, 2014). Do rostlinných buněk se konstrukty CRISPR/Cas9 systému vkládají do zárodečných buněk pomocí transformace Agrobakteriem (Katavic *et al.*, 1994).

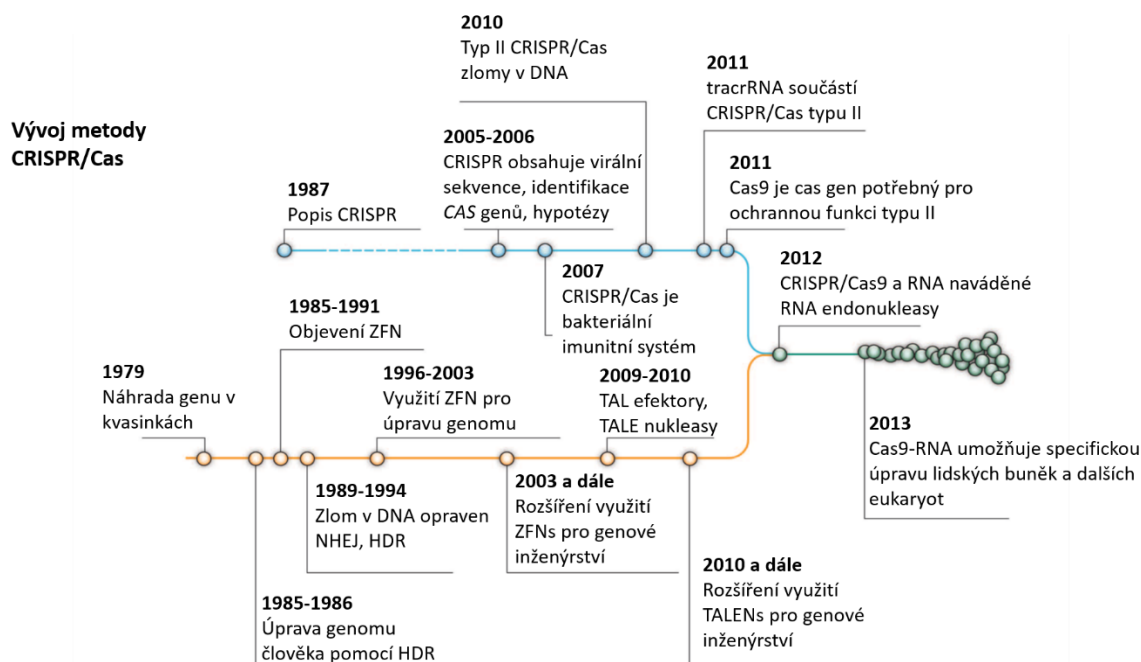


Obr. 6 Model komplexu CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Technologie CRISPR/Cas9 využívá nukleasu Cas9, která vytváří komplex s naváděcí RNA (single guide RNA, sgRNA), pomocí které je celý komplex přiváděn na cílovou sekvenci DNA. Komplex je nejdříve připojen na základě komplementarity pomocí sgRNA k sekvenci DNA (protospacer), poté je rozpoznán PAM motiv (protospacer adjacent motif) a pokud je přítomen, nukleasa Cas9 se napojí podjednotkou RuvC k vlákně s PAM motivem a podjednotkou HNH k vlákně protějším. Poté Cas9 vytvoří dvojitý zlom v sekvenci DNA, a nakonec je celý komplex CRISPR/Cas9 odpojen (převzato z Mahfouz *et al.*, 2014).



### 2.2.3.1 Historie CRISPR/Cas technologie

Přítomnost systému CRISPR byla poprvé popsána u bakterie *Escherichia coli* v roce 1987 (Ishino *et al.*, 1987) (Obr. 7). Později byla jeho přítomnost prokázána také u jiných bakterií a archea, proto se vědci začali zajímat o jeho funkci při úpravě DNA a regulaci genů (Mojica *et al.*, 2000; Makarova *et al.*, 2002; Guy *et al.*, 2004). Průlomový byl rok 2005, kdy byly objeveny spacer sekvence v CRISPR systému virového a plasmidového původu (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005) (Obr. 7). Později byl také objeven transkripční lokus CRISPR a genů *CAS* kódující nukleasy a helikasy, což vedlo k potvrzení, že CRISPR/Cas systém funguje jako imunitní mechanismus proti invazivní DNA (Jansen *et al.*, 2002; Bolotin *et al.*, 2005; Haft *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005) (Obr. 7). Tyto objevy poté vedly k využití CRISPR/Cas systému v bakteriích při imunizaci proti fágům, což se dá považovat za první biotechnologickou aplikaci této metody (Barrangou a Horvath, 2012). Např. v roce 2008 se výzkum zaměřil na přesné fungování CRISPR/Cas systému a crRNA jako naváděcího systému Cas proteinů u bakterií *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis* (Brouns *et al.*, 2008; Marraffini a Sontheimer, 2008).



Obr. 7 Vývoj genového inženýrství a metody CRISPR/Cas zobrazující důležité milníky ve výzkumu v obou oblastech. Vývoj genového inženýrství a metody CRISPR/Cas se spojil v roce 2012 při objevu funkce CRISPR/Cas9 jako RNA naváděné endonukleasy (převzato z Doudna a Charpentier, 2014).

### 2.2.3.2 Využití CRISPR/Cas9 technologie

CRISPR/Cas9 technologie byla použita např. při úpravě genomu lidských embryonálních buněk ledvin 293 (HEK293), buněk osteosarkomu (U2OS) nebo imortalizovaných buněk myelogenní leukémie (K562). Dále byla tato technologie využita na úpravu genomu modelových organismů z živočišné i rostlinné říše, jako jsou myši, krysy, octomilky, hlístice, mločí, žáby, dokonce i opice. V rostlinné biotechnologii byl systém CRISPR/Cas9 využit pro úpravu *Arabidopsis*, rýže, pšenice, čiroku, tabáku a také hub rodu *Kluyveromyces* a *Chlamydomonas*. Tato technologie našla své uplatnění také v biomedicíně, kde byla použita na modifikaci organoidů, což jsou malé jednoduché verze orgánů připravené *in vitro*, dále na lidské embryonální kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové buňky (Doudna a Charpentier, 2014).

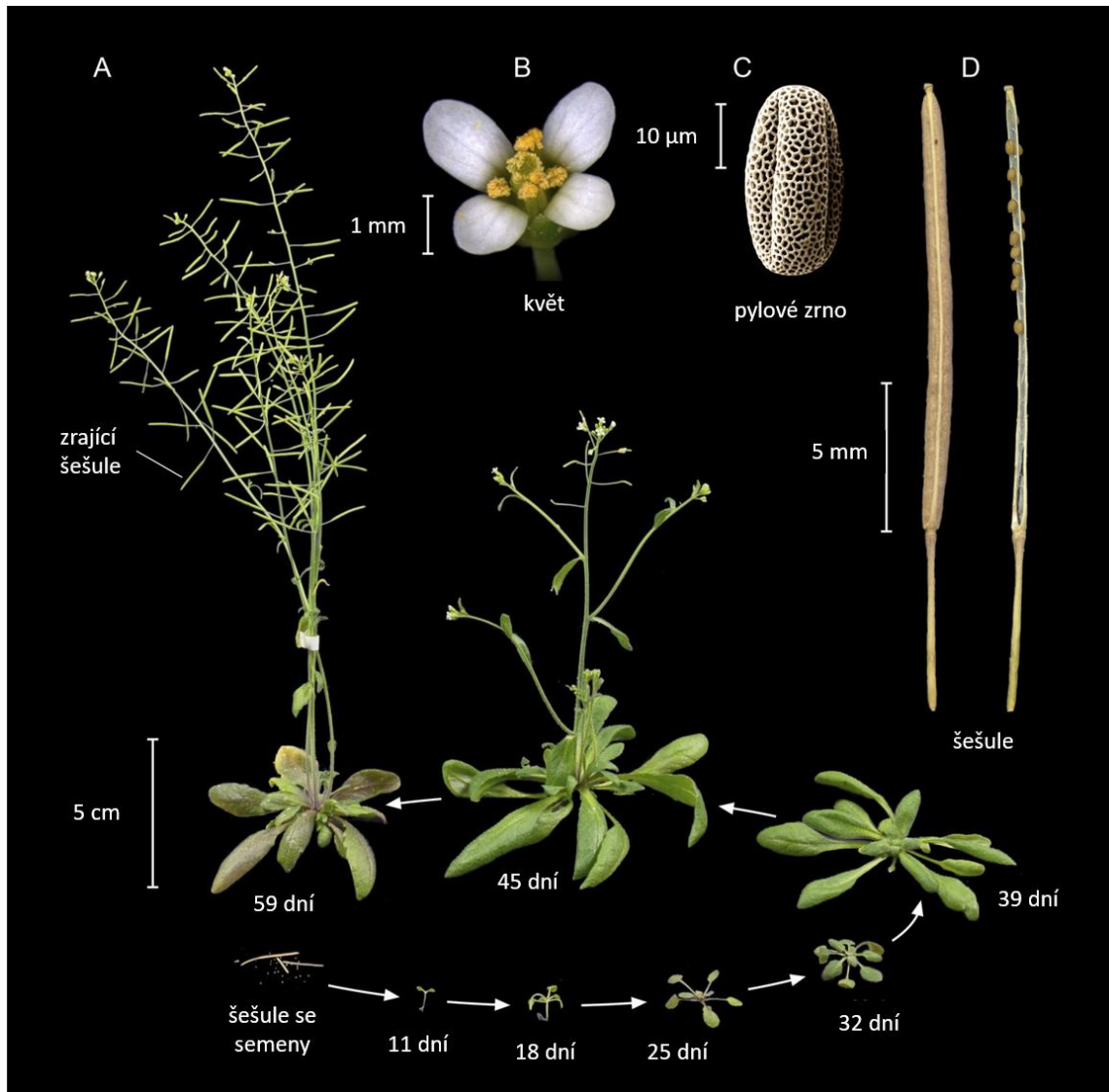
Technologie úpravy genomu pomocí CRISPR/Cas systému má v budoucnu široké uplatnění např. v genové terapii při léčbě závažných onemocnění člověka, také při zlepšení kvality a odolnosti zemědělských plodin, při syntéze biologických látek umělou cestou (syntetická biologie), nebo při sterilizaci komárů k zamezení jejich přemnožení a přenosu nemocí (Doudna a Charpentier, 2014).

### 2.3 Modelový organismus *Arabidopsis thaliana*

Dvouděložná rostlina *Arabidopsis thaliana* neboli huseníček rolní patřící do čeledi brukvovitých (*Brassicales*) je používána jako modelový organismus pro výzkum v mnoha oblastech (Meyerowitz a Somerville, 1994). Výhodou této rostliny je krátký životní cyklus trvající 6-8 týdnů, dále snadná kultivace v *in vitro* i *in vivo* podmínkách a také velké množství semen, které dokáže vyprodukovat jedna rostlina (asi 5000) (Meinke *et al.*, 1998). V neposlední řadě je velmi výhodná samosprašnost, díky které lze jednoduše křížit rostliny přenesením pylu na bliznu. Životní cyklus *Arabidopsis* začíná klíčením semen, pokračuje vývinem růžice rostliny a stonku, kvetením a končí maturací prvních semen (Obr. 8). Základní ekotypy používané pro genetické a molekulární studie jsou ekotypy Columbia (Col-0) a Landsberg erecta (Ler) (Meinke *et al.*, 1998).

*Arabidopsis* je až 20 cm vysoká rostlina s typickými bílými květy o délce 2 mm. Květ se skládá z osmi listů, čtyř kališních a čtyř okvětních. Střed květu je tvořen šesti tyčinkami tvořícími pyl a centrálního gynecea, které tvoří plody zvané šesule. Každá šesule obsahuje velké množství semen, která mohou být až 0,5 mm velká. Velmi jednoduchou stavbu mají kořeny, které se dělí na jeden hlavní kořen a z něho vyrůstající kořeny postranní. *Arabidopsis* vytváří růžice přizemních listů v průměru široké 2 až 10 cm. Listy jsou typické výskytem jednobuněčných trichomů, které se používají ke studiu buněčné diferenciace a morfogeneze. Přibližně po třech týdnech od klíčení se začne vyvíjet stonek a květ (Meinke *et al.*, 1998) (Obr. 8).

Celý genom *Arabidopsis* byl kompletně sekvencován v roce 2000. Bylo zjištěno, že je složen z 26 000 genů seskupených do 5 chromozomů, ale počet funkčních proteinů je značně menší (Fink, 1998; Fransz *et al.*, 1998; Arabidopsis Genome Initiative, 2000).



Obr. 8 Životní cyklus a fenotyp modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. (A) *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 v různých vývojových fázích od klíčení semene, přes vegetativní růst (do 39. dne) až po reprodukční růst (45. den) a stárnutí rostliny (59. den). (B) Květ *Arabidopsis thaliana* má v průměru 2 mm, je typický svou bílou barvou, je složen ze 4 kališních a 4 okvětních lístků a střed květu obsahuje 6 tyčinek a centrální gynoecium. (C) Typické pylové zrno má velikost do 30  $\mu\text{m}$ . (D) Plodem *Arabidopsis thaliana* jsou šešule, které tvoří velké množství semen (převzato z Krämer, 2015).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Použité přístroje**

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

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifugy (ScanSpeed 1730R Refrigerated microcentrifuge) (Beckman Coulter Microfuge® 16, USA)

Dokumentační zařízení Geldoc™ MP (BioRad, USA)

Fytotron (Weiss Gallenkamp, UK)

Horizontální agarosová elektroforéza (Bio-Rad)

Inkubační termoblok (Bioer Thermocell Cooling & Heating Block CHB 202)

Laboratorní digestoř (M 1200) (MERCY, USA)

Magnetická míchačka (MSH-420) (BOECO, Německo)

Mikrocentrifugy (FVL-2400N Combi-Spin, Mini-Centrifuge/Vortex; Benchmark MyFuge™ Mini) (Benchmark Scientific, USA)

pH metr (PC 2700, Eutech Instruments)

Předvážky (S1502, BEL Engineering, Itálie)

Spektrofotometr pro měření koncentrace proteinů (Beckman Coulter DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer) (Beckman Coulter)

Spektrofotometr pro měření koncentrace DNA a RNA (Thermo Scientific NanoDrop™ Lite Spectrophotometer) (Thermo Scientific, USA)

Thermocycler (MyCycler™ Personal Thermal Cycler Bio-Rad) (BioRad)

Třepačka (BioSan Multi rocker shaker MR-12) (Biosan, Lotyšsko)

Zařízení pro přípravu MilliQ vody (Millipore SIMSV0001 Simplicity UV WaterPurification System) (Merk, Německo)

Vertikální elektroforéza SDS-PAGE (Bio-Rad)

#### **3.1.2 Software pro zpracování výsledků**

ImageLab (Bio-rad)

ApE – A plasmid editor

### **3.1.3 Enzymy a chemikálie**

#### **Herbicid na selekci**

- fosfotricin (Duchefa, Nizozemí)

#### **Barviva**

- 6x Gel Loading dye (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Midori green DNA Staining Solution (Genetics, Německo)
- Bradfordovo činidlo (Serva, Německo)

#### **Standardy pro elektroforézu**

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

#### **Chemikálie na PCR a RT-PCR**

- DreamTaq polymerasa, 10x DreamTaq PCR MasterMix pufr (Thermo Scientific, USA)
- M-MLV reverzní transkriptasa, M-MLV pufr (Promega, USA)
- Phire® Hot Start DNA polymerasa II, 2x Phire® Plant PCR pufr s nukleotidy (Thermo Scientific)
- DNasa I, 10x Reaction Buffer with MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific)
- RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega)

#### **Protilátky použité na Western blot**

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

#### **Substráty a inhibitory na Western blot**

- Clarity™ Western ELC Blotting Substrates (Bio-Rad)
- inhibitory fosfatas a proteas – Complete™, DTT, Pefablock, PhoStop™ (Roche, Švýcarsko)

#### **Použité Kity**

- QIAquick PCR Purification Kit (250) (QIAGEN, Nizozemsko)

## **Ostatní chemikálie**

Agarosa (Sigma-Aldrich), 1-brom-3-chlor-propan (BCP) (Sigma-Aldrich), hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich), dry milk blocker (Sigma-Aldrich), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich), 70 % ethanol, 96 % ethanol, fluorid sodný (Sigma-Aldrich), guma gellan (Sigma-Aldrich), glycerol (Sigma-Aldrich), hydroxid draselný (Sigma-Aldrich), chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich), 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES) (Duchefa), chlorid sodný (Sigma-Aldrich), isopropanol (Sigma-Aldrich), 4x Laemmli pufr (Bio-Rad),  $\beta$ -merkptoethanol (Sigma-Aldrich), methanol (Sigma-Aldrich), 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES) (Sigma-Aldrich), Murashige – Skoog médium bez vitamínů (Duchefa), peroxid vodíku (Sigma-Aldrich), phytoagar (Sigma-Aldrich), Ponceau S, sacharosa (Sigma-Aldrich), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich)

### **3.1.4 Složení médií a roztoků**

#### **3.1.4.1 Kultivační média**

##### **½ Murashige & Skoog (½ MS) medium bez vitamínů (1 l)**

- 2,2 g Murashige-Skoog bez vitamínů
- 1 g MES
- 10 g sacharosy
- 6 g gummy gellan (0,6 %)

Doplněno milliQ dH<sub>2</sub>O na celkový objem 1 l, pH 5,8 upraveno pomocí KOH (0,1M; 1M) před přidáním gummy gellan, sterilizováno autoklávováním.

##### **½ Murashige & Skoog (½ MS) medium bez vitamínů s fytoagarem (1 l)**

- 2,2 g Murashige-Skoog bez vitamínů
- 1 g MES
- 10 g sacharosy
- 6 g fytoagaru (0,6 %)

Doplněno milliQ dH<sub>2</sub>O na celkový objem 1 l, pH 5,8 upraveno pomocí KOH (0,1M; 1M) před přidáním gummy gellan, sterilizováno autoklávováním.

### **Selekční ½ Murashige & Skoog (½ MS) medium bez vitamínů (1 l)**

- 2,2 g Murashige-Skoog bez vitamínů
- 1 g MES
- 10 g sacharosy
- 6 g gellan gum (0,6%)
- 50 µM fosfinotricin

Doplněno milliQ dH<sub>2</sub>O na celkový objem 1 l, pH 5,8 upraveno pomocí KOH (0,1M; 1M) před přidáním gummy gellan, sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci přidán fosfinotricin na výslednou koncentraci 50 µM.

### **½ Murashige & Skoog (½ MS) medium bez vitamínů s přidavkem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 l)**

- 2,2 g Murashige-Skoog bez vitamínů
- 1 g MES
- 10 g sacharosy
- 6 g phytoagaru (0,6%)
- 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Doplněno milliQ dH<sub>2</sub>O na celkový objem 1 l, pH 5,8 upraveno pomocí KOH (0,1M; 1M) před přidáním gummy gellan, sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci přidán H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na výslednou koncentraci 6 mM.

### **3.1.4.2 Roztoky a gely**

#### **50x TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (1 l)**

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

#### **1x TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (1 l)**

- 20 ml 50x TAE
- 980 ml dH<sub>2</sub>O



### **1 % Agarosový gel na gelovou elektroforézu (100 ml)**

- 1 g agarosy
- 100 ml 1x TAE pufu

Po rozpuštění agarosy přidáno barvivo Midori green DNA Staining Solution (5 µl/100 ml gelu).

### **Pufu E pro extrakci proteinů (100 ml)**

- 1,19 g HEPES, pH 7,5 (NaOH)
- 0,43 g NaCl
- 0,038 g EGTA
- 0,0095 g MgCl<sub>2</sub>
- 0,004 g NaF
- 10 % glycerol

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

- 1 µl 1M DTT
- 20 µl 0,1M Pefablock
- 20 µl Complete™
- 100 µl PhoStop™

### **10x elektrodový pufu (1 l)**

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

### **1x elektrodový pufu (1 l)**

- 100 ml 10x elektrodového pufu
- 900 ml dH<sub>2</sub>O

### **10x transferový pufu (1 l)**

- 30 g Tris
- 144 g glycinu

### **1x transferový pufr (1 l)**

- 100 ml 10x transferového pufru
- 100 ml methanolu
- 800 ml dH<sub>2</sub>O

### **10x TBS pufr (1 l)**

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

### **1x TBS – T pufr**

- 100 ml 10x TBS
- 1 ml Tween 20
- 900 ml dH<sub>2</sub>O

### **Ponceau S (100 ml)**

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

## **3.1.5 Rostlinný materiál**

*Arabidopsis thaliana* – ekotyp Columbia (Col-0)

*Arabidopsis thaliana* – mutant *mpk3-5*, generace T2, heterozygotní linie 2/27

*Arabidopsis thaliana* – mutant *mpk3-5*, generace T2, heterozygotní linie 2/30

*Arabidopsis thaliana* – mutant *mpk3-4/2* (SAIL\_873\_G05, (Sessions *et al.*, 2002)

*Arabidopsis thaliana* – mutant *mpk3-1* (SALK\_151594, (Alonso *et al.*, 2003)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Povrchová sterilizace semen *A. thaliana*

Povrchová sterilizace semen *A. thaliana* byla provedena ve flowboxu. K semenům odsypaným do čisté 1,5 ml mikrozkuřavky byl napipetován 1 ml 70 % ethanolu, ve kterém byla semena ponechána 5 min za mírného třepání. Následně byl ethanol odpipetován, k semenům byl napipetován 1 ml 96 % ethanolu a semena v něm byla inkubována 1 min opět za mírného třepání. Po uplynutí této doby byla semena promyta v 1 ml sterilní dH<sub>2</sub>O 2x5 min. Nakonec byla semena napipetována na Petriho misku s filtračním papírem a po uschnutí filtračního papíru byla miska se semeny uzavřena pomocí parafilmu a uložena do lednice.

### 3.2.2 Výsev semen na Petriho misku

Semena jednotlivých linií *Arabidopsis* byla ve flowboxu vyseta na Petriho misky obsahující sterilní ½ MS médium. Petriho misky byly poté uzavřeny lepící prodyšnou páskou a uloženy přes noc do lednice (4 °C) kvůli proběhnutí procesu stratifikace. Následující den byly Petriho misky se semeny přeneseny do fytotronu a kultivovány ve vertikální nebo horizontální poloze při teplotě 23 °C v režimu 16 hod světlo/8 hod tma po různě dlouhou dobu v závislosti na experimentu.

### 3.2.3 Selektce mutantů *Arabidopsis mpk3-5*

Mutantní linie *Arabidopsis mpk3-5* generace T2 byly selektovány na ½ MS médiu s obsahem 50 µM fosfinitricinu. Pro selekci mutantních rostlin byly použity 14denní semenáčky rostoucí na kontrolním médiu bez obsahu fosfinitricinu, kterým byl sterilně odstřižen lístek a přenesen na selekční médium. Takto připravená miska s odstřiženými lístky byla kultivována v horizontální poloze po dobu 7 dní. Po této době bylo vyhodnoceno, který semenáček obsahuje požadovaný konstrukt pro CRISPR/Cas9 s genem rezistence na fosfinitricin. Výsledky selekce byly zdokumentovány na fotoaparát.

### 3.2.4 Genotypizace vyselektovaných mutantů *mpk3-5*

#### 3.2.4.1 Extrakce gDNA

Genomová DNA (gDNA) byla extrahována z vyselektovaných 3týdenních semenáčků mutantů *mpk3-5* pomocí Phire Plant Direct PCR kitu následujícím způsobem. Ze semenáčku byl odstříhnut list, který byl vložen do 0,6 ml mikrozkušavky obsahující 20  $\mu$ l dilučního pufru a rozmělněn pomocí špičky. Takto připravené vzorky byly ponechány minimálně 1 hod na ledu a vyextrahovaná gDNA byla následně použita jako templát pro PCR.

#### 3.2.4.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Do 0,2 ml mikrozkušavky byla připravena reakční směs obsahující 25  $\mu$ l 2x Phire Plant PCR pufru s nukleotidy, 0,5  $\mu$ M primer F a 0,5  $\mu$ M primer R, jejichž sekvence je uvedena v Tab. 1. Reakce byla doplněna deionizovanou vodou pro PCR na celkový objem 50  $\mu$ l a na závěr byl přidán 1  $\mu$ l Phire<sup>®</sup> Hot Start DNA polymerasy II a 2,5  $\mu$ l templátové DNA. Podmínky pro PCR byly nastaveny podle Tab. 2.

Tab. 1 Sekvence použitých primerů pro PCR

primer	sekvence
primer F (forward)	5' – GTCTCTCTGTTGACTCCGACTG – 3'
primer R (reverse)	5' – TCTTCTTCATCGCTACTAGTCGTTC – 3'

Tab. 2 Nastavení thermocycleru pro PCR

Krok	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	iniciační denaturace	98 °C	5 min	1
2	denaturace	98 °C	5 s	36
3	annealing primerů	60 °C	5 s	
4	elongace	72 °C	20 s	
5	finální elongace	72 °C	1 min	1

### 3.2.4.3 Agarosová elektroforéza

Pro ověření průběhu PCR byla použita agarosová elektroforéza v 1 % agarosovém gelu. Z každého vzorku po proběhnutí PCR bylo odebráno 5 µl reakční směsi a smícháno s 1 µl 6x Gel Loading dye. K vizualizaci DNA bylo do gelu přidáno barvivo Midori Green DNA Staining Solution (5 µl barviva/100 ml gelu). Elektroforetická vana byla zalita 1x TAE pufrem a elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V. Po 40 min byla amplifikovaná DNA v gelu zdokumentována pomocí zařízení Geldoc™ EZ a výsledek vyhodnocen pomocí programu ImageLab.

### 3.2.4.4 Purifikace PCR produktů

K purifikaci PCR produktů byl použit QIAquick PCR Purification Kit (250). Celý objem vzorku z PCR (45 µl) byl smíchán s 5násobkem PB pufru, zvortexován a přepipetován do purifikačních kolonek, které byly centrifugovány při 13 000 rpm/1 min/RT. Supernatant byl odlit a do kolonek bylo napipetováno 750 µl PE pufru. Poté byly vzorky opět centrifugovány při 13 000 rpm/1 min/RT a supernatant byl následně odlit. Pro odstranění veškerých zbytků PE pufru z kolonky byla centrifugace opakována při stejných podmínkách. Dále byly kolonky přemístěny do čistých 1,5 ml mikrozkušavek. DNA byla z kolonek eluována přidáním 30 µl MilliQ vody do středu kolonky a následnou centrifugací při 13 000 rpm/1 min/RT. Na závěr byla změřena koncentrace DNA pomocí NanoDrop™ Lite spektrofotometru.

### 3.2.4.5 Příprava vzorků na sekvenaci

Každý vzorek na sekvenaci obsahoval 50 ng DNA a 25 pmol primeru F (Tab. 1). Reakční směs byla doplněna MilliQ vodou na konečný objem 10 µl. Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny pomocí programu ApE – A plasmid editor.

## 3.2.5 PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)

### 3.2.5.1 Izolace RNA a její ošetření DNase I

Celková RNA byla izolována ze 14denních semenáčků Col-0, *mpk3-1* a *mpk3-5*. Rostlinný materiál byl homogenizován v tekutém dusíku na jemný prášek, ke kterému bylo přidáno 800 µl Triagent solution. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány po dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté následovala centrifugace při 12 000 xg/10 min/4 °C a přenesení supernatantu do čistých mikrozkušavek. K supernatantu bylo přidáno 80 µl BCP, vzorky byly následně vortexovány po dobu 15 s a poté inkubovány 10 min

při pokojové teplotě. Po inkubaci následovala centrifugace při 12 000 xg/15 min/4 °C. Vodná fáze vzniklá centrifugací byla odebrána a přenesena do čistých mikrokumavek, kde k ní byl přidán isopropanol v množství 70 % z celkového objemu vodné fáze. Vzorky byly promíchány a inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Opět následovala centrifugace při 12 000 xg/8 min/4 °C. Supernatant byl odpipetován, vzniklý pelet RNA promyt v 1 ml 75 % ethanolu a krátce vysušen v digestoři. Na závěr byl pelet RNA rozpuštěn ve 30 µl deionizované vody pro PCR a koncentrace RNA byla změřena na NanoDrop™ Lite spektrofotometru.

Izolovaná RNA byla ošetřena DNasou I pro odstranění zbytků DNA ze vzorku RNA. Pro ošetření byla připravena reakční směs obsahující 2 µl 10x reakčního pufru pro DNasu I, 2 µl DNasy I a 2 µg RNA. Směs byla doplněna deionizovanou vodou pro PCR na konečný objem 20 µl. Poté byly vzorky inkubovány 40 min při 37 °C. Po inkubaci byla DNasa I inaktivována přidáním 2 µl EDTA (50 mM) a další inkubací 10 min při 70 °C.

### **3.2.5.2 Reverzní transkripce**

RNA byla následně použita pro syntézu komplementární DNA (cDNA) reverzní transkripcí. Připravená reakční směs obsahovala 500 ng RNA, 0,5 µl oligo(dT) 18 primeru a deionizovanou vodu pro PCR v celkovém objemu 10 µl. Vzorky byly inkubovány 10 min při 70 °C, poté byly přidány 4 µl 5x M-MLV pufru, 1 µl dNTPs (10 mM), 0,4 µl M-MLV reverzní transkriptasy, 0,4 µl inhibitoru RNas RNasin a deionizovaná voda pro PCR v celkovém objemu 10 µl. Následovala inkubace 3 hod při 42 °C a poté inaktivace reverzní transkriptasy zvýšením teploty na 70 °C po dobu 10 min. Připravená cDNA byla 4x naředěna.

### **3.2.5.3 PCR**

Pro PCR amplifikující gen *MPK3* byla připravena reakční směs obsahující 1,5 µl 10x reakčního pufru pro DreamTaq polymerasu, 0,3 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µM primeru F, 0,5 µM primeru R, 0,25 µl DreamTaq polymerasy, 3 µl templátu cDNA a deionizovanou vodu pro PCR v celkovém objemu 15 µl. Podmínky PCR byly nastaveny podle Tab. 3. Jako endogenní kontrola byl použit referenční gen pro elongační faktor 1a (*EF-1a*). Sekvence použitých primerů je uvedena v Tab. 4.

Tab. 3 Nastavení thermocycleru pro RT-PCR

Krok	Fáze	Teplota	Čas	Počet opakování
1	iniciační denaturace	95 °C	3 min	1
2	denaturace	95 °C	30 s	40
3	annealing primerů	58 °C	30 s	
4	elongace	72 °C	1 min s	
5	finální elongace	72 °C	15 min	1

Tab. 4 Sekvence použitých primerů pro PCR reakci

primer	sekvence
<i>MPK3_F</i> (forward)	5'-GGTGGAAACTCACGGAGGAC-3'
<i>MPK3_R</i> (reverse)	5'-AATACCAGGCATTCACGGGG-3'
<i>EF1<math>\alpha</math>_F</i> (forward)	5'-GATGCCACCACCCCAAATA-3'
<i>EF1<math>\alpha</math>_R</i> (reverse)	5'-TTGGGTCCTTCTTGTCACG-3'

### 3.2.6 Extrakce proteinů

Proteiny byly extrahovány ze 14denních semenáčků Col-0, *mpk3-1* a *mpk3-5* pěstovaných *in vitro* nebo ze starších rostlin jmenovaných linií pěstovaných *ex vitro*. Rostlinný materiál byl homogenizován v tekutém dusíku na jemný prášek. Podle váhy rostlinného materiálu v mikrozkuvkách byl ke vzorkům přidán extrakční pufru E s přidávanými inhibitory proteas a fosfatas v poměru 1  $\mu$ l pufru/1 mg vzorku. Vzorky byly ponechány 1 hod na ledu a následně centrifugovány při 12 000  $\times$ g/10 min/4 °C. Poté byl supernatant přepipetován do čistých mikrozkuvek. Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm pomocí metody Bradfordové a každý vzorek byl poté naředěn na koncentraci 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### 3.2.7 SDS-PAGE elektroforéza

K připraveným proteinovým vzorkům naředěným na požadovanou koncentraci byl přidán 4x Laemmli pufr s 5 %  $\beta$ -merkaptoethanolem, následně byly vzorky denaturovány

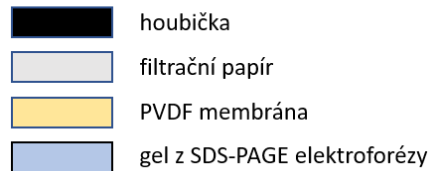
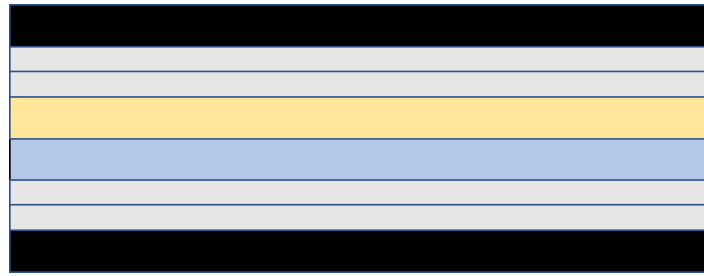
při teplotě 95 °C, 10 min. Na SDS-PAGE elektroforézu byl použit komerční 10 % Mini-Protean TGX Stain-Free Precast gel. Gel byl upevněn v elektroforetickém aparátu a vložen do elektroforetické vany. Vana i meziprostor mezi gely byly vyplněny 1x elektrodoým pufrem. Do první jamky bylo napipetováno 5 µl proteinového standardu (Precision Plus Protein™ Dual Colour Standards) a do dalších jamek 20 µl z připravených vzorků, tzn. 20 µg proteinů na jamku. SDS-PAGE elektroforéza probíhala 40 min při konstantním napětí 180 V.

### 3.2.8 Western blot

Pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu byla připravena komůrka zobrazena na Obr. 9. Před přenosem proteinů byla membrána krátce (10 s) rehydratována v methanolu. Složená komůrka byla vložena do elektroforetické vany a zalita 1x transferovým pufrem. Transfer proteinů z gelu na membránu probíhal nejdříve 10 min při konstantním napětí 100 V, poté bylo elektrické napětí sníženo na 16 V a transfer proteinů probíhal přes noc při 4 °C. Na druhý den bylo elektrické napětí opět zvýšeno na 100 V a přenos proteinů probíhal ještě dalších 10 min. Po přenosu byla membrána barvena barvivem Ponceau S a zdokumentována na fotoaparát. Poté bylo barvivo z membrány vymyto 1x TBS-T pufrem.

Membrána byla následně blokována 1 hod při pokojové teplotě na třepačce (15 rpm) v roztoku 5 % sušeného mléka a 5 % BSA v 1x TBS-T. Po blokování byla membrána krátce promyta v 1x TBS-T. Následovala inkubace s primární protilátkou proti MPK3 produkované v králíkovi (rabbit anti-MPK3) ředěnou 1:5000 v roztoku 4 % BSA v 1x TBS-T 1 hod, 15 rpm při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membrána promyta v 1x TBS-T 6 x 10 min. Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou proti králíčí primární protilátce produkované v koze (goat anti-rabbit) konjugovanou s křenovou peroxidasou ředěnou 1:5000 v roztoku 1 % BSA v TBS-T po dobu 1,5 hod, 15 rpm, při pokojové teplotě. Poté byla membrána opět promyta v 1x TBS-T 6 x 10 min. Proteiny na membráně byly detekovány pomocí komerčního roztoku Clarity™ Western ELC Blotting Substrates, ve kterém byla membrána inkubována 1 min a následně vyvolána na dokumentačním zařízení Chemidoc™ MP a vyhodnocena v programu ImageLab.





Obr. 9 Pořadí jednotlivých vrstev v komůrce pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu.

### 3.2.9 Aplikace oxidativního stresu na mutanty *mpk3-5*

Semena *mpk3-5* linie 2/27 a 2/30 v T3 generaci a semena Col-0 byla vyseta na kontrolní ½ MS médium s fytoagarem. Petriho misky byly zalepeny prodyšnou páskou a ponechány přes noc v lednici (4 °C) kvůli procesu stratifikace. Na druhý den byly misky se semeny přeneseny do fytotronu a kultivovány po dobu 3 dnů. Poté byly 3denní semenáčky sterilně přeneseny na ½ MS médium s fytoagarem obsahujícím 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a následně kultivovány ve fytotronu. Účinek peroxidu vodíku na mutantní a kontrolní semenáčky *Arabidopsis* byl pozorován a zaznamenán na fotoaparát po jednom a dvou týdnech.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části byly použity linie *Arabidopsis thaliana* s mutací v genu *MPK3* s označením *mpk3-5*, které byly připraveny technologií CRISPR/Cas9. Mutace se nachází v prvním exonu genu *MPK3* před PAM motivem (AGG), který je součástí protospaceru, kde se na základě komplementarity bází váže sgRNA a dochází zde ke štěpení nukleasou Cas9, a tím ke vzniku možné mutace (Obr. 10).

Mutantní linie *mpk3-5* byly nejprve selektovány pomocí genu rezistence *bar*, který je součástí konstruktu pro komplex sgRNA/Cas9. U selektovaných mutantních rostlin byl určen druh mutace a zda se jedná o mutaci homozygotní, transheterozygotní nebo heterozygotní. Následně byla ověřována přítomnost transkriptu *MPK3* a proteinu MPK3 ve všech mutantních rostlinách pomocí metody semikvantitativní RT-PCR, respektive pomocí metody western blot. Výsledky měly potvrdit, že homozygotní a transheterozygotní mutanti připravení metodou CRISPR/Cas9 skutečně obsahují mutaci v genu *MPK3*, tím pádem netvoří protein MPK3 a úprava genomu *Arabidopsis* pomocí metody CRISPR/Cas9 tak proběhla úspěšně.

```
cactattattgcattatttaactatggcagatagatagatacagaaccgtaaaggacgtaggaagaggaagaacgttgac
gaagtcaacaacgaacagaaaccgtcgattgagggcgtcttaactcaaccacacgatcttctctgcctttccctctctct
cttcttcttcttctctctctctctcgaattaccgcgaaaactcatctctgctcaatcctcaatctcagtctctctgttgactcc
gactgtatataaaaccatacaaatccttcagattcactactcaaacctcaaagcaaccactgaatctcgactttgatcaatt
gagagagaaATGAACACCGGCGGTGGCCAATACACGGATTTCCGGCGGTGGA
AACTCACGGAGGACAGTTCATAAGTTACGATATCTTCGGTAGTTTATTCGA
GATCACATCTAAGTATCGTCCTCCGATTATACCAATTGGTCGTGGAGCTTAT
GGAATCGTTTG
```

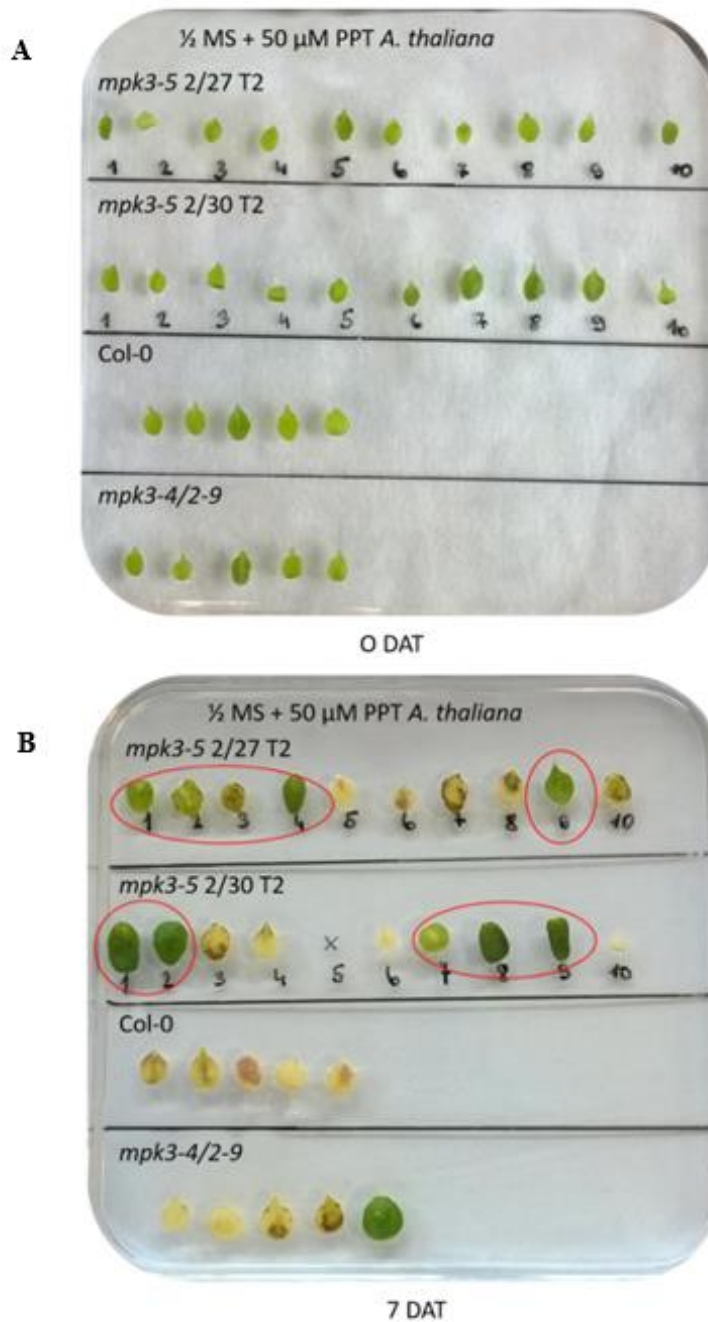
Obr. 10 Sekvence části genu *MPK3* s vyznačeným místem mutace zprostředkované technologií CRISPR/Cas9 v mutantní linii *mpk3-5*. Mutace by se měla nacházet v prvním exonu genu *MPK3* (vyznačen žlutě) před PAM motivem se sekvencí AGG (vyznačen červeně), který je součástí protospaceru (vyznačen modře). START kodon (ATG) je vyznačen zeleně.

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

Pro selekci byly použity semena heterozygotní linie mutantu *mpk3-5*, linie 2/27 a 2/30 v generaci T2, které byly připraveny a poskytnuty vedoucí bakalářské práce. Selektce mutantních linií probíhala pomocí herbicidu fosfinitricinu, jelikož konstrukt pro CRISPR/Cas9, který byl použit ke stabilní transformaci rostlin ekotypu Col-0, obsahuje gen *bar* nesoucí rezistenci na daný herbicid.

Semena heterozygotních mutantů *mpk3-5* byla vyseta na Petriho misky s ½ MS médiem. Jako negativní kontrola byla použita semena *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col-0 a jako pozitivní kontrola mutant *mpk3-4/2*, který ve svém genomu také obsahuje gen rezistence na fosfinitricin (Sessions *et al.*, 2002). Aby stresovým podmínkám při působení herbicidu nebyla vystavena celá rostlina, byly ze 14denních semenáčků sterilně odstřiženy přibližně stejně velké listy, které byly přeneseny na Petriho misku s ½ MS médiem obsahujícím 50 µM fosfinitricin (Obr. 11).

Listy semenáčků *mpk3-5* s možnou mutací v genu *MPK3* zůstaly po týdenním působení herbicidu zelené, což prokazuje přítomnost genu pro rezistenci na fosfinitricin. U listů semenáčků, které nebyly rezistentní na přítomnost herbicidu v médiu, docházelo k výrazné ztrátě chlorofylu kvůli hromadění amoniaku (Obr. 11), jelikož fosfinitricin způsobuje blokaci glutaminsynthasy katalyzující reakci glutamátu a amoniaku za vzniku glutaminu.



Obr. 11 Selektce mutantů *mpk3-5*, linie 2/27 a 2/30 v generaci T2. Pro selektci byly použity sterilně odstřižené listy ze 14denních rostlin, které byly přeneseny na selekční médium s obsahem 50 µM fosfinitricinu. Listy byly ponechány na médiu po dobu jednoho týdne. (A) Fotografie pořízená 0 dní po přenosu (0 DAT), (B) fotografie pořízená 7 dní po přenosu (7 DAT). Listy rezistentních rostlin jsou vyznačeny červeně. Jako negativní kontrola byly použity semenáčky Col-0 a jako pozitivní kontrola semenáčky mutantu *mpk3-4/2* s rezistencí na fosfinitricin.

## 4.2 Určení mutantních rostlin *A. thaliana mpk3-5* pomocí genotypizace

Z vyselektovaných semenáčků *mpk3-5* byla extrahována genomová DNA (gDNA), která byla použita jako templát pro PCR reakci. Pomocí PCR byla amplifikovaná část *MPK3* genu o velikosti 398 bp obsahující možnou mutaci (Obr. 12). Amplifikace metodou PCR byla poté ověřena pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 13). PCR produkty byly purifikovány a připraveny na sekvenaci. Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny pomocí programu ApE – A plasmid editor tak, že byly porovnány sekvence genu *MPK3* u rezistentní rostliny s rostlinou divokého typu (Col-0).

Pomocí sekvenování bylo celkem určeno 23 heterozygotů, 1 homozygot a 1 transheterozygot. U mutantní rostliny *mpk3-5 2/27-1* (Obr. 14) byla v sekvenci genu *MPK3* zjištěna inserce adeninu (A). Podle grafu sekvenace se tato mutace nachází na obou alelách, proto byla rostlina *mpk3-5 2/27-1* určena jako homozygot (Obr. 14). U mutantní rostliny *mpk3-5 2/30-1* (Obr. 15) byla v sekvenci genu *MPK3* zjištěna inserce W, které zastupuje báze adenin nebo thymín. Podle grafu sekvenace bylo určeno, že jedna alela genu *MPK3* nese inserci adeninu a druhá inserci thymínu. Proto byla rostlina *mpk3-5 2/30-1* určena jako transheterozygot (Obr. 15). Na Obr. 16 je znázorněn příklad heterozygotního mutantu *mpk3-5 2/27-5*. V sekvenci genu *MPK3* se nachází inserce adeninu (A), která je však přítomna pouze na jedné alele genu *MPK3*, druhá alela je nemutovaná. Proto byla tato rostlina určena jako heterozygot (Obr. 16).

Insercí nukleotidu na obou alelách *MPK3* genu u homozygotního a transheterozygotního mutantu dochází k posunu čtecího rámce, což by mělo způsobit vyřazení genu *MPK3* z činnosti. U heterozygotů, kteří mají mutovanou pouze jednu alelu genu, je druhá alela stále funkční a protein *MPK3* tak může být normálně syntetizován. Vyselektované rostliny s potvrzenou mutací genu *MPK3* byly dále pěstovány v *ex vitro* podmínkách a byla u nich testována přítomnost transkriptu *MPK3* a tvorba *MPK3* proteinu. Homozygotní a transheterozygotní mutanti identifikovaní pomocí sekvenování byli vysazeni do půdy pro získání semen generace T3, se kterými byly prováděny další experimenty.

Z výsledků je patrné, že k mutacím docházelo před PAM motivem (Obr. 14, 15, 16) tak, jak se předpokládalo (Fauser *et al.*, 2014). V této studii byla tvorba bodových mutací po použití CRISPR/Cas9 technologie studována na mutantech *adh1* a *tt4*. Bylo zjištěno, že opravnými mechanismy buňky dochází především k insercím nukleotidu do sekvence, s menší pravděpodobností k delecím. Také bylo touto studií prokázáno,



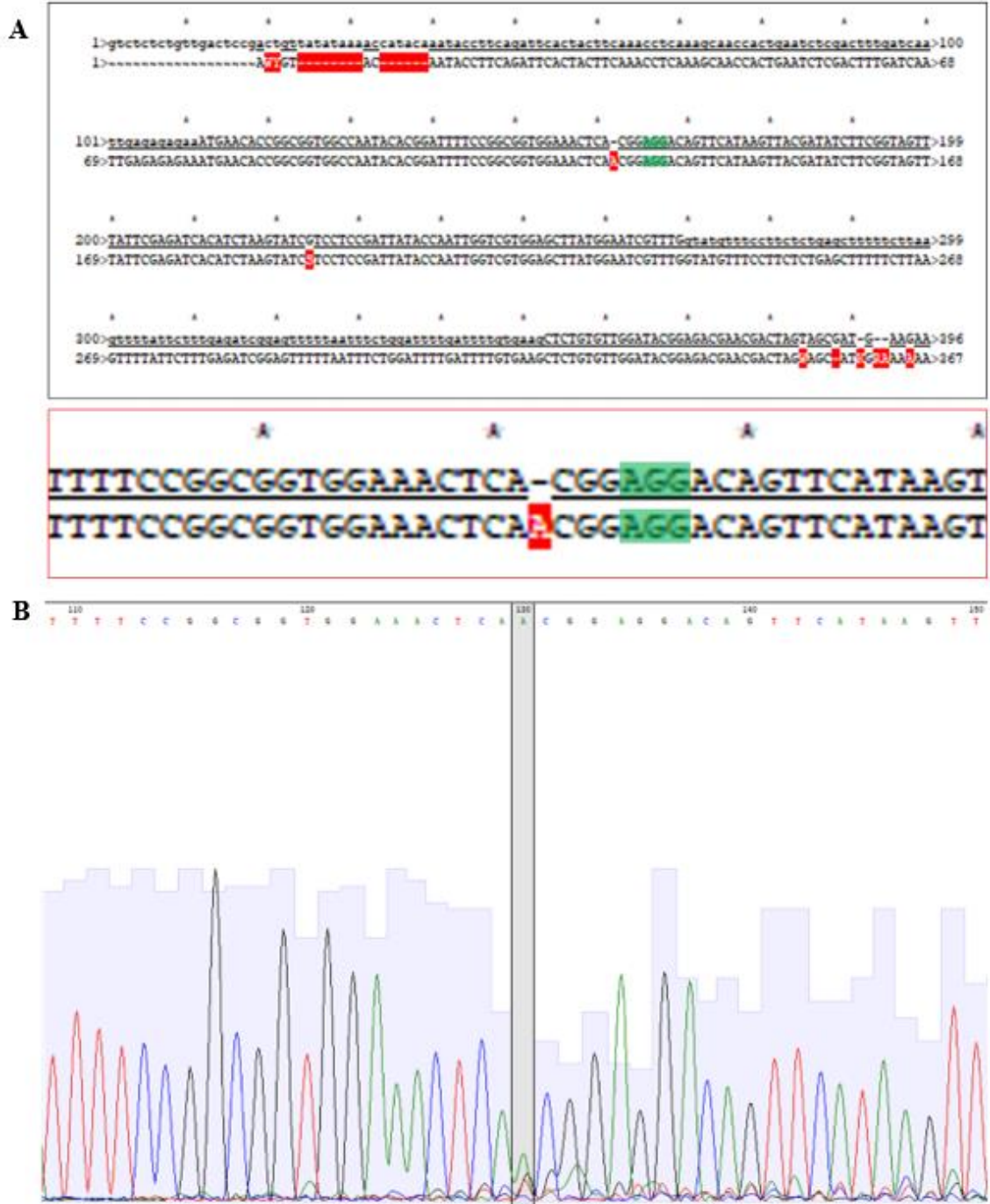


Obr. 14 Výsledky sekvenace homozygotního mutantu *mpk3-5 2/27-1* generace T2. (A) Porovnání sekvencí amplifikované části genu *MPK3* kontrolní rostliny (horní sekvence) a selektované rostliny (dolní sekvence). V sekvenci selektované rostliny došlo před PAM motivem (AGG, vyznačen zeleně) k inzerci cytosinu - C. (B) Určení typu mutace podle grafu sekvenace. Jelikož se píky v místě mutace překrývají, znamená to, že k inzerci cytosinu došlo na obou alelách genu. Proto byla rostlina určena jako homozygotní mutant.



Obr. 15 Výsledky sekvenace transheterozygotního mutantu *mpk3-5* 2/30-1 generace T2. (A) Porovnání sekvenace amplifikované části genu *MPK3* kontrolní rostliny (horní sekvenace) a selektované rostliny (dolní sekvenace). V sekvenaci selektované rostliny došlo před PAM motivem (AGG, vyznačen zeleně) k inserci bází s označením W zastupující adenin a thymin. (B) Určení typu mutace podle grafu sekvenace. Jelikož se píky v místě mutace nepřekrývají a na každé alele genu *MPK3* se nachází inserce jiné báze, byla tato rostlina určena jako transheterozygotní mutant.



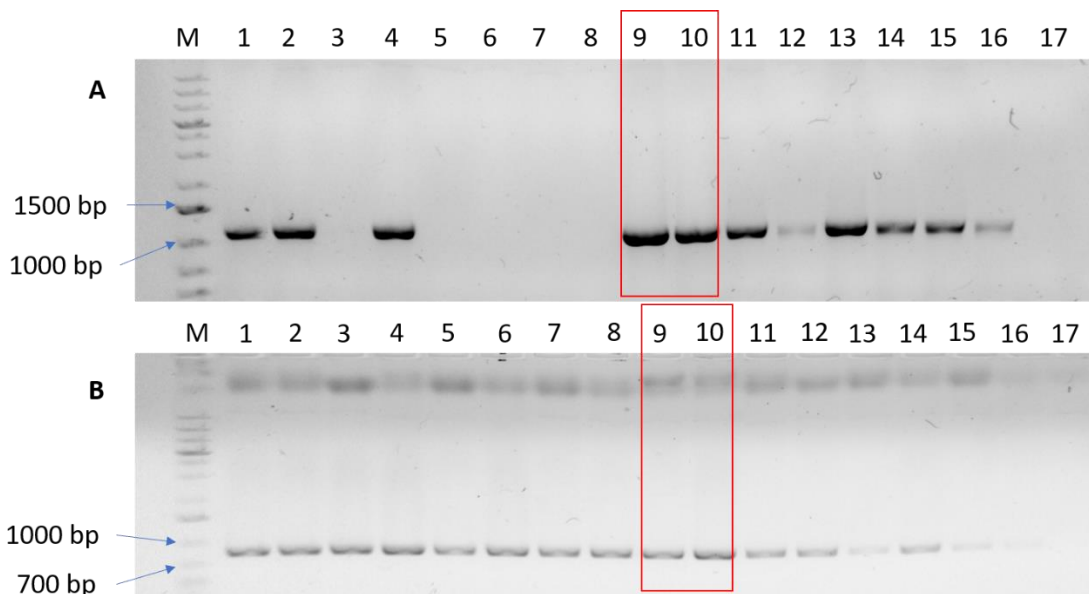


Obr. 16 Výsledky sekvenace heterozygotního mutanta *mpk3-5 2/27-5* generace T2. (A) Porovnání sekvenace amplifikované části genu *MPK3* kontrolní rostliny (horní sekvenace) a selektované rostliny (dolní sekvenace). V sekvenaci selektované rostliny došlo před PAM motivem (AGG, vyznačen zeleně) k inzerci adeninu - A. (B) Určení typu mutace podle grafu sekvenace. Jelikož se píky v místě mutace nepřekrývají a mutace se nachází pouze na jedné alele genu *MPK3*, byla tato rostlina určena jako heterozygotní mutant.

### 4.3 Přítomnost transkriptu *MPK3* v mutantních rostlinách *mpk3-5*

Pro zjištění, zda mutace zapříčiňuje vyřazení genu *MPK3* z činnosti na úrovni transkriptu, byla provedena semikvantitativní RT-PCR. Z potvrzených mutantních rostlin byla izolována RNA, která byla ošetřena DNasou I pro odstranění zbytků DNA ze vzorků RNA. Následně byla RNA pomocí reverzní transkripce přepsána na cDNA, která sloužila jako templát pro následnou PCR reakci pro amplifikaci *MPK3* transkriptu o velikosti 1106 bp. PCR reakce byla vyhodnocena pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 17). Jako endogenní kontrola pro porovnání úrovně exprese byl použit referenční gen elongační faktor 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ). Velikost PCR produktu pro transkript *EF1 $\alpha$*  byla 838 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0 a jako negativní kontrola T-DNA inzerční mutant *mpk3-1* s knock-outovaným genem *MPK3* (Alonso *et al.*, 2003).

Transkript *MPK3* byl přítomen jak v homozygotním mutantovi, tak i v heterozygotech *mpk3-5* (Obr. 17). Přítomnost transkriptu u homozygotní rostliny *mpk3-5* 2/27-1 je pravděpodobně způsobena tím, že mutace genu *MPK3* vznikla inzercí pouze jednoho nukleotidu, na rozdíl od mutantu *mpk3-1*, u kterého byl gen *MPK3* vyřazen vložením dlouhé sekvence T-DNA do genu *MPK3* (Alonso *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu probíhá transkripce genu u homozygotního mutantu normálním způsobem, a proto je transkript *MPK3* přítomen. U heterozygotních mutantů *mpk3-5* je přítomnost transkriptu způsobená jednou nemutovanou alelou, která umožňuje tvorbu transkriptu a dále i proteinu.



M	marker	A <i>MPK3</i> transkript (1106 bp)
1-2	Col-0-1 (pozitivní kontrola)	B <i>EFL1α</i> transkript (836 bp)
3-4	Col-0-2 (pozitivní kontrola)	
5-6	<i>mpk3-1-1</i> (negativní kontrola)	
7-8	<i>mpk3-1-2</i> (negativní kontrola)	
9-10	homozygot <i>mpk3-5 2/27-1</i>	
11-12	heterozygot <i>mpk3-5 2/27-7</i>	
13-14	heterozygot <i>mpk3-5 2/30-8</i>	
15-16	heterozygot <i>mpk3-5 2/30-5</i>	
17	negativní kontrola	

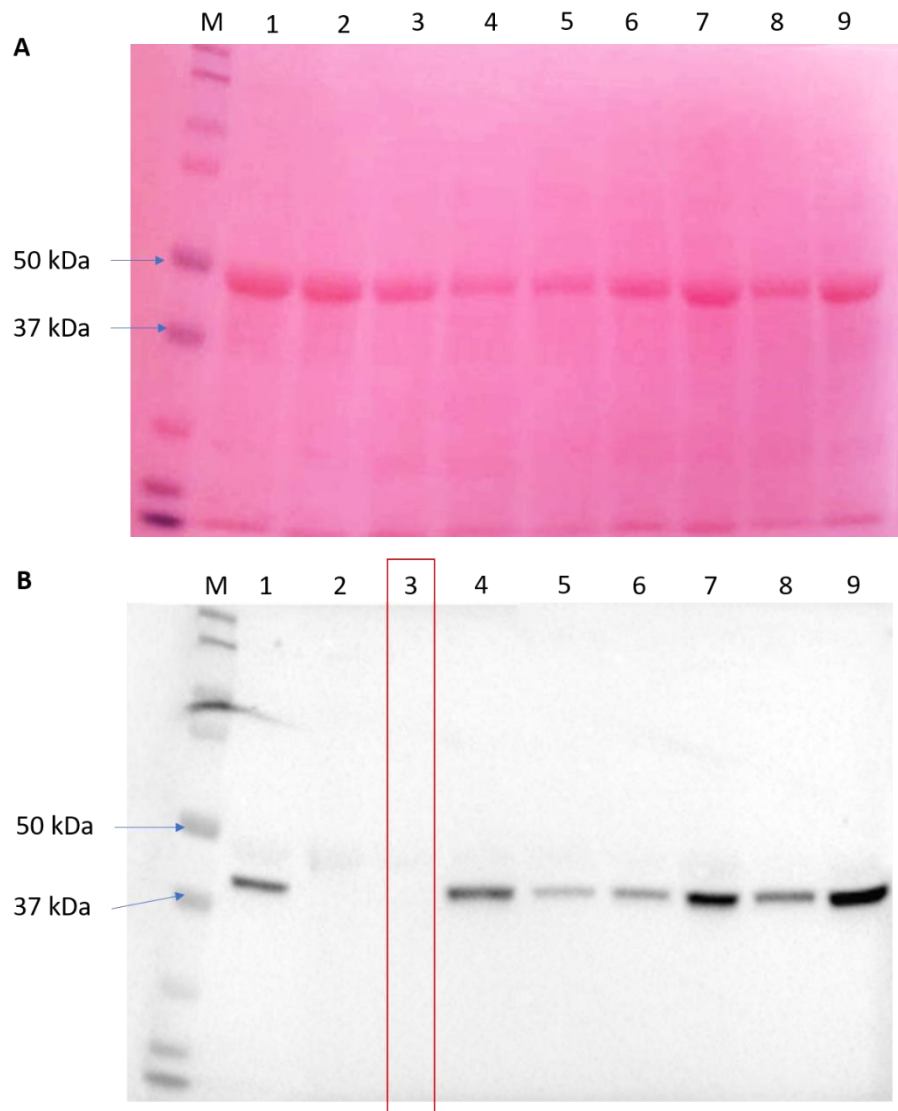
Obr. 17 Semikvantitativní RT-PCR pro ověření přítomnosti transkriptu *MPK3* v mutantních rostlinách *mpk3-5* generace T2. (A) Transkript *MPK3* genu byl přítomný ve všech mutantních rostlinách (9-16) a v Col-0 (1-4) sloužící jako pozitivní kontrola. V mutantovi *mpk3-1* (negativní kontrola) nebyl transkript *MPK3* přítomen (5-8). (B) Transkript referenčního genu *EFL1α* byl přítomen u všech vzorků (1-16). V červeném rámečku je zvýrazněn homozygotní mutant *mpk3-5 2/27-1*. Každý vzorek byl amplifikován ve dvou technických replikátech. Jako negativní kontrola byla použita deionizovaná voda pro PCR (17).

#### 4.4 Nepřítomnost proteinu MPK3 v mutantních rostlinách *mpk3-5*

Protože u všech mutantních rostlin *mpk3-5* byl přítomen transkript genu *MPK3*, bylo nutné ověřit funkčnost mutace v *MPK3* genu na úrovni proteinu za použití metody western blot.

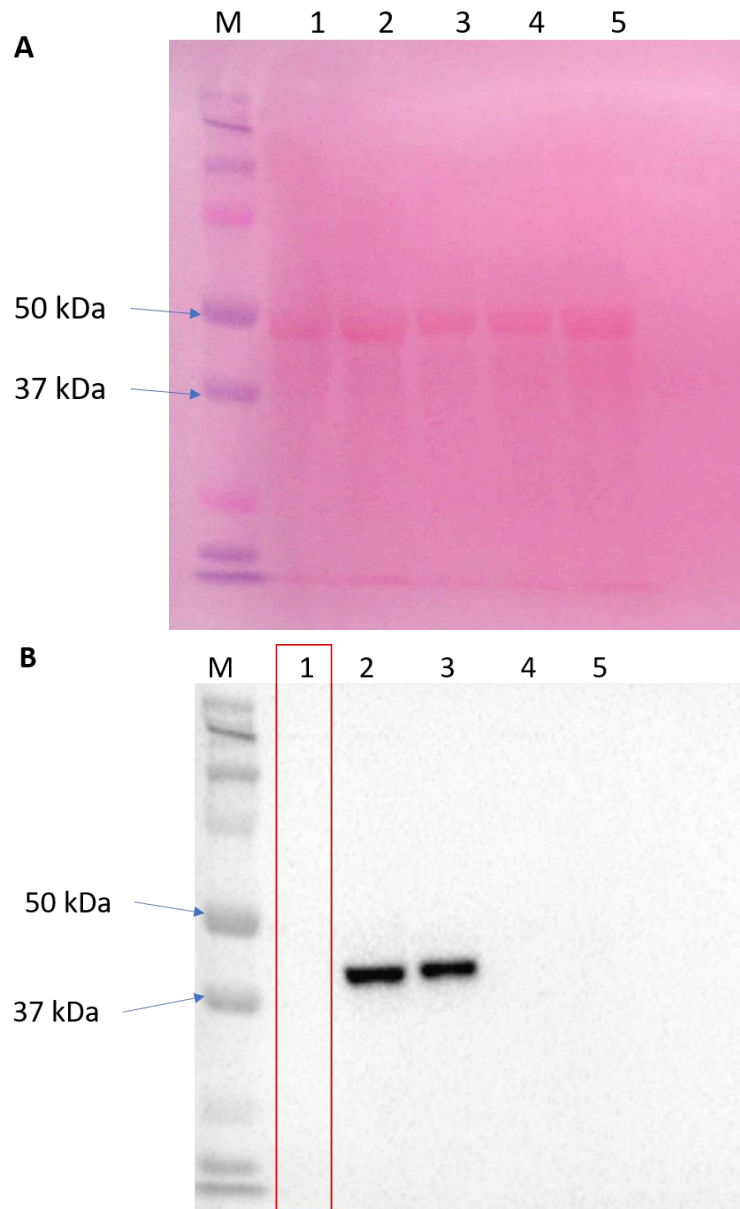
Ze 14denních semenáčků *mpk3-5* (linie 2/27 generace T2 a 2/30 generace T3) byly extrahovány proteiny, které byly separovány na základě molekulové hmotnosti SDS-PAGE elektroforézou. Poté byly proteiny z gelu přeneseny na PVDF membránu. Ověření přenosu proteinů na membránu bylo ověřeno obarvením membrány barvivem Ponceau S (Obr. 18A, 19A). Membrána byla následně inkubována s primární protilátkou proti MPK3 a dále se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou. Vizualizace proteinu MPK3 na membráně o velikosti 42 kDa byla provedena chemiluminiscenčně. Jako negativní kontrola byl použit mutant *mpk3-1* (Alonso *et al.*, 2003), který má vyřazený gen *MPK3* z činnosti, a jako pozitivní kontrola byla použita rostlina ekotypu Col-0.

Bylo dokázáno, že u homozygotního mutantu *mpk3-5* 2/27-1 (Obr. 18B) a transheterozygotního mutantu *mpk3-5* 2/30-1 (Obr. 19B) se protein MPK3 (42 kDa) netvoří, zatímco u všech heterozygotních mutantů (Obr. 18B) byla přítomnost proteinu MPK3 prokázána. Celkem byly tedy získány dvě nezávislé linie mutantu *mpk3-5*, u kterých není syntetizován protein MPK3, čímž bylo prokázáno, že mutace genu *MPK3* pomocí systému CRISPR/Cas9 proběhla úspěšně.



M	marker	5	heterozygot <i>mpk3-5</i> 2/27-10
1	Col-0 (pozitivní kontrola)	6	heterozygot <i>mpk3-5</i> 2/27-7
2	<i>mpk3-1</i> (negativní kontrola)	7	heterozygot <i>mpk3-5</i> 2/30-8
3	homozygot <i>mpk3-5</i> 2/27-1	8	heterozygot <i>mpk3-5</i> 2/30-9
4	heterozygot <i>mpk3-5</i> 2/27-8	9	heterozygot <i>mpk3-5</i> 2/30-5

Obr. 18 (A) Ověření přenosu proteinů na PVDF membránu barvením Ponceau S. (B) Detekce proteinu MPK3 u mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-5* 2/27 generace T2 a *mpk3-5* 2/30 generace T3 metodou western blot. Membrána inkubována s primární protilátkou proti MPK3 a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou. Protein MPK3 o velikosti 42 kDa nebyl detekován u homozygotního mutantu *mpk3-5* linie 2/27-1 v červeném rámečku (3) a u T-DNA inzerčního mutantu *mpk3-1* (2), který sloužil jako negativní kontrola. Naopak u heterozygotních mutantů *mpk3-5* (4-9) byl protein MPK3 detekován stejně jako u kontrolní rostliny Col-0 (1).



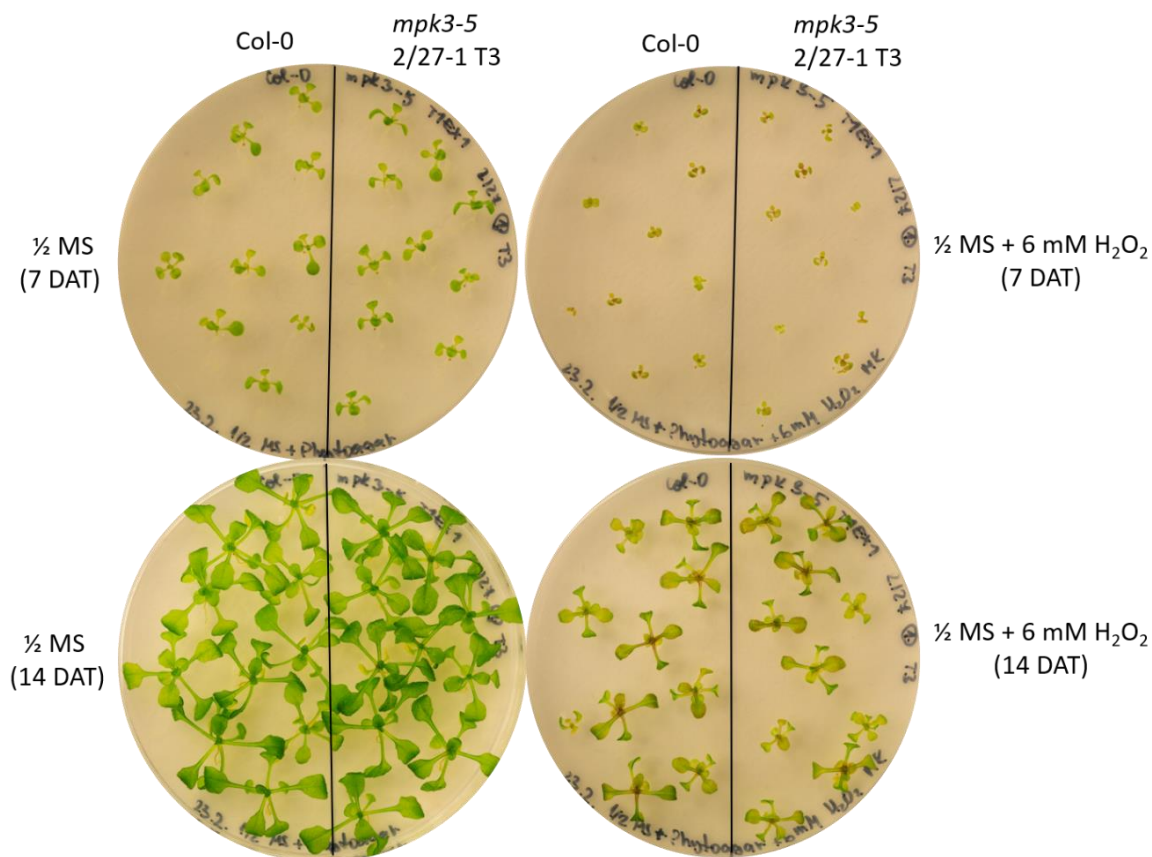
- M marker  
 1 transheterozygot *mpk3-5* 2/30-1  
 2 Col-0-1 (pozitivní kontrola)  
 3 Col-0-2 (pozitivní kontrola)  
 4 mutant *mpk3-1-1* (negativní kontrola)  
 5 mutant *mpk3-1-2* (negativní kontrola)

Obr. 19 (A) Ověření přenosu proteinů na PVDF membránu barvením Ponceau S. (B) Detekce proteinu u mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana mpk3-5* 2/30 generace T3 metodou western blot. Membrána inkubována s primární protilátkou proti MPK3 a sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou. U transheterozygota *mpk3-5* linie 2/30-1 (1), který je označen červeným rámečkem, nebyl protein MPK3 (42 kDa) přítomen stejně jako u negativní kontroly – mutantu *mpk3-1* (4, 5). Protein MPK3 se vyskytoval pouze u pozitivní kontroly, kdy byla použita rostlina ekotypu Col-0 (2, 3).

#### 4.5 Působení oxidativního stresu na mutantní rostliny *mpk3-5*

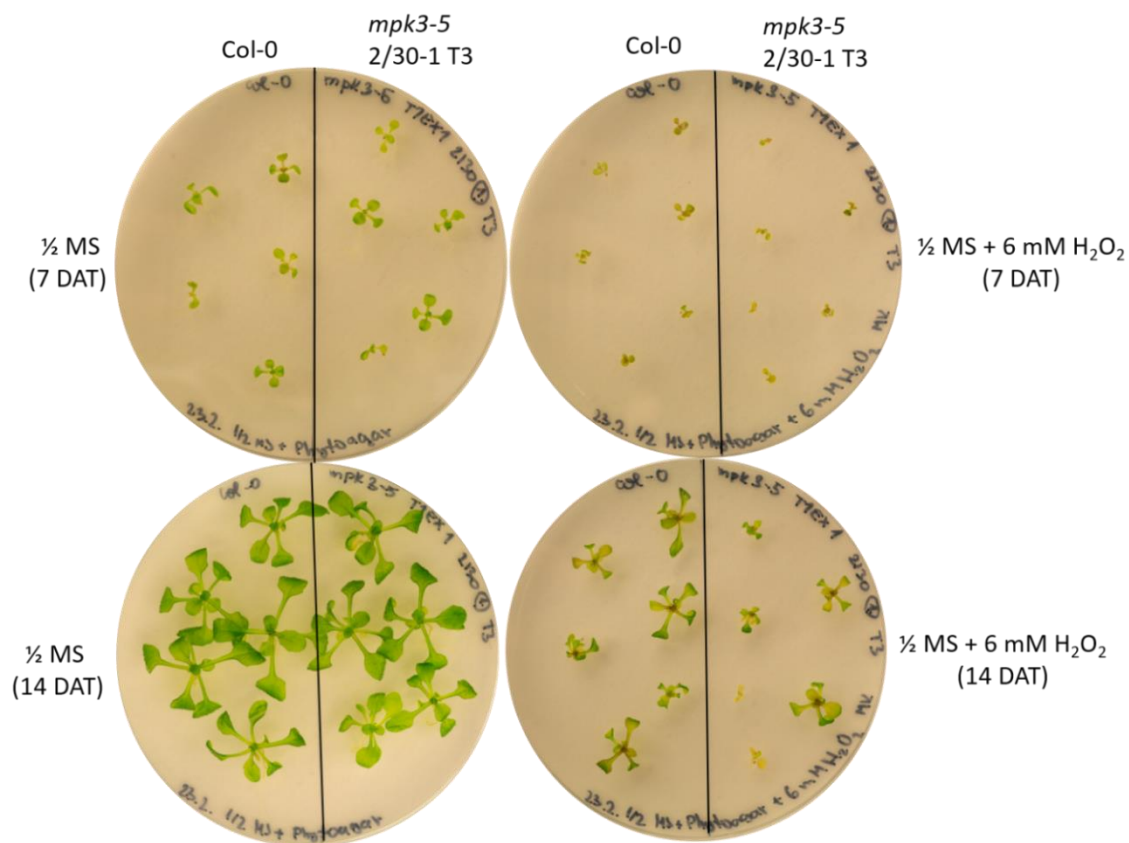
Jelikož MPK3 je součástí signální dráhy reagující na oxidativní stres (Smékalová *et al.*, 2014), předpokládá se, že vyřazení genu *MPK3* z činnosti bude ovlivňovat adaptaci rostlin právě na tento typ stresu. Proto byl na identifikované mutantní rostliny *mpk3-5* linie 2/27-1 a 2/30-1 v generaci T3 aplikován dlouhodobý oxidativní stres v podobě přidání peroxidu vodíku do kultivačního média. Semena zmíněných linií byla vyseta na ½ MS médium a po třech dnech byly semenáčky přeneseny na ½ MS médium s obsahem 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Působení oxidativního stresu bylo dokumentováno po 1 a 2 týdnech.

Ačkoliv se očekávalo, že mutanti *mpk3-5* budou vůči oxidativnímu stresu odolnější (Smékalová, 2014), zvýšená rezistence se v porovnání s kontrolními rostlinami (Col-0) nepotvrdila (Obr. 20, 21). Adaptace kontrolních a mutantních rostlin na přítomnost peroxidu vodíku v kultivačním médiu byla porovnatelná (Obr. 20, 21). Důvodem může být nízká koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v médiu, proto bude v budoucnu experiment opakován s použitím vyšší koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (např. 10 mM).



Obr. 20 Působení oxidativního stresu na homozygotního mutanta *Arabidopsis thaliana* *mpk3-5* 2/27-1 generace T3. Na každé misce byl kultivován stejný počet mutantních a kontrolních semenáčků, jako kontrola byly použity semenáčky ekotypu Col-0. Po aplikaci oxidativního stresu nebyl pozorován významný rozdíl v reakci mutantních a kontrolních rostlin na přítomnost peroxidu vodíku v médiu.





Obr. 21 Působení oxidativního stresu na transheterozygotního mutanta *Arabidopsis thaliana* *mpk3-5* 2/30-1 generace T3. Na každé misce byl kultivován stejný počet mutantních a kontrolních semenáčků, jako kontrola byly použity semenáčky ekotypu Col-0. Po aplikaci oxidativního stresu nebyl opět pozorován významný rozdíl v reakci mutantních a kontrolních rostlin na přítomnost peroxidu vodíku v médiu.

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPKs) a editace genomu pomocí programovatelných nukleas se zaměřením na technologii CRISPR/Cas9, která má velký aplikační potenciál, neboť v porovnání s ostatními metodami je příprava konstruktů pro tento systém jednoznačně jednodušší. Kapitola o MAPKs se soustředí především na mitogen-aktivovanou proteinkinasu 3 (MPK3), která je zapojena v odpovědi rostlin na biotický i abiotický stres (např. oxidativní nebo osmotický), a také hraje důležitou roli při vývoji rostliny.

Experimentální část je zaměřena na identifikaci mutantních linií *Arabidopsis thaliana* s označením *mpk3-5* v generaci T2 s žádoucí mutací genu *MPK3* připravených technologií CRISPR/Cas9. Selekcí pomocí selekčního markeru přítomného v konstrukt, který udává rezistenci na herbicid fosfinitricin, se podařilo vyselektovat celkem 25 mutantních rostlin, ze kterých bylo pomocí sekvencování určeno 23 heterozygotů, 1 homozygot (*mpk3-5* 2/27-1) a 1 transheterozygot (*mpk3-5* 2/30-1). Pomocí metody semikvantitativní RT-PCR bylo zjištěno, že všechny mutantní rostliny, a to heterozygoti, homozygot (*mpk3-5* 2/27-1) i transheterozygot (*mpk3-5* 2/30-1) tvoří transkript *MPK3* genu. U mutantních rostlin byla dále testována přítomnost proteinu MPK3. Jak se předpokládalo, protein MPK3 byl detekován pouze u heterozygotních mutantů, jejichž genom má mutovanou pouze jednu alelu genu *MPK3*, a proto mohou protein MPK3 syntetizovat. U homozygotního a transheterozygotního mutantu protein MPK3 detekován nebyl, čímž bylo prokázáno, že získané mutantní linie připravené technologií CRISPR/Cas9 mají skutečně mutaci v genu *MPK3*. Cílená editace genomu *A. thaliana* tak byla úspěšná. Přítomnost transkriptu *MPK3* a nepřítomnost proteinu MPK3 u homozygotní a transheterozygotní rostliny může být vysvětlena tak, že mutace byla v obou případech způsobena inzercí pouze jednoho nukleotidu, což pravděpodobně umožňuje normální přepis genu, ale transkript buňka dále vyhotoví jako defektní a k proteosyntéze proteinu MPK3 již nedojde. Homozygotní a transheterozygotní linie byly dále testovány na vliv oxidativního stresu v podobě přídatku 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do kultivačního média, kde se bohužel neprokázala zvýšená rezistence mutantních linií *mpk3-5* v porovnání s kontrolními rostlinami (Col-0). Tento experiment bude v budoucnu opakován s vyšší koncentrací peroxidu vodíku.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brosché M., Schlichting R., Scheel D., Kangasjärvi J. (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **40**, 512–522.
- Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J. R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 653–657.
- Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. (2014): Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* **513**, 569–573.
- Andersson A. F., Banfield J. F. (2008): Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 1047–1050.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- Bardwell L., Thorner J. (1996): A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 373–374.
- Barrangou R., Horvath P. (2012): CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annual Review of Food Science and Technology* **3**, 143–162.
- Bedell V. M., Wang Y., Campbell J. M., Poshusta T. L., Starker C. G., Krug II 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.
- Beerli R. R., Barbas C. F. (2002): Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nature Biotechnology* **20**, 135–141.
- Bibikova M., Carroll D., Segal D. J., Trautman J. K., Smith J., Kim Y. G., Chandrasegaran S. (2001): Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 289–297.
- Bitinaite J., Wah D. A., Aggarwal A. K., Schildkraut I. (1998): FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10570–10575.
- Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2011): TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science (New York, N.Y.)* **333**, 1843–1846.
- 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**, 101–113.
- Boch J., Bonas U. (2010): Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 419–436.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (New York, N.Y.)* **326**, 1509–1512.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. (2005): Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, England)* **151**, 2551–2561.
- Brouns S. J. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J. H., Snijders A. P. L., Dickman M. J., Makarova K. S., Koonin E. V., van der Oost J. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)* **321**, 960–964.
- Brown M. D., Sacks D. B. (2009): Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling* **21**, 462–469.

- Calderini O., Glab N., Bergounioux C., Heberle-Bors E., Wilson C. (2001): A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 18139–18145.
- Camps M., Nichols A., Arkinstall S. (2000): Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal* **14**, 6–16.
- Carbery I. D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E. J., Liaw L., Cui X. (2010): Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* **186**, 451–459.
- Carlson D. F., Tan W., Lilloco S. G., Stverakova D., Proudfoot C., Christian M., Voytas D. F., Long C. R., Whitelaw C. B. A., Fahrenkrug S. C. (2012): Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 17382–17387.
- Carroll D. (2011): Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188**, 773–782.
- Cermak T., Doyle E. L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J. A., Somia N. V., Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2011): Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* **39**, e82.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical Journal* **413**, 217–226.
- Colleaux L., d'Auriol L., Betermier M., Cottarel G., Jacquier A., Galibert F., Dujon B. (1986): Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease. *Cell* **44**, 521–533.
- 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 (New York, N.Y.)* **339**, 819–823.
- Dai Y., Wang H., Li B., Huang J., Liu X., Zhou Y., Mou Z., Li J. (2006): Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**, 308–320.
- Doudna J. A., Charpentier E. (2014): Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)* **346**, 1258096.
- Enslin H., Davis R. J. (2001): Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biology of the Cell* **93**, 5–14.
- Fausser F., Schiml S., Puchta H. (2014): Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **79**, 348–359.
- FDA (2017): FDA approval brings first gene therapy of the United States. U. S. Food And Drug Administration. (online) Dostupné z: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsrom/PressAnnouncements/ucm574058.htm> (16. 2. 2018)
- Feilner T., Hultschig C., Lee J., Meyer S., Immink R. G. H., Koenig A., Possling A., Seitz H., Beveridge A., Scheel D., Cahill D. J., Lehrach H., Kreuzberger J., Kersten B. (2005): High Throughput Identification of Potential Arabidopsis Mitogen-activated Protein Kinases Substrates. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**, 1558–1568.
- Fink G. R. (1998): Anatomy of a revolution. *Genetics* **149**, 473–477.
- Fransz P., Armstrong S., Alonso-Blanco C., Fischer T. C., Torres-Ruiz R. A., Jones G. (1998): Cytogenetics for the model system Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **13**, 867–876.
- Frye C. A., Tang D., Innes R. W. (2001): Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 373–378.
- Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* **31**, 397–405.
- Garrington T. P., Johnson G. L. (1999): Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 211–218.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E2579–2586.

- Geurts A. M., Cost G. J., Freyvert Y., Zeitler B., Miller J. C., Choi V. M., Jenkins S. S., Wood A., Cui X., Meng X., Vincent A., Lam S., Michalkiewicz M., Schilling R., Foeckler J., Kalloway S., Weiler H., Ménoret S., Anegón I., Davis G. D., Zhang L., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D., Jacob H. J., Buelow R. (2009): Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 433.
- Guan Y., Lu J., Xu J., McClure B., Zhang S. (2014a): Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in Arabidopsis. *Plant Physiology* **165**, 528–533.
- Guan Y., Meng X., Khanna R., LaMontagne E., Liu Y., Zhang S. (2014b): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in Arabidopsis. *PLoS genetics* **10**, e1004384.
- Guy C. P., Majerník A. I., Chong J. P. J., Bolt E. L. (2004): A novel nuclease-ATPase (Nar71) from archaea is part of a proposed thermophilic DNA repair system. *Nucleic Acids Research* **32**, 6176–6186.
- Haft D. H., Selengut J., Mongodin E. F., Nelson K. E. (2005): A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology* **1**, e60.
- Hahn A., Harter K. (2009): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Ethylene: Signaling, Biosynthesis, or Both? *Plant Physiology* **149**, 1207–1210.
- Händel E.-M., Alwin S., Cathomen T. (2009): Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* **17**, 104–111.
- He C., 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: MPMI* **12**, 1064–1073.
- Hickey S. F., Sridhar M., Westermann A. J., Qin Q., Vijayendra P., Liou G., Hammond M. C. (2012): Transgene regulation in plants by alternative splicing of a suicide exon. *Nucleic Acids Research* **40**, 4701–4710.
- Champion A., Picaud A., Henry Y. (2004): Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends in Plant Science* **9**, 123–129.
- Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2010): Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* **186**, 757–761.
- 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.
- International Rice Genome Sequencing Project (2005): The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793–800.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* **169**, 5429–5433.
- Jansen R., Embden J. D. A. van, Gaastra W., Schouls L. M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **43**, 1565–1575.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* **337**, 816–821.
- Jonak C., Okrészl L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415–424.
- Jouannic S., Hamal A., Leprince A. S., Tregear J. W., Kreis M., Henry Y. (1999): Plant MAP kinase kinase kinases structure, classification and evolution. *Gene* **233**, 1–11.
- Joung J. K., Sander J. D. (2013): TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 49–55.

- Katavic V., Haughn G. W., Reed D., Martin M., Kunst L. (1994): In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & general genetics: MGG* **245**, 363–370.
- Kieber J. J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K. A., Ecker J. R. (1993): CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427–441.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12**, 2247–2258.
- Kim S., Kim D., Cho S. W., Kim J., Kim J.-S. (2014): Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research* **24**, 1012–1019.
- Kim S.-H., Woo D.-H., Kim J.-M., Lee S.-Y., Chung W. S., Moon Y.-H. (2011): *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **412**, 150–154.
- Kim 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 of the United States of America* **93**, 1156–1160.
- Kim Y. G., Chandrasegaran S. (1994): Chimeric restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 883–887.
- Kim Y. G., Smith J., Durgesha M., Chandrasegaran S. (1998): Chimeric restriction enzyme: Gal4 fusion to FokI cleavage domain. *Biological Chemistry* **379**, 489–495.
- Kondoh K., Nishida E. (2007): Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1773**, 1227–1237.
- Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2940–2945.
- Kovtun Y., Chiu W. L., Zeng W., Sheen J. (1998): Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* **395**, 716–720.
- Krämer U. (2015): Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**.
- Lee J. S., Ellis B. E. (2007): *Arabidopsis* MAPK Phosphatase 2 (MKP2) Positively Regulates Oxidative Stress Tolerance and Inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25020–25029.
- Lei Y., Guo X., Liu Y., Cao Y., Deng Y., Chen X., Cheng C. H. K., Dawid I. B., Chen Y., Zhao H. (2012): Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 17484–17489.
- Li J.-F., Norville J. E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G. M., Sheen J. (2013): Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology* **31**, 688–691.
- Li L., Wu L. P., Chandrasegaran S. (1992): Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4275–4279.
- Li T., Huang S., Jiang W. Z., Wright D., Spalding M. H., Weeks D. P., Yang B. (2011): TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research* **39**, 359–372.
- Li T., Liu B., Spalding M. H., Weeks D. P., Yang B. (2012): High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology* **30**, 390–392.
- Liu J., Li C., Yu Z., Huang P., Wu H., Wei C., Zhu N., Shen Y., Chen Y., Zhang B., Deng W.-M., Jiao R. (2012): Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* **39**, 209–215.
- Liu Q., Segal D. J., Ghiara J. B., Barbas C. F. (1997): Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5525–5530.

- Liu W., Rudis M. R., Peng Y., Mazarei M., Millwood R. J., Yang J.-P., Xu W., Chesnut J. D., Stewart C. N. (2014): Synthetic TAL effectors for targeted enhancement of transgene expression in plants. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 436–446.
- Liu X.-M., Kim K. E., Kim K.-C., Nguyen X. C., Han H. J., Jung M. S., Kim H. S., Kim S. H., Park H. C., Yun D.-J., Chung W. S. (2010): Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* **71**, 614–618.
- Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Solé M., Capellades M., Valls M., Coca M., Pagès M. (2010): MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in Arabidopsis and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *The Plant Journal* **63**, 1017–1030.
- Ma S., Zhang S., Wang F., Liu Yong, Liu Yuanyuan, Xu H., Liu C., Lin Y., Zhao P., Xia Q. (2012): Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS One* **7**, e45035.
- Mahfouz M. M., Li L., Piatek M., Fang X., Mansour H., Bangarusamy D. K., Zhu J.-K. (2012): Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. *Plant Molecular Biology* **78**, 311–321.
- Mahfouz M. M., Li L., Shamimuzzaman M., Wibowo A., Fang X., Zhu J.-K. (2011): De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 2623–2628.
- Mahfouz M. M., Piatek A., Stewart C. N. (2014): Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 1006–1014.
- Makarova K. S., Aravind L., Grishin N. V., Rogozin I. B., Koonin E. V. (2002): A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research* **30**, 482–496.
- Makarova K. S., Aravind L., Wolf Y. I., Koonin E. V. (2011a): Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology Direct* **6**, 38.
- Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalina S. A., Wolf Y. I., Koonin E. V. (2006): A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct* **1**, 7.
- Makarova K. S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J. J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Wolf Y. I., Yakunin A. F., van der Oost J., Koonin E. V. (2011b): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* **9**, 467–477.
- Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)* **339**, 823–826.
- Marraffini L. A., Sontheimer E. J. (2008): CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 1843–1845.
- Mashimo T., Takizawa A., Voigt B., Yoshimi K., Hiai H., Kuramoto T., Serikawa T. (2010): Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* **5**, e8870.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K., Fukami Y., Kikkawa U., Yasuda T. (2002): Activation of AtMEK1, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in E. coli and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **29**, 637–647.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M. (1998): Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science (New York, N.Y.)* **282**, 662, 679–682.
- Meyer M., de Angelis M. H., Wurst W., Kühn R. (2010): Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15022–15026.
- Meyerowitz E. M., Somerville C. R. (Ed.) (1994): Arabidopsis, Cold Spring Harbor monograph series. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.

- Miles G. P., Samuel M. A., Ellis B. E. (2009): Suppression of MKK5 reduces ozone-induced signal transmission to both MPK3 and MPK6 and confers increased ozone sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 687–692.
- Miles G. P., Samuel M. A., Zhang Y., Ellis B. E. (2005): RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* **138**, 230–237.
- Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K. A., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E., Hinkley S. J., Dulay G. P., Hua K. L., Ankoudinova I., Cost G. J., Urnov F. D., Zhang H. S., Holmes M. C., Zhang L., Gregory P. D., Rebar E. J. (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* **29**, 143–148.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 765–769.
- Mojica F. J., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. (2000): Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* **36**, 244–246.
- Mojica F. J. M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* **60**, 174–182.
- Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001): The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes & Development* **15**, 352–363.
- Patterson K. I., Brummer T., O'Brien P. M., Daly R. J. (2009): Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical Journal* **418**, 475–489.
- Pavletich N. P., Pabo C. O. (1991): Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science (New York, N.Y.)* **252**, 809–817.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., Mundy J. (2000): *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111–1120.
- Pitzschke A., Djamei A., Bitton F., Hirt H. (2009): A Major Role of the MEKK1–MKK1/2–MPK4 Pathway in ROS Signalling. *Molecular Plant* **2**, 120–137.
- Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. (2005): CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading, England)* **151**, 653–663.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. (1996): Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5055–5060.
- Puchta H., Fauser F. (2014): Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal* **78**, 727–741.
- Qasim W., Zhan H., Samarasinghe S., Adams S., Amrolia P., Stafford S., Butler K., Rivat C., Wright G., Somana K., Ghorashian S., Pinner D., Ahsan G., Gilmour K., Lucchini G., Inglott S., Mifsud W., Chiesa R., Peggs K. S., Chan L., Farzaneh F., Thrasher A. J., Vora A., Pule M., Veys P. (2017): Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Science Translational Medicine* **9**.
- Quimby B. B., Wilson C. A., Corbett A. H. (2000): The interaction between Ran and NTF2 is required for cell cycle progression. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2617–2629.
- Ramakrishna S., Kwaku Dad A.-B., Beloor J., Gopalappa R., Lee S.-K., Kim H. (2014): Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Research* **24**, 1020–1027.



- Rentel M. C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S. L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S. C., Grierson C. S., Hirt H., Knight M. R. (2004): OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**, 858.
- Römer P., Recht S., Lahaye T. (2009): A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20526–20531.
- Sander J. D., Cade L., Khayter C., Reyon D., Peterson R. T., Joung J. K., Yeh J.-R. J. (2011): Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology* **29**, 697–698.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J. D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff S. A. (2002): A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant Cell* **14**, 2985–2994.
- Shimizu Y., Bhakta M. S., Segal D. J. (2009): Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 3970–3972.
- Shukla V. K., Doyon Y., Miller J. C., DeKolver R. C., Moehle E. A., Worden S. E., Mitchell J. C., Arnold N. L., Gopalan S., Meng X., Choi V. M., Rock J. M., Wu Y.-Y., Katibah G. E., Zhifang G., McCaskill D., Simpson M. A., Blakeslee B., Greenwalt S. A., Butler H. J., Hinkley S. J., Zhang L., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D. (2009): Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 437–441.
- 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: MPMI* **12**, 882–893.
- Smékalová V. (2014): Characterization of selected *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase mutants. Disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances*, Plant Biotechnology 2013: „Green for Good II". **32**, 2–11.
- Smith J., Bibikova M., Whitby F. G., Reddy A. R., Chandrasegaran S., Carroll D. (2000): Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Research* **28**, 3361–3369.
- Son Y., Cheong Y.-K., Kim N.-H., Chung H.-T., Kang D. G., Pae H.-O. (2011): Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of Signal Transduction* **2011**, 1–6.
- Sternberg S. H., Redding S., Jinek M., Greene E. C., Doudna J. A. (2014): DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* **507**, 62–67.
- Stoner G. D., Wang L.-S., Casto B. C. (2008): Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis* **29**, 1665–1674.
- Sun C. L., Barrangou R., Thomas B. C., Horvath P., Fremaux C., Banfield J. F. (2013): Phage mutations in response to CRISPR diversification in a bacterial population. *Environmental Microbiology* **15**, 463–470.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012): ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **35**, 259–270.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M. A., Mittler R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14/6 Cell biology **14**, 691–699.
- Symington L. S., Gautier J. (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* **45**, 247–271.
- 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.
- Tesson L., Usal C., Ménoret S., Leung E., Niles B. J., Remy S., Santiago Y., Vincent A. I., Meng X., Zhang L., Gregory P. D., Anegón I., Cost G. J. (2011): Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature Biotechnology* **29**, 695–696.
- Thannickal V. J., Fanburg B. L. (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**, L1005-1028.

- Townsend J. A., Wright D. A., Winfrey R. J., Fu F., Maeder M. L., Joung J. K., Voytas D. F. (2009): High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 442–445.
- Urnov F. D., Rebar E. J., Holmes M. C., Zhang H. S., Gregory P. D. (2010): Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews. Genetics* **11**, 636–646.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44–84.
- Voytas D. F. (2013): Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 327–350.
- Wang F., Shang Y., Fan B., Yu J.-Q., Chen Z. (2014): Arabidopsis LIP5, a Positive Regulator of Multivesicular Body Biogenesis, Is a Critical Target of Pathogen-Responsive MAPK Cascade in Plant Basal Defense. *PLoS Pathogens* **10**.
- Watanabe T., Ochiai H., Sakuma T., Horch H. W., Hamaguchi N., Nakamura T., Bando T., Ohuchi H., Yamamoto T., Noji S., Mito T. (2012): Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nature Communications* **3**, 1017.
- Wood A. J., Lo T.-W., Zeitler B., Pickle C. S., Ralston E. J., Lee A. H., Amora R., Miller J. C., Leung E., Meng X., Zhang L., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D., Meyer B. J. (2011): Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science (New York, N.Y.)* **333**, 307.
- Xing Y., Cao Q., Zhang Q., Qin L., Jia W., Zhang J. (2013): MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* **54**, 1217–1227.
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G., Ren D. (2008): Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 26996–27006.
- Xu J., Meng J., Meng X., Zhao Y., Liu J., Sun T., Liu Y., Wang Q., Zhang S. (2016): Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in Arabidopsis Immunity. *The Plant Cell* **28**, 1144–1162.
- Zhang T., Liu Y., Yang T., Zhang L., Xu S., Xue L., An L. (2006): Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant physiology and biochemistry: PPB* **44**, 274–283.
- Zhou C., Cai Z., Guo Y., Gan S. (2009): An arabidopsis mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology* **150**, 167–177.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAD	acidická aktivační doména na TALEs
<i>ADH1</i>	gen pro alkoholdehydrogenasu 1
AMK	aminokyselina
ANP	<i>Arabidopsis</i> NPK1- related proteinkinasa
ApE	A plasmid editor - program na vyhodnocení sekvenace
ATN1	Atropin1-like proteinkinasa
B-ALL	B-buňky způsobující akutní lymfoblastickou leukémií
<i>BAR</i>	gen pro resistenci na fosfotricin
BSA	hovězí sérový albumin
Cas9	nukleasa 9 asociovaná s CRISPR
CCR5	C-C receptor chemikonu
Col-0	ekotyp Columbia rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>
CRISPR	nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
crRNA	CRISPR RNA
CTR1	kinasa konstitutivní trojnásobné reakce 1 (Constitutive Triple Response 1)
DAT	dní po přenosu
DBDs	doména vázající se na DNA na TALEs
dNTPs	deoxyribonukleotidy
DSBs	dvojitě zlomy na vláknech DNA (double-strand breaks)
ECL	chemiluminiscenční substrát
EDR1	kinasa pro resistenci k nemocem (Enhanced Disease Resistance 1)
EF-1 $\alpha$	elongační faktor 1 $\alpha$
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FLS2	receptor na přítomnost flagellinu 22
gDNA	genomová DNA
GSH	glutathion
HEK293	lidské embryonální buňky ledvin 293
HRP	křenová peroxidasa
K562	imortalizované buňky myelogenní leukémie
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
Ler	ekotyp Landsberg erecta rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>

MAP2K	mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa (MAPKK, MKK)
MAP3K	mitogen-aktivované proteinkinasa kinasa kinasa (MAPKKK, MEKK)
MAPK	mitogen-aktivované proteinkinasy (MPK)
MilliQ	deionizovaná voda
MKP	fosfatasa mitogen-aktivovaných proteinkinás
MRK1	<i>Arabidopsis</i> MPL/Raf-related proteinkinasa 1
MS	Murashige & Skoog
NPK1	<i>Nicotiana</i> proteinkinasa 1
<i>OXII</i>	gen účastnící se odpovědi na oxidativní stres (Oxidative signal-inducible1)
PAGE	gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAM	motiv přiléhající k protospaceru
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPT	fosfinotricin
PVDF	polyvinylidendifluorid
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (Reactive oxygen speciese)
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
RVDs	hypervariabilní dvojité zbytky
SAIL	Inzerční knihovna <i>Arabidopsis</i>
SALK	Institut biologických studií (Jonas Edward Salk)
SDS	dodecylsulfát sodný
sgRNA	navádějící RNA (single guide RNA)
SOD	superoxiddismutasa
TALENs	nukleasy transkripčních faktorů (transcription activator-like nukleases)
TALEs	efektory transkripčních aktivátorů, DNA-vazebná doména TALENs
T-DNA	transferová DNA vložena do hostitele
tracrRNA	transaktivační crRNA
<i>TT4</i>	transparent tesla 4 gen
U2OS	buňky osteosarkomu
ZFNs	nukleasy zinkových prstů