

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Gabriela Šerá

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Příprava rekombinantních enzymů
Fe superoxiddismutasy 2/3 z rostliny
*Arabidopsis thaliana***

Bakalářská práce

Gabriela Šerá

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Gabriela ŠERÁ**
Osobní číslo: **R21755**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Příprava rekombinantních enzymů Fe superoxiddismutasy 2/3 z rostliny *Arabidopsis thaliana***
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Vypracování řešerše na téma: Reaktivní formy kyslíku, jejich role při buněčné signalizaci a odpovědi na (a)biotický stres. Antioxidační obrana rostlin se zaměřením na superoxiddismutasy s důrazem na jejich funkci při obraně a regulaci chloroplastů.

Experimentální cíle: Získání praktických zkušeností v práci s bakteriálními kulturami, rostlinami a v základních molekulárně-biologických a biochemických metodách.

Příprava konstruktů pro bakteriální expresi rekombinantní FSD2 a FSD3 z rostliny *Arabidopsis thaliana* pomocí vektorů pGEX a pMAL. Transformace a optimalizace exprese FSD2/FSD3 v expresních bateriích *E.coli* BL21 Star (DE3). Afinní purifikace rekombinantních FSD2/FSD3. Selektce mutantních linií *fsd2* a *fsd3* T-DNA inzerčních mutantů pomocí metody genotypování a jejich následná fenotypová analýza.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 23,

Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 69, 209–236.

Dvořák, P., Krasylenko, Y., Ovečka, M., Basheer, J., Zapletalová, V., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). In vivo light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant, cell & environment*, 44(1), 68–87.

Dvořák, P., Krasylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in plant science*, 11, 618835.

Castro, B., Citterico, M., Kimura, S., Stevens, D. M., Wrzaczek, M., & Coaker, G. (2021). Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature plants*, 7(4), 403–412.

Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Izumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., et al. (2008). A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 3148–3162.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.**
Katedra biotechnologií

Datum zadání bakalářské práce: 6. dubna 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 11. dubna 2023

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Gabriela Šerá

Název práce: Příprava rekombinantních enzymů Fe superoxiddismutasy 2/3 z rostliny *Arabidopsis thaliana*

Typ práce (bakalářská, diplomová): bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: (a)biotický stres, reaktivní formy kyslíku, antioxidační ochrana, chloroplast, superoxiddismutázy, FSD2, FSD3, *Arabidopsis thaliana*

Počet stran: 69

Počet příloh: 5

Jazyk: český

SOUHRN

Superoxiddismutázy jsou nepostradatelnou složkou enzymatické antioxidační obrany rostlin, jelikož zprostředkovávají přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který je současnou literaturou popisován jakožto významná signální molekula. Díky této specifické reakci neřadíme superoxiddismutázy jenom mezi důležité prvky obrany rostlin, ale taktéž mezi esenciální součást signálních a vývojových procesů rostlin. V chloroplastu, kde probíhá jeden z nejvýznamnějších procesů rostlin známý jako fotosyntéza, se nachází u rostliny *Arabidopsis thaliana* tři významné Fe superoxiddismutázy (FSD) a to konkrétně FSD1, FSD2 a FSD3. FSD2 a FSD3 mají významnou roli při obraně chloroplastu před oxidativním stresem spojeným s fotosyntézou a jsou esenciální pro raný vývoj chloroplastu. Jsou taktéž součástí plastid-encoded polymerase (PEP) komplexu. Ten zodpovídá za transkripci genů kódovaných v plastidovém genomu, kde se nachází naprostá většina genů potřebných pro plnou funkci fotosyntetického aparátu.

Z tohoto důvodu byla teoretická část bakalářské práce věnována shrnutí nejdůležitějších poznatků o reaktivních formách kyslíku, antioxidační obraně rostlin a superoxiddismutázách, se zaměřením na FSD2 a FSD3. Pomocí molekulárních klonovacích technik byly připraveny konstrukty pro přípravu fúzních rekombinantních proteinů *pMAL-c2X::FSD2*, *pGEX6P-1::FSD2* a *pMAL-c2X::FSD3*, *pGEX6P-1::FSD3*. Tyto konstrukty byly následně využity pro přípravu rekombinantních proteinů v bakteriálním expresním systému. Následnou afinitní purifikací byly získány čisté frakce GST-FSD2, MBP-FSD2 a GST-FSD3,

MBP-FSD3 proteinů, na kterých byla provedena biochemická analýza. V experimentální části byla také provedena selekce *fsd2* a *fsd3* mutantů pomocí alelově specifické PCR a jejich fenotypová analýza. Selektované mutantní linie a připravené rekombinantní enzymy budou sloužit pro následné studium úloh FSD2 a FSD3 u *Arabidopsis*.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Gabriela Šerá

Title: Preparation of recombinant Fe superoxide dismutase 2/3 enzymes from *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis (bachelor, master): bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, FS UP in Olomouc

Supervisor: Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: (a)biotic stress, reactive oxygen species, antioxidant protection, chloroplast, superoxide dismutases, FSD2, FSD3, *Arabidopsis thaliana*

Number of pages: 69

Number of appendices: 5

Language: Czech

SUMMARY

Superoxide dismutases are an indispensable component of the enzymatic antioxidant defence of plants, as they mediate the conversion of superoxide to hydrogen peroxide, which is described in the current literature as an important signalling molecule. This specific reaction makes superoxide dismutases not only an important element of plant defence but also an essential component of plant signalling and development. Three important *Arabidopsis thaliana* Fe superoxide dismutases (FSDs), namely FSD1, FSD2 and FSD3, are found in the chloroplast, where one of the most important plant processes, known as photosynthesis, takes place. FSD2 and FSD3 play an important role in chloroplast defence against oxidative stress, which is associated with photosynthesis. Moreover, both are essential for early chloroplast development as a part of the plastid-encoded polymerase (PEP) complex, which is responsible for the transcription of genes encoded in the plastid genome.

For this reason, the theoretical part of the bachelor thesis was devoted to summarizing the most important knowledge about reactive oxygen species, antioxidant defence of plants and superoxide dismutases with a focus on FSD2 and FSD3. Using molecular cloning techniques, various constructs for the preparation of recombinant fusion proteins were prepared: *pMAL-c2X::FSD2*, *pGEX6P-1::FSD2*, *pMAL-c2X::FSD3* and *pGEX6P-1::FSD3*. These constructs were subsequently used to prepare recombinant proteins in a bacterial expression system. Subsequently, specific affinity purification was performed and purified fractions of GST-FSD2, MBP-FSD2, GST-FSD3 and MBP-FSD3 were analysed by using biochemical

approaches. In the experimental part, selection of *fsd2* and *fsd3* mutants by allele-specific PCR and their phenotypic analysis were also performed. The selected mutant lines and the prepared recombinant enzymes will be used for subsequent studies of FSD2 and FSD3 role in Arabidopsis.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, za použití uvedených literárních zdrojů, pod vedením Mgr. Petra Dvořáka, Ph.D.

V Olomouci dne 18. 3. 2024.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především Mgr. Petru Dvořákovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, věnovaný čas, cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc při zpracování teoretické i praktické části této práce.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Reaktivní formy kyslíku.....	3
3.1.1	Signální role ROS.....	6
3.1.2	Vývojová role ROS	11
3.2	Antioxidační obrana.....	12
3.3	Superoxiddismutázy	14
3.3.1	Role při obraně chloroplastů	16
3.3.2	FSD2 a FSD3 u <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
4	Materiál a metody	20
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	25
4.4	Seznam použitých programů a databází	27
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	27
4.5.1	PCR amplifikace <i>FSD2</i> a <i>FSD3</i> genů	27
4.5.2	Horizontální elektroforetická separace v 1% agarozovém gelu.....	28
4.5.3	Izolace a purifikace amplifikované DNA.....	28
4.5.4	Enzymatické štěpení vektorů a produktů	29
4.5.5	Ligace produktů štěpení	30
4.5.6	Transformace bakteriálních buněk <i>Escherichia coli</i> , One Shot TOP10	31
4.5.7	Kultivace transformovaných bakterií	32
4.5.8	Izolace plazmidové DNA	32
4.5.9	Štěpení plazmidové DNA pomocí restričních endonukleáz	33
4.5.10	Purifikace plazmidové DNA	33
4.5.11	Transformace bakteriálních buněk <i>Escherichia coli</i> , BL21 Star (DE3)	34
4.5.12	Nasazení transformovaných bakteriálních buněk	34
4.5.13	Lýze bakteriálních buněk	35
4.5.14	Afinitní purifikace rekombinantních enzymů FSD	35
4.5.15	SDS-PAGE.....	36
4.5.16	Měření koncentrace rekombinantních enzymů FSD	36

4.5.17	Stanovení enzymatické aktivity rekombinantních enzymů FSD	37
4.5.18	Imunoblotování	38
4.5.19	Povrchová sterilizace semen	39
4.5.20	Výsev sterilních semen.....	39
4.5.21	Alelově specifická PCR	40
5	Výsledky	42
5.1	PCR amplifikace <i>FSD2</i> a <i>FSD3</i> genů.....	42
5.2	Příprava konstruktů amplifikované DNA s vektory pGEX6P-1 a pMAL-c2X	43
5.3	Afinitní purifikace připravených rekombinantních enzymů FSD.....	45
5.4	Biochemická analýza rekombinantních enzymů FSD.....	47
5.5	Alelově specifická PCR.....	50
5.6	Fenotypová analýza mutantních rostlin.....	53
6	Diskuse.....	55
7	Závěr	58
8	Literatura.....	59
9	Přílohy.....	69

Seznam symbolů a zkratek

$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
ABA	Kyselina abscisová
AMP	Ampicilin
ANAC	Nac domain containing protein
APS	Peroxodisíran amonný
APX	Askorbát peroxidázy
APX	Askorbát peroxidáza
Asc	Askorbát
CAT	Kataláza
CBL4	Potato calcineurin B-like protein 4
CIPK26	Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase 26
CO_2	Oxid uhličitý
CRK	Cysteine-rich receptor-like kinázy
Cys	Cystein
DHA	Dehydroaskorbát
DHAR	Dehydroaskorbát reduktáza
dNTP	Deoxyribonukleotidy
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FSD2	Fe superoxiddismutáza 2
FSD3	Fe superoxiddismutáza 3
GFP	Zelený fluorescenční protein (Green fluorescent protein)
GPX	Glutation peroxidáza
GR	Glutation reduktáza
GRX	Glutaredoxiny
GSH	Glutation
GSNO	S-nitrosoglutation
GSSG	Glutation disulfid
GST	Gluthathione S-transferase
H_2O_2	Peroxid vodíku
HPCA1	Hydrogen-peroxide-induced Ca^{2+} increases 1
HSFA	Heat shock factor A

HSP	Heat shock protein
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LRR	Leucine-rich receptor-like kináza
LRR-RK	Leucin-rich-repeat receptor kináza
MAPK	Mitogen aktivované protein kinázy
MBP	Maltose-binding protein
MDHA	Monodehydroaskorbát
MDHAR	Monodehydroaskorbát reduktáza
MDHAR	Monodehydroaskorbát reduktázy
MES	Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové
mROS	Mitochondriální ROS
MRS	Methioninsulfoxid reduktáza
MS	Murashige a Skoog médium
MV	Metylviologen
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	Chlorid nitrotetrazoliové modři
O ₂	Molekulární kyslík
O ₂ ^{•-}	Superoxidový radikál
OH [•]	Hydroxylový radikál
ONOO ⁻	peroxynitrit
OST1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide protein
PAP	PEP-associated protein
PEP	Plastid-encoded polymerase
pKa	Disociační konstanta
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluoride
PS	Fotosystém
PTM	Posttranslační modifikace
PTM	Post-translační modifikace
PVDF	Polyvinyliden difluoridová membrána
RBOH	Respiratory burst oxidase homologues
SDS	Dodecylsírán sodný
SOD	Superoxiddismutáza
SPL	SQUAMOSA promoter-binding protein-like
TAE	Tris Acetát EDTA

TBS-T	Tris buffer saline s přídavkem Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TF	Transkripční faktor
TRX	Thioredoxiny

Seznam obrázků

Obrázek 1: Princip vzniku a chemická struktura reaktivních forem kyslíku.....	3
Obrázek 2: Schéma askorbát-glutathionového cyklu při abiotickém stresu u rostlin.....	14
Obrázek 3: Přehled lokalizace jednotlivých izoform SOD v rostlinné buňce modelového organismu <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
Obrázek 4: Fenotypy <i>Arabidopsis thaliana</i> potvrzených <i>fsd2</i> a <i>fsd3</i> mutantů v porovnání s rostlinou divokého typu (WT)	18
Obrázek 5: Subcelulární lokalizace FSD3 a FSD3S v mezofylových buňkách transgenních rostlin prostřednictvím GFP technologie	19
Obrázek 6: Detekce ampliconů <i>FSD2</i> a <i>FSD3</i> po elektroforetické separaci v 1% agarozovém gelu	42
Obrázek 7: Restrikční analýza izolované plasmidové DNA z kolonií potencionálně nesoucí <i>pGEX6P-1::FSD2</i> ; <i>pGEX6P-1::FSD3</i> ; <i>pMAL-c2X::FSD2</i> a <i>pMAL-c2X::FSD3</i> s následnou elektroforetickou separací	44
Obrázek 8: Analýza jednotlivých frakcí fúzních FSD2 enzymů získaných pomocí afinitní purifikace, SDS-PAGE a následného CBB G-250 barvení.....	46
Obrázek 9: Analýza jednotlivých frakcí fúzních FSD3 enzymů získaných pomocí afinitní purifikace, SDS-PAGE a následného CBB G-250.....	47
Obrázek 10: Vizualizace enzymatické SOD aktivity rekombinantních enzymů po Nativní PAGE	48
Obrázek 11: Detekce přítomnosti rekombinantního FSD3 proteinů pomocí imunoblotování se specifickou anti-FSD3 protilátkou	49
Obrázek 12: Detekce přítomnosti rekombinantních enzymů pomocí imunoblotování se specifickou anti-GST protilátkou	49
Obrázek 13: Detekce přítomnosti rekombinantních enzymů pomocí imunoblotování se specifickou anti-MBP protilátkou	50
Obrázek 14: Selektce <i>FSD3</i> heterozygotů pomocí alelově specifické PCR a následné elektroforetické separace na 1% agarozovém gelu	51
Obrázek 15: Selektce mutantů <i>fsd3</i> pomocí alelově specifické PCR a následné elektroforetické separace na 1% agarozovém gelu	52
Obrázek 16: Selektce <i>fsd2</i> mutantů pomocí alelově specifické PCR a následné elektroforetické separace na 1% agarozovém gelu	53
Obrázek 17: Fenotypová analýza divokého typu a <i>fsd3</i> mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i> 14. den po kultivaci na ½ MS médiu v kultivační místnosti.....	54

Seznam tabulek

Tabulka 1: Reakční směs pro PCR amplifikaci <i>FSD2</i> a <i>FSD3</i> genu s využitím iProof High-Fidelity PCR Kitu	27
Tabulka 2: Teplotní program termocykleru při PCR amplifikaci <i>FSD2</i> a <i>FSD3</i> z cDNA templátu	28
Tabulka 3: Seznam primerů použitých při PCR amplifikaci <i>FSD2</i> a <i>FSD3</i> s využitím cDNA templátu (FW – forward primer; REV – reverse primer).....	28
Tabulka 4: Reakční směs štěpení izolované DNA pomocí endonukleáz <i>EcoRI</i> a <i>Sall</i>	30
Tabulka 5: Reakční směs štěpení cílových vektorů pGEX6P-1 a pMAL-c2X pomocí endonukleáz <i>EcoRI</i> a <i>Sall</i>	30
Tabulka 6: Reakční směs pro ligaci (T4 DNA ligáza) lepivých konců enzymaticky připravených štěpením vektoru pMAL-c2X a fragmentů DNA	31
Tabulka 7: Reakční směs pro ligaci (T4 DNA ligáza) lepivých konců enzymaticky připravených štěpením vektoru pGEX6P-1 a fragmentů DNA	31
Tabulka 8: Složení enzymatické reakce pro štěpení izolované plazmidové DNA pomocí restriční endonukleázy.....	33
Tabulka 9: Reakční směs pro alelově specifickou PCR s použitím Phire Hot Start II DNA polymerázy	40
Tabulka 10: Nastavení teplotního a časového programu pro alelově specifickou PCR.....	40
Tabulka 11: Sekvence použitých primerů při alelově specifické PCR (LB – Left T-DNA Border primer; LP – Left genomic Primer; RP – Right genomic Primer)	41
Tabulka 12: Koncentrace a čistota plazmidových DNA zaslaných k sekvenování.....	45

Úvod

Velkou roli v (a)biotickém stresu, adaptaci na životní podmínky a v signální a vývojové funkci u rostlin sehrávají reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS jsou zásadními signální molekulami, které modulují celou řadu signálních drah a tím významně přispívají k odolnosti a obranným mechanismům rostlin. Nicméně ve vyšších koncentracích mohou znamenat oxidativní poškození buněk, a proto je potřeba jejich přísná regulace na buněčné úrovni (Mittler *et al.*, 2022). V rámci evoluce si rostliny vyvinuly antioxidační ochranu, která udržuje ROS ve fyziologických koncentracích, a tím se řadí mezi faktory přispívající k rostlinné toleranci vůči stresovým podmínkám (Dvořák *et al.*, 2021).

Jedno z nejvýznamnějších míst vzniku ROS u rostlin je chloroplast. Produkce ROS v chloroplastu je úzce spjata s procesem fotosyntézy, v níž jejich zvýšená produkce signalizuje změnu externích či interních podmínek vyžadující aklimatizaci nebo úpravu metabolismu rostliny (Waszczak *et al.*, 2018). Mezi hlavní složky enzymatické antioxidační obrany patří enzymy známé jako superoxiddismutázy (SOD), jejichž úlohou je rychlá přeměna superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$) na peroxid vodíku (H_2O_2). U rostliny *Arabidopsis thaliana* se v chloroplastu nachází tři Fe superoxiddismutázy (FSD), konkrétně FSD1, FSD2 a FSD3, jejichž primární funkce je popisována jako ochrana chloroplastů právě před nebezpečím oxidativního poškození spojeným s fotosyntézou (Myouga *et al.*, 2008; Dvořák *et al.*, 2021).

Tato bakalářská práce je primárně zaměřena na funkci FSD2 a FSD3 izoenzymů. V rámci literárního přehledu bylo cílem poskytnout stávající informace o tématice ROS a antioxidační ochraně se zaměřením na SOD. Praktická část zadané bakalářské práce byla zaměřena na přípravu rekombinantních enzymů FSD2 a FSD3 v bakteriálním expresním systému a dále na selekci *fsd2* a *fsd3* homozygotních T-DNA inzerčních mutantů.

Cíle práce

Vypracování literární rešerše na téma:

- Reaktivní formy kyslíku, jejich role při buněčné signalizaci a odpovědi na (a)biotický stres
- Antioxidační obrana rostlin
- Superoxiddismutázy, jejich funkce při obraně a regulaci chloroplastů

Experimentální cíle:

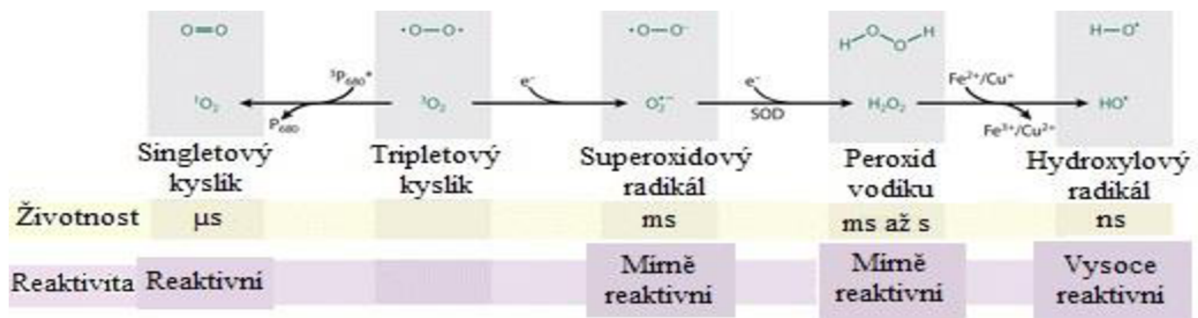
- Příprava konstruktů pro bakteriální expresi rekombinantní FSD2 a FSD3 z rostliny *Arabidopsis thaliana* pomocí vektorů pGEX6P-1 a pMAL-c2X
- Transformace a optimalizace exprese FSD2 a FSD3 v expresních buňkách *Escherichia coli* BL21 Star (DE3)
- Afinitní purifikace připravených rekombinantních FSD2 a FSD3
- Selektce mutantních linií *fsd2* a *fsd3* T-DNA inzerčních mutantů pomocí metody genotypování a jejich následná základní fenotypová analýza

Literární přehled

3.1 Reaktivní formy kyslíku

Vývoj a život aerobních mnohobuněčných organismů je podmíněn přítomností atmosféry bohaté na kyslík. Kyslík se ve významném množství objevil v zemské atmosféře před více než 2,2 miliardami let, a to především díky vývoji fotosyntézy u sinic (Halliwell, 2006). V atmosféře se kyslík většinou nachází v nereaktivní formě molekulárního kyslíku (O_2). Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species; ROS) jsou charakteristická skupina molekul schopných samostatné existence odvozených z O_2 zahrnující radikálové i neradikálové formy (Mittler *et al.*, 2022). V přítomnosti O_2 vedou buněčné procesy charakterizované vysokou rychlostí přenosu elektronů nebo energie nevyhnutelně k tvorbě ROS, a to záchytem elektronů nebo energie do O_2 (Waszczak *et al.*, 2018). ROS jsou v organismech navíc vyvíjeny řadou enzymatických reakcí jako primární či vedlejší produkty. Příkladem metabolické dráhy produkující ROS u rostlin je fotosyntéza nebo respirace (Mhamdi *et Van Breusegem*, 2018).

Existuje více forem ROS, které se odlišují vlastnostmi jako chemickou reaktivitou a stabilitou či schopností přecházet přes buněčnou membránu. Mezi nejběžnější formy ROS u rostlin patří peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a singletový kyslík (1O_2) (Obr. 1; Janků *et al.*, 2019).



Obrázek 1: Princip vzniku a chemická struktura reaktivních forem kyslíku (převzato z Waszczak *et al.*, 2018); \cdot – volné elektrony; SOD – superoxididmutázy, $^3P_{680}^*$ – tripletový stav primárního donora elektronů ve fotosystému II

Nejreaktivnější formou ROS je OH^{\cdot} , který se v organismu vyskytuje po dobu ns. OH^{\cdot} je schopný způsobit poškození většině organických molekul v buňce. V souvislosti s OH^{\cdot} se primárně zmiňuje poškození lipidových membrán, popřípadě proteinů a DNA. 1O_2 , který v porovnání s ostatními zmíněnými jako jediný vzniká unikem energie do molekulárního kyslíku, má životnost v rámci μs . Doba výskytu H_2O_2 , nejstabilnější formy ROS, je závislá na

přítomnosti a aktivitě eliminačních mechanismů, nicméně v průměru se pohybuje v řádu ms až s. Delší dobu výskytu až v řádu ms má také $O_2^{\cdot-}$ (Richards *et al.*, 2015; Waszczak *et al.*, 2018). Rozdíl mezi jednotlivými formami ROS je také ve schopnosti migrovat do různých částí buňky nebo mezi jednotlivými buňkami. Transport ROS probíhá za účelem akumulace, odbourání nebo souvisí s jejich signální funkcí. Schopnost transportu přes buněčné membrány je specifická pro stabilnější formy ROS. Jediná forma ROS, která má výše zmíněnou schopnost je H_2O_2 , který difunduje přes lipidové membrány pomocí proteinových kanálů akvaporinů (Bienert *et al.*, 2007; Tamma *et al.*, 2018). ROS způsobují oxidativní poškození buněčných komponentů jako jsou lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a mnoho dalších menších molekul v buňce. To je způsobeno jejich vyšší chemickou reaktivitou, která umožňuje ROS odevzdat elektron nebo přenést excitovaný stav na akceptorovou molekulu (Mittler *et al.*, 2022).

Rostliny si jako odpověď na potenciální nebezpečí ROS v průběhu evoluce vyvinuly řadu mechanismů souvisejících s antioxidační obranou a monitorováním ROS koncentrace v jednotlivých buněčných částech (Waszczak *et al.*, 2015). Za příznivých podmínek je produkce ROS v rostlinných buňkách nízká. Zvýšení produkce ROS patří k prvním známkám změny prostředí, čehož jsou rostliny schopny využít pro aklimatizaci na stres, metabolické změny nebo zahájení programované buněčné smrti (Nadarajah, 2020). Vyšší koncentrace ROS, která vzniká v důsledku vyšší produkce v určitém kompartmentu buňky, způsobí změnu redoxní rovnováhy směrem k oxidovanému stavu, což jsou schopny zaznamenat různé systémy v organismu ovlivňující genovou expresi (Singh *et al.*, 2016). Mezi takové systémy patří proteiny jako glutathionperoxidázy (GPX), peroxiredoxiny (PrxR), glutaredoxiny (GRX) a thioiredoxiny (TRX) (Liebthal *et al.*, 2020; Mittler *et al.*, 2022). Vyšší produkce ROS v určitých částech buňky je spojena s reakcí rostliny na okolní podmínky, a taktéž na její fyziologický a vývojový stav. V nepříznivých podmínkách dochází ke zvýšení produkce ROS v mitochondriích, chloroplastech a peroxizomech (Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016).

Jelikož jsou ROS esenciální pro mnohé biologické procesy a zároveň představují ve vyšších koncentracích nebezpečí oxidativního poškození částí buněk, musí většina organismů, včetně rostlin, balancovat jejich produkci a eliminaci (Sharma *et al.*, 2012). Na regulaci metabolismu ROS v rostlinách se podílí až stovky genů kódujících proteiny a enzymy. Mimo nevyhnutelné vedlejší produkty metabolismu mohou rostliny vyvíjet ROS za účelem signalizace pomocí speciálních oxidáz. Produkce ROS má významný vliv na růst a vývoj rostliny, taktéž na již zmíněnou signalizaci. Produkce je přísně časově i prostorově regulovaná. Zároveň jsou ROS odbourávány řadou enzymatických a neenzymatických

antioxidantů, které se rovněž nacházejí ve většině buněčných kompartmentů (Mittler *et al.*, 2022).

Chloroplasty jsou jedním z nejohroženějších kompartmentů rostlinné buňky v rámci oxidativního poškození, jelikož jeden z hlavních zdrojů ROS je proces fotosyntézy. Konkrétně tylakoidní membrány chloroplastů, kde probíhá řada redoxních reakcí. Zároveň jsou místem lokalizace elektron transportního řetězce. Fotosystémy (PS) I a II jsou častými místy produkce ROS z důvodu inhibice CO₂ a sníženého obsahu vody v buňce, což je typické při nepříznivých podmínkách prostředí (Lee *et al.*, 2007; Nadarajah, 2020). Ve PSII při fotosyntéze dochází k produkci ¹O₂, jelikož v chloroplastu dochází k nadměrnému hromadění fotonů a jejich energie je chlorofylem přenášena až na O₂ (Telfer *et al.*, 1994). Ve PSI je O₂^{•-} produkován pomocí úniku elektronů z elektron transportního řetězce a následně dismutován skrze superoxid-dismutázu (SOD) na H₂O₂, který může být molekulou obsahující ion železa redukován na vysoce toxický radikál OH[•]. Redukce H₂O₂, která je podmíněna přítomností železnatých iontů (Fe²⁺), na OH[•] je označovaná jako Fentonova reakce (Asada *et al.*, 1974; Li *et al.*, 2021).

Dalším významným místem produkce ROS jsou mitochondrie, místo lokalizace dýchacího řetězce v buňce. Transport elektronů přes mitochondriální komplexy I a III je často považován za hlavní místo produkce mROS z elektronového transportního řetězce (Gleason *et al.*, 2011). Pokud v dýchacím řetězci dochází k nadměrné redukcí ubichinonu, elektrony unikají přes cytochrom C až na O₂ a dochází k produkci O₂^{•-}. Produkovaný O₂^{•-} je přeměněn SOD na H₂O₂, který je odstraněn mitochondriální antioxidační obranou nebo prochází membránou do cytosolu buňky (Han *et al.*, 2001). Navíc v mitochondriálním komplexu I dochází k redukcí O₂ na O₂^{•-} prostřednictvím NADPH dehydrogenázy (Miwa *et al.*, 2014).

V rostlině ROS vznikají také v apoplastu pomocí peroxidáz (Daudi *et al.*, 2012) či NADPH oxidáz, které jsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně. Produkce přes NADPH oxidázy a peroxidázy je spojena s reakcí rostliny na přítomnost infekce patogenem, na abiotický stres nebo s regulací vývojových procesů. NADPH oxidázy, u rostlin označovaných respiratory burst oxidase homologues (RBOHs), jsou skupina membránových proteinů, která katalyzuje vznik O₂^{•-} prostřednictvím přenosu elektronu z NADPH na O₂ (Keller *et al.*, 1998; Sagi *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2011). V rostlinném genomu je kódováno více izoform RBOH. Například v genomu *Arabidopsis thaliana* je 10 genů kódujících RBOH izoformy označované od A do J (Torres *et al.*, 2005). Jednotlivé izoformy se liší svým významem. Například RBOHD a RBOHF jsou důležité při biotickém a abiotickém stresu. Na druhou stranu RBOHC má význam při vývoji kořene. Ze všech

izoforem je považován RBOHD za nejpodstatnějšího producenta ROS (Torres *et al.*, 2002). V apoplastu je produkovaný $O_2^{\cdot -}$ přeměněn na H_2O_2 spontánně nebo pomocí SOD (Waszczak *et al.*, 2018).

Významný intracelulární zdroj ROS jsou peroxizomální metabolické dráhy. V rostlinných peroxizomech probíhá několik klíčových metabolických drah, jako je β -oxidace mastných kyselin, fotorespirace, metabolismus ureidů a detoxikace xenobiotik. Příkladem produkce ROS v rámci těchto metabolických dějů může být oxidace glykolátu na glyoxylát při fotorespiraci, při čemž dochází k produkci H_2O_2 . Dále produkce $O_2^{\cdot -}$ prostřednictvím krátkého elektronového řetězce na membráně peroxizomu nebo při oxidaci xantinu a hypoxantinu na kyselinu močovou. Výsledný $O_2^{\cdot -}$ je přeměněn aktivitou SOD na H_2O_2 . Výše zmíněné nejsou jedinými zdroji ROS, jejich produkce probíhá i v dalších buněčných kompartmentech jako je endoplazmatické retikulum, cytosol a glyoxyzomy (Janků *et al.*, 2019).

3.1.1 Signální role ROS

Během posledních 20 let bylo ustanoveno, že ROS zastávají v rostlinách funkci signálních molekul a nemají pouze destruktivní charakter. Význam ROS je v současné době prokázán pro většinu procesů ve vývoji a aklimatizaci rostlin (Dietz *et al.*, 2016). S tím souvisí řada mechanismů, které monitorují, vnímají a přenášejí získané podněty z prostředí. Podněty z prostředí jsou rostlinnými buňkami registrovány specifickými receptory. Detekce fyzických a chemických změn v prostředí probíhá hlavně na plazmatické membráně buňky a v systémech, které vyvíjejí a využívají energii (Sies *et Jones*, 2020).

Pro signalizaci je esenciální schopnost buněk zaznamenat přítomnost signální molekuly. Většina signálních molekul funguje na principu interakce s receptorem. Výjimku tvoří ROS, jejichž změny v koncentraci jsou buňkou vnímány pomocí změn v redoxním stavu enzymů a struktur proteinů (Ali *et al.*, 2023). Z mnoha produkovaných látek je H_2O_2 považován za klíčovou signální molekulu, a to díky svému relativně dlouhému poločasu rozpadu, schopnosti oxidovat proteiny a pohybovat se přes plazmatickou membránu prostřednictvím akvaporinů díky svým podobným molekulárním vlastnostem jako H_2O (Bienert *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2021).

V případě nárůstu koncentrace ROS v kompartmentu buňky ROS interagují s ROS-senzitivními proteiny a mají schopnost modifikovat jejich strukturu. Modifikace struktury ovlivňuje funkci, aktivitu a lokalizaci proteinů. Důsledkem změny vlastností proteinu je aktivace či potlačení různých signálních transdukčních drah. Ovlivnění vlastností

je časté pro kinázy, fosfatázy nebo transkripční faktory. Primárně má ROS vliv na signální dráhy zodpovědné za rostlinné reakce na stres, v čemž spočívá celý princip ROS signalizace (Mittler *et al.*, 2022).

Ovlivnění vlastností proteinů je v případě působení ROS založeno na oxidativní posttranslační modifikaci. Ta probíhá hlavně pomocí nukleofilního ataku ROS na thiolové skupiny cysteinů a methioninové zbytky proteinů (Chan *et al.*, 2016; Mittler *et al.*, 2022). Cystein (Cys) je senzitivní k ROS a je hlavním místem modifikací proteinů z důvodu, že obsahuje atom síry bohatý na elektrony, který existuje v širokém rozsahu oxidačních stavů. Ne všechny Cys zbytky v proteinu jsou náchylné k modifikacím zprostředkovaným ROS a reaktivita různých thiol-proteinů vůči ROS se liší v závislosti na jejich fyziologické funkci a místním redoxním prostředí (Zaffagnini *et al.*, 2016). Důležitým aspektem reaktivity Cys zbytků je jejich disociační konstanta pKa. Ta je snižována přítomností polárních kladně nabitých aminokyselin nebo lokálních dipólů a vodíkových můstků v prostředí, které stabilizují thiolát prostřednictvím elektrostatických sil. Cys jsou náchylnější k oxidaci, pokud pH prostředí dosahuje vyšší hodnoty než pKa Cys zbytků. Dalšími důležitými faktory reaktivity Cys zbytků jsou jejich přístupnost v trojrozměrné struktuře proteinů a nukleofilita (Waszczak *et al.*, 2015).

Pokud se Cys nachází v podmínkách, kdy reaguje s ROS, dochází k oxidaci. Prvním meziproduktem, který vzniká konkrétně působením H₂O₂ na thiol Cys, je kyselina sulfenová (-SOH), která je vysoce reaktivní. Bylo prokázáno, že tvorba -SOH, počátečního produktu oxidace zbytku Cys, funguje jako redoxní senzor zapojený do mnoha fyziologických drah; ovlivňuje enzymatickou a kovovou vazbu klíčových signálních proteinů a aktivitu transkripčních faktorů modulujících genovou expresi (Akter *et al.*, 2015). Pokud není stabilizována v proteinu, reaguje -SOH buď s GSH, což vede k S-glutathionylaci proteinu (-SSG), nebo s jinými thiolovými skupinami, vedoucí k tvorbě vnitro- nebo mezimolekulárních disulfidických vazeb (-S-S-) (Waszczak *et al.*, 2018). V případě vysoké koncentrace H₂O₂ může být -SOH dále oxidována na kyselinu sulfinovou (-SO₂H) a sulfonovou (-SO₃H). Na rozdíl od sulfenových modifikací mohou být sulfinové a sulfonové modifikace nevratné a vedou k trvalému poškození proteinů (tj. oxidačnímu stresu) (Schieber *et Chandel*, 2014).

Methioninové zbytky proteinů podléhají oxidaci působením H₂O₂ za vzniku methioninsulfoxidu (-(S=O)-CH₃), který může být redukován zpět methioninsulfoxid reduktázami (MSRs) na methionin nebo podléhá nevratné změně na methioninsulfon (-(SO₂)-CH₃). Většina případů, kdy dochází k oxidaci methioninu, zahrnuje inaktivaci

proteinové funkce. Na rozdíl od oxidativní posttranslační modifikace cysteinových zbytků, je většina signalizačních dějů způsobených oxidací methioninů v proteinu nepopsaná (Waszczak *et al.*, 2018).

Pokud rostlina potřebuje regulovaně zvrátit oxidativní posttranslační modifikace, v případě například různých vývojových nebo stresových signálů, některé rostlinné enzymy, konkrétně GRX a TRX, mají tuto schopnost. Oba tyto enzymy však reagují velmi selektivně. V závislosti na původním kontextu oxi-PTM může její obrácení reaktivovat nebo potlačit funkci proteinu. Výsledkem může být aktivace, potlačení nebo změna dráhy reakce na stres (Mittler *et al.*, 2022). GRX, které fungují jako oxidoreduktázy, katalyzují vznik původního thiolu, pokud došlo k S-glutathionylaci proteinu. TRX fungují jako donory elektronů a redukují zpět vzniklé disulfidické vazby (Tarrago *et al.*, 2009; Tossounian *et al.*, 2018).

Jelikož je rostlinná buňka velmi složitý komplex, může být ROS signalizace rozdělena na vnější, vnitřní a organelární, podle toho, kde dochází k percepci ROS a ovlivnění signální transdukční dráhy. Vnější signalizace zahrnuje buněčnou stěnu a apoplast. Ze všech míst produkce ROS má pro signalizaci největší význam apoplast, kde se vyskytují již zmíněné RBOHs. RBOH jsou nazývány "motory signalizace ROS" a jsou zapínány nebo vypínány v reakci na mnoho různých stresů a/nebo jiných podnětů, což vede k tvorbě ROS v apoplastu (Mittler *et al.*, 2022). Také peroxidázy v buněčné stěně mohou za určitých podmínek zvýšit koncentraci ROS v apoplastu. Celkový podíl apoplastické produkce ROS peroxidázami se udává kolem 50 %. Akumulované ROS v apoplastu mohou reagovat s HPCA1 receptorem na povrchu buňky, oxidovat antioxidanty nebo regulovat propustnost Ca^{2+} a K^+ kanálů. Často ale dochází k transportu do cytosolu buňky přes akvaporiny (Rodrigues *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020).

Cytosol a jádro patří do vnitřní signalizace, která je pro buňky nejdůležitější. Samotný cytosol obsahuje enzymy, které produkují ROS, ale také ROS odbourávající mechanismy, jejichž úkolem je regulovat ROS signály. Důležitost cytosolu spočívá ve výskytu mnoha signalizačních uzlů, které spojují signály z ROS s dalšími signálními molekulami. Mezi takové uzly patří mitogen-aktivované protein kinázové kaskády (MAPK), protein kinázy závislé na vápníku (Calcium-dependent protein kinases) a další (Zhang *et al.*, 2007). V principu jsou v cytosolu dekodovány různé ROS signály, a následně jsou informace z nich převedeny do jádra (De Clercq *et al.*, 2021; Mittler *et al.*, 2022). Příkladem je aktivace transkripčních faktorů jako ANAC a HSFA, které jsou zodpovědné za rostlinné odpovědi na stres, která probíhá v cytosolu, a poté transkripční faktory putují do jádra buňky (Ohama *et al.*, 2017; Shapiguzov *et al.*, 2019).

Organelární signalizace je specifická pro každou buněčnou organelu, jelikož organely se odlišují mechanismy produkujícími a odbourávajícími ROS. Z toho vyplývá, že koncentrace ROS za normálních podmínek se neshodují v jednotlivých organelách a jsou ovlivňovány různými podněty (Das *et al.*, 2015). Nárůst koncentrace ROS v jedné organelle buňky může ovlivnit koncentraci v ostatních organelách pomocí vzniklých metabolitů, hormonů či mobilizovaných proteinů, a proto je možná komunikace mezi organelami, a také organelami a jádrem. Rostlina je schopna rozlišit, zda informace o vnějším podnětu přišla z konkrétní organely nebo z cytosolu, a tím spustit vhodnou odpověď na stres (Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016).

Se signalizací souvisí tzv. ROS vlna ("ROS wave"), což je přenos ROS signálu na dlouhou vzdálenost z buňky na buňku (cell to cell signalling). Výsledkem je, že podnět přijatý jednou částí rostliny způsobí změny genové exprese ve vzdálené tkáni, čímž připravuje rostlinu na daný stresový stimul (Fichman *et al.*, 2020). Vlna začíná chemickým či fyzickým stresovým stimulem, který je vnímán receptorem. To způsobí aktivaci RBOHD v plazmatické membráně, a tím dojde k produkci $O_2^{\cdot-}$ do apoplastu. V apoplastu je $O_2^{\cdot-}$ dismutován na H_2O_2 . Mezi stresové stimuly aktivující RBOHD patří chlad, teplo, salinita a poranění (Miller *et al.*, 2009). Rostliny mají speciální senzory, které monitorují koncentraci ROS v apoplastu, příkladem je HPCA1 receptor. HPCA1 receptor obsahuje specifickou vnější doménu. Ta se označuje jako H_2O_2 doména a disponuje dvěma páry Cys. Zároveň je součástí receptoru leucin-rich-repeat receptor kináza (LRR-RK). V případě nárůstu koncentrace H_2O_2 dochází jeho prostřednictvím k oxidaci Cys v H_2O_2 doméně, čímž je aktivována kináza. Výsledkem je autofosforylace HPCA1 receptoru. S tím je spojené ovlivnění Ca^{2+} permeabilních kanálů, které vede k nárůstu koncentrace Ca^{2+} v cytosolu (Wu *et al.*, 2020). Změna koncentrace Ca^{2+} může aktivovat Ca^{2+} -dependentní proteiny včetně CBL4, CIPK26 a OST1. Tyto proteiny následně znovu aktivují produkci ROS přes RBOHDs, což už je schopna zaznamenat sousední buňka pomocí vlastního HPCA1 (Drerup *et al.*, 2013; Fichman *et al.*, 2022). Tímto způsobem dochází k přenosu signálu v tzv. cell to cell podobě, čímž se signál může rozšířit až do distálních tkání rostliny (Miller *et al.*, 2009).

Rostliny jsou schopny detekovat stimuly z prostředí pomocí receptorů, často vázaných na plazmatickou membránu buňky. Pro každý stimul mají rostliny jiný receptor. Abiotický i biotický stres jsou schopny zaznamenat například leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR) nebo cysteine-rich receptor-like kinases (CRK). Mezi významné abiotické stresové stimuly, které je rostlina schopna zaznamenat, patří změny teploty, změny osmotického tlaku či změny množství a intenzity světla dopadající na rostlinu (Soltabayeva *et al.*, 2022). Většina

těchto receptorů má kinázovou aktivitu a je následně schopna fosforylovat NADPH oxidázy, respektive RBOHs. RBOH jsou regulovatelné díky jejich N-terminální doméně, která obsahuje vazebné místo pro vápenaté ionty (Ca^{2+}). Vazba Ca^{2+} a současná fosforylace N-terminální domény jsou důležitým aspektem aktivace RBOH. Aktivita RBOH je podmíněna jejich konformační změnou způsobenou právě navázáním Ca^{2+} (Torres *et al.*, 2005; Ogasawara *et al.*, 2008). RBOHs jsou spojeny s Ca^{2+} permeabilními kanály, z čehož vyplývá, že aktivace RBOHs způsobí vtok Ca^{2+} do cytosolu buňky. Buňka zaznamená změnu koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu, čehož důsledkem je opětovná aktivace RBOHs a zvýšená apoplastická produkce ROS (Kimura *et al.*, 2020).

Podobným systémem je rostlina schopná vnímat biotický stres, který může být způsobený například napadnutím patogenem. ROS mají přímý antimikrobiální efekt a podporují zpevnování buněčné stěny, ale zároveň fungují jako signální molekuly aktivující antimikrobiální ochranu. Mimo akumulaci ROS, je aktivací stresových receptorů způsobena změna hladiny stresových metabolitů v buňce, což se označuje jako stresově specifická nerovnováha (Waszczak *et al.*, 2018).

Změny v metabolomu a transkriptomu rostliny, které můžeme označit jako reakce na stres, mohou nastat v lokální tkáni v řádu desítek sekund a v distální tkáni v řádu minut od zaznamenání stresového stimulu (Suzuki *et al.*, 2013, 2015). Důsledkem těchto reakcí je aktivace různých obranných a aklimatizačních sítí, které jsou esenciální pro rostlinu pro přežití a zotavení se ze stresu. Aktivace stresových signalizačních drah je také spojena s rychlým zvýšením hladiny hormonů v rostlině. Dochází k syntéze kyseliny jasmonové anebo uvolnění kyseliny salicylové a abscisové z konjugovaných forem, ve kterých se nacházejí v rostlině v příznivých podmínkách (Suzuki *et al.*, 2013; Zandalinas *et al.*, 2019).

Dalším nepostradatelným aspektem, který mění aktivaci stresových signalizačních drah, je produkce ROS v jednotlivých kompartmentech buňky, což již bylo vysvětleno v kapitole 3.1, kdy v nepříznivých podmínkách například dochází ke zvýšené produkci ROS v procesu fotosyntézy. (Mittler *et al.*, 2022)

ROS se tedy podílejí na téměř všech fázích časných i pozdních reakcí na stres. Jsou úzce propojeny s mnoha dráhami, sítěmi a hormony potřebnými pro přežití rostlin během stresu. Důležitější roli ROS sehrávají na začátku stresového stimulu, kdy aktivují nesespecifické signální dráhy a spouští primární odpověď. Následně rostlinný metabolismus po rozpoznání konkrétního stresového stimulu, ale i jejich kombinací, reaguje unikátně a spouští specifickou genovou expresi (Zandalinas *et al.*, 2021).

Příkladem takové reakce je například reakce rostliny na zvýšenou teplotu prostředí

a světlo, kdy dochází k akumulaci chloroplastového ROS v cytosolu buňky. Zvýšená hladina ROS ovlivňuje HSFA1 protein pomocí změny jeho redoxního stavu, čímž dojde k jeho aktivaci a translokaci do jádra buňky. Následně tento protein v jádře aktivuje transkripci proteinu tepelného šoku (heat shock protein) HSP70 a faktorů vázajících elementy reagující na dehydrataci (dehydration-responsive element-binding factors). Všechny tyto transkripční produkty jsou nutné pro získání termotolerance rostliny. K termotoleranci rostliny navíc přispívá redoxní stav chloroplastů (Dickinson *et al.*, 2018).

3.1.2 Vývojová role ROS

Mimo signalizační funkci a reakci rostlin na stres mají ROS také význam v mnoha procesech souvisejících s vývojem rostlin. Jako primární regulátor takových procesů se v dosavadní době považuje apoplastická produkce ROS (Waszczak *et al.*, 2018). Mezi procesy závislých na produkci ROS se řadí tvorba pylových tubic (Potocký *et al.*, 2007), vývoj sekundární struktury buněčné stěny (Denness *et al.*, 2011), dozrávání semen a klíčení (Müller *et al.*, 2009), programovaná buněčná smrt (Torres *et al.*, 2005), uzavírání stomat (Zhang *et al.*, 2009), vývoj Casparyho proužku (Lee *et al.*, 2013), vývoj primárního kořene a kořenových vlásků (Foreman *et al.*, 2003; Kuběnová *et al.*, 2023), vývoj různých tkání a orgánů jako například semenný obal (Daneva *et al.*, 2016) a dalších.

Růst kořenových vlásků je prakticky přestavba buněčné stěny v dané oblasti za působení specifických proteinů, mezi které patří například expanzin (Zhang *et al.*, 2023). K tomu může dojít pouze v případě, že je v místě růstu vytvořen protonový gradient, který je úzce svázaný s ROS produkcí (Kuběnová *et al.*, 2023). Ve špičkách kořenových vlásků dochází k produkci H_2O_2 přes peroxidázy a $O_2^{\cdot-}$ přes NADPH oxidázy. V apoplastu často dojde k přeměně $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 , který může přecházet přes akvaporiny do cytoplazmy buněk (Bienert *et al.*, 2007; Sundaravelpandian *et al.*, 2013). ROS regulují expanzi polárních kořenových vlásků aktivací vápníkových kanálů umožňujících příjem Ca^{2+} . Příjem Ca^{2+} zpětně aktivuje produkci ROS, a tím udržuje aktivní expanzi buněk kořenového vlásku (Takeda *et al.*, 2008). V rostoucím kořenovém vlásku se ROS nachází hlavně v apikální a subapikální oblasti cytoplazmy, kde v průběhu prodlužování kořenového vlásku dochází ke zvyšování jejich koncentrace. Mimo NADPH oxidáz a peroxidáz, se na ROS produkci podílí také mitochondrie (Kuběnová *et al.*, 2023). Narušená homeostáza ROS způsobuje redukci hustoty i růstu kořenových vlásků, což naznačuje, že ROS jsou podstatné pro iniciaci růstu kořenových vlásků i jejich prodlužování. Pro růst kořenových vlásků je významná nejen produkce, ale také distribuce ROS v buňce. Při poruše distribuce ROS dochází k růstu více

kořenových vlásku z jednoho iniciačního místa (Salazar-Henao *et al.*, 2016).

3.2 Antioxidační obrana

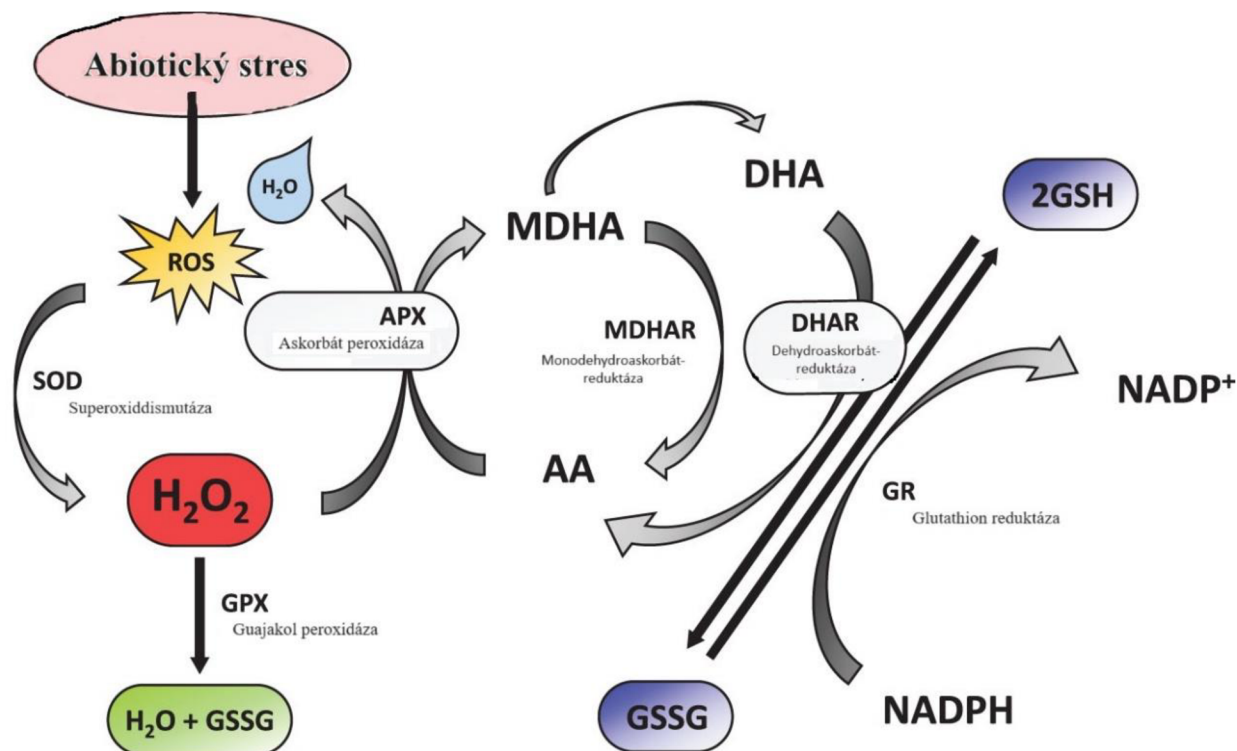
V přechodí kapitole byla mnohokrát zmíněna schopnost rostlin odbourávat ROS, a tak zabránit jejich nadměrné akumulaci v rostlině. Nadměrná akumulace často znamená oxidativní poškození buněčných molekul. Za účelem hlídání fyziologických koncentrací ROS si rostliny vyvinuly dobře regulovaný antioxidační mechanismus. Ten se skládá z enzymatických a neenzymatických složek, které mohou vyrovnávat syntézu a odstraňování ROS a zabránit poškození buněk (Nadarajah, 2020). Antioxidační obrana je také zásadní součástí signalizační funkce ROS, jelikož její nedostatečná funkce by znamenala, že původně signální molekula se změní na molekulu pro buňku toxickou (Hasanuzzaman *et al.*, 2021). Existuje přímá korelace mezi expresí genů antioxidační obrany a rostlinnou tolerancí na stres. Aktivace těchto genů probíhá přes specifické signální dráhy. Expresie antioxidačních genů se také liší u jednotlivých rostlinných druhů. Pokud v rostlině nedochází k dostatečné expresi antioxidačních enzymů, rostlina vykazuje sníženou toleranci na stres, což může přispět ke spuštění programované buněčné smrti (De Pinto *et al.*, 2012).

Neenzymatické antioxidanty se skládají z nízkomolekulárních sloučenin, které se dále dělí na antioxidanty rozpustné ve vodě, jako je kyselina askorbová a glutation, a lipofilní antioxidanty, jako jsou tokoferoly a β -karoteny. Tyto sloučeniny pracují na odbourání ROS z buňky samy nebo spolupracují s enzymatickou složkou antioxidační obrany (Hasanuzzaman *et al.*, 2021; Mishra *et al.*, 2023). Tokoferoly se obvykle vyskytují v nejvyšší koncentraci v chloroplastech, kde chrání rostliny před oxidativním poškozením spojeným s fotosyntézou. β -karoteny jsou významné pro svou schopnost delokalizovat nepárový elektron, a tím jsou schopny reagovat s volnými radikály jako například superoxid. Glutation se vyskytuje v cytoplazmě. Podílí se na vývoji rostlin a většině reakcí na prostředí. Glutation patří k evolučně nejstarším obranným složkám rostlin. Askorbát vzniká v mitochondriích. Do ostatních buněčných kompartmentů přechází pomocí difuze nebo na základě elektrochemického gradientu. Askorbát má význam v regulaci růstu rostlin, v rostlinném metabolismu a diferenciaci buněk (Locato *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2023).

Enzymatické antioxidanty jsou dnes považovány za první linii v obraně proti ROS. Mezi hlavní zástupce antioxidačních enzymů patří SOD (EC 1.15.1.1), katalázy (CAT; EC 1.11.1.6), askorbát peroxidázy (APX; EC 1.11.1.1), dehydroaskorbát reduktázy (DHAR; EC 1.8.5.1), monodehydroaskorbát reduktázy (MDHAR; EC 1.6.5.4) a glutation reduktázy (GR; EC 1.6.4.2) (Dvořák *et al.*, 2021; Mishra *et al.*, 2023).

CAT je tetramerní enzym, obsahující hem, zodpovědný za dismutaci H_2O_2 na H_2O a O_2 . Na rozdíl od jiných antioxidačních enzymů odbourávají CAT H_2O_2 energeticky úsporným způsobem, protože nevyžadují buněčný redukční ekvivalent (Anjum *et al.*, 2016). Svoji roli má kataláza nejen v obraně rostliny při stresu, ale také při vnímání signálu. Všechny CAT izoformy, konkrétně například genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje 3 geny pro CAT, se vyskytují převážně v peroxizomech. Hrají důležitou roli při obraně rostliny vůči fotooxidativnímu stresu a udržování ROS homeostázy v období sucha nebo zimy (Du *et al.*, 2008).

Další zásadní součástí udržování optimální ROS hladiny v buňce jsou enzymy askorbát-glutathionového cyklu, mezi které patří APX, MDHAR, DHAR a GR (Obr. 2). APX katalyzují reakci, při které dochází k přeměně H_2O_2 na H_2O , při čemž se elektrony transportují z askorbátu (Asc), a tím vzniká monodehydroaskorbát (MDHA). Za zpětnou redukci MDHA na Asc zodpovídá MDHAR, který katalyzuje tuto reakci za přítomnosti NADPH. Přestože tyto mechanismy účinně recyklují Asc, je nevyhnutelné, aby se v určité míře tvořil také dehydroaskorbát (DHA) v důsledku spontánní disproportionace MDHA na Asc a DHA. Přeměna DHA na Asc je katalyzovaná enzymem DHAR, kdy jako donor elektronů slouží redukovaný glutation, který tedy podléhá oxidaci na disulfid glutationu. Recyklace glutationu je dosaženo pomocí GR v reakci závislé na NADPH. Význam tohoto cyklu byl dokázán při reakci rostliny na stress z vysokého osvětlení, tepla, zasolení, sucha, ale také jako regulátor hladiny H_2O_2 při signalizaci a regulátor ROS při mnoha vývojových procesech (Polle, 2001; Dvořák *et al.*, 2021).

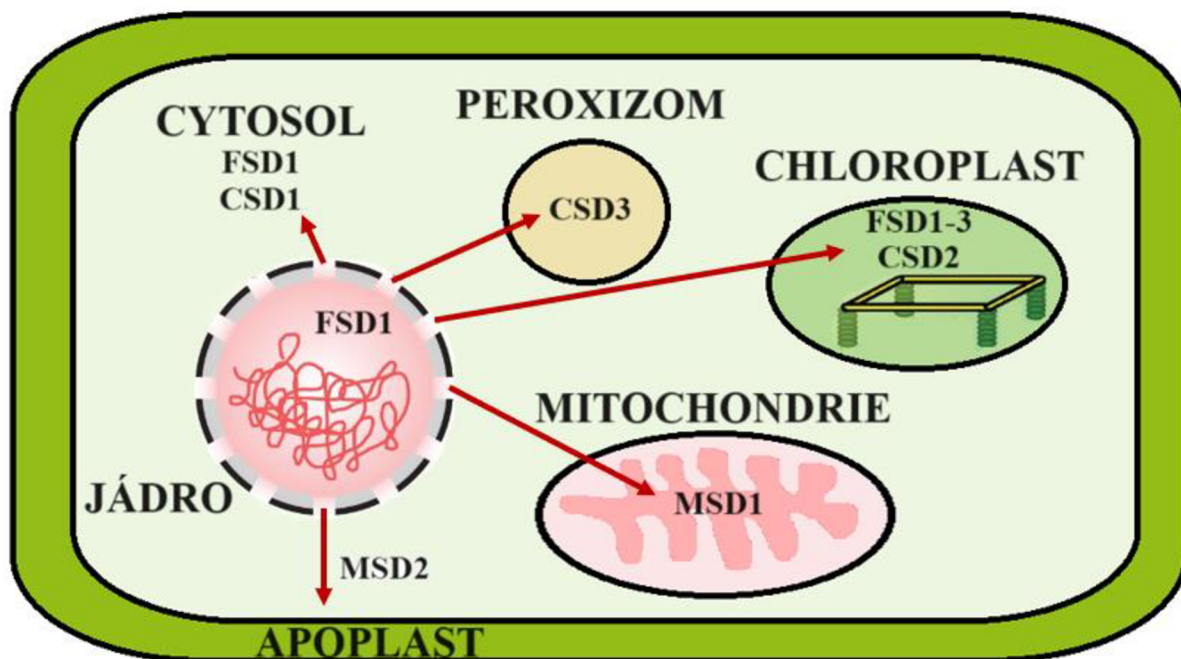


Obrázek 2: Schéma askorbát-glutathionového cyklu při abiotickém stresu u rostlin (převzato z Mishra *et al.*, 2023), ROS – reaktivní formy kyslíku, MDHA – monodehydroaskorbát, DHA – dehydroaskorbát, GSSG – disulfid glutationu, GSH – glutation, NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, NADP⁺ – oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu

3.3 Superoxiddismutázy

Mezi zcela stěžejní zástupce enzymatické antioxidační ochrany řadíme SOD, které katalyzují dismutaci $O_2^{\cdot-}$ na molekulární kyslík a méně toxický H_2O_2 ($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \leftrightarrow H_2O_2 + O_2$) (Fridovich, 1997). SOD patří mezi nejefektivnějších komponenty antioxidační obrany, a to především díky jejich kinetickým parametrům odbourávání $O_2^{\cdot-}$, které se limitně blíží difúzi $\approx 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$ (Sheng *et al.*, 2014). Hrají tedy zcela nezastupitelnou roli u všech organismů existujících za přítomnosti kyslíku a představují první obranu linii proti poškození vyvolaným reaktivními formami kyslíku či dusíku (Wang *et al.*, 2018). SOD jsou definovány jako tzv. metaloenzymy, a tudíž obsahují ve své struktuře kovový ion, který plní v aktivním místě enzymu funkci kofaktoru. Na základě typu kovového kofaktoru se SOD dělí do 4 skupin, a to na SOD obsahující nikl (NiSOD), železo (FeSOD), mangan (MnSOD) nebo zinek-měď (Cu/ZnSOD) (Kliebenstein *et al.*, 1998; Pilon *et al.*, 2011). SOD využívající jako kofaktor nikl se vyskytují u eukaryot pouze u zelené řasy *Ostreococcus tauri* (Schmidt *et al.*, 2009).

Rostliny obvykle obsahují řadu SOD izoenzymů. Subcelulární lokalizace jednotlivých SOD je spjata s požadavky na detoxikaci. Konkrétně v genomu *Arabidopsis thaliana* jsou tři geny kódující FeSOD (*FSD1*, *FSD2* a *FSD3*), tři Cu/ZnSOD (*CSD1*, *CSD2* a *CSD3*) a dva geny kódující MnSOD (*MSD1*, *MSD2*) (Kliebenstein *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2022). Rostlinné buňky často disponují plastidovými, cytosolovými, mitochondriálními a peroxizomálními SOD (Kundu *et al.*, 2013; Dreyer *et al.*, 2019). Všechny SOD izoenzymy jsou kódovány v jádře buněk a do cílových míst působení jsou transportovány pomocí rozpoznávání signálních sekvencí (Bowler *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2012). Cu/ZnSOD plní svou funkci téměř ve všech kompartmentech rostlinné buňky. MnSOD byly detekovány především v mitochondriích. Výskyt FeSOD je hlavně v chloroplastech, ale mohou být také v menší míře v ostatních částech buňky (Obr. 3; Sandalio *et al.*, 2001; Pilon *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2023). Například výskyt *FSD1* byl zjištěn také v jádře a cytosolu. (Dvořák *et al.*, 2021).



Obrázek 3: Přehled lokalizace jednotlivých izoform SOD v rostlinné buňce modelového organismu *Arabidopsis thaliana* (převzato a upraveno z Mishra *et al.*, 2023), *MSD1* – izoforma MnSOD; *CSD1-2* – izoformy Cu/ZnSOD; *FSD1-3* – izoformy FeSOD

Expres *SOD* není stejná pro všechny izoformy. Izoformy *FSD1*, *CSD1*, *CSD2* a *MSD1* vykazují vyšší expresi v porovnání s ostatními SOD (Kliebenstein *et al.*, 1998; Pilon *et al.*, 2011). *FSD1* je nejvíce exprimována v raných stádiích vývoje a se začátkem kvetení její expresi klesá. Naopak *CSD1* a *CSD2* mají původně expresi nižší a s nástupem kvetení

dochází k expresi častěji. *CSD3* je exprimována nejméně a hladina jejich transkriptů stoupá pouze při kvetení. *MSD1* má jako jediná neustále stejnou expresi, tedy nemění se v závislosti na vývoji rostliny (Pilon *et al.*, 2011). Exprese *SOD* je regulovaná mnoha způsoby a mnoha faktory. Jedním z nejdůležitějších regulátorů exprese *CSD1*, *CSD2* a *FSD1* je měď, což naznačuje její důležitou roli v regulaci obrany proti oxidačnímu stresu. V případě nízkého obsahu mědi je exprese *FSD1* zvýšená. Na druhou stranu klesá exprese *CSD1* a *CSD2*. V opačném případě, když je obsah mědi vysoký, dochází ke snížení exprese *FSD1* a zvýšení *CSD1* a *CSD2* (Abdel-Ghany *et al.*, 2005). Mechanismus regulace exprese mědi je dnes již dobře prostudovaný. Zahrnuje SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 (SPL7) transkripční faktor, který se při deficienci mědi váže na GTAC motiv v DNA, čímž přímo reguluje genovou expresi. V promotoru *FSD1* se vyskytuje několik GTAC motivů, na které se může SPL7 vázat (Yamasaki *et al.*, 2009). Zároveň SPL7 snižuje expresi *CSD1* a *CSD2* prostřednictvím exprese Cu-regulovaných miRNA. Konkrétně *miR398* negativně reguluje transkripty *CSD1* a *CSD2* (Burkhead *et al.*, 2009; Cohe *et al.*, 2009).

SOD podléhají více typům post-translačních modifikací (PTMs). PTM způsobují změnu vlastností, čímž mohou ovlivnit SOD aktivitu. Mezi PTM modifikace SOD se řadí nitrace, fosforylace, glutathionylace a glykace (Yamakura *et al.*, 2010). Nejprostudovanější ze zmíněných je nitrace. Nitrace tyrosinových zbytků *MSD1*, *CSD3* a *FSD3* prostřednictvím peroxynitritu (ONOO^-) způsobila značný pokles jejich aktivity. Největší pokles aktivity, tudíž nejcitlivější izoforma k ONOO^- , je *MSD1*. Naopak aktivita *MSD1*, *CSD3* a *FSD3* se nemění při působení S-nitrosoglutationu (GSNO), který má schopnost S-nitrosylace Cys zbytků (Holzmeister *et al.*, 2015).

3.3.1 Role při obraně chloroplastů

SOD hrají zásadní roli při obraně chloroplastů právě před nebezpečím spojeným s fotosyntézou. Naprostá většina produkovaného $\text{O}_2^{\cdot-}$ je díky nim přeměněna na H_2O_2 . Ztráta funkce SOD vede k oxidativnímu poškození chloroplastové membrány, karbonylaci proteinů, a dokonce zlomům plastidové DNA, což znemožňuje normální vývoj chloroplastů a růst rostliny. Hlavními součástmi SOD obrany chloroplastů jsou izoformy *FSD1*, *FSD2*, *FSD3* a *CSD2* (Myouga *et al.*, 2008; Hasanuzzaman *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Melicher *et al.*, 2022).

V případě T-DNA inzerčního mutanta ve *fsd1* v normálních podmínkách prostředí nedochází k zásadní změně fenotypu. Ztráta funkce *FSD1* minimálně ovlivňuje fotosyntetický aparát a růst rostliny. U mutantů nedochází ani ke změně hladiny ROS v porovnání s rostlinou

divokého typu (Myouga *et al.*, 2008; Gallie *et Chen*, 2019). Na druhou stranu chloroplastová FSD1 sehrává roli při závažnějších podmínkách prostředí, když je rostlina pod větším nebezpečím oxidativního poškození. Konkrétně byla její role potvrzena při navození oxidativního stresu indukovaným methylviologenem (MV). FSD1 se zdá být taktéž zapojená do vývoje laterálních kořenů a možná kořenových vlásků. Tam má pravděpodobně roli v regulaci redoxního stavu, a tím zabezpečuje jejich správný vývoj (Dvořák *et al.*, 2021). Redukce exprese *CSD2* způsobila nižší funkci fotosyntézy a sníženou hladinu chlorofylu. Redukce způsobuje abnormální vývoj chloroplastů ve smyslu sníženého množství granálních thylakoidů. Granální thylakoidy jsou taktéž méně uspořádané. Celkově chloroplasty dosahují menší velikosti než chloroplasty rostlin divokého typu (Rizhsky *et al.*, 2003; Myouga *et al.*, 2008). Role FSD2 a FSD3 je popsána v kapitole 3.3.2. V závěru fotoprotekce chloroplastů a jejich správný vývoj je především daná FSD2, FSD3 a CSD2 (Gallie *et Chen*, 2019).

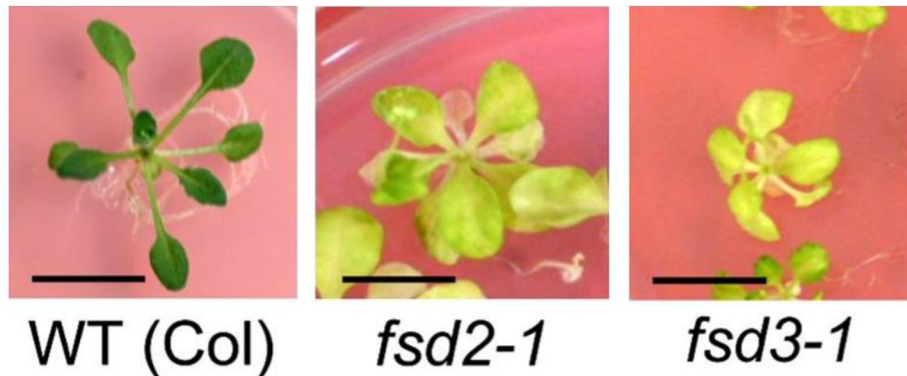
3.3.2 FSD2 a FSD3 u *Arabidopsis thaliana*

Huseniček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je malá, samosprašná kvetoucí rostlina s malým genomem. Má vysokou plodnost a krátkou dobu generace, čímž spolu s dalšími aspekty tvoří vhodný modelový organismus pro výzkum rostlin (Kang *et al.*, 2023).

S využitím GFP technologie se zjistilo, že FSD3 je lokalizována v chloroplastu u plastidového nukleoidu. Dále, že lokalizace FSD2 je po celé stromě chloroplastu (Gallie *et Chen*, 2019). *FSD2* a *FSD3* mají v rostlinách nízkou bazální expresi. Nicméně v raném vývoji je jejich exprese častější než v období kvetení (Myouga *et al.*, 2008; Pilon *et al.*, 2011). V *in vitro* podmínkách při navození nadexprese *FSD2* nebo *FSD3* existuje mezi jejich expresí reciproká regulace. Přílišná exprese jednoho enzymu je snížena expresí druhého. *In vivo* se zvyšuje exprese těchto genů současně jako odpověď převážně na přílišné sluneční záření a zimu (Myouga *et al.*, 2008).

FSD2 a FSD3 proteiny, jsou zodpovědné za vývoj chloroplastů, hlavně thylakoidních membrán. Oba T-DNA inzerční mutanti ve *fsd2* a *fsd3* genech vykazují bělavě bílý fenotyp (pale-green phenotype; Obr. 4) a abnormální vývoj jejich chloroplastů. Jejich chloroplasty postrádají vnitřní membránové struktury, obsahují abnormální struktury suborganel a jsou silně vakuolizované (Myouga *et al.*, 2008). FSD2 a FSD3 se funkčně liší. Ztráta funkce *FSD2* není pro rostlinu tak zásadní jako ztráta funkce *FSD3*. Rostliny s defektní *FSD3* v kultivačních podmínkách daleko častěji nepřekročily stádium sazenic než ty s defektní *FSD2*. V souvislosti s tímto, je významný fakt, že vysoká exprese *FSD3* je částečně schopna nahradit nefunkční *FSD2* (Gallie *et Chen*, 2019). Rozsah změny fenotypu rostliny záleží na

mutaci, kterou rostlina nese. Rostliny s mutantní *FSD3* vykazují bělavější fenotyp než ty s mutantní *FSD2*. Mutantní rostliny, které disponují mutací pouze na jeden z genů (buď na *FSD2* nebo na *FSD3*), prokazují pomalý růst a opožděné rozkvetení, ale jsou schopny produkce semen. Obě tyto mutace, ale můžou být do jisté míry limitovány pěstováním rostlin mimo přímé světelné záření. V kontrastu rostliny dvojitéch mutantů *fsd2/fsd3* vykazují daleko výraznější bělavý fenotyp a nejsou schopny rozkvetení a produkce semen (Myouga *et al.*, 2008).

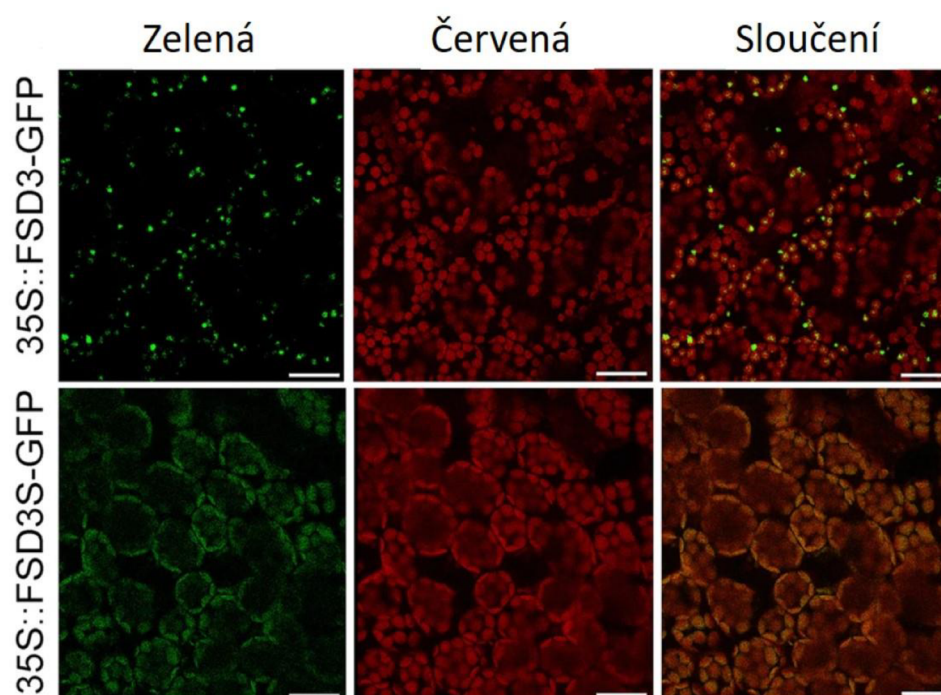


Obrázek 4: Fenotypy *Arabidopsis thaliana* potvrzených *fsd2* a *fsd3* mutantů v porovnání s rostlinou divokého typu (WT) (převzato a upraveno z Myouga *et al.*, 2008); WT (Col) – rostlina divokého typu ekotyp Columbia; *fsd2-1* – mutantní linie *fsd2* ekotyp Nossen: 11-6562-1; mutantní linie *fsd3* ekotyp Columbia: SALK_103228; měřítko = 1 cm

FSD2 a FSD3 v chloroplastů formují heterodimer neboli heterokomplex v oblasti plastidového nukleoidu. Tento heterodimer má silnou afinitu k ROS. Enzymatická aktivita heterokomplexu je kombinací enzymatické aktivity jednotlivých proteinů (Myouga *et al.*, 2008). FSD2 i FSD3 jsou součástí tzv. PEP komplexu (plastid-encoded polymerase complex), který je zodpovědný přímo za transkripci plastidových genů, obzvláště těch spojených s fotosyntézou. V rámci PEP komplexu se FSD2 označuje jako PAP9 (PEP-associated protein 9), zatímco FSD3 jako PAP4 (PEP-associated protein 4). PEP (plastid-encoded RNA polymerase) se skládá do zmíněného komplexu s 12 PAPs, které všechny přispívají k aktivitě a funkci komplexu. FSD2 i FSD3 se v komplexu váží na pTAC10 protein, který je považován za klíčový pro sestavení PEP komplexu. Je předpokládáno, že úlohou FSD2 a FSD3 je ochrana celého zmíněného komplexu před ROS produkovanými fotosyntézou. Bělavý fenotyp *fsd2* a *fsd3* mutantů je důsledek právě poruchy funkce PEP komplexu, a tedy poruchou exprese fotosyntetických genů (Pfannschmidt *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2017).

Po transkripci *FSD3* genu se v rostlinách vyskytují 2 funkční sestříhové varianty mRNA. První, označovaná standardně *FSD3*, se skládá z 8 exonů, druhá, označovaná *FSD3S*, pouze ze 6 exonů. V důsledku je výsledný enzym FSD3S složený z 256 aminokyselin

v porovnání s 263 aminokyselinami ve FSD3. Toto zkrácení se nachází na C-konci proteinu a ovlivňuje vlastnosti proteinu. Například C-termální oblast FSD3S vykazuje větší hydrofobicitu. V rámci SOD aktivity jednotlivých sestřihových variant nebyl detekován rozdíl, ale rozdíl v C-terminální oblasti ovlivnil lokalizaci jednotlivých enzymů. FSD3 byla detekována v plastidovém nukleotidu, zatímco FSD3S varianta je lokalizována v okolí chloroplastových membrán a není přítomná v plastidovém nukleotidu (Obr. 5). Lokalizace FSD3S byla ovlivněna přítomností transmembránového helixu v C-terminální oblasti, který rozpoznávají mnohé membránové a transportérové proteiny. Zajímavé je, že nadexprese *FSD3S* způsobila redukci fotosyntetické aktivity, obsahu chlorofylu a růstu v porovnání s rostlinou divokého typu, z čehož je usuzováno, že FSD3S negativně reguluje vývoj chloroplastu. Na druhou stranu hladina *FSD3S* je zvýšená u senescenčních rostlin, což naznačuje že FSD3 a FSD3S zastupují v rostlinách rozdílné funkce (Lee *et al.*, 2019).



Obrázek 5: Subcelulární lokalizace FSD3 a FSD3S v mezofylových buňkách transgenních rostlin prostřednictvím GFP technologie (převzato z Lee *et al.*, 2019); zelená – GFP fluorescenční signál; červená – autofluorescence chlorofylu; sloučení – kombinace GFP fluorescenčního signálu a autofluorescence chlorofylu; měřítko = 20 μ m

V současnosti existují stále spekulace o tom, zda zvýšená exprese *FSD2* a *FSD3* může vylepšit rostlinou toleranci k přírodním podmínkám, což bude předmětem dalších výzkumů (Gallie *et Chen*, 2019).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), ekotyp Columbia (Col-0; rostliny divokého typu); mutantní linie *fsd2*: SALK_080457; mutantní linie *fsd3*: SALK_103228
- Pro kultivaci bakterií s potenciálně neseným inzertem byl použit kmen *Escherichia coli*: **DH5 α** (F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻ mK⁺) *phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1*), kultivace probíhala při 37 °C v aerobních podmínkách (Chemically Competent; Thermo Scientific; kat. č. EC0112)
- Pro expresi rekombinantních proteinů byl použit speciálně upravený kmen *Escherichia coli*: **BL21 Star (DE3)** (F⁻ *ompT hsdSB* (r_B⁻, m_B⁻) *gal dcm rne131*), kultivace probíhala při 37 °C v aerobních podmínkách (Chemically Competent; Thermo Scientific; kat. č. EC0114)
- cDNA *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0), ze 14denních rostlin (poskytnuto vedoucím bakalářské práce Mgr. Petrem Dvořákem, Ph. D.)
- Plasmidový klonovací vektor pGEX6P-1 (Cytiva; kat. č. 28954648)
- Plasmidový klonovací vektor pMAL-c2X (Creative Biogene; kat. č. VET1042)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 2-merkptoethanol (Sigma Aldrich; kat. č. M6250)
- Agaróza (Sigma Aldrich; kat. č. A2576)
- Akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid, 40%, 37,5:1 (BioRad; kat. č. 1610148)
- Alkalická fosfatáza (Thermo Scientific; kat. č. EF0654)
- Ampicilin (Ampicillin sodium; Duchefa Biochemie; kat. č. A0104.0025)
- Amylose Resin (New England Biolabs; kat. č. E8021S)
- Anti FSD3, primární protilátka (rabbit; PhytoAB; kat. č. PHY1619S)
- Anti GST, primární protilátka (mouse; Agrisera; kat. č. AS21 4677)
- Anti MBP, primární protilátka (mouse; Agrisera; kat. č. AS21 4678)
- Anti Mouse, sekundární protilátka (Thermo Scientific; kat. č. 31430)
- Anti Rabbit, sekundární protilátka (Thermo Scientific; kat. č. 31460)
- Coomassie Brilliant Blue G 250 Staining Solution (BioRad; kat. č. 1610803)

- D(+)-Maltóza monohydrát (Thermo Scientific; kat. č. 11477727)
- Deoxyribonukleotidy (dNTP; 10 mM)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄; Sigma Aldrich, kat. č. P8416)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄; Sigma Aldrich; kat. č. S8282)
- Dithiothreitol (DTT; Sigma Aldrich; kat. č. D0632)
- DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Scientific; kat. č. R0611)
- Dodecylsírán sodný (SDS; Sigma Aldrich; kat. č. L3771)
- Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (MES; Duchefa Biochemie; kat. č. M1503)
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma Aldrich; kat. č. E5134)
- Ethanol (C₂H₅OH; Sigma Aldrich; kat. č. 493546)
- Gellan Gum (Alfa Aesar; kat. č. Y28C036)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific; kat. č. SM1331)
- Glutathione Sepharose 4B GST-tagged protein purification resin (Cytiva; kat. č. 17075601)
- Glycerol (Sigma Aldrich; kat. č. G5516)
- Glycin (Sigma Aldrich; kat. č. G8898)
- Hydroxid draselný (KOH; Sigma Aldrich; kat. č. 60130)
- Hydroxid sodný (NaOH; Sigma Aldrich; kat. č. S8045)
- Chlorid draselný (KCl; Sigma Aldrich; kat. č. P9541)
- Chlorid nitrotetrazoliové modři (NBT; Sigma Aldrich; kat. č. N6876)
- Chlorid sodný (NaCl; Sigma Aldrich; kat. č. S3014)
- IPTG Solution (Thermo Scientific; kat. č. R1171)
- Isopropanol (Sigma Aldrich; kat. č. 278475)
- Kultivační médium Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) (Sigma Aldrich; kat. č. S1797)
- Kyselina chlorovodíková (HCl; Sigma Aldrich; kat. č. 30721)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich; kat. č. A92902)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich; kat. č. 45726)
- Laemliho pufr, 4X (BioRad; kat. č. 1610747)
- LB Broth (Miller; Sigma Aldrich; kat. č. L3522)
- LB Broth s agarem (Miller; Sigma Aldrich; kat. č. L3147)
- L-Glutation redukovaný (ApppliChem; kat. č. A2084,0005)
- Methanol (MeOH; Sigma Aldrich; kat. č. 34860)

- Midori Green Advance DNA/RNA stain (Nippon Genetics; kat. č. MG04)
- Murashige a Skoog (MS) médium, basal salt mixture (Duchefa Biochemie; kat. č. M0221.0050)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma Aldrich; kat. č. T9281)
- Odtučněné sušené mléko, Blotting Grade Blocker (BioRad; kat. č. 1706404)
- P1, pufr (QIAGEN; kat. č. 19051)
- P2, pufr (QIAGEN; kat. č. 19052)
- P3, pufr (QIAGEN; kat. č. 19053)
- Peroxodisíran amonný (APS; Sigma Aldrich; kat. č. A3678)
- Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific; kat. č. F122S)
- PMSF Protease Inhibitor (Thermo Scientific; kat. č. 36978)
- Ponceau S (Sigma Aldrich; kat. č. 78376)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad; kat. č. 1610374)
- Primery (sekvence uvedeny při specifickém použití; Eurofins Genomics)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5X (Bradfordovo činidlo; BioRad; kat. č. 5000006)
- Restrikční endonukleáza FastDigest *EcoRI* (Thermo Scientific; kat. č. FD0274)
- Restrikční endonukleáza FastDigest *HindIII* (Thermo Scientific; kat. č. FD0504)
- Restrikční endonukleáza FastDigest *NdeI* (Thermo Scientific; kat. č. FD0583)
- Restrikční endonukleáza FastDigest *PstI* (Thermo Scientific; kat. č. FD0614)
- Restrikční endonukleáza FastDigest *Sall* (Thermo Scientific; kat. č. FD0644)
- Restrikční endonukleáza FastDigest *XhoI* (Thermo Scientific; kat. č. FD0694)
- Riboflavin (Applichem; kat. č. A0968,0010)
- T4 DNA ligasa, LC (Thermo Scientific; kat. č. EL0016)
- T4 DNA ligase pufr, 10X (Thermo Scientific; kat. č. B69)
- Tekutý dusík (Messer Technogas)
- Tris Acetát EDTA (TAE), 50X, pH 8,3 (Sigma Aldrich; kat. č. 106174)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris; Sigma Aldrich; kat. č. 108386)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich; kat. č. T8787)
- Tween 20 (Sigma Aldrich; kat. č. P1379)
- UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda (Invitrogen; kat. č. 10977015)

Použité soupravy

- Clarity Western ECL Substrate (BioRad, kat. č. 1705061)
- GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich; kat. č. PLN70)
- iProof High-Fidelity PCR Kit (BioRad; kat. č. 1725331)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel; kat. č. 740609.250)
- Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific; kat. č. F130WH)
- Polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána (GE Healthcare; kat. č. GE10600023)
- TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12% (BioRad; kat. č. 1610185)

Použité roztoky a jejich příprava

0,5M Tris-HCl, pH 6,8 (100 ml): 6 g Tris rozpustit v deionizované vodě, upravit pH na 6,8 pomocí HCl, doplnit objem deionizovanou vodou do 100 ml.

0,6mM NBT (50 ml): 24,4 mg NBT rozpustit v 50 ml fosfátového pufru bez glycerolu a kyseliny L-askorbové.

½ MS médium (1000 ml): 10 g sacharózy + 0,5 g MES + 2,15 g MS média rozpustit v 900 ml deionizované vody, upravit pH na 5,7 pomocí NaOH, doplnit deionizovanou vodou do 1000 ml, do dvou litrových flašek nasypat 3,25 g Gellan gum a do každé přidat 500 ml připraveného roztoku, sterilizovat autoklávováním.

1X Phosphate Buffered Saline (PBS) (1000 ml): 8 g NaCl + 1,44 g Na₂HPO₄ + 0,2 g KCl + 0,24 g KH₂PO rozpustit v 800 ml deionizované vody, upravit pH na 7,4 pomocí HCl, doplnit deionizovanou vodou do 1000 ml.

50mM Tris pufr s 150mM NaCl (500 ml): 3,0285 g Tris + 4,383 g NaCl rozpustit v 500 ml deionizované vody.

1% (w/v) agarózový gel (150 ml): 1,5 g agarózy rozpustit v 150 ml 1X TAE, zahřát v mikrovlnné troubě dokud není roztok čirý, ponechat vychladnout na teplotu přibližně 50 °C, přidat 3 µl Midori, nalít do elektroforetické vany, nechat ztuhnout.

1% (w/v) odtučněné sušené mléko (50 ml): 0,5 g mléka rozpustit v 50 ml TBS-T.

1,5M Tris-HCl, pH 8,8 (100 ml): 18,15 g Tris rozpustit v deionizované vodě, upravit pH

na 8,8 pomocí HCl, doplnit objem deionizovanou vodou do 100 ml.

10% (v/v) Triton X-100 (50 ml): 5 ml zásobního roztoku doplnit 1X PBS do 50 ml.

10% (w/v) APS (1 ml): 100 mg APS rozpustit v 1 ml deionizované vody.

10% (w/v) SDS (1 ml): 100 mg SDS rozpustit v 1 ml deionizované vody.

12% rozdělovací gel (25 ml): smíchat 6,25 ml 40% Akrylamidu + 6,25 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) + 12,5 μ l TEMED + 125 μ l 10 % APS + 12,375 ml deionizované vody (v případě SDS-PAGE 12,125 ml deionizované vody + 250 μ l 10% SDS)

1X TAE (Tris Acetát EDTA) (1000 ml): 20 ml zásobního 50X TAE doplnit deionizovanou vodou do 1000 ml.

20mM glutation s 5mM DTT (50 ml): 307 mg glutationu + 38,56 mg DTT rozpustit v 50 ml 50mM Tris pufru s 150mM NaCl.

20mM maltóza s 5mM DTT (50 ml): 360 mg maltózy + 38,56 mg DTT rozpustit v 50 ml 50mM Tris pufru s 150mM NaCl.

4% zaostřovací gel (10 ml): smíchat 1 ml 40% Akrylamidu + 2,52 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8) + 10 μ l TEMED + 50 μ l 10% APS + 6,46 ml deionizované vody (v případě SDS-PAGE 6,36 ml deionizované vody + 0,1 ml 10% SDS).

5% (w/v) odtučněné sušené mléko (150 ml): 7,5 g odtučněného sušeného mléka rozpustit ve 150 ml TBS-T.

50% (v/v) glycerol (50 ml): 25 ml 100% glycerol + 25 ml deionizované vody, sterilizovat ve flowboxu přefiltrováním.

5mM Na₂EDTA, 0,25% TEMED a 0,06mM riboflavin (50 ml): 92 mg EDTA + 162 μ l TEMED + 6 μ l riboflavinu rozpustit v 50 ml fosfátového pufru bez glycerolu a kyseliny L-askorbové.

Ampicilin, 50 mg·ml⁻¹ (1 ml): 50 mg ampicilinu rozpustit v 1 ml deionizované vody, sterilizovat přefiltrováním.

Elektroforetický pufr (1000 ml): 3 g Tris + 14,4 g glycin + 1 g SDS doplnit do objemu

1000 ml deionizovanou vodou.

Fosfátový pufr (200 ml): 1,2 g NaH_2PO_4 rozpustit v deionizované vodě, upravit pH na 7,8 pomocí NaOH, přidat 35,2 mg kyseliny L-askorbové a 20 ml glycerolu, doplnit deionizovanou vodou do objemu 200 ml.

Odbarvovací roztok (500 ml): 200 ml methanolu + 50 ml kyseliny octové + 250 ml deionizované vody.

Pevné LB médium (250 ml): 10 g LB Broth s agarem (Miller) rozpustit v 250 ml deionizované vody, sterilizovat autoklávováním.

Ponceau S roztok (1000 ml): 1 g Ponceau S + 50 ml kyselina octová doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou.

Riboflavin (500 μl): 7,2 mg Riboflavin rozpustit v 500 μl 96% etanolu, před použitím udržovat ve tmavém prostředí.

Tekuté LB médium (500 ml): 12,5 g LB Broth (Miller) rozpustit v 450 ml deionizované vody, upravit pH na 7,2 pomocí KOH, doplnit do objemu 500 ml deionizovanou vodou, sterilizovat autoklávováním.

Tris buffer saline s přídavkem Tween 20 (TBS-T; 1000 ml): 2,42 g Tris + 8,78 g NaCl rozpustit v deionizované vodě, upravit pH na 7,4 pomocí HCl, doplnit deionizovanou vodou do objemu 999 ml, přidat 1 ml Tween 20.

Tris-glycinový (transferový) pufr (1000 ml): 3 g Tris + 14,4 g glycin doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou.

Tris-glycinový (transferový) pufr s 10% methanolem (2000 ml): 200 ml tris-glycinového pufru + 200 ml methanolu doplnit do objemu 2000 ml deionizovanou vodou.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytická váha XA110/2X (Radwag)
- Aparatura pro transfer proteinů Mini Trans-Blot Cell (BioRad)
- Autokláv Sterrivap HP IL (MMM Group)
- Centrifuga MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific)
- Centrifuga ScanSpeed 1730R (Beckman Coulter)

- Digestoř (MERCİ)
- Dokumentační systém Gel Doc EZ Imager (BioRad)
- Dokumentační zařízení ChemiDoc MP Imaging System (BioRad)
- Elektroforetická vana Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)
- Elektroforetická vana Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad)
- Hlubokomrazící box MDF-U500VX-PE (Panasonic)
- Chlazená centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter)
- Inkubátor s třepačkou ES-20 (Grant Instruments)
- Inkubovaná třepačka Ecotron (Infors HT)
- Kultivační místnost (WEISS Gallenkamp)
- Laboratorní chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)
- Laboratorní mikrocentrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)
- Laboratorní předvážky S1502 (Bel Engineering)
- Laminární box (MERCİ)
- Magnetická míchačka s ohřevem MSH-300 (Biosan)
- Mraznička LIE G 5216 513L (Liebherr Comfort)
- Obrazový skener Image Scanner III (GE Healthcare)
- Spektrofotometr Infinite M Nano (TECAN)
- Spektrofotometr NanoDrop ND LITE-PR (Thermo Scientific)
- Spektrofotometr SmartSpec Plus (BioRad)
- Stolní chlazená centrifuga ScanSpeed 1730R (LaboGene)
- Stolní multimetr PC 2700 (Eutech Instruments)
- Suchá lázeň ThermoCell MixingBlock (Bioer)
- Termocykler T100 (BioRad)
- Třepačka MR-12 (Biosan)
- Ultrazvukový homogenizátor model 3000MP (BioLogics)
- UV transluminátor WUV-L20 (Witeg)
- Vortex Genie 2Pulse (Genie)
- Výrobník deionizované vody Simplicity Water Purification System (Merck)
- Výrobník ledu AF80 (Scotsman)
- Zdroj napětí PowerPac HV (BioRad)

4.4 Seznam použitých programů a databází

- ApE, A Plasmid editor (Jorgensen Lab, USA)
- Image Lab (verze 4.0.1 build 6; BioRad; USA)
- Microsoft Excel (Microsoft; USA)
- Microsoft PowerPoint (Microsoft; USA)
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>)
- T-DNA Primer Design Tool (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 PCR amplifikace *FSD2* a *FSD3* genů

Pomocí PCR reakce byla provedena amplifikace *FSD2* a *FSD3* genů. Před začátkem pipetování reakční směsi PCR byly naředěny 4 pracovní primery (pro každý gen 2 pracovní primery, viz Tabulka 3) na koncentraci $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ke každému primeru přiložena výrobcem informace o ředění, v našem případě ředění 10 μl primer a 90 μl deionizované vody). Celou dobu práce byly pracovní primery udržovány na ledu. Byly připraveny 2 mikrozkušavky. Do každé byl napipetován PCR mix pro výsledný objem 200 μl (pro 5 PCR reakcí; Tabulka 1) s použitím iProof High-Fidelity PCR Kitu.

Tabulka 1: Reakční směs pro PCR amplifikaci *FSD2* a *FSD3* genu s využitím iProof High-Fidelity PCR Kitu

Komponent	Výsledná koncentrace	Objem pro 1 reakci [μl]	Objem pro 5 reakcí [μl]
iProof HF pufr, 5X	1X	8,00	40,00
dNTP	$0,20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,80	4,00
Primer, 10 μM	FW	$0,50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	2,00
	REV	$0,50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	2,00
iProof DNA polymeráza	$0,02 \text{ U}/\mu\text{l}$	0,40	2,00
Deionizovaná voda		26,80	134,00
Celkový objem		40,00	200,00

Po napipetování složek reakční směsi do obou mikrozkušavek, byly obě mikrozkušavky centrifugovány. Následně bylo vždy 48 μl reakční směsi přeneseno do PCR mikrozkušavky, takže objem jedné reakční směsi byl rozdělen do 5 PCR mikrozkušavek. Do každé PCR mikrozkušavky byl přidán 1 μl cDNA. Jako PCR templát byla použita cDNA *Arabidopsis thaliana* poskytnuta vedoucím bakalářské práce. Po přidání byly objemy zvortexovány a centrifugovány. Takto připravené vzorky byly přeneseny do termocyklieru a byl nastaven teplotní a časový program (Tabulka 2).

Tabulka 2: Teplotní program termocyklu při PCR amplifikaci *FSD2* a *FSD3* z cDNA templátu

Krok cyklu	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Annealing	pro <i>FSD2</i>	20 s	35
	pro <i>FSD3</i>		
Extenze	72	30 s	
Finální extenze	72	5 min	1

Tabulka 3: Seznam primerů použitých při PCR amplifikaci *FSD2* a *FSD3* s využitím cDNA templátu (FW – forward primer; REV – reverse primer)

Typ	Název	Sekvence (5'→3')
FW	EcoRI_fwd_fsd2	CCGGAATTCATGATGAATGTTGCAGTGAC
REV	SalI_rev_fsd2	ACGCGTCGACTTAGTCAACCTCAGATACAT
FW	EcoRI_fwd_fsd3	CCGGAATTCATGAGTTCTTGTGTTGTGACG
REV	SalI_rev_fsd3	ACGCGTCGACTTAAGCGATTGGGATGTTGG

4.5.2 Horizontální elektroforetická separace v 1% agarozovém gelu

Výsledné produkty PCR amplifikace byly separovány pomocí horizontální elektroforetické separace v 1% (w/v) agarozovém gelu. Do první jamky gelu byly napipetovány 3 µl markeru relativní molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, a za ním byly do gelu naneseny produkty PCR reakce smíchané s 6 µl DNA Gel Loading Dye, 6X. Elektroforetická separace probíhala při 100 V přibližně 30 minut. Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí zařízení Gel Doc EZ Imager, a následně upraveny v programu Image Lab. Do konečné podoby byl záznam gelu upraven v programu Microsoft PowerPoint.

4.5.3 Izolace a purifikace amplifikované DNA

Po provedení horizontální elektroforetické separace byly fragmenty gelu, které obsahovaly produkty PCR amplifikace, z 1% (w/v) agarozového gelu opatrně vyřezány skalpelem za pomoci UV transluminátoru, a následně přeneseny do 2ml mikrozkuhavky (odděleně gelové fragmenty s amplikony *FSD2* a s *FSD3*). Pro izolaci a purifikaci amplifikovaných DNA fragmentů byl využit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit podle návodu výrobce s mírnými úpravami.

Ke gelovým fragmentům v 2ml mikrozkuhavce bylo přidáno 200 µl NTI pufru na

100 mg vyřezaného 1% (w/v) agarozového gelu. Obsah mikrozkušavky byl zahříván do úplného rozpuštění gelové matrice v termobloku (50 °C). V průběhu zahřívání byl obsah mikrozkušavek každé 3–4 minuty promíchán.

Na připravenou kolonu ve sběrné zkušavce bylo napipetováno 700 µl vzniklého roztoku a centrifugováno (2 minuty; 12500 g; laboratorní teplota). Po skočení centrifugace byl eluát opětovně nanesen na kolonu a zcentrifugován za stejných podmínek. Výsledný eluát po druhé centrifugaci byl vylit. Takto byl zpracován i zbytek objemu rozpuštěné gelové matrice s amplikony.

Po odstranění posledního eluátu z předchozího kroku, bylo na kolonu naneseo 700 µl NT3 pufru a centrifugováno (2 minuty; 12500 g; laboratorní teplota). Prošlý eluát byl odstraněn vylitím. Kolona byla za účelem zbavit se zbytků roztoků centrifugována (2 minuty; 12500 g; laboratorní teplota) bez přidání jakéhokoliv roztoku.

Po centrifugování byla kolona přenesena do nové 1,5ml mikrozkušavky. Mikrozkušavka s kolonou byla ponechána 5 minut otevřená na pracovním místě, aby došlo k odpaření zbytku ethanolu. Následně bylo na kolonu naneseo 35 µl deionizované vody. Po naneseo deionizované vody byla provedena centrifugace (2 minuty; 12500 g; laboratorní teplota). Eluát z centrifugace byl nanesen zpět na kolonu a byla provedena centrifugace (5 minut; 12500 g; laboratorní teplota).

Po centrifugaci byla odstraněna kolona. Tento pracovní postup byl proveden zároveň pro gelové fragmenty s amplikony *FSD2* a *FSD3*. Po dokončení purifikace byla změřena koncentrace DNA. Na spektrofotometru NanoDrop Lite byl nastaven program pro měření koncentrace dsDNA. První byl na přístroj nanesen blank (3 µl) ve formě deionizované vody a přístroj byl vyblankován. Následně byl na spektrofotometr nanesen vzorek (3 µl izolované DNA). Byla změřena jeho koncentrace. Postup byl opakován pro druhý izolovaný vzorek. Po změření koncentrace byla izolovaná DNA uchovávána při –20 °C.

4.5.4 Enzymatické štěpení vektorů a produktů

Za účelem následné ligace bylo nejprve provedeno štěpení cílových vektorů (pMAL-c2X a pGEX6P-1) a izolované DNA pomocí dvou restričních endonukleáz (*EcoRI* a *Sall*), aby byly získány lepivé konce. Ze změřené koncentrace izolované DNA byl vypočítán její objem potřebný do reakce, abychom přibližně přidali 1000–1500 ng. Do mikrozkušavek bylo připraveno 50 µl reakční směsi pro jednotlivé vektory a izolované DNA (Tabulka 4 a 5).

Po přípravě reakčních směsí probíhalo štěpení 1 hodinu na třepačce při teplotě 37 °C.

Po uplynutí stanovené doby pro enzymatickou reakci byla do zkumavek, kde probíhalo štěpení vektorů, přidána alkalická fosfatáza, aby nedošlo ke spojení vektorů do kruhu. Po přidání fosfatázy probíhalo štěpení dalších 30 minut při stejných podmínkách. Pro ukončení štěpení byly enzymy v reakční směsi inaktivovány zahřáním na teplotu 80 °C v termobloku na 5 minut.

Tabulka 4: Reakční směs štěpení izolované DNA pomocí endonukleáz *EcoRI* a *Sall*

	Výsledná koncentrace	Objem [μl]
FastDigest pufr, 10X	1X	5,0
Restrikční endonukleáza <i>EcoRI</i>		0,5
Restrikční endonukleáza <i>Sall</i>		0,5
DNA	<i>FSD2</i>	1269,6 ng
	<i>FSD3</i>	1328,0 ng
Deionizovaná voda	pro <i>FSD2</i>	20,0
	pro <i>FSD3</i>	24,0
Celkový objem		50,0

Tabulka 5: Reakční směs štěpení cílových vektorů pGEX6P-1 a pMAL-c2X pomocí endonukleáz *EcoRI* a *Sall*

	Výsledná koncentrace	Objem [μl]
FastDigest pufr, 10X	1X	5,0
Restrikční endonukleáza <i>EcoRI</i>		0,5
Restrikční endonukleáza <i>Sall</i>		0,5
Plazmidová DNA	2200 ng	2,5
Deionizovaná voda		41,5
Celkový objem		50,0

4.5.5 Ligace produktů štěpení

Ligace byla provedena ve 4 kombinacích pro vytvoření konstruktů: *pMAL-c2X::FSD2*; *pMAL-c2X::FSD3*; *pGEX6P-1::FSD2*; *pGEX6P-1::FSD3*. Byla použita T4 DNA ligáza a ligace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakční směs byla připravena podle Tabulky 6 pro ligaci pMAL-c2X vektoru s produkty štěpení izolované DNA a podle Tabulky 7 pro ligaci pGEX6P-1 vektoru s produkty štěpení izolované DNA. Jelikož se koncentrace vektorů pMAL-c2X a pGEX6P-1 nelišila, byl pipetován stejný objem pro oba vektory. Příslušné množství DNA k množství linearizovaného vektoru bylo vypočítáno pomocí rovnice (viz níže) a upraveno na poměr 3:1.

$$\frac{\text{velikost inzertu [kb]}}{\text{velikost vektoru [kb]}} \cdot \text{hmotnost vektoru [ng]} = \text{množství inzertu [ng]}$$

Tabulka 6: Reakční směs pro ligaci (T4 DNA ligáza) lepivých konců enzymaticky připravených štěpením vektoru pMAL-c2X a fragmentů DNA

	Výsledná koncentrace	Objem [μl]
Linearizovaný vektor pMAL	100 ng	2,30
Inzert DNA	<i>FSD2</i>	41 ng
	<i>FSD3</i>	36 ng
T4 DNA Ligase pufr	1X	2,00
T4 DNA Ligáza	1U	0,50
Deionizovaná voda	pro <i>FSD2</i>	12,90
	pro <i>FSD3</i>	13,84
Celkový objem		20,00

Tabulka 7: Reakční směs pro ligaci (T4 DNA ligáza) lepivých konců enzymaticky připravených štěpením vektoru pGEX6P-1 a fragmentů DNA

	Výsledná koncentrace	Objem [μl]
Linearizovaný vektor pGEX	100 ng	2,30
Inzert DNA	<i>FSD2</i>	55 ng
	<i>FSD3</i>	48 ng
T4 DNA Ligase pufr	1X	2,00
T4 DNA Ligáza	1U	0,50
Deionizovaná voda	pro <i>FSD2</i>	13,03
	pro <i>FSD3</i>	13,39
Celkový objem		20,00

4.5.6 Transformace bakteriálních buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10

Transformovány teplotním šokem byly kompetentní buňky *Escherichia Coli*, DH5α. K 10 μl ligační směsi (plazmid potenciálně nesoucí inzert) v 1,5ml mikrozkumavce bylo přidáno 50 μl kompetentních buněk *Escherichia Coli*. Směs byla inkubována 30 minut na ledě. Následně byla směs přenesena do termobloku nastaveného na teplotu 42 °C na dobu 1 minuty. Po uplynutí 1 minuty byla směs opětovně uložena do ledu na 3 minuty. Nakonec bylo ke směsi napipetováno 250 μl SOC média a inkubováno 1 hodinu při 37 °C. Tento postup byl uplatněn pro všechny ligační směsi.

4.5.7 Kultivace transformovaných bakterií

Předem připravené pevné LB médium bylo rozeřáno v mikrovlnné troubě. Ve flowboxu bylo do média, po snížení jeho teploty na přijatelnou hodnotu, přidáno příslušné antibiotikum ampicilin (AMP) s ohledem na rezistenci vektoru (výsledná koncentrace antibiotika v médiu byla $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Médium bylo nalito do Petriho misek a ponecháno ztuhnout.

Na ztuhnuté médium byla nanesea a hokejkou rozetřena suspenze transformovaných bakterií. Bakteriální kultura byla kultivována přes noc ($37 \text{ }^\circ\text{C}$; 180 RPM; tma). Pro dlouhodobější uchování byly Petriho misky s bakteriemi uloženy do lednice ($4 \text{ }^\circ\text{C}$).

Po kultivaci byly narostlé kolonie, které potenciálně nesly příslušný plazmid, ve flowboxu přeneseny do tekutého LB média s přidaným ampicilinem (výsledná koncentrace antibiotika $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Do uzavíratelné zkumavky bylo nalito tekuté LB médium, do kterého byly s pomocí sterilního párátko vybrané kolonie přeneseny. Kultivace probíhala v neuzavřené zkumavce v inkubátoru ($37 \text{ }^\circ\text{C}$; 180 RPM; tma).

4.5.8 Izolace plazmidové DNA

Izolace plazmidové DNA byla provedena z přes noc kultivované bakteriální kultury. Tekuté médium s bakteriálními koloniemi bylo postupně po 2 ml dvakrát centrifugováno (4 minuty; 4000 g; laboratorní teplota) ve 2ml mikrozkuavce. Supernatant byl odstraněn vylitím a odpipetováním. Výsledný pelet z celého objemu média byl rozpuštěn vortexováním v 250 μl P1 pufru. Následně bylo přidáno 250 μl P2 pufru a obsah mikrozkuavky byl promíchán otáčením (přibližně 10x). Do mikrozkuavky dále bylo přidáno 300 μl P3 pufru a obsah byl opětovně promíchán otáčením mikrozkuavky. Mikrozkuavka byla přenesena na led a byla ponechána k inkubaci po dobu 5 minut.

Po ukončení inkubace byla provedena centrifugace (15 minut; 15000 g; $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Do prázdné 1,5ml mikrozkuavky bylo mezitím přeneseno 700 μl isopropanolu. Po centrifugaci byl supernatant převeden do 1,5ml mikrozkuavky k isopropanolu. Obsah byl promíchán a ponechán v klidu po dobu 15 minut a následně centrifugován (15 minut; 15000 g; $3 \text{ }^\circ\text{C}$). Po vytažení byl supernatant odstraněn a byl přidán 1 ml 75% (v/v) ethanolu. Mikrozkuavky byly centrifugovány (10 minut; 15000 g; laboratorní teplota), poté byl odstraněn ethanol. Poslední krok byl zopakován ještě jednou. Pro úplné odstranění ethanolu byly mikrozkuavky ponechány otevřené na pracovním místě po dobu 30 minut. Nakonec bylo přidáno 50 μl vody s nulovou aktivitou RNAs, ve které byl pelet rozpuštěn. Byla změřena

koncentrace plazmidové DNA (obdobný postup jako měření koncentrace v kapitole 4.5.3).

4.5.9 Štěpení plazmidové DNA pomocí restrikčních endonukleáz

Úspěšnost klonování byla ověřena štěpením izolované plazmidové DNA restrikčními endonukleázami. Reakční směs byla připravena podle Tabulky 8. Přidaný objem plazmidové DNA (x) byl přizpůsobený podle jednotlivých koncentrací změřených v kapitole 4.5.9, aby bylo přidáno nejméně 2000 ng do reakce. Objem deionizované vody (y) byl dopočítán podle plazmidové DNA do celkového objemu reakce 20 μ l. Reakční pufr byl vybrán podle použitého enzymu, aby bylo dosaženo maximální efektivity enzymu. Enzymy byly vybrány podle map jednotlivých plazmidů v závislosti na vloženém inzertu.

Tabulka 8: Složení enzymatické reakce pro štěpení izolované plazmidové DNA pomocí restrikční endonukleázy

	Výsledná koncentrace	Objem pro 1 reakci [μ l]
FastDigest pufr, 10X	1X	2,0
Enzym		0,2
Plazmidová DNA	>2000 ng	x
Deionizovaná voda		y
Celkový objem		20,0

Výsledná reakční směs bylo promíchána a byla provedena inkubace (1 hodina; 37 °C). Následně byla provedena horizontální elektroforetická separace podle kapitoly 4.5.2 s mírnými modifikacemi (ke vzorku 4 μ l DNA Gel Loading Dye, 6X).

4.5.10 Purifikace plazmidové DNA

Pro další postup (transformace, sekvenování) byla izolovaná plazmidová DNA purifikovaná pomocí GenElute™ Plasmid Miniprep Kitu podle návodu výrobce s úpravami. GenElute Miniprep Binding kolona byla umístěna do mikrocentrifugační zkumavky, a na ní bylo nanášeno 500 μ l Column Preparation Solution. Bylo centrifugováno (1 minuta; 12000 g; laboratorní teplota). Dříve izolovaná plazmidová DNA byla smíchána s 250 μ l PB pufru a nanášena na připravenou kolonu. Byla provedena centrifugace za stejných podmínek a výsledný eluát byl odstraněn vylitím. Na kolonu bylo následně nanášeno 750 μ l Wash Solution a opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek, která byla zopakovaná ještě jednou bez nanášení jakékoliv roztoku. Nakonec byla kolona přenesena do prázdné mikrozkušavky a bylo na ní nanášeno 40 μ l Elution Solution. Kolona s roztokem byla centrifugována poprvé za stejných podmínek, a poté, co byl eluát opětovně nanášen

na kolonu, podruhé na dobu 3 minut. Po dokončení byla kolona odstraněna.

Takto purifikované vzorky (vždy jeden zástupní vzorek pro stejný výsledek štěpení) byly po změření koncentrace a čistoty odeslány k sekvenování. Bylo odesláno 500 ng purifikované plazmidové DNA firmě SEQme (Česká republika). Výsledky byly vyhodnoceny v programu ApE.

4.5.11 Transformace bakteriálních buněk *Escherichia coli*, BL21 Star (DE3)

Pro expresi rekombinantních proteinů byly transformovány bakteriální buňky *Escherichia coli*, BL21 Star (DE3). K 50 μl bakteriálních buněk bylo přidáno 5 μl purifikované plazmidové DNA potvrzené nesoucí inzert. Následovala transformace tepelným šokem a kultivace transformovaných bakterií podle stejného postupu jako v předchozích krocích. Bakteriální suspenze byla pro dlouhodobé uchování zamrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 50% sterilním glycerolu v poměru 1:1 (výsledná koncentrace glycerolu 25 %).

4.5.12 Nasazení transformovaných bakteriálních buněk

Ve flowboxu byly připraveny Erlenmeyerovy baňky. Do každé bylo převedeno 50 ml tekutého LB média s 40 μl adekvátního antibiotika ampicilin (AMP, výsledná koncentrace $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Do média bylo přidáno 100 μl z bakteriální suspenze (transformované bakterie *Escherichia coli*, BL21 Star (DE3)). Bakteriální kultura byla kultivována přes noc v inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 180 RPM; tma).

Po dokončení kultivace bylo provedeno přepasážování. Výsledná namnožená bakteriální kultura byla převedena do 400 ml tekutého LB média ve větší Erlenmeyerově baňce s přidaným ampicilinem, které bylo dále uloženo ke kultivaci do inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 180 RPM; tma). U kultivované bakteriální suspenze byla sledována optická hustota při vlnové délce 600 nm (OD_{600} , optical density), která byla měřena na 1 ml bakteriální kultury pomocí spektrofotometru s využitím čistého tekutého LB média jako slepého vzorku. Po dosažení hodnoty optické hustoty 0,8 (přibližně), bylo k bakteriální kultuře přidáno 200 μl 1M IPT6 (indukce exprese proteinů, udržováno na ledu). Takto připravené bakteriální kultury byly kultivovány přes noc v inkubátoru ($18\text{ }^{\circ}\text{C}$; 180 RPM; tma).

Po dokončení kultivace byla bakteriální kultura postupně centrifugována ve Falconových zkumavkách (10 minut; 4000 g; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl odstraněn slítím a výsledný pelet byl zamrazen v tekutém dusíku a skladován při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.13 Lýze bakteriálních buněk

K peletu, tvořenému bakteriálními buňkami *Escherichia coli*, BL21 Star (DE3), bylo přidáno 5 ml vychlazeného 1X PBS. Pelet byl rozpuštěn v PBS pomocí vortexu. Následně byly sloučeny do jedné Falconovy zkumavky bakteriální kultury nesoucí stejný konstrukt, takže celkový objem suspenze byl přibližně 13 ml (objem se s rozsuspendováním bakteriální kultury zvýšil). K bakteriální kultuře bylo přidáno 260 μl 100mmol $\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF (inhibitor proteáz, výsledná koncentrace dosahovala hodnoty 2 mM).

Takto připravené bakteriální buňky byly homogenizovány pomocí sonifikace. Ultrazvukový homogenizátor model 3000MP byl nastaven na amplitudu 50 po dobu 5 minut (6 sekund sonifikace a 7 sekund pauza). Falconova zkumavka s bakteriální kulturou byla uložena do misky s ledem a vložena do přístroje. Pro každý vzorek byla homogenizace zopakována 3x.

Po ukončení byly homogenizované bakteriální buňky udržovány na ledu. Následně k nim bylo přidáno 1,3 ml 10% Tritonu X-100, aby výsledná koncentrace byla 1 % (ředění 10x). Poté byla provedena centrifugace (20 minut; 14000 g; 4 °C). Supernatant byl odebrán do nové Falconovy zkumavky a centrifugace byla zopakována (15 minut; 14000 g; 4 °C). Výsledný supernatant byl opět přenesen do nové Falconovy zkumavky.

4.5.14 Afinitní purifikace rekombinantních enzymů FSD

Pro provedení afinitní purifikace byly nejprve promyty matrice k nanesení na kolonu. Byly použity 2 různé matrice, jelikož byly použity 2 vektory (konstrukty obsahující pGEX6P-1 vektor expresovány jako proteiny fúzovány s GST; konstrukty obsahující pMAL-c2X vektor expresovány jako proteiny fúzovány s MBP). Připraveny k použití byly smícháním 200 μl matrice (Glutathione Sepharose 4B (pro GST-fúzované proteiny) nebo Amylose Resin (pro MBP-fúzované proteiny), před pipetováním řádně protřepané) s 10 ml 1X PBS do 15 ml Falconové zkumavky.

Kolony byly umístěny ve vhodné pozici do lednice, aby bylo možné odebírat protečený roztok. Kolony byly promyty 1X PBS (kolony vždy naplněny až po okraj). Po promytí byly na kolony nanесeny připravené matrice. Kolony byly po nanesení matrice opětovně promyty 1X PBS. Ze získaného supernatantu (kapitola 4.5.15) bylo nejprve odebráno 100 μl do 1,5ml mikrozkušavky. Následně, když hladina 1X PBS dosáhla úrovně matrice, byl na kolonu nanесen zbytek supernatantu. Po protečení supernatantu byl na kolonu nanесen 1X PBS. Do 1,5ml mikrozkušavky bylo odebráno 200 μl z roztoku vylučovaného

kolonou.

Následně byl na kolonu nanesen 1 ml příslušného elučního roztoku k matici (20mmol·l⁻¹ maltóza s 5mmol·l⁻¹ DTT pro Amylose Resin a 20mM glutation s 5mmol·l⁻¹ DTT pro Glutathione Sepharose 4B GST-tagged protein purification resin). Při eluci bylo do 1,5ml mikrozkuvek postupně odebráváno 200 µl protékajícího roztoku. Celkem bylo odebráno až 6 frakcí. Do poslední frakce byla přidána část pevné matrice z kolony (tzv. frakce beads). Všechny odebrané frakce byly zamrazeny do dusíku a uchovávány v -80 °C.

4.5.15 SDS-PAGE

Polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm pro elektroforetickou separaci za denaturujících podmínek (SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného) byl připraven pomocí soupravy TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit podle návodu výrobce. Nejprve byl nanesen 12% rozdělovací gel Pasteurovou pipetou mezi skla očištěná 96% etanolem, vysušena plynným dusíkem a sestavena do příslušné aparatury. Na něj byl ihned nanesen 4% zaostřovací gel a vložen hřebínek. Oba gely byly ponechány 30 minut tuhnout.

Pro nanesení vzorků do gelu byl nejprve připraven 1 ml barviva. Nejprve byl Laemliho pufr smíchan v digestoři s 2-merkaptetanolem v poměru 9:1 (900 µl Laemliho pufru + 100 µl 2-merkaptetanolu). Následně bylo 20 µl takto připraveného barviva přidáno k 60 µl vzorku. Takto připravené vzorky byly promíchány vortexováním a přeneseny k inkubaci do termostatu (5 minut; 96 °C). Po dokončení inkubace a zchladnutí na pokojovou teplotu bylo 25 µl vzorků nanášeno za marker relativní molekulové hmotnosti do připraveného gelu uloženého v elektroforetické vaně naplněné elektroforetickým pufrem. Samotná separace probíhala na ledu při konstantním napětí 100 V prvních 15 minut, a následně při 150 V přibližně 1 hodinu. Výsledné gely byly nabarveny pomocí roztoku Coomassie Brilliant blue G 250, ve kterém byly ponechány 15 minut. Následně byly 2x 15 minut gely odbarvovány pomocí odbarvovacího roztoku.

Detekce proteinů probíhala pomocí obrazového skeneru Image Scanner III. Pro konečnou úpravu výsledky byl použit program Microsoft PowerPoint.

4.5.16 Měření koncentrace rekombinantních enzymů FSD

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno Bradfordovou metodou (Bradford, 1976). Bradfordovo činidlo bylo naředěno v poměru 1:4 do celkového objemu 15 ml, tudíž ke 3 ml činidla bylo přidáno 12 ml deionizované vody. Do 96jamové mikrotitrační destičky

bylo pro měření pipetováno 299 μl Bradfordova činidla na jamku, ke kterým byl následně přidán vždy 1 μl vzorku získaného afinitní purifikací proteinů. Pro jeden vzorek byly vyčleněny 3 jamky, aby bylo měření provedeno na 3 replikách. Objem jamky mikrotitrační destičky byl promíchán pipetováním. Následně byly vzorky ponechány k inkubaci (10 minut; laboratorní teplota). Analýza byla provedena pomocí spektrofotometru s monochromátorem Infinite M Nano při vlnové délce 595 nm. Výsledná kvantifikace byla provedena s pomocí kalibrační křivky roztoku BSA o známe koncentraci. Získaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel.

4.5.17 Stanovení enzymatické aktivity rekombinantních enzymů FSD

Pro stanovení enzymatické aktivity připravených rekombinantních FSD byly nejprve vzorky rozděleny elektroforetickou separací v nedenedurujících podmínkách, tzv. Nativní PAGE. Pro jednotlivé konstrukty byla vybrána 1 reprezentativní frakce. Polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm byl připraven ze 4% zaostřovacího gelu a 12% rozdělovacího gelu, které byly Pasteurovou pipetou postupně nanášeny mezi tenká skla očištěná 70% etanolem, usušena plynným dusíkem a sestavena do příslušné aparatury. Pro elektroforetickou separaci byl použit jako elektrodový pufr tris-glycinový (transferový) pufr.

Do připraveného gelu bylo nanášeno 5 μg a 10 μg proteinu v 15 μl . Objem potřebný pro nanášení zmíněného množství byl stanoven z dat Bradfordovy metody. Stanovený objem byl obohacen glycerolem, aby výsledná koncentrace glycerolu dosahovala hodnoty 10 %, a doplněn 1X PBS do požadovaného objemu 15 μl . Elektroforetická separace probíhala na ledu při konstantním proudu 40 mA a napětí 270 V na gel po dobu 2 hodin.

Po dokončení elektroforetické separace byly gely inkubovány (10 minut; laboratorní teplota) v 50 ml fosfátového pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu. Následně byl gel inkubován v 50 ml fosfátového pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu, ale s 0,6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NBT (20 minut; tma; laboratorní teplota). Poté v 50 ml fosfátového pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu s 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2EDTA , 0,25% TEMED a 0,06 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ riboflavinem (15 minut; tma; laboratorní teplota). Po ukončení inkubace byl gel vystaven na dobu 5 minut přímému světlu o intenzitě 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po expozici byl fosfátový pufr opakovaně (3x) nahrazen deionizovanou vodou.

Výsledná dokumentace gelu byla provedena pomocí Image Scanner III. Do finální podoby byly výsledky zpracovány s použitím programu Microsoft PowerPoint.

4.5.18 Imunoblotování

Před samotným provedením transferu proteinů na membránu, byla provedena elektroforetická separace za denaturujících podmínek s vybranými frakcemi s nejvhodnější koncentrací proteinů (frakce získány afinitní purifikací (kapitola 4.5.16) a připraveny k nanesení do gelu (kapitola 4.5.17)). K separaci byl použit 4% a 12% polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm připravený smícháním příslušných složek. TEMED a APS byly přidány těsně před nanesením. První byl do připravené aparatury na gely přenesen 12% rozdělovací gel, který byl převrstven isopropanolem a ponechán polymerizovat 45 minut. Po dokončení polymerizace byl isopropanol slit z gelu a gel byl opláchnut 5x deionizovanou vodou. Zbytky vody byly odstraněny pomocí filtračního papíru. Jako druhý byl nanesen 4% zaostřovací gel, do kterého byl okamžitě vložen hřebínek. Gel byl ponechán polymerizovat 20 minut. Pro následnou elektroforetickou separaci bylo do gelu nanесeno 10–15 μ l vzorku (podle koncentrace) a samotná separace probíhala při stejných podmínkách jako v kapitole 4.5.17.

Po dokončení elektroforetické separace byly separované proteiny přeneseny na PVDF membránu o rozměrech 8,5 cm na šířku a 6 cm na výšku. Membrána byla nejprve vložena na 30 s do methanolu, a poté přenesena spolu s filtračním papírem, houbičkou a výsledným polyakrylamidovým gelem, který byl po dokončení separace promyt destilovanou vodou, k inkubaci do transferového pufu s obsahem 10% (v/v) methanolu na dobu 10 minut. Následně byly jednotlivé části složeny do kazety v pořadí: houbička, 3 filtrační papíry, gel, PVDF membrána, 3 filtrační papíry, houbička. Při skládání do kazety byly z jednotlivých vrstev odstraňovány bubliny pomocí válečku. Takto složená kazeta byla přenesena do elektroforetické vany naplněné transferovým pufrem s obsahem 10% (v/v) methanolu. Transfer probíhal při konstantním napětí 24 V přes noc v lednici.

Další den byla membrána opatrně vytažena z kazety a promyta destilovanou vodou. Pro ověření přenosu proteinů byla membrána vložena na 30 s do roztoku Panceau S, omyta 3x v destilované vodě a zdokumentovaná fotoaparátem. Odbarvení membrány bylo docíleno promytím 2x na 10 minut v destilované vodě na třepačce a následně za stejných podmínek v TBS-T.

Pro detekci FSD byly membrány nejprve blokovány v roztoku 5% (w/v) odtučněného sušeného mléka v TBS-T za pomalého třepání po dobu 1,5 hodiny. Po uplynutí stanovené doby byl roztok nahrazen roztokem primární protilátky (anti GST, 1:1000; anti MBP, 1:1000; anti FSD3, 1:1000), která byla ředěna v 1% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Membrány byly inkubovány s roztokem s primární protilátkou přes noc za

pomalého třepání ve 4 °C. Následující den byl roztok s protilátkou odstraněn a membrána byla 5x promývána v roztoku TBS-T po dobu 5 minut. Následně byla membrána inkubována na 1,5 hodiny za pomalého třepání v 10 ml roztoku sekundární protilátky (podle primární protilátky buď anti rabbit protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou, 1:5000 nebo anti mouse protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou, 1:5000), která byla naředěna v 1% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Po ukončení inkubace byla membrána 3x promývána v roztoku TBS-T po dobu 10 minut.

Vizualizace značených proteinů byla provedena pomocí komerčního substrátu Clarity Western ECL Substrate, ve kterém byla membrána inkubována po dobu 2 minuty. Následně byla membrána zdokumentována pomocí přístroje ChemiDoc MP Imaging System, kdy byl využit protokol Chemi. Zpracování získaného obrazového materiálu bylo dosaženo využitím Image Lab a pro finální verzi program Microsoft PowerPoint.

4.5.19 Povrchová sterilizace semen

Bylo pracováno ve flowboxu. Do 1ml mikrozkušavky byla přenesena semena Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Do mikrozkušavky byl přidán 1 ml 70% (v/v) ethanolu. Obsah byl míchán převrácením mikrozkušavky po dobu 5 minut. Po sedimentaci semen byl 70% (v/v) ethanol odebrán pomocí automatické pipety. Do mikrozkušavky s usazenými semeny byl přidán 1 ml 96% (v/v) ethanolu a obsah byl míchán po dobu 1 minuty. Po usazení semen byl 96% (v/v) ethanol odebrán pomocí automatické pipety. Následně byl k semenům přidán 1 ml sterilní deionizované vody. Mikrozkušavka byla párkrát převrácena, aby došlo k promytí semen, a poté byla deionizovaná voda odebrána. Sterilní deionizovaná voda byla přidána znovu a obsah byl opět promíchán. Nakonec byla semena přenesena pomocí automatické pipety na filtrační papír v Petriho misce a ponechána ve flowboxu k vyschnutí.

4.5.20 Výsev sterilních semen

Ve flowboxu byla suchá sterilizovaná semena pomocí párátko přenesena z filtračního papíru na připravené ½ MS médium v Petriho miskách. Semena byla pokládána na médium přibližně 2 cm od okraje Petriho misky a 1 cm od sebe. Petriho misky s nasazenými semeny na médiu byly uzavřeny parafilmem a přeneseny do temného prostředí o teplotě 4 °C za účelem sjednotit jejich klíčení (stratifikace). Následující den byly Petriho misky s nasazenými semeny uloženy ve vertikální poloze do kultivační místnosti. Kultivace probíhala při teplotě 22 °C, 70% vlhkosti, při střídání režimů (16 hodin světla a 8 hodin tmy,

kdy intenzita světla dosahovala hodnoty $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

4.5.21 Alelově specifická PCR

Alelově specifická PCR byla provedena s vzorky odebranými ze 14denních rostlin kultivovaných *in vitro*. Z rostlin pěstovaných v Petriho miskách byla pomocí sterilních nůžek ustřižena část listu (přibližně 2 mm^2) a pomocí sterilní pinzety přenesena do 1,5ml mikrozkušavky. Sterilizace nástrojů mezi odběry jednotlivých vzorků byla provedena opláchnutím v 96% etanolu a destilované vodě. Spolu s fragmenty listu bylo do mikrozkušavky přidáno 50 μl extrakčního pufru (Dilution Buffer; Phire Plant Direct PCR Kit), ve kterém byl fragment mechanicky rozmělněn prostřednictvím 10 μl špičky. Vzniklá směs v mikrozkušavce byla přemístěna do ledové tříště a následně inkubována přes noc při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Takto připravené vzorky DNA byly následně použity pro alelově specifickou PCR, jejíž reakční směs byla připravena podle Tabulky 9. Teplotní a časový program termocyklieru byl nastaven podle Tabulky 10. Využity byly primery (RP; LP; LB; viz Tabulka 11), které byly navrženy za pomoci programu T-DNA Primer Design Tool.

Tabulka 9: Reakční směs pro alelově specifickou PCR s použitím Phire Hot Start II DNA polymerázy

Komponent	Výsledná koncentrace	Objem pro 1 reakci [μl]
Phire Reaction Buffer, 5X	1X	4,00
Phire Hot Start II DNA polymeráza		0,50
dNTP mix, 10 mM	$0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,50
Primer, 10 μM	FW	$0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
	REV	$0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Deionizovaná voda		13,00
DNA templát		1,00
Celkový objem		20,00

Tabulka 10: Nastavení teplotního a časového programu pro alelově specifickou PCR

Krok cyklu	Teplota [$^\circ\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	5 s	
Annealing	61	5 s	32
Extenze	72	60 s	
Finální extenze	72	5 min	1

Tabulka 11: Sekvence použitých primerů při alelově specifické PCR (LB – Left T-DNA Border primer; LP – Left genomic Primer RP – Right genomic Primer)

Typ	Název	Sekvence (5'→3')
LB	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
RP	fsd2_RP	GAATGCAATGGAAAAGAAACG
LP	fsd2_LP	AACTTGCCACTATGACCATGG
RP	fsd3_RP	ATATACGGCTCCAAAGCATCC
LP	fsd3_LP	CACTCTCTTGGAAAAATGAGGG

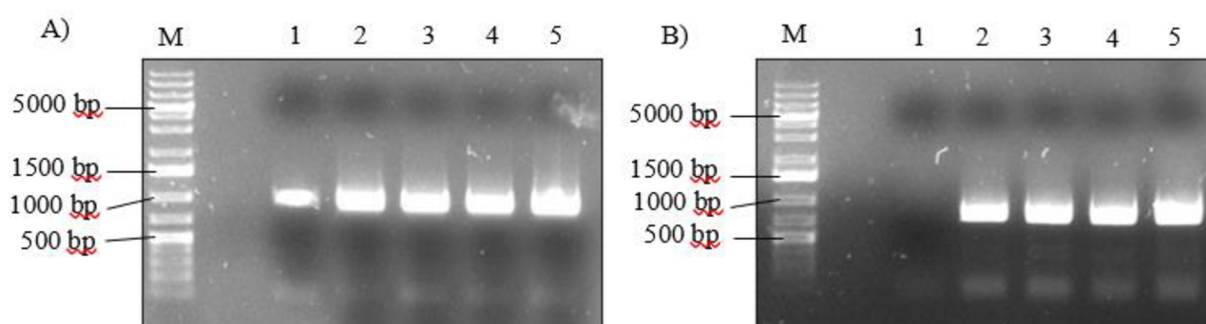
Po dokončení PCR reakce byly amplifikované fragmenty separovány pomocí horizontální elektroforetická separace v 1% (w/v) agarozovém gelu podle postupu v kapitole 4.3.2 s mírnými úpravami. Ke vzorkům byly před nanesením do gelu přidány 3 µl DNA Gel Loading Dye, 6X a do gelu byl vnesen celý objem (23 µl).

Po vizualizaci amplifikovaných fragmentů bylo možné odlišit jednotlivé genotypy, jelikož kombinace primerů LP a RP nasedá na alelu divokého typu a kombinace primerů LB a RP umožňuje detekci T-DNA inzertu v daném genu. Pro kombinaci primerů LP a RP (detekce alely divokého typu) byla předpokládána velikost fragmentů *FSD3* 1265 bp a u *FSD2* 1134 bp. Velikost fragmentů při použití primerů LB a RP (detekce T-DNA inzerce) byla předpokládána mezi 500–700 bp (rozmezí je uvedeno z důvodu nejednoznačné polohy inzerce).

5 Výsledky

5.1 PCR amplifikace *FSD2* a *FSD3* genů

Za účelem následné přípravy rekombinantních enzymů byla provedena PCR amplifikace příslušných genů *FSD2* a *FSD3*. Amplifikace probíhala s templátovou cDNA z rostliny *Arabidopsis thaliana* (poskytnuta vedoucím bakalářské práce) se specifickými primery pro žádané sekvence, které byly navrženy tak, aby výsledná sekvence disponovala restrikčními místy pro následné restrikční štěpení. Pro ověření úspěšnosti amplifikace a pro další postup práce byla provedena horizontální elektroforetická separace v 1% agarozovém gelu (Obrázek 6), kdy byla očekávaná velikost ampliconů *FSD2* genu 915 bp a *FSD3* genu 789 bp.



Obrázek 6: Detekce ampliconů *FSD2* a *FSD3* po elektroforetické separaci v 1% agarozovém gelu. A – Detekce ampliconů *FSD2* genu (očekávaná velikost produktu 915 bp); B – Detekce ampliconů *FSD3* genu (očekávaná velikost produktu 789 bp); M – Marker relativní molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–5 – analyzované amplicony

Na základě získaných elektroforetogramů (Obrázek 6) jsme vyhodnotili produkty PCR amplifikace, kdy většina výsledků odpovídala předpokládaným velikostem. Amplicony *FSD2* genu odpovídaly velikosti 915 bp a amplicony *FSD3* genu odpovídaly velikosti 789 bp. Na elektroforetogramu na Obrázku 6B jsme pozorovali absenci produktu u prvního z analyzovaných ampliconů. To mohlo být způsobeno chybným vnesením cDNA do reakční směsi, ale jelikož ostatní analyzované amplicony *FSD3* genu vyšly podle předpokladů, byly naše výsledky vhodné pro další práci.

Vizualizované produkty byly z gelu vyřezány a byla provedena izolace a purifikace podle výše popsaného postupu. Z gelu obsahujícího produkty *FSD2* amplifikace bylo vyřezáno 1,0291 g a z gelu obsahujícího produkty *FSD3* amplifikace 0,8836 g, čemuž byl uzpůsoben objem NTI pufru ze zmíněného postupu. Po dokončení izolace a purifikace jsme změřili koncentraci dsDNA, která dosahovala hodnot 52,9 ng·μl⁻¹ pro *FSD2* a 66,4 ng·μl⁻¹ pro

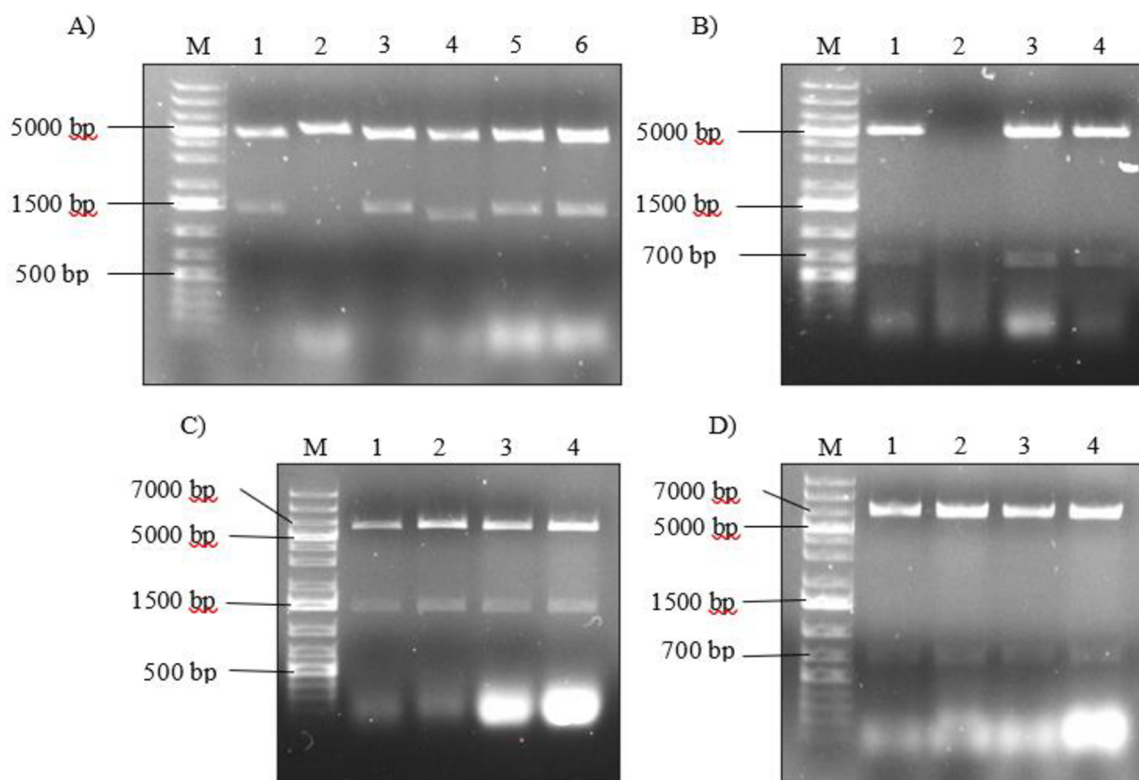
FSD3. Obě koncentrace byly dostačující pro následující práci.

5.2 Příprava konstruktů amplifikované DNA s vektory pGEX6P-1 a pMAL-c2X

Přečištěné PCR produkty byly následně enzymaticky štěpeny pomocí dvojice restričních enzymů (*EcoRI* a *SalI*). Objem přidáný do reakce byl odvozen z výsledné koncentrace amplifikované DNA po purifikaci (viz metoda 4.5.3 Izolace a purifikace amplifikované DNA/ 4.5.4 Enzymatické štěpení vektorů a produktů). Pomocí stejné dvojice enzymů byly štěpeny i prázdné vektory *pGEX-6P-1* a *pMAL-c2X*. Vektory a fragmenty DNA, které díky enzymatickému štěpení obsahovaly komplementární lepivé konce, byly následně vhodně ligovány pomocí T4 DNA ligázy.

Po dokončení ligace, tedy po potencionální přípravě konstruktů *pGEX6P-1::FSD2*; *pGEX6P-1::FSD3*; *pMAL-c2X::FSD2* a *pMAL-c2X::FSD3*, byla provedena transformace a kultivace bakterií na pevném LB médiu obsahující selekční antibiotikum. Narostlé kolonie byly z pevného média přesunuty do tekutého média, ze kterého byla po kultivaci izolovaná plasmidová DNA jednotlivých kolonií. Byla změřena koncentrace izolované plasmidové DNA jednotlivých kolonií (Příloha 1).

Za účelem identifikace pozitivních kolonií bylo provedeno restriční štěpení s vybranými endonukleázami. Pro konstrukt *pGEX6P-1::FSD2* bylo nasazeno a přezkoumáváno 6 kolonií. Pro ostatní konstrukty *pGEX6P-1::FSD3*; *pMAL-c2X::FSD2* a *pMAL-c2X::FSD3* byly nasazeny a přezkoumávány 4 kolonie každého konstruktu. Produkty štěpení byly rozděleny elektroforetickou separací (Obrázek 7). Očekávané velikosti fragmentů s použitím specifických enzymů byly pro *pGEX6P-1::FSD2* (*PstI*: 4516; 1382 bp), *pGEX6P-1::FSD3* (*XhoI*: 5093; 679 bp), *pMAL-c2X::FSD2* (*NdeI*: 6174; 1377 bp) a pro *pMAL-c2X::FSD3* (*HindIII*: 6758; 667 bp). Předpokládané velikosti fragmentů byly získány *in silico* štěpením.



Obrázek 7: Restriční analýza izolované plasmidové DNA z kolonií potencionálně nesoucí *pGEX6P-1::FSD2*; *pGEX6P-1::FSD3*; *pMAL-c2X::FSD2* a *pMAL-c2X::FSD3* s následnou elektroforetickou separací. A – Detekce štěpů *FSD2* genu a pGEX-6P-1 vektoru (*Pst*I; předpokládaná velikost štěpů 4516 bp a 1382 bp); B – Detekce štěpů *FSD3* genu a pGEX-6P-1 vektoru (*Xho*I; předpokládaná velikost štěpů 5093 bp a 679 bp); C – Detekce štěpů *FSD2* genu a pMAL-c2X vektoru (*Nde*I; předpokládaná velikost štěpů 6174 bp a 1377 bp); D – Detekce štěpů *FSD3* genu a pMAL-c2X vektoru (*Hind*III; předpokládaná velikost štěpů 6758 bp a 667 bp); M – Marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–6 – analyzované plasmidové DNA jednotlivých kolonií

Podle detekovaných fragmentů (Obrázek 7) byly identifikovány klony nesoucí vložené inzerty pomocí srovnání s předpokládanými velikostmi fragmentů. Na základě odpovídajících velikostí fragmentů byly určeny 4 kolonie pozitivní pro konstrukt *pGEX6P-1::FSD2* (Obrázek 7A; dráha 1; 3; 5 a 6) a 2 negativní (Obrázek 7A; dráha 2; 4). V dráze 2 byl detekován pouze fragment vektoru pGEX6P-1, takže tento plazmid nenesl inzert a nebyl využit pro další pracovní postup. Současně byly u klonu v dráze 4, který nebyl brán jako pozitivní, detekovány fragmenty s mírně odlišnými velikostmi. Pro konstrukt *pGEX6P-1::FSD3* byly detekovány 3 pozitivní kolonie (Obrázek 7B; dráha 1; 3 a 4) a 1 negativní (Obrázek 7B; dráha 2). Bylo předpokládáno, že došlo k chybě v přípravě reakční směsi. Všechny fragmenty konstrukt *pMAL-c2X::FSD2* (Obrázek 7C) odpovídaly předpokládaným velikostem, a proto byly všechny 4 kolonie považovány za pozitivní. Stejným způsobem byly určeny všechny 4 analyzované kolonie potencionálně nesoucí

konstrukt *pMAL-c2X::FSD3* (Obrázek 7D) jako pozitivní.

Plasmidová DNA pozitivních klonů byla purifikována podle postupu uvedeného výše. Správnost připravených konstruktů byla ověřena metodou Sangerova sekvencování skrze sekvencování získané plasmidové DNA o dané koncentraci a čistotě (Tabulka 12). Výsledkem sekvenování bylo potvrzení vložení inzertu u všech odeslaných vzorků.

Tabulka 12: Koncentrace a čistota plasmidových DNA zaslaných k sekvenování

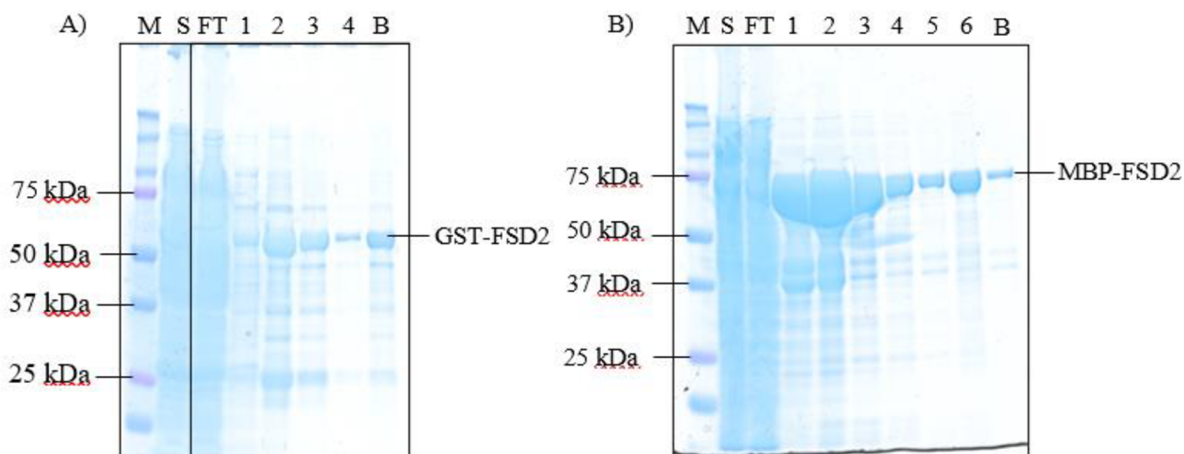
Vzorek	Číslo kolonie	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]	Čistota (260/280)
<i>pGEX6P-1::FSD2</i>	1	90,50	1,92
<i>pGEX6P-1::FSD3</i>	1	55,00	1,96
<i>pMAL-c2X::FSD2</i>	1	57,00	1,92
<i>pMAL-c2X::FSD3</i>	1	80,80	1,96

5.3 Afinitní purifikace připravených rekombinantních enzymů FSD

Po ověření úspěšnosti klonování byly bakterie *Escherichia coli*, BL21 Star (DE3) transformovány pozitivními plazmidy. Zmíněné bakterie byly nejprve kultivovány na pevném médiu a následně přesazeny do tekutého média, kdy byla při optimální optické hustotě indukována exprese rekombinantních enzymů. Po dokončení kultivace s indukcí, byly bakteriální buňky sesbírány pomocí centrifugace a homogenizovány. Získaný supernatant byl podroben afinitní purifikaci dle výše uvedeného postupu.

Afinitní purifikací byly pomocí specifických matic zachyceny připravené rekombinantní enzymy FSD2 a FSD3. Inzerty ligovány s *pGEX6P-1* plazmidem, byly bakterií expresovány jako proteiny fúzovány s GST. Ty byly purifikovány pomocí matrice, která vážala GST-tag proteinu (Glutathione Sepharose 4B GST-tagged protein purification resin). Inzerty ligovány s *pMAL-c2X* plazmidem, byly expresovány jako proteiny fúzovány s MBP. Ty byly purifikovány pomocí matrice specifické pro MBP-tag proteinu (Amylose resin).

Jednotlivé frakce, získané během procesu afinitní purifikace, byly přezkoumány pomocí SDS-PAGE s následným barvením proteinů pomocí CBB G-250 (Obrázek 8 a 9). Očekávaná velikost fúzních proteinů byla 58,6 kDa pro GST-FSD2; 54 kDa pro GST-FSD3; 76,6 kDa pro MBP-FSD2 a 72 kDa pro MBP-FSD3 (velikosti odvozeny ze známých velikostí jednotlivých enzymů a tagů (GST: 24 kDa; MBP: 42 kDa; FSD2: 34,6 kDa; FSD3: 30 kDa).

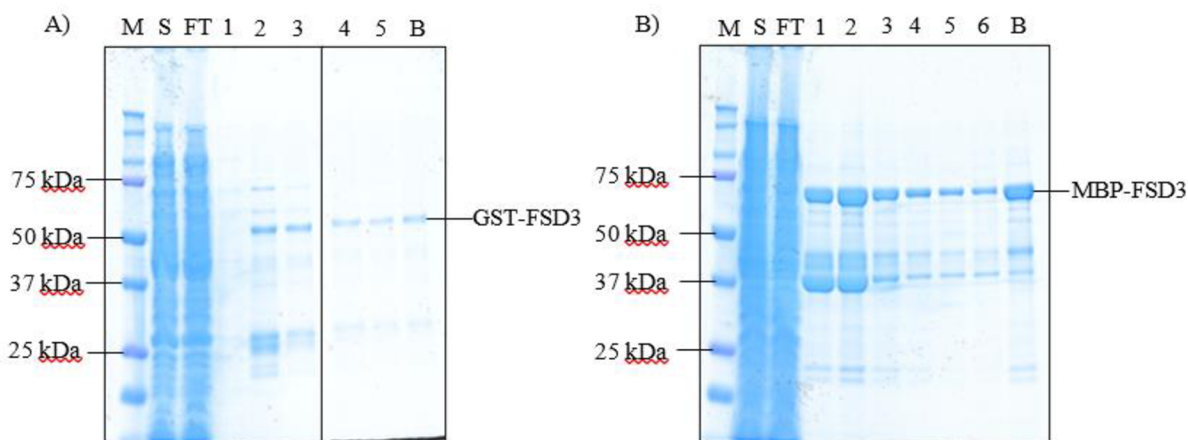


Obrázek 8: Analýza jednotlivých frakcí fúzních FSD2 enzymů získaných pomocí afinitní purifikace, SDS-PAGE a následného CBB G-250 barvení. A – Detekce GST-FSD2 rekombinantního enzymu (očekávaná hmotnost proteinu 58,8 kDa); B – Detekce MBP-FSD2 rekombinantního enzymu (očekávaná hmotnost proteinu 76,6 kDa); M – Marker relativní molekulové hmotnosti proteinů Precision Plus Protein Dual Color Standards; S – supernatant; FT – flow through; 1–6 – odebrané frakce při eluci; B – frakce obsahující beads (část matrice)

Na základě této detekce byla potvrzena úspěšnost purifikace připravených enzymů porovnáním s předpokládanými velikostmi. Největší množství čistého proteinu GST-FSD2 (Obrázek 8A) bylo detekováno ve frakci 2, která na druhou stranu obsahovala větší množství proteinů neodpovídajících předpokládané velikosti. Naopak nejčistější byla frakce 4, ve které ale byla zaznamenána nejmenší koncentrace proteinu. Ve většině frakcí byla detekována větší koncentrace produktů o velikosti přibližně 25 kDa. Usuzujeme, že se jednalo o samotný GST tag, jelikož velikost produktů odpovídala předpokládané velikosti tagu 24 kDa.

Největší koncentraci proteinu MBP-FSD2 (Obrázek 8B) měla frakce 2, která ale obsahovala značné množství nespecifických proteinů. Největší čistotu, ale menší koncentraci proteinu zájmu měla frakce 5. Stejně jako v předchozím případě byla ve většině frakcí detekována větší koncentrace produktů odpovídajících velikosti tagu. V tomto případě velikosti MBP tagu 42 kDa. Při porovnání afinitní purifikace rekombinantní FSD2 byla zaznamenána efektivnější afinitní purifikace při využití MBP tagu a k němu příslušné matrice (Obrázek 8B). Koncentrace enzymu nesoucí MBP-tag značně předčila množství purifikovaných enzymů s GST tagem. Nicméně velká koncentrace enzymů způsobila odchýlení od očekávaných hodnot (nejvýrazněji u MBP-FSD2; Obrázek 8B). Pro přesnější výsledky by bylo potřeba metodu provést znova s menšími objemy frakcí. Pro naši další práci bylo toto odchýlení opomenutelné, proto byly výsledky dostačující. U obou výsledků byly detekovány enzymy zájmu ve frakci beads, což naznačuje, že část připravených rekombinantních enzymů nebyla eluovaná z matrice. Taktéž jsme u obou výsledků porovnáním frakce obsahující supernatant (S) s frakcí flow through (FT) detekovali, že velká

část nespecifických proteinů produkovaných expresním bakteriálním systémem byla z matrice vyloučena před samotným odebráním frakcí.



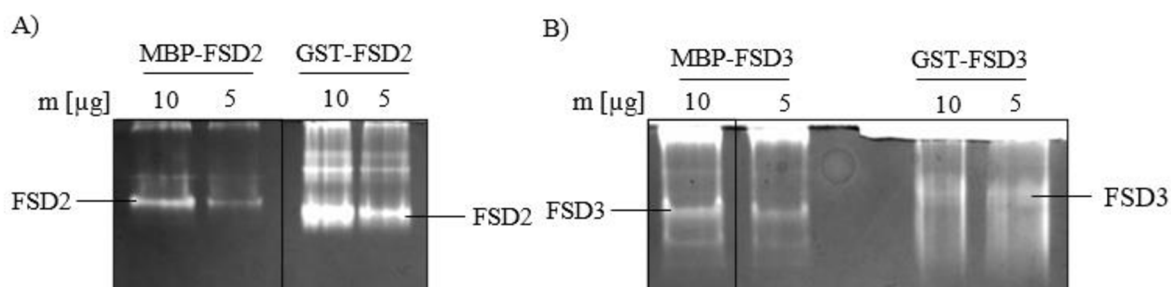
Obrázek 9: Analýza jednotlivých frakcí fúzních FSD3 enzymů získaných pomocí afinitní purifikace, SDS-PAGE a následného CBB G-250 barvení. A – Detekce GST-FSD3 rekombinantního enzymu (očekávaná hmotnost proteinu 54 kDa); B – Detekce MBP-FSD3 rekombinantního proteinu (očekávaná hmotnost proteinu 72 kDa); M – Marker relativní molekulové hmotnosti proteinů Precision Plus Protein Dual Color Standards; S – supernatant; FT – flow through; 1–6 – odebrané frakce při eluci; B – frakce obsahující beads (část matrice)

U rekombinantního enzymu GST-FSD3 (Obrázek 9A) bylo zaznamenáno, že koncentrace purifikovaných proteinů v jednotlivých frakcích je menší než koncentrace, které bylo dosaženo při ostatních provedených purifikacích. Nicméně největší množství proteinu zájmu obsahovala frakce 2. Naopak nejmenší množství obsahovala frakce 5. Za nejčistější byla považována frakce 4 a 5. Nejvíce proteinu MBP-FSD3 (Obrázek 9B) obsahovala frakce 2 a za nejčistější byla považovaná frakce 6. Frakce 6 zároveň obsahovala nejnižší množství proteinu zájmu. V případě purifikace rekombinantní FSD3 platí stejné předpoklady o přítomnosti samostatných tagů, nekompletní eluci a vyloučení nespecifických proteinů, které byly zmíněny výše.

5.4 Biochemická analýza rekombinantních enzymů FSD

První krok biochemické analýzy bylo ověření, zda purifikované FSD2 a FSD3 vykazují enzymatickou SOD aktivitu pomocí metody Nativní PAGE s následným barvením SOD aktivity. Enzymatická aktivita byla potvrzena u všech připravených rekombinantních enzymů (Obrázek 10). Jelikož byly MBP a GST tagy připojeny na N-terminální doménu enzymu, byly purifikovány také nekompletní rekombinantní enzymy, které vykazovali taktéž SOD aktivitu, nicméně v mnohem menší míře. V každém případě byl pozorován jeden hlavní pás, který vykazoval nejvyšší SOD aktivitu (Obrázek 10A, B). Nejvyšší aktivita byla pozorována pro GST-FSD2 (Obrázek 10A), zatímco nejnižší aktivita byla pozorována pro

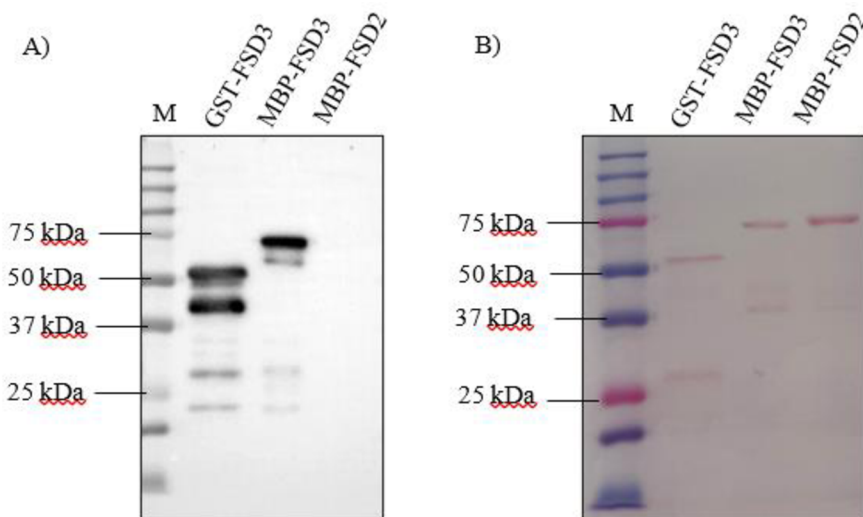
rekombinantní enzym GST-FSD3 (Obrázek 10B), který taktéž vykazoval nejnižší míru exprese v bakteriálním systému (Obrázek 9A).



Obrázek 10: Vizualizace enzymatické SOD aktivity rekombinantních enzymů po Nativní PAGE. Bylo nanášeno vždy 10 µg a 5 µg rekombinantního proteinu (objem zjištěný Bradfordovou metodou). A – Vizualizace enzymatické aktivity FSD2; B – Vizualizace enzymatické aktivity FSD3

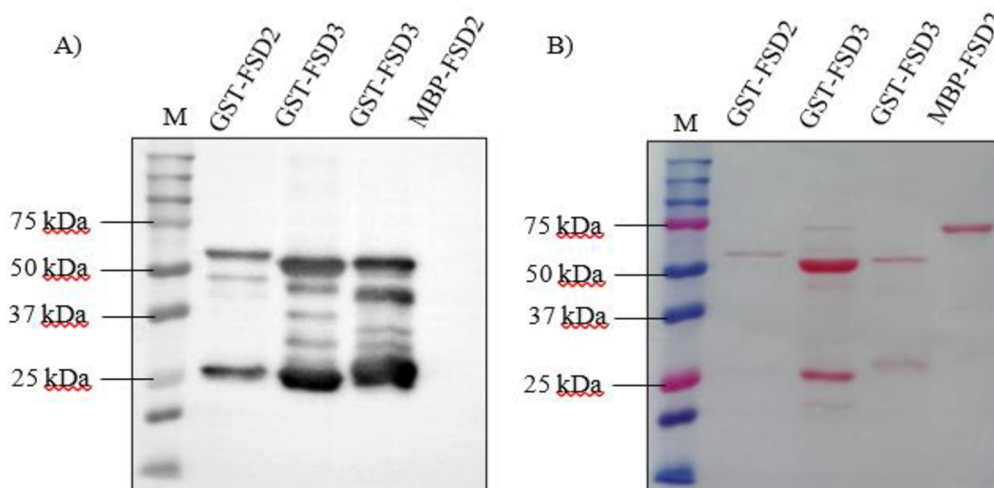
Dále byla ověřena specifická přítomnost jednotlivých připravených proteinů metodou imunoblotování se specifickými primárními protilátkami anti-GST; anti-MBP a anti-FSD3. Detekce FSD2 byla pouze přes anti-GST a anti-MBP protilátku, jelikož není k dispozici specifická primární anti-FSD2 protilátka. K metodě byly využity zástupní eluční frakce z afinitní purifikace, které obsahovaly přijatelnou koncentraci proteinů. Využity byly následující frakce: 5. frakce (pro MBP-FSD2 a MBP-FSD3); 4. frakce (pro GST-FSD2) a 3. frakce (pro GST-FSD3). Stejně jako u afinitní purifikace byl očekáván o velikosti pásů 58,6 kDa pro GST-FSD2; 54 kDa pro GST-FSD3; 76,6 kDa pro MBP-FSD2 a 72 kDa pro MBP-FSD3.

U analyzovaných vzorků při použití anti-FSD3 protilátky (Obrázek 11) byly detekovány rekombinantní FSD3 enzymy o předpokládaných velikostech, což potvrzuje fúzi s GST a MBP. Potvrzení specifity protilátky bylo uskutečněno pomocí negativní kontroly ve formě rekombinantního MBP-FSD2 enzymu, která vyšla podle předpokladu negativně. U obou vzorků byly detekovány i pásy s nižší molekulovou hmotností, které reprezentují dílčí proteiny, u kterých nebyla dokončena translace nebo mohli být štěpeny bakteriálními proteázami, což považujeme za méně pravděpodobné.



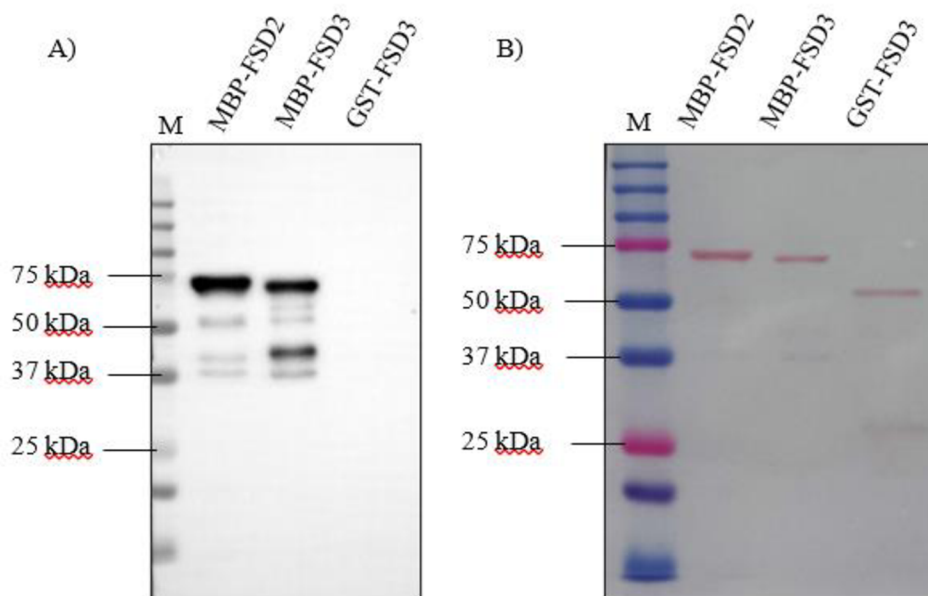
Obrázek 11: Detekce přítomnosti rekombinantního FSD3 proteinů pomocí imunoblotování se specifickou anti-FSD3 protilátkou. A – Vizualizace rekombinantního FSD3 (předpokládaná velikost produktu 54 kDa pro GST-FSD3 a 72 kDa pro MBP-FSD3); B – Kontrola proteinové nanášky rekombinantních enzymů na membránu pomocí nabarvení membrány barvivem Ponceau S; M – Marker molekulové hmotnosti proteinů Precision Plus Protein Dual Color Standards

Při provedení reakce s anti-GST protilátkou (Obrázek 12) byla potvrzena přítomnost enzymů nesoucí GST tag pro proteiny GST-FSD2 a GST-FSD3. Také byla detekována přítomnost dílčích enzymů, což lze vysvětlit stejným způsobem jak v případě popsaném výše. Tato skutečnost byla potvrzena faktem, že maximální velikost odpovídala velikosti kompletního produktu a nebyl detekován produkt větší, než by odpovídalo předpokládané velikosti. Ověření reakce bylo provedeno negativní kontrolou pomocí MBP-FSD2, kde nebyl podle předpokladu zaznamenán produkt reakce (Obrázek 12).



Obrázek 12: Detekce přítomnosti rekombinantních enzymů pomocí imunoblotování se specifickou anti-GST protilátkou. A – Vizualizace rekombinantních enzymů nesoucích GST tag (předpokládaná velikost produktu 58,6 kDa pro GST-FSD2 a 54 kDa pro GST-FSD3); B – Kontrola proteinové nanášky rekombinantních enzymů na membránu pomocí nabarvení membrány barvivem Ponceau S; M – Marker molekulové hmotnosti proteinů Precision Plus Protein Dual Color Standards

Při použití anti-MBP protilátky (Obrázek 13) byly detekovány produkty předpokládaných velikostí, a tím byla potvrzena přítomnost FSD2 a FSD3 vázaných na MBP. Opět byly detekovány dílčí enzymy. U negativní kontroly v podobě GST-FSD3 nebyla pozorována přítomnost žádného pásu, což potvrzuje specifitu protilátky.



Obrázek 13: Detekce přítomnosti rekombinantních enzymů pomocí imunoblotování se specifickou anti-MBP protilátkou. A – Vizualizace rekombinantních enzymů nesoucích MBP tag (předpokládaná velikost produktu 76,6 kDa pro MBP-FSD2 a 72 kDa pro MBP-FSD3); B – Kontrola proteinové nanášky rekombinantních enzymů na membránu pomocí nabarvení membrány barvivem Ponceau S; M – Marker molekulové hmotnosti proteinů Precision Plus Protein Dual Color Standards

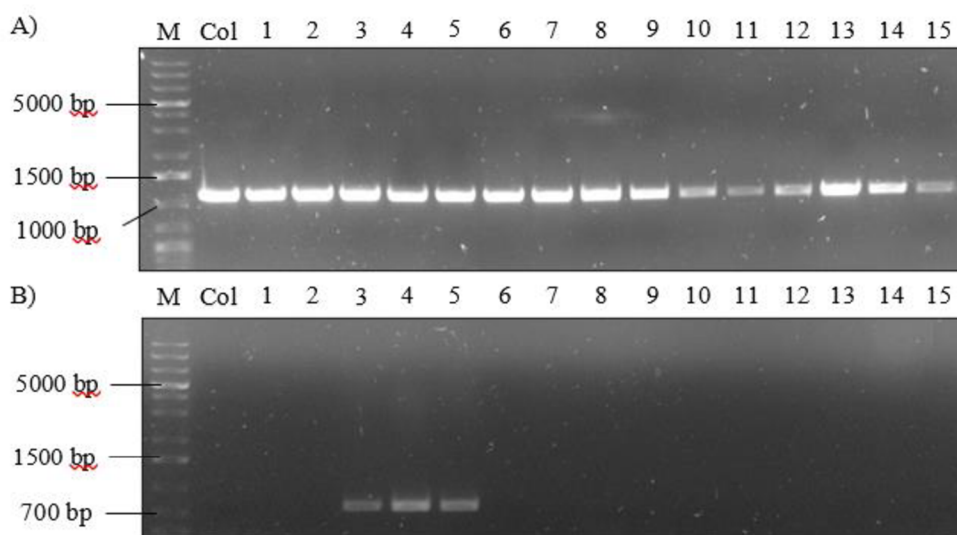
Závěrem lze konstatovat, že biochemické analýzy v podobě vizualizace SOD aktivity jednotlivých fúzních proteinů a imunoblot se specifickými primárními protilátkami potvrdily přítomnost a funkčnost rekombinantních proteinů, které budou následně využity pro funkční studie FSD2 a FSD3 u *Arabidopsis*.

5.5 Alelově specifická PCR

Za účelem vyselektovat a charakterizovat mutantní *fsd2* a *fsd3* linie, byly objednány z databáze semen T-DNA inzerčních linií pro *Arabidopsis* tyto varianty: SALK_080457 (*fsd2* mutant) a SALK_103228 (*fsd3* mutant).

Z každé z mutantních linií bylo vyseto 15 semen, ze kterých byla po 14 dnech extrahovaná DNA. Ta byly podrobena alelově specifické PCR. Jako první byla přezkoumána DNA izolována pro potencionální *fsd3* T-DNA inzerční linie, kdy se podařilo vyselektovat 3 heterozygotní rostliny (Obrázek 14: dráha 3, 4 a 5), což bylo 20 % z celkového počtu vysetých rostlin. Identifikace heterozygotů byla uskutečněna pomocí detekce PCR produktů

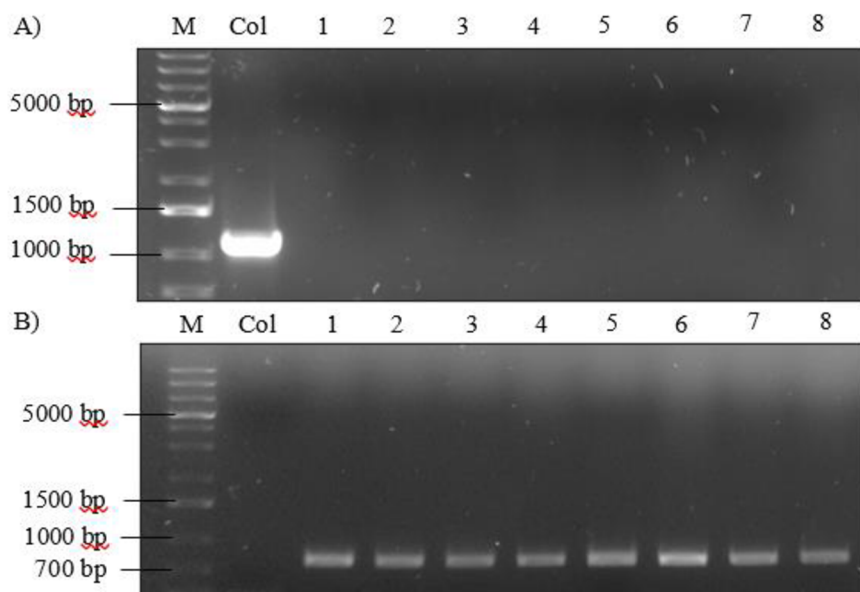
s využitím 2 párů primerů. Kombinace primerů LP a RP poskytovala PCR produkt, pokud rostlina disponovala alelou divokého typu (Obrázek 14A). Na druhou stranu při kombinaci primerů RP a LB vznikl produkt, pokud rostlina nesla T-DNA inzerci (Obrázek 14B). Při identifikaci heterozygotů byly detekovány produkty PCR při použití obou párů primerů. Ostatních 12 rostlin (80 % z celkového počtu vyšetých rostlin) bylo identifikováno jako rostliny nesoucí alelu divokého typu genu *FSD3*, kdy byla zaznamenána absence PCR produktu při využití RP a LB primerů. Současně byla správnost výsledku potvrzena využitím kontrolního vzorku ve formě vyextrahované DNA z rostliny divokého typu (Col-0) a kontrolou předpokládaných velikostí jednotlivých produktů. Všechny PCR produkty odpovídaly předpokládaným velikostem.



Obrázek 14: Selektce *FSD3* heterozygotů pomocí alelově specifické PCR a následné elektroforetické separace na 1% agarozovém gelu. A – Detekce alely divokého typu (očekávaná velikost produktu 1265 bp); B – Detekce T-DNA inzerci (očekávaná velikost produktu 500–700 bp); M – Marker relativní molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – vyextrahovaná DNA z rostliny divokého typu (Col-0), která byla použita jako pozitivní kontrola; 1–15 – analyzovaná DNA extrahovaná z jednotlivých rostlin

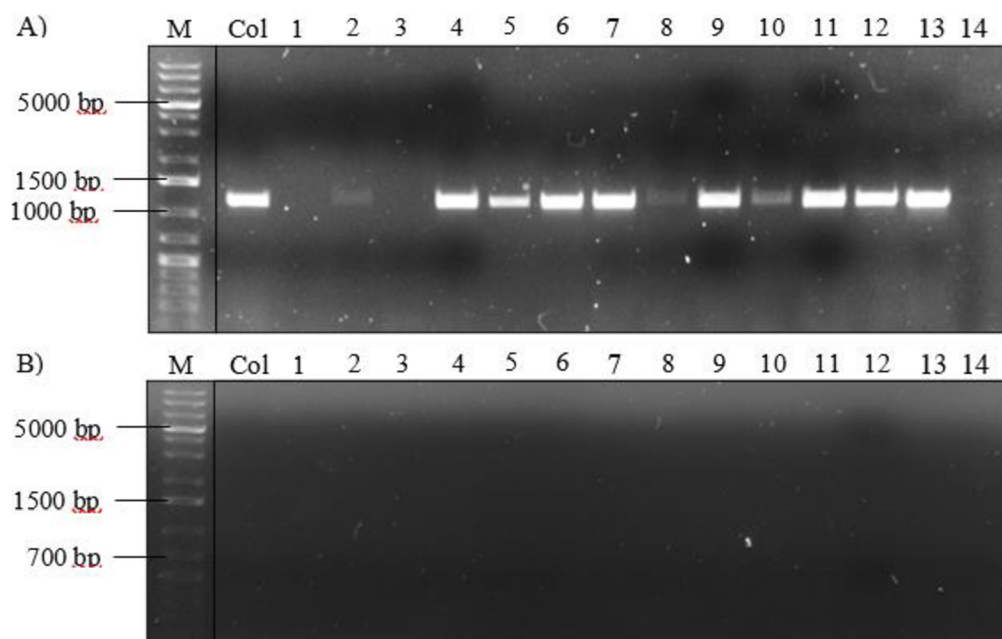
Pro získání homozygotních *fsd3* mutantních rostlin byly identifikované heterozygotní rostliny nasazeny propagovány do další generace. Následně bylo vyseto 60 semen dle dříve popsaného postupu na $\frac{1}{2}$ MS média. Po dokončení kultivace byla extrahovaná DNA z rostlin, kterých fenotyp odpovídal předpokládanému pro danou mutaci (viz níže).

Stejným způsobem identifikace bylo vyselektováno 8 mutantních rostlin (13,33 % z celkového počtu vyšetých rostlin) nesoucí T-DNA inzert linie *fsd3* (Obrázek 15: dráha 1–8). Správnost výsledku byla potvrzena kontrolním vzorkem DNA z rostliny divokého typu (Col-0), kdy byl očekáván produkt pouze pro alelu divokého typu genu *FSD3* (Obrázek 15A), a zároveň porovnáním velikostí produktů s předpokládanými. Splněním obou podmínek byla potvrzena správnost výsledku.



Obrázek 15: Selektce mutantů *fsd3* pomocí alelově specifické PCR a následné elektroforetické separace na 1% agarozovém gelu. A – Detekce alely divokého typu (očekávaná velikost produktu 1265 bp); B – Detekce T-DNA inzerce (očekávaná velikost produktu 500–700 bp); M – Marker relativní molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – vyextrahovaná DNA z rostliny divokého typu (Col-0), která byla použita jako pozitivní kontrola; 1–8 – analyzovaná DNA izolovaná z jednotlivých rostlin

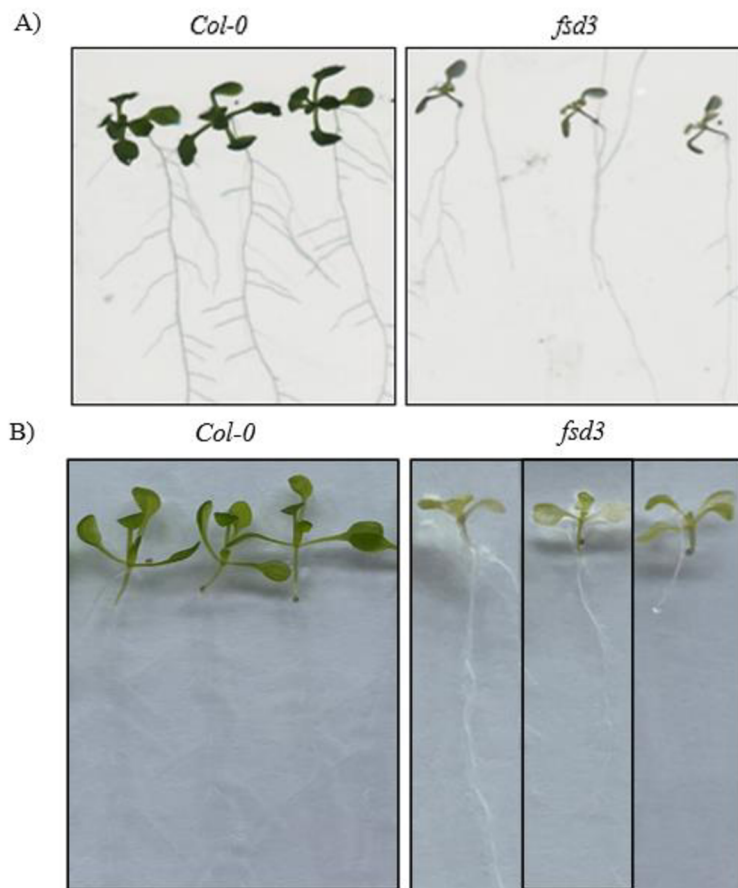
Při selekci *fsd2* mutantů bylo podrobena alelově specifické PCR přibližně 40 vzorků DNA extrahovaných z nasazených rostlin. Na žádném z výsledků nebyl detekován produkt při použití kombinace primerů RP a LB, tedy žádná z analyzovaných rostlin nenesla T-DNA inzerce (Obrázek 16). Pro selekci by bylo potřeba zanalyzovat větší množství vzorků, což nebylo z časových důvodů uskutečněno. U některých vzorků nedošlo k amplifikaci produktu pro alelu divokého typu (Obrázek 16A) a to konkrétně pro vzorek 1, 3 a 14. To bylo pravděpodobně zapříčiněno přidáním nízkého množství DNA nebo jinou chybou při pipetování, jelikož kontrolní vzorek DNA z divokého typu produkt poskytl.



Obrázek 16: Selektce *fsd2* mutantů pomocí alelově specifické PCR a následné elektroforetické separace na 1% agarozovém gelu. A – Detekce alely divokého typu (očekávaná velikost produktu 1134 bp); B – Detekce T-DNA inzerce (očekávaná velikost produktu 500–700 bp); M – Marker relativní molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – vyextrahovaná DNA z rostliny divokého typu (Col-0), která byla použita jako pozitivní kontrola; 1–14 – analyzovaná DNA izolovaná z jednotlivých rostlin

5.6 Fenotypová analýza mutantních rostlin

Získaná a validovaná homozygotní linie byla podrobena fenotypové analýze, kdy byl sledován vliv T-DNA inzertu na jednotlivé části rostliny v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0). Byl sledován vliv na raný vývoj rostlin na $\frac{1}{2}$ MS médiu po 14 dnech kultivace, kdy byly u *fsd3* pozorovány již dříve publikované fenotypové projevy (Obrázek 17). Na základě vizuálního hodnocení byly kořeny mutantních rostlin kratší a méně rozvětvené oproti kořenům rostliny divokého typu. Také bylo zaznamenáno klasické bledé zbarvení rostliny, které souvisí s abnormálním vývojem chloroplastů rostlin nesoucí příslušnou mutaci, a zakrslý růst. Z důvodu zkreslené barvy záznamu *fsd3* mutantů při použití obrazového skeneru Image Scanner III (Obrázek 17A) je přiložen i záznam pořízený mobilním fotoaparátem (Obrázek 17B), který lépe zobrazuje bledý fenotyp mutantů. Všechny tyto zjištěné fenotypové projevy budou v následné diplomové práci kvantitativně charakterizovány, jelikož z časových důvodů nemohly být tyto experimenty provedeny.



Obrázek 17: Fenotypová analýza divokého typu a *fsd3* mutantů *Arabidopsis thaliana* 14. den po kultivaci na 1/2 MS médiu v kultivační místnosti. A – záznam pořízený pomocí obrazového skeneru Image Scanner III; B – záznam pořízený pomocí mobilního fotoaparátu

Jelikož nebyly vyselektovány rostliny nesoucí mutaci *FSD2* genu, nebyla fenotypová analýza provedena. Pokud by došlo k selekci takových rostlin, byl by očekáván podobný fenotyp jako u *fsd3* mutantní rostliny. Selektce *fsd2* mutantů bude provedena v navazující práci.

6 Diskuse

V současné době je již dobře známo, že SOD patří mezi nejdůležitější složky antioxidační obrany rostlin. Tím, že katalyzují dismutaci $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 , zodpovídají za obranu proti oxidativnímu nebezpečí toxickejších forem ROS a zároveň přispívají k signální funkci H_2O_2 (Fridovich, 1997; Wang *et al.*, 2018). Kromě CSD2 a FSD1 byly v chloroplastu *Arabidopsis thaliana* objeveny dvě esenciální FSD izoformy, FSD2 a FSD3 (Kliebenstein *et al.*, 1998). Ty v chloroplastu formují heterodimer se silnou afinitou k ROS a přispívají k fungování exprese plastidových genů. Na základě jejich funkce v chloroplastu byla potvrzena jejich zásadní role v raném vývoji rostlin (Myouga *et al.*, 2008). V současné době není zcela jasné, zdali FSD2 a FSD3 jsou zcela nezbytné kvůli své SOD aktivitě anebo kvůli své funkci v PEP komplexu, kde ovlivňují expresi chloroplastových genů. Z tohoto důvodu byla předložená práce zaměřena na přípravu funkčních rekombinantních FSD2 a FSD3, které poslouží v budoucí práci pro studium jejich úloh v obraně a vývoji chloroplastů u *Arabidopsis thaliana*.

V rámci přípravy rekombinantní FSD2 a FSD3 se nám úspěšně podařilo amplifikovat *FSD2* a *FSD3* geny z cDNA rostliny *Arabidopsis thaliana*. Amplifikované produkty byly ligovány do expresních vektorů pGEX-6P-1 a pMAL-c2X. Připravené konstrukty *pGEX6P-1::FSD2*; *pGEX6P-1::FSD3*; *pMAL-c2X::FSD2* a *pMAL-c2X::FSD3* byly transformovány do bakteriálního expresního systému, prostřednictvím kterého byly exprimovány rekombinantní proteiny. Připravené rekombinantní proteiny byly podrobeny afinitní purifikaci. U afinitní purifikace jsme zaznamenali zisk vyšší koncentrace proteinů zájmu s použitím MBP tagu. V předchozí studii naznačili, že MBP tag je vhodný k použití pro purifikaci z důvodu, že zvyšuje rozpustnost proteinů narozdíl od GST tagu (Morales *et al.*, 2018). Můžeme spekulovat, zda naše výsledky byly ovlivněny interakcí GST tagu s proteiny zájmu a důsledným snížením jejich rozpustnosti nebo výběrem matrice a provedeným postupem purifikace.

Biochemická analýza nám potvrdila enzymatickou SOD aktivitu pro každý z připravených rekombinantních proteinů. V provedené studii detekovali až 10x vyšší SOD aktivitu pro rekombinantní FSD3 než pro rekombinantní FSD2 (Myouga *et al.*, 2008). V tomto případě jsou naše výsledky nesouhlasné. To může být zapříčiněno buďto přítomností rozdílných tagů (v předchozí práci použity polyHis tagy) anebo nevhodné prostředí pufru (pH, soli, atd.). I v našem případě dávalo použití dvou rozdílných tagů různé výsledky na úrovni aktivity stejného proteinu. Pro bližší porovnání těchto výsledků bychom museli provést

optimalizaci podmínek aktivity těchto proteinů a měřit kinetické parametry. V oblasti SOD aktivity doposud nebylo zjištěno, jestli formace heterokomplexu *in vivo* způsobuje zvýšení enzymatické aktivity. Dosavadní výzkumy prokazují, že *in vitro* heterokomplex vykazuje SOD aktivitu úměrnou kombinaci SOD aktivitě jednotlivých enzymů FSD2 a FSD3 (Myouga *et al.*, 2008).

V práci jsme také věnovali vlivu T-DNA inserce ve *FSD3* genu na fenotyp *Arabidopsis thaliana*. V souladu s předchozími provedenými studiemi jsme pozorovali bledé zbarvení a zakrslý vzrůst vyselektovaných validovaných *fsd3* mutantů (Myouga *et al.*, 2008; Gallie *et Chen*, 2019). Toto pozorování by mohlo být podmíněno tím, že FSD3 je nedílnou součástí PEP komplexu. Tento komplex zodpovídá za transkripci genů kódovaných v plastidovém nukleoidu, které jsou nekompromisní součástí procesu fotosyntézy u rostlin. To dává PEP komplexu jasnou spojitost s vývojem chloroplastů. Bělavý fenotyp je důsledkem právě nedostatečné funkce zmíněného komplexu, a tím způsobeným úpadkem fotosyntetické aktivity rostlin. Je naznačováno, že hlavní úlohou FSD3 je ochrana komplexu, popřípadě mRNA transkriptů, před fotooxidativním stresem (Myouga *et al.*, 2008; Pfannschmidt *et al.*, 2015). Omezení vlivu T-DNA inserční *FSD3* mutace je možné dosáhnout kultivací rostlin v podmínkách s nižším osvětlením (Myouga *et al.*, 2008), čehož jsme využili pro propagaci *fsd3* mutantů.

Jelikož FSD2 hraje v PEP komplexu podobnou úlohu, očekávali jsme, že fenotyp vyselektovaných *fsd2* mutantů bude blízký pozorovanému fenotypu *fsd3* mutantů. Bohužel se z časových důvodů nepovedlo vyselektovat *fsd2* mutanty, tudíž nebyla provedena základní fenotypová analýza. Pokud by k takové selekci došlo, dalo by se posoudit tvrzení, že mutace *FSD2* má méně výrazný efekt na fenotyp rostliny než mutace *FSD3*, což by naznačovalo funkční odlišnost jednotlivých enzymů. Bělavé zbarvení *fsd2* mutantů má být méně patrné než *fsd3* mutantů, což by mohlo být spojeno s menší SOD aktivitou FSD2 (Myouga *et al.*, 2008; Gallie *et Chen*, 2019).

Předmětem budoucího studia T-DNA inserčních mutantů *fsd2* a *fsd3* bude kvantitativní charakterizace fenotypových projevů. Také by se mohla zabývat ověřením zpomaleného růstu a opožděného vyklíčení mutantů, což by mohlo vysvětlovat zakrslý vzrůst mutantních rostlin v porovnání s rostlinou divokého typu. Taktéž by bylo vhodné provést ověření nepřítomnosti FSD3 proteinu u vyselektovaných *fsd3* homozygotních T-DNA inserčních mutantů. Nabízí se možnost imunoblotování se specifickou anti-FSD3 protilátkou. V budoucích výzkumech by bylo také vhodné se věnovat ověření a ujasnění funkce heterokomplexu FSD2 a FSD3 v chloroplastu. Stejně by se také mohly zabývat objasněním,

zda nadexprese *FSD2* a *FSD3* vede ke zvýšení tolerance fotooxidativního stresu rostlinami, jelikož dosavadní výzkumy si v tomto ohledu rozporují (Myouga *et al.*, 2008; Gallie *et al.*, 2019).

7 Závěr

V teoretické části bakalářské práce jsme se věnovali poskytnutí literární rešerše na téma ROS a jejich signální a vývojové roli v rostlinném organismu. V rámci literární rešerše jsme se také zaměřili na antioxidační obranu rostlin s důrazem na SOD, konkrétně na izoformy FSD2 a FSD3 u *Arabidopsis thaliana*.

V praktické části bakalářské práce jsme prostřednictvím molekulárních klonovacích technik připravili konstrukty *pMAL-c2X::FSD2*, *pGEX6P-1::FSD2*; *pMAL-c2X::FSD3* a *pGEX6P-1::FSD3*, které jsme vložili do bakteriálního expresního systému. Tímto jsme připravili fúzní rekombinantní proteiny GST-FSD2, MBP-FSD2 a GST-FSD3, MBP-FSD3, které jsme podrobili afinitní purifikaci. Afinitní purifikací jsme získali frakce jednotlivých proteinů. Na získaných frakcích jsme provedli biochemickou analýzu, kterou jsme potvrdili funkčnost a SOD aktivitu připravených rekombinantních enzymů. Pomocí imunoblotování jsme úspěšně ověřili přítomnost jednotlivých proteinů.

Pro zkoumání dopadu *fsd2* a *fsd3* T-DNA inzerční mutace na fenotyp *Arabidopsis thaliana*, jsme vybrali dvě T-DNA inzerční linie: SALK_080457 (*fsd2* mutant) a SALK_103228 (*fsd3* mutant). Za použití alelově specifické PCR jsme nejprve identifikovali 3 *FSD3* heterozygotní rostliny, které jsme zpropagovali do další generace. Tím jsme získali 8 homozygotních *fsd3* T-DNA inzerčních mutantních rostlin, u kterých jsme pozorovali bledé zbarvení a zakrslý růst v porovnání s rostlinou divokého typu. Na základě alelově specifické PCR jsme nebyli schopni vyselektovat *fsd2* mutantní rostliny, což nám znemožnilo provést základní fenotypovou analýzu. Získané výsledky a připravené proteiny budou sloužit pro další pokrok ve studium tematiky FSD2 a FSD3, který máme naplánovaný navazující diplomové práce.

8 Literatura

- Abdel-Ghany, S. E., Müller-Moulé, P., Niyogi, K. K., Pilon, M., & Shikanai, T. (2005). Two P-Type ATPases Are Required for Copper Delivery in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts. *The Plant Cell*, 17, 1233–1251.
- Akter, S., Huang, J., Waszczak, C., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F., & Messens, J. (2015). Cysteines under ROS attack in plants: A proteomics view. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2935–2944.
- Ali, S., Tyagi, A., & Bae, H. (2023). ROS interplay between plant growth and stress biology: Challenges and future perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 203, 108032.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., ... Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—Representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 19002–19029.
- Asada, K., Kiso, K., & Yoshikawa, K. (1974). Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 2175–2181.
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes *. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 1183–1192.
- Bowler, C., Camp, W. V., Montagu, M. V., Inzé, D., & Asada, P. K. (1994). Superoxide Dismutase in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. (world). <https://doi.org/10.1080/07352689409701914>
- Burkhead, J. L., Gogolin Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., & Pilon, M. (2009). Copper homeostasis. *New Phytologist*, 182, 799–816.
- Castro, B., Citterico, M., Kimura, S., Stevens, D. M., Wrzaczek, M., & Coaker, G. (2021). Stress-induced ROS compartmentalization, perception, and signaling. *Nature plants*, 7, 403–412.
- Cohu, C. M., Abdel-Ghany, S. E., Gogolin Reynolds, K. A., Onofrio, A. M., Bodecker, J. R., Kimbrel, J. A., ... Pilon, M. (2009). Copper Delivery by the Copper Chaperone for Chloroplast and Cytosolic Copper/Zinc-Superoxide Dismutases: Regulation and Unexpected Phenotypes in an *Arabidopsis* Mutant. *Molecular Plant*, 2, 1336–1350.
- Daneva, A., Gao, Z., Van Durme, M., & Nowack, M. K. (2016). Functions and Regulation of Programmed Cell Death in Plant Development. *Annual Review of Cell and*

- Developmental Biology, 32, 441–468.
- Das, P., Nutan, K. K., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2015). Oxidative environment and redox homeostasis in plants: Dissecting out significant contribution of major cellular organelles. *Frontiers in Environmental Science*, 2. Získáno z <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2014.00070>
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J. A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F. M., & Bolwell, G. P. (2012). The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity[W][OA]. *The Plant Cell*, 24, 275–287.
- De Clercq, I., Van de Velde, J., Luo, X., Liu, L., Storme, V., Van Bel, M., ... Vandepoele, K. (2021). Integrative inference of transcriptional networks in Arabidopsis yields novel ROS signalling regulators. *Nature Plants*, 7, 500–513.
- Denness, L., McKenna, J. F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., ... Hamann, T. (2011). Cell Wall Damage-Induced Lignin Biosynthesis Is Regulated by a Reactive Oxygen Species- and Jasmonic Acid-Dependent Process in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156, 1364–1374.
- Dickinson, P. J., Kumar, M., Martinho, C., Yoo, S. J., Lan, H., Artavanis, G., ... Wigge, P. A. (2018). Chloroplast Signaling Gates Thermotolerance in Arabidopsis. *Cell Reports*, 22, 1657–1665.
- Dietz, K.-J., Mittler, R., & Noctor, G. (2016). Recent Progress in Understanding the Role of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Signaling. *Plant Physiology*, 171, 1535–1539.
- Drerup, M. M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., & Kudla, J. (2013). The Calcineurin B-Like Calcium Sensors CBL1 and CBL9 Together with Their Interacting Protein Kinase CIPK26 Regulate the Arabidopsis NADPH Oxidase RBOHF. *Molecular Plant*, 6, 559–569.
- Dreyer, B. H., & Schippers, J. H. M. (2019). Copper-Zinc Superoxide Dismutases in Plants: Evolution, Enzymatic Properties, and Beyond. In *Annual Plant Reviews online* (s. 933–968). John Wiley & Sons, Ltd.
- Du, Y.-Y., Wang, P.-C., Chen, J., & Song, C.-P. (2008). Comprehensive Functional Analysis of the Catalase Gene Family in Arabidopsis thaliana. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1318–1326.
- Dvořák, P., Krasnylenko, Y., Ovečka, M., Basheer, J., Zapletalová, V., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). *In vivo* light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant, Cell & Environment*, 44, 68–87.

- Dvořák, P., Krasnylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 618835.
- Fichman, Y., & Mittler, R. (2020). Rapid systemic signaling during abiotic and biotic stresses: Is the ROS wave master of all trades? *The Plant Journal*, 102, 887–896.
- Fichman, Y., Zandalinas, S. I., Peck, S., Luan, S., & Mittler, R. (2022). HPCA1 is required for systemic reactive oxygen species and calcium cell-to-cell signaling and plant acclimation to stress. *The Plant Cell*, 34, 4453–4471.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., ... Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422, 442–446.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide Anion Radical (O_2^-), Superoxide Dismutases, and Related Matters *. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18515–18517.
- Gallie, D. R., & Chen, Z. (2019). Chloroplast-localized iron superoxide dismutases FSD2 and FSD3 are functionally distinct in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 14, e0220078.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L. F., Foley, R. C., Anderson, C. R., Carroll, A. J., ... Singh, K. B. (2011). Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 10768–10773.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, 141, 312–322.
- Han, D., Williams, E., & Cadenas, E. (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochemical Journal*, 353, 411–416.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, Md. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., ... Fujita, M. (2021). Regulation of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 9326.
- Holzmeister, C., Gaupels, F., Geerlof, A., Sarioglu, H., Sattler, M., Durner, J., & Lindermayr, C. (2015). Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Journal of Experimental Botany*, 66, 989–999.
- Chan, K. X., Mabbitt, P. D., Phua, S. Y., Mueller, J. W., Nisar, N., Gigolashvili, T., ...

- Pogson, B. J. (2016). Sensing and signaling of oxidative stress in chloroplasts by inactivation of the SAL1 phosphoadenosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E4567–E4576.
- Chang, S. H., Lee, S., Um, T. Y., Kim, J.-K., Do Choi, Y., & Jang, G. (2017). pTAC10, a Key Subunit of Plastid-Encoded RNA Polymerase, Promotes Chloroplast Development1. *Plant Physiology*, 174, 435–449.
- Chen, H., Lee, J., Lee, J.-M., Han, M., Emonet, A., Lee, J., ... Lee, Y. (2022). MSD2, an apoplastic Mn-SOD, contributes to root skotomorphogenic growth by modulating ROS distribution in Arabidopsis. *Plant Science*, 317, 111192.
- Janků, M., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2019). On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants*, 8, 105.
- Kang, D. S., Kim, Y., & Stanley, D. (2023). What is in a model? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 112, e21972.
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell*, 10, 255–266.
- Kimura, S., Hunter, K., Vaahtera, L., Tran, H. C., Citterico, M., Vaattovaara, A., ... Wrzaczek, M. (2020). CRK2 and C-terminal Phosphorylation of NADPH Oxidase RBOHD Regulate Reactive Oxygen Species Production in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 32, 1063–1080.
- Kliebenstein, D. J., Monde, R.-A., & Last, R. L. (1998). Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization1. *Plant Physiology*, 118, 637–650.
- Kuběnová, L., Haberland, J., Dvořák, P., Šamaj, J., & Ovečka, M. (2023). Spatiotemporal distribution of reactive oxygen species production, delivery, and use in Arabidopsis root hairs. *Plant Physiology*, kiad484.
- Kundu, N., Dozier, U., Deslandes, L., Somssich, I. E., & Ullah, H. (2013). Arabidopsis scaffold protein RACK1A interacts with diverse environmental stress and photosynthesis related proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e24012.
- Lee, K. P., Kim, C., Landgraf, F., & Apel, K. (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 10270–10275.
- Lee, S., Joung, Y. H., Kim, J.-K., Do Choi, Y., & Jang, G. (2019). An isoform of the plastid

- RNA polymerase-associated protein FSD3 negatively regulates chloroplast development. *BMC Plant Biology*, 19, 524.
- Lee, Y., Rubio, M. C., Alassimone, J., & Geldner, N. (2013). A Mechanism for Localized Lignin Deposition in the Endodermis. *Cell*, 153, 402–412.
- Li, M., & Kim, C. (2021). Chloroplast ROS and stress signaling. *Plant Communications*, 3, 100264.
- Liebthal, M., Schuetze, J., Dreyer, A., Mock, H.-P., & Dietz, K.-J. (2020). Redox Conformation-Specific Protein–Protein Interactions of the 2-Cysteine Peroxiredoxin in *Arabidopsis*. *Antioxidants*, 9, 515.
- Locato, V., Cimini, S., & De Gara, L. (2017). Glutathione as a Key Player in Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance. In M. A. Hossain, M. G. Mostofa, P. Diaz-Vivancos, D. J. Burritt, M. Fujita, & L.-S. P. Tran (Ed.), *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance* (s. 127–145). Cham: Springer International Publishing.
- Melicher, P., Dvořák, P., Šamaj, J., & Takáč, T. (2022). Protein-protein interactions in plant antioxidant defense. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1035573.
- Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145, dev164376.
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoerberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., ... Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: Subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 67, 3831–3844.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., ... Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2, ra45.
- Mishra, N., Jiang, C., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A., & Shen, G. (2023). Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 14. Získáno z <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1110622>
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 663–679.
- Miwa, S., Jow, H., Baty, K., Johnson, A., Czapiewski, R., Saretzki, G., ... von Zglinicki, T. (2014). Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice. *Nature Communications*, 5, 3837.

- Morales, L., Hernández, P., & Chaparro-Olaya, J. (2018). Systematic Comparison of Strategies to Achieve Soluble Expression of Plasmodium falciparum Recombinant Proteins in E. coli. *Molecular Biotechnology*, 60, 887–900.
- Müller, K., Carstens, A. C., Linkies, A., Torres, M. A., & Leubner-Metzger, G. (2009). The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *New Phytologist*, 184, 885–897.
- Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., ... Shinozaki, K. (2008). A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20, 3148–3162.
- Nadarajah, K. K. (2020a). ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21155208>
- Nadarajah, K. K. (2020b). ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 5208.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., ... Kuchitsu, K. (2008). Synergistic Activation of the Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 8885–8892.
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends in Plant Science*, 22, 53–65.
- Pfannschmidt, T., Blanvillain, R., Merendino, L., Courtois, F., Chevalier, F., Liebers, M., ... Lerbs-Mache, S. (2015). Plastid RNA polymerases: Orchestration of enzymes with different evolutionary origins controls chloroplast biogenesis during the plant life cycle. *Journal of Experimental Botany*, 66, 6957–6973.
- Pilon, M., Ravet, K., & Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807, 989–998.
- Polle, A. (2001). Dissecting the Superoxide Dismutase-Ascorbate-Glutathione-Pathway in Chloroplasts by Metabolic Modeling. *Computer Simulations as a Step towards Flux Analysis. Plant Physiology*, 126, 445–462.
- Potocký, M., Jones, M. A., Bezdová, R., Smirnoff, N., & Žárský, V. (2007). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist*, 174, 742–751.
- Ravi, B., Foyer, C. H., & Pandey, G. K. (2023). The integration of reactive oxygen species

- (ROS) and calcium signalling in abiotic stress responses. *Plant, Cell & Environment*, 46, 1985–2006.
- Richards, S. L., Wilkins, K. A., Swarbreck, S. M., Anderson, A. A., Habib, N., Smith, A. G., ... Davies, J. M. (2015). The hydroxyl radical in plants: From seed to seed. *Journal of Experimental Botany*, 66, 37–46.
- Rizhsky, L., Liang, H., & Mittler, R. (2003). The Water-Water Cycle Is Essential for Chloroplast Protection in the Absence of Stress *. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38921–38925.
- Rodrigues, O., Reshetnyak, G., Grondin, A., Saijo, Y., Leonhardt, N., Maurel, C., & Verdoucq, L. (2017). Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 9200–9205.
- Sagi, M., & Fluhr, R. (2001). Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91phox NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology*, 126, 1281–1290.
- Salazar-Henao, J. E., Vélez-Bermúdez, I. C., & Schmidt, W. (2016). The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis. *Development*, 143, 1848–1858.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., & del Río, L. A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2115–2126.
- Shapiguzov, A., Vainonen, J. P., Hunter, K., Tossavainen, H., Tiwari, A., Järvi, S., ... Kangasjärvi, J. (2019). Arabidopsis RCD1 coordinates chloroplast and mitochondrial functions through interaction with ANAC transcription factors. *eLife*, 8, e43284.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.
- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A.-F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chemical Reviews*, 114, 3854–3918.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current biology : CB*, 24, R453–R462.
- Schmidt, A., Gube, M., Schmidt, A., & Kothe, E. (2009). *In silico* analysis of nickel containing superoxide dismutase evolution and regulation. *Journal of Basic Microbiology*, 49, 109–118.

- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 363–383.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R. K., Tripathi, D. K., Singh, V. P., ... Prasad, S. M. (2016). Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299>
- Soltabayeva, A., Dauletova, N., Serik, S., Sandybek, M., Omondi, J. O., Kurmanbayeva, A., & Srivastava, S. (2022). Receptor-like Kinases (LRR-RLKs) in Response of Plants to Biotic and Abiotic Stresses. *Plants*, 11, 2660.
- Sundaravelpandian, K., Chandrika, N. N. P., Tsai, Y.-H., & Schmidt, W. (2013). PFT1-controlled ROS balance is critical for multiple stages of root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e24066.
- Suzuki, N., Devireddy, A. R., Inupakutika, M. A., Baxter, A., Miller, G., Song, L., ... Mittler, R. (2015). Ultra-fast alterations in mRNA levels uncover multiple players in light stress acclimation in plants. *The Plant Journal*, 84, 760–772.
- 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, 691–699.
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H. A., Shulaev, E., Cortes, D. F., ... Mittler, R. (2013). Temporal-Spatial Interaction between Reactive Oxygen Species and Abscisic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants[W][OPEN]. *The Plant Cell*, 25, 3553–3569.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., & Dolan, L. (2008). Local Positive Feedback Regulation Determines Cell Shape in Root Hair Cells. *Science*, 319, 1241–1244.
- Tamma, G., Valenti, G., Grossini, E., Donnini, S., Marino, A., Marinelli, R. A., & Calamita, G. (2018). Aquaporin Membrane Channels in Oxidative Stress, Cell Signaling, and Aging: Recent Advances and Research Trends. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1501847.
- Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Maréchal, P., Rouhier, N., ... Rey, P. (2009). Regeneration Mechanisms of *Arabidopsis thaliana* Methionine Sulfoxide Reductases B by Glutaredoxins and Thioredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 18963–18971.
- Telfer, A., Bishop, S. M., Phillips, D., & Barber, J. (1994). Isolated photosynthetic reaction

- center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 13244–13253.
- Torres, M. A., & Dangl, J. L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 397–403.
- Torres, M. A., Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 517–522.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, 37, 1130–1134.
- Tossounian, M.-A., Van Molle, I., Wahni, K., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F., ... Messens, J. (2018). Disulfide bond formation protects Arabidopsis thaliana glutathione transferase tau 23 from oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1862, 775–789.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of Cell Biology*, 217, 1915–1928.
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., & Van Breusegem, F. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2923–2934.
- Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 209–236.
- Wu, F., Chi, Y., Jiang, Z., Xu, Y., Xie, L., Huang, F., ... Pei, Z.-M. (2020). Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in Arabidopsis. *Nature*, 578, 577–581.
- Yamakura, F., & Kawasaki, H. (2010). Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804, 318–325.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., & Shikanai, T. (2009). SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21, 347–361.

- Zaffagnini, M., Fermani, S., Calvaresi, M., Orrù, R., Iommarini, L., Sparla, F., ... Trost, P. (2016). Tuning Cysteine Reactivity and Sulfenic Acid Stability by Protein Microenvironment in Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 24, 502–517.
- Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Burks, D., Azad, R. K., & Mittler, R. (2019). Identification and characterization of a core set of ROS wave-associated transcripts involved in the systemic acquired acclimation response of *Arabidopsis* to excess light. *The Plant Journal*, 98, 126–141.
- Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Fritschi, F. B., Azad, R. K., Nechushtai, R., & Mittler, R. (2021). The impact of multifactorial stress combination on plant growth and survival. *The New Phytologist*, 230, 1034–1048.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X., & Tan, M. (2007). Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist*, 175, 36–50.
- Zhang, Yanyan, Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., ... Wang, X. (2009). Phospholipase D α 1 and Phosphatidic Acid Regulate NADPH Oxidase Activity and Production of Reactive Oxygen Species in ABA-Mediated Stomatal Closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21, 2357–2377.
- Zhang, Yuanyuan, Yang, Z., Zhang, Z., Li, Y., Guo, J., Liu, L., ... Han, G. (2023). Root Hair Development and Adaptation to Abiotic Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 9573–9598.

9 Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Koncentrace jednotlivých plazmidů izolovaných z transformovaných kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10

Příloha 2: *In silico* štěpení konstruktů *pGEX-6P-1::FSD2* v programu ApE

Příloha 3: *In silico* štěpení konstruktů *pGEX-6P-1::FSD3* v programu ApE

Příloha 4: *In silico* štěpení konstruktů *pMAL-c2X::FSD2* v programu ApE

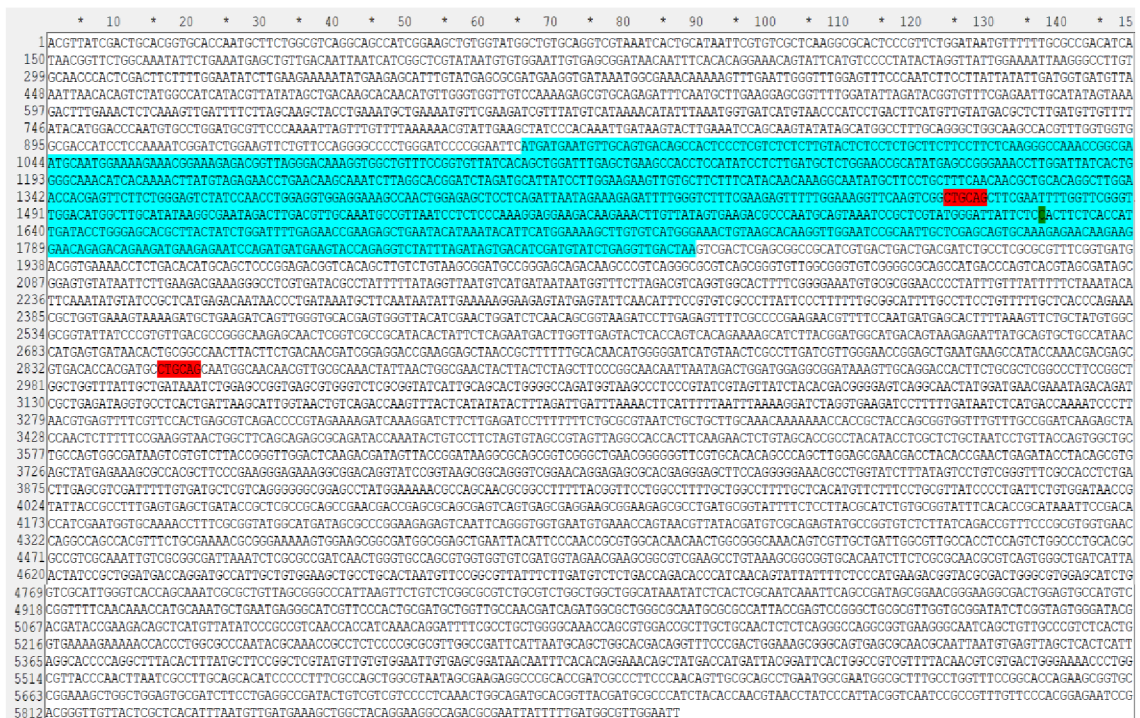
Příloha 5: *In silico* štěpení konstruktů *pMAL-c2X::FSD3* v programu ApE

Příloha 1: Koncentrace jednotlivých izolovaných plazmidů z transformovaných kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10

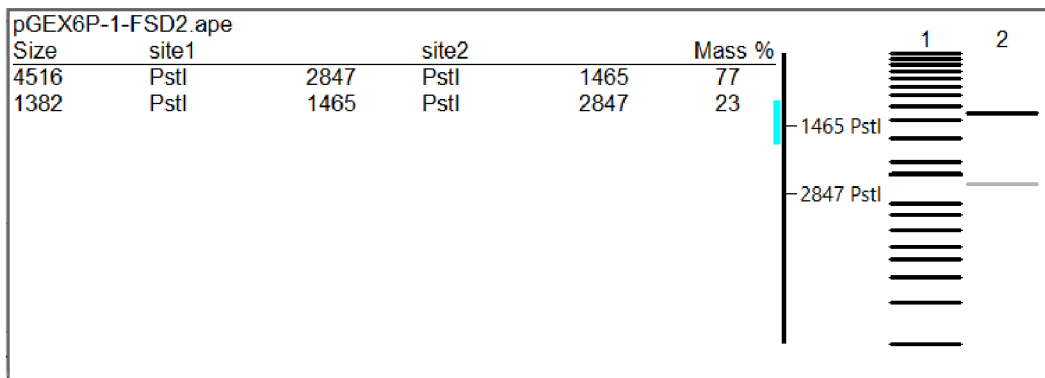
Vzorek	Číslo kolonie	Koncentrace [ng·μl⁻¹]
<i>pGEX::FSD2</i>	1	2724,80
	2	2653,90
	3	2670,10
	4	2946,70
	5	2812,70
	6	2817,90
<i>pGEX::FSD3</i>	1	2722,80
	2	2811,00
	3	2804,90
	4	2831,90
<i>pMAL::FSD2</i>	1	2846,00
	2	2637,50
	3	2767,20
	4	2839,00
<i>pMAL::FSD3</i>	1	2796,80
	2	2787,80
	3	2802,10
	4	2819,50

Příloha 2: *In silico* štěpení konstruktů *pGEX-6P-1::FSD2* v programu ApE. (A – Lokalizace polohy restričních míst (*Pst*I; červeně) a inzertu *FSD2* (modře); B – Přehled velikosti vzniklých štěpných fragmentů a přesné polohy štěpných míst)

A)



B)

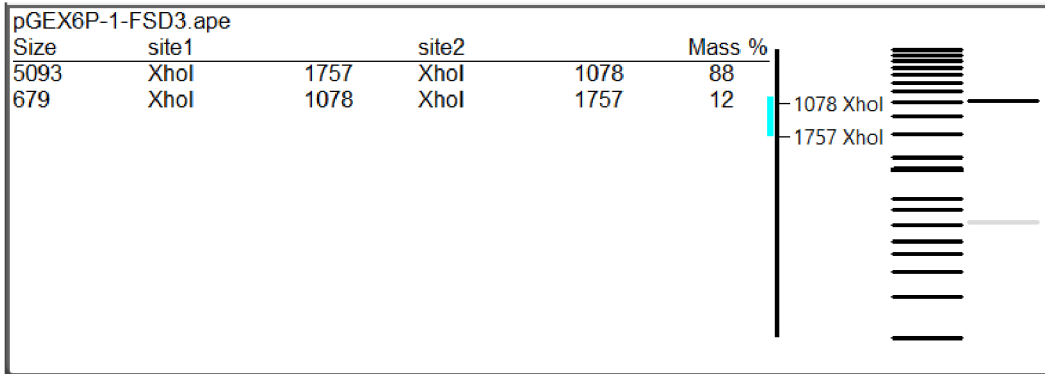


Příloha 3: *In silico* štěpení konstruktů *pGEX-6P-1::FSD3* v programu ApE. (A – Lokalizace polohy restričních míst (*XhoI*; červeně) a inzertu *FSD3* (modře); B – Přehled velikosti vzniklých štěpných fragmentů a přesné polohy štěpných míst)

A)



B)



Příloha 4: *In silico* štěpení konstruktů *pMAL-c2X::FSD2* v programu ApE. (A – Lokalizace polohy restričních míst (*NdeI*; červeně) a inzertu *FSD2* (modře); B – Přehled velikosti vzniklých štěpných fragmentů a přesné polohy štěpných míst)

A)



B)

