

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Kateřina Navrátilová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Selekce homozygotních mutantních linií
Arabidopsis thaliana s T-DNA inzercí
v genu *CSD1***

Bakalářská práce

Kateřina Navrátilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Petr Dvořák

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina NAVRÁTILOVÁ**
Osobní číslo: **R18653**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Selekce homozygotních mutantních linií *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí v genu CSD1**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Vypracování řešerše na téma: Reaktivní formy kyslíku a jejich role při buněčné signalizaci a oxidačním stresu u rostlin, superoxid dismutasy s důrazem na CSD1, SQUAMOSA promoter-binding protein-like7 transkripční faktor a jeho role při regulaci superoxid dismutas.

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

Selekce homozygotních *csd1-1* a *csd1-2* linií pomocí genotypové analýzy. Potvrzení nepřítomnosti CSD1 proteinu v selektovaných homozygotních liniích pomocí imunoblot analýzy se specifickou protilátkou rozpoznávající CSD1 a CSD2. Detekce aktivity jednotlivých SOD isoenzymů u *csd1* mutantů.

Bioinformatická analýza potencionálních transkripčních faktorů ovlivňujících expresi CSD1 a CSD2 skrze regulaci mitogen-aktivovaných protein kinas.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55, 373-399.
2. Huang, C. H., Kuo, W. Y., Weiss, C., & Jinn, T. L. (2012). Copper chaperone-dependent and-independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 158(2), 737-746.
3. Kliebenstein, D. J., Monde, R. A., & Last, R. L. (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant physiology*, 118(2), 637-650.
4. Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in cell & developmental biology*, 80, 3-12.
5. 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(1), 347-361

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Petr Dvořák
Centrum regionu Haná

Datum zadání bakalářské práce: 24. dubna 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan



prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holiče
tel.: +420 585 634 901
-2-

- 7 -04- 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Kateřina Navrátilová

Název práce: Selekce homozygotních mutantních linií *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí v genu *CSD1*

Typ práce: bakalářská

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

Vedoucí práce: Mgr. Petr Dvořák

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: superoxiddismutázy, CSD1, CSD2, *Arabidopsis thaliana*, reaktivní formy kyslíku, mitogen-aktivované protein kinázové kaskády, antioxidační obrana, SQUAMOSA promoter-binding protein-like

Počet stran: 57

Počet příloh: 13

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Kateřina Navrátilová

Title: Selection of *Arabidopsis thaliana* homozygous mutant lines with T-DNA insertion in the *CSD1* gene

Type of thesis: bachelor

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

Supervisor: Mgr. Petr Dvořák

The year of presentation: 2021

Keywords: superoxide dismutases, CSD, CSD2, *Arabidopsis thaliana*, reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinase cascades, antioxidant defence, SQUAMOSA promoter-binding protein-like

Number of pages: 57

Number of appendices: 13

Language: Czech

Souhrn

Superoxiddismutázy jsou jednou z hlavních složek enzymatické antioxidační obrany. Plní důležitou roli v odklizení vznikajících reaktivních forem kyslíku, které při nadměrné produkci mohou vyvolat oxidační stres v organismu. Taktéž byla popsána jejich nezastupitelná role v řadě vývojových procesů rostlin. Jedním z hlavních regulátorů exprese některých izoform superoxiddismutáz se zdají být transkripční faktory známé jako SQUAMOSA promoter-binding protein-like.

Z tohoto důvodu jsme se v teoretické části věnovali superoxiddismutázám se zaměřením zejména na CSD1 a CSD2 izoenzymy. Konkrétně jsme se zabývali jejich funkcí v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Věnovali jsme se také SQUAMOSA promoter-binding protein-like transkripčním faktorům se zaměřením na SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7, jež je schopný regulace izoenzymů CSD1 a CSD2. Zabývali jsme se také studiem mitogen-aktivovaných protein kinázových kaskád, jelikož jsou schopné regulovat aktivitu některých transkripčních faktorů. Jsou také známé tím, že regulují antioxidační obranu, a to včetně superoxiddismutáz.

Experimentální část jsme proto zaměřili na bioinformatickou analýzu s cílem predikovat potencionální transkripční faktory schopné regulovat geny *CSD1* a *CSD2* pod kontrolou mitogen-aktivovaných protein kinázových kaskád. Prostřednictvím alelově specifické PCR a imunoblotování s anti-CSD protilátkou jsme vyseletovali homozygotní T-DNA inzerční linie *csd1-1* a *csd1-2*, u kterých byla potvrzena nepřítomnost CSD1 proteinu. Zabývali jsme se studiem vlivu koncentrace mědi na abundanci a aktivitu CSD1 a CSD2, která je úzce spojena s regulací superoxiddismutáz skrze SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 transkripční faktor.

Summary

Superoxide dismutases are one of the main components of enzymatic antioxidant defence. They play an important role in scavenging of emerging reactive oxygen species, which in case of excessive production can cause oxidative stress of an organism. Their irreplaceable role in several plant developmental processes was also described. Furthermore, one of the major regulators of expression of superoxide dismutases isoforms appear to be the transcription factors known as SQUAMOSA promoter-binding protein-like.

Therefore, in the theoretical part we focused on superoxide dismutases focusing mainly on CSD1 and CSD2 isoenzymes. Specifically, we discussed their function in the model plant *Arabidopsis thaliana*. We also addressed SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors, focusing on SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7, which is capable of regulating CSD1 and CSD2 isoenzymes. In addition, we studied mitogen-activated protein kinase cascades as they can regulate the activity of some transcription factors. They are also known to regulate antioxidant defence, including superoxide dismutases.

Thus, we focused the experimental part on bioinformatics analysis to predict potential transcription factors capable of regulating *CSD1* and *CSD2* genes under the control of mitogen-activated protein kinase cascades. By allele-specific PCR and immunoblotting with anti-CSD antibody, we selected homozygous T-DNA insertion lines *csd1-1* and *csd1-2*, in which the absence of CSD1 protein was confirmed. We studied the effect of copper concentration on the abundance and activity of CSD1 and CSD2, which is closely related to the regulation of superoxide dismutases through SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 transcription factor.

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

V Olomouci dne 29. 7. 2021

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Petru Dvořákovi za vedení mé bakalářské práce, věnovaný čas, ochotu a trpělivost při zpracování literární rešerše a vedení laboratorní práce. Ráda bych také poděkovala Mgr. Adamu Zeinerovi za cenné rady, věnovaný čas a pomoc při sepisování bakalářské 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	7
3.1.2	Vývojová role ROS	8
3.2	Antioxidační obrana	9
3.3	Superoxiddismutázy	10
3.3.1	CSD1 a CSD2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
3.3.2	FSD1, FSD2 a FSD3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
3.3.2.1	Mitogen-aktivované proteinkinázové kaskády.....	14
3.4	SQUAMOSA promoter-binding protein-like transkripční faktory	15
3.4.1	SPL7.....	16
4	Materiál a metody	18
4.1	Biologický materiál.....	18
4.2	Chemikálie	18
4.3	Soupravy	20
4.4	Roztoky a jejich příprava	20
4.5	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.6	Seznam použitých programů a databází.....	24
4.7	Metodika	25
4.7.1	Bioinformatická predikce regulace exprese <i>CSD1</i> a <i>CSD2</i> genů.....	25
4.7.2	Povrchová sterilizace semen	25
4.7.3	Výsev sterilních semen	26
4.7.4	Alelově specifická PCR	26
4.7.5	Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu	28
4.7.6	Extrakce proteinů pro biochemické analýzy	28
4.7.7	Měření koncentrace proteinů.....	28
4.7.8	Stanovení enzymatické aktivity SOD	29
4.7.9	SDS-PAGE.....	29
4.7.10	Imunoblotování	30
5	Výsledky	32
5.1	Bioinformatická predikce regulace exprese <i>CSD1</i> a <i>CSD2</i> genů.....	32

5.2	Alelově specifická PCR	35
5.3	Nepřítomnost CSD1 proteinu v mutantních rostlinách <i>csd1-1</i> a <i>csd1-2</i>	37
5.4	Závislost abundance a aktivity SOD na přítomnosti mědi v médiu	38
6	Diskuse.....	41
7	Závěr	45
8	Seznam použité literatury.....	46
9	Přílohy	57

Seznam symbolů a zkratek

$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
AGF1	AT-HOOK PROTEIN OF GA FEEDBACK 1
AGL15	AGAMOUS-LIKE 15
AHL	AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN
APS	Peroxodisíran amonný
APX	Askorbát peroxidáza
ARF3	AUXIN RESPONSE TRANSCRIPTION FACTOR 3
ASL18	ASYMETRIC LEAVES2-LIKE 18
ATAF2	ARABIDOPSIS THALIANA ACTIVATION FACTOR 2
BSA	Hovězí sérový albumin; Bovine serum albumin
bZIP	BASIC LEUCINE-ZIPPER
CAT	Kataláza
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CCS	COPPER CHAPERONE FOR SUPEROXIDE DISMUTASE
CDPK	Calcium-dependent protein kinase
CPN20	Chloroplast chaperonin 20
CuRE	Elementy reagující na nedostatek mědi; Cu deficiency-responsive elements
DAG2	DOF AFFECTING GERMINATION 2
DAZ1	DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER 1
DEAR3	DREB AND EAR MOTIF PROTEIN 3
DHA	Dehydroaskorbát
DHAR	Dehydroaskorbát reduktáza
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	Ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
ERF	ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR
GATA12	GATA TRANSCRIPTION FACTOR 12
GFP	Zelený fluorescenční protein; Green fluorescent protein
GLK1	GBF'S PRO-RICH REGION-INTERACTING FACTOR 1

GPX	Glutathion peroxidáza
GR	Glutathion reduktáza
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfid
GT2L	GT-2LIKE PROTEIN
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HB51	HOMEBOX 15
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HPCA1	HYDROGEN-PEROXIDE-INDUCED Ca ²⁺ INCREASES 1
HSF	HEAT SHOCK FACTOR
ICU4	INCURVATA 4
KAN1	KANADI 1
LEC2	LEAFY COTYLEDON 2
LFY	LEAFY
LRR	Leucine-rich receptor kinase
MAPK	Mitogen aktivované protein kinázy
MAPKK	Mitogen aktivované protein kinázy kinázy
MAPKKK	Mitogen aktivované protein kinázy kinázy kinázy
MDHA	Monodehydroaskorbát
MDHAR	Monodehydroaskorbát reduktáza
MES	Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové
MS	Murashige a Skoog médium
MYB	MYB DOMAIN PROTEIN
NAC	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN
NBT	Chlorid nitrotetrazoliové modři
O ₂	Molekulární kyslík
O ₂ ^{•-}	Superoxid
OH [•]	Hydroxylový radikál
ORA47	OCTADECANOID-RESPONSIVE AP2/ERF-DOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR 47

PC	Plastocyanin
PVDF	Polyvinyliden difluoridová membrána
RAP	RELATED TO
RAV1	RELATED TO ABI3/VP1 1
RBOH	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG
ROS	Reaktivní formy kyslíku; Reactive oxygen species
RR	RESPONSE REGULATOR
RVE1	REVEILLE 1
SBP	SQUAMOSA binding protein
SCAP1	STOMATAL CARPENTER 1
SDS	Dodecylsiran sodný
SOD	Superoxiddismutáza
SPL	SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE
TAE	Tris Acetát EDTA
TBS-T	Tris buffer saline s přídavkem Tween 20
TCP11	TCP DOMAIN PROTEIN 11
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGA	TGACG SEQUENCE-SPECIFIC BINDING PROTEIN
TOE	TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED
TREE1	TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR OF EIN3-DEPENDENT ETHYLENE-RESPONSE 1
WOX13	WUSCHEL RELATED TO HOMEBOX 13
WRKY12	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 12
YAB	YABBY
ZAT	ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6
ZML2	ZIM-LIKE 2

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schématický přehled zdrojů ROS v kompartmentech rostlinných buněk	5
Obrázek 2: Lokalizace SOD izoforem v modelové rostlině <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
Obrázek 3: Schématicky znázorněná regulace SOD exprese prostřednictvím SPL7	17
Obrázek 4: Popis jednotlivých vrstev v kazetě pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu	31
Obrázek 5: Identifikace potencionálních transkripčních faktorů schopných regulace exprese <i>CSD1</i> a <i>CSD2</i>	33
Obrázek 6: Grafické znázornění překryvu sekvencí transkripčního faktoru SPL8 získaných prostřednictvím dílčích softwarů GPS 3.0, ELM a PhosPhAt 4.0.	34
Obrázek 7: Schématické znázornění struktury genu <i>CSD1</i> a místo T-DNA inserce	35
Obrázek 8: Selektce mutantů <i>CSD1</i> linie <i>csd1-1</i> (SALK_109389) pomocí alelově specifické PCR a elektroforetické separace na agarosových gelech	36
Obrázek 9: Selektce mutantů <i>CSD1</i> linie <i>csd1-2</i> (SALK_024857) pomocí alelově specifické PCR a elektroforetické separace na agarosových gelech	36
Obrázek 10: Detekce přítomnosti <i>CSD1</i> proteinu u mutantních linií <i>csd1-1</i> a <i>csd1-2</i> v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) prostřednictvím imunoblotování se specifickou anti-CSD protilátkou	37
Obrázek 11: Detekce přítomnosti <i>CSD1</i> a <i>CSD2</i> proteinů pomocí imunoblotování u mutantních linií <i>csd1-1</i> a <i>csd1-2</i> v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) při různých koncentracích mědi v médiu	38
Obrázek 12: Hodnocení enzymatické aktivity SOD mutantních linií <i>csd1-1</i> a <i>csd1-2</i> v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) při různých koncentracích mědi v médiu	39

Seznam tabulek

Tabulka 1: Vlastnosti a reaktivita ROS	4
Tabulka 2: Reakční směs pro alelově specifickou PCR s využitím Phire Plant Direct PCR Kitu. .	26
Tabulka 3: Nastavení teplotního programu pro alelově specifickou PCR.....	27
Tabulka 4: Seznam sekvencí použitých primerů pro alelově specifickou PCR	27

1 Úvod

Přítomnost atmosférického kyslíku je pro většinu organismů esenciální. Kyslík sám o sobě tvoří relativně stabilní molekulu. Nicméně pokud dojde ke změně v jeho elektronové struktuře dochází ke vzniku tzv. reaktivních forem kyslíku (Baker et Orlandi, 1995; Huang et al., 2019). Reaktivní formy kyslíku plní v rostlině řadu vývojových a signálních funkcí, avšak v nadbytku vyvolávají v organismu oxidační stres (Schieber et Chandel, 2014). Organismy si tak vytvořily speciální obranný mechanismus zvaný antioxidační obrana. Její hlavní složku tvoří tzv. superoxiddismutázy. Jedná se o enzymy s navázaným kovovým iontem ve své struktuře aktivního místa (Pilon et al., 2011; Wang et al., 2018). Některé z izoform superoxiddismutáz mohou být regulovány prostřednictvím SQUAMOSA promotor-binding protein-like transkripčních faktorů (Yamasaki et al., 2009). Stejně tak mohou být superoxiddismutázy regulovány prostřednictvím mitogen-aktivovaných protein kinázových kaskád (Dvořák et al., 2021b), které jsou schopné regulovat i aktivitu některých transkripčních faktorů (Ishihama et Yoshioka, 2012).

Na základě tématu uvedené bakalářské práce byla provedena bioinformatická analýza pro identifikaci potencionálních transkripčních faktorů regulujících *CSD1* a *CSD2* pod kontrolou mitogen-aktivovaných protein kinázových kaskád. Pro možné studium vlivu *CSD1* proteinu byly vybrány dvě T-DNA inzerční linie u genu *CSD1 Arabidopsis thaliana*. Z těchto T-DNA inzerčních linií jsme vyseletovali homozygotní T-DNA inzerční mutanty prostřednictvím alelově specifické PCR a nepřítomnost *CSD1* proteinu potvrdili pomocí imunoblotování se specifickou protilátkou. U potvrzených *csd1* mutantních linií byla pozorována odpověď semenáčků na různé koncentrace mědi se zaměřením na parametry superoxiddismutáz.

2 Cíle práce

Vypracování literární rešerše na téma:

- Reaktivní formy kyslíku a jejich role při buněčné signalizaci a oxidačním stresu u rostlin
- Superoxiddismutázy s důrazem na CSD1
- SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 transkripční faktor a jeho role při regulaci superoxiddismutáz

Experimentální cíle:

- Bioinformatická analýza potencionálních transkripčních faktorů ovlivňujících expresi *CSD1* a *CSD2*
- Selektce homozygotních *csd1-1* a *csd1-2* linií pomocí genotypové analýzy
- Potvrzení nepřítomnosti CSD1 proteinu u selektovaných homozygotních liniích pomocí imunoblotování se specifickou protilátkou rozeznávající CSD1 a CSD2
- Detekce aktivity jednotlivých SOD izoenzymů u *csd1* mutantů na základě různé koncentrace mědi v médiu

3 Literární přehled

3.1 Reaktivní formy kyslíku

Všechny aerobní organismy, včetně živočichů a rostlin, vyžadují ke svému bazálnímu metabolismu přítomnost atmosférického kyslíku. Molekulární kyslík (O_2) je sám o sobě považován za relativně stabilní molekulu. Jsou však známy a detailně popsány případy, při kterých se může stát nebezpečným, a to nastane-li změna v jeho elektronové struktuře (Baker et Orlandi, 1995; Huang et al., 2019). Ta dává za vznik reaktivním formám kyslíku (Reactive Oxygen Species – ROS) buďto přenosem energie, kdy dochází ke vzniku singletového kyslíku (1O_2), anebo přenosem elektronů, kdy se kyslík postupně redukuje na superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH^{\cdot} ; Apel et Hirt, 2004). Právě 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 a OH^{\cdot} patří mezi základní a nejvýznamnější členy ROS u rostlin. Navzájem se od sebe liší svými chemickými vlastnostmi, reaktivitou a stabilitou. Obecně platí, že mezi reaktivnější ROS řadíme radikálové formy. Nejreaktivnější zástupcem ROS je již dříve zmíněný OH^{\cdot} , který vzniká v přítomnosti volných iontů kovů. Naopak mezi nejméně reaktivní zástupce ROS řadíme H_2O_2 , který disponuje relativně největší stabilitou v porovnání s ostatními zástupci ROS (Tabulka 1; Mittler, 2017; Smirnov et Arnaud, 2018).

S reaktivitou a stabilitou také souvisí schopnost přenosu ROS přes membránu, kdy ROS bez náboje, především H_2O_2 , mohou prostupovat přes lipidové membrány prostřednictvím aquaporinů (Tamma et al., 2018). V porovnání s H_2O_2 má 1O_2 velmi krátký poločas rozpadu. Může tak difundovat pouze na vzdálenost několika nanometrů (Skovsen et al., 2005). Proto jej označujeme za velmi nestabilní. Podobně je na tom, co se týká stability, $O_2^{\cdot-}$. Jeho poločas rozpadu se podobá 1O_2 , avšak na rozdíl od něj $O_2^{\cdot-}$ často podněcuje tvorbu dalších ROS (Halliwell, 2006). Díky vysoké stabilitě, relativně nízké reaktivitě a schopnosti difundovat přes membrány je H_2O_2 považován za zcela unikátního zástupce ROS, který hraje nezastupitelnou roli v řadě rostlinných vývojových procesů a buněčné signalizaci (Smirnov et Arnaud, 2018).

Všeobecně lze říct, že ROS vznikají především jako vedlejší produkty aerobního dýchání v mitochondriích při procesu získávání energie (Schieber et Chandel, 2014). Nicméně u rostlin patří mezi hlavní producenty ROS chloroplasty a peroxizomy s návazností na práci fotosyntetického aparátu a dílčích kroků fotosyntézy (Del Río, 2011; Gleason et al., 2011). K nezanedbatelné produkci ROS dochází i v jiných buněčných organelách, které mají dostatečně vysoký redoxní potenciál, díky čemuž jsou schopny excitovat, či darovat elektron atmosférickému kyslíku (Mittler, 2016).

Tabulka 1: Vlastnosti a reaktivita ROS (převzato a upraveno z Mittler, 2017).

ROS	Poločas rozpadu	Migrační vzdálenost	Způsob reakce	Místo produkce	Detoxifikační mechanismy
Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)	1–4 μ s	30 nm	Reaguje s Fe–S proteiny Dismutace na H_2O_2	Apoplast (RBOH), chloroplasty, mitochondrie, peroxizomy, elektron transportní řetězec	SOD, flavonoidy, askorbát
Hydroxylový radikál (OH^{\cdot})	1 ns	1 nm	Extremně reaktivní se všemi biomolekulami včetně DNA, RNA, lipidů a proteinů	Železo a H_2O_2 (Fentonova reakce)	Flavonoidy, prolin, cukry, askorbát
Peroxid vodíku (H_2O_2)	>1 ms	>1 μ m	Reaguje s proteiny prostřednictvím cysteinových a methioninových zbytků. Reaguje s hemovými proteiny. Reaguje s DNA.	Peroxizomy, chloroplasty, mitochondrie, cytosol, apoplast	Asorbát peroxidáza, kataláza, glutathion peroxidáza, peroxidáza, peroxiredoxin, askorbát, glutathion
Singletový kyslík (1O_2)	1–4 μ s	30 nm	Oxiduje lipidy, proteiny (Trp, His, Tyr, Met a Cys zbytky) a G zbytky DNA	Membrány, chloroplasty, jádra	Karotenoidy a α - tokoferol

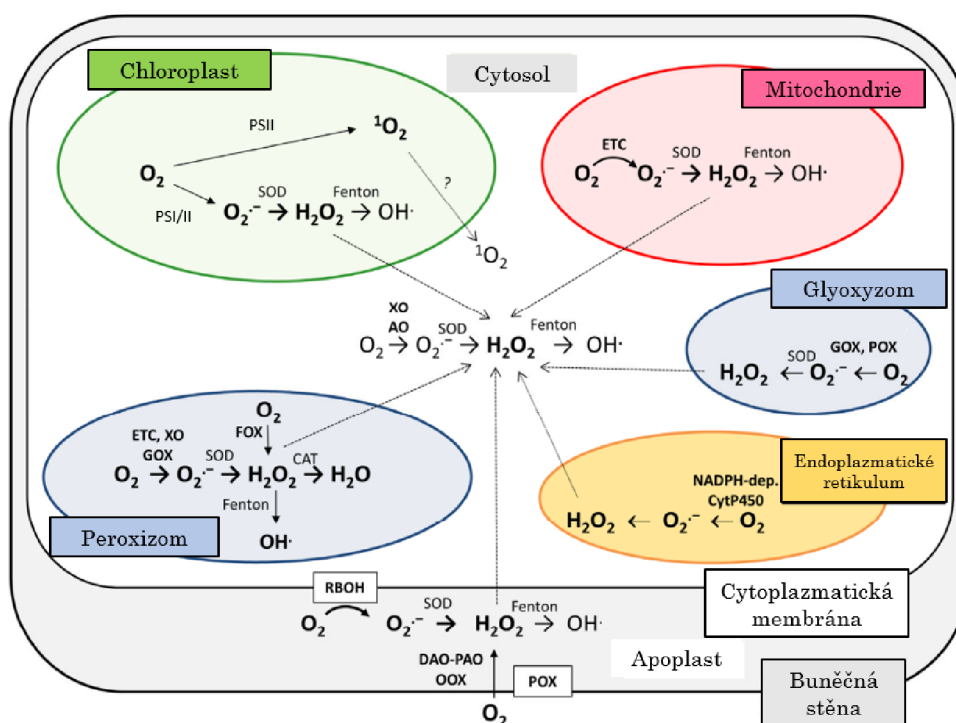
V mitochondriích je tvorba ROS asociována s chodem dýchacího řetězce na jejich vnitřní membráně v průběhu mitochondriálního dýchání. Právě díky němu dochází k tvorbě $O_2^{\cdot-}$, jenž je dále rozložen na H_2O_2 a O_2 prostřednictvím superoxidodismutáz (SOD) v matrixu mitochondrií (Navrot et al., 2007).

Chloroplasty jsou hlavními producenty ROS u rostlin, k jejichž tvorbě dochází prostřednictvím elektron transportního řetězce v thylakoidní membráně během světelné fáze fotosyntézy. Hlavním produktem je zejména 1O_2 , jehož primárním zdrojem jsou chlorofylové pigmenty v reakčním centru fotosystému II, kdy dochází k reakci molekulárního kyslíku s chlorofylem, jenž je ve stavu tripletu (Roach et Krieger-Liszkay, 2014). Dalším produktem je $O_2^{\cdot-}$, jenž se vytváří jak ve fotosystému I, tak i ve fotosystému II. Ve fotosystému I vzniká $O_2^{\cdot-}$ tzv. Mehlerovou reakcí (fotoredukce kyslíku), ke které dochází v případě nízkých koncentracích $NADP^+$. V případě fotosystému II může také docházet k redukci molekulárního kyslíku, kdy vzniká opět $O_2^{\cdot-}$, který však může být dále dismutován na H_2O_2 a následně redukován na OH^{\cdot} v důsledku volně se vyskytujících kovových iontů (Obrázek 1; Krieger-Liszkay et al., 2008; Roach et Krieger-Liszkay, 2014). Proto mluvíme o nezaměnitelné roli kovů při tvorbě ROS, zejména se tato problematika týká železa, mědi a manganu. Například volné železo ve formě železnatých iontů (Fe^{2+})

zapříčiňuje tvorbu toxických OH^\cdot redukcí H_2O_2 při Fentonově reakci (Ames et al., 1993; Mittler, 2017). Důsledkem této aktivity iontů kovů došlo k vývoji obranných mechanismů, jakýmž je například chelatace, za účelem vyhnout se tak Fentonově reakci (Ames et al., 1993).

Dalšími zdroji ROS jsou také peroxizomy a glyoxyzomy. V peroxizomech dochází k tvorbě $\text{O}_2^{\cdot-}$ prostřednictvím krátkého elektron transportního řetězce během fotorespiračních procesů (Obrázek 1; López-Huertas et al., 1999). Vzniklý $\text{O}_2^{\cdot-}$ je stejně jako v chloroplastech dismutován na H_2O_2 , případně je následně redukován až na OH^\cdot . V glyoxyzomech dochází též k produkci $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 prostřednictvím β -oxidace mastných kyselin a aktivity enzymů jako jsou glykolát a urát oxidázy (del Río, 2011; Janků et al., 2019).

Existují však i další místa, kde dochází k produkci ROS, jako například endoplazmatické retikulum, cytoplazma a především apoplast. Právě v apoplastu dochází k tvorbě ROS prostřednictvím NADPH oxidáz, u rostlin známých jako RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (RBOH), které jsou vázané na plazmatickou membránu. U živočichů jsou tyto enzymy označovány jako NOX (Sagi et Fluhr 2006; Suzuki et al., 2011; Janků et al., 2019).



Obrázek 1: Schématický přehled zdrojů ROS v kompartmentech rostlinných buněk (převzato a upraveno z Janků et al., 2019). AO – aldehydoxidáza, CAT – kataláza, DAO – diaminoxidáza, GOX – glykolát oxidáza, ETC – elektron transportní řetězec, FOX – aminoxidoreduktázy obsahující flavin, OOX – oxalát oxidáza, PAO – polyaminoxidáza, POX – peroxidáza, PS – fotosystém, RBOH – respiratory burst oxidase homolog, SOD – superoxidismutázy, XO – xanthinoxidáza/dehydrogenáza.

Jak již bylo naznačeno, rostliny za zcela běžných podmínek vytváří relativně vysoké množství ROS v souvislosti s bazálním metabolismem. Jejich nekontrolovatelná produkce může vést k oxidaci buněčných komponent, které jsou pro organismus esenciální. Jedná se především o DNA, bílkoviny či lipidy, které jsou vlivem působení ROS oxidovány. Jejich nadměrná oxidace způsobuje trvalé poškození a v krajních případech může vést až k buněčné smrti (Mittler, 2017; Bellegarde et al., 2019). Je proto zásadní udržovat homeostázu mezi produkcí a odstraňováním ROS, aby tak byla zachována samotná integrita buněk (Bellegarde et al., 2019). V návaznosti na výskyt ROS došlo u rostlin a dalších organismů k vývoji efektivní antioxidační obrany (samostatně diskutována v kapitole 3.2), která je zodpovědná za udržování fyziologických koncentrací ROS.

Bylo však dokázáno, že role ROS není pouze destruktivní. ROS v rostlinách plní řadu důležitých funkcí, například jako signální molekuly během nepříznivých environmentálních podmínek, a taktéž jsou zapojeny do mnoha vývojových procesů u rostlin (Schieber et Chandel, 2014; Mittler, 2017).

Je-li rostlina vystavena stresovým podmínkám, může docházet v návaznosti na daný stres ke zvýšené produkci ROS, která v mnoha případech přesahuje kapacitu antioxidační obrany. Za těchto podmínek je rostlina vystavena tzv. oxidačnímu stresu. Ten charakterizujeme jako následek přílišného hromadění ROS překračující jejich fyziologickou hladinu v buňkách (Desikan et al., 2001; Bellegarde et al., 2019).

Stresové podmínky, které mohou nepříznivě ovlivnit rostliny, dělíme na biotické a abiotické. Biotickým stresem myslíme zejména vystavení rostliny patogenům. Následkem toho dochází ke spuštění obranné reakce, kdy rostlina daný patogen rozpozná receptory, jež jsou lokalizovány na plazmatické membráně, a dochází tak ke spuštění signálních drah vedoucích k intenzivní produkci ROS, která je označována jako „oxidative burst“ neboli oxidační vzplanutí. Mezi patogeny schopné vyvolat tuto reakci řadíme například bakterie, houby, viry či býložravce (Shinya et al., 2016; Castro et al., 2021).

Naopak abiotické podmínky lze charakterizovat jako nadbytek či deficit ve fyzikálním nebo chemickém prostředí (Apel et Hirt, 2004). Příkladem může být zvýšená intenzita světla, kdy může docházet k přílišné redukci fotosyntetického elektronového transportního řetězce a tím ke vzniku přebytku ROS (He et al., 2015). Dalšími faktory způsobujícími nadprodukcí ROS mohou být ionizující záření (Yamamori et al., 2012), UV záření (de Jager et al., 2017), salinita (Van Camp et al., 1996; Hossain et Dietz, 2016), sucho (Duan et al., 2009) či chlad (McKersie et al., 1993; Zhang et al., 2016).

3.1.1 Signální role ROS

V současné době se již zcela upouští od předchozích tvrzení, že ROS jsou pouze nežádoucím výsledkem oxidačního metabolismu a neplní žádnou jinou významnou roli u rostlin. Existuje celá řada experimentálních důkazů o tom, že ROS jsou zapojeny do celé řady buněčných procesů, a především plní důležitou roli jako signální molekuly v životně důležitých procesech (Schieber et Chandel, 2014; Mittler, 2017; Waszczak et al., 2018).

Signální funkce ROS závisí v určité míře na rovnováze mezi jejich produkcí a jejich detoxikací (Foyer et Noctor, 2013). To znamená, že rovnováha je posouvána ve prospěch tvorby ROS, a to buď jejich konstantní produkcí, a/nebo snížením množství komponent antioxidační obrany (Noctor et al., 2018).

ROS mohou modulovat signalizaci prostřednictvím své schopnosti ovlivňovat strukturu řady redox-senzitivních proteinů. Dochází tak k oxidaci jejich methioninových zbytků a thiolových skupin cysteinů, následkem čehož dochází k aktivaci/inaktivaci nebo dokonce změně struktury a funkce proteinů (Waszczak et al., 2015). Tyto modifikace jsou přísně regulovány proteiny citlivými na redukci či oxidaci. Mezi ně řadíme thioredoxiny, peroxiredoxiny a glutaredoxiny, které mají schopnost reverzibilní oxidace či redukce a mohou být aktivovány nebo inaktivovány v reakci právě na redoxní stav buňky (Waszczak et al., 2015; Waszczak et al., 2018).

Konkrétním příkladem ROS podílejícím se na přímé modulaci signalizace u rostlin je H_2O_2 . Bylo zjištěno, že apoplastický H_2O_2 aktivuje receptor HYDROGEN-PEROXIDE-INDUCED Ca^{2+} INCREASES 1 (HPCA1). Ten je lokalizován na plazmatické membráně patřící do rodiny kináz bohatých na leucin (leucine-rich receptor kinase – LRR). K jeho aktivaci dochází prostřednictvím oxidace dvou párů cysteinových zbytků umístěných v jejich extracelulární doméně, což má za následek autofosforylaci HPCA1. To vede ke zrychlení přísunu Ca^{2+} prostřednictvím Ca^{2+} kanálů a následnému uzavření průduchů (Wu et al., 2020). H_2O_2 má také významnou úlohu při aktivaci obranných systémů při vystavení rostliny stresu, včetně programované buněčné smrti (Gechev et al., 2005; Castro et al., 2021).

Samotná signalizace ROS je umožněna regulovaným procesem akumulace ROS v určitých buněčných organelách. Příkladem mohou být RBOH vázané na plazmatickou membránu (Qi et al., 2017). Tyto enzymy mají zásadní roli při signalizaci ROS přes buňky na dlouhé vzdálenosti, tzv. cell to cell signalizaci. Celý tento proces je zahájen vnějším podnětem, který aktivuje tvorbu $O_2^{\cdot-}$ prostřednictvím RBOHD. Ten je uvolněn do apoplastu, kde je následně dismutován na H_2O_2 , který volně putuje apoplastem do sousedních buněk. H_2O_2 aktivuje Ca^{2+} kanály a dochází tak k nárůstu koncentrace Ca^{2+} v cytoplasmě a jejich přímou vazbou s RBOHD dojde k jejich aktivaci a zároveň

dochází také k nepřímé aktivaci proteinových kináz závislých na vápníku (CDPK – calcium-dependent protein kinase). Výsledkem tohoto procesu je nahromadění H_2O_2 v apoplastu sousedních buněk a vytvoření tzv. vlny, která se může rozšířit do celé rostliny (Miller et al., 2009).

Tato tzv. vlna ROS plní důležitou funkci v reakci na stresové podněty, kdy vysílá rostlině varovný signál a připravuje tak rostlinu na obranu na daný stresový stimul (Fichman et Mittler, 2020).

V důsledku nahromadění ROS se v rostlině spouští také další signální děje, jako je aktivace mitogen-aktivovaných protein kinázových kaskád (MAPK; Son et al., 2011; Smékalová et al., 2014), které jsou diskutovány v samostatné kapitole 3.3.2.1.

Signalizace ROS je také úzce spjata s hormonálními signálními dráhami, což rostlinám umožňuje lépe reagovat na vnější podněty, jako je stres, či regulace vývojových procesů (Mittler et al., 2011). Příkladem mohou být fytohormony, jako je kyselina abscisová, kyselina salicylová, kyselina jasmonová, ethylen či brassinosteroidy (Noctor et al., 2018; Talaat, 2019). Ty dokážou spustit produkci $O_2^{\cdot-}$ a akumulaci H_2O_2 aktivací RBOH v reakci na stresový stimul (Bartoli et al., 2013).

3.1.2 Vývojová role ROS

Jak už bylo popsáno výše, ROS hrají zásadní roli při regulaci metabolismu či při stresových reakcích. ROS mají zásadní význam i co se týče regulace vývojových procesů rostlin (Singh et al., 2016). Příkladem může být klíčení semen (Ishibashi et al., 2008), růst kořenů (Foreman et al., 2003), prodloužování pylové láčky (Cárdenas et al., 2006), lignifikace (Potikha et al., 1999), či senescence (Chen et al., 2012). Mezi nejvýznamnější ROS regulující tyto procesy patří zejména ROS tvořené v apoplastu (Waszczak et al., 2018).

Nejlépe popsaným procesem, jenž zahrnuje produkci ROS v apoplastu, je tvorba pylové láčky (Potocký et al., 2007) a zejména růst kořenových vlásků (Monshausen et al., 2009). Pro prodloužování buněk v kořenových vláscích je nezbytná stimulace produkce ROS prostřednictvím RBOH, konkrétně RBOHC. Zásluhou této stimulace dochází k aktivaci kanálů pro Ca^{2+} a spuštění přílivu extracelulárního Ca^{2+} do buňky. Právě Ca^{2+} jsou nezbytné pro elongaci buněk v kořenových vláscích a zároveň tento influx Ca^{2+} určuje s jakou rychlostí se tak bude dít (Foreman et al., 2003).

Za tvorbu pylových láček, ale zejména pro jejich správné růstové zakončení, jsou zodpovědné RBOHH a RBOHJ. Tento proces je nezbytně důležitý pro správný průběh fertilizace (Chen et Yang, 2020).

U mnohobuněčných organismů růst a vývoj závisí také na udržování rovnováhy mezi dělením a diferenciací buněk. Pro zachování této rovnováhy je důležitá dynamická rovnováha různých ROS,

konkrétně se jedná o $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Akumulace $O_2^{\cdot-}$ indukuje buněčnou proliferaci, zatímco u buněčné diferenciace hraje zásadní roli tvorba H_2O_2 . Jakmile poměry koncentrací mezi těmito dvěma druhy ROS dosáhnou určité hladiny, začínají se buňky prodlužovat (Tsukagoshi et al., 2010).

3.2 Antioxidační obrana

Vzhledem k významnosti udržování rovnováhy ROS došlo nejen u rostlin ke vzniku široké škály obranných mechanismů, které udržují hladinu ROS ve fyziologických koncentracích. Souhrnně tyto mechanismy nazýváme jako antioxidační obrana (Bellegarde et al., 2019).

Antioxidační obranu lze rozdělit na neenzymatickou a enzymatickou obranu, jejichž hlavní funkcí je snížení reaktivity ROS a dalších produktů oxidačních reakcí (Creissen et al., 1999). Mezi zástupce neenzymatické obrany řadíme hydrofilní a lipofilní antioxidanty, jako jsou karotenoidy, flavonoidy, alkaloidy, vitamin E, vitamin D, a především kyselinu askorbovou (Conklin et al., 1996; Creissen et al., 1999; de Jager et al., 2017). Taktéž glutathion (GSH) zastává klíčovou detoxifikační roli ve většině aerobních organismů, včetně rostlin (Creissen et al., 1999).

Mezi nejvýznamnější zástupce enzymatické obrany zahrnujeme katalázu (CAT), askorbát peroxidázu (APX), monodehydroaskorbát reduktázu (MDHAR), dehydroaskorbát reduktázu (DHAR), glutathion peroxidázu (GPX), glutathion reduktázu (GR) (Apel et Hirt, 2004; Asada 2006; Mhamdi et al., 2010). Jedním z nejvýznamnějších členů antioxidační obrany jsou enzymy známé jako SOD, kterým bude věnována následující kapitola 3.3.

CAT jsou významné svojí schopností rozkladu H_2O_2 na vodu a kyslík. U rostlin pozorujeme tři různé třídy CAT. Třída I, která je přítomna ve fotosyntetických pletivech, jako jsou listy, a podílí se na odklizení H_2O_2 během fotorespirace. Třída II, která se nachází v cévních svazcích, a třídu III, jenž se nachází zejména v semenech a reprodukčních pletivech (Mhamdi et al., 2010). Konkrétně v genomu *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny tři izoformy *CAT1*, *CAT2* a *CAT3*, jejichž genové produkty jsou lokalizovány v peroxizomech (Du et al., 2008).

Dále je H_2O_2 také metabolizován tzv. Foyer-Asada-Halliwellovým cyklem využívajícím askorbát a glutathion. Právě za pomoci askorbátu, který slouží jako donor elektronu, APX metabolizuje H_2O_2 na monodehydroaskorbát (MDHA), čímž je celý cyklus zahájen. Následně MDHAR přeměňuje MDHA na dehydroaskorbát (DHA), který využívá NADPH produkovaný během fotosyntézy k regeneraci askorbátu. Regenerace askorbátu z DHA je zprostředkována DHAR, která je poháněna oxidací GSH na glutathion disulfid (GSSG). Poté může nastoupit GR, která regeneruje GSH z GSSG prostřednictvím NADPH sloužícím jako redukční činidlo (Apel et Hirt, 2004; Foyer et Noctor, 2011).

Stejně tak jako APX, tak i GPX detoxikuje H_2O_2 na vodu, zde však za přímého využití GSH jako redukčního činidla. Celý cyklus GPX je opět zakončen regenerací GSH z GSSG prostřednictvím GR (Apel et Hirt, 2004).

3.3 Superoxiddismutázy

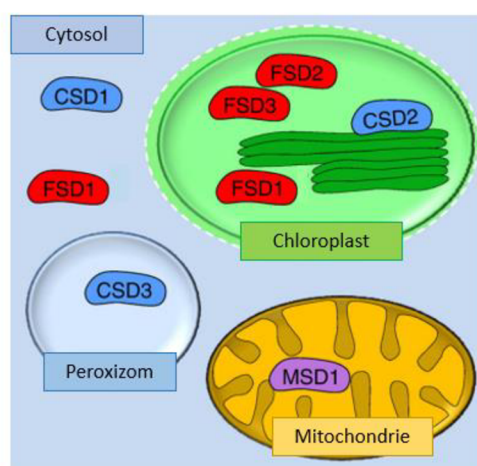
Mezi stěžejní součást antioxidantní obrany řadíme skupinu metaloenzymů označované jako SOD. Základní reakcí, kterou tyto enzymy katalyzují, je dismutace dvou molekul $\text{O}_2^{\cdot-}$ za vzniku méně toxického zástupce ROS, H_2O_2 a O_2 ($2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). Přítomnost a aktivita SOD byla prokázána již u prokaryot, cyanobakterií a eukaryot, včetně kvasinek, savců a rostlin (Pilon et al., 2011; Wang et al., 2018). SOD dělíme na základě schopnosti vázat odlišné ionty kovů ve své struktuře aktivního místa, a to konkrétně měď, zinek, železo, mangan, nebo nikl (Pilon et al., 2011). Na základě těchto vlastností jsou SOD řazeny do čtyř podskupin, a to konkrétně na Cu/ZnSOD, FeSOD, MnSOD, či NiSOD. Všechny tyto čtyři podskupiny SOD spojuje společná schopnost dismutace $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Dreyer et Schippers, 2019). Jelikož se však NiSOD nenachází u rostlin (Pilon et al., 2011), nebude dále rozebírána.

Ke vzniku těchto čtyř rozlišných skupin SOD došlo evolučně díky schopnosti organismů adaptovat se na měnící se podmínky chemického prostředí, což podpořilo vývoj nových, či zánik některých funkcí enzymatických soustav. Jedním z charakteristických znaků rozvíjení enzymatických systémů jsou právě kovy. Enzymy se proto evolucí pozměnily tak, aby byly schopny kofaktory těchto kovů začlenit do svojí struktury (Martinez Cuesta et al., 2015). Při raných začátcích naší planety se ve vnější atmosféře nacházelo praktické minimum volného O_2 (Hong Enriquez et Do, 2012). Právě toto prostředí omezilo biologickou dostupnost kovů na železo, mangan a nikl. Avšak později při vzestupu O_2 v atmosféře dochází k naprostému opaku, kdy právě měď se stává rozpustnější v přítomnosti O_2 a je tak hojnější než například železo. (Hong Enriquez et Do, 2012; Saito et al., 2003).

I přesto, že kovy jako železo, mangan, měď a zinek plní životně důležité funkce v řadě organismů, při jejich nekontrolovatelné produkci dochází ke stimulaci tvorby ROS (Ravet et Pilon, 2013).

U rostlin jsou SOD subcelulárně rozděleny podle primární produkce $\text{O}_2^{\cdot-}$. Například modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* obsahuje geny kódující sedm SOD, a to konkrétně tři Cu/ZnSOD (CSD1, CSD2, CSD3), jednu MnSOD (MSD1) a tři FeSOD (FSD1, FSD2, FSD3) s rozdílnou lokalizací a funkcí (Kliebenstein et al., 1998; Pilon et al., 2011). CSD1 se typicky nachází v cytosolu (Myouga et al., 2008; Pilon et al., 2011), CSD2 v chloroplastech (Alscher et al., 2002)

a CSD3 v peroxizomech (Kliebenstein et al., 1998). Naopak FSD1, FSD2 i FSD3 se převážně poji s přítomností v chloroplastech (Myouga et al., 2008; Kuo et al., 2013), ale výjimku tvoří FSD1, která se nachází i v cytoplasmě a jádře (Myouga et al., 2008; Dvořák et al., 2021a). Naopak MSD1 pozorujeme pouze v mitochondriích (Obrázek 2; Kliebenstein et al., 1998, Morgan et al., 2008).



Obrázek 2: Lokalizace SOD izoform v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* (převzato a upraveno z Pilon et al., 2011). CSD1-3 patří mezi Cu/ZnSOD, FSD1-3 patří mezi FeSOD, MSD1 patří mezi MnSOD

Role SOD nesouvisí pouze s ochranou organel vůči oxidačnímu stresu. Existují studie, které poukazují i na další velmi významné role SOD. Příkladem může být MSD1, pro kterou bylo prokázáno, že při její snížené hladině dochází ke zpomalení růstu kořenů a zpomalení růstu semenáčků celkově (Morgan et al., 2008). Hlavní role MSD1 se předpokládá především pro udržení mitochondriální hladiny ROS. Nicméně bylo zjištěno, že MSD1 reguluje homeostázi ROS během samičí gametogeneze, jenž je nezbytná pro normální vývoj embryonálního vaku a fertilizaci (Martin et al., 2013).

SOD mohou být cílem různých posttranslačních modifikací. Příkladem mohou být zejména nitrace, fosforylace, glutathionylace či glykace. Tyto modifikace mohou mít vliv na proteinovou aktivitu, kdy ve většině případů dochází ke snížení jejich aktivity, avšak existují i případy, kdy může dojít až k inaktivaci SOD (Yamakura et Kawasaki, 2010).

3.3.1 CSD1 a CSD2 *Arabidopsis thaliana*

Jednotliví zástupci SOD jsou odlišně regulováni. Zejména CSD1 a CSD2 jsou více abundantní v reakci na stresové podmínky produkující ROS. Jedná se zejména o stres způsobený ozonem, UV-B zářením a světlem (Kliebenstein et al. 1998, Sunkar et al. 2006). Existuje studie, která potvrzuje, že CSD2 hrají zásadní roli při vystavení rostliny silnému světelnému záření (Xing et al., 2013).

Potvrzuje to zejména studie T-DNA inzerčních mutantů *csd2*, kde byl pozorován pomalejší růst, snížená fotosyntetická aktivita a hladina chlorofylu. Stejně tak bylo prostřednictvím fenotypové analýzy zjištěno, že tyto mutanti měli menší chloroplasty a obsahovali méně granálních tylakoidů. Všechny tyto výsledky naznačují, že CSD2 chrání rostlinu před fotooxidačním stresem, a pokud by došlo k úplnému potlačení CSD2, mohlo by docházet ke vzniku závažných fenotypových projevů (Rizhsky et al., 2003).

Podobné výsledky byly pozorovány u *CSD1*-RNAi linií. I zde byl zaznamenán potlačený růst a rychlost fotosyntézy i snížená hladina chlorofylu (Xing et al., 2013). V literatuře prozatím nejsou detailně popsány fenotypové projevy *csd1* mutantní linie s vyřazenou genovou expresí (knockout). Nicméně z těchto RNAi linií lze usuzovat, že při vyřazení *CSD1* genu by mohlo dojít ke vzniku výše popsaných fenotypových projevů.

CSD jsou řízeny několika různými způsoby na transkripční a translační úrovni. Dostupnost mědi je zdaleka nejdůležitějším, téměř nezbytným faktorem, jenž reguluje expresi *CSD1* a *CSD2* (Abdel-Ghany et al., 2005). Měď také označujeme jako esenciální minerální živinu, jež je spojená jako kofaktor s Cu/ZnSOD, plastocyaninem (PC) a dalšími důležitými měď-obsahujícími proteiny (Abdel-Ghany et Pilon, 2008; Cohu et al., 2009). U rostlin hraje měď zásadní roli zejména při elektronovém transportu během fotosyntézy či dýchání, ale také při ochraně proti oxidačnímu stresu. Vysoké hladiny mědi mohou být pro buňku toxické a může tak docházet k inhibici růstu kořenů, což zahrnuje také sníženou funkci fotosystému II, inhibici syntézy chlorofylu a také tvorbu přebytečných ROS v chloroplastu. Na druhou stranu nízké hladiny mědi v buňce mohou vyústit v redukci syntézy plastochinonu, pigmentů a k redukci transportu elektronů během fotosyntézy nebo také až k rozpadu thylakoidní membrány (Abdel-Ghany et Pilon, 2008). Z tohoto důvodu dochází při nedostatku mědi k potlačení exprese *CSD1* a *CSD2* na úkor ochrany funkčnosti PC a dalších esenciálních enzymů obsahujících ve své struktuře měď. Při snížení exprese *CSD1* a *CSD2* dochází ke zvýšení abundance FSD1, jelikož CSD1 je nahrazen v cytosolu a CSD2 v chloroplastech FSD1 (Yamasaki et al., 2007; Abdel-Ghany et Pilon, 2008; Cohu et al., 2009). Tato změna exprese je zprostředkována pomocí

transkripčního faktoru SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 (SPL7; Yamasaki et al., 2009), který bude diskutován v samostatné kapitole 3.4.1.

Další možným způsobem regulace SOD mohou být například chaperonové proteiny. Tyto chaperonové proteiny, podílející se na posttranslační aktivaci SOD, jsou známy jako „copper chaperone for SOD1“ (CCS; Brown et al., 2004). Úlohou CCS je zejména aktivace Cu/ZnSOD apoenzymu. Tato funkce je zejména dobře popsána u homologa CCS u kvasinek, kdy CCS interaguje se SOD1, což vede k zabudování mědi do struktury apoenzymu a dochází ke katalýze tvorby disulfidické vazby, která vede k aktivaci SOD1 (Huang et al., 2012). Bylo také zjištěno, že pro aktivaci SOD1 je vyžadován O_2 , respektive O_2^- , stejně tak jako přísun mědi, díky čemuž dochází k urychlení aktivace CCS a následné exprese *SOD1* (Brown et al., 2004).

3.3.2 FSD1, FSD2 a FSD3 *Arabidopsis thaliana*

Jak již bylo dříve zmíněno, *Arabidopsis thaliana* obsahuje tři FeSOD (FSD1, FSD2 a FSD3), kdy každá se vyznačuje svým umístěním a funkcí (Myouga et al., 2008; Kuo et al., 2013). Hlavní funkcí všech FSD je ochrana rostliny před oxidačním stresem. Konkrétním příkladem FSD ochrany může být například její lokalizace uvnitř chloroplastu, kde dochází k tvorbě O_2^- , kdy FSD chrání fotosystém II před jeho znehodnocením (Van Camp et al., 1996; Myouga et al., 2008). Zejména se jedná o heterodimer tvořený FSD2 a FSD3, který chrání transkripčně aktivní chromozomy při raném vývoji chloroplastů před ROS (Myouga et al., 2008). Důležitou roli při indukovaném oxidačním stresu hraje taktéž FSD1. Bylo zjištěno komparativní fenotypovou analýzou *fsd1* mutantů a rostlin divokého typu, kde byla zjištěna vyšší náchylnost mutantních rostlin vůči zvýšení salinity a paraquat (Dvořák et al., 2021a).

FSD taktéž hrají nezastupitelnou úlohu během vývoje rostlin. Příkladem je důležitá role FSD2 a FSD3 pro normální růst rostlin, kdy jejich mutantní linie byly zpomaleny v růstu, vykazovaly chlorózu a měly deformované chloroplasty. Nicméně tyto linie byly schopny kvést a vytvářet semena (Myouga et al., 2008). Naopak role FSD1 byla prokázána jako významná pro normální vývoj laterálních kořenů, což bylo prokázáno na *fsd1* T-DNA inzerčních mutantech, kteří vykazovali snížený počet laterálních kořenů (Dvořák et al., 2021a).

Stejně jako ostatní SOD, tak i aktivita FSD může podléhat regulaci. Příkladem může být FSD1, jehož aktivita je regulována pomocí mediátoru chloroplast chaperonin 20 (CPN20), který aktivuje FSD1 přímou interakcí (Kuo et al., 2013).

3.3.2.1 Mitogen-aktivované proteinkinázové kaskády

Mitogen-aktivované proteinkinázové kaskády jsou konzervované intracelulární cesty, jenž se nacházejí ve všech eukaryotických buňkách (Colcombet et Hirt, 2008; Liu et He, 2017). Skládají se ze tří hierarchicky aktivovaných proteinových kináz zvaných mitogen aktivované protein kinázy kinázy kinázy (MAPKKK), mitogen aktivované protein kinázy kinázy (MAPKK) a mitogen aktivované protein kinázy (MAPK; Komis et al., 2018). Konkrétně u *Arabidopsis thaliana* bylo odhaleno 60 MAPKKK, 10 MAPKK a 20 MAPK (Ichimura et al., 2002).

Prostřednictvím regulace MAPK kaskád jsou buňky schopny reagovat na řadu abiotických a biotických stresů (Sinha et al., 2011). Stejně tak se MAPK podílejí i na dalších aspektech fyziologie rostlin jako je buněčné dělení (Komis et al., 2011), či růst a vývoj rostlin (Xu et Zhang, 2015).

Přenos signálu MAPK kaskád je aktivován MAPKKK prostřednictvím stimulace receptorů plazmatické membrány prostřednictvím stimulů jako jsou ROS, Ca²⁺ ionty, či hormony (Smékalová et al., 2014). Následně se aktivuje MAPKK fosforylací dvou serinových a threoninových zbytků v S/T-X3-5-S/T (kde X značí libovolnou aminokyselinu) motivu MAPKK. Jako poslední dochází k aktivaci MAPK fosforylací jejich threoninových a tyrosinových zbytků v motivu T-X-Y vyvolanou MAPKK (Jagodzik et al., 2018). Takto aktivované MAPK následně regulují aktivitu dalších proteinových kináz (Popescu et al., 2009), či transkripčních faktorů (Ishihama et Yoshioka, 2012).

Aktivitu transkripčních faktorů regulují MAPK prostřednictvím fosforylace. Příkladem může být třeba MYB DOMAIN PROTEIN 44, který je fosforylován skrze MPK4 a MPK6 (Persak et Pitzschke, 2013), stejně tak je tomu i u kupříkladu HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A4A (HSFA4A). Tento transkripční faktor je znám jako regulátor odpovědi na tepelný šok. Všeobecně jsou transkripční faktory tepelného šoku známy svou rolí při vystavení rostliny abiotickým stresům, kdy dochází k nadměrné expresi HSFA4A a tím nastává snížení H₂O₂. Mimo jiné se HSFA4A podílí také na aktivaci genů regulujících jiné transkripční faktory, které hrají také zásadní roli v odpovědi rostlin na biotické a abiotické stresy. Mluvíme tak například o ZING FINGER PROTEIN ZAT12, ZING FINGER PROTEIN ZAT6, CYSTEIN-RICH RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 13 a dalších (Pérez-Salamó et al., 2014).

MAPK fungují také jako regulátory antioxidační obrany. Jelikož jejich genetické modifikace mohou za různých podmínek prostředí změnit profil exprese mnoha antioxidačních enzymů, a to především SOD (Dvořák et al., 2021b). Příkladem může být *Arabidopsis thaliana*, u které bylo pozorováno, že při vystavení rostliny intenzivnímu záření dochází k aktivaci MAPK. Konkrétně hovoříme o MKK5, jenž slouží jako regulátor, který dokáže zprostředkovat zvýšenou expresi genů *CSD1* a *CSD2* při vystavení rostliny světelnému stresu. U rostlinných linií *MKK5*-RNAi byla výrazně

snížena exprese a aktivita CSD1/CSD2. Vzájemné propojení MAPK a CSD bylo taktéž dokumentováno u rostlinných linií *MKK5-RNAi* a *CDS1/2-RNAi*, u kterých byla pozorována vyšší citlivost vůči světelnému stresu (Xing et al., 2013).

3.4 SQUAMOSA promoter-binding protein-like transkripční faktory

SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) proteiny představují rodinu transkripčních faktorů zapojených do celé řady buněčných pochodů (Yamasaki et al., 2004). Tyto transkripční faktory jsou přítomny ve všech zelených rostlinách, včetně jednobuněčných zelených řas, mechů, nahosemenných a krytosemenných rostlin (Preston et Hileman, 2013). SPL geny plní celou řadu důležitých funkcí během růstu a vývoje rostlin, včetně změny vegetativní fáze, doby kvetení či iniciace tvorby listů (Si et al., 2016; Preston et Hileman 2013).

Počet těchto genů se může lišit u různých rostlinných druhů. Například genom *Arabidopsis thaliana* kóduje 17 genů SPL, kde však SPL13A a SPL13B, SPL10 a SPL11 se ukázaly jako tandemové duplikace, kdy každý pár genů sdílel stejné nukleotidové a aminokyselinové sekvence. U rýže bylo pozorováno 19 genů SPL (Yang et al., 2008; Chen et al., 2010).

Samotné SPL proteiny jsou relativně rozmanité svou funkcí a svými sekvencemi aminokyselin (Liu et al., 2016). U *Arabidopsis thaliana* můžeme pozorovat velikosti od 131 (AtSPL3) až po 927 (AtSPL12) aminokyselin (Chen et al., 2010). Právě na základě sekvence a velikosti a genové struktury je lze rozdělit do jednotlivých podskupin (Yang et al., 2008). SPL se dělí na strukturně složitější velké SPL (SPL1, SPL7, SPL12, SPL14, SPL16), které jsou exprimovány konstitutivně, a malé SPL. Ty mají jednodušší složení domény, s výjimkou SPL8, jsou posttranskripčně regulovány prostřednictvím mikroRNA (Rhoades et al., 2002; Schwab et al., 2005).

Společným charakteristickým rysem SPL proteinů je vysoce konzervovaná SBP (SQUAMOSA binding protein) doména, která je dlouhá 76 aminokyselin (Birkenbihl et al., 2005). Tato doména je zodpovědná za jaderný import a vazbu DNA do specifické oblasti promotoru cílových genů prostřednictvím dvou motivů (Zn-1 a Zn-2), jenž jsou podobné zinkovým prstům (Yamasaki et al., 2004; Birkenbihl et al., 2005; Guo et al., 2008). Ve zmíněné oblasti promotoru se vyskytuje motiv TNCGTACAA, kde N značí libovolnou bázi (Cardon et al., 1999; Yamasaki et al., 2004). Nicméně náhodným výběrem cílového místa bylo dokázáno, že konkrétně sekvence GTAC je nezbytná pro efektivní vazbu na DNA (Birkenbihl et al., 2005; Kropat et al., 2005).

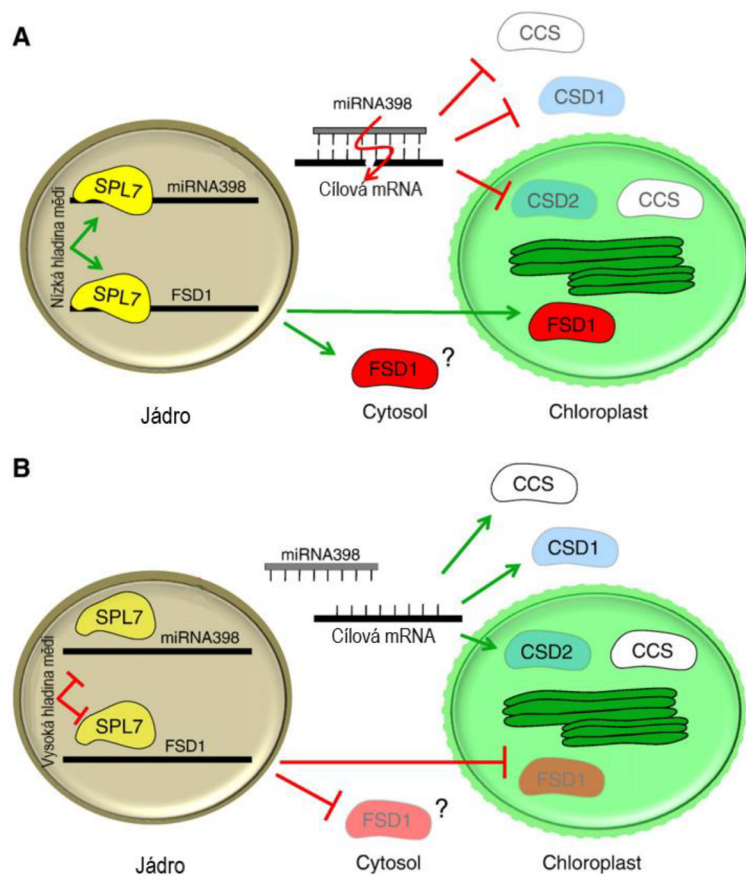
3.4.1 SPL7

SPL7 patří mezi nejlépe prostudované SPL vůbec. Jeho exprese se v průběhu vývoje rostlin postupně zvyšuje. K nejvyšší expresi dochází před kvetením i přesto, že akumulace mRNA SPL7 se nachází převážně v kořenovém systému, stoncích a květech (Yamasaki et al., 2009; Garcia-Molina et al., 2014; Jorgensen et Preston, 2014). SPL7 protein značený pomocí fúze se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP – green fluorescent protein) byl pozorován v jádře a v blízkosti plazmatické membrány. Fúzní protein je s největší pravděpodobností připojen taktéž k endomembránovému systému, a to konkrétně k endoplazmatickému retikulu (Garcia-Molina et al., 2014).

SPL7 společně s transkripčním faktorem Cu-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1 jsou hlavními regulátory homeostázy mědi u *Arabidopsis thaliana*. SPL7 reguluje genovou expresi při deficienci mědi přímou vazbou na GTAC motiv. Tento motiv obsahuje elementy reagující na nedostatek mědi (Cu deficiency-responsive elements – CuRE), které jsou umístěné v promotorové oblasti genů, jenž se také podílejí na regulaci homeostázy Cu^{2+} (Garcia-Molina et al., 2014). Mezi tyto geny můžeme zařadit *Fe reductázové oxidázy* (Jain et al., 2014), *Copper Transporters* proteinové rodiny (Jung et al., 2012), *FSD1* a některé *miRNA* (Yamasaki et al. 2009; Yan et al., 2017).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.1, *CSD1*, *CSD2* a *FSD1* jsou regulovány prostřednictvím SPL7. SPL7 se při nízkých hladinách Cu^{2+} váže do CuRE promotorové sekvence a tím indukuje expresi *FSD1*. Zároveň dochází k navázání SPL7 na GTAC motiv v promotorové oblasti Cu-regulovaných *miRNA*, v tomto případě konkrétně *miR398*, což vede ke zvýšení její exprese. Následně pak *miR398* cíleně snižuje abundanci *CSD1*, *CSD2* a také jejich chaperonových CCS mRNA (Obrázek 3; Abdel-Ghany et al., 2005; Pilon et al., 2016; Yamasaki et al., 2009). SPL7 tak hraje nezaměnitelnou roli jako modulátor homeostázy mědi prostřednictvím *miRNA* a přímé stimulace exprese cílových genů (Burkhead et al., 2008; Araki et al., 2018).

Všechny důležité role SPL7 byla prokázány studiem mutantů *spl7*. Ty ukázaly, že mutant *spl7* akumuluje méně Cu^{2+} a má různé vývojové vady při nízkých koncentracích Cu^{2+} v růstovém médiu (Yamasaki et al., 2009; Schulten et al., 2019).



Obrázek 3: Schematicky znázorněná regulace SOD exprese prostřednictvím SPL7 (převzato a upraveno z Pilon et al., 2011). A – Při nízkých koncentracích mědi SPL7 aktivuje transkripci miRNA398, která poté cíleně snižuje abundanci CCS, CSD1 a CSD2. Naopak exprese FSD1 je prostřednictvím SPL7 zvyšována. B – Při vysokých koncentracích mědi je snižována exprese FSD1, a naopak abundanci CCS, CSD1 a CSD2 je zvyšována. CCS – copper chaperone for SOD; CSD1 – Cu/ZnSOD ležící v cytosolu; CSD2 – Cu/ZnSOD ležící v chloroplastech; FSD1 – FeSOD; SPL7 – SQUAMOSA promoter-binding protein-like7.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- *Arabidopsis thaliana*: ekotyp Columbia (Col-0; rostliny divokého typu); mutantní linie genu *CSD1*: SALK_109389 a SALK_024857. Semena byla získána z Nottingham Arabidopsis Stock Center (Nottingham, Velká Británie).

4.2 Chemikálie

- 2-merkptoethanol (Sigma Aldrich, kat. č. M6250)
- 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma Aldrich, kat. č. H3375)
- Agarosa (Sigma Aldrich, kat. č. A2576)
- Akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid, 40%, 37,5:1 (BioRad, kat. č. 1610148)
- Anti Cu/ZnSOD, primární protilátka (rabbit; Agrisera, kat. č. AS06 170)
- Anti Rabbit, sekundární protilátka (Thermo-Fischer, kat. č. 31460)
- cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete; Roche, kat. č. 11697498001)
- Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na₂EDTA; Sigma Aldrich, kat. č. E5134)
- Dihydrát molybdenanu sodného (NaMoO₄·2H₂O; Sigma Aldrich, kat. č. M1651)
- 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)
- Dusičnan draselný (KNO₃; Sigma Aldrich kat. č.: P6030)
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma Aldrich, kat. č. E5134)
- Ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA; Sigma Aldrich: E3889)
- Fluorid sodný (NaF; Sigma Aldrich, kat. č. 201154)

- Gellan Gum (Alfa Aesar, kat. č. Y28C036)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM1331)
- Glycerol (Sigma Aldrich, kat. č. G5516)
- Heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. 230391)
- Heptahydrát síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. Z0251)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. 769495)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Bovine serum albumin; Sigma Aldrich, kat. č. A2153)
- Hydroxid draselný (KOH; Sigma Aldrich, kat. č. 60130)
- Hydroxid sodný (NaOH; Sigma Aldrich, kat. č. S8045)
- Chlorid nitrotetrazoliové modři (NBT; Sigma Aldrich, kat. č. N6876)
- Chlorid sodný (NaCl; Sigma Aldrich, kat. č. 31434)
- Chlorid vápenatý (CaCl_2 ; Sigma Aldrich, kat. č. C2661)
- Kyselina boritá (H_3BO_3 ; Sigma Aldrich, kat. č. B7901)
- Kyselina chlorovodíková (HCl; Sigma Aldrich, kat. č. 30721)
- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich, kat. č. A92902)
- Laemliho pufr, 4X (BioRad, kat. č. 1610747)
- Methanol (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, kat. č. Sigma Aldrich; T9281)
- Odtučněné sušené mléko, Blotting Grade Blocker (BioRad, kat. č. 1706404)
- Pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Duchefa Biochemie, kat. č. C0508)
- Peroxodisíran amonný (APS; Sigma Aldrich, kat. č. A3678)
- Ponceau S (Sigma Aldrich, kat. č. 78376)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, kat. č. 1610374)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5X (Bradfordovo činidlo; BioRad, kat. č. 5000006)
- Riboflavin (Applichem, kat. č. A0968,0010)
- Sacharosa (Sigma Aldrich, kat. č. S8501)
- Tetrahydrát dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, kat. č. C1396)
- Tetrahydrát chloridu hořečnatého ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Applichem, kat. č. A7326)
- Tris Acetát EDTA (TAE), 10X (Sigma Aldrich, kat. č. 574797)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, kat. č. P1379)

4.3 Soupravy

- Clarity Western ECL Substrate (BioRad, kat. č. 1705061)
- Phire Green Hot Start II DNA Polymeráza (Thermo Scientific, kat. č. F124S)
- Polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána (GE Healthcare, kat. č. GE10600023)

4.4 Roztoky a jejich příprava

1% (w/v) agarosový gel (100 ml):

- 100 ml TAE, 1X
- 1 g agarosa
- 5 µl Midori Green Advance DNA/RNA stain

½MS médium (1000 ml):

- 10 g sacharosa
- 0,5 g MES
- 2,15 g MS médium
- 6,5 g Gellan Gum
- pH 5,8 (KOH)
- Doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou
- Sterilizace autoklávováním

APS, 10% (w/v):

- 0,1g APS
- Doplnit do objemu 1 ml deionizovanou vodou

Ara médium (250 ml):

- 25 ml zásobní roztok makroelementy
- 2,5 ml zásobní roztok železa
- 27,75 mg CaCl₂
- 2,5 g sacharóza
- 0,125 g MES, pH 5,7
- 1,5 g Gellan gum

- 250 μl zásobní roztok mikroelementy (přidat po autoklávování)

E pufr (100 ml):

- 4,198 mg NaF
- 1,19 g HEPES, pH 7,8 (NaOH)
- 0,43 g NaCl
- 38 mg EGTA
- 9,52 mg MgCl_2
- 10 ml glycerol
- Doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou
- 10 tablet cOplete
- 100 μl DTT, $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

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):

- 1,1998 g NaH_2PO_4
- pH 7,8 (NaOH)
- 35,2 mg kyselina L-askorbová
- 20 ml glycerol
- Doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou

Ponceau S, roztok (500 ml):

- 0,5 g Ponceau S
- 25 ml kyselina octová
- Doplnit do objemu 500 ml deionizovanou vodou

Rozdělovací gel, 12% (10 ml):

- 3 ml akrylamid/ N,N' -metylenbisakrylamid
- 2,5 ml TrisCl, $1,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 8,8

- 4,45 ml deionizovaná voda
- 5 μ l TEMED
- 50 μ l APS, 10% (w/v)
- Pro případ SDS-PAGE bylo přidáno 0,1 ml SDS, 10% (w/v)

SDS 10% (w/v):

- 10 g SDS
- Doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou

TAE, 1X (1000 ml):

- 100 ml TAE, 10X
- Doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou

Tris buffer saline s přísávkem Tween 20 (TBS-T; 2000 ml):

- 4,84 g Tris
- 17,56 g NaCl
- pH 7,4 (HCl)
- Doplnit do objemu 1998 ml deionizovanou vodou
- 2 ml Tween 20

Tris-Cl, 0,5 mol \cdot dm⁻³, pH 6,8 (100 ml):

- 6 g Tris
- pH 6,8 (HCl)
- Doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou

Tris-Cl, 1,5 mol \cdot dm⁻³, pH 8,8 (300 ml):

- 54,45 g Tris
- pH 8,8 (HCl)
- Doplnit do objemu 300 ml deionizovanou vodou

Tris-glycinový pufr (1000 ml):

- 3 g Tris
- 14,4 g glycin
- Doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou

Zaostřovací gel, 4% (5 ml):

- 0,5 ml akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid
- 1,26 ml TrisCl, $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 6,8
- 3,23 ml deionizovaná voda
- 5 μl TEMED
- 25 μl APS, 10% (w/v)
- Pro případ SDS-PAGE bylo přidáno 0,05 ml SDS, 10% (w/v)

Zásobní roztok makroelementy, 10X (1000 ml):

- 5,06 g KNO_3
- 3,4 g KH_2PO_4
- 3,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 4,82 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Zásobní roztok mikroelementy, 1000X (250 ml):

- 1,075 g H_3BO_3
- 560 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 65 mg (pro koncentraci mědi $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 6,5 mg (pro koncentraci mědi $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$),
0,65 mg (pro koncentraci mědi $0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 12,5 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 145 mg NaCl
- 72,5 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,625 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Zásobní roztok železa, 100X (50 ml):

- 186,1 mg Na_2EDTA
- 55,75 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

4.5 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytická váha XA110/2X (Radwag, Polsko)
- Digestor (MERCİ; Česká republika)
- Dokumentační systém Gel Doc EZ Imager (BioRad; USA)

- Elektroforetická vana Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad; USA)
- Elektroforetická vana Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad; USA)
- Elektroforetická vana Wide Mini-Sub Cell GT Cell (BioRad; USA)
- Flowbox (MERCİ; Česká republika)
- ChemiDoc MP Imaging System (BioRad; USA)
- Chlazená centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter; USA)
- Image Scanner III (GE Healthcare)
- Infinite M Nano (TECAN; Švýcarsko)
- Kultivační místnost (WEISS Gallenkamp; Německo)
- PCR cykler T100 Thermal Cycler (BioRad; USA)
- pH metr (Eutech Instruments; Singapur)
- Simplicity Water Purification System (Merk; Německo)
- Spektrofotometr SmartSpec Plus (BioRad; USA)
- Stolní centrifuga ScanSpeed 1730R (LaboGene; Dánsko)
- Suchá lázeň ThermoCell MixingBlock (Bioer; Čína)
- Třepačka MR-12 (Biosan; Lotyšsko)
- Vortex Genie 2Pulse (Genie; Holandsko)
- Zdroj napětí PowerPac HV (BioRad; USA)

4.6 Seznam použitých programů a databází

- AthaMap (<http://www.athamap.de>) (Hehl et al., 2016)
- ATTED-II (http://atted.jp/top_search.shtml#CoExSearch) (Obayashi et al., 2018)
- Group-based Prediction System 3.0 (GPS 3.0) (Xue et al., 2005)
- Image Lab (verze 4.0.1 build 6; BioRad; USA)
- Image Processing and Analysis on Java (ImageJ; 1.51j8)
- Microsoft Excel, PowerPoint (Microsoft; USA)
- PhosPhAt 4.0 (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/>) (Zulawski et al., 2013)
- T-DNA Primer Design Tool (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org/>)
- The Eukaryotic Linear Motif (ELM) (<http://elm.eu.org/>) (Kumar et al., 2020)

4.7 Metodika

4.7.1 Bioinformatická predikce regulace exprese *CSD1* a *CSD2* genů

Predikce potenciaálních transkripčních faktorů schopných regulovat expresi *CSD1* a *CSD2*, které mohou být případně regulovány MAPK, byla provedena pomocí vícerych programů.

Nejprve byly identifikovány transkripční faktory specifické pro *cis* elementy přítomné v promotorové oblasti cílových *CSD1* a *CSD2* genů pomocí softwaru AthaMap (Genová analýza – „Upstream“ oblast: -1000; „Downstream“ oblast: 50; % omezení pro vysoce konzervovaná vazebná místa pro transkripční faktory: 0; výběr transkripčních rodin: „ALL“) (<http://www.athamap.de>) (Hehl et al., 2016). Následně byly vybrané transkripční faktory analyzovány s využitím softwaru GPS 3.0 (specifické druhy: *Arabidopsis thaliana*; skupina kináz: „CMGC/MAPK“) pro přítomnost specifických fosforylačních míst pro MAPK (Xue et al., 2005). U transkripčních faktorů vykazujících pozitivní výsledek byla provedena identifikace dokovacích sekvencí specifických pro MAPK pomocí ELM databáze (buněčný kompartment: nespecifikovaný; taxonomický kontext: *Arabidopsis thaliana*) (<http://www.elm.eu.org>) (Kumar et al., 2020). Informace o experimentálně prokázané fosforylaci byly získány z databáze PhosPhAt 4.0 (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/>) (Zulawski et al., 2013). Nakonec bylo zjištěno, zda identifikované transkripční faktory jsou koexprimovány s geny našeho zájmu (*CSD1*, *CSD2*, *MPK3*, *MPK4*, *MPK6*), a to s využitím softwaru ATTED-II (http://atted.jp/top_search.shtml#CoExSearch) (Obayashi et al., 2018).

4.7.2 Povrchová sterilizace semen

Semena *Arabidopsis thaliana* byla ve flowboxu sterilizována v mikrozkuhavce pomocí 1 ml 70% (v/v) ethanolu. Obsah mikrozkuhavky byl míchán po dobu 6 min a následně po sedimentaci semen byl 70% (v/v) ethanol odebrán a nahrazen 96% (v/v) ethanolem. Následně byl opět obsah mikrozkuhavky jejím překlápěním promíchán a po uplynutí 2 min a sedimentaci semen byl 96% (v/v) ethanol odstraněn. Poté byla semena celkem pětkrát promývána deionizovanou vodou a takto připravená semena byla poté přenesena na sterilní filtrační papír umístěný v Petriho misce.

4.7.3 Výsev sterilních semen

Sterilní semena byla ve flowboxu přenesena z filtračního papíru pomocí párátko na připravené ½MS médium, nebo Ara médium o koncentraci mědi 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v Petriho miskách, které byly uzavřeny pomocí parafilmu. Poté byla semena v miskách stratifikována za účelem synchronizace klíčení přes noc ve tmě při 4 °C. Následně byla takto připravená semena v miskách kultivována v kultivační místnosti při 22 °C, 70% vlhkosti, ve svislé poloze, za denního režimu při intenzitě osvětlení 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kdy docházelo ke střídání 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

4.7.4 Alelově specifická PCR

Po čtrnáctidenní *in vitro* kultivaci byly z rostlin pěstovaných v Petriho miskách odebrány části listů (cca 2 mm²) s využitím sterilních nůžek a pinzety ošetřených 70% (v/v) ethanolem (prováděno ve flowboxu). Případně byl odebrán i biologický materiál z rostlin pěstovaných *ex vitro*, tedy v květináčích se substrátem.

Takto získané fragmenty listů byly vloženy do mikrozkuhavky spolu s extrakčním pufrem o objemu 50 μl (Dilution Buffer; Phire Plant Direct PCR Kit), kde byl list mechanicky rozmělněn prostřednictvím 10 μl špičky. Vzniklá směs v mikrozkuhavce byla následně přemístěna do ledové tříště a inkubována nejméně 60 min. Takto připravený vzorek DNA byl následně použit pro alelově specifickou PCR, která byla připravena podle Tabulky 2. Teplotní program reakce byl nastaven podle Tabulky 3 a primery, které byly použity, jsou poté uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 2: Reakční směs pro alelově specifickou PCR s využitím Phire Plant Direct PCR Kitu.

	Výsledná koncentrace	Objem 1 reakce [μl]
Phire Plant Tissue PCR puf, 2X		10
Phire Hot Start II DNA polymeráza		0,4
Primer, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	FW	0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
	REV	0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
Deionizovaná voda		7
DNA templát		0,6
Celkový objem		20

Tabulka 3: Nastavení teplotního programu pro alelově specifickou PCR.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	5 min	1
Denaturace	98	5 s	30
Anelace	63	5 s	
Extenze	72	23 s	
Finální Extenze	72	1 min	1

Tabulka 4: Seznam sekvencí použitých primerů pro alelově specifickou PCR. LB – Left T-DNA Border primer; LP – Left genomic Primer; RP – Right genomic Primer.

Typ	Název	Sekvence (5' → 3')
LB	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
LP	SALK_024857-LP	ATGAACCCCGAGTTACCAGAG
RP	SALK_024857-RP	TTGCAGTTTTGAACAGCAGTG
LP	SALK_109389-LP	TCTTCTGAAGATGCCTTGACC
RP	SALK_109389-RP	GTCATTACCCTTCCGAGGTC

Navržení primerů bylo provedeno pomocí programu T-DNA Primer Design Tool. Byly navrženy celkem 3 primery: LB, LP a RP, kdy primer LB (Left T-DNA Border) je shodný pro všechny použité linie. Označení primerů LP (Left genomic) a RP (Right genomic) se shoduje s označením linie, pro kterou byly primery navrženy.

Následně podle amplifikovaných úseků bylo možné odlišit jednotlivé genotypy, a to prostřednictvím použitých primerů LB, LP a RP. Kombinace primerů LP a RP udává alelu divokého typu a kombinace primerů LB a RP poukazuje na přítomnost T-DNA inzerce v daném genu.

Pro kombinaci primerů LP a RP (detekce alely divokého typu) byla předpokládána velikost fragmentů u linie SALK_024857 1220 bp a u linie SALK_109389 1176 bp. Velikost fragmentů při

použití primerů LB a RP (detekce T-DNA inserce) se u linie SALK_024857 pohybuje mezi 562–862 bp a u linie SALK_109389 mezi 503–803 bp. Rozmezí je uvedeno z důvodu nejednoznačné polohy inserce.

4.7.5 Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu

PCR produkty byly separovány pomocí horizontální elektroforetické separace v 1% (w/v) agarosovém gelu s využitím GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (3 μ l) jako markeru relativní molekulové hmotnosti. Ke vzorku (20 μ l) byly přidány celkově 4 μ l DNA Gel Loading Dye, 6X. Elektroforetická separace probíhala 35–45 min při 100 V, pokud není uvedeno jinak. Vizualizace DNA v gelu byla provedena pomocí zařízení Gel Doc EZ Imager. Získaný obrazový záznam byl poté upraven s využitím programu Image Lab a na závěr zpracován pomocí Microsoft PowerPoint do finální podoby.

4.7.6 Extrakce proteinů pro biochemické analýzy

Do předem vychlazené třecí misky bylo přeneseno 8 semenáčků desetidenních rostlin *Arabidopsis thaliana* kultivované *in vitro*. Za pomoci tloučku a tekutého dusíku byl rostlinný materiál homogenizován a vzniklý homogenát byl následně přenesen do 1,5ml mikrozkušavky a převrstven 200 μ l extrakčního pufru. Jako extrakční pufr pro stanovení enzymatické aktivity byl použit fosfátový pufr a pro elektroforetickou separaci za denaturujících podmínek (SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) E pufr. Vzniklá směs byla s využitím vortexu promíchána a poté uložena na led nejméně na 30 min a následně centrifugována při 18000 g, 15 min, při 4 °C. Po provedení centrifugace byl supernatant odebrán a přenesen do čisté 1,5ml mikrozkušavky.

4.7.7 Měření koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno podle Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Do každé jamky 96jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 299 μ l Bradfordova činidla, 1X, které bylo nejprve připraveno z Bradfordova činidla, 5X naředěním deionizovanou

vodou. K 299 μl Bradfordova činidla, 1X v jamce byl následně přidán 1 μl proteinového extraktu a obsah byl propipetován. Vzorek byl poté inkubován po dobu 10 min, ne však déle jak 30 minut, při laboratorní teplotě a následně měřen při vlnové délce 595 nm s využitím spektrofotometru s monochromátorem Infinite M Nano (TECAN). Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních a stanovení množství proteinů bylo provedeno pomocí kalibrační křivky, jež byla sestavena s využitím roztoků BSA o známé koncentraci. Zpracování dat bylo provedeno pomocí Microsoft Excel.

4.7.8 Stanovení enzymatické aktivity SOD

Pro stanovení enzymatické aktivity SOD bylo použito 20 μg proteinů extrahovaných s využitím fosfátového pufru. Elektroforetická separace těchto proteinů probíhala za nenedenaturujících podmínek v 1,5mm polyakrylamidovém gelu, jenž byl připraven ze 4% zaostřovacího a 12% rozdělovacího gelu. Samotná elektroforetická separace probíhala při konstantním proudu 20 mA na gel, 120 min s využitím tris-glycinového pufru jakožto elektrodového pufru. Po provedení separace byl gel přenesen do 50 ml fosfátového pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu, ve kterém byl inkubován po dobu 10 min při pokojové teplotě. Po uplynutí daného časového intervalu byl dále gel inkubován ve tmě po dobu 20 min v 50 ml fosfátovém pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu s $0,6\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NBT. Poté následovala inkubace opět ve tmě pouze 15 min ve fosfátovém pufru bez kyseliny L-askorbové a glycerolu s $5\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Na_2EDTA , 0,25% TEMED a $0,06\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ riboflavinem. Tím byla inkubace ukončena a gel byl poté vystaven zdroji světla o intenzitě $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 5 min za laboratorní teploty. Následně byl inkubační roztok vyměněn za deionizovanou vodu. Pro dokumentaci výsledného gelu byl využit Image Scanner III (GE Healthcare) a na závěr zpracován pomocí Microsoft PowerPoint do finální podoby.

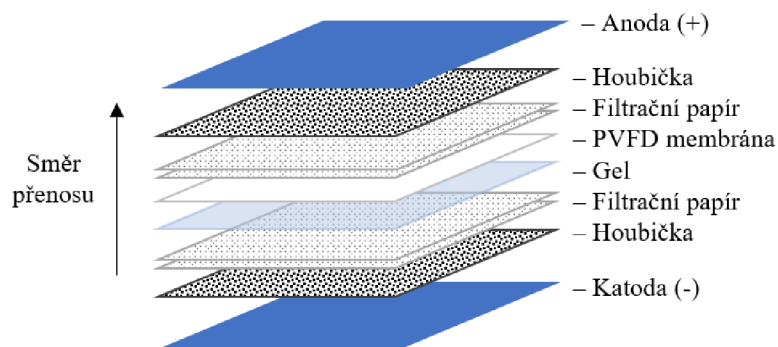
4.7.9 SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE bylo využito 15 μg proteinů získaných prostřednictvím extračního E pufru. Proteinový extrakt byl smíchán s Laemliho pufrem v poměru 3:1, který byl nejprve připraven smícháním s 2-merkptoethanolem v poměru 9:1. Takto připravené vzorky byly promíchány pomocí vortexu a následně denaturovány inkubací 10 min při teplotě 95 °C. Denaturované vzorky byly ponechány zchladnout na pokojovou teplotu a krátce centrifugovány na stolní centrifuze. SDS-PAGE

byla provedena v Imm polyakrylamidovém gelu jenž byl připraven ze 4% zaostřovacího a 12% rozdělovacího gelu s přidavkem SDS jako denaturujícího činidla. Takto připravený gel byl upevněn do elektroforetického aparátu a umístěn do elektroforetické vany. Do každé z jamek byl napipetován objem nutný pro dosažení 15 µg nanesených proteinů, vyjma první jamky, kde bylo napipetováno 5 µl proteinového standardu (Precision Plus Protein Dual Colour Standards). Samotná separace probíhala 15 min při 100 V a dále 60 min při 150 V s využitím elektroforetického pufru jakožto elektrodového pufru.

4.7.10 Imunoblotování

Proteiny získané elektroforetickou separací za denaturujících podmínek byly přeneseny na PVDF membránu o rozměrech 9 cm na délku a 6,5 cm na výšku, která byla nejdříve rehydratována v methanolu po dobu 30 sekund. Pro samotný přenos byla připravena kazeta, která byla sestavena podle Obrázku 4, kde byla membrána inkubována 10 min s filtračním papírem, houbičkami a polyakrylamidovým gelem v tris-glycinovém pufru obsahující 10% (v/v) methanol. Složená kazeta byla vložena do vany, která byla umístěna v ledové tříšti. Samotný přenos probíhal při konstantním napětí 24 V přes noc. Poté byla membrána vyjmuta z kazety a omyta deionizovanou vodou. Pro dokumentaci byly všechny membrány obarveny roztokem Ponceau S, následně třikrát promyty deionizovanou vodou a zdokumentovány pomocí Image Scanner III (GE Healthcare). Po provedení dokumentace byly membrány odbarveny promytím v TBS-T. Pro detekci SOD bylo nutné membrány nejprve blokovat, a to v 5% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T (přes noc, při 4 °C). Den poté, po odstranění blokovacího roztoku, byla membrána inkubována (přes noc, při 4 °C) v roztoku obsahujícím primární protilátku anti Cu/ZnSOD (1:2000). Použité primární protilátky byly naředěny v 1% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána v pěti opakováních promývána roztokem TBS-T po dobu 5 min. Nakonec byla provedena inkubace (1,5 hodiny) v roztoku obsahujícím sekundární protilátku (anti rabbit protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou, 1:5000). Použitá sekundární protilátka byla nejprve naředěna v 1% (w/v) roztoku BSA v TBS-T. Po ukončení poslední inkubace byla membrána opět v pěti opakováních promývána roztokem TBS-T po dobu 5 min.



Obrázek 4: Popis jednotlivých vrstev v kazetě pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu.

Pro vizualizaci značených proteinů byla membrána inkubována 2 min v substrátu Clarity Western ECL Substrate, jenž byl připraven podle pokynů výrobce. Následná dokumentace byla provedena pomocí dokumentační jednotky ChemiDoc MP Imaging System a protokolu Chemi. Obrazový záznam byl vyhodnocen prostřednictvím Image Lab.

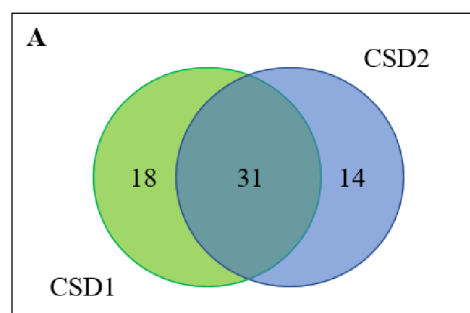
5 Výsledky

5.1 Bioinformatická predikce regulace exprese *CSD1* a *CSD2* genů

Za účelem predikce potencionálních transkripčních faktorů schopných regulovat expresi genů *CSD1* a *CSD2*, které mohou být případně regulovány MAPK, byla provedena bioinformatická analýza s využitím několika programů.

Jako první byly s využitím predikčního softwaru AthaMap (Hehl et al., 2016) identifikovány potencionální transkripční faktory schopné navázat se do sekvence v promotorové oblasti *CSD1* a *CSD2* genů. Pro gen *CSD1* bylo získáno 65 potencionálních transkripčních faktorů (Příloha 3) a pro gen *CSD2* bylo identifikováno 58 potencionálních transkripčních faktorů (Příloha 4). Z nich byly následně vyřazeny ty transkripční faktory, které nenáležely naší modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* pro oba zkoumané geny (Příloha 3, 4).

Následně byly v aminokyselinových sekvencích vybraných transkripčních faktorů predikovány pomocí softwaru GPS 3.0 (Xue et al., 2005) MAPK-specifická potencionálně fosforylovatelná místa a také pravděpodobnost, že v tomto místě dochází k fosforylaci vyjádřena pomocí skóre (Příloha 5, 6, 7). Vyšší skóre ukazuje na vyšší pravděpodobnost možné fosforylace. Dalším významným údajem, který tento software poskytuje, je pozice rezidua. Tento údaj nám vyznačuje potenciálně fosforylovatelné reziduum, kde může případně docházet k fosforylaci. V našem případě se jedná o serin a threonin, což je dáno tím, že MAPK řadíme mezi serin/threonin kinázy (Jagodzík et al., 2018). Ne u všech transkripčních faktorů byla získána MAPK-specifická fosforylovatelná místa. Byly proto vyřazeny pro další analýzy ze souboru vstupních dat sloužící pro identifikaci MAPK-specifických fosfopeptidů pomocí GPS 3.0 (Příloha 3, 4). Celkově tak bylo pro gen *CSD1* vyselektováno 49 transkripčních faktorů (Obrázek 5: zelené pole) a pro gen *CSD2* 45 transkripčních faktorů (Obrázek 5: modré pole), z nichž celkem 31 transkripčních faktorů je schopných potencionálně regulovat, jak gen *CSD1*, tak gen *CSD2* (Obrázek 5: překryv).



B

	Počet transkripčních faktorů	Transkripční faktory
Specifické transkripční faktory pro <i>CSD1</i>	18	SPL8, F-box/kelch-repeat protein, MYB52, ZML2, TOE1, NAC3, EIN3, Putative C2H2-zinc-finger-type, MYB55, RR10, HSF4, Putative C2H2-zinc-finger-type, HB51, TGA2, bZIP1, MYB59, LFY, TGA1
Transkripční faktory společné pro <i>CSD1</i> a <i>CSD2</i>	31	MYB61, RAV1, LEC2, BZIP60, ICU4, AHL12, ARR11, RR14, DAZ1, GLK1, ASL18, YAB1, CCA1, NAC046, MYB83, NAC058, AHL20, AGF1, WOX13, TREE1, ZAT6, MYB46, AGL15, KAN1, RVE1, SPL7, GT2L, MYB111, TOE2, HSF2A, SCAP1
Specifické transkripční faktory pro <i>CSD2</i>	14	RAP2.6, ORA47, DEAR3, ARF3, TCP11, WRKY12, DAG2, RAP2.3, ERF1, ERF1A, ERF109, RAP2.10, ATAF2, GATA12

Obrázek 5: Identifikace potencionálních transkripčních faktorů schopných regulace exprese *CSD1* a *CSD2*. Grafický (A) a tabulkový (B) přehled transkripčních faktorů, u nichž se předpokládá, že regulují expresi *CSD1* a *CSD2* pod kontrolou MAPK. SPL – SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE, MYB – MYB DOMAIN PROTEIN, ZML2 – ZIM-LIKE 2, TOE – TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED, RR – RESPONSE REGULATOR, HSF – HEAT SHOCK FACTOR, HB51 – HOMEBOX 51, TGA – TGACG SEQUENCE-SPECIFIC BINDING PROTEIN, bZIP – BASIC LEUCINE-ZIPPER, LFY – LEAFY, RAV1 – RELATED TO ABI3/VP1 1, LEC2 – LEAFY COTYLEDON 2, ICU4 – INCURVATA 4, AHL – AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN, DAZ1 – DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER 1, GLK1 – GBF'S PRO-RICH REGION-INTERACTING FACTOR 1, ASL18 – ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 18, YAB – YABBY, CCA1 – CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1, NAC – NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN, AGF1 – AT-HOOK PROTEIN OF GA FEEDBACK 1, WOX13 – WUSCHEL RELATED HOMEBOX 13, TREE1 – TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR OF EIN3-DEPENDENT ETHYLENE-RESPONSE 1, ZAT – ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6, AGL15 – AGAMOUS-LIKE 15, KAN1 – KANADI 1, RVE1 – REVEILLE 1, GT2L – GT-2LIKE PROTEIN, SCAP1 – STOMATAL CARPENTER 1, RAP – RELATED TO, ORA47 – OCTADECANOID-RESPONSIVE AP2/ERF-DOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR 47, DEAR3 – DREB AND EAR MOTIF PROTEIN 3, ARF3 – AUXIN RESPONSE TRANSCRIPTION FACTOR 3, TCP11 – TCP DOMAIN PROTEIN 11, WRKY12 – WRKY DNA-BINDING PROTEIN 12, DAG2 – DOF AFFECTING GERMINATION 2, ERF – ETHYLENE RESPONSE FACTOR, ATAF2 – ARABIDOPSIS THALIANA ACTIVATION FACTOR 2, GATA12 – GATA TRANSCRIPTION FACTOR 12.

Následně s využitím ELM softwaru (Kumar et al., 2020) byly získány MAPK-specifické dokovací domény (Příloha 8, 9, 10). Místa, kde může docházet k potenciální interakci mezi MAPK a transkripčním faktorem.

Prostřednictvím databáze PhosPhAt 4.0 (Zulawski et al., 2013) se nám podařilo nalézt experimentální důkazy o fosforylaci pouze u některých ze získaných transkripčních faktorů (Příloha 11, 12, 13). Příkladem může být transkripční faktor SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 8 (SPL8) a LEAFY (LFY) pro gen *CSD1*, RELATED TO AP2 10 (RAP2.10) pro gen *CSD2* a HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR B2A (HSFB2A) pro oba z dříve zmíněných genů *CSD1* a *CSD2*. Naopak transkripčním faktorem, u kterého nebyla doposud experimentálně prokázána fosforylace, je například transkripční faktor SPL7. Některé experimentálně získané fosfopeptidy vybraných transkripčních faktorů odpovídají také sekvencím získaným softwaru GPS 3.0 a ELM. Například experimentálně získaný fosfopeptid transkripčního faktoru SPL8 odpovídá sekvenci fosfopeptidu získaného prostřednictvím GPS 3.0 (Příloha 5), který se shoduje se sekvencí dokovací domény MOD_ProDKin_1 získané prostřednictvím databáze ELM (Příloha 8, Obrázek 6). Stejně tomu tak je u transkripčního faktoru RAP2.10 (Příloha 6, 9, 12). A u transkripčního faktoru HSFB2A, kde dochází ke shodě nejen u dokovací domény MOD_ProDKin_1, ale také u dokovací domény DOC_MAPK_gen_1 (Příloha 7, 10, 13). Avšak například u transkripčního faktoru LFY experimentálně získaná sekvence neodpovídá ani dokovací sekvenci ani fosfopeptidu získaných z ELM a GPS 3.0 (Příloha 5, 8, 11).

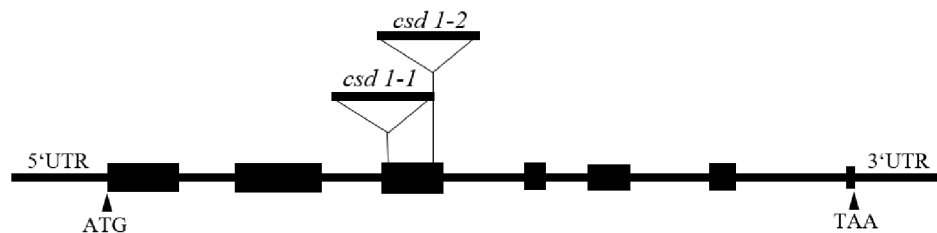
Software	Dokovací doména	Pozice	Skóre	Sekvence
GPS 3.0 ELM PhosPhAt 4.0	MOD_ProDKin_1	278–284	51,742	TGKTT TPKSPND SGVK TPKSPND T TPKSPND SGVK

Obrázek 6: Grafické znázornění překryvu sekvencí transkripčního faktoru SPL8 získaných prostřednictvím dílčích softwarů GPS 3.0, ELM a PhosPhAt 4.0.

Na závěr byla provedena analýza pomocí softwaru ATTED-II (Obayashi et al., 2018), zda identifikované transkripční faktory jsou koexprimovány s geny našeho zájmu (*CSD1*, *CSD2*, *MPK3*, *MPK4*, *MPK6*). Nejdříve byla analýza provedena pro gen *CSD1* a *CSD2* zvlášť a poté byly provedeny kombinace *CSD1* s *MPK3*, *CSD1* s *MPK4*, *CSD1* s *MPK6*, *CSD2* s *MPK3*, *CSD2* s *MPK4* a *CSD2* s *MPK6*. Naše analýza však neposkytlala výsledky, které by odpovídaly našemu předpokladu koexprese získaných transkripčních faktorů při kombinaci analyzovaných genů.

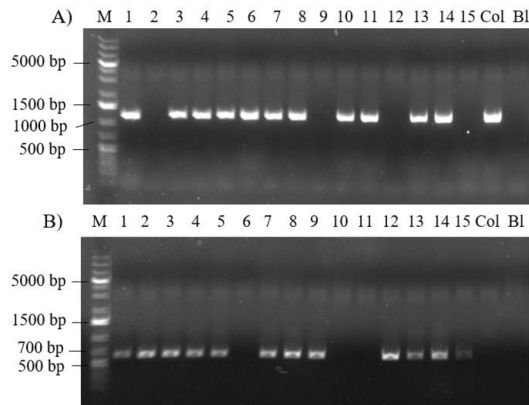
5.2 Alelově specifická PCR

Za účelem podrobné studie *CSD1* genu byly vybrány dvě T-DNA inzerční SALK linie: SALK_109389 (*csd1-1*) a SALK_024857 (*csd1-2*), jakožto nejvhodnější T-DNA inzerční linie dostupné v Nottingham Arabidopsis Stock Center. Obě z mutantních linií mají T-DNA inzerce v 3. exonu (Obrázek 7). Za účelem charakterizace získaných mutantních linií bylo vyseto 15 semen z každé z T-DNA inzerční linie: SALK_109389 a SALK_024857.



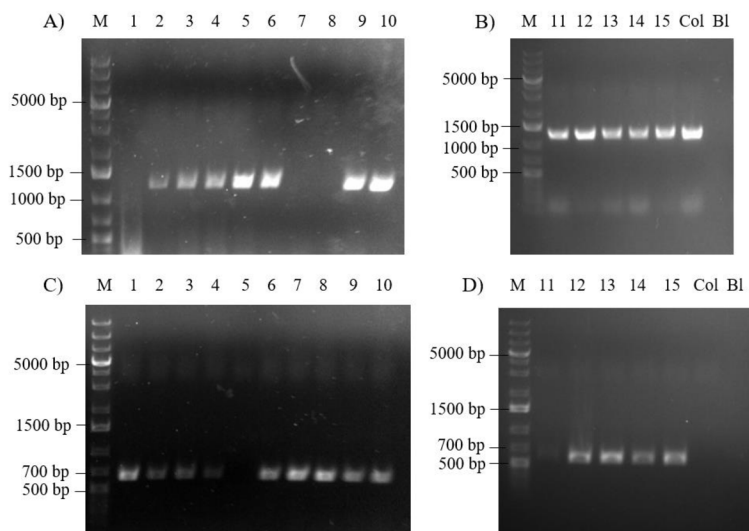
Obrázek 7: Schématické znázornění struktury genu *CSD1* a místo T-DNA inzerce. Mutantní linie *csd1-1* (SALK_109389); mutantní linie *csd1-2* (SALK_024857). „tenká linie“ – intron; „tlustá linie“ – exon.

Z čtrnáctidenních rostlin T-DNA inzerční linie *csd1-1* byly podle výsledků alelově specifické PCR vyselektovány 4 homozygotní rostliny odpovídající 26,7 % z celkového počtu vysetých rostlin (Obrázek 8: dráha 2, 9, 12 a 15). Selektce homozygotů proběhla na základě vzniklého PCR produktu s využitím primerů LB a RP pro identifikaci T-DNA inzerce (Obrázek 8B) a současně nepřítomnosti PCR produktu s využitím primerů LP a RP pro identifikaci alely divokého typu genu *CSD1* (Obrázek 8A). Dále bylo vyselektováno 8 heterozygotních rostlin odpovídajících 53,3 % z celkového počtu vysetých rostlin (Obrázek 8: dráha 1, 3, 4, 5, 7, 8, 13 a 14). Selektce heterozygotů proběhla na základě detekce vzniklých PCR produktů, jak s využitím primerů LB a RP pro identifikaci T-DNA inzerce (Obrázek 8B), tak s využitím primerů LP a RP pro identifikaci alely divokého typu (Obrázek 8A). Byly detekovány také 3 rostliny divokého typu odpovídající 20 % z celkového počtu vysetých rostlin (Obrázek 8: dráha 6, 10 a 11). Identifikace rostlin nesoucí pouze alelu divokého typu proběhla na základě vzniklého PCR produktu pro identifikaci alely divokého typu genu *CSD1* (Obrázek 8A) a současně nepřítomnosti PCR produktu pro identifikaci T-DNA inzerce (Obrázek 8B). Vzniklý PCR produkt odpovídal velikosti PCR produktu pozitivní kontroly Col-0 (Obrázek 8A), což potvrzuje správnost výsledku.



Obrázek 8: Selektce mutantů CSD1 linie *csdl-1* (SALK_109389) pomocí alelově specifické PCR a elektroforetické separace na agarosových gelech. A – Detekce alely divokého typu (očekávaná velikost produktu 1176 bp); B – Detekce T-DNA inserce (očekávaná velikost produktu 503–803 bp); 1–15 – analyzovaná DNA vyextrahovaná z jednotlivých rostlin; M – Marker molekulové hmotnosti: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – vyextrahovaná DNA z rostliny divokého typu (Col-0), která byla použita jako pozitivní kontrola; Bl – slepý vzorek (voda).

U T-DNA inzerční linie *csdl-2* byly vyselektovány 3 homozygotní rostliny – 20 % (Obrázek 9: dráha 1, 7 a 8), 11 heterozygotních rostlin – 73,3 % (Obrázek 9: dráha 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14 a 15) a 1 rostlina divokého typu – 6,7 % (Obrázek 9: dráha 5). Selektce homozygotů, heterozygotů a rostlin divokého typu byla provedena stejně jako u inzerční linie *csdl-1*.

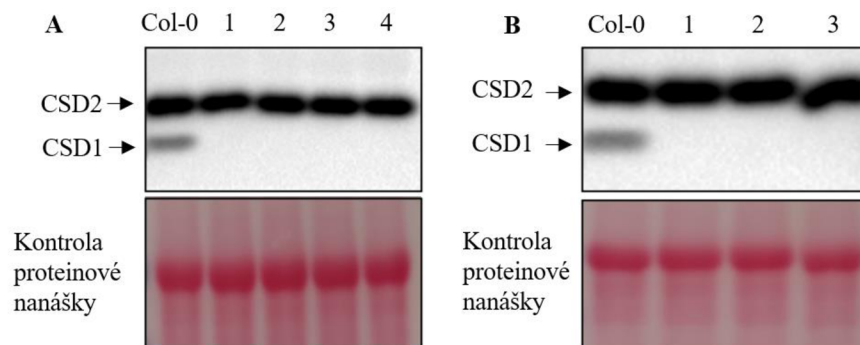


Obrázek 9: Selektce mutantů CSD1 linie *csdl-2* (SALK_024857) pomocí alelově specifické PCR a elektroforetické separace na agarosových gelech. A, B – Detekce alely divokého typu (očekávaná velikost produktu 1220 bp); C, D – Detekce T-DNA inserce (očekávaná velikost produktu 562–862 bp); 1–15 – analyzovaná DNA vyextrahovaná z jednotlivých rostlin; M – Marker molekulové hmotnosti: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – vyextrahovaná DNA z rostliny divokého typu (Col-0), která byla použita jako pozitivní kontrola; Bl – slepý vzorek (voda).

5.3 Nepřítomnost CSD1 proteinu v mutantních rostlinách *csd1-1* a *csd1-2*

U rostlin, které byly identifikované jako homozygotní prostřednictvím alelově specifické PCR, byla provedena biochemická analýza za účelem ověření přítomnosti či nepřítomnosti CSD1 proteinu. Za tímto účelem byla využita metoda imunoblotování se specifickou anti-CSD protilátkou, jenž je schopná rozpoznat CSD1 a CSD2 izoformy.

U vyselektovaných homozygotních *csd1-1* mutantů byla potvrzena nepřítomnost CSD1 proteinu, zatímco u rostliny divokého typu byl pozorován pás odpovídající molekulovou hmotností velikosti CSD1 proteinu (Obrázek 10A). Naopak přítomnost CSD2 proteinu byla pozorována, jak u rostliny divokého typu, tak i u homozygotních *csd1-1* mutantů. (Obrázek 10A).



Obrázek 10: Detekce přítomnosti CSD1 proteinu u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) prostřednictvím imunoblotování se specifickou anti-CSD protilátkou. A – Detekce přítomnosti proteinu CSD1 u mutantní linie *csd1-1*; B – Detekce přítomnosti proteinu CSD1 u mutantní linie *csd1-2*; Col-0 – Proteiny vyextrahované z rostliny divokého typu, který sloužil jako pozitivní kontrola; Dráha 1, 2, 3, 4 z obrázku A – Proteiny vyextrahované z homozygotních rostlin (*csd1-1*) identifikované alelově specifickou PCR; Dráha 1, 2, 3 z obrázku B – Proteiny vyextrahované z homozygotních rostlin (*csd1-2*) identifikované alelově specifickou PCR. Kontrola proteinové nanášky byla provedena nabarvením membrány s využitím Ponceau S. Jedná se pouze o reprezentativní obrázek viz Příloha 1A, B; Příloha 2A, B.

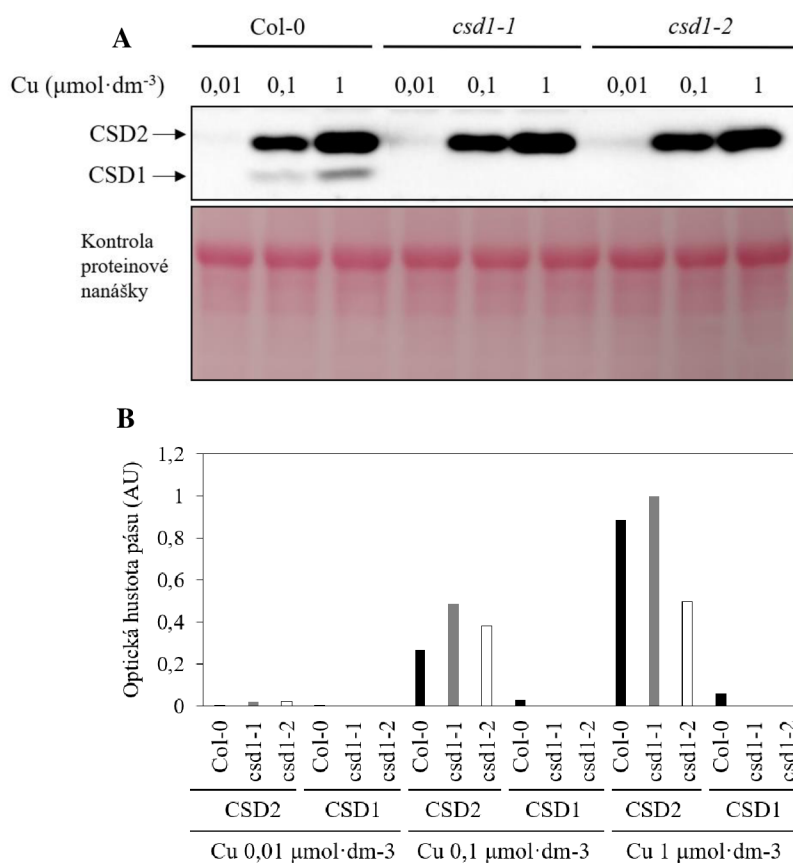
Stejně tomu tak bylo u homozygotních *csd1-2* mutantů, kde byla potvrzena nepřítomnost CSD1 proteinu, zatímco u rostliny divokého typu byl pozorován pás odpovídající molekulovou hmotností velikosti CSD1 proteinu (Obrázek 10B). Přítomnost CSD2 byla pozorována, jak u rostliny divokého typu, tak i u homozygotních *csd1-2* mutantů. (Obrázek 10B).

Tato analýza jednoznačně potvrdila, že se jedná o knockout mutanty, jelikož nebyla detekována přítomnost CSD1 proteinu ani u jedné z mutantních *csd1* linií.

5.4 Závislost abundance a aktivity SOD na přítomnosti mědi v médiu

Dále byla stanovena abundance a přítomnost proteinů CSD1 a CSD2 při různých koncentracích mědi. Ta byla stanovena opět pomocí imunoblotování s anti-CSD protilátkou rozeznávající, jak izoformu CSD1, tak i izoformu CSD2.

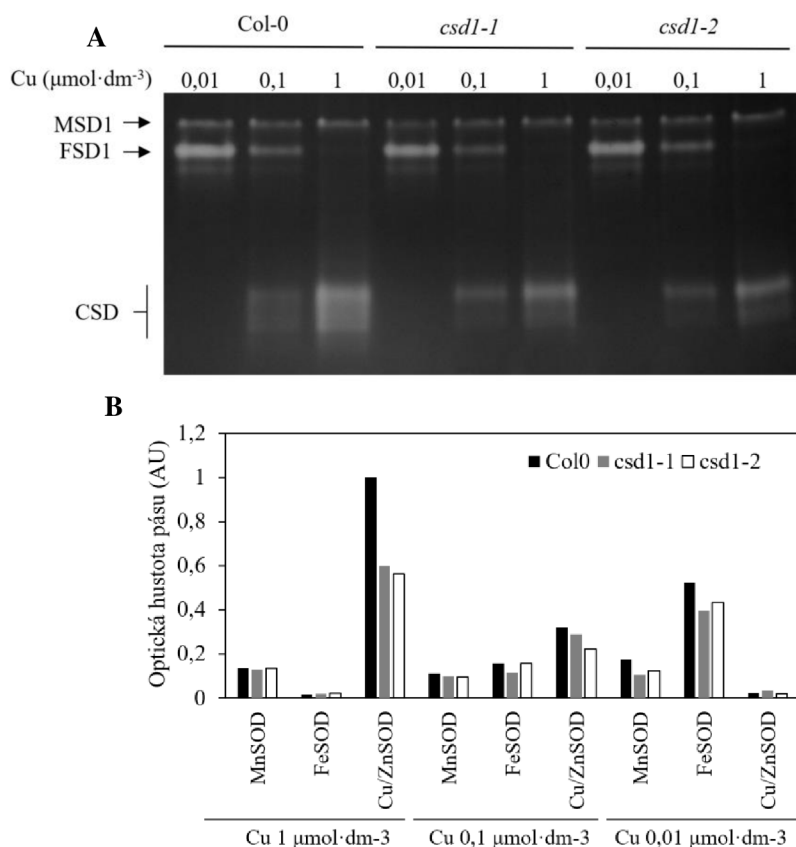
Při koncentraci mědi $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (standardní koncentrace mědi v MS médiu) byla pozorována přítomnost proteinu CSD2, jak u rostliny divokého typu, tak u obou mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2*. Stejně tak byla pozorována přítomnost proteinu CSD1 u rostliny divokého typu. Nicméně u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* nepozorujeme přítomnost proteinu u žádné z koncentrací mědi z důvodu narušení exprese genu *CSD1* T-DNA inzercí (Obrázek 11A, B).



Obrázek 11: Detekce přítomnosti CSD1 a CSD2 proteinů pomocí imunoblotování u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) při různých koncentracích mědi v médiu. A – Vizualizace proteinu CSD1 a CSD2; B – Kvantifikace optických pásů z obrázku A; Col-0 – rostlina divokého typu sloužící jako pozitivní kontrola; *csd1-1*–T-DNA inzerční linie SALK_109389; *csd1-2*–T-DNA inzerční linie SALK_024857; 0,01, 0,1, 1 – koncentrace mědi v médiu v $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Kontrola proteinové nanášky byla provedena nabarvením membrány s využitím Ponceau S. Jedná se pouze o reprezentativní obrázek viz Příloha 1C; Příloha 2C.

Při desetkrát vyšší koncentraci mědi ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) než je standartní, byla pozorována zvýšená abundance proteinu CSD2, jak u rostliny divokého typu, tak i v mutantních liniích *csd1-1* a *csd1-2* v porovnání s výsledky získanými při $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mědi. Naopak při koncentraci mědi desetkrát nižší ($0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) než je standartní, bylo pozorováno pouze zanedbatelné množství proteinu CSD2 v porovnání s výsledky získanými při $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mědi. Vyšší abundance byla také pozorována u proteinu CSD1 u rostliny divokého typu. Nicméně u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* nebyla detekována přítomnost proteinu CSD1 (Obrázek 11A, B).

Nakonec byla stanovena aktivita SOD na základě různých hladin mědi v médiu. Při koncentraci mědi $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (standartní koncentrace mědi v médiu) byla pozorována, jak u rostliny divokého typu, tak i u obou mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* aktivita FSD1, tak i CSD (Obrázek 12A, B).



Obrázek 12: Hodnocení enzymatické aktivity SOD mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) při různých koncentracích mědi v médiu. A – Vizualizace aktivit SOD; B – Kvantifikace optických pásů z obrázku A; Col-0 – rostlina divokého typu sloužící jako pozitivní kontrola; *csd1-1*–T-DNA inzerční linie SALK_109389; *csd1-2*–T-DNA inzerční linie SALK_024857; 0,01, 0,1, 1 – koncentrace mědi v médiu v $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Při koncentraci mědi desetkrát nižší ($0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) než je standartní, byla pozorována, jak u rostliny divokého typu, tak u obou mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* zvýšená aktivita FSD1, a naopak nebyla pozorována žádná aktivita CSD (Obrázek 12A, B).

Naopak při koncentraci mědi desetkrát vyšší ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) než je standartní, pozorujeme opačný jev, než u koncentrace mědi $0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zde pozorujeme, jak u rostliny divokého typu, tak u obou mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* zvýšenou aktivitu CSD, a naopak sníženou aktivitu FSD1 (Obrázek 12A, B).

U MSD1 byla pozorována stejná aktivita při všech koncentracích mědi (Obrázek 12A, B), můžeme tak říct, že aktivita MSD1 není regulována v závislosti na koncentraci mědi v médiu.

Tato separační metoda není schopná jednoznačně rozdělit CSD1 a CSD2 izoformu, splývají tak do jednoho bandu, proto je hodnotíme dohromady. Nicméně při koncentraci mědi $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je vidět, že band pozorovaný u rostliny divokého typu je silnější než band u obou *csd1* mutantů (Obrázek 12A, B). Dá se tak uvažovat, že aktivita CSD1 u mutantních linií chybí, a proto je band slabší. Naopak při koncentraci mědi $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozdíl není tak patrný, jelikož CSD2 je mnohem více abundantní než CSD1. To lze pozorovat na Obrázku 11A u rostliny divokého typu.

6 Diskuse

Biotechnologický výzkum se v současné době intenzivně zaměřuje na význam regulační role některých potenciaálně zajímavých transkripčních faktorů za účelem zlepšení tolerance rostliny vůči stresovým reakcím. Hlavním předpokladem je, že transkripční faktory plní roli jako regulátory mnoha genů zodpovědných za odpověď působící stres (Wang et al., 2016; Cui et al., 2018). Mezi tyto geny mohou být řazeni zástupci antioxidační obrany, a to včetně SOD jako jsou *CSD1* a *CSD2*. Proto jsme se v této práci zabývali predikcí potenciaálních transkripčních faktorů regulujících expresi genů *CSD1* a *CSD2* pod kontrolou MAPK, a to prostřednictvím bioinformatické analýzy.

V rámci této predikce se nám podařilo identifikovat celkově 31 potenciaálních transkripčních faktorů, které by mohly regulovat expresi genů *CSD1* a *CSD2*. Tento relativně velký počet společných transkripčních faktorů naznačuje, že oba geny by mohly být regulovány podobným způsobem.

Z identifikovaných transkripčních faktorů jsou zajímavé pro další studium transkripční faktory SPL8, LFY pro gen *CSD1*, RAP2.10 pro gen *CSD2* a transkripční faktory SPL7 a HFSB2A, které jsou schopné regulace exprese, jak genu *CSD1*, tak genu *CSD2*.

SPL8 je nezbytný pro správný průběh mikrosporogeneze. Plní také důležitou roli při vstupu mateřské spory do meiózy, jelikož při absenci tohoto genu sporocyty nejsou schopné vytvářet volné meiocyty a následně dochází k jejich degeneraci (Unte et al., 2003). Existuje také studie, která popisuje nezbytnou účast MAPK signalizace během tvorby pylu pro správné dokončené samčí cytokineze na konci meiózy, konkrétně signální dráhy MPK4 (Zeng et al., 2011). Důležitými regulátory těchto procesů se zdají být i ROS (Hu et al., 2011).

LFY můžeme řadit mezi takzvané pionýrské transkripční faktory, tedy do skupiny transkripčních faktorů, které jsou schopné se vázat do oblasti chromatinu, kde se DNA obtáčí okolo histonů (Lai et al., 2021). Jeho hlavní funkcí je regulace vývoje kvetení u *Arabidopsis thaliana*. Zejména je nezbytný pro vývoj květů ještě před determinací květních orgánů (Schultz et Haughn, 1991). Během kvetení dochází z počátku k nárůstu ROS a později k jejich poklesu. To naznačuje, že ROS plní během různé fáze kvetení různou funkci (Zafra et al., 2009). Právě kvetení a samotná tvorba květů je spojena s MAPK signalizací zakončená aktivací MPK6 (Bush et Krysan, 2007).

Transkripční faktor RAP2.10 se vyznačuje zejména svojí schopností regulace senescence listu. Jeho exprese může být vyvolána stresem, jako je tma, sucho, či salinita. Podle nedávné studie může RAP2.10 také indukovat produkci ROS, které jsou spojovány s vyvoláváním stresových

odpovědi a senescenci. To naznačuje, že RAP2.10 může hrát důležitou roli v těchto procesech, a to potencionálně regulací ROS (Zhang et al., 2020). Do regulace senescence listu je také zapojena signální dráha MKK9–MPK6 (Zhou et al., 2009).

HSFB2A patří mezi transkripční faktory tepelného stresu. Jak už název napovídá, jedná se o hlavní regulátory odpovědi na tepelný stres. Avšak kromě této hlavní funkce je nezbytný také pro správný vývoj samičího gametofytu (Wunderlich et al., 2014). U dalších izoform HSF transkripčních faktorů zapojených do odpovědi na tepelný stres, jako je například HSFA4A, je známá regulace skrze MPK4 a MPK6 (Pérez-Salamó et al., 2014). Jelikož se jedná o příbuzné transkripční faktory, lze předpokládat, že i HSFB2A by mohl být fosforylován skrze MAPK. Tomuto tvrzení přispívá i fakt, že u tohoto transkripčního faktoru HSFB2A byla experimentálně prokázána fosforylace (Zhang et al., 2013).

SPL7 patří mezi hlavní regulátory homeostázy mědi u *Arabidopsis thaliana*. Při nedostatku mědi se tento transkripční faktor váže do promotorové oblasti genů reagujících na nedostatek mědi jako je *FSD1*, či *miR398* a aktivuje tak jejich expresi. Právě aktivací exprese *miR398* dochází ke změně exprese *CSD1* a *CSD2* a tím k potlačení abundance *CSD1* a *CSD2* z důvodu zachování funkčnosti PC (Abdel-Ghany et Pilon, 2008; Yamasaki et al., 2009; Garcia-Molina et al., 2014).

U čtyř výše zmíněných transkripčních faktorů (SPL8, LFY, RAP2.10 a HSFB2A) byla získána data prostřednictvím databáze PhosPhAt 4.0 (Zulawski et al., 2013), která poskytuje informace o experimentálně potvrzené fosforylaci. Bylo by proto možné do budoucna studovat vliv fosforylace na jejich regulaci. Naopak u SPL7 nebyla experimentálně prokázána fosforylace prostřednictvím databáze PhosPhAt 4.0, což však neznamená, že u SPL7 nedochází k fosforylaci. Proto by bylo více než vhodné do budoucna provést experimenty, které by dokázaly, zda může být SPL7 fosforylován, či nikoliv.

Stěžejní část této práce byla věnována zejména studiu SOD, jejich regulaci a vývojové funkci, a to především se zaměřením na CSD1 izoenzym u rostliny *Arabidopsis thaliana*. Za účelem studia CSD1 byly vyselektovány dvě nezávislé T-DNA inzerční linie prostřednictvím alelově specifické PCR. Na těchto dvou nezávislých T-DNA inzerčních liniích bylo provedeno imunoblotování se specifickou anti-CSD protilátkou za účelem ověření absence CSD1 proteinu. Následně byl také pozorován vliv mědi na abundanci a aktivitu SOD.

Získané výsledky nám potvrdily nepřítomnost CSD1 proteinu u mutantních T-DNA inzerčních linií. Tato absence proteinu poukazuje na narušení exprese genu *CSD1* vlivem T-DNA

inzerce. Naopak CSD2 protein byl pozorován, jak u rostliny divokého typu, tak u mutantních linií, lze proto říct, že narušená exprese genu *CSD1* nijak neovlivnila expresi genu *CSD2*.

Studium vlivu koncentrace mědi na abundanci a přítomnost proteinu CSD1 a CSD2 ukázala, že u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* nedochází k vzniku CSD1 proteinu. Naopak s rostoucí koncentrací mědi v médiu bylo možné pozorovat zvyšující se abundanci CSD2, jak u rostliny divokého typu, tak i u obou mutantních linií, což poukazuje na zachovanou funkčnost regulace prostřednictvím SPL7, kterou můžeme pozorovat také v rámci CSD1, ale pouze u rostliny divokého typu.

Dále byla na základě gradientu mědi pozorován její vliv na aktivitu SOD. Při nízké koncentraci mědi ($0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) nebyla pozorována žádná aktivita CSD1 a CSD2, ale naopak byla pozorována zvýšená aktivita FSD1. Naopak při zvýšené koncentraci mědi můžeme sledovat naprosto opačný efekt. Tato pozorovaná změna aktivity je zapříčiněna vlivem SPL7, který při nízkých hladinách mědi snižuje abundanci CSD1 a CSD2 a zároveň zvyšuje abundanci FSD1. Hlavním důvodem je snaha o zachování funkčnosti PC, proteinu, který má ve své struktuře navázanou měď, a který je důležitý pro správný chod fotosyntézy (Abdel-Ghany et Pilon, 2008). Avšak lze si povšimnout, že u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* při koncentraci $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je intenzita pásu CSD nižší v porovnání s rostlinou divokého typu, jelikož vlivem T-DNA inzerce došlo k narušení aktivity CSD1.

Právě měď je jedním z hlavních regulátorů exprese *CSD1* a *CSD2*. Při nízkých hladinách mědi může docházet u rostlin k redukcí transportu elektronů během fotosyntézy nebo také až k rozpadu thylakoidní membrány (Abdel-Ghany et al., 2005). To stejné platí pro nadměrnou koncentraci mědi, která může být pro rostlinu toxická. Již při koncentracích $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl pozorován výrazně snížený růst kořenů (Lequeux et al., 2010). Námi použité koncentrace mědi v těchto experimentech můžeme tedy stále ještě považovat za hladiny fyziologické.

Navazující práce do budoucna by se mohla zabývat fenotypovou analýzou získaných *csd1* mutantů. Zejména fenotypovou analýzou kořene, jelikož u *fsd1* mutantů byl pozorován snížený počet laterálních kořenů (Dvořák et al., 2021a) a také proto, že FSD1 se nachází v cytosolu, stejně jako CSD1, dá se tak předpokládat, že by mohlo docházet k vzniku obdobných fenotypů. Stejně tak by mohla být provedena fenotypová analýza *csd1* mutantů na základě studie prováděné na *CSD1*-RNAi transgenických rostlinách, kde byl u těchto rostlin pozorován potlačený růst (Xing et al., 2013).

Zjištěné fenotypové projevy *csd1* mutantů by mohly být následně zvráceny pomocí genetické komplementace konstruktem kódující CSD1 protein fúzovaný s GFP, a to pod kontrolou nativního

promotoru. Takto komplementované linie by mohly být následně použity pro detailní mikroskopickou analýzu, která by objasnila subcelulární lokalizaci tohoto proteinu a odhalila pletivovou expresi tohoto proteinu. Tyto informace by výrazným způsobem přispěly k pochopení funkce CSD1 proteinu v rostlině *Arabidopsis thaliana*.

7 Závěr

V první části bakalářské práce jsme zpracovali literární rešerši na téma ROS a jejich signální a vývojová role, antioxidační obranu se zaměřením na SOD, konkrétně na izoformy *CSD1* a *CSD2*. Taktéž jsme se zabývali jejich regulací prostřednictvím SPL7 a MAPK, které jsou rovněž schopné regulace antioxidačních enzymů a mohou dokonce regulovat i aktivitu některých transkripčních faktorů.

V druhé části bakalářské práce jsme provedli bioinformatickou analýzu, kde jsme predikovali potencionální transkripční faktory regulující *CSD1* a *CSD2*. Na základě této analýzy jsme získali celkem 31 potencionálních transkripčních faktorů, jenž mohou regulovat, jak gen *CSD1*, tak i gen *CSD2* a dalších 18 potencionálních transkripčních faktorů pro *CSD1* a 14 pro gen *CSD2*. Z identifikovaných transkripčních faktorů by mohly být zajímavé pro budoucí studium zejména transkripční faktory SPL8, LFY pro gen *CSD1*, RAP2.10 pro gen *CSD2* a HSF2 pro oba zmíněné geny.

Pro studium *CSD1* genu jsme vybrali dvě T-DNA inzerční linie v genu *CSD1* SALK_109389 a SALK_02487. Na základě alelově specifické PCR jsme vyseletovali 4 homozygotní T-DNA inzerční rostliny z linie SALK_109389 a 3 rostliny z linie SALK_02487. Pro potvrzení nepřítomnosti *CSD1* proteinu u jednotlivých mutantních linií jsme provedli imunoblotování s protilátkou anti-CSD, která rozlišuje izoformu *CSD1* a *CSD2*. Výsledky imunoblotování potvrzují nepřítomnost *CSD1* proteinu u obou vybraných T-DNA inzerčních linií.

Na základě získaných *csd1* mutantních linií jsme pozorovali absenci proteinu *CSD1* a změny v abundanci *CSD2* v rámci různých koncentrací mědi v médiu. A následně jsme pozorovali aktivitu SOD, zejména FSD1, *CSD1* a *CSD2*, opět v rámci různých koncentrací mědi v médiu za účelem studia vlivu mědi na regulaci jednotlivých izoformem.

8 Seznam použité literatury

- Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T (2005): Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell* 17: 1233–1251.
- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008): MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 15932–15945.
- Al-Momani S, Qi D, Ren Z, Jones AR (2018): Comparative qualitative phosphoproteomics analysis identifies shared phosphorylation motifs and associated biological processes in evolutionary divergent plants. *Journal of Proteomics* 181: 152–159.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331–1341.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7915–7922.
- Apel K, Hirt H (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Araki R, Mermoud M, Yamasaki H, Kamiya T, Fujiwara T, Shikanai T (2018): SPL7 locally regulates copper-homeostasis-related genes in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 224–225: 137–143.
- Asada K (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391–396.
- Baker CJ, Orlandi EW (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299–321.
- Bartoli CG, Casalagué CA, Simontacchi M et al. (2013): Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany* 94: 73–88.
- Bellegarde F, Maghiaoui A, Boucherez J, Krouk G, Lejay L, Bach L, Gojon A, Martin A (2019): The Chromatin Factor HNI9 and ELONGATED HYPOCOTYL 5 Maintain ROS Homeostasis under High Nitrogen Provision. *Plant Physiology* pp.01473.2018.
- Bhaskara GB, Wen TN, Nguyen TT, Verslues PE (2017): Protein Phosphatase 2Cs and *Microtubule-Associated Stress Protein 1* Control Microtubule Stability, Plant Growth, and Drought Response. *The Plant Cell* 29(1): 169–191.
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P (2005): Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of Molecular Biology* 352: 585–596.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248–254.

- Brown NM, Torres AS, Doan PE, O'Halloran TV (2004): Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 5518–5523.
- Bush SM, Krysan PJ (2007): Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of experimental botany* 58: 2181–2191.
- Cárdenas L, McKenna ST, Kunkel JG, Hepler PK (2006): NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. *PLANT PHYSIOLOGY* 142: 1460–1468.
- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1999): Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene* 237: 91–104.
- Castro B, Citterico M, Kimura S, Stevens DM, Wrzaczek M, Coaker G (2021): Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature Plants* 7(4): 403–412.
- Cohu CM, Abdel-Ghany SE, Gogolin Reynolds KA, Onofrio AM, Bodecker JR, Kimbrel JA, Niyogi KK, 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.
- Colcombet J, Hirt H (2008): ArabidopsisMAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413: 217–226.
- Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996): Environmental stress sensitivity of an ascorbic aciddeficient Arabidopsis mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9970–9974.
- Corpas FJ, Gupta DK, Palma JM (2015): Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells.
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P (1999): Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell* 11: 1277–1292.
- Cui J, Jiang N, Zhou X, Hou X, Yang G, Meng J, Luan Y (2018): Tomato MYB49 enhances resistance to *Phytophthora infestans* and tolerance to water deficit and salt stress. *Planta* 248: 1487–1503.
- de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS (2017): Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. In: Ahmad S (ed.): *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 996, pp. 15–23. Springer, Cham.
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001): Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127: 159–172.
- Dreyer BH, Schippers JHM (2019): Copper-Zinc Superoxide Dismutases in Plants: Evolution, Enzymatic Properties, and Beyond. *Annual Plant Reviews Online*, 1–36.
- Du YY, Wang PC, Chen J, Song CP (2008): Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in Arabidopsis thaliana. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1318–1326.

- Duan ZQ, Bai L, Zhao ZG, Zhang GP, Cheng FM, Jiang LX, Chen KM (2009): Droughtstimulated activity of plasma membrane nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and its catalytic properties in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 51: 1104–1115.
- Dvořák P, Krasylenko Y, Ovečka M, Basheer J, Zapletalová V, Šamaj J, Takáč T (2021a): In vivo light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant Cell Environ* 44: 68–87.
- Dvořák P, Krasylenko Y, Zeiner A, Šamaj J, Takáč T (2021b): Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in Plant Science* 11: 618835.
- Engelsberger WR, Schulze WX (2012): Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* 69(6): 978–995.
- 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.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442–6.
- Foyer CH, Noctor G (2011): Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *PLANT PHYSIOLOGY* 155: 2–18.
- Foyer CH, Noctor G (2013): Redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling* 18(16): 2087–90.
- Garcia-Molina A, Xing S, Huijser P (2014): Functional characterisation of Arabidopsis SPL7 conserved protein domains suggests novel regulatory mechanisms in the Cu deficiency response. *BMC Plant Biology* 14: 231.
- Gechev TS, Minkov IN, Hille J (2005): Hydrogen peroxide-induced cell death in Arabidopsis: transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life* 57(3): 181–8.
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008): Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 418: 1–8.
- Halliwell B (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *PLANT PHYSIOLOGY* 141(2): 312–322.
- Hehl R, Norval L, Romanov A, Bülow L (2016): Boosting AthaMap Database Content with Data from Protein Binding Microarrays. *Plant and Cell Physiology* 57: e4.
- Hoehenwarter W, Thomas M, Nukarinen E, Egelhofer V, Röhrig H, Weckwerth W, Conrath U, Beckers GJ (2013): Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in Arabidopsis thaliana through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* 12(2): 369–380.
- Hong Enriquez RP, Do TN (2012): Bioavailability of metal ions and evolutionary adaptation. *Life* 2: 274–285.
- Hossain MS, Dietz KJ (2016): Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science* 7: 548.

- Hu L, Liang W, Yin C, Cui X, Zong J, Wang X, Hu J, Zhang D (2011): Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. *The Plant Cell* 23(2): 515–33.
- Huang C-H, Kuo W-Y, Weiss C, Jinn T-L (2012): Copper Chaperone-Dependent and – Independent Activation of Three Copper-Zinc Superoxide Dismutase Homologs Localized in Different Cellular Compartments in Arabidopsis. *Plant Physiology* 158: 737–746.
- Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y (2019): Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science* 10: 800.
- Chen HJ, Wu SD, Huang GJ, Shen CY, Afiyanti M, Li WJ, Lin YH (2012): Expression of a cloned sweet potato catalase SPCAT1 alleviates ethephon mediated leaf senescence and H₂O₂ elevation. *Journal of Plant Physiology* 169: 86–97.
- Chen Q, Yang G (2020): Signal Function Studies of ROS, Especially RBOH-Dependent ROS, in Plant Growth, Development and Environmental Stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 39: 157–171.
- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L (2010): SQUAMOSA promoter-binding proteinlike transcription factors: star players for plant growth and development. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 946–951.
- Choudhary MK, Nomura Y, Wang L, Nakagami H, Somers DE (2015): Quantitative Circadian Phosphoproteomic Analysis of Arabidopsis Reveals Extensive Clock Control of Key Components in Physiological, Metabolic, and Signaling Pathways. *Molecular & Cellular Proteomics* 14(8): 2243–2260.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7: 301–308.
- Ishibashi Y, Yamamoto K, Tawaratsumida T, Yuasa T, Iwaya-Inoue M (2008): Hydrogen peroxide scavenging regulates germination ability during wheat (*Triticum aestivum* L.) seed maturation. *Plant Signaling & Behavior* 3: 183–188.
- Ishihama N, Yoshioka H (2012): Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 431–7.
- Jagodzik P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M, Ludwikow A (2018): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1387.
- Janků M, Luhová L, Petřivalský M (2019): On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants* 8: 105.
- Jorgensen SA, Preston JC (2014): Differential SPL gene expression patterns reveal candidate genes underlying flowering time and architectural differences in *Mimulus* and *Arabidopsis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 73: 129–139.
- Jung HI, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian LV, Vatamaniuk OK (2012): COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 33252–33267.

- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL (1998): Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* 118: 637–650.
- Komis G, Illes P, Beck M, Samaj J (2011): Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 650–657.
- Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Šamaj J (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* 69: 237–265.
- Krieger-Liszka A, Fufezan C, Trebst A (2008): Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98: 551–564.
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depège N, Huijser P, Merchant S (2005): A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18730–18735.
- Kumar M, Gouw M, Michael S, Sámano-Sánchez H, Pancsa R, Glavina J, Diakogianni A, Valverde JA, Bukirova D, Čalyševa J, Palopoli N, Davey NE, Chemes LB, Gibson TJ (2020): ELM—the eukaryotic linear motif resource in 2020. *Nucleic Acids Research* 48: D296–D306.
- Kuo WY, Huang CH, Liu AC, Cheng CP, Li SH, Chang WC, Weiss C, Azem A, Jinn TL (2013): CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in Arabidopsis chloroplasts. *The New Phytologist* 197: 99–110.
- Lai X, Blanc-Mathieu R, GrandVuillemin L, Huang Y, Stigliani A, Lucas J, Thévenon E, Loue-Manifel J, Turchi L, Daher H, Brun-Hernandez E, Vachon G, Latrasse D, Benhamed M, Dumas R, Zubieta C, Parcy F (2021): The LEAFY floral regulator displays pioneer transcription factor properties. *Molecular Plant* 14(5): 829–837.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N (2010): Response to copper excess in Arabidopsis thaliana: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(8): 673–82.
- Lin LL, Hsu CL, Hu CW, Ko SY, Hsieh HL, Huang HC, Juan HF (2015): Integrating Phosphoproteomics and Bioinformatics to Study Brassinosteroid-Regulated Phosphorylation Dynamics in Arabidopsis. *BMC Genomics* 16(1): 533.
- Liu Q, Harberd NP, Fu X (2016): SQUAMOSA Promoter Binding Protein-like Transcription Factors: Targets for Improving Cereal Grain Yield. *Molecular Plant* 9(6): 765–767.
- Liu Y, He C (2017): A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox Biology* 11: 192–204.
- López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, Del Río LA (2019): Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal* 337: 531–536.
- Martin MV, Fiol DF, Sundaresan V, Zabaleta EJ, Pagnussat GC (2013): oiwa, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25: 1573–1591.
- Martínez Cuesta S, Rahman SA, Furnham N, Thornton JM (2015): The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal* 109: 1082–1086.

- Mayank P, Grossman J, Wuest S, Boisson-Dernier A, Roschitzki B, Nanni P, Nühse T, Grossniklaus U (2012): Characterization of the phosphoproteome of mature Arabidopsis pollen. *The Plant Journal* 72(1): 89–101.
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J (1993): Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 103: 1155–1163.
- Meyer KM, Kump LR (2008): Oceanic Euxinia in Earth History: Causes and Consequences. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 36: 251–288.
- Meyer LJ, Gao J, Xu D, Thelen JJ (2012): Phosphoproteomic analysis of seed maturation in Arabidopsis, rapeseed, and soybean. *PLANT PHYSIOLOGY* 159(1): 517–528.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010): Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61: 4197–4220.
- Mhamdi A, Van Breusegem F (2018): Reactive oxygen species in plant development. *Development* 145(15): dev164376.
- Miller AF (2012): Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters* 586: 585–595.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R (2009): The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2(84): ra45.
- Mithoe SC, Boersema PJ, Berke L, Snel B, Heck AJ, Menke FL (2012): Targeted quantitative phosphoproteomics approach for the detection of phospho-tyrosine signaling in plants. *Journal of Proteome Research* 11(1): 438–448.
- Mittler R (2017): ROS Are Good. *Trends in Plant Science* 22: 11–19.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16(6): 300–309.
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S (2009): Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in Arabidopsis roots. *The Plant Cell* 21(8): 2341–56.
- Morgan MJ, Lehmann M, Schwarzländer M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TC, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Finkemeier I (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *PLANT PHYSIOLOGY* 147: 101–114.
- Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, 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.
- Nakagami H, Sugiyama N, Mochida K, Daudi A, Yoshida Y, Toyoda T, Tomita M, Ishihama Y, Shirasu K (2010): Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *PLANT PHYSIOLOGY* 153(3): 1161–1174.

- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot J-P (2007): Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 185–195.
- Noctor G, Foyer CH (2016): Intracellular Redox Compartmentation and ROS-Related Communication in Regulation and Signaling. *Plant Physiology* 171: 1581–1592.
- Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH (2018): ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 80: 3–12.
- Obayashi T, Aoki Y, Tadaka S, Kagaya Y, Kinoshita K (2018): ATTED-II in 2018: A Plant Coexpression Database Based on Investigation of the Statistical Property of the Mutual Rank Index. *Plant and Cell Physiology* 59: e3.
- Pérez-Salamó I, Papdi C, Rigó G, Zsigmond L, Vilela B, Lumbreras V, Nagy I, Horváth B, Domoki M, Darula Z, Medzihradzky K, Bögre L, Koncz C, Szabados L (2014): The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. *PLANT PHYSIOLOGY* 165: 319–334.
- Persak H, Pitzschke A (2013): Tight interconnection and multi-level control of Arabidopsis MYB44 in MAPK cascade signalling. *PLoS ONE* 8: e57547.
- Pilon M (2017): The copper microRNAs. *New Phytologist* 213: 1030–1035.
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807: 989–998.
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2009): MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* 23: 80–92.
- Potikha TS, Collins CC, Johnson DI, Delmer DP, Levine A (1999): The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *PLANT PHYSIOLOGY* 119: 849–858.
- Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnov N, Žárský V (2007): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist* 174(4): 742–751.
- Preston JC, Hileman LC (2013): Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Frontiers in Plant Science* 4: 80.
- Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou JM (2017): Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 38: 92–100.
- Ravet K, Pilon M (2013): Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 19(9): 919–932.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002): Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513–520.
- 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(40): 38921–38925.
- Roach T, Krieger-Liszkay A (2014): Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Current Protein & Peptide Science* 15: 351–362.
- Roitinger E, Hofer M, Köcher T, Pichler P, Novatchkova M, Yang J, Schlögelhofer P, Mechtler K (2015): Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and

- ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* 14(3): 556–571.
- Sagi M, Fluhr R (2006): Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *PLANT PHYSIOLOGY* 141: 336–340.
- Saito MA, Sigman DM, Morel FM (2003): The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: the co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean–Proterozoic boundary? *Inorganica Chimica Acta* 356: 308–318.
- Shinya T, Hojo Y, Desaki Y, Christeller JT, Okada K, Shibuya N, Galis I (2016): Modulation of plant defense responses to herbivores by simultaneous recognition of different herbivore-associated elicitors in rice. *Scientific Reports* 6: 32537.
- Schieber M, Chandel NS (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 24: R453–R462.
- Schulten A, Bytomski L, Quintana J, Bernal M, Krämer U (2019): Do *Arabidopsis Squamosa* promoter binding Protein-Like genes act together in plant acclimation to copper or zinc deficiency? *Plant Direct* 3: 1–14.
- Schultz EA, Haughn GW (1991): LEAFY, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 3(8): 771–781.
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005): Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell* 8: 517–527.
- Si L, Chen J, Huang X, Gong H, Luo J, Hou Q, Zhou T, Lu T, Zhu J, Shangguan Y, Chen E, Gong C, Zhao Q, Jing Y, Zhao Y, Li Y, Cui L, Fan D, Lu Y, Weng Q, Wang Y, Zhan Q, Liu K, Wei X, An K, An G, Han B (2016): OsSPL13 controls grain size in cultivated rice. *Nature Genetics* 48(4): 447–456.
- Singh R, Singh S, Parihar P, Mishra RK, Tripathi DK, Singh VP, Chauhan DK, Prasad SM (2016): Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1299.
- Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* 6: 196–203.
- Skovsen E, Snyder JW, Lambert JD, Ogilby PR (2005): Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *The Journal of Physical Chemistry B* 109: 8570–8573.
- Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 32: 2–11.
- Smirnoff N, Arnaud D (2019): Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist* 221: 1197–1214.
- Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO (2011): Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of Signal Transduction* 2011: 1–6.
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y (2008): Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* 4: 193.

- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006): Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell* 18: 2051–2065.
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R (2011): Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr. Current Opinion in Plant Biology* 14: 691–699.
- Talaat NB (2019): Role of Reactive Oxygen Species Signaling in Plant Growth and Development. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, 225–266.
- Tamma G, Valenti G, Grossini E, Donnini S, Marino A, Marinelli RA, Calamita G (2018): Aquaporin Membrane Channels in Oxidative Stress, Cell Signaling, and Aging: Recent Advances and Research Trends. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 1–14.
- Tsakagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010): Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143: 606–616.
- Umezawa T, Sugiyama N, Takahashi F, Anderson JC, Ishihama Y, Peck SC, Shinozaki K (2013): Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis thaliana. *Science Signaling* 6(270): rs8–rs8.
- Unte US, Sorensen AM, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P (2003): SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15(4): 1009–1019.
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inzé D, Slooten L (1996): Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* 112: 1703–1714.
- Van Leene J, Han C, Gadeyne A, Eeckhout D, Matthijs C, Cannoot B, De Winne N, Persiau G, Van De Slijke E, Van de Cotte B, Stes E, Van Bel M, Storme V, Impens F, Gevaert K, Vandepoele K, De Smet I, De Jaeger G (2019): Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants* 5(3):316-327.
- Wang H, Wang H, Shao H, Tang X (2016): Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. *Frontiers in Plant Science* 7: 67.
- Wang P, Xue L, Batelli G, Lee S, Hou YJ, Van Oosten MJ, Zhang H, Tao WA, Zhu JK (2013): Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(27): 11205–11210.
- Wang X, Bian Y, Cheng K, Gu LF, Ye M, Zou H, Sun SS, He JX (2013): A large-scale protein phosphorylation analysis reveals novel phosphorylation motifs and phosphoregulatory networks in Arabidopsis. *Journal of Proteomics* 78: 486–498.
- 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(6): 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(10): 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, Wan D, Ni J, Yuan F, Wu X, Zhang Y, Wang L, Ye R, Byeon B, Wang W, Zhang S, Sima M, Chen S, Zhu M, Pei J, Johnson DM, Zhu S, Cao X, Pei C, Zai Z, Liu Y, Liu T, Swift GB, Zhang W, Yu M, Hu Z, Siedow JN, Chen X, Pei ZM (2020): Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in Arabidopsis. *Nature* 578(7796): 577–581.
- Wunderlich M, Gross-Hardt R, Schöfl F (2014): Heat shock factor HSF2a involved in gametophyte development of Arabidopsis thaliana and its expression is controlled by a heat-inducible long non-coding antisense RNA. *Plant Molecular Biology* 85(6): 541–50.
- Xing Y, Cao Q, Zhang Q, Qin L, Jia W, Zhang J (2013): MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 54: 1217–1227.
- Xu J, Zhang S (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20: 56–64.
- Xue L, Wang P, Wang L, Renzi E, Radivojac P, Tang H, Arnold R, Zhu JK, Tao WA (2013): Quantitative measurement of phosphoproteome response to osmotic stress in Arabidopsis based on Library-Assisted eXtracted Ion Chromatogram (LAXIC). *Molecular & Cellular Proteomics* 12(8): 2354–2369.
- Xue Y, Zhou F, Zhu M, Ahmed K, Chen G, Yao X (2005): GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Research* 33: W184–W187.
- Yamakura F, Kawasaki H (2010): Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804: 318–325.
- Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O (2012): Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine* 53: 260–270.
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007): Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 16369–16378.
- 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.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2004): A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors. *Journal of Molecular Biology* 337: 49–63.
- Yan J, Chia JC, Sheng H, Jung HI, Zavadna TO, Zhang L, Huang R, Jiao C, Craft EJ, Fei Z, Kochian LV, Vatamaniuk OK (2017): Arabidopsis Pollen Fertility Requires the Transcription Factors CITF1 and SPL7 That Regulate Copper Delivery to Anthers and Jasmonic Acid Synthesis. *The Plant Cell* 29: 3012–3029.
- Yang Z, Wang X, Gu S, Hu Z, Xu H, Xu C (2008): Comparative study of SBP-box gene family in Arabidopsis and rice. *Gene* 407: 1–11.

- Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché Jde D. Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development (2010): *BMC Plant Biology* 10: 36.
- Zeng Q, Chen JG, Ellis BE (2011): AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *The Plant journal* 67: 895–906.
- Zhang H, Zhou H, Berke L, Heck AJ, Mohammed S, Scheres B, Menke FL (2013): Quantitative phosphoproteomics after auxin-stimulated lateral root induction identifies an SNX1 protein phosphorylation site required for growth. *Molecular & Cellular Proteomics* 12(5): 1158–1169.
- Zhang J, Luo W, Zhao Y, Xu Y, Song S, Chong K (2016): Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species-dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice. *The New Phytologist* 211: 1295–1310.
- Zhang Z, Li W, Gao X, Xu M, Guo Y (2020): DEAR4, a Member of DREB/CBF Family, Positively Regulates Leaf Senescence and Response to Multiple Stressors in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 11: 367.
- Zulawski M, Braginets R, Schulze WX (2013): PhosPhAt goes kinases-searchable protein kinase target information in the plant phosphorylation site database PhosPhAt. *Nucleic Acids Research* 41: D1176–D1184.

9 Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Kontrola přenosu proteinů na PVDF membránu s využitím barvení Ponceau S.

Příloha 2: Detekce přítomnosti CSD1 proteinu u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) prostřednictvím imunoblotování se specifickou anti-CSD protilátkou.

Příloha 3: Seznam vyřazených transkripčních faktorů pro gen *CSD1*.

Příloha 4: Seznam vyřazených transkripčních faktorů pro gen *CSD2*.

Příloha 5: Data získaná s využitím softwaru GPS 3.0 pro gen *CSD1*.

Příloha 6: Data získaná s využitím softwaru GPS 3.0 pro gen *CSD2*.

Příloha 7: Data získaná s využitím softwaru GPS 3.0 pro gen *CSD1* a *CSD2* (překryv).

Příloha 8: Data získaná s využitím softwaru ELM pro gen *CSD1*.

Příloha 9: Data získaná s využitím softwaru ELM pro gen *CSD2*.

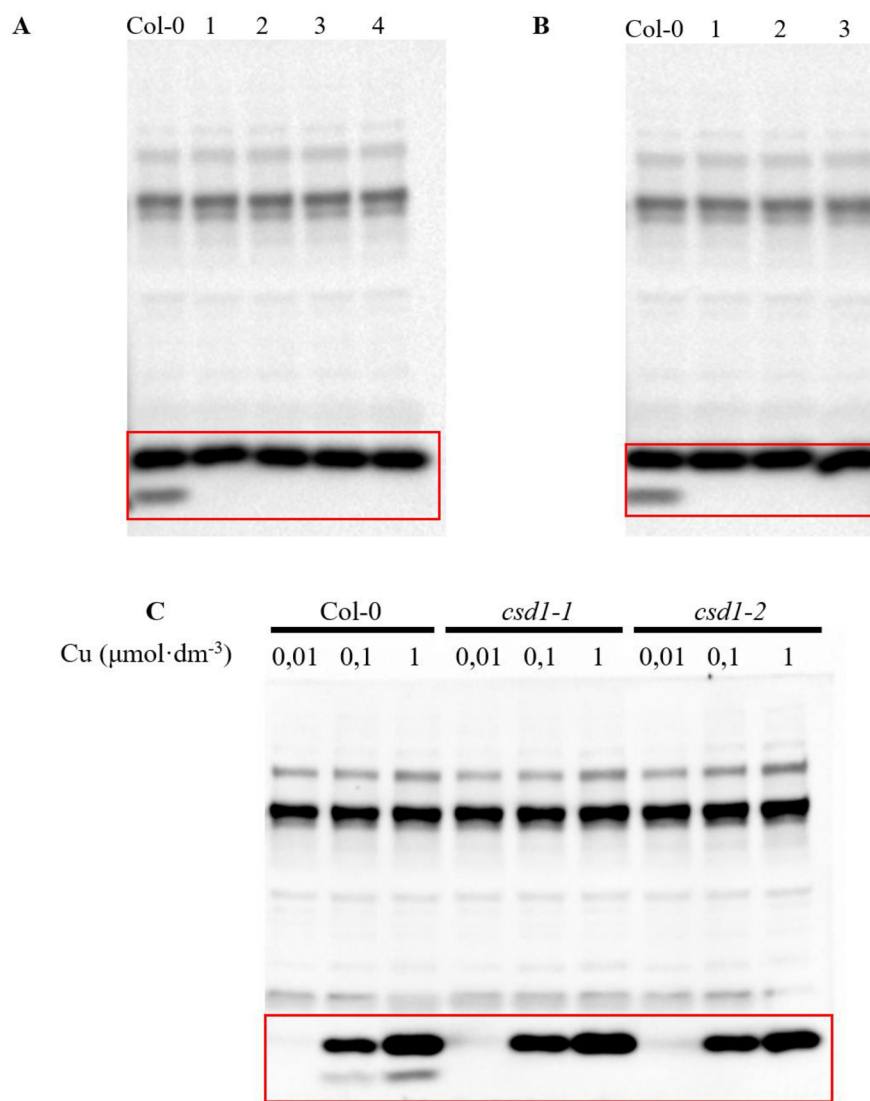
Příloha 10: Data získaná s využitím softwaru ELM pro gen *CSD1* a *CSD2* (překryv).

Příloha 11: Data získaná s využitím databáze PhosPhAt pro gen *CSD1*.

Příloha 12: Data získaná s využitím databáze PhosPhAt pro gen *CSD2*.

Příloha 13: Data získaná s využitím databáze PhosPhAt pro gen *CSD1* a *CSD2* (překryv).

Příloha 2: Detekce přítomnosti CSD1 proteinu u mutantních linií *csd1-1* a *csd1-2* v porovnání s rostlinou divokého typu (Col-0) prostřednictvím imunoblotování se specifickou anti-CSD1 protilátkou. A – Detekce přítomnosti proteinu CSD1 u mutantní linie *csd1-1*; B – Detekce přítomnosti proteinu CSD1 u mutantní linie *csd1-2*; C – Detekce přítomnosti proteinu CSD1 v závislosti na gradientu mědi v médiu; Col-0 – Protein vyextrahovaný z rostliny divokého typu, který sloužil jako pozitivní kontrola; 1, 2, 3, 4 (A) – Proteiny vyextrahované z homozygotních rostlin (*csd 1-1*) identifikované alelově specifickou PCR; 1, 2, 3 (B) – Proteiny vyextrahované z homozygotních rostlin (*csd1-2*) identifikované alelově specifickou PCR; *csd1-1*-T-DNA inzerční linie SALK_109389; *csd1-2*-T-DNA inzerční linie SALK_024857; 0,01, 0,1, 1 – koncentrace mědi v médiu v $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; „červený čtverec“ –výřez použitý ve výsledcích.



Příloha 3: Seznam vyřazených transkripčních faktorů pro gen *CSD1*.

Všechny identifikované transkripční faktory pro <i>CSD1</i>	Vyřazeno na základě AthaMap	Vyřazeno na základě GPS 3.0
<p>AGAMOUS-LIKE 15, ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 12 (ATHB12), ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 18, AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 12, AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 20, AT-HOOK PROTEIN OF GA FEEDBACK 1, BASIC LEUCINE-ZIPPER 1, BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1, DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER 1, ETHYLENE-INSENSITIVE3, ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 2 (ERF2), F-BOX/KELCH-REPEAT PROTEIN, GBF'S PRO-RICH REGION-INTERACTING FACTOR 1, GT-2LIKE PROTEIN, HEAT SHOCK FACTOR 4, HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR B2A, HOMEODOMAIN PROTEIN 51, HOX2a PROTEIN (HOX2a), HVH21, INCURVATA 4, INDETERMINATE 1 (ID1), KANADI 1, LEAFY, LEAFY COTYLEDON 2, MYB DOMAIN PROTEIN 111, MYB DOMAIN PROTEIN 46 (MYB46), MYB DOMAIN PROTEIN 52, MYB DOMAIN PROTEIN 55, MYB DOMAIN PROTEIN 59, MYB DOMAIN PROTEIN 61, MYB DOMAIN PROTEIN 83, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 3, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 46, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 58, NAC TRANSCRIPTION FACTOR 69 (TaNAC69), OPAQUE-2 (O2), P, PHD FINGER PROTEIN ALFIN1 (ALFIN1), PUTATIVE C2H2-ZINC-FINGER-TYPE, RELATED TO ABI3/VP1 1/ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 4, RESPONSE REGULATOR 10, RESPONSE REGULATOR 11, RESPONSE REGULATOR 14, REVEILLE 1, SHI RELATED SEQUENCE 1 (SRS1), SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 (SPL3), SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 7, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 8, STOMATAL CARPENTER 1, TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 1, TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 2, TGACG SEQUENCE-SPECIFIC BINDING PROTEIN 1, TGACG SEQUENCE-SPECIFIC BINDING PROTEIN 2, TRANSCRIPTION FACTOR GAMYB (GAMYB), TRANSCRIPTION FACTOR TEIL (TEIL), TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR OF EIN3-DEPENDENT ETHYLENE-RESPONSE 1, TRIHELIX TRANSCRIPTION FACTOR GT-1 (GT1), WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN PROTEIN 13, YABBY 5 (YAB5), YABBY 1, ZIM-LIKE 2/GATA TRANSCRIPTION FACTOR 28, ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6</p>	<p>ERF2, HOX2a, HVH21, ID1, TaNAC69, O2, P, ALFIN1, GAMYB, TEIL, GT1</p>	<p>ATHB12, MYB46, SRS1, SPL3, YAB5</p>

Příloha 4: Seznam vyřazených transkripčních faktorů pro gen *CSD2*.

Všechny identifikované transkripční faktory pro <i>CSD2</i>	Vyřazeno na základě AthaMap	Vyřazeno na základě GPS 3.0
<p>AGAMOUS-LIKE 15, ARABIDOPSIS THALIANA ACTIVATION FACTOR 2, ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 18, AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 12, AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 20, AT-HOOK PROTEIN OF GA FEEDBACK 1, AUXIN RESPONSE TRANSCRIPTION FACTOR 3, BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1, CORE-BINDING FACTOR (CBF), DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 2C (DREB2C), DOF AFFECTING GERMINATION 2, DREB AND EAR MOTIF PROTEIN 3, DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER 1, ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1, ETHYLENE RESPONSE FACTOR 109, ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 1, ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 2 (ERF2), ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR ABI4 (ABI4), GATA TRANSCRIPTION FACTOR 12, GBF'S PRO-RICH REGION-INTERACTING FACTOR 1, GT-2LIKE PROTEIN, HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR B2A, HOX2a PROTEIN (HOX2a), HVH21, INCURVATA 4, KANADI 1, LEAFY COTYLEDON 2, MYB DOMAIN 61, MYB DOMAIN 111, MYB DOMAIN 83, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 46 NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 58, OCTADECANOID-RESPONSIVE AP2/ERF-DOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR 47, P, PHD FINGER PROTEIN ALFIN1 (ALFIN1), RELATED TO ABI3/VP1 1/ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 4, RELATED TO AP2 10/DREB AND EAR MOTIF PROTEIN 4, RELATED TO AP2 3/ETHYLENE RESPONSE FACTOR 72, RELATED TO AP2 6, RESPONSE REGULATOR 11, RESPONSE REGULATOR 14, REVEILLE 1, SHATTERPROOF 1 (SHP1), SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 7, STOMATAL CARPENTER 1, TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 2, TATA BOX-BINDING PROTEIN-LIKE (TBP), TCP DOMAIN PROTEIN 11, TRANSCRIPTION FACTOR PCF2 (PCF2), TRANSCRIPTION FACTOR TEIL (TEIL), TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR OF EIN3-DEPENDENT ETHYLENE-RESPONSE 1, TRIHELIX TRANSCRIPTION FACTOR GT-1 (GT1), WRKY DNA-BINDING PROTEIN 12, WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 13, YABBY1, ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6</p>	<p>CBF, ERF2, ABI4, HOX2a, HVH21, P, ALFIN1, TBP, PCF2, TEIL, GT1</p>	<p>DREB2C, SHP1</p>

Příloha 5: Data získaná s využitím softwaru GPS 3.0 pro gen *CSD1*.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT1G02065	SPL8	49	S	DHRHITISPPPLLSSF	0,982	0,554
		49	S	DHRHITISPPPLLSSF	43,656	14,896
		94	T	LYGSTTTTTPYGASD	17,943	14,896
		95	T	YGSTTTTTPYGASDP	1,277	0,554
		95	T	YGSTTTTTPYGASDP	47,233	14,896
		185	T	GMANSLSTPRCQAEQ	0,743	0,554
		185	T	GMANSLSTPRCQAEQ	41,656	14,896
		277	T	QDTGTGKTTPKSPND	0,595	0,554
		278	T	DTGTGKTTPKSPNDS	1,273	0,554
		278	T	DTGTGKTTPKSPNDS	36,815	14,896
		281	S	TGKTTPKSPNDSGVK	1,819	0,554
		281	S	TGKTTPKSPNDSGVK	51,742	14,896
		292	S	SGVKASSSPSSNAPP	1,128	0,554
		292	S	SGVKASSSPSSNAPP	34,959	14,896
		295	S	KASSSPSSNAPPTIS	0,623	0,554
320	S	TTASSSTASSSNS	0,622	0,554		
AT1G12870	F-box/kelch-repeat protein	142	S	DGIFCIHSPKTQDIY	0,612	0,554
		142	S	DGIFCIHSPKTQDIY	22,677	14,896
		361	T	KDLVLESSTPVAIYKD	0,766	0,554
		361	T	KDLVLESSTPVAIYKD	23,716	14,896
AT1G17950	MYB52	61	T	RINRNPFTEEEEERL	1,649	0,554
		177	T	IGFRNSTTPIQEGAI	0,904	0,554
		177	T	IGFRNSTTPIQEGAI	27,281	14,896
AT1G51600	ZML2	125	S	AAPPGLGSPHQNNRV	0,683	0,554
		125	S	AAPPGLGSPHQNNRV	28,236	14,896
		138	T	RVSSLPGTPQRFSIP	1,839	0,554
		138	T	RVSSLPGTPQRFSIP	40,696	14,896
		233	T	CGIGEKSTPMMRRGP	0,802	0,554
		233	T	CGIGEKSTPMMRRGP	26,228	14,896
		267	S	FRDLSKASPQTAQNL	0,75	0,554
		267	S	FRDLSKASPQTAQNL	36,694	14,896

Příloha 5: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT2G28550	TOE1	10	S	DLNLNADSP S PESTQYG	0,977	0,554
		10	S	DLNLNADSP S PESTQYG	37,74	14,896
		13	S	LNADSP S PESTQYGGDS	14,921	14,896
		40	T	NRVEESG T STSSVIN	0,718	0,554
		78	S	SSSGGDE S PAASASV	0,73	0,554
		78	S	SSSGGDE S PAASASV	39,108	14,896
		128	T	DGETKLV T PVPTPAP	1,659	0,554
		128	T	DGETKLV T PVPTPAP	40,718	14,896
		132	T	KLVTPV T PAPVPAQ	1,821	0,554
		132	T	KLVTPV T PAPVPAQ	30,853	14,896
AT3G15500	NAC3	188	T	YSNNGSS T SSSSHQY	0,587	0,554
		AT3G20770	EIN3	42	T	SIVEDDY T DDEIDVD
AT3G20770	EIN3	174	T	GNNPIG T PHTLQEL	0,837	0,554
		174	T	GNNPIG T PHTLQEL	31,845	14,896
		592	T	FQLVFD S TPFDMAF	28,409	14,896
AT3G53600	Putative C2H2-zinc-finger-type	6	S	**MKRDR S DYEEESMK	0,607	0,554
		151	T	EILDNL T PLENDLV	1,096	0,554
		151	T	EILDNL T PLENDLV	40,602	14,896
AT4G01680	MYB55	18	S	KLRKGLW S PPEEDEKL	1,221	0,554
		18	S	KLRKGLW S PPEEDEKL	28,596	14,896
		146	T	KLLTEI E TGTDDKTK	0,603	0,554
		148	T	LTEI E TGTDDKTKPV	0,64	0,554
		176	S	SSST T TCSTNQNNNT	16,799	14,896
AT4G31920	RR10	356	S	SFTSQQN S PMVAPSN	0,898	0,554
		356	S	SFTSQQN S PMVAPSN	43,114	14,896
		383	S	LPSNPG F SPHFEISK	0,589	0,554
		383	S	LPSNPG F SPHFEISK	27,588	14,896
		401	S	HWSNAAL S TNIPQSD	15,62	14,896
		426	S	NAFCDS A SPLVNPPL	0,677	0,554
		426	S	NAFCDS A SPLVNPPL	33,181	14,896

Příloha 5: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT4G36990	HSF4	28	T	QLVDDHSTDDVVS WN	0,768	0,554
		120	S	GKCVVVGSPSES NSG	1,393	0,554
		120	S	GKCVVVGSPSES NSG	36,664	14,896
		139	S	HGSSSTS SPGSSKNP	1,832	0,554
		139	S	HGSSSTS SPGSSKNP	50,261	14,896
AT5G03510	Putative C2H2-zinc-finger-type	30	S	TKRQRSASPLMMNAA	0,641	0,554
		30	S	TKRQRSASPLMMNAA	31,929	14,896
		67	T	EVEFQGATDEDEDMA	1,408	0,554
		180	T	SFLSLQV TSSDGSKK	0,565	0,554
AT5G03790	HB51	44	T	PYAGNSYTPGDTQTG	1,082	0,554
		44	T	PYAGNSYTPGDTQTG	32,317	14,896
AT5G06950	TGA2	5	S	***MADTSPRTDVST	0,646	0,554
		5	S	***MADTSPRTDVST	43,791	14,896
		8	T	MADTSPRTDVSTDDD	0,859	0,554
		11	S	TSPRTDVSTDDDTDH	0,727	0,554
		12	T	SPRTDVSTDDDTDHP	1,555	0,554
		181	T	LLSGMWKTPAERCFL	22,7	14,896
AT5G49450	bZIP1	7	T	*MANAEKTSSGSDID	0,59	0,554
		11	S	AEKTSSGSDIDEKKR	0,619	0,554
		128	T	AVGDCRRTPWKLSCG	0,686	0,554
		128	T	AVGDCRRTPWKLSCG	30,957	14,896
AT5G59780	MYB59	14	T	EYRKGPWTEQEDILL	0,739	0,554
		67	T	GLKRGKMPQEERLV	0,98	0,554
		67	T	GLKRGKMPQEERLV	30,182	14,896
		120	S	QEKKRPMSP TSSSSN	2,161	0,554
		120	S	QEKKRPMSP TSSSSN	47,715	14,896
		134	T	NCCSSMTTTTSQDT	0,754	0,554
		135	T	CCSSMTTTTSQDTG	0,63	0,554
		136	T	CSSMTTTTSQDTGG	0,712	0,554
		136	T	CSSMTTTTSQDTGG	15,746	14,896
		196	S	LNFPPLASPTWESSL	0,867	0,554
196	S	LNFPPLASPTWESSL	39,761	14,896		
AT5G61850	LFY	36	T	PLQQQPVPQTAAFG	1,602	0,554
		36	T	PLQQQPVPQTAAFG	52,517	14,896
		205	T	PMLTSVETDEDVNEG	1,078	0,554
AT5G65210	TGA1	41	T	ISNGTMNTPNHIIIP	0,836	0,554
		41	T	ISNGTMNTPNHIIIP	28,552	14,896
		68	T	TSHGTAGTPHMF DQE	0,669	0,554
		68	T	TSHGTAGTPHMF DQE	34,42	14,896

Příloha 6: Data získaná s využitím softwaru GPS 3.0 pro gen *CSD2*.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT1G43160	RAP2.6	169	T	LVGMLQPTEEENHFF	0,762	0,554
AT1G74930	ORA47	52	T	IWLGSYDTPEKAARA	1,015	0,554
		52	T	IWLGSYDTPEKAARA	25,572	14,896
		90	T	ISVEKSLTPPEIQEA	1,356	0,554
		90	T	ISVEKSLTPPEIQEA	34,458	14,896
		127	S	GSEIRPESPSTSASV	1,75	0,554
		127	S	GSEIRPESPSTSASV	45,147	14,896
AT2G23340	DEAR3	59	T	IWLGSYATPEAAARA	0,747	0,554
		59	T	IWLGSYATPEAAARA	28,065	14,896
		165	S	KLPDPENSDGDDDEC	1,126	0,554
AT2G33860	ARF3	12	T	IDLNVMETEEDETQT	1,174	0,554
		17	T	METEEDETQTQTPSS	0,698	0,554
		19	T	TEEDETQTQTPSSAS	0,661	0,554
		21	T	EDETQTQTPSSASGS	1,957	0,554
		21	T	EDETQTQTPSSASGS	51,409	14,896
		30	S	SSASGSVSPTSSSSA	2,009	0,554
		30	S	SSASGSVSPTSSSSA	43,434	14,896
		32	T	ASGSVSPSSSSASV	0,656	0,554
		155	T	EVLKRSNTPHMFCKT	19,195	14,896
		343	S	EDASERRSPGIISGI	0,783	0,554
		343	S	EDASERRSPGIISGI	26,534	14,896
		383	S	NGHQQRVSPWEIEPS	27,192	14,896
		427	T	VSEGIRATDFEESLR	0,613	0,554
		524	S	LPPSVSSPSSVLLT	1,386	0,554
		524	S	LPPSVSSPSSVLLT	36,456	14,896
		535	S	VLLTNSNSPNGRLED	0,742	0,554
535	S	VLLTNSNSPNGRLED	21,151	14,896		
AT2G37000	TCP11	124	S	SSSSSMTSPQTQTQT	1,424	0,554
		124	S	SSSSSMTSPQTQTQT	46,922	14,896
		127	T	SSMTSPQTQTQTPQS	0,818	0,554
		127	T	SSMTSPQTQTQTPQS	17,19	14,896
		131	T	SPQTQTQTPQSPSCR	1,889	0,554
		131	T	SPQTQTQTPQSPSCR	43,062	14,896
		134	S	TQTQTPQSPSCRLDL	1,183	0,554
		134	S	TQTQTPQSPSCRLDL	47,8	14,896
		168	T	AMLLEPMTTTAESEV	0,587	0,554
		168	T	AMLLEPMTTTAESEV	18,929	14,896
		169	T	MLLEPMTTTAESEVE	0,853	0,554

Příloha 6: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT2G44745	WRKY12	53	S	SSSSSLSSPSFPIHN	0,966	0,554
		53	S	SSSSSLSSPSFPIHN	41,902	14,896
		65	T	IHNSSSTTTHAPLG	0,648	0,554
		66	T	HNSSSTTTHAPLGF	17,317	14,896
		208	T	HIPSDDSTSPDHDCL	0,934	0,554
		209	S	IPSDDSTSPDHDCLS	0,88	0,554
		209	S	IPSDDSTSPDHDCLS	37,233	14,896
AT2G46590	DAG2	226	S	SVYGSSSPVSALEL	1,067	0,554
		226	S	SVYGSSSPVSALEL	40,632	14,896
		326	T	KELSSSIQEVDHDD	0,647	0,554
		350	S	NNNNNNSPNNGYWS	0,588	0,554
		350	S	NNNNNNSPNNGYWS	30,75	14,896
AT3G16770	RAP2.3	146	T	HPPPPNYTPPPSSPR	1,835	0,554
		146	T	HPPPPNYTPPPSSPR	27,908	14,896
		150	S	PNYTPPPSSPRSTDQ	0,737	0,554
		151	S	NYTPPPSSPRSTDQP	2,02	0,554
		151	S	NYTPPPSSPRSTDQP	49,723	14,896
		154	S	PPPSSPRSTDQPPAK	0,714	0,554
		154	S	PPPSSPRSTDQPPAK	17,116	14,896
AT3G23240	ERF1	8	S	MDPFLIQSPFSGFSP	33,472	14,896
		14	S	QSPFSGFSPEYSIGS	32,212	14,896
		22	S	PEYSIGSPDSFSSS	0,92	0,554
		22	S	PEYSIGSPDSFSSS	35,469	14,896
		159	S	YTYEDGCSPVVALKR	0,681	0,554
		159	S	YTYEDGCSPVVALKR	28,429	14,896
AT4G17500	ERF1A	100	S	GGWEPSSSSDEDRS	1,059	0,554
		101	S	GWEPSSSSDEDRSS	0,683	0,554
		102	S	WEPSSSSDEDRSSF	0,97	0,554
		116	T	FPSVKIETPESFAAV	0,852	0,554
		116	T	FPSVKIETPESFAAV	25,688	14,896
		134	S	PVKKEKTPVSAAVT	0,882	0,554
		134	S	PVKKEKTPVSAAVT	34,475	14,896
AT4G34410	ERF109	25	S	RYQKEQLSPEQELSV	0,812	0,554
		25	S	RYQKEQLSPEQELSV	39,686	14,896
		104	T	HQQEEETSSNRRR	0,666	0,554
		114	S	SNRRRESPVAKKAE	0,777	0,554
		114	S	SNRRRESPVAKKAE	24,531	14,896
		202	S	DYTSSVSPVAADDI	1,308	0,554
		202	S	DYTSSVSPVAADDI	39,07	14,896
		222	T	ASASVSATDSVEAEQ	0,684	0,554

Příloha 6: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT4G36900	RAP2.10	13	T	EVATVVSTPAVTVAA	1,614	0,554
		13	T	EVATVVSTPAVTVAA	43,301	14,896
		61	T	IWLGSYSTPEAAARA	0,747	0,554
		61	T	IWLGSYSTPEAAARA	28,742	14,896
		192	T	NKLPDPETSDDD***	1,239	0,554
		193	S	KLPDPETSDDD****	1,16	0,554
AT5G08790	ATAF2	175	T	PADEKPRTTTMAEQS	0,587	0,554
		175	T	PADEKPRTTTMAEQS	16,648	14,896
		184	S	TMAEQSSSPFDTSDS	1,023	0,554
		184	S	TMAEQSSSPFDTSDS	39,97	14,896
		195	T	TSDSTYPTLQEDDSS	0,644	0,554
		212	S	GGHGHVVSPDVLEVQ	0,725	0,554
		212	S	GGHGHVVSPDVLEVQ	34,274	14,896
AT5G25830	GATA12	24	S	DDLIVDFSNDDDEEN	0,786	0,554
		38	T	NDVVADSTTTTTITD	14,992	14,896
		40	T	VVADSTTTTTITDSS	18,211	14,896
		41	T	VADSTTTTTITDSSN	0,588	0,554
		41	T	VADSTTTTTITDSSN	15,417	14,896
		42	T	ADSTTTTTITDSSNF	0,567	0,554
		94	S	NIVDESLSPEDVHKL	1,162	0,554
		94	S	NIVDESLSPEDVHKL	30,719	14,896
		119	S	DPKSDTGSPENPNSS	1,418	0,554
		119	S	DPKSDTGSPENPNSS	50,195	14,896
		127	S	PENPNSSSPIFTTDV	0,989	0,554
		127	S	PENPNSSSPIFTTDV	27,834	14,896
		165	S	LKETFYDSPFTGETI	28,68	14,896
		180	S	LSSQHLSPPTSPPL	1,259	0,554
		180	S	LSSQHLSPPTSPPL	34,487	14,896
		184	S	QHLSPPTSPPLLMAP	1,619	0,554
		184	S	QHLSPPTSPPLLMAP	62,17	14,896
		210	S	RRKKDVS SPESGGAE	0,873	0,554
		210	S	RRKKDVS SPESGGAE	36,496	14,896
		229	T	LHCATDKTPQWRTGP	0,58	0,554
229	T	LHCATDKTPQWRTGP	28,441	14,896		
264	S	PEYRPAA SPTFVLAK	0,749	0,554		
264	S	PEYRPAA SPTFVLAK	28,607	14,896		

Příloha 7: Data získaná s využitím softwaru GPS 3.0 pro gen *CSD1* a *CSD2* (překryv).

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT1G09540	MYB61	18	S	KLRKGLWSP E EDEKL	1,221	0,554
		18	S	KLRKGLWSP E EDEKL	28,596	14,896
		71	S	DLKRGAFSP E EENLI	0,984	0,554
		71	S	DLKRGAFSP E EENLI	32,372	14,896
		155	S	RSGNDHKSP S SSSAT	1,238	0,554
		155	S	RSGNDHKSP S SSSAT	32,998	14,896
		208	S	SMIPPQFSPGNMVG S	0,953	0,554
		208	S	SMIPPQFSPGNMVG S	35,67	14,896
		219	T	MVGSVLQTPVCVK P S	1,153	0,554
		219	T	MVGSVLQTPVCVK P S	35,743	14,896
		237	S	PPDNNSSSP I SGGDH	0,875	0,554
		237	S	PPDNNSSSP I SGGDH	29,593	14,896
		277	S	FSWSIPNST S SSSQV	0,608	0,554
		301	T	KWSEYLNTPFFIG S T	30,463	14,896
		344	T	SQ N ENLGT T ETSDVF	0,764	0,554
AT1G13260	RAV1	12	S	SVDESTTSTGSIC E T	15,231	14,896
		19	T	STGSICETPAIT P AK	1,372	0,554
		19	T	STGSICETPAIT P AK	44,688	14,896
		23	T	ICETPAITPAKK S SV	1,864	0,554
		23	T	ICETPAITPAKK S SV	34,328	14,896
		193	T	ALFEKAVTPSDVG K L	1,148	0,554
		193	T	ALFEKAVTPSDVG K L	31,937	14,896
		310	S	RLFGVNI S P E SSRND	1,119	0,554
		310	S	RLFGVNI S P E SSRND	31,998	14,896
AT1G28300	LEC2	124	S	MRSRNNSPN S SPSE	1,07	0,554
		124	S	MRSRNNSPN S SPSE	31,357	14,896
		128	S	NNSSPNSP S SELVDS	1,229	0,554
		128	S	NNSSPNSP S SELVDS	39,628	14,896
AT1G42990	BZIP60	38	S	AEDFLQSP D SWIGE	28,507	14,896
		100	S	DKVLTVDSPAA A DDS	0,87	0,554
		100	S	DKVLTVDSPAA A DDS	41,504	14,896

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT1G52150	ICU4	22	T	NGKYVRYTPEQVEAL	0,954	0,554
		22	T	NGKYVRYTPEQVEAL	22,006	14,896
		121	T	NSYFRQHTPNPSLPA	0,706	0,554
		121	T	NSYFRQHTPNPSLPA	23,832	14,896
		154	S	QNPQRDASPAGLLSI	33,712	14,896
		351	S	VLRPLYESPKVLAQK	0,574	0,554
		351	S	VLRPLYESPKVLAQK	32,941	14,896
		431	S	VTITVNSSPDKLMGL	1,046	0,554
		431	S	VTITVNSSPDKLMGL	40,819	14,896
		535	S	KLEGLGHSPEDAIVP	0,562	0,554
		535	S	KLEGLGHSPEDAIVP	26,032	14,896
		599	S	SAKQEVSPNRTLDD	1,155	0,554
		599	S	SAKQEVSPNRTLDD	39,786	14,896
		673	S	QRVALALSPSHISSQ	1,044	0,554
		673	S	QRVALALSPSHISSQ	41,913	14,896
		685	T	SSQVGLRTPPLGTPEA	0,984	0,554
		685	T	SSQVGLRTPPLGTPEA	39,209	14,896
		689	T	GLRTPPLGTPEAQTLA	1,307	0,554
689	T	GLRTPPLGTPEAQTLA	37,713	14,896		
AT1G63480	AHL12	121	S	SNKSRDSSPMSDPNE	1,02	0,554
		121	S	SNKSRDSSPMSDPNE	33,593	14,896
		124	S	SRDSSPMSDPNEPKR	0,665	0,554
		303	S	PNEEDNNSMETTPG	0,613	0,554
		308	T	NNSEMETTPGSAAEP	1,102	0,554
		308	T	NNSEMETTPGSAAEP	42,086	14,896
		311	S	EMETTPGSAAEPAAS	15,496	14,896
		323	T	AASAGQQTPOQNFSSQ	0,749	0,554
323	T	AASAGQQTPOQNFSSQ	37,029	14,896		
AT1G67710	ARR11	7	S	*MEKSGFSPVGLRVL	0,666	0,554
		7	S	*MEKSGFSPVGLRVL	32,128	14,896
		271	S	GVKNADSSPKDVEVN	0,886	0,554
		271	S	GVKNADSSPKDVEVN	33,209	14,896
		283	S	EVNSGYQSPGRSSYV	1,199	0,554
		283	S	EVNSGYQSPGRSSYV	24,675	14,896
		398	T	EMKPPYETPAGGSSV	0,893	0,554
		398	T	EMKPPYETPAGGSSV	30,396	14,896
		485	S	QFQDYSSSPSLLSEL	0,761	0,554
		485	S	QFQDYSSSPSLLSEL	32,71	14,896

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT2G01760	RR14	265	S	LSGEASQ S NDSESTK	0,599	0,554
AT2G17180	DAZ1	4	T	*** M SN T SNSDPNS	0,563	0,554
		7	S	* M SNT S N S DPNSDIP	0,557	0,554
		47	S	E V G S S S S S SPR P K P V T	1,514	0,554
		47	S	E V G S S S S S SPR P K P V T	31,436	14,896
		54	T	SPR P K P V T Q P D P D A S	0,676	0,554
AT2G20570	GLK1	5	S	*** M L A L S P A T R D G C	0,82	0,554
		5	S	*** M L A L S P A T R D G C	35,597	14,896
		87	T	M N A S S T I T T S D K T D	0,788	0,554
		88	T	N A S S T I T T S D K T D S	0,607	0,554
		89	T	A S S T I T T T S D K T D S Q	0,625	0,554
		93	T	I T T T S D K T D S Q G E T T	0,978	0,554
		175	T	F F L K V D W T P E L H R R F	0,754	0,554
		175	T	F F L K V D W T P E L H R R F	15,487	14,896
		315	S	P K H L P P P S T A M P N P P	18,631	14,896
		316	T	K H L P P P S T A M P N P P F	0,688	0,554
		339	T	H P M H N G T T P Y L P T V A	0,64	0,554
339	T	H P M H N G T T P Y L P T V A	32,287	14,896		
AT2G42430	ASL18	14	S	G T T A G T G S P C G A C K F	0,612	0,554
		14	S	G T T A G T G S P C G A C K F	39,223	14,896
		146	S	T W Q Q T S V S P I G S A S Y S	1,058	0,554
		146	S	T W Q Q T S V S P I G S A S Y S	33,791	14,896
		154	T	P I G S A S Y S T P Y N H H Q P	0,596	0,554
		154	T	P I G S A S Y S T P Y N H H Q P	23,796	14,896
		173	S	V N P N N P V S P Q S S L E E	1,548	0,554
		173	S	V N P N N P V S P Q S S L E E	52,211	14,896
		183	S	S S L E E S F S N T S S D V T	0,61	0,554
		185	T	L E E S F S N T S S D V T T T	0,579	0,554
AT2G45190	YAB1	8	S	M S M S S M S S P S S A V C S	1,426	0,554
		8	S	M S M S S M S S P S S A V C S	44,315	14,896
		15	S	S P S S A V C S P D H F S P S	1,002	0,554
		15	S	S P S S A V C S P D H F S P S	34,569	14,896
		20	S	V C S P D H F S P S D H L C Y	0,591	0,554
		20	S	V C S P D H F S P S D H L C Y	16,45	14,896
		227	T	A A A N V G V T P Y *****	1,07	0,554
		227	T	A A A N V G V T P Y *****	36,073	14,896

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT2G46830	CCA1	28	T	TKQRRERWTEEEHNRF	0,93	0,554
		151	T	QSKPEEKTLQEDNCS	0,61	0,554
		275	T	IMSTLLQTPALYTAA	0,791	0,554
		275	T	IMSTLLQTPALYTAA	38,475	14,896
		297	S	PPDSSGGSPVPGNSP	1,057	0,554
		297	S	PPDSSGGSPVPGNSP	35,285	14,896
		303	S	GSPVPGNSPPNLAAM	0,871	0,554
		303	S	GSPVPGNSPPNLAAM	34,683	14,896
		403	T	CHEQPSATPESDAKG	1,442	0,554
		403	T	CHEQPSATPESDAKG	34,282	14,896
		406	S	QPSATPESDAKGS DG	16,83	14,896
		429	T	RSSCGSNTPSSSDDV	1,389	0,554
		429	T	RSSCGSNTPSSSDDV	28,36	14,896
		431	S	SCGSNTPSSSDDVEA	0,6	0,554
		432	S	CGSNTPSSSDDVEAD	0,794	0,554
		441	S	DDVEADASERQEDGT	0,608	0,554
		448	T	SERQEDGTNGEVKET	0,587	0,554
		455	T	TNGEVKETNEDTNKP	0,714	0,554
		537	T	LNFTAQLTPVDDQEE	1,107	0,554
537	T	LNFTAQLTPVDDQEE	42,307	14,896		
AT3G04060	NAC046	176	T	FHKNAPSTTITTTKQ	0,673	0,554
		176	T	FHKNAPSTTITTTKQ	20,962	14,896
		301	T	SDVNTTATPEISSYP	1,744	0,554
		301	T	SDVNTTATPEISSYP	42,404	14,896
AT3G08500	MYB83	36	S	KLRKGLWSPDEDEKL	1,16	0,554
		36	S	KLRKGLWSPDEDEKL	24,64	14,896
		89	S	DLKRGFSFPQEEDLI	1,154	0,554
		89	S	DLKRGFSFPQEEDLI	26,017	14,896
		142	T	KNNSNNNTSSGSSPN	0,587	0,554
		147	S	NNTSSGSPNNSNSN	1,239	0,554
		147	S	NNTSSGSPNNSNSN	42,144	14,896
		195	S	TMRMDSSSPFNVGPM	26,314	14,896
AT3G18400	NAC058	173	S	SSQPSFGSPCDANSS	0,558	0,554
		173	S	SSQPSFGSPCDANSS	34,13	14,896
		251	S	SLLGPPLSPINSLLL	1,534	0,554
		251	S	SLLGPPLSPINSLLL	54,715	14,896

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT4G14465	AHL20	90	S	PIFVTRD S PNALRSH	0,668	0,554
		90	S	PIFVTRD S PNALRSH	32,417	14,896
		166	S	GAFPLPGP S PPGSTGL	1,108	0,554
		166	S	GAFPLPGP S PPGSTGL	36,681	14,896
		170	S	PGPSPPG S TGLTVYL	0,592	0,554
		170	S	PGPSPPG S TGLTVYL	21,144	14,896
		234	S	QIHGGGD S PPRIGSN	0,779	0,554
		234	S	QIHGGGD S PPRIGSN	27,187	14,896
AT4G35390	AGF1	23	T	QRPEDSR T PPDQNNM	1,387	0,554
		23	T	QRPEDSR T PPDQNNM	26,748	14,896
		45	T	DEAKAET T PTGGATS	0,794	0,554
		45	T	DEAKAET T PTGGATS	47,396	14,896
		55	T	GGATSSA T ASGSSSG	0,59	0,554
		86	S	PTIITRD S PNVLRSH	0,613	0,554
		86	S	PTIITRD S PNVLRSH	30,003	14,896
		219	T	LPIEEEE T PPPRTTG	1,433	0,554
		219	T	LPIEEEE T PPPRTTG	32,732	14,896
		224	T	EETPPP R TGVQQQQ	0,604	0,554
AT4G35550	WOX13	39	T	GMYVKVM T DEQYETL	0,655	0,554
		101	T	MTARQRW T PTPVQLQ	1,041	0,554
		101	T	MTARQRW T PTPVQLQ	19,293	14,896
		103	T	ARQRW T PTPVQLQIL	0,647	0,554
		103	T	ARQRW T PTPVQLQIL	33,499	14,896
		120	T	IFDQGT G TPSKQKIK	1,599	0,554
		120	T	IFDQGT G TPSKQKIK	37,073	14,896
		207	T	SNNGL G TTTATTTA	15,307	14,896
		211	T	GLGTT A TTTAPRPE	17,623	14,896
		224	S	PEDLCFQ S PEISSDL	35,563	14,896
AT4G35610	TREE1	14	T	EKTKVDV T EEEEKEES	1,363	0,554
		26	S	EESDEQW S DEETNMR	1,097	0,554
		54	S	RIFGESS S VVEEDAE	0,576	0,554
		106	T	KSRPRIS T QTDDEGD	0,673	0,554
		108	T	RPRIS T QTDDEGDGL	1,346	0,554
		259	S	AKFDLNK S PPKDEEE	1,196	0,554
		259	S	AKFDLNK S PPKDEEE	31,176	14,896

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT5G04340	ZAT6	8	S	MALETLTSPRLSSPM	1,188	0,554
		8	S	MALETLTSPRLSSPM	44,258	14,896
		13	S	LTSPLRLSPMPTLFQ	0,93	0,554
		13	S	LTSPLRLSPMPTLFQ	32,35	14,896
		47	T	EFDRQSLTEDEYIAL	0,661	0,554
		77	S	DLPSSSSSPPLLPL	1,287	0,554
		77	S	DLPSSSSSPPLLPL	42,094	14,896
		86	T	PLLPLPLTPPIYKCSV	0,793	0,554
		86	T	PLLPLPLTPPIYKCSV	27,564	14,896
		184	S	GGVSSSVNSSEVGS	0,706	0,554
		223	S	NGDEEVMSPMPAKKL	1,186	0,554
		223	S	NGDEEVMSPMPAKKL	32,36	14,896
AT5G12870	MYB46	24	S	KMKKGLWSPEEDSKL	1,095	0,554
		24	S	KMKKGLWSPEEDSKL	27,209	14,896
		77	S	DLKRGAFSPQEEDLI	1,027	0,554
		77	S	DLKRGAFSPQEEDLI	32,074	14,896
		138	S	LINNSSSPNTASDS	1,383	0,554
		138	S	LINNSSSPNTASDS	40,61	14,896
		141	T	NSSSPNTASDSSN	1,123	0,554
		199	T	HPCNDDFTPYVDGIY	0,604	0,554
		199	T	HPCNDDFTPYVDGIY	26,19	14,896
AT5G13790	AGL15	78	S	NHQSSASKAEDCA	0,779	0,554
		205	T	SKCSLQNTDSDTTLQ	0,822	0,554
		231	S	TNEGERESPSSDSVT	1,038	0,554
		231	S	TNEGERESPSSDSVT	31,125	14,896
		234	S	GERESPSSDSVTNT	0,565	0,554
		234	S	GERESPSSDSVTNT	20,141	14,896
		238	T	SPSSDSVTNTSSET	0,742	0,554
		239	T	PSSDSVTNTSSETA	0,725	0,554
		241	T	SDSVTTNTSSETAER	0,606	0,554
		257	S	DQSSLANSPPEAKRQ	1,218	0,554
		257	S	DQSSLANSPPEAKRQ	35,319	14,896

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT5G16560	KAN1	13	T	VFLEKTKNTTTTLP	0,578	0,554
		16	T	EKTKTNTTTLPDLS	16,816	14,896
		164	S	AYRSLQSSPRLKGV	0,688	0,554
		164	S	AYRSLQSSPRLKGV	37,945	14,896
		191	S	VGSSDSSPHHHNH	0,889	0,554
		191	S	VGSSDSSPHHHNH	20,78	14,896
		246	T	LGGHERATPKSVLEL	0,75	0,554
		246	T	LGGHERATPKSVLEL	27,127	14,896
		287	S	PAASSDGSGEEMGI	0,847	0,554
AT5G17300	RVE1	4	S	***MASPLTANVQ	0,981	0,554
		4	S	***MASPLTANVQ	43,12	14,896
		59	T	TKERERWDEEHKKF	0,974	0,554
		149	S	DQTSRSVSPSERDTQ	1,304	0,554
		149	S	DQTSRSVSPSERDTQ	27,834	14,896
		157	S	PSERDTQSPTSVLST	1,059	0,554
		157	S	PSERDTQSPTSVLST	39,727	14,896
		177	S	LCSLDSSPNRSLSP	0,874	0,554
		177	S	LCSLDSSPNRSLSP	34	14,896
		183	S	SSPNRSLSPVSSASP	1,33	0,554
		183	S	SSPNRSLSPVSSASP	33,095	14,896
		189	S	LSPVSSASPPAALT	0,944	0,554
		189	S	LSPVSSASPPAALT	42,723	14,896
		258	S	TTSTYCKSPIQPLPR	0,735	0,554
		258	S	TTSTYCKSPIQPLPR	28,859	14,896
		319	T	GSSTGSNTGSVDDTG	0,62	0,554
		328	T	SVDDTGHTTEKTTEPE	0,557	0,554
		331	T	DTGHTEKTTEPETML	0,609	0,554
		332	T	TGHTEKTTEPETMLC	0,584	0,554
		357	T	AFSELRRTNSESNSR	0,575	0,554
376	T	YKKRKMVTEEEEHEI	1,106	0,554		

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT5G18830	SPL7	7	S	*MSSLSQSPPPPEMD	1,493	0,554
		7	S	*MSSLSQSPPPPEMD	36,475	14,896
		59	S	IHFPPVLSPPPLPLI	1,429	0,554
		59	S	IHFPPVLSPPPLPLI	37,759	14,896
		70	T	PPLIPTQTPAESELD	1,757	0,554
		70	T	PPLIPTQTPAESELD	42,586	14,896
		79	S	AESELDPSPEESGSG	1,168	0,554
		79	S	AESELDPSPEESGSG	42,743	14,896
		304	S	NDTKFERSPSNGDNK	0,643	0,554
		304	S	NDTKFERSPSNGDNK	26,19	14,896
		431	S	RVDVKLESPKLQFVY	28,231	14,896
		670	S	DIHRKHQSPIESKVN	0,828	0,554
		670	S	DIHRKHQSPIESKVN	22,477	14,896
		718	S	ERIQADCSPDSGGKE	0,618	0,554
718	S	ERIQADCSPDSGGKE	38,96	14,896		
AT5G28300	GT2L	16	S	QIHRFIASPPPPPPPL	1,055	0,554
		16	S	QIHRFIASPPPPPPPL	29,788	14,896
		142	S	AEVGFKRSPQECKEK	19,157	14,896
		376	T	IKFISKFTDHDLDVV	0,637	0,554
		388	S	DVVQNPTSPSQDSSS	1,688	0,554
		388	S	DVVQNPTSPSQDSSS	59,019	14,896
		419	T	SLLPQTLTPHNLLTI	0,803	0,554
		419	T	SLLPQTLTPHNLLTI	45,97	14,896
		434	S	DKSLEPFSTKTLKPK	15,989	14,896
		450	S	QNPKPPKSDDKSDLG	0,761	0,554
		563	T	YSQPPTGTTATTATT	0,556	0,554
		563	T	YSQPPTGTTATTATT	17,512	14,896
		566	T	PPTGTTATTATTATS	21,41	14,896
AT5G49330	MYB111	18	T	GLKRGRWTAEEDEIL	0,969	0,554
		71	T	DLKRGNITSDEEEI I	1,339	0,554
		72	S	LKRGNITSDEEEI IV	0,696	0,554
		267	T	KIGHVGI TEVDHDMT	0,573	0,554

Příloha 7: Pokračování.

GPS 3.0 (CMGC/MAPK)						
AGI	Název	Pozice	Kód	Peptid	Skóre	Cutoff
AT5G60120	TOE2	14	T	DVDSTESTQNERDSI	0,924	0,554
		36	T	NQMDESVTSNSSVVN	0,622	0,554
		380	T	MAAAACDTPFNFLKR	27,881	14,896
		404	S	ALPSAFFSPMERTPE	0,942	0,554
		404	S	ALPSAFFSPMERTPE	27,819	14,896
		409	T	FFSPMERTPEKGLML	1,057	0,554
		409	T	FFSPMERTPEKGLML	25,141	14,896
		AT5G62020	HSFB2A	3	S	*****MNSPPVDAMI
3	S			*****MNSPPVDAMI	33,529	14,896
11	T			PPVDAMITGESSSQ	0,569	0,554
22	T			SSQRSIPTPFLTKTF	0,872	0,554
22	T			SSQRSIPTPFLTKTF	35,374	14,896
137	S			RNQTMVVSPSNSGED	1,329	0,554
137	S			RNQTMVVSPSNSGED	34,385	14,896
154	S			NNQVMSSSPSSWYCH	23,038	14,896
221	S			QPTDRSYSPGGSSSQ	1,058	0,554
221	S			QPTDRSYSPGGSSSQ	26,612	14,896
250	S			IEEEEEASPRLFGVP	27,918	14,896
280	S			TAVVGENSDEETPWL	0,732	0,554
284	T			GENSDEETPWL RHYN	24,165	14,896
AT5G65590	SCAP1			9	S	SSHTNLSPKPVPKP
		9	S	SSHTNLSPKPVPKP	24,612	14,896
		48	S	LKCPRCNSPNTKFCY	0,672	0,554
		48	S	LKCPRCNSPNTKFCY	19,586	14,896
		170	T	MSSGRENTPVDVGSG	0,815	0,554
		170	T	MSSGRENTPVDVGSG	27,236	14,896
		191	S	GDFNNNHSPGTGTTA	0,733	0,554
		191	S	GDFNNNHSPGTGTTA	27,433	14,896
		260	S	LEIVNSSSPSSPTKK	1,438	0,554
		260	S	LEIVNSSSPSSPTKK	28,862	14,896
		263	S	VNSSSPSPSTKKGDN	2,257	0,554
		263	S	VNSSSPSPSTKKGDN	49,602	14,896

Příloha 8: Data získaná s využitím softwaru ELM pro gen *CSD1*.

ELM						
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost	
AT1G02065	SPL8	MOD_ProDKin_1	46–52	ITISPPL	1,54E-02	
			92–98	TTTTPYG		
			182–188	SLSTPRC		
			275–281	GKTTPKS		
			278–284	TPKSPND		
			289–295	ASSSPSS		
AT1G12870	F-box/kelch-repeat protein	DOC_MAPK_FxFP_2	118–121	FNEP	5,63E-05	
			DOC_MAPK_gen_1	19–28	RKRRYKKLMI	4,32E-03
				20–28	KRRYKKLMI	
				21–28	RRYKKLMI	
				383–390	KRLEVLEL	
		406–412		KRDALLV		
		DOC_MAPK_HePTP_8	90–102	ITEKWNPDIEISF	1,07E-04	
		DOC_MAPK_MEF2A_6	93–102	KWNPDIEISF	2,58E-03	
		MOD_ProDKin_1	139–145	CIHSPKT	1,54E-02	
			358–364	ESSTPVA		
AT1G17950	MYB52	MOD_ProDKin_1	174–180	NSTTPIQ	1,54E-02	
AT1G51600	ZML2	DOC_MAPK_MEF2A_6	172–179	RKEVALRM	2,58E-03	
			MOD_ProDKin_1	122–128	GLGSPHQ	1,54E-02
				135–141	LPGTPQR	
				264–270	SKASPQT	

Příloha 8: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT2G28550	TOE1	DOC_MAPK_FxFP_2	340–343	FHFP	5,63E-05
		DOC_MAPK_MEF2A_6	109–116	RNWIDLSF	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	7–13	NADSPES	1,54E-02
			75–81	GDESPAA	
			125–131	KLVTVPV	
			129–135	PVPTPAP	
			365–371	PVNTPLP	
AT3G20770	EIN3	DOC_MAPK_gen_1	53–62	RRMWRDKMRL	4,32E-03
			54–62	RMWRDKMRL	
			244–251	KKAWKVG	
		DOC_MAPK_MEF2A_6	219–228	KEDWWPQLGL	2,58E-03
			620–628	KQQDVSIWF	
		MOD_ProDKin_1	171–177	IGTPPHT	1,54E-02
			589–595	FDSTPFD	
AT3G53600	Putative C2H2-zinc-finger-type	DOC_MAPK_DCC_7	163–171	KNLVPQIDL	4,51E-04
		DOC_MAPK_gen_1	72–78	KKPKLIV	4,32E-03
		DOC_MAPK_MEF2A_6	143–150	KEILDNL	2,58E-03
			163–171	KNLVPQIDL	
		MOD_ProDKin_1	148–154	LNLTPLE	1,54E-02
AT4G31920	RR10	DOC_MAPK_FxFP_2	456–459	FFYP	5,63E-05
		MOD_ProDKin_1	353–359	QQNSPMV	1,54E-02
			380–386	PGFSPHF	
			423–429	DSASPLV	

Příloha 8: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT4G36990	HSF4	MOD_ProDKin_1	117–123 136–142	VVGSPSE STSSPGS	1,54E-02
AT5G03510	Putative C2H2-zinc-finger-type	DOC_MAPK_gen_1	104–112 244–253	KKPVASLGL RPKNFLQLDL	4,32E-03
		DOC_MAPK_MEF2A_6	105–114 244–253 246–255	KPVASLGLGL RPKNFLQLDL KNFLQLDLNL	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	27–33	RSASPLM	1,54E-02
AT5G03790	HB51	MOD_ProDKin_1	41–47	NSYTPGD	1,54E-02
AT5G06950	TGA2	DOC_MAPK_gen_1	316–325	RLRALSSLWL	4,32E-03
		MOD_ProDKin_1	2–8 178–184	ADTSPRT MWKTPAE	1,54E-02
AT5G49450	bZIP1	MOD_ProDKin_1	125–131	CR RTPWK	1,54E-02
AT5G59780	MYB59	MOD_ProDKin_1	117–123 193–199	RPMSPTS PLASPTW	1,54E-02
AT5G61850	LFY	DOC_MAPK_gen_1	128–134	RRRHLLL	4,32E-03
		MOD_ProDKin_1	33–39	QPVTPT	1,54E-02
AT5G65210	TGA1	DOC_MAPK_MEF2A_6	236–245	RPSDLLKVLL	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	38–44 65–71	TMNTPNH TAGTPHM	1,54E-02

Příloha 9: Data získaná s využitím softwaru ELM pro gen *CSD2*.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Instance (Odpovídající sekvence)	Pozice	Pravděpodobnost
AT1G43160	RAP2.6	DOC_MAPK_gen_1	RGSKAKLNF	108–116	4,32E-03
AT1G74930	ORA47	MOD_ProDKin_1	KSLTPPE	87–93	1,54E-02
			RPESPST	124–130	
AT2G33860	ARF3	DOC_MAPK_FxFP_2	FGFP	553–556	5,63E-05
		DOC_MAPK_gen_1	KRGSLVLYF	68–76	4,32E-03
			RKVREGIIDV	131–140	
			KVREGIIDV	132–140	
			KRSRIGF	405–411	
		DOC_MAPK_MEF2A_6	KRGSLVLYF	68–76	2,58E-03
			RGSLVLYF	69–76	
			RDMLLDIAL	600–608	
		DOC_MAPK_NFAT4_5	RGSLVLYFP	69–77	1,64E-04
		MOD_ProDKin_1	QTQTPSS	18–24	1,54E-02
			GSVSPTS	27–33	
			RSNTPHM	152–158	
			ERRSPGI	340–346	
			QRVSPWE	380–386	
			VSSSPSS	521–527	
			NSNSPNG	532–538	
AT2G37000	TCP11	MOD_ProDKin_1	SMTSPQT	121–127	1,54E-02
			QTQTPQS	128–134	
			TPQSPSC	131–137	

Příloha 9: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Instance (Odpovídající sekvence)	Pozice	Pravděpodobnost
AT2G44745	WRKY12	MOD_ProDKin_1	SLSSPSF	50–56	1,54E-02
			DSTSPDH	206–212	
AT2G46590	DAG2	DOC_MAPK_JIP1_4 MOD_ProDKin_1	KPSNLSF	276–282	1,29E-04
			SSSSPVS	223–229	1,54E-02
			NNSSPNN	347–353	
AT3G16770	RAP2.3	DOC_MAPK_gen_1	RDPRKGVRVWL	95–105	4,32E-03
			RKGVRVWL	98–105	
			RGDKAKLNF	126–134	
		DOC_MAPK_MEF2A_6 MOD_ProDKin_1	RKGVRVWL	98–105	2,58E-03
			PNYTPPP	143–149	1,54E-02
			PPSSPRS	148–154	
AT3G23240	ERF1	DOC_MAPK_gen_1	RSVKLDNVVVF	187–197	4,32E-03
			DOC_MAPK_MEF2A_6	RNGIRVWL	102–109
		MOD_ProDKin_1	LIQSPFS	5–11	1,54E-02
			SGFSPEY	11–17	
			IGSSPDS	19–25	
			DGCSPVV	156–162	
AT4G17500	ERF1A	DOC_MAPK_gen_1	RGSRALLNF	196–204	4,32E-03
			DOC_MAPK_MEF2A_6	RSSFPSVKI	106–114
		MOD_ProDKin_1	KIETPES	113–119	1,54E-02
			EKTSPVS	131–137	

Příloha 9: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Instance (Odpovídající sekvence)	Pozice	Pravděpodobnost
AT4G34410	ERF109	DOC_MAPK_gen_1	RDPKRATRVWL	152–162	4,32E-03
			KRATRVWL	155–162	
			RGPRAKLNF	183–191	
		MOD_ProDKin_1	EQLSPEQ	22–28	1,54E-02
			RESSPVA	111–117	
			SVSSPVA	199–205	
AT4G36900	RAP2.10	MOD_ProDKin_1	VVSTPAV	10–16	1,54E-02
AT5G08790	ATAF2	DOC_MAPK_gen_1	KKNNLRL	142–148	4,32E-03
			DOC_MAPK_JIP1_4	KPKTLGI	99–105
		MOD_ProDKin_1	YFFSPRD	64–70	1,54E-02
			QSSSPFD	181–187	
			HVVSPDV	209–215	
AT5G25830	GATA12	MOD_ProDKin_1	ESLSPED	91–97	1,54E-02
			DTGSPEN	116–122	
			NSSSPIF	124–130	
			FYDSPFT	162–168	
			QHLSPPT	177–183	
			PPTSPPL	181–187	
			DVSSPES	207–213	

Příloha 10: Data získaná s využitím softwaru ELM pro gen *CSD1* a *CSD2* (překryv).

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT1G09540	MYB61	DOC_MAPK_HePTP_8	350–362	VFSKDLQRMVVSF	1,07E-04
		DOC_MAPK_MEF2A_6	353–362	KDLQRMVVSF	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	152–158	DHKSPSS	1,54E-02
			205–211	PQFSPGN	
			216–222	VLQTPVC	
			234–240	NSSSPIS	
			298–304	YLNTPPF	
AT1G13260	RAV1	DOC_MAPK_gen_1	264–274	KNLRAGDVVSF	4,32E-03
			300–309	RVLRLFVNI	
		MOD_ProDKin_1	16–22	ICETPAI	1,54E-02
			20–26	PAITPAK	
			190–196	KAVTPSD	
			307–313	VNISPES	
AT1G28300	LEC2	DOC_MAPK_FxFP_2	49–52	FSYP	5,63E-05
		DOC_MAPK_gen_1	136–144	KRQLMMLNL	4,32E-03
		DOC_MAPK_MEF2A_6	136–144	KRQLMMLNL	2,58E-03
			137–144	RQLMMLNL	
		DOC_MAPK_RevD_3	140–154	MMLNLKNNVQISDKK	1,81E-04
		MOD_ProDKin_1	121–127	NNSSPNS	1,54E-02
			125–131	PNSSPSE	
AT1G42990	BZIP60	DOC_MAPK_gen_1	285–293	RMKYQILTL	4,32E-03
		MOD_ProDKin_1	35–41	LQSSPDS	1,54E-02
			97–103	TVDSPAA	

Příloha 10: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT1G52150	ICU4	DOC_MAPK_MEF2A_6	434–442	KLMGLNLTFF	2,58E-03
			631–638	RSVMTIAF	
			118–124	RQHTPNP	
		151–157	RDASPAG		
		428–434	VNSSPDK		
		532–538	LGHSPED		
		596–602	EVSSPNR		
		670–676	LALSPSH		
		682–688	GLRTPLG		
686–692	PLGTPEA				
AT1G63480	AHL12	MOD_ProDKin_1	118–124	RDSSPMS	1,54E-02
			305–311	METTPGS	
			320–326	GQQTPQN	
AT1G67710	ARR11	DOC_MAPK_gen_1	326–334	KTKKTRIGF	4,32E-03
			328–334	KKTRIGF	
		MOD_ProDKin_1	4–10	SGFSPVG	1,54E-02
			268–274	ADSSPKD	
			280–286	GYQSPGR	
			395–401	PYETPAG	
482–488	YSSPSL				
AT2G17180	DAZ1	MOD_ProDKin_1	44–50	SSSSPRP	1,54E-02

Příloha 10: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT2G20570	GLK1	DOC_MAPK_DCC_7	400–409	RPWLPLPLGL	4,51E-04
		DOC_MAPK_HePTP_8	397–409	VLTRPWLPLPLGL	1,07E-04
		DOC_MAPK_MEF2A_6	400–409	RPWLPLPLGL	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	2–8	LALSPAT	1,54E-02
			325–331	VSDSPYW	
			336–342	NGTTPYL	
AT2G42430	ASL18	DOC_MAPK_MEF2A_6	59–66	KLLLNVPPI	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	11–17	GTGSPCG	1,54E-02
			143–149	TSVSPIG	
			151–157	AYSTPYN	
			170–176	NPVSPQS	
AT2G45190	YAB1	MOD_ProDKin_1	5–11	SMSSPSS	1,54E-02
			12–18	AVCSPDH	
			17–23	DHFSPSD	
AT2G46830	CCA1	DOC_MAPK_gen_1	545–553	KRNTGFLGI	4,32E-03
		DOC_MAPK_MEF2A_6	523–532	RYPMALDLNF	2,58E-03
			546–555	RNTGFLGIGL	
		MOD_ProDKin_1	272–278	LLQTPAL	1,54E-02
			294–300	SGGSPVP	
			300–306	PGNSPPN	
			400–406	PSATPES	
			426–432	GSNTPSS	
			534–540	AQLTPVD	

Příloha 10: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT3G04060	NAC046	DOC_MAPK_gen_1	39–47	KEKVFNIRF	4,32E-03
		MOD_ProDKin_1	298–304	TTATPEI	1,54E-02
AT3G08500	MYB83	MOD_ProDKin_1	144–150	SGSSPNN	1,54E-02
			192–198	DSSSPFN	
AT3G18400	NAC058	DOC_MAPK_gen_1	25–32	RKVSDIGF	4,32E-03
		DOC_MAPK_MEF2A_6	35–42	KAVVDVDL	2,58E-03
			97–104	RSGVLVGM	
		MOD_ProDKin_1	170–176	SFGSPCD	1,54E-02
			248–254	PPLSPIN	
AT4G14465	AHL20	DOC_MAPK_gen_1	77–86	KNKPKAPIFV	4,32E-03
			79–86	KPKAPIFV	
		DOC_MAPK_MEF2A_6	36–43	KGDLGIAM	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	87–93	TRDSPNA	1,54E-02
			231–237	GGDSPPR	
AT4G35390	AGF1	MOD_ProDKin_1	20–26	DSRTPPD	1,54E-02
			42–48	AETTPTG	
			83–89	TRDSPNV	
			216–222	EEETPPP	
AT4G35550	WOX13	DOC_MAPK_gen_1	184–195	KRVVRPESLLGL	4,32E-03
			185–195	RVVRPESLLGL	
		MOD_ProDKin_1	221–227	CFQSPEI	1,54E-02
AT4G35610	TREE1	DOC_MAPK_MEF2A_6	228–236	RGSGIDLNV	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	256–262	LNKSPPK	1,54E-02

Příloha 10: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT5G04340	ZAT6	DOC_MAPK_FxFP_2	232–235	FDFP	5,63E-05
			5–11	TLTSPRL	1,54E-02
			10–16	RLSSPMP	
			74–80	SSSSPPL	
			220–226	EVMSPPM	
AT5G12870	MYB46	DOC_MAPK_gen_1	2–8	RKPEVAI	4,32E-03
			135–141	SSSSPNT	1,54E-02
			196–202	DDFTPYV	
AT5G13790	AGL15	MOD_ProDKin_1	228–234	ERESPSS	1,54E-02
			254–260	LANSPPPE	
AT5G16560	KAN1	MOD_ProDKin_1	161–167	LQSSPRL	1,54E-02
			188–194	DSSSPHH	
AT5G17300	RVE1	MOD_ProDKin_1	1–7	MASSPLT	1,54E-02
			146–152	RSVSPSE	
			154–160	DTQSPTS	
			174–180	DSSSPNR	
			180–186	RSLSPVS	
			186–192	SSASPPA	
			255–261	YCKSPIQ	

Příloha 10: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT5G18830	SPL7	DOC_MAPK_FxFP_2	436–439	FVYP	5,63E-05
		DOC_MAPK_gen_1	155–161	KRHRVCL	4,32E-03
			423–429	KRVDVKL	
			461–468	KCRFLVSF	
		DOC_MAPK_MEF2A_6	250–259	RAEEEPSLIF	2,58E-03
			401–408	RGSMTVYL	
			428–436	KLESPKLQF	
		MOD_ProDKin_1	4–10	LSQSPPP	1,54E-02
			56–62	PVLSPPL	
			67–73	PTQTPAE	
			76–82	LDPSPEE	
			301–307	FERSPSN	
			428–434	KLESPKL	
			667–673	KHQSPIE	
715–721	ADCSPDS				
AT5G28300	GT2L	DOC_MAPK_DCC_7	32–40	RSLPFPVSF	4,51E-04
		DOC_MAPK_gen_1	132–139	RKLAEVGF	4,32E-03
		MOD_ProDKin_1	13–19	FIASPPP	1,54E-02
			139–145	FKRSPQE	
			385–391	NPTSPSQ	
			416–422	QTLTPHN	

Příloha 10: Pokračování.

ELM					
AGI	Název	Elm Název	Pozice	Instance (Odpovídající Sekvence)	Pravděpodobnost
AT5G60120	TOE2	DOC_MAPK_gen_1	324–332	KQKDRALRL	4,32E-03
		DOC_MAPK_MEF2A_6	110–117	RSTVDISF	2,58E-03
			308–317	KLDLNLGISL	
		MOD_ProDKin_1	377–383	ACDTPFN	1,54E-02
			401–407	AFFSPME	
			406–412	MERTPEK	
AT5G62020	HSFB2A	DOC_MAPK_gen_1	236–243	KRFSEMEI	4,32E-03
			261–270	KRTRSEGVQV	
			262–270	RTRSEGVQV	
		DOC_MAPK_MEF2A_6	252–260	RLFGVPIGL	2,58E-03
		MOD_ProDKin_1	134–140	MVVSNSN	1,54E-02
			151–157	MSSSPSS	
			218–224	RSYSPGG	
			247–253	EEASPRL	
			281–287	DEETPWL	
AT5G65590	SCAP1	MOD_ProDKin_1	6–12	NLPSPKP	1,54E-02
			45–51	RCNSPNT	
			167–173	RENTPVD	
			188–194	NNHSPTG	
			257–263	NSSSPSS	
			260–266	SPSSPTK	

Příloha 11: Data získaná s využitím databáze PhosPhAt pro gen *CSD1*.

PhosPhAt 4.0				
AGI	Název	Peptid	Skóre	Zdroje
AT1G02065	SPL8	TTPKSPNDSGVK	29,45	Roitinger et al., 2015
		SPNDSGVK	24,62	Roitinger et al., 2015
AT1G12870	F-box/kelch-repeat protein	STLESCYFSQRHLKIAER	30,99	Mithoe et al., 2012
AT1G17950	MYB52			
AT1G51600	ZML2	ELPQAAPPGLGSPHQNNR	85,805	Van Leene et al., 2019
		VSSLPGTPQR	47,712	Van Leene et al., 2019
		VSSLPGTPQR	39,68	Roitinger et al., 2015
		ELPQAAPPGLGSPHQNNR	38,34	Roitinger et al., 2015
		VSSLPGTPQR	36,94	Roitinger et al., 2015
		ASPQTAQNLPLNK	30,84	Roitinger et al., 2015
		VSSLPGTPQR	27,91	Roitinger et al., 2015
		ASPQTAQNLPLNK	25	Nakagami et al., 2010
		ELPQAAPPGLGSPHQNNR	23	Umezawa et al., 2013
		ELPQAAPPGLGSPHQNNR	N	Bhaskara et al., 2017
ASPQTAQNLPLNK	N	Bhaskara et al., 2017		
AT2G28550	TOE1	VGSSSGGDESPAASASVTK	45	Zhang et al., 2013
		MLDLNLNADSPSTQYGGDSYLDLDR	33	Umezawa et al., 2013
AT3G15500	NAC3	YDGGTQQQTEGIPR	26	Nakagami et al., 2010
		KQTSAQKQAYNNLMTSGR	25,20	Mithoe et al., 2012
AT4G01680	MYB55	YGHGCWSSVVK	24	N
AT4G36990	HSF4	FKPVESDEESECEGCDGGGGAEEGVGEGLK	30	Zhang et al., 2013
		SVIASTAGK	20	Engelsberger et Schultze, 2012
AT5G49450	bZIP1	TSSGSDIDEK	47,06	Roitinger et al., 2015
AT5G61850	LFY	SGASYINKPKMR	22,49	Mithoe et al., 2012

Příloha 12: Data získaná s využitím databáze PhosPhAt pro gen *CSD2*.

PhosPhAt 4.0				
AGI	Název	Peptid	Skóre	Zdroje
AT2G23340	DEAR3	ETEAAVTATVTAATMGIGTRKR	24	N
AT2G33860	ARF3	VSPWEIEPSGISNSGSFVTTGPKRSR	3,913	Wang et al., 2013
AT3G16770	RAP2.3	KEQATEPGKR	21	N
AT4G36900	RAP2.10	VDLNKLPDPETSDDD	41	Sugiyama et al., 2008
		VDLNKLPDPETSDDD	41	Nakagami et al., 2010
		VDLNKLPDPETSDDD		Meyer et al., 2012

Příloha 13: Data získaná s využitím databáze PhosPhAt pro gen *CSD1* a *CSD2* (překryv).

PhosPhAt 4.0				
AGI	Název	Peptid	Skóre	Zdroje
AT1G09540	MYB61	DKPTTSNNKR	21	Engelsberger et Schultze, 2012
		DKPTTSNNKR	18	Engelsberger et Schultze, 2012
		DKPTTSNNKR	17	Engelsberger et Schultze, 2012
		DKPTTSNNKR	16	Engelsberger et Schultze, 2012
AT1G13260	RAV1	KSSVGNLYR	33,97	Roitinger et al., 2015
		SSVGNLYR	23,20	Roitinger et al., 2015
		MESSSVDESTTSTGSICETPAITPAK	15	N
AT1G63480	AHL12	DSSPMSDPNEPK	133,95	Van Leene et al., 2019
		DSSPMSDPNEPK	48,37	Roitinger et al., 2015
		GWPGSGSGSGR	40,57	Roitinger et al., 2015
		DSSPMSDPNEPKR	38,24	Roitinger et al., 2015
		KYGEPMVSNSKSR	31,53	Roitinger et al., 2015
		SRDSSPMSDPNEPK	31,15	Roitinger et al., 2015
		SRDSSPMSDPNEPK	29,11	Roitinger et al., 2015
		SRDSSPMSDPNEPK	22,94	Roitinger et al., 2015
		DSSPMSDPNEPK	20,65	Roitinger et al., 2015
		SRDSSPMSDPNEPKR	19,23	Roitinger et al., 2015
SRDSSPMSDPNEPKR	14,06	Roitinger et al., 2015		
AT2G46830	CCA1	LMSRGRTGFKPYK	25,10	Mithoe et al., 2012
AT4G14465	AHL20	LPMEEEEDGGGSR	28	Zhang et al., 2013
		QIHGGGDSPPR	21	Zhang et al., 2013

Příloha 13: Pokračování.

PhosPhAt 4.0				
AGI		Peptid	Skóre	Zdroje
AT4G35390	AGF1	NKPKPPTIIITR	99	Engelsberger et Schultze, 2012
		NKPKPPTIIITR	99	Engelsberger et Schultze, 2012
		AETTPTGGATSSATASGSSSSGR	40	Zhang et al., 2013
		AETTPTGGATSSATASGSSSSGR	33	Zhang et al., 2013
		AETTPTGGATSSATASGSSSSGR	30	Zhang et al., 2013
		LPIEEEEETPPPR	30	Zhang et al., 2013
		NKPKPPTIIITR	26	Engelsberger et Schultze, 2012
		NKPKPPTIIITR	24	Engelsberger et Schultze, 2012
AT4G35610	TREE1	SSGDFSGSGGGDAPGSEGGR	95,38	Mayank et al., 2012
		ISTQTDDEGDGLGEGEAK	94,6	Mayank et al., 2012
		IFGESSSVVEEDA EK	43,07	Mayank et al., 2012
AT5G16560	KAN1	AQSDDTSLHQETDISSTQPR	32,25	Roitinger et al., 2015
AT5G28300	GT2L	DQDQGQVEEASMENQR	64,28	Roitinger et al., 2015
		FTDHDLDVVQNPTSPSQDSSSLALR	30	Zhang et al., 2013
		FTDHDLDVVQNPTSPSQDSSSLALR	N	Choudhary et al., 2015
		FTDHDLDVVQNPTSPSQDSSSLALR	N	Wang et al., 2013
		FTDHDLDVVQNPTSPSQDSSSLALR	N	Hoehenwarter et al., 2013
		FTDHDLDVVQNPTSPSQDSSSLALR	N	Xue et al., 2013
		FISKFTDHDLDVVQNPTSPSQDSSSLALR	N	Hoehenwarter et al., 2013

Příloha 13: Pokračování.

PhosPhAt 4.0				
AGI		Peptid	Skóre	Zdroje
AT5G62020	HSFB2A	TTAVVGENSDEETPWLR	35	Zhang et al., 2013
		TRSEGVQVK		Al-Momani et al., 2018
		MNSPPVDAMITGESSQR		Lin et al., 2015
AT5G65590	SCAPI	NLEIVNSSSPSSPTK	59	Umezawa et al., 2013
		NLEIVNSSSPSSPTK	47	Umezawa et al., 2013
		NLEIVNSSSPSSPTK	35	Umezawa et al., 2013
		NLEIVNSSSPSSPTK	18,55	Roitinger et al., 2015
		SSHTNLPSKPKVVK	13,38	Roitinger et al., 2015