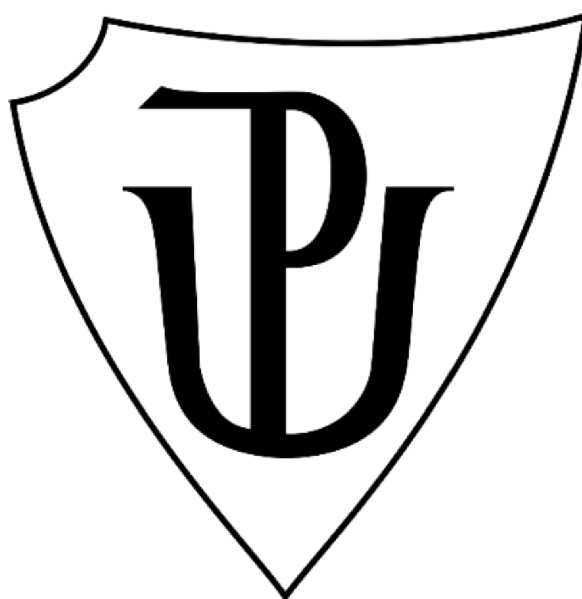


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Fenotypová charakterizace a příprava annexinových  
mutantů *Arabidopsis thaliana* pomocí Multiplex  
CRISPR/Cas9 metody**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Kateřina Hegerová</b>
Studijní program:	B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Miroslava Medelská, Ph.D.</b>
Rok:	2024

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

V Olomouci dne 5. 5. 2024

Kateřina Hegerová



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Miroslavě Medelské, Ph.D. za její ochotu, odborné rady, pomoc a čas, který mi věnovala v celém průběhu vypracovávání práce. Dále děkuji celému kolektivu Katedry biotechnologií za jejich přívětivý přístup a ochotu kdykoliv poskytnout pomoc a prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. za možnost pracovat a využívat vybavení laboratoří.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Hegerová
Název práce	Fenotypová charakterizace a příprava annexinových mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí Multiplex CRISPR/Cas9 metody
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	Mgr. Miroslava Medelská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

Annexiny jsou konzervovaná, široce rozšířená rodina proteinů schopná vázat se na fosfolipidy v závislosti na vápenatých iontech. Účastní se různých buněčných procesů, odpovědí na abiotický i biotický stres a mají vliv na růst a vývoj rostlin. Tato práce se zaměřuje na studii annexinů 1 a 4 v *Arabidopsis thaliana*, široce používaném modelovém organismu. Teoretická část práce zahrnuje přehled literatury, jehož cílem je pochopit základní charakteristiky annexinů a úlohu vápníkové signalizace v *A. thaliana*. Praktická část práce se zaměřuje na experimentální ověření a charakterizaci annexinových mutantů. Toho je dosaženo pomocí PCR genotypování, které potvrzuje přítomnost požadovaných mutací v annexinových genech. Po validaci je provedena fenotypová charakterizace mutantů pro prohloubení znalostí o vlivech těchto proteinů na rostliny *A. thaliana*. Dále tato práce zahrnuje molekulární přípravu konstruktů pro tvorbu jednoduchých a dvojitých annexinových mutantů pomocí metody Multiplex CRISPR/Cas9. Tato pokročilá technika genového inženýrství umožňuje přesnou a účinnou editaci několika genů annexinů v rostlině zároveň.

Klíčová slova	annexiny, <i>Arabidopsis thaliana</i> , ANNAT1, ANNAT4, fenotypová analýza, Multiplex CRISPR/Cas9
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Kateřina Hegerová
Title	Phenotypic characterization and preparation of <i>Arabidopsis</i> annexin mutants by Multiplex CRISPR/Cas9 method
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Miroslava Medelsk, Ph.D.
The year of presentation	2024

### Abstract

Annexins are a conserved, widely distributed family of proteins capable of binding to phospholipids in response to calcium ions. They are involved in a variety of cellular processes, responses to abiotic and biotic stresses, and influence plant growth and development. This work is focused on the study of annexins 1 and 4 in *Arabidopsis thaliana*, a widely used model organism. The theoretical part of this work includes a literature review to understand the basic characteristics of annexins and the role of calcium signaling in *A. thaliana*. The practical part of the thesis focuses on experimental validation and characterization of annexin mutants. This is achieved by PCR genotyping to confirm the presence of the desired mutations in the annexin genes. After validation, phenotypic characterization of these mutants is performed to deepen the knowledge of the effects of these proteins on *A. thaliana* plants. Furthermore, this work involves the molecular preparation of constructs for the generation of single and double annexin mutants using the Multiplex CRISPR/Cas9 method. This advanced genetic engineering technique allows precise and efficient editing of multiple annexin genes in the plant simultaneously.

Keywords	annexins, <i>Arabidopsis thaliana</i> , ANNAT1, ANNAT4, Multiplex CRISPR/Cas9, phenotype analysis
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> jako modelový organismus.....	2
2.2	Annexiny .....	2
2.2.1	Historie annexinů .....	2
2.2.2	Základní charakteristika annexinů .....	3
2.2.3	Molekulární struktura annexinů .....	5
2.2.4	Annexiny u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	6
2.3	Vápníková signalizace.....	12
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	17
3.1	Materiál .....	17
3.1.1	Biologický materiál .....	17
3.1.2	Chemikálie .....	17
3.1.3	Kultivační média .....	18
3.1.4	Roztoky a pufry .....	20
3.1.5	Přístrojové vybavení.....	20
3.1.6	Software .....	21
3.2	Metody .....	22
3.2.1	Příprava kultivačních médií .....	22
3.2.2	Povrchová sterilizace semen .....	22
3.2.3	<i>In vitro</i> kultivace rostlin .....	22
3.2.4	Genotypová analýza .....	22
3.2.5	Fenotypová analýza.....	24
3.2.6	Multiplex CRISPR/Cas9 .....	24
3.2.7	Tranzientní transformace <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	30
4	VÝSLEDKY .....	31
4.1	PCR genotypování.....	31
4.2	Fenotypová charakterizace mutantní linie annexinu 4 ( <i>ann4-1</i> ).....	33
4.3	Příprava konstruktů Multiplex CRISPR/Cas9.....	40
4.4	Validace destinačních vektorů pomocí tranzientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	45
5	DISKUSE .....	50
6	ZÁVĚR.....	53
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	62

## CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Zpracování literární rešerše na téma *Arabidopsis thaliana* jako modelový organismus, základní charakterizace annexinů a vápníková signalizace.

Praktická část:

- Validace annexinových mutantů pomocí PCR genotypování.
- Fenotypová charakterizace ověřených annexinových mutantů.
- Molekulární příprava konstruktů pro annexinové mutanty pomocí Multiplex CRISPR/Cas9 metody.
- Vyhodnocení získaných výsledků a sepsání experimentální části bakalářské práce.

# 1 ÚVOD

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je v oblasti molekulární biologie užitečným modelovým organismem, který poskytuje cenné poznatky o základech fyziologie a vývoje dvouděložných rostlin. Snadná genetická manipulace, znalost celého genomu a životního cyklu, z huseníčku činí vynikající systém i pro zkoumání funkcí jednotlivých proteinů (Wienkoop et al., 2010).

Annexiny jsou všudypřítomná vysoce konzervovaná rodina proteinů vážících se na fosfolipidy. Podílejí se na mnoha buněčných procesech, včetně membránové dynamiky, vezikulárního transportu, reakcí na stres a signalizaci vápníku. Jejich exprese je silně závislá na fázi vývoje a vnějších podmínkách (Laohavisit & Davies, 2011). Z osmi annexinů u *Arabidopsis thaliana* je nejvíce zastoupený a prozkoumaný annexin 1 (ANNAT1). Nachází se v celé rostlině a má řadu různých funkcí. Annexin 4 (ANNAT4) je méně zastoupený, má od ostatních proteinů z této rodiny odlišnou strukturu, ale sdílí s ANNAT1 podobné funkce (Clark et al., 2001).

Vápníková signalizace je signalizační mechanismus ovlivňující zásadní fyziologické procesy napříč všemi eukaryotickými organismy. Organizace vápníkových signálů závisí na komplexní síti proteinů, včetně iontových kanálů, pump a senzorů (Clapham, 2007). Mezi tyto proteiny patří i annexiny, které jsou schopné vázat vápníkové ionty. Mohou hrát roli jako vápníkové kanály nebo jejich regulátory (Davies, 2014).

Pro sledování možných vlivů annexinů byla použita fenotypová charakterizace zkoumající morfologické znaky ověřených T-DNA „knock-out“ mutantních rostlin *A. thaliana*. Rostliny s T-DNA inzercí v genech zájmu jsou důležitým zdrojem informací pro pochopení funkce genů a regulačních mechanismů nebo pro identifikaci genů, které jsou odpovědné za fenotypové znaky (Krysan et al., 1999).

Multiplex CRISPR/Cas9 je metoda uzpůsobená k přípravě molekulárních konstruktů pro tvorbu mutantních rostlin. Tento přístup genetického inženýrství umožňuje přesnou kontrolu nad genomickými změnami i několika genů zároveň, což usnadňuje zkoumání specifických vlivů proteinů (Zhang et al., 2016).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 *Arabidopsis thaliana* jako modelový organismus

Huseníček rolní neboli *A. thaliana* je dvouděložná rostlina přirozeně se vyskytující v Evropě, Asii a Severní Americe. Taxonomicky je zařazena do čeledi brukvovitých rostlin (*Brassicaceae*; Meinke et al., 1998). *Arabidopsis* se začala využívat jako modelový organismus dvouděložných rostlin, jelikož má důkladně prozkoumané základní vlastnosti životního cyklu a osekvenovaný genom. To se ukázalo být vhodné pro mnohé geneticky založené výzkumy (Meinke et al., 1998; Meyerowitz, 1989; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Celkový životní cyklus rostliny, od začátku klíčení po první semena, trvá pouze 6 týdnů. Podle podmínek se dorůstá růžice s listy 2–10 cm, s výškou stonku nejvýše 30 cm. Květy jsou asi 2 mm velké, oboupohlavné a po otevření pupenu dojde k samoopylení. Její malá velikost, schopnost růst v laboratorních podmínkách i v běžných zeminách, tvoří z *A. thaliana* ideální nenáročnou rostlinu s nízkými náklady na její pěstování (Meinke et al., 1998; Meyerowitz, 1989).

Genom *A. thaliana* obsahuje 25 498 genů kódující proteiny z 11 000 proteinových rodin na pěti chromosomech. Jeho velikost dosahuje 125 Mb s hustotou genů a úrovní exprese konzistentní mezi všemi chromosomy. Byl osekvenovaný v roce 2000 mezinárodní spoluprací pod záštitou iniciativy AGI (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

### 2.2 Annexiny

Annexiny jsou skupina evolučně konzervovaných proteinů, které mají schopnost se vratně vázat na fosfolipidy v závislosti na vápenatých iontech ( $\text{Ca}^{2+}$ ; Gerke & Moss, 2002). Annexiny jsou rozděleny do pěti rodin. Proteiny obratlovců nesou označení A, bezobratlých B, hub a některých jednobuněčných eukaryot C, annexiny rostlin patří do skupiny D a prvoci do E (Jami et al., 2012; Moss & Morgan, 2004).

#### 2.2.1 Historie annexinů

Skupina annexinů byla vytvořena pro proteiny s podobnými biochemickými vlastnostmi, u kterých se zjistilo, že mají srovnatelnou genovou strukturu a sekvenční charakteristiky. Jednalo se o na sobě nezávisle objevené proteiny, na které se přišlo v rámci výzkumu živočišných proteinů v průběhu sedmdesátých a osmdesátých let minulého století (Gerke & Moss, 2002). Jako první byl popsán a izolován lidský annexin A7 (zprvu pojmenován

synexin; Creutz et al., 1978). Následně byly tyto proteiny v roce 1990, kvůli své vlastnosti vázat se na membrány, pojmenované podle řeckého výrazu *annex* neboli „dát/držet pohromadě“ (Gerke & Moss, 2002; Moss & Morgan, 2004). Evolučně je primární struktura annexinů konzervována u většiny mnohobuněčných eukaryotických druhů. Jsou primitivní skupinou proteinů, která se dá datovat přibližně 1 až 1,5 miliardy let zpátky k jednobuněčným organismům (Morgan & Fernández, 1995). Zachovává se u nich pozice exonů a intronů, s variabilním množstvím intronů u různých skupin organismů (Smith & Moss, 1994). K rozšíření a rozdílnosti annexinů mezi jednotlivými skupinami mohlo dojít pomocí duplikace genů (Braun et al., 1998; Jami et al., 2012). Díky genomovému sekvenování se rodina annexinů rozšířila a bylo nalezeno více než 1000 členů annexinových podrodin, které pocházejí ze živočichů, rostlin, hub i prvoků (Gerke & Moss, 2002; Moss & Morgan, 2004; Wu et al., 2022).

Rostlinné annexiny jsou monofyletickou skupinou. Předpokládá se, že se vyvinuly odlišným způsobem než živočišné annexiny. První annexin fotosyntetizujícího organismu nejspíše pochází z doby před 1 miliardou let při přechodu zelených řas na souš (Moss & Morgan, 2004). Konzervace a expanze rostlinných annexinů v průběhu evoluce naznačuje jejich důležitou roli ve fyziologických procesech a adaptaci rostlin na vnější prostředí (Jami et al., 2012). U vyšších rostlin byl annexin poprvé dokázán v roce 1989 u rajčete (Boustead et al., 1989), kdy byly extrahovány proteiny, které precipitovaly s  $Ca^{2+}$ , reagovaly s fosfolipidy a protilátkami vytvořenými na živočišné annexiny (Delmer & Potikha, 1997). Rostlinné annexiny jsou dodnes předmětem intenzivního vědeckého studia (Laohavisit & Davies, 2011; Luo et al., 2024; Wu et al., 2022).

### **2.2.2 Základní charakteristika annexinů**

Annexiny jsou rozpustné hydrofilní proteiny se schopností se vázat na negativně nabitě fosfolipidy v závislosti na vápníku (Gerke & Moss, 2002). Je to hojně a všudypřítomně se vyskytující skupina proteinů a jsou důležitým elementem pro vápníkovou signalizaci. Jsou charakterizovány rozsáhlým souborem funkcí (Gupta, 2012; Jami et al., 2012; Kodavali et al., 2013; Lizarbe et al., 2013). Lokalizační studie annexinů založené na frakcionaci proteinů, imunohistochemii a mikroskopii živých buněk potvrdily vysokou abundanci annexinů v cytoplasmě (Clark et al., 1998; 2005b; Lee et al., 2004). Po zvýšení vápníkové koncentrace dochází k přemístění k plasmatické membráně (Gerke & Moss, 2002). Mohou se nacházet i v buněčné stěně, jako integrální membránové proteiny (Lee et al., 2004), v centrální či vegetativní vakuole (Carter et al., 2004), v jaderném matrixu



(Kovács et al., 1998), nebo v stromě chloroplastů (Rudella et al., 2006). Nejvíce jsou pak koncentrovány v místech polarizovaného růstu (Clark et al., 1994; Konopka-Postupolska, 2007).

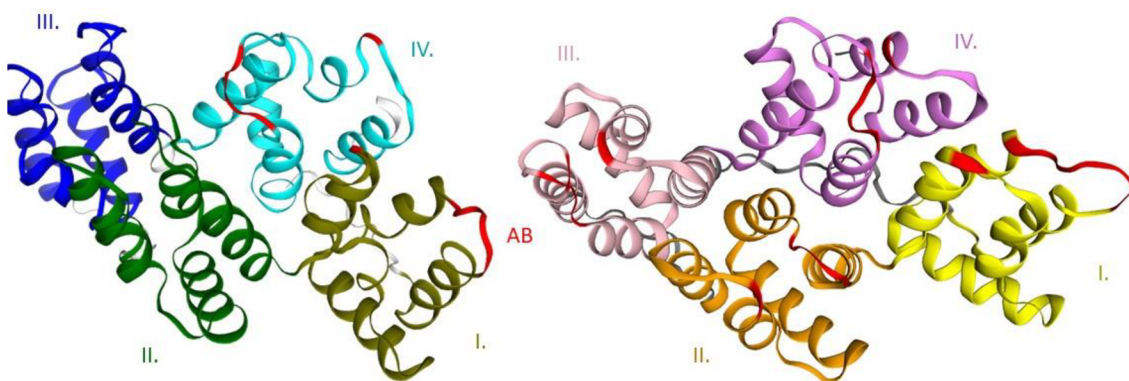
Biochemicky jsou definované jako rozpustné, hydrofilní  $\text{Ca}^{2+}$ /fosfolipidy vážící proteiny. Tato vazba je reverzibilní a odstranění  $\text{Ca}^{2+}$  iontů chelatačními činidly vede k odpojení annexinů od fosfolipidů. Jednotlivé annexiny se od sebe mohou lišit citlivostí k  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidovou specificitou dle typu substituentu navázaného na kyselinu fosfatidovou (Gerke & Moss, 2002).

Annexiny mají v rostlinách mnoho funkcí. Díky své schopnosti vázat se na membrány jsou spjaté s procesy související s endomembránami, jako je přenos přes membrány, vezikulární přenos, interakci membrány s cytoskeletem, (Carter et al., 2004; Konopka-Postupolska, 2007), jsou zodpovědné za membránové opravy, konstitutivní či stresem způsobenou autofagii nebo exo/endocytosu (Carroll et al., 1998; Laohavisit & Davies, 2011). Jsou spojeny se syntézou buněčné stěny (Clark et al., 1994) a kromě toho může vazba  $\text{Ca}^{2+}$  na annexiny ovlivnit vezikulární sekreci (Konopka-Postupolska & Clark, 2017).

Mnohé annexiny mají funkce při odpovědích rostlin na biotický a abiotický stres. Aktivita annexinů je ovlivněna interakcí rostliny se symbiotickými organismy i při napadení patogeny (Kodavali et al., 2013; Zhao et al., 2019). Je intenzivně studována jejich účast v abiotických stresových reakcích, jako jsou reakce na oxidativní, tepelný a slaný stres (Huh et al., 2010; Konopka-Postupolska et al., 2009; Richards et al., 2014), ale i v reakcích na chlad, osmotický stres a vodní deficit (Cantero et al., 2006; Lee et al., 2004). Jsou důležité v buněčném cyklu, regulují biochemické a buněčné procesy, růst a vývoj rostlin (Wu et al., 2022). Mohou mít peroxidasovou (Mortimer et al., 2009), ATPasovou a GTPasovou aktivitu (Wang et al., 2020), mohou regulovat  $\text{Ca}^{2+}$  kanály (Laohavisit et al., 2012) nebo na sebe vázat filamentní aktin (F-aktin; Hu et al., 2000), což jsou všechny funkce úzce spjaté s regulací rostlinného růstu a odpovědí na vlivy prostředí (Wu et al., 2022). Enzymatická aktivita annexinů, jako peroxidasová aktivita, je zodpovědná za antioxidační funkci při oxidativním stresu (Gorecka et al., 2005; Richards et al., 2014). Dále jsou důležité při reprodukční fázi (Lichocka et al., 2018) nebo v cirkadiálních rytmech (Hoshino et al., 2004).

### 2.2.3 Molekulární struktura annexinů

Důležitým strukturním znakem živočišných annexinů je evolučně vysoce konzervovaný motiv, tetráda (I – IV) opakujících se 70 aminokyselin, tzv. endonexin sekvence, která se opakuje čtyřikrát v jedné molekule (Obr.1; Hofmann et al., 1997). Tyto tetrády tvoří C-koncovou doménu (Hofmann, 2004). Každé opakování tvoří pět charakteristických  $\alpha$ -helixů (A – E) a smyček, přičemž tyto úseky sdílejí podobnost v rozmezí 25–35 % mezi sebou a 45–50 % mezi různými typy annexinů (Smith & Moss, 1994). Šroubovice tak představují většinu sekundární struktury annexinů a formují lehce zakřivený disk. Na druhé straně molekuly se nachází rozmanitá N-terminální oblast (Konopka-Postupolska et al., 2011). U živočichů je délka a struktura N-terminálního konce vysoce variabilní a způsobuje různorodost funkcí (Crompton et al., 1988; Hawkins et al., 2000). Může být cílem posttranslačních modifikací a hraje roli v interakci s dalšími proteiny (Clark & Roux, 1995). U rostlin je tato doména kratší, skládá se z 5–50 aminokyselin a připojuje se k jádru proteinu vodíkovými vazbami. Funkčně se tak tato doména liší od živočišných annexinů, ale u obou skupin se většinou neúčastní vazby k membránám. K tomu je uzpůsobena C-terminální doména (Konopka-Postupolska et al., 2011). Smyčky na C-terminální doméně umožňují vazbu s membránami a obsahují  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebná místa. U živočichů se na vypouklé straně proteinu vyskytují  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebná místa typu II a III na každém opakování (Weng et al., 1993). Rostliny jsou schopné vázat vápník pouze přes opakování I a IV, další dvě jsou dysfunkční a využívají typ II  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebný konzervovaný endonexinový motiv K-G-X-G-T-(38-40 variabilní)-D/E (Cantero et al., 2006; Mortimer et al., 2008). Rostlinné a živočišné annexiny sdílejí společné antigenní determinanty a částečnou homologii na úrovni aminokyselin (Delmer & Potikha, 1997).



Obrázek 1: Vlevo rostlinný ANNEXIN D1, vpravo lidský ANNEXIN A5 s vyznačenými doménami I-IV., červeně vyznačeny  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebná místa na smyčkách AB. Vytvořeno podle Konopka-Postupolska, (2007), Clark et al. (2012), Gerke & Moss, (2002) pomocí SWISS-MODEL.

Annexiny ve své struktuře mohou obsahovat IRI (isoleucin-arginin-isoleucin) motiv, který zajišťuje vazbu na F-aktin, dále DXXG-motiv, který dává annexinu GTPasovou aktivitu (Mortimer et al., 2008), hem-vážíci motiv pro peroxidasovou aktivitu (Mortimer et al., 2009), solné můstky umožňující kanálovou aktivitu (Laohavisit et al., 2009) nebo tryptofan (Trp27), který zesiluje funkci se vázat na fosfolipidy (Clark et al., 2001; Mortimer et al., 2008). Jak již bylo zmíněno, annexiny jsou charakterizovány především svou schopností reverzibilně interagovat s fosfolipidy membrán, k čemuž slouží konvexní strana jejich struktury (Lizarbe et al., 2013), avšak tuto interakci může ovlivňovat i N-terminální doména (Dabitz et al., 2005). Na konvexní straně se nachází i  $\text{Ca}^{2+}$  vázající domény, díky kterým může dojít k tvorbě komplexu mezi  $\text{Ca}^{2+}$ , annexinem a membránou (Swairjo et al., 1995).  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebné domény jsou pro vazbu k membránám typické, hlavně doména nacházející se mezi helixy AB (Jin et al., 2004), ale v závislosti na pH může tato interakce probíhat i bez přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  (Dabitz et al., 2005). Podle afinity jádra tyto proteiny nejčastěji interagují s kyselými fosfolipidy, jako je kyselina fosfatidová, fosfatidylserin nebo fosfatidylinositol, ale existují i výjimky (Gerke & Moss, 2002; Lizarbe et al., 2013).

Z živočišných annexinů je známá důležitost posttranslačních modifikací na konečnou funkci proteinu. Může docházet k transglutaminaci (Ando et al., 1991) myristoylaci (Wice & Gordon, 1992), S-glutathionylaci (Sullivan et al., 2000) a hlavně k fosforylaci (Rothhut, 1997). Fosforylace serinu, threoninu anebo tyrosinu vede k regulaci buněčné funkce či změně odpovědi na změny prostředí. Možná místa k fosforylaci se nacházejí na C-terminálním i N-terminálním konci (Konopka-Postupolska et al., 2011). Rostlinné annexiny dále obsahují dva konzervované cysteinové zbytky, které mohou být cílem pro S-nitrosylaci nebo S-glutathionylaci. Tyto posttranslační modifikace mohou regulovat vazby na membrány, kvůli ovlivněné afinitě  $\text{Ca}^{2+}$  k vazbě na lipidy (Konopka-Postupolska et al., 2009; Laohavisit & Davies, 2011; Lindermayr et al., 2005).

#### **2.2.4 Annexiny u *Arabidopsis thaliana***

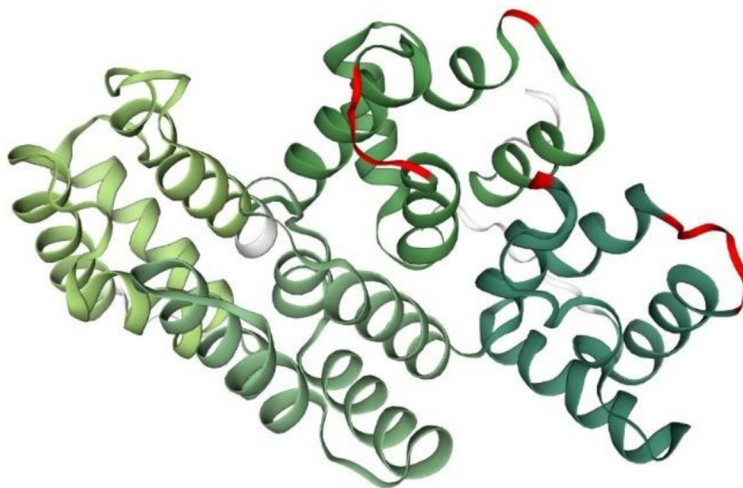
U *A. thaliana* bylo zjištěno 8 genů (*ANNAT1–8*) kódující annexiny o molekulové hmotnosti 32–42 kDa (Jami et al., 2012). Jsou rozmístěny na chromosomu 1, 2 a 5 a to tak, že na prvním chromosomu se nachází *ANNAT1* a *ANNAT5*, na druhém umístěny v tandemu *ANNAT3* a *ANNAT4* a na pátém chromosomu *ANNAT2*, *ANNAT6*, *ANNAT7* a *ANNAT8* (Jami et al., 2012). Zajímavé bylo zjištění, že *ANNAT3*, *ANNAT4*, *ANNAT5*

a *ANNAT8* sdílejí identickou genovou strukturu s šesti exony. Naopak analýza zbývajících čtyř annexinů (*ANNAT1*, *ANNAT2*, *ANNAT6* a *ANNAT7*) ukázala, že mají společný úbytek intronů. *ANNAT1* ztratil poslední tři introny, *ANNAT2* ztratil poslední intron a tandemová dvojice *ANNAT6*, *ANNAT7* ztratila poslední dva introny (Cantero et al., 2006). Obecně platí, že primární sekvence rostlinných annexinů se vzájemně liší. *ANNAT2*, *ANNAT6* a *ANNAT7* jsou si nejvíce podobné navzájem. Byla zde zjištěna identita na úrovni nukleotidů v rozmezí 80–86 % a shoda na úrovni aminokyselin 76–83 % (Cantero et al., 2006; Clark et al., 2001). I když geny *ANNAT3* a *ANNAT4* vznikly nejspíše genovou duplikací (Clark et al., 2001), zdají se být odlišné na úrovni aminokyselin (Cantero et al., 2006). Při porovnání opakujících se sekvencí u *A. thaliana* s jinými rostlinnými annexiny je zřejmé, že tato strukturální opakování jsou specifická a pomáhají odlišovat annexiny *A. thaliana* od ostatních (Barton et al., 1991; Cantero et al., 2006). Aby se *ANNAT1–8* mohly řadit do rodiny annexinů, musí obsahovat čtyři charakteristické domény a endonexinový region pro vazbu  $\text{Ca}^{2+}$ , totožný se živočišnými annexiny (Clark et al., 2001). Celkově je známo, že první a čtvrtá doména vykazuje nejvyšší míru konzervativnosti, zatímco druhá a třetí doména jsou nejvíce odlišné (Cantero et al., 2006). Tyto odlišnosti pak způsobují rozdíly mezi funkcemi a regulačními mechanismy každého z annexinů (Clark et al., 2001). Genová exprese annexinů není podmíněná určitým pletivem (kromě *ANNAT6*) a v průběhu vývoje rostliny se jednotlivé annexiny vyskytují v rozdílných typech buněk. Samotné množství proteinů se dynamicky mění. Místo exprese je většinou relevantní k funkci jednotlivých annexinů. *ANNAT1* a *ANNAT2* jsou nejvíce zastoupeny ve stoncích nebo kořenech (Clark et al., 2001; 2005b), *ANNAT3* v kořenech a hypokotylu (Xu et al., 2023), *ANNAT4* v kořenech a květech (Huh et al., 2010), *ANNAT5* v pylu a prašnicích (Lichocka et al., 2018) a *ANNAT6–8* se nachází převážně v květech (Clark et al., 2001; Yadav et al., 2016).

#### **2.2.4.1 ANNEXIN1, ANNEXIN3, ANNEXIN4**

Annexin 1 (Obr. 2) je z osmi annexinů *A. thaliana* nejhojněji zastoupený (Clark et al., 2001). V průběhu vývoje rostliny se v různém množství vyskytuje ve stoncích, kořenech, kořenových vláscích, vodivých pletivech či mladých listech, ve kterých se množství proteinu postupně snižuje (Clark et al., 2001; 2005b). Stejně se tak může nacházet na více pozicích na buněčné úrovni (Laohavisit & Davies, 2011). V jeho molekulární struktuře se nachází v prvním opakování hem-vázající doména typická pro rostlinné peroxidasy (Gidrol et al., 1996; Gorecka et al., 2005). Tato sekvence se překrývá s  $\text{Ca}^{2+}$ -vázající

doménou, a tak lze předpokládat, že jeho peroxidasaová aktivita může být ovlivňována vápenatými ionty. Dále se ve struktuře *ANNAT1* nachází modifikovaný GTP-vázací motiv, jež se znovu překrývá s vápník-vázacím motivem. Dochází k inhibici GTPasové aktivity vápenatými ionty (Clark et al., 2001).



Obrázek 2: 3D struktura *ANNAT1* s červeně vyznačenými  $\text{Ca}^{2+}$  vazebnými místy typu II na doméně I a IV. Vytvořeno podle Clark et al. (2012), Konopka-Postupolska (2007) pomocí programu SWISS-MODEL.

*ANNAT1* je exprimován téměř ve všech pletivech *A. thaliana*, přičemž největší množství se nachází v kořeni, kořenových vlásčích a epidermálních buňkách hypokotylu (Tichá et al., 2020). Větší abundance v trichoblastech oproti atrichoblastům naznačuje zapojení při polárním růstu kořenových vlásků. *ANNAT1* asociuje s mitotickými a cytokinetickými mikrotubuly, jako je dělicí vřeténko nebo fragmoplast v buňkách kořenové špičky (Tichá et al., 2020). Dále by interakcí mohl aktivovat různé enzymy a regulovat enzymové komplexy plasmatické membrány, jako jsou kalosa a celulosa syntasa (Hofmann et al., 2003; Tichá et al., 2020; Verma & Hong, 2001). *ANNAT1* zprostředkovává signalizaci  $\text{Ca}^{2+}$  a reguluje odpovědi během různých abiotických stresů. Mutant *Atann1* vykazuje při klíčení a raném růstu semenáčků přecitlivělost na osmotický stres a kyselinu abscisovou (ABA). Má stresem opožděné klíčení, což nasvědčuje, že tento annexin hraje roli při osmotickém stresu, ABA signalizaci, exocytose či při kontrole buněčného cyklu (Lee et al., 2004). Tento mutant má také rozdílné odpovědi na sucho a akumuluje více peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Konopka-Postupolska et al., 2009). Exprese genu *ANNAT1* byla zvýšena při navýšení koncentrace chloridu sodného (NaCl), vystavení chladnému i teplému prostředí, či při dehydrataci (Cantero et al., 2006), čímž tento

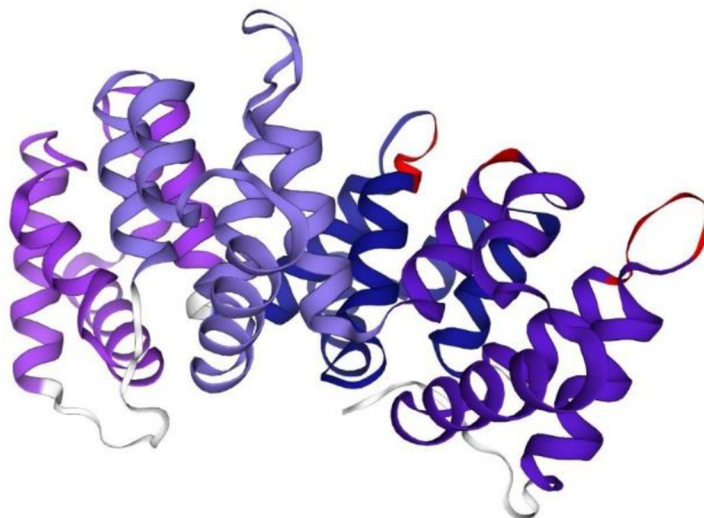
annexin může ovlivňovat odpověď na solný stres (Laohavisit et al., 2013), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Richards et al., 2014) nebo na stres z tepla (Wang et al., 2015). Ukázalo se, že funkce ANNAT1 je závislá na fotoperiodě. Při stresu způsobeného suchem je *Atann1* mutant za krátkého dne na tento stres citlivější než divoký typ, zatímco v podmínkách dlouhého dne je naopak méně citlivý (Huh et al., 2010). S-glutathionylace ANNAT1 může vést ke snížení jeho afinity k Ca<sup>2+</sup>, což omezuje jeho vázání na membrány. Toto naznačuje důležitou fyziologickou roli posttranslačních modifikací (Konopka-Postupolska et al., 2009). ANNAT1 má transportní aktivitu v plasmatické membráně kořenových buněk a je schopen narušit cytosolickou koncentraci Ca<sup>2+</sup> a výdej draslíkových iontů (K<sup>+</sup>) z buňky. Podporuje zde radikály aktivovanou Ca<sup>2+</sup> a K<sup>+</sup>- permeabilní vodivost, je zapojený do prodlužování buněk a signalizaci sodíkového stresu (Laohavisit et al., 2012).

ANNAT1 a ANNAT4 se spolu váží v závislosti na Ca<sup>2+</sup>. Ze zkoumání jejich dvojitého mutantu *Atann1Atann4* se zjistilo, že spolu kooperují při odpovědích na stres ze sucha a soli. Tento mutant je sice nejvíce defektní při klíčení za stresových podmínek, ale dále v podmínkách dlouhého dne je ke stresu podstatně více tolerantní než divoký typ (Huh et al., 2010). Pokud jsou rostliny vystaveny tepelnému a oxidativnímu stresu, ANNAT1 a ANNAT4 sdílí stejný transkripční regulátor, který má negativní vliv na změny v cytosolické koncentraci Ca<sup>2+</sup> (Liao et al., 2017). Dále oba ovlivňují imunitní odpověď na biotický stres, kde kombinací s efektory mohou měnit signalizaci vápníku a tím infekci hlístic (Zhao et al., 2019)

Annexin 3 (Obr. 3) má jako jediný u *A. thaliana* dva konzervované endonexin regiony a klasickou Ca<sup>2+</sup>-vázající smyčku na více než jednom opakování. Účastní se jaderného lokalizačního signálu a je tedy možné, že je jaderným proteinem (Clark et al., 2001). Jeho expresi ovlivňuje chlad a dehydratace (Cantero et al., 2006; Laohavisit & Davies, 2011). ANNAT3 je zapojený v růstu semenáčku regulovaném extracelulární ATP (eATP). To reguluje distribuci auxinu a auxinových transportérů ve vegetativních orgánech. Upravuje tak orientaci a rychlost elongace při růstu kořene a hypokotylu (Xu et al., 2023). Funguje ve vezikulárním transportu rozpustných vakuolárních proteinů v post-transgolgiho síti (TGN). Je potřebný v posledním kroku transportu z TGN na multivezikulární tělísko (MVB), při vypouštění MVB, kde slouží jako transportní nosič do vakuoly (Scheuring et al., 2011). Společně s ANNAT2 jsou zapojeny do zvýšení tolerance rostliny vůči suchu. Genová exprese obou genů byla zvýšena v kořenech ošetřených mannitolem a proteiny



byly rychle přemístěny na plasmatickou membránu, kde pomáhaly regulovat přenos  $\text{Ca}^{2+}$  přes membránu. Jejich funkci v tomto případě negativně ovlivňoval fotoreceptor, který potlačoval funkce ANNAT2 a ANNAT3 ovlivněním jejich lokalizace na plasmatické membráně a inhiboval transmembránový tok  $\text{Ca}^{2+}$  závislý na ANNAT2 a ANNAT3 v reakci na stres ze sucha (Liu et al., 2021).



Obrázek 3: 3D struktura ANNAT3 s červeně vyznačenými  $\text{Ca}^{2+}$  vazebnými místy typu II na doméně I a IV. Vytvořeno podle Clark et al. (2012) a Konopka-Postupolska, (2007) pomocí programu SWISS-MODEL.

Gen *ANNAT3* společně s *ANNAT4* jsou lokalizovány blízko sebe na druhém chromozomu a jsou přepisovány v opačném směru. To naznačuje možnou koregulaci těchto dvou annexinů a původ v genové duplikaci (Clark et al., 2001). Sdílejí 5'-promotorový region ve své genové struktuře, avšak nejsou regulovány stejným způsobem při stresových odpovědích (Cantero et al., 2006).

Annexin 4 (Obr. 4) je nejrozdílnější z annexinů *Arabidopsis* (Clark et al., 2001). Ve své struktuře obsahuje pouze jeden rozpoznatelný motiv, který by vázal vápník nebo fosfolipidy (Konopka-Postupolska, 2007). Jeho exprese může být ovlivněna ABA (Xin et al., 2005), NaCl (Cantero et al., 2006), kyselinou salicylovou (SA; Kiba et al., 2005), mechanickým poškozením (Yan et al., 2007) a biotickým stresem (Marathe et al., 2004). Místa exprese tohoto annexinu jsou pak dána jak vývojem rostliny, tak podmínkami růstu. Při pěstování *Arabidopsis* v hlíně byla největší exprese v listech a květech a při růstu v tekutém MS (Murashige & Skoog) médiu v kořenech (Huh et al., 2010). ANNAT4 negativně reguluje rostlinou odpověď na stres ze sucha a soli. Množství ANNAT4 je rozdílné na proteinové a RNA úrovni. RNA transkripty se neshodují s množstvím

proteinů, a tak nejspíše dochází k regulaci jeho aktivity posttranskripčními nebo posttranslačními modifikacemi (Huh et al., 2010). Analýza genové exprese odhalila nadexpresi *ANNAT4* v reakci na oxidační stres vyvolaný  $H_2O_2$ , což naznačuje jeho možnou roli v antioxidační odpovědi rostliny (Richards et al., 2014).



Obrázek 4: 3D struktura ANNAT4 s červeně vyznačeným možným  $Ca^{2+}$  vazebným místem typu II na doméně I. Vytvořeno podle Konopka-Postupolska, (2007) vytvořeno pomocí programu SWISS-MODEL.

Jedna z možných funkcí ANNAT4 je, že slouží jako  $Ca^{2+}$  transportér, kanál nebo jeho kofaktor, který vytváří vápníkový signál při solném stresu. S dalšími proteiny, jako jsou SOS3-podobným  $Ca^{2+}$ -vázajícím proteinem 8 (ScaBP8; SOS3-like calcium binding protein 8) a SOS2 (Salt overly sensitive 2) proteinkinasa, pomáhá aktivovat SOS (salt overly sensitive) dráhu. Ta je základním mechanismem tolerance k solnému stresu, obsahuje vápníkové sensorové proteiny, proteinkinasy a  $Na^+/H^+$  antiporter, čím nastoluje iontovou homeostázi v rostlině (Ma et al., 2019). Další funkcí ANNAT4 je role v exocytose, jelikož kooperuje s rozpustnými nsf-připojovacími proteinovými receptory (SNARE; soluble nsf attachment proteins receptor) v plasmatické membráně a tonoplastu, čím ovlivňuje fúzi vezikul (Fujiwara et al., 2014). ANNAT4 se podílí na reakcích na oxidační stres prostřednictvím přenosu vápníkového signálu v kořenech (Liao et al., 2017). Abiotické stresy mohou vyvolat alternativní sestřih genů v rostlinách a indukují tak změny v genové expresi, které jsou klíčové pro adaptivní reakce na nepříznivé prostředí. *ANNAT4* jako gen reagující na abiotický stres vykazoval v reakci na NaCl a mannitol dvě alternativní sestřihové varianty. *ANNAT4.1* byl vysoce nadexprimován v kořenech, zatímco pro *ANNAT4.2* nebyly pozorovány žádné významné



rozdíly. Exprese *ANNAT4.1* byla významně vyšší než *ANNAT4.2*, což naznačuje, že vysoce exprimované alternativní sestřihové varianty mohou hrát důležitou roli v reakcích na stres ze soli a sucha (Seok et al., 2023).

### 2.3 Vápníková signalizace

Rostliny si vyvinuly sofistikované signalizační strategie jak odolat nepříznivým vnějším podmínkám. Mezi nejvíce používané strategie patří právě spleť signální sítě zahrnující vápník. Většina biotických a abiotických stresů vyvolává zvýšení cytosolického množství vápníku ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) a je dobře známo, že vápenaté ionty ( $Ca^{2+}$ ) hrají klíčovou roli jako mediátor při regulaci a specifikaci buněčných reakcí na stresy z prostředí (Dodd et al., 2010). Vápníková signalizace na buněčné úrovni reguluje odpovědi na abiotický stres (McAinsh & Pittman, 2009), otevírání průduchů (Ng et al., 2001), interakce s patogeny, nebo symbiotickými organismy (Ma & Berkowitz, 2007; Oldroyd et al., 2009), vývoj pylové láčky a kořenových vlásků (Hepler et al., 2001). Dále se účastní světelné a cirkadiální signalizace (Dodd et al., 2010; Shimazaki et al., 2007). Jeden vápníkový senzor je schopen přispět k odpovědi na více různých stresů, může současně zprostředkovávat odpověď na biotické i abiotické stresy (Ranty et al., 2016). Vápník je rostlinnou živinou, která ve formě  $Ca^{2+}$  působí jako dynamický vnitrobuněčný posel a tím ovlivňuje převážnou část života buňky (Clapham, 2007; Kudla et al., 2010; Thor, 2019). Společně s fosfátovými ionty jsou hlavními činiteli změny lokálního elektrostatického pole a proteinové konformace. Mohou tedy sloužit jako univerzální nástroje k signalizaci. Základem rychlosti a efektivity  $Ca^{2+}$  je 20 000-násobný gradient mezi koncentrací uvnitř a vně buňky. Buňky byly nuceny vynalézt cesty jak co nejrychleji snížit cytosolické množství vápníku, či jak dále využít jeho vazebnou energii (Clapham, 2007; Dodd et al., 2010).  $Ca^{2+}$  není buňka schopna chemicky upravit, a tak musí docházet k chelataci, kompartmentalizaci, nebo je buňka musí vypudit ven. Velké množství proteinů se adaptovalo k vazbě těchto iontů. Některé pouze umírňují jejich účinky, některé proteiny se však vyvinuly k využití  $Ca^{2+}$  v buněčných procesech (Clapham, 2007; Pirayesh et al., 2021).

$Ca^{2+}$  signál je základním regulátorem buněčné fyziologie a odpovědi na prostředí (Dodd et al., 2010). Základní mechanismy tvorby signálu jsou kanály, pumpy a nosiče zajišťující  $Ca^{2+}$  homeostázu. Regulují pohyb iontů mezi subcelulárními kompartmenty a intracelulárním a extracelulárním prostorem buněk. Aby byla vápníková signalizace efektivní, musí zde být jak mechanismy zvyšující koncentraci v buňce

tzv. „on mechanismy“, tak mechanismy jak ji vrátit do původního stavu „off mechanismy“ (Berridge et al., 2003).  $\text{Ca}^{2+}$  je versatilní signalizační ion a je tak v centru sítě dalších signalizačních drah. Tyto dráhy spojují informace z biotických a abiotických zdrojů a mají vliv na fungování buňky a genovou expresi (Dodd et al., 2010).

Buňka reaguje na konkrétní stimuly specifickým zvýšením  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Koncentrace  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  je obvykle udržována na submikromolární úrovni v rozmezí 50 až 100  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , aby se zabránilo jeho toxickému účinku na buněčný energetický metabolismus (Pirayesh et al., 2021).  $\text{Ca}^{2+}$  se mohou do cytosolu dostávat z externího média nebo ze subcelulárních kompartmentů (vakuoly, ER; McAinsh & Pittman, 2009). Většinou se výkyvy  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  dějí opakovaně, kdy frekvence, amplituda a tvar těchto oscilací jsou přesně definovány stimulem (Dodd et al., 2010). Tato reakce je pak určena místem a časem a označuje se jako „ $\text{Ca}^{2+}$  podpis“ (Webb et al., 1996). Každý „ $\text{Ca}^{2+}$  podpis“ je výsledkem složitého vzájemného působení kanálů a transportérů lokalizovaných v plasmatické membráně a membránách buněčných organel (Demidchik et al., 2018; McAinsh & Pittman, 2009). Na úrovni regulace jsou proteiny schopné dekodovat stimul-specifické informace z těchto „ $\text{Ca}^{2+}$  podpisů“. Jedná se o velké množství různých sensorových proteinů, které jsou schopné vázat  $\text{Ca}^{2+}$ . Způsobují přenos signálu na další proteiny nebo mohou mít přímo enzymatickou aktivitu a upravovat buněčnou funkci (Dodd et al., 2010; Hashimoto & Kudla, 2011).

Specializované proteiny na sebe váží  $\text{Ca}^{2+}$  přes atomy kyslíku karboxylových a karbonylových skupin. K chelataci pak dochází většinou pomocí EF-domény proteinu. Jedná se o motiv střídající helix-otočku-helix a negativně nabitě atomy kyslíku drží  $\text{Ca}^{2+}$  ve smyčce mezi  $\alpha$ -helixy (Clapham, 2007; Strynadka & James, 1989). Vápníková signalizace je využívána všudypřítomně ke spojení extracelulárního stimulu s jejich charakteristickou odpovědí jak u živočichů, tak u rostlin (Berridge et al., 2000). Základní charakteristiky vápníkové signalizace zůstávají u obou skupin stejné. Už prvotní jednobuněčné organismy byly schopné přenášet vápník přes plasmatickou membránu a evoluce transportního systému udržující nízké koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  vytvořila příležitost pro tvorbu signalizační dráhy (Edel et al., 2017; Sanders et al., 1999). Oproti živočichům ztratily rostliny v průběhu evoluce diverzitu mechanismů vápníkového nárůstu na plasmatické membráně (Wheeler & Brownlee, 2008). Na druhou stranu si vyvinuly nové možnosti regulace cytosolové koncentrace jako ukládání iontů do specializované vakuoly a velké množství vápník-vnímajících a dekodujících proteinů (Edel et al., 2017). Na

základě zkoumání proteinových struktur typických pro  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci byl tento mechanismus přítomen už i u posledního společného předchůdce eukaryot. Evoluce těchto proteinů se výrazně odlišovala od ostatních, jelikož se velmi rychle vytvářela jejich intragenomová diverzita (Marchadier et al., 2016). V průběhu evoluce došlo k tvorbě diverzity mezi jednotlivými proteiny, jelikož bylo zapotřebí nových specializovaných funkcí proteinů. Většinu proteinů vápníkové signalizace lze zařadit mezi pár silně expandovaných rodin (Edel et al., 2017).

Nejčastějším motivem, který váže vápník, je EF-motiv (Tuteja, 2009). U *A. thaliana* bylo nalezeno více než 250 proteinů s EF doménou (Day et al., 2002). Afinita EF-motivu k  $\text{Ca}^{2+}$  se liší v závislosti na aminokyselinové sekvenci proteinu. Patří mezi ně kalmoduliny (CaM), kalmodulinu podobné proteiny (CML), na  $\text{Ca}^{2+}$ -závislé proteinkinasy (CDPK) a kalcineurin B-podobné proteiny (CBL; Hashimoto & Kudla, 2011).

- CaM je malý všudypřítomný protein, který slouží k navázání  $\text{Ca}^{2+}$  a jeho přizpůsobení na velikost větších proteinů. Jedná se o vysoce konzervovaný kyselý protein, který obsahuje dvě globulární domény, z nichž každá obsahuje dva EF-motivy (Luan et al., 2002). Velké množství proteinů se nachází hlavně v cytosolu (Yang & Poovaiah, 2003). Kalmoduliny jsou konzervovanou rodinou proteinů u všech eukaryot a fungují jako  $\text{Ca}^{2+}$  senzory. Prvním identifikovaným proteinem, spolupracujícím s CaM u *A. thaliana*, byla serin/treonin fosfatáza (PP7; Liu et al., 2007).
- CDPK mají kinasovou aktivitu a po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  přenášejí tuto informaci na fosforylaci. Kombinují senzorovou a proteinkinasovou funkci v rámci jednoho proteinu. Jsou aktivovány zvýšením intracelulárních hladin  $\text{Ca}^{2+}$  a převádějí informace kódované v  $\text{Ca}^{2+}$  podpisech na fosforylaci specifických cílových proteinů (Ludwig et al., 2004).
- CBL sami nemají enzymovou funkci, ale interagují se serin/threonin proteinkinasami (CIPK) a společně má tento komplex kinasovou aktivitu (Hashimoto & Kudla, 2011).

Mezi senzorové proteiny mohou patřit i proteiny s jinými  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebnými místy než je EF-doména, jako jsou proteiny s doménou umožňující současně vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  a vazbu na fosfolipidy obsahující tzv. C2 doménu, proteiny jako kalretikulin

v intercelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  zásobárnách nebo annexiny. Annexiny pro vazbu s vápníkem využívají  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebná místa typu II a III (Laohavisit & Davies, 2011; Weng et al., 1993). Jsou tak schopné regulovat změny  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , ovlivňují přenos signálu a jeho amplifikaci (Kovács et al., 1998; Ma et al., 2019).  $\text{Ca}^{2+}$  a membránová vazebná vlastnost annexinů je klíčová pro jejich zapojení do různých signálních procesů při stresových odpovědích. Mohou být komponentem salinitou indukované vápníkové signalizace (Laohavisit et al., 2013) a při solném stresu jako vápník-propustné transportující proteiny generují vápníkový signál (Ma et al., 2019). Hrají roli při obnovení vápníkové a iontové homeostázy po mrazem způsobeném poškození (Chen et al., 2013), jsou zapojené do signalizační dráhy a regulují  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  při stresových hladinách peroxidu vodíku nebo při stresu z vysokých teplot (Liao et al., 2017; Richards et al., 2014; Wang et al., 2015).

Transportní systémy musí udržovat vysoký rozdíl elektrochemického potenciálu, a proto musí být dodávána energie.  $\text{Ca}^{2+}$  pumpy jsou napájeny hydrolýzou ATP a vápníko-protonové ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$ ) antiportery napájeny silou protonového řetězce (Sanders et al., 2002). ATP dependentní transport je prováděn prostřednictvím ATPas. Ty přenášejí  $\text{Ca}^{2+}$  do endoplasmatického retikula nebo přes plasmatickou membránu s velkou afinitou, ale nízkou kapacitou (Boursiac & Harper, 2007).  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$  výměna je cytosolový exportní systém s nízkou afinitou. Je spojený s termodynamicky výměnným tokem  $\text{H}^+$ . U *Arabidopsis* se pak jedná o kationtové výměníky (CAX; Shigaki & Hirschi, 2006).

Primární hnací silou vápníkové signalizace je považován pasivní zpětný tok  $\text{Ca}^{2+}$  dolů elektrochemickým potenciálem, který je generován ATPasami a CAX (Sanders et al., 2002). Tento tok probíhá přes iontové kanály, které jsou normálně inaktivní, ale mohou být aktivovány ABA, reaktivními formami kyslíku (ROS; Murata et al., 2001) i extracelulární ATP (eATP; Demidchik et al., 2009). Existuje více druhů těchto kanálů, některé jsou aktivované membránovou hyperpolarizací, depolarizací a jiné zase změnou napětí (Clapham, 2007; Dodd et al., 2010).

Nahromadění vápníkových iontů nemusí být zprostředkováno pouze obyčejnými iontovými kanály. Některé annexiny mají  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu podobné vlastnosti (Laohavisit et al., 2012, 2013). V centru molekuly mají hydrofilní pór, který bývá strukturním základem iontových kanálů (Gerke & Moss, 2002) a k jejich tvorbě, regulaci a selektivitě přispívají zde přítomné solné můstky (Laohavisit et al., 2009; Liemann et al., 1996). Mohou být asociované či vloženy ve dvouvrstvě membrány. Je zde tak možnost pasivního transportu

vápníku annexiny (Kourie & Wood, 2000; Laohavisit et al., 2012). V závislosti na ROS mohou být schopny tvořit pasivní vápníkový transport a spojovat tak ROS a  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci (Laohavisit et al., 2010).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

Semena *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh:

- ekotyp Columbia (Col-0)
- T-DNA mutantní linie annexinu 1: *ann1-2* (SALK\_095886C)
- T-DNA mutantní linie annexinu 4: *ann4-1* (SALK\_019725C) a *ann4-2* (SALK\_073121)

Rostliny *Nicotiana benthamiana*

Bakteriální kultury:

- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$
- *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3103

#### 3.1.2 Chemikálie

- 2-(N-morfolino)etansulfonová kyselina (MES; Sigma Aldrich)
- Acetosyringon (Sigma Aldrich)
- Agarosa (Sigma Aldrich)
- Ampicilin (Duchefa Biochemie)
- ATP (Thermo Fisher Scientific)
- *BbsI* (Thermo Fisher Scientific)
- CutSmart Buffer 10x (Thermo Fisher Scientific)
- Deoxyribonukleotidy (dNTP; Thermo Fisher Scientific)
- DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Fisher Scientific)
- Ethanol (Penta)
- Extrakční pufr (Thermo Fisher Scientific)
- Gellan gum (Thermo Fisher Scientific)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
- Glukosa (Sigma Aldrich)
- Glycerol (Sigma Aldrich)
- Hydroxid draselný (KOH; Sigma Aldrich)

- Chlorid draselný (KCl Sigma Aldrich)
- Chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>, Sigma Aldrich)
- Chlorid sodný (NaCl; Sigma Aldrich)
- Kvasnicový extrakt (Sigma Aldrich)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich)
- LB broth (Sigma Aldrich)
- LB broth s agarem (Sigma Aldrich)
- Midori Green Advance DNA/RNA stain (Nippon Genetics)
- Murashige & Skoog médium, basal salt mixture (MS; Duchefa Biochemie)
- Phire Plant Direct PCR kit (Thermo Fisher Scientific)
- Plasmid DNA mini kit I (Omega Bio-Tek)
- *PvuII* fast digest (Thermo Fisher Scientific)
- Rifampicin (Duchefa Biochemie)
- Sacharosa (Penta Chemicals)
- Specifické primery (Eurofins Genomics)
- Spektinomycin (Duchefa Biochemie)
- T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific)
- Trypton (Sigma Aldrich)

### 3.1.3 Kultivační média

½ MS médium (1% sacharosa)

10 g·l <sup>-1</sup>	sacharosa
6 g·l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
2,15 g·l <sup>-1</sup>	MS médium, basal salt mixture
0,5 g·l <sup>-1</sup>	MES
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 5,8 (upravování pomocí KOH);
	sterilizace autoklávováním

### Kokultivační médium

45 ml	milliQ H <sub>2</sub> O
5 ml	100 mmol·l <sup>-1</sup> MES
500 µl	1 mol·l <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>
7,5 µl	1 mol·l <sup>-1</sup> acetosyringon

### SOC médium

20 g·l <sup>-1</sup>	trypton
5 g·l <sup>-1</sup>	kvasnicový extrakt
3,6 g·l <sup>-1</sup>	glukosa
0,952 g·l <sup>-1</sup>	MgCl <sub>2</sub>
0,584 g·l <sup>-1</sup>	NaCl
0,186 g·l <sup>-1</sup>	KCl
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 7,5; sterilizace autoklávováním

### Tekuté Luria Bertani (LB) médium

25 g·l <sup>-1</sup>	LB Broth
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 7,2; sterilizace autoklávováním
	po autoklávování přidání antibiotik

### Tuhé Luria Bertani (LB) médium

40 g·l <sup>-1</sup>	LB Broth s agarem
	milliQ H <sub>2</sub> O
	sterilizace autoklávováním
	po autoklávování přidání antibiotik



### 3.1.4 Roztoky a pufry

1% (w/v) agarosový gel

1 g	agarosa
100 ml	TAE
1 $\mu$ l	Midori Green Advance DNA/RNA stain

Roztok na odbarvení listů

90 ml	96% ethanol
30 ml	glycerol
30 ml	kyselina octová

50 x koncentrovaný TAE pufr

121 g	Tris
28,55 ml	kyselina octová
50 ml	0,5 mol·l <sup>-1</sup> EDTA
421,45 ml	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 8,0

1 x koncentrovaný TAE pufr

20 ml	50 x TAE pufr
980 ml	milliQ H <sub>2</sub> O

### 3.1.5 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)
- Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)
- Centrifuga ROTANTA 460R (Schoeller Instruments)
- Digestoř (Merci)
- Elektroforetická vana (Bio-Rad)

- Elektromagnetická míchačka (Boeco)
- Epifluorescenční mikroskop Axio Imager 2 (Carl ZEISS)
- Fytotron (Weiss)
- Konfokální mikroskop AxioObserver LSM 880 (Carl ZEISS)
- Kultivační třepačka Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan Ltd)
- Laminární box (Merci)
- MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific)
- NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)
- pH metr (HANA)
- Pipety (Eppendorf)
- Simplicity Water Purification System (Merk)
- Skener (Epson)
- Spektrofotometr Smart Spec™ plus (Bio-Rad)
- Stereo zoomovací mikroskop Axio Zoom V16 (Carl ZEISS)
- Termocykler T100 Thermal Cycler, (Bio-Rad)
- ThermoStat C (Eppendorf)
- UV vizualizátor Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad)
- Vortex Microspin FV2400 (Biosan)

### **3.1.6 Software**

- ApE, A plasmid Editor
- Epson Scan
- ImageJ 1.8
- Image Lab 6.1
- Geneious Prime
- SWISS-MODEL
- Zeiss ZEN 3.9 Blue edition
- Zeiss ZEN Black edition

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava kultivačních médií

Pro kultivaci rostlin bylo použito ½ MS médium (Murashige & Skoog, 1962). Po navážení jednotlivých složek kromě Gellan Gumu došlo k jejich rozpuštění v milliQ vodě a upravení pH na hodnotu 5,8. Takto upravené médium se společně s odměřeným množstvím zpevňovací složky naplnilo do lahví, tak aby byly kvůli následné sterilizaci autoklávováním plné pouze do poloviny. Po sterilizaci se v laminárním boxu za aseptických podmínek rozlilo médium do sterilních Petriho misek a nechalo se zatuhnout.

Tekuté a tuhé LB médium pro kultivaci bakterií bylo připraveno rozmícháním LB broth (s agarem) v milliQ vodě a vysterilizováno autoklávováním.

### 3.2.2 Povrchová sterilizace semen

Veškerá semena využitá pro *in vitro* kultivaci byla sterilizována nejdříve 5 minut v 70% (v/v) ethanolu za občasného promíchávání. Po odpipetování co největšího množství byl následně přidán 96% (v/v) ethanol po dobu 1 minuty. Za stejného postupu se dále semena dvakrát po 1 minutě promývala ve sterilní milliQ vodě. Pomocí pipety se semena rozprostřela na sterilním filtračním papíru v Petriho misce a nechala se oschnout.

### 3.2.3 *In vitro* kultivace rostlin

Za aseptických podmínek se pomocí párátko vysadila sterilizovaná semena na připravené čtvercové Petriho misky s kultivačním médiem. Ty byly pro udržení sterilních podmínek uzavřeny pomocí parafilmu a chirurgické pásky. Petriho misky se semeny se nechaly stratifikovat chladem v lednici při 4 °C, 24–48 hod. Dále se přenesly do fytotronu, kde byly kultivovány ve vertikální poloze při 21 °C, 70% vzdušné vlhkosti a fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

### 3.2.4 Genotypová analýza

Na PCR genotypování byl použit Phire Plant Direct PCR Kit, jehož součástí je diluční pufr k izolaci DNA z rostlin. Byly použity mladé listy z minimálně 10 dní starých *in vitro* kultivovaných rostlin. Do mikrozkušavek bylo přidáno 20 µl dilučního pufru, ve kterém byly v aseptických podmínkách malé listy rozdrceny pomocí pipetové špičky. Po jeho rozdrcení měl roztok nazelenalou barvu a nechal se stát na ledě po dobu 45 minut. Současně byly připraveny PCR reakční směsi popsány v Tab. 1 za použití primerů z Tab. 2. Samotná PCR reakce probíhala za podmínek uvedených v Tab. 3.

Tab. 1: Složení PCR reakčních směsí pro genotypování s použitím Phire Plant Direct PCR Kitu

<b>Chemikálie</b>	<b>1 reakce (10 µl)</b>
Phire Reaction Buffer 5x	2
dNTPs (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	0,2
MilliQ H <sub>2</sub> O	6,7
Phire Hot Start II DNA polymerasa	0,2
RP primer (finální koncentrace 0,5 µmol·l <sup>-1</sup> )	0,2
LP primer (pro alelu divokého typu; finální koncentrace 0,5 µmol·l <sup>-1</sup> ) nebo	0,2
LB primer (pro alelu s T-DNA inzercí; finální koncentrace 0,5 µmol·l <sup>-1</sup> )	
Templátová DNA	0,5

Tab. 2: Použité primery pro PCR genotypování *ann4* mutantů

<b>Název primeru</b>	<b>Sekvence</b>
AtANN4-RP1	AGGTGAAATTCGGTTGGAATC
AtANN4-LP1	CTCGGTGCACGTAAAGCTTAC
AtANN4-RP2	AGCTTGAGGTGTCTGACGAAG
AtANN4-LP2	ATAGGTCCATGTGTGTTTCGC
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC

Tab. 3: Podmínky PCR reakce s Phire Reaction Buffer 5x

<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Opakování</b>
Iničiační denaturace	98 °C	5 min	1 x
Denaturace	98 °C	5 s	
Nasedání primerů	podle primerů	5 s	40 x
Elongace	72 °C	20 s	
Finální elongace	72 °C	1 s	1 x
	4 °C	∞	-

Po dokončení PCR reakce byly ke každému vzorku přidány 2 µl DNA Gel Loading Dye, 6X a pomocí 1% agarosové elektroforézy bylo možné ověřit, zda se jednalo o homozygotní nebo heterozygotní rostliny. Gel byl připraven rozpuštěním 1 g agarosy ve 100 ml 1x TAE pufu a přidáním 1 µl Midori Green Advance DNA/RNA stain. Do jamek na gelu bylo nanášeno 6 µl obarvených PCR produktů a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 100 V, proudu 400 mA, po dobu 30 min. Gel byl následně vizualizován a vyhodnocen. Produkty amplifikované reakční směsí s LP a RP primery značily alelu divokého typu a produkty směsí s LB a RP alelu s T-DNA inzercí.

### 3.2.5 Fenotypová analýza

*In vitro* kultivované rostliny na médiích se sacharosou byly sledovány po dobu 14 dní a skenovány pomocí skeneru. Tyto snímky byly využity na měření délky kořenů, jejich přírůstků a hypokotylů. Sedmý den po vysazení byly pod ZOOM mikroskopem pozorovány vzdálenosti mezi kořenovou špičkou a náběhem na první kořenový vlásek a samotné kořenové vlásky. Analýza byla provedena v programu ImageJ.

Velikost průduchů byla zkoumána na odbarvených 3. pravých listech odebraných z rostlin starých 28 dní. Chlorofyl byl z listů odstraněn pomocí odbarvovacího roztoku, ve kterém se opakovaně promývaly po dobu 20 min, dokud nebyl veškerý chlorofyl vymyt. Listy se následně položily na podložní sklíčko abaxiální stranou nahoru, zalily kapkou 100% glycerolu a přikryly krycím sklíčkem. Vzorky byly sledovány pod epifluorescenčním mikroskopem a vyhodnocovány podle metody použité v článku Melicher et al. (2024).

### 3.2.6 Multiplex CRISPR/Cas9

Při přípravě vektorů bylo postupováno podle Decaestecker et al. (2019). Odzbrojené („unarmed“) vstupní a prázdné destinační vektory byly poskytnuty již připravené.

#### 3.2.6.1 Dimerizace gRNA sekvencí (oligos annealing) a příprava vstupních vektorů

Jednotlivé vodící RNA (single gRNA; Tab. 4) použity k přípravě konstruktů Multiplex CRISPR/Cas9 byly navrhnuté vedoucí práce pomocí programu CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>). Sekvence *ANV* genů byla získaná z referenční databáze TAIR (The Arabidopsis Information Resource). Při návrhu gRNA byla použita následující pravidla podle Gerashchenkov et al. (2020):

- nejnižší aktivita nespécifického zacílení (nízké off-skóre);
- maximální specifita zacílení (vysoké on-skóre);
- zacílení gRNA na první exon;
- délka sekvence gRNA mezi 15–23 nukleotidy;
- obsah G/C párů bází mezi 40–60 %;
- při použití *U6* promotoru vzít guanin jako první nukleotid gRNA.

Před samotnou přípravou vstupních vektorů bylo potřebné dimerizovat jednotlivé gRNA sekvence. Do 48  $\mu$ l milliQ vody bylo přidáno po 1  $\mu$ l obou primerů a nechalo se inkubovat v termocykleru: 5 min 95 °C; 95–85 °C, -2 °C·s<sup>-1</sup>; 85–25 °C, -0,1 °C·s<sup>-1</sup>.

Tab. 4: Primery pro přípravu gRNA pro *ANN* geny

<b>gRNA</b>	<b>Sekvence</b>
gANN1_fw1	ATTGGTTACCTCATACAGGTACGA
gANN1_rev1	AAACTCGTACCTGTATGAGGTAAC
gANN1_fw2	ATTGGACGTTGCTCACCACACTAC
gANN1_rev2	AAACGTAGTGTGGTGAGCAACGTC
gANN4_fw1	ATTGGGTAAAGCTTTACGTGCACCG
gANN4_rev1	AAACCGGTGCACGTAAAGCTTACC
gANN4_fw2	ATTGGATGTGGGCAATGCATCCAT
gANN4_rev2	AAACATGGATGCATTGCCACATC

Následovalo jejich klonování do vstupních vektorů pomocí Golden Gate reakce, kde zároveň proběhla restrikce a ligace. Seznam použitých vstupních vektorů je uveden v Tab. 5. Složení reakční směsi a podmínky v termocykleru jsou popsány v Tab. 6 a 7.

Tab. 5: Seznam vstupních vektorů použitých při přípravě Multiplex CRISPR/Cas9 konstruktů pomocí Golden Gate klonování

<b>Název</b>	<b>Popis</b>	<b>Klonovací místo</b>	<b>Rezistence</b>
<i>pGG-A-AtU6-26-BbsI-CcdB-BbsI-B</i>	akceptorový vektor pro gRNA	A-B	Amp <sup>R</sup>
<i>pGG-B-AtU6-26-BbsI-CcdB-BbsI-C</i>	akceptorový vektor pro gRNA	B-C	Amp <sup>R</sup>
<i>pGG-C-AtU6-26-BbsI-CcdB-BbsI-D</i>	akceptorový vektor pro gRNA	C-D	Amp <sup>R</sup>
<i>pGG-D-AtU6-26-BbsI-CcdB-BbsI-E</i>	akceptorový vektor pro gRNA	D-E	Amp <sup>R</sup>

Vysvětlivky: *BbsI* – rozpoznávací místo restrikčního enzymu; Amp<sup>R</sup> – ampicilin; *AtU6-26* – *U6-26* promotor RNA polymerázy III z *A. thaliana*; *CcdB* – gen kódující cytotoxický protein CcdB.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro Golden Gate reakci vstupních vektorů

Chemikálie	Množství (celkem 15 $\mu$ l)
Dimerizované gRNA	1
Vstupní vektory 200 ng	1
10x CutSmart Buffer	1,5
10 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> ATP	4,5
T4 DNA ligasa	0,5
<i>BbsI</i>	0,5
MilliQ H <sub>2</sub> O	9

Tab. 7: Podmínky pro Golden Gate reakci vstupních vektorů

Teplota	Čas	Opakování
37 °C	3 min	30 x
16 °C	3 min	
50 °C	5 min	1 x
80 °C	5 min	1 x
16 °C	$\infty$	-

### 3.2.6.2 Transformace *Escherichia coli*

Pomocí tepelného šoku se 5  $\mu$ l reakční směsi transformovalo do 50  $\mu$ l buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ . Po přidání směsi do buněk se směs nechala inkubovat 30 min na ledě, následně proběhla transformace tepelným šokem 45 s při 45 °C a buňky byly ochlazeny 3 min na ledě. Poté se přidalo 300  $\mu$ l SOC média a směs se nechala inkubovat při 37 °C v horizontální poloze za stálého míchání 1,5 hod. Na pevné LB médium s přídavkem ampicilinu (50  $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup>) se rozetřelo 150  $\mu$ l kultury a do druhého dne se inkubovala při 37 °C.

### 3.2.6.3 Izolace plasmidové DNA

K izolaci plasmidové DNA byl použit Plasmid DNA mini kit. Byly odpíchnuty kolonie z tuhého média do tekutého LB média s ampicilinem (50  $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup>) a nechaly se inkubovat přes noc při 37°C za stálého míchání. Odebraly se 2 ml kultury, které se centrifugovaly 5 min, 10 000 g, supernatant byl odlit a k peletu bylo přidáno 250  $\mu$ l prvního roztoku izolačního kitu SI. Pro rozmíchání peletu byl použit vortex a bylo přidáno 250  $\mu$ l roztoku SII, směs se párkrát převrátila a nechala 2–3 min odstát. Poté bylo přidáno 350  $\mu$ l roztoku SIII, kdy po jemném převrácení vznikly ve směsi bílé sraženiny buněčných stěn bakterií. Směs se centrifugovala 15 min, 10 000 g. Supernatant byl přenesen do speciálních kolonek s filtrem zasazených v sběrných tubách a nechal se centrifugovat 1,5 min, 13 000 g. Roztok co protekl kolonkou byl odstraněn a do kolonky bylo přidáno 500  $\mu$ l

HBC pufru (s isopropanolem), byl centrifugován 1,5 min, 13 000 g. Přetečený roztok byl znovu odstraněn a do kolonky bylo přidáno 700  $\mu$ l DNA promývacího pufru (s ethanolem), byl centrifugován 1,5 min, 13 000 g. Filtrát byl odlit a kolonky se nechaly centrifugovat prázdné do prázdných sběrných tub, pro odstranění přebytečného ethanolu, 3 min, 13 000 g. Kolonky se přenesly do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek. Bylo do nich přidáno 15  $\mu$ l milliQ vody a nechalo se centrifugovat 1,5 min při 9000 g a tento krok se ještě jednou zopakoval.

#### **3.2.6.4 Ověření vstupních vektorů**

Vstupní vektory se ověřily pomocí restrikčního štěpení a sekvencování. Pro štěpení byl v připravené reakční směsi použit *PvuII* „fast digest“ restrikční enzym. Na finální množství 10  $\mu$ l bylo použito 6,8  $\mu$ l milliQ vody, 1  $\mu$ l pufru, 0,2  $\mu$ l *PvuII* a 2  $\mu$ l DNA. Nechalo se inkubovat v termocykleru 20 min a bylo ověřeno 1% agarosovou elektroforézou. Sekvencování bylo provedeno firmou SEQme. Vzorky izolované plasmidové DNA (pDNA) byly připraveny s 2,5  $\mu$ l vlastního primeru (oligo\_62: CGACGGCCAGGTAATACGACT; 10  $\mu$ mol $\cdot$ l<sup>-1</sup>) a milliQ vodou tak, aby byl celkový objem 10  $\mu$ l.

#### **3.2.6.5 Příprava destinačních vektorů pro jednoduché a dvojité mutanty**

Po ověření vstupních vektorů pomocí restrikčního štěpení a sekvencování, byly vstupní vektory s inzerty gRNA vloženy do destinačního vektoru spolu s jednotlivými vektory sloužícími jako linker pro daný destinační vektor viz Tab. 8. Vložení vstupních vektorů do destinačního vektoru pro jednoduché mutanty *ann1* a *ann4* bylo dosaženo pomocí Golden Gate reakce viz Tab. 9 za podmínek v Tab. 11 a vložení vstupních vektorů do destinačního vektoru pro dvojitého mutantu *ann1ann4* bylo dosaženo pomocí Golden Gate reakce viz Tab. 10 za podmínek v Tab. 11.



Tab. 8: Seznam destinačního vektoru a vektorů sloužících jako linker pro daný destinační vektor použitých při přípravě Multiplex CRISPR/Cas9 konstruktů pomocí Golden Gate klonování

Název	Popis	Klonovací místo	Rezistence
<i>pFASTR_UBQ10-Cas9-SV40-mRuby-NLS-A-ccdB-CmR-G</i>	destinační vektor s <i>UBQ10</i> promotorem a fluorescenční značkou mCherry	A-G	Spe <sup>R</sup> (OLE1-mRuby)
<i>pGG-C-LinkerII-G</i>	akceptorový vektor pro gRNA	C-G	Gen <sup>R</sup>
<i>pGG-E-LinkerII-G</i>	akceptorový vektor pro gRNA	E-G	Gen <sup>R</sup>

Vysvětlivky: *pFASTR – UBQ10* – promotor genu *Ubiquitin 10* z *A. thaliana*; (OLE1-mRuby) – selekce semen *A. thaliana* na základě červeného fluorescenčního barviva mRuby; Spe<sup>R</sup> – spetinomycin; *CcdB* – gen kódující cytotoxický protein CcdB; Gen<sup>R</sup> – gentamycin; NLS – jaderný lokalizační signál; SV40 – jaderný lokalizační signál z opičího virusu.

Tab. 9: Reakční směs pro Golden Gate reakci pro přípravu destinačních vektorů pro jednoduché mutanty *ann1* a *ann4*

Chemikálie	Množství (celkem 15 µl)
A-B vstupní vektor	1
B-C vstupní vektor	1
C-G linker	1
Destinační vektor	1
10 x CutSmart Buffer	1,5
10 mmol·l <sup>-1</sup> ATP	1,5
T4 DNA ligasa	0,5
<i>Bsal</i> -HF v2	0,5
MilliQ H <sub>2</sub> O	4

Tab. 10: Reakční směs pro Golden Gate reakci pro přípravu destinačního vektoru pro dvojitého mutantu *ann1ann4*

Chemikálie	Množství (celkem 15 µl)
A-B vstupní vektor	1
B-C vstupní vektor	1
C-D vstupní vektor	1
D-E vstupní vektor	1
E-G linker	1
Destinační vektor	1
10 x CutSmart Buffer	1,5
10 mmol·l <sup>-1</sup> ATP	1,5
T4 DNA ligasa	0,5
<i>Bsal</i> -HF v2	0,5
MilliQ H <sub>2</sub> O	4

Tab. 11: Podmínky Golden Gate reakce na termocykleru

Teplota	Čas	Opakování
37 °C	3 min	30 x
16 °C	3 min	
50 °C	5 min	1 x
80 °C	5 min	1 x
16 °C	∞	-

Takto připravené destinační vektory se transformovaly do 50 µl buněk *E. coli* DH5α za stejného postupu jako je popsáno výše, s výjimkou selekčního antibiotika v LB médiu. Zde byl použit spektinomycin.

Validace konstruktů byla provedena pomocí colony PCR. Část z vybrané kolonie byla za aseptických podmínek pomocí pipetové špičky odpíchnuta do 10 µl sterilní milliQ vody. Pro PCR byla použita reakční směs viz Tab. 12 a podmínky podle specifických primerů viz Tab. 13 a 14.

Tab. 12: Reakční směs pro colony PCR na ověření destinačních vektorů

Chemikálie	1 reakce (10 µl)
Phire Reaction Buffer 5x	2
10 mmol·l <sup>-1</sup> dNTPs	0,2
MilliQ H <sub>2</sub> O	6,7
Phire Hot Start II DNA polymerasa	0,2
t67-149-F' (finální koncentrace 0,5 µmol·l <sup>-1</sup> )	0,2
pOLE 5t-R (finální koncentrace 0,5 µmol·l <sup>-1</sup> )	0,2
Templátová DNA	0,5

Tab. 13: Podmínky na termocykleru pro colony PCR na ověření destinačních vektorů

Krok	Teplota	Čas	Opakování
Iniciační denaturace	98 °C	5 min	1 x
Denaturace	98 °C	5 s	
Nasedání primerů	61 °C	5 s	40 x
Elongace	72 °C	20 s	
Finální elongace	72 °C	1 s	1x
	4 °C	∞	-

Tab. 14: Specifické primery pro colony PCR na ověření destinačních vektorů

Název primeru	Sekvence
tG7_149_F	TGCTTGGACTATAATACCTGACTTGT
pOLE	AGTGTTGTTGTGGTTGTT

Zbytek kolonií byl odpíchnut do tekutého LB média, další den proběhla izolace plasmidové DNA a restriční štěpení pomocí *PvuII* pro ověření pDNA, jak je popsáno výše. Ze zbylé tekuté kultury byly připraveny glycerolové zásobní roztoky smícháním 600  $\mu\text{l}$  kultury a 600  $\mu\text{l}$  50% glycerolu za aseptických podmínek a zmrazeny na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.6.6 Transformace *Agrobacterium tumefaciens***

Ze vzorků izolované pDNA destinačních vektorů bylo přidáno 15  $\mu\text{l}$  do 200  $\mu\text{l}$  buněk *A. tumefaciens* GV3103, směs se opatrně promíchala a nechala se stát na ledě 35 min. Následně se dala na 5 min do tekutého dusíku, kdy proběhla transformace ledovým šokem. Směs se vytáhla na 15 min na pokojovou teplotu. Přidalo se 400  $\mu\text{l}$  SOC média a nechalo se inkubovat 2 hod při  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  v horizontální poloze za stálého míchání. Na tuhé LB médium se selekčními antibiotiky – rifampicin ( $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), spektinomycin ( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) bylo rozetřeno 200  $\mu\text{l}$  kultury a nechalo se ve tmě kultivovat 48 hod při  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Narostlé kolonie byly odpíchnuty do tekutého LB média se stejnými antibiotiky a kultivovány 24–48 hod v inkubátoru při  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  za stálého míchání. Z tohoto byly připraveny glycerolové zásobní roztoky pro uchování v mrazicím boxu na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.7 Tranzientní transformace *Nicotiana benthamiana***

Funkčnost destinačních vektorů byla zkontrolována pomocí tranzientní transformace epidermálních buněk listů *N. benthamiana*. Do 5 ml tekutého LB média s antibiotiky - rifampicin ( $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), spektinomycin ( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  z glycerolového zásobního roztoku *A. tumefaciens* a nechalo se kultivovat ve tmě přes noc při  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  za stálého míchání. Pomocí spektrofotometru byla změřena optická hustota přes noc narostlých kultur při vlnové délce 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) a odebráno takové množství aby  $\text{OD}_{600} = 0,7$ . Tento objem byl centrifugován při 3000 g po dobu 9 min, supernatant byl odlit a pelet resuspendován ve 2 ml kokultivačního média. Následně se bakteriální suspenze inkubovala 2 hod ve tmě, při pokojové teplotě. Pomocí injekční stříkačky byla suspenze infiltrována do spodní strany listu *N. benthamiana*. Rostliny byly přikryty a kultivovány 2 až 3 dny v kultivační místnosti s konstantními hodnotami teploty, osvětlení, fotoperiody a vlhkosti ( $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16/8, 70 %). Preparát z infiltrované plochy listu byl pozorován pomocí konfokálního mikroskopu LSM 710 (Axio Imager 2). Získaný obrazový materiál byl zpracovaný pomocí programu ZEN Black a ZEN Blue.

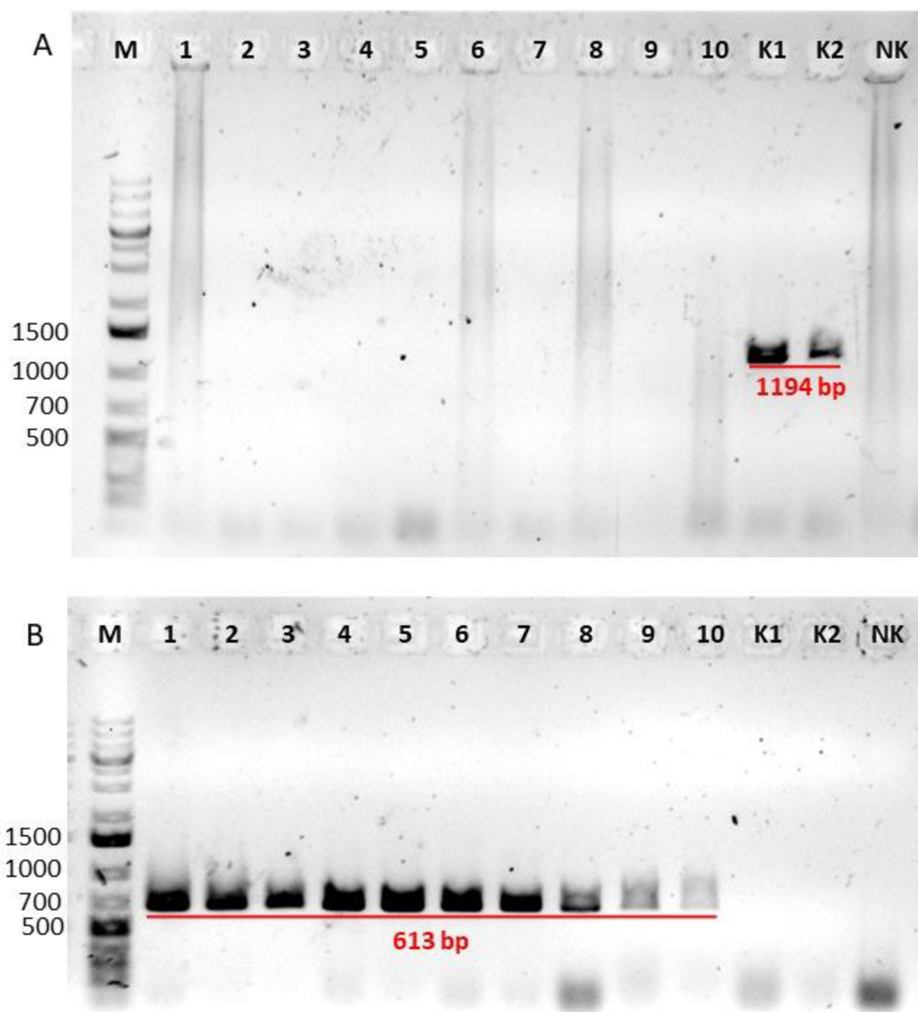
## 4 VÝSLEDKY

Experimentální výsledky dosaženy v průběhu bakalářské práce jsou prezentovány v následující kapitole. Výsledky sestávají ze dvou oddělených částí. První část je zaměřena na fenotypovou analýzu *ann4* mutantů a druhá část je zaměřena na přípravu konstruktů pro Multiplex CRISPR/Cas9 mutagenezi annexinů 1 a 4.

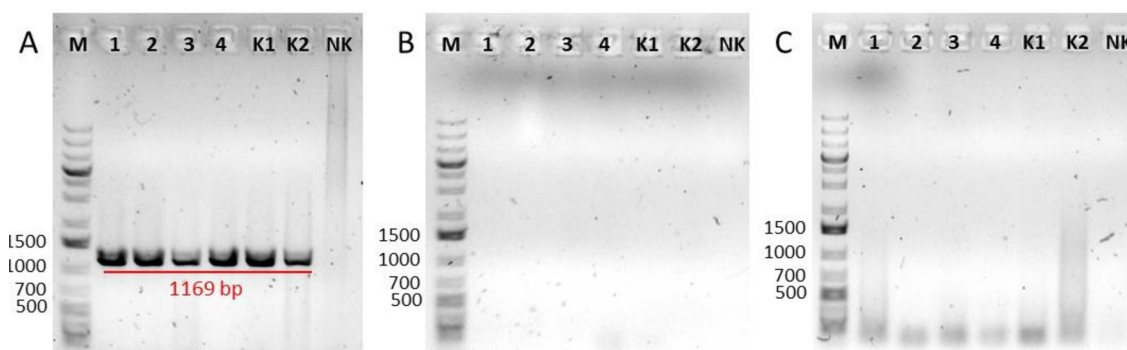
### 4.1 PCR genotypování

Jako první byla provedena genotypová analýza pro vyselektování homozygotních SALK T-DNA knock-out mutantních rostlin *A. thaliana ann4* (*ann4-1*, SALK\_019725C; *ann4-2*, SALK\_073121). U homozygotních rostlin byly detekovány pouze alely s T-DNA inzercí a u heterozygotních jak alela s T-DNA inzercí, tak alela divokého typu. Teoretické velikosti PCR produktů 1194 bp pro alelu divokého typu (kombinace LP+RP; Obr. 5A) a 613 bp pro mutantní alelu *ann4-1* (kombinace LB+RP; Obr. 5B), odpovídají vzniklým produktům za použití specifických kombinací primerů (Obr. 5).

U mutantů *ann4-2* vznikly pouze 1169 bp velké produkty specifické pro alelu divokého typu (kombinace LP+RP; Obr. 6A). Amplifikovaný úsek mutantní alely s inzercí v opačném směru měl mít velikost 561 bp (kombinace LB+RP; Obr. 6B), případně s použitím primerů pro inzerci ve stejném směru 978 bp (kombinace LB+LP; Obr. 6C), avšak ani v jedné ze zkoumaných rostlin nebyly pozorovány (Obr. 6).



Obrázek 5. Výsledný gel agarosové elektroforézy rostlin 1 – 10 mutantní linie *ann4-1*. (A) LP+RP kombinace primerů pro divokou alelu o velikosti 1194 bp; (B) LB+RP kombinace primerů pro alelu s T-DNA inzercí o velikosti 613bp. M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1kb plus; K1, K2 – rostliny divokého typu Col-0; NK-negativní kontrola.



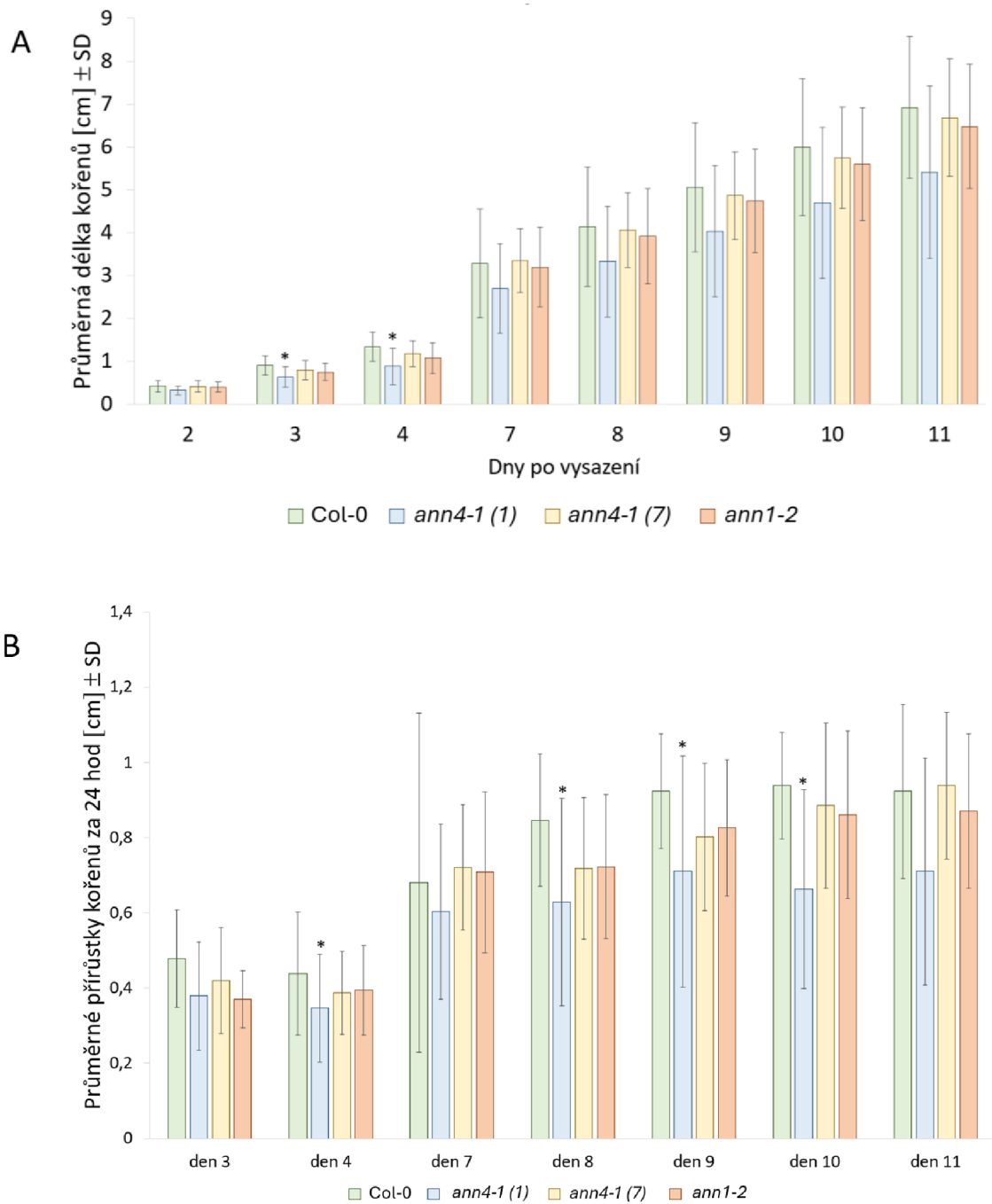
Obrázek 6. Výsledné gely agarosové elektroforézy rostlin 1 – 4 mutantní linie *ann4-2*. (A) LP+RP kombinace primerů pro divokou alelu o velikosti 1169 bp; (B) LB+RP kombinace pro alelu s T-DNA inzercí o velikosti 561 bp; (C) LB+RP kombinace pro alelu s T-DNA inzercí o velikosti 978 bp; M - marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1kb plus; K1,K2 – rostliny divokého typu Col-0; NK - negativní kontrola.

Pomocí PCR genotypování bylo potvrzeno a vyselektováno 17 homozygotních rostlin *ann4-1*. Byly vysazeny do půdního substrátu a použity pro získání další generace semen na fenotypovou analýzu, linie *ann4-2* se dále nevyužívaly.

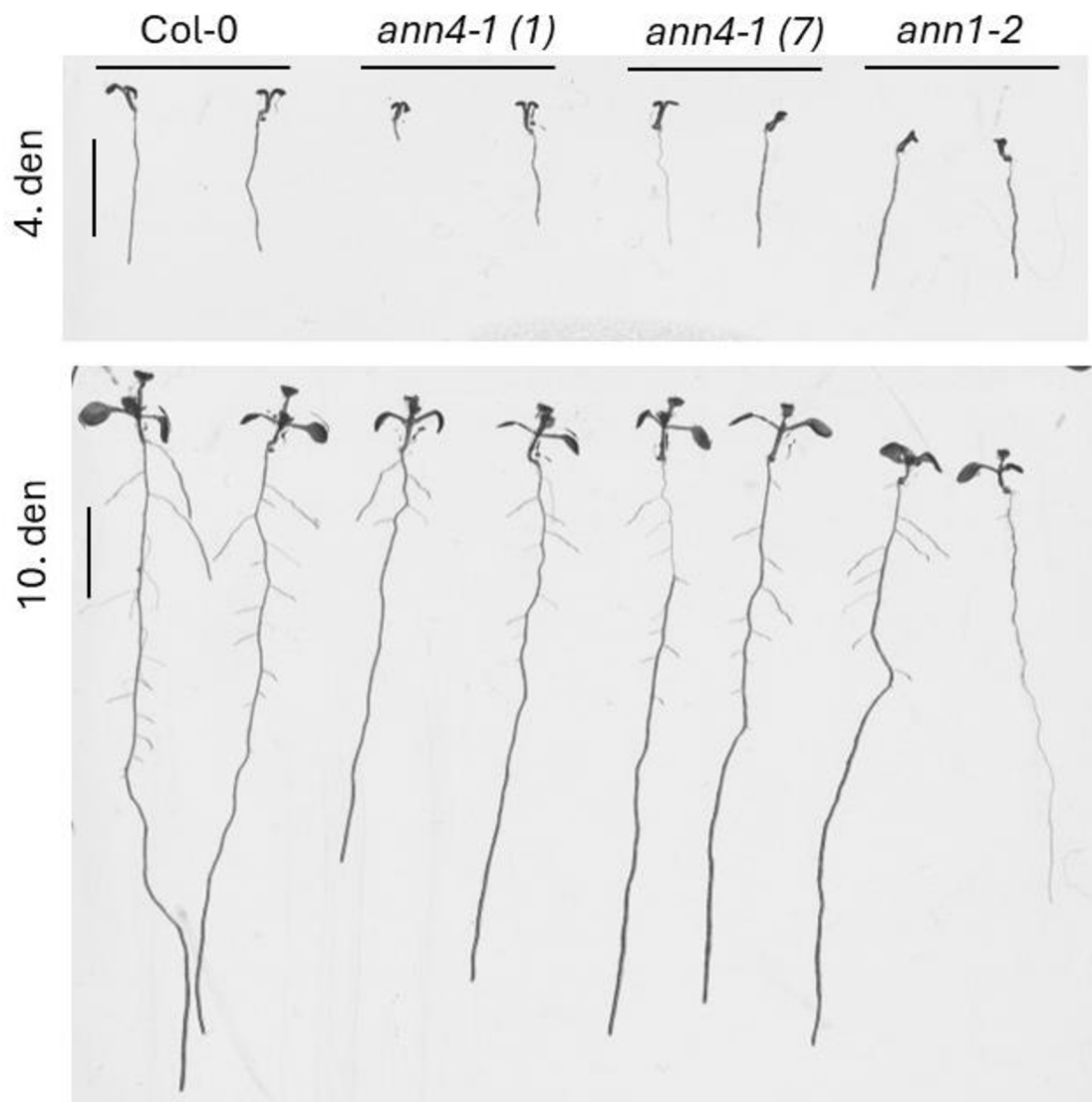
#### **4.2 Fenotypová charakterizace mutantní linie annexinu 4 (*ann4-1*)**

Jelikož se ANNAT4 vyskytuje v celé rostlině, k prozkoumání vlivu tohoto annexinu na fenotyp *A. thaliana* byly pozorovány primární kořeny, přírůstky kořenů, počet vedlejších kořenů, hypokotyly, listová růžice a velikost průduchů na rostlinách *ann4-1* pěstovaných v *in vitro* podmínkách na ½ MS médiu. U mutantních rostlin *ann1-2* byl za určitých podmínek pozorován vliv na kořenový fenotyp, a proto měla tato linie sloužit k porovnávání vlivů jednotlivých annexinů. Pro účely fenotypové charakterizace byly použity rostliny divokého typu Col-0, mutantní linie *ann1-2* a rostliny ověřených homozygotních rostlin *ann4-1* č. 1 [*ann4-1 (1)*] a č. 7 [*ann4-1 (7)*].

Semena linií Col-0, *ann1-2* a *ann4-1* byla vysazena na ½ MS medium bez vitaminů. Délka primárních kořenů byla měřena a porovnávána s divokým typem Col-0 v průběhu prvních 11 dnů po vysazení (Obr. 7 a 8) ve třech biologických replikách. Růst primárních kořenů ukázal, že po 11. dni od vyklíčení dosahovaly rostliny divokého typu Col-0 průměrnou délku 6,9 cm, kořeny rostlin *ann4-1 (1)* průměrně 5,4 cm, *ann4-1 (7)* 6,7 cm a kořeny *ann1-2* průměrně dorůstaly 6,5 cm. Linie nevykazovaly výrazné rozdíly, avšak po statistickém vyhodnocení jedné z analýz pomocí Studentova t-testu vyplynul mezi Col-0 a *ann4-1 (1)* statisticky významně kratší kořenový fenotyp ve 3. a 4. dnu (Obr. 7A, Obr. 8), kdy průměrná délka kořenů ve 4. dnu od vyklíčení byla 1,3 cm u divokého typu Col-0, u *ann4-1 (1)* 0,9 cm. Stejně tak kořeny rostliny *ann4-1 (1)* ukázaly statisticky nejnižší přírůstek kořenů za 24 hod (Obr. 7B). Rostliny vysazené na ½ MS médiu byly podrobeny dalším fenotypovým analýzám, avšak se významně nelišily počtem bočních kořenů (Obr. 9A) a vývinem listové růžice, kdy se vážila její čerstvá hmotnost (Obr. 9B). Rostliny neukázaly statisticky významný rozdíl v délce hypokotylů (Obr. 9C) ani rozdíl v klíčení semen (Obr. 9D).

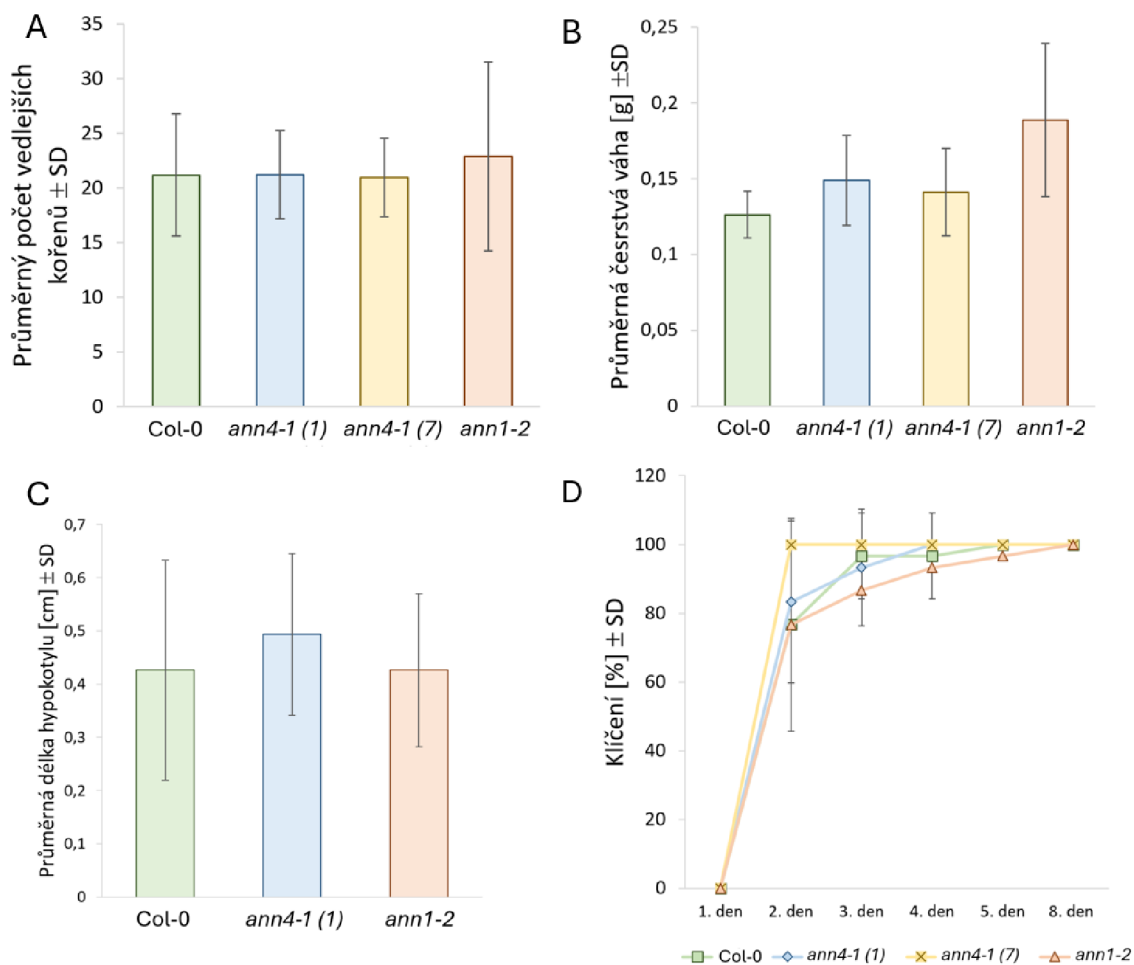


Obrázek 7. Fenotypová analýza primárních kořenů rostlin *A. thaliana* Col-0, *ann4-1 (1)*, *ann4-1 (7)*, *ann1-2* v průběhu 11 dnů po vysazení na ½ MS médium. (A) Porovnání délek primárních kořenů; (B) porovnávání přírůstků primárního kořene za 24 hod. Hvězdičky značí statisticky významný rozdíl mezi kontrolními rostlinami Col-0 a *ann4-1 (1)*.



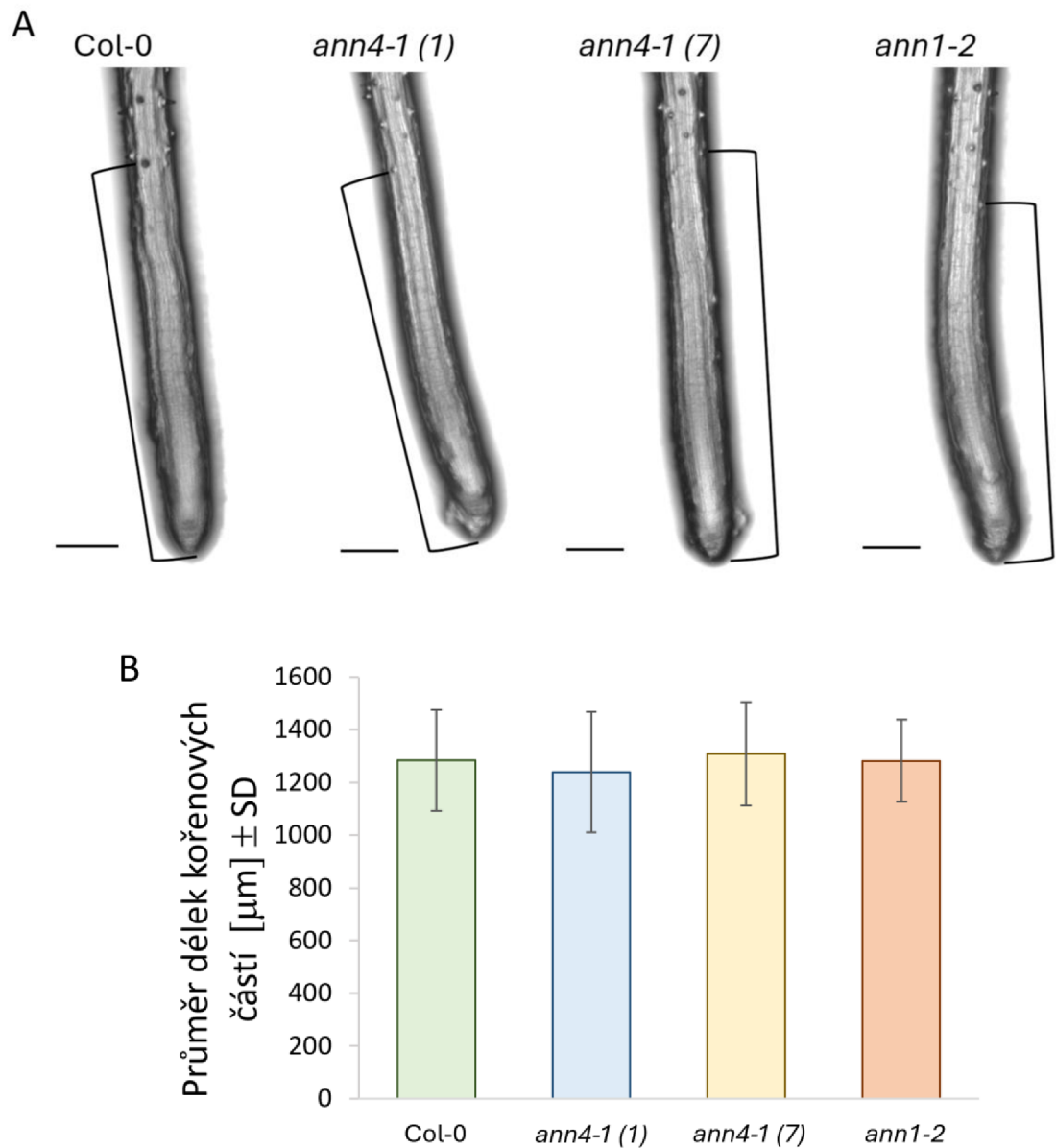
Obrázek 8. Reprezentativní fenotypy kořenů 4. a 10. den po vysazení rostlin *A. thaliana* Col-0, *ann4-1* (1), *ann4-1* (7), *ann1-2* na ½ MS médium. Měřitko 1 cm.





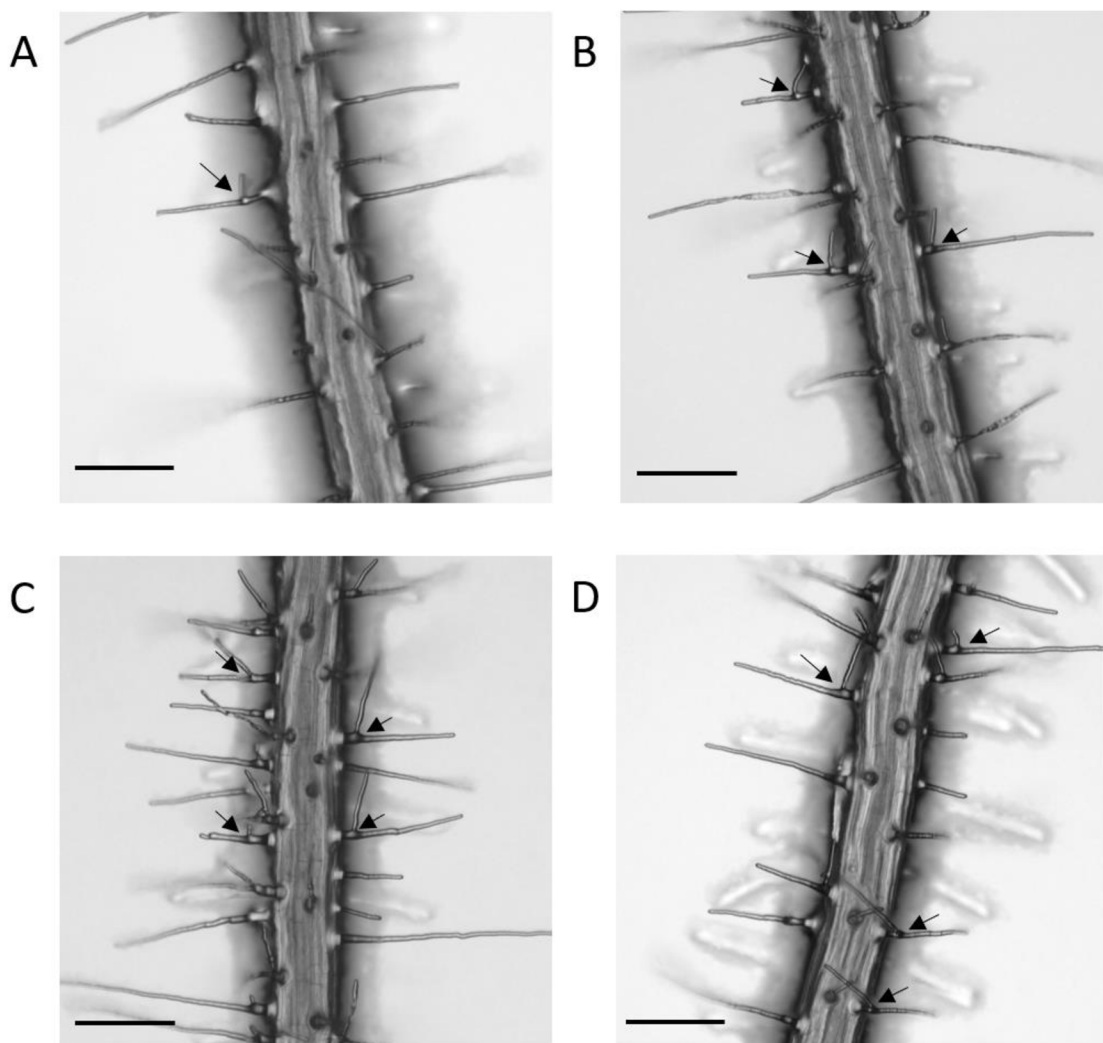
Obrázek 9. Fenotypová analýza rostlin *A. thaliana* Col-0, *ann4-1 (1)*, *ann4-1 (7)*, *ann1-2* na ½ MS médiu: (A) porovnání čerstvých vah 28-dní starých rostlin; (B) porovnávání počtu vedlejších kořenů 11. den; (C) délka hypokotylů 12-dní starých rostlin; (D) porovnání průběhu klíčení.

Primární kořeny byly dále pozorovány pod ZOOM mikroskopem, kde byla zdokumentována vzdálenost mezi kořenovou špičkou a náběhu na první kořenový vlásek (Obr. 10A) a následně změřena tato vzdálenost (Obr. 10B). Průměrná vzdálenost u Col-0 byla 1283,5  $\mu\text{m}$ , u *ann4-1 (1)* byla 1239,2  $\mu\text{m}$ , u *ann4-1 (7)* 1308,4  $\mu\text{m}$  a u *ann1-2* průměrně měřila 1281,9  $\mu\text{m}$ . Mezi jednotlivými pozorovanými liniemi nebyla statisticky významná změna (Obr. 10B).



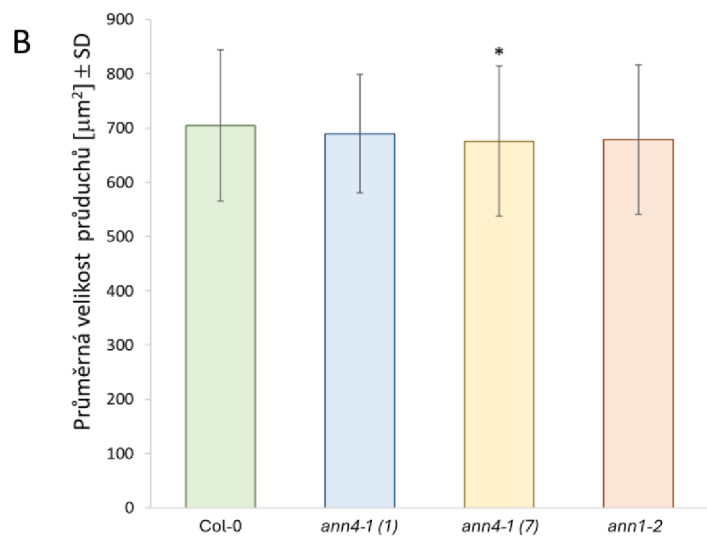
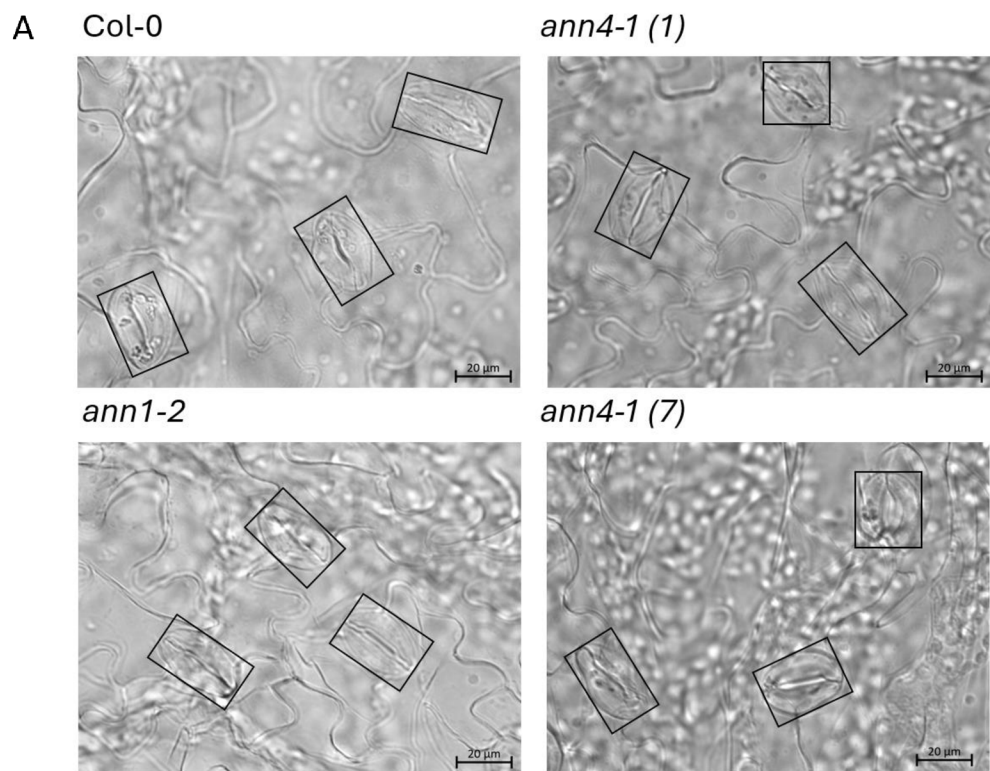
Obrázek 10. Kořenové fenotypy 7-denních rostlin Col-0, *ann4-1* (1), *ann4-1* (7) a *ann1-2* na ½ MS médiu. (A) Repräsentativní snímky jednotlivých linií; (B) graf průměrné délky kořenové špičky k náběhu na první kořenový vlásek. Měřítko 200 μm.

Dále byl pozorován ektopický růst kořenových vlásků (Obr. 11), avšak byly v menším zastoupení nacházeny i na rostlinách divokého typu Col-0 (Obr. 11A, černá šipka) než u rostlin linií *ann4-1* (1) (Obr. 11B, černé šipky), *ann4-1* (7) (Obr. 11C, černé šipky) a *ann1-2* (Obr. 11D, černé šipky). Pro potvrzení specifického fenotypového znaku kořenových vlásků by bylo nutné využít jiné médium než ½ MS médium.



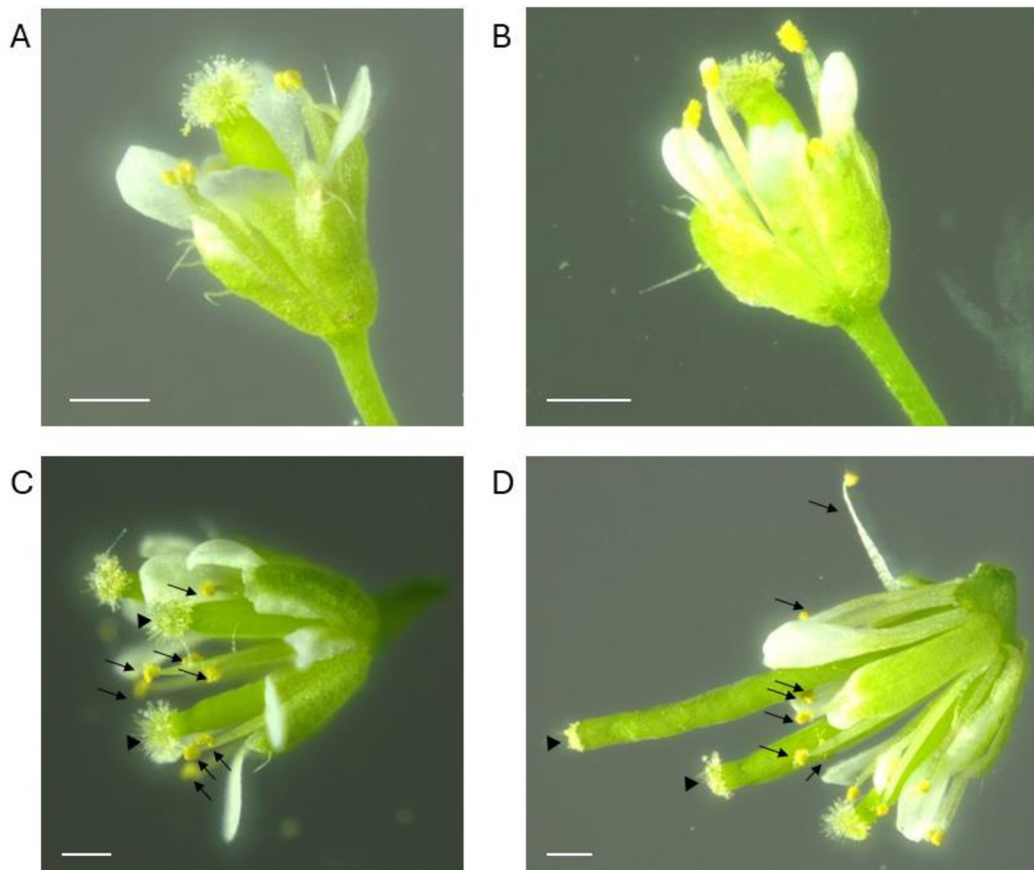
Obrázek 11. Fenotyp kořenových vlásků na 7-dní starých rostlinách (A) *A. thaliana* Col-0, (B) *ann4-1* (1), (C) *ann4-1* (7), (D) *ann1-2*. Černé šipky ukazují na ektopický růst kořenových vlásků. Měřítko 200  $\mu\text{m}$ .

Následně byla vyhodnocována velikost průduchů pomocí epifluorescenčního mikroskopu. Semena použitých linií Col-0, *ann4-1* (1), *ann4-1* (7) a *ann1-2* byla vysazena na  $\frac{1}{2}$  MS médium bez vitaminů. Po 28 dnech byl odebrán 3. pravý list z listové růžice. Listy byly zbaveny chlorofylu pomocí odbarvovacího roztoku, průduchy byly zdokumentovány (Obr. 12A) a vyhodnoceny přímo v ZEN Blue software (Obr. 12B). Po vyhodnocení měření se ukázalo, že u jednotlivých linií je velikost průduchů podobná u všech použitých linií (Obr. 12B). Průduchy *ann4-1* (7) vyšly po zpracování výsledků Studentovým t-testem statisticky menší oproti divokému typu Col-0. Průduchy *ann4-1* (1) i *ann1-2* měly menší plochu než Col-0, ale bez statistické významnosti (Obr 12B). Průměrná velikost průduchů 3. pravého listu u Col-0 byla přibližně 704,8  $\mu\text{m}^2$ , u *ann4-1* (1) 689,7  $\mu\text{m}^2$ , u *ann4-1* (7) 675,8  $\mu\text{m}^2$  a u *ann1-2* 678,9  $\mu\text{m}^2$ .



Obrázek 12. Průduchy na spodní straně 3. pravých listů 28-dní starých rostlinách *A. thaliana* Col-0, *ann4-1 (1)*, *ann4-1 (7)*, *ann1-2*.; (A) Reprezentativní snímky průduchů, černé obdélníky vyznačují porovnávaný obsah; (B) graf průměrné velikosti průduchů u jednotlivých rostlinných linií. Hvězdička vyznačuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolními rostlinami Col-0 a *ann4-1 (7)*. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

Na tři měsíce starých *ex vitro* rostlinách *ann4-1 (1)* bylo zpozorováno několik květů obsahující dvojnásobný počet tyčinek (Obr. 13C,D; černé šipky) a dva pestíky (Obr. 13C,D; černé trojúhelníky) oproti většině květů *ann4-1* a Col-0 (Obr. 13A,B).

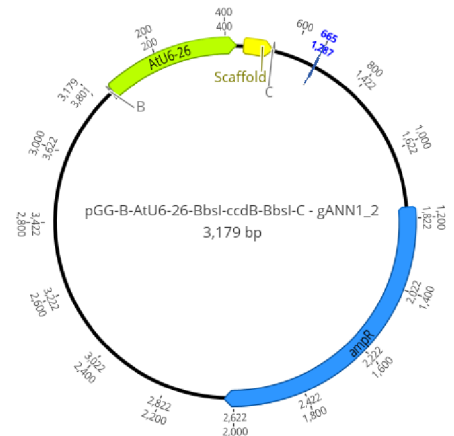
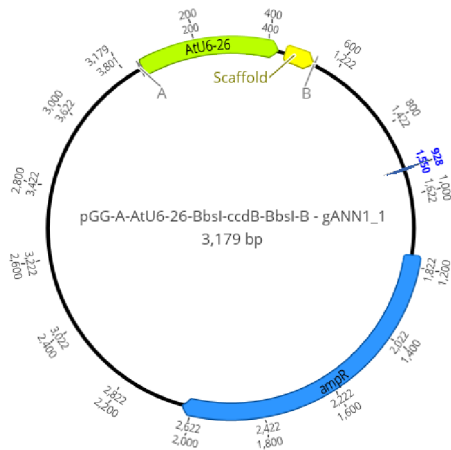


Obrázek 13. Fenotyp květů 3-měsíce starých rostlin *A. thaliana* Col-0 (A,B) a *ann4-1 (1)* (C,D) obsahující dvě sady tyčinek (černé šípky) a dva pestíky (černé trojúhelníky). Měřítko 500  $\mu\text{m}$ .

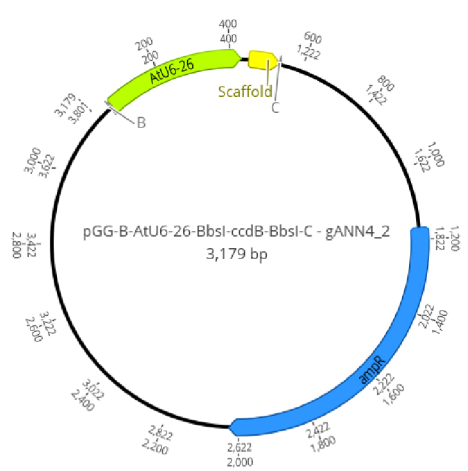
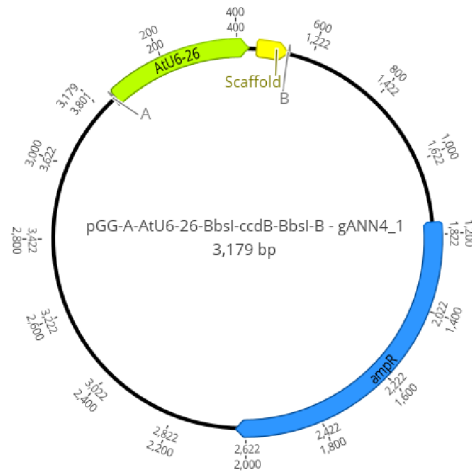
### 4.3 Příprava konstruktů Multiplex CRISPR/Cas9

Dalším cílem bakalářské práce bylo připravit Multiplex CRISPR/Cas9 vektory pro mutagenezi genů *ANNAT1* a *ANNAT4*. Pro budoucí experimenty byly vytvořeny konstrukty na tvorbu nových linií jednotlivých knock-out mutantů *ANNAT1* (*ann1*) a *ANNAT4* (*ann4*) a dvojitého mutantu *ANNAT1* a *ANNAT4* (*ann1ann4*). Vstupní vektory se specifickými restrikčními místy pro vložení naváděcí RNA (gRNA) byly již předpřipraveny. Byly navrženy dvě sady gRNA pro vytvoření komplementárních sekvencí ke genům, které byly editované (*ANNAT1* a *ANNAT4*). Pomocí Golden Gate reakce byly vytvořeny dva vstupní vektory (A-B a B-C) pro daný gen (*ANNAT1* a *ANNAT4*) každý se dvěma gRNA (Obr. 14). Pro *ANNAT4* pak byla vytvořena ještě další sada vstupních vektorů (C-D a D-E) pro tvorbu dvojitého mutantu. Připravené vstupní konstrukty byly transformované do bakteriálních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ .

A



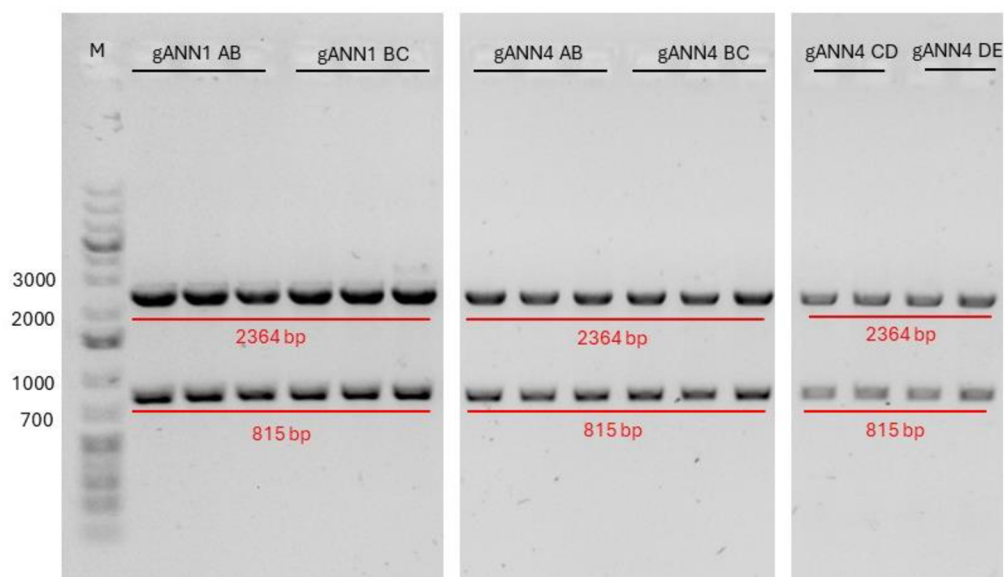
B



Obrázek 14. Mapy vstupních vektorů se dvěma gRNA pro *ANNAT1* (A) a pro *ANNAT4* (B) geny. Připraveno pomocí Geneious Prime programu.

Pro ověření vstupních vektorů bylo provedeno restriční štěpení pomocí *PvuII* (Obr. 15) a sekvencování (Obr. 16). Restriční endonukleasa *PvuII* způsobuje štěpení na dvou místech s předpokládanými produkty o velikostech 2364 bp a 815 bp (Obr. 15). Výsledky sekvenace plasmidové DNA (pDNA) potvrzují přítomnost zaklonované inzerce navádějící gRNA (shodná se sekvencí primerů; Obr. 16).





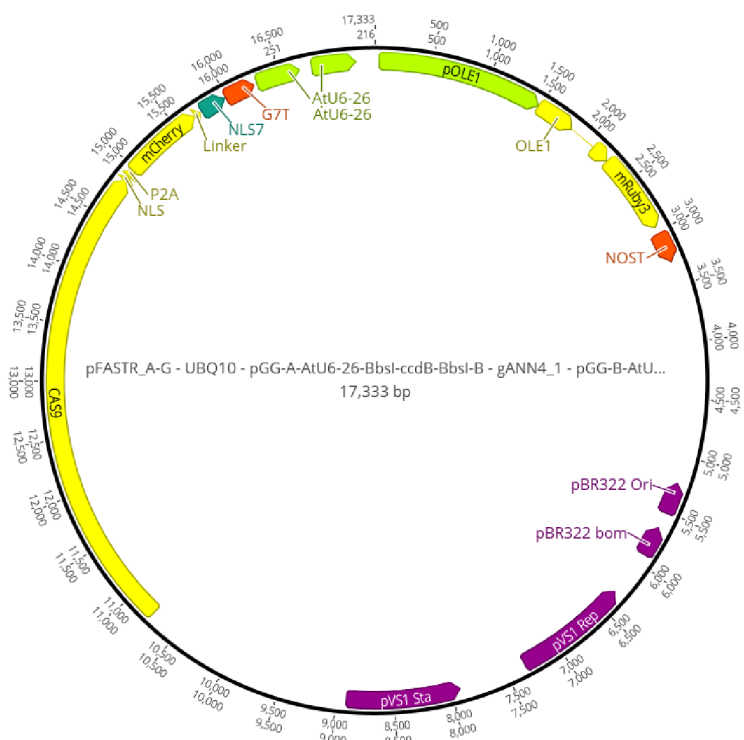
Obrázek 15. Elektroforetogram restrikčního štěpení pomocí *PvuII* vstupních vektorů obsahující gRNA pro mutagenézi genů *ANNAT1* a *ANNAT4*: gANN1AB, gANN1BC, gANN4AB, gANN4BC, gANN4CD, gANN4DE; M - marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb plus.



Obrázek 16. Reprezentativní úsek sekvenace firmou SEQme vstupních vektorů s naváděcími sekvencemi pro (A) gANN1\_AB; (B) gANN4\_AB, pomocí specifického primeru oligo62. Vytvořené v programu Geneious Prime.

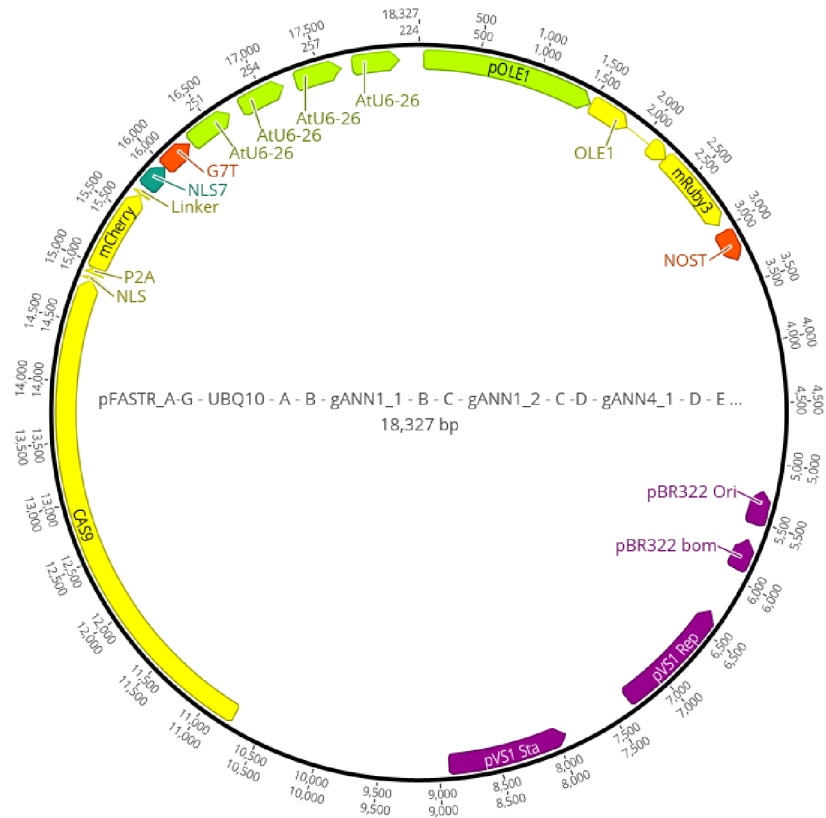
Po ověření vstupních vektorů byly konstrukty vklonovány do destinačního vektoru (Obr. 17, 18) pomocí Golden Gate reakce pro vytvoření vektorů pro jednotlivé mutanty *ann1* a *ann4* (Obr. 17) a pro vytvoření vektoru pro dvojitého mutantu *ann1ann4* (Obr. 18). Destinační vektory byly transformovány do bakteriálních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Destinační vektory s inzerty gRNA pro *ANNAT1* a *ANNAT4* geny obsahují opakující se sekvence a nebylo doporučeno je sekvenovat, proto byly destinační vektory ověřeny pomocí colony PCR s primery tG7\_149\_F, pOLE. Pro destinační vektory s 2 gRNA (pro jednotlivé mutanty *ann1* a *ann4*) byla velikost produktu 1343 bp a pro destinační vektory se 4 gRNA (pro dvojitého mutantu *ann1ann4*) 2270 bp (Obr. 19). Z ověřených kolonií s cílovým inzertem byly po kultivaci v tekutém LB médiu vytvořeny glycerolové zásobní roztoky. V dalším kroku se destinační vektory ověřily i pomocí restriční štěpení *PvuII*. Pro vektory s 2 gRNA restriční endonukleasa štěpila na 4 místech za vzniku úseků 13 269 bp, 2895 bp, 647 bp, 520 bp (Obr. 20), pro vektory se 4 gRNA štěpila také na 4 místech, ale za vzniku 13 269 bp, 3889 bp, 647 bp a 522 bp velkých úseků (Obr. 20). Jako kontrola byl použit prázdný destinační vektor, kde *PvuII* štěpila na 5 místech za vzniku 5 úseků 13 269 bp, 1868 bp, 1420 bp, 647 bp a 520 bp (Obr. 20).

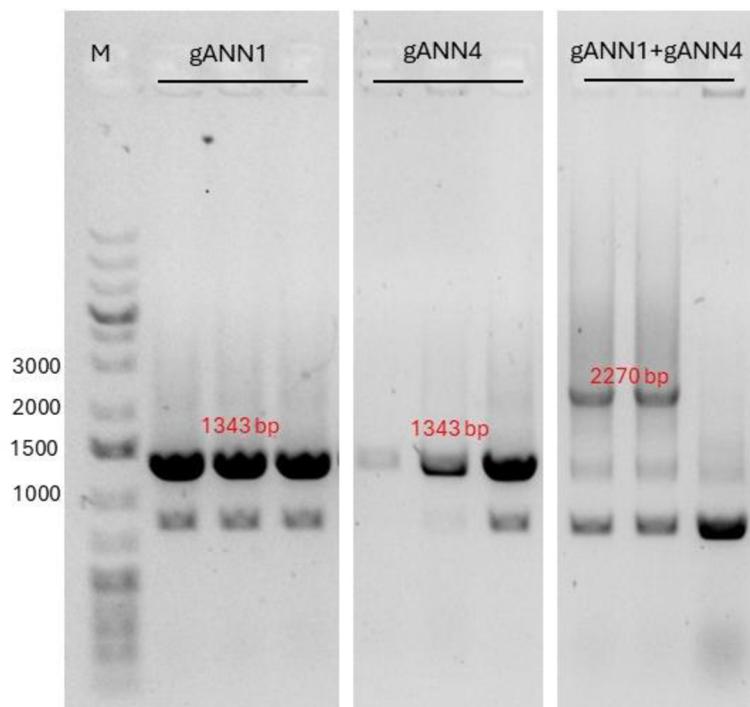


Obrázek 17. Mapa destinačního vektoru obsahující gRNA pro mutování *ANNAT4* genu. Vytvořeno pomocí programu Geneious Prime.

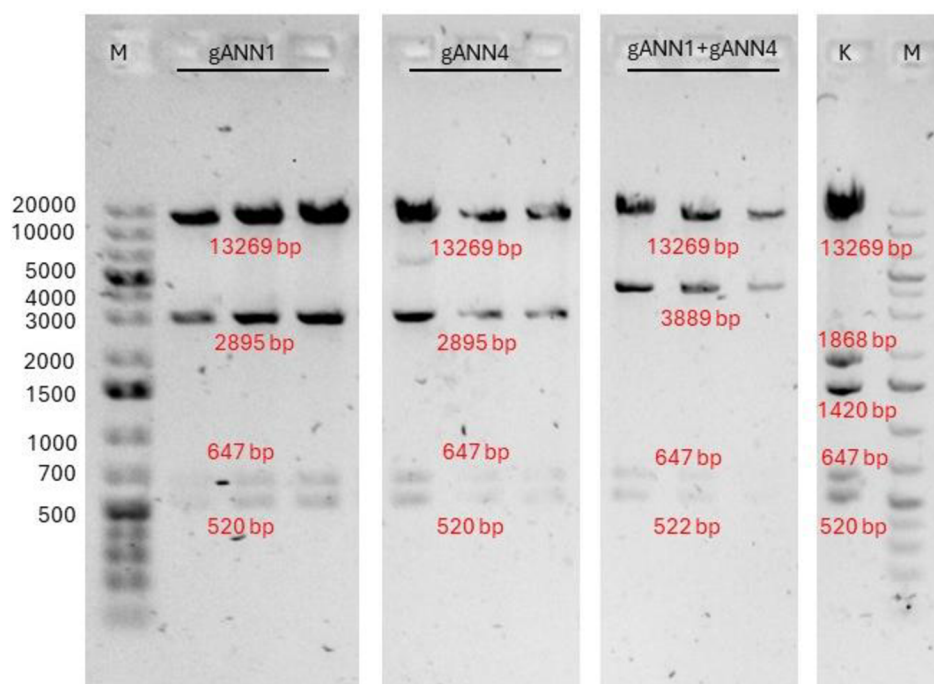




Obrázek 18. Mapa destinačního vektoru obsahující gRNA pro mutování *ANNAT1* a *ANNAT4* genů. Vytvořeno pomocí programu Geneious Prime.



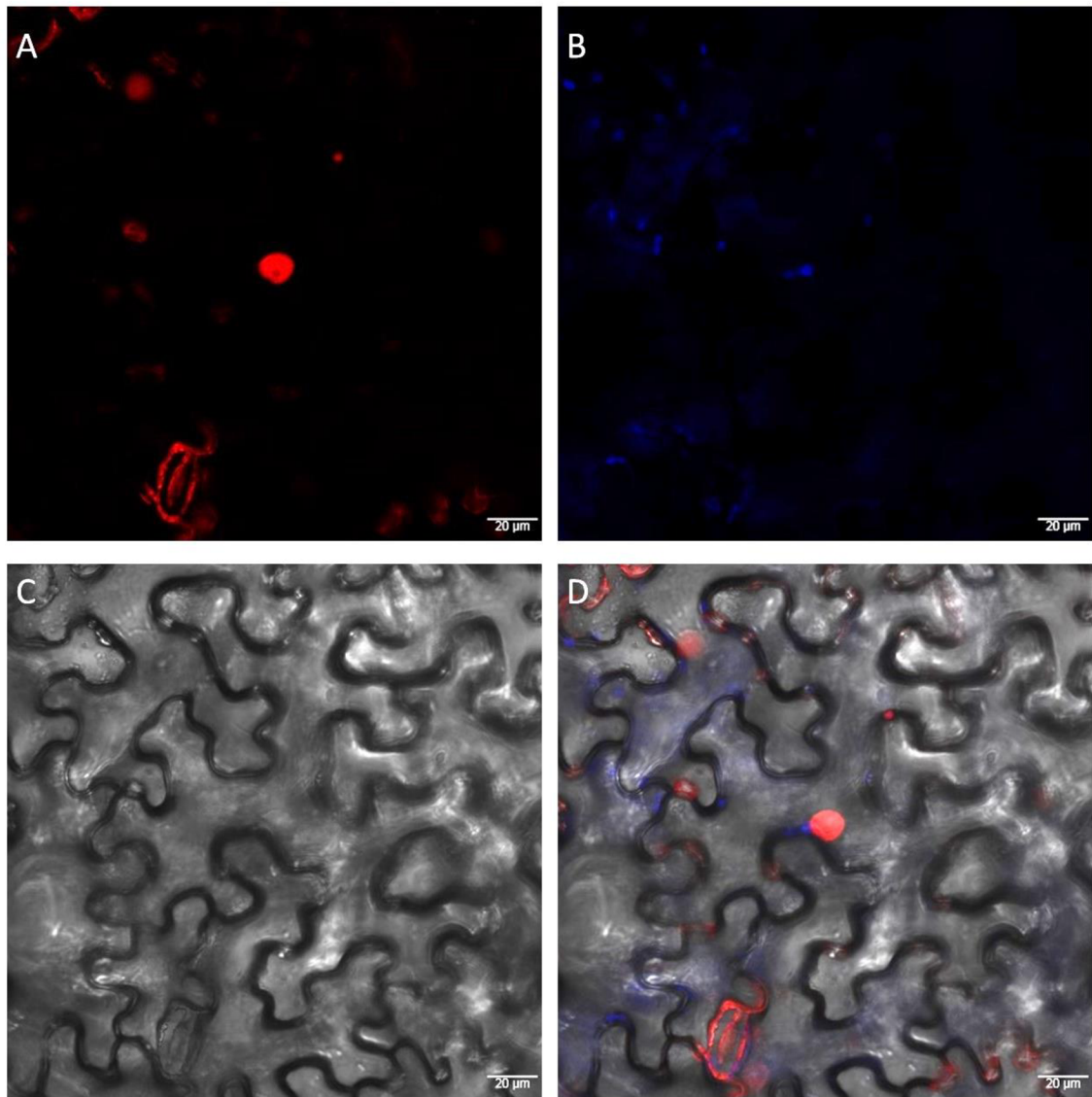
Obrázek 19. Elektroforetogram agarosové elektroforézy po colony PCR, použité primery tG7\_149\_F a pOLE, s velikostí PCR produktu pro gANN4 1343 bp a pro vektory s gANN1 a gANN4 2270 bp, M - marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1kb plus.



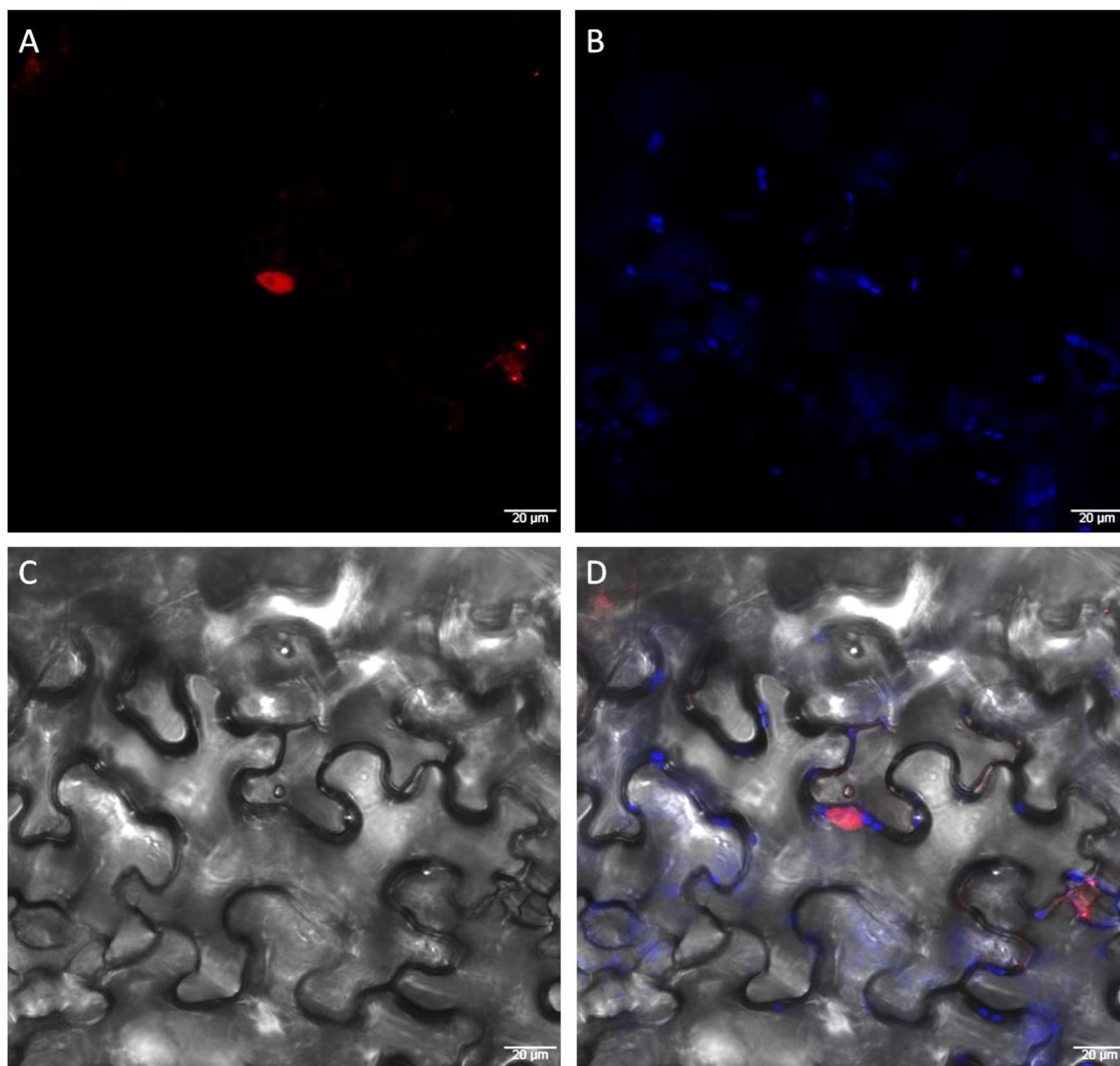
Obrázek 20. Elektroforetogram restrikčního štěpení pomocí *PvuII* destinačních vektorů obsahující gRNA pro mutagenizi genů *ANNAT1* a *ANNAT4*: gANN1 – 2 gRNA pro tvorbu *ann1*; gANN4 – 2 gRNA pro tvorbu *ann4*, gANN1+4 – 4 gRNA pro tvorbu *ann1ann4*; K - prázdný destinační vektor použitý jako kontrola; M - marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb plus.

#### 4.4 Validace destinačních vektorů pomocí tranzientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*

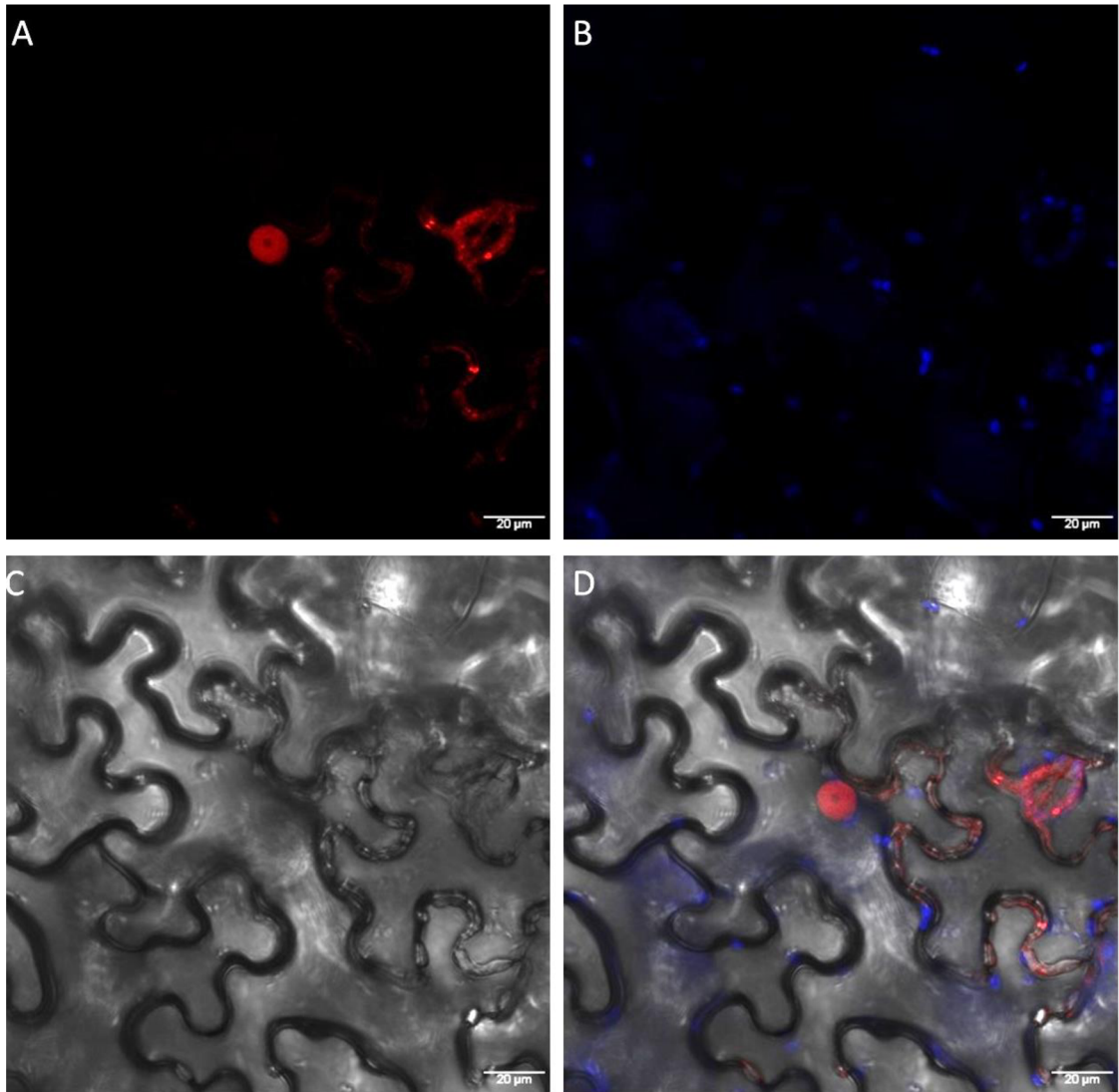
K ověření funkčnosti konstruktů byla provedena tranzientní transformace epidermálních buněk listů *N. benthamiana* prostřednictvím agroinfiltrace. Z infiltrovaných listů pak byly připraveny preparáty, které byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem AxioObserver LSM 880 (Carl ZEISS). Pomocí červeného kanálu bylo možné v epidermálních buňkách pozorovat specificky červený signál mCherry v jádrech, ale ne v jadérku (Obr. 21A,D, 22A,D a 23A,D). Kanálu pro autofluorescenci chlorofylu byla následně v programu přiřazena modrá barva (Obr. 21B, Obr. 22B, Obr. 23B). Listy infiltrované kokultivačním médiem bez bakteriálních kultur byly použity jako negativní kontrola (Obr. 24).



Obrázek 21. Tranzientní transformace epidermálních buněk listů *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* obsahujícím destinační vektor pro mutagenezi *ANNATI* genu. (A) červený kanál pro mCherry; (B) modrý kanál pro chlorofyl; (C) procházející světlo; (D) spojené obrázky. Měřítko 20  $\mu\text{m}$ .

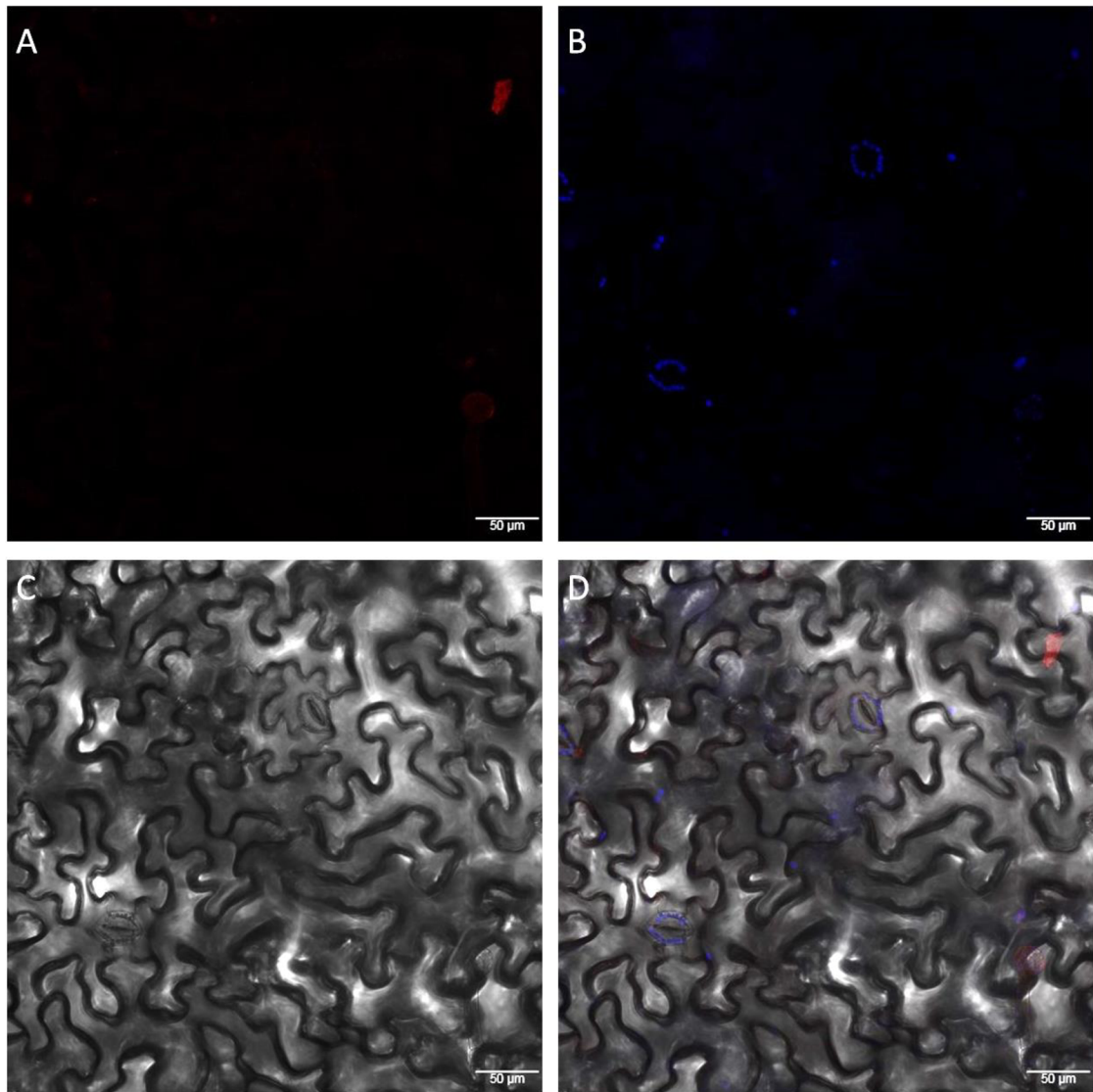


Obrázek 22. Tranzientní transformace epidermálních buněk listů *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* obsahujícím destinační vektor pro mutagenezi *ANNAT4* genu. (A) červený kanál pro mCherry; (B) modrý kanál pro chlorofyl; (C) procházející světlo; (D) spojené obrázky. Měřítko 20 µm.



Obrázek 23. Tranzientní transformace epidermálních buněk listů *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* obsahujícím destinační vektor pro mutagenezi *ANNAT1* a *ANNAT4* genu. (A) červený kanál pro mCherry; (B) modrý kanál pro chlorofyl; (C) procházející světlo; (D) spojené obrázky. Měřítko 20 µm.





Obrázek 24. Kontrola tranzientní transformace epidermálních buněk listů *N. benthamiana* pomocí čistého kokultivačního média; (A) červený kanál pro mCherry; (B) modrý kanál pro chlorofyl; (C) procházející světlo; (D) spojené obrázky. Měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

## 5 DISKUSE

Annexiny jsou rodina proteinů schopná se vázat na negativně nabitě fosfolipidy membrán v závislosti na  $\text{Ca}^{2+}$ . Jsou lokalizované hlavně v cytosolu a po zvýšení cytosolické koncentrace vápníků dochází k jejich přemístění k membránám (Laohavisit & Davies, 2011). Annexin 1 a 4 jsou proteiny nacházející se v různých koncentracích ve všech pletivech *A. thaliana*, účastní se různých metabolismů a odpovědí na stres (Huh et al., 2010). ANNAT1 se v největším množství nachází v kořenech a dalších polárně rostoucích částech rostliny. Je známo, že má vliv na kořenový fenotyp a knock-out mutantní rostliny *ann1* by se tak měly odlišovat od kontrolních (Clark et al., 2005a).

Knock-out mutantní rostliny *ann4* jsou při klíčení hypersenzitivní k osmotickému stresu a ABA (Lee et al., 2004). V pozdějším vývoji jsou tyto rostliny více tolerantní k stresu ze sucha a soli (Huh et al., 2010). ANNAT1 je nejvíce zastoupen v kořenech. Společně s ANNAT4 tyto dva proteiny sdílejí řadu funkcí a jsou schopny spolu interagovat (Huh et al., 2010). Z těchto důvodů byla analýza z velké části zaměřena na sledování kořenového fenotypu *A. thaliana* v ideálních *in vitro* podmínkách na ½ MS médiu.

ANNAT4 se v závislosti na kultivačních podmínkách nejvíce vyskytuje v kořenech, nebo ve květech a stoncích (Huh et al., 2010). U rostlin však nebyl experimentálně prokázán vliv tohoto proteinu na fenotyp, za jiných než stresových podmínek, což odpovídá výsledkům z fenotypové charakterizace *ann4-1* mutantů použitých v této bakalářské práci. Ze třech biologických replikátů nezískal žádný statisticky významný opakující se fenotypový znak, i přes předpokládaný rozdíl mezi divokou linií Col-0 a linií *ann1-2*. Nebyly pozorovány opakované výrazné změny v klíčení, mezi délkou primárních kořenů, přírůstu kořene za 24 hodin, počtu laterálních kořenů, délkou mezi kořenovou špičkou a náběhem na první kořenový vlásek, délkou hypokotylů ani ve vývinu listové růžice potvrzované čerstvou vahou nadzemních částí rostlin. Byly pozorované ektopické kořenové vlásky u mutantních linií *ann1-2* a *ann4-1*, avšak tyto změny v kořenových vláscích se nacházely v menší míře i na kontrolních rostlinách divokého typu Col-0. Mezi velikostí průduchů byla viděna změna u rostlin *ann4-1* (7) v porovnání s divokým typem Col-0.

T-DNA knock-out mutanty mají ideálně obsahovat pouze jednu T-DNA inzerci nejlépe v exonové části genu zájmu, aby bylo jisté, že se jedná právě o fenotypový projev

mutace sledovaného genu. Mutantní linie *ann1-2* byla ověřena pro účely sepsání disertační práce (Tichá M.,2020). Obsahuje dvě inserce, ale druhá by se měla vyskytovat v nekódující oblasti mezi pseudogeny At4g09880.1 a At4g09890.1. Používaná linie *ann4-1* by podle Lee et al. (2004) měla obsahovat jednu inserci v šestém exonu genu, ale výsledky podporující toto tvrzení nebyla v této publikaci ukázána.

Wang et al. (2018) popisovali kratší primární kořeny mutantních *ann1* rostlin na ½ MS médiu s 0% sacharosou, avšak v této studii byly používány jiné mutantní linie (SAIL\_414\_C01, WiscDsLox477–480P11) a odlišné kultivační podmínky (intenzita světla 275  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , vlhkost 80 % a teplota 20 °C). V této bakalářské práci byla použita semena (SALK\_095886C) a kultivační podmínky (150  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; vlhkost 70 % a teplota 22 °C). Výsledky měření délky kořenů ukazují kratší fenotyp *ann1-2* linie, ale rozdíl nebyl statisticky potvrzen. Tichá M. (2020) popisovala ve své dizertační práci kultivační podmínky shodné s podmínkami, které byly použity v této bakalářské práci, avšak její výsledky ukázaly delší kořenový fenotyp i při využití ½ MS média se sacharosou. Je na místě využít proto ½ MS médium bez přídavku sacharosy a analýzu zopakovat.

Při pozorování květů na 3-měsících starých v půdě pěstovaných rostlinách *ann4-1 (1)* byly nalezeny občasné zdvojené květy vyrůstající ze stejného květního lůžka obsahující dvojnásobný počet tyčinek, 2 pestíky, každý v různém stádiu vývoje a různý počet okvětních lístků. Huh et al. (2018) publikoval, že při pěstování v půdě je ve květech vysoká exprese ANNAT4 a je tedy možné, že se tento protein podílí na vývoji květů. Pro potvrzení této hypotézy by byla zapotřebí důkladnější analýza.

Dalším cílem práce bylo připravit konstrukty pro Multiplex CRISPR/Cas9 mutagenezi *ANNAT1* a *ANNAT4* genů. Jedním z důvodů bylo neúspěšné genotypování linie *ann4-2*, kdy ani jedna z rostlin neměla mutantní alelu s T-DNA insercí. Druhým důvodem bylo připravit konstrukt pro dvojitého mutantu *ann1ann4* pro budoucí účely analýzy.

Multiplex CRISPR/Cas9 je technika editace genomu, která umožňuje editovat více genomových lokusů současně. CRISPR/Cas9 je účinný a přesný nástroj genového inženýrství, odvozeného z bakteriálního imunitního systému. Pro dosažení multiplexní editace bylo navrženo více gRNA, každá z nich specifická pro jinou cílovou sekvenci



v genomu. Tyto gRNA jsou navrženy tak, aby byla zajištěna specifická a účinnost při cílení pro knock-out požadovaného genu nebo vícero genů současně (Zhang et al., 2016).

Byly připravené konstrukty pro tvorbu jednoduchých mutantů *ann1* a *ann4* a konstrukty pro tvorbu dvojitého mutantu *ann1ann4*. Pro každý z cílových genů byly vybrány dvě navádějící gRNA, ty byly exprimované pod konstitutivním promotorem (*AtU6-26*) ve vstupních vektorech. Exprese Cas9 byla také řízena konstitutivním *UBQ10*, pro zajištění vyšší efektivity. Konstrukty byly v průběhu přípravy ověřovány pomocí restriční štěpení, sekvencování a colony PCR. Funkčnost konstruktů byla následně potvrzena tranziční transformací listů *N. benthamiana*. Bylo možné sledovat specifický signál červeného fúzního proteinu Cas-mCherry v jádře epidermálních buněk listů. V buňkách byl však pozorován mimojaderný signál organizovaný do struktur kolem buněčné stěny. Ten mohl být způsobený druhým fluorescenčním proteinem mRuby nacházející se v konstrukt pro selekci semen. Mezi jejich emisními parametry je velmi malý rozdíl, a tak nebylo možné rozlišit od sebe jejich signály. FAST metoda využívá OLE1-mRuby pro selekci transgenních semen. Za ideálních podmínek se má exprimovat až v semeni, avšak za stresových podmínek, z neznámých důvodů, může docházet k expresi ve vegetativních pletivech, jako jsou listy do olejových tělísek nebo endoplasmatického retikula (Li et al., 2020; Shimada et al., 2010). Tato skutečnost však nemá vliv na funkčnost konstruktů. Můžeme tedy předpokládat, že po stabilní transformaci zprostředkované *A. tumefaciens* by bylo pomocí Multiplex CRISPR/Cas9 dosaženo tvorby knock-out mutantních linií jak jednoduchých mutantů *ann1* a *ann4*, tak tvorby dvojitého annexinového mutantu *ann1ann4*. Příprava stabilních linií *ann* mutantů bude předmětem diplomové práce.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byl shrnut současný stav řešené problematiky. Byla zde popsána *A. thaliana* jako modelový organismus, charakterizovány annexiny a s nimi spjatá vápníková signalizace.

V praktické části této práce byly validovány annexinové mutanty pomocí genotypování a následně byla na nich provedena fenotypová analýza. Ačkoli annexiny nejsou považovány za esenciální, hrají klíčovou roli v buněčných procesech. Cílem bylo porozumět vlivům ANNAT1 a ANNAT4 na fenotyp *A. thaliana* pomocí skenovacích a mikroskopických analýz jejich fenotypů. Z výsledků fenotypové analýzy nevzešel žádný opakující se znak. Kvůli absenci statisticky významných rozdílů mezi vegetativními pletivy jednotlivých linií nelze vyvodit žádný jednoznačný vliv těchto annexinů na pozorovatelné charakteristiky rostlin za normálních podmínek. Výsledky pouze potvrdily významný vliv podmínek prostředí na funkční dynamiku těchto annexinů a navrhly možný vliv ANNAT4 ve vývoji květů.

Pro budoucí experimenty byly připraveny specializované konstrukty pro vytvoření annexinových mutantů pomocí Multiplex CRISPR/Cas9 metody. Funkčnost a účinnost konstruktů byla ověřena tranzientní transformací na listech *N. benthamiana*.

Celkově získané informace zdůrazňují složitost rolí annexinů v buněčných procesech a potřebu dalšího zkoumání. Budoucí experimenty budou moci stavět na výsledcích provedené fenotypové analýzy a využít zde připravené konstrukty k tvorbě stabilních mutantních linií. Prostřednictvím vytvoření a charakterizace těchto jednoduchých a dvojitých *ann* mutantních rostlin bude umožněno podrobněji zkoumat specifické role ANNAT1 a ANNAT4, a to jak jednotlivě, tak v kombinaci.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ando, Y., Imamura, S., Owada, M. K., & Kannagi, R. (1991). Calcium-induced intracellular cross-linking of lipocortin I by tissue transglutaminase in A431 cells. Augmentation by membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 266(2), 1101–1108. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)35288-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)35288-2)
- Barton, G. J., Newman, R. H., Freemont, P. S., & Crumpton, M. J. (1991). Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *European Journal of Biochemistry*, 198(3), 749–760. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16076.x>
- Berridge, M., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Berridge, M., Lipp, P., & Bootman, M. (2000). The versality and universality of calcium signaling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1, 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Boursiac, Y., & Harper, J. F. (2007). The origin and function of calmodulin regulated Ca<sup>2+</sup> pumps in plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(5), 409–414. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9104-z>
- Boustead, C. M., Smallwood, M., Small, H., Bowles, D. J., & Walker, J. H. (1989). Identification of calcium-dependent phospholipid-binding proteins in higher plant cells. *FEBS Letters*, 244(2), 456–460. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80582-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80582-4)
- Braun, E. L., Kang, S., Nelson, M. A., & Natvig, D. O. (1998). Identification of the First Fungal Annexin: Analysis of Annexin Gene Duplications and Implications for Eukaryotic Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 47(5), 531–543. <https://doi.org/10.1007/PL00006409>
- Cantero, A., Barthakur, S., Bushart, T. J., Chou, S., Morgan, R. O., Fernandez, M. P., Clark, G. B., & Roux, S. J. (2006). Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.02.002>
- Carroll, A., Moyen, C., Van Kesteren P, Tooke, F., Battey, N., & Brownlee, C. (1998). Ca<sup>2+</sup>, annexins, and GTP modulate exocytosis from maize root cap protoplasts. *The Plant Cell*, 10(8), 1267–1276.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T., & Raikhel, N. V. (2004). The Vegetative Vacuole Proteome of Arabidopsis thaliana Reveals Predicted and Unexpected Proteins. *The Plant Cell*, 16(12), 3285–3303. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027078>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clark, G. B., Cantero-Garcia, A., Butterfield, T., Dauwalder, M., & Roux, S. J. (2005a). Secretion as a key component of gravitropic growth: Implications for annexin involvement in differential growth. *Gravitational and Space Biology*, 18(2), 113–115.
- Clark, G. B., Dauwalder, M., & Roux, S. J. (1994). Immunolocalization of an annexin-like protein in corn. *Advances in Space Research*, 14(8), 341–346. [https://doi.org/10.1016/0273-1177\(94\)90421-9](https://doi.org/10.1016/0273-1177(94)90421-9)
- Clark, G. B., Dauwalder, M., & Roux, S. J. (1998). Immunological and biochemical evidence for nuclear localization of annexin in peas. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(9), 621–627. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80010-7](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80010-7)
- Clark, G. B., Lee, D., Dauwalder, M., & Roux, S. J. (2005b). Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different Arabidopsis annexins with secretion during early seedling growth and development. *Planta*, 220(4), 621–631. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1374-7>
- Clark, G. B., Morgan, R. O., Fernandez, M.-P., & Roux, S. J. (2012). Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. *New Phytologist*, 196(3), 695–712. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04308.x>
- Clark, G. B., & Roux, S. J. (1995). Annexins of plant cells. *Plant Physiology*, 109(4), 1133–1139. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1133>

- Clark, G. B., Sessions, A., Eastburn, D. J., & Roux, S. J. (2001). Differential Expression of Members of the Annexin Multigene Family in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *126*(3), 1072–1084. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1072>
- Creutz, C., Pazoles, C., & Pollard, H. (1978). Identification and purification of an adrenal medulla (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *The Journal of biological chemistry*, *253*, 2858–2866. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40901-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40901-X)
- Crompton, M. R., Moss, S. E., & Crumpton, M. J. (1988). Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell*, *55*(1), 1–3. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90002-5)
- Dabitz, N., Hu, N.-J., Yusof, A. M., Tranter, N., Winter, A., Daley, M., Zschörnig, O., Brisson, A., & Hofmann, A. (2005). Structural Determinants for Plant Annexin–Membrane Interactions. *Biochemistry*, *44*(49), 16292–16300. <https://doi.org/10.1021/bi0516226>
- Davies, J. M. (2014). Annexin-Mediated Calcium Signalling in Plants. *Plants*, *3*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/plants3010128>
- Day, I. S., Reddy, V. S., Shad Ali, G., & Reddy, A. (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis. *Genome Biology*, *3*(10), research0056.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-10-research0056>
- Decaestecker, W., Buono, R. A., Pfeiffer, M. L., Vangheluwe, N., Jourquin, J., Karimi, M., Van Isterdael, G., Beeckman, T., Nowack, M. K., & Jacobs, T. B. (2019). CRISPR-TSKO: A Technique for Efficient Mutagenesis in Specific Cell Types, Tissues, or Organs in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *31*(12), 2868–2887. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00454>
- Delmer, D. P., & Potikha, T. S. (1997). Structures and functions of annexins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *53*(6), 546–553. <https://doi.org/10.1007/s000180050070>
- Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T. A., & Pottosin, I. (2018). Calcium transport across plant membranes: Mechanisms and functions. *New Phytologist*, *220*(1), 49–69. <https://doi.org/10.1111/nph.15266>
- Demidchik, V., Shang, Z., Shin, R., Thompson, E., Rubio, L., Laohavisit, A., Mortimer, J. C., Chivasa, S., Slabas, A. R., Glover, B. J., Schachtman, D. P., Shabala, S. N., & Davies, J. M. (2009). Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca<sup>2+</sup> channels. *The Plant Journal*, *58*(6), 903–913. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.03830.x>
- Dodd, A. N., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The Language of Calcium Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *61*(1), 593–620. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070109-104628>
- Edel, K. H., Marchadier, E., Brownlee, C., Kudla, J., & Hetherington, A. M. (2017). The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Current Biology*, *27*(13), R667–R679. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.020>
- Fujiwara, M., Uemura, T., Ebine, K., Nishimori, Y., Ueda, T., Nakano, A., Sato, M. H., & Fukao, Y. (2014). Interactomics of Qa-SNARE in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, *55*(4), 781–789. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu038>
- Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Kuluev, B. R., Kiryanova, O. Yu., Gumerova, G. R., Knyazev, A. V., Vershinina, Z. R., Mikhailova, E. V., Chemeris, D. A., Matniyazov, R. T., Baimiev, An. Kh., Gubaidullin, I. M., Baimiev, Al. Kh., & Chemeris, A. V. (2020). Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Molecular Biology*, *54*(1), 24–42. <https://doi.org/10.1134/S0026893320010069>
- Gerke, V., & Moss, S. E. (2002). Annexins: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, *82*(2), 331–371. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001>
- Gidrol, X., Sabelli, P. A., Fern, Y. S., & Kush, A. K. (1996). Annexin-like protein from Arabidopsis thaliana rescues delta oxyR mutant of Escherichia coli from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(20), 11268–11273. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11268>
- Gorecka, K. M., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., Buchet, R., & Pikula, S. (2005). Peroxidase activity of annexin 1 from Arabidopsis thaliana. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *336*(3), 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.181>

- Gupta, G. S. (2012). *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. Springer Science & Business Media.
- Hashimoto, K., & Kudla, J. (2011). Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie*, 93(12), 2054–2059. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.019>
- Hawkins, T. E., Merrifield, C. J., & Moss, S. E. (2000). Calcium signaling and annexins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 33(3), 275–296. <https://doi.org/10.1385/CBB:33:3:275>
- Hepler, P. K., Vidali, L., & Cheung, A. Y. (2001). Polarized Cell Growth in Higher Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 159–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.159>
- Hofmann, A. (2004). Annexins in the plant kingdom: Perspectives and potentials. *Annexins 1*, 51–61.
- Hofmann, A., Benz, J., Liemann, S., & Huber, R. (1997). Voltage dependent binding of annexin V, annexin VI and annexin VII-core to acidic phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1330(2), 254–264. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00150-8)
- Hofmann, A., Delmer, D. P., & Wlodawer, A. (2003). The crystal structure of annexin Gh1 from *Gossypium hirsutum* reveals an unusual S3 cluster. *European Journal of Biochemistry*, 270(12), 2557–2564. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03612.x>
- Hoshino, D., Hayashi, A., Temmei, Y., Kanzawa, N., & Tsuchiya, T. (2004). Biochemical and immunohistochemical characterization of Mimosa annexin. *Planta*, 219(5), 867–875. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1285-7>
- Hu, S., Brady, S. R., Kovar, D. R., Staiger, C. J., Clark, G. B., Roux, S. J., & Muday, G. K. (2000). Identification of plant actin-binding proteins by F-actin affinity chromatography. *The Plant Journal*, 24(1), 127–137. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00852.x>
- Huh, S. M., Noh, E. K., Kim, H. G., Jeon, B. W., Bae, K., Hu, H.-C., Kwak, J. M., & Park, O. K. (2010). Arabidopsis Annexins AnnAt1 and AnnAt4 Interact with Each Other and Regulate Drought and Salt Stress Responses. *Plant and Cell Physiology*, 51(9), 1499–1514. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq111>
- Chen, K., Renaut, J., Sergeant, K., Wei, H., & Arora, R. (2013). Proteomic changes associated with freeze-thaw injury and post-thaw recovery in onion (*Allium cepa* L.) scales. *Plant, Cell & Environment*, 36(4), 892–905. <https://doi.org/10.1111/pce.12027>
- Jami, S. K., Clark, G. B., Ayele, B. T., Ashe, P., & Kirti, P. B. (2012). Genome-wide Comparative Analysis of Annexin Superfamily in Plants. *PLOS ONE*, 7(11), e47801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047801>
- Jin, M., Smith, C., Hsieh, H.-Y., Gibson, D. F., & Tait, J. F. (2004). Essential Role of B-helix Calcium Binding Sites in Annexin V-Membrane Binding \*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40351–40357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405846200>
- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H., & Mizuno, T. (2005). Combinatorial Microarray Analysis Revealing Arabidopsis Genes Implicated in Cytokinin Responses through the His→Asp Phosphorelay Circuitry. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), 339–355. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci033>
- Kodavali, P. K., Skowronek, K., Koszela-Piotrowska, I., Strzelecka-Kiliszek, A., Pawlowski, K., & Pikula, S. (2013). Structural and functional characterization of annexin 1 from *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.08.010>
- Konopka-Postupolska, D. (2007). Annexins: Putative linkers in dynamic membrane–cytoskeleton interactions in plant cells. *Protoplasma*, 230(3–4), 203–215. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0234-7>
- Konopka-Postupolska, D., & Clark, G. (2017). Annexins as Overlooked Regulators of Membrane Trafficking in Plant Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms18040863>
- Konopka-Postupolska, D., Clark, G., Goch, G., Debski, J., Floras, K., Cantero, A., Fijolek, B., Roux, S., & Hennig, J. (2009). The Role of Annexin 1 in Drought Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 150(3), 1394–1410. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135228>

- Konopka-Postupolska, D., Clark, G., & Hofmann, A. (2011). Structure, function and membrane interactions of plant annexins: An update. *Plant Science*, *181*(3), 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.013>
- Kourie, J. I., & Wood, H. B. (2000). Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *73*(2), 91–134. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00003-1)
- Kovács, I., Ayaydin, F., Oberschall, A., Ipacs, I., Bottka, S., Pongor, S., Dudits, D., & Tóth, É. C. (1998). Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa. *The Plant Journal*, *15*(2), 185–197. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00194.x>
- Krysan, P. J., Young, J. C., & Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *11*(12), 2283–2290. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.12.2283>
- Kudla, J., Batistič, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *The Plant Cell*, *22*(3), 541–563. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072686>
- Laohavisit, A., Brown, A. T., Cicuta, P., & Davies, J. M. (2010). Annexins: Components of the Calcium and Reactive Oxygen Signaling Network. *Plant Physiology*, *152*(4), 1824–1829. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145458>
- Laohavisit, A., & Davies, J. M. (2011). Annexins. *New Phytologist*, *189*(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03533.x>
- Laohavisit, A., Mortimer, J. C., Demidchik, V., Coxon, K. M., Stancombe, M. A., Macpherson, N., Brownlee, C., Hofmann, A., Webb, A. A. R., Miedema, H., Battey, N. H., & Davies, J. M. (2009). Zea mays Annexins Modulate Cytosolic Free Ca<sup>2+</sup> and Generate a Ca<sup>2+</sup>-Permeable Conductance. *The Plant Cell*, *21*(2), 479–493. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059550>
- Laohavisit, A., Richards, S. L., Shabala, L., Chen, C., Colaço, R. D. D. R., Swarbreck, S. M., Shaw, E., Dark, A., Shabala, S., Shang, Z., & Davies, J. M. (2013). Salinity-Induced Calcium Signaling and Root Adaptation in Arabidopsis Require the Calcium Regulatory Protein Annexin1. *Plant Physiology*, *163*(1), 253–262. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217810>
- Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cuin, T. A., Véry, A.-A., Wang, A., Mortimer, J. C., Macpherson, N., Coxon, K. M., Battey, N. H., Brownlee, C., Park, O. K., Sentenac, H., Shabala, S., Webb, A. A. R., & Davies, J. M. (2012). Arabidopsis Annexin1 Mediates the Radical-Activated Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>—And K<sup>+</sup>-Permeable Conductance in Root Cells. *The Plant Cell*, *24*(4), 1522–1533. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097881>
- Lee, S., Lee, E. J., Yang, E. J., Lee, J. E., Park, A. R., Song, W. H., & Park, O. K. (2004). Proteomic Identification of Annexins, Calcium-Dependent Membrane Binding Proteins That Mediate Osmotic Stress and Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*(6), 1378–1391. <https://doi.org/10.1105/tpc.021683>
- Li, M., Jiang, L.-Y., Liu, Q., Wu, Y.-H., Liu, G.-D., Chen, Y.-H., & Luo, L.-J. (2020). A method combining TA cloning and fluorescence screening for rapid acquisition of transgenic seeds. *BioTechniques*, *68*(5), 251–256. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0141>
- Liao, C., Zheng, Y., & Guo, Y. (2017). MYB30 transcription factor regulates oxidative and heat stress responses through ANNEXIN-mediated cytosolic calcium signaling in Arabidopsis. *New Phytologist*, *216*(1), 163–177. <https://doi.org/10.1111/nph.14679>
- Liemann, S., Benz, J., Burger, A., Voges, D., Hofmann, A., Huber, R., & Göttig, P. (1996). Structural and Functional Characterisation of the Voltage Sensor in the Ion Channel Human Annexin V. *Journal of Molecular Biology*, *258*(4), 555–561. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0268>
- Lichocka, M., Rymaszewski, W., Morgiewicz, K., Barymow-Filoniuk, I., Chlebowski, A., Sobczak, M., Samuel, M. A., Schmelzer, E., Krzymowska, M., & Hennig, J. (2018). Nucleus- and plastid-targeted annexin 5 promotes reproductive development in Arabidopsis and is essential for pollen and embryo formation. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1405-3>
- Lindermayr, C., Saalbach, G., & Durner, J. (2005). Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *137*(3), 921–930. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058719>

- Liu, H.-T., Li, G.-L., Chang, H., Sun, D.-Y., Zhou, R.-G., & Li, B. (2007). Calmodulin-binding protein phosphatase PP7 is involved in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, *30*(2), 156–164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01613.x>
- Liu, T., Du, L., Li, Q., Kang, J., Guo, Q., & Wang, S. (2021). AtCRY2 Negatively Regulates the Functions of AtANN2 and AtANN3 in Drought Tolerance by Affecting Their Subcellular Localization and Transmembrane Ca<sup>2+</sup> Flow. *Frontiers in Plant Science*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.754567>
- Lizarbe, M. A., Barrasa, J. I., Olmo, N., Gavilanes, F., & Turnay, J. (2013). Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms14022652>
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., & Gruissem, W. (2002). Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins: Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants. *The Plant Cell*, *14*(suppl\_1), S389–S400. <https://doi.org/10.1105/tpc.001115>
- Ludwig, A. A., Romeis, T., & Jones, J. D. G. (2004). CDPK-mediated signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*, *55*(395), 181–188. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh008>
- Luo, J., Li, M., Ju, J., Hai, H., Wei, W., Ling, P., Li, D., Su, J., Zhang, X., & Wang, C. (2024). Genome-Wide Identification of the GhANN Gene Family and Functional Validation of GhANN11 and GhANN4 under Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms25031877>
- Ma, L., Ye, J., Yang, Y., Lin, H., Yue, L., Luo, J., Long, Y., Fu, H., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Chen, L., Kudla, J., Wang, Y., Han, S., Song, C.-P., & Guo, Y. (2019). The SOS2-SCaBP8 Complex Generates and Fine-Tunes an AtANN4-Dependent Calcium Signature under Salt Stress. *Developmental Cell*, *48*(5), 697–709.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.010>
- Ma, W., & Berkowitz, G. A. (2007). The grateful dead: Calcium and cell death in plant innate immunity. *Cellular Microbiology*, *9*(11), 2571–2585. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01031.x>
- Marathe, R., Guan, Z., Anandalakshmi, R., Zhao, H., & Dinesh-Kumar, S. (2004). Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Molecular Biology*, *55*(4), 501–520. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0439-0>
- Marchadier, E., Oates, M. E., Fang, H., Donoghue, P. C. J., Hetherington, A. M., & Gough, J. (2016). Evolution of the Calcium-Based Intracellular Signaling System. *Genome Biology and Evolution*, *8*(7), 2118–2132. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw139>
- McAinsh, M. R., & Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist*, *181*(2), 275–294. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x>
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, *282*(5389), 662–682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>
- Melicher, P., Dvořák, P., Řehák, J., Šamajová, O., Pechan, T., Šamaj, J., & Takáč, T. (2024). Methyl viologen-induced changes in the Arabidopsis proteome implicate PATELLIN 4 in oxidative stress responses. *Journal of Experimental Botany*, *75*(1), 405–421. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad363>
- Meyerowitz, E. M. (1989). Arabidopsis, a useful weed. *Cell*, *56*(2), 263–269. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90900-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90900-8)
- Morgan, R. O., & Fernández, M. P. (1995). Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in Giardia lamblia. *Molecular Biology and Evolution*, *12*(6), 967–979. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040290>
- Mortimer, J. C., Coxon, K. M., Laohavisit, A., & Davies, J. M. (2009). Heme-independent soluble and membrane-associated peroxidase activity of a Zea mays annexin preparation. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(5), 428–430.
- Mortimer, J. C., Laohavisit, A., Macpherson, N., Webb, A., Brownlee, C., Battley, N. H., & Davies, J. M. (2008). Annexins: Multifunctional components of growth and adaptation. *Journal of Experimental Botany*, *59*(3), 533–544. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm344>

- Moss, S. E., & Morgan, R. O. (2004). The annexins. *Genome Biology*, 5(4), 219. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-4-219>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murata, Y., Pei, Z.-M., Mori, I. C., & Schroeder, J. (2001). Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Channels in Guard Cells Requires Cytosolic NAD(P)H and Is Differentially Disrupted Upstream and Downstream of Reactive Oxygen Species Production in *abi1-1* and *abi2-1* Protein Phosphatase 2C Mutants. *The Plant Cell*, 13(11), 2513–2523. <https://doi.org/10.1105/tpc.010210>
- Ng, CarL. K.-Y., Mcainsh, M. R., Gray, J. E., Hunt, LeE., Leckie, C. P., Mills, L., & Hetherington, A. M. (2001). Calcium-based signalling systems in guard cells. *New Phytologist*, 151(1), 109–120. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00152.x>
- Oldroyd, G. E. D., Harrison, M. J., & Paszkowski, U. (2009). Reprogramming Plant Cells for Endosymbiosis. *Science*, 324(5928), 753–754. <https://doi.org/10.1126/science.1171644>
- Pirayesh, N., Giridhar, M., Ben Khedher, A., Vothknecht, U. C., & Chigri, F. (2021). Organellar calcium signaling in plants: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(4), 118948. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118948>
- Ranty, B., Aldon, D., Cotellet, V., Galaud, J.-P., Thuleau, P., & Mazars, C. (2016). Calcium Sensors as Key Hubs in Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00327>
- Richards, S. L., Laohavisit, A., Mortimer, J. C., Shabala, L., Swarbreck, S. M., Shabala, S., & Davies, J. M. (2014). Annexin 1 regulates the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced calcium signature in *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Journal*, 77(1), 136–145. <https://doi.org/10.1111/tpj.12372>
- Rothhut, B. (1997). Participation of annexins in protein phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(6), 522–526. <https://doi.org/10.1007/s000180050066>
- Rudella, A., Friso, G., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & van Wijk, K. J. (2006). Downregulation of ClpR2 Leads to Reduced Accumulation of the ClpPRS Protease Complex and Defects in Chloroplast Biogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(7), 1704–1721. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042861>
- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F. (1999). Communicating with Calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691–706. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.691>
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the Crossroads of Signaling. *The Plant Cell*, 14(suppl\_1), S401–S417. <https://doi.org/10.1105/tpc.002899>
- Seok, H.-Y., Lee, S.-Y., Sarker, S., Bayzid, M., & Moon, Y.-H. (2023). Genome-Wide Analysis of Stress-Responsive Genes and Alternative Splice Variants in *Arabidopsis* Roots under Osmotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms241914580>
- Shigaki, T., & Hirschi, K. D. (2006). Diverse Functions and Molecular Properties Emerging for CAX Cation/H<sup>+</sup> Exchangers in Plants. *Plant Biology*, 8(4), 419–429. <https://doi.org/10.1055/s-2006-923950>
- Shimada, T. L., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 61(3), 519–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04060.x>
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T. (2007). Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 219–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434>
- Scheuring, D., Viotti, C., Krüger, F., Künzl, F., Sturm, S., Bubeck, J., Hillmer, S., Frigerio, L., Robinson, D. G., Pimpl, P., & Schumacher, K. (2011). Multivesicular Bodies Mature from the Trans-Golgi Network/Early Endosome in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(9), 3463–3481. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.086918>
- Smith, P. D., & Moss, S. E. (1994). Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends in Genetics*, 10(7), 241–245. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90171-6)



- Strynadka, N. C. J., & James, M. N. G. (1989). Crystal Structures of the Helix-Loop-Helix Calcium-Binding Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 951–999. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004511>
- Sullivan, D. M., Wehr, N. B., Fergusson, M. M., Levine, R. L., & Finkel, T. (2000). Identification of Oxidant-Sensitive Proteins: TNF- $\alpha$  Induces Protein Glutathiolation. *Biochemistry*, 39(36), 11121–11128. <https://doi.org/10.1021/bi0007674>
- Swairjo, M. A., Concha, N. O., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., & Seaton, B. A. (1995). Ca<sup>2+</sup>-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nature Structural Biology*, 2(11), 968–974. <https://doi.org/10.1038/nsb1195-968>
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), Article 6814. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Thor, K. (2019). Calcium—Nutrient and Messenger. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440>
- Tichá, M. (2020). *Úloha annexinu a cytoskeletu vo vývoji a stresových reakciách rastlín* [Dizertační práce]. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Tichá, M., Richter, H., Ovečka, M., Maghelli, N., Hrbáčková, M., Dvořák, P., Šamaj, J., & Šamajová, O. (2020). Advanced Microscopy Reveals Complex Developmental and Subcellular Localization Patterns of ANNEXIN 1 in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.01153>
- Tuteja, N. (2009). Integrated Calcium Signaling in Plants. In S. Mancuso & F. Baluška (Ed.), *Signaling in Plants* (s. 29–49). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-89228-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-89228-1_2)
- Verma, D. P. S., & Hong, Z. (2001). Plant callose synthase complexes. *Plant Molecular Biology*, 47(6), 693–701. <https://doi.org/10.1023/A:1013679111111>
- Wang, X., Ma, X., Wang, H., Li, B., Clark, G., Guo, Y., Roux, S., Sun, D., & Tang, W. (2015). Proteomic Study of Microsomal Proteins Reveals a Key Role for *Arabidopsis* Annexin 1 in Mediating Heat Stress-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels\*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(3), 686–694. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.042697>
- Wang, X., Movahedi, A., Wei, H., Wu, X., Zhang, J., Sun, W., Li, D., & Zhuge, Q. (2020). Overexpression of PtAnnexin1 from *Populus trichocarpa* enhances salt and drought tolerance in transgenic poplars. *Tree Genetics & Genomes*, 16(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s11295-020-1412-z>
- Webb, A. A. R., McAinsh, M. R., Taylor, J. E., & Hetherington, A. M. (1996). Calcium Ions as Intracellular Second Messengers in Higher Plants. In J. A. Callow (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Roč. 22, s. 45–96). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60056-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60056-7)
- Weng, X., Luecke, H., Song, I. S., Kang, D. S., Kim, S.-H., & Huber, R. (1993). Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Science*, 2(3), 448–458. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020317>
- Wheeler, G. L., & Brownlee, C. (2008). Ca<sup>2+</sup> signalling in plants and green algae – changing channels. *Trends in Plant Science*, 13(9), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.004>
- Wice, B. M., & Gordon, J. I. (1992). A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: Characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin. *Journal of Cell Biology*, 116(2), 405–422. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.2.405>
- Wienkoop, S., Baginsky, S., & Weckwerth, W. (2010). *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research. *Journal of Proteomics*, 73(11), 2239–2248. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.012>
- Wu, X., Wang, Y., Bian, Y., Ren, Y., Xu, X., Zhou, F., & Ding, H. (2022). A critical review on plant annexin: Structure, function, and mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 190, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.019>

- Xin, Z., Zhao, Y., & Zheng, Z.-L. (2005). Transcriptome Analysis Reveals Specific Modulation of Abscisic Acid Signaling by ROP10 Small GTPase in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *139*(3), 1350–1365. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068064>
- Xu, J., Han, L., Xia, S., Zhu, R., Kang, E., & Shang, Z. (2023). ATANN3 Is Involved in Extracellular ATP-Regulated Auxin Distribution in Arabidopsis thaliana Seedlings. *Plants*, *12*(2), 330. <https://doi.org/10.3390/plants12020330>
- Yadav, D., Ahmed, I., Shukla, P., Boyidi, P., & Kirti, P. B. (2016). Overexpression of Arabidopsis AnnAt8 Alleviates Abiotic Stress in Transgenic Arabidopsis and Tobacco. *Plants*, *5*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/plants5020018>
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., & Farmer, E. E. (2007). A Downstream Mediator in the Growth Repression Limb of the Jasmonate Pathway. *The Plant Cell*, *19*(8), 2470–2483. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050708>
- Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*, *8*(10), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.004>
- Zhang, Z., Mao, Y., Ha, S., Liu, W., Botella, J. R., & Zhu, J.-K. (2016). A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, *35*(7), 1519–1533. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1900-z>
- Zhao, J., Li, L., Liu, Q., Liu, P., Li, S., Yang, D., Chen, Y., Pagnotta, S., Favery, B., Abad, P., & Jian, H. (2019). A MIF-like effector suppresses plant immunity and facilitates nematode parasitism by interacting with plant annexins. *Journal of Experimental Botany*, *70*(20), 5943–5958. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz348>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$	cytosolická koncentrace vápenatých iontů
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	kyselina abscisová
ANNAT	annexin <i>A. thaliana</i>
Amp <sup>R</sup>	amplicilinová rezistence
ATP	adenosintrifosfát
<i>AtU6-26</i>	<i>U6-26</i> promotor RNA polymerázy III z <i>A. thaliana</i>
bp	páry bází
<i>Bsbl</i>	restrikční enzym
Ca <sup>2+</sup>	vápenatý ion
CaM	kalmodulin
Cas9	CRISPR asociovaný protein 9)
CAX	cation exchangers;
CBL	kalcineurin B-podobné proteiny
<i>CcdB</i>	gen kódující cytotoxický protein CcdB
CDPK	Ca <sup>2+</sup> -závislé proteinkinasy
CIPK	serin/threonin proteinkinasami
CML	kalmodulinu podobné proteiny
Col-0	<i>A. thaliana</i> ekotype Columbia-0
CRISPR	clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
eATP	extracelulární adenosintrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	endoplasmatické retikulum
F-aktin	filamentní aktin
gAnn	gRNA pro <i>ANNAT</i>
Gen <sup>R</sup>	gentamycin rezistence
gRNA	naváděcí ribonukleová kyselina
GTP	guanosintrifosfát
H <sup>+</sup>	proton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
IRI	Isoleucin-arginin-isoleucin
K <sup>+</sup>	draselný kation
KCl	chlorid draselný
KOH	hydroxid draselný
LB médium	Luria Bertani médium
LB primer	„left border“ primer pro T-DNA inzerci
LP primer	levý genomický primer
MES	2(N-morfolino)etansulfonová kyselina
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
MS	Murashige & Skoog
MVB	multivezikulární tělísko

Na <sup>+</sup>	sodný kation
NaCl	chlorid sodný
OD <sub>600</sub>	optická hustota při vlnové délce 600 nm
OLE1-mRuby	fúzní protein pro selekci semen <i>A. thaliana</i> na základě červeného fluorescenčního barviva mRuby
pDNA	plasmidová deoxyribonukleová kyselina
PCR	řetězová polymerasová reakce
<i>pFASTR – UBQ10</i>	promotor genu <i>Ubiquitin 10</i> z <i>A. thaliana</i>
PP7	serin/treonin fosfatasa
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP primer	pravý genomický primer
SA	kyselina salicylová
SCaBP	SOS3-like calcium binding protein
SI-III	roztoky Plasmid DNA mini kitu
SNARE	soluble NSF attachment proteins receptor
SOC	super optimal broth
SOS	salt overly sensitive dráha
SOS2	proteinkinasa SOS dráhy
Spe <sup>R</sup>	spetinomycin rezistence
SV40	jaderný lokalizační signál z opičího virusu
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TAE	Tris-acetát-EDTA
T-DNA	transferová DNA

TGN	trans-golgiho síť
Trp27	tryptofan
UBQ10	promotor genu <i>Ubiquitin 10</i> z <i>A. thaliana</i>
UV	ultrafialové světlo
X	jakákoliv aminokyselina