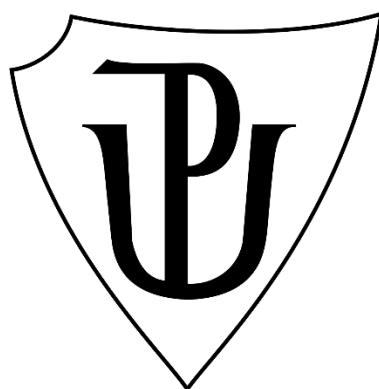


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Redox proteomická analýza signálních funkcí superoxiddismutasy FSD1 u *Arabidopsis thaliana*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jan Řehák
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Ing. Tomáš Takáč. PhD.
Rok:	2023

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

V Olomouci dne

Podpis studenta

Nejdříve bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu doc. Ing. Tomáši Takáčovi, PhD. za cenné rady a odbornou pomoc, kterou mně poskytoval při zpracovávání mé diplomové práce, a za čas, který mně věnoval. Dále také všem pracovníkům katedry biotechnologií, kteří nám udělali příjemné prostředí pro práci v laboratoři. Obzvláště bych pak chtěl poděkovat panu Mgr. Pavolovi Melicherovi a panu Mgr. Petru Dvořákovi, PhD. za jejich bezmeznou pomoci a cenné rady, které mně poskytovali během experimentální části. Práce byla částečně podpořená granty IGA_PrF_2022_014 s názvem Časová a prostorová distribuce reaktivních forem kyslíku při vývoji kořenových vlásků *Arabidopsis thaliana* a IGA_PrF_2023_015 s názvem Vliv hladiny stresem-indukované mitogen-aktivované protein kinasy na odolnost vojtěšky seté proti oxidativnímu stresu ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci. Na závěr bych rád poděkoval své rodině a všem přátelům, kteří mě při vytváření této práce podpořili a bez jejichž pomoci by nebylo možné práci dokončit.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jan Řehák
Název práce	Redox proteomická analýza signálních funkcí superoxidodismutasy FSD1 u <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biotechnologií, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Reaktivní formy kyslíku (ROS) mohou být pro buňku toxické a vážně ji poškodit. Na druhou stranu, díky svým vlastnostem jsou významné signální molekuly, které se účastní mnoha buněčných procesů a reakcí na stresové podmínky prostředí. Velmi důležitá signální molekula z řad ROS je peroxid vodíku. Vzniká přeměnou ze superoxidového aniontu působením enzymu superoxidodismutasy. Jedním z cílů této práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivní vyřazení genu pro superoxidodismutasu 1 s železným kofaktorem (*FSD1*) redoxní signalizaci v odpovědi na oxidativní stres. Redoxní proteomická analýza odhalila, že proteiny heat shock protein 70-1 (HSP70-1) a α -tubulin 4 obsahují zvýšenou abundanci redoxně aktivních cysteinů po indukci tvorby superoxidového aniontu pomocí ovlivnění rostlin divokého typu *Arabidopsis thaliana* methyl viologenem (MV) po dobu 30 minut. Analýza míry oxidace proteinů pomocí tzv. redoxního posunu proteinů potvrdila tyto modifikace a pomohla odhalit různé oxidační stavy. Mutantní rostliny *fsd1* vykazovaly rozdíly v oxidaci výše zmíněných proteinů. FSD1 se tedy může podílet na redoxní buněčné signalizaci. Druhá část práce byla věnována proteinu patellin 4 (PATL4), který byl dříve pomocí diferenciální proteomické analýzy identifikován jako rychle reagující na oxidativní stres indukovaný MV. *In vivo* mikroskopická analýza ukázala snížení abundance GFP-PATL4 po 30 minut dlouhém ošetření rostlin MV. Mutantní rostliny *patl4* vykazovaly odolnost vůči oxidativnímu stresu vyvolaném MV. Kromě toho mutantní rostliny *patl4* vykazovaly výrazně větší průduchy ve srovnání s divokým typem. Taktéž vykazovaly rozdílné hodnoty stomatální denzity, stomatálního indexu a indexu meristemoidů. PATL4 byl identifikován jako protein mající funkci při obraně rostlin vůči oxidativnímu stresu. PATL4 hraje také roli při zakládání a vývoji stomat.

Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , FSD1, oxidace, oxidativní stres, patelliny, PATL4, redoxní posttranslační modifikace, signalizace, superoxidodismutasy
Počet stran	103
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Bc. Jan Řehák
surname

Title Redox proteomic analysis of signalling functions of iron superoxide dismutase FSD1 in *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis Diploma

Department Department of Biotechnology, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

Supervisor doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.

The year of presentation 2023

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) can be toxic and cause serious cell damage. On the other hand, their properties allow them to be important signalling molecules involved in many plant cellular processes and responses to stress conditions. One of the most important ROS with signalling function is hydrogen peroxide. It is formed by conversion of the superoxide radical in a reaction catalyzed by superoxide dismutase. One of the aims of this study was to investigate the influence of iron superoxide dismutase 1 (*FSD1*) gene knocking out on redox signalling in response to oxidative stress. Redox proteomic analysis revealed the increased abundance of redox active cysteines in heat shock protein 70-1 and α -tubulin 4 after a 30 minutes long methyl viologen (MV) treatment in wild type plants. The oxidation of both proteins was validated using a redox protein shift assay, allowing also detection of their oxidation states. *Arabidopsis fsd1* mutants exert different oxidation of these proteins compared to the wild type. FSD1 may therefore be involved in redox cell signaling. The second part of the work is focused on patellin 4 (PATL4), which was identified by differential proteomic analysis as responding rapidly to MV-induced oxidative stress. *In vivo* microscopic analysis showed a rapid decrease in the abundance of GFP-PATL4 after treatment of plants with MV. The *patl4* mutant plants were resistant to MV-induced oxidative stress. Furthermore, *patl4* mutant plants exhibit stomata of significantly bigger size compared to wild type. They also showed different values of stomatal density, stomatal index and meristemoid index. PATL4 was identified as a protein with a function in plant defense against oxidative stress. PATL4 has also a role in stomatal establishment and development.

Keywords *Arabidopsis thaliana*, FSD1, oxidation, oxidative stress, redox posttranslational modifications, superoxide dismutases

Number of pages 103

Number of appendices 0

Language Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Reaktivní formy kyslíku (ROS)	2
2.1.1	Produkce ROS v chloroplastech	3
2.1.2	Produkce ROS indukovaná methyl viologinem	5
2.1.3	Mechanismus působení MV	6
2.2	Antioxidační obrana rostlin	6
2.2.1	Superoxiddismutasy v rostlinách	8
2.3	Signalizace pomocí ROS	14
2.3.1	Vnější ROS signalizace	14
2.3.2	Vnitřní ROS signalizace	15
2.3.3	Meziorganelová signalizace	16
2.4	Redox a oxidativní modifikace proteinů způsobené ROS	18
2.4.1	Reaktivita cysteinů a náchylnost k oxidaci	18
2.4.2	Modifikace cysteinů pomocí ROS a RNS	19
2.4.3	Redoxní biologie v průběhu stresových podmínek v chloroplastech	22
2.4.4	Redoxní regulace transkripčních faktorů	23
2.5	Redox proteomické metody a metody detekce redoxních modifikací proteinů 25	
2.5.1	Metody detekce založené na gelové separaci	25
2.5.2	Metody založené na afinitní chromatografii	29
2.5.3	Metody bez gelové separace	30
2.6	Patelliny a jejich funkce u rostlin	35
2.6.1	Úvod	35
2.6.2	Sec14 s doménou GOLD – Patelliny	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
3.1	Biologický materiál	40
3.2	Přístroje a pomůcky	40
3.3	Chemikálie	41
3.4	Roztoky a jejich složení	44
3.5	Metody	45
3.5.1	Příprava kultivačních médií	45
3.5.2	Povrchová sterilizace semen <i>A. thaliana</i>	46
3.5.3	<i>In vitro</i> kultivace rostlin <i>A. thaliana</i>	46
3.5.4	Ovlivnění rostlin MV	46

3.5.5	Redoxní proteomická analýza	47
3.5.6	Bioinformatická predikce redoxně aktivních cysteinů.....	48
3.5.7	Homogenizace a extrakce proteinů pro redoxní posun proteinů.....	49
3.5.8	Imunoblotová analýza	50
3.5.9	<i>In vivo</i> konfokální mikroskopie	51
3.5.10	Genotypová analýza	52
3.5.11	Fenotypová analýza <i>patl4</i> mutantních rostlin	53
3.5.12	Mikroskopická analýza průduchů <i>patl4</i> mutantních rostlin.....	54
4	VÝSLEDKY	55
4.1	Redox proteomická analýza	55
4.2	Optimalizace metody redoxního posunu proteinů.....	56
4.3	Analýza oxidačních stavů α -tubulinu	58
4.4	Analýza oxidačních stavů HSP70	61
4.5	Analýza oxidačních stavů katalas.....	64
4.6	Mikroskopická analýza GFP-PATL4 po navození oxidativního stresu.....	66
4.7	Genotypová analýza <i>patl4</i> mutantních rostlin.....	68
4.8	Fenotypová analýza mutantů <i>patl4</i> po vystavení oxidativnímu stresu.....	70
4.9	Fenotypová analýza průduchů u mutantních rostlin <i>patl4</i>	72
5	DISKUSE.....	74
5.1	Vliv FSD1 na redoxní modifikace.....	74
5.2	Oxidace cysteinových zbytků α -tubulinu se mění po ovlivnění MV	75
5.3	Oxidativní stres snížil abundanci GFP-PATL4.....	76
5.4	Mutantní rostliny <i>patl4</i> jsou odolnější vůči oxidativnímu stresu	77
6	ZÁVĚR	79
7	LITERATURA.....	80
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	94
9	PŘÍLOHY	97

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE

Cílem teoretické části mé diplomové práce bylo vypracování literární rešerše na témata:

- Reaktivní formy kyslíku (ROS) a ROS signalizace;
- Redox modifikace proteinů;
- Redox proteomické metody a metody detekce redox modifikací proteinů;
- Superoxiddismutasy u rostlin;
- Patelliny a jejich role u rostlin.

PRAKTICKÁ ČÁST PRÁCE

- Extrakce, zahuštění a štěpení proteinů s oxidovaným cysteinem u divokého typu a *fsd1* mutanta *Arabidopsis thaliana*;
- Bioinformatické vyhodnocení redox proteomu;
- Validace proteomických dat pomocí fenotypovacích, biochemických a mikroskopických metod.

1 ÚVOD

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou redukované či excitované formy kyslíku. V rostlinách jsou hojně produkovány v průběhu buněčného metabolismu, nebo působením stresových faktorů. Příliš vysoké hladiny ROS mohou způsobit rozsáhlá poškození ireverzibilní oxidací bílkovin, peroxidací lipidů či narušením struktury nukleových kyselin. Nicméně, díky jejich vlastnostem, jako jsou schopnost difundovat membránami, velikost, reaktivita a poločas rozpadu, mají ROS významnou roli v buněčné signalizaci v reakci na stresové podmínky prostředí (Mittler *et al.*, 2022). Na základě těchto poznatků je zřejmé, že hladina ROS musí být velmi striktně kontrolována, aby nedošlo k rozsáhlým buněčným poškozením až k buněčné smrti (Petrov *et al.*, 2015).

Aby mohly rostliny regulovat hladiny ROS, vyvinuly si velmi efektivní antioxidační obranu, která se běžně rozděluje na enzymatickou a neenzymatickou. Různé druhy ROS jsou specificky odbourávány různými antioxidačními enzymy či nízkomolekulárními antioxidanty (Dvořák *et al.*, 2021b). V této diplomové práci se zaměřujeme na superoxiddismutasu s železným kofaktorem 1 (FSD1), která odbourává superoxidový aniont (O_2^-) na méně reaktivní peroxid vodíku (H_2O_2) a kyslík (O_2 ; Gill a Tuteja, 2010). H_2O_2 se považuje za efektivní signální molekulu, která dokáže prostřednictvím redoxních posttranslačních modifikací proteinů přenášet signál. Naším záměrem v této práci bylo zjistit, zda FSD1 má vliv na redoxní signalizaci v průběhu oxidativního stresu indukovaném methyl viologenem (MV).

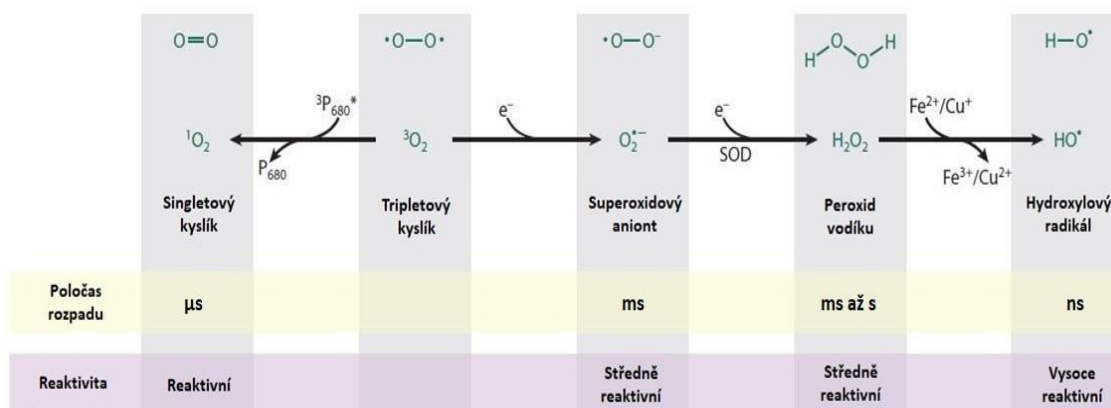
Souvislost s oxidativním stresem má i protein patellin 4 (PATL4). V diferenciální proteomické analýze byl PATL4 identifikován jako rychle reagující na oxidativní stres indukovaný MV u *Arabidopsis thaliana* (Melicher *et al.*, 2023). PATL4 patří do rodiny proteinů, která se řadí mezi transférové proteiny přenášející fosfatidylinosity na plasmatické membráně (Peterman *et al.*, 2004; Tejos *et al.*, 2018). Druhým úkolem předložené diplomové práce bylo zjistit funkci PATL4 při oxidativním stresu indukovaném MV.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Mnohobuněčné organismy žijící v přítomnosti kyslíku (O_2) jsou charakterizovány vysokými hodnotami přenosu elektronů a energie (Waszczak *et al.*, 2018). Tyto pochody následně vedou k vytváření reaktivních forem kyslíku (ROS). Vznikají buď přijetím elektronu nebo energie molekulou O_2 , a proto ROS vykazují vyšší reaktivitu. V rostlinách se rozlišují čtyři nejdůležitější ROS, a to singletový kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový aniont ($O_2^{\cdot-}$) a hydroxylový radikál (HO^{\cdot} ; Foyer a Hanke, 2022). Jednotlivé formy se od sebe navzájem odlišují poločasem rozpadu, kdy nejkratší má HO^{\cdot} a nejdelší 1O_2 , a také reaktivitou (Obr. 1). Mezi nejreaktivnější se řadí HO^{\cdot} . ROS jsou velmi všestranné díky svým rozdílným vlastnostem, které zahrnují kromě různé reaktivity, také místo jejich produkce a schopnost procházet biologickými membránami (Waszczak *et al.*, 2018). Z těchto vlastností vyplývá, že v určitém koncentračním rozsahu působí ROS jako molekuly, které se mohou účastnit řady biologických procesů, a to vývoje, diferenciaci, signalizaci v reakci na stresové podmínky, redoxní homeostázi, systémové odpovědi a programované buněčné smrti (Petrov *et al.*, 2015).

Pro iniciaci specifických reakcí na vývojové a environmentální faktory je ROS signalizace úzce provázána s mnoha dalšími sekundárními posly (reaktivní formy dusíku, vápenaté kationty, kyselina abscisová, kyselina jasmonová) a signálními dráhami (mitogenem aktivované proteinkiny; Baxter *et al.*, 2014; Sewelam *et al.*, 2016).



Obrázek 1. Souhrn nejběžnějších reaktivních forem kyslíku (ROS) společně s jejich strukturou. Na obrázku lze vidět jejich způsob vzniku, poločas rozpadu a také reaktivita vůči jiným molekulám. Převzato a upraveno od Waszczak *et al.*, 2018.

Kromě výše uvedených prospěšných vlastností mají ROS i nežádoucí účinky na živé organismy. Jelikož jsou velmi reaktivní, v některých případech mohou vážně poškozovat biologické membrány lipidovou peroxidací (Farmer *et al.*, 2013), molekuly DNA (Srinivas *et al.*, 2019) či nevratně oxidovat proteiny (Checa a Aran, 2022). Tyto děje nastávají ve chvíli, kdy dochází k jejich nadměrné akumulaci. Aby se těmto negativním vlivům předešlo, vyvinuly si organismy řadu obranných mechanismů, které se běžně rozdělují na enzymatické (superoxiddismutasy, katalasy, peroxidasy; Dvořák *et al.*, 2021b) a neenzymatické (askorbová kyselina, karotenoidy, flavonoidy; Das a Roychoudhury, 2014).

Naopak velmi nízké koncentrace ROS v buňce brání normálním buněčným funkcím a také narušují diferenciaci a imunitní reakce rostlin. Z toho vyplývá, že příliš vysoké nebo příliš nízké koncentrace buněčných ROS negativně ovlivňují růst a vývoj rostlin (Mittler, 2017).

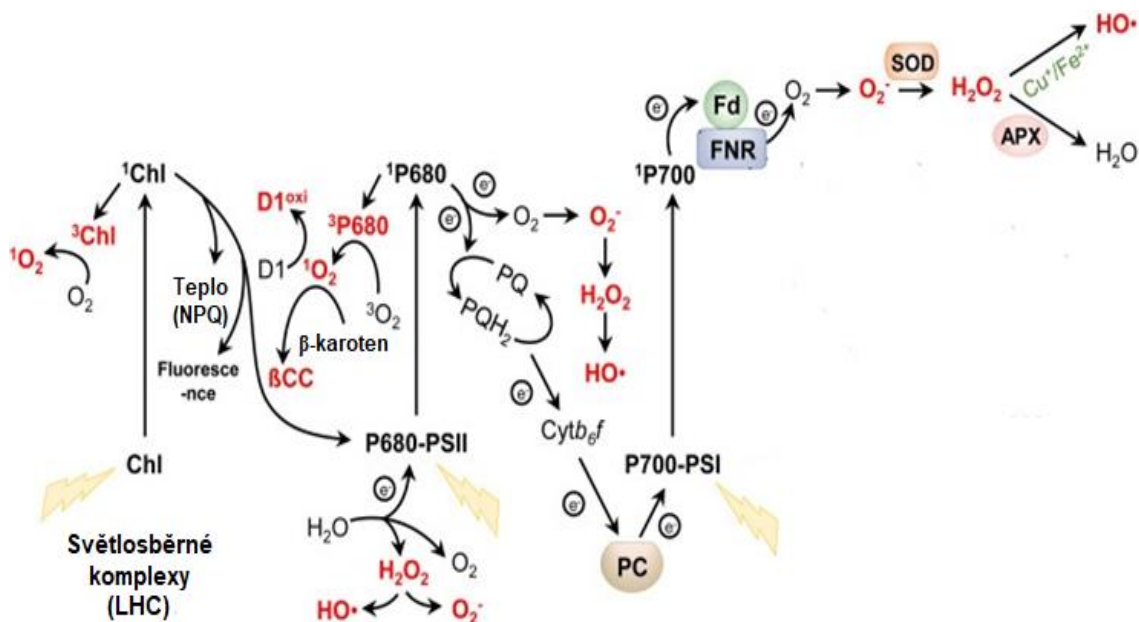
2.1.1 Produkce ROS v chloroplastech

Místo produkce ROS v rostlinné buňce determinuje jejich biologickou funkci. Všeobecně se dá říct, že O_2^- , $HO\cdot$ a H_2O_2 jsou produkovány v takřka všech buněčných organelách (Waszczak *et al.*, 2018). Koncentrace a životnost se pak odvíjejí od složení a dostupnosti antioxidačních systémů. Hlavními buněčnými organelami, kde se produkují ROS, jsou chloroplasty (Pospíšil, 2016), mitochondrie (Lambert a Brand, 2009), peroxisomy (Del Río a López-Huertas, 2016) a apoplast (Qi *et al.*, 2017).

Produkce chloroplastových ROS je velmi úzce spojena s fotosyntetickými reakcemi závislými na světle, kde zvyšující se míra vytváření ROS slouží jako indikátor změn vnějších či vnitřních podmínek, což může následně vést k přizpůsobení metabolických pochodů (Waszczak *et al.*, 2018). Obecně se dá říct, že existují dva hlavní mechanismy, pomocí kterých vznikají ROS v chloroplastech. Ten první sestává z přenosu energie z excitovaného chlorofylu na molekulu O_2 (v tripletovém stavu) za vzniku vysoce reaktivního 1O_2 . Příjem energie ve fotosystému II (PSII) vede ke vzniku excitovaného tripletového chlorofylu (3Chl) buď ve světlosběrném komplexu nebo přímo v reakčním centru PSII. Kvůli zvyšující se délce životnosti dokážou tyto excitované molekuly chlorofylu přenést část absorbované energie na molekulu O_2 , a tím zprostředkovat vznik 1O_2 (Li a Kim, 2021). Část vyprodukovaného 1O_2 buňka zhasí pomocí karotenoidů tím, že dochází k jejich oxidaci (Dogra *et al.*, 2018; Obr. 2).

Krom $^1\text{O}_2$ vzniká ve PSII také O_2^- . Vzniká redukcí O_2 pomocí jednoho elektronu na straně akceptorové části PSII (Pospíšil, 2016). Jako donory elektronu zde figurují feofytin, plastosemichinony (Yadav *et al.*, 2014) a plastochinon (Pospíšil 2004). H_2O_2 vzniká jedoelektronovou redukcí O_2^- a dvoelektronovou oxidací vody. Tvorba H_2O_2 jedoelektronovou redukcí O_2^- probíhá pomocí enzymatické dismutace nebo je zprostředkována plastosemichinonem (Prasad *et al.*, 2015). Z H_2O_2 může vzniknout $\text{HO}\cdot$ jedoelektronovou redukcí, a to buď na akceptorové, či donorové straně PSII. Bylo prokázáno, že tvorba $\text{HO}\cdot$ jedoelektronovou redukcí H_2O_2 je zabezpečována volným železem, respektive nehemovým železem (Fentonova reakce; Pospíšil, 2004; Obr. 2).

Druhým mechanismem je přímý přenos elektronů na molekulu O_2 , ze kterého následně vzniká O_2^- . Hlavními faktory, které rozhodují o tom, zda k této reakci dojde, jsou životnost redukovaných kofaktorů a jejich dostupnost (Li a Kim, 2021). Tato



Obrázek 2. Metabolismus reaktivních forem kyslíku v chloroplastech. Po absorpci světelné energie dojde přeměně chlorofylu (Chl) na singletový chlorofyl (^1Chl). Část této energie se může vyzářit v podobě tepla nebo fluorescence. Další možností je spontánní rozpad ^1Chl , jehož výsledkem je tripletový chlorofyl (^3Chl). ^3Chl dokáže přenést absorbovanou energii na molekulu kyslíku (O_2) za vzniku singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Energie je přenesena do fotosystému II (PSII), kde rovněž může vznikat $^1\text{O}_2$. Mimo $^1\text{O}_2$ může ve PSII vznikat také peroxid vodíku (H_2O_2) a superoxidový aniont (O_2^-) dvoelektronovou oxidací vody. Fotosystém I (PSI) se také podílí na procesu produkce a detoxikace O_2^- a H_2O_2 . Elektronový akceptor PSI ferredoxin (Fd)-NADP⁺ oxidoreduktáza (FNR) přenáší elektrony z ferredoxinu na NADP⁺ za vzniku NADPH. Aby se PSII udržel v částečně oxidované formě za podmínek, FNR přenáší elektron na O_2 , čímž vzniká O_2^- , který je dále přeměněn na H_2O_2 pomocí superoxiddismutasy (SOD). Askorbát peroxidázy (APX) přispívají k odstraňování H_2O_2 . Hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) vzniká prostřednictvím Fentonovy reakce interakcí H_2O_2 s redukovanými ionty přechodných kovů, jako jsou Fe^{2+} a Cu^+ . Převzato a upraveno od Li a Kim, 2021.

reakce může být akcelerována v době, kdy je nedostatek elektronových akceptorů. Za běžných podmínek ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktasa (FNR) přenáší elektron na NADP⁺ (oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát) za vzniku NADPH (redukováný nikotinamidadeninukleotidfosfát). Ve chvíli, kdy dochází k nadměrné redukci elektrontransportního řetězce, FNR přenáší elektron na O₂, aby zachovala PSII v částečně oxidované formě (Li a Kim, 2021). O₂⁻ je v co nejkratší době přeměněn na méně reaktivní H₂O₂. Tato reakce je zprostředkována jak enzymaticky, a to prostřednictvím superoxidodismutas (Dvořák *et al.*, 2021a), tak může probíhat i spontánně. I když je H₂O₂ méně reaktivní v porovnání s ostatními ROS, tak ve vysokých koncentracích může být taktéž pro buňky toxický. Z tohoto důvodu je detoxifikován pomocí askorbátperoxidasy (APX), které jsou součástí askorbát-glutathionového cyklu. Tyto APX jsou buď asociovány s thylakoidními membránami, nebo mohou být volně uloženy ve strómě (Apel a Hirt, 2004). Vysoce abundantní 2-Cys peroxiredoxiny jsou také zapojeny do detoxifikace H₂O₂ v přítomnosti thioredoxinů (Trx) a NADPH dependentních thioredoxin reduktas (NTRC; Dietz *et al.*, 2002).

2.1.2 Produkce ROS indukovaná methyl viologenem

Methyl viologen (N, N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid; MV), známý taktéž jako paraquat, je velmi účinný, neselektivní herbicid indukující produkci ROS u rostlin. MV je ve světě hojně používaným herbicidem, prostřednictvím kterého jsou kontrolovány traviny rostoucí během pěstování důležitých plodin (Hawkes, 2014). V Evropské unii je však od roku 2007 zakázán. MV je kationtové povahy složený ze dvou pyridinových kruhů, každý z nich obsahuje kvartérní amin, a tím i 2+ náboj. Chemikálie založené na bipyridiniu vykazují velice rychlý příjem rostlinami, z čehož vyplývá jejich vysoká efektivita i za deštivých podmínek. Rychlý vysoušecí účinek po aplikaci a omezený pohyb v pletivech znamenají, že při cílené aplikaci vykazuje bezpečnost pro plodiny (Hawkes, 2014).

Ačkoli je většina jiných herbicidů pasivně transportována přes membrány jako neutrální molekuly, transport pozitivně nabitého MV je nezvyklý. Studie zkoumající mechanismus transportu odhalily dva hlavní způsoby. MV může být transportován pomocí ABC (ATP binding cassette) transportérů, velkých membránových proteinů, které využívají ATP (adenosintrifosfát) k aktivnímu transportu (Xi *et al.*, 2012), nebo pomocí malých antiportérových proteinů, jež vyměňují protony za jiné nabitě molekuly prostřednictvím elektrochemického gradientu (Yerushalmi *et al.*, 1995).

2.1.3 Mechanismus působení MV

MV působí hlavně v chloroplastech. Toxicita se projevuje tím, že katalyzuje na světle závislý elektronový přenos z PSI na molekulu O_2 . Díky jeho redoxnímu potenciálu -446 mV dokáže velmi efektivně odebírat elektrony. Přijetím jednoho elektronu se z dvojmocného kationtu (MV^{2+}) stává redukováný kationtový radikál ($MV^{\cdot+}$). Tato reakce pravděpodobně probíhá ve PSI. Nicméně přesné místo, ze kterého $MV^{\cdot+}$ odebírá elektrony, není doposud jasné (Hawkes, 2014). Krátce po vzniku je $MV^{\cdot+}$ oxidován pomocí molekuly O_2 a vzniká $O_2^{\cdot-}$. Těmito reakcemi dochází k regeneraci MV^{2+} , který může být následně opět redukován na $MV^{\cdot+}$ a takto opakovat celý cyklus vzniku $O_2^{\cdot-}$ (Babbs *et al.*, 1989). Výsledná velmi rychlá produkce $O_2^{\cdot-}$ indukovaná MV překoná endogenní obranné mechanismy a vede k řadě buněčných poškození (Hawkes, 2014). Dalšími chemickými reakcemi se ze $O_2^{\cdot-}$ mohou stát další typy ROS, a to H_2O_2 nebo HO^{\cdot} (Babbs *et al.*, 1989).

MV ovlivňuje nespočet biologických procesů v rostlinách. ROS vyvolané MV významně ovlivňují fotosyntézu, což vede k oxidaci proteinu D1 PSII (Krieger-Liszskay *et al.*, 2011) nebo k inhibici translace proteinu D1 (Nishiyama *et al.*, 2006). Navíc, posléze vznikající H_2O_2 může poškodit komplex uvolňující vodu PSII (Song *et al.*, 2006) a tím i redukovat maximální fotochemickou výtěžnost toho komplexu (Fv/Fm; Krieger-Liszskay *et al.*, 2011). Posléze vzniklé HO^{\cdot} velmi snadno dokážou reagovat s nenasycenými mastnými kyselinami, což může způsobit vážná poškození buněčných membrán. Poškození buněčných membrán může mít za následek uvolnění chlorofylu či dokonce buněčnou smrt (Suntres, 2002; Chen a Dickman, 2004).

Kromě změn na úrovni proteinů, MV způsobuje změny i na úrovni genové exprese. Han *et al.* (2014) zjistili, že MV ovlivňuje expresi 2258 genů, z čehož 818 mělo zvýšenou expresi a 1440 sníženou expresi. Zvýšená exprese byla pozorována hlavně u genů kódujících antioxidantní enzymy (askorbátperoxidasa 4, většina isoform superoxid-dismutas, 2-Cys peroxidoredoxy). Z transkripčních faktorů jsou pozitivně regulovány především zástupci *MYB*, *MYC*, *WRKY* (Han *et al.*, 2014).

2.2 Antioxidační obrana rostlin

Rostlinné buňky produkují ROS i za fyziologických podmínek. Drtivá většina ROS je metabolizována antioxidantními enzymy, které jsou lokalizovány v příslušných organelách. Rovnováha mezi produkcí a detoxikací ROS může být narušena různými

abiotickými a biotickými stresy (Sharma *et al.*, 2012) a musí být udržována, aby nedošlo k poškození buněčných struktur. Buněčné antioxidanty se běžně rozdělují na dvě základní skupiny: antioxidační enzymy, jako jsou superoxiddismutasa (SOD), askorbátperoxidasa (APX), katalasa (CAT), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR), monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR), glutathionreduktasy (GR) a peroxiredoxiny (Prx), a neenzymatické antioxidanty, jako jsou askorbát (ASC), glutathion (GSH), α -tokoferol a karotenoidy (Farooq *et al.*, 2019). Superoxiddismutasám je věnována celá jedna kapitola této práce.

CAT jsou enzymy zodpovědné za detoxikaci H_2O_2 (Tuzet *et al.*, 2019). CAT jako homotetramerní proteiny obsahující železo katalyzují rozklad H_2O_2 na H_2O a O_2 . Obecně se enzymy CAT dělí na monofunkční (dismutační) a bifunkční (dismutační a peroxidační), přičemž druhé jmenované byly identifikovány pouze u prokaryot a nižších eukaryot (Mhamdi *et al.*, 2012). V genomu *A. thaliana* byly identifikovány tři geny *CAT1*, *CAT2* a *CAT3*. CAT jsou lokalizovány v peroxisomech (Du *et al.*, 2008) a hrají důležitou roli v odpovědi rostlin na nepříznivé podmínky prostředí. Všechny tři isoformy jsou nezbytné pro obrannou reakci vůči oxidativnímu stresu (Zhang *et al.*, 2020). *CAT1* se účastní obranných reakcí na stres ze sucha a z nadměrného zasolení (Xing *et al.*, 2007), zatímco *CAT2* hraje úlohu v reakci rostlin na tepelný (nízké i vysoké teploty) stres a stres vyvolaný těžkými kovy (Corpas a Barroso, 2017; Ono *et al.*, 2021). Poslední zástupce této skupiny, *CAT3*, participuje v reakci na stres ze sucha (Zou *et al.*, 2015). Mimo tyto defenzivní úlohy se CAT podílejí na prodlužování kořenů (Yang *et al.*, 2018), vývoji a senescenci listů (Mhamdi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020) a na mnoha dalších biologických procesech v rostlinách. Obecně se tedy dá říct, že CAT jsou rostlině prospěšné a jejich úloha je v mnoha případech velmi různorodá.

Hladiny buněčného H_2O_2 jsou také regulovány prostřednictvím askorbát-glutathionového cyklu, který se skládá ze čtyř enzymů (APX, MDHAR, DHAR a GR) a dvou neenzymatických antioxidantů (ASC a GSH). APX, která je prvním enzymem cyklu, detoxikuje H_2O_2 za současného přenosu elektronu z ASC. Výsledkem této reakce je monodehydroaskorbát (MDHA) a voda (Shigeoka *et al.*, 2002). MDHA je buď přímo redukován zpět na ASC pomocí MDHAR, nebo může podléhat neenzymatické disproportionaci na ASC na dehydroaskorbát (DHA). Dalším krokem cyklu je redukce DHA na ASC zprostředkovaná DHAR, která využívá GSH jako reduktant. DHAR tak pomáhá při regeneraci ASC a hraje důležitou roli při udržování buněčné zásoby ASC

(Gallie, 2012). Stejně jako ASC je důležitá i regenerace GSH, který je regenerován z oxidovaných glutathionových dimerů (GSSG) pomocí NADPH-dependentní GR (Gill a Tuteja, 2010). Askorbát-glutathionový cyklus nejen detoxikuje H_2O_2 , ale také přispívá k udržení buněčných zásob ASC a GSH v různých buněčných kompartmentech (Pandey *et al.*, 2015).

V genomu *A. thaliana* bylo identifikováno devět různých genů pro APX. Jsou lokalizovány v cytosolu (APX1, APX2, APX6), chloroplastech (stromální sAPX, thylakoidní tAPX) a peroxisomech (APX3, APX5; Maruta *et al.*, 2016). APX mají důležitou roli při fotoprotekci buněk (Huang *et al.*, 2019). Stejně jako CAT mají APX velmi rozmanitou funkci v obranných reakcích vůči stresovým podmínkám. APX1 participuje na reakcích rostlin na tepelný stres, stres ze sucha (Koussevitzky *et al.*, 2008; Vanderauwera *et al.*, 2011) a při poranění rostlinných pletiv (Maruta *et al.*, 2012). Úloha APX2 byla prokázána při stresu z nadměrného osvětlení a vysokých teplot (Rossel *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2013). Navíc, cytosolické APX hrají důležitou roli během stresu z nízkých teplot (van Buer *et al.*, 2016). Hrají zásadní roli jako enzymatické regulátory H_2O_2 jakožto signalizační molekuly během vývoje rostlin (Pandey *et al.*, 2017; Chin *et al.*, 2019).

2.2.1 Superoxiddismutasy v rostlinách

Důležitou součástí antioxidačního systému je superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1). SOD představují první linii antioxidační obrany. Jejich hlavní reakcí je přeměna $O_2^{\cdot-}$ na méně reaktivní H_2O_2 a vedlejší produkt, kterým je molekula O_2 (Foyer a Noctor, 2005). Právě touto reakcí předcházejí oxidativnímu poškození v buňkách a také snižují následnou produkci HO^{\cdot} , který se považuje za nejnebezpečnější a nejreaktivnější ze všech ROS (Waszczak *et al.*, 2018).

Řadí se do rodiny metalloenzymů, která ke své funkci vyžaduje kofaktor v podobě kovových iontů. Na základě přítomnosti kovových kofaktorů v jejich aktivním místě se v živých organismech rozlišují čtyři různé SOD, a to FeSOD, MnSOD, NiSOD (není přítomna u vyšších rostlin) a Cu/ZnSOD. V genomu *A. thaliana* byly identifikovány tři geny *FeSOD* (*FSD1*, *FSD2* a *FSD3*), dva *MnSOD* (*MSD1*, *MSD2*) a tři *Cu/ZnSOD* (*CSD1*, *CSD2* a *CSD3*; Kliebenstein *et al.*, 1998; Pilon *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2022).

FeSOD se považuje za evolučně nejstarší SOD. MnSOD je strukturně podobná jako FeSOD (Bannister *et al.*, 1991). Detailní trojrozměrné struktury ukazují, že enzymy

FeSOD a MnSOD mají velmi podobná složení vyšších proteinových struktur a využívají konzervovaná rezidua pro vazbu kovů (Perry *et al.*, 2010). Naproti tomu, Cu/ZnSOD není strukturně příbuzná s předchozími dvěma isoformami a lze ji považovat za evolučně nejmladší. Cu/ZnSOD se pravděpodobně vyvinula v reakci na nárůst O₂ v biosféře. Událost, která vývoji Cu/ZnSOD napomohla, byl fakt, že se železo stalo mnohem méně biologicky dostupným, což zřejmě vedlo k využití mědi jako kofaktoru (Bowler *et al.*, 1994).

U každé SOD je mechanismus katalyzované reakce až na drobné obměny stejný. Zahrnuje místo v proteinové struktuře, které je ohraničeno aminokyselinami s kladnými náboji. Vytvářejí elektrostatický náboj, kterým přitahují O₂⁻ k aktivnímu místu enzymu. Přechodný kov přítomný v aktivním místě poté provádí přenos jednoho elektronu mezi dvěma O₂⁻ a účastní se střídavých oxidačně/redukčních reakcí (Kliebenstein *et al.*, 1998).

Subcelulární lokalizace jednotlivých isoform SOD je přizpůsobena potřebám buněčných kompartmentů. Donedávna jediný zástupce MnSOD, MSD1 u *A. thaliana*, je lokalizován v mitochondriích, kde odbourává O₂⁻ produkovaný v elektrontransportním řetězci (Kliebenstein *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 2008). Chen *et al.* (2022) experimentálně ověřili existenci MSD2, která je lokalizována v apoplastu. Dle doposud zjištěných informací se uvádí, že enzymy CSD2 a FSD2 jsou lokalizovány v blízkosti thylakoidní membrány v chloroplastech, kdežto FSD3 je kolokalizována s chloroplastovými nukleoidy a chrání je před oxidativním poškozením prostřednictvím tvorby heterodimerního komplexu s FSD2 (Myouga *et al.*, 2008; Gallie a Chen, 2019). Dvě isoformy SOD, CSD1 a FSD1, vykazují lokalizaci v cytoplasmě (Kliebenstein *et al.*, 1998; Dvořák *et al.*, 2021a). Poslední zástupce CSD, CSD3, je lokalizován v peroxisomech (Kliebenstein *et al.*, 1998). V nedávných studiích bylo navíc zjištěno, že FSD1 je také lokalizována v jádře a chloroplastové strómě (Dvořák *et al.*, 2021a).

2.2.1.1 Superoxiddismutasa s železným kofaktorem 1 (FSD1)

SOD s kovovým kofaktorem železa jsou dimerní enzymy skládající se ze dvou identických podjednotek (Bowler *et al.*, 1994). Kromě již zmíněné lokalizace byla FSD1 pozorována při osmotickém strese v Hechtových řetězcích a Hechtovém retikulu plasmolyzovaných buněk, které propojují buněčnou stěnu a stažený protoplast (Dvořák *et al.*, 2021a).

Expres *FSD1*, abundance a enzymová aktivita je ovlivněna mnoha faktory, mezi které se řadí dostupnost železnatých (Fe^{2+} ; Waters *et al.*, 2012) a měďnatých kationtů (Cu^{2+} ; Yamasaki *et al.*, 2009), poté dostupnost dusíku (Mermod *et al.*, 2019) a sacharosy jakožto zdroje energie pro buňky (Dugas a Bartel, 2008). Expres *FSD1* se zvyšuje při nízké dostupnosti Cu^{2+} , kdežto v případě exprese *CSD1* a *CSD2* je trend opačný. S nízkou koncentrací Cu^{2+} dochází k poklesu jejich exprese. Naopak při dostatku Cu^{2+} se exprese *CSD1* a *CSD2* zvyšuje, zatímco exprese *FSD1* klesá na minimální úroveň (Cohu *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009). Tyto informace naznačují, že rostlinný systém je tímto způsobem připraven reagovat na případné výkyvy či nedostatky v dostupnosti těchto iontů.

Transkripční faktor SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 (SPL7) je považován za důležitý regulátor reakcí na měnící se hladinu Cu^{2+} . SPL7 striktně kontroluje expresi výše zmíněných SOD v závislosti na Cu^{2+} (Cohu *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009). Kromě toho, SPL7 reguluje homeostázu měďnatých kationtů (Yamasaki *et al.*, 2009). Ve chvíli, kdy je Cu^{2+} nedostatek, SPL7 se váže GTAC motivy v oblasti promotoru *FSD1*, čímž ovlivňuje její expresi. Zajímavé je, že tento transkripční faktor také zprostředkovává snížení hladin mRNA *CSD* pomocí miRNA398 v těchto podmínkách (Yamasaki *et al.*, 2009).

Melicher *et al.* (2022) tuto závislost zkoumali detailněji. Bylo prokázáno, že *FSD1* chrání fotosyntetický aparát, konkrétně PSII, před oxidativním poškozením po aplikaci MV. Tato schopnost chránit PSII je značně závislá na koncentraci Cu^{2+} . Měření fotosyntetické aktivity a kvantové výtěžnosti odhalila, že náchylnost mutantních rostlin *fsd1* je závislá na koncentraci Cu^{2+} , přičemž k nejvyšší inhibici došlo při úplné absenci Cu^{2+} v růstovém médiu. Inhibice byla méně výrazná a do značné míry nezávislá na Cu^{2+} u rostlin divokého typu a komplementovaných linií *FSD1*-GFP (Melicher *et al.*, 2022).

Absence exprese *FSD1* v mutantních rostlinách *fsd1* vedla ke snížené schopnosti odbourat O_2^- (Melicher *et al.*, 2022). Dlouhodobé působení MV také razantně snížilo hladiny ASC u *fsd1* mutantních rostlin a linie GFP-*FSD1*, zatímco u rostlin divokého typu byl pozorován méně razantní pokles. Navíc, MV způsobil zvýšení podílu oxidovaného ASC v porovnání s redukováným ASC u všech linií, přičemž u mutantních linií *fsd1* a linie GFP-*FSD1* byla zjištěna vyšší míra oxidace ASC ve srovnání s divokým typem (Melicher *et al.*, 2022).

Jak již bylo zmíněno výše, FSD1 je důležitý enzym při ochraně vůči oxidativnímu stresu. Nejen, že chrání PSII před inaktivací a poškozením, ale také chrání plasmatickou membránu před jejich poškozením vzniklým peroxidací (Van Breusegem *et al.*, 1999). Kromě oxidativního stresu se FSD1 aktivně účastní obranných reakcí vůči osmotickému stresu odbouráváním vzniklých ROS (Dvořák *et al.*, 2021a).

Kromě antioxidační obrany vůči stresovým podmínkám má FSD1 důležitou úlohu při vývoji organismu. FSD1 má výraznou roli při klíčení semen. Byla pozorována její vysoká abundance při ruptuře endospermu, následném vytváření primárních kořenů, obzvláště v transientní a prodlužovací zóně, a v pozdějších fázích vývoje v děložních a pravých listech (Dvořák *et al.*, 2021a). FSD1 je vývojově regulována a je hojně exprimována v raných vývojových stádiích (Dvořák *et al.*, 2021a).

Exprese genů *SPL7* a *FSD1* je regulována cirkadiálními rytmy (Perea-García *et al.*, 2016). Aktivita FSD1 je navíc zprostředkována přímou interakcí s chloroplastovým čaperoninem 20 (CPN20; Kuo *et al.*, 2013) a částečně ovlivněna mitogenem aktivovanými proteinkinasami (Takáč *et al.*, 2014). Tento protein je známý čaperonin lokalizovaný v chloroplastech, konkrétně ve strómě (Weiss *et al.*, 2009). Během inkubace CPN20 a FSD1 se aktivita enzymu zvyšovala se zvyšujícím se množstvím CPN20 (Kuo *et al.*, 2013).

FSD1, stejně jako *CPN20*, vykazovaly vyšší expresi u *anp2anp3*, dvojitého mutanta *A. thaliana* s chybějící expresí *ANP2* a *ANP3* (*Arabidopsis* nucleus-phragmoplast-localized kinase 2, 3), patřící mezi MAPKKK (mitogenem aktivované proteinkinasy kinasy kinasy). Tento jev koreloval s vyšší odolností dvojitých mutantů vůči oxidativnímu stresu (Takáč *et al.*, 2014). Z těchto informací vyplývá, že tyto MAPKKK mohou negativně ovlivňovat FSD1.

2.2.1.2 Superoxiddismutasy FSD2 a FSD3

V porovnání s FSD1 mají FSD2 a FSD3 u *A. thaliana* výraznější vliv na vegetativní růst rostliny. U mutantních rostlin, u kterých byl umlčen gen pro FSD2, byl pozorován zpomalený růst a vybledlé listy. U rostlin s umlčeným *FSD3* genem byly dopady markantnější. Rostliny měly silně redukováný obsah chlorofylu, velmi zpomalený růst, až mnohdy došlo k uhynutí rostlin (Myouga *et al.*, 2008).

Už dříve bylo experimentálně dokázáno, že se všechny tři isoformy FeSOD účastní obrany vůči oxidativnímu stresu (Kliebenstein *et al.*, 1998). Zvýšená exprese

jednotlivých isoformem vedla ke zvýšení odolnosti vůči oxidativnímu stresu indukovaném MV (Van Camp *et al.*, 1996). Myouga *et al.* (2008) zjistili, že se FSD2 a FSD3 účastní vývoje plastidů. U mutantních rostlin *fsd2* a *fsd3* byly objeveny silně vakuolizované plastidy, které postrádaly vnitřní membránové struktury, jako jsou jednotlivé stromální thylakoidy a správně uspořádané thylakoidy grán (Myouga *et al.*, 2008; Gallie a Chen, 2019).

FSD2 a FSD3 jsou lokalizovány v thylakoidech, nikoli ve strómě. Společně vytvářejí heterodimer, který plní funkce v chloroplastových nukleoidech (Myouga *et al.*, 2008). Z těchto poznatků vznikla otázka, zda se tyto proteiny mohou navzájem nahrazovat v antioxidační funkci. Zvýšená exprese *FSD2* není schopná kompenzovat umlčení *FSD3*, protože rostliny nepřežily déle než do stádia semenáčku. Naproti tomu, *FSD3* ztrátu *FSD2* mohla kompenzovat, ale jen částečně. Rostliny byly zelenější, dospělé rostliny dosahovaly většího vzrůstu, byla u nich naměřena podobná fixace oxidu uhličitého jako u divokého typu, ale kompenzace byla vždy jen částečná (Gallie a Chen 2019).

Mimo *FSD1*, *CPN20* také přímo interaguje s *FSD2* a *FSD3* a zvyšuje jejich enzymatickou aktivitu. Schéma jejich vzájemné koexistence je velmi podobné. Se zvyšujícím se množstvím *CPN20* se také zvyšuje aktivita *FSD2* a *FSD3* (Kuo *et al.*, 2013).

Mimo zapojení *FSD2* a *FSD3* v obraně vůči oxidativnímu stresu bylo nedávno objevena spojitost mezi těmito enzymy a obrannou vůči stresu z vysokých teplot. Během vystavení *fsd2* a *fsd3* vyšším teplotám (30°C) došlo ke změně v abundanci některých zástupců tzv. heat shock proteinů (HSP). U těchto mutantních rostlin také došlo ke změnám v množství mRNA chloroplastových genů. U genů kódujících enzymy pro syntézu tetrapyrólů, protochlorofylid oxidoreduktasu a světlosběrnou anténu PSII došlo k výraznému snížení abundance (Bychkov *et al.*, 2022).

Nedávno byla identifikována varianta *FSD3* vznikající alternativním sestřihem mRNA. Oproti *FSD3* obsahuje varianta *FSD3S* pouze 6 exonů a odlišují se v C-terminální části. Tento protein vykazoval velmi podobnou enzymatickou aktivitu jako *FSD3* (Sangyool *et al.*, 2019). Tato varianta se lišila subcelulární lokalizací, kdy *FSD3S* byla lokalizována v porovnání s *FSD3* v celém chloroplastu (Sangyool *et al.*, 2019), kdežto *FSD3* byla lokalizována v tečkovitých strukturách v thylakoidech (Myouga *et*

al., 2008). Zvýšená exprese FSD3S nijak neovlivnila odbourávání O_2^- v rostlinách. Navíc ovlivnila tvorbu chlorofylu a růst rostlin, negativně ovlivňuje vývoj chloroplastů a expresi genů potřebných pro fotosyntézu (Sangyool *et al.*, 2019).

2.3 Signalizace pomocí ROS

V komplexním subcelulárním prostředí rostlinných buněk dochází k cílené tvorbě ROS a následné aktivaci různých cest přenosu signálu v kompartmentech. Signalizace v apoplastu a na buněčné membráně se označuje jako „vnější“, v cytosolu a jádře jako „vnitřní“ a přenos signálu mezi buněčnými organelami jako „organelová“ (Mittler *et al.*, 2022).

2.3.1 Vnější ROS signalizace

Apoplast a buněčná stěna obsahují širokou škálu enzymů, které buď snižují koncentraci ROS, nebo je aktivně produkují. Mimo enzymy se zde nachází mnoho neenzymatických antioxidantů. Mezi enzymy mající největší roli při signalizaci prostřednictvím ROS v apoplastu se řadí NADPH oxidasy (kódované geny *RBOH* – respiratory burst oxidase homolog) a apoplastické peroxidasy. Důležitou úlohu mají taktéž aquaporíny (AQP), které slouží také k transportu H_2O_2 z periplasmatického prostoru do cytosolu (Mittler *et al.*, 2022).

RBOH jsou vysoce regulované transmembránové proteiny využívající cytosolické molekuly NADPH k produkci O_2^- , který je velmi rychle konvertován buď spontánně, nebo enzymaticky pomocí superoxidodismutasy na H_2O_2 (Smirnoff a Arnaud, 2019). RBOH se nacházejí na plasmatické membráně v tzv. nanodoménách společně s pomocnými proteiny, které se podílejí na jejich regulaci (Nagano *et al.*, 2016; Martinière *et al.*, 2019). Produkce ROS skrze RBOH může být regulována vápenatými ionty (Ogasawara *et al.*, 2008), fosforylací anebo defosforylací (Kimura *et al.*, 2020) či navázáním kyseliny fosfatidové (Zhang *et al.*, 2009). RBOH je aktivována různými stresovými faktory a velmi širokou škálou dalších stimulů, což má za následek významnou produkci ROS v apoplastu (Miller *et al.*, 2009). Peroxidasy taktéž produkují a zhášejí ROS a tímto regulují hladiny apoplastických ROS v odpovědi na podněty z prostředí (Kämän-Toth *et al.*, 2019).

ROS akumulující se v apoplastu mohou přímo či nepřímo interagovat s receptory, oxidovat antioxidanty či jiné proteiny, nebo regulovat vápenaté či draselné transportní kanály (Mittler *et al.*, 2022). Nicméně, k tomu, aby mohly apoplastické ROS regulovat intracelulární signální dráhy, jsou nejdříve přeneseny pomocí AQP dovnitř buňky. AQP jsou kanály urychlující primárně transport vody, ale umožňují také transport H_2O_2 (Maurel *et al.*, 2015) a jiných substancí (glycerol, močovina; Gomes *et*

al., 2009; Zwiazek *et al.*, 2017). Propustnost AQP je regulováno rozdílnými posttranslačními modifikacemi (fosforylace, acetylace), které se odvíjejí od působících stresových podmínek (Wang *et al.*, 2020). Kromě transportu pomocí AQP mohou být některé ROS (např. H₂O₂) přenášeny prostřednictvím difúze (Mittler *et al.*, 2004).

Protože produkce ROS prostřednictvím RBOH a transport ROS prostřednictvím AQP jsou regulované procesy, mohou být hladiny ROS v apoplastu a cytosolu a jejich signalizační funkce aktivně řízeny. Kvůli všem výše zmíněným faktům a vlastnostem se rozhraní apoplast-cytosol stává hlavním centrem mnoha procesů přenosu signálů spojených s ROS (Mittler *et al.*, 2022).

ROS mohou zprostředkovávat také mezibuněčnou signalizaci. ROS mohou být přenášeny z výchozího pletiva do vzdálených pletiv během několika minut, což umožňuje rostlinám dosáhnout systémově získané aklimatizace (SAA) při stresových podmínkách (Mittler *et al.* 2011; Gilroy *et al.* 2016). Různé typy stresových faktorů (poranění, teplo, vysoká salinita) spouštějí produkci apoplastických ROS, která je závislá na funkci RBOH lokalizovaných v plasmatické membráně, které produkují O₂⁻ na apoplastické straně buňky. O₂⁻ může být rychle přeměněn na H₂O₂ extracelulární SOD (Fichman *et al.*, 2022; Zandalinas *et al.*, 2020).

ROS zprostředkované RBOHD vstupují do sousedních buněk a vyvolávají přechodné zvýšení koncentrace vápenatých iontů, čímž následně dochází k aktivaci proteinkinasy, jako je CPK5 (calcium dependent protein kinase 5). CPK5 fosforyluje a aktivuje RBOHD, čímž vzniká vlna ROS a vápenatých iontů, která funguje jako komunikační prostředek mezi buňkami na dlouhé vzdálenosti (Dubiella *et al.* 2013; Hake a Romeis, 2019). Mezi další významné mechanismy šíření ROS vlny je fosforylace RBOHD a RBOHF pomocí CIPK26 (calcineurin B-like protein interacting protein kinase 26; Steinhorst a Kudla, 2014) a tonoplastický kanál TPC1 (two-pore channel 1) aktivovaný ROS, který uvolňuje Ca²⁺ do cytosolu během stresové reakce (Pottosin a Dobrovinskaya, 2022).

2.3.2 Vnitřní ROS signalizace

Cytosol obsahuje mechanismy, které jak zhášejí ROS, tak je dokážou produkovat. Jsou schopny regulovat hladiny ROS vyprodukované přímo v cytosolu, ale i ty transportované z apoplastu, a přenést je až do jádra (Shapiguzov *et al.*, 2012). Kromě toho, cytosol obsahuje signalizační dráhy, jako jsou kaskády MAPK (mitogenem

aktivované proteinkinasy), protein kinasy závislé na vápníku, malé GTPasy ROC/RAC, fosfatasy a různé sítě redoxních senzorů, které integrují signály ROS s dalšími signálními molekulami, jako jsou vápenaté ionty a různé hormony (Zhu, 2016).

Vzhledem k tomu, že se AQP nacházejí na plasmatické membráně, může být H₂O₂ transportován oběma směry, což umožňuje rychlé změny jeho koncentrace (Chan *et al.*, 2016). Kromě toho jsou v cytosolu přenášeny anterográdní a retrográdní signály mezi jednotlivými organelami a jádrem. Cytosol tedy hraje důležitou roli při rozpoznávání a integraci ROS generovaných v různých částech buňky a přenáší informace do jádra. Navíc, v cytosolu dochází k aktivaci mnoha transkripčních regulátorů v závislosti na ROS a redoxních stavech dříve, než tyto proteiny vstoupí do jádra (Zhou *et al.*, 2022).

V porovnání s cytosolickou regulací je regulace ROS a redoxních hladin v jádře málo známá. Rostlinné jádro obsahuje několik proteinů (FSD1, CAT) regulujících ROS a redoxní rovnováhu, jako jsou Grx, Trx, peroxiredoxiny a glutathionredoxiny (Marchal *et al.*, 2014). Ty mohou regulovat oxidativní posttranslační modifikace transkripčních faktorů a také tlumit signály ROS v jádře. Zjištění, že mnoho redoxně reagujících transkripčních faktorů je aktivováno v cytosolu před vstupem do jádra, naznačuje, že hladiny ROS v jádře jsou velmi striktně regulovány, aby se předešlo extrémním výkyvům, které by mohly způsobit poškození a mutace DNA (Li *et al.*, 2019).

2.3.3 Meziorganelová signalizace

Hladiny ROS v jednotlivých organelách jsou dány souhrnem tří procesů: autonomní regulací organel, retrográdní či anterográdní regulací řízenou jádrem a přímým exportem a importem ROS. Některé signály zprostředkované ROS mezi organelami nebo z organel do jádra nemusí procházet cytosolem nebo jím procházejí jen na velmi krátké vzdálenosti (Exposito-Rodriguéz *et al.*, 2017). V tomto procesu hrají roli nejméně tři různé mechanismy: fyzické přiblížení mezi organelami, spojení mezi organelami a jádrem (stromuly, peroxuly a matrixuly), a proteinové komplexy mezi organelami, které vytvářejí membránová kontaktní místa a mohou obsahovat AQP (Exposito-Rodriguéz *et al.*, 2017).

Hladina ROS v jedné organelě může ovlivnit hladinu ROS v jiné organelě včetně jádra prostřednictvím metabolitů, hormonů a proteinů (Chan *et al.*, 2016). Reakce na stresové podněty primárně spouštějící vnější nebo vnitřní ROS signalizaci by

tedy mohly být prostorově a/nebo časově odděleny od reakcí na stresy zprostředkované signalizační dráhou ROS mezi organelami nebo mezi organelami a jádrem. Tyto rozdíly mohou být mechanismem, kterým ROS předávají jádru specifické informace o typu stresu, kterému rostliny čelí a odolávají (Mittler *et al.*, 2022).

Informace o tom, jak se v buňkách během stresu vytvářejí signatury ROS a jak jsou hladiny ROS v organelách vzájemně propojeny, naznačují, že jednotlivé typy stresových podnětů mohou vytvářet rozdílné dráhy ROS specifické pro konkrétní stres. Ty by mohly být rozeznány vícero senzory ROS v různých organelách. Detekce stresového faktoru a následné spuštění specifické reakce je tedy spíše reakce způsobující komplexní buněčnou reakce (Mittler *et al.*, 2022).

2.4 Redox a oxidativní modifikace proteinů způsobené ROS

Místně specifická kovalentní modifikace aminokyselinových zbytků proteinů reprezentuje významný molekulární mechanismus přeměny oxidačního signálu do biologické odpovědi. Aminokyseliny, které jsou nejvíce náchylné k reverzibilním modifikacím, jsou cysteiny a methioniny, jejichž thiolové (sulfhydrylové) postranní řetězce jsou ve fyziologickém pH deprotonované. Tato vlastnost je klíčová pro zvyšování reaktivity. Kromě cysteinu a methioninu mohou ROS modifikovat i jiné aminokyseliny, a to histidin, tryptofan, tyrosin (Jacob a Winyard, 2009).

Síra má v organismu velmi cenné a jedinečné postavení díky svým vlastnostem setrvávat v široké škále oxidačních stavů (-2 až +6) a chemicky jedinečných forem, z nichž každá má odlišné fyzikální vlastnosti, odlišnou reaktivitu a způsob vzniku (Jacob a Winyard, 2009). Redoxní reakce cysteinových zbytků mohou vést k řadě posttranslačních modifikací, které jsou důležitým mechanismem regulace proteinů. Mezi tyto modifikace patří jak reverzibilní, mající regulační funkci (disulfidy, S-glutathionylace, sulfenové kyseliny, sulfenamidy, S-nitrosylace), tak ireverzibilní (sulfinové kyseliny, sulfonové kyseliny a sulfoamidy), které jsou často považovány za indikátory oxidativního stresu a onemocnění (Moldogazieva *et al.*, 2018). Reverzibilita mnoha oxidačních posttranslačních modifikací cysteinových zbytků zdůrazňuje jejich schopnost fungovat jako binární přepínač, který reguluje funkci, interakce a lokalizaci proteinů, podobně jako fosforylace (Paulsen a Carroll, 2013).

2.4.1 Reaktivita cysteinů a náchylnost k oxidaci

Ionizační konstanta (pK_a) nízkomolekulární thiolových skupin se pohybuje v rozmezí mezi 8,3 až 8,8. Nicméně, hodnota pK_a cysteinových zbytků v rámci proteinů je velmi ovlivněna lokálním prostředím samotné skupiny, jako například vzdáleností kladně nabitých aminokyselin (Lutolf *et al.*, 2001), vodíkovými vazbami (Roos *et al.*, 2013) a lokalizací N-terminálního konce α -helixu (Iqbalsyah *et al.*, 2006). Thiolové skupiny mající nízkou hodnotu pK_a v proteinech, ionizující primárně při fyziologickém pH, se často nazývají jako „reaktivní cysteiny“ (Marino a Gladyshev, 2012).

Ačkoli molekulární podstata není doposud zcela objasněna, tak experimentální důkazy ukazují, že ne všechny cysteinové zbytky v proteinech jsou stejně citlivé na oxidaci. Protože thioláty jsou mnohem silnější nukleofily než thiolové skupiny, je jedním z klíčových faktorů náchylnosti k oxidaci nízká pK_a . Tento fakt je zvýrazněn

tím, že mnoho biologických oxidantů, jako je H_2O_2 , reaguje výhradně s thiolátovým aniontem (Winterbourn a Hampton, 2008).

2.4.2 Modifikace cysteinů pomocí ROS a RNS

Reakce ROS s thiolovými skupinami proteinů představuje mechanismus, kterým buňky mohou vnímat změny v redoxní homeostáze. Ačkoli je H_2O_2 nejčastěji spojován s rolí sekundárního posla a je považován za molekulu vhodnou pro redoxní modifikace, tak existují experimentální důkazy, které ukazují, že v této funkci funguje také O_2^- . Některé studie prokázaly, že rozdílné gradienty O_2^- a H_2O_2 odlišně regulují proliferaci a diferenciaci kořenů rostlin, což naznačuje odlišné reaktivity těchto ROS (Tsukagoshi *et al.*, 2010). O_2^- je relativně nereaktivní a pravděpodobně jeho primárními buněčnými cíli jsou jiné radikálové formy, jako je oxid dusnatý (NO) nebo kovy. V proteinech může reagovat s klastry železa a síry a hemovými centry, což vede k uvolnění a/nebo oxidaci železa (Winterbourn a Metodiewa, 1999). Na O_2^- je citlivá řada proteinů obsahujících klastry železa a síry, například akonitasa, (Gardner a Fridovich, 1991) myeloperoxidasa (Kettle *et al.*, 2007).

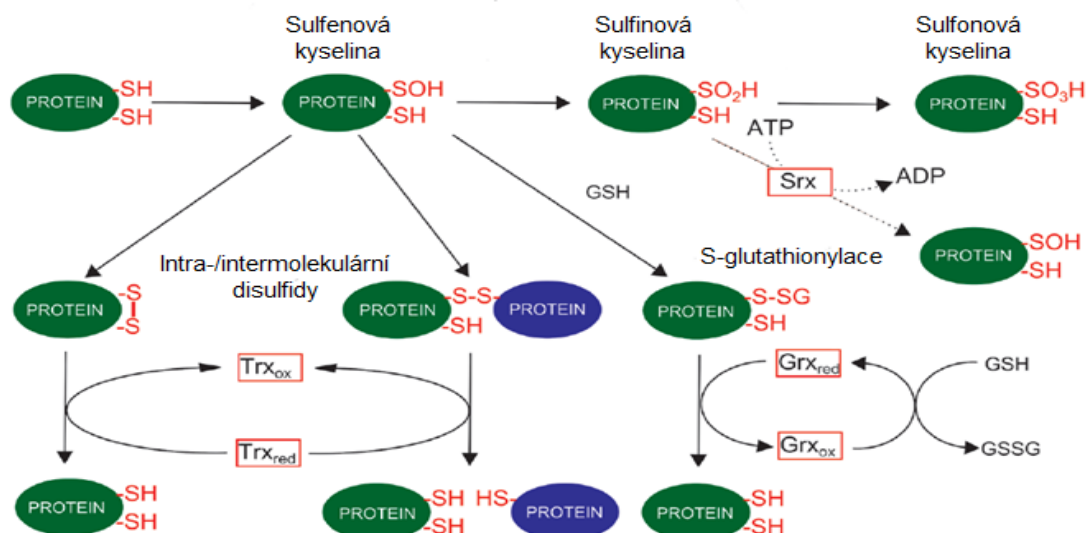
Jak již bylo zmíněno, v biologických systémech se jako nejvýznamnější aktér v redoxních modifikacích považuje H_2O_2 . Kromě thiolové skupiny, se kterou nejčastěji reaguje a oxiduje, může také reagovat s thioesterovou skupinou methioninu za vzniku methioninsulfoxidu (Bobrowski *et al.*, 2007). Dvouelektronovou oxidací thiolové skupiny pomocí H_2O_2 vzniká kyselina sulfenová (R-SOH; Obr. 3), o které se stále objevují důkazy o jejím působení v řadě důležitých biochemických procesů. Po vzniku podléhá kyselina sulfenová několika alternativním stavům. V závislosti na mikroprostředí může být modifikace na kyselinu sulfenovou stabilizována (Salsbury *et al.*, 2008). V tomto případě existuje několik faktorů, které této reakci napomáhají, a to nepřítomnost thiolových skupin v blízkosti nebo nedostupnost nízkomolekulárních látek s thiolovými skupinami (GSH; Reddie a Carroll, 2008).

Nadále může reakcí kyseliny sulfenové s thiolovou skupinou jiného proteinu vzniknout inter/intramolekulární disulfidový můstek nebo reakcí s GSH poté vzniká protein-S-SG (S-glutathionylace; Obr. 3). U některých proteinů může alternativně s kyselinou sulfenovou reagovat dusíkový atom amidové skupiny za vzniku cyklického sulfenamidu. K tomuto jemu dochází hlavně v případě, kdy protein postrádá sousední cystein (Lee *et al.*, 2007). Tvorba disulfidických můstků a S-glutathionylace chrání před

ireverzibilní oxidací a trvalým poškozením proteinů, protože vazby S-S a S-SG mohou být redukovány prostřednictvím aktivity enzymů jako Trx či Grx (Berndt *et al.*, 2007).

Rostliny jsou vybaveny složitým systémem, který využívá právě zmíněné Trx a Grx. Genom *A. thaliana* kóduje 44 Grx a 50 Trx (Meyer *et al.*, 2012). V závislosti na subcelulární lokalizaci, Trx využívají k redukci intra-/intermolekulárních disulfidových vazeb více redukčních činidel. V chloroplastech světelné reakce redukují ferredoxin (Fdx), který zase redukuje ferredoxin-thioredoxin reduktasu (FTR), která nakonec regeneruje sulfhydrylové skupiny Trx (Schürmann a Buchanan, 2008). Dalším zdrojem vodíkových protonů, společným pro systémy Trx a Grx, je NADPH, který je po oxidaci na NADP^+ redukován Fdx: NADP^+ reduktasou ve strómě chloroplastu a také během oxidativní pentosofosfátové dráhy. Zatímco Trx jsou přímo redukovány NADPH-dependentními thioredoxin reduktasami, Grx se zapojují do dvoustupňové reakce za účasti GSH a NADPH-dependentních glutathion reduktas (Waszczak *et al.*, 2015).

Všechny výše zmíněné posttranslační modifikace thiolových skupin jsou reverzibilní a mnohdy mají regulační či signální funkci. Nicméně, v přítomnosti přebytku H_2O_2 může být kyselina sulfenová přeměněna a dále oxidována na kyselinu



Obrázek 3. Oxidativní posttranslační modifikace cysteinových zbytků. Vystavení redoxně aktivních cysteinových zbytků reaktivním formám kyslíku vede k reverzibilní tvorbě kyseliny sulfenové. Může reagovat s volnou thiolovou skupinou na stejném nebo dalším proteinu za vzniku disulfidové vazby. Tyto modifikace jsou reverzibilní a mohou být redukovány glutaredoxinem (Grx), nebo thioredoxinem (Trx). V přítomnosti vysokých hladin ROS může dojít k ireverzibilní oxidaci na kyselinu sulfinovou nebo sulfonovou. Převzato a upraveno od Waszczak *et al.*, 2015.

sulfinovou (RSO₂H) či sulfonovou (RSO₃H; Obr. 3). Tyto dvě modifikace jsou považovány za ireverzibilní a jako příznaky výrazného oxidativního poškození (Roos a Messens, 2011).

H₂O₂ není jedinou molekulou, která může reagovat s thiolovými skupinami. Další důležitou molekulou je NO. NO je v nízkých koncentracích přítomen ve všech buňkách. Je všeobecně známo, že produkce NO je zvýšena během reakce rostlin na stresové podmínky a působí jako signál, jehož signální dráhy se částečně překrývají se signálními dráhami H₂O₂ (Zago *et al.*, 2006). Tato modifikace zahrnuje kovalentní navázání nitrosylového radikálu (\cdot NO) k thiolové skupině cysteinu. Bohužel tato reakce neprobíhá přímo. Byly tedy navrženy dva mechanismy, které vysvětlují tvorbu S-nitrosothiolu (Paulsen a Carroll, 2013).

Prvním mechanismem je přeměna \cdot NO na sloučeninu N₂O₃ (oxid dusitý). Počáteční reakce \cdot NO s molekulárním O₂ za vzniku \cdot NO₂ je následována spojením dvou radikálů, \cdot NO a \cdot NO₂, což umožňuje vznik N₂O₃ (Goldstein a Czapski, 1996). N₂O₃ může následně reagovat s thiolovou skupinou proteinu za vzniku S-nitrosothiolu. Alternativně může \cdot NO₂ podporovat jedoelektronovou oxidaci proteinu za vzniku thylradikálu, který může reagovat s \cdot NO za vzniku S-nitrosothiolu (Chen *et al.*, 2011).

Podobně jako u jiných oxidačních posttranslačních modifikací se specifická modifikace řídí reaktivitou cysteinu, lokálním prostředím proteinu a blízkostí zdroje oxidantu. Touto reakcí vzniká řada produktů podobných reakcí s H₂O₂, včetně disulfidů a sulfenových, sulfinových a sulfonových kyselin, jakož i S-nitrosothiolů (Costa *et al.*, 2003). S-nitrosothiolová skupina nepodléhá ionizaci (Paige *et al.*, 2008), může ale podléhat hydrolyze za vzniku kyseliny sulfenové, (Moran *et al.*, 2011) nebo reagovat s thiolovou skupinou. Zajímavé je, že reakce S-nitrosothiolu s thiolovou skupinou proteinu nebo GSH nevede vždy ke vzniku disulfidové vazby, ale může místo toho usnadnit proces známý jako transnitrosylace. Schopnost transnitrosylace je způsobena odlišnými chemickými vlastnostmi ⁺NO ve srovnání s hydroxyem v kyselině sulfenové (Doulias *et al.*, 2010; Seth a Stamler, 2011).

Vzhledem k tomu, že S-nitrosothiolové skupiny mají tendenci se účastnit transnitrosylačních reakcí, existují redukční systémy, které S-nitrosylované thiolové skupiny redukují. GSH může redukovat S-nitrosothiol za vzniku volné thiolové skupiny a GSNO (nitrosylovaný GSH), který je zase redukován za účelem regenerace GSH

a uvolnění HNO (kyselina dusná) pomocí GSNO reduktas (GSNOR; Bateman *et al.*, 2008). Proteinové S-nitrosothioly mohou být také redukovány systémem Trx/TrxR (Behnar *et al.*, 2008).

Kromě dvou výše zmíněných posttranslačním modifikacím probíhajících na cysteinových zbytcích proteinů existuje ještě celá řada dalších, které mohou probíhat na tryptofanu, jehož oxidací na atomu síry vzniká *N*-formylkynurenin (Navrot *et al.*, 2011) nebo methioninu, který podléhá oxidaci atomu síry za vzniku sulfoxidu (Tola *et al.*, 2021). Lze tedy říct, že posttranslačních modifikací proteinů je hojné množství a že zastávají velmi důležité funkce.

2.4.3 Redoxní biologie v průběhu stresových podmínek v chloroplastech

Metabolismus ROS a redoxní stav organel v chloroplastech a mitochondriích jsou klíčové pro retrográdní signály, které hrají důležitou roli v přizpůsobení rostlin na proměnlivé podmínky prostředí (Foyer *et al.*, 2017). Změny v chloroplastové redoxní homeostáze jsou tedy buď posílány do jádra retrográdní cestou, nebo prostřednictvím metabolitů do cytoplasmy.

Redoxní stav chloroplastů je důležitý pro redoxně regulovanou genovou expresi při abiotických stresech, zejména při oxidativním stresu a stresu z nadměrného osvětlení, které výrazně mění homeostázu ROS. V chloroplastech je signalizace ROS modulována redoxním stavem plastochinonů a hraje klíčovou roli v aklimatizaci rostlin, včetně změny exprese antioxidantních a obranných genů a změněné fosforylace thylakoidních proteinů (Li *et al.*, 2009; Mittler *et al.*, 2011). Chloroplastové kinasy a fosfatasy jsou důležité při udržování vysoké fotosyntetické aktivity a redoxního stavu při různých abiotických stresech (Schliebner *et al.*, 2008). U *A. thaliana* se uvádí, že proteinkinasa STN7 (serin/threoninová proteinkinasa 7) může ovlivnit Mg-protopoyrfirín IX, který slouží jako retrográdní signál do jádra, kde řídí expresi obranných genů (Li *et al.*, 2009; Pesaresi *et al.*, 2009).

Procesy redoxní regulace a metabolismu ROS v buněčných kompartmentech jsou vzájemně propojeny a podílejí se na optimalizaci buněčných funkcí. Ačkoli každý kompartment má schopnost produkovat a řídit svou vlastní homeostázu ROS, gradienty redoxního stavu vytvářejí specifický signál ROS (Choudhury *et al.*, 2016). Tento signál ROS je pak prostřednictvím AQP přenášen do cytosolu a modifikuje redoxní stav důležitých regulačních proteinů (např. transkripčních faktorů ovlivňujících expresi

jaderných genů) a v konečném důsledku aktivuje aklimatizační reakce (Choudhury *et al.*, 2016; Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016). Pro iniciaci specifických odpovědí na vývojové a environmentální signály se však signály ROS integrují také s dalšími součástmi buněčných signálních drah, jako jsou reaktivní formy dusíku, hormony a intracelulární toky vápenatých iontů (Baxter *et al.*, 2014; Sewelam *et al.*, 2016).

Buněčný metabolismus ROS je spjat se signální dráhou MAPK, která reguluje ROS a redoxní homeostázu (Liu a He, 2017). MAPK kaskády mohou být přímo aktivovány H₂O₂ prostřednictvím MAPKKK nebo inaktivací represorů MAPK (Liu a He, 2017). Studie odhalily, že aplikace exogenního H₂O₂ může aktivovat komponenty kaskád MAPK (MPK3 a MPK6) a podílet se na signálních drahách reakce vůči oxidativního stresu (Kovtun *et al.*, 2000). Experimenty s využitím transienční exprese v protoplastech ukázaly, že aktivace MPK3 a MPK6 vyžaduje ANP1 (MAPKKK), která může být stimulována H₂O₂ a může iniciovat kaskádu MAPK pro následnou expresi genů reagujících na stres (Kovtun *et al.*, 2000). Taktéž bylo prokázáno, že stresové podněty generující H₂O₂ indukují expresi genu *OXI1* (oxidative signal-inducible1) kódujícího serin/treoninovou proteinkinasu, která je nezbytná pro aktivaci MPK3 a MPK6 (Rentel *et al.*, 2004). Studie identifikovaly *OXI1* jako klíčový signální prvek v signálních drahách závislých na H₂O₂ produkovaném respiračním vzplanutím (respiratory burst) i na ¹O₂ generovaném chloroplastem (Shumbe *et al.*, 2016). Signální dráha H₂O₂ je integrována se složkami dráhy MAPK a reguluje genovou expresi v obranných a hypersenzitivních reakcích. Naopak, stimulace *OXI1* závislá na ¹O₂ ovlivňuje signální dráhu kyseliny jasmonové, která řídí dráhu programované buněčné smrti spojené s ¹O₂ (Shumbe *et al.*, 2016).

Navíc, MPK6 je silně exprimována při stresu z vysokého osvětlení a reguluje expresi transkripčních faktorů ERF6 a ERF104 (ethylene response factor) jako složek retrogradní signalizace mezi chloroplastem a jádrem, která může být klíčová pro toleranci rostlin vůči kolísavým světelným podmínkám (Vogel *et al.*, 2014). Všechny tyto informace naznačují, že retrogradní signální dráhy indukované ROS působí jako důležité regulátory obrany rostlin proti abiotickým stresům.

2.4.4 Redoxní regulace transkripčních faktorů

ROS mohou přímo či nepřímo interagovat s transkripčními faktory (TF) a tím modulovat jejich konformaci, lokalizaci či aktivitu. TF tepelného šoku (Hsf)

zprostředkovávají rychlé přizpůsobení transkripce při působení stresových faktorů (Scharf *et al.*, 2012). Bylo prokázáno, že podskupina Hsf zprostředkovává časnou odpověď na vysoké osvětlení a u jednoho z nich (HSFA1D) bylo zjištěno, že je při vysokém osvětlení translokován z cytosolu do jádra (Jung *et al.*, 2013). Při opětovných experimentech se tento TF skutečně při působení H₂O₂ přemístil z cytosolu do jádra. Tato translokace závisí na přítomnosti specifických cysteinových zbytků (Dietz, 2014).

NPR1 (non-expresser of pathogenesis related gene 1) je klíčový transkripční koaktivátor, který reguluje imunitní odpověď rostlin závislou na kyselině salicylové (SA; Loake a Grant, 2007). Klíčovou vlastností NPR1 je jeho redoxní regulace. Konzervované cysteinové zbytky v NPR1 vytvářejí mezimolekulární disulfidové vazby, které vedou k tvorbě cytosolického oligomeru NPR1 (Mou *et al.*, 2003). Oligomerní struktura blokuje translokaci z cytosolu do jádra, a tím inhibuje potenciální interakci s transkripčními regulátory.

Po indukci patogenu nebo elicitoru dochází v důsledku redoxních změn (s-nitrosylace) k redukci NPR1 z oligomeru na monomery, což usnadňuje translokaci NPR1 z cytosolu do jádra, po níž následuje aktivace cílových genů a imunitní reakce závislá na NPR1 (Mou *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008). Předpokládá se, že Cys82 a Cys216 jsou rozhodující pro tvorbu intermolekulární disulfidové vazby usnadňující vznik oligomeru NPR1. Mutace obou cysteinů vedla ke konstitutivní jaderné lokalizaci monomeru NPR1 (Mou *et al.*, 2003).

Mezi základní leucinové zipy (bZIP) se řadí TF bZIP16, bZIP68, u nichž bylo zjištěno, že reagují na redoxní změny v chloroplastu po vystavení vysokému osvětlení (Shaikhali *et al.*, 2012). Všechny tři TF se dokážou vázat na G-box elementy v promotoru *LHCB2.4* (light harvesting chlorophyll binding protein 2.4; Shaikhali *et al.*, 2012). *LHCB2.4* funguje ve PSII společně s další podjednotkou *LHCB1*, *LHCB1.1*. bZIP16 se může vázat na promotorovou oblast *LHCB2.4*. Shaikhali *et al.* (2012) studovali mechanismus, který reguluje vazbu bZIP16, bZIP68 na promotor *LHCB2.4*. Při přidání redukčního činidla došlo ke rapidnímu zvýšení afinity TF na promotor *LHCB2.4*, protože redukční činidlo stimulovalo redukci vazeb a narušení oligomerních struktur. Naopak přidání oxidačního činidla snížilo afinitu TF k promotoru (Shaikhali *et al.*, 2012).

2.5 Redox proteomické metody a metody detekce redoxních modifikací proteinů

Díky reverzibilní povaze sulfenových kyselin, disulfidů a S-glutathionylace jsou vhodné pro regulování funkcí proteinů během buněčné signalizace. Na druhou stranu jsou nestabilní a přechodné, což může ve výsledku ztížit samotnou detekci a málokdy odráží skutečný redoxní stav proteinů. V důsledku toho bylo vyvinuto značné úsilí v oblasti vývoje metod pro studium redoxních posttranslačních modifikací proteinů s cysteinovým zbytkem. Tyto techniky zahrnují nepřímé a přímé metody detekce. Mohou být také rozděleny na metody založené na gelové separaci, či na metody, které se bez gelové separace obejdou.

2.5.1 Metody detekce založené na gelové separaci

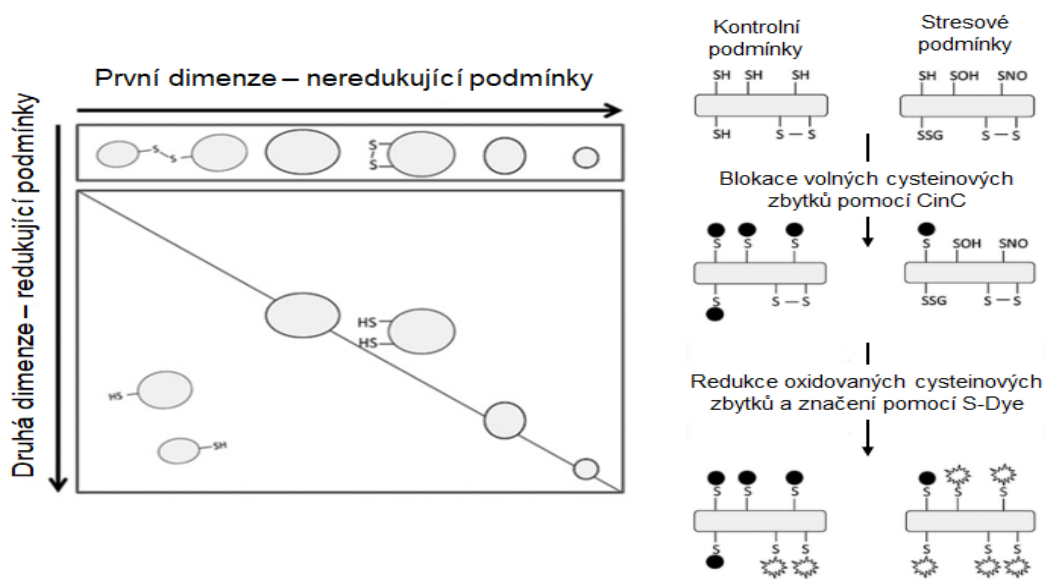
2.5.1.1 Dvoudimenzionální elektroforéza

Metody využívající gelovou matici pro separaci proteinů jsou v drtivé většině případů založeny na 2D-SDS-PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém gelu při denaturujících podmínkách). Diagonální 2D-SDS PAGE je metodou, která se využívá a slouží pro studium globálního disulfidového proteomu. Umožňuje identifikovat proteiny obsahující intra– či intermolekulární disulfidové vazby pomocí sekvenční neredukující/redukující elektroforézy díky jejich odlišným migračním vlastnostem v gelu (McDonagh, 2012). Tato technika byla velmi úspěšně použita při identifikování produktů oxidativního stresu v srdečních myocytech v reakci na nově vyvinuté sloučeniny, které modifikují redoxní stavy právě v těchto buňkách (Brennan *et al.*, 2004). Kromě disulfidických můstků je možné definovat S-glutathionylované a sulfonylované proteiny po separaci extrahovaných proteinů z buněčných lyzátů pomocí imunoblotovacích metod s použitím specifických protilátek. Tyto protilátky jsou vytvořeny tak, aby rozpoznávaly konzervovaný cystein situovaný na N-terminálním konci proteinu určité rodiny redoxně aktivních proteinů (Woo *et al.*, 2003).

Kvůli nepříliš velké účinnosti a umělému oxidacím proteinů během přípravy vzorků jsou tyto metody už používány v omezené míře. K překonání výše uvedených problémů byla vyvinuta technika Redox-DIGE (diferenciální gelová elektroforéza; Hurd *et al.*, 2007). Tato metoda využívá způsobu značení, jež se opírá o dvě odlišná fluorescenční barviva (CyDye DIGE Fluor Cy3 a Cy5). Tato barviva specificky reagují s nemodifikovanými thiolovými skupinami prostřednictvím reaktivních maleimidových

skupin. Reakcí se vytvářejí stabilní esterové vazby. Prvotní krok jak pro referenční vzorek, tak pro vzorek ovlivněný podmínkami prostředí, spočívá v blokaci všech volných thiolových skupin alkylačním činidlem (např. N-ethylmaleimid (NEM), jodoacetylové deriváty). Tato blokáce je důležitá pro zachování redukovaných thiolových skupin, tak aby nedošlo během manipulace k jejich oxidaci. Po tomto kroku následuje redukce reverzibilně modifikovaných thiolových skupin a jejich následné značení odlišnými fluorescenčními barvivy. Dále byla tato metoda rozšířena o identifikaci S-nitrosovaných mitochondriálních proteinů pomocí askorbátu či měďnatých kationtů, které selektivně dokáží redukovat S-nitrosované thiolové skupiny (Chouchani *et al.*, 2010). Po kompletní přípravě vzorků dojde k jejich smíchání, následné elektroforetické separaci na jednom gelu a konečným krokem je emise fluorescenčních barviv. Poté se rozdíly jednotlivých skvrn ve vzorcích právě vztahují k redoxním modifikacím proteinů, které lze následně vyextrahovat z gelové matrice a dále analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

Technologie Redox-DIGE prošla řadou modifikací, tak aby byla účinnější



Obrázek 4. Metody detekce redoxních změn založené na gelové matrici. A) Princip 2D polyakrylamidové elektroforézy s SDS při zjišťování intra- a intermolekulových disulfidových můstků. Proteiny, kterým chybí redoxně aktivní cysteiny migrují na diagonále. Proteiny s mezimolekulárními disulfidickými vazbami migrují za redukčních podmínek pod diagonálu. Naopak proteiny obsahující intradisulfidové můstky migrují nad diagonálu. B) Pracovní postup nepřímého značení Redox-DIGE. Po zablokování volných cysteinů v příslušných vzorcích pomocí CinC se přebytečné CinC odstraní gelovou filtrací, výsledný eluát se zredukuje a jeho volné thiolové skupiny jsou značeny barvivem S (S-200). Převzato a upraveno od Lennicke *et al.*, 2016.

a reprodukovatelnější (Obr. 4). Lennicke *et al.* (2016) provedli úpravu této metody, která je založena na paralelním značení odlišných subproteomů barvivem na bázi maleimidu (komerční název S-200) v kombinaci s velikostně a nábojově odpovídajícím blokovacím činidlem na bázi maleimidu CinC (cystein interagující sloučenina). Volné thiolové skupiny ve vzorku se nejprve označí fluorescenčním barvivem (S-200), poté se provede redukce oxidovaných thiolových skupin pomocí tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP) a následné značení pomocí CinC. Jako vnitřní proteinový standard je využita značená směs referenčních vzorků jiným barvivem taktéž na bázi maleimidu (komerční název S-300; Lennicke *et al.*, 2016).

Bez ohledu na způsob značení, kvantifikace při této technice je stále omezená a mnohdy nepřesná. Mezi běžná omezení metody založené na 2D elektroforéze patří špatné rozlišení či úplná absence proteinů buď s vysokou nebo velmi nízkou molekulovou hmotností, s vysoce kyselými nebo zásaditými hodnotami isoelektrického bodu a zejména vysoce hydrofobních nebo membránově vázaných proteinů. Nicméně, tyto metody založené na gelové matici jsou vhodné k získání přehledu o efektu určitých podmínek prostředí na stav buněčné redoxní homeostázy, čímž poskytují důležité indicie k definování specifických cílových skupin (Lennicke *et al.*, 2016).

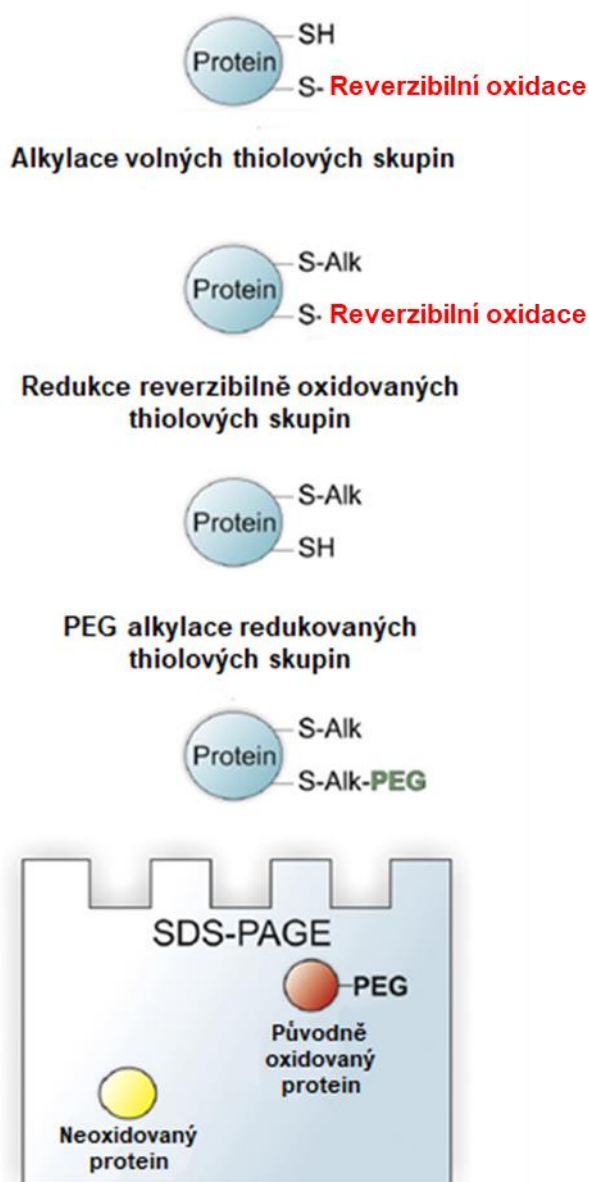
2.5.1.2 Redoxní posun proteinů

Tato metoda je založena na elektroforetické separaci proteinů v gelové matici (SDS-PAGE) a následné imunoblotové analýze pomocí specifické protilátky rozpoznávající konkrétní protein (Kobayashi *et al.*, 1997). Je možné analyzovat reverzibilní oxidované stavy proteinů včetně intra- či intermolekulární disulfidové vazby a rozlišit počet oxidovaných thiolových skupin cysteinů. Klíčovou částí této metody je extrakce a paralelní alkylace volných thiolových skupin pomocí např. NEM, tak aby nedošlo k jejich dodatečné oxidaci během manipulace se vzorkem. Takto se stav jednotlivých skupin zachová nezměněn. Následuje redukce reverzibilně oxidovaných thiolových skupin, a to z toho důvodu, že chemické substance, které se využívají při této metodě, se váží pouze na redukované thiolové skupiny.

Poslední krokem je značení redukovaných thiolových skupin pomocí široké škály reagentů, a to 4-acetamid-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonová kyselina (AMS), EZ-Link Maleimide-PEG₁₁-Biotinu (EZ-Link; Yoshida *et al.*, 2016) či Methoxy polyethylen glykol maleimidu (mPEG; Burgoyne *et al.*, 2013; Obr. 5). Navázání těchto

látek způsobí zpomalení motility oxidovaného proteinu v gelové matrici a v závislosti na molekulové hmotnosti dané substance můžeme následně rozlišit jednotlivé oxidované stavy proteinu. Z toho vyplývá, že redukovanou formu reprezentuje nejnižší situovaný proužek na gelu, kdežto oxidované formy proteinu mají zpomalenou motilitu, resp. vyšší molekulovou hmotnost.

Při této metodě je důležitá specifita použité protilátky. V případě, kdy by protilátka rozpoznávala i další součásti extraktu, nastal by problém v rozlišení



Obrázek 5. Schématické znázornění přípravy vzorku a průběhu metody redoxní posun proteinů. Prvním krokem metody je extrakce a alkylation redukováných thiolových skupin. Následuje redukce reverzibilně oxidovaných thiolových skupin a PEG alkylation redukováných thiolových skupin. Poslední krokem je imunoblotová analýza. Převzato a upraveno od Burgoyne *et al.*, 2013.

oxidovaných forem studovaného protein od nescifických vazeb protilátky. Důležitá je také důkladná separace oxidovaných stavů, což je možno zabezpečit modifikací parametrů elektroforézy. Další omezení této metody spočívá v tom, že reakce cysteinového zbytku s velkou (obvykle 2-5 kDa) aktivovanou částí PEG může být pomalá, což může vést k neúplné reakci s thiolovými skupinami proteinu (Van Leeuwen *et al.*, 2017).

Kvůli výše zmíněným nedostatkům byla tato metoda modifikována a vylepšena. Byla vyvinuta metoda tzv. Click-PEG, kde spolu selektivně reagují azidové a alkylové skupiny v přítomnosti měďných kationtů sloužících jako katalyzátor celé reakce (Rostovtsev *et al.*, 2002). Lze ji využít ke značení jak redukovaných, tak oxidovaných cysteinových zbytků. V tom prvním případě nejdříve dochází k reakci mezi redukovanými thiolovými skupinami s maleimidovou sloučeninou obsahující Click-reaktivní alkylovou část a následně ke konjugaci s molekulou PEG, která obsahuje Click-azidovou část. Ke značení oxidovaných cysteinových zbytků musí nejdříve dojít k zablokování redukovaných thiolových skupin, následně k *in vitro* redukci a navázání Click-PEG značek (Van Leeuwen *et al.*, 2017).

Hlavní výhodou tohoto přístupu je jednoduchá aplikovatelnost na experimentální vzorek, čímž se lze vyhnout pomalé a obtížné přímé reakci maleimid-PEG polymeru. Kromě toho lze tuto metodu snadno přizpůsobit k selektivní detekci specifické modifikace cysteinového zbytku využitím konkrétní biochemické reaktivity ve fázi značení - např. u S-nitrosylace se před značením ke vzorku přidá směs Cu/askorbát (Jaffrey *et al.*, 2001).

2.5.2 Metody založené na afinitní chromatografii

Tradičně se identifikace reverzibilních modifikací cysteinu prováděly pomocí metody založené na afinitě mezi biotinem a avidinem (Biotin-switch metoda, BST). Původně byla vyvinuta pro detekci S-nitrosylovaných proteinů (Derakhshan *et al.*, 2007). Postupem se detekce rozšířila na další typy reverzibilních modifikací (S-glutathionylace, S-acetylace; Roth *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007). BST se obvykle skládá z následujících kroků: (i) prvotní blokování nemodifikovaných cysteinových zbytků alkylačním činidlem (NEM), (ii) selektivní redukce modifikovaných cysteinových zbytků odvíjející se od druhu zkoumané modifikace, (iii) značení redukovaných cysteinů činidly obsahujícími biotinovou značku a (iv) zahuštění

značených proteinů avidinovou afinitní purifikací pro následné biochemické (imunoblotové analýza) či proteomické analýzy (LC-MS/MS; Guo *et al.*, 2013).

Jako alternativa k BST byla vyvinuta metody založená na afinitní chromatografii s využitím thiol-afinitní pevné fáze, jež má specifickou afinitu k peptidům, či proteinům obsahujícím cysteinové zbytky. Celá metoda se skládá z několika zásadních kroků. Nejprve dochází k blokaci volných thiolových skupin pomocí NEM a selektivní redukci modifikovaných cysteinů na volné thiolové skupiny pomocí různých redukčních činidel specifických pro každý typ reverzibilní modifikace (dithithreitol (DTT) pro celkovou oxidaci, askorbátu pro S-nitrosylaci, hydroxylamin pro S-acetylaci). Dalším krokem je selektivní zachycení proteinů obsahujících volné thiolové skupiny na pevnou fázi, následuje enzymatické štěpení na chromatografické matrici, multiplexní isobarické značení s použitím buď iTRAQ (isobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci; Ross *et al.*, 2004) nebo multiplexní TMT (tandemové hmotnostní značky; Dayon *et al.*, 2008) činidel a konečná eluce zachycených peptidů. Označené peptidy se poté podrobí LC-MS/MS analýze pro identifikaci specifických modifikovaných cysteinových zbytků a kvantifikaci reverzibilních modifikací (Guo *et al.*, 2013).

V porovnání s BST tento postup nabízí jednodušší pracovní postup tím, že usnadňuje přímé zachycení proteinů obsahujících thiolové skupiny, po kterém následuje enzymatické štěpení a isobarické značení přímo na matrici bez nutnosti čištění vzorku před MS analýzou. Naproti tomu, BST vyžaduje navázání biotinových značek na thiolové skupiny proteinů před zahuštěním na avidinové koloně. Zadruhé, proces kovalentního zachycení poskytuje vyšší specifitu a lepší citlivost než zahuštění na bázi avidinu. V neposlední řadě je tento přístup účinnější pro umožnění identifikace a kvantifikace modifikovaných cysteinových zbytků na základě MS, protože umožňuje štěpení proteinů a multiplexní isobarické značení na chromatografické matrici (Guo *et al.*, 2013).

2.5.3 Metody bez gelové separace

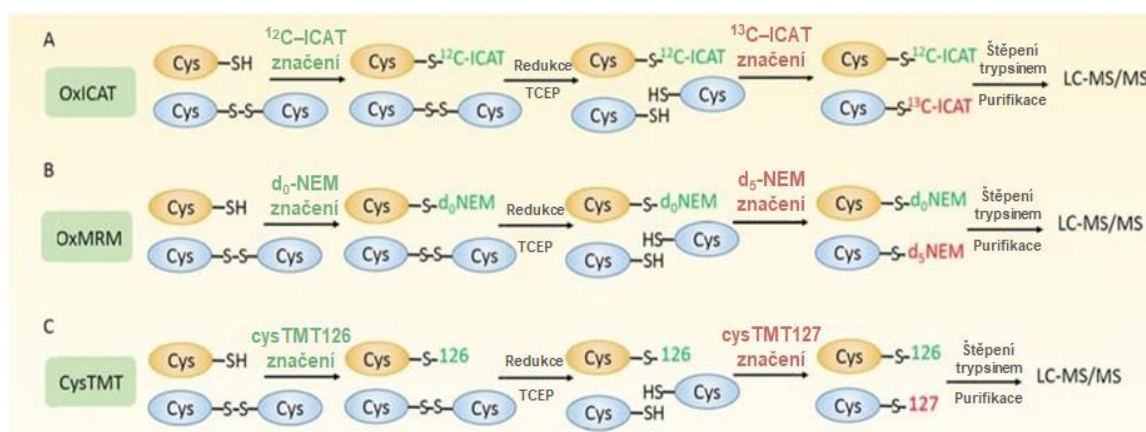
Proteomické přístupy selektivní pro cysteinové zbytky umožňují jak kvantifikaci, tak rovněž identifikaci redoxně modulovaných proteinů či štěpených peptidů v komplexních vzorcích, čímž překonávají některá omezení metod, která jsou založena na gelové separaci. Většina těchto metod je závislá na isobarických a isotopických značkách selektivních pro cysteinové zbytky, které umožňují zahuštění takto značených

peptidů či proteinů multiplexním způsobem. Navíc poskytují specifické informace o příslušných typech redoxních modifikací cílových cysteinových zbytků (Lennicke *et al.*, 2016).

2.5.3.1 OxICAT (Isotopicky značené afinitní značky)

Metoda oxICAT kombinuje značení thiolových skupin pomocí technologie isotopově kódovaného afinitního značení (ICAT) zároveň s metodou zahuštění proteinových směsí s modifikovanými thiolovými skupinami k určení oxidačního stavu proteinů pomocí MS analýzy. Komerčně dostupné ICAT činidla jsou deriváty vysoce specifických jodoacetamidů reagujících s thiolovými skupinami (Lindemann a Leichert, 2012).

Činidlo ICAT se skládá z jodoacetamidové části se štěpitelnou biotinovou značkou a 9uhlíkatého „linkeru“. Jsou dostupná ve dvou isotopicky odlišných formách (Leichert *et al.*, 2008). Činidlo označující se jako „lehké“ (light) obsahuje devět atomů uhlíku s nukleonovým číslem 12, zatímco „těžké“ (heavy) činidlo sice také obsahuje devět atomů uhlíku, ale s nukleonovým číslem 13. Obě formy mají tedy stejnou chemickou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti, ale liší se molekulovou hmotností o 9 Da (Lindemann a Leichert, 2012). V prvním kroku dochází k denaturaci proteinů



Obrázek 6. Schématické znázornění tří typů redoxních proteomických metod. A) V případě OxICAT nejdříve dochází ke značení redukovaných thiolových skupin ^{12}C – ICAT, následně k redukci ostatních thiolových skupin pomocí tris(2-karboxyethyl) fosfinu (TCEP) a značení těchto vzniklých skupin ^{13}C -ICAT; B) U metody OxMRM se proteiny inkubují s d_0 -NEM k blokaci volných thiolových skupin, poté se nově vznikající thiolové skupiny redukované TCEP označí d_5 -NEM; C) V případě cysTMT jsou redukované thiolové skupiny nevratně značeny cysTMT značkami. Poté se oxidované thiolové skupiny redukují pomocí TCEP a označí se dalšími značkami cysTMT, které se liší od těch v prvním kroku. Poslední a společným krokem pro všechny metody je štěpení proteinů pomocí trypsinu a následná analýza pomocí LC-MS/MS. Převzato a upraveno od Zhou *et al.*, 2016.

k rozvinutí vyšších struktur a odhalení všech redukovaných cysteinovým zbytkům. Následuje nevratné značení prostřednictvím „lehké“ formy činidel. Poté za pomoci silného redukčního činidla TCEP dojde k redukci všech reverzibilně oxidovaných cysteinových zbytků téhož vzorku a všechny takto redukované thiolové skupiny jsou modifikovány „těžkou“ formou činidel. Důležitým aspektem je, že tímto způsobem vznikají chemicky identické proteiny, které se liší pouze specifickou molekulovou hmotností své značky ICAT v závislosti na jejich předchozím redoxním stavu (Leichert *et al.*, 2008; Obr. 6A).

Po enzymatickém štěpení a afinitní purifikaci peptidů značených ICAT se provede MS analýza pro kvantifikaci a tandemová MS/MS analýza pro identifikaci peptidů. Na základě tohoto schématu metoda OxICAT detekuje všechny reverzibilně oxidované cysteiny, zatímco vyšší oxidační stavy, jako jsou sulfinové a sulfonové kyseliny, detekovat nedokáže (Leichert *et al.*, 2008). Nahrazením TCEP specifitějšími redukčními činidly, jako je Grx nebo ASC, umožní detekci S-glutathionylace či S-nitrosylace (Jaffrey a Snyder, 2001; Lind *et al.*, 2002).

U peptidů původně obsahujících pouze redukované cysteinové zbytky se předpokládá, že poskytnou jediný hmotnostní pík, který odpovídá „lehké“ formě činidla ICAT. Naopak, peptidy obsahující původně oxidované cysteinové zbytky budou vykazovat hmotnosti, které jsou přesně o 9 Da vyšší nebo jejich násobky odpovídající počtu oxidací na cysteinech. Předpokládá se, že mnoho buněčných proteinů se vyskytuje jak v oxidované, tak v redukované formě. Odpovídající peptidy by tedy měly být přítomny jak v „lehké“, tak v „těžké“ formě činidel ICAT. MS/MS analýza peptidů se používá k identifikaci příslušného proteinu a současně k identifikaci cysteinu (cysteinů) citlivých na oxidaci. Metoda OxICAT poskytuje absolutní poměr redukovaných a oxidovaných proteinů v rámci jednoho vzorku. Díky tomu je OxICAT ideální také pro analýzu změn redoxního stavu proteinů v buňkách vystavených stresovým podmínkám (Leichert *et al.*, 2008).

2.5.3.2 OxMRM (monitorování vícenásobných reakcí)

OxMRM (multiple reaction monitoring) je metoda opět založená na MS analýze, prostřednictvím které lze identifikovat peptidy obsahující modifikované cysteinové zbytky. Zahrnuje purifikaci proteinů a diferenciatní alkylation pomocí stabilně značených isotopů NEM. Lze ji použít prakticky na jakýkoli vzorek proteinů (Held a Gibson,

2012). Experimentální kroky metody OxMRM jsou na velmi podobném principu jako v případě metody oxICAT. Nejprve dochází k ireverzibilní alkylosti volných thiolových skupin nezačleněným NEM. Následuje redukce reverzibilně oxidovaných cysteinových zbytků a chemické značení značenou variantou NEM stabilním isotopem (Obr. 6B). V závislosti na redukčním činidle lze zkoumat několik typů oxidace. Askorbát sodný se používá pro S-nitrosylované thiolové skupiny, arseničnan sodný selektivně působí na sulfenové kyseliny a silná redukční činidla, jako je DTT nebo TCEP, ovlivňují všechny reverzibilní oxidační stavy cysteinů (Lennicke *et al.*, 2016)

Rozdílne alkylované proteiny, které jsou předmětem zájmu, se poté přečistí pomocí specifických protilátek a následně podrobí enzymatickému štěpení (nejčastěji pomocí trypsinu) na směs peptidů, která se analyzují pomocí LC-MRM-MS (Held *et al.*, 2010).

Úskalí této metody spočívají v potřebě specifické protilátky k purifikaci studovaného proteinu a v předchozí znalosti peptidu nesoucího oxidovaný cystein, aby bylo možné navrhnout správný MRM experiment. Navzdory těmto omezením OxMRM profituje z vysoké citlivosti a reprodukovatelnosti metody a může být tak využita ke kvantifikaci specifických cysteinových zbytků náchylných k oxidaci v cílových proteinech jak s vysokou, tak dokonce i s nízkou abundancí (Lennicke *et al.*, 2016).

2.5.3.3 CysTMT (tandemová hmotnostní značka)

Metoda tandemové hmotnostní značky (TMT) je dobře zavedenou metodou hmotnostní analýzy, jež umožňuje současnou identifikaci a multiplexní kvantifikaci proteinů v rozdílných vzorcích (Calabrese *et al.*, 2015). CysTMT je odvozená od TMT a je zaměřená na cysteinové zbytky. Specifita vůči cysteinovým zbytkům byla zabezpečena změnou reaktivní skupiny (z amidové skupiny na skupinu pyridyldithiovou). Poskytuje výhodu vícenásobných isobarických značek s reportérovými ionty o hmotnostech mezi 126 a 131 Da během následné analýzy pomocí LC-MS/MS. Právě kvůli těmto různorodým isobarickým značkám tato metoda umožňuje efektivní multiplexní analýzu (Murry *et al.*, 2012). Činidla cysTMT obsahující několik isobarických (hmotnostních a strukturních) izomerů je možné použít k ireverzibilnímu značení-SH skupin (Obr. 6C).

Postup při značení je principiálně podobný jako u metody oxICAT. Jednotlivá činidla specificky reagují s redukovanými cysteinovými zbytky v proteinech. Označené vzorky se následně smíchají dohromady a enzymaticky (nejčastěji pomocí trypsinu) se

štěpí na peptidy. Směs peptidů, které obsahují různě modifikované cysteinové zbytky se podrobí LC-MS/MS analýze (Murry *et al.*, 2012). Následuje identifikace podle místa značení a kvantifikace výpočtem poměrů mezi jednotlivými šesti reportérovými ionty (Kohr *et al.*, 2012). Pomocí této metody lze také zjistit a objasnit samotné místo oxidace mapováním získané peptidové sekvence, ze které se může získat sekvence celého proteinu (Murry *et al.*, 2012). Pro přesnou identifikaci obsazenosti cysteinových zbytků S-nitrosylací byl počáteční krok blokace nahrazen přímým značením volných thiolových skupin isobarickou značkou. Po redukci S-nitrosylovaných thiolových skupin askorbátem sodným jsou následně označeny jinou isobarickou značkou (Kohr *et al.*, 2012).

Ve srovnání s tradiční technikou ICAT poskytuje tato metoda výrazné výhody, včetně trvalé a stabilní hmotnostní značky. U metody ICAT totiž dochází k částečné fragmentaci už v kolizní cele hmotnostního spektrometru a poskytuje velmi složitá hmotnostní spektra. Další výhodou je použití až šesti isotopicky identických reportérových iontů o hmotnostech od 126 do 131 Da (Lennicke *et al.*, 2016).

Z metody CysTMT se vyvinuly i další metody, jako například CysTMTRAQ, která kombinuje metodu TMT a iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation). Touto kombinací vznikla strategie dvojího značení pro současnou analýzu redoxního stavu thiolových skupin a samotné abundance proteinů (Parker *et al.*, 2015). Mírnou modifikací činidel CysTMT došlo k vytvoření nových činidel a metody, která se označuje jodoTMT. Opět dochází ke specifické reakci mezi činidly a thiolovými skupinami prostřednictvím IAM skupiny. V průběhu metody lze sériově provádět několik redukčních reakcí, které vedou ke specifické identifikaci určité redoxní modifikace a zároveň od sebe můžeme tyto modifikace spolehlivě odlišit (Pan *et al.*, 2014).

2.6 Patelliny a jejich funkce u rostlin

2.6.1 Úvod

Fosfatidylinositol (PtdIns) je minoritní fosfolipid ve většině eukaryotických buněk, který se výhradně vytváří v endoplasmatickém retikulu působením PtdIns syntasy (Balla, 2013). I přes nízké zastoupení jsou PtdIns v eukaryotických buňkách nezbytnou součástí. Jsou prekurzorem pro fosfoinositidy vznikající pomocí specifických lipidových kinas, jež modifikují inositolovou skupinu PtdIns (Huang *et al.*, 2016).

Fosfoinositidy jsou velmi užitečné univerzální signální molekuly ve všech eukaryotických buňkách. Slouží nejen jako prekurzory pro další rozpustné a lipidové sekundární posly, ale vytvářejí základ důležitých a rozmanitých signálních drah (Michell, 2008; Balla, 2013). Přispívají k sestavení chemicky odlišných struktur na povrchu membrán umožňujících prostorovou a časovou regulaci proteinů. Působí také jako alosterické regulátory mnoha enzymů (Brown *et al.*, 2001) a iontových kanálů (Rjasanow *et al.*, 2015).

PtdIns jsou transportovány pomocí fosfatidylinositol transportních proteinů (PITP). Jsou schopny přenášet PtdIns nebo fosfatidylcholin (PtdCho) mezi jednotlivými membránami a stimulovat tak rozdílné signální dráhy, včetně exocytosy indukované Ca^{2+} a tvorbu vesikul v trans-Golgiho aparátu (Simon *et al.*, 1998). Uvádí se, že PITP se podílejí na regulaci aktivit PtdIns kinas tím, že napomáhají PtdIns 4-OH kinasám překonat jejich neschopnost účinně využívat substráty PtdIns uložené v membráně (Bankaitis *et al.*, 2010). PITP jsou tedy nezbytné pro metabolismus fosfoinositidů a přenos signálu.

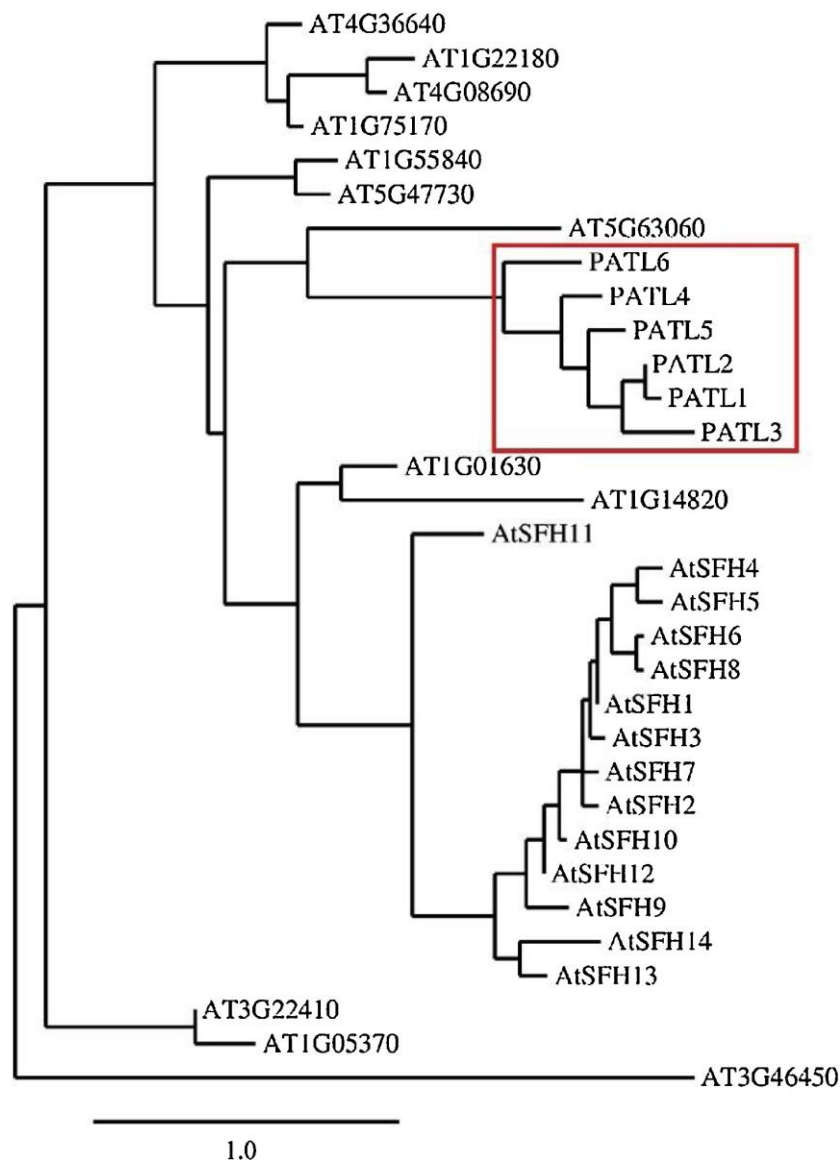
Mezi PITP se radí tzv. proteiny podobné Sec14. U vyšších eukaryotních organismů jsou tyto proteiny exprimovány ve vysoké míře. Například *A. thaliana* exprimuje 32 různých zástupců této proteinové rodiny. Tyto proteiny zahrnují rozmanité spektrum uspořádání domén – od specifických dvoudoménoých proteinů Sec14-nodulin, přes proteiny Sec14-GOLD, které se také vyskytují u jiných mnohobuněčných eukaryot, až po proteiny Sec14 obsahující pouze jednu doménu (Huang *et al.*, 2016).

2.6.2 Sec14 s doménou GOLD – Patelliny

Patelliny (PATL) jsou typické Sec14 proteiny obsahující doménu GOLD patřící do rodiny PITP (Peterman *et al.*, 2004; Tejos *et al.*, 2018). Uvádí se, že PATL proteiny vznikly poměrně pozdě během evoluce (Huang *et al.*, 2016). Ze strukturního hlediska se

rodina proteinů PATL vyznačuje dvěma konzervovanými doménami, které jsou taktéž pozorovány u jiných proteinů souvisejících s membránovým transportem. Obsahují doménu Sec14p a doménu GOLD, která následuje za N-koncovou variabilní doménou (Peterman *et al.*, 2004). Doména GOLD se hojně vyskytuje ve skupině proteinů souvisejících s funkcí v Golgiho aparátu, homeostázou membrán a s transportem vesikul (Peterman *et al.*, 2004).

Fylogenetická analýza identifikovala v rostlinné říši 44 sekvencí PATL (Peterman *et al.*, 2006). Rostlinné proteiny podobné PATL lze rozdělit do čtyř různých



Obrázek 7. Fylogenetický strom Sec14 podobným proteinům v *A. thaliana*. Vypracováno na základě nukleotidové sekvence vazebné doména pro lipidy. 32 proteinů z *A. thaliana*. Červený rámeček označuje podrodinu PATL. Převzato od Zhou *et al.*, 2019.

tříd a každá jedna skupina obsahuje specifické odlišnosti v doméně GOLD (Obr. 7). Z toho vyplývá, že u každé skupiny došlo k záměně aminokyselin (Peterman *et al.*, 2006). C-konec domény GOLD u PATL je bohatý na lysin a má konzervovaný motiv, který je velmi podobný motivu vazebné domény u mnoha proteinů souvisejících s membránovým přenosem (Peterman *et al.*, 2004). Proteiny PATL u *A. thaliana* také obsahují variabilní doménu na N-konci, která se liší jak délkou, tak aminokyselinovým složením (Peterman *et al.*, 2004, 2006). Důležité je, že ve variabilní doméně existuje motiv PXXP, který by mohl hrát roli v cytoskeletální dynamice i transportu mezi membránami. U proteinů PATL se rovněž nachází motiv, který pravděpodobně slouží pro protein-proteinové interakce (Peterman *et al.*, 2004).

Všichni zástupci PATL jsou funkčně spojeni s membránovým systémem a zároveň vykazují výraznou lokalizaci v buněčné destičce během cytokineze (Tejos *et al.*, 2018), což poukazuje na jejich regulační funkci během buněčného dělení v rostlinných buňkách, ačkoli základní mechanismus ještě nebyl objasněn (Peterman *et al.*, 2004). PATL1 je periferní membránový protein, ale částečně se nachází i v cytoplasmě. Je distribuován v celé buněčné destičce, hlavně v oblasti, kde dochází k diferenciaci a zrání destičky (Peterman *et al.*, 2004). Subcelulární lokalizace PATL2 je podobná jako u PATL1. PATL2 se během cytokineze soustřeďuje na buněčné destičce a dočasně se udržuje v rovině buněčného dělení i po dozrání buněčné destičky (Suzuki *et al.*, 2016; Tejos *et al.*, 2018).

PATL jsou exprimovány v odlišných, ale částečně se překrývajících motivech. Jsou všudypřítomně exprimovány v různých orgánech a ve všech fázích embryogeneze. PATL1 je exprimován v celém kořenovém meristému (RAM; Tejos *et al.*, 2018). I když se PATL2 podobá v expresním vzoru PATL1, tak je navíc lokalizován v buňkách pericyklu elongační zóně kořene a mohl by se podílet na vývoji postranních kořenových primordií (LRP; Tejos *et al.*, 2018). Exprese a lokalizace PATL3, PATL4 a PATL6 jsou úzce spojeny s pletivou s vysokou mitotickou aktivitou, včetně RAM, LRP, embryí a prekurzorových buněk průduchů. PATL3 se exprimuje spíše ve vnějších buněčných vrstvách (epidermis, buňky kortexu), zatímco PATL4 a PATL6 v bazálním kořenovém meristému, LRP a plasmatické membráně dělících se buněk (Tejos *et al.*, 2018).

Jednotlivé PATL proteiny mají rozdílnou vazebnou schopnost interagovat s fosfolipidy. PATL1 je schopen vázat PtdIns, PtdCho a fosfatidylethanolamin (PtdEth),

kdežto k PtdIns(4)P a PtdIns(3,5)P₂ má nízkou afinitu a PtdIns(3,4)P₂ neváže vůbec. Oproti tomu, PATL2 dokáže vázat všech sedm fosforylovaných forem PtdIns (Peterman *et al.*, 2004). Vazebná síla klesá od monofosforylovaných, kde je nejvyšší, až po trifosforylované, kde je nejnižší (Suzuki *et al.*, 2016). PATL3 váže PtdIns(4,5)P₂ a PtdIns(4)P (Wu *et al.*, 2017). U zbývajících zástupců jejich afinita k fosfolipidům zkoumána nebyla.

Objevuje se čím dál více vědeckých studií poukazujících na důležitou funkci PATL jakožto regulátorů signálních drah. PATL1 v *A. thaliana* interaguje s mnoha proteiny, např. SOS1 (Salt overly sensitive 1; Zhou *et al.*, 2018) nebo s calmodulinem 4 (CaM4; Chu *et al.*, 2018). Společně s proteinem SOS1 je PATL1 zapojen do regulace iontové homeostázy. U *patl1* mutantních rostlin byla aktivita Na⁺/H⁺ antiportéru výrazně snížena. Také se podílí na redoxní homeostáze během solného stresu (Zhou *et al.*, 2018).

Existuje také experimentální důkaz přímé interakce mezi PATL1 a CaM4. Mutantní rostliny *patl1* vykazovaly vyšší odolnost vůči mrazu. Předpokládá se, že CaM4 negativně reguluje toleranci k mrazu prostřednictvím interakce s PATL1 v *A. thaliana* (Chu *et al.*, 2018). Kromě toho se PATL1 může také podílet na transportu vesikul, který je zprostředkován AMSH3 (associated molecule with SH3 domain; Isono *et al.*, 2010). Vzhledem k tomu, že AMSH3 je možným regulátorem autofágie u rostlin, PATL1 by mohl hrát roli i v regulaci autofágie (Katsiarimpa *et al.*, 2013).

PATL2 je v některých případech fosforylován prostřednictvím MPK4 na pozici serin536. Vlivem této fosforylace dochází ke změně vazebné síly vůči jednotlivým fosforylovaným formám PtdIns, což naznačuje roli kaskády MPK4-PATL2 během cytokineze u rostlin (Suzuki *et al.*, 2016). PATL2 může být taktéž fosforylován při solném stresu, ačkoli tato fosforylace nemusí být zprostředkována MPK4 (Hsu *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2016). PATL2 tedy u rostlin pravděpodobně funguje také jako možný regulátor tolerance rostlin vůči solnému stresu.

PATL3 a PATL6 interagují s pohybovým proteinem (MP) viru mozaiky vojtěšky (Alfalfa mosaic virus, AMV), což poukazuje na možnou roli PATL v regulaci šíření virových částic v pletivech (Peiro *et al.*, 2014). Subcelulární lokalizace odhalila, že PATL3 a PATL6 mohou snižovat pohyb virových částic tím, že zabraňují MP cílit do plasmodesmat, přes které se přenášejí v pletivech a orgánech rostlin.

GOLD doména PATL3 interaguje s EXO70A1 (Wu *et al.*, 2017). EXO70A1 je součástí komplexu exocyst, který před fúzí přitahuje vesikuly pro transport do cílových míst nově vznikající plasmatické membrány. Je také zapojen do cytokineze rostlin (Wu a Guo, 2015). Jak PATL3, tak EXO70A1 vážou fosfoinositid, který by mohl pomoci přitáhnout cílové proteiny k membráně. Ve skutečnosti by všechny ostatní PATL kromě PATL5 mohly interagovat s EXO70A1 (Wu *et al.*, 2017). Je možné, že EXO70A1 hraje klíčovou roli v lokalizaci PATL do různých membránových systémů způsobem nezávislým na exocystu.

Geny *PATL* jsou regulované auxinem. Mutantní linie *patl2*, *patl4*, *patl5* a *patl6* vykazovaly výrazné defekty v transportu a distribuci auxinu. Jsou také vyžadovány pro auxinem zprostředkovanou regulaci vývoje a velikosti kořenového meristému a gravitropického růstu (Tejos *et al.*, 2018). Hrají klíčovou roli ve vývoji a organizaci embrya a organogenezi, přičemž jsou navzájem redundantní. PATL se tak mohou podílet na zpětné vazbě auxinu na polarizovanou lokalizaci PIN (auxinový transportér) v rostlinách (Tejos *et al.*, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

V průběhu diplomové práce byla použity rostliny *Arabidopsis thaliana*:

- Ekotyp Columbia (Col0) – rostliny divokého typu
- T-DNA mutantní linie *fsd1-1* (SALK 029455, Dvořák *et al.*, 2021a)
- T-DNA mutantní linie *fsd1-2* (GabiKat 740E11, Dvořák *et al.*, 2021a)
- T-DNA mutantní linie *pat14-1* (SALK 139423; Tejos *et al.*, 2018)
- T-DNA mutantní linie *pat14-2* (GabiKat 091407)
- Komplementovaná linie *proPATLA::GFP:PATLA* (poskytnuto prof. J. Frimlem; Tejos *et al.*, 2018)

3.2 Přístroje a pomůcky

- Amicon Ultra 0,5 ml, centrifugační kolony (Merck Millipore)
- Allegra 64R, chlazená centrifuga (Beckman Coulter)
- Axio Imager 2, epifluorescenční mikroskop (Carl ZEISS)
- Axio Zoom V16, stereo zoomovací mikroskop (Carl ZEISS)
- Bond Elut C18, C18 kolony (Agilent Technologies)
- Digestoř (Merci)
- Elektromagnetická míchačka (Boeco)
- Fytotron, kultivační místnost (Weiss)
- Gel Doc EZ Imager, dokumentační přístroj (Bio-Rad)
- ChemiDoc MP Imaging Systém, dokumentační přístroj (Bio-Rad)
- Infinite M Nano, spektrofotometr (TECAN)
- Laminární box (Merci)
- LSM 710, Axio Imager 2, konfokální laserový skenovací mikroskop (Carl ZEISS)
- Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electroforesis Cell, aparatura pro SDS-PAGE elektroforézu (Bio-Rad)
- pH metr (Eutech Instruments)
- Pipety s rozsahem 2,5; 10; 100; 200; 1000 μ l (Eppendorf)
- Plastové mikrozkušavky o objemu 1,5 a 2 ml (Eppendorf)
- Plastové špičky (Eppendorf)

- Simplicity Water Purification System, purifikace vody (Merk)
- T100 Thermal Cycler, PCR termocyklér (Bio-Rad)
- TransBlot Turbo Transfer System, přístroj pro velmi rychlý přenos proteinů na membránu (Bio-Rad)
- Vortex Genie 2, vortex (Scientific Industries)
- XA 110/2X, analytické váhy (Radwag)

3.3 Chemikálie

- 2-merkapt ethanol (Sigma Aldrich)
- 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES; Sigma Aldrich)
- 4-acetamid-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonová kyseliny (AMS; Sigma Aldrich)
- 4x Laemlli vzorkový pufr (Bio-Rad)
- 80% aceton (Merck)
- Acetonitril (Sigma Aldrich)
- Agarosa (Sigma Aldrich)
- Anti α -tubulin primární protilátka (Agrisera)
- Anti-CAT primární protilátka (Agrisera)
- Anti-HSP70 primární protilátka (Agrisera)
- Anti-rabbit sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou
- Bradfordovo činidlo Protein Assay Dey Reagent Concentrate (Bio-Rad)
- Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad)
- cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
- Deoxyribonukleotidy
- Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA ; Sigma Aldrich)
- Dihydrát molybdenanu sodného ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 ; Sigma Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4 ; Sigma Aldrich)
- Dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich)
- DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Scientific)
- Dodecylsulfát sodný (SDS; Sigma-Aldrich)

- Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (MES; Duchefa Biochemie)
- Dusičnan draselný (KNO₃; Sigma Aldrich)
- EZ-Link Maleimide-PEG₁₁-Biotin (Thermo Scientific)
- Fluorid sodný (NaF; Sigma Aldrich)
- Gellan gum (Sigma-Aldrich)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)
- Glycerol (Sigma Aldrich)
- Glycin (Sigma Aldrich)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO₄*7H₂O; Sigma Aldrich)
- Heptahydrát síranu zinečnatého (ZnSO₄*7H₂O; Sigma Aldrich)
- Heptahydrát síranu železnatého (FeSO₄*7H₂O; Sigma Aldrich)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého (CoCl₂*6H₂O; Sigma Aldrich)
- Hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich)
- HPLC voda (Sigma Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄; Sigma Aldrich)
- Hydrogenuhličitan amonný (NH₄HCO₃; sigma Aldrich)
- Hydroxid draselný (KOH; Sigma Aldrich)
- Hydroxid sodný (NaOH; Sigma Aldrich)
- Chlorid vápenatý (CaCl₂; Sigma Aldrich)
- Chlorid sodný (NaCl; Sigma Aldrich)
- Isopropanol (Sigma Aldrich)
- Jodacetamid (IAA; Sigma Aldrich)
- Kit pro měření koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA; Thermo Scientific)
- Komerční směs akrylamidu a N, N'-methylenbisakrylamidu v poměru 37,5:1, 40% (Bio-Rad)
- Komerční DNA extrakční pufr, součást kitu „Phire Plant Direct PCR kit“ (Thermo Scientific)
- Kyselina boritá (H₃BO₃; Sigma Aldrich)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA; Sigma Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (HCl; Sigma Aldrich)

- Kyselina L-askorbová (Sigma Aldrich)
- Kyselina trifluoroctová (TFA; Merck)
- Methanol (Sigma Aldrich)
- Methoxy polyethylen glykol maleimid (5 kDa; Thermo Scientific)
- Midori Green Advance DNA/RNA stain (Nippon Genetics)
- Močovina (Sigma Aldrich)
- Murashige & Skoog médium, basal salt mixture (MS; Duchefa Biochemie)
- N, N, N',N'-tetrametylethylendiamin, 99% (TEMED; Sigma Aldrich)
- N-ethylmaleimid (NEM; Sigma Aldrich)
- N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES; Duchefa Biochemie)
- Odtučněné sušené mléko Blooting Grade Blocker (Bio-Rad)
- Pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich)
- Persíran amonný (APS; Bio-Rad)
- Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- Phire Plant Direct PCR kit (Thermo Scientific)
- PhosSTOP (Roche)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich)
- Protein Assay Dey Reagent Concentrate (Bio-Rad)
- Sacharosa (Penta Chemicals)
- Specifické primery (Eurofins Genomics)
- Tandem Mass Tag (TMT) značky (Thermo Scientific)
- Tekutý dusík (Messer Technogas)
- Tetrahydrát dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich)
- Tetrahydrát chloridu manganatého ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich)
- TGX Stain Free FastCast Acrylamide Kit, 10%, 12% (Bio-Rad)
- Thiol-sepharosa 4B (Sigma Aldrich)
- Tris(hydroxymetyl)aminomethan (Tris; Sigma Aldrich)
- TritonX-100 (Sigma Aldrich)
- Tween 20 (Sigma Aldrich)
- UltraPure DNase/RNase-free destilovaná voda (Invitrogen)

3.4 Roztoky a jejich složení

- ½ MS médium (1000 ml): 10 g sacharosy; 0,5 g MES; 2,15 g MS médium, basal salt mixture; 6 g Gellan Gum; pH 5,8 (upraveno pomocí KOH). Objem doplněn do 1000 ml deionizovanou vodou. Sterilizace pomocí autoklávování
- 1% (w/v) agarosový gel (100 ml): 100 ml TAE, 1X; 1 g agarosa; a 4 µl Midori Green Advance DNA/RNA stain
- ARA médium (1000 ml): 10 g sacharosy; 0,5 g MES; 0,5 g CaCl₂, 100 ml makroelementů; 1 ml mikroelementů, 10 ml roztoku železa, 6 g Gellan Gumu; pH 5,8 (upraveno pomocí KOH)
- DTT (1 mol·l⁻¹)
- Extrakční pufr pro redoxní posun proteinů (50 ml): 0,6057 g Tris, pH 7,5 (upraveno pomocí KOH); 0,292 g NaCl; 2 g SDS; 0,0186 g EDTA; 0,06265 g NEM
- Extrakční pufr pro redoxní proteomickou analýzu (50 ml): 0,2383 g HEPES, pH 7,7 (upraveno pomocí NaOH); 0,292 g NaCl; 50 µl 0,5 mol·l⁻¹ EDTA; 250 µl TritonX-100; 0,5 g SDS; 0,6265 g NEM µ
- Makroelementy, 10X (1000 ml): 5,06 g KNO₃; 3,4 g KH₂PO₄; 4,93 g MgSO₄*7H₂O; 4,72 g Ca(NO₃)₂*4H₂O
- Mikroelementy, 1000X (250 ml): 1,075 g H₃BO₃; 0,56 g MnCl₂*4H₂O; 0,0125 g Na₂MoO₄*2H₂O; 0,145 g NaCl; 0,0725 g ZnSO₄*7H₂O; 0,625 mg CoCl₂*6H₂O; 0,62 mg CuSO₄*5H₂O
- Na fosfátový pufr (100 ml): 25 ml 0,2 mol·l⁻¹ pufru smíchaného z NaH₂PO₄ a Na₂HPO₄ v poměru 1:15, pH 7,8; 10 ml glycerolu; 17,6 mg kyseliny L-askorbové; do konečného objemu byl roztok doplněn deionizovanou vodou
- Obohacovací pufr pro redoxní proteomickou analýzu (50 ml): 0,5956 g HEPES, pH 7,7 (upraveno pomocí NaOH); 100 µl 0,5 mol·l⁻¹ EDTA
- Persíran amonný 10% (w/v)
- Promývací pufr pro redoxní posun proteinů (50 ml): 0,6057 g Tris, pH 7,5 (upraveno pomocí KOH); 0,292 g NaCl; 2 g SDS
- Pufr pro SDS-PAGE (1000 ml): 3 g Tris; 14,4 g glycin; 1 g SDS; a doplnění objemu 1000 ml deionizovanou vodou
- Resuspendační pufr pro redoxní proteomickou analýzu (50 ml): 2,979 g HEPES, pH 7,7 (NaOH); 24,024 g močoviny; 0,05 g SDS

- Resuspendační purf pro redoxní posun proteinů (50 ml): 0,6057 g Tris, pH 7,5 (upraveno pomocí KOH); 0,292 g NaCl; 2 g SDS; 0,77125 g DTT
- Roztok pro přípravu rozdělovacího polyakrylamidového gelu, 10% (10 ml): 2,5 ml akrylamid/N, N'-methylenbisakrylamidu; 2,5 ml Tris-Cl, 1,5 mol·l⁻¹, pH 8,8; 4,95 ml deionizovaná voda; 5 µl TEMED; a 50 µl APS, 10% (w/v)
- Roztok pro přípravu rozdělovacího polyakrylamidového gelu, 12% (10 ml): 3 ml akrylamid/N, N'-methylenbisakrylamidu; 2,5 ml Tris-Cl, 1,5 mol·l⁻¹, pH 8,8; 4,45 ml deionizovaná voda; 5 µl TEMED; a 50 µl APS, 10% (w/v)
- Roztok pro přípravu rozdělovacího polyakrylamidového gelu, 8% (10 ml): 2 ml akrylamid/N, N'-methylenbisakrylamidu; 2,5 ml Tris-Cl, 1,5 mol·l⁻¹, pH 8,8; 5,35 ml deionizovaná voda; 5 µl TEMED; 50 µl APS, 10% (w/v)
- Roztok Ponceau S (200 ml): 0,2 g Ponceau S; 10 ml kyseliny octové; a doplnění objemu do 200 ml deionizovanou vodou
- Roztok železa, 100X (50ml): 0,1861 g Na₂EDTA; 0,05575 g FeSO₄*7H₂O
- TAE, 50X: 121 g Tris; 28,55 ml vychlazené octové kyseliny; 50 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA, pH 8.
- Tris buffer saline s přidavkem Tween 20 (TBS-T; 1000 ml): 2,42 g Tris; 8,78 g NaCl; pH 7,4 (upraveno pomocí HCl); doplnění do 999 ml deionizovanou vodou a 1 ml Tween 20
- Tris-Cl, 0,5 mol·l⁻¹, pH 6,8 (500 ml): 30 g Tris; pH 6,8 (HCl); a doplnění do objemu 500 ml deionizovanou vodou
- Tris-Cl, 1,5 mol·l⁻¹, pH 8,8 (500 ml): 90,75 g Tris; pH 8,8 (HCl); a doplnění do objemu 500 ml deionizovanou vodou
- Tris-glycinový pufr (1000 ml): 3 g Tris; 14,4 g glycin; a doplnění do objemu 1000 ml deionizovanou vodou
- Zaostřovací gel, 4% (5 ml): 0,5 ml akrylamid/N, N'-methylenbisakrylamidu; 1,26 ml Tris-Cl, 0,5 mol·l⁻¹, pH 6,8; 3,23 ml deionizované vody; 5 µl TEMED; a 25 µl APS, 10% (w/v)

3.5 Metody

3.5.1 Příprava kultivačních médií

Kultivační média (½ MS médium a ARA médium) byla připravena podle Murashige a Skoog (1962). Navážky a složení jsou uvedeny v sekci 3.4 Roztoky a jejich složení. Po

navážení a odměření jednotlivých komponent byly rozpuštěny ve sterilní destilované (MilliQ) vodě. Před přidáním zpevňovací látky bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 5,8 pomocí $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku KOH. Takto připravené médium bylo přelito do skleněných lahví. Lahve byly naplněny vždy do poloviny celkového objemu z důvodu následné sterilizace autoklávovaním. S médií bylo manipulováno v aseptických podmínkách.

3.5.2 Povrchová sterilizace semen *A. thaliana*

Zralá a očištěná semena *A. thaliana* byla přenesena do 2 ml Eppendorf zkumavky. Jako první byl přidán 1 ml 70% (v/v) ethanolu a po dobu 5 minut byla semena protřepávána, aby 70% (v/v) ethanol omyl všechna semena. Po uplynutí zmíněné doby byl ethanol odsán pomocí automatické pipety a nahrazen 1 ml 96% (v/v) ethanolu. Jím byla semena promývána 1 minutu. Opět po uplynutí doby byl ethanol odsán a semena byla třikrát promyta sterilní deionizovanou vodou. Takto sterilizovaná a promytá semena byla nasáta automatickou pipetou a rozprostřena na sterilní filtrační papír umístěný v okrouhlé Petriho misce. Po odpaření zbytkové vody byly misky uzavřeny parafilmem a uchovány v lednici při 4°C.

3.5.3 *In vitro* kultivace rostlin *A. thaliana*

Sterilní semena *A. thaliana* byla v aseptických podmínkách přenesena pomocí sterilních dřevěných párátek z filtračního papíru na povrch kultivačního média. Petriho misky byly následně uzavřeny dvěma vrstvami parafilmu a vrstvou papírové pásky. Petriho misky s nasazenými semeny byly stratifikovány 1-2 dny při 4°C. Po uplynutí stratifikační doby byly misky přeneseny do kultivační místnosti, kde byly potřebnou dobu kultivovány při 22°C, denním režimu: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70% vlhkosti a intenzitě osvětlení $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.5.4 Ovlivnění rostlin MV

Po 14denní kultivaci byly semenáčky přemístěny z tuhého $\frac{1}{2}$ média do jamek 6jamkové plastové destičky, ve kterých bylo vždy shodně 8 ml tekutého média. Kontrolní vzorky („mock control“ později ve výsledcích jako „C“) byly inkubovány v tekutém médiu bez přídatku jakékoli jiné chemikálie. Vzorky ovlivněné MV byly inkubovány v tekutém médiu s přídatkem $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ MV (ve výsledcích označovány jako „P“). Inkubace probíhala po dobu 30 minut v kultivační místnosti při zvýšené intenzitě osvětlení 180

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Takto byly připraveny a ovlivněny vzorky pro redoxní proteomickou analýzu a redoxní posun proteinů.

3.5.5 Redoxní proteomická analýza

Metodický postup při přípravě vzorků pro redoxní proteomickou analýzu byl nejdříve modifikován pro využití v oblasti rostlinné biologie (Guo *et al.*, 2013). Rostlinný materiál uchovávaný při -80°C byl homogenizován pomocí tekutého dusíku, tloučku a třecí misky. Homogenát byl přenesen pomocí laboratorní lžičky do předem označených 2 ml Eppendorf zkumavek. Do takto připraveného rostlinného materiálu byl přidán extrakční pufr (složení uvedeno v sekci 3.4 Roztoky a jejich příprava). Vzorky se inkubovaly 1 hodinu při laboratorní teplotě s občasným promícháním. Následovala centrifugace při 10 000 g, 10 minut, při 4°C . Supernatant byl přenesen do čistých 2 ml Eppendorf zkumavek a proteiny byly přes noc precipitovány pomocí 80% (v/v) acetonu při -20°C . Pelet získaných proteinů byl 3x promyt 80% (v/v) acetonem. Poté byl vysušený pelet rozpuštěn v resuspendačním pufru (složení uvedeno v sekci 3.4 Roztoky a jejich příprava). Po důkladném rozpuštění bylo přidáno DTT (koncentrace zásobního roztoku $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; výsledná koncentrace $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a vzorky byly inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě při stálém třepání 250 R.P.M. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky promyty pomocí Amicon Ultra 0,5 ml kolon (Merck Millipore), nejdříve pomocí $8\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močoviny a následně HPLC vody podle instrukcí výrobce.

Po přečištění následovalo měření koncentrace proteinů pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Tato metoda je založena na posunu absorpčního maxima Coomassie Brilliant Blue G-250 z hodnoty 465 nm na 595 nm. Při této vlnové délce také dochází ke spektrofotometrickému měření. Metoda byla provedena v 96jamkové destičce, kdy každá jamka shodně obsahovala: 239 μl vody, 60 μl barviva („Protein Assay Dey Reagent Concentrate“, Bio-Rad) a 1 μl vzorku. Směs byla promíchána pipetováním a nechala se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Poté došlo k měření absorbance při 595 nm ve spektrofotometru Infinite M Nano (TECAN). Koncentrace proteinů byla posléze stanovena na základě kalibrační křivky sestavené ze známých hodnot hmotnosti hovězího sérového albuminu (BSA) v roztoku.

Vzorky byly následně upraveny tak, aby v každém vzorku bylo 100 μg proteinů a konečný objem 120 μl . Poté byly přidán roztok DTT (koncentrace zásobního roztoku $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; výsledná koncentrace $25\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 10% (w/v) SDS. Vzorky byly následně

naneseny na thiol-sepharosu 4B, která byla připravena v chromatografických kolonkách. Zde došlo k zachycení původně oxidovaných proteinů (DTT způsobilo jejich redukci), které byly poté promyty 8 mol·l⁻¹ močovinou, 2 mol·l⁻¹ NaCl, roztokem 80% (v/v) acetonitrilu s 0,1% (v/v) TFA a 25 mmol·l⁻¹ HEPES.

Přečištěná proteinová směs zachycená na thiol-sepharose 4B byla enzymaticky štěpena pomocí trypsinu přes noc při 37 °C za stálého třepání 550 R.P.M. Následovalo přečištění celé směsi pomocí 8 mol·l⁻¹ močoviny, 2 mol·l⁻¹ NaCl, roztokem 80% (v/v) acetonitrilu s 0,1% (v/v) TFA a 25 mmol·l⁻¹ HEPES. Jedním z posledních kroků bylo značení peptidů pomocí „Tandem Mass Tags“ značek (TMT; Thermo Scientific). Štěpené peptidy byly s roztokem TMT značek inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě za stálého třepání při 500 R.P.M podle instrukcí výrobce.

Eluce štěpených a značených peptidů probíhala pomocí několika roztoků: (i) 25 mmol·l⁻¹ NH₄HCO₃ a 20 mmol·l⁻¹ DTT; (ii) 25 mmol·l⁻¹ NH₄HCO₃, 20 mmol·l⁻¹ DTT, 80% (v/v) acetonitril, 0,1% (v/v) TFA; (iii) 80% (v/v) acetonitril a 0,1% (v/v) TFA. Mezi jednotlivými roztoky byla vždy 10minutová inkubace za laboratorní teploty. Poté se musely vzorky vysušit pomocí přístroje SpeedVac. Pelet byl následně rozpuštěn v 25 mmol·l⁻¹ NH₄HCO₃. Peptidy byly poté redukovány pomocí DTT (koncentrace zásobního roztoku 1 mol·l⁻¹; výsledná koncentrace 50 mmol·l⁻¹) a alkylovány pomocí IAA (výsledná koncentrace 15 mmol·l⁻¹). Posledním krokem bylo odsolení a přečištění vzorků pomocí Bond Elute C18 kolon (Agilent Technologies) podle instrukcí výrobce a jejich následná eluce 90% (v/v) acetonitrem a opětovné vysušení pomocí přístroje SpeedVac. Takto připravené vzorky bylo možné odeslat na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Analýzy LC-ESI-MS/MS byly provedeny pomocí nanopřtokového systému HPLC (Easy-nLC1200) spojeného s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion Lumos vybaveným ionizačním zdrojem nanoelektrospreje.

3.5.6 Bioinformatická predikce redoxně aktivních cysteinů

Bioinformatická analýza redoxně aktivních cysteinových zbytků byla provedena pro proteiny heat shock protein 70-1 (HSP70-1), všechny tři isoformy katalas a všech šest isoform α-tubulinu. Pro tyto účely byl využit bioinformatický nástroj pCysMod (<http://pcysmod.omicsbio.info/action.php>), který na základě aminokyselinové sekvence predikuje redoxně aktivní cysteinové zbytky. Také byl využit bioinformatický nástroj iCysMod (<http://icysmod.omicsbio.info/index.php>), který sdružuje experimentální data

ohledně redoxních modifikací proteinů. Softwary zohledňují S-nitrosylaci, S-sulfhydrataci, S-sulfenylaci a S-sulfinylaci. Predikované výsledky následně porovnávají s doposud získanými experimentálními daty.

3.5.7 Homogenizace a extrakce proteinů pro redoxní posun proteinů

Metodický postup při přípravě vzorků byl inspirován publikacemi Burgoyne *et al.* (2013) a Yoshida *et al.* (2016). Poté byla metoda modifikována pro přípravu rostlinných vzorků. Ošetřené semenáčky byly krátce osušeny mezi dvěma filtračními papíry a následně okamžitě přeneseny do třecí misky s tekutým dusíkem a rozetřeny na prášek pomocí tloučku. Homogenizovaný materiál byl přenesen pomocí laboratorní lžičky do předem vychlazených 2 ml Eppendorf zkumavek s příslušným označením. Podle množství homogenátu bylo přidáno adekvátní množství extrakčního pufru pro redoxní posun proteinů (složení uvedeno v sekci 3.4 Roztoky a jejich příprava). Vzorky byly ponechány 1 hodinu při laboratorní teplotě. V průběhu inkubační doby došlo k občasnému promíchání. Následovala centrifugace při 10 000 g, při 4°C po dobu 15 minut. Supernatant byl přenesen do čistých zkumavek a následovala precipitace pomocí 80% (v/v) acetonu přes noc při -20°C.

Druhý den bylo dalším krokem promytí precipitovaných proteinů pomocí 80% (v/v) acetonu (3x). Vysušený a čistý pelet byl rozpuštěn v resuspendačním roztoku (složení uvedeno v sekci 3.4 Roztoky a jejich příprava) a ponechán 45 minut při laboratorní teplotě. Důležitým krokem bylo promytí vzorku od DTT. Tento krok byl realizován pomocí Amicon Ultra 0,5 ml kolon (Merck Millipore). V tuto chvíli došlo na rozdělení vzorků na dvě frakce. Jedna frakce byla ponechána bez značení (sloužila k porovnání molekulové hmotnosti a čistoty protilátky) a u druhé frakce následovalo přidání EZ-Link Maleimide-PEG₁₁-Biotinu (koncentrace zásobního roztoku 250 mmol·l⁻¹, výsledná koncentrace 2,5 mmol·l⁻¹) či methoxy polyethylen glykol maleimidu (koncentrace zásobního roztoku 20 mmol·l⁻¹, výsledná koncentrace 10 mmol·l⁻¹) pro značení redukovaných thiolových skupin a inkubace po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě za stálého třepání 200 R.P.M.

Koncentrace proteinů v daných vzorcích byla zjištěna pomocí bicinchoninové metody (BCA; Walker, 2009). Tato metoda je založená na reakci peptidové vazby proteinů s měďnatými kationty za vzniku měďných kationtů, které poté reagují s kyselinou bicinchoninovou za produkce výrazného fialového zbarvení, které je

spektrofotometricky zaznamenáno při 562 nm. Při měření bylo využito 200 μ l BCA činidla, které bylo napipetováno do jamky v 96jamkové mikrotitrační destičce. K tomuto činidlu bylo následně přidáno 25 μ l vzorku a promícháno opakovaným pipetováním. Takto připravená směs byla inkubována při 37°C po dobu 30 minut a poté analyzována pomocí spektrofotometru Infinite M Nano (TECAN) při vlnové délce 562 nm. Každý vzorek byl reprezentován třemi technickými replikami. Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky, pro jejíž sestavení byly využity komerční roztoky BSA o známých koncentracích. Výsledné hodnoty byly analyzovány v programu Microsoft Excel.

3.5.8 Imunoblotová analýza

Proteinový extrakt byl smíchán se vzorkovým Laemliho pufrem (4X) v poměru 3:1 (v/v). Vzorkový pufr byl těsně před použitím smíchán s 2-merkptoethanolem v poměru 9:1 (v/v). Takto připravené vzorky byly poté důkladně promíchány a inkubovány 5 minut při 95°C. Elektroforetická separace probíhala na polyakrylamidových (PA) gelech při denaturujících podmínkách. Elektroforetické rozdělovací gely měly hustoty od 8-12% podle analyzovaného proteinu. Do každé jamky bylo napipetováno stejné množství proteinu (20 μ g), které se separovaly nejdříve při 80 V po dobu 10 minut a následně při 110 V 120 minut.

Po ukončení elektroforetické separace byly proteiny přeneseny z PA gelu na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu o rozměrech 8,5 cm x 6 cm. Membrána byla předtím rehydratována methanolem po dobu 1 minuty. Houbičky, filtrační papír, gel i membrána byly před složením kazety inkubovány 10 minut v tris-glycínovém pufru s přídavkem methanolu (10% v/v). Kazeta složená z houbičky, 2 filtračních papírů, gelu, membrány, 2 filtračních papírů a houbičky byla vložena do transférové vany naplněné tris-glycínovým pufrem s přídavkem methanolu (10% v/v). Takto připravená vana byla vložena do ledu. Přenos probíhal 2 hodiny při konstantním elektrickém proudu 240 mA.

Po uplynutí stanovené doby byla membrána vyjmuta z kazety a promyta deionizovanou vodou. Membrána byla obarvena roztokem Ponceau S po dobu 1 minuty. Přebytké barvivo bylo vymyto pomocí deionizované vody a membrána byla zdokumentována pomocí fotoaparátu. Na dodatečné odbarvení byla použita deionizovaná voda a následně TBS-T pufr.

Pro detekci všech tří použitých protilátek byla nespecifická vazebná místa membrán blokována pomocí 4% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka rozpuštěného v TBS-T pufru. Blokace probíhala přes noc při 4°C za stálého mírného třepání. Následující den byl roztok vyměněn za 1% (w/v) roztok odtučněného sušeného mléka v TBS-T s přidavkem specifické primární protilátky (1:1000 anti α -tubulin, 1:5000 anti HSP70, 1:1000 anti CAT). Anti α -tubulin rozpoznává všech 6 isoform α -tubulinu. Anti HSP70 rozpoznává cytoplasmatickou isoformu HSP70-1. Anti CAT rozpoznává všechny tři isoformy CAT. Inkubace s primární protilátkou taktéž probíhala přes noc při 4°C. Po dostatečné inkubaci, nejčastěji následující den ráno, byla membrána 5x7 minut promyta TBS-T pufrům při rychlém třepání. Poté byla membrána inkubována s roztokem 1% (w/v) BSA rozpuštěným v TBS-T pufru s přidavkem sekundární protilátky (ve všech případech se jednalo o anti rabbit sekundární protilátku konjugovanou s křenovou peroxidázou; ředění 1:5000). Po 2hodinové inkubaci byla membrána 5x5 minut promyta TBS-T pufrům.

Posledním krokem byla vizualizace luminiscence pocházející z konkrétních proteinů (v konjugaci s primární a sekundární protilátkou), která se provedla pomocí „Clarity Western ECL Substrate“ (Bio-Rad). Membrána byla v tomto roztoku inkubována 3-4 minuty a poté snímána a vyhodnocena v dokumentačním přístroji „ChemiDoc MP Imaging System“ (Bio-Rad). Byl využit protokol „Colorimetric“ pro vizualizaci proteinového standardu a následně protokol „Chemi Sensitivity“ pro vizualizaci luminiscence. Získaný materiál byl vyhodnocen pomocí softwarů Image Lab a ImageJ. Výsledné hodnoty byly analyzovány v programu Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem. Pro každou protilátku byla provedena tři nezávislá biologická opakování.

3.5.9 *In vivo* konfokální mikroskopie

Pro *in vivo* mikroskopii byly použity 4 až 5denní *in vitro* kultivované rostliny komplementované linie *A. thaliana proPATLA::GFP::PATLA*. Semenáčky byly opatrně přeneseny z tuhého ½ MS média v Petriho misce pomocí pinzety do tekutého ½ MS média na podložním sklíčku a poté celé překryty krycím sklíčkem. Po nasnímaní několika snímků (ve výsledcích označeno jako „před ovlivněním“) bylo médium vyměněno pomocí mikroperfúze filtračním papírem a pipetou za 100 μ l (měněno postupně po 10 μ l) ½ MS média s přidavkem 1 μ mol \cdot l⁻¹ MV. Poté byly preparáty vloženy do vlhké komůrky a inkubovány po dobu 30 minut v kultivační místnosti při

zvýšené intenzitě osvětlení $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nebo ve tmě (ve výsledcích označeno jako „po ovlivnění“). Po uplynutí inkubační doby byly preparáty opět snímány. Tyto experimenty byly provedeny pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu Zeiss LSM 710. Zelený fluorescenční protein byl excitován laserem o vlnové délce 488 nm a emise fluoroforu byla snímána v rozmezí 525-560 nm.

Pořízené mikroskopické snímky byly zpracovány a analyzovány pomocí programu Zeiss ZEN 3.5 Blue edition, kde byla měřena intenzita fluorescence. Semikvantitativní hodnocení intenzity fluorescence GFP-PATL4 bylo provedeno pomocí profilového měření plasmatických membrán prvních pravých listů. Hodnoty relativní intenzity fluorescence byly získány z epidermálních buněk prvního pravého listu 5-6 jednotlivých rostlin pro každé ošetření. Naměřené hodnoty byly následně zpracovány programem Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem.

3.5.10 Genotypová analýza

Pro genotypovou analýzu byly využity 10denní rostliny *A. thaliana* pro zjištění T-DNA inserce v sekvenci *PATL4* (AT1G30690) genu. V aseptických podmínkách byla pomocí nůžek a pinzety odstrižena část listu a přenesena do 0,6 ml Eppendorf zkumavky, ve které bylo 50 μl extrakčního pufru (komerční „Dilution Buffer“). Zde byla část listu co nejvíce rozrušena pomocí sterilní 100 μl špičky. Následně se Eppendorf zkumavky s materiálem inkubovaly na ledu po dobu 30 minut k dostatečné extrakci DNA.

Pro genotypovou analýzu byla použita „Phire Hot Start II“ DNA polymerasa. Celkový objem jedné PCR reakce byl 10 μl a byla složena z: 6,4 μl destilované vody („UltraPure DNase/RNase Free“); 2 μl Phire Green Reaction Buffer 5x; 0,2 μl dNTP 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; 0,5 μl LP primeru, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (pro alelu divokého typu); 0,5 μl LB primeru, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (pro alelu s T-DNA inzercí), 0,5 μl RP, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; 0,2 μl izolované DNA; 0,2 μl Phire Hot Start II DNA polymerasy.

Sekvence použitých primerů byly následující:

- patl4_GK_091407_T-DNA: 5'-ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT-3'
- patl4_GK_091407_RP: 5-GAGAAGAGTCTCTCTGACCTTAGC-3'
- patl4_GK_091407_LP: 5'-TGACAGGCTTTAAGATGACTGCTG-3'

- pat14_SALK_139423_RP: 5'-TCTACTGTTTTGAACCCACCG-3'
- pat14_SALK_139423_LP: 5'-CTGAGGCTGTTGTTACCGAAG-3'
- LBb1.3_LB: 5'-ATTTTGCCGATTCGGAAC-3')

PCR reakce probíhala při následujícím teplotním programu: počáteční denaturace DNA (2 minuty, 98°C); druhotná denaturace (30 vteřin, 98°C), nasedání primerů (30 vteřin, 60°C); extenze vlákna (60 vteřin, 72°C); konečná extenze (10 minut; 72°C). Druhotná denaturace, nasedání primerů a extenze vlákna proběhly ve 30 cyklech. Po ukončení PCR reakce byl ke každému vzorku přidán „DNA Loading Dye“, 6X (výsledná koncentrace 1X) pro vizualizaci vzorku v gelové matici a poté byl výsledný PCR produkt separován pomocí horizontální elektroforézy na 1% agarosovém gelu. Elektroforéza proběhla při 90 V po dobu 40-50 minut. Kromě PCR produktů byl při separaci využit indikátor relativní molekulové hmotnosti „GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder“ (5 µl). Vizualizace byla provedena pomocí přístroje „Gel Doc EZ Imager“ (Bio-Rad).

Pro následné vyhodnocení genotypové analýzy platilo, že PCR produkt amplifikovaný za pomoci kombinace primerů LP a RP odpovídá a indikuje alelu divokého typu, kdežto kombinace LBb1.3 (T-DNA) a RP primerů odpovídá a indikuje alelu s T-DNA inzercí.

3.5.11 Fenotypová analýza *pat14* mutantních rostlin

U mutantních rostlin *pat14* byly provedeny fenotypové analýzy. Prvním parametrem analýzy bylo zjištění biomasy. Rostliny *A. thaliana* byly kultivovány 14 dní na ½ MS médiu a poté byla zaznamenána hmotnost čerstvé biomasy z 15 až 19 semenáčků na jednu linii a jedno biologické opakování. Byla provedena tři biologická opakování. Získaná data byla následně vyhodnocena v programu Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem.

Pro zkoumání fenotypové reakce rostlin na oxidativní stres vyvolaný MV byly použity 5denní semenáčky divokého typu (Col0), *fsd1-1*, mutantů *pat14* a komplementované linie GFP-PATL4. Rostliny byly kultivovány na ½ MS médiu. Po 4 dnech byly přeneseny na ½ MS médium obsahující 2 µmol·l⁻¹ MV, kde byly kultivovány dalších 7 dní. Semenáčky byly poté zdokumentovány pomocí skeneru Image Scanner III (GE Healthcare). Rostliny byly hodnoceny na základě poměru zelených a životaschopných rostlin. Kromě toho byla 7. den po přenosu současně

měřena délka primárního kořene pomocí softwaru ImageJ. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem.

3.5.12 Mikroskopická analýza průduchů *pat14* mutantních rostlin

Klíčné listy 5denních *in vitro* kultivovaných rostlin *A. thaliana* ekotyp Col-0 a *pat14* byly zbaveny obsahu chlorofylu inkubací v roztoku z 96% (v/v) ethanolu, kyseliny octové a glycerolu v poměru 3:1:1 (v/v) po dobu 4 hodin. Tento roztok byl poté dvakrát nahrazen čerstvým vždy po hodině. Odbarvené listy byly třikrát promyty roztokem 96% (v/v) ethanolu a glycerolu v poměru 3:1 (v/v) z důvodu vymytí kyseliny octové. Listy byly přeneseny do kapky glycerolu na podložním sklíčku vždy abaxiální stranou vzhůru a překryty krycím sklíčkem. Přebytečný glycerol byl odsán pomocí vakua. Pro každý genotyp bylo využito 6-8 klíčných rostlin. Takto připravené preparáty byly mikroskopicky analyzovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu Axio Imager.M2 v procházejícím světle. Hodnoty jako šířka a délka průduchů, počet průduchů, počet meristemoidů a počet epidermálních buněk byly posléze měřeny v programu Zeiss ZEN 3.5 Blue edition, kde probíhalo i samotné zpracování snímků. Parametry pro vyhodnocení průduchů, jako plocha, stomatální denzita (SD), stomatální index (SI) a index meristemoidů (MI) byly vypočítány pomocí vzorců uvedených níže. Naměřené hodnoty byly následně zpracovány programem Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem.

$$Plocha = \text{šířka} * \text{délka průduchu} (mm^2)$$

$$SD = \frac{\text{počet stomat}}{mm^2}$$

$$SI = \frac{\text{počet stomat}}{(\text{počet stomat} + \text{počet epidermálních buněk})} * 100$$

$$MI = \frac{\text{počet meristemoidů}}{(\text{počet meristemoidů} + \text{počet epidermálních buněk})} * 100$$

4 VÝSLEDKY

4.1 Redox proteomická analýza

Jako první byla provedena redoxní proteomická analýza na rostlinách divokého typu (Col-0) a mutantních rostlinách *fsd1-1* a *fsd1-2* po 30minutovém ovlivnění ARA médiem s přidavkem $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ MV. Při této analýze byly identifikovány protein heat shock protein 70-1 (HSP70-1) a α -tubulin 4 (Tab. 1). Z hodnot poměru mezi podmínkami oxidativního stresu navozenými $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ MV a kontrolními podmínkami můžeme vidět nárůst abundance obou proteinů u rostlin ošetřených ARA médiem s přidavkem $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ MV. Zmíněné proteiny jsme vybrali pro následnou analýzu pomocí redoxního posunu proteinů.

Tabulka 1. Souhrnná tabulka všech naměřených hodnot pomocí LC-MS/MS u proteinů heat shock protein 70-1 (HSP70-1) a α -tubulinu 4. NCBI číslo – databázové číslo v databázi National Center of Biotechnology Information; PSM – počet identifikovaných peptidových spekter shodných pro daný protein; PEP skóre – představuje pravděpodobnost, že je PSM přiřazeno nesprávně. Obecně platí, že čím větší hodnota PEP skóre, tím je větší jistota správného přiřazení peptidu; Poměr PQ/Mock – poměr mezi rostlinami ošetřenými MV a kontrolními rostlinami; *p* hodnota představuje staticky signifikantní rozdíly; HT skóre – součet skóre jednotlivých peptidů z vyhledávání v programu Sequest, který slouží pro analýzu dat získaných z tandemové hmotnostní spektrometrie, používá se k identifikaci proteinů; HT skóre peptidů – počet odlišných peptidových sekvencí ve skupině proteinů z vyhledávání v programu Sequest.

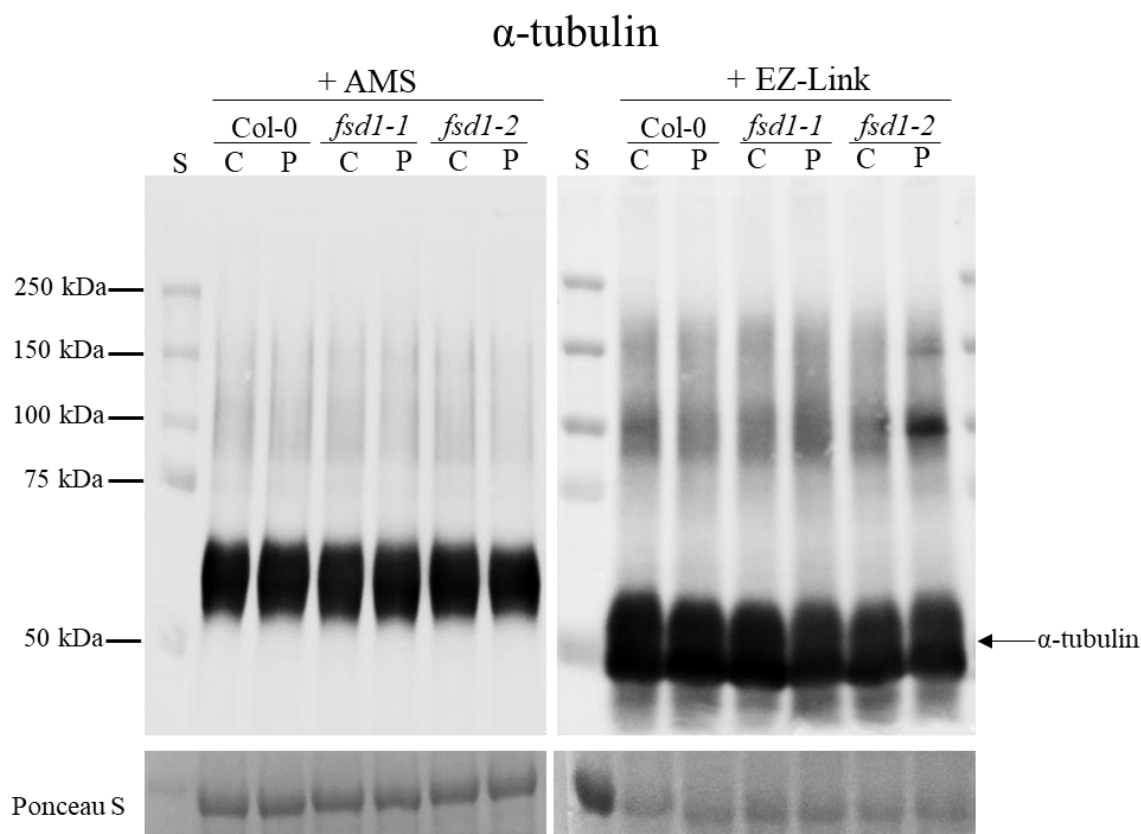
Protein/ Hodnota	HSP70-1	α -tubulin 4
NCBI číslo	NP_195870.1	NP_171974.1
Lokalizace	Cytosol	cytoskelet
PSM	8	4
Souhrnné PEP skóre	12,148	5,476
Poměr PQ/Mock	1,545	1,654
<i>P</i> hodnota	0,011682	0,028315
HT skóre	25,25	9,37
HT skóre peptidů	2	2

4.2 Optimalizace metody redoxního posunu proteinů

Pro validaci redoxní proteomické analýzy byla použita metoda redoxního posunu proteinů, pomocí které lze zjistit počet redukovaných a oxidovaných stavů proteinů, stejně jako abundanci jednotlivých forem.

V první řadě byla pro detekci redukovaných stavů α -tubulinu využita substance AMS (4-acetamid-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonová kyselina; Mr 536,44 Da), která se váže na redukované cysteinové zbytky. α -tubulin má v *A. thaliana* 6 isoform, přičemž obsahují od 11 do 12 cysteinových zbytků (Breviario *et al.*, 2013). Oxidace α -tubulinu může proto vést až k objevení 12 pásů za předpokladu, že všechny cysteiny budou oxidovány. Je třeba zmínit, že protilátka rozeznává všechny isoformy α -tubulinu. Už dříve publikovaná data (Gu *et al.*, 2021), včetně našich výsledků (Obr. 10A, levý panel), ukazují, že tato protilátka rozeznává pouze jeden pás na membráně. Na obrázku č. 8, levý panel, lze vidět, že s využitím této substance byl na membráně identifikován pouze jeden pás (Mr 59,7 kDa). Ani při vyšších expozicích nebyly pozorovány další pruhy na membráně. Je ale nutno říct, že tento pás byl poměrně difúzní. Na základě Mr AMS se dal očekávat pás rozeznávající redukovaný stav proteinu těsně nad pásem α -tubulinu. Žádný podobný pás nebyl detekován, nebo nebyl detekovatelný z důvodu difúze pásu pro α -tubulin. Z naměřené molekulové hmotnosti je zřejmé, že AMS způsobila razantní zhoršení motility proteinů v gelové matici, protože teoretická Mr α -tubulinu je 50 kDa.

Druhou substancí, která byla použita při optimalizaci metody, je EZ-Link Maleimide-PEG₁₁-Biotin, který umožňuje z důvodu větší Mr (Mr 922,02 Da) lepší separaci oxidovaných a redukovaných stavů proteinu. I v tomto případě byl identifikován pouze jeden pás příslušící α -tubulinu. Stejně jako při použití AMS, byl tento pás velmi difúzní a opět nelze rozpoznat redoxní formy α -tubulinu. V tomto případě lze na obrázku č. 8, pravý panel, vidět, že zjištěná Mr (49,7 kDa) souhlasí s predikovanou hodnotou Mr α -tubulinu. Kromě pruhu příslušícímu α -tubulinu, byly na obrázku č. 8, pravý panel, pozorovány pruhy o Mr 100 kDa a 150 kDa. Z důvodů velmi vysoké Mr jsou tyto pruhy pravděpodobně nespecifické, které vznikly při aplikaci protilátky, nebo při vyvolávání luminiscence. Při použití EZ-Linku nebylo pozorováno žádné zhoršení motility proteinu v gelové matici. Jelikož byly tyto experimenty pouze zkušební a nebyly provedeny ve třech nezávislých biologických opakováních, nebyla u nich měřena optická denzita pásů.



Obrázek 8. Analýza redoxního posunu proteinu α -tubulinu provedena na rostlinách *A. thaliana* ekotyp Columbia (Col-0; divoký typ), *fsd1-1* a *fsd1-2* mutantních liniích, které byly podrobeny 30minutovému ošetření $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ methyl viologenem. Imunoblotová analýza byla doplněna o kontrolu nanášky proteinu vizualizovanou pomocí Ponceau S. Analýza je rozdělena na dvě části, levý panel (+AMS), pravý panel (+EZ-Link). Membrána obsahuje proteinové extrakty jak z mokré kontroly (označeno jako „C“), tak z rostlin ošetřených MV (označeny jako „P“). Šipkou je označen identifikovaný pás představující α – tubulin.

Ze získaných informací lze vyvodit, že ani jedna použitá substance neposkytla adekvátní rozlišovací schopnost. Navíc, u AMS došlo k výraznému ovlivnění motility proteinů, proto by bylo určení přesné M_r obtížné. Kvůli těmto nedostatkům jsme se rozhodli protokol modifikovat a jako značící substanci vybrat methoxypolyethylen glycol maleimidu (mPEG), jehož M_r je 5 kDa, z čehož jsme vyvodili, že rozlišovací schopnost bude v tomto případě dostatečná.

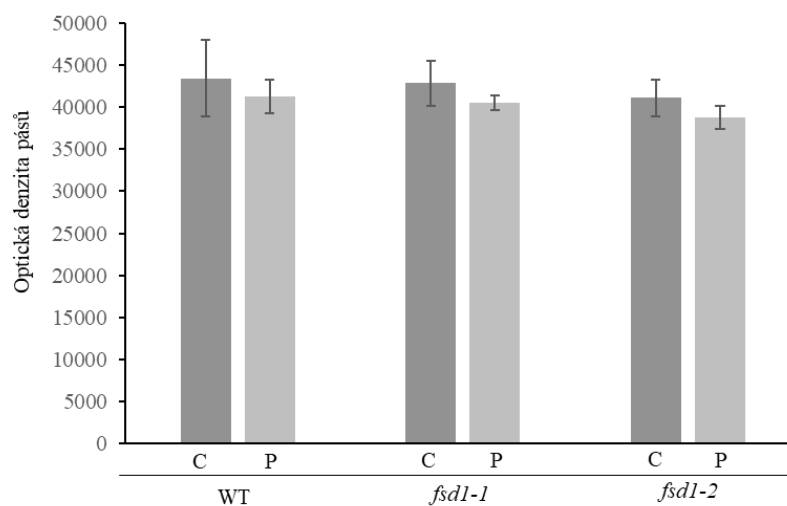
4.3 Analýza oxidačních stavů α -tubulinu

Prvním proteinem, který byl vybrán z redoxního proteomu pro následnou analýzu, je α -tubulin. Byla provedena analýza oxidačních stavů α -tubulinu pomocí redoxního posunu proteinů s využitím mPEG.

Analýza oxidačních stavů α -tubulinu vedla k identifikaci tří pásů (Obr. 10A, pravý panel). Pás s nejmenší Mr o hodnotě 49,67 kDa, která souhlasila s Mr α -tubulinu na imunoblotové analýze bez substance mPEG, měl největší optickou denzitu a představuje redukovanou formu α -tubulinu. Dva zbývající pásy situované výše představují oxidované formy. Pás s Mr o hodnotě 57,34 kDa byl v porovnání s pásem s Mr 49,67 kDa méně abundantní. Třetí a zároveň poslední identifikovaný pás s hodnotou Mr 68,6 kDa byl nejméně abundantní. Jelikož má jedna molekula mPEG 5 kDa, tak ze získaných hodnot Mr oxidovaných forem vyplývá, že v případě Ox₁ došlo k oxidaci jednoho cysteinového zbytku. Při Ox₂ pravděpodobně došlo k oxidaci až 4 cysteinových zbytků.

Pomocí bioinformatických nástrojů a databází byly predikovány tzv. redoxně aktivní cysteinové zbytky, tj. ty, které jsou z hlediska své pozice v aminokyselinové sekvenci nejnáchylnější k oxidativním posttranslačním modifikacím. S výjimkou α -tubulinu 1 bylo u všech isoformů predikováno 9 redoxně aktivních proteinových zbytků, přičemž CYS20, CYS118, CYS315, CYS316, CYS347, CYS353 a CYS376 jsou konzervované mezi isoformami (Příloha 1). Experimentálně byly z nich potvrzeny oxidace na pozici CYS376 (S-nitrosylace a S-sulfenylace), CYS347 (S-nitrosylace, přímá oxidace) a CYS118 (S-sulfenylace, S-nitrosylace a S-sulfhydratace; Příloha 2). Naše výsledky ukazují, že metoda redoxního posunu proteinů odhalila nejméně 2 oxidační stavy u α -tubulinu v *A. thaliana in vivo*.

Při semikvantitativní analýze optických denzit pásů imunoblotové analýzy bez mPEG nebyly mezi rostlinami divokého typu a *fsd1* mutantními rostlinami nalezeny žádné signifikantní změny v abundanci α -tubulinu, ani v případě kontrolních podmínek a ani v případě rostlin ošetřených ARA médiem s přídavkem 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MV (Obr. 9).

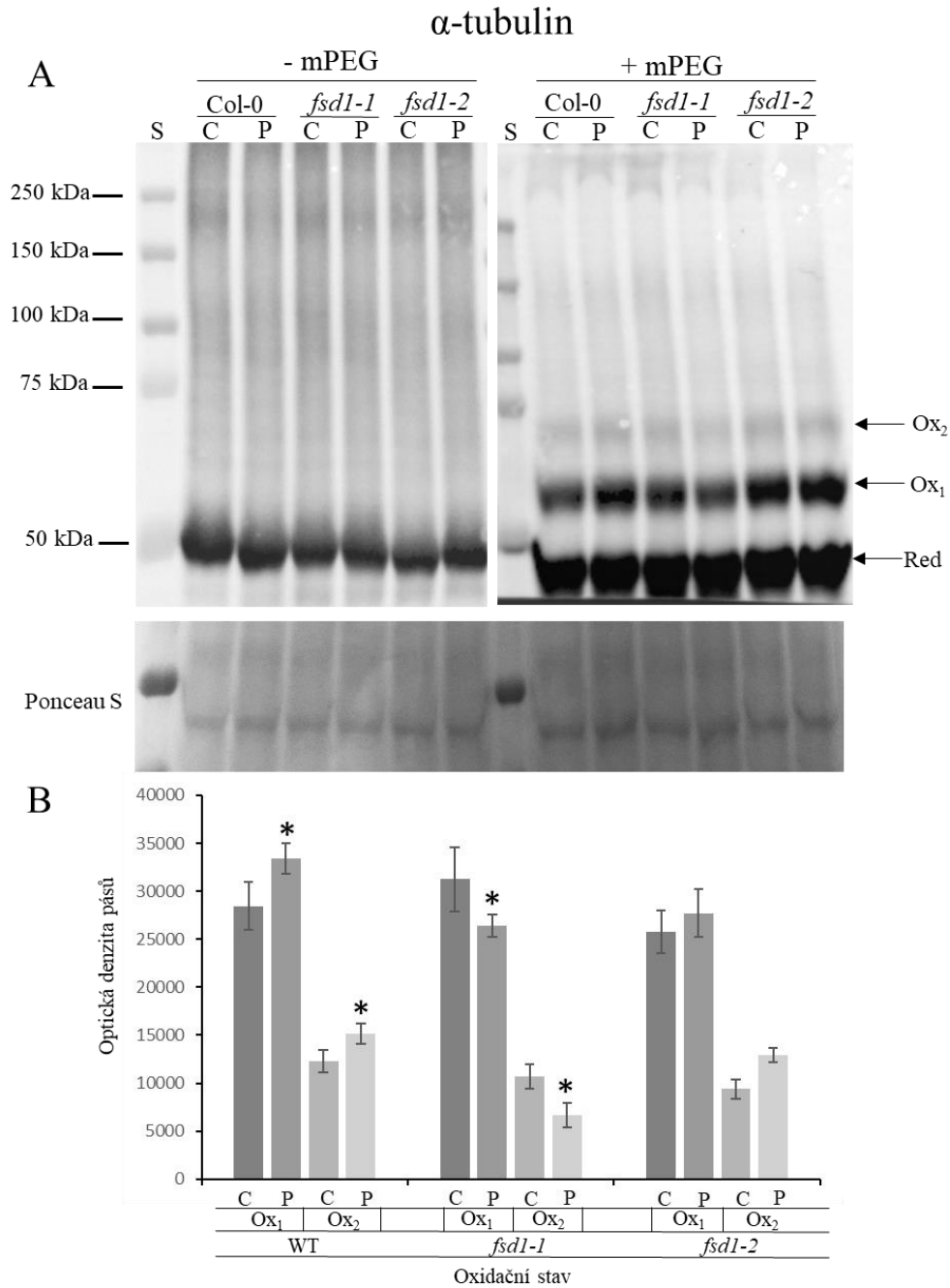


Obrázek 9. Semikvantitativní analýza optické denzity pášť představující α -tubulin v rostlinách *A. thaliana* ekotyp Col-0 (WT), *fsd1-1* a *fsd1-2* v kontrolních podmínkách a po ovlivnění rostlin ARA médiem s přidavkem $1 \mu\text{mol}^{-1}$ MV. Vizualizace α -tubulin je uvedena na obrázku č. 10A, levý panel. „C“ – mokrá kontrola; „P“ – ovlivnění MV. Analýza byla provedena z třech nezávislých biologických replik.

Semikvantitativní analýza ukázala, že u rostlin divokého typu (Col-0) byla pozorována zvýšená abundance obou oxidovaných forem α -tubulinu po 30minutovém ošetření tekutým ARA médiem s přidavkem $1 \mu\text{mol}^{-1}$ MV v porovnání s kontrolními rostlinami, které byly ošetřeny pouze tekutým ARA médiem (Obr. 10B).

Ve srovnání s divokým typem, u *fsd1-1* mutantních rostlin byl pozorován opačný trend. U rostlin ošetřených tekutým ARA médiem s přidavkem $1 \mu\text{mol}^{-1}$ MV byla detekována snížená abundance pášť u obou oxidovaných forem oproti kontrolním podmínkám. U první oxidované formy (Ox_1) byl tento rozdíl markantnější. V případě mutantních rostlin *fsd1-2* nebyla pozorována změna abundance oxidovaných forem α -tubulinu po ovlivnění rostlin tekutým ARA médiem s $1 \mu\text{mol}^{-1}$ MV v porovnání s kontrolou (Obr. 10B).

Za povšimnutí také stojí porovnání Mr α -tubulinu mezi vzorky bez a s mPEG. Je zřejmé, že Mr α -tubulinu analyzovaného bez mPEG je vyšší, než u redukované formy (Obr. 10A). Jelikož byly vzorky připravovány stejným způsobem a lišily se pouze přidáním mPEG, tak to bylo zřejmě způsobeno právě touto substancí.



Obrázek 10. Analýza redoxního posunu proteinu α -tubulinu provedena na rostlinách *A. thaliana* ekotyp Columbia (Col-0; divoký typ), *fsd1-1* a *fsd1-2* mutantních liniích, které byly podrobeny 30 minut dlouhému ošetření $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ methyl viologenem (MV). A) Redoxní posun proteinu α -tubulinu doplněný o kontrolu nanášky proteinu vizualizovanou pomocí Ponceau S. Analýza je rozdělena na dvě části, část bez značení mPEG (-mPEG), která slouží jako kontrola čistoty protilátky a ke stanovení molekulové hmotnosti, část se značením pomocí mPEG (+mPEG), která slouží z rozoznání jednotlivých oxidovaných stavů α -tubulinu. Membrána obsahuje proteinové extrakty jak z mokré kontroly (označeno jako „C“), tak z rostlin ošetřených MV (označeny jako „P“). Šipkami s příslušnými popisky jsou označeny pásy indikující redukovanou a oxidované formy; B) Semikvantitativní analýza optických denzit jednotlivých zachycených pásů. Hvězdičky vyznačují statisticky významné rozdíly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami ošetřenými MV.

4.4 Analýza oxidačních stavů HSP70

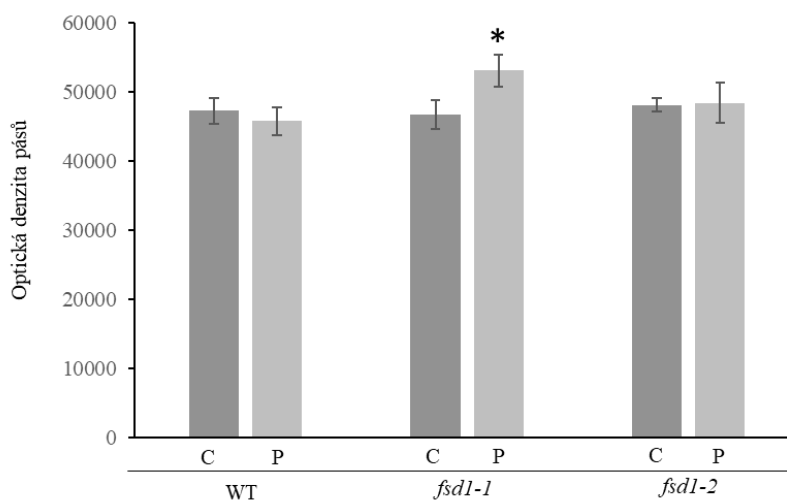
Druhým vybraným proteinem z redoxního proteomu je HSP70-1 (heat shock protein 70-1). Obdobně byla provedena analýza redoxního posunu proteinů pomocí polyklonální protilátky proti HSP70. U námi používané protilátky byla už dříve experimentálně ověřena její specifita (Bychkov *et al.*, 2022). Tyto výsledky potvrzují i naše experimenty (Obr. 12A, levý panel).

Analýza oxidačních stavů HSP70 vedla k identifikaci dvou pásů (Obr. 12A, pravý panel). Pás s nejnižší Mr o hodnotě 70,6 kDa, která souhlasila s Mr HSP70 na imunoblotové analýze bez substance mPEG, měl největší optickou denzitu a představuje redukovanou formu HSP70. Zbývající pás s Mr 76,31 kDa situovaný výše představuje oxidovanou formu. Abundance oxidovaného HSP70 byla v porovnání s redukovaným HSP70 méně výrazná. Z těchto získaných výsledků lze vyvodit, že v podmínkách oxidativního stresu navozeném MV podléhá HSP70 oxidaci na jednom cysteinovém zbytku.

Pomocí bioinformatických nástrojů a databází byly predikovány tzv. redoxně aktivní cysteinové zbytky. Celkem bylo predikováno 7 redoxně aktivních cysteinových zbytků CYS20, CYS273, CYS319, CYS326, CYS366, CYS483, CYS609 (Příloha 5). Experimentálně byly potvrzeny oxidace tří z nich, a to na pozici CYS319 (S-nitrosylace), CYS326 (S-nitrosylace) a CYS609 (S-nitrosylace, S-sulfenylace a S-sulfhydratace; Příloha 6). Naše výsledky ukazují, že metoda redoxního posunu proteinů odhalila 1 oxidační stav u HSP70 v *A. thaliana in vivo*.

Při semikvantitativní analýze optických denzit pásů imunoblotové analýzy bez použití mPEG nebyly naměřeny signifikantní rozdíly mezi kontrolními podmínkami a podmínkami oxidativního stresu u rostlin divokého typu. U *fsd1-1* mutantních rostlin došlo ke zvýšení abundance HSP70 po aplikaci 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ MV v porovnání s kontrolními podmínkami. U *fsd1-2* mutantních rostlin nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi kontrolními podmínkami a podmínkami oxidativního stresu (Obr. 11). Z těchto výsledků vyplývá, že HSP70 může rostlině napomáhat v obraně vůči oxidativnímu stresu.

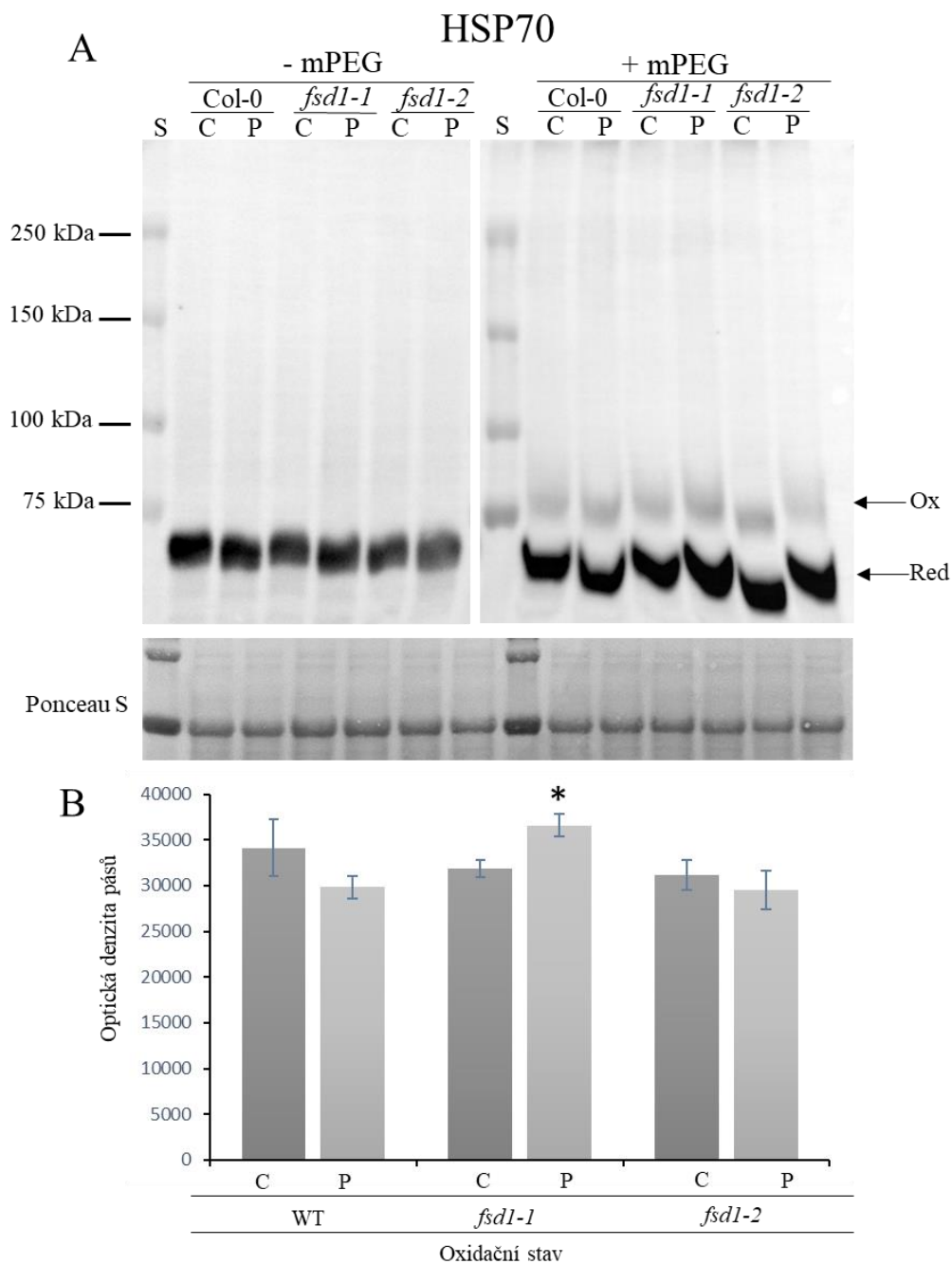
Semikvantitativní měření optických denzit jednotlivých pásů příslušících pouze oxidované formě proteinu odhalily, že v případě divokého typu (Col-0) došlo ke snížení abundance u rostlin ošetřených tekutým ARA médiem s 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ MV v porovnání



Obrázek 11. Semikvantitativní analýza optické denzity pásů představujícího HSP70 v rostlinách *A. thaliana* ekotyp Col-0 (WT), *fsd1-1* a *fsd1-2* v kontrolních podmínkách a po ovlivnění rostlin ARA médiem s přidavkem $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ methyl viologenem (MV). Vizualizace HSP70 je uvedena na obrázku č. 12A, levý panel. „C“ – mokrá kontrola; „P“ – ovlivnění MV. Analýza byla provedena z třech nezávislých biologických replik. Hvězdičkami jsou označeny signifikantní rozdíly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami ovlivněnými MV.

s kontrolními podmínkami (tekuté ARA médium). Nicméně, u *fsd1-1* mutantních rostlin byl tento trend zcela opačný. Rostliny ošetřené tekutým ARA médiem s $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MV prokázaly vyšší míru oxidace HSP70 v porovnání s kontrolními podmínkami. U mutantních rostlin *fsd1-2* došlo k velmi mírnému poklesu abundance oxidované formy po ovlivnění rostlin $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MV v porovnání s kontrolními podmínkami (Obr. 12B).

Stejně jako u α -tubulinu, i zde byla pozorována menší hodnota Mr HSP70 (Obr. č. 12A, levý panel) v porovnání s hodnotou Mr u redukované formy HSP70. Znovu je zde možné vysvětlení, že motilita proteinu byla ovlivněna substancí mPEG.



Obrázek 12. Analýza redoxního posunu proteinu HSP70 provedena na rostlinách *A. thaliana* ekotyp Columbia (Col-0; divoký typ), *fsd1-1* a *fsd1-2* mutantních liniích, které byly podrobeny 30 minut dlouhému ošetření $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ methyl viologenem (MV). A) Redoxní posun proteinu HSP70 doplněný o kontrolu nanášky proteinu vizualizovanou pomocí Ponceau S. Analýza je rozdělena na dvě části, levý panel (-mPEG), který slouží jako kontrola čistoty protilátky a ke stanovení molekulové hmotnosti, pravý panel (+mPEG), který slouží k rozeznání jednotlivých oxidovaných stavů HSP70. Membrána obsahuje proteinové extrakty jak z mokré kontroly (označeno jako „C“), tak z rostlin ošetřených MV (označeny jako „P“). Šipkami s příslušnými popisky jsou označeny pásy indikující redukovanou a oxidované formy; B) Semikvantitativní analýza optických denzit jednotlivých pástů. Hvězdičkami jsou označeny signifikantní rozdíly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami ovlivněnými MV.

4.5 Analýza oxidačních stavů katalas

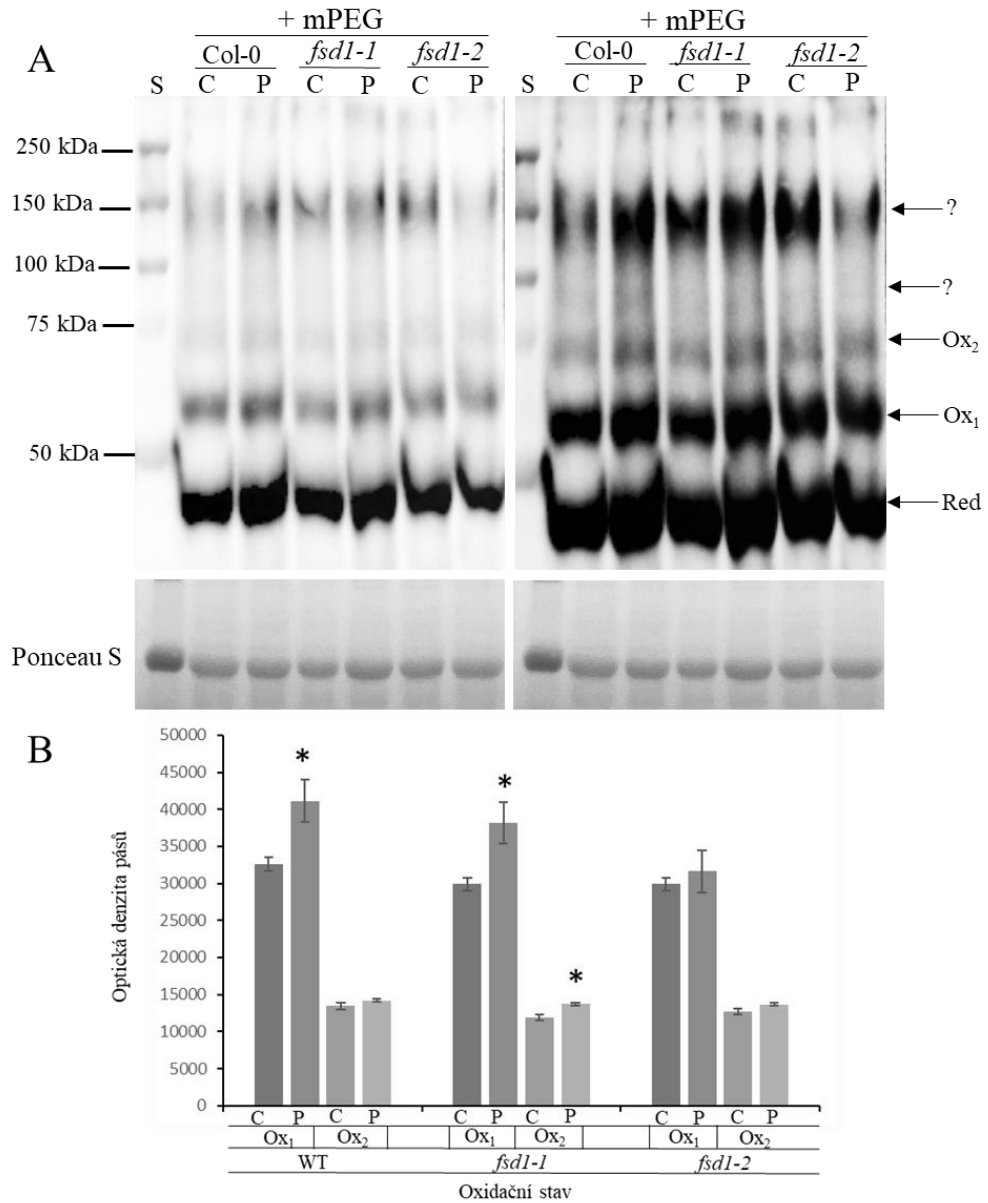
Katalasy podléhají početným oxidacím (Lledías *et al.*, 1998; van Leeuwen *et al.*, 2017), a proto byla specifická protilátka rozeznávající 3 isoformy katalasy využita pro kontrolu funkčnosti metody redoxního posunu proteinů. Imunoblotová analýza rostlin *A. thaliana* ukázala, že použití protilátky vede k detekci jediného pásu (Melicher *et al.*, 2023), který ale představuje všechny 3 isoformy (CAT1, CAT2 a CAT3).

Při analýze redoxního posunu proteinů pro katalasu bylo identifikováno celkem pět pásů na PVDF membráně. Spodní a zároveň nejvíce abundanční pás s Mr o hodnotě 46,36 kDa byl přiřazen redukované formě. Čtyři výše situované pásy měli Mr 58,66, 70,4, 86,13 a 147,68 kDa. Teoreticky by dané pásy mohly představovat 2, 5, 9 a 20 oxidovaných cysteinů.

Aminokyselinová sekvence CAT1 obsahuje 6 cysteinů, ze kterých 4 byly predikovány jako redoxně aktivní a 2 byly experimentálně detekovány jako oxidované (Přílohy 3 a 4). CAT2 má 5 redoxně aktivních cysteinů ze 6 a 4 byly experimentálně potvrzeny. CAT3 má 5 redoxně aktivních cysteinů ze 7, přičemž 4 byly experimentálně potvrzeny (Přílohy 3 a 4). To znamená, že nejvyšší možný oxidační stav může být detekován pro CAT2 a CAT3, u kterých by simultánní oxidace 5 cysteinů představovala posun v elektroforetické mobilitě o 25 kDa. Z těchto důvodů považujeme pásy s Mr 58,66 a 70,4 jako možné oxidační stavy isoform katalas. Abundance pásy s Mr 58,66 byla vyšší v porovnání s pásem s Mr 70,4, což naznačuje, že oxidační stav s oxidacemi 2 cysteinů je častější.

Poté bylo provedeno semikvantitativní měření optické denzity pásů představujících oxidované formy katalas. Ze získaných údajů bylo patrné, že už všech linií bylo pozorováno zvýšení abundance u oxidovaných stavů po ošetření rostlin ARA médiem s $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MV v porovnání s kontrolními podmínkami. Nejvyšší nárůst abundance byl vždy pozorován při prvním oxidačním stupni u rostlin divokého typu a *fsd1-1* mutantech, u *fsd1-2* nebyl nárůst tak markantní (Obr. 13B). Z těchto informací lze vyvodit, že katalasy jsou citlivé na oxidativní stres vyvolaný MV. Úloha FSD1 v regulaci jejích oxidace nebyla jednoznačně potvrzena.

Katalasa

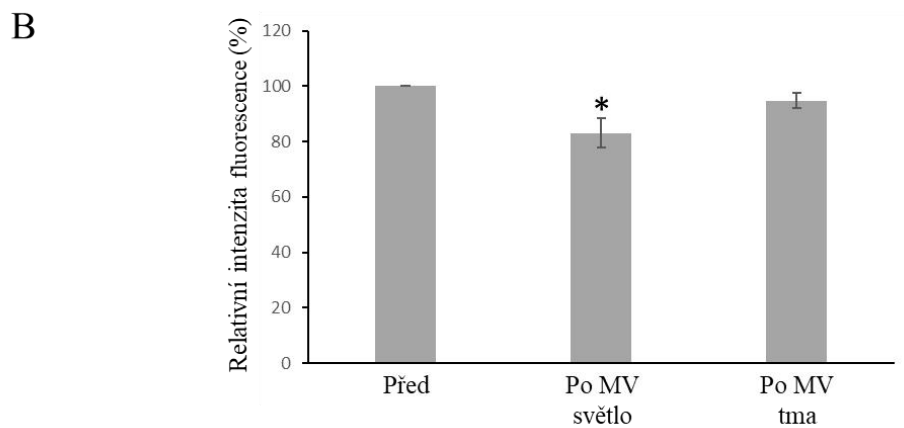
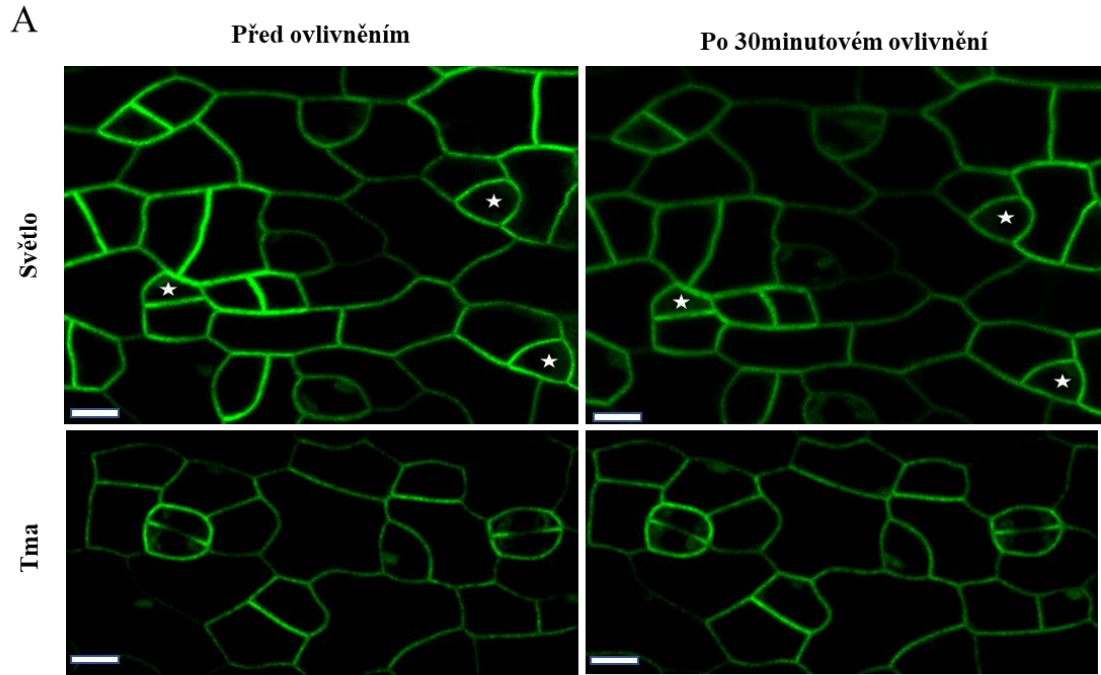


Obrázek 13. Analýza redoxního posunu proteinu katalasy (CAT) provedena na rostlinách *A. thaliana* ekotyp Columbia (Col-0; divoký typ), *fsd1-1* a *fsd1-2* mutantních liniích, které byly podrobeny 30 minut dlouhému ošetření $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ methyl viologenem (MV). A) Redoxní posun proteinů katalas doplněný o kontrolu nanášky proteinu vizualizovanou pomocí Ponceau S. Membrána obsahuje proteinové extrakty jak z mokré kontroly (označeno jako „C“), tak z rostlin ošetřených MV (označeny jako „P“). Šipkami s příslušnými popisky jsou označeny pásy indikující redukovanou a oxidované formy; B) Semikvantitativní analýza optických denzit jednotlivých pásů. Hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami ošetřenými MV.

4.6 Mikroskopická analýza GFP-PATL4 po navození oxidativního stresu

Pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie GFP-PATL4 rostlin byla potvrzena lokalizace PATL4 na plasmatické membráně, v prekurzorových buňkách průduchů (meristemoidech) a v průduších (Obr. 14A) prvních pravých listů stabilně transformovaných linií *patl4-1* exprimujících konstrukt *proPATL4::GFP-PATL4*. Zajímavé bylo zjištění, že fluorescenční signál GFP-PATL4 neměl ve všech buňkách stejnou intenzitu. V meristemoidech byla pozorována větší intenzita fluorescence v porovnání s jinými buňkami.

Poté byla monitorována intenzita fluorescence GFP-PATL4 v epidermálních buňkách prvního pravého listu po 30minutovém ošetření MV. U rostlin, které byly po aplikaci MV vystaveny světlu, došlo na plasmatické membráně ke statisticky signifikantnímu poklesu fluorescence GFP-PATL4. Naproti tomu, u rostlin, které byly po ošetření MV ponechány 30 minut ve tmě, nebyly pozorovány buď žádné změny intenzity fluorescence, nebo velmi malé snížení intenzity fluorescence (Obr 14B). Z těchto výsledků lze vyvodit, že abundance GFP-PATL4 je ovlivněna už po krátkodobém ovlivnění rostlin oxidativním stresem způsobeným MV, který je provázán s fotosyntetickou aktivitou buněk.

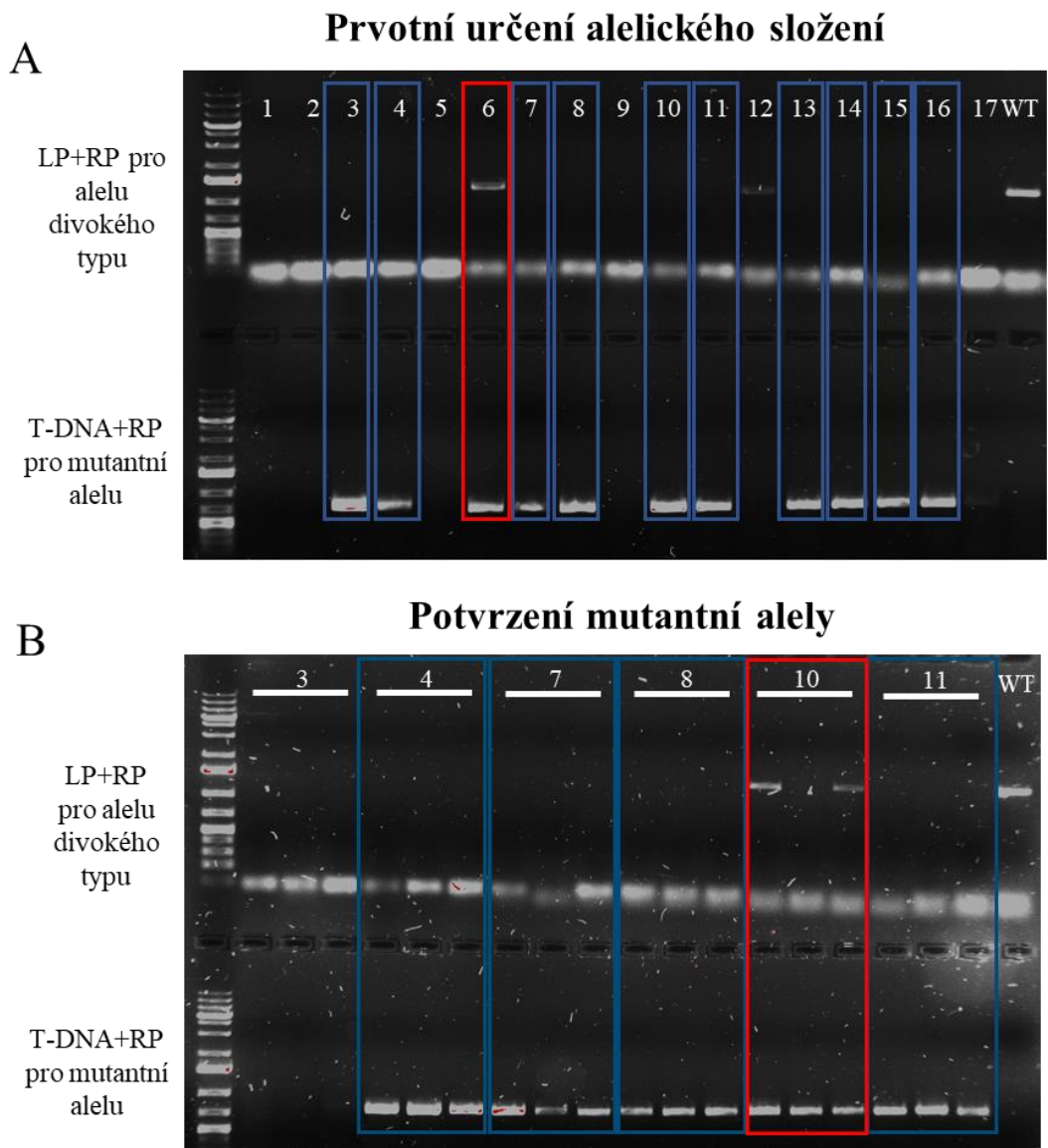


Obrázek 14. Lokalizace GFP-PATL4 v epidermálních buňkách prvního pravého listu *A. thaliana* po 30minutovém ovlivnění methyl viologenem (MV). A) Lokalizace GFP-PATL4 na plasmatické membráně v epidermálních buňkách prvního pravého listu před a po 30minutovém ovlivnění MV jak při světelných podmínkách, tak podmínkách tmy. Hvězdičkami jsou označeny prekuzory průduchů, meristemoidy, B) Semikvantitativní analýza intenzity fluorescence GFP-PATL4 měřená na plasmatické membráně před a po ovlivnění MV jak za světelných podmínek, tak za podmínek tmy. Hvězdička označuje statisticky signifikantní rozdíl mezi ošetřenými a neošetřenými buňkami. Měřítka u mikroskopických snímků bylo 10 μm .

4.7 Genotypová analýza *patl4* mutantních rostlin

Pro budoucí studium funkce proteinu PATL4 v reakci na oxidativní stres bylo zapotřebí vyselektovat mutantní rostliny *patl4*. Semena potenciálních mutantních rostlin jsme získali z genových bank, celkově 12 linií GabiKat a 1 linií SALK. Pomocí genotypové analýzy byly získány jak rostliny heterozygotní, obsahující jak alelu divokého typu, tak mutantní alelu s T-DNA inzercí, tak rostliny homozygotní, obsahující obě alely genu *PATL4* s T-DNA inzercí (Obr. 15). U těchto rostlin tedy nebyla detekována alela divokého typu. Přítomnost T-DNA inzerce byla identifikována pomocí specifické kombinace primerů v PCR reakci. Velikost PCR produktů pro kombinaci primerů pro alelu divokého typu byla porovnána s velikostí uvedenou v databázích. Pro GabiKat linie byly navrženy primery tak, aby amplifikovaný úsek pro alelu divokého typu byl mezi 1000-1500 bp. V našem případě byla konkrétní velikost 1324 bp. Tato velikost odpovídá velikosti PCR produktu na obrázku č. 15A. U alely mutantního typu s T-DNA inzercí jsou primery navrhovány tak, aby se velikost PCR produktu pohybovala mezi 300-800 bp, aby se mutantní alely daly spolehlivě rozlišit od alel divokého typu. Opět to v našem případě souhlasí. Velikost PCR produktu při kombinaci primerů pro mutantní alelu odpovídá danému rozsahu.

Homozygotní rostliny byly dále kultivovány v půdním substrátu a samosprášeny. S heterozygotními rostlinami bylo manipulováno jinak. Nejdříve byly také přeneseny do půdního substrátu, kultivovány a samosprášeny. V budoucích generacích byly pomocí genotypování vyselektovány rostliny, které už byly v genu *patl4* homozygotní. Celkově bylo vyselektováno 15 homozygotních rostlin *patl4-1* a 3 homozygotní rostliny *patl4-2*, jejichž semena byla následně použita pro budoucí analýzy.



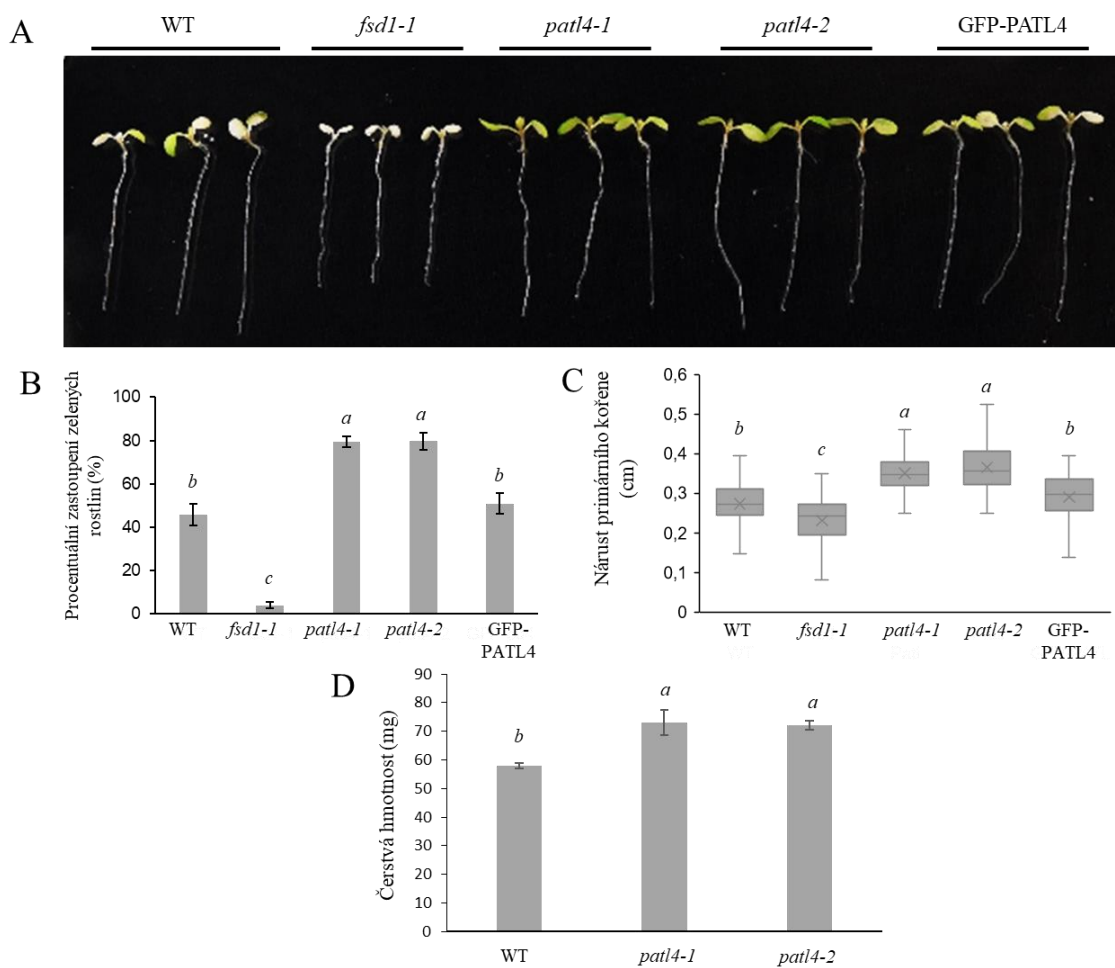
Obrázek 15. Genotypová analýza mutantních rostlin *pat14 A. thaliana* pomocí polymerázové řetězové reakce z linií GabiKat. Produkty PCR reakce byly separovány na 1% agarosovém gelu. A) Primární selekce potenciálních mutantních rostlin *pat14*; B) Potvrzení vyselektovaných mutantních rostlin *pat14* třemi nezávislými biologickými replikami. Modré rámečky indikují homozygotní mutantní rostliny, červené rámečky indikují heterozygotní mutantní rostliny.

4.8 Fenotypová analýza mutantů *patl4* po vystavení oxidativnímu stresu

K prozkoumání funkce PATL4 během oxidativního stresu vyvolaného MV byly 5denní semenáčky *A. thaliana* pěti různých genotypů, a to Col-0 (divoký typ), *fsd1-1*, *patl4-1*, *patl4-2* a komplementovaná linie nesoucí GFP-PATL4, přeneseny na ½ MS médium s přidavkem 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MV.

Dle očekávání *fsd1-1* mutantní rostliny vykazovaly hypersenzitivní reakci na oxidativní stres vyvolaný MV, což potvrdilo správnost nastavení experimentu. Tento fakt se projevil téměř kompletním vybělením listů (Obr. 16A) a navíc tyto rostliny vykazovaly nejvýraznější inhibici růstu primárního kořene (Obr. 16C). Oba *patl4* mutanti naopak vykazovali nejvyšší míru tolerance vůči oxidativnímu stresu, což bylo dáno nejvyšším poměrem plně zelených listů vůči těm vyběleným a nejvýraznějším nárůstem primárního kořene po přenosu na ½ MS médium s přidavkem 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MV (Obr. 16A-C). Rostliny divokého typu a GFP-PATL4 komplementované linie vykazovaly odolnost vyšší než u *fsd1-1* mutantních rostlin, ale nižší než *patl4* mutantních rostlin, což podpořilo fakt, že komplementace *PATL4* zvrátila fenotypovou reakci a odolnost *patl4* mutantních rostlin.

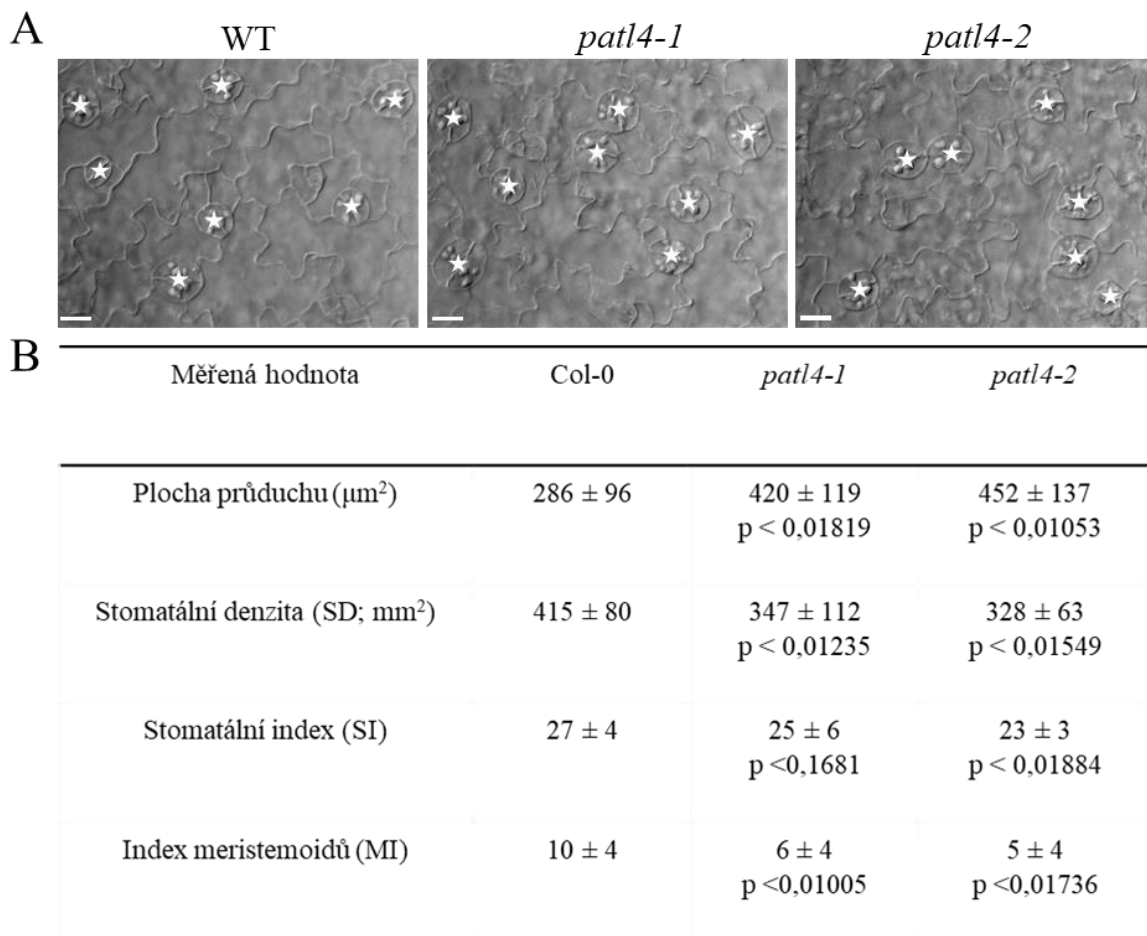
V kontrolních podmínkách (½ MS médium) nevykazovaly linie výrazné rozdíly v rychlosti růstu primárních kořenů a délce primárních kořenů (data neuvedena). Nicméně, *patl4* mutantní rostliny vykazovaly vyšší čerstvou hmotnost ve srovnání s divokým typem (Obr. 16D). Získaná experimentální data naznačila, že PATL4 má funkci v odpovědi rostlin vůči oxidativnímu stresu vyvolaném MV.



Obrázek 16. Fenotypová analýza reakcí rostlin *A. thaliana* Col-0, *fsd1-1*, *patl4-1*, *patl4-2* a GFP-PATL4 na oxidativní stres indukovaný 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ methyl viologenem (MV). A) Reprerentativní fotografický snímek semenáčků, které byly dokumentovány 7. den po přenosu na $\frac{1}{2}$ MS médiu s 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ MV. B) Kvantitativní analýza zastoupení plně zelených rostlin všech zkoumaných genotypů; C) Kvantitativní analýza inhibice růstu primárního kořene reprezentována rozdílem délky před přenosem a 7.den po přenosu v odpovědi na oxidativní stres indukovaný MV; D) Kvantitativní analýza biomasy 14denních semenáčků. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny pomocí písmen nacházejících se nad jednotlivými sloupci grafů.

4.9 Fenotypová analýza průduchů u mutantních rostlin *patl4*

Jelikož bylo prokázáno, že PATL4 je lokalizován v meristemoidech a průduších, tak zde vyplynula otázka, zda má v těchto buňkách nějakou funkci. Měření velikosti šířky a délky průduchů ukázalo, že průduchy u mutantních rostlin *patl4-1* a *patl4-2* jsou delší a širší v porovnání s průduchy u rostlin divokého typu. Co se týče plochy průduchů, tak byl pozorován podobný trend (Obr. 17B). Průduchy u *patl4* mutantních rostlin měly větší plochu. Statistické vyhodnocení pomocí ANOVA testu s post-hoc Tukey HSD testem zaznamenalo statistický rozdíl mezi rostlinami divokého typu a *patl4* mutanty. Ke zjištění funkce PATL4 při vývoji průduchů byly porovnány hodnoty stomatální denzity (SD), stomatálního indexu (SI) a indexu meristemoidů (MI) rostlin divokého typu a *patl4* mutantů (Obr. 17B). Mezi rostlinami divokého typu a oběma *patl4* byly u hodnot SD a MI nalezeny statisticky signifikantní rozdíly, kdežto u hodnot SI byl tento statisticky signifikantní rozdíl nalezen jen mezi rostlinami divokého typu a mutantních rostlin *patl4-2*. Z výsledků je patrné, že *patl4* mutantní rostliny mají nižší hodnoty všech tří zkoumaných parametrů v porovnání s divokým typem, což naznačuje funkci PATL4 při zakládání a vývoji průduchů.



Obrázek 17. Fenotypová analýza průduchů u rostlin divokého typu a *patl4* mutantních rostlin *A. thaliana* v kontrolních podmínkách. A) Snímky prvních pravých listů rostlin divokého typu (WT) a *patl4* mutantů *A. thaliana*, které byly zbaveny chlorofylu; B) Souhrn plochy průduchů, stomatální denzity (SD), stomatálního indexu (SI) a indexu meristemoidů (MI) různých genotypů *A. thaliana*. Jednotlivé hodnoty jsou vyjádřena společně se směrodatnými odchylkami a *p* hodnoty znázorňující statisticky výrazné rozdíly mezi divokým typem a *patl4* mutantními rostlinami. Měřítka u mikroskopických snímků je 10 μm .

5 DISKUSE

5.1 Vliv FSD1 na redoxní modifikace

FSD1 je důležitý antioxidantní enzym, který společně s ostatními SOD působí jako první linie antioxidantní obrany. Má významnou roli při obraně rostlin vůči oxidativnímu a solnému stresu (van Breusegem *et al.*, 1999; Dvořák *et al.*, 2021a). SOD jsou jedním z hlavních producentů H_2O_2 , který může sloužit jako signální molekula. Z těchto důvodů existují indicie, že by SOD mohly mít funkci v redoxní signalizaci. Redoxní signalizace vyvolaná ROS u rostlin spouští program genové exprese, který pomáhá udržovat buněčnou redoxní homeostázu a průběh mnoha základních biologických procesů souvisejících s buněčnou proliferací a diferenciací (Farooq *et al.*, 2019).

U rostlin doposud nebyla experimentálně prokázána redoxní signalizace skrze SOD. Naproti tomu, u savčích buněk jich bylo ukázáno hned několik. Například, CuZnSOD je schopna se fyzicky vázat na podjednotku regulující specifické isoformy NADPH oxidas (NOX) Rac1. Při mutaci této SOD došlo k narušení redoxní regulace podjednotky Rac1 a celkové aktivity NOX (Harraz *et al.*, 2008). NOX jsou enzymy generující $O_2^{\cdot-}$, což naznačuje, že lokalizace CuZnSOD v jejich těsné blízkosti přináší možnost omezit difuzní vzdálenost $O_2^{\cdot-}$, který má být přísně regulovaným a prostorově orientovaným způsobem přeměněn na H_2O_2 . Navíc, H_2O_2 pocházející z této interakce NOX-CuZnSOD se přímo podílí na fyziologické aktivaci transkripčních faktorů citlivých na redoxní změny, jako je NF κ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells; Mumbengegwi *et al.*, 2008).

Optimalizovaná metoda redoxního posunu proteinů ukázala, že již 30minutové ovlivnění rostlin MV způsobuje vyšší oxidaci katalasy a α -tubulinu u divokého typu, přičemž oxidované formy HSP70-1 měly sníženou abundanci. Oxidační modifikace rostlinných katalas byly dobře popsány. Např. CYS420 je vysoce konzervovaný mezi všemi třemi isoformami katalas u *A. thaliana* a může podléhat S-nitrosylaci (Palma *et al.*, 2020). Dalším cysteinovým zbytkem společným pro všechny tři isoformy katalas je CYS230, který také podléhá S-nitrosylaci (Hu *et al.*, 2015). Kromě S-nitrosylace, byla u katalasy 3 identifikována přímá oxidace na CYS402 po vystavení rostlin nízkým teplotám (O'Slade *et al.*, 2015). Naše výsledky ukazují přítomnost 2 oxidačních stavů katalas, což může naznačovat, že katalasy jsou regulované vícenásobnými modifikacemi cysteinů. Není možné ale rozlišit, kterých isoform se daná oxidace týká.

Proto je jednou z důležitých podmínek úspěšného použití redoxního posunu proteinů výběr specifické protilátky, nebo použití dvojitéch mutantů s expresí pouze jedné isoformy. Experiment s dvojitými mutanty by také vyřešil otázku původu pásů na imunoblotové analýze s vyššími Mr u katalas. Významný je ale poznatek, že k oxidaci peroxisomálních katalas dochází po indukci tvorby ROS v chloroplastech, což může představovat nový mechanismus aktivace antioxidační obrany.

Z námi získaných výsledků z redoxního posunu proteinů nelze jednoznačně určit, zda FSD1 má regulační vliv na redoxní modifikace katalas, protože jsme zjistili rozdíly mezi *fsd1* mutantními rostlinami. Oxidace katalas se mezi rostlinami divokého typu a mutanty *fsd1-1* nelišila, přičemž u *fsd1-2* mutantních rostlin jsme změny v oxidaci nepozorovali. Podobné výsledky jsme pozorovali také u HSP70 a α -tubulinu. Tyto výsledky nekorelují s vysokou senzitivitou obou mutantů vůči oxidativnímu stresu (Dvořák *et al.*, 2021a). Na druhou stranu, tento efekt může být také způsoben tím, že při vyřazení *FSD1* genu dochází ke zvýšené akumulaci O_2^- kvůli snížené schopnosti jej dismutovat na H_2O_2 (Melicher *et al.*, 2022). O_2^- nemá v porovnání s H_2O_2 tak výrazné schopnosti reverzibilně oxidovat cysteinové zbytky v proteinech (Mittler *et al.*, 2022). O_2^- má spíše schopnost v proteinech napadat a poškozovat Fe-S klastry (Melicher *et al.*, 2022). Je proto možné že FSD1 nemá rozhodující vliv na redoxní modifikace těchto proteinů. Ještě je dobré vzpomenout, že ošetření rostlin trvalo pouze 30 minut. U déletrvajícího ošetření by mohl být efekt jiný.

5.2 Oxidace cysteinových zbytků α -tubulinu se mění po ovlivnění MV

Z našich výsledků vyplývá, že α -tubulin podléhá oxidačním modifikacím cysteinů v rostlinách *A. thaliana*. U divokého typu ovlivnění MV způsobilo zvýšení abundance oxidovaných forem proteinu. Je známo, že tubuliny jsou citlivé na oxidativní stres a že jejich cysteinové zbytky mohou být snadno oxidovány i po krátkém působení ROS. Oxidace cysteinových zbytků může podporovat zesíťování mezi α a β tubulinovými podjednotkami v důsledku tvorby disulfidových vazeb, a tím bránit polymeraci a sestavení mikrotubulů (MT; Landino *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2014). U *A. thaliana* způsobila 30minutová exogenní aplikace H_2O_2 kompletní depolymerizaci MT (Song *et al.*, 2020). Kromě efektů depolymerizace mohou ROS vyvolat tvorbu netypicky uspořádaných MT, které tak v buňce neplní svou funkci (Livanos *et al.*, 2011; Bogoutdinova *et al.*, 2020). Je zajímavé, že chybějící exprese *FSD1* způsobující akumulaci O_2^- nevedla ke zvýšení oxidace v porovnání s divokým typem. Dopad

samotné oxidace na α -tubulin a podíl FSD1 na tomto jevu by se dal studovat prostřednictvím mutantní rostliny *fsd1* exprimující fluorescenčně značené MT, například pomocí konstruktů TUA6-GFP či TUA6-mRFP. Po aplikaci oxidativního stresu by se dal mikroskopicky potvrdit vliv mutace v genu *FSD1* na struktury MT.

U rostlin bohužel existuje velmi málo poznatků o oxidaci tubulinových podjednotek. Nicméně, proteomická analýza rostlin *A. thaliana* ošetřených H_2O_2 ukázala, že α a β tubulinové podjednotky jsou náchylné k oxidaci (Wang *et al.*, 2012). Kromě toho bylo pomocí proteomické analýzy zjištěno, že obě podjednotky tubulinu podléhají v buňkách *A. thaliana* S-glutathionylaci. Vazba GSH poskytuje ochranu thiolových skupin cysteinů před oxidací. Neexistují ale důkazy o oxidaci α -tubulinu po indukci tvorby ROS v chloroplastech. Bylo ale zjištěno, že MT (společně s aktinem) obklopují chloroplasty a vytvářejí kolem nich komplexní síť, obzvláště v kortikální oblasti buněk. Navíc, MT mají společně s aktinem roli při organizaci chloroplastů v rámci buňky. Po aplikaci oryzalinu (indukuje rozpad MT) bylo uspořádání chloroplastů v buňce náhodné a mnohdy se chloroplasty agregovaly do nefunkčních shluků (Chuong *et al.*, 2006). Je možné proto vyslovit hypotézu, že oxidace α -tubulinu může souviset s rolí MT v prostorovém uspořádání chloroplastů u *A. thaliana*. Role MT ve spojení s narušením procesu fotosyntézy není ale vůbec prostudována.

5.3 Oxidativní stres snížil abundanci GFP-PATL4

Naše výsledky z mikroskopické analýzy ukázaly, že se abundance GFP-PATL4 snížila po 30minutovém působení oxidativního stresu vyvolaném MV. Tyto výsledky potvrdily změnu abundance PATL4, která byla zjištěna po diferenciální proteomické analýze divokého typu *A. thaliana* (Melicher *et al.*, 2023). Jelikož jsou pravděpodobně všichni zástupci PATL rodiny lokalizováni na plasmatické membráně a buněčné destičce a jsou spojováni s pletivou, které podléhají vysoké mitotické aktivitě (Tejos *et al.*, 2018), tak jev snížené abundance může být spojován s narušením mitotické aktivity. Z našich výsledků je také znatelné, že k největším poklesům abundance docházelo právě na plasmatické membráně prekurzorových buněk průduchů a pravděpodobně nově vznikajících buněk.

Jsou známy experimentální data, která ukazují, že při oxidativním stresu, který byl vyvolaný vysokou salinitou, došlo k ovlivnění mitotické aktivity buněk, ba dokonce k výskytu chromosomových abnormalit (Singh a Roy, 2016). Oxidativní stres má velmi

komplexní vliv na mitotickou aktivitu. Vlivem oxidativního stresu indukovaného MV a alloxanem došlo u rostlin *A. thaliana* ke změně orientace růstu, která zahrnovala snížení aktivity buněčného dělení v apikálním meristému kořene (Pasternak *et al.*, 2005a). Dle našich výsledků mají mutantní rostliny *patl4* v podmínkách oxidativního stresu delší primární kořeny v porovnání s divokým typem. Tento jev může souviset právě s mitotickou aktivitou v meristemické zóně kořene. Pro pochopení specifčnosti těchto morfogenních procesů je také třeba zohlednit lokální gradienty auxinu a ROS.

Oxidativní stres hraje specifickou roli v regulaci progresu buněčného cyklu (Pyo *et al.*, 2013). Experimentální data naznačují, že oxidativní stres může nepřímo ovlivňovat mitotickou aktivitu tím, že zvyšuje účinky auxinu na růst. Práce na rostlinách *A. thaliana* vystavených abiotickému stresu ukázaly význam změn v gradientech auxinu pro reakce rostlin na stres, včetně morfogeneze (Pasternak *et al.*, 2005b). Oxidativní stres vyvolává široké spektrum účinků podobných auxinu (včetně inhibice elongace primárních kořenů a inhibice prodlužování listů a kotyledonů) a tyto účinky odpovídají změnám v hladinách a/nebo distribuci auxinu. Navíc, během oxidativního stresu je exprese genů *PIN1* a *PIN3* (auxinové transportéry) snížena, což odpovídá roli auxinových gradientů v reakcích na stresové podmínky. Zajímavé je, že *PATL4* koexperimentuje s *PIN1* a *patl4* mutantní rostliny vykazují repolarizaci *PIN1* (Tejos *et al.*, 2018). Je tedy možné, že *PATL4* ovlivňuje prodlužování kořene skrze regulaci repolarizace *PIN1*. Doposud ale nebyla prokázána spojitost auxinové signalizace s ROS produkovanými v chloroplastech při oxidativním stresu. Proto naše hypotéza vyžaduje další zkoumání. Avšak bylo by to zajímavým předmětem dalšího zkoumání.

5.4 Mutantní rostliny *patl4* jsou odolnější vůči oxidativnímu stresu

Doposud bylo objeveno několik důkazů o tom, že *PATL* jsou spojeny se signalizací pomocí auxinu (Tejos *et al.*, 2018), stejně tak jako s odolností vůči vysokému zasolení (Hsu *et al.*, 2009) či imunitou vůči virům (Peiro *et al.*, 2014). Z našich výsledků fenotypovacích analýz vyplývá, že mutantní rostliny *patl4* jsou odolnější vůči oxidativnímu stresu vyvolaném MV. Domníváme se, že tato funkce může být také propojena se schopností *PATL* ovlivňovat auxinovou signalizaci.

Auxin je dobře známý tím, že reguluje mnoho růstových a vývojových procesů, jako je vývoj meristému, buněčné dělení, prodlužování buněk a udržování polarity (Pan

et al., 2015; Verma *et al.*, 2021), v čemž se prolíná s funkcemi PATL. Poslední dobou je také funkce auxinu spojována s obranyschopností rostlin vůči stresovým podmínkám (Verma *et al.*, 2022).

Hladiny auxinu a ROS se rychle mění vlivem stresových faktorů prostředí. Bylo prokázáno, že exogenně aplikovaný auxin indukuje produkci H₂O₂ (Takáč *et al.*, 2016). Iglesias *et al.* (2010) experimentálně potvrdili, že rostliny mutantní v genech kódující auxinové receptory jsou odolnější vůči oxidativnímu stresu indukovaném MV. Ukázalo se, že pro auxinem indukovanou produkci H₂O₂ je nutná aktivace fosfatidylinositol-3-kinasy. Ošetření rostlin inhibitory fosfatidylinositol-3-kinasy razantně snížilo produkci ROS (Joo *et al.*, 2005). Elongace rostlinných buněk vyvolaná auxinem je zprostředkována produkcí ·OH a H₂O₂. Produkované ·OH prostřednictvím reakcí katalyzovaných peroxidasami napomáhají narušení polysacharidů buněčné stěny, což má za následek zvýšenou míru elongace rostlinných buněk (Schweikert *et al.*, 2000).

Mimo odolnosti vůči oxidativnímu stresu jsme objevili, že u *patl4* mutantních rostlin dochází k vytváření větších průduchů. Tento jev může právě souviset se schopností *patl4* mutantních rostlin efektivněji vyměňovat plyny s okolním prostředím, a tak lépe odolávat stresovým podmínkám. Už dříve bylo prokázáno, že oxidativní stres vyvolaný MV indukuje uzavírání průduchové štěrbin a tím snižuje výměnu plynů s okolím (McAinsh *et al.*, 1996). To by poukazovalo na negativní regulační úlohu PATL4 ve vývoji průduchů a odolnosti vůči oxidativnímu stresu. Přesný mechanismus, jakým PATL4 reguluje odolnost vůči oxidativnímu stresu zůstává ale nejasný a bylo by přinejmenším zajímavé jej důkladně prostudovat.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly teoreticky shrnuty poznatky z oblasti reaktivních forem kyslíku, jejich negativních či pozitivních dopadů, signalizace a antioxidační obrany u rostlin, zejména superoxiddismutasám s železným kofaktorem. Další kapitola je věnována posttranslačním modifikacím zprostředkovaným ROS a RNS primárně na cysteinových zbytcích proteinů. Předposlední kapitola pojednává o laboratorních technikách a metodách, pomocí kterých je možné redoxní posttranslační modifikace identifikovat. Poslední kapitola se věnuje problematice patellinů a jejich funkcí u rostlin.

Cílem této práce bylo charakterizovat vliv FSD1 na redoxní signalizaci v podmínkách oxidativního stresu indukovaného MV. Naše výsledky odhalily nové signální mechanismy spojené s odpovědí rostlin na oxidativní stres vyvolaný v chloroplastech. Pomocí redoxní proteomické analýzy jsme identifikovali HSP70-1 a α -tubulin 4 jako redoxně aktivní v podmínkách oxidativního stresu. Oba zmíněné proteiny byly dále analyzovány pomocí redoxního posunu proteinů, kde bylo zjištěno, že α -tubulin podléhá oxidaci po ošetření rostlin MV. Tyto výsledky mohou naznačovat důležitou úlohu MT v odpovědi na oxidativní stres vyvolaný v chloroplastech. Katalasa byla vyhodnocena jako velmi redoxně senzitivní na podmínky oxidativního stresu. Nicméně, detekce oxidace proteinů *in vivo* je velmi obtížná. Redoxní posun proteinů s využitím mPEG je vhodná metoda pro detekci oxidovaných stavů *in vivo*, avšak je nutno říct, že metoda vyžaduje použití specifické protilátky.

Pomocí mikroskopické analýzy jsme také zjistili, že PATL4 je proteinem, jehož abundance se už po 30minutovém působení oxidativního stresu snižuje. Reverzní genetické analýzy ukázaly, že PATL4 má pravděpodobně negativní regulační funkci v odpovědi na oxidativní stres. Tento účinek může být následkem regulace dělení buněk při vývoji průduchů, což může vést ke změnám ve výměně plynů přes průduchy. Patellin je proto zcela novým proteinem s důležitou funkcí v odpovědi rostlin na oxidativní stres v chloroplastech. Celkově tyto výsledky mohou být užitečné při objevování dalších funkcí PATL4.

7 LITERATURA

- Apel K. a Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Reviews in Plant Biology* **55**, 373-399. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Babbs Ch.F., Pham J.A., Coolbaugh R.C. (1989): Lethal Hydroxyl Radical Production in Paraquat-Treated Plants. *Plant Physiology* **90**(4), 1267-1270. DOI: 10.1104/pp.90.4.1267
- Balla T. (2013): Phosphoinositides: Tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiological reviews* **93**(3), 1019-1137. DOI: 10.1152/physrev.00028.2012
- Bankaitis V.A., Mousley C.J., Schaaf G. (2010): The Sec14 superfamily and mechanisms for crosstalk between lipid metabolism and lipid signaling. *Trends in Biochemical Sciences* **35**(3), 150-160. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.10.008
- Bannister W.H., Bannister J.V., Barra D. *et al.* (1991): Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Research Communications* **12**(1), 349-361. DOI: 10.3109/10715769109145804
- Bateman R.L., Rauh D., Tavshaniyan B. *et al.* (2008): Human carbonyl reductase 1 is a S-nitrosoglutathione reductase. *Journal of Biological Chemistry* **283**(51), 35756-35762. DOI:10.1074/jbc.M807125200
- Baxter A., Mittler R., Suzuki N. (2014): ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**(5), 1229-1240. DOI: 10.1093/jxb/ert375
- Behnar M., Forrester M.T., Hess D.T. *et al.* (2008): Regulated protien denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**(5879), 1050-1054. DOI:10.1126/science.1158265
- Berndt C., Lilling Ch.H., Holmgren A. (2007): Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Heart and Circulatory Physiology* **292**(3), 1227-1236. DOI: 10.1152/ajpheart.01162.2006
- Bobrowski K., Hug G.L., Pogocki D. *et al.* (2007): Stabilization of sulfide radical cations through complexation with the peptide bond: mechanisms relevant to oxidation of proteins containing multiple methionine residues. *Journal of physical chemistry* **111**(33), 9608-9620. DOI:10.1021/jp071191w
- Bogoutdinova L.R., Lazareva E.M., Chaban I.A. *et al.* (2020): Salt stress-induced structural changes are mitigated in transgenic tomato plants overexpressing superoxide dismutase. *Biology* **9**(9), 297-307. DOI:10.3390/biology9090297
- Bowler Ch., Van Camp W., Van Montagu M. *et al.* (1994): Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**(3), 199-218. DOI: 10.1080/07352689409701914
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
- Brennan J.P., Wait R. Begum S. *et al.* (2004): Decetion and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* **279**(40), 41352-41360. DOI:10.1074/jbc.M403827200
- Breviario D., Giani S., Morello L. (2013): Multiple tubulins:evolutionary aspects and biological implications. *The Plant Journal* **75**(2), 202-218. DOI:10.1111/tpj.12243
- Brown F.D., Rozelle A.L., Yin H.L. *et al.* (2001): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6 regulated membrane traffic. *Journal of Cell Biology* **154**(6), 1007-1018. DOI: 10.1083/jcb.200103107
- Bueso E., Alejandro S., Carbonell P. *et al.* (2007): The lithium tolerance of the *Arabidopsis cat2* mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. *The Plant Journal* **52**(6), 1052-1065. DOI:10.1111/j.1365-313X.2007.03305.x
- Burgoyne J.R., Oviosu O., Eaton P. (2013): The PEG-switch assay: A fast semi-quantitative method to determine protein reversible cysteine oxidation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **68**(3), 297-301. DOI: 10.1016/j.vascn.2013.07.001
- Burkhead J.L., Reynolds K.A.G., Ghany S.E.A. *et al.* (2009): Copper homeostasis. *New Phytologist* **182**(4), 799-816. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x

- Bychkov I.A., Andreeva A.A., Kudryakova N.V. *et al.* (2022): The role of PAP4/FSD3 a PAP9/FSD2 in heat stress responses of chloroplast genes. *Plant Science* **322**, 111356. DOI: 10.1016/j.plantsci.2022.111359
- Calabrese V., Dattilo S., Petralia A. *et al.* (2015): Analytical approaches to diagnosis and treatment of aging and aging-related disease: redox statut and proteomics. *Free Radical Research* **49**(5), 511-524. DOI: 10.3109/10715762.2015.1020799
- Clark H.M., Hagedorn T.D., Landino L.M. (2014): Hypothiocyanous acid oxidation of tubulin cysteines inhibits microtubule polymerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **541**(1), 67-73. DOI:10.1016/j.abb.2013.10.026
- Cohu C.Ch., Abdel-Grany S.E., Gogolin R.K.A. *et al.* (2009): Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc superoxide dismutases: regulation and unexpected phenotypes in an *Arabidopsis* mutant. *Molecular Plant* **2**(6), 1336-1350. DOI: 10.1093/mp/ssp084
- Corpas F.J. a Barroso J.B. (2017): Lead-induced stress, which triggers the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion in *Arabidopsis* peroxisomes affects catalase activity. *Nitric Oxide* **68**, 103-110. DOI: 10.1016/j.niox.2016.12.010
- Costa N.J., Dahm Ch.C., Hurrell F. *et al.* (2003): Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxidants & Redox Signaling* **5**(3), 291-305. DOI:10.1089/152308603322110878
- Das K., Roychoudhury A. (2014): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* **2**(53), 1-13, DOI: 10.3389/fenvs.2014.00053.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H. *et al.* (2005): Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**(1), 268-281. DOI: 10.1105/tpc.104.026971
- Dayon L., Hainard A., Licker V. *et al.* (2008): Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Analytical Chemistry* **80**(8), 2921-2931. DOI:10.1021/ac702422x
- Del Río L.A. a López-Huertas E. (2016): ROS generation in peroxisomes and its role in cell signalling. *Plant & Cell Physiology* **57**(7), 1364-1376. DOI: 10.1093/pcp/pcw076.
- Derakhshan B., Wille P.C., Gross S.S. (2007): Inbaised identification of cysteine S-nitrosylation sites of proteins. *Nature Protocols* **2**(7), 1685-1691. DOI: 10.1038/nprot.2007.210
- Dietz K.J. (2014): Redox regulation of transcription factors in plant stress acclimation and development. *Antioxidants and Redox Signalling* **21**(9). DOI:10.1089/ars.2013.5672
- Dietz K.J., Horling F., Konig J. *et al.* (2002): The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1321-1329. DOI: 10.1093/jxb/53.372.1321
- Dogra V., Rochaix J.D. a Kim C. (2018): Singlet oxygen-triggered chloroplast to nucleus retrograde signalling pathways: an emerging perspective. *Plant, Cell & Enviroment* **41**(8), 1727-1738. DOI:10.1111/pce.13332
- Doulias P.S., Greene J.L., Greco T.M. *et al.* (2010): Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation. *PNAS* **107**(39), 16958-16963. DOI:10.1073/pnas.1008036107
- Du Y.Y., Wang P.Ch., Son Ch.P. (2008): Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**(10), 1318-1326. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2008.00741.x
- Dubiella U., Seybold H., Durian G. *et al.* (2013): Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *PNAS* **110**(21), 8744-8749. DOI:10.1073/pnas.1221294110
- Dugas D.V. a Bartel B. (2008): Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant & Molecular Biology* **67**, 403-417. DOI: 10.1007/s11103-008-9329-1
- Dvořák P., Krasnylenko Y., Ovečka M. *et al.* (2021a): *In vivo* light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection. *Plant, Cell & Environment* **44**(1), 68-87. DOI: 10.1111/pce.13894

- Dvořák P., Krasnylenko Y., Zeiner A. *et al.* (2021b): Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in Plant Science* **11**. DOI: 10.3389/fpls.2020.618835
- Exposito-Rodríguez M., Laissue P.P., Yvon-Durocher G. *et al.* (2017): Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nature Communications* **8**(49). DOI: 10.1038/s41467-017-00074-w
- Farmer E.E., Mueller M.J. (2013): ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signalling. *Annual Reviews of Plant biology* **64**, 429-450. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120132
- Farooq M.A., Niazi A.J., Akhtar J. *et al.* (2019): Acquiring control: the evolution of ROS-induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry* **141**, 353-369. DOI:10.1016/j.plaphy.2019.04.039
- Fichman Y., Zandalinas S.I., Peck S. *et al.* (2022): HPCA1 is required for systemic reactive oxygen species and calcium cell-to cell signaling and plant acclimation to stress. *The Plant Cell* **34**(11), 4453-4471. DOI:10.1093/plcell/koac241
- Foyer Ch.H. a Hanke G. (2022): ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *The Plant Journal* **111**, 642-661. DOI:10.1111/tpj.15856
- Foyer Ch.H. a Noctor G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* **28**(8), 1056-1071. DOI:1. 0.1111/j.1365-3040.2005.01327.x
- Foyer Ch.H., Ruban A.V. a Noctor G. (2017): Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. *Biochemical Journal* **474**(6), 877-883. DOI: 10.1042/BCJ20160814
- Gallie D.R. (2012): The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany* **64**(2), 433-443. DOI:10.1093/jxb/ers330
- Gallie D.R. a Chen Z. (2019): Chloroplast-localized iron superoxide dismutases FSD2 a FSD3 are functionally distinct in *Arabidopsis*. *PLoS One* **14**(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0220078
- Gardner P.R. a Fridovich I. (1991): Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *Journal of biological chemistry* **266**(29), 19328-19333. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)55001-8
- Gill S.S. a Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**(12), 909-930. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gilroy S., Bialasek M., Suzuki N. *et al.* (2016): ROS, Calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology* **171**(3), 1606-1615. DOI: 10.1104/pp.16.00434
- Goldstein S. a Czapski G. (1996): Formation of peroxynitrite from the nitrosation of hydrogen peroxide by an oxygenated nitric oxide solution. *Inorganic Chemistry* **35**(20), 5935-5940. DOI: 10.1021/ic960438t
- Gomes D., Agasse A., Thiebaud P. *et al.* (2009): Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* **1788**(6), 1213-1228. DOI:10.1016/j.bbamem.2009.03.009
- Gu X., Cao L., Wu X. *et al.* (2021): A lipid bodies-associated galactosyl hydrolase is involved in triacylglycerol biosynthesis and galactolipid turnover in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plants* **10**(4), 675. DOI:10.3390/plants10040675
- Guo J., Gaffrey M.J., Su D. *et al.* (2013): Resin-assisted enrichment of thiols as a general strategy for proteomic profiling of cysteine-based reversible modifications. *Nature Protocols* **9**(1), 64-75. DOI: 10.1038/nprot.2013.161
- Hake K. a Romeis T. (2019): Protein kinase-mediated signalling in pining: immune signal initiation, propagation, and establishment of long-term pathogen resistance in plants. *Plant, Cell & Environment* **42**(3), 904-917. DOI:10.1111/pce.13429

- Han H.J., Peng R.H., Zhu B. *et al.* (2014): Gene expression profiles of Arabidopsis under the stress of methyl viologen: a microarray analysis. *Molecular Biology Reports* **41**, 7089-7102. DOI: 10.1007/s11033-014-3396-y
- Harraz M.M., Marden J.J., Zhou W. *et al.* (2008): SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *The Journal of Clinical Investigation* **118**(2), 659-670. DOI:10.1172/JCI34060
- Hawkes T.R. (2014): Mechanisms of resistance to paraquat in plants. *Society of Chemical Industry* **70**, 1316-1323. DOI:10.1002/ps.3699
- Held J.M. a Gibson B.W. (2012): Regulatory control or oxidative damage? Proteomic approaches to interrogate the role of cysteine oxidation status in biological processes. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**(4). DOI: 10.1074/mcp.R111.013037
- Held J.M., Danielson S.R., Behring J.B. *et al.* (2010): Targeted quantitation of site-specific cysteine oxidation in endogenous proteins using a differential alkylation and multiple reaction monitoring mass spectrometry approach. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**(7), 1400-1410. DOI: 10.1074/mcp.M900643-MCP200
- Hsu J.L., Wang L.Y., Wang S.Y. *et al.* (2009): Functional phosphoproteomic profiling of phosphorylation sites in membrane fractions of salt-stressed *Arabidopsis thaliana*. *Proteome Science* **7**(42). DOI:10.1186/1477-5956-7-42
- Hu J., Huang X., Chen L. *et al.* (2015): Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **167**(4), 1731-1746. DOI:10.1104/pp.15.00026
- Huang J., Ghosh R., Bankaitis V.A. (2016): Sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins and the biological landscape of phosphoinositide signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (ABA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* **1861**(9), 1352-1364. DOI: 10.1016/j.bbailip.2016.03.027
- Huang W., Yang Y.J., Zhang S.B. (2019): The role of water-water cycle in regulating the redox state of photosystem I under fluctuating light. *Biochimica et Biophysica ACTA (BBA) – Bioenergetics* **1860**(5), 383-390. DOI: 10.1016/j.bbatio.2019.03.007
- Hurd T.R., Prime T.A., Harbour M.E. *et al.* (2007): Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by Redox Difference gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* **282**(30), 22040-22051. DOI: 10.1074/jbc.M703591200.
- Chan K.X., Mabbitt P.D., Phua S.Y. *et al.* (2016): Sensing and signaling of oxidative stress in chloroplast by inactivation of the SAL1 phosphoadenosine phosphatase. *PNAS* **113**(31), 4567-4576. DOI: 10.1073/pnas.1604936113
- Checa J. a Aran J.M. (2022): Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *Journal of Inflammation Research* **13**, 1057-1073. DOI: 10.2147/JIR.S275595
- Chen H., Lee J., Lee J.M. *et al.* (2022): MSD2, an apoplastic Mn-SOD, contributes to root skotomorphogenic growth by modulation ROS distribution in *Arabidopsis*. *Plant Science* **317**, 111192. DOI:10.1016/j.plantsci.2022.111192
- Chen Ch.A., Lin Ch.H., Druhan L.J. *et al.* (2011): Superoxide induces endothelial nitric-oxide synthase protein thiyl radical formation, a novel mechanism regulation eNOS function and coupling. *Journal of Biological Chemistry* **286**(33), 29098-29107. DOI:10.1074/jbc.M111.240127
- Chen S. a Dickman M.B. (2004): Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *Journal of Experimental Botany* **55**(408), 2617-2623. DOI:10.1093/jbx/erh275
- Chin D.Ch., Kumar R.S., Suen Ch.S. *et al.* (2019): Plant cytosolic ascorbate peroxidase with dual catalytic activity modulates abiotic stress. *iScience* **16**, 31-49. DOI: 10.1016/j.isci.2019.05.014
- Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E. *et al.* (2016): Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* **90**(5), 856-867. DOI:10.1111/tpj.13299
- Chouchani E.T., Hurd T.R., Nadtochiy S.M. *et al.* (2010): Identification of S-nitrosated mitochondrial proteins by S-nitrosothiol difference in gel electrophoresis (SNO-DIGE): implications for the regulation of mitochondrial function by reversible S-nitrosation. *Biochemical Journal* **430**(1), 49-59. DOI: 10.1042/BJ20100633.

- Chu M., Li J., Zhang J. *et al.* (2018): AtCaM4 interacts with a Sec14-like protein, PATL1, to regulate freezing tolerance in *Arabidopsis* in a CBF-independent manner. *Journal of Experimental Botany* **69**(21), 5241-5253. DOI:10.1093/jxb/ery278
- Chuong S.D.X., Franceschi V.R., Edwards G.E. (2006): The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C₄ photosynthesis in chenopodiaceae species. *The Plant Cell* **18**(9), 2207-2223. DOI:10.1105/tpc.105.036186
- Iglesias M.J., Terrile M.C., Bartoli C.G. *et al.* (2010): Auxin signaling participates in the adaptive response against oxidative stress and senescence by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **74**, 215-222. DOI:10.1007/s11103-010-9667-7
- Iqbalsyah T.M., Moutevelis E., Warwicker J. *et al.* (2006): The CXXC motif at the N-terminus of an α -helical peptide. *Protein Science* **15**(8), 1945-1950. DOI:10.1110/ps.062271506
- Isono E., Katsiarimpa A., Müller I.K. *et al.* (2010): The deubiquitinating enzyme AMSH3 is required for intracellular trafficking and vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **22**(6), 1826-1837. DOI: 10.1105/tpc.110.075952
- Jacob C. a Winyard P. (2009): *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. 1st edition, Wiley-VCH, Weinheim, 514 stran.
- Jaffrey S.R. a Snyder S.H. (2001): The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science Signaling* **2001**(86). DOI:10.1126/stke.2001.86.pl1
- Jaffrey S.R., Erdjument-Bromage H., Ferris Ch.D. *et al.* (2001): Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neural nitric oxide. *Nature Cell Biology* **3**, 193-197. DOI:10.1038/35055104.
- Joo J.H., Yoo H.J., Hwang I. *et al.* (2005): Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Letters* **579**(5), 1243-1248. DOI:10.1016/j.febslet.2005.01.018
- Jung H.S., Crisp P.A., Estavillo G.M. *et al.* (2013): Subset of heat-shock transcription factors required for the early response of *Arabidopsis* to excess light. *PNAS* **110**(35), 14474-14479. DOI:10.1073/pnas.1311632110
- Kämän-Toth E., Dankó T., Gullner G. *et al.* (2019): Contribution of cell wall peroxidase – and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola*-induced oxidative burst in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology* **20**(4), 485-499. DOI:10.1111/mpp.12769
- Katsiarimpa A., Kalinowska K., Anzenberger F. *et al.* (2013): The deubiquitinating enzyme AMSH1 and the ESCRT-III subunit VPS2.1 are required for autophagic degradation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**(6), 2236-2252. DOI: 10.1105/tpc.113.113399
- Kaya H., Iwano M., Takeda S. *et al.* (2015): Apoplastic ROS production upon pollination by RbohH and RbohJ in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **10** (2). DOI: 10.4161/15592324.2014.989050.
- Kettle A.J., Anderson R.F., Hampton M.B. *et al.* (2007): Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochemistry* **46**(16), 4888-4897. DOI:10.1021/bi602587k
- Kimura S., Hunter K., Vaahtera L. *et al.* (2020): CRK2 and C-terminal phosphorylation of NADPH oxidase RBHOD regulate reactive oxygen species production in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **32**(4), 1063-1080. DOI: 10.1105/tpc.19.00525
- Kliebenstein D.J., Monde R.A., Last R.L. (1998): Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118**(2), 637-650. DOI:10.1104/pp.118.2.637
- Kobayashi T., Kishigami S., Sone M. *et al.* (1997): Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *PNAS* **94**(22), 11857-11862. DOI:10.1073/pnas.94.22.11857
- Kohr M.J., Aponte A., Sun J. *et al.* (2012): Measurement of S-nitrosylation occupancy in the myocardium with cysteine-reactive tandem mass tags. *Circulation Research* **111**(10), 1308-1312. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271320
- Koussevitzky S., Suzuki N., Huntignton S. *et al.* (2008): Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biological Chemistry* **283**(49), 34197-34203. DOI:10.1074/jbc.M806337200

- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G. *et al.* (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS* **97**(6), 2940-2945. DOI:10.1073/pnas.97.6.2940
- Krieger-Liszakay A., Kós P.B., Hideh E. (2011): Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiologia Plantarum* **142**(1), 17-25. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01416.x
- Kuo W.Y., Huang C.H., Liu A.C. *et al.* (2013): Chaperonin 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **197**(1), 99-110. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04369.x
- Lambert A.J. a Brand M.D. (2009): Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria. *Methods in Molecular Biology* 165-181. DOI: 10.1007/978-1-59745-521-3_11
- Landino L.M., Hasan R., McGaw A. *et al.* (2011): Inhibition of tubulin polymerization by hypochlorous acid and chloramines. *Free Radical Biology and Medicine* **50**(8), 1000-1008. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.018
- Lee J.W., Soonsanga S. a Helmann J.D. (2007): A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *PNAS* **104**(21), 8743-8748. DOI: 10.1073/pnas.0702081104
- Leichert L.I., Gehrke F., Gudiseva V. *et al.* (2008): Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*. *PNAS* **105**(24), 8197-8202. DOI: 10.1073/pnas.0707723105
- Lennicke C., Rahn J., Heimer N. *et al.* (2016): Redox proteomics: MEthods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. *Proteomics* **16**(2), 197-231. DOI:10.1002/pmic.201500268
- Li M. a Kim Ch. (2021): Chloroplast ROS and stress signaling. *Plant Communications* **3**(1), 100264. DOI: 10.1016/j.xplc.2021.100264
- Li Y., Liu W., Zhong H. *et al.* (2019): Redox-sensitive bZIP68 plays a role in balancing stress tolerance with growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **100**(4), 768-783. DOI:10.1111/tpj.14476
- Li Z., Wakao S., Fischer B.B. *et al.* (2009): Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 239-260. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844
- Lind Ch., Gerdes R., Hammell Y. *et al.* (2002): Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **406**(2), 229-240. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00468-X
- Lindemann C. a Leichert L.I. (2012): *Quantitative Methods in Proteomics*. 1st edition, Humana Totowa, Jew Jersey. 539 stran.
- Liu Y. a He Ch. (2017): A revise of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox Biology* **11**, 192-204. DOI:10.1016/j.redox.2016.12.009
- Livanos P., Galatis B., Quader H. *et al.* (2011): Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton* **69**(1), 1-21. DOI:10.1002/cm.20538
- Lledías F., RAngel P.a Hansberg W. (1998): Oxidation of Catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **273**(17), 10630-10637. DOI:10.1074/jbc.273.17.10630
- Loake G a Grant M. (2007): Salicylic acid in plant defence – the players and prognosts. *Current Opinion in Plant Biology* **41**(5), 466-472. DOI:10.1016/j.pbi.2007.08.008
- Lutolf M.P., Tirelli N., Cerritelli S. *et al.* (2001): Systematic modulation of Michael-type reactivity of thiols though the use of charged amino acids. *Bioconjugate Chemistry* **12**(6), 1051-1056. DOI:10.1021/bc015519e
- Marchal C., Delorme-Hinoux V., Bariat L. *et al.* (2014): NTR/NRX Define a new thioredoxin system in the nucleus of *Arabidopsis thaliana* cells. *Molecular Plant* **7**(1), 30-44. DOI:10.1093/mp/sst162
- Marino S.M. a Gladyshev V.N. (2012): Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *Journal of Biological Chemistry* **287**(7), 4419-4425. DOI:10.1074/jbc.R111.275578

- Martinière A., Fiche J.B., Smokvarska M. *et al.* (2019): Osmotic stress activates two reactive oxygen species pathways with distinct effects on protein nanodomains and diffusion. *Plant Physiology* **179**(4), 1581-1593. DOI:10.1104/pp.18.01065
- Maruta T., Inoue T., Noshi M. *et al.* (2012): Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding and jasmonate induced H₂O₂ in *Arabidopsis* plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* **1820**(12), 1901-1907. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.08.003
- Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S. *et al.* (2016): Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplast: More than just a classical antioxidant enzyme? *Plant & Cell Physiology* **57**(7), 1377-1386. DOI: 10.1093/pcp/pcv203
- Maurel Ch., Boursiac Y., Luu D.T. *et al.* (2015): Aquaporins in Plants. *Physiological reviews* **95**(4), 1321-1358. DOI:10.1152/physrev.00008.2015
- McAinsh M.R., Clayton H., Mansfield T.A. *et al.* (1996): Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology* **111**(4), 1031-1042. DOI:10.1104/pp.111.4.1031
- McDonagh B. (2012): Diagonal electrophoresis for the detection of protein disulfides. *Methods in Molecular Biology* **869**, 309-315. DOI: 10.1007/978-1-61779-821-4_26.
- Melicher P., Dvořák P., Krasylenko Y. *et al.* (2022): *Arabidopsis* iron superoxide dismutase FSD1 protects against methyl viologen-induced oxidative stress in copper-dependent manner. *Frontiers in Plant Science* **13**, 823561. DOI: 10.3389/fpls.2022.823561
- Melicher P., Dvořák P., Řehák J. *et al.* (2023): Proteomic analysis reveals PATELLIN 4 as a protein sensitive to short-term methyl viologen treatment and participating in plant oxidative stress tolerance. *Authorea*, článek v procesu publikace. DOI:10.22541/au.167595886.61987181/v1
- Mermoud M., Takusagawa M., Kurata T. *et al.* (2019): SQUAMOSA promoter-binding protein-like7 mediates copper deficiency response in the presence of high nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **38**, 835-846. DOI: 10.1007/s00299-019-02422-0
- Meyer Y., Belin Ch., Delorme-Hinoux V. *et al.* (2012): Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks and functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling* **17**(8), 1124-1160. DOI:10.1089/ars.2011.4327
- Mhamdi A., Noctor G a Baker A. (2012): Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **525**(2), 181-194. DOI: 10.1016/j.abb.2012.04.015
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S. *et al.* (2010): Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**(15), 4197-4220. DOI: 10.1093/jxb/erq282
- Mignolet-Spruyt L., Xu E., Idäheimo N. *et al.* (2016): Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany* **67**(13), 3831-3844. DOI: 10.1093/jxb/erw080
- Michell R.H. (2008): Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 151-161. DOI: 10.1038/nrm2334
- Miller G., Schlauch K., Tam R. *et al.* (2009): The plant NADPH oxidase RBHOD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* **2**(84), 45-58. DOI: 10.1126/scisignal.2000448
- Mittler R. (2017): ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**(1), 11-19. DOI:10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N. *et al.* (2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**(6), 300-309. DOI:10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. *et al.* (2004): Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**(10), 490-498. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Mittler R., Zandalinas S.I., Fichman Y. *et al.* (2022): Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23**, 663-679. DOI:10.1038/s41580-022-00499-2
- Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Feldman N.B. *et al.* (2017): ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radical Research* **52**(5), 507-543. DOI:10.1080/10715762.2018.1457217

- Moon H., Lee B., Choi G. *et al.* (2002): NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *PNAS* **100**(1), 358-363. DOI:10.1073/pnas.252641899
- Moran E.E., Timerghazin Q.K., Kwong E. *et al.* (2011): Kinetics and mechanisms of S-nitrosothiol acid-catalyzed hydrolysis: sulfur activation promotes facile NO⁺ release. *The Journal of physical chemistry* **115**(12), 3112-3126. DOI:10.1021/jp1035597
- Morgan M.J., Lehmann M., Schwarzländer M. *et al.* (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiology* **147**(1), 101-114. DOI: 10.1104/pp.107.113613
- Morimyo M., Hongo E., Hama-Inaba H. *et al.* (1992): Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escheria coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acid Research* **20**, 3159-3165. DOI:10.1093/nar/20.12.3159
- Mou Z., Fan W., Dong X. (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**(7), 935-944. DOI:10.1016/S0092-8674(03)00429-x
- Mumbengegwi D.R., Li Q., Li C. *et al.* (2008): Evidence for superoxide permeability pathway in endosomal membranes. *Molecular and Cellular Biology* **28**(11). DOI:10.1128/MCB.02038-07
- Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**(3), 473-479. DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murry Ch.I., Uhrigshardt H., O'Meally R.N. *et al.* (2012): Identification and quantification of S-nitrosylation by cysteine reactive tandem mass tag switch assay. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**(2). DOI: 10.1074/mcp.M111.013441
- Myouga F., Hosoda Ch., Umezawa T. *et al.* (2008): A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**(11), 3148-3162. DOI: 10.1105/tpc.108.061341
- Nagano M., Ishikawa T., Fujiwara M. *et al.* (2016): Plasma membrane microdomains are essential for Rac1-RbohB/H-mediated immunity in rice. *The Plant Cell* **28**(8), 1966-1983. DOI:10.1105/tpc.16.00201
- Navrot N., Finnie Ch., Svensson B. *et al.* (2011): Plant redox proteomics. *Journal of Proteomics* **74**(8), 1450-1462. DOI:10.1016/j.prot.2011.03.008
- Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I., Murata N. (2006): A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1757**(7), 742-749. DOI:10.1016/j.bbabi.2006.05.013
- O'Slade W., Werth E.G., McConnell E.W. *et al.* (2015): Quantifying reversible oxidation of protein thiols in photosynthetic organisms. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **26**(4), 631-640. DOI:10.1007/s13361-014-1073-y
- Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka *et al.* (2008): Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **283**(14), 8885-8892. DOI:10.1074/jbc.M708106200
- Ono M., Isono K., Sakata Y. *et al.* (2021): CATALASE2 plays a crucial role in long-term heat tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **534**, 747-751. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.11.006
- Paige J.S., Xu G., Stamcevic B. *et al.* (2008): Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chemistry & Biology* **15**(12), 1307-1316. DOI:10.1016/j.chembiol.2008.10.013
- Palma J.M., Mateos R.M., Jaramillo J.L. *et al.* (2020): Plant catalase as NO and H₂S targets. *Redox Biology* **34**, 101525. DOI:10.1016/j.redox.2020.101525
- Pan K.T., Chen Y.Y., Pu T.H. *et al.* (2014): Mass spectrometry-based quantitative proteomics for dissecting multiplexed redox cysteine modifications in nitric oxide-protected cardiomyocyte under hypoxia. *Antioxidants & Redox signaling* **20**(9), 1365-1381. DOI: 10.1089/ars.2013.5326

- Pan X., Chen J., Yang Z. (2015): Auxin regulation of cell polarity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **28**, 144-153. DOI:10.1016/j.pbi.2015.10.009
- Pandey P., Singh J., Achary V.M.M. *et al.* (2015): Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Frontiers in Environmental Science* **3**(25). DOI:10.3389/fenvs.2015.00025
- Pandey S., Fartyal D., Agarwal A. *et al.* (2017): Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science* **8**(581). DOI: 10.3389/fpls.2017.00581
- Parker J., Balmant K., Zhu *et al.* (2015): cysTMTRAQ – an integrative method for unbiased thiol-based redox proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **14**(1), 237-242. DOI: 10.1074/mcp.O114.041772
- Pasternak T., Potters G., Caubergs R. *et al.* (2005a): Complementary interactions between oxidative stress and auxin control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* **56**(418), 1991-2001. DOI:10.1093/jxb/eri196
- Pasternak T., Rudas V., Potters G. *et al.* (2005b): Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **53**(3). DOI:10.1016/j.envexpbot.2004.04.009
- Paulsen C.E. a Carroll K.S. (2013): Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology and tools for discovery. *Chemical Reviews* **113**(7), 4633-4679. DOI:10.1021/cr3000163e
- Peiro A., Izquierdo-Garcia A.C., Sanchez-Navarro J.A. *et al.* (2014): Patellins 3 and 6, two members of the plant patellin family interact with the movement protein of *Alfalfa mosaic virus* and interfere with viral movement. *Molecular Plant Pathology* **15**(9), 881-891. DOI:10.1111/mpp.12146
- Perea-García A., Andrés-Bordería A., Myo de Andrés S. *et al.* (2016): Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **67**(1), 391-403. DOI: 10.1093/jxb/erv474
- Perry J.J.P., Shin D.S., Getzoff E.D. *et al.* (2010): The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics* **1804**(2), 245-262. DOI:10.1016/j.bbapap.2009.11.004
- Pesaresi P., Hertle A., Pribil M. *et al.* (2009): *Arabidopsis* STN7 kinase provides a link between short and long-term photosynthetic acclimation. *The Plant Cell* **21**(8), 2402-2423. DOI:10.1105/tpc.108.064964
- Peterman T.K., Ohol Y.M., McReynolds J. *et al.* (2004): Patellin1, a novel Sec14-like protein localizes to the cell wall and binds phosphoinositides. *Plant Physiology* **136**(2), 3080-3094. DOI: 10.1104/pp.104.045369
- Peterman T.K., Sequeira A.S., Samia J.A. (2006): Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*). *Journal of Plant Physiology* **163**(11), 1150-1158. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.01.009
- Petrov V., Hille J., Mueller-Roeber B. *et al.* (2015): ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**. DOI: 10.3389/fpls.2015.00069
- Pilon M., Ravet K. a Tapken W. (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1807**(8), 989-998. DOI:10.1016/j.bbabi.2010.11.002
- Pospíšil P. (2016): Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Frontiers in Plant Science* **7**(1950). DOI: 10.3389/fpls.2016.01950
- Pospíšil P., Arato A., Krieger-Liszkay A. *et al.* (2004): Hydroxyl radical generation by photosystem II. *Biochemistry* **43**, 6783-6792. DOI:10.1021/bi036219i
- Pottosin I. a Dobrovinskaya O. (2022): Major vacuolar TPC1 channel in stress signaling: what matters, K⁺, Ca²⁺ conductance or an ion-flux independent mechanism? *Stress Biology* **2**(31). DOI:10.1007/s44154-022-00055-0
- Prasad A., Kumar A., Suzuki M. *et al.* (2015): Detection of hydrogen peroxide in photosystem II (PSII) using catalytic amperometric biosensor. *Frontiers in Plant Science* **6**(862). DOI:10.3389/fpls.2015.00862

- Pyo Ch.W., Choi J.H., Oh S.M. *et al.* (2013): Oxidative stress-induced cyclin D1 depletion and its role in cell cycle processing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General subjects* **1830**(11), 5316-5325. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.07.030
- Qi J., Song Ch.P., Wang B. *et al.* (2018): Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. *Journal of Integrative Plant Biology* **60**(9), 805-826. DOI:10.1111/jipb.12654
- Qi J., Wang J., Gong Z. *et al.* (2017): Apoplast ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **38**, 92-100. DOI:10.1016/j.pbi.2017.04.022
- Reddie K.G. a Carroll K.S. (2008): Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**(6), 746-754. DOI:10.1016/j.cbpa.2008.07.028
- Rentel M.C., Lecourieux D., Ouaked F. *et al.* (2004): OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**, 858-861. DOI:10.1038/nature02353
- Rjasanow A., Leitner M.G., Thallmair V. *et al.* (2015): Ion channel regulation by phosphoinositides analyzed with VSPs-PI(4,5)P₂ affinity, phosphoinositide selectivity and PI(4,5)P₂ pool accessibility. *Pharmacology of Ion Channels and Channelopathies* **6**(127). DOI: 10.3389/fphar.2015.00127
- Roos G. a Messens J. (2011): Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine* **51**, 314-326. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031
- Roos G., Foloppe N. a Messens J. (2013): Understanding the pKa of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**(1), 94-127. DOI: 10.1089/ars.2012.4521
- Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N. *et al.* (2004): Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular proteomics* **3**(12), 1154-1169. DOI:10.1074/mcp.M400123-MCP200
- Rossel J.B., Walter P.B., Hendrickson L. *et al.* (2005): A mutation affecting *ASCORBATE PEROXIDASE 2* gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. *Plant, Cell & Environment* **29**(2), 269-281. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01419.x
- Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V. *et al.* (2002): A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie* **114**(14), 2708-2711. DOI:10.1002/1521-3757(20020715)114:14<2708:AID-ANGE2708>3.0.CO;2-04
- Roth A.F., Wan J., O'Bailey A. *et al.* (2006): Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *The Cell* **125**(5), 1003-1013. DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.042
- Salsbury F.R., Knutson S.T., Poole L.B. *et al.* (2008): Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein Science* **17**(2), 299-312. DOI:10.1110/ps.073096508
- Sangyool L., Hee J.Y., Ju-Kon K. *et al.* (2019): An isoform of the plastid RNA polymerase-associated protein FSD3 negatively regulates chloroplast development. *BMC Plant Biology* **19**(524). DOI: 10.1186/s12870-019-2128-9
- Seth D. a Stamler J.S. (2011): The SNO-proteome: causation and classifications. *Current Opinions in Chemical Biology* **15**(1), 129-136. DOI:10.1016/j.cbpa.2010.10.012
- Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. (2016): Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the crossroad. *Frontiers in Plant Science* **7**(187). DOI: 10.3389/fpls.2016.00187
- Shaikhlai J., Norén L., Barajas-López J.D. *et al.* (2012): Redox mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the G-group of basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **287**(33), 27510-27525. DOI:10.1074/jbc.M112.361394
- Shapiguzov A., Vainonen J.P., Wrzaczek M. *et al.* (2012): ROS-talk-how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in Plant Science* **3**(292). DOI:10.3389/fpls.2012.00292

- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S. *et al.* (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidant defense mechanism in plants in stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**, 1-26. DOI: 10.1155/2012/217037
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M. *et al.* (2002): Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**(372), 1305-1319. DOI: 10.1093/jexbot/53.372.1305
- Shumbe L., Chevalier A., Legeret B. *et al.* (2016): Singlet Oxygen induced cell death in *Arabidopsis* under high-light stress is controlled by OXI1 kinase. *Plant Physiology* **170**(3), 1757-1771. DOI:10.1104/pp.15.01546
- Scharf K.D., Berberich T., Ebersberger I *et al.* (2012): The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function, evolution. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms* **1819**(2), 104-119. DOI:10.1016/j.bbagrm.2011.10.002
- Schliebner I., Pribil M., Zuhlke J. *et al.* (2008): A survey of chloroplast protein kinases and phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Current Genomics* **9**(3), 184-190. DOI:10.2174/138920208784340740
- Schürmann P. a Buchanan B.B. (2008): The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**(7), 1235-1274. DOI:10.1089/ars.2007.1931
- Schweikert C., Liskay A., Chopfer P. (2000): Scission of polysaccharide by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* **53**(5), 565-570. DOI:10.1016/S001931-9422(99)00586-5
- Simon J.P., Morimoto T., Bankaitis V.A. *et al.* (1998): An essential role for the phosphatidylinositol transfer protein in the scission of coatmer-coated vesicles from the trans-Golgi network. *PNAS* **95**(19), 11181-11186. DOI: 10.1073/pnas.95.19.11181
- Smirnoff N. a Arnaud D. (2019): Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist* **221**(3), 1197-1214. DOI:10.1111/nph.15488
- Song P., Jia Q., Chen L. *et al.* (2020): Involvement of *Arabidopsis phospholipase D* in regulation of ROS-mediated microtubule organization and stomatal movement upon heat shock. *Journal of Experimental Botany* **71**(20), 6555-6570. DOI: 10.1093/jxb/eraa359
- Song Y.G., Liu B., Wang L.F. *et al.* (2006): Damage to the oxygen evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II. *Photosynthesis Research* **90**, 67-78. DOI:10.1007/s11120-006-9111-7
- Srinivas U.S., Tan B.W.Q., Vellayappan B.A. *et al.* (2019): ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* **25**, 101084. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101084.
- Steinhorst L. a Kudla J. (2014): Signaling in cells and organisms – calcium holds the line. *Current Opinion in Plant Biology* **22**, 14-21. DOI:10.1016/j.pbi.2014.08.003
- Suntres Z.E. (2002): Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* **180**(1), 65-77. DOI:10.1016/s0300-483x(02)00382-7
- Suzuki N., Miller G., Sejima H. *et al.* (2013): Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in *Arabidopsis thaliana* plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. *Journal of Experimental Botany* **64**(1), 253-263. DOI: 10.1093/jxb/ers335
- Suzuki T., Matsushima Ch., Nishimura S. *et al.* (2016): Identification of phosphoinositide-binding protein Patellin2 as a substrate of *Arabidopsis* MPK4 MAP kinase during septum formation in cytokinesis. *Plant & Cell Physiology* **57**(8), 1744-1755. DOI: 10.1093/pcp/pcw098
- Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K. *et al.* (2008): Plant immunity requires conformational changes on NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**(5891), 952-956. DOI:10.1126/science.1156970
- Takáč T., Obert B., Rolčík J. *et al.* (2016): Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. *New Biotechnology* **33**(5), 728-734. DOI:10.1016/j.nbt.2016.02.008
- Takáč T., Šamajová O., Vadovič P. *et al.* (2014): Proteomic and biochemical analyses show a functional network of proteins involved in antioxidant defense of the *Arabidopsis anp2anp3* double mutant. *Journal of Proteome research* **13**(12), 5347-5361. DOI: 10.1021/pr500588c

- Tejos R., Furlán C.R., Adamowski M. *et al.* (2018): PATELILINS are regulators of auxin-mediated PIN1 relocation and plant development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* **131**(2). DOI:10.1242/jcs.204198
- Tola A.J., Jaballi A., Missihoum T.D. (2021): Protein carbonylation:emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants* **10**(7), 1451. DOI:10.3390/plants10071451
- Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P.N. (2010): Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**(4), 606-612. DOI:10.1016/j.cell.2010.10.020
- Tuzet A., Rahantaniaina M.S., Noctor G. (2019): Analyzing the function of catalase and ascorbate-glutathione pathway in H₂O₂ processing:insights from an experimentally constrained kinetic model. *Antioxidants & Redox Signaling* **30**(9), 1238-1268. DOI: 10.1089/ars.2018.7601
- Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J.M. *et al.* (1999): Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant & Cell Physiology* **40**(5), 515-523. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029572
- Van Buer J., Cvetkovic J., Baier M. (2016): Cold regulation of plastid ascorbate peroxidases serves as a priming hub controlling ROS signaling in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **16**(163). DOI: 10.1186/s12870-016-0856-7
- Van Camp W., Capiou K., Van Montagu M *et al.* (1996): Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **112**(4), 1703-1714. DOI:10.1104/pp.112.4.1703
- Van Leeuwen L.A.G., Hinchy E.C., Murphy M.P. *et al.* (2017): Click-PEGylation – A mobility shift approach to assess the redox state of cysteines in candidate proteins. *Free Radical Biology and Medicine* **108**, 374-382. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.037.
- Vanderauwera S., Suzuki N., Miller *et al.* (2011): Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *PNAS* **108**(4), 1711-1716. DOI: 10.1073/pnas.1018359108
- Verma S., Attuluri V.P.S, Robert H.S. (2021): An essential function for auxin on embryo development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **13**(4). DOI:10.1101/cshperspect.a039966
- Verma S., Negi N.P., Pareek S. *et al.* (2022): Plant response factors in adaptation to drought and salinity stress. *Physiologia Plantarum* **174**(3), e13714. DOI:10.1111/ppl.13714
- Vogel M.O., Moore M., König K. *et al.* (2014): Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, mitogen-activated protein kinase 6 and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **36**(3), 1151-1165. DOI: 10.1105/tpc.113.121061
- Walker J.M. (2009): *The Protein Protocols Handbook*, 3rd edition, Humana Press, Totowa, New Jersey. 1984 stran.
- Wan J., Roth A.F., O’Bailey A. *et al.* (2007): Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nature Protocols* **2**(7), 1573-1584. DOI: 10.1038/nprot.2007.225
- Wang H., Schoebel S., Schmitz F. *et al.* (2020): Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* **1862**(2). DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.183065
- Wang H., Wang S., Lu Y. *et al.* (2012): Proteomic analysis of early-responsive redox-sensitive protein in *Arabidopsis*. *Journal of proteome research* **11**(1), 412-424. DOI:10.1021/pr200918f
- Waszczak C., Akter S., Jacques S. *et al.* (2015): Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany* **66**(10), 2923-2934. DOI:10.1093/jxb/erv084
- Waszczak C., Carmody M. a Kangasjarvi J. (2018): Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Reviews of Plant Biology* **69**, 209-236. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042817-040322
- Water B.M., McInturf S.A. a Stein R.J. (2012): Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**(16), 5903-5918. DOI: 10.1093/jxb/ers239

- Weiss C., Bonhshtien A., Farchi-Pisanty O. *et al.* (2009): CPN20: siamese twins of the chaperonin world. *Plant Molecular Biology* **69**, 227-238. DOI: 10.1007/s11103-008-9432-3
- Winterbourn Ch.C. a Hampton M.B. (2008): Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **45**(5), 549-561. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004
- Winterbourn Ch.C. a Metodiewa D. (1999): Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* **27**(3-4), 322-328. DOI: 10.1016/s0891-5849(99)00051-9
- Woo H.A., Kang S.W., Kim H.K. *et al.* (2003): Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cystein sulfenic acid. *Journal of Biological Chemistry* **278**(48), 47361-47364. DOI: 10.1074/jbc.C300428200.
- Wu Ch., Tan L., van Hooren M. *et al.* (2017): *Arabidopsis* EXO70A1 recruits Patellin3 to the cell membrane independent of its role as an exocyst subunit. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**(12), 851-865. DOI:10.1111/jipb.12578
- Xi J., Xu P., Xiang Ch.B. (2012): Loss of AtPDR11, a plasma membrane-localized ABC transporter, confers paraquat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **69**(5), 782-791. DOI:10.1111/j.1365-3113X.2011.04830.x
- Xing Y., Jia W., Zhang J. (2007): AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Biology* **58**(11), 2969-2981. DOI:10.1093/jxb/erm144
- Yadav D.K., Prasad A., Kruk J. *et al.* (2014): Evidence for the involvement of loosely bound plastosemiquinones in superoxide anion radical production in photosystem II. *PLOS ONE* **10**(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0115466
- Yamasaki H., Hayashi M., Fukazawa M. *et al.* (2009): SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**(1), 347-361. DOI: 10.1105/tpc.108.060137
- Yang Z., Mhamdi A., Noctor G. (2018): Analysis of catalase mutants underscores the essential role of CALATASE2 for plant growth and day length-dependent oxidative signalling. *Plant, Cell & Environment* **42**(2), 688-700. DOI: 10.1111/pce.13453
- Yerushalmi H., Lebediker M. a Schuldiner S. (1995): EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *Journal of Biological chemistry* **270**, 6856-6863. DOI:10.1074/jbc.270.12.6856
- Yoshida K. a Hisabori T. (2016): Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *PNAS* **113**(27), 3967-3976. DOI:10.1073/pnas.1604101113
- Zago E., Morsa S., Dat J.F. *et al.* (2006): Nitric Oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology* **141**(2), 404-411. DOI:10.1014/pp.106.078444
- Zandalinas S.I., Fichman Y., Devireddy A.R. *et al.* (2020): Systemic signaling during abiotic stress combination in plants. *PNAS* **117**(24), 13810-13820. DOI:10.1073/pnas.2005077117
- Zhang S., Li Ch., Ren H. *et al.* (2020): BAK1 mediates light intensity to phosphorylate and activate catalases to regulate plant growth and development. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(4), 1437. DOI: doi.org/10.3390/ijms21041437
- Zhang Y., Ji T.T., Li T.T. *et al.* (2020): Jasmonic acid promotes leaf senescence through MYC2-mediated repression of CATALASE2 expression in *Arabidopsis*. *Plant Science* **299**, 110604. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110604
- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q. *et al.* (2009): Phospholipase Dα1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**(8), 2357-2377. DOI: 10.1105/tpc.108.062992
- Zhou H., Duan H., Liu Y. *et al.* (2019): Patellin protein family functions in plant development and stress response. *Journal of Plant Biology* **234**, 94-97. DOI:10.1016/j.plph.2019.01.012
- Zhou H., Huang J., Willems P. *et al.* (2022): Cysteine thiol-base post-translational modification: what do we know about transcription factors? *Trends in Plant Science* **28**(4), 415-428. DOI:10.1016/j.tplants.2022.11.007

- Zhou H., Wang C., Tan T. *et al.* (2018): Patellin 1 negatively modulates salt tolerance by regulating PM Na⁺/H⁺ antiport activity and cellular redox homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **59**(8), 1630-1642. DOI:10.1093/pcp/pcy081
- Zhou L., Wen J., Huang Z. *et al.* (2016): Redox proteomics screening cellular factors associated with oxidative stress in hepatocarcinogenesis. *PROTEOMICS-Clinical Applications* **11**(3-4), 1600089. DOI: 10.1002/prca.201600089
- Zhu J.K. (2016): Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* **167**(2), 313-324. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.029
- Zou J.J., Li X.D., Ratnasekera D. *et al.* (2015): *Arabidopsis* Calcium-dependent protein kinase 8 and catalase3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell* **27**(5), 1445-1460. DOI: 10.1105/tpc.15.00144
- Zwiazek J.J., Xu H., Tan X. *et al.* (2017): Significance of oxygen transport through aquaporins. *Scientific Reports* **7**(40411). DOI:10.1038/srep40411

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	Singletový kyslík
^3Chl	Excitovaný tripletový chlorofyl
ABC transporter	ATP binding cassette transporter
AMS	4-acetamid-4'-maleimidylstilben-2,2'- disulfonová kyselina
ANP1, 2, 3	<i>Arabidopsis</i> nucleus-phragmoplast-localized kinase 1, 2, 3
APX	Askorbátperoxidasa
AQP	Aquaporíny
ASC	Askorbát
ASC	Askorbát
ATP	Adenosintrifosfát
BST	Biotin switch metoda
bZIP	Základní leucinové zipy
CaM4	Calmodulin 4
CAT	Katalasa
CIPK26	Calcineurin B-like protein interacting protein kinase 26
CPK5	Calcium dependent protein kinase 5
CPN20	Čaperonin 20
CSD1,2,3	Superoxiddismutasa obsahující měď a zinek 1, 2, 3
Cu/ZnSOD	Superoxiddismutasa obsahující měď a zinek
Da	Jednotka Dalton
DHAR	Dehydroaskorbátreduktasa
DIGE	Diferenciační gelová elektroforéza
ERF104	Ethylene response factor 104
ERF6	Ethylene response factor 6
Fdx	Ferredoxin
FeSOD	Superoxiddismutasa s železným kofaktorem
FNR	Ferredoxín NADP ⁺ oxidoreduktasa
FSD1,2,3	Superoxiddismutáza s železným kofaktorem 1. 2. 3
FSD3S	Sestříhová varianta superoxididmutasy s železným kofaktorem 3
FTR	Ferredoxin-thioredoxin reduktasa
GFP	Zelený fluorescenční protein
GR	Glutathionreduktasy
Grx	glutaredoxíny
GSH	Glutathion
GSH	Redukovaný glutathion

GSNO	Nitrosylovaný glutathion
GSSG	Oxidovaný glutathion
GTP	Guanosintrifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HSF	Heat shock factor
HSP	Heat shock proteiny
ICAT	Isotopově kódované afinitní značení
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
LC	Kapalinová chromatografie
LHC	Light harvesting complex
LHCB2.4	Light harvesting chlorophyll binding protein 2.4
MAPKKK	Mitogenem aktivované protein kinasy kinasy kinasy
MDAR	Monodehydroaskorbátreduktasa
MDHAR	Monodehydroaskorbátreduktasa
MES	Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové
miRNA	Mikro ribonukleová kyselina
MnSOD	Superoxiddismutasa obsahující mangan
MP	Pohybový protein
mPEG	Methoxy polyethylen glykol maleimid
MPK3,4, 6	Mitogenem aktivované proteinkinasy 3, 4, 6
MRM	Multiple reaction monitoring
MRM	Multiple reaction monitoring
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MS	Hmotnostní spektrometrie
MSD1,2	Superoxiddismutasa obsahující mangan 1, 2
MV	Methyl viologen
mV	milivolt
NADP ⁺	Oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NEM	N-ethylmaleimid
NiSOD	Superoxiddismutasa obsahující nikl
NRP1	Non-expresser of pathogenesis related gene 1
NTRC	NADPH dependentní thioredoxin reduktáza
O ₂	Kyslík
O ₂ ⁻	Superoxidový aniont

OH·	Hydroxylový radikál
OXI1	Oxidative signal-inducible1
PAGE	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PEG	Polyethylen glykol
PIPT	proteiny transportující fosfatidylinositol
pK _a	Disociační konstanta
Prx	Peroxiredoxiny
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
PtdEth	Fosfatidylethanolamin
PtdCho	Fosfatidylcholin
PtdIns	Fosfatidylinositol
RBOH	Respirátory burst oxidase homolog
RBOHD, F	Respiratory burst oxidase homolog D, F
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSO ₂ H	Kyselina sulfinová
RSO ₃ H	Kyselina sulfonová
R-SOH	Kyseliny sulfenová
SA	Kyselina salicylová
SAA	Systémově získaná aklimatizace
SDS	Dodecylsírán sodný
SOD	Superoxiddismutasa
SOS1	Salt overly sensitive 1
SPL7	SQUAMOSA promotor-binding protein-like7
STN7	Serin/threonin proteinkinasa 7
STN7	Serin/threoninová proteinkinasa 7
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TF	Transkripční faktor
TMT	Tandemová hmotnostní znančka
TPC1	Two-pore channel 1
Trx	Thioredoxíny
v/v	Objem na objem (objemový zlomek)
w/v	Hmotnost na objem (hmotnostní zlomek)

9 PŘÍLOHY

Příloha č. 1 Predikce redoxně aktivních cysteinů v aminokyselinové sekvence isoform α -tubulin u *Arabidopsis thaliana* provedena pomocí softwaru pCysMod (<http://pcysmod.omicsbio.info/action.php>)

Isoforma	Pozice	Modifikace	Peptid
α -tubulin 1	20	S-nitrosylace (-SNO)	GIQVGNSCWELYCLE
	118	S-sulhydratace (-SSH)	GREIVDTCLERLRKL
	315	S-sulfenylace (-SOH)	RHGKYMACCLMYRGD
	316	S-sulfenylace (-SOH)	HGKYMACCLMYRGDV
	347	S-nitrosylace (-SNO)	TIQFVDWCPTGFKCG
	353	S-nitrosylace (-SNO)	WCPTGFKCGINYQPP
	376	S-nitrosylace (-SNO)	AKVQRAVCMISNNTA
	376	S-sulfenylace (-SOH)	AKVQRAVCMISNNTA
α -tubulin 2	4	S-sulfenylace (-SOH)	****MRECISIHIGQ
	4	S-sulfinylace (-SOO)	****MRECISIHIGQ
	20	S-nitrosylace (-SNO)	GIQVGNACWELYCLE
	118	S-nitrosylace (-SNO)	GKEIVDLCLDRIRKL
	118	S-sulfenylace (-SOH)	GKEIVDLCLDRIRKL
	118	S-sulhydratace (-SSH)	GKEIVDLCLDRIRKL
	129	S-nitrosylace (-SNO)	IRKLADNCTGLQGFL
	315	S-sulfenylace (-SOH)	RHGKYMACCLMYRGD
	316	S-sulfenylace (-SOH)	HGKYMACCLMYRGDV
	347	S-nitrosylace (-SNO)	TIQFVDWCPTGFKCG
	353	S-nitrosylace (-SNO)	WCPTGFKCGINYQPP
	376	S-nitrosylace (-SNO)	AKVQRAVCMISNSTS
	376	S-sulfenylace (-SOH)	AKVQRAVCMISNSTS
α -tubulin 3	20	S-nitrosylace (-SNO)	GIQVGNSCWELYCLE
	118	S-sulfenylace (-SOH)	GKEIVDLCLDRVRKL
	118	S-sulhydratace (-SSH)	GKEIVDLCLDRVRKL
	129	S-nitrosylace (-SNO)	VRKLADNCTGLQGFL
	305	S-sulfenylace (-SOH)	PASMMAKCDPRHGKY
	305	S-sulfinylace (-SOO)	PASMMAKCDPRHGKY
	315	S-sulfenylace (-SOH)	RHGKYMACCLMYRGD
	316	S-sulfenylace (-SOH)	HGKYMACCLMYRGDV
	347	S-nitrosylace (-SNO)	TVQFVDWCPTGFKCG
	353	S-nitrosylace (-SNO)	WCPTGFKCGINYQPP
	376	S-nitrosylace (-SNO)	AKVQRAVCMISNNTA
	376	S-sulfenylace (-SOH)	AKVQRAVCMISNNTA
	α -tubulin 4	4	S-sulfenylace (-SOH)
4		S-sulfinylace (-SOO)	****MRECISIHIGQ
20		S-nitrosylace (-SNO)	GIQVGNACWELYCLE
118		S-nitrosylace (-SNO)	GKEIVDLCLDRIRKL
118		S-sulfenylace (-SOH)	GKEIVDLCLDRIRKL
118		S-sulhydratace (-SSH)	GKEIVDLCLDRIRKL
129		S-nitrosylace (-SNO)	IRKLADNCTGLQGFL
315		S-sulfenylace (-SOH)	RHGKYMACCLMYRGD
316		S-sulfenylace (-SOH)	HGKYMACCLMYRGDV
347		S-nitrosylace (-SNO)	TIQFVDWCPTGFKCG
353		S-nitrosylace (-SNO)	WCPTGFKCGINYQPP
376		S-nitrosylace (-SNO)	AKVQRAVCMISNSTS
376		S-sulfenylace (-SOH)	AKVQRAVCMISNSTS
α -tubulin 5	20	S-nitrosylace (-SNO)	GIQVGNSCWELYCLE

	118	S-sulfenylace (-SOH)	GKEIVDLCLDRVRKL
	118	S-sulhydratace (-SSH)	GKEIVDLCLDRVRKL
	129	S-nitrosylace (-SNO)	VRKLADNCTGLQGFL
	305	S-sulfenylace (-SOH)	PASMMAKCDPRHGKY
	305	S-sulhydratace (-SSH)	PASMMAKCDPRHGKY
	315	S-sulfenylace (-SOH)	RHGKYMACCLMYRGD
	316	S-sulfenylace (-SOH)	HGKYMACCLMYRGDV
	347	S-nitrosylace (-SNO)	TVQFVDWCPTGFKCG
	353	S-nitrosylace (-SNO)	WCPTGFKCGINYQPP
	376	S-nitrosylace (-SNO)	AKVQRAVCMISNNTA
	376	S-sulfenylace (-SOH)	AKVQRAVCMISNNTA
α -tubulin 6	4	S-sulfenylace (-SOH)	****MRECISIHIGQ
	4	S-sulfinylace (-SOO)	****MRECISIHIGQ
	20	S-nitrosylace (-SNO)	GIQVGNACWEL YCLE
	118	S-nitrosylace (-SNO)	GKEIVDLCLDRIRKL
	118	S-sulfenylace (-SOH)	GKEIVDLCLDRIRKL
	118	S-sulhydratace (-SSH)	GKEIVDLCLDRIRKL
	129	S-nitrosylace (-SNO)	IRKLADNCTGLQGFL
	315	S-sulfenylace (-SOH)	RHGKYMACCLMYRGD
	316	S-sulfenylace (-SOH)	HGKYMACCLMYRGDV
	347	S-nitrosylace (-SNO)	TIQFVDWCPTGFKCG
	353	S-nitrosylace (-SNO)	WCPTGFKCGINYQPP
	376	S-nitrosylace (-SNO)	AKVQRAVCMISNSTS
	376	S-sulfenylace (-SOH)	AKVQRAVCMISNSTS

Příloha č. 2 Experimentálně zjištěné oxidační modifikace cysteinových zbytků u všech isoform α -tubulinu u *Arabidopsis thaliana*. Data získané z pomoci softwaru iCysMod (<http://icysmod.omicsbio.info/index.php>)

Název proteinu příslušná isoforma	Pozice modifikace	Posttranslační modifikace
α -tubulin 1	C20	S-nitrosylace (-SNO)
	C315	S-sulfenylace (-SOH)
	C347	S-nitrosylace (-SNO)
	C376	S-nitrosylace (-SNO)
	C376	S-sulfenylace (-SOH)
α -tubulin 2/4	C20	S-nitrosylace (-SNO)
	C118	S-nitrosylace (-SNO)
	C118	S-sulfenylace (-SOH)
	C118	S-sulhydratace (-SSH)
	C129	S-nitrosylace (-SNO)
	C315	S-sulfenylace (-SOH)
	C347	S-nitrosylace (-SNO)
	C353	S-nitrosylace (-SNO)
	C376	S-nitrosylace (-SNO)
	C376	S-sulfenylace (-SOH)
α -tubulin 3/5	C20	S-nitrosylace (-SNO)
	C118	S-sulfenylace (-SOH)
	C118	S-sulhydratace (-SSH)
	C315	S-sulfenylace (-SOH)
	C347	Oxidace
	C347	S-nitrosylace (-SNO)
	C353	S-nitrosylace (-SNO)
	C376	S-nitrosylace (-SNO)
	C376	S-sulfenylace (-SOH)
	α -tubulin 6	-

Příloha č. 3 Predikce redoxně aktivních cysteinů v aminokyselinové sekvence isoform katalas u *Arabidopsis thaliana* provedena pomocí softwaru pCysMod (<http://pcysmod.omicsbio.info/action.php>).

Isoforma	Pozice	Modifikace	Peptid
Katalasa 1	230	S-nitrosylace (-SNO)	KFHWKPTCGIKCLSD
	230	S-sulhydratace (-SSH)	KFHWKPTCGIKCLSD
	230	S-sulfinylace (-SOO)	KFHWKPTCGIKCLSD
	234	S-sulhydratace (-SSH)	KPTCGIKCLSDEEAI
	370	S-sulfinylace (-SOO)	LPVNAPKCAHHNNHH
	413	S-nitrosylace (-SNO)	YPTTPIVCSGNREKC
Katalasa 2	86	S-nitrosylace (-SNO)	HDISNLTCADFLRAP
	86	S-sulfenylace (-SOH)	HDISNLTCADFLRAP
	230	S-nitrosylace (-SNO)	KFHWKPTCGVKSLE
	230	S-sulhydratace (-SSH)	KFHWKPTCGVKSLE
	230	S-sulfinylace (-SOO)	KFHWKPTCGVKSLE
	370	S-nitrosylace (-SNO)	LPVNAPKCAHHNNHH
	370	S-sulfinylace (-SOO)	LPVNAPKCAHHNNHH
	413	S-nitrosylace (-SNO)	YTPPAVCSGKRERC
	413	S-sulfenylace (-SOH)	YTPPAVCSGKRERC
	420	S-nitrosylace (-SNO)	CSGKRERCIIEKENN
420	S-sulfenylace (-SOH)	CSGKRERCIIEKENN	
Katalasa 3	86	S-nitrosylace (-SNO)	HDISNLTCADFLRAP
	86	S-sulfenylace (-SOH)	HDISNLTCADFLRAP
	230	S-nitrosylace (-SNO)	KFHWKPTCGIKNLTD
	230	S-sulhydratace (-SSH)	KFHWKPTCGIKNLTD
	230	S-sulfinylace (-SOO)	KFHWKPTCGIKNLTD
	370	S-nitrosylace (-SNO)	LPVNAPKCAHHNNHH
	370	S-sulfinylace (-SOO)	LPVNAPKCAHHNNHH
	402	S-nitrosylace (-SNO)	SKFDPVRCAEKVPTP
	402	S-sulfenylace (-SOH)	SKFDPVRCAEKVPTP
	420	S-sulfenylace (-SOH)	YTGIRTKCVIKKENN
420	S-sulfinylace (-SOO)	YTGIRTKCVIKKENN	

Příloha č. 4 Experimentálně zjištěné oxidační modifikace cysteinových zbytků u všech isoform katalas u *Arabidopsis thaliana*. Data získané z pomoci softwaru iCysMod (<http://icysmod.omicsbio.info/index.php>).

Název proteinu příslušná isoforma	Pozice modifikace	Posttranslační modifikace
Katalasa 1	C230	S-nitrosylace (-SNO)
	C413	S-nitrosylace (-SNO)
Katalasa 2	C86	S-nitrosylace (-SNO)
	C230	S-nitrosylace (-SNO)
	C370	S-nitrosylace (-SNO)
Katalasa 3	C413	S-nitrosylace (-SNO)
	C86	S-nitrosylace (-SNO)
	C230	S-nitrosylace (-SNO)
	C370	S-nitrosylace (-SNO)
	C402	Oxidace
	C402	S-nitrosylace (-SNO)

Příloha č. 5 Predikce redoxně aktivních cysteinů v aminokyselinové sekvence HSP70-1 u *Arabidopsis thaliana* provedena pomocí softwaru pCysMod (<http://pcysmod.omicsbio.info/action.php>).

Isoforma	Pozice	Modifikace	Peptid
HSP70-1	20	S-nitrosylace (-SNO)	DLGTTYSCVGVWQHD
	20	S-sulhydratace (-SSH)	DLGTTYSCVGVWQHD
	20	S-sulfenylace (-SOH)	DLGTTYSCVGVWQHD
	20	S-sulfinylace (-SOO)	DLGTTYSCVGVWQHD
	273	S-nitrosylace (-SNO)	LRRLRTSCERAKRTL
	273	S-sulhydratace (-SSH)	LRRLRTSCERAKRTL
	273	S-sulfenylace (-SOH)	LRRLRTSCERAKRTL
	273	S-sulfinylace (-SOO)	LRRLRTSCERAKRTL
	319	S-nitrosylace (-SNO)	NMDLFRKCMEPVEKC
	319	S-sulhydratace (-SSH)	NMDLFRKCMEPVEKC
	319	S-sulfenylace (-SOH)	NMDLFRKCMEPVEKC
	319	S-sulfinylace (-SOO)	NMDLFRKCMEPVEKC
	326	S-nitrosylace (-SNO)	CMEPVEKCLRDAKMD
	326	S-sulhydratace (-SSH)	CMEPVEKCLRDAKMD
	326	S-sulfenylace (-SOH)	CMEPVEKCLRDAKMD
	326	S-sulfinylace (-SOO)	CMEPVEKCLRDAKMD
	366	S-nitrosylace (-SNO)	FFNGKELCKSINPDE
	366	S-sulhydratace (-SSH)	FFNGKELCKSINPDE
	366	S-sulfenylace (-SOH)	FFNGKELCKSINPDE
	366	S-sulfinylace (-SOO)	FFNGKELCKSINPDE
	483	S-nitrosylace (-SNO)	GVPQITVCFDIDANG
	483	S-sulhydratace (-SSH)	GVPQITVCFDIDANG
	483	S-sulfenylace (-SOH)	GVPQITVCFDIDANG
	483	S-sulfinylace (-SOO)	GVPQITVCFDIDANG
	609	S-nitrosylace (-SNO)	MKELESICNPIIAKM
	609	S-sulhydratace (-SSH)	MKELESICNPIIAKM
	609	S-sulfenylace (-SOH)	MKELESICNPIIAKM
	609	S-sulfinylace (-SOO)	MKELESICNPIIAKM

Příloha č. 6 Experimentálně zjištěné oxidační modifikace cysteinových zbytků u všech HSP70-1 u *Arabidopsis thaliana*. Data získané z pomoci softwaru iCysMod (<http://icysmod.omicsbio.info/index.php>).

Isoforma	Pozice	Modifikace
HSP70-1	C319	S-nitrosylace (-SNO)
	C326	S-nitrosylace (-SNO)
	C609	S-nitrosylace (-SNO)
	C609	S-sulfenylace (-SOH)
	C609	S-sulfhydratace (-SSH)