

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Adam Zeiner

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Selekce homozygotních mutantních linií
Arabidopsis thaliana s T-DNA inzercí
v genech *SPL1* a *SPL7* a příprava expresních
vektorů pro kvasinkový dvouhybridní
systém**

Bakalářská práce

Adam Zeiner

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Petr Dvořák

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití uvedených literárních zdrojů a pod vedením doc. Ing. Tomáše Takáče, Ph.D. a Mgr. Petra Dvořáka.

V Olomouci dne 6. 5. 2019.

Souhrn

SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteiny jsou transkripční faktory, které jsou významné pro regulaci různých vývojových procesů rostlin. Regulují také expresi některých izoform superoxid dismutas. Superoxid dismutasy jsou klíčové antioxidační enzymy, které jsou důležité pro odbourání kyslíkových radikálů. Jelikož aktivita některých superoxid dismutas je zprostředkována mitogen aktivovanými protein kinasami, SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteiny se staly potenciálním fosforylačním substrátem mitogen aktivovaných protein kinas ve vztahu k regulaci Fe superoxid dismutasy 1.

Proto jsme se v teoretické části bakalářské práce zaměřili na shrnutí nejdůležitějších funkcí a vlastností SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteinů. Věnovali jsme se také mitogen aktivovaným protein kinasám a oxidačnímu stresu, včetně enzymatické antioxidační obrany. V experimentální části jsme provedli cílenou bioinformatickou analýzu, která ukázala SQUAMOSA promoter-binding protein-like 1 jako možný transkripční faktor Fe superoxid dismutasy 1, který je ovlivněný MPK3. Selektovali jsme pomocí alelově specifické PCR a reverzní transkripce spojenou s PCR homozygotní T-DNA inzerční linie *spl1.1*, *spl1.2* a *spl7.1* a připravili expresní vektory pro kvasinkové dvouhybridové systémy (pGBDT7-cDNA_*SPL7* a pGADT7 AD-cDNA_*SPL7*).

Závěrem: SPL se jeví jako transkripční faktory, které mohou být fosforylovány mitogen aktivovanými protein kinasami. Vyselektované homozygotní mutantní linie a připravené expresní vektory budou důležitým experimentálním nástrojem pro testování interakce mezi mitogen aktivovanými protein kinasami a SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteiny.

Summary

SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteins are transcription factors important for regulation of various developmental processes in plants. They are also known to regulate the transcription of some superoxide dismutase isoforms. Superoxide dismutases are key antioxidant enzymes important for the removal of reactive oxygen species. Since the activity of some superoxide dismutases is mediated by mitogen activated protein kinase signalling, SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteins emerged as a potential mitogen activated protein kinase phosphorylation targets in order to regulate Fe superoxide dismutase 1.

Therefore, we aimed to provide a theoretical overview on SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteins, mitogen activated protein kinases and oxidative stress including antioxidant defence. Within the experimental part, we present a targeted bioinformatic analysis showing SQUAMOSA promoter-binding protein-like 1 as probable transcription factor guiding Fe superoxide dismutase 1 transcription governed by MPK3. We selected homozygous T-DNA insertion mutant lines *spl1.1*, *spl1.2* and *spl7.1*. Moreover, we prepared expression vectors for the yeast two-hybrid system (pGBDT7-cDNA_*SPL7* and pGADT7 AD-cDNA_*SPL7*).

In conclusion, our data presents SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteins as transcription factors likely phosphorylated by mitogen activated protein kinases. The selected homozygous mutant lines and vectors represent valuable tools for studying mitogen activated protein kinases and SQUAMOSA promoter-binding protein-like proteins interactions.

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval doc. Ing. Tomáši Takáčovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracování literární rešerše a bioinformatické části této práce. Rád bych také poděkoval Mgr. Petru Dvořákovi za vedení laboratorní části, trpělivost, ochotu a věnovaný čas.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	SQUAMOSA promoter-binding protein-like transkripční faktory	3
3.1.1	Struktura SPL proteinů.....	4
3.1.1.1	SBP doména	4
3.1.1.2	Ankyrinové repetice (ANK).....	5
3.1.2	Regulace exprese <i>SPL</i> díky miRNA	6
3.1.3	Zástupci AtSPL	6
3.1.3.1	AtSPL7.....	8
3.2	Mitogen-aktivované protein kinasové kaskády	9
3.2.1	Komponenty MAPK kaskád	10
3.2.1.1	Mitogen aktivované protein kinasy	11
3.3	Oxidační stres.....	12
3.4	Kyslíkové radikály	13
3.4.1	Zástupci reaktivních kyslíkových radikálů	15
3.5	Antioxidační obrana	16
3.5.1	Enzymatická antioxidační obrana	17
4	Materiál a metody	20
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	20
4.2.1	Chemikálie	20
4.2.2	Soupravy	22
4.2.3	Roztoky a jejich příprava	22
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.4	Seznam použitých programů a databází.....	24
4.5	Metodika	24
4.5.1	Bioinformatická charakterizace AtSPL.....	24
4.5.1.1	Bioinformatická analýza expresních profilů	24
4.5.1.2	Identifikace fosforylačních míst spojená s analýzou přítomnosti lineárních motivů ..	25
4.5.1.3	Identifikace přítomných domén	25
4.5.1.4	Komplexní analýza AtSPL.....	25
4.5.2	Povrchová sterilizace semen a jejich uchování	25
4.5.3	Výsev sterilních semen	26

4.5.4	Alelově specifická PCR (genotypování).....	26
4.5.5	Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu	28
4.5.6	Reverzní transkripce spojená s polymerasovou řetězovou reakcí (RT-PCR)	28
4.5.6.1	Izolace celkové RNA	28
4.5.6.2	Odstranění nežádoucí zbytkové DNA.....	29
4.5.6.3	Reverzní transkripce.....	30
4.5.6.4	PCR amplifikace cDNA templátu.....	31
4.5.7	Subklonování cDNA <i>SPL7</i> do plazmidů pGADT7 AD a pGBDT7	32
4.5.7.1	Amplifikace cDNA <i>SPL7</i>	32
4.5.7.2	Izolace amplifikované DNA	34
4.5.7.3	Enzymatické štěpení pomocí dvou endonukleas.....	34
4.5.7.4	Ligace fragmentů DNA.....	35
4.5.7.5	Transformace	36
4.5.7.6	Kultivace bakteriálních kultur.....	36
4.5.7.7	Izolace plasmidové DNA.....	37
4.5.7.8	Restrikce a vizualizace plasmidové DNA pro ověření úspěšného klonování	37
5	Výsledky	39
5.1	Bioinformatická charakterizace AtSPL.....	39
5.1.1	Bioinformatická analýza koexprimovaných genů.....	39
5.1.2	Predikce fosforylace.....	39
5.1.3	Bioinformatické hodnocení genové exprese	40
5.1.4	Identifikace přítomných domén	42
5.2	Selekce mutantních linií <i>Arabidopsis thaliana</i> s T-DNA inzercí v genu <i>SPL1</i>	44
5.2.1	Alelově specifická PCR	44
5.2.2	Reverzní transkripce spojená s polymerasovou řetězovou reakcí (RT-PCR)	46
5.3	Selekce mutantní linie <i>Arabidopsis thaliana</i> s T-DNA inzercí v genu <i>SPL7</i>	49
5.4	Příprava expresních vektorů pro kvasinkový dvouhybridní systém	50
5.4.1	Subklonování cDNA <i>SPL7</i> do plazmidů pGADT7 AD a pGBDT7	51
6	Diskuse.....	53
7	Závěr	56
8	Seznam použité literatury.....	57
9	Přílohy.....	72

Seznam obrázků

Obrázek 1: Fylogenetická analýza SPL	7
Obrázek 2: Schématické zobrazení MAPK kaskád.....	10
Obrázek 3: Lokalizace SOD izoformem	18
Obrázek 4: Alelově specifická PCR pro linii SALK_058642.....	44
Obrázek 5: Alelově specifická PCR pro linii SALK_134584.....	45
Obrázek 6: Výsledky izolace celkové RNA a DNAsou I ošetřený izolát celkové RNA	46
Obrázek 7: PCR kontrola přepisu cDNA pro elongační faktor <i>EF1α</i> (konstitutivně exprimovaný gen).....	47
Obrázek 8: PCR amplifikace cDNA (<i>SPL1</i>) pomocí navržených primerů	48
Obrázek 9: Detekce přítomnosti transkriptu <i>SPL1</i> (SALK_058642: 3) za pomoci primerů SQ1-RT-Fwd-2 a SQ1-RT-Rev-2	49
Obrázek 10: Potvrzení správnosti lokalizace T-DNA inzertu díky změně párů primerů.....	49
Obrázek 11: Alelově specifická PCR pro linii SALK_093849.....	50
Obrázek 12: Restrikce izolovaných plasmidů pGBDT7 a pGADT7 AD obsahujících cDNA <i>SPL7</i>	52

Seznam grafů

Graf 1: Hodnoty exprese <i>AtSPL</i> v kořenových pletivech získané z databáze eFP browser (pro průměrnou přiřazenou hodnotu exprese větší než 300).....	41
Graf 2: Hodnoty exprese <i>MPK3/6</i> v kořenových pletivech získané z databáze eFP browser (pro průměrnou přiřazenou hodnotu exprese větší než 900).....	42

Seznam tabulek

Tabulka 1: Reakční směs pro alelově specifickou PCR.....	26
Tabulka 2: Sekvence použitých primerů pro alelově specifickou PCR.....	27
Tabulka 3: Teplotní program cycleru pro alelově specifickou PCR.....	27
Tabulka 4: Schématické zobrazení vyhodnocení PCR při selekci T-DNA mutantních linií selektovaných pomocí alelově specifické PCR.....	28
Tabulka 5: Množství odebrané vodné fáze při izolaci RNA pomocí TRIzol REagent a objem přidaného isopropanolu.....	29
Tabulka 6: Reakce pro odstranění nežádoucí zbytkové DNA pomocí DNasy I v procesu izolace celkové RNA pro RT-PCR.....	30
Tabulka 7: Reakce 1 a 2 pro přepis RNA do cDNA při procesu RT-PCR.....	30
Tabulka 8: Reakce PCR při amplifikaci cDNA templátu v rámci provedení RT-PCR.....	31
Tabulka 9: Teplotní program termocycleru při PCR amplifikaci cDNA templátu pro zjištění prevalence transkriptu <i>EF1α</i> a <i>SPL1</i>	32
Tabulka 10: Primery použité při PCR amplifikaci fragmentů cDNA v metodě RT-PCR.....	32
Tabulka 11: Reakce PCR pro amplifikaci cDNA <i>SPL7</i> pomocí M13 primerů pro subklonování do daných vektorů.....	33
Tabulka 12: Teplotní program PCR cycleru při amplifikaci cDNA <i>SPL7</i> z rodičovského vektoru.....	33
Tabulka 13: Sekvence použitých M13 primerů při amplifikaci cDNA <i>SPL7</i> pro následné subklonování.....	33
Tabulka 14: Reakční směs pro štěpení izolované DNA a cílového vektoru pomocí dvou zvolených enzymů.....	35
Tabulka 15: Použitá restriční směs pro štěpení substrátu za použití dvou odlišných endonukleas.....	35
Tabulka 16: Reakční směs pro ligaci (T4 DNA ligasa) lepivých konců enzymaticky připravených produktů štěpení pomocí dvou zvolených endonuklas.....	36
Tabulka 17: Parametry enzymatické reakce při využití enzymu <i>HindIII</i> pro štěpení izolované plasmidové DNA při ověření úspěšnosti klonování cDNA <i>SPL7</i>	38
Tabulka 18: Údaje o topologii SPL získané pomocí databáze Aramemnon.....	43
Tabulka 19: Čistota, koncentrace a množství pipetovaného izolátu RNA pro přečištění od kontaminující DNA.....	47
Tabulka 20: Čistota a koncentrace přečištěných plasmidů a inzertů pro subklonování cDNA <i>SPL7</i>	51

Tabulka 21: Koncentrace a čistota izolovaných plasmidů po transformaci kompetentních buněk rekombinantním molekulou DNA nesoucí cDNA <i>SPL7</i>	52
--	----

1 Úvod

Proteiny s názvem SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) jsou pro rostliny specifické transkripční faktory (Birkenbihl *et al.*, 2005), které regulují expresi genů významných pro ontogenezi a fyziologické procesy, jako například odbourávání kyslíkových radikálů (ROS; Yamasaki *et al.*, 2009). ROS způsobují oxidační stres, ale hrají také významnou roli pro odpověď rostliny na abiotický a biotický stres a její vývoj. Jako signální molekuly jsou zapojeny do různých signálních drah. Mezi takovéto dráhy patří i takové, které jsou tvořeny mitogen aktivovanými protein kinasami (MAPK; Desikan *et al.*, 2001).

ROS jsou schopny aktivovat MAPK, které ve výsledku mohou fosforylovat transkripční faktory, a tak spustit expresi genů zapojených do antioxidační obrany (Takáč *et al.*, 2016b).

V rámci předložené bakalářské práce byla pomocí bioinformatické analýzy identifikována SPL1 jako potenciální substrát MAPK. SPL1 je na základě bioinformatické analýzy predikovaná jako transkripční faktor antioxidačního enzymu Fe superoxid dismutasa 1 (FSD1). Výběr SPL7 byl proveden na základě provedené literární rešerše. Možnost regulace exprese *FSD1* pomocí SPL7 byla publikována (Yamasaki *et al.*, 2009).

Pro umožnění studia (fenotypové analýzy, příprava dvojitéch mutantů) těchto transkripčních faktorů byly selektovány mutantní T-DNA inzerční linie *Arabidopsis thaliana* v genech *SPL1* a *SPL7* a konstruovány expresní vektory obsahující cDNA *SPL7* pro kvasinkové dvouhybridové systémy pro ověření možných interakcí s MAPK, ale i samotných SPL.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma: Oxidační stres u rostlin, superoxid dismutasy (SOD), mitogen aktivované protein kinasy (MAPK) a SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) transkripční faktory a jejich role v oxidačním stresu. Regulace Fe superoxid dismutas (FSD) a jejich zapojení do MAPK signalizace.
2. Experimentální cíle: Získání praktických zkušeností v práci s rostlinami a v metodách genotypování a klonování. Bioinformatická predikce transkripčních faktorů pro regulaci *FSD1*, které jsou fosforylovány MAPK. Bioinformatická charakterizace SPL proteinů. Genotypová analýza mutantní linie *spl1* a *spl7*. Klonování *SPL* genů do expresních vektorů pro dvouhybridní kvasinkový systém.

3 Literární přehled

V rámci literárního přehledu předkládané bakalářské práce se věnujeme SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) transkripčním faktorům, ale také mitogen aktivovaným protein kinasám (MAPK), které pravděpodobně (na základě našich bioinformatických analýz) SPL proteiny fosforylují. Uvedeny jsou také základní informace týkající se oxidačního stresu, se zaměřením na kyslíkové radikály a antioxidační obranu, která je regulována, mimo jiné, pomocí transkripčních faktorů, jako jsou například SPL.

3.1 SQUAMOSA promoter-binding protein-like transkripční faktory

Proteiny SQUAMOSA promoter-binding protein-like (do promotorové oblasti genu SQUAMOSA se vážící příbuzný protein; SPL) jsou pro rostliny specifické transkripční faktory. Hrají významnou roli v různých procesech v rámci ontogeneze (Cardon *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 2005; Fornara *et Coupland*, 2009). Takovými procesy jsou například limitování formace orgánů (Liu *et al.*, 2016; Si *et al.*, 2016), utváření listových nodů (Preston *et Hileman*, 2010) a odpověď na abiotický a biotický stres (Cardon *et al.*, 1999; Preston *et Hileman*, 2013; Stief *et al.*, 2014). Rozdílné funkce těchto genů vznikaly nezávisle na základě výrazných genových duplikací (Preston *et Hileman*, 2013; Cheng *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018).

Jejich exprese je vývojově závislá, což ukazuje na význam v rámci různých vývojových stádií. Někteří zástupci vykazují konstitutivní charakter exprese (Cardon *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016).

Počet genů kódujících tyto proteiny se liší v závislosti na rostlinném druhu. Například u *Arabidopsis thaliana* je pozorováno 17 genů *AtSPL* (Chen *et al.*, 2010; Chao *et al.*, 2017), u *Betula luminifera* bylo identifikováno 18 *BISPL* (Li *et al.*, 2018) nebo u *Hordeum vulgare* L. 17 *HvSPL* (Tripathi *et al.*, 2018). Jsou však popsány i u dalších druhů, jako například *Physcomitrella patens* (Riese *et al.*, 2007), *Populus trichocarpa* (Li *et Lu*, 2014), *Brassica napus* (Cheng *et al.*, 2016), *Solanum lycopersicum* L. (Salinas *et al.*, 2012) nebo u rodu *Oryza* (Si *et al.*, 2016).

Je předpokládána, v některých případech prokázána, stejná/blízká funkce homologních genů odlišných druhů. To zvyšuje význam primárního výzkumu pro následné aplikace, například při studiu *Triticum aestivum* a jiných zemědělsky významných plodin (Zhang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Si *et al.*, 2016; Chao *et al.*, 2017).

3.1.1 Struktura SPL proteinů

Absolutní délka aminokyselinové sekvence těchto proteinů je variabilní, u *A. thaliana* se pohybuje od 131 (AtSPL3) po 1037 (AtSPL14) aminokyselin. Právě podle jejich velikosti a odlišných vlastností (například odlišnost v přítomnosti některých domén) jsou řazeny do specifických podskupin. U *A. thaliana* jsou geny *SPL* nerovnoměrně rozprostřeny v rámci chromosomů (Chen *et al.*, 2010). Na 4. chromosomu se tyto geny nevyskytují (Cardon *et al.*, 1999).

Výraznou odlišností je také rozdílný počet intronů v sekvenci genů. *A. thaliana* má 1–10 (Cardon *et al.*, 1999; Kropat *et al.*, 2005), *H. vulgare* L. má až 11 intronů v nukleotidové sekvenci (Tripathi *et al.*, 2018). Rozdílný počet intronů je však i u jednotlivých paralogních genů kódující SPL proteiny. Typická je přítomnost intronu v SBP (SQUAMOSA binding protein) boxu. SBP doména je tedy výsledkem složení 2 exonů (Cardon *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2014).

Zmíněná SBP doména vykazuje vysoký stupeň sekvenční konzervovanosti, ale jsou skupiny zástupců, kteří sdílí podobnost ve struktuře ve vyšší míře i mimo tuto oblast (Cardon *et al.*, 1999).

Kromě regionů bez významné komplexity se vyskytují v aminokyselinové sekvenci i významnější domény. Těmito doménami jsou SBP doména, méně typicky ankyrinové repetice (Kropat *et al.*, 2005) a transmembránová doména (Garcia-Molina *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2017).

3.1.1.1 SBP doména

Jde o konzervovanou doménu, která je charakteristická pro tuto proteinovou rodinu. Vyznačuje se relativně konzervovanou sekvencí 76 aminokyselin, přičemž sekvence mimo SBP doménu se mohou zásadně lišit mezi jednotlivými zástupci. Právě přítomnost této domény je řadí primárně mezi transkripční faktory (Yamasaki *et al.*, 2004; Birkenbihl *et al.*, 2005).

Jedná se o DNA-interagující doménu, která byla jako první popsána u dvou blízké příbuzných proteinů SBP1 a SBP2 *Antirrhinum majus*, kde byla prokázána její schopnost vázat se do GTAC motivu promotorové oblasti genu *SQUAMOSA*, který patří do MADS (MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1, AGAMOUS, DEFICIENS, Serum response factor) box genové rodiny. Od tohoto pochází tedy název – SQUAMOSA binding protein (Klein *et al.*, 1996; Birkenbihl *et al.*, 2005).

SQUAMOSA je gen zodpovědný za tvorbu květu, což nastínilo možný význam SPL proteinů v ontogenetickém vývoji (Klein *et al.*, 1996). Proteinu SQUAMOSA ortologní protein APETALA1 (AP1) byl později objeven u dalších rostlinných druhů (Mandel *et al.*, 1992; Klein

et al., 1996; Cardon *et al.*, 1997). Redundanci SPL proteinů, tak jako je ukázána pro SBP1/2 (Klein *et al.*, 1996), podporují *in silico* predikce a *in vitro* analýzy (Li *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018).

Konsenzuální sekvence v promotorových oblastech cílových genů SPL transkripčních faktorů je TNCGTACAA (N je libovolná báze; Cardon *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2004). Obecně však platí za cílovou sekvenci palindromický úsek DNA obsahující konzervovaný/shodný element GTAC. Tedy GTAC můžeme brát jako klíčový motiv pro rozpoznání sekvence SBP doménou (Birkenbihl *et al.*, 2005; Kropat *et al.*, 2005). Mimo jiné je tento motiv spjat s regulací genové aktivity při nedostatku mědi (Cu response elements; CuRE), což ukazuje na význam SPL v těchto podmínkách (Nagae *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009; Garcia-Molina *et al.*, 2014).

Náboj SBP domény je pozitivní, který je dán přítomností argininu a lysinu. Pozitivní náboj umožňuje interakci s negativně nabitou molekulou DNA, v tomto případě v oblasti velkého žlábků. Této protein-DNA interakce se účastní především vysoce konzervovaná residua SBP domény (Yamasaki *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014). Významnou roli také hrají přítomné dva motivy (Zn-1 a Zn-2) podobné motivu zinkového prstu (zinc-finger like motiv). Právě ty jsou klíčové pro interakci s cílovou DNA (Yamasaki *et al.*, 2004; Birkenbihl *et al.*, 2005). Jejich integrita je zásadní pro úspěšnou asociaci SPL s DNA (Birkenbihl *et al.*, 2005). Vazba zapojeného iontu Zn^{2+} k proteinu je těsná, k disociaci dochází až po denaturaci SBP domény. Deplece tohoto kofaktoru negativně ovlivňuje schopnost vázat se na cílovou DNA, jeho suplementace tuto schopnost opět obnovuje (Birkenbihl *et al.*, 2005; Kropat *et al.*, 2005).

C-terminální oblast této domény obsahuje jadernou lokalizační sekvenci (Moreno *et al.*, 1997; Birkenbihl *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014).

3.1.1.2 Ankyrinové repeticce (ANK)

Ankyrinové repeticce jsou vnímány jako jeden z nejčastěji pozorovaných motivů v proteinových databázích. Jsou pozorovány nejen u eukaryotních organismů, ale také u bakterií a archeí, kde se proteiny obsahující tento motiv zapojují do procesů buněčné signalizace, udržení buněčné integrity, transkripce a regulace buněčného cyklu (Mosavi *et al.*, 2004). Samotná přítomnost těchto domén, ale i jejich počet, výrazně ovlivňuje architekturu a kompaktnost proteinů (Mosavi *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2015).

Jedná se o motiv zodpovědný za protein-protein interakce, který je u SPL proteinů obvykle přítomen v tandemovém uspořádání, ve více kopiích. Nejedná se o motiv vyskytující se u všech SPL (Michaely *et al.*, 1992; Parra *et al.*, 2015; Chao *et al.*, 2017). Vyskytuje se

především u zástupců SPL s delší aminokyselinovou sekvencí (Li *et al.*, 2014), například AtSPL1/12/14/16 (Yang *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2017) anebo u HvSPL1/6/15 (Tripathi *et al.*, 2018).

3.1.2 Regulace exprese SPL díky miRNA

Bylo zjištěno, že transkripce některých SPL je regulována pomocí mikroRNA (miRNA), konkrétně miR156 a blízké příbuzné miR157. miRNA regulované SPL hrají především roli v přechodu rostliny z juvenilního do dospělého stádia (Rhoades *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016), nebo pro odpověď rostliny na stres vyvolaný zvýšenými teplotami (Stief *et al.*, 2014). V rámci ontogeneze platí nepřímá úměra mezi expresí zmíněných miRNA a expresí regulovaných genů, včetně SPL (Wu *et al.*, 2006; Stief *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). Takováto regulace exprese prostřednictvím miRNA se vyskytuje nejen u *A. thaliana*, ale také u dalších rostlinných druhů, jako například u *Populus trichocarpa* (Li *et al.*, 2014), *Brassica napus* (Cheng *et al.*, 2016), *Oryza sativa* L. (Si *et al.*, 2016), *Betula luminifera* (Li *et al.*, 2018) anebo *Hordeum vulgare* L. (Tripathi *et al.*, 2018).

Xu *et al.* (2016) dělí deset miRNA-regulovaných AtSPL do tří funkčně odlišných skupin: (i) AtSPL2/9/10/11/13/15 hrají roli v přechodu rostliny z juvenilního do dospělého a z vegetativního do reprodukčního stádia; (ii) AtSPL3/4/5 jsou klíčové pro meristémovou identitu; a (iii) AtSPL6 je bez přiřazené zvláštní funkce.

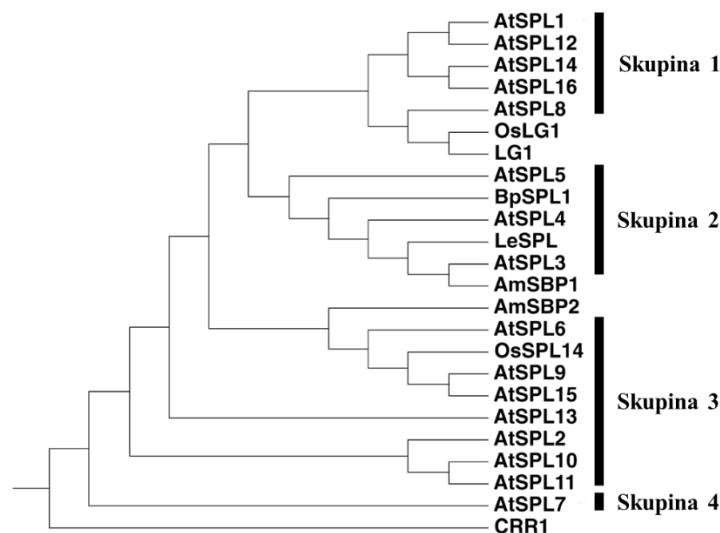
Obecně platí, že miR156-regulované SPL také potlačují růst adventivních kořenů. Jako taková je miR156 exprimována v rannějších fázích ontogeneze (semenáčky) a blokuje expresi cílových SPL genů, kde je jejich exprese pozorována především v prvních dvou listech rosety. Jejich význam se snižuje u starších rostlin (Rhoades *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2016).

3.1.3 Zástupci AtSPL

AtSPL jsou často děleny do podskupin podle aminokyselinové sekvence, respektive podle fylogenetické příbuznosti (viz obrázek 1), expresního profilu, nebo podle struktury genů (Cardon *et al.*, 1999; Birkenbihl *et al.*, 2005; Preston *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

Na základě fylogenetické analýzy (Chen *et al.*, 2010) mohou být děleny do skupin, které sdružují příbuzné SPL proteiny. V rámci každé skupiny je pozornost ve výzkumu věnována hlavním zástupcům, ostatní jsou obecně uvažovány jako funkčně podobné.

AtSPL1/12/14/16 jsou všechny relativně velké proteiny obsahující zmíněné ANK repetice (Yang *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2017). AtSPL1/12 jsou redundantní proteiny, které hrají roli v termotoleranci a vývoji květu. Jejich význam v suchozemských rostlinách je stále víceméně neznámý. Exprese je také ovlivněna zvýšenou intenzitou záření, vyššími teplotami, nedostatkem vody, expozicí anorganickým látkám, aplikací fytohormonů a látkami zodpovědnými za oxidační stres (Chao *et al.*, 2017).



Obrázek 1: Fylogenetická analýza SPL. AtSPL – SPL původem z *Arabidopsis thaliana*; OsLG – *Oryza sativa* LIGULELESS1; LG1 – LIGULELESS 1 (kukuřice); BpSPL – SPL původem z *Betula pendula*; LeSPL – *Lycopersicon esculentum*; AmSBP – *Antirrhinum majus* SQUAMOSA binding protein; CRR1 – Copper Response Regulator 1. Převzato, upraveno z Chen *et al.* (2010).

AtSPL8 byl jeden z prvních popsáných AtSPL proteinů. Je důležitý pro sporogenezi, tvorbu květu (především vývoj prašníků) a semen, ovlivňuje tak sterilitu rostlin. Ovlivňuje i tvorbu trichomů kališních lístků, kde *sp18* vykazoval jejich nižší počet (Unte *et al.*, 2003). Zapojena je do regulace gibereliny-ovládanými (GA) vývojovými procesy (Zhang *et al.*, 2007).

Příbuznost SPL3/4/5 byla stanovena na základě podobnosti na molekulární úrovni, ale i díky redundanci v regulovaných procesech. U SPL4/5 se obecně uvažuje shodná funkce s SPL3 (Xu *et al.*, 2016). Exprese *SPL3* je ovlivněna prostřednictvím miR156 v průběhu vegetativního růstu (Wu *et Poethig*, 2006) a kvetení (Preston *et Hileman*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016). V prvním týdnu vývoje rostliny je exprese *SPL3* nízká, zvyšuje se v průběhu ontogeneze. Jeho konstitutivní exprese v rostlinách ústí v dřívější kvetení (Yamaguchi *et al.*, 2009), díky interakcím s promotorovými oblastmi genů *API* (Cardon *et al.*, 1997; Cardon *et al.*, 1999), *LEAFY (LFY)* a *FRUITFUL (FUL)* (Xu *et al.*, 2016). SPL3/4/5 ovlivňují nejen tvorbu/stavbu květu, meristematickou identitu (Cardon *et al.*, 1997; Cardon *et al.*, 1999), ale také mají vliv na vývoj listů (Cardon *et al.*, 1997; Wu *et Poethig*, 2006).

Další skupinou je AtSPL2/6/9/10/11/13/15. SPL2/10/11 jsou regulované prostřednictvím miRNA. U mutantů *A. thaliana spl2/9/11/13/15* je redukována exprese *LFY*, *API* a *FUL*, což ukazuje na význam pro tvorbu květu (Schwarz *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016).

Expresce homologních *SPL2/11* ale také *SPL9* je snížena vystavením rostlin zvýšené teplotě (Stief *et al.*, 2014). Xu *et al.* (2016) nepozorovali významnou funkci AtSPL6/9/15 pro morfogenezi prýtu. Paralogní AtSPL9/15 jsou zapojeny do podobných procesů jako AtSPL2/10/11/13 (Schwarz *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). Jsou zapojeny do procesů ovlivňující počet a tvar listů rosety, morfologii apikálního vrcholu a tvorbu květu (Schwarz *et al.*, 2008).

Vzhledem k interakcím s miRNA je vývojový expresní profil *AtSPL13* podobný dříve zmíněným. Funkce SPL13 je obdobná jako u AtSPL2/10/11 (Schwarz *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). SPL13 je důkazem o nedávném procesu diverzifikace *SPL* genů, a to díky tandemovému výskytu dvou kopií *AtSPL13A* (At5G50570) a *AtSPL13B* (At5G50670), které jsou bez známek polymorfismu (Xu *et al.*, 2016). I u dalších druhů pozorujeme takovouto segmentovou duplikaci (Guo *et al.*, 2008; Preston *et al.*, 2013).

3.1.3.1 AtSPL7

SPL7 je jedna z nejméně prostudovaných AtSPL. Podílí se na tvorbě prašníků a pylového zrna. Spolu s transkripčním faktorem Cu-deficiency Induced Transcription Factor 1 (CITF1) hraje významnou roli v signalizaci kyseliny jasmonové (JA; Yan *et al.*, 2017), ovlivňují hospodaření s mědí (centrální geny Cu homeostázy), což má vliv na vývoj rostlin (Abdel-Ghany *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2012). Yan *et al.* (2017) ukázali ve své práci, že nedostatek Cu vede ke zvýšení exprese některých genů, jejichž produkty ovlivňují biosyntézu JA. Pro hospodaření s mědí však hrají významnou roli i jiné proteiny (Quinn *et al.*, 1995), jako například zástupci z copper transporter (COPT) proteinové rodiny (Jung *et al.*, 2012).

Aktivitou SPL7 je ovlivněna exprese enzymů antioxidační obrany využívající měď jako kofaktor, například *Cu/Zn superoxid dismutasa 1/2* (*CSD1/2*). Je však ovlivněna i exprese jiných genů, například *Fe superoxid dismutasy 1* (*FSD1*; Yamasaki *et al.*, 2009; Garcia-Molina *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2017). Při dostatečném množství mědi v substrátu je *CSD1/2* vysoce abundantní, *FSD1* je syntetizována minimálně. Nedostatek mědi však vede ke zvýšení transkripce *FSD1* z důvodu prioritní alokace mědi pro plastocyanin (PC). Dochází tak k zachování funkce fotosyntetického aparátu (Cohu *et al.*, 2007; Cohu *et al.*, 2009). Této regulace je docíleno pomocí miR398, ale také miR397/408/857 (obsahují v promotorových oblastech GTAC motiv), potažmo přímou regulací exprese (Abdel-Ghany *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009; Araki *et al.*, 2018).

Zvýšení exprese těchto miRNA vede ke snížení exprese *CSD1/2* (Abdel-Ghany *et Pilon*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2012). Snížení exprese *CSD1/2* je vyváжено zvýšením exprese *FSD1* prostřednictvím *AtSPL7*, která se váže do promotorové oblasti genu *FSD1* (Abdel-Ghany *et Pilon*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009). Opětovné dodání mědi působí snížení exprese *FSD1*. Při dostatečném množství Cu v substrátu je u *Arabidopsis* *CSD1/2* abundantní, bez významné aktivity *FSD1* (Cohu *et Pilon*, 2007; Abdel-Ghany *et Pilon*, 2008).

3.2 Mitogen-aktivované protein kinasové kaskády

Mitogen-aktivované protein kinasové (MAPK) kaskády jsou vysoce konzervované tříúrovňové hierarchicky uspořádané transdukční moduly, které se vyskytují u eukaryotických organismů – rostlin i živočichů (Colcombet *et Hirt*, 2008, Dóczi *et al.*, 2012; Komis *et al.*, 2018). Jejich studium, ale také studium jejich interakčních partnerů (díky *in silico* a následně *in vitro* analýzám), má význam pro medicínské, agrární a další biotechnologické aplikace (Kovtun *et al.*, 2000; Sörensson *et al.*, 2012; Pitzschke, 2015; Bi *et al.*, 2018).

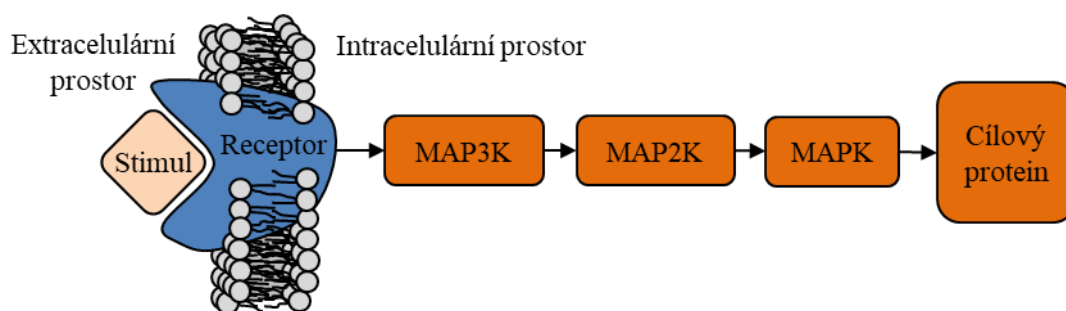
Stimulace drah zahrnující tyto transduktory je vyvolána primárně extracelulárním podnětem (fyzická interakce s receptorem), ale může docházet i k přímým interakcím iniciační molekuly s MAPK. Jsou tedy spjaty s receptory lokalizovanými na cytoplasmatické membráně a transdukují signál k cílovým proteinům. Takovými proteiny mohou být například transkripční faktory, které ovládají expresi genů významných pro vývoj anebo reakci na daný stimul (Pitzschke, 2015; Bi *et al.*, 2018; Komis *et al.*, 2018). MAPK hrají úlohu v reakci na mnoho abiotických (Ichimura *et al.*, 2000; Kovtun *et al.*, 2000; Xing *et al.*, 2015; Takáč *et al.*, 2016b) a biotických (Nühse *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2018) podnětů. Jsou důležité pro organizaci mikrotubulů (Beck *et al.*, 2010), buněčné dělení (Takenaka *et al.*, 1998; Komis *et al.*, 2011), růst kořenového vlásku (Beck *et al.*, 2010), pylové láčky (Guan *et al.*, 2014) a dalších vývojových procesů, jako například tvorbu laterálních kořenů (López-Bucio *et al.*, 2014), stomat (Lee *et al.*, 2016), nebo generativních orgánů (Hord *et al.*, 2008). MAPK kaskády mají podíl na regulaci genů zapojených do hormonální signalizace JA (Takahashi *et al.*, 2007) nebo signálních drah auxinů (Kovtun *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2009).

Zejména u rostlin je nutnost komplexní signalizační sítě spojena s adaptací na změnu podmínek díky jejich omezené mobilitě (Smékalová *et al.*, 2014a). Transdukce, ale často i amplifikace signálu souvisí s fosforylací jednotlivých MAPK, substrátů obecně (strukturní proteiny, enzymy, transkripční faktory), což může mít za následek změnu jejich konformace, aktivity, nebo například lokalizace na subcelulární úrovni (Colcombet *et Hirt*, 2008; Sörensson *et*

al., 2012; Pitzschke, 2015). Aktivace těchto drah je také spjata s tranzientním navýšením aktivity MAPK (Nühse *et al.*, 2000; Tsuda *et al.*, 2013).

3.2.1 Komponenty MAPK kaskád

Transdukce signálu je umožněna fosforylací mitogen aktivované protein kinasu kinasu (MAP3K) díky aktivitě receptoru, potažmo aktivací pomocí stimulu, jako například ROS, Ca²⁺, hormony nebo NO (Smékalová *et al.*, 2014a). MAP3K aktivuje fosforylací mitogen aktivovanou protein kinasu kinasu (MAP2K), která fosforyluje MAPK (Komis *et al.*, 2018; viz obrázek 2). U *A. thaliana* pozorujeme 20 AtMAPK, 10 AtMAP2K a 60 AtMAP3K (Ichimura *et al.*, 2002).



Obrázek 2: Schématické zobrazení MAPK kaskády. Díky stimulaci dochází k aktivaci kaskády, která umožňuje transdukci signálu díky fosforylací jednotlivých členů kaskády.

MAP3K jsou serin/threonin (S/T) kinasu fosforylující S/T-X₃₋₅-S/T motiv MAP2K, které v rámci terminálních sekvencí obsahují regulační oblasti. Fosforylace MAP2K vede k jejich aktivaci, přičemž jedna MAP2K může být fosforylována více MAP3K (Colcombet *et Hirt*, 2008). Ichimura *et al.* (2002) dělí MAP3K do dvou hlavních skupin: (i) MAP3K jako takové, kam patří například AtMEKK1, která je zapojená do dráhy zahrnující MPK4 (Nakagami *et al.*, 2006), ale i MPK6 (Xing *et al.*, 2015); a (ii) takzvané RAF-like, kam náleží například constitutive response 1 (CTR1; Zhong *et Chang*, 2012) nebo enhanced disease resistance 1 (EDR1; Frye *et al.*, 2001), MAP3K.

Dalším členem MAPK kaskád jsou MAP2K kinasu. Ichimura *et al.* (2002) na základě odlišné struktury dělí AtMAP2K na čtyři odlišné skupiny (A–D). Rostlinné a živočišné MAP2K vykazují odlišnosti v primární struktuře. Tyto rozdíly jsou především ve složení a počtu aminokyselin fosfopeptidu (Ichimura *et al.*, 2002). Na příkladu MKK1/2 můžeme demonstrovat možnou funkční zaměnitelnost v aktivaci MPK4 (Pitzschke *et al.*, 2009). Pozorovatelná je redundance mezi ortology AtMEK4/5 a NtMEK2 v transgenní rostlině (Ren *et al.*, 2002).

Ve své struktuře obsahují MAP2K doménu zajišťující vazbu s komplementární MAPK, nebo jiným substrátem. Výskyt této MAPK-dokovacích domény ovlivňuje vzájemnou interakci enzym-substrát. Tyto domény jsou charakteristické přítomností pozitivně nabitých aminokyselin na vnější straně katalytické domény (Tanoue *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2007; Bardwell *et al.*, 2009). Blokace této domény antagonistnou má za následek inhibici celé kaskády. Byla pozorována i odlišná afinita mezi jednotlivými typy kinas, která byla ovlivněna jejich příbuzností – dochází tedy k preferované fosforylaci MAPK příbuznou MAP2K (Takahashi *et al.*, 2007; Bardwell *et al.*, 2009). Také může docházet k substrátové promiskuitě, která umožňuje vzájemné ovlivňování a redundanci komponentů kaskád v aktivaci cílových proteinů (Smékalová *et al.*, 2014a; Pitzschke, 2015; Komis *et al.*, 2018). Příkladem může být zahrnutí AtMKK5 do signalizační dráhy v odpovědi na solný stres, který iniciuje expresi *FSD* a *CSD* (Xing *et al.*, 2015). Nadexprese *AtMKK5* vede ke zvýšení odolnosti vůči vysoké intenzitě záření (Xing *et al.*, 2013). *AtMKK1* je spojena s *MPK6* a odpovídá na přítomnost peroxidu vodíku (Xing *et al.*, 2008).

Aktivita MAPK modulů je regulována také takzvanými scaffold proteiny. Tyto proteiny jsou schopny vázat všechny komponenty MAPK drah a v podmínkách stresu tyto komponenty uvolnit. MAPK jsou poté transportovány na místo své funkce, jako například do jádra, kde mohou fosforylovat transkripční faktory (Ichimura *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2015; Komis *et al.*, 2018).

Negativní vliv na vedení signálu mají specifické fosfatasy (MKP). Podobně jako MAPK, také MKP jsou aktivovány různými podněty. Jejich úlohou je kontrola reversibilně fosforylovaných proteinů, čímž umožňují inaktivaci signálních drah. Zabezpečují tedy regulaci transdukce signálu, fyziologickou odpověď rostlin (Camps *et al.*, 2000; Bartels *et al.*, 2010).

3.2.1.1 Mitogen aktivované protein kinasy

MAPK jsou serin/threonin kinasy, které jsou schopny fosforylovat širokou skupinu substrátů. Fosforylace substrátu vyžaduje přítomnost SP (serin, prolin), nebo TP (threonin, prolin) motivu v jeho aminokyselinové sekvenci (Colcombet *et al.*, 2008; Pitzschke, 2015). Znalost těchto reziduí a celkově vlastností těchto proteinů umožňuje predikce interakčních partnerů. Jsou aktivovány fosforylací na aminokyselinách threonin a tyrosin (Pitzschke, 2015).

Ichimura *et al.* (2002) dělí AtMAPK podle prezence rozdílných motivů (TEY a TDY) na dvě skupiny. U prvně zmíněného subtypu pozorujeme evolučně konzervovanou doménu (C-terminální region), někdy označovanou CD (conserved domain), která hraje zásadní roli při interakci dokovací sekvence s dalšími proteiny jako MAP2K, fosfatasy a jinými substráty. Patří sem například *AtMPK4/6/7* (Ichimura *et al.*, 2000; Tanoue *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2002; Pitzschke, 2015).

Nejvíce studovány/charakterizovány jsou AtMPK3/4/6 díky jejich spojení s více signalizačními drahami a odpovědí na odlišné iniciační signály (Komis *et al.*, 2018).

AtMPK3/6 jsou redundantní MAPK, které sdílejí společnou funkci v odpovědi na různé podněty. Aktivované MPK3/6 mohou být translokovány do jádra (Ahlfors *et al.*, 2004; Latrasse *et al.*, 2017). Vstupují do drah signalizujících bakteriální napadení, v rámci kaskády zahrnující AtMAPKKK3/5 (Nühse *et al.*, 2000; Tsuda *et al.*, 2013; Bi *et al.*, 2018).

Dráha zahrnující ANP1 a MPK3/6 je aktivována pokud je jedinec vystaven nepříznivým environmentálním podmínkám, například vystavení peroxidu vodíku (Kovtun *et al.*, 2000). Zde hraje významnou roli OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1 (OXI1), který umožňuje plnou aktivaci MPK3/6 (Rentel *et al.*, 2004). Ovlivňují přípravu na potenciální aktivaci, tedy opětovné vystavení dříve nastalým podmínkám (Kovtun *et al.*, 2000; Nakagami *et al.*, 2006). Příprava na opětovné vystavení aktivátoru (priming) je proces spojený s akumulací transkriptů a proteinů (inaktivních forem/prekurzorů) zapojených do reakce na daný stresor, včetně proteinů transdukujících signál. To bylo studováno díky *mpk3/6* mutantním rostlinám, které vykazují nižší aktivitu proteinů zapojených do rostlinné obranné odpovědi. Stimulací subletálními dávkami stresoru může být docíleno vyšší odolnosti/rychlejší reakce na daný podnět (Ichimura *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2004; Beckers *et al.*, 2009). MPK6 je zahrnuta do vývoje preprofázního svazku a fragmoplastu, čímž výrazně zasahuje do buněčného dělení. Také má vliv na morfologii kořene (Smékalová *et al.*, 2014b).

AtMPK4, v rámci dráhy zahrnující MEKK1-MKK1/2, je spojována s regulací ROS metabolismu. MEKK1 je brána jako jeden z hlavních regulátorů redox homeostázy, především jako součást výše uvedené kaskády (Pitzschke *et al.*, 2009). AtMPK4 je také spojována s vlivem na vývoj kořene, kořenových vlásků a epidermálních buněk. Její významná tranzientní aktivace v listech je spojována s rozdílnými stresory, jako například nízká teplota, nízká vlhkost, hyperosmotické prostředí, dotek, mechanické poškození. Za těchto podmínek je pozorováno také navýšení aktivity AtMPK6. (Ichimura *et al.*, 2000; Pitzschke *et al.*, 2009; Smékalová *et al.*, 2014a; Takáč *et al.*, 2016b). Role MPK4 a MPK6 není úplně identická (Ichimura *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014a; Takáč *et al.*, 2016b). Jejich odlišnost může být demonstrována rozdílnou dobou aktivace (Ichimura *et al.*, 2000).

3.3 Oxidační stres

Oxidační stres je stav, při kterém je organismus vystaven nadbytku oxidačně aktivních molekul/radikálů, díky čemuž je narušena jeho biologická rovnováha. Obecně platí, že síla stresu je úměrná množství radikálů stres působících. Tyto radikály jsou exogenního, ale také

endogenního původu. Interakcemi s buněčnými strukturami (nukleové kyseliny, protein, lipidy, sacharidy) na molekulární úrovni způsobují oxidační činidla jejich degradaci, narušení jejich biologických vlastností, což může mít pro daný organismus fatální důsledky (Schuchmann *et von* Sonntag, 1978; Fry, 1998; Krieger-Brauer *et Kather*, 1992; Ames *et al.*, 1993; Schweikert *et al.*, 2000; Mittler, 2017). V konečném důsledku může tento stav ovlivnit i biologickou integritu (Apel *et Hirt*, 2004; Bellegarde *et al.*, 2019).

S pokrokem v poznání na poli biologie a chemie rostl význam těchto radikálů, které mají roli v ontogenezi. Již v padesátých letech se do středu zájmu dostala teorie, která uvažuje částice způsobující tento typ stresu jako jeden z hlavních faktorů, který ovlivňuje proces stárnutí (Harman, 1956). Později byl význam přikládán také enzymům, které s těmito částicemi souvisí (Ames *et al.*, 1993; Schriener *et al.*, 2005).

Z hlediska zdroje oxidačního stresu, můžeme dělit původce na reaktivní částice dusíku (reactive nitrogen species; RNS) a reaktivní částice kyslíku (reactive oxygen species, ROS; někdy také aktivní částice kyslíku – active oxygen species). Nejvyšší význam mají superoxidové anionty, potažmo peroxid vodíku nebo hydroxylové radikály (Neill *et al.*, 2002a; Apel *et Hirt*, 2004; Yamakura *et Kawasaki*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014a).

3.4 Kyslíkové radikály

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) jsou charakteristické přítomností jednoho nebo více nepárových elektronů na molekule kyslíku. ROS primárně vznikají v rámci aerobního metabolismu, případně konverzí dříve vzniklých ROS díky přítomnosti látek s antioxidačním charakterem, jako jsou například ionty kovů nebo specifické enzymy (Baker *et Orlandi*, 1995; Apel *et Hirt*, 2004; Asada, 2006; del Río *et al.*, 2006).

ROS jsou tvořeny především díky aktivitě elektrontransportního řetězce (dýchací a fotosyntetický elektrontransportní řetězec) a jsou kontinuálně produkovány v rozdílných metabolických pochodech. Mechanismus tvorby ROS se v jednotlivých organelách liší díky kompartmentaci metabolických procesů. Na formování těchto částic má přímý vliv přítomnost molekuly O₂ (Cochemé *et Murphy*, 2008; Heyno *et al.*, 2011; Kovac *et al.*, 2015). Typicky se jedná o peroxisomy (del Río *et López-Huertas*, 2016), ale především mitochondrie (Gleason *et al.*, 2011), které jsou majoritní producent ROS. U rostlin na významu nabývají také chloroplasty (Robertson *et al.*, 1995; Kale *et al.*, 2017). Nespornou roli zastávají ionty kovů (především železa, mědi, manganu nebo zinku) jejichž redukční potenciál umožňuje tvorbu radikálů – Haber-Weissova reakce, Fentova reakce. Tyto reakce hrají významnou roli nejen jako odklízecí mechanismy, ale samozřejmě souvisí s konverzí na jiné ROS. Fentova reakce je spojena s tvorbou

vysoce reaktivních hydroxylových radikálů z peroxidu vodíku za přítomnosti Fe^{2+} (Schieber *et al.*, 2014). Z důvodu aktivity iontů kovů tedy hrají významnou roli v antioxidační obraně i chelatační látky (Ames *et al.*, 1993).

Jejich produkce je radikálně zvýšena po vystavení organismu nepříznivým podmínkám (Apel *et al.*, 2004), vznik je stimulován abiotickými faktory, jako například vysoká koncentrace solí (Van Camp *et al.*, 1996; Hossain *et al.*, 2016), sucho (Duan *et al.*, 2009), zvýšená intenzita světla (He *et al.*, 2015), UV záření (de Jager *et al.*, 2017), ionizující záření (Yamamori *et al.*, 2012) nebo chlad (McKersie *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2016). Tyto faktory jsou obecně spjaty s indukcí exprese genů souvisejících s odpovědí na ROS (Creissen *et al.*, 1999; Desikan *et al.*, 2001). Malé dávky ROS stimulují proliferaci (Mittler, 2017). Nadměrná produkce/přítomnost ROS může vést k dříve zmíněné degradaci biopolymerů a následně k buněčné smrti (Hippeli *et al.*, 1996; Creissen *et al.*, 1999; Tsugane *et al.*, 1999; Demidchik *et al.*, 2003; Mhamdi *et al.*, 2010).

ROS nemají jen negativní efekt, ale také mají významnou roli jako signální molekuly (Rhee, 2006; Smékalová *et al.*, 2014a). Příkladem může být schopnost ROS regulace/modulace influxu Ca^{2+} a effluxu K^{+} iontů přes cytoplasmatickou membránu rostlinných buněk (Demidchik *et al.*, 2003). Jsou také zapojeny do drah zahrnující fytohormonální signalizaci, jmenovitě kyseliny abscisové (ABA; Whitaker *et al.*, 2010) a giberelinů (GA; Fath *et al.*, 2001). Výrazně ovlivňují schopnost rostliny čelit nepříznivým podmínkám (Chen *et al.*, 1996; Whitaker *et al.*, 2010). ROS oxidují cysteinové a methioninové zbytky aminokyselin, čímž může dojít ke změně konformace proteinů, typicky ke změně aktivity enzymů. Tyto konformační změny jsou mechanismem, kterým ROS aktivují, nebo inaktivují signální dráhy (Apel *et al.*, 2004; Yamakura *et al.*, 2010). ROS mají schopnost aktivace MAPK (Schieber *et al.*, 2014).

Další ukázkou jejich významu může být vliv na proliferaci buněk, případnou deregulaci tohoto procesu a následnou tumorigenezi (Ames *et al.*, 1993; Moshfegh *et al.*, 2019). U živočichů mohou vyvolat kardiovaskulární potíže, onemocnění imunitního systému, dysfunkce mozku nebo katarakt (Schieber *et al.*, 2014; Moshfegh *et al.*, 2019).

V živých soustavách hrají roli nejen jako mediátory/signální molekuly, ale také dochází k využití oxidačních mechanismů jako takových (Demidchik *et al.*, 2003; Mittler, 2017). K jejich tvorbě dochází po interakci rostliny s patogenem (virus, bakterie, houbové organismy; Apel *et al.*, 2004). Kontrolovanou produkcí ROS, označovanou jako oxidační vzplanutí (oxidative burst), může dojít k degradaci patogenu nebo může být zapříčiněna hypersenzitivní reakce rostliny. Toto posiluje schopnost rostlin, ale i živočichů, typicky spjata s buňkami imunitního systému (T-lymfocyty) a superoxidovými radikály, čelit infekci (Ames *et al.*, 1993; Legendre *et al.*, 1993; Moshfegh *et al.*, 2019).

Ukazuje se, že můžeme mluvit o jisté hormezi ROS – nižší dávka (bazální stres) má pozitivní vlastnosti na organismus, jeho prospěch (Mhamdi *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012;

Schieber *et Chandel*, 2014; Agathokleous *et al.*, 2019). Často také nízké dávky ROS pomáhají překonat vystavení organismu vyšším dávkám, které jsou bez předřazené aplikace letální. Hladina ROS je však striktně regulována antioxidačními mechanismy (Apel *et Hirt*, 2004).

3.4.1 Zástupci reaktivních kyslíkových radikálů

Mezi nejvýznamnější ROS patří superoxidové radikály, peroxid vodíku, hydroxylové radikály a singletový kyslík (Conklin *et al.*, 1996; Mittler, 2017).

Významným problémem při studiu jednotlivých částic je konverze vysoce reaktivních částic na částice méně reaktivní, což také činí jejich monitorování obtížné (Apel *et Hirt*, 2004).

Zdrojem superoxidových aniontů/radikálů je xanthin oxidasa a NADPH oxidasa. Tyto enzymy zapříčiní transfer elektronu z redukčního substrátu na molekulu O₂, což má za následek formování superoxidového radikálu (Chen *et Schopfer*, 1999; Heyno *et al.*, 2011). Konkrétní funkce těchto ROS nejsou známy, především jsou uvažovány jako prekurzor pro peroxid vodíku. Významným producentem jsou mitochondrie, konkrétně mitochondriální komplex I (flavinová prostetická skupina) a komplex III (Murphy, 2009).

Superoxidové radikály jsou rapidně dismutovány na peroxid vodíku enzymatickou a neenzymatickou cestou (del Río *et al.*, 2006; Kukavica *et al.*, 2009). Právě odklizení superoxidového radikálu pomocí SOD může však ve výsledku vyústit v navýšení koncentrace hydroxylových radikálů (Kukavica *et al.*, 2009). Obě zmíněné ROS mají významnou roli při funkci stomat (McAinsh *et al.*, 1996). Zvýšení koncentrace superoxidových radikálů může vést ke vzniku peroxinitritu, který také může zapříčinit poškození buňky (Speckmann *et al.*, 2016; Yamakura *et Kawasaki*, 2010).

Peroxid vodíku řadíme mezi ROS, i když se charakterem nejedná o radikál, jelikož se u něj nevyskytuje nepárový elektron. Mezi jeho enzymatické zdroje řadíme amino oxidasu (Corpas *et al.*, 2001) a SOD (produkt dismutace superoxidového radikálu; Pilon *et al.*, 2011). Jeho produkce je především spojována s peroxisomy (del Río *et López-Huertas*, 2016) a fotorespirací (Gleason *et al.*, 2011). Mezi hlavní enzymy zapojené do metabolismu peroxidu vodíku patří askorbát peroxidasa (Maruta *et al.*, 2016), peroxidasy obecně (Sies, 2017), a katalasa (CAT; Mhamdi *et al.*, 2010). Cílené generování peroxidu vodíku spolu s aktivací MAPK (AtMPK6) předchází a doprovází hypersenzitivní reakci, procesy spjaté s buněčnou smrtí (Kovtun *et al.*, 2000; Yuasa *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2002).

Peroxid vodíku způsobuje výrazný oxidační stres, především díky jeho relativně vysoké stabilitě (Mhamdi *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). Jeho přenos přes membránu probíhá prostřednictvím akvaporinů (Miller *et al.*, 2010), může však docházet i k difuzi (Bienert *et al.*,

2006). Zprostředkovává odpověď na abiotický a biotický stres (Neill *et al.*, 2002b), ovlivňuje expresi genů (Desikan *et al.*, 2001), buněčný cyklus a je zapojen do signalizace pomocí fytohormonů, například auxinů (Kovtun *et al.*, 2000; Joo *et al.*, 2001). Ovlivňuje tvorbu adventivních kořenů (Takáč *et al.*, 2016a). Tranzientně zvýšená intercelulární koncentrace peroxidu vodíku ovlivňuje gravitropismus v kořenových částech rostlin (Joo *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2002c).

Jako nejvíce reaktivní ROS jsou považovány hydroxylové radikály, jejichž produkce je ovlivněna produkcí ABA a GA (Schopfer *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2015) a koresponduje s enzymy zapojenými do produkce jejich prekurzorů (Kukavica *et al.*, 2009). Jako jejich prekurzory považujeme superoxidové radikály a peroxid vodíku. Jejich produkci tedy výrazně ovlivňují peroxidasy (Chen *et al.*, 1999; Heyno *et al.*, 2011), SOD a NADPH oxidasa (Richards *et al.*, 2015). Možný je také vznik díky ionizujícímu záření – rozpadem molekuly vody (Yamamori *et al.*, 2012).

Hydroxylové radikály jsou zapojeny do procesů souvisejících s vývojem buněčné stěny a její degradací, ale také s buněčným dělením. Degradace buněčné stěny umožňuje následnou expanzi pletiv (Fry, 1998; Kukavica *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2014) nebo abscisi rostlinných orgánů (Schopfer *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2015). Umožňují nejen expanzi pletiv maturovaných rostlin, ale ovlivňují svou činností i proces klíčení (Müller *et al.*, 2009).

Negativní vliv hydroxylových radikálů lze demonstrovat na degradaci fotosystému II v průběhu fotoinhibice (Kale *et al.*, 2017).

3.5 Antioxidační obrana

Cytostatický až cytotoxický význam ROS dal za vznik komplexní sítě enzymatické a neenzymatické obrany, která reguluje hladinu ROS, a tak zajišťuje jejich fyziologické funkce (Apel *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2016). Pokud dojde ke snížení antioxidační kapacity, dochází k nárůstu aktivity ROS (jejich produkce není limitována, vyskytují se v nadbytku), tedy ke zvýšení jejich negativního efektu (Izawa *et al.*, 1995). Míra komplexity antioxidační obrany je určena odlišnostmi díky kompartmentalizaci, ale také různou expresí antioxidačních enzymů na pletivové a orgánové úrovni (Apel *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2016). Dysfunkce antioxidační obrany může vést k vytvoření toxických koncentrací ROS, oxidačnímu poškození biologických struktur a smrti postižené buňky (Izawa *et al.*, 1995; Corpas *et al.*, 2001).

Antioxidační obranu můžeme dělit na enzymatickou a neenzymatickou. Enzymatické antioxidační obraně bude věnována následující kapitola. Obě skupiny antioxidační obrany jsou

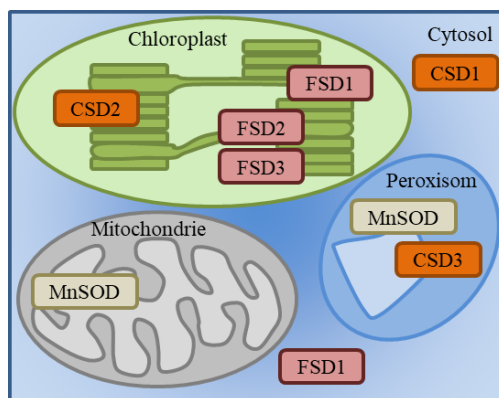
však provázané a platí, že inkubace s prekursory výrazně podporuje jejich syntézu, tedy zvyšuje antioxidační kapacitu (Izawa *et al.*, 1995; Apel *et Hirt*, 2004; Cohu *et al.*, 2009).

Mezi prvky neenzymatické antioxidační obrany patří látky jako glutathion (GSH), flavonoidy, alkaloidy, vitamín E nebo karotenoidy (Conklin *et al.*, 1996; Creissen *et al.*, 1999; Apel *et Hirt*, 2004). Významná je také kyselina askorbová (L-askorbová, askorbáty, vitamín C), která hraje roli v odklízení volných radikálů v rostlinných ale i živočišných buňkách (Conklin *et al.*, 1996; Kukavica *et al.*, 2009). Významnou roli hraje i vitamín D (de Jager *et al.*, 2017). Význam neenzymatické antioxidační obrany demonstrují studie provedené na transgenních rostlinách, které nadexprimují geny, jejichž produkty jsou zodpovědné za biosyntézu těchto antioxidantů (například antokyanů). Tyto studie popisují zvýšenou odolnost vůči abiotickému stresu (Xu *et al.*, 2017).

3.5.1 Enzymatická antioxidační obrana

Enzymatickou obranu tvoří enzymy, které jsou svou aktivitou zodpovědné za udržení homeostázy ve vztahu k oxidačnímu stresu. To se týká především limitování a determinace síly oxidačního stresu. Exprese genů kódující enzymy antioxidační obrany je ovlivněna přítomností fytohormonů, ale také dostupností živin, i když primárně jsou ovlivněny transkripčními faktory, které regulují jejich expresi. Jejich transkripce je zintenzivněna v podmínkách stresu (Van Breusegem *et al.*, 1999; Fath *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 2009). V rámci této kapitoly je kladen důraz na SOD, jelikož se jedná o proteiny, které jsou spjaty s tématem této práce. Další enzymy zapojené do antioxidační obrany jsou uvedeny v kapitole 3.4.1 Zástupci reaktivních kyslíkových radikálů.

SOD jsou metaloenzymy, které dismutují superoxidové radikály na peroxid vodíku a jejich klasifikace je založena na přítomnosti daného kofaktoru – Cu,ZnSOD (CSD), FeSOD (FSD) a MnSOD (Pilon *et al.*, 2011). Z lokalizace můžeme soudit na význam izoformy pro ochranu dané organely před oxidačním stresem. CSD se vyskytuje v cytosolu (CSD1), stromě (CSD2) a peroxisomech (CSD3); FSD je spojována s majoritním výskytem v chloroplastech (FSD1, FSD2, FSD3), ale i cytoplasmě (FSD1); a MnSOD je lokalizována v mitochondriích a peroxisomech (viz obrázek 3; Van Camp *et al.*, 1996; Kliebenstein *et al.*, 1998; Myouga *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2013). Konkrétním příkladem prezervace může být obranná funkce FSD pro chloroplasty, kde chrání fotosystém II před jeho degradací (Van Camp *et al.*, 1996). Lokalizace ovlivňuje zapojení odlišných izoform do odpovědi na specifický stimul (Kliebenstein *et al.*, 1998).



Obrázek 3: Lokalizace SOD izoform (Van Camp *et al.*, 1996; Kliebenstein *et al.*, 1998; Myouga *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2013). Podle Pilon *et al.* (2011).

Podle fylogenetických analýz se dá soudit na původ MnSOD a FSD v jednom ancestrálním genu. CSD sekvenční/strukturní podobnost nesdílí, což ukazuje na odlišný původ. Proběhlá diverzifikace je spjata především s dostupností kyslíku v průběhu vývoje atmosféry (Alscher *et al.*, 2002; Pilon *et al.*, 2011). Strukturní podobnost umožňuje využití Fe, nebo Mn jako kofaktoru enzymaticky aktivním proteinem. Majoritní rozdíl mezi těmito zmíněnými izoenzymy je především v subcelulární lokalizaci (Alscher *et al.*, 2002).

Transkripce genů pro CSD limituje přítomnost mědi, která je jejím kofaktorem. Bylo ukázáno, že nedostatek mědi potlačuje expresi CSD1/2 ve snaze o zachování funkčního PC (Yamasaki *et al.*, 2007; Cohu *et al.*, 2009). Takovéto jemné modulace je dosaženo díky popsaným transkripčním faktorům, jako jsou například SPL (viz kapitola 3.1.3.1 AtSPL7) nebo Cyanobacterial AbrB-like (CalA; Cohu *et al.*, 2007; Agervald *et al.*, 2010). Při porovnání exprese CSD můžeme pozorovat relativně vyšší expresi CSD3 než CSD1/2 (Xing *et al.*, 2013).

Transkripce nebo aktivita SOD může být ovlivněna také protein-proteinovými interakcemi (Van Camp *et al.* 1996). Zapojenými proteiny mohou být chaperonové proteiny, které se významně podílí na posttranslační aktivaci SOD – copper chaperone for SOD1 (CCS) aktivuje CSD1/2 v přítomnosti O₂, potažmo superoxidového radikálu, dodáním kofaktoru (iont mědi). To umožňuje rychlou odpověď na stimul díky aktivaci dostupných prekurzorů SOD (Brown *et al.*, 2004; Cohu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012). Exprese CCS je také ovlivněna miR398 (Cohu *et al.*, 2009).

Aktivita je regulována i u dalších SOD, jako je FSD1, kde je její aktivita ovlivněna interakcí s chloroplast chaperonin 20 (CNP20; Kuo *et al.*, 2013). V signální kaskádě MKK5-MPK3/6 jsou zahrnuty FSD2/3 v odpovědi na stres vyvolaný přítomností solí, jako například NaCl. To ukazuje na odpověď SOD na stres vyvolaný odlišnými způsoby a poukazuje na komplexnost jejich regulace (Xing *et al.*, 2015).

Pozorovány byly i různé posttranslační modifikace jako fosforylace, nitrace (spojena s produkcí RNS a oxidačním poškozením) a S-glutathionylace (modifikace cysteinových reziduí),

glykace nebo výše zmíněná inserce katalytického kovu do apoSOD (CCS). Tyto modifikace ovlivňují aktivitu těchto enzymů, případně mohou SOD inaktivovat (Yamakura *et* Kawasaki, 2010). Možné jsou i interakce mezi SOD, jako například FSD, které mohou tvořit dimery, nebo tetramery (Alscher *et al.*, 2002; Myouga *et al.*, 2008).

CAT rozkládá peroxid vodíku na molekulu vody a kyslíku (Mhamdi *et al.*, 2010). Metabolizace H₂O₂ je také umožněna přítomností askorbát peroxidasy (APX) nebo glutathion peroxidasy (GPX; Apel *et* Hirt, 2004; Asada, 2006).

Zvýšená exprese CAT je spjata s nastalým abiotickým/biotickým stresem (Tsugane *et al.*, 1999; Apel *et* Hirt, 2004) a hraje tak roli například při prezervaci buněčné stěny před aktivitou peroxidu vodíku (Fry, 1998). ABA-indukovaná exprese CAT (CAT1) je ovlivněna dráhou zahrnující AtMKK1 a AtMPK6 (Xing *et al.*, 2008). Přítomnost superoxidových aniontů inhibuje funkci katalasy, což nastiňuje synergický vztah mezi CAT a SOD (Kono *et* Fridovich; 1982; CoHu *et al.*, 2009).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- *Arabidopsis thaliana*: ekotyp Columbia (Col-0), mutantní linie obsahující T-DNA inzerci v genech *SPL1* (AT2G47070; SALK_134584 a SALK_058642) a *SPL7* (AT5G18830; SALK_093849). Semena byla získána z Nottingham Arabidopsis Stock Center (Nottingham, Velká Británie).
- cDNA *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0), ze 14denních rostlin (velkoryse poskytnuto Mgr. Petrem Dvořákem)
- *Escherichia coli*, One Shot TOP10 (Chemically Competent; Invitrogen; C404010)
- Vektor pGADT7 AD (Clontech Laboratories; 630442)
- Vektor pGBKT7 (Clontech Laboratories; 630443)
- Vektor pGEM-T Easy-cDNA_ *SPL7* (Dvořák *et* Zeiner, nepublikováno)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Chemikálie

- 1-bromo-3-chloropropan (BCP; Sigma Aldrich; B9673).
- Agarosa (Sigma Aldrich; A2576)
- Alkalická fosfatasa (Thermo Scientific; EF0654)
- Ampicilin (Ampicillin sodium; Duchefa Biochemie; A0104.0025)
- Pufr O, 10X (Thermo Scientific; BO5)
- Pufr R, 10X (Thermo Scientific; BR5)
- CutSmart Pufr, 10X (New England Biolabs; B7204S)
- Deoxyribonukleotidy (dNTPs; 10 mmol·dm⁻³)
- D-glukosa (Sigma Aldrich; G8270)
- DNA Gel Loading Dye, 6X (Thermo Scientific; R0611)
- DNasa I (Invitrogen; 18047019)
- DreamTaq DNA polymerasa (Thermo Scientific; EP0701)
- DreamTaq pufr, 10X (Thermo Scientific; EP0701)
- EDTA (Sigma Aldrich; E5134)

- Ethanol p.a., 99,8% (v/v)
- Gellan Gum (Alfa Aesar; Y28C036)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific; SM1331)
- Glycerol (Sigma Aldrich; G5516)
- *Hind*III (Thermo Scientific; ER0501)
- Hydroxid draselný (Sigma Aldrich; 221473)
- Hydroxid sodný (Sigma Aldrich; S8045)
- Chlorid draselný (Sigma Aldrich; 60130)
- Chlorid hořečnatý (Sigma Aldrich; M8266)
- Chlorid sodný (Sigma Aldrich; S6191)
- Isopropanol (Sigma Aldrich; 278475)
- Kanamycin (Kanamycin monosulfate; Duchefa Biochemie; K0126.0025)
- Kvasniční extrakt (Sigma Aldrich; Y1625)
- LB Broth (Miller; Sigma Aldrich; L3522)
- LB Broth s agarem (Miller; Sigma Aldrich; L3147)
- MES (Duchefa Biochemie; M1503)
- Midori Green Advance DNA/RNA stain (Nippon Genetics; MG04)
- Murashige and Skoog médium (Duchefa Biochemie; M0221.0050)
- *Nde*I (New England Biolabs; R0111L)
- *Nde*I (Thermo Scientific; ER0581)
- Oligo(dT)18 primer, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
- Primer, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (sekvence specifikovány v kapitole 4.5 Metodika)
- Reakční pufr s MgCl_2 pro DNasu I, 10X (Thermo Scientific; B43)
- RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega; N2111)
- Sacharosa (Sigma Aldrich; S8501)
- *Sal*I (Thermo Scientific; ER0641)
- Savo, 50% (v/v)
- T4 DNA ligasa, LC (Thermo Scientific; EL0016)
- T4 DNA Ligase pufr, 10X (Thermo Scientific; B69)
- TAE, 1X
- TRIzol Reagent (Invitrogen; 15596026)
- Trypton (Sigma Aldrich; T9410)
- UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda (Invitrogen; 10977015)
- *Xho*I (New England Biolabs; R0146L)

4.2.2 Soupravy

- iProof High-Fidelity PCR Kit (Bio-Rad; 1725330)
- M-MLV reverzní transkriptasa (Invitrogen; M1705)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL; 740609.250)
- Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific; F130WH)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; 27106)

4.2.3 Roztoky a jejich příprava

½ MS medium (1 liter):

Sacharosa	10 g
MES	1 g
Murashige and Skoog médium	2,15 g
Gellan Gum	10 g
Deionizovaná voda (milliQ)	doplnit do objemu 1 liter
pH 5,8 (hydroxid draselný)	
Sterilizace autoklávováním	

1% (w/v) agarosový gel pro horizontální elektroforézu (100 ml):

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

Ampicilin, 50 mg·ml⁻¹

Ampicilin	50 mg
Deionizovaná voda (milliQ)	1 ml
Sterilizace přefiltrováním	

Kanamycin, 50 mg·ml⁻¹

Kanamycin	50 mg
Deionizovaná voda (milliQ)	1 ml
Sterilizace přefiltrováním	

SOC médium (1 litr):

Kvasniční extrakt	5 g
Trypton	20 g
Chlorid sodný	0,584 g
Chlorid draselný	0,186 g
pH 7,5 (hydroxid sodný)	
Sterilizace autoklávováním	
D-glukosa	3,6 g
Chlorid hořečnatý	0,952 g
Sterilizace přefiltrováním	

Tekuté LB médium (1 litr):

LB Broth (Miller)	25 g
Deionizovaná voda (milliQ)	1 l
pH 7,2 (hydroxid sodný)	
Sterilizace autoklávováním	

Tuhé LB médium

LB Broth s agarem (Miller)	40 g
Deionizovaná voda (milliQ)	1 l
Sterilizace autoklávováním	

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- ES-20, Orbital Shaker-Incubator (Biosan; Litva)
- Gel Doc EZ Imager (BioRad; USA)
- Laminární box
- Simplicity Water Purification System (Merk, Německo)
- PCR cykler T100 Thermal Cyclor (BioRad; USA)
- ScanSpeed 1730R (LaboGene; Dánsko)
- NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- ThermoStat C (Eppendorf; Německo)
- UV vizualizátor

4.4 Seznam použitých programů a databází

- ApE (A plasmid editor, 8.5.2.0)
- Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>)
- ARAMEMNON (<http://aramemnon.uni-koeln.de/>)
- ATTED-II (http://atted.jp/top_search.shtml#CoExSearch)
- Blast2GO (BioBam Bioinformatics; Spain)
- eFP browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)
- Group-based Prediction System 3.0 (GPS 3.0)
- Image Lab (BioRad; USA)
- PhosPhAt 3.0 (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/>)
- T-DNA Primer Design Tool (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)
- Simple Modular Architecture Research Tool (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de/>)
- The Eukaryotic Linear Motif (ELM; <http://elm.eu.org/>)

4.5 Metodika

4.5.1 Bioinformatická charakterizace AtSPL

Pokud není uvedeno jinak, byla daná analýza za pomoci daného softwaru provedena s přednastavenými (default) parametry. Sekvence analyzovaných proteinů byly získány z databáze TAIR (data získána 2. 11. 2017; Berardini *et al.*, 2015).

Pro práci se sekvencemi byl použit program ApE.

4.5.1.1 Bioinformatická analýza expresních profilů

Analýza koexprese s cílovými proteiny byla provedena pomocí ATTED-II (data získána 18. 11. 2017; Obayashi *et al.*, 2018). Analýza exprese AtSPL v kořenech byla provedena pomocí databáze eFP browser (data získána 26. 11. 2017; Root; Toufighi *et al.*, 2005).

4.5.1.2 Identifikace fosforylačních míst spojená s analýzou přítomnosti lineárních motivů

Predikce fosforylačních míst byla provedena pomocí PhosPhAt 3.0 (data získána 25. 10. 2017; Zulawski *et al.*, 2013) a GPS 3.0 (Xue *et al.*, 2005).

Pro kvalitativní analýzu lineárních motivů AtSPL, respektive MAPK specifických dokovacích sekvencí, byla použita databáze ELM (data získána 12. 11. 2017; Dinkel *et al.*, 2016).

4.5.1.3 Identifikace přítomných domén

Identifikace domén v aminokyselinové sekvenci SPL byla provedena pomocí databáze SMART (data získána 12. 2. 2018; Letunic *et Bork*, 2018).

4.5.1.4 Komplexní analýza AtSPL

Komplexní analýza (se zaměřením na identifikaci proteinových domén a lokalizaci) byla provedena za pomoci Blast2GO (data získána 14. 2. 2018; Götz *et al.*, 2008) a databáze ARAMEMNON (data získána 12. 11. 2017; Schwacke *et al.*, 2003).

4.5.2 Povrchová sterilizace semen a jejich uchování

Semena *A. thaliana* byla sterilizována v laminárním boxu v 1 ml 70% (v/v) ethanolu po dobu 5 minut v 1,5ml mikrozkuhavce. Obsah mikrozkuhavky byl promícháván kývavými pohyby. Po uplynutí 5 minut a sedimentaci semen byl 70% (v/v) ethanol odstraněn a nahrazen 96% (v/v) ethanolem (1 ml). Opět byl obsah mikrozkuhavky kývavými pohyby promícháván, po uplynutí 1 minuty byl 96% (v/v) ethanol odpipetován. Následovalo promývání semen sterilní deionizovanou vodou (5 promytí). Semena byla v laminárním boxu rozprostřena pomocí mikropipety na filtrační papír v Petriho misce. Suchá semena byla uchována v lednici při 4 °C.

4.5.3 Výsev sterilních semen

Sterilní semena byla pomocí párátko přenesena v laminárním boxu z filtračního papíru na pevné ½MS médium v Petriho miskách. Následně byla semena přes noc stratifikována ve tmě při 4 °C. Takto připravené misky se semeny byly přemístěny do kultivační místnosti, kde byla kultivována (22 °C, vertikální poloha, denní režim: 16 hodin světlo, 8 hodin tma).

4.5.4 Alelově specifická PCR (genotypování)

Po 14 dnech kultivace *in vitro* byly misky s rostlinami přemístěny do laminárního boxu a z rostlin byly pomocí sterilní pinzety a nůžek odebrány fragmenty listů o ploše přibližně 2 mm². Nástroje byly ošetřeny 70% (v/v) ethanolem. Alternativně byl biologický materiál odebrán, opět s pomocí 70% (v/v) ethanolem ošetřených nástrojů (mezi odběry jednotlivých vzorků), *ex vitro* z rostlin pěstovaných v květináčích se substrátem.

Odřatá část listu byla bezprostředně přemístěna do mikrozkušavky, která obsahovala 30 µl extrakčního pufru (Dilution Buffer; Phire Plant Direct PCR Kit). List byl mechanicky rozdrcen pomocí 100µl špičky. Mikrozkušavka obsahující homogenát byla uložena 30 minut v ledové tříšti. Takto připravený vzorek DNA byl použit pro následnou alelově specifickou PCR.

Reakce alelově specifické PCR byla připravena podle tabulky 1, použité primery jsou uvedeny v tabulce 2. Teplotní program je uveden v tabulce 3. Primery byly navrženy za pomoci programu T-DNA Primer Design Tool. LB (Left T-DNA Border) primer je shodný pro všechny linie. Označení LP (Left genomic) a RP (Right genomic) primeru se shoduje s označením linie, pro kterou byl primer použit.

Tabulka 1: Reakční směs pro alelově specifickou PCR. PCR byla provedena za použití Phire Plant Direct PCR Kitu.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [µl]
Phire Plant Tissue PCR pufr, 2X	1X	5,0
Phire Hot Start II DNA polymerasa		0,2
Primer, 10 µmol·dm⁻³	FW	0,5 µmol·dm ⁻³
	REV	0,5 µmol·dm ⁻³
Deionizovaná voda (milliQ)		3,5
DNA templát		0,3
	Celkový objem	10

Tabulka 2: Sekvence použitých primerů pro alelově specifickou PCR. LP – Left genomic Primer; RP – Right genomic Primer; LB – Left T-DNA Border primer.

Primer		Sekvence (5' → 3')
Typ	Název	
LB	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
LP	SALK_134584-LP	AAAGCCCAGACCATAATGACC
RP	SALK_134584-RP	GGAAAACTGACGTCCCCTAG
LP	SALK_058642-LP	CTGATGAACAACATGTGACCG
RP	SALK_058642-RP	TCTGGATCTCTTAGCCTGCTG
LP	SALK_093849-LP	TTGGAAATTCAAGCTGATTTCG
RP	SALK_093849-RP	TCCACCTGTCAAACCAAGAC

Tabulka 3: Teplotní program cycleru pro alelově specifickou PCR.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Čas	Cyklů
Počáteční denaturace	98	5 min	1
Denaturace	98	5 s	
Annealing	63	5 s	35
Extenze	72	23 s	
Finální extenze	72	1 min	1

Po dokončení PCR byla pro separaci amplifikovaných fragmentů použita horizontální elektroforetická separace v 1% (w/v) agarosovém gelu.

Podle přítomnosti amplifikovaných fragmentů je umožněno odlišení jednotlivých genotypů na základě kombinace použitých primerů označených LP, RP a LB primer. Schématické vyhodnocení je ukázáno v tabulce 4. Sekvence jednotlivých primerů odlišných SALK linií se liší, jejich obecné značení je však zachováno.

Předpokládána velikost fragmentů pro primery LP+RP: (i) 1093 bp (SALK_134584); (ii) 1067 bp (SALK_058642), a (iii) 1188 bp (SALK_093849). Velikost produktů LB+RP není uvedena z důvodu nejisté polohy inserce.

Tabulka 4: Schématické zobrazení vyhodnocení PCR při selekci T-DNA mutantních linií selektovaných pomocí alelově specifické PCR. Kombinace/přítomnost PCR produktu určuje genotyp jedince (v rámci zkoumaného genu). LP – Left genomic Primer; RP – Right genomic Primer; LB – Left T-DNA Border primer; X – přítomnost PCR produktu při amplifikaci za využití dané kombinace primerů. Col-0 – divý typ.

Genotyp	Kombinace primerů	
	LP+RP	LB+RP
T-DNA homozygotní		X
Heterozygotní	X	X
Col-0	X	

4.5.5 Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu

Pokud není uvedeno jinak, elektroforetická separace proběhla za shodných podmínek. Pro separaci byl využit 1% (w/v) agarosový gel. Jako marker relativní molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (3 µl).

Pipetovaný objem vzorků byl smíchán s adekvátním množstvím DNA Gel Loading Dye, 6X. U alelově specifické PCR bylo tedy smícháno 10 µl PCR produktu s 2 µl DNA Gel Loading Dye, 6X.

Elektroforetická separace probíhala 30 minut, 100 V.

Vizualizace byla provedena pomocí dokumentační jednotky.

4.5.6 Reverzní transkripce spojená s polymerasovou řetězovou reakcí (RT-PCR)

4.5.6.1 Izolace celkové RNA

Kořen/prýt z deseti 14denních rostlin byl homogenizován v třecí misce za pomoci tloučku a tekutého dusíku. Třecí miska, tlouček, ale i pracovní plocha byly před použitím ošetřeny 70% (v/v) ethanolem a 50% (v/v) roztokem Sava pro zabránění nežádoucí kontaminace/degradace izolátu.

Homogenát byl kvantitativně převeden do 1,5ml mikrozkušavek a převrstven 800 µl TRIzol Reagentu. Obsah mikrozkušavky byl pečlivě promíchán a inkubován 5 minut v ledové tříšti. Po uplynutí doby inkubace byla provedena centrifugace (14000 g, 10 minut, 4 °C).

Supernatant byl přenesen do nové 1,5ml mikrozkušavky, kde proběhlo jeho smíchání s 80 μ l BCP. Po energickém promíchání (vířivá třepačka) následovala inkubace (10 minut, ledová tříšť).

Pro získání vodné fáze byla směs centrifugována (14000 g, 10 minut, 4 °C) a následně byla zmíněná vodná fáze přenesena do nové 1,5ml mikrozkušavky. K vodné fázi byl přidán 100% isopropanol v poměru 1:0,7 (vodná fáze:isopropanol) a celý objem byl promíchán za pomoci pipety (specifické pipetované objemy jsou uvedeny v tabulce 5).

Tabulka 5: Množství odebrané vodné fáze při izolaci RNA pomocí TRIzol Reagent a objem přidaného isopropanolu.

Vzorek	Objem vodného roztoku [μ l]	Objem přidaného isopropanolu [μ l]
1R	355	248,5
1S	290	203
3R	320	224
3S	315	220,5
5R	310	217
5S	295	206,5

Byla provedena inkubace (5 minut, ledová tříšť). Po následné centrifugaci (14000 g, 10 minut, 4 °C) byl supernatant odpipetován a získaný pelet převrstven 1 ml 75% (v/v) ethanolu. Poklepem na mikrozkušavku bylo docíleno oddělení peletu od mikrozkušavky. Takto připravený vzorek byl inkubován 1 hodinu v ledové tříšti.

Po uplynutí inkubace byl vzorek centrifugován (10 minut, 7500 g, 4 °C), supernatant byl odebrán a zbylý pelet vysušen (digestoř, 2 hodiny, ledová tříšť). Vysušený pelet byl rozsuspendován v 30 μ l destilované vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNAs (UltraPure DNase/RNase-Free destilovaná voda). Takto připravené vzorky byly inkubovány 30 minut v ledové tříšti a zamraženy (-80 °C).

4.5.6.2 Odstranění nežádoucí zbytkové DNA

Koncentrace výše připravených vzorků byla upravena na 200 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (destilovaná voda s deklarovanou nulovou aktivitou RNAs). Odstranění nežádoucí DNA bylo provedeno pomocí DNasy I (40 minut, 37 °C; viz tabulka 6).

Tabulka 6: Reakce pro odstranění nežádoucí zbytkové DNA pomocí DNasy I v procesu izolace celkové RNA pro RT-PCR.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [μl]
Reakční pufr s MgCl ₂ pro DNasu I, 10X	1X	2
DNasa I, 1U·μl ⁻¹	2U	2
Izolát, 200 ng·μl ⁻¹	2000 ng	10
Deionizovaná voda (milliQ)		6
Celkový objem		20

Po inkubaci byly ke vzorkům přidány 2 μl 50mmol·dm⁻³ roztoku EDTA. Následovala inkubace (10 minut, 70 °C). Takto připravené vzorky byly zamrazeny (-80 °C).

4.5.6.3 Reverzní transkripce

Přepis do komplementární DNA (cDNA) byl proveden podle tabulky 7. Do 0,2ml mikrozkušavky byla napipetována reakce 1 a obsah mikrozkušavky byl inkubován v termocycleru (10 minut, 70 °C, 75 °C teplota víka). Po uplynutí inkubační doby byla mikrozkušavka přemístěna do ledové tříště a k reakci 1 byla připipetována reakce 2. Následná syntéza cDNA byla provedena za daných podmínek (3 hodiny, 42 °C, 45 °C víko) v již dříve použitém termocycleru.

Tabulka 7: Reakce 1 a 2 pro přepis RNA do cDNA při procesu RT-PCR.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [μl]
Reakce 1 (10 μl)	Oligo(dT)18 primer, 10 μmol·dm⁻³	0,5
	Izolát RNA	25 ng·μl ⁻¹
	Deionizovaná voda (milliQ)	4,5
Reakce 2 (10 μl)	First Strand Pufr, 5X	1X
	RNasin Ribonuclease inhibitor	0,4
	M-MLV reverzní transkriptasa	0,4
	dNTPs, 10 mmol·dm⁻³	0,5 mmol·dm ⁻³
	Deionizovaná voda (milliQ)	4,2
Celkový objem		20

Pro inaktivaci reverzní transkriptasy byl získaný transkript inkubován v dříve použitém termocycleru (10 minut, 70 °C, 75 °C víko).

Finální transkript (20 µl) byl naředěn 60 µl destilované vody s deklarovanou nulovou aktivitou RNas.

4.5.6.4 PCR amplifikace cDNA templátu

Po provedení reverzní transkripce byla provedena PCR, nejdříve kontrolní PCR pro elongační faktor 1 α (*EF1 α*) a následně pro zjištění přítomnosti transkriptu *SPL1* (pro obě linie). Reakce byly provedeny podle tabulky 8, při nastavených parametrech termocycleru, které jsou uvedeny v tabulce 9. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 10. Primery byly navrženy, aby splňovaly podmínku exon-exon junction, tato podmínka je splněna u reverse primerů.

Amplifikované fragmenty byly vyhodnoceny (viz 4.5.5 Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu).

Očekávaná velikost fragmentů pro primery: (i) SQ1-RT-Fwd-1/SQ1-RT-Rev-1 – 612 bp; (ii) SQ1-RT-Fwd-2/SQ1-RT-Rev-2 – 672 bp; (iii) SQ1-RT-Fwd-4/SQ1-RT-Rev-4 – 1281 bp; (iv) SQ1-RT-Fwd-5/SQ1-RT-Rev-5 – 1279 bp; (v) SQ1-RT-Fwd-1/ SQ1-RT-Rev-4 – 2367 bp; a (iv) SQ1-RT-Fwd-2/ SQ1-RT-Rev-4 – 2440 bp. Pro *EF1 α _F/EF1 α _R* – 836 bp.

Tabulka 8: Reakce PCR při amplifikaci cDNA templátu v rámci provedení RT-PCR.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [µl]
DreamTaq pufr, 10X	1	1,50
Deionizovaná voda (milliQ)		8,45
Primer, 10 µmol·dm⁻³	FW	0,5 µmol·dm ⁻³
	REV	0,5 µmol·dm ⁻³
dNTPs, 10 mmol·dm⁻³	200 µmol·dm ⁻³	0,30
DreamTaq DNA polymerasa		0,25
cDNA templát		3,00
	Celkový objem	15

Tabulka 9: Teplotní program termocycleru při PCR amplifikaci cDNA templátu pro zjištění presence transkriptu *EF1 α* a *SPL1*.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Čas	Cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	1
Denaturace	95	30 s	
Annealing	Pro <i>SPL1</i>	51	30 s
	Pro <i>EF1α</i>	58	
Extenze	72	1 min	
Finální extenze	72	15 min	1

Tabulka 10: Primery použité při PCR amplifikaci fragmentů cDNA v metodě RT-PCR. FW – forward primer; REV – reverse primer.

Primer		Sekvence (5' → 3')
Typ	Název	
FW	EF1 α _F	GATGCCACCACCCCAAATA
REV	EF1 α _R	TTGGGTCCTTCTTGCCACG
FW	SQ1-RT-Fwd-1	GGCATCTGTGTTGGCTTACA
REV	SQ1-RT-Rev-1	ACTCCTGAAGAAGATGGAACCTAC
FW	SQ1-RT-Fwd-2	GTCTCTGTTGCGTTCAAGAGC
REV	SQ1-RT-Rev-2	ATGGAACCTACTACATTGCTGACA
FW	SQ1-RT-Fwd-4	CGAATCCAGCGACCAGTTCT
REV	SQ1-RT-Rev-4	CAATCCCCACCATTGCAGGA
FW	SQ1-RT-Fwd-5	ACGAATCCAGCGACCAGTTC
REV	SQ1-RT-Rev-5	TCCCCACCATTGCAGGATCT

4.5.7 Subklonování cDNA *SPL7* do plazmidů pGADT7 AD a pGBDT7

4.5.7.1 Amplifikace cDNA *SPL7*

Dříve klonovaná cDNA genu *SPL7* (Dvořák *et* Zeiner, nepublikováno) byla amplifikována pomocí M13 primerů z pGEM-T Easy-cDNA_*SPL7*. PCR proběhla za podmínek uvedených v tabulce 11 a 12.

Tabulka 11: Reakce PCR pro amplifikaci cDNA *SPL7* pomocí M13 primerů pro subklonování do daných vektorů.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [μl]
iProof HF pufr, 5X	1	5,0
dNTPs, 10 mmol·dm⁻³	200 μmol·dm ⁻³	1,0
Primer, 10 μmol·dm⁻³	FW	0,5 μmol·dm ⁻³
	REV	0,5 μmol·dm ⁻³
iProof High Fidelity DNA polymerasa	1U	0,5
Deionizovaná voda (milliQ)		x
cDNA templát		y
Celkový objem		50

Tabulka 12: Teplotní program PCR cyklu při amplifikaci cDNA *SPL7* z rodičovského vektoru.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Čas	Cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	5 s	35
Annealing	60	10 s	
Extenze	72	70 s	
Finální extenze	72	10 min	1

Sekvence použitých M13 primerů je uvedena v tabulce 13.

Tabulka 13: Sekvence použitých M13 primerů při amplifikaci cDNA *SPL7* pro následné subklonování. FW – forward primer; REV – reverse primer.

Primer		Sekvence (5' → 3')
Typ	Název	
REV	M13_REV	CAGGAAACAGCTATGACC
FW	M13_FWD	TGTAACACGACGGCCAGT

Amplifikované fragmenty byly separovány a vizualizovány (viz 4.5.5 Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu).

Za pomoci UV vizualizátoru byly fragmenty vizualizovány a patřičně vyřezány skalpelem pro izolaci DNA pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (DNA extraction from agarose gels).

4.5.7.2 Izolace amplifikované DNA

Izolace amplifikované DNA byla provedena podle návodu poskytnutého výrobcem s drobnými změnami (viz níže).

K vyřezanému gelu (2ml mikrozkušavka) byl přidán NTI pufr v poměru 200 μ l NTI pufru na 100 mg gelu. Mikrozkušavka byla následně vložena do termobloku (5–10 minut, respektive do rozpuštění gelu; 50 °C). Obsah mikrozkušavky byl důkladně promíchán.

700 μ l roztoku bylo přepipetováno na kolonu umístěnou v přiložené sběrné zkumavce a následně centrifugováno (30 sekund, 11000 g). Eluát byl opět nanesen na kolonu a centrifugován (stejně parametry). Totéž bylo provedeno ještě jednou.

Stejný postup byl proveden i pro případný zbytek směsi rozpuštěného gelu a NTI pufru.

Na kolonu bylo napipetováno 700 μ l NT3 pufru. Centrifugace opět proběhla za výše uvedených podmínek. Membrána kolony byla vysušena centrifugací (1 minuta, 11000 g).

Eluce DNA byla provedena 30 μ l deionizované vody (milliQ). Po 1 minutě inkubace membrány s nanesenou deionizovanou vodou byla kolona umístěna do čisté 1,5ml mikrozkušavky a obsah centrifugován (1 minuta, 11000 g). Po centrifugaci byl eluát znovu nanesen na kolonu a centrifugován. Toto bylo provedeno ještě jednou.

Výše uvedené znovu nanášení eluátu bylo zařazeno do postupu pro maximalizaci výtěžku DNA.

Izolovaná DNA byla uchována při -20 °C.

4.5.7.3 Enzymatické štěpení pomocí dvou endonukleas

Štěpení izolované DNA a cílového vektoru pro získání lepivých konců bylo dosaženo pomocí dvou restričních endonukleas (double digest; viz tabulka 14 a 15). Štěpení probíhalo v termostatu (37 °C) přes noc. Odlišné enzymy byly použity kvůli odlišným specifikům daných vektorů. Enzymy rozdílných výrobců byly použity z důvodu výhodnějších parametrů reakce (štěpení).

Po uplynutí doby stanovené pro enzymatickou reakci byla k vektorům přidána alkalická fosfatasa (1 μ l). Následovala inkubace (1 hodina, 37 °C). Restrikcí vzniklé fragmenty byly izolovány pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu (PCR clean-up). K získanému vzorku byla přidána deionizovaná voda (milliQ) pro dosažení finálního objemu 50 μ l (minimální objem vzorku při použití soupravy). Takto připravené vzorky byly smíchány s NTI pufrům v poměru 1:2, bylo tedy přidáno 100 μ l NTI pufru.

Tabulka 14: Reakční směs pro štěpení izolované DNA a cílového vektoru pomocí dvou zvolených enzymů. ¹ – použitý pufr pro enzym *Nde*I a *Xho*I; ² – pufr použitý pro kombinaci enzymů *Nde*I a *Sal*I.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [μl]
<i>Nde</i> I		1
<i>Sal</i> I, nebo <i>Xho</i> I		1
CutSmart pufr, 10X ¹ , nebo Pufr O, 10X ²	1X	2
DNA	500–1000 ng	x
Deionizovaná voda (milliQ)		y
Celkový objem		20

Tabulka 15: Použitá restriční směs pro štěpení substrátu za použití dvou odlišných endonukleas. Uvedena koncentrace použitého inzertu a plasmidu.

	Pro vektor			
	pGBDT7	pGADT7 AD		
Enzym	1	<i>Nde</i> I		
	2	<i>Sal</i> I		
Pufr	Pufr O, 10X	CutSmart pufr, 10X		
DNA	Templát	Plasmid		
	V [μl]	17	5	
	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]	157,6	413,3	
		131,9	415,5	
Deionizovaná voda (milliQ) [μl]	0	12	0	12

Následoval postup izolace shodný s výše uvedeným (viz 4.5.7.2 Izolace amplifikované DNA).

4.5.7.4 Ligace fragmentů DNA

Ligace pomocí T4 DNA ligasy byla provedena přes noc (4 °C) podle tabulky 16.

Tabulka 16: Reakční směs pro ligaci (T4 DNA ligasa) lepivých konců enzymaticky připravených produktů štěpení pomocí dvou zvolených endonuklas. ¹ – V poměru 1:1 a 5:1 k linearizovanému vektoru.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [μl]
Linearizovaný vektor	20-100 ng	x
Insert DNA ¹		y
T4 DNA Ligasa	1U	1
T4 DNA Ligase pufr	1X	2
Deionizovaná voda (milliQ)		z
	Celkový objem	20

Pro výpočet adekvátního množství DNA ku linearizovanému vektoru byla použita rovnice:

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

4.5.7.5 Transformace

Kompetentní buňky *Escherichia coli*, One Shot TOP10 byly transformovány teplotním šokem.

K 50 μl požadovaných buněk *Escherichia coli*, One Shot TOP10 v 1,5ml mikrozkušavce bylo přidáno 6 μl daného plasmidu potenciálně nesoucího cDNA *SPL7*.

Směs byla inkubována 30 minut v ledové tříšti a následně umístěna na 60 sekund do termobloku (42 °C). Po uplynutí 60 sekund byla mikrozkušavka přemístěna do ledové tříště. Po 2–3 minutách inkubace v ledové tříšti bylo k buněčné suspenzi přidáno 300 μl SOC média. Následovala inkubace (1 hodina, 37 °C).

4.5.7.6 Kultivace bakteriálních kultur

Pevné LB médium bylo pomocí mikrovlnné trouby rozežráto. Po snížení teploty, na adekvátní hodnotu, byla do média přidána antibiotika. Výsledná koncentrace antibiotika v médiu

byla $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Antibiotikum bylo voleno podle rezistence specifického vektoru: pGADT7 AD (*Amp*) – ampicilin; pGBKT7 (*Kan*) – kanamycin.

Bakteriální suspenze byla sterilní hokejkou v laminárním boxu rozetřena na připravené Petriho misky ve dvou rozdílných množstvích: $100 \mu\text{l}$ a $200 \mu\text{l}$ bakteriální suspenze na Petriho misku.

Bakterie byly kultivovány přes noc ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). Petriho misky s koloniemi/bakteriemi byly následně uloženy do lednice ($4 \text{ }^\circ\text{C}$; dlouhodobé uchování).

Narostlé kolonie (bakterie potenciálně nesoucí požadovaný inzert) byly přeneseny sterilním párátkem do tekutého LB media. Následovala kultivace (přes noc, $37 \text{ }^\circ\text{C}$; $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ antibiotika). Bakteriální suspenze byla použita pro izolaci plasmidové DNA a případné alikvotování pozitivních bakterií – dlouhodobé uchování v 25% (v/v) glycerolu při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.7.7 Izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA bylo dosaženo pomocí soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit.

5 ml kultivované (přes noc) bakteriální kultury bylo centrifugováno (postupně v 2ml mikrozkuřavce; 8000 g, laboratorní teplota). Pelet byl rozsuspendován ve $250 \mu\text{l}$ P1 pufru pomocí vířivé třepačky. K bakteriální suspenzi bylo přidáno $250 \mu\text{l}$ P2 pufru a celý obsah mikrozkuřavky byl promíchán 4–6 otočeními mikrozkuřavky. Lýze buněk nepřekročila 5 minut, byla ukončena přidáním $350 \mu\text{l}$ N3 pufru.

Připravená suspenze byla centrifugována (20 minut, 18000 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) a supernatant byl kvantitativně převeden na QIAprep kolonu. Kolona (její obsah) umístěná ve sběrné mikrozkuřavce byla centrifugována (1 minuta, 18000 g). Eluát byl dvakrát nanesen na kolonu a centrifugován za stejných podmínek.

Kolona byla promyta $750 \mu\text{l}$ PE pufru a membrána následně vysušena centrifugací (1 minuta, 18000 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$).

Eluce navázané DNA proběhla stejným způsobem jako dříve.

4.5.7.8 Restrikce a vizualizace plasmidové DNA pro ověření úspěšného klonování

Pro ověření úspěšnosti klonování byl využit enzym *HindIII*. Restrikce izolované plasmidové DNA byla provedena za níže uvedených podmínek (viz tabulka 17; 1 hodina, $37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tabulka 17: Parametry enzymatické reakce při využití enzymu *HindIII* pro štěpení izolované plasmidové DNA při ověření úspěšnosti klonování cDNA *SPL7*.

	Výsledná koncentrace	V 1 reakce [μ l]
<i>Hind III</i>		1
Puf ^r R, 10X	1X	2
DNA	200–500 ng	x
Deionizovaná voda (milliQ)		y
	Celkový objem	20

10 μ l výsledné směsi fragmentů DNA bylo separováno (viz 4.5.5 Horizontální elektroforetická separace v agarosovém gelu). Očekávaná velikost fragmentů vzniklých štěpením *HindIII*: (i) 7187 a 3201 bp (pGADT7 AD-cDNA_*SPL7*); a (ii) 4937, 3297 a 1498 bp (pGBKT7-cDNA_*SPL7*). Velikost fragmentů po restrikci vektorů: (i) 7187 a 800 bp (pGADT7 AD); a (ii) 4937, 1498 a 868 bp (pGBDT7).

5 Výsledky

5.1 Bioinformatická charakterizace AtSPL

Cílem bioinformatické analýzy byla predikce izoforem SPL, které mají největší předpoklady pro interakci s MAPK a fosforylaci pomocí MAPK. Dalším cílem bylo odhalení SPL, které mají největší předpoklad pro regulaci transkripce *FSD1*.

5.1.1 Bioinformatická analýza koexprimovaných genů

Pomocí ATTED-II jsme hledali možné koexprimované geny s *MPK3/6* a *FSD1*. Jako významné byly považovány geny kódující proteiny se spojitostí s oxidačním stresem, především geny pro transkripční faktory, které by mohly mít případnou souvislost s regulací *FSD1*. Za významné jsme považovali takové, které se umístily na prvních dvaceti místech CoexSearch seznamu (výsledky uvedeny v příloze 1). Za významný výsledek zde považujeme zjištění koexprimovaného genu *SPL1* při *MPK3* a *FSD1*, což by mohlo ukazovat na jistou souvislost s těmito proteiny.

Získané proteiny (výsledek analýzy koexprese *MPK3* a *FSD1*) jsme zpracovali pomocí GPS 3.0. Seřazením podle přiřazeného skóre jsme získali informace o možné fosforylaci pomocí MAPK. I zde se v rámci prvních 20 pozic objevila *SPL1* (viz příloha 2). Získali jsme tedy informace o možném vztahu *SPL1*, pravděpodobně i blízké *SPL12* (koexprimována, nepublikováno), oxidačním stresem a *MPK3*.

Další analýzy se nezaměřovaly však jen na *SPL1*, ale celkově na SPL proteiny.

5.1.2 Predikce fosforylace

Cílem bioinformatické analýzy pomocí PhosPhAt 3.0 bylo zjistit, zda všechny SPL proteiny splňují kritéria pro fosforylaci MAPK. Všechny SPL obsahují v aminokyselinové sekvenci fosforylační místa, přičemž 3 fosfopeptidy byly i experimentálně potvrzeny. Fosforylace *AtSPL8* a *AtSPL9* byla uvedena jako experimentálně pozorovaná za podmínek ionizujícího záření a *AtSPL14* v prostředí se zvýšenou koncentrací xylasy (Zulawski *et al.*, 2013; viz příloha 3).

Druhým kritériem pro možnou fosforylaci pomocí MAPK je přítomnost MAPK specifického fosforylačního místa anotovaná GPS 3.0. Software přiřadil ke každému fosforylačnímu místu skóre, které určí pravděpodobnost fosforylace danou kinasou.

Na základě dat získaných z obou zmíněných programů jsme vyřadili AtSPL3/4/5/6/16 mimo oblast primárního zájmu, jelikož nesplňovaly námi určený parametr – prokázat pomocí *in silico* analýzy, pomocí obou programů, možnost být substrátem pro MAPK. U všech aminokyselinových sekvencí SPL však byla pomocí těchto programů možná interakce, zmíněné sekvence však nevykazovaly překryv získaných dat.

Pozice MAPK specifických fosfopeptidů v aminokyselinové sekvenci se na základě výsledků nedá generalizovat a je spojena především s příbuzností jednotlivých zástupců. Nebyla nalezena významná spojitost s SBP doménou a interakcí s MAPK a je tedy možné, že ne všechny proteiny musí nutně s MAPK interagovat. To by však neznamenala ani predikovaná interakce v rámci SBP domény. Nebyla tedy odhalena konkrétní vzájemná poloha těchto peptidů a SBP domény. Z funkce SBP domény, jako DNA interagující domény, se však dá soudit o její expozici jiným molekulám. Nebyl predikován ani významný vztah s ANK.

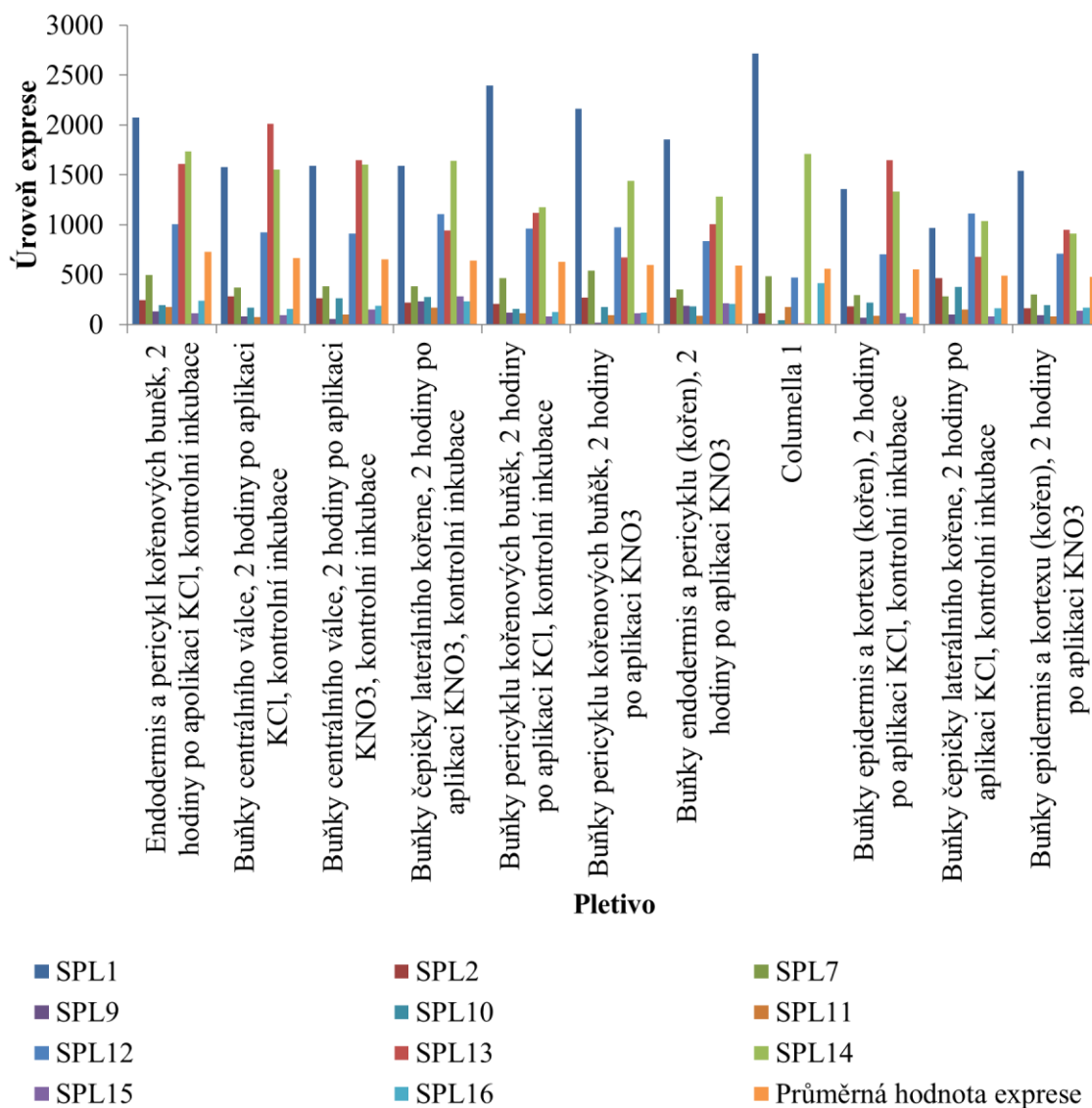
Spolu s EML a lokalizací MAPK specifických dokovacích sekvencí tak bylo docíleno získání dat o možné fosforylaci, o možné interakci obou skupin proteinů, a tedy možném zahrnutí v rámci jedné signalizační dráhy. Získaná data jsou uvedena v příloze 4.

Další analýzy se zaměřovaly především na obecnou charakterizaci celé proteinové rodiny.

5.1.3 Bioinformatické hodnocení genové exprese

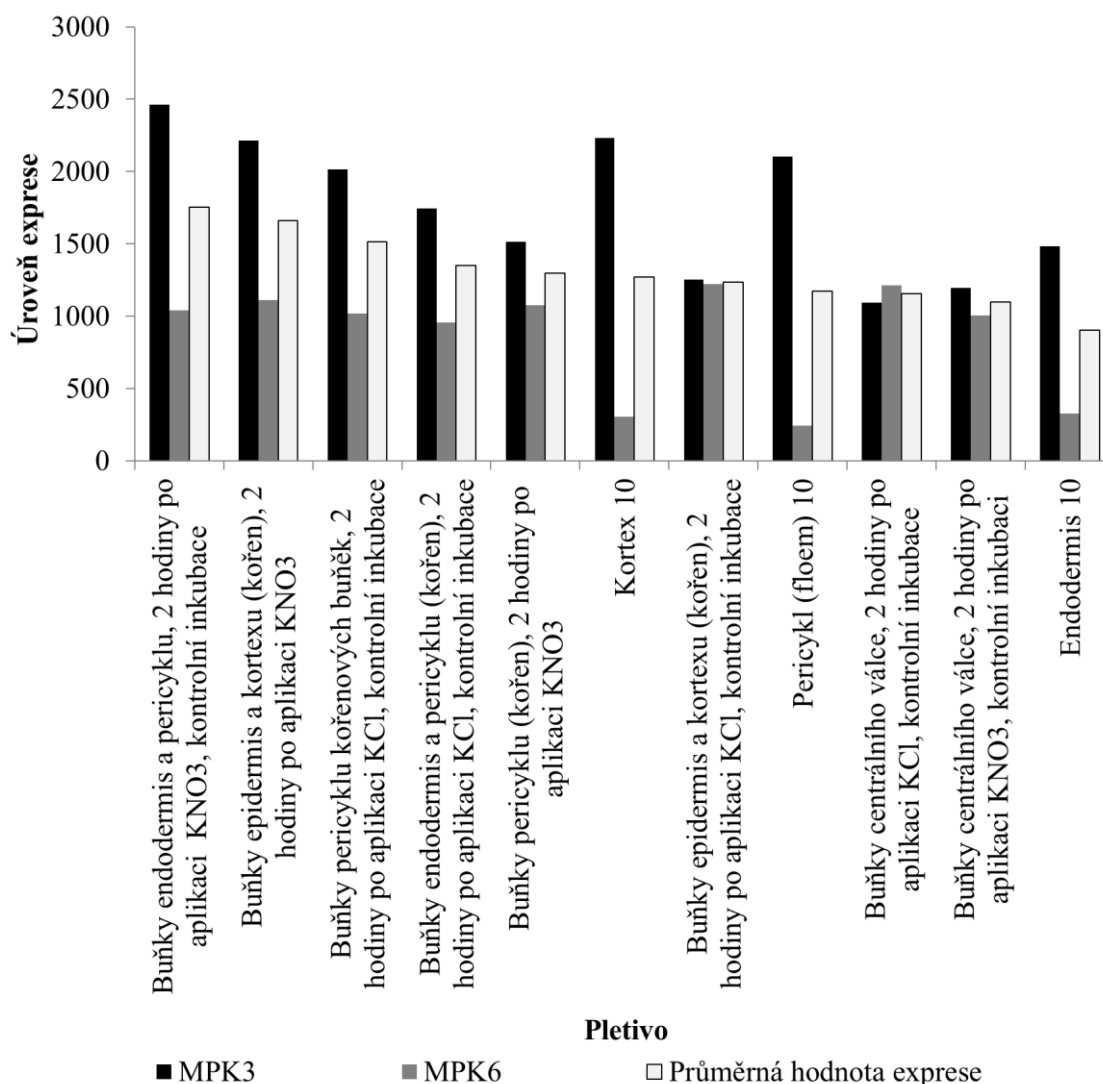
Pro porovnání exprese jednotlivých *SPL* jsme použili databázi eFP browser. Data o expresi jsme zpracovali a seřadili pletiva (za daných podmínek) podle průměrné hodnoty exprese všech *AtSPL* (význam směrodatné odchylky byl zanedbán).

Ze získaných dat se za nejvíce exprimovaný dá považovat *SPL1* (viz graf 1), vysoká úroveň exprese je však pozorována i u *SPL7/12/13/14*. To (ve spojitosti s dalšími analýzami, viz 5.1.4 Identifikace přítomných domén) nastiňuje možnou redundanci, nebo velice podobnou funkci příbuzných *SPL1/12/14* proteinů.



Graf 1: Hodnoty exprese *AtSPL* v kořenových pletivech získané z databáze eFP browser (pro průměrnou přiřazenou hodnotu exprese větší než 300). Seřazeno podle průměrné hodnoty exprese.

Po provedení podobné analýzy pro *MPK3/6* (graf 2) jsme získali informace o podobné expresi s *SPL* – při seřazení pletiv na základě průměrné hodnoty exprese *MPK3/6*, jsme pozorovali shodná pletiva mezi výběrem s průměrnou vyšší expresí. Tato exprese byla především spojena s vystavením rostlin KCl a KNO₃.



Graf 2: Hodnoty exprese *MPK3/6* v kořenových pletivech získané z databáze eFP browser (pro průměrnou přiřazenou hodnotu exprese větší než 900). Seřazeno podle průměrné hodnoty exprese.

5.1.4 Identifikace přítomných domén

Zjištění přítomnosti domén v aminokyselinové sekvenci SPL proteinů jsme provedli pomocí SMART, který se ukázal jako lepším nástrojem pro tyto účely než Blast2GO, který nebyl schopen anotovat všechny sekvence (AtSPL2/16 anotovány nebyly). Získaná data však byla shodná: (i) byla identifikována SBP doména, která je charakteristickou pro tyto transkripční faktory; a (ii) výskyt ANK domény byl shodný v rámci malé skupiny SPL. Tato skupina obsahuje AtSPL1/12/14/16, sekvenčně velice podobné zástupce. Byla identifikována přítomnost transmembránových domén (SMART, ale také ELM) a to u AtSPL1/7/12/14/16 (viz příloha 4). Možnou spojitost s cytoplasmatickou membránou potvrdil však i Blast2GO ve spojitosti s anotací buněčné lokalizace (gene ontology annotation pro parametr „buněčný kompartment“). Proteinům

AtSPL7/14 byla přiřazena anotace „membrána“ (součást membrány, plasmatická membrána, vnitřní/integrální komponenta membrány).

Lokalizace (Aramemnon, Blast2GO) potvrdila také AtSPL jako transkripční faktory, díky popsané lokalizaci v jádře (určeno na základě Score – AramLocCon; viz tabulka 18). U AtSPL2/7/9/12/13/15 byla anotována i lokalizace v chloroplastech. V tabulce 18 jsou poskytnuty údaje o přiřazeném skóre – Score (AramLocCon – konsenzuální predikce subcelulární lokalizace), kde vyšší skóre vyjadřuje vyšší spolehlivost predikce.

Tabulka 18: Údaje o topologii SPL získané pomocí databáze Aramemnon. Score (AramLocCon – konsenzuální predikce subcelulární lokalizace); AGI – databázové číslo.

AtSPL		Topologie (Aramemnon)		
AGI	Jméno	Jádro	Sekreční dráhy	Chloroplast
At2G47070	AtSPL1	17,70	2,30	-0,10
At5G43270	AtSPL2	18,40	1,90	1,00
At5G18830	AtSPL7	13,20	0,20	1,20
At1g02065	AtSPL8	13,40	0,90	0,20
At2g42200	AtSPL9	13,40	-1,30	3,40
At1g27370	AtSPL10	18,20	0,60	-0,10
At1g27360	AtSPL11	18,20	0,40	0,20
At3G60030	AtSPL12	17,40	2,10	1,00
At5G50570	AtSPL13	18,00	0,50	2,70
At1g20980	AtSPL14	13,20	-0,60	-0,10
At3g57920	AtSPL15	11,90	0,10	9,70
At1g76580	AtSPL16	16,50	0,40	-1,00

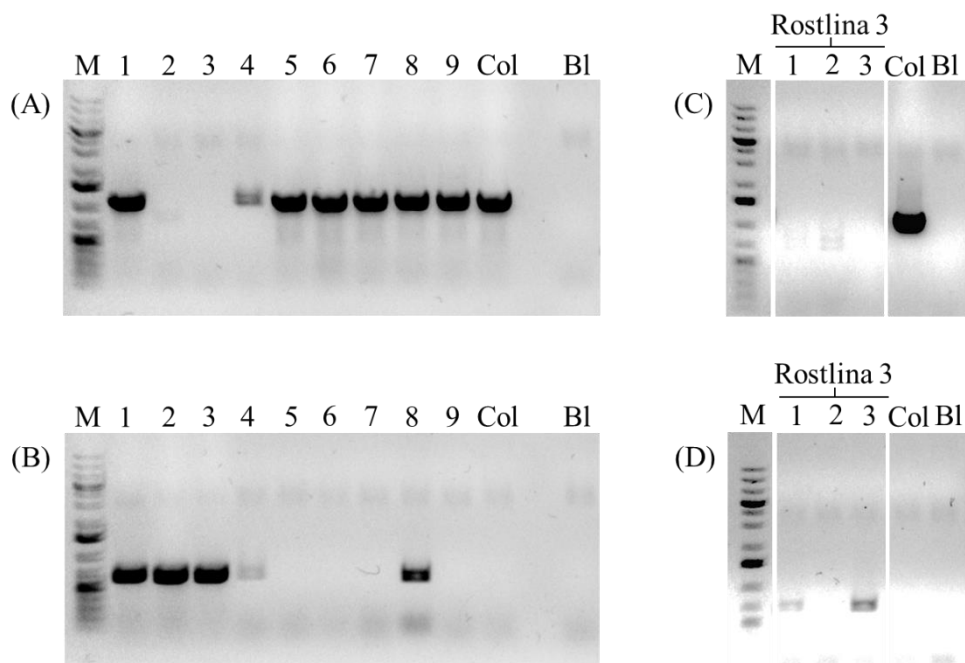
Tyto informace jsme využili pro výběr SPL1 pro laboratorní analýzy. Jako druhá SPL pro naše experimenty byla vybrána SPL7, to především na základě literární rešerše a splnění podmínek možné fosforylace, která byla predikována.

5.2 Selekce mutantních linií *Arabidopsis thaliana* s T-DNA inzercí v genu *SPL1*

5.2.1 Alelově specifická PCR

Pomocí databáze byly vybrány 2 vhodné SALK linie (SALK_058642 a SALK_134584). Z každé z linií bylo vyseto 9 semen. Na základě provedené alelově specifické PCR jsme vyseletovali ze zmíněných 18 rostlin čtyři předpokládané homozygotní rostliny (obrázek 4 a 5). Dvě rostliny z linie SALK_058642 a dvě rostliny z linie SALK_134584. Tento výběr byl založen na přítomnosti PCR produktu amplifikovaného primery pro detekci T-DNA inzerce (obrázek 4B a 5B), zároveň absence amplifikované sekvence ohraničené primery pro detekci alely divého typu genu *SPL1* (obrázek 4A a 5A). Schématické vyhodnocení je uvedeno v kapitole 4.5.4 Alelově specifická PCR (genotypování).

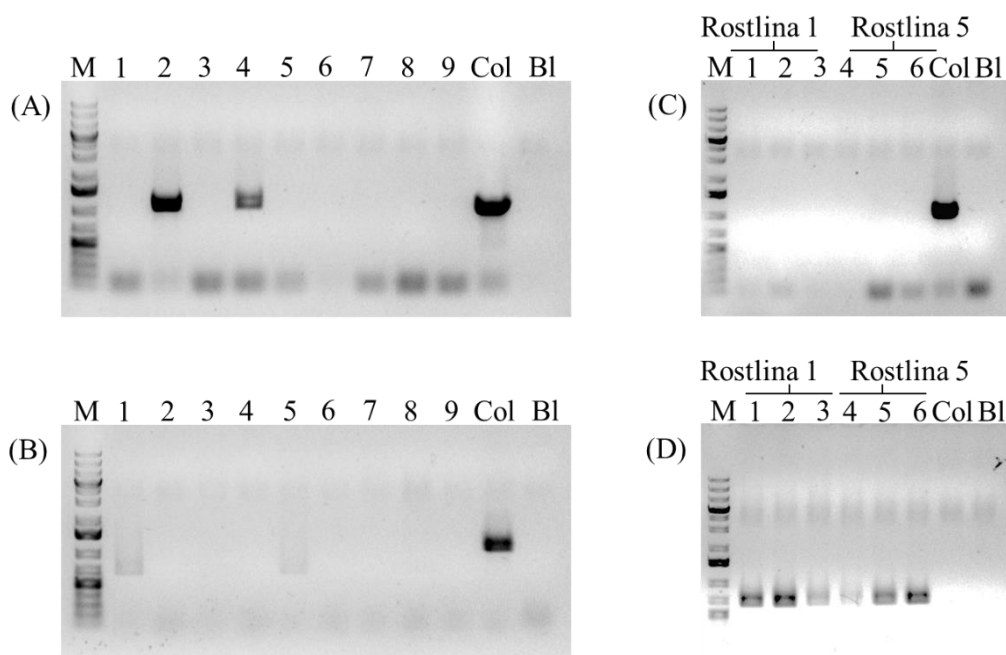
Z vyselektovaných homozygotních rostlin (SALK_058642: rostlina 2 a 3; SALK_134584: rostlina 1 a 5) bylo dále pracováno jen se třemi (SALK_058642: rostlina 3; SALK_134584: rostlina 1 a 5) a to z důvodu ztráty SALK_058642: rostlina 2 při převodu z *in vitro* podmínek do substrátu (*ex vitro*).



Obrázek 4: Alelově specifická PCR pro linii SALK_058642. A, C – Přítomnost amplifikovaného fragmentu ukazuje na gen bez přítomnosti T-DNA inzerce. B, D – Amplifikovaná DNA ukazuje na narušení genu T-DNA inzercí. C, D – triplikáty pro rostlinu 3. 1–9 – izoláty; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – pozitivní kontrola (Col-0); Bl – slepý vzorek.

Velikost PCR produktu u Col (divý typ; pozitivní kontrola) u T-DNA inzerce (obrázek 5B; SALK_134584) nasvědčuje o záměně primeru, jelikož došlo ke vzniku produktu o charakteristické velikosti (velikost jako při detekci alely bez T-DNA inzerce).

Neúspěšná amplifikace některých vzorků může být dána metodou izolace DNA, která nezahrnuje krok purifikace. Případný neúspěch může být dán nízkou výtěžností extrakce DNA. Právě čistota a koncentrace DNA jednotlivých vzorků je hlavním rozdílem mezi vzorky jako takovými.



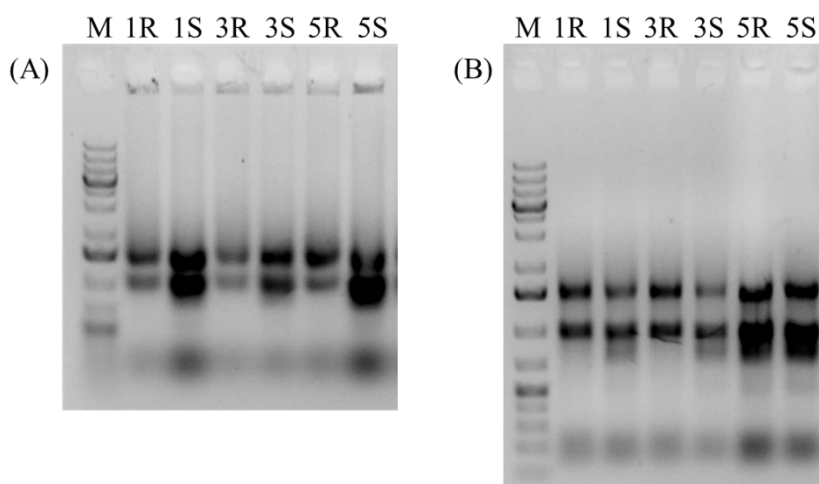
Obrázek 5: Alelově specifická PCR pro linii SALK_134584. A, C – Přítomnost amplifikovaného fragmentu ukazuje na gen bez přítomnosti T-DNA inzerce. B, D – Přítomnost amplifikované DNA ukazuje na T-DNA inzerce. C, D – triplikáty pro rostlinu 1 a 5. Přítomnost produktu amplifikace u rostliny v obou variantách (WT i T-DNA) ukazuje na heterozygotní stav jedince. 1–9 – izoláty; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – pozitivní kontrola (Col-0); Bl – slepý vzorek.

Z vyselektovaných homozygotních rostlin byla opět izolována DNA, která sloužila pro opětovné provedení alelově specifické PCR (ve formě technických triplikátů) pro vyloučení případné chyby a ověření dříve získaných výsledků (obrázek 4C a 4D, obrázek 5C a 5D). Potvrdili jsme výsledky předchozí PCR a podpořili hypotézu kontaminace, záměny primerů (obrázek 5B). To díky absenci produktu Col (pozitivní kontrola) při kombinaci primerů detekujících T-DNA (obrázek 5D). Pravděpodobně došlo k záměně primerů detekujících T-DNA inzerce a alelu divého typu.

Na základě opětovné PCR jsme potvrdili vybrané rostliny jako homozygotní jedince s T-DNA inzerce v genu *SPLI*. Vybrané rostliny byly využity pro ověření výsledků pomocí RT-PCR. Tato metoda byla vybrána jako druhá nezávislá metoda pro určení narušení exprese cílového genu.

5.2.2 Reverzní transkripce spojená s polymerasovou řetězovou reakcí (RT-PCR)

Semena z dříve vyselektovaných rostlin jsme kultivovali za výše uvedených podmínek (14 dní). Deset rostlin z každé linie jsme rozdělili pomocí skalpelu na kořen a prýt, ze kterých jsme udělali směsné vzorky označené R (kořen) a S (prýt). Rozdělení bylo zařazeno kvůli možné odlišné expresi v kořenové části a v prýtu (možné sestříhové varianty). Po dokončení izolace celkové RNA jsme provedli její elektroforetickou separaci (2 μ l izolátu; obrázek 6A) pro potvrzení úspěšné izolace celkové RNA, která byla indikována přítomností nedegradované rRNA ribozomálních podjednotek.



Obrázek 6: Výsledky izolace celkové RNA (A) a DNasou I ošetřený izolát celkové RNA (B). 1R, 1S – SALK_134584: 1; 3R, 3S – SALK_058642: 3; 5R, 5S – SALK_134584: 5; R – kořen; S – prýt; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

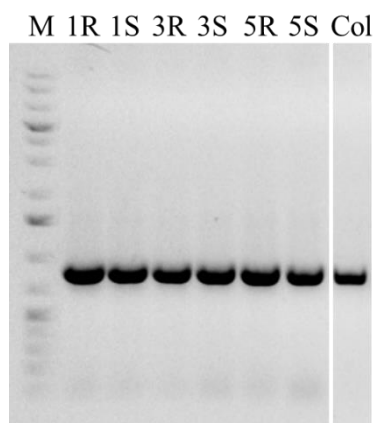
Změřili jsme koncentraci a čistotu izolované RNA, významné parametry pro další práci (viz tabulka 19). Ideální čistota RNA je hodnota poměru absorbancí získaných při měření poměru vlnových délek 260/280 nm rovna 2,0. Hodnoty zmíněného poměru našich vzorků byly blízké požadované hodnotě (viz tabulka 19). Na základě potvrzení úspěšné izolace jsme pokračovali s přečištěním izolátu pomocí DNasy I, jelikož byla patrna přítomnost genomické DNA, která může být pozorována na obrázku 6A, jako málo mobilní fragmenty v blízkosti jamek gelu. Shodného množství nukleových kyselin v purifikační reakci bylo docíleno díky znalosti koncentrace. Objem pipetovaného vzorku je uveden v tabulce 19.

Po chelataci Mg^{2+} iontů, které jsou kofaktor DNasy I, jsme provedli kontrolní elektroforetickou separaci (4 μ l vzorku; 40 minut, 100 V) nukleových kyselin ve vzorcích. Na obrázcích 6A a 6B je patrný rozdíl před a po purifikaci (absence genomické DNA, viz dříve). Takto upravená DNA byla přepsána do cDNA (viz 4.5.6.3 Reverzní transkripce).

Tabulka 19: Čistota, koncentrace a množství pipetovaného izolátu RNA pro přečištění od kontaminující DNA.

Vzorek	Čistota (260/280)	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]	RNA izolátu [μl]
1R	2	442,8	4,51
1S	2,08	1001,8	1,99
3R	1,98	320,1	6,25
3S	2,01	530,1	3,77
5R	1,98	241,2	8,29
5S	1,99	182,8	10,94

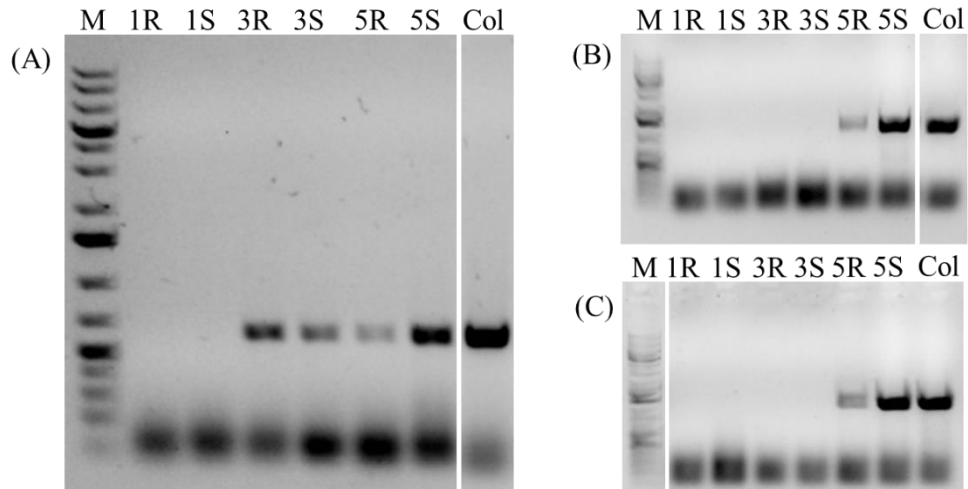
Pro potvrzení úspěšnosti přepisu mRNA do cDNA byl vybrán jako referenční gen konstitutivně exprimovaný gen pro elongační faktor 1α (*EF1α*). Amplifikace fragmentu pomocí primerů pro *EF1α* vypovídá o úspěšném provedení přepisu (obrázek 7).



Obrázek 7: PCR kontrola přepisu cDNA pro elongační faktor *EF1α* (konstitutivně exprimovaný gen). 3R, 3P – SALK_058642: 3; 1R, 1P – SALK_134584: 1; 5R, 5P – SALK_134584: 5; R – kořen; S – prýť; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – pozitivní kontrola (Col-0).

Po úspěšném ověření přepisu (*EF1α*) jsme použili navržené primery pro detekci cDNA *SPLI* vybraných rostlin (viz obrázek 8). Elektroforetickou separaci jsme provedli při parametrech: 30 minut, 120 V (obrázek 8A); potažmo 20 minut, 80 V (obrázek 8B a 8C). Na základě RT-PCR jsme v tomto okamžiku mohli vyvodit závěr, že SALK_134584: rostlina 1 (dále *spl1.1*) neexprimuje gen *SPLI*. Toto tvrzení je založeno na absenci produktu při amplifikaci fragmentu cDNA (obrázek 8, 1R a 1S). SALK_134584: rostlina 5 není vhodná pro další práci z důvodu nenarušené exprese genu, která je patrna na obrázku 8 (5R a 5S), kde při použití odlišných primerů byla amplifikována parciální sekvence cDNA *SPLI*. Pro rostlinu 3 vycházel

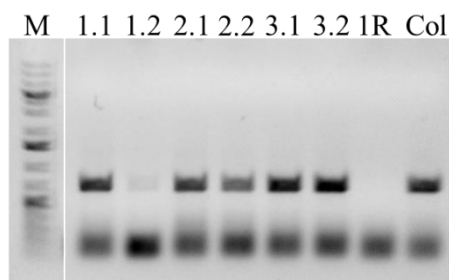
jeden pár primerů pozitivně (obrázek 8A), což by ve spojitosti s negativním výsledkem dalších PCR (obrázek 8B a 8C) mohlo ukazovat na možnou kontaminaci vzorku. Proto jsme se rozhodli přistoupit k opětovné izolaci pro vyloučení možné kontaminace.



Obrázek 8: PCR amplifikace cDNA (*SPLI*) pomocí navržených primerů. A – použitý pár primerů: SQ1-RT-Fwd-1 a SQ1-RT-Rev-1; B – použitý pár primerů: SQ1-RT-Fwd-4 a SQ1-RT-Rev-4; C – použitý pár primerů: SQ1-RT-Fwd-5 a SQ1-RT-Rev-5; 1R, 1S – SALK_134584: 1; 3R, 3S – SALK_058642: 3; 5R, 5S – SALK_134584: 5; R – kořen; S – prýt; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – pozitivní kontrola (Col-0).

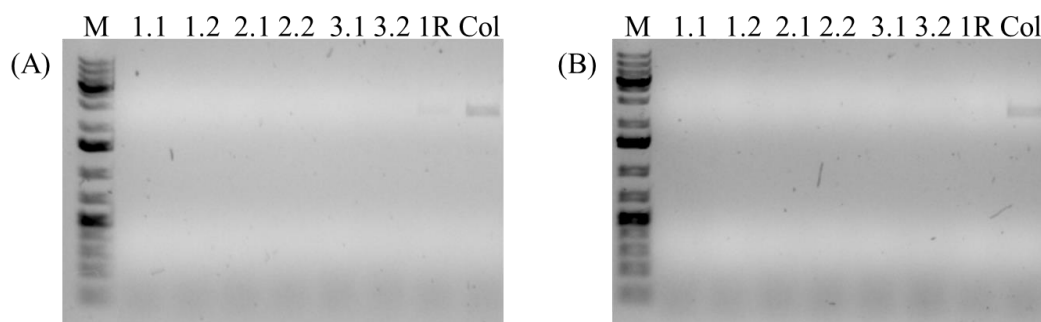
Pro SALK_058642: rostlina 3 jsme znovu provedli izolaci celkové RNA z 5 14denních rostlin podle výše popsaného postupu. Tentokrát však RNA byla izolována z celých rostlin (dříve zamýšlené semikvantitativní hodnocení exprese nebylo provedeno). Takto jsme zpracovali 15 rostlin ve formě 3 biologických replik. Z každé repliky byly přepsány do cDNA 2 technické duplikáty. Po provedení úspěšné kontroly přepisu *EFla* byla provedena PCR pro detekci cDNA za použití dříve využitých primerů se shodnými výsledky z předchozí analýzy (elektroforetogram neuveden z důvodu totožného výsledku). Byly použity i primery SQ1-RT-Fwd-2 a SQ1-RT-Rev-2 (viz obrázek 9), kde došlo k detekci cDNA *SPLI*. Jako negativní kontrola byl použit izolát 1R.

Vyloučení kontaminace nás vedlo k zaměření pozornosti na polohu primerů a jejich odlišností. Na základě polohy primerů (viz příloha 5) a absence produktů při kombinaci primerů SQ1-RT-Fwd-4 a SQ1-RT-Rev-4, SQ1-RT-Fwd-5 a SQ1-RT-Rev-5 (viz obrázek 8B a 8C) jsme zjistili přibližné místo inserce, na základě překryvu oblasti amplifikované primery SQ1-RT-Fwd-2 a SQ1-RT-Rev-2 a SQ1-RT-Fwd-4 a SQ1-RT-Rev-4, potažmo SQ1-RT-Fwd-5 a SQ1-RT-Rev-5. Dochází tedy k přepisu, ale s vysokou pravděpodobností za vzniku nesmyslného produktu.



Obrázek 9: Detekce přítomnosti transkriptu *SPL1* (SALK_058642: 3) za pomoci primerů SQ1-RT-Fwd-2 a SQ1-RT-Rev-2. 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 – vzorky SALK_058642: 3 (první číslo určuje biologickou repliku; druhé číslo ukazuje na technický duplikát při přepisu izolované RNA do cDNA); 1R – SALK_134584: 1; R – kořen; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – pozitivní kontrola (Col-0).

Pro potvrzení/ověření přítomnosti inserce jsme použili kombinace primerů SQ1-RT-Fwd-1 a SQ1-RT-Rev-4 (obrázek 10A), SQ1-RT-Fwd-2 a SQ1-RT-Rev-4 (obrázek 10B). Změnou kombinace primerů jsme získali nové kombinace, tedy nezávislé repliky.



Obrázek 10: Potvrzení správnosti lokalizace T-DNA inserce díky změně párů primerů. A – primery SQ1-RT-Fwd-1 a SQ1-RT-Rev-4; B – pár primerů SQ1-RT-Fwd-2 a SQ1-RT-Rev-4. 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 – vzorky SALK_058642: 3 (první číslo určuje biologickou repliku; druhé číslo ukazuje na technický duplikát při přepisu izolované RNA do cDNA); 1R – SALK_134584: 1; R – kořen; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – pozitivní kontrola (Col-0).

Na základě získaných elektroforetogramů (obrázek 8, 9, 10) jsme potvrdili přítomnost T-DNA inserce v genu *SPL1* v oblasti vymezené SQ1-RT-Rev-2 a SQ1-RT-Rev-5. SALK_058642: rostlina 3 (*spl1.2*) je tedy na základě provedených analýz vhodná pro další práci.

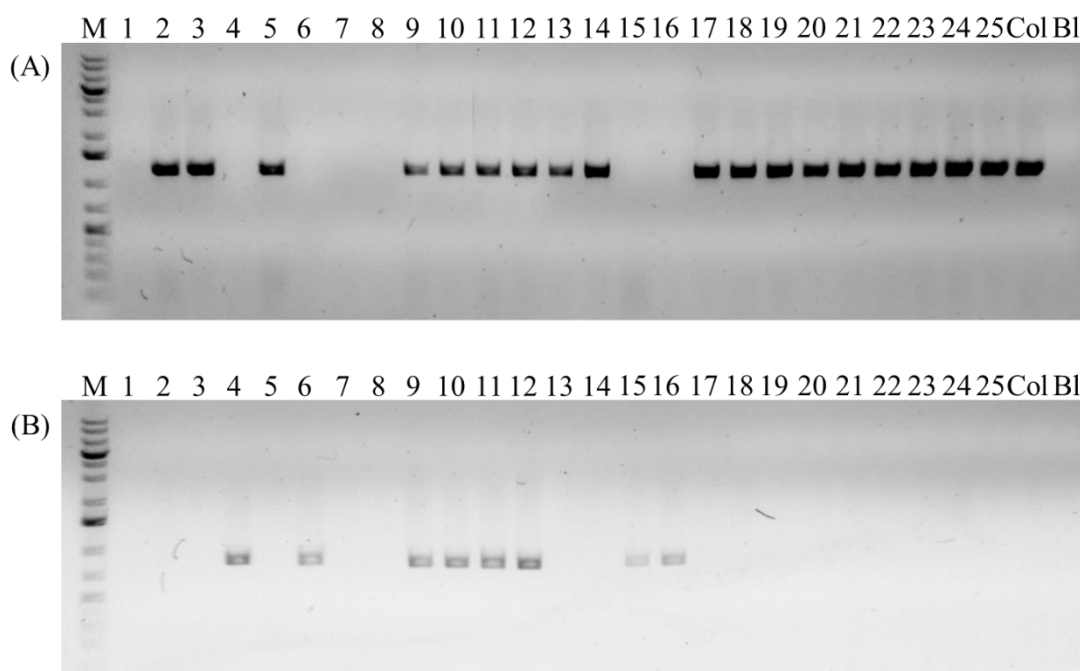
5.3 Selekcce mutantní linie *Arabidopsis thaliana* s T-DNA insercí v genu *SPL7*

Alelově specifická PCR byla provedena i pro linii SALK_093849 (*SPL7*). Kde jsme vyseletovali 4 rostliny jako potenciálně vhodné pro další práci (obrázek 11; rostlina 4, 6, 15, 16),

jelikož jsme pozorovali amplifikovaný fragment DNA, který indikuje přítomnost T-DNA inzerce (obrázek 11B). U detekce alely divého typu nedošlo k amplifikaci (obrázek 11A).

Přítomnost amplifikovaného fragmentu pro rostliny 2, 3, 5, 13, 14 a 17–25 pouze na obrázku 11A a zároveň ne na obrázku 11B (pro danou rostlinu) ukazuje na genotyp divého typu. Rostlina 9, 10, 11 a 12 jsou podle produktu PCR přítomného v obou variantách (obrázek 11A i 11B) heterozygotní, tedy na daném lokusu mají na homologních chromosomech variantu divého typu a variantu narušenou T-DNA inzercí.

Vybrané rostliny (rostlina 4, 6, 15, 16) byly převedeny z podmínek *in vitro* do *ex vitro*. Pozitivní rostliny vykazovaly odlišný fenotyp (trpasličí) od rostlin negativních (bez T-DNA inzerce, nebo v heterozygotní konformaci), potažmo od Col-0.



Obrázek 11: Alelově specifická PCR pro linii SALK_093849. A – Detekce genu bez přítomnosti T-DNA inzerce. B – Přítomnost fragmentu ukazuje na narušení genu T-DNA inzercí. 1–25 – zkoumané rostliny; M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; Col – pozitivní kontrola (Col-0); Bl – slepý vzorek.

5.4 Příprava expresních vektorů pro kvasinkový dvouhybridní systém

Příprava vektorů obsahující cDNA *SPL7* byla provedena z důvodu budoucí analýzy možné interakce mezi *SPL7*-*MPK3/6*, *SPL7*-*SPL1* a potvrzení dimerizace *SPL7*, která již byla publikována (Garcia-Molina *et al.*, 2014).

5.4.1 Subklonování cDNA *SPL7* do plazmidů pGADT7 AD a pGBDT7

Dříve klonovaná cDNA *SPL7* (obsah restrikčních míst pro níže použité restrikční endonukleasy) byla amplifikována z mateřského vektoru pomocí M13 primerů a high fidelity polymerasy. Amplifikovaná DNA byla izolována z gelu a enzymaticky štěpena pomocí dvojice specifických restrikčních enzymů. Vektory byly taktéž štěpeny pomocí zmíněných enzymů a následně defosforylovány pomocí alkalické fosfatasy. Přečištěný vektor a dříve získané fragmenty byly ligovány pomocí T4 DNA ligasy. Koncentrace přečištěných produktů po štěpení pomocí endonukleas (po ošetření plasmidu fosfatasou) a jejich čistota je uvedena v tabulce 20. Nízká koncentrace je dána zvolenou metodou izolace, která však poskytuje vysoký stupeň čistoty. Pro potřeby klonování byla však koncentrace dostatečná.

Tabulka 20: Čistota a koncentrace přečištěných plasmidů a inzertů pro subklonování cDNA *SPL7*.

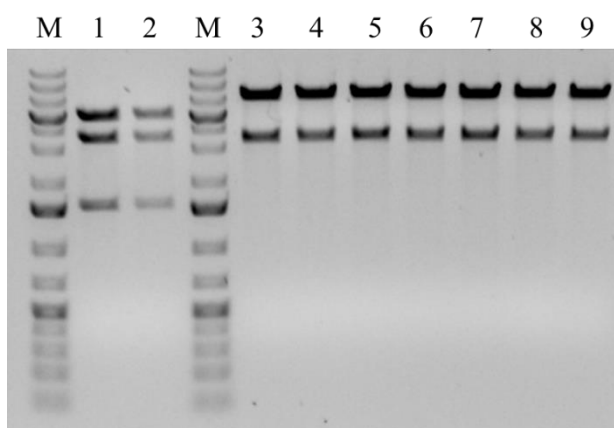
Vzorek	Čistota (260/280)	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]
SPL7 pro pGBDT7	1,72	85,0
SPL7 pro pGADT7 AD	1,87	58,4
pGBDT7	1,84	29,6
pGADT7 AD	1,83	46,5

Po provedené transformaci a kultivaci bakterií na pevném LB médiu jsme provedli jejich rekultivaci v tekutém médiu pro potřeby izolace plasmidové DNA a následné restrikce. Z 10 rekultivovaných kolonií/bakterií potenciálně nesoucích cDNA *SPL7* v pGADT7 AD bylo pozitivních 7; pro vektor pGBDT7 byly pozitivní 2 (opět z 10 rekultivovaných kolonií; viz příloha 6).

Pro ověření výsledků byla provedena rekultivace bakterií, které byly dříve selektovány a zamraženy v 25% glycerolu. Plasmidová DNA byla opět izolována (koncentrace uvedena v tabulce 21) a provedena restrikce (*HindIII*; viz obrázek 12). Elektroforetická separace proběhla při parametrech: 60 minut, 80 V. Pozorovali jsme fragmenty o očekávané velikosti (viz kapitola 4.5.7.8 Restrikce a vizualizace plasmidové DNA pro ověření úspěšného klonování).

Tabulka 21: Koncentrace a čistota izolovaných plasmidů po transformaci kompetentních buněk rekombinantní molekulou DNA nesoucí cDNA *SPL7*.

Vzorek		Koncentrace [ng·μl ⁻¹]	Čistota (260/280)
pGBDT7	K7	482,2	1,90
	K10	239,7	1,89
pGADT7 AD	A1	469,5	1,88
	A3	349,3	1,86
	A4	473,3	1,87
	A6	427,0	1,87
	A8	458,8	1,87
	A9	439,1	1,85
	A10	412,5	1,87



Obrázek 12: Restrikce izolovaných plasmidů pGBDT7 (1, 2) a pGADT7 AD (3-9) obsahujících cDNA *SPL7*. M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

Na základě této restrikce jsme potvrdili úspěšnost klonování. Úspěšnost subklonování cDNA *SPL7* byla potvrzena sekvencováním (Sangerova metoda sekvencování).

6 Diskuse

Cílem předložené bakalářské práce byla predikce nejpravděpodobnějších transkripčních faktorů pro regulaci *FSD1* pomocí MPK3/6. Nedávná studie ukázala, že FSD může být regulována pomocí MAPK (MPK6), potažmo MAP2K (MKK5). Tato regulace probíhá pravděpodobně na transkripční úrovni (Xing *et al.*, 2015). FSD1 může být také pod vlivem regulace MAPKKK zvaných ANP (Takáč *et al.*, 2014), které jsou součástí dráhy zahrnující MKK4/5 a MPK6 (Kovtun *et al.*, 2000). Nepublikovaná data (Zapletalová *et al.*) ukazují na možnou závislost abundance FSD1 na MPK3. *FSD1* je regulována pomocí SPL7. K této regulaci dochází díky *cis* elementům v promotorové oblasti *FSD1*, tyto elementy nejsou přítomny v genech *CSD1/2*. K negativní regulaci exprese zmíněných *CSD* dochází prostřednictvím miRNA (především miR398), které zmíněné *cis* elementy v promotorových oblastech obsahují (Abdel-Ghany *et Pilon*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2009).

ATTED-II, databáze umožňující bioinformatické vyhodnocení genové exprese, spolu s analýzou jejich výsledků pomocí GPS 3.0 ukázala spojitost SPL1 s MPK3 a FSD1, což ve spojitosti s možnou redundancí SPL vyzdvihuje i úlohu SPL12 (Xu *et al.*, 2016; Chao *et al.*, 2017). Mimo jiné jsou SPL i MPK3 zahrnuty do tvorby generativních orgánů (Liu *et al.*, 2016; Hord *et al.*, 2008).

Výsledky získané na základě predikce fosforylace a dokovacích pozic ukazují správnost navrhované interakce MAPK-SPL. SPL, jako transkripční faktory, by tak vyplňovaly případný chybějící článek dráhy zahrnující MAPK a FSD (Xing *et al.*, 2015). Možnost SPL jako transkripčních faktorů *SOD* ukázal například Yamasaki *et al.* (2009). Byla brána v potaz i možnost přímé fosforylace FSD1 MAPK. Tuto možnost potvrzují data (nepublikováno) o přítomnosti fosfopeptidu (GPS. 3.0) a dokovací domény (ELM). Fosforylace je jedna z možných postranlačních modifikací *SOD* (Csar *et al.*, 2001). U rostlin fosforylace *SOD* doposud nebyla publikována. Také databáze fosfoproteinů PhosPhat 4.0 (Zulawski *et al.*, 2013) neeviduje žádný identifikovaný fosfopeptid v aminokyselinové sekvenci FSD1. Z tohoto důvodu bude potřebné provést další cílené experimenty pro zjištění, zda FSD1 může být fosforylována.

Význam fosforylace bude potřeba dále studovat, například pomocí stabilně transformovaných rostlin *spl* exprimující fosfomimetické, nebo fosfomutantní formy SPL v MAPK specifickém fosfopeptidu. Fosfomimeticky modifikovaný peptid má fosfoserin zaměněný za kyselinu asparagovou, která mimikuje aktivní fosforylaci a fosfomutantní modifikovaný peptid má serin zaměněný za alanin, který nemůže být fosforylován.

Fosforylace, popřípadě jiná modifikace, může negativně ovlivnit translokaci do jádra. Případná fosforylace by případně ovlivnila lokalizaci a funkci SPL, což by mohlo mít zásadní dopad na ontogenetický vývoj vzhledem k významu SPL (Birkenbihl *et al.*, 2005).

Získaná data o přítomných doménách byla ve shodě s literaturou (Kropat *et al.*, 2005). Významnou informací se jeví anotace transmembránových domén u AtSPL1/7/12/14/16, což by ve vztahu k popsané lokalizaci na endoplasmatickém retikulu SPL7 (Garcia-Molina *et al.*, 2014) a daty o topologii mohlo ukázat na podobné vlastnosti i AtSPL1/12/14/16. Význam SPL7 a jeho souvislostí s membránou potvrdila i analýza Gene ontology annotation pomocí Blast2Go. Sekvenční příbuznost by mohla odhalit podobné funkce.

Informace získané o lokalizaci bude potřeba potvrdit, například pomocí stabilně transformovaných rostlin exprimující SPL::GFP pod kontrolou nativního promotoru s využitím dostupného vybavení pro mikroskopii. Jako vhodná metoda se jeví takzvaná light sheet mikroskopie, která umožňuje pozorování fluorescenčního signálu v intaktní rostlině. Tato pozorování jsou prováděna v prakticky environmentálních podmínkách (Ovečka *et al.*, 2015; Ovečka *et al.*, 2018). Trojdimenzionální rekonstrukce signálu umožňuje kvantitativní vyhodnocení pletivově specifické distribuce signálu, jeho dynamiky, tak jak to bylo demonstrováno například pro AtEB1c (END BINDING protein 1c; Novák *et al.*, 2016).

Právě pro tvorbu konstruktů je významná informace o N-terminální pozici SBP domény, respektive NLS, kterou tato doména na svém C-konci nese (Birkenbihl *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014). Přítomnost GFP by mohla narušit lokalizační signál, i když Garcia-Molina *et al.* (2014) ukázali funkčnost N-terminální fúze pro SPL7.

Získané informace o vztahu s KCl a KNO₃ by mohly ukazovat na souvislost s oxidačním stresem, i když charakter KCl jako oxidačního činidla je spíše sekundární efekt této látky. *SPL1* se ukázala jako nejvíce exprimovaný gen. Oxidační stres je spjat i s MAPK, konkrétně MPK3/6 (Kovtun *et al.*, 2000; Takáč *et al.*, 2016b). Bioinformatická analýza odhalila expresi *SPL* a *MPK3/6* ve shodných pletivech při zmíněné expozici KCl a KNO₃. Význam MPK4, která hraje podstatnou roli v signalizaci oxidačního stresu (Takáč *et al.*, 2016b), je otázkou budoucích analýz.

Na základě bioinformatické analýzy (*SPL1*) a rešerše (*SPL7*) byly vybrány *SPL1* a *SPL7* jako proteiny primárního zájmu této bakalářské práce. Byla provedena selekce *spl1* T-DNA inzerčních linií na základě dvou nezávislých metod (alelově specifická PCR, RT-PCR). Právě uvedené výsledky potvrzují nutnost využití více nezávislých metod pro validaci výsledků – rostlina 3, která vyšla opakovaně pozitivní pomocí alelově specifické PCR na přítomnost T-DNA inserce, RT-PCR však ukázala expresi genu. Pro *spl7.1* je nutno provést RT-PCR, vybrané rostliny však vykazují trpasličí fenotyp (nepublikováno) popsaný v dostupné literatuře (Yamasaki *et al.*, 2009). Pro všechny mutanty však bude potřeba validace pomocí metody Southern blot pro zjištění počtu inzercí, případně provedení zpětného křížení.

Pro cíle této práce je významné použití zvolených linií *spl1/7* ve člancích publikovaných v impaktových časopisech, kde byly použity SALK_134584 (Chao *et al.*, 2017) a SALK_093849 (Yamasaki *et al.*, 2009), což může ukazovat na využitelnost těchto linií. Selektované linie mohou sloužit pro dokázání vztahu s FSD1, například pomocí zjištění její aktivity (Beauchamp *et*

Fridovich, 1971), transkripce a abundance. Bude také možno připravit dvojité mutanty *spl1/mpk3* a *spl7/mpk3* pro analýzu genetických interakcí mezi SPL a MPK3. Snížená aktivita FSD1 v *spl1* a *spl7* mutantech může indikovat možnou regulaci. Také bude provedena fenotypizace těchto linií.

Připravené expresní vektory pGADT7 AD a pGBDT7 nesoucí cDNA *SPL7* a *SPL1* budou sloužit pro prokázání domnělé interakce s MPK3/6, případně s FSD1 (vektory připraveny Mgr. Petrem Dvořákem). Řešena bude i otázka dimerizace SPL1, tak jako je možná u SPL7 (Garcia-Molina *et al.*, 2014), a tvorba heterodimerů SPL1-SPL7. Potvrzení výsledků získaných kvasinkovými dvouhybridovými systémy bude provedeno pomocí Split-YFP (yellow fluorescent protein) a BiFC (bimolekulární fluorescenční komplementace). Právě BiFC byla použita Garcia-Molina *et al.* (2014) pro zjištění dimerizace. Další interakce pomocí databáze BioGRID nebyly pro SPL7 publikovány (Oughtred *et al.*, 2019).

7 Závěr

Zpracovali jsme literární rešerši na téma SPL, MAPK a oxidačního stresu, tedy vzájemně provázaných témat. Zejména z části věnované SPL jsme vycházeli při bioinformatické charakterizaci, ale informace o zapojení MPK3/6 do oxidačního stresu nastínily možnou souvislost s SPL, které, jako například SPL7 (potenciálně SPL1), regulují prvky antioxidační obrany (Yan *et al.*, 2017). Právě možnou interakci MPK3/6 a SPL1/7 je potřeba ověřit, například pomocí kvasinkových dvouhybridových systémů, kde jsme úspěšně klonovali z mateřského vektoru cDNA *SPL7* do expresních vektorů pGADT7 AD a pGBDT7.

Jako významný zástupce z AtSPL se jeví SPL1 (na základě bioinformatické analýzy) a SPL7 (na základě dostupné literatury). Proto jsme se v rámci laboratorní části věnovali selekci *SPL1* a *SPL7* mutantních linií, které jsou potřeba pro popis významu deficience daného proteinu, popis možného ovlivnění antioxidační obrany.

Podařilo se nám selektovat 2 mutantní linie *SPL1* s T-DNA inzercí v tomto genu za pomoci alelově specifické PCR. Výsledky alelově specifické PCR jsme potvrdili pomocí RT-PCR s navrženými primery. U linie SALK_134584, ze které jsme vyseletovali *spl1.1*, nedochází k přepisu tohoto genu. U druhé z použitých linií SALK_058642 (*spl1.2*) dochází k přepisu, avšak k výraznému narušení sekvence přítomností T-DNA inzerce. Přibližná poloha inzerce u této linie byla experimentálně prokázána díky překryvu oblasti vymezené navrženými primery.

V rámci selekce *spl7* linie SALK_093849 jsou získané pozitivní rostliny doporučeny pro ověření dysfunkce genu pomocí RT-PCR.

8 Seznam použité literatury

- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008): MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 15932–15945.
- Agathokleous E, Kitao M, Calabrese EJ (2019): Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science. *Trends in Plant Science* 24: 318–327.
- Agervald A, Baebprasert W, Zhang X, Incharoensakdi A, Lindblad P, Stensjö K (2010): The CyAbrB transcription factor CalA regulates the iron superoxide dismutase in *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *Environmental Microbiology* 12: 2826–2837.
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosché M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjärvi J (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal* 40: 512–522.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331–1341.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7915–7922.
- Apel K, Hirt H (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Araki R, Mermod M, Yamasaki H, Kamiya T, Fujiwara T, Shikanai T (2018): SPL7 locally regulates copper-homeostasis-related genes in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 224–225: 137–143.
- Asada K (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391–396.
- Baker CJ, Orlandi EW (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299–321.
- Bardwell AJ, Frankson E, Bardwell L (2009): Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 13165–13173.
- Bartels S, González Besteiro MA, Lang D, Ulm R (2010): Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science* 15: 322–329.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276–287.

- Beck M, Komis G, Müller J, Menzel D, Šamaj J (2010): *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant Cell* 22: 755–771.
- Beckers GJ, Jaskiewicz M, Liu Y, Underwood WR, He SY, Zhang S, Conrath U (2009): Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 21: 944–953.
- Bellegarde F, Maghiaoui A, Boucherez J, Krouk G, Lejay L, Bach L, Gojon A, Martin A (2019): The Chromatin Factor HNI9 and ELONGATED HYPOCOTYL 5 Maintain ROS Homeostasis under High Nitrogen Provision. *Plant Physiology* pp.01473.2018.
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E (2015): The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis* 53: 474–485.
- Bi G, Zhou Z, Wang W, Li L, Rao S, Wu Y, Zhang X, Menke FLH, Chen S, Zhou JM (2018): Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 30: 1543–1561.
- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006): Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 994–1003.
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P (2005): Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of Molecular Biology* 352: 585–596.
- Brown NM, Torres AS, Doan PE, O'Halloran TV (2004): Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 5518–5523.
- Camps M, Nichols A, Arkininstall S (2000): Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal* 14: 6–16.
- Cardon GH, Höhmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1997): Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *The Plant Journal* 12: 367–377.
- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1999): Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* 237: 91–104.
- Cohen MF, Gurung S, Fukuto JM, Yamasaki H (2014): Controlled free radical attack in the apoplast: a hypothesis for roles of O, N and S species in regulatory and polysaccharide cleavage events during rapid abscission by *Azolla*. *Plant Science* 217–218: 120–126.
- Cohu CM, Pilon M (2007): Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiologia Plantarum* 129: 747–755.

- Cohu CM, Abdel-Ghany SE, Gogolin Reynolds KA, Onofrio AM, Bodecker JR, Kimbrel JA, Niyogi KK, Pilon M (2009): Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: regulation and unexpected phenotypes in an *Arabidopsis* mutant. *Molecular Plant* 2: 1336–1350.
- Cochemé HM, Murphy MP (2008): Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 1786–1798.
- Colcombet J, Hirt H (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical Journal* 413: 217–226.
- Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996): Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9970–9974.
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA (2001): Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 145–150.
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P (1999): Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell* 11: 1277–1292.
- Csar XF, Wilson N, Strike P, Sparrow L, McMahon KA, Ward AC, Hamilton JA (2001): Copper/zinc superoxide dismutase is phosphorylated and modulated specifically by granulocyte-colony stimulating factor in myeloid cells. *Proteomics* 1: 435–443.
- Cui F, Sun W, Kong X (2018): RLCKs Bridge Plant Immune Receptors and MAPK Cascades. *Trends in Plant Science* 23: 1039–1041.
- de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS (2017): Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. In: Ahmad S (ed.): *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 996, pp. 15–23. Springer, Cham.
- del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006): Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141: 330–335.
- del Río LA, López-Huertas E (2016): ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant and Cell Physiology* 57: 1364–1376.
- Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM (2003): Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science* 116: 81–88.
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001): Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127: 159–172.
- Dinkel H, Van Roey K, Michael S, Kumar M, Uyar B, Altenberg B, Milchevskaya V, Schneider M, Kühn H, Behrendt A, Dahl SL, Damerell V, Diebel S, Kalman S, Klein S, Knudsen

- AC, Mäder C, Merrill S, Staudt A, Thiel V, Welte L, Davey NE, Diella F, Gibson TJ (2016): ELM 2016 – data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Research* 44: 294–300.
- Dóczi R, Okrészl L, Romero AE, Paccanaro A, Bögre L (2012): Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends in Plant Science* 17: 518–525.
- Duan ZQ, Bai L, Zhao ZG, Zhang GP, Cheng FM, Jiang LX, Chen KM (2009): Drought-stimulated activity of plasma membrane nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and its catalytic properties in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 51: 1104–1115.
- Fath A, Bethke PC, Jones RL (2001): Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiology* 126: 156–166.
- Fornara F, Coupland G (2009): Plant phase transitions make a SPLash. *Cell* 138: 625–627.
- Fry SC (1998): Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal* 332: 507–515.
- Frye CA, Tang D, Innes RW (2001): Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 373–378.
- García-Molina A, Xing S, Huijser P (2014): Functional characterisation of *Arabidopsis* SPL7 conserved protein domains suggests novel regulatory mechanisms in the Cu deficiency response. *BMC Plant Biology* 14: 231.
- Gleason C, Huang S, Thatcher LF, Foley RC, Anderson CR, Carroll AJ, Millar AH, Singh KB (2011): Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 10768–10773.
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A (2008): High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* 36: 3420–3435.
- Guan Y, Lu J, Xu J, McClure B, Zhang S (2014): Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 165: 528–533.
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008): Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 418: 1–8.
- Harman D (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journals of Gerontology* 11: 298–300.

- He Q, Yang H, Wu L, Hu C (2015): Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology* 191: 219–228.
- Heyno E, Mary V, Schopfer P, Krieger-Liszkay A (2011): Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* 234: 35–45.
- Hippeli S, Elstner EF (1996): Mechanisms of Oxygen Activation during Plant Stress: Biochemical Effects of Air Pollutants. *Journal of Plant Physiology* 148: 249–257.
- Hord CL, Sun YJ, Pillitteri LJ, Torii KU, Wang H, Zhang S, Ma H (2008): Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular Plant* 1: 645–658.
- Hossain MS, Dietz KJ (2016): Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science* 7: 548.
- Huang C-H, Kuo W-Y, Weiss C, Jinn T-L (2012): Copper Chaperone-Dependent and -Independent Activation of Three Copper-Zinc Superoxide Dismutase Homologs Localized in Different Cellular Compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 158: 737–746.
- Chao LM, Liu YQ, Chen DY, Xue XY, Mao YB, Chen XY (2017): *Arabidopsis* Transcription Factors SPL1 and SPL12 Confer Plant Thermotolerance at Reproductive Stage. *Molecular Plant* 10: 735–748.
- Chen W, Chao G, Singh KB (1996): The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *The Plant Journal* 10: 955–966.
- Chen SX, Schopfer P (1999): Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* 260: 726–735.
- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L (2010): SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 946–951.
- Cheng H, Hao M, Wang W, Mei D, Tong C, Wang H, Liu J, Fu L, Hu Q (2016): Genomic identification, characterization and differential expression analysis of SBP-box gene family in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology* 16: 196.
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* 24: 655–665.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig

- DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7: 301–308.
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A (1995): Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 368: 73–76.
- Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001): Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* 126: 1055–1060.
- Jung HI, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian LV, Vatamaniuk OK (2012): COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 33252–33267.
- Kale R, Hebert AE, Frankel LK, Sallans L, Bricker TM, Pospíšil P (2017): Amino acid oxidation of the D1 and D2 proteins by oxygen radicals during photoinhibition of Photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 2988–2993.
- Klein J, Saedler H, Huijser P (1996): A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Molecular and general genetics* 250: 7–16.
- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL (1998): Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* 118: 637–650.
- Komis G, Illés P, Beck M, Šamaj J (2011): Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 650–657.
- Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Šamaj J (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* 69: 237–265.
- Kono Y, Fridovich I (1982): Superoxide Radical Inhibits Catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 5751–5754.
- Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY (2015): Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850: 794–801.
- Kovtun Y, Chiu WL, Zeng W, Sheen J (1998): Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395: 716–720.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 2940–2945.

- Krieger-Brauer HI, Kather H (1992): Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *Journal of Clinical Investigation* 89: 1006–1013.
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depège N, Huijser P, Merchant S (2005): A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18730–18735
- Kukavica B, Mojovic M, Vuccinic Z, Maksimovic V, Takahama U, Jovanovic SV (2009): Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology* 50: 304–317.
- Kuo WY, Huang CH, Liu AC, Cheng CP, Li SH, Chang WC, Weiss C, Azem A, Jinn TL (2013): CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in *Arabidopsis* chloroplasts. *The New Phytologist* 197: 99–110.
- Latrasse D, Jégu T, Li H, de Zelicourt A, Raynaud C, Legras S, Gust A, Samajova O, Veluchamy A, Rayapuram N, Ramirez-Prado JS, Kulikova O, Colcombet J, Bigeard J, Genot B, Bisseling T, Benhamed M, Hirt H (2017): MAPK-triggered chromatin reprogramming by histone deacetylase in plant innate immunity. *Genome Biology* 18: 131.
- Lee JS, Wang S, Sritubtim S, Chen JG, Ellis BE (2009): *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. *The Plant Journal* 57: 975–985.
- Lee Y, Kim YJ, Kim MH, Kwak JM (2016): MAPK Cascades in Guard Cell Signal Transduction. *Frontiers in Plant Science* 7: 80.
- Legendre L, Rueter S, Heinstein PF, Low PS (1993): Characterization of the Oligogalacturonide-Induced Oxidative Burst in Cultured Soybean (*Glycine max*) Cells. *Plant Physiology* 102: 233–240.
- Letunic I, Bork P (2018): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* 46: D493–D496.
- Li C, Lu S (2014): Molecular characterization of the SPL gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* 14: 131.
- Li XY, Lin EP, Huang HH, Niu MY, Tong ZK, Zhang JH (2018): Molecular Characterization of SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family in *Betula luminifera*. *Frontiers in Plant Science* 9: 608.
- Liu Q, Harberd NP, Fu X (2016): SQUAMOSA Promoter Binding Protein-like Transcription Factors: Targets for Improving Cereal Grain Yield. *Molecular Plant* 9: 765–767.
- López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, Ramos-Vega M, León P, Guevara-García AA (2014): *Arabidopsis*

- thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany* 65:169–183.
- Mandel MA, Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky MF (1992): Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360: 273–277.
- Maruta T, Sawa Y, Shigeoka S, Ishikawa T (2016): Diversity and Evolution of Ascorbate Peroxidase Functions in Chloroplasts: More Than Just a Classical Antioxidant Enzyme? *Plant and Cell Physiology* 57: 1377–1386.
- McAinsh MR, Clayton H, Mansfield TA, Hetherington AM (1996): Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress. *Plant Physiology* 111: 1031–1042.
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J (1993): Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 103: 1155–1163.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010): Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61: 4197–4220.
- Michaely P, Bennett V (1992): The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends in Cell Biology* 2: 127–129.
- Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ (2010): Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 15681–15686.
- Mittler R (2017): ROS Are Good. *Trends in Plant Science* 22: 11–19.
- Moreno MA, Harper LC, Krueger RW, Dellaporta SL, Freeling M (1997): *liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. *Genes and Development* 11: 616–628.
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY (2004): The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* 13: 1435–1448.
- Moshfegh CM, Collins CW, Gunda V, Vasanthakumar A, Caoc JZ, Singh PK, Godley LA, Case AJ (2019): Mitochondrial superoxide disrupts the metabolic and epigenetic landscape of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. *Redox Biology* 21: 101141.
- Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszkay A, Leubner-Metzger G (2009): *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology* 150: 1855–1865.
- Murphy MP (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal* 417: 1–13.
- Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K (2008): A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends

- chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 3148–3162.
- Nagae M, Nakata M, Takahashi Y (2008): Identification of Negative cis-Acting Elements in Response to Copper in the Chloroplastic Iron Superoxide Dismutase Gene of the Moss *Barbula unguiculata*. *Plant Physiology* 146: 1687–1696.
- Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, Žárský V, Hirt H (2006): A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 38697–38704.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002a): Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* 128: 13–16.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002b): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237–1247.
- Neill SJ, Desikan R, Hancock J (2002c): Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388–395.
- Noctor G, Foyer CH (2016): Intracellular Redox Compartmentation and ROS-Related Communication in Regulation and Signaling. *Plant Physiology* 171: 1581–1592.
- Novák D, Kuchařová A, Ovečka M, Komis G, Šamaj J (2016): Developmental Nuclear Localization and Quantification of GFP-Tagged EB1c in *Arabidopsis* Root Using Light-Sheet Microscopy. *Frontiers in Plant Science* 6: 1187.
- Nühse TS, Peck SC, Hirt H, Boller T (2000): Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 7521–7526.
- Obayashi T, Aoki Y, Tadaka S, Kagaya Y, Kinoshita K (2018): ATTED-II in 2018: A Plant Coexpression Database Based on Investigation of Statistical Property of the Mutual Rank Index. *Plant and Cell Physiology* 59: e3.
- Oughtred R, Stark C, Breitschultz BJ, Rust J, Boucher L, Chang C, Kolas N, O'Donnell L, Leung G, McAdam R, Zhang F, Dolma S, Willems A, Coulombe-Huntington J, Chatr-Aryamontri A, Dolinski K, Tyers M (2019): The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Research* 47: D529–D541.
- Ovečka M, Vaškebová L, Komis G, Luptovčíak I, Smertenko A, Šamaj J (2015): Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nature Protocols* 10: 1234–1247.
- Ovečka M, von Wangenheim D, Tomančák P, Šamajová O, Komis G, Šamaj J (2018): Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy. *Nature Plants* 4: 639–650.
- Parra RG, Espada R, Verstraete N, Ferreiro DU (2015): Structural and Energetic Characterization of the Ankyrin Repeat Protein Family. *PLOS Computational Biology* 11: e1004659.

- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011): The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807: 989–998.
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H (2009): A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular plant* 2: 120–137.
- Pitzschke A (2015): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* 20: 49–55.
- Preston JC, Hileman LC (2010): SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN 1 initiates flowering in *Antirrhinum majus* through the activation of meristem identity genes. *The Plant Journal* 62: 704–712.
- Preston JC, Hileman LC (2013): Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Frontiers in Plant Science* 4: 80.
- Quinn JM, Merchant S (1995): Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators. *The Plant Cell* 7: 623–628.
- Ren D, Yang H, Zhang S (2002): Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 559–565.
- Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson CS, Hirt H, Knight MR (2004): OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427: 858–861.
- Rhee SG (2006): Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312: 1882–1883.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002): Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513–520.
- Riese M, Höhmann S, Saedler H, Münster T, Huijser P (2007): Comparative analysis of the SBP-box gene families in *P. patens* and seed plants. *Gene* 401: 28–37.
- Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, McAinsh M, Davies JM (2015): The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany* 66: 37–46.
- Robertson D, Davies DR, Gerrish C, Jupe SC, Bolwell GP (1995): Rapid changes in oxidative metabolism as a consequence of elicitor treatment of suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology* 27: 59–67.
- Salinas M, Xing S, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P (2012): Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta* 235: 1171–1184.
- Schieber M, Chandel NS (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 24: R453–R462.

- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G, Wagner A (2002): Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214: 821–828.
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS (2005): Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308: 1909–1911.
- Schuchmann MN, von Sonntag C (1978): The effect of oxygen on the OH-radical-induced scission of the glycosidic linkage of cellobiose. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 34: 397–400.
- Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge UI, Kunze R (2003): ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* 131: 16–26.
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P (2008): The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 67: 183–195.
- Schweikert C, Liskay A, Schopfer P (2000): Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* 53: 565–570.
- Si L, Chen J, Huang X, Gong H, Luo J, Hou Q, Zhou T, Lu T, Zhu J, Shangguan Y, Chen E, Gong C, Zhao Q, Jing Y, Zhao Y, Li Y, Cui L, Fan D, Lu Y, Weng Q, Wang Y, Zhan Q, Liu K, Wei X, An K, An G, Han B (2016): OsSPL13 controls grain size in cultivated rice. *Nature Genetics* 48: 447–456.
- Sies H (2017): Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* 11: 613–619.
- Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J (2014a): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* 32: 2–11.
- Smékalová V, Luptovčíak I, Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Doskočilová A, Takáč T, Vadovič P, Novák O, Pechan T, Ziemann A, Košútová P, Šamaj J (2014b): Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryogenic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *The New Phytologist* 203: 1175–1193.
- Sörensson C, Lenman M, Veide-Vilg J, Schopper S, Ljungdahl T, Grøtli M, Tamás MJ, Peck SC, Andreasson E (2012): Determination of primary sequence specificity of *Arabidopsis* MAPKs MPK3 and MPK6 leads to identification of new substrates. *The Biochemical Journal* 446: 271–278.
- Speckmann B, Steinbrenner H, Grune T, Klotz LO (2016): Peroxynitrite: From interception to signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 595: 153–160.

- Stief A, Altmann S, Hoffmann K, Pant BD, Scheible WR, Bäurle I (2014): *Arabidopsis* miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. *The Plant Cell* 26: 1792–1807.
- Stone JM, Liang X, Nekl ER, Stiers JJ (2005): *Arabidopsis* AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *The Plant Journal* 41: 744–754.
- Su J, Xu J, Zhang S (2015): RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends in Plant Science* 20: 405–407.
- Takáč T, Šamajová O, Vadovič P, Pechan T, Košútová P, Ovečka M, Husičková A, Komis G, Šamaj J (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: 5347–5361.
- Takáč T, Obert B, Rolčík J, Šamaj J (2016a): Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. *New Biotechnology* 33: 728–734.
- Takáč T, Vadovič P, Pechan T, Luptovčíak I, Šamajová O, Šamaj J (2016b): Comparative proteomic study of *Arabidopsis* mutants *mpk4* and *mpk6*. *Scientific Reports* 6: 28306.
- Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 19: 805–818.
- Takenaka K, Moriguchi T, Nishida E (1998): Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* 280: 599–602.
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000): A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* 2: 110–116.
- Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E, Provart NJ (2005): The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *The Plant Journal* 43: 153–163.
- Tripathi RK, Bregitzer P, Singh J (2018): Genome-wide analysis of the SPL/miR156 module and its interaction with the AP2/miR172 unit in barley. *Scientific Reports* 8: 7085.
- Tsuda K, Mine A, Bethke G, Igarashi D, Botanga CJ, Tsuda Y, Glazebrook J, Sato M, Katagiri F (2013): Dual regulation of gene expression mediated by extended MAPK activation and salicylic acid contributes to robust innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 9: e1004015.
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H (1999): A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell* 11: 1195–1206.

- Unte US, Sorensen A-M, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser, P (2003): *SPL8*, an SBP-Box Gene That Affects Pollen Sac Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15: 1009–1019.
- Van Breusegem F, Slooten L, Stassart JM, Moens T, Botterman J, Van Montagu M, Inzé D (1999): Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant and Cell Physiology* 40: 515–523.
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inzé D, Slooten L (1996): Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* 112: 1703–1714.
- Wang JW, Czech B, Weigel D (2009): miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138: 738–749.
- Wang H, Wang H (2015): The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits. *Molecular Plant* 8: 677–688.
- Whitaker C, Beckett RP, Minibayeva FV, Kranner I (2010): Alleviation of dormancy by reactive oxygen species in *Bidens pilosa* L. seeds. *South African Journal of Botany* 76: 601–605.
- Wu G, Poethig RS (2006): Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. *Development* 133: 3539–3547.
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2008): AtMKK1 mediates ABA-induced *CAT1* expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 54: 440–451.
- Xing Y, Cao Q, Zhang Q, Qin L, Jia W, Zhang J (2013): MKK5 regulates high light-induced gene expression of Cu/Zn superoxide dismutase 1 and 2 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 54: 1217–1227.
- Xing Y, Chen WH, Jia W, Zhang J (2015): Mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5)-mediated signalling cascade regulates expression of iron superoxide dismutase gene in *Arabidopsis* under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 66: 5971–5981.
- Xu M, Hu T, Zhao J, Park MY, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS (2016): Developmental Functions of miR156-Regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 12: e1006263.
- Xu Z, Mahmood K, Rothstein SJ (2017): ROS Induces Anthocyanin Production Via Late Biosynthetic Genes and Anthocyanin Deficiency Confers the Hypersensitivity to ROS-Generating Stresses in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 58: 1364–1377.
- Xue Y, Zhou F, Zhu M, Ahmed K, Chen G, Yao X (2005): GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Research* 33: W184–W187.
- Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D (2009): The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Developmental Cell* 17: 268–278.

- Yamakura F, Kawasaki H (2010): Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804: 318–325.
- Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O (2012): Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine* 53: 260–270.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2004): A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *Journal of Molecular Biology* 337: 49–63.
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007): Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 16369–16378.
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009): SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 347–361.
- Yan J, Chia JC, Sheng H, Jung HI, Zavodna TO, Zhang L, Huang R, Jiao C, Craft EJ, Fei Z, Kochian LV, Vatamaniuk OK (2017): *Arabidopsis* Pollen Fertility Requires the Transcription Factors CITF1 and SPL7 That Regulate Copper Delivery to Anthers and Jasmonic Acid Synthesis. *The Plant Cell* 29: 3012–3029.
- Yang Z, Wang X, Gu S, Hu Z, Xu H, Xu C (2008): Comparative study of SBP-box gene family in *Arabidopsis* and rice. *Gene* 407: 1–11.
- Yuasa T, Ichimura K, Mizoguchi T, Shinozaki K (2001): Oxidative stress activates ATMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant and Cell Physiology* 42: 1012–1016.
- Zhang Y, Schwarz S, Saedler H, Huijser P (2007): SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 63: 429–439.
- Zhang B, Liu X, Zhao G, Mao X, Li A, Jing R (2014): Molecular characterization and expression analysis of *Triticum aestivum* squamosa-promoter binding protein-box genes involved in ear development. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 571–581.
- Zhang J, Luo W, Zhao Y, Xu Y, Song S, Chong K (2016): Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species-dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice. *The New Phytologist* 211: 1295–1310.
- Zhong S, Chang C (2012): Ethylene Signalling: The CTR1 Protein Kinase. In: McManus MT (ed.): *Annual Plant Reviews Volume 44*, pp. 147-168. Wiley-Blackwell, Hoboken.

Zulawski M, Braginets R, Schulze WX (2013): PhosPhAt goes kinases – Searchable protein kinase target information in the plant phosphorylation site database PhosPhAt. *Nucleic Acids Research* 41: D1176–D1184.

9 Přílohy

Seznam příloh

Příloha 1: Data získaná z databáze ATTED-II (Target: TF).

Příloha 2: Pomocí GPS 3.0 zpracovaná data získaná z databáze ATTED-II.

Příloha 3: Experimentálně získané informace o fosforylaci AtSPL8/9/14 uvedené v databázi PhosPhAt 3.0.

Příloha 4: Obecná charakterizace struktury AtSPL se zaměřením na informace užitečné pro predikci a možnou interakci s MAPK.

Příloha 5: Lokalizace polohy T-DNA inzerce za pomoci překryvu navržených primerů.

Příloha 6: Restrikce (*Hind*III) 10 izolovaných plasmidů pro pGBDT7 a pGADT7 AD, vektory potenciálně nesoucí klonovanou cDNA *SPL7*.

Příloha 1: Data získaná z databáze ATTED-II (Target: TF). V tabulce uvedeno prvních dvacet (konsenzuálně) pozic CoexSearch seznamu vyhodnocených proteinů.

Kombinace	AGI	Zkratka	Function	
MPK3/6 + FSD1	1	At1g68840	ABI3VP1	related to ABI3/VP1 2
	2	At5g57660	C2C2-Colike	CONSTANS-like 5
	3	At1g25550	G2-like	myb-like transcription factor family protein
	4	At3g45260	C2H2	C2H2-like zinc finger protein
	5	At1g50440	C3H	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein
	6	At3g52800	C2H2	A20/AN1-like zinc finger family protein
	7	At1g08930	C2H2	Major facilitator superfamily protein
	8	At5g48150	GRAS	GRAS family transcription factor
	9	At5g47390	MYBrelated	myb-like transcription factor family protein
	10	At5g05090	G2-like	Homeodomain-like superfamily protein
	11	At5g67300	MYB	myb domain protein r1
	12	At1g63900	C3H	E3 Ubiquitin ligase family protein
	13	At2g22430	Homeobox	homeobox protein 6
	14	At1g25560	ABI3VP1	AP2/B3 transcription factor family protein
	15	At5g54680	BHLH	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
	16	At4g36730	bZIP	G-box binding factor 1
	17	At2g43060	BHLH	IL11 binding bHLH 1
	18	At1g22510	C3H	RING/U-box protein with domain of unknown function (DUF 1232)
	19	At1g50600	GRAS	scarecrow-like 5
	20	At4g37490	TCP	CYCLIN B1;1
MPK6 + FSD1	1	At3g17100	BHLH	sequence-specific DNA binding transcription factors
	2	At3g60080	C3H	RING/U-box superfamily protein
	3	At5g60850	C2C2-Dof	OBF binding protein 4
	4	At5g57660	C2C2-CO-like	CONSTANS-like 5
	5	At5g54680	BHLH	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
	6	At1g68840	ABI3VP1	related to ABI3/VP1 2
	7	At5g48150	GRAS	GRAS family transcription factor
	8	At2g40970	G2-like	Homeodomain-like superfamily protein
	9	At3g06590	BHLH	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
	10	At4g36730	bZIP	G-box binding factor 1
	11	At1g19000	MYB-related	Homeodomain-like superfamily protein
	12	At5g47390	MYB-related	myb-like transcription factor family protein
	13	At5g62000	ARF	auxin response factor 2
	14	At1g63900	C3H	E3 Ubiquitin ligase family protein
	15	At2g23780	C3H	RING/U-box superfamily protein
	16	At1g09250	BHLH	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
	17	At1g18330	MYB	Homeodomain-like superfamily protein
	18	At4g21550	ABI3VP1	VP1/ABI3-like 3
	19	At4g11140	AP2-EREBP	cytokinin response factor 1
	20	At5g11510	MYB	myb domain protein 3r-4

Příloha 1: Pokračování.

Kombinace	AGI	Zkratka	Function	
MPK3 + FSD1	1	At5g07580	AP2-EREBP	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
	2	At1g20823	C3H	RING/U-box superfamily protein
	3	At1g51700	C2C2-Dof	DOF zinc finger protein 1
	4	At1g68840	ABI3VP1	related to ABI3/VP1 2
	5	At1g21910	AP2-EREBP	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
	6	At3g59060	BHLH	phytochrome interacting factor 3-like 6
	7	At2g31230	AP2-EREBP	ethylene-responsive element binding factor 15
	8	At2g15580	C3H	RING/U-box superfamily protein
	9	At5g10380	C3H	RING/U-box superfamily protein
	10	At4g25470	AP2-EREBP	C-repeat/DRE binding factor 2
	11	At5g62470	MYB	myb domain protein 96
	12	At2g17040	NAC	NAC domain containing protein 36
	13	At5g61590	AP2-EREBP	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
	14	At5g08330	TCP	TCP family transcription factor
	15	At5g67300	MYB	myb domain protein r1
	16	At5g57660	C2C2-CO-like	CONSTANS-like 5
	17	At1g71030	MYB	MYB-like 2
	18	At5g18240	G2-like	myb-related protein 1
	19	At2g47070	SBP	squamosa promoter binding protein-like 1
	20	At2g02450	NAC	NAC domain containing protein 35

Příloha 2: Pomocí GPS 3.0 zpracovaná data získaná z databáze ATTED-II. Tak jako při hledání koexprimovaných proteinů, bylo považováno za významné prvních dvacet pozic v rámci vygenerovaného seznamu. Tyto proteiny (jejich sekvence) byly následně zpracovány pomocí GPS 3.0.

Kombinace	Výsledek
MPK6 x FSD1	1 AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
	2 AT3G60080.1 Symbols: no symbol available
	3 AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
	4 AT3G60080.1 Symbols: no symbol available
	5 AT1G18330.2 Symbols: EPR1, RVE7
	6 AT4G11140.1 Symbols: CRF1
	7 AT1G09250.1 Symbols: AIF4
	8 AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
	9 AT5G57660.1 Symbols: ATCOL5, COL5, BBX6
	10 AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
	11 AT5G60850.1 Symbols: AtDOF5.4, OBP4
	12 AT3G60080.1 Symbols: no symbol available
	13 AT3G60080.1 Symbols: no symbol available
	14 AT4G11140.1 Symbols: CRF1
	15 AT3G60080.1 Symbols: no symbol available
	16 AT5G60850.1 Symbols: AtDOF5.4, OBP4
	17 AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
	18 AT5G47390.1 Symbols: KUA1, MYBH
	19 AT5G57660.1 Symbols: ATCOL5, COL5, BBX6
	20 AT1G18330.2 Symbols: EPR1, RVE7
MPK3/6 x FSD1	1 AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
	2 AT3G45260.1 Symbols: BIB BALDIBIS
	3 AT1G50440.1 Symbols: no symbol available
	4 AT1G50440.1 Symbols: no symbol available
	5 AT1G50440.1 Symbols: no symbol available
	6 AT1G50600.1 Symbols: SCL5 scarecrow-like 5
	7 AT5G05090.1 Symbols: no symbol available
	8 AT5G05090.1 Symbols: no symbol available
	9 AT3G45260.1 Symbols: BIB BALDIBIS
	10 AT1G50440.1 Symbols: no symbol available
	11 AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
	12 AT5G05090.1 Symbols: no symbol available
	13 AT1G50440.1 Symbols: no symbol available
	14 AT2G43060.1 Symbols: AtIBH1, IBH1
	15 AT1G50440.1 Symbols: no symbol available
	16 AT5G05090.1 Symbols: no symbol available
	17 AT2G43060.1 Symbols: AtIBH1, IBH1
	18 AT1G25560.1 Symbols: EDF1, AtTEM1, TEM1
	19 AT1G08930.1 Symbols: ERD6
	20 AT2G43060.1 Symbols: AtIBH1, IBH1


Příloha 2: Pokračování

Kombinace	Výsledek
1	AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
2	AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
3	AT2G17040.1 Symbols: NAC036, anac036
4	AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
5	AT5G57660.1 Symbols: ATCOL5, COL5, BBX6
6	AT1G21910.1 Symbols: DREB26
7	AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
8	AT2G47070.1 Symbols: SPL1
9	AT1G68840.1 Symbols: AtRAV2, EDF2, TEM2, RAP2.8, RAV2
10	AT2G17040.1 Symbols: NAC036, anac036
11	AT5G67300.1 Symbols: MYBR1, ATMYBR1, ATMYB44, MYB44
12	AT2G47070.1 Symbols: SPL1
13	AT5G57660.1 Symbols: ATCOL5, COL5, BBX6
14	AT1G71030.1 Symbols: ATMYBL2, MYBL2
15	AT4G25470.1 Symbols: DREB1C, CBF2, ATCBF2, FTQ4
16	AT5G57660.1 Symbols: ATCOL5, COL5, BBX6
17	AT2G47070.1 Symbols: SPL1
18	AT2G47070.1 Symbols: SPL1
19	AT5G57660.1 Symbols: ATCOL5, COL5, BBX6
20	AT3G59060.2 Symbols: PIF5, PIL6

MPK3 x FSD1

Příloha 3: Experimentálně získané informace o fosforylaci AtSPL8/9/14 uvedené v databázi PhosPhAt 3.0. A – AtSPL8; B – AtSPL9; C – AtSPL14.


A

	Species:	Arabidopsis thaliana	Modifications	Peptide parameters
	Protein:	AT1G02065.1	K 4 ITRAQ144	Mascot_Score 29.45
	Peptide:	TTPKSPNDSGVK	S 5 phos	Enrichment IMAC / TiO2
	Mod. peptide:	TTP(K*)(pS)PNDSGV(K*)	K 12 ITRAQ144	Treatment ionizing radiation
	m/z (float) • Charge:	581.96588 • 3		Instrument LTQ-Orbitrap Velos
			Tissue rosette	CellCompartment total protein

B

	Species:	Arabidopsis thaliana	Modifications	Peptide parameters
	Protein:	AT2G42200.1	S 7 phos	Mascot_Score 64.24
	Peptide:	DNDNDMSPLNLGR		Enrichment IMAC / TiO2
	Mod. peptide:	DNDNDM(pS)PVLNLGR		Treatment ionizing radiation
	m/z (float) • Charge:	892.39435 • 2		Instrument LTQ-Orbitrap Velos
			Tissue rosette	CellCompartment total protein

C

	Species:	Arabidopsis thaliana	Modifications	Peptide parameters
	Protein:	AT1G20980.1	S 3 phos	Mascot_Score 59
	Peptide:	SGSPGGNYPMQVDNCTEDLSHAK	C 11 carb	Tissue cell culture
	Mod. peptide:	SG(pS)PGGNYPM(C*)QVDN(C*)TEDLSHAK	C 16 carb	Instrument LTQ-FT
	m/z (float) • Charge:	902.02307 • 3		CellCompartment plasma membrane
			Enrichment TiO2	Treatment v/v/lanase

Příloha 4: Obecná charakterizace struktury AtSPL se zaměřením na informace užitečné pro predikci a možnou interakci s MAPK. Analýza domény byla provedena pomocí SMART, kde informace o přítomné transmembránové doméně byla anotována také ELM. ELM bylo také použito pro odhalení MAPK dokovacích peptidů/sekvencí. V tabulce uvedeny i údaje získané softwarem GPS 3.0.

AtSPL		Doména (SMART)		Fosfopeptid (GPS 3.0)	Dokování (ELM)			Transmembránová doména (ELM)
AGI	Jméno	Jméno	Pozice		Jméno	Sekvence	Pozice	
At2G47070	AtSPL1	low complexity	53–62	SDSASDQSPSSSED	DOC_MAPK_gen_1	KKRRAVAI	68–75	836–858
		Pfam:SBP	106–180	DDTDVERSPPTNPA		KRRAVAI	69–75	
		low complexity	242–253	PSWIHQSSPPQTSRN	DOC_MAPK_MEF2A_6	RKLLNMFF	649–656	
		low complexity	339–356	AAGPAGLTPHIAAG		KNLVELLL	237–244	
		ANK	672–701	ILDWLSHSPTDMESY	RPGCIVLTI	400–408		
		ANK	713–743		VERSPPP	310–316		
transmembrane region	836–858		MOD_ProDKin_1	HQSSPPQ	331–337			
				SDQSPSS	346–352			
				LSHSPTD	388–394			
				TGFTPED	753–759			
At5G43270	AtSPL2	low complexity	44–58	FAKGIDTSPSLELSF	DOC_MAPK_MEF2A_6	KGLGLPVTL	138–146	Není
		low complexity	65–77	SIPQRLQTPHCQVEG	MOD_ProDKin_1	IDTSPSL	101–107	
		low complexity	148–159	TLASSSVSPVKKSKS		SSVSPVK	149–155	
		Pfam:SBP	169–243					

Příloha 4: Pokračování.

AtSPL		Doména (SMART)		Fosfopeptid (GPS 3.0)	Dokování (ELM)			Transmembránová doména (ELM)
AGI	Jméno	Jméno	Pozice		Jméno	Sekvence	Pozice	
At5G18830	AtSPL7	low complexity	55–67	AESELDPSPEESGSG	DOC_MAPK_FxFP_2	FVYP	436–439	763–782
		Pfam:SBP	138–212	PPLIPTQTPAESELD		KRHRVCL	155–161	
		transmembrane region	764–786	ERIQADCSPDSGGKE	DOC_MAPK_gen_1	KRVDVKL	423–429	
				IHFPPVLSPLPLLI		KCRFLVSF	461–468	
				*MSSLSQSPPPPEMD		RAEEEPSLIF	250–259	
				RVDVKLESPKLFVY	DOC_MAPK_MEF2A_6	RGSMTVYL	401–408	
				NDTKFERSPSNGDNK		KLESPKLQF	428–436	
				DIHRKHQSPIESKVN		KVTQLAVAI	785–793	
						LSQSPPP	4–10	
						PVLSPLL	56–62	
						PTQTPAE	67–73	
						LDPSPEE	76–82	
				FERSPSN	301–307			
				KLESPKL	428–434			
				KHQSPIE	667–673			
				ADCSPDS	715–721			
At1g02065	AtSPL8	Pfam:SBP	188–262	TGKTTPKSPNDSGVK		ITISPPL	46–52	Není
		low complexity	289–299	YGSTTTTTPYGASDP		TTTTPYG	92–98	
		low complexity	313–332	DHRHITISPLLSSF	MOD_ProDKin_1	SLSTPRC	182–188	
				GMANSLSTPRCQAEQ		GKTTPKS	275–281	
				DTGTGKTTPKSPNDS		TPKSPND	278–284	
		SGVKASSSPSSNAPP		ASSSPSS	289–295			
At2g42200	AtSPL9	low complexity	18–31	GGGTSFSSPEIMDTK		PVSSPSW	201–207	Není
		low complexity	43–69	VMRRPVSSPSWQINP		SFSSPEI	226–232	
		Pfam:SBP	74–148	VCGVHSKTPKVTVAG	MOD_ProDKin_1	NDMSPVL	314–320	
		low complexity	214–229	KDNDNDMSPVNLGR				

Příloha 4: Pokračování.

AtSPL		Doména (SMART)		Fosfopeptid (GPS 3.0)	Dokování (ELM)			Transmembránová doména (ELM)	
AGI	Jméno	Jméno	Pozice		Jméno	Sekvence	Pozice		
At1g27370	AtSPL10	low complexity	70–82	CNLASQSSPGDSSSN	DOC_MAPK_HePTP_8	LQVKPSTALEVPI	106–118	Není	
		Pfam:SBP	176–250	AVSMNLLTPSVVARK	DOC_MAPK_MEF2A_6	KPSTALEVPI	109–118		
		low complexity	364–371	DSQGIKHTPVAEPPP STSINSSPEDKRCN	MOD_ProDKin_1	NSSSPED	79–85		
					SQSSPGD	92–98			
					NLLTPSV	152–158			
					IKHTPVA	376–382			
At1g27360	AtSPL11	low complexity	70–82	CKLASESSPGDSCSN	DOC_MAPK_HePTP_8	VQVKAPTALEVSV	106–118		Není
		Pfam:SBP	175–249	AVSMKLLTPSVVAGK	DOC_MAPK_MEF2A_6	KAPTALEVSV	109–118		
		low complexity	319–330	STSINSSPEAKRCK	MOD_ProDKin_1	NSSSPEA	79–85		
					SESSPGD	92–98			
					KLLTPSV	152–158			
At3G60030	AtSPL12	low complexity	47–55	SDSASDQSPSSSSGD		KKKKRRAVTV	72–81	882–904	
		low complexity	61–77	EEGTVDPSDAALSE		KKKRAVTV	73–81		
		low complexity	97–110	TTDIERSPPPTNPA		KKRRAVTV	74–81		
		Pfam:SBP	127–201	HQDSRQSSPPQTSRR	DOC_MAPK_gen_1	KRRAVTV	75–81		
		low complexity	267–276	VEMLLRFSPPKKNQT		RRLESTLEF	622–630		
		low complexity	338–349	KHHSVSETPWQEVYA		RFKFLIEF	674–681		
		low complexity	352–363	EHKQEKRSMPDSSSL		KKLLNILF	692–699		
		low complexity	368–400	ILNWLHAHTPTDMESY		RPGCIVLTI	441–449		
		low complexity	461–480	SRDNTGFTPEDYARL	DOC_MAPK_MEF2A_6	KKLLNILF	692–699		
		ANK	713–743			KEHVVVNI	828–835		
		ANK	757–787			VSETPWQ	303–309		
		transmembrane region	882–904			ERSSPPP	350–356		
				RQSSPPQ	371–377				
				SDQSPSS	387–393				
				MOD_ProDKin_1	LAHTPTD	429–435			
					VDPSPDA	704–710			
					TGFTPED	797–803			
					EKRSPMD	846–852			

Příloha 4: Pokračování.

AtSPL		Doména (SMART)		Fosfopeptid (GPS 3.0)	Dokování (ELM)			Transmembránová doména (ELM)
AGI	Jméno	Jméno	Pozice		Jméno	Sekvence	Pozice	
At5G50570	AtSPL13	low complexity	80–89	FDQEPDLSPMDGSIS	MOD_ProDKin_1	PDLSPMD	19–25	Není
		Pfam:SBP	101–175	IMFPISSPNSTRSI		VGSSPAK	239–245	
		low complexity	295–316	QSYVVGSPAKTGIM		ISSPNS	252–258	
				VCDVHSKTPVVTING				
		low complexity	93–99	ASSGSDYSPPSLNSD	DOC_MAPK_gen_1	KRNKQVSLNI	936–945	
		Pfam:SBP	120–194	SLQLFTSSPEDESRP		RNKQVSLNI	937–945	
		low complexity	211–231	ELFPLQASPETMRSK	DOC_MAPK_HePTP_8	LEQKLLQRLGVLL	564–576	
		low complexity	359–380	EDRSPSSPVMQELF		LADKRNKQVSLNI	933–945	
		low complexity	406–417	SPELISVSPVAVVAG		KINALPLPM	260–268	
		ANK	823–852	RSSSSNQSPQSDSDS		RSSLSLQL	385–392	
ANK	869–899	SKNHKNSSPRTGCLP	DOC_MAPK_MEF2A_6	RTGCLPEL	455–463			
low complexity	966–974	SNPVEDRSPSSPVM		RPGCVVLSV	544–552			
transmembrane region	996–1018	KSWRTWNSPELISVS		KLLQRLGVLL	567–576			
		GSQRLFPTPIHSML		KRNKQVSLNI	936–945			
		NKKVRSGPSGGNYPM		RNKQVSLNI	937–945			
At1g20980	AtSPL14				DOC_MAPK_RevD_3	AQVAAPMFIHQSLGRKR	6–22	996–1018
						RSGSPGG	109–115	
						PVGSPAV	242–248	
						NGASPST	297–303	
						GSSSPDA	315–321	
						SNQSPSQ	369–375	
						FTSSPED	393–399	
					MOD_ProDKin_1	EDRSPSS	421–427	
						PSSSPVM	425–431	
						LQASPET	437–443	
						KNSSPRT	450–456	
						SDYSPPS	490–496	
						VAMSPAA	554–560	
				LQNSPSD	576–582			
				TWNSPEL	613–619			

Příloha 4: Pokračování.

AtSPL		Doména (SMART)		Fosfopeptid (GPS 3.0)	Dokování (ELM)			Transmembránová doména (ELM)
AGI	Jméno	Jméno	Pozice		Jméno	Sekvence	Pozice	
At1g20980	AtSPL14				MOD_ProDKin_1	ISVSPVA	620–626	996–1018
						TGQTPYS	909–915	
At3g57920	AtSPL15	low complexity	7–26	IHQQLQTPTNTWRP	MOD_ProDKin_1	QLQTPTN	236–242	Není
		Pfam:SBP	59–133	KSNSHYMSPVQSISE		HYMSPVS	297–303	
				NTRAYDSSPQHFNWS	YDSSPQH	343–349		
				MAQPPPISTHQPPIS				
At1g76580	AtSPL16	low complexity	66–77	LPELITVSP LAVVAG	DOC_MAPK_gen_1	KKGLDLNL	36–43	947–969
		Pfam:SBP	82–156	NYKDTSTSPRTSCLP		RLSKSWRTLNL	569–579	
		low complexity	266–278	ASSGSDYSPSLNSN		RLTKVDELNV	631–640	
		low complexity	368–379	SLQLFTSSPEESRP		RSREEVLCF	706–714	
		low complexity	640–652	EDRSPSSSPVMQELF	KKGLDLNL	36–43		
		ANK	784–813	GFNDVEGTPVDLTRP	KIKALPLPM	218–226		
		ANK	826–856	SKKVRSGSPGSGGGG	DOC_MAPK_MEF2A_6	RSSLQL	347–354	
		ANK	866–902	SNPVEDRSPSSPVM	RTSCLPEL	419–427		
		low complexity	911–922	RTSSTNHSPSQYSDS	RPGCVILSV	509–517		
		transmembrane region	947–969	GSRRLFPTPIHSML	VEGTPVD	50–56		
				ELFPLHTSPETRRYN	RSGSPGS	65–71		
					TNGSPGV	200–206		
			EQSPMN	244–250				
			GASSPST	257–263				
			TNHSPSQ	331–337				
			MOD_ProDKin_1	FTSSPEE	355–361			
				EDRSPSS	383–389			
				PSSSPVM	387–393			
				LHTSPET	399–405			
				TSTSPRT	414–420			
				SDYSPPS	455–461			
				ITVSPLA	583–589			

Příloha 5: Lokalizace polohy T-DNA inserce (zeleně) za pomoci překryvu navržených prumerů. V obrázku zdůrazněna poloha párů prumerů SQ1-RT-Fwd-2 a SQ1-RT-Rev-2 (oranžově) a SQ1-RT-Fwd-4 a SQ1-RT-Rev-4, potažmo SQ1-RT-Fwd-5 a SQ1-RT-Rev-5 (červeně).

```

GAAAAGGTGCTCTGTTGCGTTCAAAGGCTAGCTTTAGGGCTATATATTAAGAGGTTTCCAGAGGTTTTTTTTGGATTATAGGCATCT
GTGTTTGGCTTACATGGATCCTTTTTTTAAGGTTTTCTGGGCAAGACTAATTGATTAGGACCAAAGTTTTGTGTTTTATTGTTTGGGA
TCTACAAGATCAATTAGGCTGTTGTTGAATTGGATCGAGTATGGAAGCTAGAATTGATGAAGTGGGGAGGCTCAACAATTCATG
GGTCCGTAGGTAAAAGAAGTGTGGAGTGGGATTTGAATGATTGGAATGGGATGGTGATCTCTTCTCGCCACCCAACTACTAGGGG
ACGTCAGTTTTTCCCTCTAGGAACTCGTCCAATAGCTCCTCCTCCTGCTCTGATGAAGGCAATGACAAGAAGAGGAGGCTGTGCGC
ATTCAAGGAGACACTAATGGTGTCTTACTTTGAATCTTAATGGTGAAAGTGATGGCCTTTTTTCTGCCAAAGAAGACCAAAATCCGGAG
CCGTTTGTGAGGTCGAAAACGTGAAGCTGATCTTAGTAAAGTTAAGGATTATCATAGACGCCATAAGGTCGTGAGATGCATTCCAA
GGCTACTAGTGCCACTGTGCGAGGTATCTTGACGCGCTTTTGTGACCAATGTAGTAGGTTCCATCTTCTCAGGAGTTTGATGAAGGA
AAGAGAAGTTGTCTAGACGTTTGGCTGGCCATAATAAACGTCGGAGGAAAACAAATCCCGAACCTGGCGCTAACGGGAATCCTAGTG
ATGATCACTCAAGCAACTATCTCTGATTACTCTCTGAAGATACTCTCCAATATGCATAACCATAACCGGTGATCAAGATTTGATGTC
TCATCTCTGAAGAGCCTCGTAAGCCATGCTGGCGAACAGTTAGGGAAAACTTAGTTGAACTTCTTCTACAAGGAGGAGGATCTCAA
GGTTCCTTAAATATGGAACTCGGCTTTGCTTGGGATTGAGCAAGCTCCTCAAGAGGAGTTAAAGCAATTTTCGGCTCGGCAAGATG
GGACAGCTACCGAGAACGATCAGAAAAACAAGTCAAAATGAATGATTTTGAATGATATCTATATAGACTCAGATGACACAGA
CGTCGAAAGATCTCCTCCTCCAACGAAATCCAGCGACCGATTCTCTGATTATCCTTCATGGATACATCAGTCTAGTCCGCCTCAGACA
AGTAGGAATTCAGATTCAGCATCTGACCACTCACCTCAAGTCTAGTGAAGATGCTCAGATGCGCACAGCCCGGATTTGTTTCAAAC
TATTTGGGAAAGAGCCAAATGAATTTCTATTGTCTTACGAGGACAGATTTCTGACTGGTTATCGCATAGTCCAACCTGACATGGAGAG
CTACATAAGACCTGGCTGTATCGTATTGACCATCTATCTTCTGCAAGCTGAAACTGCTTGGGAAGAACTTCAGACGATCTGGGTTTT
AGCTTAGGGAAGCTTCTAGATCTCTCGATGATCCCTTGTGGACAACCTGGATGGATTTATGTTAGGGTGCAGAACCAACTTGCATTTG
TATATAACGGTCAGGTTGTCTGTGACACTTCATTTGCTCTAAAAAGTCTGTATTATAGTCACATCATTAGCGTTAAACCGCTTGCTAT
AGCTGCAACGAGAGAAGGCTCAATTTACAGTTAAAGGCATGAATCTCCGTCAGCGTGGCAACAAGTTACTTTGTTCTGTTGAAGGAAAA
TACTTGATTCAGGAAACAACACAGGATTCGACGACAGGAGGATGACGATTTCAAGGACAACAGTGAGATTTGTTGAGTGTGTAACCT
TCTCTGTGATATGCCATATTTAGTGGTCGAGGATTCATGGAGATTTGAAGACCAAGGACTCAGTAGCAGCTTCTTCCCTTCTTAGT
GGTTGAAGATGACGATGTTTGTCTGAAATCCGTATACTTGAACCACATTAGAGTTCACTGGAACCTGATCTGCTAAGCAAGCTATG
GATTTACATACATAAAATCGGTTGGCTTCTTACAGAAGTAAACTTGGGGAAATCAGACCCAAATCCAGGCGTTTTCCCATTAATACGCT
TCCAGTGGCTAATCGATTTCTCAATGGATCGAGAGTGGTGGCTGTGATCAGAAGCTATTAACAATGTTCTTGTGATGGAGCTGTTGG
TGAATTTCTTCCCTCTAATGCCACACTGTCAGAACTGTGCCCTTCTTCCAGAGCCGTTGAGGAAAACTCTAAGCCTATGGTTGAA
ATGCTCTTGAGATATATCCCAAGCAACAAGAAACAGCTTGTTTAGACCCGATGCTGCTGGTCCAGCCGGCTTAACACCTCTTCATA
TTGACGCTGGTAAAGACGGTTCAGAAGATGTTGGATGCGCTAACAGAAGATCCTGCAATGGTGGGATTAAGCGTGAAGACAT

```

Příloha 6: Restrikce (*Hind*III) 10 izolovaných plasmidů pro pGBDT7 (A) a pGADT7 AD (B), vektory potenciálně nesoucí klonovanou cDNA *SPL7*. 1–10 – izolované plasmidy; pGB – vektor pGBDT7 (4937, 1498 a 868 bp); pGA – vektor pGADT7 AD (7187 a 800 bp); M – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

