

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Petr Šesták

Role β -podjednotky komplexu asociovaného s nascentním polypeptidem (NAC) při odpovědi
huseníčku rolního na různé abiotické stresy

The role of the nascent polypeptide-associated complex (NAC) subunit β in *Arabidopsis*
thaliana response to various abiotic stresses

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Jan Fíla, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 12. 2023

.....
Petr Šesták

Poděkování

Děkuji mému školiteli RNDr. Janu Fílovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivý přístup a pomoc, kterou mi poskytl při zpracování této diplomové práce, prof. RNDr. Fatimě Cvrčkové, Dr.rer.nat. za cenné rady ke statistickému zpracování dat, Mgr. Aleně Náprstkové za ochotu, vstřícnost a sdílení mnoha praktických zkušeností s přípravou klonovacích vektorů a provedením RT-qPCR a Mgr. Boženě Klodové za rady při přípravě SDS gelů a zpracování RT-qPCR dat. Také chci poděkovat všem členům Laboratoře biologie pylu za velmi příjemné pracovní prostředí. Dík patří rovněž mé rodině za jejich podporu během studia.

Abstrakt

Komplex asociovaný s nascentním polypeptidem (NAC) je heterodimerní komplex složený z α - a β -podjednotky. Je konzervovaný napříč eukaryotními organismy a byl nalezen i u archeí. Tento komplex se váže na nově syntetizované proteiny vystupující z ribozomu a podílí se na jejich cílení do endoplasmatického retikula. U rostlin je komplex NAC studován v souvislosti s odolností vůči různým abiotickým stresům. V naší laboratoři jsme dříve charakterizovali T-DNA inserčního mutanta huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v obou genech kódujících NAC β , který vykazoval řadu fenotypových defektů. Mezi nimi se objevil například větší počet květních orgánů, zhoršená klíčivost pylových zrn a tvorba kratších šesulí s menším počtem obsažených semen.

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat roli β -podjednotky komplexu NAC u huseníčku rolního při klíčení semen za osmotického a solného stresu. Prokázali jsme, že absence NAC β vede ke snížení klíčivosti semen a k prodloužení doby klíčení, stejně jako nadexprese této podjednotky. Dále jsme studovali, zda stresové podmínky ovlivňují hladinu transkriptu jednotlivých genů pro obě podjednotky NAC za využití metody RT-qPCR. Abychom zjistili, jakými molekulárními mechanismy by mohl studovaný komplex ovlivňovat odpověď rostliny na stresové podmínky, rozhodli jsme se ověřit jeho chaperonovou aktivitu provedením testu holdázové aktivity.

Klíčová slova: *Arabidopsis thaliana*, komplex asociovaný s nascentním polypeptidem, NAC, osmotický stres, solný stres, chaperon

Abstract

Nascent polypeptide-associated complex (NAC) represents a heterodimeric complex composed of an α - and a β -subunit. It is conserved in eukaryotic organisms and has also been found in archaea. This complex binds to newly synthesized proteins emerging from the ribosome and participates in their targeting to the endoplasmic reticulum. In plants, the NAC complex has been studied in the context of tolerance to various abiotic stresses. In our laboratory, we have previously characterized a T-DNA insertion mutant of *Arabidopsis thaliana* in both NAC β -encoding genes that exhibited a number of phenotypic defects. These included for instance the appearance of more floral organs, reduced pollen grain germination, and the production of shorter siliques with less seeds inside.

The aim of this diploma thesis was to characterize the role of the NAC β subunit in *Arabidopsis thaliana* during seed germination under osmotic and salt stress. We have shown that the absence of NAC β leads to a reduced seed germination and a prolonged germination time, as does overexpression of this subunit. We further studied whether stress conditions affect the transcript levels of individual genes encoding for both NAC subunits by RT-qPCR. In order to investigate the molecular mechanisms by which the studied complex could influence the plant response to stress conditions, we decided to verify its chaperone activity by a holdase assay.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, nascent polypeptide-associated complex, NAC, osmotic stress, salt stress, chaperone

Seznam použitých zkratek

BTF3	bazická transkripční faktor 3, z angličtiny <i>basic transcription factor 3</i>
Col-0	Columbia-0
CS	citrátsyntáza
DNA, cDNA	deoxyribonukleová kyselina, komplementární DNA (z angličtiny <i>complementary DNA</i>)
dNTP	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfát
eEF1 α	eukaryotní elongační faktor 1 α
eIF1	eukaryotní iniciační faktor 1
ER	endoplasmatické retikulum
GFP	zelený fluorescenční protein (z angličtiny <i>green fluorescent protein</i>)
GroEl	jiný název pro protein HSP 60 u bakterií
GTP	guanointrifosfát
HSP	protein teplotního šoku (z angličtiny <i>heat shock protein</i>)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAC	komplex asociovaný s nascentním polypeptidem (z angličtiny <i>nascent polypeptide associated complex</i>)
PABP	z angličtiny <i>poly(A)-binding protein</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angličtiny <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	polyethylenglykol
RAC	komplex asociovaný s ribozomem (z angličtiny <i>ribosome associated complex</i>)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT-qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase (z angličtiny <i>real time quantitative PCR</i>)
SRP	z angličtiny <i>signal recognition particle</i>
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UBA	doména vázající se na ubiquitin (z angličtiny <i>ubiquitin-associated domain</i>)
WT	divoký typ (z angličtiny <i>wild type</i>)

Obsah

Úvod	8
1 Cíle a hypotézy	9
2 Literární přehled	10
2.1 Translace u eukaryot	10
2.2 Proteiny interagující s nascentním polypeptidem na ribozomu	13
2.3 Komplex asociovaný s nascentním polypeptidem	15
2.4 Komplex asociovaný s nascentním polypeptidem u rostlin	19
3 Materiál a metodika	23
3.1 Kultivace rostlin v podmínkách <i>in vitro</i>	23
3.2 Kultivace rostlin v půdním substrátu	25
3.3 Extrakce DNA a genotypování rostlin	25
3.4 Kvantitativní PCR v reálném čase	27
3.5 GoldenBraid klonování	31
3.6 Příprava transformovaných linií rostlin	38
3.7 Exprese rekombinantního proteinu v <i>E. coli</i>	39
3.8 Izolace proteinů	40
3.9 Imunoprecipitace	40
3.10 SDS-PAGE elektroforéza	41
3.11 Western blot	42
3.12 Test holdázové aktivity	43
4 Výsledky	45
4.1 Vliv osmotického a solného stresu na klíčivost semen	45
4.2 Testování holdázové aktivity podjednotek komplexu NAC	58
5 Diskuze	67
5.1 Absence i nadexprese NAC β za stresových podmínek vede k nižší klíčivosti semen	67
5.2 Nedostatečná koncentrace exprimovaných proteinů pro použití v testu holdázové aktivity	72
5.3 Proteiny NAC α vykazují na Western blotu zvýšení své molární hmotnosti	74
5.4 Test holdázové aktivity a další možnosti výzkumu	75
6 Závěr	77
Seznam použité literatury	78

ÚVOD

Translace je proces, při kterém jsou v buňce syntetizovány nové proteiny za využití ribozomů a širokého spektra dalších proteinů, které dokáží translaci ovlivnit. Jedním z těchto proteinů je komplex asociovaný s nascentním polypeptidem (NAC). Tento komplex je společný pro všechny eukaryotní organismy (shrnuto v Kogan and Gvozdev, 2014) a archea (Makarova *et al.*, 1999) a skládá se z α a β podjednotky (Wiedmann *et al.*, 1994). Důvody pro jeho studium jsou jeho zapojení do translace, podíl na cílení proteinů do endoplazmatického retikula (Wiedmann *et al.*, 1994) a jeho nezbytnost pro embryonální vývoj živočichů (Deng and Behringer, 1995; Markesich *et al.*, 2000). Kromě živočichů je NAC studován i u rostlin, kde je sledována jeho role při odpovědi na různé abiotické stresy (Wang *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2013).

V genomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) se nachází pět paralogů pro NAC α podjednotku a dva pro podjednotku NAC β . Během dřívějšího výzkumu v Laboratoři biologie pylu byla získána křížením dostupných T-DNA inserčních linií homozygotní mutantní linie *nac β 1nac β 2*, u které došlo k vyřazení obou genů kódujících β -podjednotku (Fíla *et al.*, 2020). Tyto rostliny vykazovaly značné defekty ve fenotypu oproti rostlinám divokého typu. Měly opožděný růst, listy obsahovaly menší množství chlorofylu a květy měly abnormální počet květních orgánů. Mimo to měl pyl těchto rostlin zhoršenou klíčivost a pylové láčky cílily méně efektivně zárodečné vaky. To vedlo ke tvorbě kratších šešulí s menším počtem semen (Fíla *et al.*, 2020).

Abychom lépe porozuměli funkci komplexu NAC u huseníčku rolního, rozhodli jsme se prostudovat vliv osmotického a solného stresu na semena *nac β 1nac β 2* vysetá v podmínkách *in vitro*. Následně jsme testovali stejné podmínky na rostliny, které nadexprimovaly gen kódující NAC β 1, nebo NAC β 2. Očekávali jsme, že absence β -podjednotky povede ke snížení klíčivosti, a naopak její nadexprese zvýší životaschopnost semen vystavených stresovým podmínkám. Jako další cíl jsme si stanovili, že provedeme s podjednotkami komplexu NAC test holdázové aktivity a dokážeme tak jeho schopnost chránit další proteiny před denaturací zapříčiněnou neoptimálními podmínkami prostředí.

1 CÍLE A HYPOTÉZY

Tato práce je součástí dlouhodobého výzkumu probíhajícího v Laboratoři biologie pylu, který si klade za cíl funkčně charakterizovat komplex asociovaný s nascentním polypeptidem (NAC) u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Po dříve provedené fenotypové charakterizaci mutantní linie *nacβ1nacβ2* jsme se zaměřili na roli podjednotky NACβ při stresu. Cílem této práce se tak stalo testování hypotézy, zda komplex NAC napomáhá rostlinám huseníčku rolního přežít při vystavení osmotickému a solnému stresu díky své chaperonové aktivitě. Při testování naší hypotézy jsme testovali následující hypotézy:

- Absence podjednotky NACβ vede ke snížení klíčivosti semen při vystavení osmotickému a solnému stresu. Nadměrná exprese genu kódujícího NACβ zlepšuje schopnost přežití semenáčků za stresových podmínek.
- Komplex NAC je přímo zapojen do odpovědi semenáčků *A. thaliana* na abiotický stres, proto se mění exprese genů kódujících jednotlivé podjednotky komplexu NAC při stresu.
- Podjednotky komplexu NAC chrání proteiny v buňce před agregací díky své chaperonové aktivitě.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

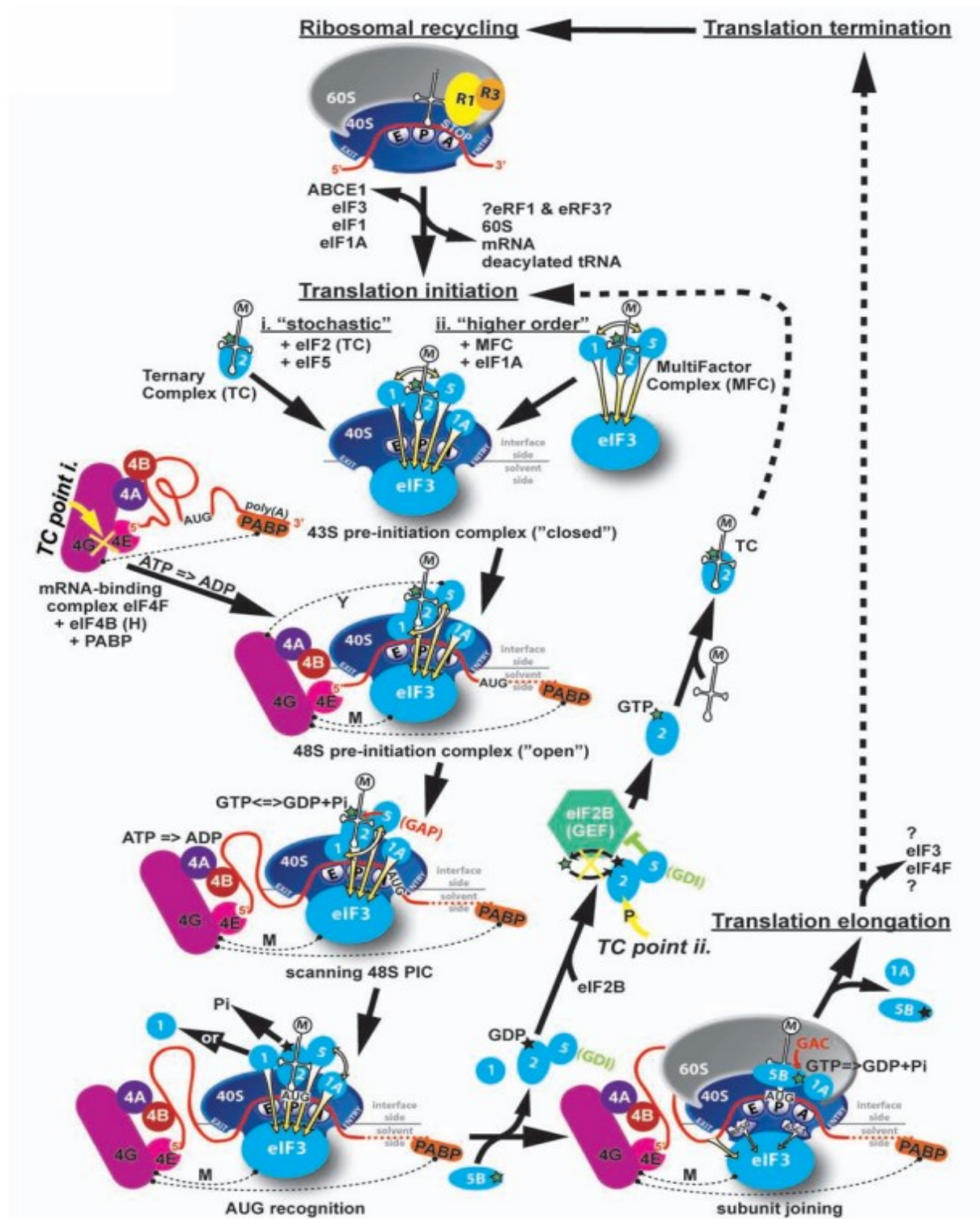
2.1 Translace u eukaryot

Translace je jedním ze základních procesů v živých organismech (Crick, 1970), který zajišťuje přepis genetické informace kódované v mRNA (z angličtiny *messenger RNA*) do funkčního proteinu. Translace se u eukaryotických organismů odehrává v cytoplazmě, plastidech a mitochondriích a sestává z celé řady komponentů jako jsou ribozomy, transferová RNA (tRNA), iniciační, elongační a terminační faktory a řada dalších proteinů.

Translace probíhá na ribozomech, což jsou ribonukleoproteinové struktury. Eukaryotický ribozom je v průběhu translace složen ze dvou podjednotek, malé podjednotky 40S a velké podjednotky 60S. Podjednotka 40S je u rostlin složena z až 30 různých proteinů a 18S ribozomální RNA (rRNA) (shrnutí v Sáez-Vásquez and Delseny, 2019). Velká podjednotka 60S je tvořena 40-48 ribozomálními proteiny, 25S-26S rRNA, 5S rRNA a 5,8S RNA (shrnutí v Sáez-Vásquez and Delseny, 2019). Na ribozomu rozeznávána tři funkční místa: A-aminoacylové, P-peptidylové a E-exitové (shrnutí v Wilson and Cate, 2012). Samotný proces translace pak probíhá ve čtyřech krocích, kterými jsou iniciace, elongace, terminace a recyklace ribozomu.

Iniace translace je závislá na proteinech zvaných iniciační faktory, které řídí sestavení translačního aparátu. Jedním z nich je iniciační faktor 2 (eIF2). Když je eIF2 aktivovaný navázáním guanosintrifosfátu (GTP), tak se váže s iniciační methionyl tRNA, čímž je zformován ternární komplex. Malá ribozomální podjednotka 40S je aktivována navázáním iniciačních faktorů eIF1, eIF1A, eIF3 a eIF5, a spolu s ternárním komplexem tvoří 43S preiniciační komplex (shrnutí v Hinnebusch, 2014) (Obr. 1). Preiniciační komplex následně nasedá na 5' konec mRNA, která nese na svém 3' konci navázaný multipodjednotkový iniciační faktor složený z eIF4F a eIF4B a PABP proteinu (z angličtiny *poly(A)-binding protein*). Následuje skenování mRNA (shrnutí v Hinnebusch, 2017). Preiniciační komplex 43S se poté váže na mRNA, která prochází tunelem na malé podjednotce a dostává se tak do blízkosti iniciační tRNA, která hledá start kodon. Během skenování se mRNA pohybuje preiniciačním komplexem dokud iniciační methionyl tRNA nerozpozná start kodon. Když je start kodon nalezen, dojde k navázání podjednotky 60S a vytvoření funkčního ribozomu 80S. Během

tohoto procesu dojde k uvolnění většiny iniciačních faktorů s výjimkou eIF1A, eIF3 a eIF4F (shrnutí v Merrick and Pavitt, 2018).



Obrázek 1: Schéma kanonické translační dráhy u eukaryot s detailně znázorněnými fázemi iniciace translace a recyklace ribozomů. Tento obrázek kombinuje poznatky z kvasinek i savců. Upraveno podle Valasek, 2012.

Po úspěšném nalezení iniciačního kodonu následuje elongace peptidického řetězce. Proces elongace začíná s iniciační methionyl tRNA na P místě ribozomu a do A místa se váže aminoacyl tRNA odpovídající překládanému kodonu. Jakmile je tRNA navázána v A místě, dojde k vytvoření peptidové vazby mezi aminokyselinami. Tvorba vazby je katalyzována peptidyltransferázovým centrem velké ribosomální podjednotky za využití energie z hydrolyzy GTP (shrnutí v Xu et al., 2022). Hydrolyza GTP způsobí disociaci eEF1A z A místa ribozomu, přičemž použitá eEF1A je recyklována eukaryotickým elongačním faktorem 1 B (eEF1B), který na eEF1A vymění GDP za GTP. Elongační faktor 2 s navázaným GTP se váže na ribozom po syntéze peptidické vazby a způsobí posun ribozomu o 3 nukleotidy po mRNA. Současně s tím dojde k posunu tRNA z A místa do P místa a předchozí tRNA z P místa do E místa. Deacylovaná tRNA je z E místa odstraněna L1 výběžkem ribozomu při konformační změně způsobené hydrolyzou GTP. Prázdné A místo je připraveno k příjmu další aminoacyl-tRNA a ribozom je tak připraven k dalšímu kolu elongace (shrnutí v Dever et al., 2018).

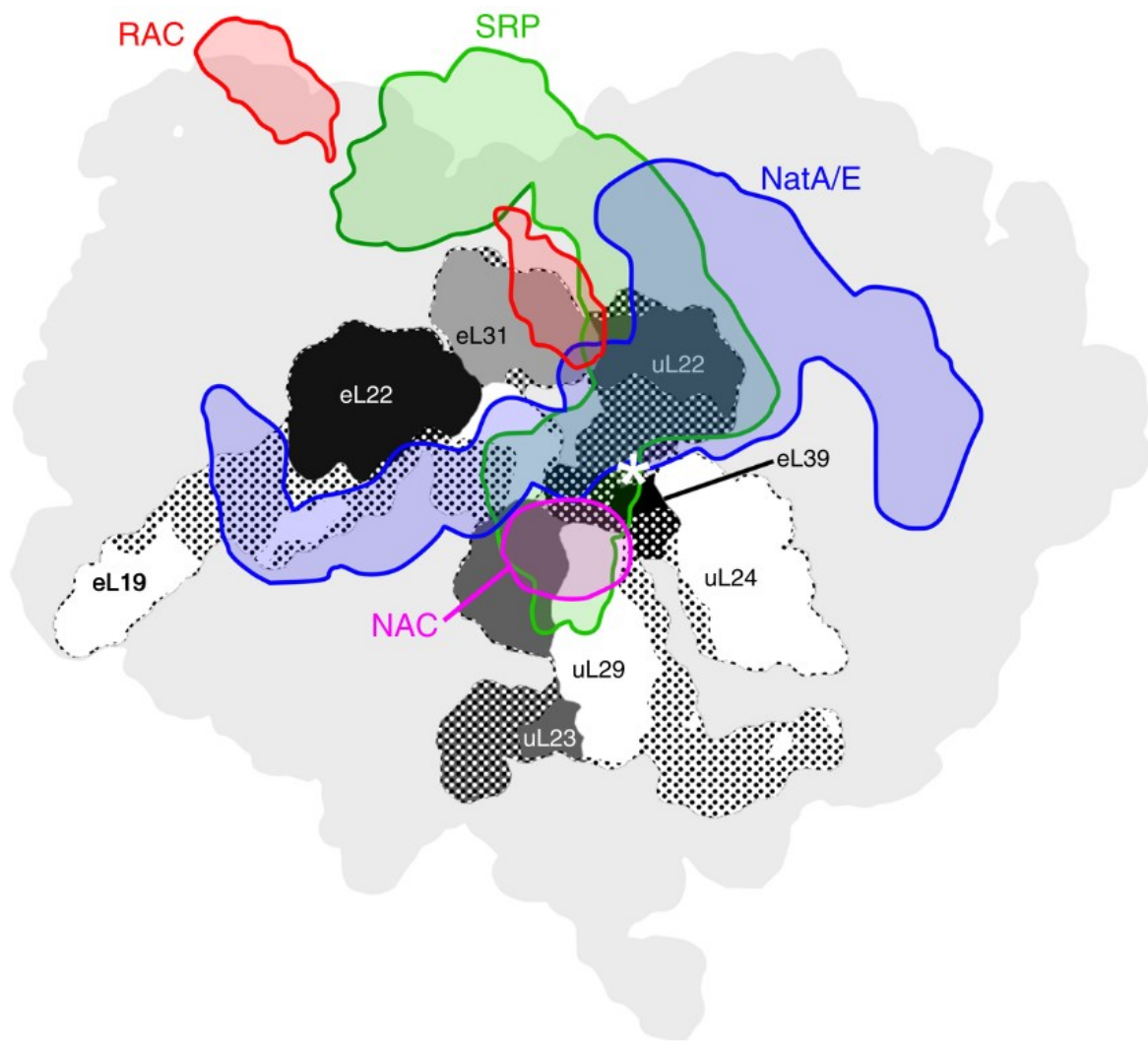
Proces elongace pokračuje, dokud není rozpoznán jeden ze tří terminačních kodonů. Všechny tyto kodony jsou u eukaryot rozpoznávány uvolňovacím faktorem 1 (z angličtiny *release factor 1*; eRF1). Když je terminační kodon v A místě ribozomu, naváže se do tohoto místa eRF1 společně s eRF3, na kterém je připojeno GTP (shrnutí v Hellen, 2018). Na to reaguje peptidyltransferázové centrum hydrolyzou GTP a připojením molekuly vody na karboxylový konec vzniklého polypeptidu. Tím je polypeptid uvolněn z ribozomu a deacylovaná tRNA přesunuta do E místa, odkud rovněž opustí ribozom (shrnutí v Blanchet and Ranjan, 2022). Následuje recyklace částí translačního aparátu, kterou spouští protein ABCE1 (z angličtiny *ATP-binding cassette sub-family E member 1*). Ten se váže na eRF1 ještě během jeho pobytu na A místě a spolu s ním je přenesen na P místo, kde od sebe oddělí ribosomální podjednotky. Protein ABCE1 společně s eIF1A, eIF2 a eIF3 zůstává navázaný na malé ribosomální podjednotce, kde zabraňují navázání velké podjednotky. Mezitím je odstraněna navázaná mRNA za pomoci iniciačních faktorů eIF1, eIF1A a eIF3. Tyto iniciační faktory se mohou oddělit, nebo zůstat navázané na 40S podjednotce, čímž urychlí její znovupoužití pro další translaci (shrnutí v Nürenberg-Goloub and Tampé, 2019).

2.2 Proteiny interagující s nascentním polypeptidem na ribozomu

Již v průběhu elongační fáze translace dochází k interakci nově vznikajících polypeptidů s celou řadou dalších proteinů, které mají za úkol zajistit jejich správné sbalení (angl. folding), zacílení do různých buněčných kompartmentů, nebo kontrolovat kvalitu translace. Všechny tyto interakce zabraňují hromadění špatně sbalených, nebo nefunkčních proteinů a udržují tak proteostázi v buňce.

Cílení proteinů do jednotlivých kompartmentů je u eukaryotických organismů zajišťováno dvěma cestami. První z nich, nazývaná posttranslační, zajišťuje přesun proteinů po skončení translace z cytoplazmy. Tyto proteiny obsahují aminokyselinové sekvence, které zajistí jejich transport do mitochondrií, chloroplastů, nebo peroxisomů. Signální sekvence je po doručení proteinu odštěpena a protein nabývá své funkční konformace (shrnutí v Pizarro and Norambuena, 2014). Proteiny mohou být transportovány i tzv. kotranslačně, tedy již v průběhu své syntézy i s celým translačním aparátem. Jedním ze systémů zajišťujících kotranslační transport jsou SRP částice (z angličtiny *signal recognition particle*), které rozpoznávají signální sekvenci na N konci nově syntetizovaného proteinu. SRP částice se naváže na ribozom u výstupního tunelu a dočasně pozastaví translaci. Translační aparát je poté transportován k endoplazmatickému retikulu (ER), kde SRP částice interaguje s SRP receptorem na membráně ER. Nascentní polypeptid je posléze syntetizován přímo do ER (shrnutí v Pool, 2022).

Na nově vznikající polypeptidický řetězec se může vázat řada chaperonů, které zabezpečují správné sbalení proteinu. Jedním z nich je i komplex asociovaný s ribozomem (z angličtiny *ribosome associated complex*; RAC), který napomáhá sbalení syntetizovaného proteinu a zároveň ho chrání. RAC je heterodimerní komplex složený z proteinu Zuo1 (člen rodiny proteinů HSP40) a proteinu Ssz1 (ATPázově neaktivní HSP70). Společně s proteinem Ssb1, což je homolog HSP70, tvoří jeden z prvních chaperonových systémů bránících agregaci nascentních polypeptidů (shrnutí v Zhang *et al.*, 2017). Dalším komplexem, který interaguje s ribozomem a nascentními polypeptidy je komplex asociovaný s nascentním polypeptidem (NAC). Tento komplex byl kanonicky popsán jako ribozomální chaperon zabraňující agregaci syntetizovaných proteinů, ale hraje roli i při cílení proteinů do ER, během čehož spolupracuje s SRP částicemi, nebo slouží jako cytoplazmatický chaperon (shrnutí v Deuerling *et al.*, 2019).

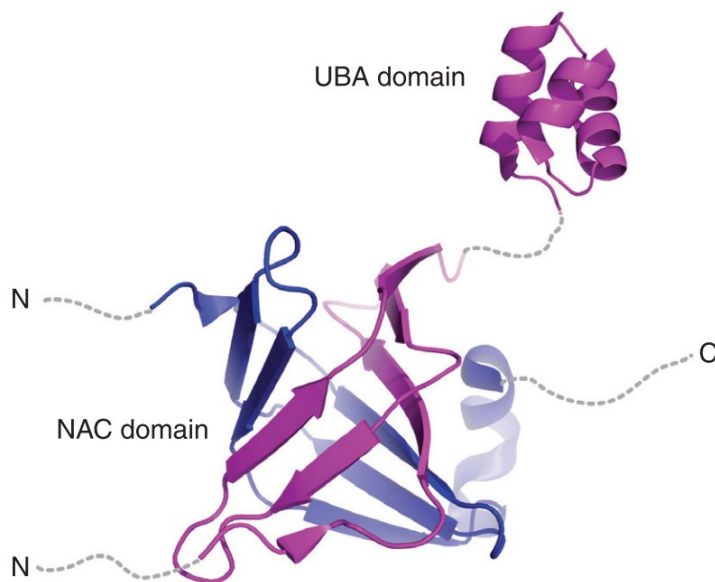


Obrázek 2: Model 80S ribozomu vytvořený na základě elektronové mikroskopie s vyznačenými povrchovými ribozomálními proteiny. Výstupní tunel ribozomu je znázorněn hvězdičkou. Na modelu jsou dále vyznačeny proteiny vážící se v oblasti výstupního tunelu a přímo na nascentní polypeptid jako jsou komplex asociovaný s ribosomem (RAC), komplex asociovaný s nascentním polypeptidem (NAC), SRP částice a NatA/E (z angličtiny *N-terminal acetyltransferase A/F*). Upraveno podle Hsieh et al., 2020.

2.3 Komplex asociovaný s nascentním polypeptidem

Komplex asociovaný s nascentním polypeptidem byl poprvé popsán u eukaryot (Wiedmann *et al.*, 1994)(Zheng *et al.*, 1990). Během experimentů bylo zjištěno, že NAC je heterodimerní komplex tvořený α a β podjednotkou (Wiedmann *et al.*, 1994). Během následujícího výzkumu byly vysoce konzervované sekvence genů NAC objeveny v genomech různých eukaryotických organismů od kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) po člověka. Sekvence pro NAC α byly nalezeny i u archeí (zde označovány jako aeNAC) (Makarova *et al.*, 1999). U archeí nejsou přítomny orthologní geny pro NAC β , takže NAC netvoří heterodimerní komplex, ale homodimer složený z NAC α podjednotek (Makarova *et al.*, 1999).

První informace o struktuře NAC proteinů vychází ze studie provedené na aeNAC z buněk *Methanothermobacter marburgensis*. Rentgenová krystalografie odhalila, že na C



Obrázek 3: Model komplexu NAC s vyznačenou UBA (fialová) a NAC (modrá) doménou. Převzato z Deuerling *et al.*, 2019.

konci proteinu se nachází struktura homologní s UBA doménou (z angličtiny *ubiquitin-associated domain*) složená ze svazku tří α -helixů (obr 3) (Spreter *et al.*, 2005). Tato doména je u eukaryotních podjednotek NAC zachována pouze u NAC α . UBA doména není ale nezbytná pro správné fungování komplexu (Spreter *et al.*, 2005). Na N konci je lokalizována takzvaná NAC doména, která je vysoce konzervována. NAC doménu

tvoří šest vláken dohromady vytvářejících β barel. Tento „soudek“ vytváří hydrofobní jádro komplexu NAC a současně se jeví jako pravděpodobná spojovací část, umožňující vznik homodimerů u archeí a heterodimerů u eukaryot (Spreter *et al.*, 2005). Tvorba homodimerů není výlučnou schopností aeNAC, ale vznikají i u eukaryot, pokud není dostupná podjednotka NAC β (Liu *et al.*, 2010). NAC α homodimery byly lokalizovány nejen v cytoplazmě, ale i

v jádře, kde se dokáží vázat na DNA a RNA a ovlivňují tak i některé transkripční procesy (Liu *et al.*, 2010).

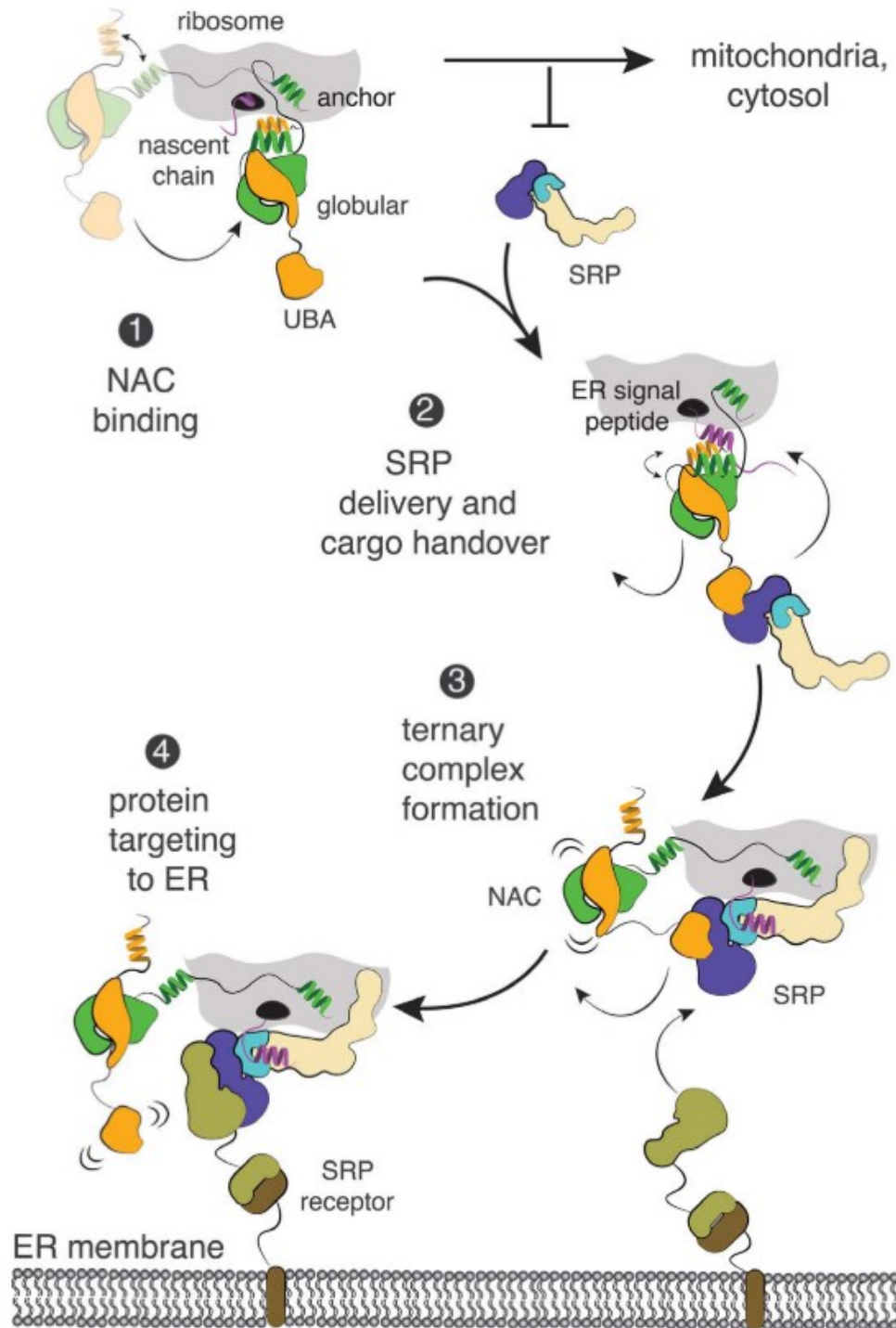
Jak již bylo zmíněno, NAC je primárně lokalizován u výstupního tunelu ribozomu, kde se váže na nově vznikající proteiny a chrání je před proteolýzou (Wang *et al.*, 1995). Již během prvních experimentů se předpokládalo, že NAC se podílí na směřování proteinů do endoplazmatického retikula (ER) (Wiedmann *et al.*, 1994). Původní hypotéza počítala s tím, že na nascentní polypeptid se může navázat pouze NAC, nebo SRP částice. Tato hypotéza však byla vyvrácena studiem interaktomu nově syntetizovaných proteinů, protože v něm byly nalezeny polypeptidy se současně navázaným NAC i SRP (del Alamo *et al.*, 2011). NAC se jeví jako zcela zásadní komplex při směřování proteinů do ER. Při *in vivo* experimentech na háďátku obecném (*Caenorhabditis elegans*) NAC zabraňoval přímé interakci ribozomu s membránou ER bez přítomnosti SRP (Gamerdinger *et al.*, 2015). O tom, že NAC zvyšuje specifitu při cílení proteinů do ER svědčí i to, že při jeho nepřítomnosti byly v ER nalezeny i mitochondriální proteiny (Gamerdinger *et al.*, 2015). Protože se SRP může vázat na nascentní polypeptid ještě předtím, než opustí výstupní tunel ribozomu (Voorhees and Hegde, 2015), může být chybně rozeznána sekvence peptidu, což může vést k transportu proteinů do ER, které tam nepatří. Ale pokud je na ribozomu navázaný NAC, nemůže se SRP připojit předčasně na syntetizovaný polypeptid a zacílit protein do ER (Hsieh *et al.*, 2020). NAC se váže na ribozom díky své vysoké afinitě již v prvních fázích translace a jeho NAC doména blokuje přístup SRP k nascentnímu polypeptidu. Pokud je na polypeptidu přítomna signální sekvence do ER, dojde k destabilizaci NAC domény, čímž se uvolní místo pro navázání SRP. NAC je přítomný i při transportu proteinu do ER (obr. 4) (Jomaa *et al.*, 2022). NAC plní svou funkci i v případě, kdy k navázání SRP nedojde. Když není destabilizovaný ER signální sekvencí, přitahuje k nascentnímu polypeptidu protein methionin aminopeptidáza 1 (METAP1, z angličtiny *methionine aminopeptidase 1*), který odstraňuje první aminokyselinu – methionin (Gamerdinger *et al.*, 2023).

Komplex NAC působí i při zvládnání stresu tím, že se podílí na udržování proteostáze. U *C. elegans* brání hromadění agregovaných proteinů při zvládnání teplotního stresu (Kirstein-Miles *et al.*, 2013). Při zvýšené teplotě došlo k navázání NAC na agregované proteiny, což vedlo ke snížení množství NAC, který byl dostupný pro ribozomy. Tím došlo ke snížení translační aktivity, a to umožnilo buňkám degradovat, nebo znovu složit agregované proteiny a zabránit tak poškození buňky teplotním stresem (Kirstein-Miles *et al.*, 2013). Naopak absence

NAC β u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* způsobovala za zvýšené teploty defekty při růstu buněk (Reimann *et al.*, 1999). Zajímavé však bylo, že tento fenotyp zmizel, když došlo zároveň k vyřazení genu NAC α . Při nadexpresi NAC α na WT pozadí se náchylnost k vyšší teplotě opět projevila a to vedlo k vyslovení hypotézy, že přílišné množství NAC α je pro buňky kvasinek toxické (Reimann *et al.*, 1999). *S. cerevisiae* je často používaným modelovým organismem při studiu NAC, protože vyřazení jeho genů není pro kvasinku smrtící (Reimann *et al.*, 1999). Oproti tomu u živočichů je NAC nezbytný pro embryonální vývoj a vyřazení tohoto komplexu z funkce vede k úmrtí embrya. K tomuto závěru dospěla jak studie prováděná na myších (*Mus musculus*), tak na octomilce (*Drosophila melanogaster*) (Deng and Behringer, 1995; Markesich *et al.*, 2000).

Kromě funkcí celého komplexu byla popsána také role jeho jednotlivých podjednotek. U myší je NAC α specificky exprimován v průběhu embryogeneze v osifikačních centrech kostí a napomáhá diferenciaci osteoblastů, v nichž funguje jako transkripční koaktivátor (Moreau *et al.*, 1998; Yotov *et al.*, 1998). V těchto buňkách také interaguje s proteinem c-JUN, což je transkripční faktor a protoonkogen. NAC α stabilizuje c-JUN v komplexu aktivačního proteinu 1 (z angličtiny *activator protein 1*) a posiluje jeho aktivitu (Moreau *et al.*, 1998). NAC α je rovněž zapojen do vývoje erytrocytů, kde figuruje jako pozitivní regulátor při jejich diferenciaci (Lopez *et al.*, 2005). V neposlední řadě byla u *D. melanogaster* provedena řada studií, které dokázaly, že NAC α je důležitý i při vývoji srdce. Pokud došlo během embryogeneze k vyřazení NAC α , byla srdce různě malformovaná. Výzkum byl zopakován na lidské kultuře progenitorových buněk srdce, přičemž absence NAC α nebo SRP vedla ke změně v morfogenezi buněk (Schroeder *et al.*, 2022).

NAC β , jinak také nazýván BTF3 (z angličtiny *basic transcription factor 3*), byl popsán jako jeden z transkripčních iniciačních faktorů, na které se váže RNA polymeráza II (Zheng *et al.*, 1990). Této jeho funkci odpovídá i to, že byl lokalizován kromě cytoplazmy i v jádře *S. cerevisiae* (Franke *et al.*, 2001). Dále je BTF3 u *C. elegans* zapojen do regulace buněčného cyklu a apoptózy (Bloss *et al.*, 2003). Zde funguje jako negativní regulátor apoptózy, ke které dochází teprve po jeho rozštěpení kaspázou-3 (Bloss *et al.*, 2003). Výzkum BTF3 je prováděn i na lidských buňkách, protože u člověka byly zaznamenány změny v expresi genu pro BTF3 v souvislosti s různými onkologickými onemocněními, jako je rakovina slinivky břišní (Kusumawidjaja *et al.*, 2007) nebo kolorektální karcinom (Dunican *et al.*, 2002).



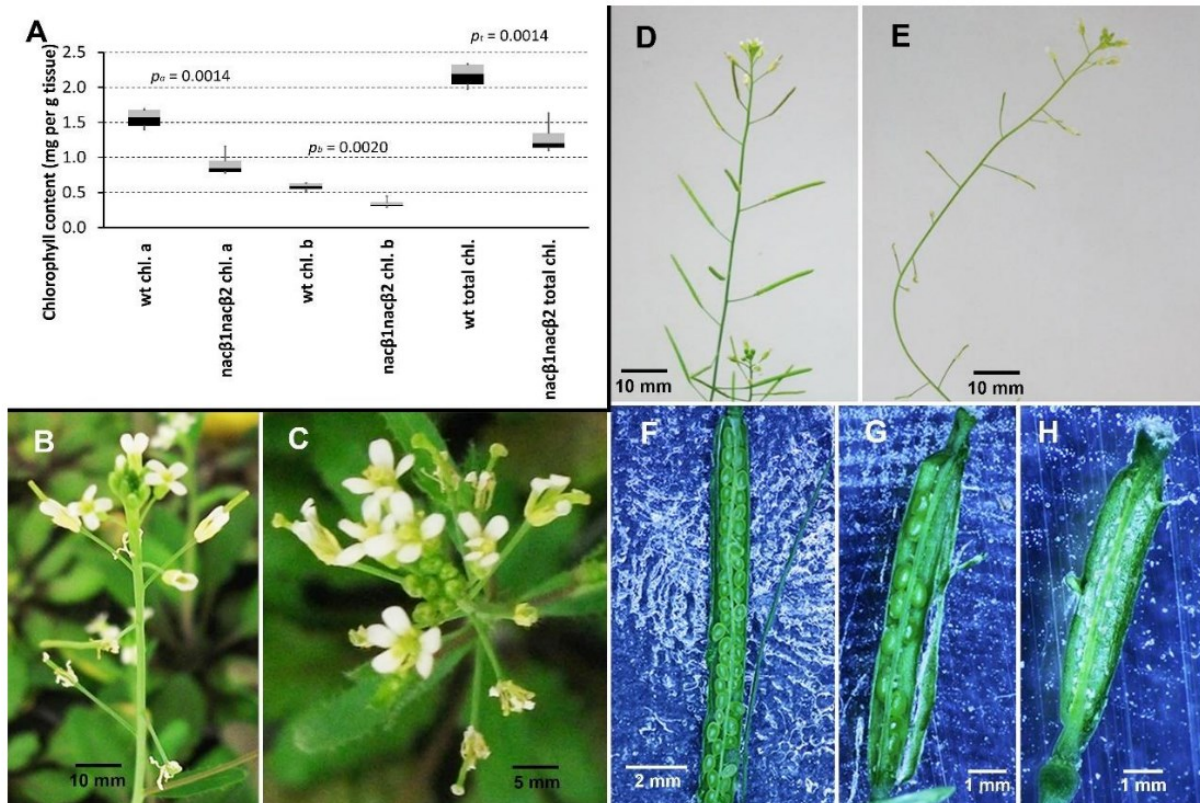
Obrázek 4: Model kotranslačního předání signální sekvence z NAC na SRP během cílení proteinů do ER. NAC je připojený k ribozomu a váže se na nově syntetizované proteiny a jeho NAC doména blokuje přístup SRP k nascentnímu polypeptidu. Pokud je na polypeptidu přítomna signální sekvence pro transport do ER, dojde k destabilizaci NAC domény, čímž se uvolní místo pro navázání SRP. Dojde k předání polypeptidu a protein je zacílen do ER. Upraveno podle Jomaa *et al.*, 2022.

2.4 Komplex asociovaný s nascentním polypeptidem u rostlin

Komplex NAC je kromě živočichů studován i u rostlin. V naší laboratoři probíhá výzkum tohoto komplexu na modelové rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). V genomu *A. thaliana* je podle databáze TAIR (Berardini *et al.*, 2015) celkem sedm anotovaných sekvencí genů pro NAC podjednotky - pět genů kódujících podjednotku α (NAC α 1 At3g12390, NAC α 2 At3g49470, NAC α 3 At5g13850, NAC α 4 At4g10480, NAC α 5 At1g33040) a dva geny kódující podjednotku β (NAC β 1 At1g73230, NAC β 2 At1g17880). V roce 2020 byla publikována studie zaměřená na charakterizaci genů kódujících β -podjednotky u *A. thaliana*. Nejdůležitější částí studie byla fenotypová charakterizace mutantní linie dvojitých homozygotů *nac β 1nac β 2*. Vyřazení těchto genů se u rostlin projevovalo jejich zpomaleným vývojem o 10-14 dní oproti kontrolním rostlinám a zároveň tyto mutantní obsahovali o dvě pětiny méně chlorofylu na gram listu. Největší změny byly pozorovány ve stavbě květů, kdy se u mutantních rostlin skládaly z abnormálního počtu květních orgánů, většinou 5-6 kališních, 5-6 korunních lístků a 7 tyčinek. Fenotypové změny se projevily i na šesulích, které byly výrazně kratší a obsahovaly méně semen (Obr. 5). To bylo způsobeno pomalejším růstem pylových láček *nac β 1nac β 2* a horší schopností navádění pylových láček zárodečnými vaky mutantního genotypu. V *in vitro* podmínkách byla pozorována i snížená klíčivost pylových zrn *nac β 1nac β 2*, která byla nižší o 75 % oproti divokým rostlinám. Další fenotypovou změnou bylo výrazné zkrácení délky vyklíčených pylových láček. Samotné proteiny NAC β 1 a NAC β 2 exprimované pod vlastními promotory byly lokalizovány v cytoplazmě a v jádře buněk.

Kromě huseníčku rolního byl NAC β 2 (nazývaný též BTF3) studován i u pšenice seté (*Triticum aestivum*). Rostliny pšenice s umlčeným genem pro BTF3 měly mírně nažloutlé listy kvůli nižšímu množství obsaženého chlorofylu. Kromě toho byly pozorovány deformace mezofylových buněk, které byly menší, nepravidelně tvarované a měly větší mezibuněčné prostory (Ma *et al.*, 2012). Další výzkum se zaměřil na studium β -podjednotky NAC při vystavení rostlin pšenice mrazu, anebo suchu, přičemž byly sledovány změny její exprese. Stresové podmínky zprvu nijak neovlivnily množství produkovaného transkriptu BTF3, ale jeho množství se významně zvýšilo 6 hodin po vystavení stresu. Poté se množství transkriptu postupně snížilo zpět na původní úroveň (Kang *et al.*, 2013). Následně byl zkoumán vliv stresových podmínek na rostliny pšenice s umlčeným genem kódujícím protein BTF3,

příčemž tyto rostliny vykazovaly výrazně nižší toleranci vůči abiotickým stresům než kontrolní rostliny (Kang *et al.*, 2013).

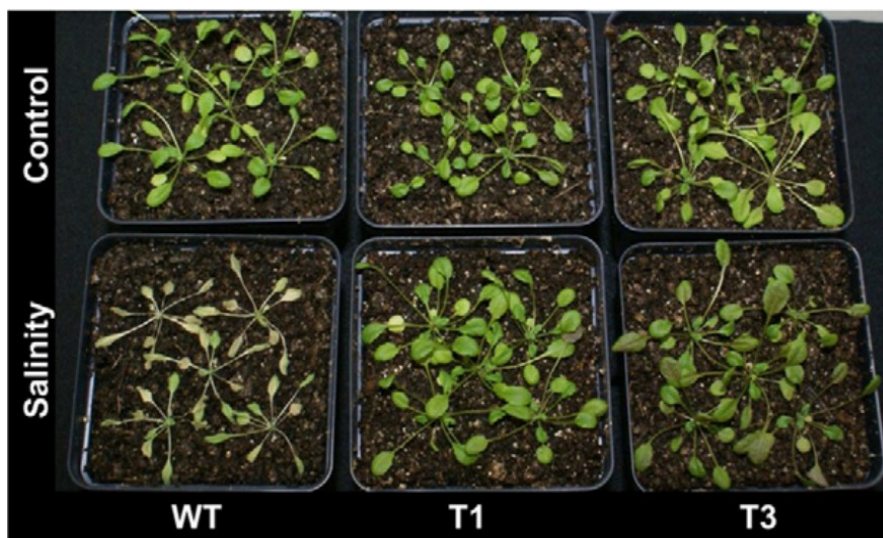


Obrázek 5: Popis fenotypu mutantních rostlin *A. thaliana nacβ1nacβ2*. A – Krabicový graf porovnávající množství chlorofylu a, b a celkového chlorofylu u *nacβ1nacβ2* a WT na hmotnost listu. B – květenství WT rostliny C – květenství *nacβ1nacβ2* rostliny s květy obsahujícími abnormální počet korunních lístků a tyčinek D – šesule WT rostliny E – šesule u *nacβ1nacβ2* rostlin jsou výrazně kratší než u WT F – řez šesulí WT rostliny obsahující normálně se vyvíjející semena G – řez šesulí *nacβ1nacβ2* vykazující méně závažné fenotypové změny. V šesuli jsou normální i abortovaná semena H – řez šesulí *nacβ1nacβ2* se závažným projevem fenotypu. Většina semen je abortována. Upraveno podle Fíla *et al.*, 2020.

Výrazné změny fenotypu se projeví i u rýže seté (*Oriza sativa*) s umlčeným genem *Osj10gBTF3*. Ty se projeví zkrácením a zeštíhlením stonku, zkrácením kořenového systému a snížením počtu samotných kořenů (Wang *et al.*, 2012). Při porovnání byly umlčené rostliny až o polovinu menší než rostliny kontrolní. Změny se netýkaly pouze vegetativních částí rostliny, ale zasáhly i její generativní orgány, takže tyto rostliny nebyly schopné vytvářet semena. Při dalších experimentech bylo pozorováno, že pyl produkovaný těmito rostlinami je abortovaný (Wang *et al.*, 2012). Pro lepší porozumění roli *BTF3* při růstu a vývoji rýže bylo pozorováno klíčení semen s umlčeným genem pro *Osj10gBTF3* za přítomnosti chloridu sodného, kyseliny abscisové a kyseliny gibberelové. Celkový počet vyklíčených semen se za

žádných podmínek nezměnil, ale semena klíčila pomaleji a semenáčky byly menší (Wang *et al.*, 2014).

Komplex NAC je u rostlin dáván do souvislosti se zvládáním různých abiotických stresů, převážně pak sucha a chladu. U transgenních rostlin huseníčku rolního, které exprimovaly gen pro BTF3 z trávy *Spartina alterniflora* byla pozorována vyšší odolnost vůči zasolení a suchu (Karan and Subudhi, 2012). Tyto rostliny měly oproti kontrolním rostlinám větší množství chlorofylu v listech a více akumulovaly prolin. Při zasolení transgenní rostliny lépe udržovaly iontovou homeostázi a později jim žloutly listy, což byl důsledek zvýšeného množství chlorofylu (obr. 6) (Karan and Subudhi, 2012). Stejný efekt, tedy zlepšení přežívání chladového stresu byl popsán i u huseníčku exprimujícího gen kódující BTF3 z dáivce černého (*Jatropha curcas*) (Peng *et al.*, 2017). V souvislosti s chladovým stresem byla v *A. thaliana* popsána interakce BTF3 s proteinem OST1 (z angličtiny *open stomata 1*) (Ding *et al.*, 2018). OST1 při vystavení rostliny nízkým teplotám fosforyluje BTF3 a ten posléze stabilizuje protein CBF. Touto dráhou je regulována transkripce zimou regulovaných genů (z angličtiny *cold regulated genes*), které mají za úkol chránit rostlinu proti mrazu (Ding *et al.*, 2018).



Obrázek 6: Dvoutýdenní rostliny divokého typu Columbia-0 a transgenní rostliny první a třetí generace s vloženým genem kódujícím BTF3 z trávy *Spartina alterniflora*. Rostliny byly každý den zalévány 150 mM roztokem NaCl. Upraveno podle Karan and Subudhi, 2012.

Zlepšené vlastnosti při zvládání solného, nebo osmotického stresu způsobeného manitolem vykazovaly i transgenní rostliny tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) exprimující gen kódující BTF3 z podzemnice olejné (*Arachis hypogaeae*) (Pruthvi *et al.*, 2017). Tyto rostliny za normálních podmínek rostly rychleji a lépe tolerovaly abiotický stres. Na

buněčné úrovni se tato tolerance stresu projevila vyšší stabilitou buněčných membrán a zvýšenou expresí genů kódujících proteiny zodpovědně za vychytávání reaktivních forem kyslíku (Pruthvi *et al.*, 2017). BTF3 je zapojen i do hypersenzitivní reakce rostliny při napadení patogenem (Huh *et al.*, 2012). Rostliny tabáku virginského s umlčeným genem pro BTF3 měly sníženou hladinu transkripce genů spojených s hypersenzitivní odpovědí, takže se virus tabákové mozaiky v napadených listech lépe replikoval. Stejný jev byl pozorován i u papriky seté (*Capsicum annuum*) s vyřazeným genem pro BTF3 (Huh *et al.*, 2012).

Komplex asociovaný s nascentním polypeptidem je vysoce evolučně konzervovaný a podílí se na řadě důležitých procesů v buňce, jako je translace, cílení proteinů do ER, nebo udržování proteostáze. U rostlin je studována především jeho β podjednotka v souvislosti s odpovědí rostlin na různé abiotické stresy.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Kultivace rostlin v podmínkách *in vitro*

Ke studiu vlivu β -podjednotky komplexu NAC při působení abiotického stresu byly použity rostliny mutantní linie huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) dvojitých homozygotů *nac β 1nac β 2* vytvořené zkřížením dvou veřejně dostupných T-DNA inzerčních linií (SALK_043673 pro gen *NAC β 1* a GK-368_H02 pro *NAC β 2*) (Fíla *et al.*, 2020) a nadexprimující linie nesoucí konstrukt pro35S::*NAC β 1*-GFP 1 a 2 a pro35S::*NAC β 2*-GFP 1 a 2 (Fíla *et al.*, 2020). Jako kontrolu vlivu abiotického stresu jsme použili divoký typ huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), ekotyp Columbia-0.

Příprava médií

Všechny testované linie byly vysety i s kontrolními rostlinami Col-0 (WT) na Murashige a Skoog médium (Murashige and Skoog, 1962) s polovičním obsahem solí (MS/2). Celkové složení média bylo 0,23% (w/v) MS směs solí (Duchefa), 1% (w/v) sacharóza (Serva) a 1% (w/v) agar (Serva). Do média použitého pro vyvolání solného stresu byl navíc k základním složkám přidán chlorid sodný (NaCl; Sigma) o finálních koncentracích 50 mM, 100 mM, 125 mM a 150 mM (Robles *et al.*, 2018). Obdobně byl do média pro osmotický stres přidán manitol (Sigma) o koncentraci 250 mM, 300 mM a 350 mM (Robles *et al.*, 2018), nebo polyethylen glykol o molekulární hmotnosti 8000 g·mol⁻¹ (PEG-8000; Thermo Scientific 043443.A3) ve výsledné koncentraci 10%, 15%, nebo 18% (w/v) (Muscolo *et al.*, 2014). V médiích s přidáním PEG byl místo agaru použit jako ztužovací složka fytigel (Sigma), protože agar v médiích s obsahem PEG nad 15 % netuhne (Van Der Weele *et al.*, 2000).

Jednotlivé složky médií, s výjimkou agaru a fytigelu, byly rozpuštěny v destilované vodě. Poté bylo upraveno pH média roztokem hydroxidu draselného (KOH), aby jeho hodnota byla 6,0. Nakonec byl přidán agar a fytigel a objem byl doplněn destilovanou vodou na finální hodnotu. Následně bylo médium sterilizováno v autoklávu (21 min, 101,3 kPa, 121 °C) a rozlito do Petriho misek o průměru 9 cm v laminárním flowboxu. Misky byly do použití skladovány v chladové místnosti.

Výsev semen v podmínkách *in vitro* a kultivace

Vysévaná semena byla odebrána do označené mikrozkušavky a vysterilizována za použití následujícího postupu. V laminárním flowboxu byl k semenům přidán roztok 70% ethanolu. Obsah mikrozkušavky byl promíchán a po usazení semen byl roztok ethanolu odsán a nahrazen roztokem SAVA (10% roztok SAVA s kapkou smáčedla TWEEN 20) a v tomto roztoku byla semena za stálého míchání sterilizována po dobu 6 minut. Po skončení sterilizace byl roztok SAVA odsán a semena byla pětkrát promyta sterilní destilovanou vodou. Obsah mikrozkušavky byl přesunut na sterilní filtrační papír, z něhož byla semena za pomoci sterilní preparační jehly vyseta na připravené Petriho misky s médiem.

Po dokončení výsevu byly misky umístěny do chladové místnosti o teplotě 8 °C po dobu 24 hodin, aby došlo ke stratifikaci semen. Následně byly misky přesunuty do kultivační místnosti o teplotě 22 °C, relativní vzdušné vlhkosti 60 % a světelném režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Čtvrtý den po přesunutí do kultivační místnosti byl poprvé vyhodnocen počet vyklíčených semen, přičemž hodnocení probíhalo vždy 4., 6., 8., 11. a 13. den od přenesení do kultivační místnosti. Za vyklíčené semeno bylo považováno to, u kterého byly na semenáčku rozeznatelné rozevřené děložní lístky. Po posledním hodnocení byly misky s nadexprimujícími liniemi prohlédnuty pod fluorescenční binokulární lupou (Leica) pro ověření, jestli u semenáček nedošlo k umlčení insertu.

Statistické vyhodnocení stresových experimentů

Pro statistické vyhodnocení získaných výsledků byl použit webový skript (Vasavada, 2016). Tento skript pro jednovýběrový test ANOVA byl použit pro zhodnocení vlivu genotypu na klíčivost semen testovaných rostlin (*nacβ1nacβ2*, p35S::*NACβ1*-GFP, p35S::*NACβ2*-GFP a WT) za stresových podmínek způsobenými různými koncentracemi NaCl, manitolu, nebo polyethylenglykolu. Pro porovnání jednotlivých variant rostlin mezi sebou za daných podmínek byl využit Tukey-HSD test (Vasavada, 2016). Získané p-hodnoty byly podrobeny korekci metodou Benjamini-Hochberg (Radua *et al.*, 2014).

Příprava rostlinného materiálu na extrakci RNA

Semena nadexprimujících linií p35S::*NACβ1*-GFP_1 a 2 a p35S::*NACβ2*-GFP_1 a 2 byla vyseta v podmínkách *in vitro* podle výše zmíněného postupu na MS/2 médium. Semena WT byla vyseta na MS/2 médium obsahující 125 mM NaCl, nebo 300 mM manitol, jako

kontrola sloužila WT semena vyšetá na čisté MS/2 médium. Vyšeté Petriho misky byly umístěny na jeden den do chladové místnosti a poté přesunuty do kultivační místnosti. Po deseti dnech kultivace byly semenáčky rozděleny na jednotlivé vzorky. Z jednoho výsevu byly sebrány vždy dvě repliky, přičemž jednu repliku tvořilo 50 mg semenáček. Celkem byl výsev opakován čtyřikrát za stresových podmínek a dvakrát pro každou z nadexprimujících linií. Vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny do dalšího zpracování v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na vzorcích cDNA získaných z těchto semenáček byla provedena RT-qPCR.

3.2 Kultivace rostlin v půdním substrátu

Pro experiment byly vysety jednak WT rostliny huseníčku rolního a další linie, konkrétně se jednalo o pro35S::NAC α 1-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 2-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 3-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 4-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 5-3 \times FLAG a pro35S::HSP90.2-3 \times FLAG, které byly využity jako zdroj proteinů pro test holdázové aktivity. Další použité linie pro35S::NAC β 1-3 \times FLAG a pro35S::NAC β 2-3 \times FLAG již dříve vytvořila Mgr. Božena Klodová (Klodová, 2019).

Semena všech testovaných linií byla pro pěstování v půdním substrátu vyseta na rašelinové tablety (Jiffy) a jeden den stratifikována v chladové místnosti při teplotě $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly tablety se semeny přeneseny do kultivační místnosti, kde byly rostliny pěstovány při $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60% vlhkosti vzduchu a za světelného režimu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Po deseti dnech byly semenáčky rozsazeny jednotlivě na nové Jiffy tablety, nebo byly pěstovány v květináčích po pěti, pokud byly určeny pro transformaci pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

3.3 Extrakce DNA a genotypování rostlin

Z třítydenních rostlin linií pro35S::NAC α 1-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 2-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 3-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 4-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 5-3 \times FLAG, pro35S::NAC β 1-3 \times FLAG, pro35S::NAC β 2-3 \times FLAG a pro35S::HSP90.2-3 \times FLAG pěstovaných v půdním substrátu byla extrahována genomická DNA, která byla následně použita jako templát pro PCR, jejíž cílem bylo ověřit, zda rostliny nesou příslušný konstrukt. Pro izolaci byl použit upravený protokol využívající hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB) (Rogers and Bendich, 1994). Zmražený vzorek byl za pomoci malého množství kuliček oxidu zirkoničitého (ZrO_2) homogenizován v přístroji Magna Lyser (Roche) s

intenzitou 4 000 rpm po dobu 40 s. Poté bylo ke vzorku přidáno 250 μ l CTAB extrakčního pufru (1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové; Sigma) pH 8,0, 100 mM Tris (2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol; Duchefa) pH 8,0, 3% w/v CTAB (Sigma)). Směs byla promíchána na vortexu a ponechána při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Následně bylo ke vzorku přidáno 250 μ l roztoku chloroformu s izoamylalkoholem (poměr mísení 24:1). Obsah mikrozkušavky byl důkladně promíchán a poté stočen v centrifuze (Eppendorf Centrifuge 5254; 14 500 rpm, 10 min). Po skončení centrifugace byla vodná fáze přesunuta do mikrozkušavky se 140 μ l isopropanolu, přičemž vzniklá směs byla promíchána a ponechána 5 min při pokojové teplotě, aby se DNA mohla vysrážet. Následně byl vzorek stočen v centrifuze (13 000 rpm, 7 min), kdy došlo k usazení DNA na dně zkumavky. Supernatant byl z mikrozkušavky odebrán a nahrazen 1 ml 70% chlazeného ethanolu, přičemž byl vzorek znovu centrifugován (13 000 rpm, 7 min). Supernatant byl znovu odstraněn a vzorek poté umístěn do vakuové vývěvy, aby došlo k odpaření zbytkového množství ethanolu. Posléze byla izolovaná DNA rozpuštěna v 50 μ l destilované vody a uskladněna při teplotě -20 °C.

Vyextrahovaná DNA byla posléze použita jako templát v polymerázové řetězové reakci (PCR), kde byly namnoženy požadované fragmenty DNA, většinou části vloženého konstruktu. Reakce byla připravena podle následující tabulky 1 a cyklus PCR proběhl podle tabulky 2.

Reagencie	Koncentrace zásobního roztoku	Objem
10× Mercíáza pufr	10×	2,50 μ l
směs dNTP (je uvedena koncentrace každého dNTP)	10 mM	0,50 μ l
Taq DNA polymeráza	50 U· μ l ⁻¹	0,15 μ l
Templátová DNA	-	1,00 μ l
Přímý primer	10 μ M	1,00 μ l
Reverzní primer	10 μ M	1,00 μ l
dH ₂ O	-	18,85 μ l
Celkový objem		25,00 μl

Tabulka 1: Složení PCR reakce

Teplota	Čas	Opakování
94 °C	2 min	
94 °C	30 s	40×
55 °C	30 s	
72 °C	1,5 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Tabulka 2: Nastavení termocykléru pro provedení PCR

Gelová elektroforéza

Pro vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA z reakce PCR byla použita gelová elektroforéza. Gel byl připraven z TAE pufru (Tris acetát EDTA pufr složený z 40 mM Tris MP Biomedicals, 20 mM kyselina octová Merck, 1 mM EDTA Merck, pH 8.0) a 1 g agarózy (Lanza). Agaróza byla rozpuštěna zahřátím v mikrovlnné troubě. Po mírném vychladnutí byla do roztoku přidána kapka 0,07% ethidium bromidu (3,8-diamino-5-ethyl-6-fenylfenanthridinium-bromid; PanReac Applichem), roztok byl důkladně rozmíchán, a poté nalit do elektroforetické vaničky. Před nanesením 10 μ l vzorku do jamky, byl vzorek z PCR smíchán v poměru 5:1 s 6 \times nanášecím pufrem bromfenolové modři (0,25 % (w/v) 3,3',5,5'-tetrabromfenolsulfonftalein, 70 % (v/v) dH₂O, 30 % (v/v) glycerol). Do jedné jamky bylo nanášeno 10 μ l 10 \times ředěného DNA žebříku 100 bp Plus (Thermo Scientific) smíchaného s 6 \times nanášecím pufrem bromfenolové modři. Elektroforéza běžela v elektrodovém pufru tvořeném 1 \times TAE při napětí 120 V. Výsledek byl následně vyfotografován systémem UVP GelStudio PLUS (Analytik Jena) pod UV světlem a filtrem pro snímání signálu ethidium bromidu.

3.4 Kvantitativní PCR v reálném čase

Extrakce RNA

Pro extrakci RNA z připraveného rostlinného materiálu byl použit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) podle návodu výrobce. Připravený vzorek byl homogenizován v třecí misce a bylo k němu přidáno 450 μ l RLT pufru (obsažen v kitu) s přidáním β -merkaptoethanolem (10 μ l β -merkaptoethanolu na 1 ml RLT pufru). Po roztátí byla vzniklá směs přenesena do QIAshredder stáčecí kolonky s dvoumilitrovou sběrnou mikrozkuvkou a centrifugována (Eppendorf Centrifuge 5254; 4000 rpm, 2 min). Z mikrozkuvky byl opatrně přenesen supernatant do čisté mikrozkuvky, kde byl smíchán s 96% ethanolem o polovičním objemu než supernatant. Výsledný roztok byl přenesen do RNeasy Mini kolonky s 2 ml sběrnou mikrozkuvkou a centrifugován (10000 rpm, 15 s). Obsah sběrné mikrozkuvky byl odstraněn a do kolonky bylo přidáno 650 μ l RW1 pufru (obsažen v kitu). Vzorek byl opětovně centrifugován (10000 rpm, 15 s). Kolonka byla dvakrát promyta 500 μ l RPE pufru (obsažen v kitu) a stočena na centrifuze (10000 rpm, první centrifugace 15 s, druhá centrifugace 2 min). Poté byla RNeasy Mini kolonka přenesena do čisté 2 ml mikrozkuvky a centrifugována (14000 rpm, 1 min), aby došlo k odstranění zbývající kapaliny z membrány kolonky. Posledním krokem extrakce bylo přesunutí RNeasy Mini kolonky do čisté 1,5 ml mikrozkuvky a přidání 30 μ l RNase-

free vody (obsažena v kitu) přímo na membránu kolonky. Ta byla poté centrifugována (1 min 10 000 rpm), čímž došlo k uvolnění RNA z kolonky. Koncentrace získaného roztoku RNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop (ThermoFischer). Dále jsme pomocí gelové elektroforézy ověřili integritu izolované RNA. Část vzorku byla smíchána s 6× nanášecím pufrem a nanášena na agarózový gel (postup přípravy je blíže popsán v části Gelová elektroforéza). Pokud byly na gelu pozorovány výrazné pruhy značící nedegradovanou 28S a 18S ribozomální RNA, použili jsme vzorky v následných experimentech.

Čištění RNA

Pro odstranění zbytkové DNA z extrahovaných vzorků RNA byl použit DNA-free Kit (Invitrogen). Ke vzorkům RNA byla přidána voda bez nukleáz, 10× DNase I pufr a rDNase I (vše obsaženo v kitu) podle následující tabulky (Tab. 3).

Celkové množství RNA	< 10 µg	> 10 µg
RNA	29,0 µl	29,0 µl
Nuclease-free Water	1,5 µl	0,5 µl
10× DNase I pufr	3,5 µl	3,5 µl
rDNase I	1,0 µl	2,0 µl
Celkový objem	35,0 µl	35,0 µl

Tabulka 3: Složení reakce pro čištění RNA

Vzorky byly důkladně promíchány na vortexu a umístěny do inkubátoru vyhřátého na 37 °C po dobu 30 minut. Poté k nim byla přidána suspenze DNase Inactivation Reagent (obsažena v kitu) o objemu 0,1 vzorku a za občasného míchání byl inkubován 2 minuty při pokojové teplotě. Následně byly vzorky centrifugovány (14 000 rpm, 90s) a supernatant byl přenesen do sterilních PCR mikrozkušavek. Nakonec byla změřena koncentrace purifikované DNA na spektrofotometru NanoDrop (ThermoFischer).

Syntéza cDNA

Pro přepis purifikované RNA do cDNA byla použita sada ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega). Aby bylo možné vzorky porovnat, bylo k přepisu vždy použito 200 ng RNA. K RNA byl přidán 1 µl Oligo(dT) primerů (500 µg·ml⁻¹, součást sady) a objem reakce do 5 µl byl doplněn vodou bez nukleáz (součást sady). Směs byla zahřáta na 70 °C po dobu 5 min, aby došlo k denaturaci RNA a primerů. Okamžitě po zahřátí byly vzorky ochlazeny ve vodě s ledem minimálně po dobu 5 min. Mezitím byla připravena RT reakční směs ze zbývajících složek reakce (Tab. 4).

Reagencie	Koncentrace zásobního roztoku	Objem
Voda bez nukleáz	-	7,3 µl
ImProm-II™ 5× Reakční pufr	5×	4,0 µl
MgCl ₂	25 mM	1,2 µl
dNTP Mix (10mM od každého dNTP)	10 mM	1,0 µl
Recombinantní RNasin Ribonukleázový inhibitor	40 U·ml ⁻¹	0,5 µl
ImProm-II™ Reverzní transkriptáza	10 U·µl ⁻¹	1,0 µl
Směs RNA a Oligo(dT) primerů	-	5,0 µl
Celkový objem		20,0 µl

Tabulka 4: Složení reakce pro syntézu cDNA

Ochlazená směs RNA a Oligo(dT) primerů byla stočena na minicentrifuze. Poté bylo ke vzorku přidáno 15 µl RT reakční směsi a PCR mikrokumavky byly umístěny do termocykléru. Program se skládal z následujících tří kroků: nasedání primerů (5 min, 25 °C), prodlužování řetězců (60 min, 42 °C) a inaktivace reverzní transkriptázy (15 min, 70 °C). Výsledná cDNA byla uložena při teplotě -20 °C do dalšího zpracování.

Kvantitativní PCR v reálném čase

Pro ověření hypotézy, zda se exprese genů kódujících podjednotky komplexu NAC mění během působení abiotického stresu, byla použita kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Pro přípravu reakcí byl využit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega).

Reagencie	Koncentrace zásobního roztoku	Objem
GO Taq qPCR Master mix	-	5,00 µl
Templátová cDNA	20 ng·µl ⁻¹	1,25 µl
přímý primer	10 µM	0,50 µl
reverzní primer	10 µM	0,50 µl
dH ₂ O	-	2,75 µl
Celkový objem		10,00 µl

Tabulka 5: Složení reakce pro RT-qPCR

Teplota	Čas	Opakování
95 °C	2 min	
95 °C	10 s	45×
58 °C	15 s	
72 °C	20 s	
95 °C	5 s	
65 °C	1 min	
Gradient 65°C - 95°C	4 min 50 s	
40 °C	30 s	

Tabulka 6: Nastavení programu pro provedení RT-qPCR

Jako referenční gen byl použit eukaryotický elongační faktor 1 α (eEF1 α). Použité primery jsou uvedené v tabulce 7 (Klodová, 2019). Reakce byly připraveny dle tabulky 5. LightCycler 480 II (Roche) byl nastaven podle parametrů v tabulce 6. Získaná data byla analyzována metodou $\Delta\Delta C \cdot CQ^{-1}$ a zpracována do grafů v programu Microsoft Office Excel.

Jméno genu	AGI identifikátor	Přímý primer	Reverzní primer
eEF1 α	At5g60390	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA
NAC α 1	At3g12390	TTCCGCACGAATCACGAATCTC	CTTCGGGCTTATCGAGATCG
NAC α 2	At3g49470	TCGTCACCTACCACCTCAC	GTAACCGGTGGTTGCTCAGG
NAC α 3	At5g13850	TAGGGTTTCGTCACCTCGCC	CAAGATCGATCTTCTGCTCTTCC
NAC α 4	At4g10480	CTCCGAAGAAGAAGATAAGAG	CGTTCTCCTTCTGGAGCTTC
NAC α 5	At1g33040	GAGGACGTCGAAGTTGAAGGG	CACTCTGCTGACATCTGAGACAG
NAC β 1	At1g73230	TGCTCAGAAGAGGTCGAGCG	GGGAGAGACTTTCGAGACCC
NAC β 2	At1g17880	GCTGAGGCGGCATTACCTTC	GCGTTCTCCTCAGACCAA

Tabulka 7: Seznam primerů použitých pro RT-qPCR Upraveno podle Klodová, 2019.

Statistické vyhodnocení RT-qPCR

Pro statistickou analýzu dat získaných z RT-qPCR byl použit dvouvýběrový nepárový t-test, kdy došlo k porovnání Ct hodnot (z angličtiny *Cycle threshold value*) měřených genů s hodnotami referenčního genu. Analýza byla provedena v programu Excel.

3.5 GoldenBraid klonování

Extrakce chromozomální DNA z *E. coli*

Jako pozitivní kontrola v holdázové esaji byl použit protein GroEl z *E. coli*. Aby mohlo dojít k jeho domestikaci a vytvoření expresního plazmidu, bylo nutné vyextrahovat genomickou DNA z *E. coli* podle (He, 2011). Nejprve bylo přes noc napěstováno 5 ml bakteriální suspenze *E. coli* kmene TOP10a v LB médiu. 1,5 ml kultury bylo centrifugováno (14 500 rpm, 1 min) a supernatant byl odstraněn. Pelet byl resuspendován v 600 μ l lyzačního pufru (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 0.6% (w/v) SDS (dodecylsírán sodný), 1,2 mg proteináza K) a inkubován 1 hodinu při 37 °C. Do mikrozkušavky bylo přidáno 600 μ l směsi fenolu s chloroformem (poměr mísení 1:1) a obsah byl opatrně promíchán. Vzorek byl posléze centrifugován (14 500 rpm, 5 min) a vodná fáze byla opatrně přenesena do nové mikrozkušavky. K vodné fázi byl přidán stejný objem chloroformu a vzorek byl znovu centrifugován (14 500 rpm, 5 min). Vodná fáze byla opět přenesena do čisté mikrozkušavky a byl k ní přidán trojnásobný objem vychlazeného 99,9 % ethanolu. Vzorek byl promíchán a inkubován 30 min při teplotě -20 °C. Následovala centrifugace (14 500 rpm, 5 min, 4°C), po níž byl supernatant odstraněn a nahrazen 70% (v/v) ethanolem. Poté následovala centrifugace (14 500 rpm, 2 min), odsátí supernatantu a vysušení peletu ve vakuové vývěvě. Vyextrahovaná DNA byla rozpuštěna v 50 μ l vody a použita jako templát pro domestikaci sekvence genu GroEl.

Domestikace genů do systému GoldenBraid

Konstrukty byly vytvořeny metodou GoldenBraid 3.0 (Dusek *et al.*, 2020). Prvním krokem byla domestikace sekvence požadovaného genu. Primery pro amplifikaci jednotlivých genů byly navrženy za využití aplikace GB Domesticator (<https://gbccloning.upv.es/do/domestication/>). Poté byly otestovány na genomické DNA s využitím Taq DNA polymerázy. Po detekci produktů PCR reakce na gelové elektroforéze bylo přistoupeno k amplifikaci sekvencí genů z cDNA za využití DNA polymerázy Phusion (Bio Labs). Reakce byla připravena v objemu 50 μ l podle tabulky 8 a vložena do termocykléru nastaveného za podmínek uvedených v tabulce 9.

Reagencie	Koncentrace zásobního roztoku	Objem
5× HF pufr		10,0 µl
směs dNTP (je uvedena koncentrace každého dNTP)	10 mM	1,0 µl
DNA polymeráza Phusion	2000 u·ml ⁻¹	0,5 µl
Templátová cDNA 20 ng	20 ng·µl ⁻¹	1,0 µl
Přímý primer	10 µM	2,5 µl
Reverzní primer	10 µM	2,5 µl
dH ₂ O		32,5 µl
Celkový objem		50,0 µl

Tabulka 8: Složení reakce pro PCR s DNA polymerázou Phusion

Produkt reakce PCR byl vizualizován na gelové elektroforéze. Pro potřeby klonování bylo potřeba izolovat amplifikovanou sekvenci z elektroforetického gelu za pomoci kitu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) podle instrukcí výrobce. Z agarózového gelu jsme vyřízli fragment obsahující produkt PCR reakce o požadované délce. Vyříznutá část gelu byla zvážena a smíchána s Binding pufrům (součást kitu) v poměru 1:1,2 (hmotnost gelu v mg : objem pufru v µl). Mikrozkušavka se směsí byla inkubována při 55 °C po 10 minut. Poté byl vzorek promíchán na vortexu a přenesen do GeneJET purifikační kolonky. Kolonka byla centrifugována (14 500 rpm, 1 min), zachycený roztok odstraněn a kolonka naplněna 750 µl promývacího pufru (součást kitu). Opět byla kolonka stočena na centrifuze (14 500 rpm, 1 min) a zachycený pufr odstraněn. Kolonka byla stočena ještě jedenkrát za stejných podmínek, aby došlo k odstranění zbytků promývacího pufru, a následně byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Na membránu kolonky bylo opatrně přidáno 25 µl Elution pufru (součást kitu) a vzorek tak byl inkubován 1 min při pokojové teplotě. Následovala poslední centrifugace (14 500 rpm, 1 min) a změření koncentrace DNA ve vzorku na spektrofotometru NanoDrop (ThermoFischer). Vzorky byly poté uskladněny v mrazáku při -20 °C.

Získané sekvence DNA byly pomocí restričního štěpení a následné ligace vloženy do plazmidu pUPD2. Reakce sestávala ze 75 ng pUPD2, 75 ng každé části domestikovaného genu (některé geny byly softwarem rozděleny na několik částí, protože obsahovaly restriční místa ve své sekvenci), 0,5 µl restričního enzymu BsmBI (10 u·µl⁻¹, Thermo Scientific), 0,6 µl T4 DNA ligázy (1 u·µl⁻¹, Invitrogen), 1 µl T4 pufru (10×, Invitrogen) a nakonec byla reakce

Teplota	Čas	Opakování
98 °C	30 s	
98 °C	30 s	30x
58 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Tabulka 9: Nastavení termocykléru pro PCR s DNA polymerázou Phusion

doplněna do finálního objemu 10,0 µl destilovanou vodou. Následně byly připravené vzorky vloženy do termocykléru a podrobeny následujícímu cyklu dle tabulky 10.

Teplota	Čas	Opakování
37 °C	30 min	
37 °C	2 min	45x
16 °C	5 min	
37 °C	30 min	
65 °C	15 min	
4 °C	∞	

Tabulka 10: Nastavení termocykléru pro ligační reakci

Transformace bakterií *E. coli*

K transformaci bakterií *Escherichia coli* kmene Top10a byly použity 2 µl výsledné reakce. Z mrazáku o teplotě -80 °C byla vyjmuta mikrozkušavka s 50 µl kompetentních buněk *E. coli* a ponechána roztát na ledu. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 2,5 µl GoldenBraid reakce připravené v předchozím kroku. Směs byla jemně promíchána a inkubována na ledu po 30 min. Následně byla mikrozkušavka s bakteriemi vložena do předehřáté vodní lázně o teplotě 42 °C na 30 s. Okamžitě po zahřátí byla mikrozkušavka vrácena na led a zde inkubována 2 min. Poté do ní bylo přidáno 250 µl SOC média (0.5 mM kvasnicový extrakt, MP Biomedicals; 2 mM trypton, Sigma; 10 mM chlorid draselný, Serva; 2.5 mM chlorid hořečnatý, Sigma; 20 mM glukóza, Serva) a směs byla inkubována na třepačce (200 rpm, 60 min, 37 °C). Po skončení inkubace bylo 100 µl bakteriální suspenze rozetřeno na Petriho misku s LB médiem (LB agar low salt (10 g·l⁻¹ trypton, 5 g·l⁻¹ chlorid sodný, 5 g·l⁻¹ kvasnicový extrakt, 10 g·l⁻¹ agar; Duchefa) s 24 µg·ml⁻¹ IPTG (Isopropyl B-D-1-thiogalactopyranosid), 20 µg·ml⁻¹ X-Gal (5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl β-D-galactopyranosid) a 34 µg·ml⁻¹ chloramfenikolu. Misky byly inkubovány do druhého dne při teplotě 37 °C.

Colony PCR

Z narostlých bakteriálních kolonií bylo vybráno 8 bílých kolonií, u kterých bylo pomocí colony PCR ověřeno, zda nesou sekvenci klonovaného genu. Reakční směs byla připravena podle tabulky 11 a napipetována do PCR destičky. Pipetovací špičkou byla část bakterií přenesena z Petriho misky přímo do jamky v destičce. Termocykler byl nastaven podle tabulky 12. Amplifikované fragmenty DNA byly vizualizovány za na gelové elektroforéze a vyhodnoceny (detailní postup byl popsán v části Gelová elektroforéza).

Reagencie	Koncentrace zásobního roztoku	Objem
Merciáza pufr	10×	2,50 μ l
směs dNTP (je uvedena koncentrace každého dNTP)	10 mM	0,50 μ l
Taq DNA polymeráza	50 U \cdot μ l ⁻¹	0,15 μ l
Přímý primer	10 μ M	1,00 μ l
Reverzní primer	10 μ M	1,00 μ l
dH ₂ O	-	19,85 μ l
Celkový objem		25,00 μl

Tabulka 11: Složení reakce pro colony PCR.

Teplota	Čas	Opakování
94 °C	5 min	
94 °C	1 min	40×
55 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Tabulka 12: Nastavení termocyklu pro colony PCR.

Extrakce plazmidů a příprava glycerolových konzerv

Ze dvou pozitivně testovaných kolonií na colony PCR byla část odebrána pipetovací špičkou a přenesena do zkumavky s 5 ml tekutého LB média (LB agar low salt (10 g \cdot l⁻¹ trypton, 5 g \cdot l⁻¹ chlorid sodný, 5 g \cdot l⁻¹ kvasnicový extrakt; Duchefa) se selekčním antibiotikem (34 μ g \cdot ml⁻¹ chloramfenikol). Kultury byly inkubovány při 37 °C s třepáním o intenzitě 200 rpm do druhého dne. Glycerolová konzerva byla připravena smícháním 0,5 ml kultury s 80% (v/v) roztokem glycerolu, zamražena v tekutém dusíku a uskladněna při -80 °C.

Zbývající kultura byla použita k extrakci plazmidů pomocí GeneJET Plasmid MiniPrep kit (ThermoFisher) podle instrukcí výrobce. 4 ml bakteriální suspenze byly centrifugovány (5000 rpm, 1 min). Supernatant byl odlit a pelet byl resuspendován v 250 μ l resuspenzačního roztoku (obsažen v kitu). Ke vzorku bylo dále přidáno 250 μ l lyzačního roztoku (obsažen v kitu) a směs byla promíchávána dokud se nestala mírně průhlednou. Poté k ní bylo přidáno 350 μ l neutralizačního roztoku (obsažen v kitu) a vzorek byl opět promíchán. Následovala

centrifugace (14 500 rpm, 5 min) a supernatant byl přenesen do GeneJet Spin kolonky. Kolonka byla centrifugována (14 500 rpm, 1 min) pro odstranění roztoku a zachycení molekul plazmidů na membráně kolonky. Proteklý roztok byl odlit a do kolonky bylo přidáno 500 μl promývacího roztoku (obsažen v kitu), přičemž byla kolonka znovu centrifugována (14 500 rpm, 1 min). Krok s promývacím roztokem byl zopakován a následně byla prázdná kolonka znovu centrifugována (14 500 rpm, 1 min), kvůli odstranění zbytků roztoků. Kolonka byla poté přenesena do čisté 1,5 ml mikroskopické kumavky. Na membránu kolonky bylo posléze nanášeno 50 μl elučního pufru a poté byla kolonka 5 minut inkubována za pokojové teploty. Mikroskopická kumavka byla centrifugována (14 500 rpm, 2 min) a koncentrace vyextrahovaných plazmidů byla změřena na spektrofotometru NanoDrop. Pro ověření integrity plazmidů byla část vzorku smíchána s 6 \times nanášecím pufrem a následně nanášena do jamek v agarózovém gelu (postup přípravy byl blíže popsán v části Gelová elektroforéza). Správnost naklonovaných konstruktů byla ověřena Sangerovým sekvenováním ve firmě Eurofins genomics.

Podle výše popsaného postupu byly následně připraveny plazmidy $\alpha 12$ a z nich vycházející plazmidy pLX určené pro transformaci rostlin. Složení reakce pro přípravu plazmidů $\alpha 12$ a pLX je uvedeno v tabulce 13 a 14. Všechny konstrukty vytvořené v rámci této práce jsou uvedeny v tabulce 15. Sekvence primerů použitých k domestikaci genů a primerů určených ke colony PCR jsou v tabulce 16.

Složky	Koncentrace zásobního roztoku	Objem
$\alpha 12_empty$	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
pUPD2_p35S	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
pUPD2_NAC α 1	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
pUPD2_3 \times FLAG	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
pUPD2_tNOS	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
BSA I	10 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,50 μl
T4 DNA ligáza	1 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,60 μl
T4 pufr	10 \times	1,00 μl
dH ₂ O	-	2,90 μl
Celkový objem		10,00 μl

Tabulka 13: Složení reakce pro přípravu expresní jednotky v plazmidu $\alpha 12$

Složky	Koncentrace zásobního roztoku	Objem
pLX12_empty	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
$\alpha 11_stuffer$	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
$\alpha 12_p35S::NAC\alpha 1-3\times FLAG$	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
$\alpha 13_stuffer$	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
$\alpha 14_stuffer$	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,00 μl
$\alpha 2_KanFast+Oleosin$	75 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,50 μl
BSMB I	10 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,50 μl
T4 DNA ligáza	1 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,60 μl
T4 pufr	10 \times	1,00 μl
dH ₂ O	-	1,90 μl
Celkový objem		10,00 μl

Tabulka 14: Složení reakce pro přípravu plazmidu pLX, určeného ke transformaci *A. tumefaciens*

Jméno konstruktů	Vektor	Antibiotická rezistence
NAC α 1	pUPD2	Chloramfenikol
NAC α 2		
NAC α 3		
NAC α 4		
NAC α 5		
HSP90.2		
GroEI		
lacI+TACprom		
rrnBT1+T2term		
p35S::NAC α 1-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 2-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 3-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 4-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 5-3 \times FLAG		
p35S::HSP90.2-3 \times FLAG		
lacI+TACprom::GroEI-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 1-3 \times FLAG	pLX	Spectinomycin
p35S::NAC α 2-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 3-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 4-3 \times FLAG		
p35S::NAC α 5-3 \times FLAG		
p35S::HSP90.2-3 \times FLAG		

Tabulka 15: Seznam vytvořených plazmidových konstruktů

Jméno primeru	Sekvence (orientace 5'-3')	Účel
dm_HSP90.2_F1	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGCGGACGCTGAAACCTT	GoldenBraid klonování
dm_HSP90.2_R1	GCGCCGTCTCGCAGTCTCATCCAGTTTCAGAC	GoldenBraid klonování
dm_HSP90.2_F2	GCGCCGTCTCGACTGAAGATGAAAAGAAGAAGAAAG	GoldenBraid klonování
dm_HSP90.2_R2	GCGCCGTCTCGGCAGTCTCAAAGAGGAGAAG	GoldenBraid klonování
dm_HSP90.2_F3	GCGCCGTCTCGCTGCTCTTCTCACTTCTGGT	GoldenBraid klonování
dm_HSP90.2_R3	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCGTCGACTTCTCCATCTTGC	GoldenBraid klonování
dm_3×FLAG_F	GCGCCGTCTCGCTCGTTCGGATTATAAGGACCATGACGGA	GoldenBraid klonování
dm_3×FLAG_R	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTCACTTATCGTCATCGTCCTT	GoldenBraid klonování
dm_lacl+TACprom_RC_F1	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGGACACCATCGAATGGTGCAA	GoldenBraid klonování
dm_lacl+TACprom_RC_R1	GCGCCGTCTCGAAACGGGCAACAGCTGATTG	GoldenBraid klonování
dm_lacl+TACprom_RC_F2	GCGCCGTCTCGTTTCACTGGTGAAGAAAGAAAACC	GoldenBraid klonování
dm_lacl+TACprom_RC_R2	GCGCCGTCTCGCTCACATTAATCTATGGTCCTTGTGGTG	GoldenBraid klonování
dm_rrnbt1+T2term_RC_F	GCGCCGTCTCGCTCGGCTTGCAGAGTAGGGAACTGCCA	GoldenBraid klonování
dm_rrnbt1+T2term_RC_R	GCGCCGTCTCGCTCAAGCGAAAAGGCCATCCGTCAGGAT	GoldenBraid klonování
dm_GroEI_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGCAGCTAAAGACGTAAAATTC	GoldenBraid klonování
dm_GroEI_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCCATCATGCCGCCCATGCCAC	GoldenBraid klonování
dm_NACα1_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGACTACCGAAGAGAAAGAG	GoldenBraid klonování
dm_NACα1_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCACCGGTGGTAAGCTCCATGA	GoldenBraid klonování
dm_NACα2_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGTCTCCTCCTCTGCTGT	GoldenBraid klonování
dm_NACα2_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCACAGTAGTGAGTTCCATTATTG	GoldenBraid klonování
dm_NACα3_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGACTGCCGAACAGAAAGTG	GoldenBraid klonování
dm_NACα3_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCAGGTAAAGCTCCATGATGGCAG	GoldenBraid klonování
dm_NACα4_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGCCAGGTCCAGTTATTGAG	GoldenBraid klonování
dm_NACα4_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCACCTGTAGTGAGTTCCATAATG	GoldenBraid klonování
dm_NACα5_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGCCAGGAGCAATTGTGGA	GoldenBraid klonování
dm_NACα5_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCTGTAGTGAGTTCCATAATGGC	GoldenBraid klonování
35S_end_F	ATTTCAATTTGGAGAGAAACACGGGGG	Colony PCR
seq_Kan_F	CGAGAAAGTATCCATCATGG	Colony PCR
seq_Kan_R	CCATGATGGATACTTTCTC	Colony PCR
cd_tOle_R	CCGACATTGGAGTTATTGG	Colony PCR
NOST_R	TCATCGCAAGACCGGCAACAG	Colony PCR
35S_middle_F	AGACCAAAGGGCAATTGAGA	Colony PCR a genotypování rostlin
Flag_R	CTTATCGTCATCGTCCTTAT	Colony PCR a genotypování rostlin
pUPD2_F	CCGATCAACTCGAGTGC	Colony PCR
pUPD2_R	TGTTCTTTCTGCGTTATCC	Colony PCR
LB_F	TGGCAGGATATATTGTGGTG	Colony PCR
RB_R	GTTTACCGCCAATATATCC	Colony PCR

Tabulka 16: Seznam použitých primerů určených k domestikaci genů do klonovacího systému GoldenBraid, primery pro colony PCR, z nichž některé byly posléze použity ke genotypování transformovaných rostlin.

3.6 Příprava transformovaných linií rostlin

Transformace *A. tumefaciens* elektroporací

Aby bylo možné vytvořeným konstruktem transformovat rostliny, bylo je nutné nejprve vložit do kompetentních buněk bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmenu GV 3101. Mikrozkušavka s 50 μl kompetentních buněk byla vyjmuta z mrazáku o teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nechána pozvolna roztát na ledu. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 200 ng plazmidové DNA. Obsah mikrozkušavky byl jemně protřepán a inkubován na ledu 3 minuty. Poté byla směs přenesena do elektroporační kyvety, která byla vystavena v elektroporátoru (Eppendorf Eporator) elektrickému pulsu o napětí 2 kV. Poté byl okamžitě k suspenzi přidán 1 ml YEB média (6 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ kvasnicového extraktu, 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ peptonu, 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharózy, 0,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ heptahydrátu síranu hořečnatého) a celý objem kyvety byl přenesen do mikrozkušavky. Ta byla uložena do třepačky (160 rpm, 2 h, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$). Následně bylo v laminárním flowboxu rozetřeno 200 μl bakteriální suspenze na Petriho misku s YEB médiem (6 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ kvasnicového extraktu, 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ peptonu Sigma, 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharózy Sigma, 0,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ heptahydrátu síranu hořečnatého Sigma, 12 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ agaru Sigma) a selekčními antibiotiky (konečná koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ rifampicin, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamycin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ spectinomycin), přičemž miska byla poté vložena do inkubátoru nastaveného na $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po dvou dnech byly vybrány 2 kolonie, ze kterých byla část přenesena do zkumavky s 5 ml tekutého YEB média s příslušnými antibiotiky (finální koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ rifampicin, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamycin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ spectinomycin). Tekuté kultury byly kultivovány přes noc v třepačce (160 rpm $28\text{ }^{\circ}\text{C}$) a následně z nich byly vytvořeny glycerolové konzervy. Ty vznikly smícháním 0,5 ml bakteriální kultury s 0,5 ml 80% glycerolu. Tyto konzervy byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v mrazáku o teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Transformace rostlin

Když WT rostliny pěstované na půdním substrátu vytvořily květní lodyhy, byla z glycerolové konzervy s transformovanými bakteriemi *A. tumefaciens* odebrána pipetovací špičkou část obsahu a rozetřena na Petriho misku s YEB médiem a odpovídajícími antibiotiky (konečná koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ rifampicin, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamycin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ spectinomycin). Misky byly ponechány přes noc při teplotě $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den byla část narostlých bakterií přenesena do zkumavky s 5 ml tekutého YEB média a byly kultivovány přes noc ve třepačce (160 rpm, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$). Třetí den bylo 200 μl bakteriální suspenze přeneseno do 200 ml čerstvého YEB média s patřičnými antibiotiky a bakterie byly opět kultivovány přes noc za

stejných podmínek. Čtvrtý den byly kultury přelity do 250 ml centrifugačních zkumavek (Beckman) a stočeny (3 900 rpm, 20 min). Supernatant byl opatrně slit a pelet byl resuspendován v 5 ml infiltračního média (0.022 % MS soli (Sigma), 5 % sacharóza (Sigma), 1 ml·l⁻¹ roztoku vitaminů podle Gamborga (Sigma), 0.05% MES (kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová; Duchefa), 10 µg·l⁻¹ benzylaminopurin). Resuspendované bakterie byly přeneseny do kádinky s 0,5 l infiltračního média a bylo k nim přidáno 150 µl surfaktantu Silwer Star (AgroBio) (upravený protokol podle Bent, 2006). Květenství rostlin byla ponořena do bakteriální suspenze po dobu 45 s. Následně byly rostliny umístěny do černého plastického pytle a uloženy v kultivační místnosti do příštího dne. Pytel byl poté odstraněn a rostliny byly pěstovány až do dozrání šešulí, z nichž byla sklizena semena.

Selekce transformovaných rostlin

Transformovaná semena byla selektována na přítomnost červeného fluorescenčního proteinu (RFP) pod fluorescenčním stereomikroskopem. Vkládaný konstrukt totiž obsahoval i sekvenci pro RFP s oleosinovým promotorem, který je aktivní výhradně ve zralých semenech. Po jejich vyklíčení byly rostliny dále genotypovány na přítomnost vnesených konstruktů.

3.7 Expresse rekombinantního proteinu v *E. coli*

Pomocí systému GoldenBraid byl vytvořen expresní plazmid, který byl následně vložen do kompetentních buněk *E. coli* kmene BL21. Proces transformace byl stejný jako u kmene Top10a, popsáný výše. Z LB agarových misek byly vybrány dvě kolonie transformovaných bakterií, které byly naočkovány do 20 ml LB média s 50 µg/ml kanamycinu. Kultury byly kultivovány přes noc v třepačce (200 rpm, 37°C). Následujícího dne byla ve spektrofotometru změřena optická denzita kultur při 600 nm (OD₆₀₀). Kultura byla následně rozředěna do 500 ml LB média s antibiotikem tak, aby její výsledné OD₆₀₀ bylo 0,05-0,1. Rozředěná kultura byla vrácena do třepačky (200 rpm, 37 °C) dokud se hodnota OD₆₀₀ nezvýšila na 0,4, což nastalo přibližně po 2-3 hodinách. Poté byla indukována exprese rekombinantního proteinu přidáním IPTG do finální koncentrace 0,1 mM. Po třech hodinách od indukce byla suspenze přelita centrifugačních zkumavek (Beckman) o objemu 250 ml a centrifugována (4 000 rpm, 20 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a pelet byl použit na extrakci proteinů a následnou imunoprecipitaci.

3.8 Izolace proteinů

Proteiny pro test holdázové aktivity byly izolovány z listů vytvořených linií huseničku rolního (pro35S::NAC α 1-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 2-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 3-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 4-3 \times FLAG, pro35S::NAC α 5-3 \times FLAG, pro35S::NAC β 1-3 \times FLAG, pro35S::NAC β 2-3 \times FLAG, pro35S::HSP90.2-3 \times FLAG), nebo v případě proteinu GroEl z transformovaných bakterií *E. coli*. Bakteriální pelet z indukovaných kultur *E. coli* byl resuspendován v 2 ml lyzačního pufru (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 14 % (v/v) glycerol; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,1 % (v/v) IGEPAL CA-630; 7 mM PMSF (benzylsulfonfyl fluorid); 1x proteázové inhibitory, A32955 Thermo Scientific) a homogenizován za použití ultrazvuku po dobu 45 s. Rostlinný materiál byl homogenizován společně s 600 μ l lyzačního pufru v homogenizátoru FastPrep-24TM 5G (MP Biomedicals). Homogenizované vzorky byly centrifugovány (14 000 rpm, 20 min, 4 °C), supernatant byl přenesen do předchlazených zkumavek a 40 μ l extraktu bylo uschováno v oddělené mikrozkuhavce pro analýzu na SDS-PAGE elektroforéze.

3.9 Imunoprecipitace

Pro oddělení požadovaných proteinů z celkového extraktu byla použita imunoprecipitace monoklonálními anti-Flag M2 protilátkami konjugovanými s magnetickými částicemi (Sigma, kat. č. M8823). Před použitím bylo ze zásobního roztoku protilátek odděleno požadované množství (20 μ l roztoku protilátek na 1 vzorek), které bylo promyto ve 100 μ l TBS pufru (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,4). Mikrozkuhavka s protilátkami byla umístěna do magnetického stojánku a pufr byl odstraněn. Proces byl dvakrát zopakován. K protilátkám byl posléze přidán proteinový extrakt a směs byla inkubována přes noc při 8 °C na rotační třepačce. Po ukončení inkubace byl vzorek umístěn do magnetického stojánku, 40 μ l supernatantu bylo odebráno do čisté mikrozkuhavky jako kontrola účinnosti imunoprecipitace a zbytek byl odstraněn. Protilátky byly 3 \times promyty pufrům TBS o objemu 1 ml. Navázané proteiny byly uvolněny 50 μ l 0,1 M roztoku glycinu (pH 3,0) po dobu 15 min za stálého míchání na rotační třepačce. Poté byl vzorek opět umístěn do magnetického stojánku a eluát přenesen do mikrozkuhavky s 10 μ l vzorkového pufru (0,5 M Tris-Cl pH 7,4 a 1,5 M NaCl).

Eluát byl dále diafiltrován a zakoncentrován použitím Amicon Ultra-2 centrifugačních filtračních jednotek s membránovými póry o velikosti 10 kDa. Jednotka byla sestavena podle

návodu a bylo do ní přeneseno 60 µl eluátu a 2 ml 40 mM HEPES pufru pH 7,5 (kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová; Sigma). Po centrifugaci (7 500×g, 30 min) byla odstraněna sběrná část filtrační jednotky s přefiltrovaným roztokem. Pro uvolnění zakonzentrovaného proteinového roztoku byla filtrační jednotka obrácena a centrifugována (1 000×g, 2 min).

Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace získaného proteinu pomocí imunoprecipitace byl použit Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 µl proteinových standardů (BSA v 40mM HEPES pufru) o koncentraci 25, 50, 75, 100, 125, 150 a 250 mg/ml ve dvou technických replikách a 10 µl měřeného vzorku. Do všech jamek bylo přidáno 300 µl Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Reagent (obsažen v kitu) a obsah jamek byl promíchán. Destička byla inkubována 10 min při pokojové teplotě a následně byla změřena absorbance vzorků při 595 nm v Clariostar Plus plate reader (BMG Labtech). Podle získaných dat byla v programu Microsoft Office Excel vytvořena standardní křivka a podle ní byla spočtena koncentrace proteinu ve vzorku po imunoprecipitaci. Následně byla část vzorku použita pro detekci proteinu na Western blotu a část pro testování holdázové aktivity.

3.10 SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v Mini-PROTEAN Tetra Cell systému (Biorad). Jako první byl připraven separační gel (11,25 % (v/v) roztok akrylamidu a bisakrylamidu 37,5:1 (Biorad), 0,125 M Tris-Cl pH 8,8 (MP Biomedicals), 0,1% SDS (Serva), 0,1% (v/v) peroxidisíran amonný (Sigma), 0,2% (v/v) tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED, Carl ROTH)). Na něj byl následně připraven zaostřovací gel (5% (v/v) roztok akrylamidu a bisakrylamidu 37,5:1, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,06% (v/v) peroxidisíran amonný, 0,2% (v/v) TEMED). Gely byly po utužení převrstveny elektrodovým pufrům (25 mM Tris, 192 mM glycin (Sigma), 0,1% SDS). Vzorky byly před nanesením na gel smíchány s 3× nanášecím pufrům (0,15M Tris-Cl pH 6,8, 30% (v/v) glycerol, 6% SDS, 0,15M DTT (2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol; Sigma), 0,03% bromfenolová modř), promíchány a zahřáty na 95 °C po dobu 5 min. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) byl spolu se vzorky nanesen do jamek. Elektroforetická vana byla poté připojena ke zdroji o napětí 75 V, dokud modré čelo vzorků nedorazilo na rozhraní koncentračního a separačního gelu. Poté bylo

napětí zvýšeno na 150 V po dobu 50-60 min. Po skončení elektroforézy byl jeden gel barven koloidní Coomassie Brilliant Blue G250 a druhý byl určen na přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu metodou Western blot.

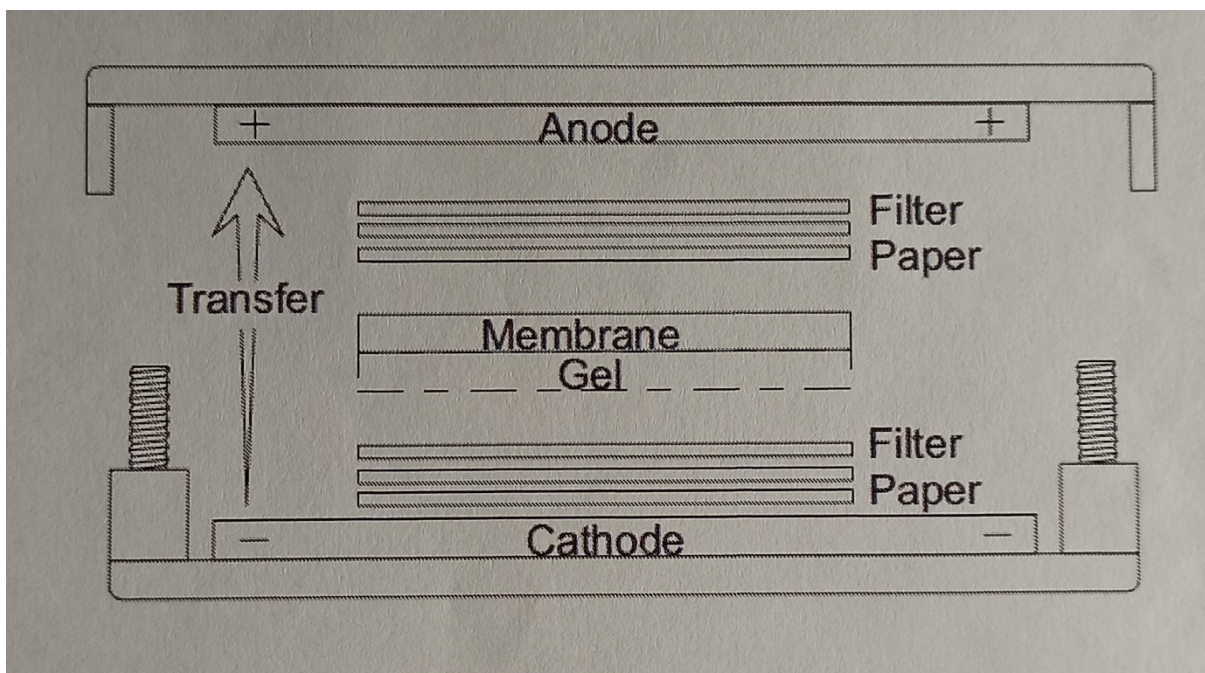
Barvení SDS-PAGE gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250

Gel byl dvakrát po deseti minutách promyt v destilované vodě. Následně byl obarven koloidním roztokem Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (5% (w/v) hydrát síranu hlinitého (Sigma), 0,02% (w/v) CBB G-250 (Sigma), 10% (v/v) ethanol, 2% (v/v) kyselina fosforečná (Roth)). SDS-PAGE gel byl v barvicím roztoku inkubován při pokojové teplotě přes noc, přičemž následujícího dne bylo pozadí gelu odbarveno hodinovou inkubací v odbarvovacím roztoku (10% (v/v) ethanol, 2% (v/v) kyselina fosforečná). Před fotografováním byl gel vložen do destilované vody po dobu 2×10 min a poté vyfocen přístrojem G-box (Syngene). Fotografie byly poté upraveny a popsány v programu Gimp.

3.11 Western blot

Proteiny z SDS-PAGE gelu byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou polosuchého Western blotování (Cold Spring Harbor Protocols, 2006). Dvanáct kusů filtračního papíru shodných s rozměry gelu bylo namočeno do transferového pufru (46,7 mM Tris, 38,6 mM glycin, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) metanol) po dobu 10 min. Do transferového pufru byla krátce namočena i nitrocelulósová membrána. Následně bylo na katodě blotovacího přístroje (Owl Hep-1, Thermo Scientific) na sebe navrstveno 6 kusů filtračního papíru, SDS gel, blotovací membrána a nakonec 6 kusů filtračního papíru (obr. 7). Přístroj byl připojen ke zdroji elektrického napětí o velikosti 20 V po dobu 30 min. Po skončení přenosu proteinů na membránu byla membrána třikrát promyta po dobu 5 min puftrem 1×TBST (Tris-buffered saline with Tween 20 složený z: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 Sigma). Následně byla membrána blokována 5% roztokem sušeného mléka (Bohemilk) v 1×TBST při teplotě 8 °C přes noc. Posléze byla 5 minut promývána puftrem 1×TBST. Následovala hodinová inkubace v primární protilátce anti-Flag M2 produkovaná v myši (F3165 Sigma) 3 000× rozředěná v 0,5% roztoku albuminu z hovězího séra (BSA) v puftrem 1×TBST. Poté byla membrána opět třikrát promyta puftrem 1×TBST a byla 30 min inkubována v roztoku sekundární anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou (A3562 Sigma) 5000× rozředěná v 0,5% BSA v TBST. Následovalo opětovné promytí membrány puftrem 1×TBST (celkem třikrát po pěti minutách) a vizualizace signálu alkalické fosfatázy. Vyvolání bylo provedeno ponořením membrány do AP

pufri (100mM Tris-Cl pH 9,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) s 0,38 mM BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát) a 0,4 mM NBT (nitro blue tetrazolium). Po zviditelnění pruhů byla reakce ukončena opláchnutím membrány destilovanou vodou. Následně byly membrány vyfoceny v přístroji pro dokumentaci gelů (G-Box; Syngene). Získané fotografie byly upraveny a popsány v programu Gimp.



Obrázek 7: Schéma vrstev při western blotování , kdy dochází k přenosu proteinů z SDS-PAGE gelu na nitrocelulósovou membránu. Převzato z Thermo Scientific, 2011.

3.12 Test holdázové aktivity

Holdázová aktivita byla testována podle (Haslbeck and Buchner, 2015). Princip této metody spočívá v měření změn absorbance způsobených agregací reportérového proteinu. Samotná agregace je vyvolána působením zvýšené teploty, nebo indukována chemicky. Pokud jsou v roztoku přítomny spolu s reportérovým proteinem i protein s holdázovou aktivitou, ke zvýšení absorbance nedojde.

Jako reportérový protein byla použita citrátsyntáza z prasečího srdce zakoupená ve formě suspenze v síranu amonném (CS; Sigma C3260-1KU). Dodaná zkumavka s CS byla nejprve centrifugována (14 000 rpm, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v TE pufri (50 mM Tris-Cl, 2mM EDTA, pH 8,0), aby bylo dosaženo výsledné koncentrace CS 150 μM.

Pro chemicky indukovanou agregaci je 150 μM CS rozředěna v poměru 1:10 roztokem 4M guanidinium chloridu a 40 mM HEPES, pH 7,5. Směs byla inkubována 2 hodiny při 16 °C. V průběhu inkubace CS byla změřena absorbance roztoků s chaperony při 360 nm ve spektrofotometru. Po skončení inkubace byl do kyvet napipetován roztok CS, aby jeho konečná koncentrace byla 1 μM a finální koncentrace chaperonů 1-16 \times vyšší. Následně byla měřena absorbance vzorků při 360 nm po dobu 7 min. Získané hodnoty byly zpracovány do grafu v programu Microsoft Office Excel.

Při tepelné agregaci byl roztok s chaperony přehřát na 43 °C a byla změřena jeho absorbance při 360 nm. Následně byla k chaperonům přidána CS o finální koncentraci 1 μM . Konečná koncentrace chaperonů opět byla v poměru k CS 1-16:1. Kyvety byly inkubovány při 43 °C a každých 5 min byla změřena absorbance při 360 nm. Měření bylo prováděno po dobu jedné hodiny. Data byla posléze zpracována v programu Microsoft Office Excel.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vliv osmotického a solného stresu na klíčivost semen

Pro funkční charakterizaci β -podjednotky komplexu NAC jsme se rozhodli studovat vliv osmotického a solného stresu na klíčivost semen mutantní linie *nac β 1nac β 2* a nadexprimujících linií pro35S::*NAC β 1-GFP* a pro35S::*NAC β 2-GFP*. Podle publikovaných dat u jiných dříve studovaných rostlinných druhů, například tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*, Pruthvi *et al.*, 2017), nebo pšenice seté (*Triticum aestivum*, Kang *et al.*, 2013), jsme předpokládali, že linie *nac β 1nac β 2* bude oproti divokým rostlinám vykazovat nižší klíčivost semen za stresových podmínek. Naopak podle původní hypotézy měla nadexprese vést k vyšší klíčivosti semen.

Aby bylo možné v průběhu stresových experimentů zajistit co nejvíce kontrolované podmínky s co nejmenší variabilitou mezi opakováními, byla semena studovaných linií vyseta v podmínkách *in vitro* na MS/2 médium s přidavkem manitolu (ve finálních koncentracích 250mM, 300mM a 350mM) nebo polyetylglykolu (PEG; o celkové koncentraci 10 %, 15 % a 18 % w/v). Přídavek obou těchto látek způsobuje osmotický stres, ale obě se liší svojí schopností vstupovat do buněk. Manitol vstupuje do nitra rostlinných buněk, zatímco PEG 8000 dovnitř buněk vniknout nemůže. Pro navození solného stresu byl do média přidán chlorid sodný o finální koncentraci 50mM, 100mM, 125mM a 150mM. Při každém výsevu byla semena vyseta i na čisté MS/2 médium, které sloužily jako kontrola. Vyseté misky byly umístěny na jeden den do chladové místnosti, aby proběhla teplotní stratifikace semen, a následně byly přemístěny do kultivační místnosti. Poté byl hodnocen počet vyklíčených semen vždy 4., 6., 8., 11. a 13. den od přenesení misek do kultivační místnosti. Semeno bylo považováno za vyklíčené, když byly na semenáčku rozeznatelné oddělené děložní lístky. Při stresových experimentech byly použity u nadexprimujících linií vždy dvě nezávisle vzniklé linie označované v této diplomové práci jako pro35S::*NAC β 1-GFP_1* a pro35S::*NAC β 1-GFP_2*, respektive pro35S::*NAC β 2-GFP_1* a pro35S::*NAC β 2-GFP_2*. Obě nadexprimující linie se chovaly za stresových podmínek obdobně, a proto jsou dále uváděna data pouze pro linie pro35S::*NAC β 1-GFP_1* a pro35S::*NAC β 2-GFP_1*. Pro mutantní linii *nac β 1nac β 2* bylo provedeno pět nezávislých výsevů na média s přidaným manitolem, nebo NaCl o celkovém počtu 308 semen a dva výsevy na MS/2 médium s PEG s celkovými 164 semeny. Každá z nadexprimujících linií byla vyseta v celkovém množství 200 semen čtyřikrát na MS/2 s manitolem, nebo NaCl a dvakrát v celkovém počtu 100 semen na médium s PEG.

Nízká koncentrace (50 mM a 100 mM) NaCl prodlužovala čas klíčení a snižovala počet vyklíčených semen u mutantní linie *nacβ1nacβ2* (Obr. 7 A). Překvapivě podobný vliv NaCl byl pozorován i u nadexprimujících linií *pro35S::NACβ1-GFP* a *pro35S::NACβ2-GFP*, kdy bylo množství nevyklíčených semen při koncentraci 100mM dokonce větší než u mutantů (Graf 2 A). U divokých rostlin (WT) došlo za těchto koncentrací pouze k prodloužení doby klíčení, ale samotná klíčivost se stále držela nad 90 %. Při 125mM a 150 mM koncentraci NaCl byl vliv stresu výraznější u všech testovaných linií včetně kontrolních divokých rostlin. U mutantní linie došlo k výraznému prodloužení doby klíčení a snížení klíčivosti, stejně jako u nadexprimujících linií, kde byl počet vyklíčených semen při koncentraci 150mM dokonce menší než u mutantů. Dále bylo pozorováno, že vysoká koncentrace NaCl více ovlivňuje klíčivost linií nadexprimujících NACβ2 než NACβ1. Nejvyšší koncentrace všech stresorů (150 mM NaCl, 350 mM manitol, 18 % PEG) snižovaly klíčivost i u kontrolních WT semen.

Jak osmotický, tak solný stres způsobovaly snížení klíčivosti a prodloužení času klíčení u všech testovaných genotypů rostlin. Překvapivě nejvíce byla osmotickým stresem vyvolaným manitolem ovlivněna linie nadexprimující NACβ2, kdy počet vyklíčených semen této linie byl nejmenší za všech. Při koncentraci 250 mM (Obr. 7 B a Graf 2 B) a 300 mM manitolu byla doba klíčení prodloužena a počet vyklíčených semen redukován. Semena kontrolních divokých rostlin oproti tomu pouze klíčila déle, ale ke konci sledovaného úseku jich většina vyklíčila. U nejvyšší testované koncentrace (350 mM) bylo pozorováno výrazné prodloužení doby klíčení i snížení počtu vyklíčených semen u všech testovaných linií, včetně kontrolní WT, kde snížení klíčivosti nebylo tak výrazné.

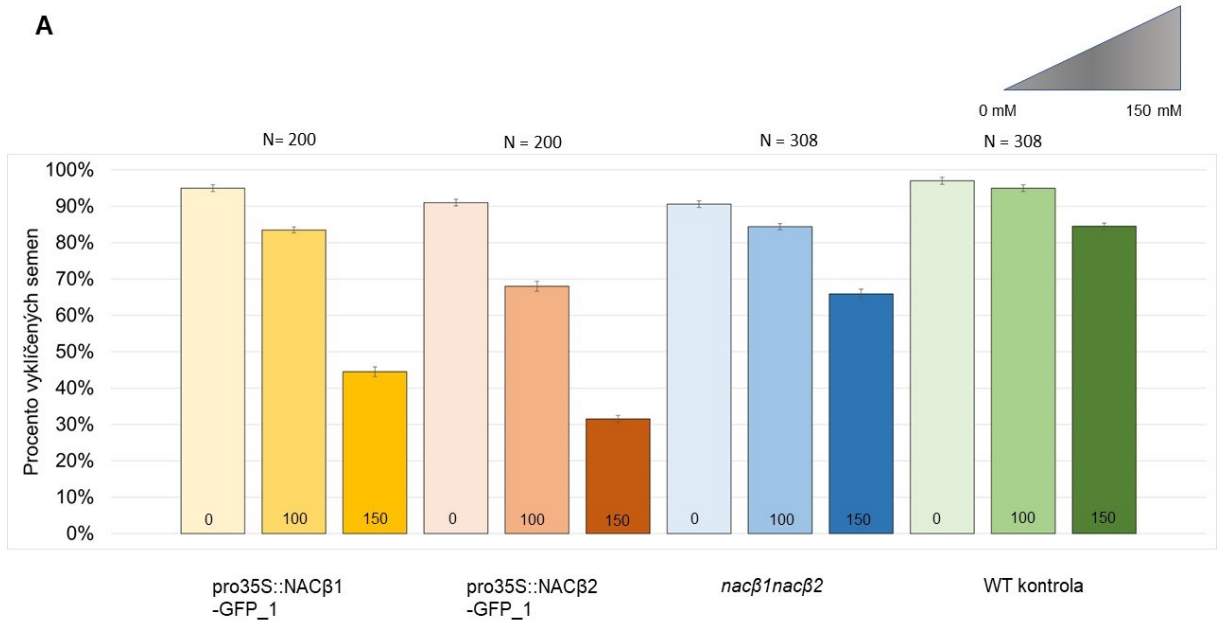
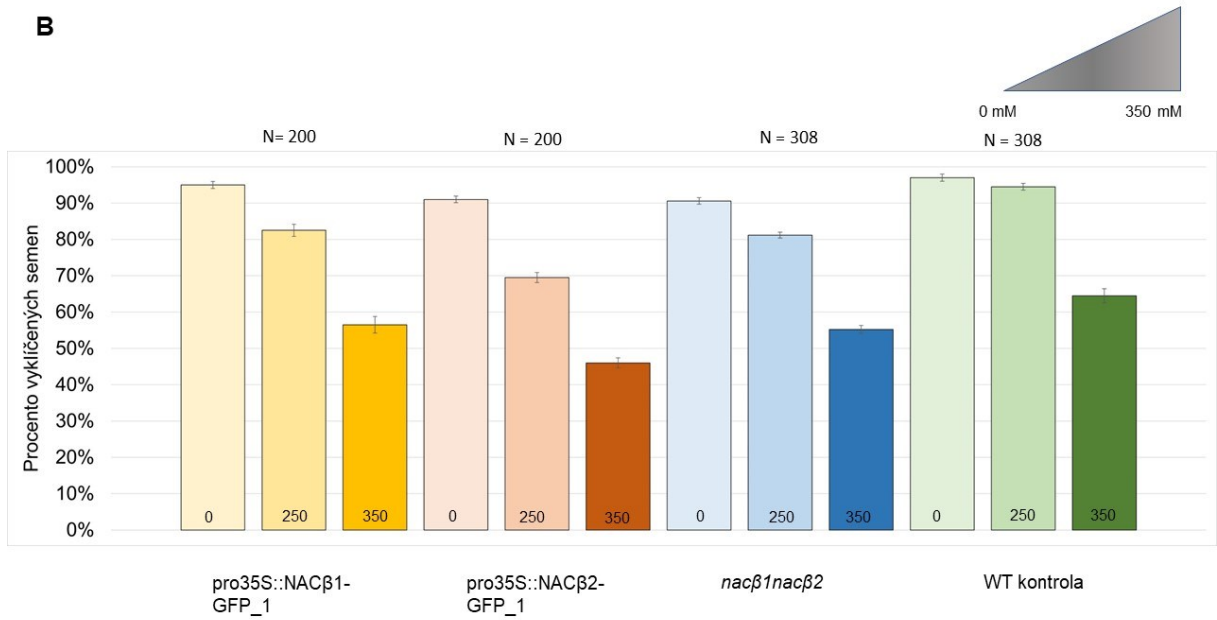
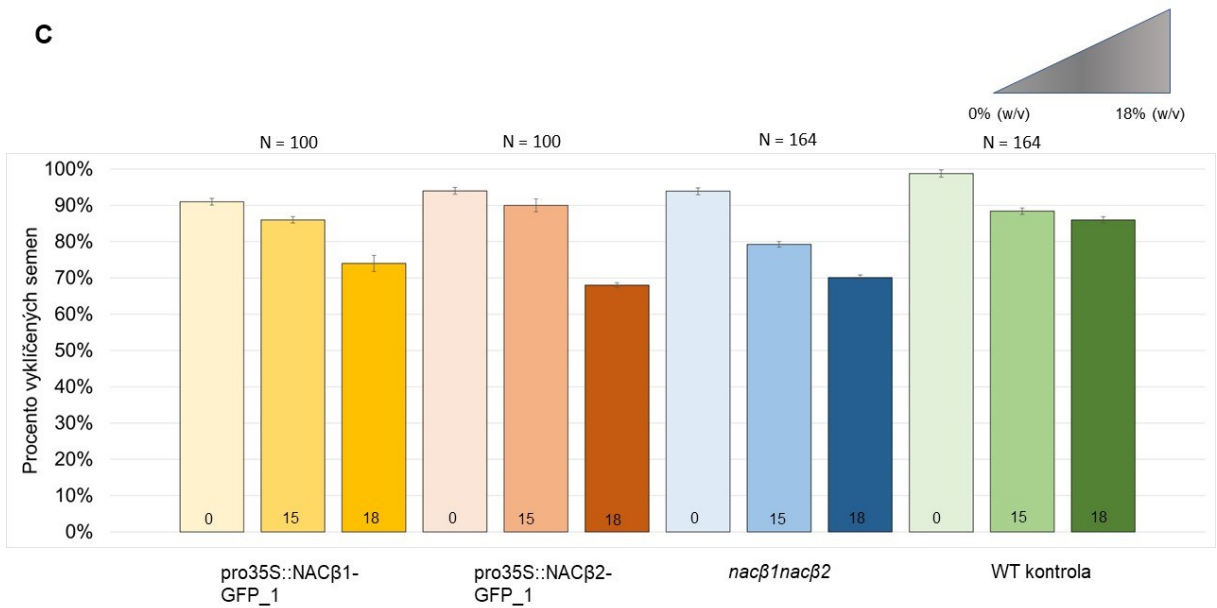
Jako příliš nízká se ukázala 10% koncentrace polyethylenglykolu (PEG), kdy změny v klíčivosti jednotlivých linií oproti kontrole byly zanedbatelné. U zbývajících dvou koncentrací (15% a 18%) se již stresové podmínky projevíly prodloužením doby klíčení, kdy semena klíčila místo 4. dne až v den 6-8 a snížením počtu vyklíčených semen u všech testovaných linií včetně WT semen. Nižší klíčivost nadexprimujících linií oproti mutantní, nebyla zaznamenána (Graf 1 C).

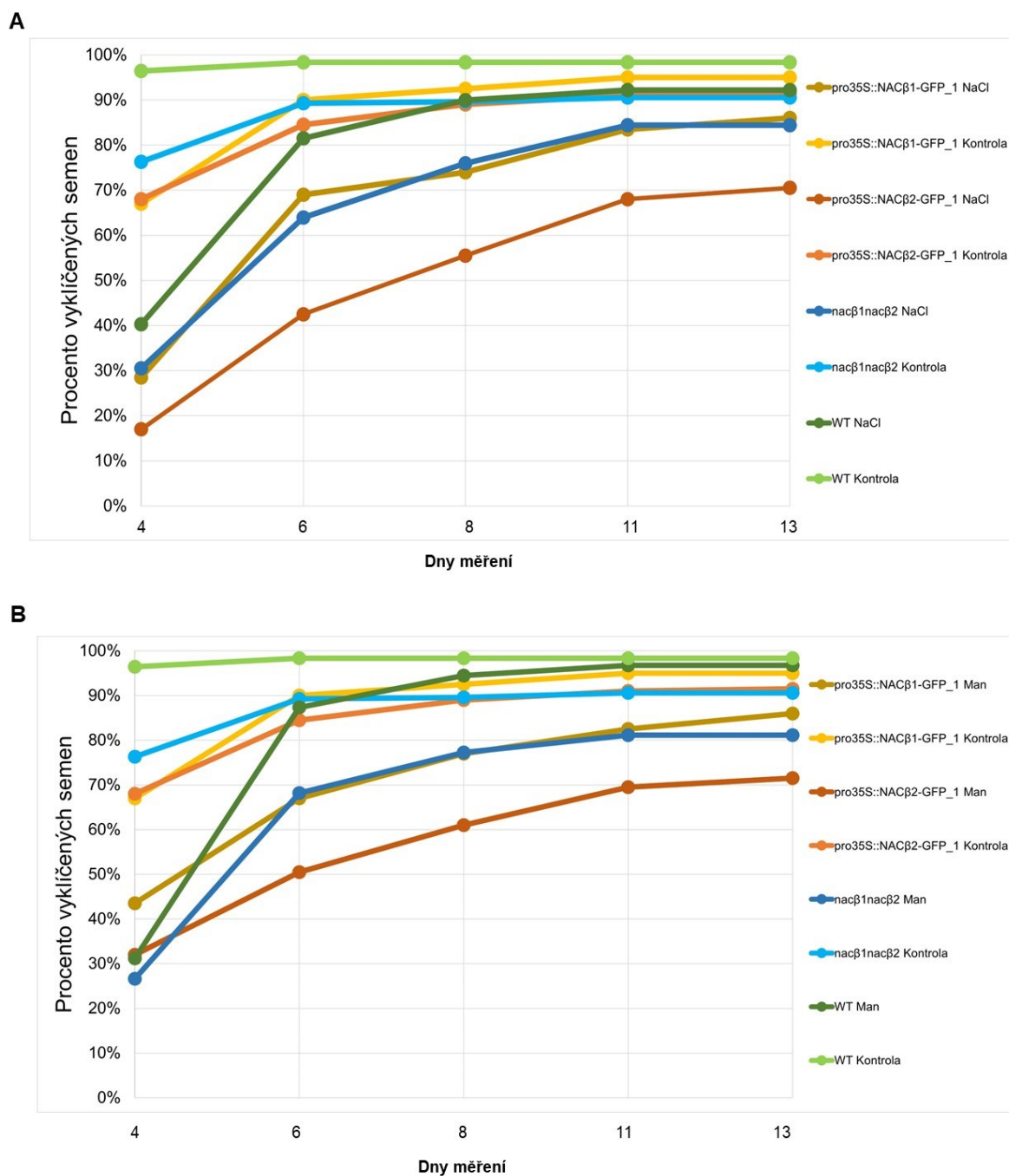
Dále jsme statisticky vyhodnotili vliv genotypu na klíčivost vyšetých semen za jednotlivých koncentrací přidaných stresorů NaCl (50 mM, 100 mM, 125 mM a 150 mM), manitolu (250 mM, 300 mM a 350 mM) a polyethylenglykolu (10 %, 15 % a 18 %). Pro vyhodnocení byl použit jednovýběrový ANOVA test, jehož výsledek byl statisticky signifikantní u 9 z 11 testovaných podmínek (Tab. 17). Dále byly mezi sebou porovnány

jednotlivé genotypy, a to Tukey HSD testem. Výsledné p-hodnoty byly podrobeny korekci pro mnohonásobné porovnání metodou Benjamini-Hochberg. Porovnání jednotlivých skupin bylo většinou nesignifikantní. Signifikantní změny mezi některými genotypy byly pozorovány jen u následujících koncentrací stresorů: NaCl (50 mM a 150 mM) a PEG (10 % a 18%).

V souladu s vyslovenou hypotézou vedla absence NAC β u linie *nac β 1nac β 2* ke snížení klíčivosti a k prodloužení doby klíčení za všech testovaných podmínek. Oproti tomu snížená klíčivost nadexprimujících linií pro35S::NAC β 1-GFP i pro35S::NAC β 2-GFP, která byla za určitých podmínek dokonce nižší než klíčivost mutantních semen, vyvrací naši původní hypotézu o prospěšnosti nadměrné exprese NAC β při zvládnutí abiotického stresu.

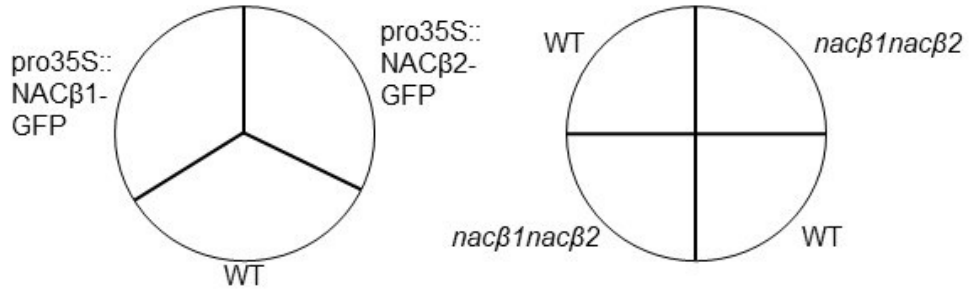
Graf 1: Klíčení semen za vybraných koncentrací stresorů. Modrá barva značí mutantní rostliny *nac β 1nac β 2* a zelená kontrolní divoké rostliny. Číslo ve sloupcích značí koncentraci stresoru. Žlutá barva reprezentuje nadexprimující linii pro35S::NAC β 1-GFP_1 a červená barva značí nadexprimující linii pro35S::NAC β 2-GFP_1. Jelikož se obě nezávislé nadexprimující linie chovaly obdobně, je v grafech uvedena pro každý gen pouze jedna z nich. Graf (A) znázorňuje klíčení semen za solného stresu. Jako reprezentativní koncentrace byly vybrány 100mM a 150mM NaCl. Graf (B) zaznamenává procento vyklíčených semen při osmotickém stresu způsobeném 250mM a 350mM koncentrací manitolu. Graf (C) znázorňuje procento vyklíčených semen na médiu s přidáním PEG 8000. Koncentrace PEG v médiu byly 15% a 18% (w/v).

A**B****C**



Graf 2: Podíl vyklíčených semen v čase za 100mM koncentrace NaCl (A) a 250mM koncentrace manitolu (B). Světlejší odstíny barev značí kontroly rostoucí na čistém MS/2 médiu, zatímco tmavší odstíny symbolizují médium s přidaným stresorem. Klíčivost všech testovaných linií za běžných podmínek přesahuje 90 % již 8 dní od vysetí. Po přidání stresorů se čas klíčení prodlužuje a dochází ke snížení klíčivosti. Zatímco stejný počet WT semen vyklíčí za stresových podmínek v porovnání s běžným stavem o sedm dní později, ostatní linie obdobných počtů vyklíčených semen v průběhu sledování nedosáhnou. Zatímco mutantní linii *nacβ1nacβ2* a linii *pro35S::NACβ1-GFP_1* stresy ovlivnily obdobně, tak nejvíce byla postižena linie *pro35S::NACβ2-GFP_1*, která klíčila za stresových podmínek nejméně, což je v rozporu s testovanou hypotézou. V grafech jsou prezentovány pouze vybrané koncentrace stresorů. Rovněž je zde prezentována pouze jedna nezávislá linie od každé nadexprimující linie, protože obě nezávislé linie se chovaly obdobně.

A

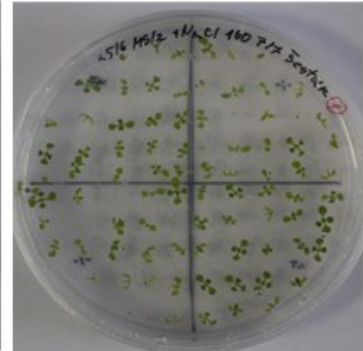
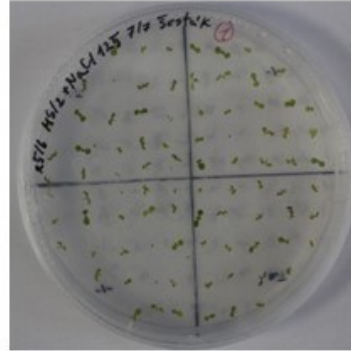
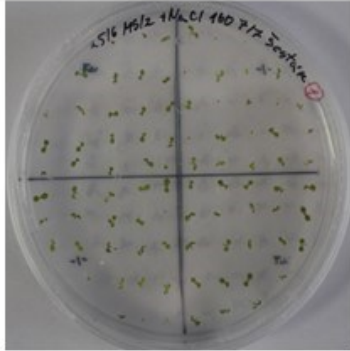


6 dní

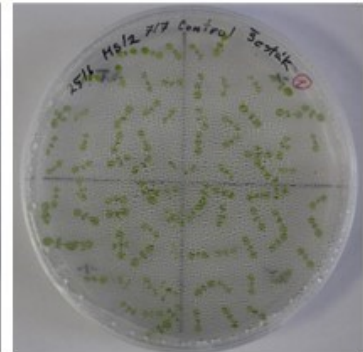
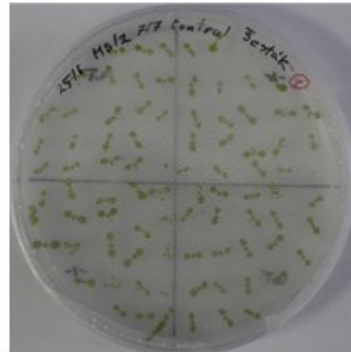
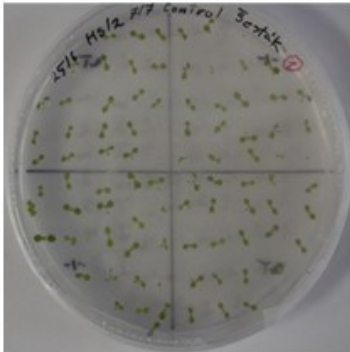
8 dní

11 dní

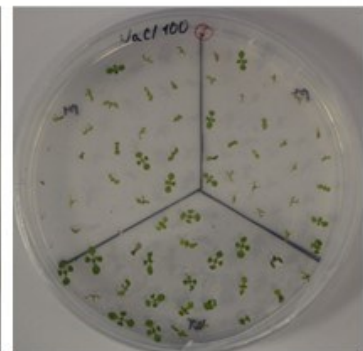
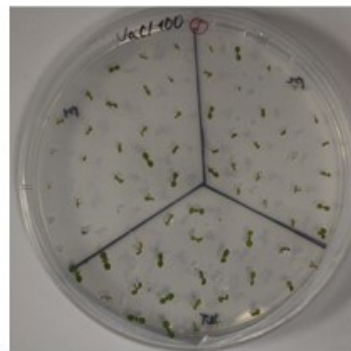
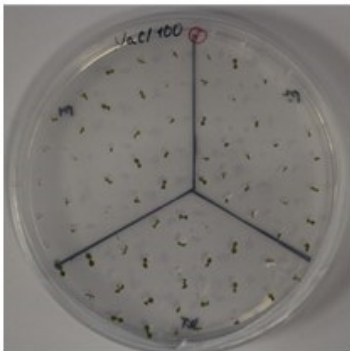
100 mM NaCl
nacβ1nacβ2



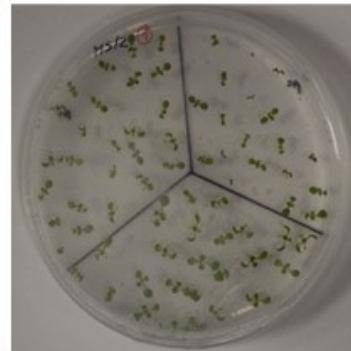
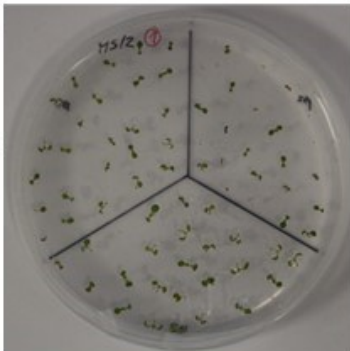
Kontrola
nacβ1nacβ2



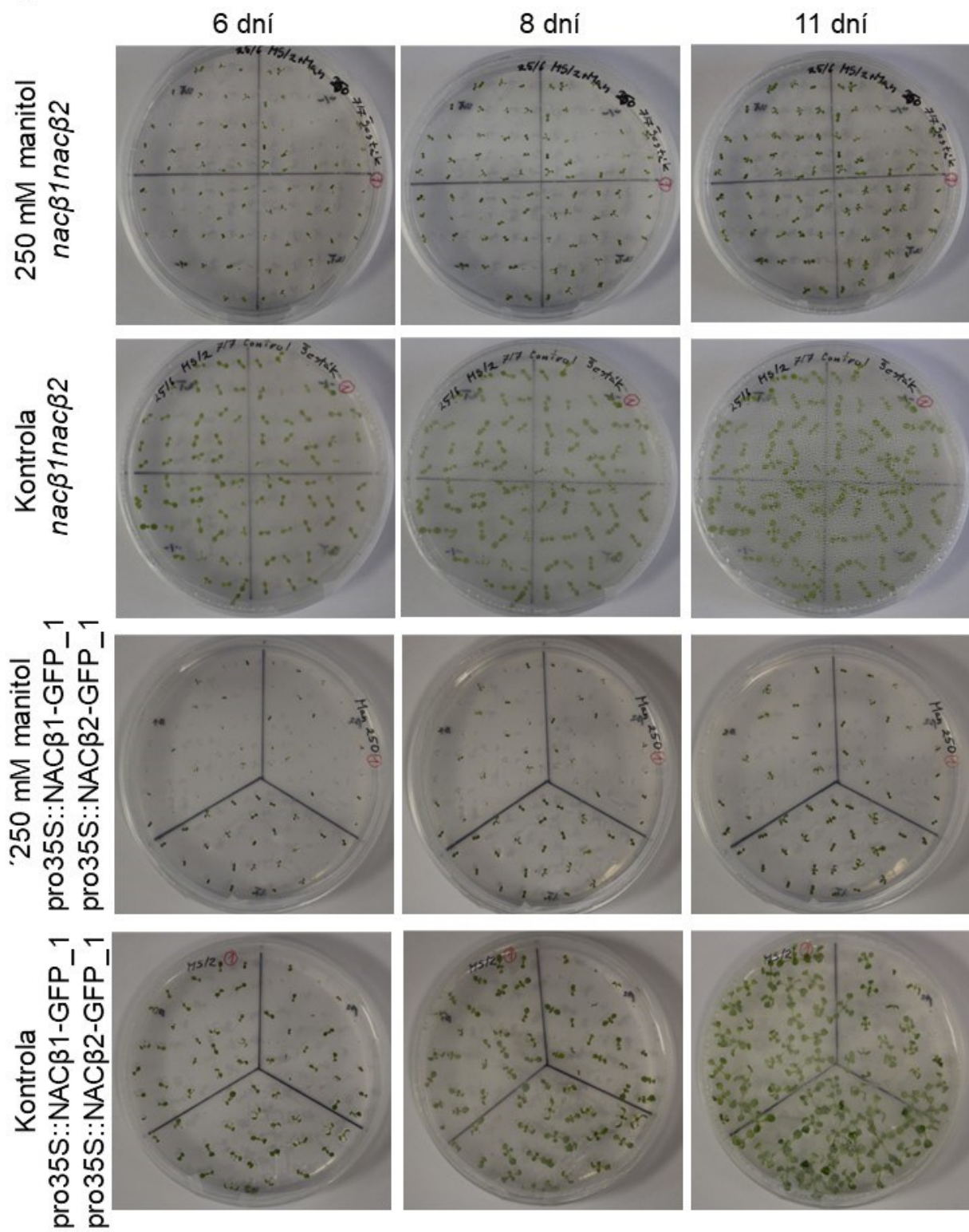
100 mM NaCl
pro35S::NACβ1-GFP_1
pro35S::NACβ2-GFP_1



Kontrola
pro35S::NACβ1-GFP_1
pro35S::NACβ2-GFP_1



B



Obrázek 8: Koláže fotografií zachycují průběh klíčení vybraných testovaných linií za 100mM koncentrace NaCl (A) a 250mM koncentrace manitolu (B). Rozložení semen jednotlivých linií na miskách je znázorněno na schématech v záhlaví (A). Měření bylo prováděno 4, 6, 8, 11, a 13 dní po přesunu vyšetých misek z chladové místnosti do kultivační místnosti. Na kolážích jsou zachycena pozorování ve vybrané dny, mezi kterými byly pozorovány největší změny. Na fotografiích je současně ukázána pouze jedna linie od každé nadexprimující linie, protože obě nezávislé varianty se při pozorování nelišily.

Stresor	Chlorid sodný NaCl							
Koncentrace	50 mM		100 mM		125 mM		150 mM	
Celková p-hodnota:	3,10E-05		0,0163		0,353		0,000048529	
	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce
nacβ1nacβ2 vs pro35S::NACβ1-GFP_1	0,001005	0,00603	0,228220	0,45644	0,604007	0,899995	0,339440	0,40733
nacβ1nacβ2 vs pro35S::NACβ2-GFP_1	0,026030	0,05206	0,548560	0,65827	0,899995	0,899995	0,023952	0,0479
nacβ1nacβ2 vs WT	0,002884	0,00865	0,341083	0,51162	0,521057	0,899995	0,059670	0,08951
pro35S::NACβ1-GFP_1 vs pro35S::NACβ2-GFP_1	0,165085	0,1981	0,030122	0,12248	0,610676	0,899995	0,633249	0,63325
pro35S::NACβ1-GFP_1 vs WT	0,161832	0,1981	0,899995	0,9	0,899995	0,899995	0,002149	0,00645
pro35S::NACβ2-GFP_1 vs WT	0,899995	0,9	0,040826	0,12248	0,553666	0,899995	0,001005	0,006

Stresor	Manitol						Kontrola	
Koncentrace	250 mM		300 mM		350 mM			
Celková p-hodnota:	0,0013		0,0084		0,83		1,289E-07	
	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce
nacβ1nacβ2 vs pro35S::NACβ1-GFP_1	0,0929075	0,13936	0,325541	0,48831	0,868137	0,899995	0,001005	0,00302
nacβ1nacβ2 vs pro35S::NACβ2-GFP_1	0,8999947	0,89999	0,869862	0,9	0,899995	0,899995	0,001005	0,00302
nacβ1nacβ2 vs WT	0,006303	0,02455	0,040285	0,12086	0,899995	0,899995	0,004505	0,00676
pro35S::NACβ1-GFP_1 vs pro35S::NACβ2-GFP_1	0,0752954	0,13936	0,144891	0,28978	0,796516	0,899995	0,395894	0,39589
pro35S::NACβ1-GFP_1 vs WT	0,8999947	0,89999	0,899995	0,9	0,882979	0,899995	0,002744	0,00549
pro35S::NACβ2-GFP_1 vs WT	0,0081831	0,02455	0,017559	0,10535	0,899995	0,899995	0,209517	0,25142

Stresor	Polyethylenglykol 8000 (PEG)					
Koncentrace	10 % (w/v)		15 % (w/v)		18 % (w/v)	
Celková p-hodnota:	4,9579E-06		6,5894E-07		0,0004	
	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce	Tukey HSD p-hodnota	Korekce
nacβ1nacβ2 vs pro35S::NACβ1-GFP_1	0,001005	0,00603	0,001005	0,00201	0,024638	0,070018
nacβ1nacβ2 vs pro35S::NACβ2-GFP_1	0,026030	0,05206	0,001005	0,00201	0,211123	0,261983
nacβ1nacβ2 vs WT	0,002884	0,00865	0,001005	0,00201	0,001005	0,006032
pro35S::NACβ1-GFP_1 vs pro35S::NACβ2-GFP_1	0,165085	0,1981	0,716218	0,85946	0,723455	0,723455
pro35S::NACβ1-GFP_1 vs WT	0,161832	0,1981	0,577633	0,85946	0,218320	0,261983
pro35S::NACβ2-GFP_1 vs WT	0,899995	0,89999	0,899995	0,89999	0,035009	0,070018

Tabulka 17: Statistické zpracování dat pro testované koncentrace NaCl (50 mM, 100 mM, 125 mM a 150 mM), manitolu (250 mM, 300 mM a 350 mM) a polyethylenglykolu (10 %, 15 % a 18 %). Data byla zpracována jednovýběrovým ANOVA testem. Jednotlivé genotypy rostlin byly porovnány mezi sebou Tukey HSD testem, čímž jsme testovali, jestli existují statisticky významné rozdíly v klíčivosti semen při porovnání genotypů za daných stresových podmínek. Takto získaná data byla podrobena korekci metodou Benjamini-Hochberga. Z jedenácti testovaných podmínek byl výsledek ANOVA testu signifikantní u devíti. Zeleně jsou vyznačena pole s p-hodnotou $< 0,05$.

Změny exprese genů NAC za stresových podmínek

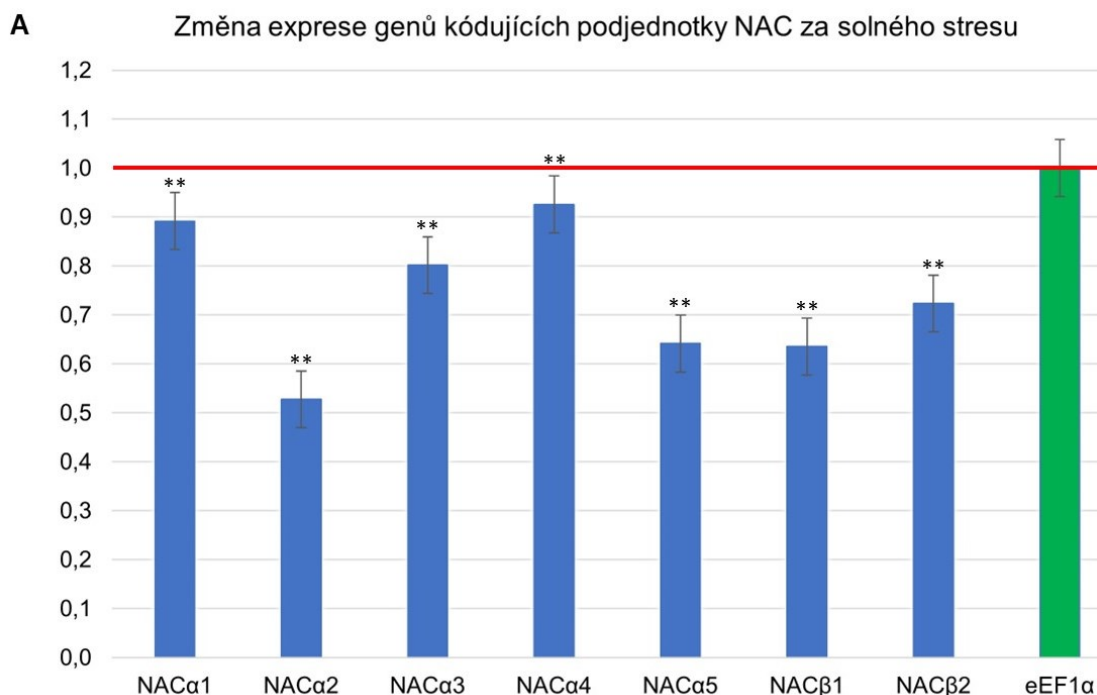
V návaznosti na sledované snížení klíčivosti semen mutantů *nacβ1nacβ2* a nadexprimujících linií pro35S::*NACβ1*-GFP a pro35S::*NACβ2*-GFP jsme se rozhodli zjistit, jak stresové podmínky ovlivňují expresi jednotlivých genů kódujících NAC podjednotky. Pro ověření této hypotézy jsme zvolili metodu RT-qPCR. Kromě stanovení abundance transkriptů kódujících NAC podjednotky za stresových podmínek u divokých rostlin, jsme také stejným způsobem ověřovali nadexpresi genů u linií pro35S::*NACβ1*-GFP a pro35S::*NACβ2*-GFP použitých při stresových experimentech.

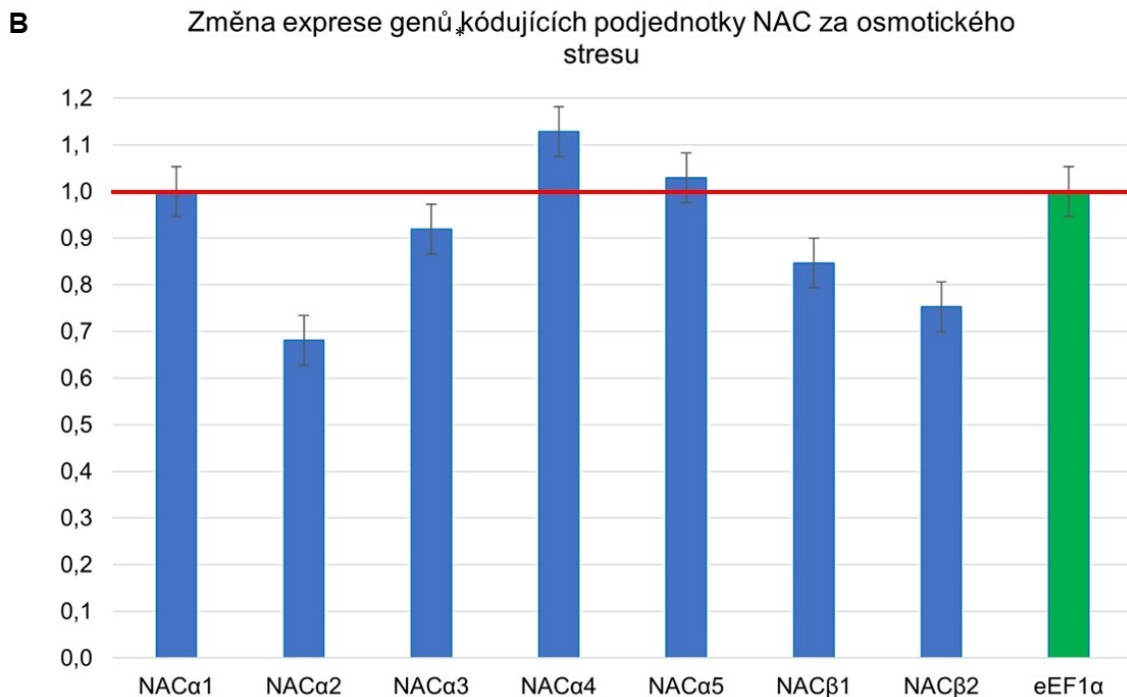
Pro stanovení abundance příslušných transkriptů jsme použili desetidenní semenáčky huseničku rolního ekotypu Col-0, které rostly v podmínkách *in vitro* na MS/2 médiu s přidaným NaCl (125 mM), nebo manitolem (300 mM). Jako kontrola sloužily semenáčky pěstované na čistém MS/2 médiu. Ze vzorků byla vyextrahována RNA, následně byla zbavena zbytkové DNA a přepsána do cDNA.

Během pilotního experimentu jsme zkoušeli šest možných referenčních genů, u nichž byly očekávány minimální změny v koncentraci jejich transkriptů napříč různými pletivy (eEF1, eEF1 α , ACT8, GAPC1, HSP70 a UGE1). Z nich jsme vybrali elongační faktor 1 α (eEF1 α ; At5g60390) jako referenční gen pro následující experimenty, protože vykazoval nejmenší změny při své expresi jak za osmotického, tak za solného stresu. V dalších experimentech již probíhalo měření abundance transkriptů kódujících jednotlivé NAC podjednotky. Celkem byly měřeny čtyři biologické repliky pro každou ze čtyř nadexprimujících linií se stejným počtem kontrolních WT vzorků. Změny v množství transkriptů sledovaných genů byly u solného stresu měřeny na sedmi biologických replikách a u osmotického stresu na pěti. Abundance transkriptů kódující NAC podjednotky byly vztaženy k referenčnímu genu eEF1 α . Prahové hodnoty cyklů (z angličtiny *Ct value*) byly použity ke statistickému zpracování dat za využití t-testu v programu Excel.

Transkripty tří genů ($NAC\alpha 1$, $NAC\alpha 3$ a $NAC\alpha 4$) byly během solného stresu obdobně nebo jen mírně méně abundantní ($0,8\times$ v porovnání s $eEF1\alpha$). U genu kódujícího $NAC\beta 1$, $NAC\beta 2$, $NAC\alpha 5$ se exprese snížila na hodnoty mezi $0,60\times$ – $0,75\times$. Nejvyšší snížení abundance jsme zaznamenali u genu kódujícího $NAC\alpha 2$, kde míra exprese dosahovala přibližně polovičních hodnot oproti kontrole. Všechny tyto změny byly statisticky signifikantní s p-hodnotami menšími než 0,01.

Oproti tomu za osmotického stresu (Graf 3 B) jsme pozorovali snížení abundance transkriptů pod hladinu $0,80\times$ pouze u genů kódujících $NAC\alpha 2$ a $NAC\beta 2$. Geny kódující $NAC\alpha 1$, $NAC\alpha 3$ a $NAC\beta 1$ měly sníženou míru exprese pouze mírně nebo vůbec, a to v hodnotách $0,85\times$ až $1,0\times$. Překvapivý výsledek byl u genů kódujících $NAC\alpha 4$ a $NAC\alpha 5$, u kterých došlo k mírnému zvýšení exprese. Statisticky se nám však nepodařilo potvrdit signifikanci jakékoliv z těchto pozorovaných změn exprese.

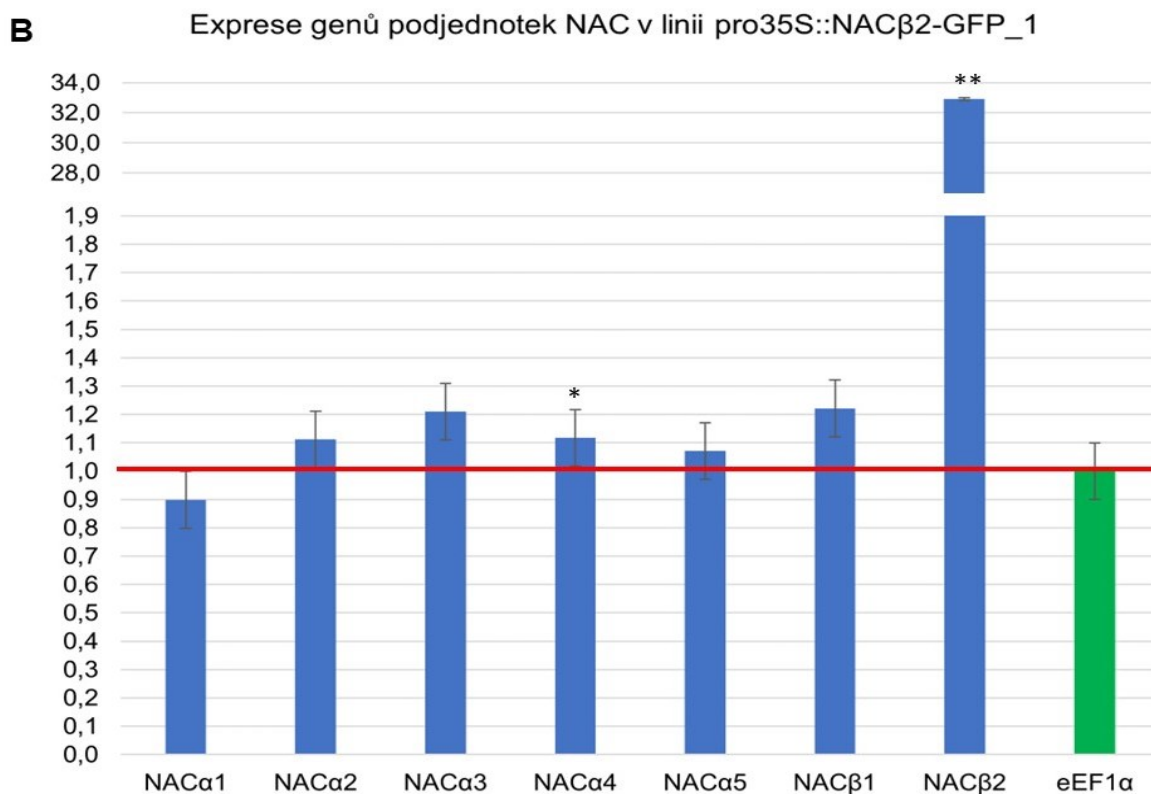
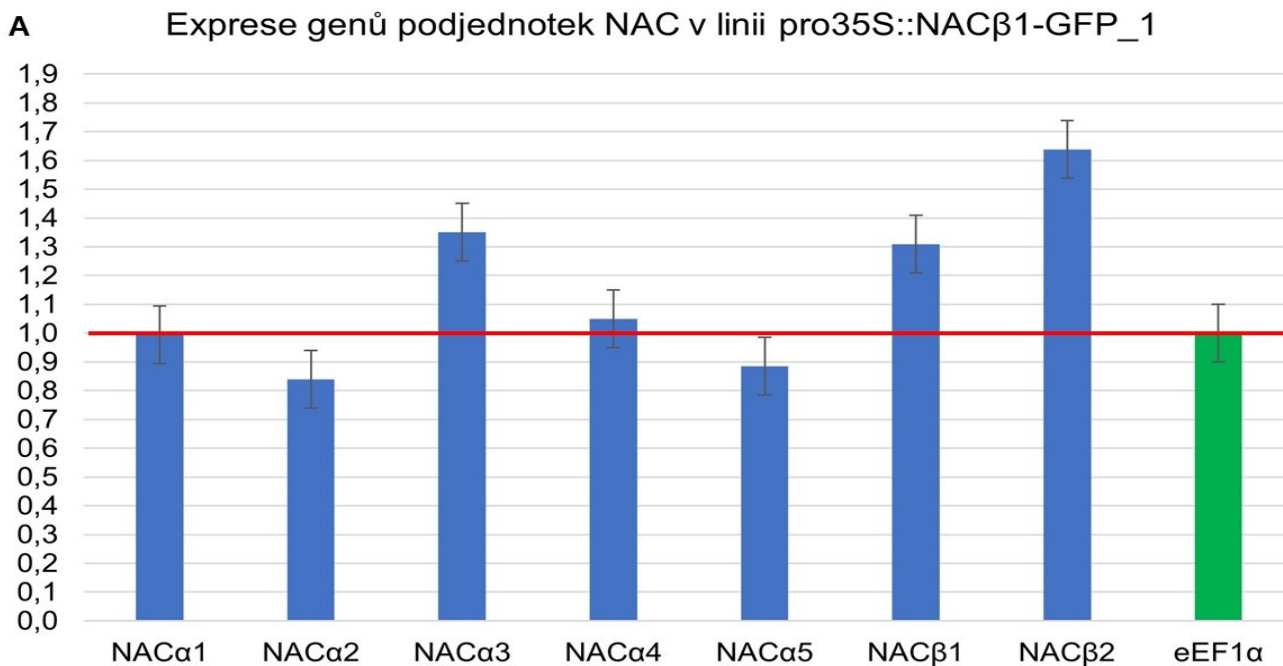




Graf 3: Grafy zachycují změny exprese genů kódujících podjednotky komplexu NAC za solného, nebo osmotického stresu. Prezentované hodnoty jsou mediánem normalizovaných hodnot sedmi měřených biologických replik u solného stresu (A) a pěti u osmotického stresu vyvolaného manitolem (B). Zelený sloupec znázorňuje referenční gen eEF1α.

Prahové hodnoty cyklů (Ct hodnoty) byly použity ke statistické analýze dat za využití t-testu. V případě působení solného stresu (A), byly všechny změny statisticky signifikantní. U osmotického stresu (B) nebyla signifikantní změna u žádného z genů. p-hodnota * < 0,05; ** < 0,01

Pro lepší pochopení, proč nadexprimující linie klíčí za stresových podmínek hůře než mutantní semena, jsme se rozhodli u všech testovaných linií zjistit, zda nadexprese jedné z β-podjednotek nevede ke změnám abundance transkriptů kódujících ostatní podjednotky komplexu NAC. Zajímavá data jsme získali při zkoumání linií pro35S::NACβ1-GFP_1 a pro35S::NACβ1-GFP_2 (Graf 4 A). U obou těchto nezávislých linií jsme zjistili pouze mírné zvýšení míry exprese transkriptu kódujícího NACβ1, ale současně docházelo i ke zvýšení abundance transkriptu kódujícího NACβ2. Z genů kódujících NACα podjednotku byla mírně zvýšená exprese u NACα3. Ostatní geny měly expresi mírně sníženou, nebo zůstala dokonce nezměněna. Žádná z těchto změn se neprokázala jako statisticky signifikantní. U nadexprimujících linií pro35S::NACβ2-GFP_1 a pro35S::NACβ2-GFP_2 (Graf 4 B) jsme nepozorovali žádné výrazné změny v míře transkripce sledovaných genů, kromě genu kódujícího NACβ2, který byl nadexprimován víc než 32×.



Graf 4: Grafy zachycují abundance transkriptů kódujících podjednotky komplexu NAC u nadexprimujících linií pro35S::NACβ1-GFP_1 (A) a pro35S::NACβ2-GFP_1 (B). V grafech je znázorněna vždy pouze jedna z dvojice nezávislých linií, vzhledem k tomu, že jejich výsledky RT-qPCR byly obdobné. Prezentovaná data jsou mediánem normovaných hodnot ze čtyř biologických replik.

Prahové hodnoty cyklů (Ct hodnoty) byly použity ke statistické analýze dat za využití t-testu. V případě linie pro35S::NAC β 1-GFP_1 (A) nedošlo k žádné signifikantní změně, zatímco u pro35S::NAC β 2-GFP_1 (B) byla signifikantně zvýšena exprese NAC α 4 a NAC β 2. p-hodnota * < 0,05; ** < 0,01

4.2 Testování holdázové aktivity podjednotek komplexu NAC

Abychom dokázali lépe charakterizovat roli komplexu NAC a jeho jednotlivých podjednotek při zvládnání stresových podmínek, rozhodli jsme se otestovat jeho chaperonovou aktivitu v podmínkách *in vitro*. Chaperony se dělí na **holdázy** (navážou se na protein a chrání ho před denaturací) a **foldázy** (navážou se již na denaturovaný protein a umožní mu opětovně získat funkční konformaci). V rámci této práce jsme testovali pouze holdázovou aktivitu podjednotek komplexu NAC. Následné experimenty testující foldázovou aktivitu NAC budou provedeny při dalším výzkumu.

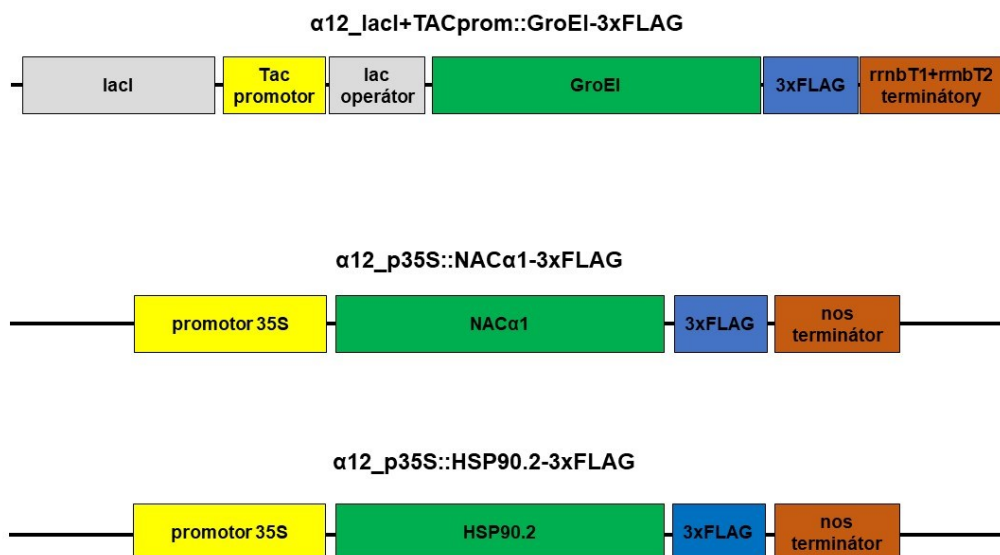
Pro provedení testu holdázové aktivity proteinu je prvně zapotřebí zkoumaný protein vyizolovat. Jelikož v laboratoři nedisponujeme dostupnými protilátkami rozeznávajícími α - a β -podjednotky komplexu NAC, natož jejich jednotlivé paralogy, bylo nutné vytvořit konstrukty, které umožnily označení NAC α 1-5 peptidovou značkou, která umožnila jejich imunoprecipitaci s využitím dostupných a ověřených protilátek. Konstrukty i následné transgenní linie *A. thaliana* s β -podjednotkou značenou FLAG-tagem byly vytvořeny v průběhu předchozího výzkumu Mgr. Boženu Klodovou (linie pro35S::NAC β 1-3 \times FLAG a pro35S::NAC β 2-3 \times FLAG). Kromě těchto konstruktů byly vytvořeny i konstrukty pro pozitivní kontroly HSP90.2 z *A. thaliana* (At5g56030) a GroEl z *E. coli* (JW4103).

Příprava konstruktů

Pro tvorbu konstruktů byl zvolen systém GoldenBraid. Tento systém je založen na vložení sekvence požadovaného genu do vstupního plazmidu pUPD2 a následném postupném skládání plazmidů do větších funkčních celků za využití restrikčních enzymů (BsmBI a BsaI) a T4 DNA ligázy. Abychom získali cDNA požadovaných genů, vyizolovali jsme celkovou RNA z listů *A. thaliana*, respektive z buněčné kultury *E. coli* v případě genu GroEl. Vyizolovaná RNA byla přepsána do cDNA, která byla použita jako templát pro PCR reakci, během níž jsme použili domestikační primery k amplifikaci sekvencí požadovaných genů doplněných o sekvence pro restrikční místa. Tato nově vytvořená restrikční místa nám dále umožnila vytvořit vstupní pUPD2 plazmidy. Vytvořenými plazmidy jsme transformovali

kompetentní buňky *E. coli*. Narostlé kolonie byly ověřeny pomocí PCR a vybrané kolonie byly dále namnoženy. Plazmidy byly ze suspenze bakterií vyizolovány a před dalším použitím ověřeny Sangerovým sekvenováním.

Plazmid pUPD2 byl poté použit ke složení expresní jednotky v plazmidu $\alpha 11$. Expresní jednotka pro α -podjednotky NAC a HSP90.2 se skládala z promotoru viru kvěťákové mozaiky (CaMV) 35S, kódující sekvence genu, peptidové značky 3×FLAG a terminátoru NOS. Plazmid nesoucí sekvence genu GroEl byl specifický, protože byl určen k indukovatelné expresi v bakteriích (Obr. 9). Výsledné plazmidy byly opětovně použity k transformaci *E. coli* a jejich integrita byla ověřena pomocí colony PCR a Sangerovým sekvenováním izolovaných plazmidů. Ověřené plazmidy $\alpha 12$ (Obr. 9) byly použity pro vytvoření plazmidů pLX určených ke genetické transformaci rostlin. Tyto plazmidy prošly stejným procesem transformace bakterií *E. coli* a následným ověřováním jako plazmidy pUPD2 a $\alpha 12$.



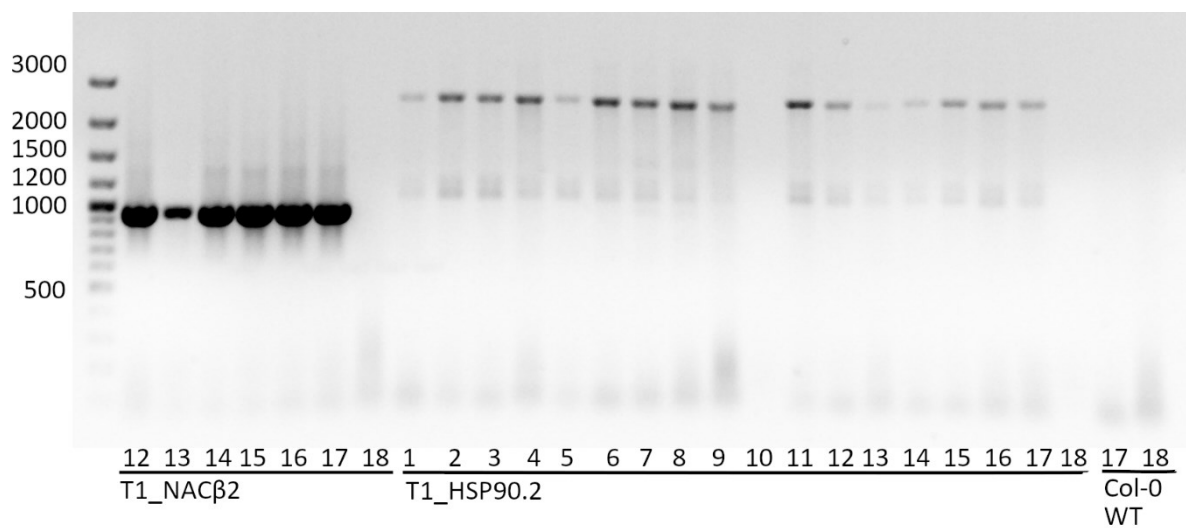
Obrázek 9: Schémata expresních jednotek vytvořených v plazmidech $\alpha 12$. Na prvním schématu je plazmid umožňující indukovanou expresi proteinu GroEl v bakteriích *E. coli*. Další dvě schémata poté ukazují stavbu expresní jednotky zkoumaného proteinu NAC $\alpha 1$ a pozitivní kontroly pro test holdázové aktivity HSP90.2. Jejich geny jsou exprimovány pod promotorem 35S a jsou doplněny o peptidový tag 3×FLAG pro účely imunoprecipitace.

Ojedinelým je v rámci práce plazmid pro expresi proteinu GroEl (Obr. 9) v bakteriích *E. coli*. Protože v laboratoři nebyl dostupný expresní plazmid umožňující spojení sekvence kódující příslušný gen se sekvencí kódující 3×FLAG na C-konci proteinu, zdomestikovali jsme regulační sekvence z dostupného Gateway vektoru pDEST-HisMBP do vstupních plazmidů

pUPD2 systému GoldenBraid. Tím jsme získali pro naši laboratoř novou možnost vytváření expresních plazmidů jiným klonovacím systémem.

Příprava transgenních rostlin

Připravené pLX plazmidy byly použity k transformaci *A. tumefaciens*. Následně byly z transformovaných bakterií připraveny tekuté kultury a ty byly použity pro transformaci rostlin *A. thaliana* ponořováním květenství. Semena z transformovaných rostlin byla selektována pod fluorescenčním mikroskopem na přítomnost červeného fluorescenčního proteinu, který značil přítomnost vkládaného konstruktů. Vybraná semena byla konvenčně pěstována a přítomnost konstruktů byla ověřena pomocí PCR (Obr. 9). Z nulté generace rostlin nesoucích vnesený konstrukt byla po dozrání sklizena semena a ta byla vyseta stejným způsobem. Rostliny první generace byly znovu genotypovány a z pozitivně testovaných rostlin byly posléze sklizeny listy určené k extrakci proteinů.

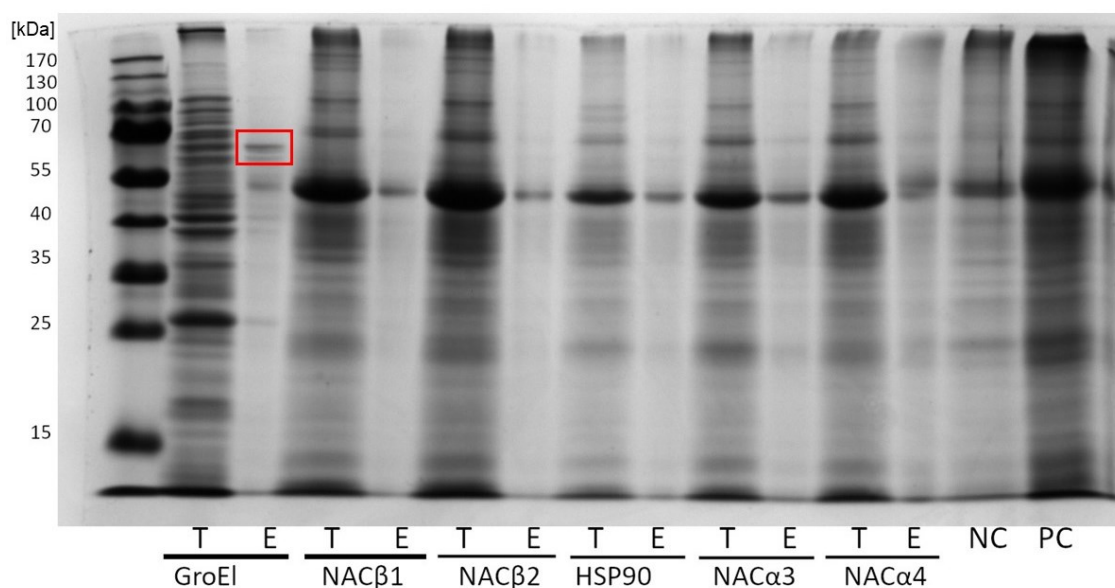


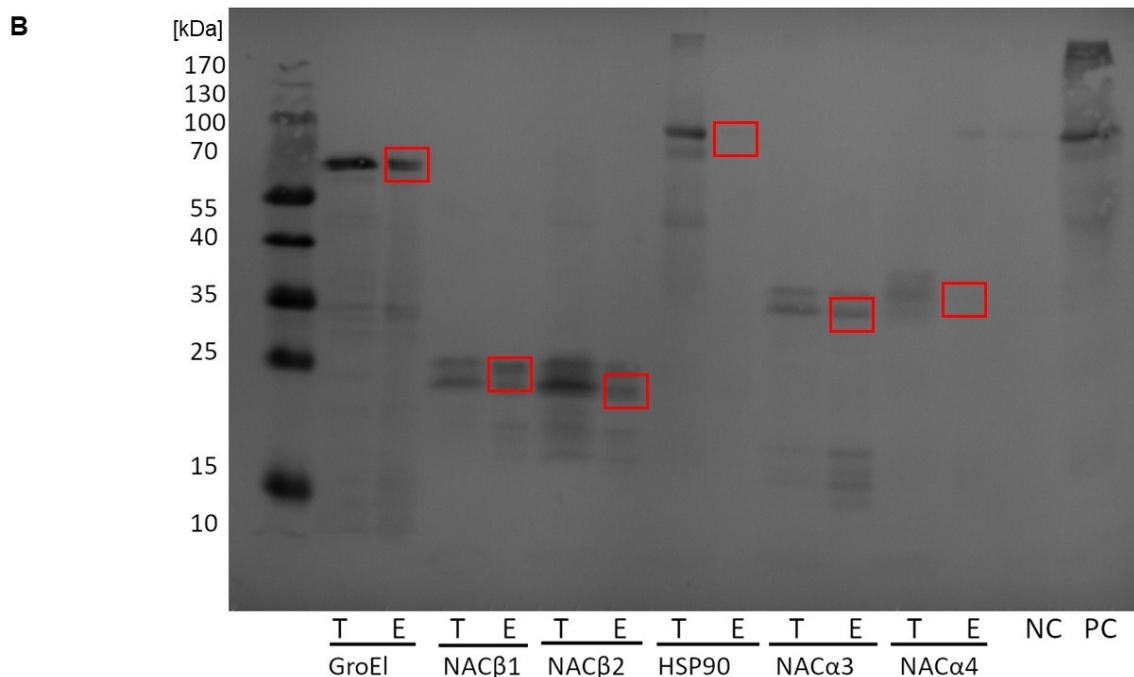
Obrázek 10: Reprezentativní fotografie elektroforetického gelu, na němž byly vizualizovány vzorky PCR jednotlivých genotypovaných rostlin první generace linií *prom35S::NACβ2-3×FLAG* a *prom35S::HSP90.2-3×Flag* spolu s negativní kontrolou, představovanou divokými rostlinami (Col-0).

Extrakce proteinů a imunoprecipitace

Všechny paralogy podjednotek komplexu NAC a pozitivní kontrola HSP90.2 byly izolovány z listů transformovaných rostlin, které byly ověřeny na přítomnost konstruktů metodou PCR. Pro oddělení jednotlivých značených podjednotek od ostatních extrahovaných proteinů jsme použili imunoprecipitaci protilátkami anti-3×FLAG konjugovanými s magnetickými částicemi. Pro kontrolu čistoty a detekci izolovaných protilátek v roztoku byly využity SDS-PAGE gely barvené Coomassie Brilliant Blue G-250 a Western bloty. Pozitivní kontrolu HSP90.2 spolu se všemi NAC α i NAC β podjednotkami nebylo možné rozpoznat na SDS-PAGE gelech barvených Coomassie Brilliant Blue, což svědčí o tom, že exprese značeného proteinu v transformovaných rostlinách nedosahuje vysokých hodnot (Obr. 10 A a B). Proteiny byly naopak úspěšně detekovány metodou Western blot pomocí primárních anti-FLAG protilátek z myši a sekundárních kozích protilátek proti myši konjugované s alkalickou fosfatázou před imunoprecipitací, avšak podjednotky NAC α vykazovaly asi o 15 kDa vyšší molární hmotnost, než bylo předpokládáno. Po imunoprecipitaci však již některé proteiny (HSP90.2, NAC α 4) nebyly na Western blotech detekovatelné. Dále jsme vyřízli fragmenty gelů a odeslali je k analýze na hmotnostním spektrometru, abychom získali přímý důkaz o extrakci požadovaných proteinů.

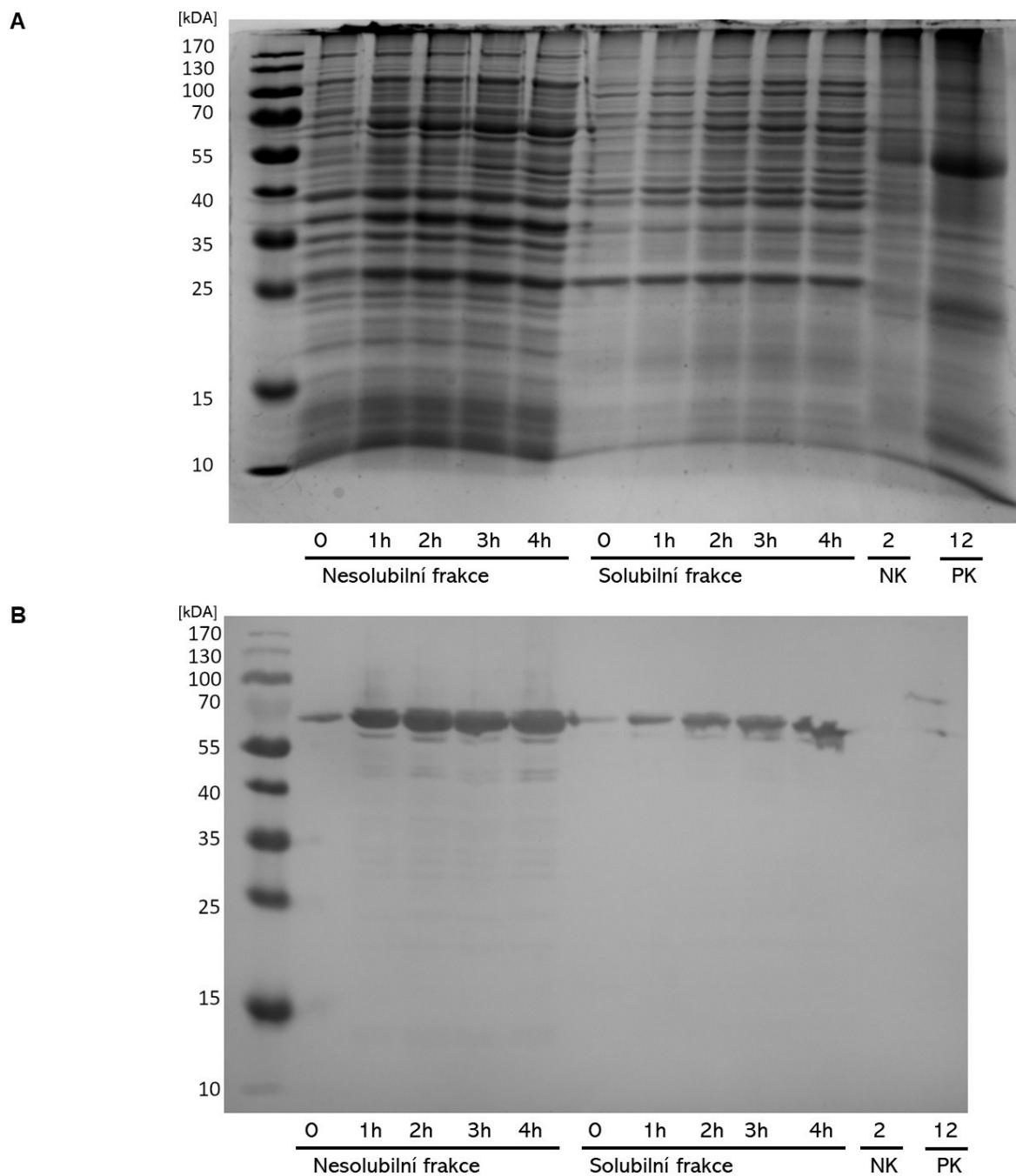
A





Obrázek 11: Kontrolní SDS-PAGE gel obarvený pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 (A) a Western blot (anti-FLAG protilátka primární, sekundární protilátka anti-myší IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou) (B) po imunoprecipitaci proteinů. Na gelech jsou naneseny vzorky s vyextrahovanými proteiny před imunoprecipitací, označeny T, a vzorky eluátu získané po imunoprecipitaci, značené E. Až na protein GroEl nebylo možné identifikovat požadované proteiny na obarveném SDS-PAGE gelu. Detekce proteinů pomocí Western blotu byla úspěšnější, především díky amplifikaci signálu. Zde jsme nebyli schopni detekovat po imunoprecipitaci pouze proteiny HSP90.2 a NACα4. Pozice jednotlivých proteinů je označena červeným rámečkem. Jako negativní kontrola (NC) byl použit vzorek extrahovaných proteinů z divoké rostliny huseníčku rolního. Jako pozitivní kontrola (PC) byla použita extrahovaná směs proteinů z transformované rostliny p35S::HSP90.2-3 ×FLAG.

U proteinu GroEl, který sloužil jako kanonická pozitivní kontrola (Lea *et al.*, 2016; Pastor *et al.*, 2016), byl postup jeho izolace mírně odlišný. Vzhledem k tomu, že se jedná o bakteriální protein z buněk *E. coli*, zvolili jsme pro jeho syntézu indukovanou expresi v kmenu *E. coli* BL21. Po transformaci expresních buněk byl proveden pilotní experiment, při němž jsme indukovali expresi proteinu kódovaného plazmidem a sledovali míru exprese v daných časových bodech. Pro vizualizaci proteinů na SDS-PAGE elektroforéze, jsme nanášeli část solubilní i nesolubilní frakce vzorku, abychom zjistili, jaký podíl exprimovaného proteinu končí v solubilní frakci a v inkluzních těliscích. K expresi proteinu docházelo v mírném množství i před indukcí, ale po indukci se exprese významně zvýšila a maximální množství detekovaného proteinu v solubilní frakci bylo pozorováno ve třetí a čtvrté hodině po indukci exprese (Obr. 12).



Obrázek 12: Výsledky pilotního experimentu indukované exprese GroEl v *E. coli*. Vzorky jsou rozdělené na solubilní a nesolubilní frakci a označeny časem odebrání vzorku. Čas 0 je kontrolní vzorek před indukcí. Na fotografii A je SDS-PAGE gel obarvený pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 a na snímku B je paralelně prováděný Western blot. Proteiny na něm byly detekovány za pomoci primární protilátky anti-FLAG z myši a sekundární protilátky proti myši z kozy konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Jako negativní kontrola (NK), byl použit vzorek extrahovaných proteinů z divoké rostliny huseníčku rolního. Jako pozitivní kontrola (PK) byla použita extrahovaná směs proteinů z transformované rostliny p35S::HSP90.2-3×FLAG. Na obou snímcích je vidět, že se exprimovaný protein nachází v obou frakcích a exprese dosáhla maxima ve třetí a čtvrté hodině po indukcí.

Test holdázové aktivity

Pro bližší charakterizaci funkce komplexu NAC pro zvládání stresových podmínek jsme se rozhodli provést test holdázové aktivity (Haslbeck and Buchner, 2015). Článek uvádí dva možné způsoby provedení testu, kterými jsou tepelně, nebo chemicky indukovaná agregace reportérového proteinu – citrátsyntázy (CS). Oba způsoby provedení testu jsou založené na tom, že při vystavení CS denaturujícím podmínkám dojde k agregaci proteinu, což vede ke zvýšení absorbance roztoku. Pokud je však v roztoku přítomen i protein s holdázovou aktivitou, je zabráněno vytvoření agregátů CS a absorbance se zvýší minimálně, nebo vůbec. Jelikož nebyl tento test v naší laboratoři dříve proveden, rozhodli jsme se vyzkoušet oba způsoby při pilotních experimentech pouze za použití CS.

Jako první jsme zkoušeli tepelně indukovanou agregaci. V původním protokolu byl pro provedení pokusu použit vyhřívaný spektrofotometr. Bohužel obdobný přístroj naše laboratoř nevládní, takže jsme se rozhodli využít Clariostar plus plate reader, který rutinně používáme k měření absorbance při stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou, který nabízí možnost vyhřát komoru se vzorky až na 45 °C. Test holdázové aktivity byl v tomto přístroji proveden dvakrát, s roztoky CS o koncentraci 0,15 μM a 1,0 μM. Připravené vzorky byly napipetovány do destičky, vloženy do předehřátého přístroje a absorbance při 360 nm byla měřena každých 30 sekund po dobu 45 minut. Ani při jednom z provedení testu jsme ale nezískali spolehlivé hodnoty absorbance.

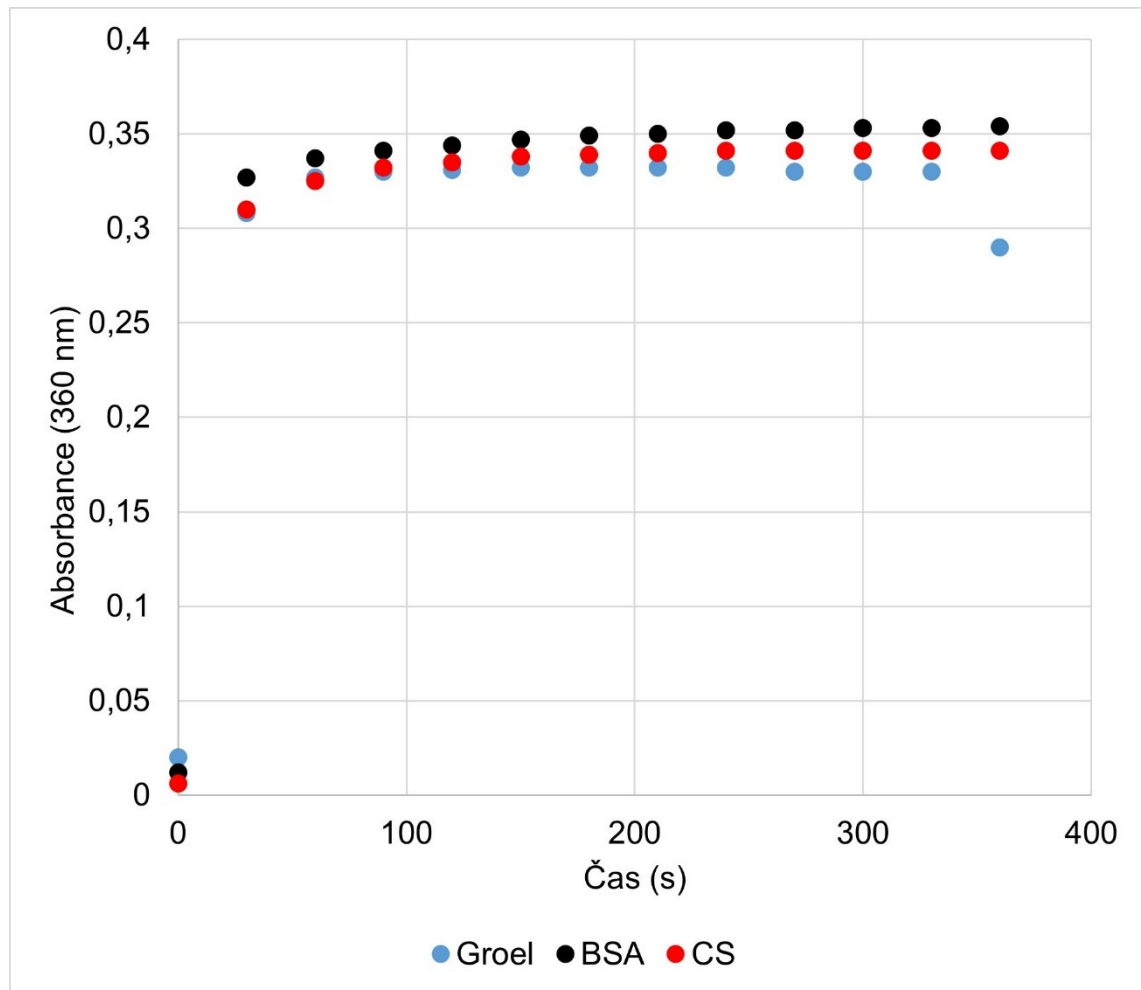
Z tohoto důvodu jsme se rozhodli test s teplotní agregací zopakovat, ale za použití jiných přístrojů. Tentokrát jsme vzorky s CS pipetovali do křemenných kyvet, které jsme uzavřeli víčkem a přelepili parafilmem. Takto zabezpečené kyvety jsme ponořili do vodní lázně o teplotě 42 °C a měřili jsme jejich absorbanci při 360 nm každé 2 minuty po dobu 1 hodiny. Při tomto nastavení testu holdázové aktivity jsme získali lepší naměřená data, ale přesto nebyl tento přístup vyhovující. Při přenášení vzorků z vodní lázně do spektrofotometru a zpět docházelo k ochlazení vzorků a celý test tak trval delší dobu. Rovněž nutnost před každým měřením kyvetu osušit vedla k tomu, že některé vzorky byly mimo vodní lázeň déle než jiné. Tyto prodlevy by byly ještě prodlouženy při měření kyvet s obsaženými studovanými proteiny, kdy by došlo ke zvýšení celkového počtu kyvet. Protože bychom nebyli schopni reprodukovat přesné časy měření a dobu pobytu vzorků mimo vodní lázeň, rozhodli jsme se tento přístup opustit.

Oproti tepelně indukované agregaci probíhá chemicky indukovaná agregace za pokojové teploty bez nutnosti vzorky během měření chladit, nebo ohřívat. Další výhodou tohoto přístupu je i zkrácení času samotného testu holdázové aktivity, kdy měření absorbance se v tomto případě provádí pouze 5-10 minut. V porovnání s ostatními vyzkoušenými přístupy byl tento nejvíce opakovatelný. Rozhodli jsme se tedy provést chemicky indukovaný test holdázové aktivity i se studovanými podjednotkami komplexu NAC.

Než jsme přistoupili k samotnému testu, bylo nutné změřit koncentraci získaných proteinů z imunoprecipitace, což jsme udělali pomocí Bradfordovy metody (Kruger, 2009). Ze všech extrahovaných proteinů jsme byli schopni změřit koncentraci pouze u proteinu GroEl. U ostatních imunoprecipitovaných proteinů, tedy všech podjednotek komplexu NAC a proteinu HSP90.2, byla i po zakoncentrování imunoprecipitátu koncentrace proteinů velmi nízká. Z tohoto důvodu jsme nebyli schopni použít pro test holdázové aktivity. Přesto jsme pokračovali alespoň s proteinem GroEl, abychom ověřili funkčnost samotného testu. Připravili jsme celkem tři vzorky s 1,0 μM koncentrací CS a 4M guanidinium chloridem v HEPES pufru, které jsme inkubovali 2 hodiny při 16 °C. Do jednoho vzorku jsme přidali hovězí sérový albumin (BSA) o finální koncentraci 3 μM , přičemž tento vzorek sloužil jako negativní kontrola. Do druhého vzorku jsme přidali protein GroEl o stejné finální koncentraci, tedy 3 μM . Poslední vzorek byl ponechán bez dalších přidaných látek a sloužil pro ověření tvorby agregátů CS. Absorbance vzorků byla měřena každých 30 sekund po dobu 6,5 minuty. Po prvotním prudkém nárůstu absorbance u všech vzorků během prvních 30 sekund dále absorbance rostla pouze mírně (Graf 5). Dle očekávání dosáhl nejnižších hodnot absorbance vzorek s přidaným proteinem GroEl, u kterého byla již dříve popsána jeho holdázová aktivita. Nejvyšších hodnot absorbance dosáhl vzorek s přidaným BSA, jelikož u něj došlo k agregaci nejen CS, ale i přidaného BSA.

Cílem testu holdázové aktivity bylo popsání interakce komplexu NAC s reportérovým proteinem a zjištění, zda má samotný komplex, nebo jeho podjednotky holdázovou aktivitu. Pokud bychom toto potvrdili v podmínkách *in vitro*, mohli bychom lépe pochopit roli komplexu NAC při odpovědi rostliny na stresové podmínky. Tohoto cíle se nám nepodařilo dosáhnout, jelikož jsme v daném čase nebyli schopni získat imunoprecipitací z listů transformovaných rostlin dostatečné množství proteinu potřebného k provedení testu. Dokázali jsme však funkčnost samotného testu holdázové aktivity na proteinu GroEl. Při dalším opakování tohoto experimentu se pokusíme izolovat/syntetizovat jednotlivé podjednotky komplexu NAC

v heterologním systému bakterií *E. coli*, u nichž dochází k vyšší expresi konstruktů než v rostlinách.



Graf 5: Test holdázové aktivity proteinu GroEl. Modře je vyznačen vzorek citrátsyntázy (CS) s přidaným proteinem GroEl, který brání agregaci CS. Proto je změna absorbance nižší. Oproti tomu černě je označena negativní kontrola, tedy vzorek CS s přidaným albuminem z hovězího séra (BSA). Ten nemá holdázovou aktivitu a navíc je sám agregován, což vede k velké změně absorbance. Červeně je poté označen vzorek se samotnou CS, který sleduje vliv podmínek na reportérový protein. Absorbance vzorků byla měřena při 360 nm každých 30 s po dobu 7 minut.

5 DISKUZE

Komplex NAC u rostlin nebyl doposud podroben tak detailnímu výzkumu jako tomu bylo u kvasinky a živočichů, a proto byly donedávna informace o jeho funkci a roli v rostlinných buňkách omezené. Během dřívějšího výzkumu byla v naší laboratoři fenotypově charakterizována mutantní linie *nacβ1nacβ2*, která vykazovala zhoršenou klíčivost v porovnání s WT i za normálních podmínek (Fíla *et al.*, 2020). Tato diplomová práce tak navázala na studium β-podjednotky komplexu NAC u huseníčku rolního a jejím cílem byla charakterizace její role při odpovědi na osmotický a solný stres. Podařilo se nám potvrdit, že absence β-podjednotky vede ke zhoršení schopnosti semen klíčit za abiotického stresu. Další naše výsledky se s dostupnou literaturou rozcházejí, protože linie nadexprimující vždy jeden ze dvou genů kódujících NACβ u huseníčku rolního nebyly vůči stresu odolnější, jak jsme očekávali podle původní hypotézy. Naopak v lepším případě klíčily srovnatelně s WT rostlinami, v případě linií pro35S::NACβ2-GFP došlo dokonce k horšímu klíčení než u WT rostlin.

Kromě toho bylo cílem ověřit molekulární funkci NACβ podjednotky, čehož jsme chtěli dosáhnout provedením testu holdázové aktivity. Zde se nám plánované cíle podařilo splnit pouze částečně, protože jsme nebyli schopni vyizolovat dostatečné množství proteinů. Přesto jsme vyzkoušeli tepelně i chemicky indukovanou agregaci reportérového proteinu a ověřili tak proveditelnost a funkčnost testu holdázové aktivity v naší laboratoři. Provedené pokusy s pozitivní kontrolou, čímž byl protein GroEl získaný z *E. coli*, byly úspěšné a výsledky byly obdobné s těmi publikovanými v odborné literatuře.

5.1 Absence i nadexprese NACβ za stresových podmínek vede k nižší klíčivosti semen

Abychom otestovali vliv NACβ podjednotky na růst huseníčku rolního za stresových podmínek, rozhodli jsme se otestovat hypotézu, zda dojde ke snížení klíčivosti semen mutantní linie *nacβ1nacβ2* oproti semenům divokého typu vystavených solnému a osmotickému stresu. Semena byla vyseta v podmínkách *in vitro*, abychom dosáhli co nejvíce kontrolovaného prostředí a byli si tak jisti, že pozorované změny v klíčivosti jsou způsobeny výhradně přidaným stresorem. Pokud bychom rostliny pěstovali v půdě, vystavovali bychom se riziku, že jednotlivá opakování experimentu budou ovlivněna proměnlivým chemickým složením půdy, nerovnoměrnou distribucí stresoru v půdě, nebo působením jiných organizmů.

Při pěstování bylo nutné zajistit přesuny misek během kultivace, abychom předešli pozičnímu efektu v rámci kultivační místnosti, kdy se může stát, že okraje police jsou osvětleny s rozdílnou intenzitou než její prostřední část. Rovněž je možné, že v různých částech police budou mírně odlišné teplotní podmínky (řádově o desetiny °C) (Janda *et al.*, 2015). Dále stojí za zmínku, že semena různých genotypů jsme vysévali společně na jednu misku a vždy na příslušnou část. Od každého výsevu jsme připravili několik misek, čímž jsme snižovali šanci náhodných vlivů působících na jednu kultivační misku. Celkově jsme těmito opatřeními chtěli předejít náhodným vlivům kultivační místnosti na testované rostliny.

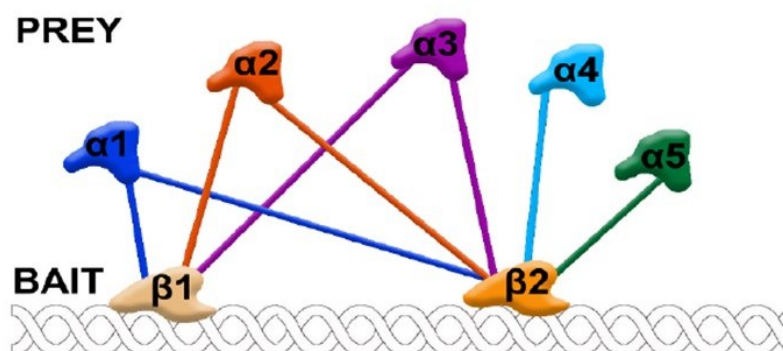
Sledovali jsme vliv solného stresu (navozeném různými koncentracemi chloridu sodného) a osmotického stresu (navozeném různými koncentracemi manitolu, nebo polyethylenglykolem). Nižší koncentrace stresorů vedly k nižší klíčivosti mutantních semen oproti divokým a často vedly k tomu, že se celý proces spíše opozdil, než že došlo k jeho úplnému zastavení (Graf 2). Oproti tomu nejvyšší koncentrace stresorů už ovlivňovaly klíčení také u divokých rostlin, čímž jsme dosáhli koncentrací stresorů působících na huseníček rolní jako takový. Nesmíme opomenout, že klíčení za osmotického stresu se lišilo u obou použitých stresorů. Klíčení semen na médiu s polyethylenglykolem bylo méně ovlivněno než klíčení semen na manitolu. Zjištěný rozdíl může reflektovat odlišnou povahu obou osmotických stresorů – manitol prochází buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou, čímž se dostává do nitra buněk, kde se koncentruje, protože ho huseníček rolní nedokáže zpracovat (Fritz and Ehwald, 2011). Kumulace manitolu uvnitř buněk tak může přímo ovlivňovat různé buněčné procesy. Oproti tomu polyethylenglykol o molekulární hmotnosti nad $6000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ cytoplazmatickou membránou neprojde, takže přímo nedokáže ovlivnit nitrobuněčné procesy jako manitol (Khajeh-Hosseini *et al.*, 2003; Mehra *et al.*, 2003; Lipavská and Vreugdenhil, 1996). Při porovnání jednotlivých stresorů, byl osmotický stres navozený polyethylenglykolem méně výrazný (Graf 1 C), než ten způsobený manitolem (Graf 1 A). Avšak ani jeden z osmotických stresorů neovlivnil klíčení všech testovaných genotypů stejně efektivně jako chlorid sodný (Graf 1 A). Přestože osmotický potenciál média s přidanými 18 % (w/v) polyethylenglykolu odpovídá osmotickému potenciálu média s přidaným NaCl o finální koncentraci 150 mM (Muscolo *et al.*, 2014), byl počet semen vyklíčených na médiu s NaCl výrazně nižší. To může být vysvětleno toxicitou chloridových iontů, které pronikly do nitra semen.

Zjištěná data jsou v souladu s původní hypotézou, podle níž jsme předpokládali, že absence podjednotky NAC β povede ke snížení klíčivosti semen za osmotického a solného stresu. Naše výsledky souzní i s publikovanými experimenty na mutantních rostlinách pšenice seté (*Triticum aestivum* (Kang *et al.*, 2013) a rýže seté (*Oryza sativa*) (Wang *et al.*, 2014). Stejně jako v našem případě byla u semen rýže postrádající β -podjednotku komplexu NAC snížena jejich klíčivost za solného stresu a byla prodloužena doba klíčení oproti kontrolním rostlinám.

Dále jsme sledovali vliv nadexprese jednotlivých paralogů kódujících NAC β . Semena linií nadexprimujících NAC β 1 a NAC β 2 (tedy nesoucí konstrukty pro35S::NAC β 1-GFP a pro35S::NAC β 2-GFP) jsme klíčili za stejných podmínek jako mutanty, tedy za solného a osmotického stresu. Předpokládali jsme, že nadměrná exprese jednoho z genů kódujících NAC β zlepší schopnost přežití semenáčků za stresových podmínek jako tomu bylo v několika dříve provedených studiích na huseníčku rolním (Karan and Subudhi, 2012; Peng *et al.*, 2017) a tabáku virginském (*Nicotiana tabacum* (Pruthvi *et al.*, 2017).

V našich experimentech ale vykazovala linie pro35S::NAC β 1-GFP stejné snížení klíčivosti jako mutantní linie *nac β 1nac β 2*, zatímco klíčivost linie pro35S::NAC β 2-GFP byla snížena ze všech testovaných linií dokonce úplně nejvíce. Tato zjištění se rozcházejí s dříve publikovanými výsledky, kdy u huseníčku rolního vedla nadexprese k vyšší odolnosti proti chladu a solnému stresu (Karan and Subudhi, 2012). To je možné vysvětlit několika způsoby. (i) Námi vytvořené nadexprimující linie nesou vložené sekvence genů původem přímo z huseníčku rolního. Oproti tomu výsledky pokusů popisujících zvýšení odolnosti vůči abiotickému stresu byly provedeny na transgenních rostlinách huseníčku rolního, v jednom případě nesoucím nadexprimující gen kódující protein BTF3 (u huseníčku rolního nazývaný NAC β 2) z trávy *Spartina alterniflora* (Karan and Subudhi, 2012) a ve druhém z dávilce černého (*Jatropha curcas*) (Peng *et al.*, 2017). Přestože jsou si proteiny NAC β 2 (BTF3) mezi druhy velmi sekvenčně podobné (při porovnání aminokyselinové sekvence BTF3 z dávilce černého s AtNAC β 2 76 %), mohly by i malé změny ve funkčních doménách proteinu změnit jeho vlastnosti. Tomu mohou napovídat i dříve získaná data z kvasinkového dvouhybridního systému, kdy byly studovány vazebné preference mezi jednotlivými variantami podjednotek NAC u huseníčku rolního (Obr. 12) (Klodová, 2019). Zatímco NAC β 2 se vázal se všemi α -podjednotkami, NAC β 1 tvořil heterodimerní komplex pouze s podjednotkami NAC α 1, NAC α 2 a NAC α 3. Proto lze předpokládat, že transgenní NAC β 2 může u huseníčku interagovat lépe s takřka jakoukoliv z α -podjednotek, čímž by docházelo ke zvýšení celkové koncentrace

komplexu NAC. Oproti tomu v našem systému byl nadexprimován protein, který se v buňce již nacházel a může mít vazebnou preferenci pouze k některým α -podjednotkám. To by mohlo vést ke hromadění monomerů podjednotky NAC β 2 v buňkách a ovlivňovat tak schopnost rostliny reagovat na stres. Toxické působení nadbytku jedné z podjednotek komplexu NAC bylo popsáno dříve u kvasinky *S. cerevisiae* (Reimann *et al.*, 1999). Ke stejnému jevu by pak mohlo docházet i v případě našich linií. (ii) Dalším možným vysvětlením je, že u nadexprimujících linií došlo k úplnému, nebo částečnému umlčení genů kvůli použití velmi silného promotoru 35S. To by způsobilo, že rostliny by místo nadexprese jedné z β -podjednotek měly naopak daného proteinu méně a to by se projevilo na jejich odolnosti vůči stresu.



Obrázek 13: Souhrnné výsledky formování heterodimerických komplexů NAC v kvasinkovém dvouhybridním systému. Při použití NAC β jako návnady (angl. bait) bylo pozorováno celkem osm interakcí. Převzato a upraveno podle Klodová, 2019.

Abychom získaným datům stresových experimentů lépe porozuměli, rozhodli jsme se kvantifikovat množství vznikajících mRNA u všech paralogů kódujících podjednotky komplexu NAC za stresových podmínek u WT semenáčků. Předpokládali jsme, že dojde ke změně exprese genů u rostlin vystavených stresu, protože absence β -podjednotky vedla ke snížení životaschopnosti rostlin. Výsledky měření metodou RT-qPCR ukázaly, že působením solného stresu dochází ke snížení exprese genů kódujících NAC α 2, NAC α 5, NAC β 1 a NAC β 2 (Graf 3 A). Oproti tomu u rostlin vystavených osmotickému stresu způsobeného manitolem byla snížena exprese pouze u genů NAC α 2 a NAC β 2 (Graf 3 B). Změny v expresi jsou však příliš malé na to, abychom z nich mohli usuzovat, že komplex NAC je přímo zapojen do odpovědi rostliny na zkoumané stresy.

Obdobná kvantifikace transkriptů metodou RT-qPCR byla provedena na trávě *S. alterniflora*, s tím rozdílem, že exprese byla měřena na vzorcích z listů a kořenů vzrostlých rostlin vystavených solnému stresu, nebo suchu (Karan and Subudhi, 2012). Zatímco my jsme pozorovali snížení exprese NAC β 2, výsledky zmiňované studie ukazují až dvojnásobné zvýšení relativního množství mRNA genu BTF3 již hodinu po vystavení suchu, nebo solnému stresu. V jiné studii provedené na dávivci černém se exprese BTF3 působením solného stresu neměnila, ale výrazné zvýšení exprese bylo spuštěno působením chladu na rostliny (Peng *et al.*, 2017). Je tedy možné, že role BTF3 při odpovědi na různé abiotické stresy liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy a nelze výsledky experimentů provedených na jednom druhu zobecnit.

Stejný experiment byl proveden na dvou nezávislých liniích nadexprimujících jeden z genů kódující β podjednotku komplexu NAC. Užití dvou nezávislých linií snižovalo risk pozičního efektu vloženého konstruktů. Následně jsme provedli kvantifikaci transkriptů u testovaných linií metodou RT-qPCR, pěstovaných za normálních podmínek, tedy bez vystavení stresorům, abychom ověřili abundanci příslušných transkriptů. Vzhledem k tomu, že k vložené sekvenci genu byla připojena také sekvence kódující GFP, byla jeho přítomnost ověřena již v průběhu stresových experimentů prohlédnutím semenáčků pod fluorescenční binokulární lupou. Výsledky RT-qPCR pro linie pro35S::NAC β 2-GFP odpovídaly našemu předpokladu, že vložením konstruktů způsobíme významnou nadexpresi vkládaného genu, v tomto případě byla exprese NAC β 2 až 33 \times vyšší oproti WT. Takto silná exprese odpovídá použitému promotoru z viru kvěťákové mozaiky CaMV 35S.

Přestože stejný promotor byl použit i u linií pro35S::NAC β 1-GFP, vyskytly se u nich neočekávané změny v expresi genů kódujících jednotlivé podjednotky komplexu NAC. Kromě mírného zvýšení exprese NAC β 1, které bylo pouze 1,3 \times vyšší, došlo i ke zvýšení exprese NAC β 2, a to až 1,6 \times . Přestože je promotor 35S považován za stabilní promotor se silnou expresí ve většině pletiv rostliny (Holtorf *et al.*, 1995), bylo v nedávné studii zjištěno, že transgeny pod promotorem 35S jsou transkribovány v různých pletivech různě silně při vystavení abiotickému stresu (Kiselev *et al.*, 2021). U našich linií by navíc bylo možné se domnívat, že by vložený konstrukt nebyl plně funkční, což by vysvětlovalo jeho výrazně nižší expresi v porovnání se stejně navrženým konstruktem v liniích pro35S::NAC β 2-GFP. Zvýšení exprese NAC β 2 by poté mohlo být vysvětleno snahou rostliny dorovnat vyšší expresi NAC β 1 navýšením množství NAC β 2. Při následných experimentech by bylo vhodné rozlišit množství transkriptu

vznikajícího přepisem původního genu a přepisem vloženého konstruktů. Toho by se dalo dosáhnout navržením nové sady primerů, které by nasedaly na hranici sekvencí NAC β 1 a GFP v konstruktů. Při použití původní i nové sady primerů na stejný vzorek bychom pak byli schopni spočítat rozdíl v míře transkripce obou genů. Je totiž možné, že nedochází k celkovému umlčení NAC β , ale transkript s obsaženým GFP je příliš nestabilní a dochází k jeho degradaci. Bylo by tak zajímavé zjistit, zda se degradace dotýká i původních transkriptů či nikoliv.

V případě že by byl problém se samotnými konstrukty, především s použitým promotorem, bylo by možné nadexpresi navodit i vytvořením konstruktů pod nativním promotorem genu NAC β 1. To by mělo výhodu, že bychom předcházeli možnému umlčení a současně by exprese genu probíhala pouze v pletivech a v časech, v nichž by byl exprimován i nativní gen. Při použití promotoru 35S totiž dochází k neustále silné expresi konstruktů ve většině pletiv rostliny, což může vyvolávat nestandardní odpověď organismu. Možností je i ovlivnění funkce fúzním proteinem GFP (27 kDa), protože tento protein je větší, než samotné NAC β 1 (18 kDa) a NAC β 2 (17,9 kDa). Připojení GFP mohlo vést k narušení schopnosti proteinů NAC β se vázat na α -podjednotky a vytvářet tak funkční komplex.

5.2 Nedostatečná koncentrace exprimovaných proteinů pro použití v testu holdázové aktivity

Jedním z cílů této diplomové práce bylo ověřit holdázovou aktivitu komplexu NAC u huseníčku rolního, jak u jednotlivých proteinů NAC α 1, NAC α 2, NAC α 3, NAC α 4, NAC α 5, NAC β 1 a NAC β 2, tak ve formě heterodimerního komplexu složeného z různých kombinací jednotlivých α - a β -podjednotek. Abychom byli schopni test holdázové aktivity provést, rozhodli jsme se vytvořit transgenní linie rostlin, z nichž proteiny byly izolovány a následně purifikovány imunoprecipitací.

Vkládané geny byly exprimovány pod promotorem 35S, který je v naší laboratoři rutinně používán při přípravě nadexprimujících linií. Protože jsou si jednotlivé NAC α i NAC β -podjednotky sekvencně velmi podobné (81 % homologie na úrovni proteinové sekvence mezi NAC β 1 a β 2 a 65%-82% mezi NAC α 1 a ostatními NAC α), jeví se jako velmi nepravděpodobná možnost vytvoření protilátek, které by spolehlivě rozlišovaly mezi jednotlivými homology zkoumaných proteinů. Proto jsme se rozhodli připravit konstrukty nesoucí kódující sekvenci

zkoumaných genů fúzovanou k se sekvencí pro 3×FLAG peptidovou značku (Einhauer and Jungbauer, 2001). Tuto značku jsme zvolili z toho důvodu, že je velmi malá (její molekulová hmotnost je pouhých 2,861 kDa) a neutrálně nabitá, tak by neměla ovlivňovat vlastnosti označených proteinů, jak se může stát v případě větších značek, například GST (glutathion-S-transferáza), nebo GFP. Peptidovou značku 3×FLAG jsme umístili na C-konec proteinu. Toto umístění bylo z našeho pohledu výhodnější v tom, že při detekci proteinů na Western blotu i jejich následné imunoprecipitaci jsme zachytili pouze plně translatované proteiny. Pokud bychom umístili 3×FLAG na N-konec proteinu, byla by jako první translatována sekvence mRNA kódující 3×FLAG a až poté samotný protein. Pokud by došlo k předčasnému ukončení translace, na Western blotu by byly detekovány i nehotové fragmenty proteinu označené 3×FLAG značkou. Zkrácené fragmenty by také mohly ovlivňovat výsledky holdázové eseje.

Jak již bylo zmíněno, rozhodli jsme se všechny fúzní proteiny NAC izolovat z listů huseníčku rolního, aby co nejvíce odpovídaly nativním proteinům včetně posttranslačních modifikací. Na rozdíl od nás u proteinu GIGANTEA a AtHSP90.2 prováděli Cha *et al.*, 2015; Cha *et al.*, 2017 obdobný test chaperonové aktivity s proteiny získanými z heterologního systému, kdy proteiny z huseníčku byly syntetizovány v bakterii *E. coli*. Expres rekombinantních proteinů eukaryotického původu v bakteriích přináší své klady i zápory. Velkými výhodami jsou například rychlá exprese proteinů a jejich vysoký výnos, vcelku jednoduchá kultivace bakteriálních kultur a jejich snadná transformace. Proti tomu stojí nevýhody, jako je častá produkce rekombinantních proteinů ve formě inkluzních tělísek, ve které bývají eukaryotní proteiny nefunkční a bývá potřeba před dalšími studiemi vyžadujícími funkční sbalený protein provést renaturaci proteinů. Další nevýhodou představuje problematická exprese proteinů s disulfidickými můstky, nebo jinými posttranslačními modifikacemi (shrnutí v Ma *et al.*, 2020).

Jak je zřejmé z našich výsledků (Obr. 10), podařilo se nám docílit exprese značených proteinů NAC α 3-4, NAC β 1-2 i HSP90.2 v listech huseníčku rolního. Problém nastal při imunoprecipitaci experimentovaných fúzních proteinů, kdy i po zakoncentrování eluátu zůstala koncentrace proteinů ve vzorcích neměřitelná Bradfordovým testem. Na kontrolních Western blotech byly proteiny v eluátu u většiny proteinů detekovatelné, což zřejmě bylo zapříčiněno výraznou amplifikací signálu na Western blotech díky použití sekundární protilátky. Stejného výsledku jsme dosáhli i při čtyřnásobném zvýšení množství listů, ze kterých byly proteiny izolovány. Jediný protein získaný v dostatečné koncentraci pro použití v testu holdázové

aktivity byl bakteriální GroEl exprimovaný v *E. coli*, který sloužil jako pozitivní kontrola. Pro budoucí experimenty jsme se rozhodli provést expresi proteinů v heterologním systému, protože očekáváme, že z kultury *E. coli* dokážeme získat výrazně větší množství proteinů při porovnání s expresí v huseníčku rolním.

5.3 Proteiny NAC α vykazují na Western blotu zvýšení své molární hmotnosti

Jednou z běžně používaných metod pro detekci proteinů je Western blot. V rámci této práce byla tato metoda používána pro ověření přítomnosti značených proteinů v úplném vzorku získaného extrakcí z vytvořených linií a v eluátu po imunoprecipitaci (Obr. 10 B). Protein HSP90.2, GroEl i oba proteiny NAC β po provedení Western blotu vykazovaly očekávanou molární hmotnost, představující hmotnost z databáze Uniprot zvýšenou o 2,861 kDa, které připadají na peptidovou značku 3 \times FLAG (Obr. 10 B).

Výrazné změny oproti předpokládané molární hmotnosti byly zaznamenány u všech izolovaných podjednotek NAC α , které byly asi o 8-11 kDa vyšší, než byla očekávaná hodnota. Vzhledem k absenci protilátek rozpoznávající přímo jednotlivé rostlinné NAC podjednotky, nelze výsledky z Western blotu považovat za přímý důkaz přítomnosti testovaných proteinů ve vzorcích. Proto jsme se rozhodli pro identifikaci proteinů ve fragmentech SDS-PAGE gelů hmotnostní spektrometrií. Z výsledků hmotnostní spektrometrie získaných týmem profesora Zbyňka Zdráhala z Masarykovy Univerzity v Brně jsme zjistili, že i přes odlišnou molární hmotnost, byly v gelových fragmentech přítomny skutečně α -podjednotky komplexu NAC.

Jako první možné vysvětlení se jevila možnost, že SDS nedokázalo dostatečně efektivně rozvolnit přítomné proteiny. K pufru jsme tak přidali ještě chaotropní činidlo, 4 M močovinu, avšak ani tento přístup nevedl ke změně detekované molekulové hmotnosti NAC α -podjednotek. Proto se jako nejpravděpodobnější důvod jeví posttranslační modifikace zkoumaných proteinů. Posttranslační modifikace jsou totiž uváděny jako jedna z nejčastějších příčin při zaznamenání vyšší než očekávané molární hmotnosti proteinu na Western blotu (Kurien, 2021). Tyto modifikace, mezi které se řadí patří například glykosylace, fosforylace, metylace nebo ubiquitinylace, přidávají další funkční skupiny na polypeptidický řetězec, což ovlivňuje jeho vlastnosti včetně molární hmotnosti (Sule *et al.*, 2023).

5.4 Test holdázové aktivity a další možnosti výzkumu

Při provedení testu holdázové aktivity je možné provést denaturaci reportérového proteinu dvěma způsoby – tepelně a chemicky (Haslbeck a Buchner 2015). U dříve provedených studií byl preferován tepelný způsob agregace (Cha *et al.*, 2015; Cha *et al.*, 2017), k čemuž jsme se zprvu přiklonili i my. Zvýšení teploty totiž lépe simuluje podmínky, které mohou nastat i v reálném prostředí. Kromě samotné holdázové aktivity je tímto způsobem vlastně i testována schopnost studovaného proteinu udržet funkční konformaci za stresových podmínek. Pro provedení experimentu je potřeba spektrofotometr s vyhřívanou komorou na vzorky. Takovým přístrojem naše laboratoř nedisponuje, takže jsme se ho pokusili nahradit klasickým spektrofotometrem a zahřívání vzorků jsme prováděli odděleně ve vodní lázni. Získaná data ze vzorků s pozitivní kontrolou GroEl odpovídala předpokládanému výsledku (Graf 5), ale samotné provedení experimentu bylo velmi náročné a případná reprodukovatelnost velmi nízká. Největší překážkou při našem přístupu bylo totiž ochlazování vzorků po jejich vyndání z vodní lázně a následném měření absorbance. Trvalo tak výrazně déle, než jsme zaznamenali zvýšení absorbance měřeného roztoku. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli přejít k chemickému způsobu denaturace reportérového proteinu, který se celou dobu provádí za laboratorní teploty.

Změny absorbance mezi jednotlivými vzorky (pozitivní a negativní kontrola) nebyly příliš velké (Graf 5). Zatímco protokol (Haslbeck and Buchner, 2015) uvádí, že by změny absorbance při použití reportérového proteinu citrátsyntázy o koncentraci 0,6 μM měly dosahovat změn přibližně 0,1-0,2, v našem případě jsme se ke spodní hranici těchto hodnot přiblížili až při zvýšení koncentrace citrátsyntázy na 1 μM . Pro ověření námi získaných dat bychom rádi experiment provedli znovu s případným navýšením koncentrace reportérového proteinu až na hodnoty 2 μM (Cha *et al.*, 2015).

Přestože se nám nepodařilo zjistit, zda β -podjednotky komplexu NAC mají holdázovou aktivitu, povedlo se nám ověřit funkčnost protokolu pro provedení testu holdázové aktivity. Protože hlavní překážkou byla nemožnost získat dostatečné množství proteinů z listů transformovaných rostlin, provedeme v dalších experimentech expresi pokusných proteinů v heterologním systému bakterie *E. coli*. Tím bychom měli dosáhnout vyšší výtěžnosti, ale za cenu získání proteinů bez posttranslačních modifikací, které *E. coli* nedokáže provést. Po vyřešení problému s množstvím extrahovaných proteinů by dalším logickým krokem bylo

vyzkoušet na všech variantách podjednotek NAC test holdázové aktivity, stejně jako na všech možných kombinacích mezi α - a β -podjednotkami.

6 ZÁVĚR

Tato diplomové práce se věnuje funkční charakterizaci komplexu NAC, a především jeho β podjednotky, při odpovědi huseníčku rolního na solný a osmotický stres. Stanoveným cílem práce bylo otestovat hypotézu, zda komplex NAC napomáhá rostlinám huseníčku rolního přežít při vystavení osmotickému a solnému stresu díky své chaperonové aktivitě.

Pro ověření této hypotézy jsme vyseli semena mutantní linie *nac β 1nac β 2* v podmínkách *in vitro* a vystavili je osmotickému stresu, způsobeném přidáním manitolu, nebo polyethyleglykolu, případně solnému stresu, který jsme navodili přidáním chloridu sodného do média. Pozorovaný výsledek odpovídal našemu předpokladu, že absence β -podjednotky povede ke zhoršení klíčivosti semen za abiotického stresu. Dále jsme předpokládali, že rostliny nadexprimující jeden z genů kódujících NAC β budou stresovým podmínkám odolávat lépe, stejně jako tomu bylo již v dříve publikovaných studiích exprimujících geny NAC β z jiných druhů v huseníčku rolním (Karan and Subudhi, 2012; Peng *et al.*, 2017), nebo v tabáku virginském (*Nicotiana tabacum*; Pruthvi *et al.*, 2017). Tuto hypotézu se nám nepodařilo potvrdit, jelikož námi testované nadexprimující linie pro35S::NAC β 1-GFP a pro35S::NAC β 2-GFP klíčily po vystavení stresovým podmínkám méně efektivně. Dále jsme zjistili, že během solného stresu dochází u semenáčků divokých rostlin ke statisticky signifikantnímu snížení transkripce u všech genů kódujících podjednotky komplexu NAC. Za osmotického stresu docházelo ke snížení exprese genů NAC α 1, NAC α 2, NAC α 3, NAC β 1 a NAC β 2, ale pouze velmi mírnému. U genů NAC α 4 a NAC α 5 došlo překvapivě k mírnému zvýšení množství transkriptu. Žádná z těchto změn však nebyla statisticky vyhodnocena jako signifikantní.

Posledním stanoveným cílem práce bylo otestovat pomocí holdázové eseje, zda komplex NAC dokáže chránit proteiny v buňce za stresových podmínek díky své chaperonové aktivitě. Tento cíl se podařilo splnit pouze částečně, protože jsme nebyli schopni získat dostatečné množství proteinů, potřebných pro *in vitro* test holdázové aktivity. Provedli jsme tedy alespoň pilotní experimenty za využití pozitivní kontroly, kterou byl protein GroEl z bakterie *E. coli*, a vyzkoušeli jsme oba možné způsoby provedení testu, tedy jak teplotně, tak chemicky vyvolanou agregaci reportérového proteinu citrátsyntázy. Výsledky odpovídaly našim očekáváním a můžeme prohlásit, že se nám povedlo vyzkoušet novou experimentální metodu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alamo, M. del, Hogan, D.J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P.O. and Frydman, J.** (2011) Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol.*, **9**.
- Bent, A.** (2006) Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. *Methods Mol. Biol.*, **343**, 87–103.
- Berardini, T.Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E. and Huala, E.** (2015) The arabidopsis information resource: Making and mining the ‘gold standard’ annotated reference plant genome. *Genesis*, **53**, 474–485.
- Blanchet, S. a Ranjan, N.** (2022) Translation Phases in Eukaryotes. In *Ribosome Biogenesis*. pp. 217–228.
- Bloss, T.A., Witze, E.S. and Rothman, J.H.** (2003) Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **424**, 1066–1071.
- Cha, J.Y., Kim, J., Kim, T.S., Zeng, Q., Wang, L., Lee, S.Y., Kim, W.Y. and Somers, D.E.** (2017) GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the Arabidopsis circadian clock. *Nat. Commun.*, **8**, 1–11.
- Cha, J.Y., Kim, M.R., Kim, W.Y. and Kim, M.G.** (2015) Development of in vitro HSP90 foldase chaperone assay using a GST-fused Real-substrate, ZTL (ZEITLUPE). *J. Plant Biol.*, **58**, 236–241.
- Cold Spring Harbor Protocols** (2006) Transfer buffer for semi-dry electroblotting. *Cold Spring Harb. Protoc.* Available at: doi: 10.1101/pdb.rec10425.
- Crick, F.** (1970) Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, **227**, 726–734.
- Deng, J.M. and Behringer, R.R.** (1995) An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res.*, **4**, 264–269.
- Deuerling, E., Gamerdinger, M. and Kreft, S.G.** (2019) Chaperone interactions at the ribosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, 1–19.
- Dever, T.E., Dinman, J.D. and Green, R.** (2018) Translation elongation and recoding in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, 1–20.
- Ding, Y., Jia, Y., Shi, Y., Zhang, X., Song, C., Gong, Z. and Yang, S.** (2018) OST 1-mediated BTF 3L phosphorylation positively regulates CBF s during plant cold responses. *EMBO J.*, **37**, 1–14.
- Dunican, D.S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A. and Croke, D.T.** (2002) Gene expression differences between the microsatellite instability (min) and chromosomal instability (cin) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene*, **21**, 3253–3257.
- Dusek, J., Plchova, H., Cerovska, N., et al.** (2020) Extended Set of GoldenBraid Compatible Vectors for Fast Assembly of Multigenic Constructs and Their Use to Create Geminiviral Expression Vectors. *Front. Plant Sci.*, **11**, 1–11.
- Einhauer, A. and Jungbauer, A.** (2001) The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**, 455–465.

- Fíla, J., Klodová, B., Potěšil, D., Juříček, M., Šesták, P., Zdráhal, Z. and Honys, D.** (2020) The beta subunit of nascent polypeptide associated complex plays a role in flowers and siliques development of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1–30.
- Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Köhler, M. and Wiedmann, B.** (2001) Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *J. Cell Sci.*, **114**, 2641–2648.
- Fritz, M. and Ehwald, R.** (2011) Mannitol permeation and radial flow of water in maize roots. *New Phytol.*, **189**, 210–217.
- Gamerding, M., Hanebuth, M.A., Frickey, T. and Deuerling, E.** (2015) The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmatic reticulum. *Science (80-.)*, **348**.
- Gamerding, M., Jia, M., Schloemer, R., et al.** (2023) NAC controls cotranslational N-terminal methionine excision in eukaryotes. *Science*, **380**, 1238–1243.
- Haslbeck, M. and Buchner, J.** (2015) Assays to Characterize Molecular Chaperone Function in vitro. *Stress Responses Methods Protoc.*, **1292**, 1–246.
- He, F.** (2011) E. coli Genomic DNA Extraction. *Bio-Protocol*, **1**, 1–3.
- Hellen, C.U.T.** (2018) Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, 1–18.
- Hinnebusch, A.G.** (2017) Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation. *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 589–611. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.03.004>.
- Hinnebusch, A.G.** (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 779–812.
- Holtorf, S., Apel, K. and Bohlmann, H.** (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **29**, 637–646.
- Hsieh, H.H., Lee, J.H., Chandrasekar, S. and Shan, S. ou** (2020) A ribosome-associated chaperone enables substrate triage in a cotranslational protein targeting complex. *Nat. Commun.*, **11**.
- Huh, S.U., Kim, K.J. and Paek, K.H.** (2012) Capsicum annuum basic transcription factor 3 (CaBtf3) regulates transcription of pathogenesis-related genes during hypersensitive response upon Tobacco mosaic virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 910–917. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.074>.
- Janda, M., Navrátil, O., Haisel, D., Jindřichová, B., Fousek, J., Burketová, L., Čerovská, N. and Moravec, T.** (2015) Growth and stress response in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum* and *Brassica napus* cultivated under polychromatic LEDs. *Plant Methods*, **11**, 1–14.
- Jomaa, A., Gamerding, M., Hsieh, H.H., et al.** (2022) Mechanism of signal sequence handover from NAC to SRP on ribosomes during ER-protein targeting. *Science (80-.)*, **375**, 839–844.
- Kang, G., Ma, H., Liu, G., Han, Q., Li, C. and Guo, T.** (2013) Silencing of TaBTF3 gene impairs tolerance to freezing and drought stresses in wheat. *Mol. Genet. Genomics*, **288**, 591–599.

- Karan, R. and Subudhi, P.K.** (2012) Overexpression of a nascent polypeptide associated complex gene (SaβNAC) of *Spartina alterniflora* improves tolerance to salinity and drought in transgenic *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424**, 747–752. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.023>.
- Khajeh-Hosseini, M., Powell, A.A. and Bingham, I.J.** (2003) The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soyabean seeds. *Seed Sci. Technol.*, **31**, 715–725.
- Kirstein-Miles, J., Scior, A., Deuerling, E. and Morimoto, R.I.** (2013) The nascent polypeptide-associated complex is a key regulator of proteostasis. *EMBO J.*, 1451–1468.
- Kiselev, K. V., Aleynova, O.A., Ogneva, Z. V., Suprun, A.R. and Dubrovina, A.S.** (2021) 35S promoter-driven transgenes are variably expressed in different organs of *Arabidopsis thaliana* and in response to abiotic stress. *Mol. Biol. Rep.*, **48**, 2235–2241. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06235-x>.
- Klodová, B.** (2019) *Studying dimer formation and effectors of Arabidopsis thaliana nascent polypeptide-associated complex*. Charles University Faculty of Science.
- Kogan, G.L. and Gvozdev, V.A.** (2014) Multifunctional nascent polypeptide-associated complex (NAC). *Mol. Biol.*, **48**, 189–196.
- Kruger, N.J.** (2009) The Bradford Method. *Springer Protoc. Handbooks*, 17–24.
- Kurien, B.T.** (2021) *Western Blotting for the Non-Expert*, Minneapolis, USA: Springer.
- Kusumawidjaja, G., Kayed, H., Giese, N., Bauer, A., Erkan, M., Giese, T., Hoheisel, J.D., Friess, H. and Kleeff, J.** (2007) Basic transcription factor 3 (BTF3) regulates transcription of tumor-associated genes in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, **6**, 367–376.
- Lea, W.A., O’Neil, P.T., Machen, A.J., et al.** (2016) Chaperonin-Based Biolayer Interferometry to Assess the Kinetic Stability of Metastable, Aggregation-Prone Proteins. *Biochemistry*, **55**, 4885–4908.
- Lipavská, H. and Vreugdenhil, D.** (1996) Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, **45**, 103–107.
- Liu, Y., Hu, Y., Li, X., Niu, L. and Teng, M.** (2010) The crystal structure of the human nascent polypeptide-associated complex domain reveals a nucleic acid-binding region on the NACA subunit. *Biochemistry*, **49**, 2890–2896.
- Lopez, S., Stuhl, L., Fichelson, S., et al.** (2005) NACA is a positive regulator of human erythroid-cell differentiation. *J. Cell Sci.*, **118**, 1595–1605.
- Ma, H.Z., Liu, G.Q., Li, C.W., Kang, G.Z. and Guo, T.C.** (2012) Identification of the TaBTF3 gene in wheat (*Triticum aestivum* L.) and the effect of its silencing on wheat chloroplast, mitochondria and mesophyll cell development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **426**, 608–614. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.137>.
- Ma, Y., Lee, C.J. and Park, J.S.** (2020) Strategies for optimizing the production of proteins and peptides with multiple disulfide bonds. *Antibiotics*, **9**, 1–26.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Galperin, M.Y., Grishin, N. V., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I. and Koonin, E. V.** (1999) Comparative genomics of the archaea (Euryarchaeota): Evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. *Genome Res.*, **9**, 608–628.

- Markesich, D.C., Gajewski, K.M., Nazimiec, M.E. and Beckingham, K.** (2000) bicaudal encodes the Drosophila beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery. *Development*, **127**, 559–572.
- Mehra, V., Tripathi, J. and Powell, A.A.** (2003) Aerated hydration treatment improves the response of Brassica juncea and Brassica campestris seeds to stress during germination. *Seed Sci. Technol.*, **31**, 57–70.
- Merrick, W.C. and Pavitt, G.D.** (2018) Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**.
- Moreau, A., Yotov, W. V., Glorieux, F.H. and St-Arnaud, R.** (1998) Bone-Specific Expression of the Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex, a Coactivator Potentiating c-Jun-Mediated Transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1312–1321.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 474–497.
- Musco, A., Sidari, M., Anastasi, U., Santonoceto, C. and Maggio, A.** (2014) Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. *J. Plant Interact.*, **9**, 354–363. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2013.835880>.
- Nürenberg-Goloub, E. and Tampé, R.** (2019) Ribosome recycling in mRNA translation, quality control, and homeostasis. *Biol. Chem.*, **401**, 47–61.
- Pastor, A., Singh, A.K., Fisher, M.T. and Chaudhuri, T.K.** (2016) Protein folding on Biosensor tips: Folding of Maltodextrin glucosidase monitored by its interactions with GroEL. *FEBS J.*, **283**, 3103–3114.
- Peng, X., Wang, Q., Liu, H. and Shen, S.** (2017) Phylogenetic and functional analysis of the basic transcription factor gene BTF3 from *Jatropha curcas*. *Plant Growth Regul.*, **82**, 247–257.
- Pizarro, L. and Norambuena, L.** (2014) Regulation of protein trafficking: Posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant Sci.*, **225**, 24–33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.004>.
- Pool, M.R.** (2022) Targeting of Proteins for Translocation at the Endoplasmic Reticulum. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**.
- Pruthvi, V., Rama, N., Parvathi, M.S. and Nataraja, K.N.** (2017) Transgenic tobacco plants constitutively expressing peanut BTF3 exhibit increased growth and tolerance to abiotic stresses. *Plant Biol.*, **19**, 377–385.
- Radua, J., Albajes-Eizaguirre, A. and Fortea, L.** (2014) FDR online calculator.
- Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S. and Wiedmann, B.** (1999) Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast*, **15**, 397–407.
- Robles, P., Navarro-Cartagena, S., Ferrández-Ayela, A., Núñez-Delegido, E. and Quesada, V.** (2018) The characterization of arabidopsis mTERF6 mutants reveals a new role for mterf6 in tolerance to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1–11.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J.** (1994) Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. *Plant Mol. Biol. Man.*, 183–190.

- Sáez-Vásquez, J. and Delseny, M.** (2019) Ribosome biogenesis in plants: From functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell*, **31**, 1945–1967.
- Schroeder, A.M., Nielsen, T., Lynott, M., Vogler, G., Colas, A.R. and Bodmer, R.** (2022) Nascent polypeptide-Associated Complex and Signal Recognition Particle have cardiac-specific roles in heart development and remodeling. *PLoS Genet.*, **18**, 1–28. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1010448>.
- Spreter, T., Pech, M. and Beatrix, B.** (2005) The crystal structure of archaeal nascent polypeptide-associated complex (NAC) reveals a unique fold and the presence of a ubiquitin-associated domain. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15849–15854. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M500160200>.
- Sule, R., Rivera, G. and Gomes, A. V.** (2023) Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *Biotechniques*, **75**, 99–114.
- Thermo Scientific** (2011) Semidry Electrobloetter.
- Valasek, L.S.** (2012) ‘Ribozoomin’ – Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs). *Curr. Protein Pept. Sci.*, **13**, 305–330.
- Vasavada, N.** (2016) One-Way ANOVA https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/.
- Voorhees, R.M. and Hegde, R.S.** (2015) Structures of the scanning and engaged states of the mammalian srp-ribosome complex. *Elife*, **4**, 1–21.
- Wang, S., Sakai, H. and Wiedmann, M.** (1995) NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J. Cell Biol.*, **130**, 519–528.
- Wang, W., Xu, M., Wang, Y. and Jamil, M.** (2014) Basal transcription factor 3 plays an important role in seed germination and seedling growth of rice. *Biomed Res. Int.*, **2014**, 1–13.
- Wang, Y., Zhang, X., Lu, S., et al.** (2012) Inhibition of a basal transcription factor 3-like gene Osj10gBTF3 in rice results in significant plant miniaturization and typical pollen abortion. *Plant Cell Physiol.*, **53**, 2073–2089.
- Weele, C.M. Van Der, Spollen, W.G., Sharp, R.E. and Baskin, T.I.** (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.*, **51**, 1555–1562.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A. and Wiedmann, M.** (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, **370**, 434–440.
- Wilson, D.N. and Cate, J.H.D.** (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, 5.
- Xu, B., Liu, L. and Song, G.** (2022) Functions and Regulation of Translation Elongation Factors. *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 1–20.
- Yotov, W. V., Moreau, A. and St-Arnaud, R.** (1998) The Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex Functions as a Transcriptional Coactivator. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 1303–1311.

- Zhang, Y., Sinning, I. and Rospert, S.** (2017) Two chaperones locked in an embrace: Structure and function of the ribosome-associated complex RAC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 611–619.
- Zheng, X.M., Black, D., Chambon, P. and Egly, J.M.** (1990) Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature*, **344**, 556–559.