



**Interakce rostlin s patogeny: význam proteasomu a  
cytoskeletu**  
Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
Mgr. Martin Černý, Ph.D.

*Vypracovala:*  
Pavla Zelená

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Interakce rostlin s patogenem: význam proteasomu a cytoskeletu vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Především bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Martinu Černému, Ph.D., za jeho vstřícné a trpělivé jednání, za veškeré rady, připomínky a odborné vedení při psaní této práce. Další poděkování patří i mému konzultantovi Mgr. Janu Skalákovi, za jeho rady a pomoc. Všem pracovníkům ústavu Molekulární biologie a radiobiologie Mendelovy univerzity v Brně děkuji za přátelské prostředí a za možnost se na ně kdykoliv obrátit s prosbou o pomoc či radu.

## **ABSTRAKT**

Modifikace proteinů ubiquitinem je jeden z regulačních procesů v eukaryotických buňkách a rostliny používají tuto modifikaci při reakci na exogenní a endogenní podněty. Stále více důkazů naznačuje, že ubiquitin- proteasomový systém je klíčový prvek při reakci na biotický stres. Tato práce s názvem Interakce rostlin s patogenem: význam proteasomu a cytoskeletu popisuje úlohu proteasomu v rostlinné signalizaci a stručně shrnuje interakce mezi cytoskeletem a patogenem a nastiňuje roli cytokininů při interakci rostliny s patogenem. V experimentální části byla pomocí několika rozdílných přístupů sledována signalizace proteasomu. Byla sledována růstová odezva, využita metoda pro identifikaci substrátů proteasomu a analyzovány změny cytoskeletu pomocí konfokální mikroskopie. Výsledky ukazují, že použité metody budou užitečné i pro studium interakcí rostlin s patogeny.

**Klíčová slova:** degradace proteinů, ubiquitinace, cytokininy, hmotnostní spektrometrie, konfokální mikroskopie

## **ABSTRACT**

Modification of substrate proteins by ubiquitin is one of the major regulatory events in eukaryotic cells, and plants use this modification to react to exogenous and endogenous cues. Mounting evidence indicates that the ubiquitin-proteasome system is also a key component in response to biotic stressors. This thesis entitled "Plant-pathogen interactions: The role of proteasome and cytoskeleton" reviews the role of proteasome in plant signaling and briefly summarizes interactions between cytoskeleton and pathogen and outlines the role of cytokinin in plant-pathogen interactions. In the experimental part, proteasome-mediated signaling is probed using growth response assay, identification of proteasome substrates and confocal microscopy of cytoskeleton structures. The results present evidence that the employed methodology will be useful for plant-pathogen interaction analyses.

**Key words:** protein degradation, ubiquitination, cytokinin, mass spectrometry, confocal microscopy

## Obsah

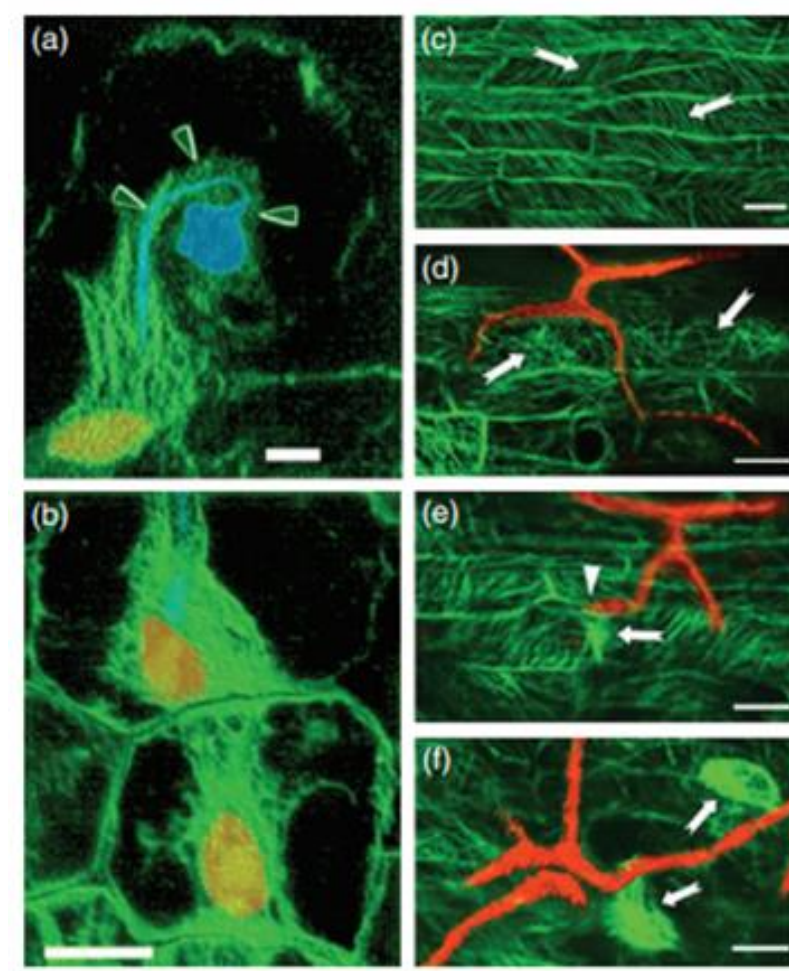
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
1.1 Struktura a funkce proteasomu.....	10
1.1.2 Degradace proteinů ubiquitin-proteasomovou cestou .....	10
1.1.3 Proteasom a signalizace rostlinných hormonů .....	11
1.2. Interakce mezi rostlinou a patogenem.....	13
1.2.1 Imunitní systém rostlin .....	13
1.2.3 Role ubiquitinu v interakci rostliny a patogena.....	15
1.3 Cytokininy.....	16
1.3.1 Biosyntéza a degradace cytokininů .....	17
1.3.2 Signalizace cytokininů.....	17
1.4. Cytokininy a imunitní systém rostlin .....	18
1.4.1 Cytokininy a fytopatogenní viry, bakterie a houby .....	18
1.4.2 Cytokininy a býložravý hmyz .....	19
1.5 Proteomika .....	20
1.5.3 Metody frakcionace .....	21
<b>2. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>23</b>
2.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace .....	23
2.2 Extrakce ubiquitinovaných proteinů.....	23
2.3 Odsolení a příprava vzorku pro LC-MS analýzu .....	24
2.4 LC-MS/MS analýza a vyhodnocení dat .....	24
2.5 Příprava vzorků pro konfokální mikroskopie.....	24
2.6 Konfokální mikroskopie .....	24
<b>3. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>25</b>
3.1 Pozorování vlivu inhibitoru proteasomu na morfometrické parametry semenáček <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
3.1.1 Pozorování vlivu inhibitoru proteasomu na morfologické parametry u linie CaMV35S>GR>HvCKX2 a CaMV35S>GR>ipt.....	25
3.2 Zachycení a identifikace ubiquitinovaných proteinů pomocí TUBE matrice.....	29

3.2.1 Funkce proteinů zachycených pomocí TUBE1 purifikace.....	30
3.2.1.1 Proteiny fotosyntézy a metabolismu uhlíku.....	32
3.2.1.2 Vybrané proteiny se známou funkcí v interakci mezi rostlinou a patogenem.....	32
3.3 Sledování dynamiky cytoskeletu v reakci na cytokinin a po ošetření inhibitorem proteasomu .....	33
3.3.2 Sledování vlivu inhibice proteasomu na dynamiku cytoskeletu .....	33
<b>4. ZÁVĚR .....</b>	<b>35</b>
<b>5. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>36</b>
<b>6. ZKRATKY .....</b>	<b>40</b>
<b>7. SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>41</b>
<b>8. PŘÍLOHY .....</b>	<b>42</b>

## 1. ÚVOD

Rostlina jako přisedlý organizmus se v přírodě neustále potýká s řadou abiotických a biotických činitelů. Na základě způsobu svého života rostlina vyvinula celou řadu mechanismů, kterými se snaží omezit či zastavit virulenci patogena. Při vzájemném kontaktu mezi rostlinou a patogenem dochází k procesům, které mohou být specifické nejen druhově, ale i lokalizací a vývojovým stadiem rostliny. Dle současných poznatků rostlinám, na rozdíl od savců, chybí mobilní obránce buněk a somatický adaptabilní imunitní systém. Místo toho se spoléhají na přirozenou imunitu každé buňky a na systémové signály vycházející z infikovaných míst. Schopnost aktivovat své obranné mechanismy je závislá na tom, zda je rostlina schopna patogena rozpoznat. Pokud se tak stane, dochází k aktivaci lokální obranné reakce, například k hypersenzitivní reakci, a zpoždění systémové reakce působících na patogena. Dalším krokem může být vyvinutí systémové získané rezistence (SAR), která vede k rezistenci v celé rostlině. V posledních letech se ukazuje, že velmi významnou roli v signálních drahách má ubiquitin-proteasomový systém (UPS). Zasahuje do každého kroku cyklu patogenů a naopak patogeny mají schopnost využít tento systém k vlastnímu prospěchu.

Cytoskelet je vysoce dynamický a univerzální intracelulární systém složený z mikrotubulů, aktinových mikrofilament a intermediárních filament. Hraje významnou roli v mnoha aspektech růstu a vývoje buněk. Cytoskeletární síť rostlinných buněk reaguje na vnější podněty změnami své organizace a prochází rozsáhlou reorganizací v reakci na symbiotické i patogenní organizmy. V mnoha situacích mohou patogeny vyvolávat depolymerizaci kortikálních mikrotubulů a tím zvyšovat náchylnost rostliny k invazi. Využití cytoskeletu patogenem je dobře prostudováno v případě živočišných virů, které interagují jak přímo s mikrotubuly a mikrofilamenty, tak zprostředkovaně asociací s molekulárními motory, které ovlivňují nitrobuněčný transport. Podobné mechanismy byly dokumentovány i u rostlinných virů. Je zřejmé, že remodelace rostlinného cytoskeletu je snaha o strukturální reakci na jiný organismus. Změny v organizaci cytoskeletu mohou také usnadnit signalizaci přítomnosti symbiontů nebo patogenů na povrchu rostlin.



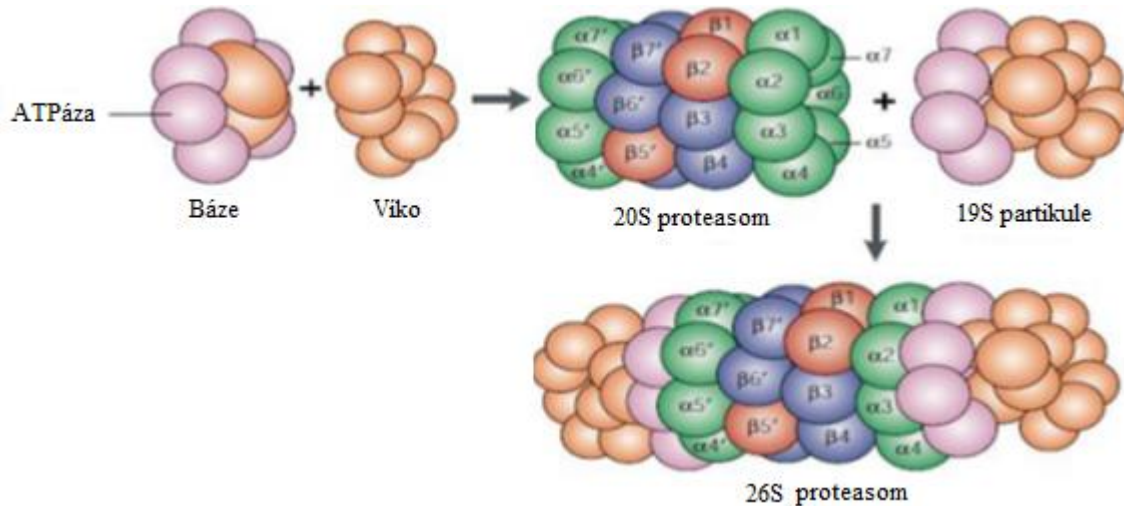
Obr. 1: Změna organizace mikrotubulů v reakci na symbiotické (a, b) a patogenní (c, d, e, f) organizmy (Hardham et al., 2013).

Tato práce měla několik cílů. Jedním z nich bylo vypracování literární rešerše, která shrnuje aktuální poznatky v oblasti zapojení ubiquitin-proteasomového systému v interakci mezi rostlinou a patogenem. V experimentální části byl sledován účinek inhibitoru proteasomu (MG-132) na dynamiku proteomu transgenní *Arabidopsis thaliana* nesoucí konstrukty, jejichž expresí je možné modulovat endogenní hladinu cytokininů. Dále byla testována metoda pro zachycení proteinů nesoucích ubiquitinaci pomocí TUBE matrice. Poslední částí bylo sledování efektu inhibitoru proteasomu a cytokininů na dynamiku cytoskeletu.



## 1.1 Struktura a funkce proteasomu

Proteasom je proteinový komplex s proteolytickou aktivitou, který se nachází uvnitř všech eukaryot, archeí a některých bakterií. U eukaryot se nachází uvnitř buněk nebo v cytoplazmě. Jeho hlavní funkcí je degradovat poškozené či nepotřebné intracelulární proteiny. Degradace proteinů řízená proteasomem je důležitá pro mnoho procesů v buňce jako je buněčný cyklus, regulace genové exprese či reakce na oxidační stres (Lodish et al., 2004).

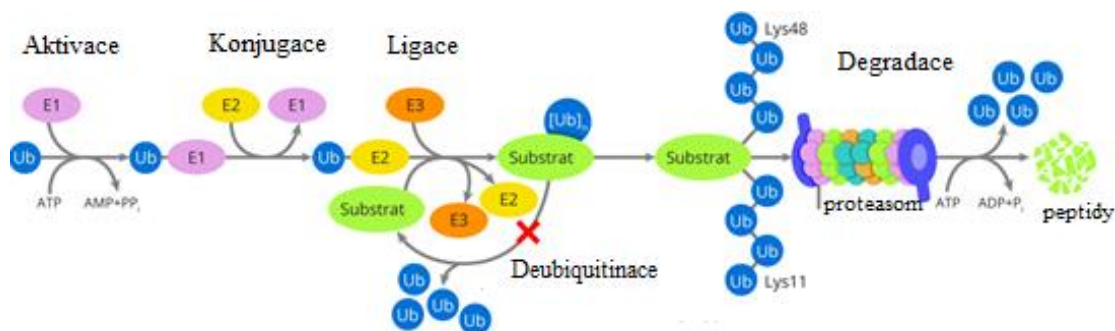


Obr. 2: Základní strukturou 26S proteasomu. 26S proteasome je válcovitý komplex o velikosti 2 MDa, který se skládá ze dvou podjednotek a to z 20S centrální jednotky a 19S regulační jednotky. Celý komplex má tvar válce složeného z heptamerických prstenců. Centrální jednotka se skládá ze čtyř prstenců, jejichž dva vnější prstence jsou složeny ze sedmi  $\alpha$  podjednotek a dva vnitřní ze sedmi  $\beta$  podjednotek. Prstence regulační podjednotky jsou navázány na  $\alpha$  prstence centrální jednotky. Regulační jednotka je složena ze dvou částí a to z „báze“ a „víka“. Báze má za úkol regulovat vstup do 20S podjednotky a víko deubiquitinovat ubiquitinované proteiny před vstupem do nitra celého 26S proteasomu (Bedford, 2010, upraveno).

### 1.1.2 Degradace proteinů ubiquitin-proteasomovou cestou

Ubiquitin-proteasomová dráha (UPS) je jedna z nejvíce konzervovaných drah sloužící k degradaci intracelulárních proteinů v eukaryotických buňkách. Proteiny, které jsou degradovány na proteasomech jsou ubiquitinovány (označeny ubiquitinem), ale asi 20% všech proteinů, které jsou štěpeny na proteasomech, nemusí mít ubiquitinové značení (Baugh et al., 2009). Proces degradace proteinu má několik kroků. Jedná se o přenos ubiquitinu na cílový protein prostřednictvím třístupňové enzymatické kaskády

mezi E1, E2 a E3 enzymem. Třetí enzym zvaný ubiquitin-ligáza E3 vytváří finální spojení ubiquitinu a proteinu, který je následně degradován. (Pickart et al., 2004).

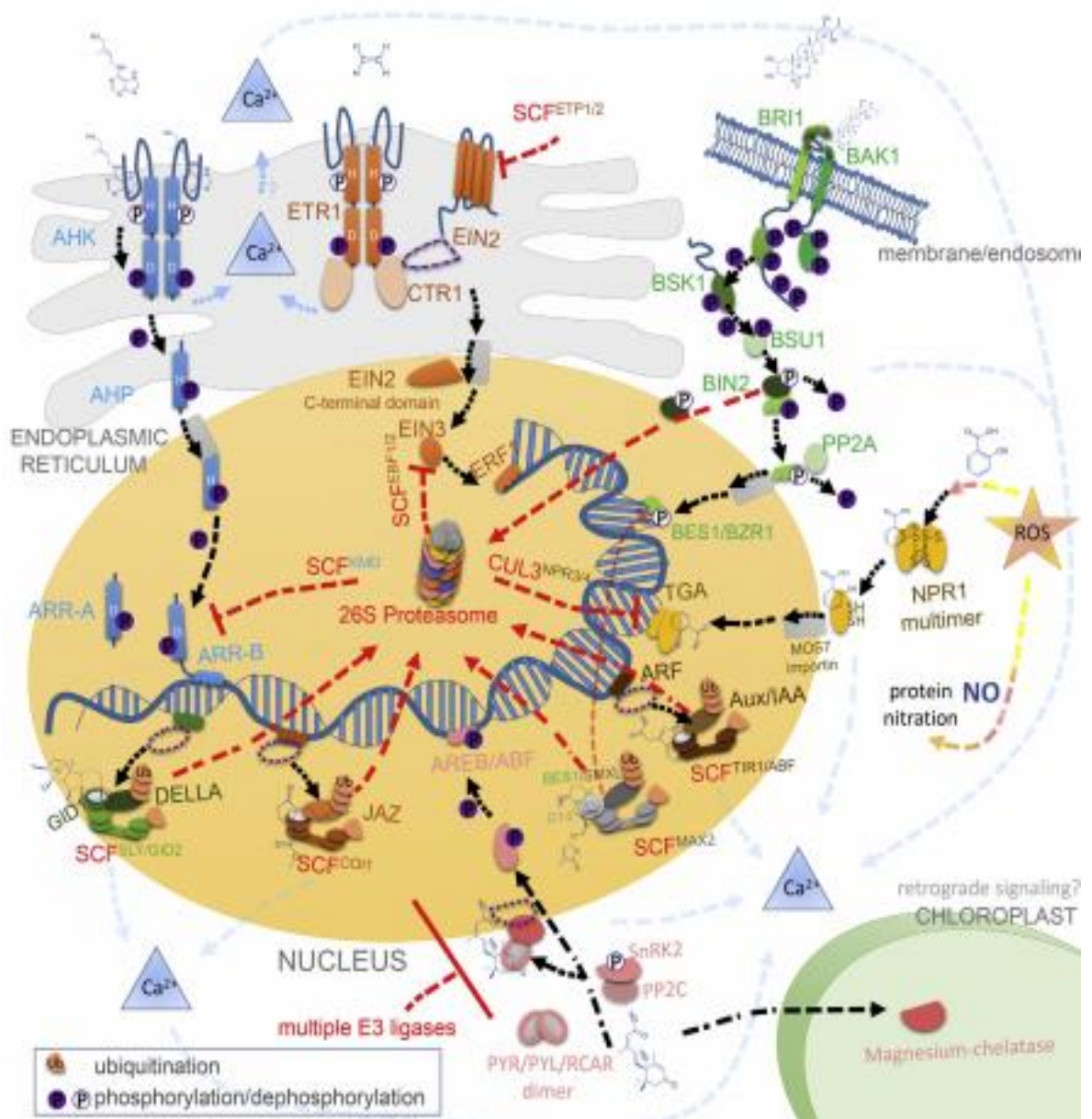


Obr. 3: Proces degradace proteinu ubiquitin-proteasomovou cestou (převzato z <http://www.formatherapeutics.com/>, upraveno)

Buňka obsahuje velké množství potenciálních substrátů pro UPS systém a je tak nutné zajistit jejich specifické rozpoznávání. To je zajištěno charakterem ubiquitinové kaskády, kdy při každém následujícím kroku narůstá počet enzymů účastnících se jednotlivých reakcí (Komander et al., 2009). E3 ligáza představuje nejrozšířenější a nejrozmanitější skupinu. Lidský genom obsahuje přibližně 600 genů E3 a modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* dokonce více jak 1000 E3 ligáz. E3 ligázy jsou multiproteinové komplexy rozdělující se do několika skupin podle jejich primární sekvence aminokyselin, struktury, substrátové specifity a modifikací (Pickart et al., 2011).

### 1.1.3 Proteasom a signalizace rostlinných hormonů

Signalizace rostlinných hormonů je úzce spojena s ubiquitin-proteasomovou dráhou a to díky komplexu Skp1-Cullin-F-box zkráceně SCF (Ub ligáza E3), který přebírá funkci regulátoru v pozitivní nebo negativní genové expresi. Název je odvozen od tří podjednotek, ze kterých se komplex skládá: SKP1 (ASK), CUL1 (Cullin) a F-box. Čtvrtou podjednotku tvoří RING prstencový protein RBX1 (Zheng et al., 2002). Role UPS je nejdětalněji prostudována v signalizaci rostlinných hormonů auxinu, gibberelinu, kyseliny jasmonové, kyseliny salicylové a ethylenu (Obr.3) (Vierstra et al., 2009).



Obr. 4: Ústřední role UPS v signalizaci fytohormonů. V signálních drahách auxinu figuruje komplex  $SCF^{TIR1}$ , který slouží jako E3 ubiquitin ligáza degradující AUX/IAA.  $SCF^{SLY/GID2}$  je zodpovědný za ubiquitinaci a degradaci DELLA proteiny v přítomnosti giberelinů.  $SCF^{COI1}$  komplex zprostředkovává degradaci JAZ proteinů v reakci na jasmonyl isoleucin.  $SCF^{EBF1/EBF2}$  komplexem jsou degradovány EIN3 a EIL1 v nepřítomnosti ethylenu.  $SCF^{KMD}$  ovlivňuje cytokininovou signalizaci regulováním degradace regulátorů odezvy typu B,  $SCF^{MAX2}$  se podílí na signalizaci strigolaktону a  $CUL3^{NPR3/4}$  komplex se podílí na signalizaci kyseliny salicylové. Signální dráha kyseliny abscisové pak zahrnuje celou řadu E3 ligáz (Černý, 2015).

## **1.2. Interakce mezi rostlinou a patogenem**

První obrannou linií proti patogenům je epidermální stěna buňky, proto například patogenní houby produkují enzymy, které umožňují proniknout kutinem pod povrch buňky. Patogenní viry enzymy neprodukují a mohou vstupovat do rostliny pouze přes přirozené otvory, jako jsou stomata či poranění. Když pak rostlina a patogen přicházejí do vzájemného kontaktu, vytvářejí mezi sebou těsnou komunikaci (Hammound-Kosack & Jones et al., 2000). Zda-li rostlina aktivuje své obranné mechanismy je závislé na schopnosti rozpoznat patogeny. Podle toho dělíme interakci mezi rostlinou a patogenem na interakci kompatibilní, kdy není patogen rostlinou rozpoznán, množí se a šíří volně v rostlině, a na nekompatibilní interakci, která se dále rozděluje na tři obecné případy. Rostlina je hostitelská a rezistentní, rostlina je nehostitelská a patogen se na ni nemůže uchytit, a nakonec patogen je rostlinou rozpoznán a rostlina spustí své obranné reakce v místě napadení (Buchanan et al., 2000), jako je hypersenzitivní reakce, která spočívá v akumulaci reaktivních forem kyslíku, což má za následek naprogramovanou smrt rostlinných buněk kolem místa napadení (Lamb et al., 1997).

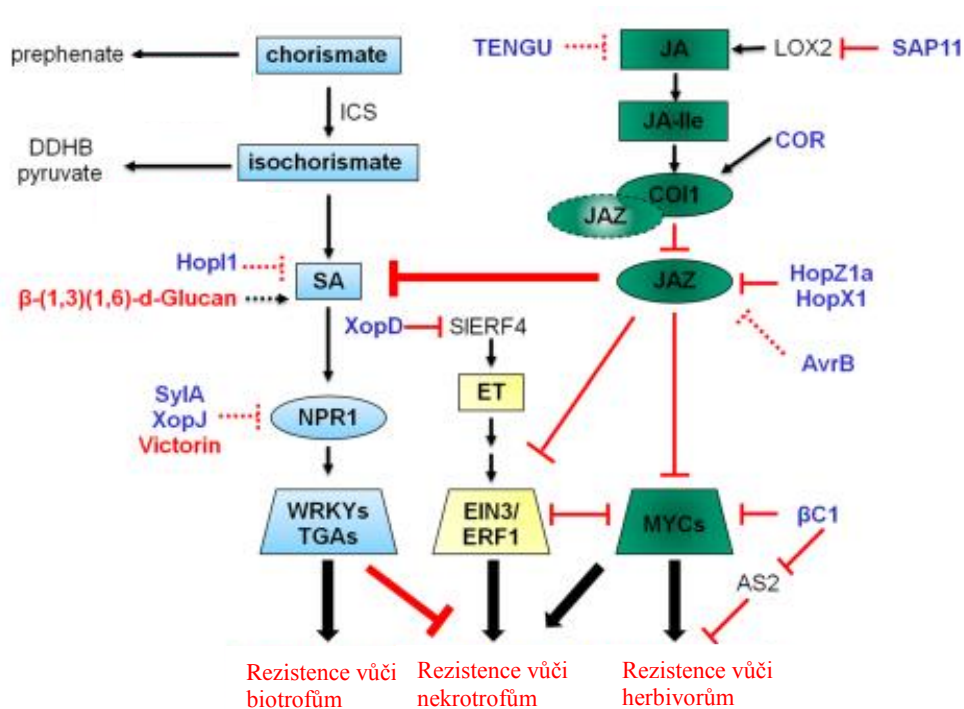
### **1.2.1 Imunitní systém rostlin**

Imunitní systém rostlin se skládá ze dvou vzájemně propojených úrovní receptoru, jedné vnější a jedné uvnitř buňky, které mají za úkol snímat vetřelce, reagovat na jeho vniknutí a popřípadě signalizovat zbytku rostliny a někdy i sousedním rostlinám jeho přítomnost. První stupeň primárně řídí rozpoznávací receptory umístěné na povrchu buněk, které jsou aktivovány rozpoznáním evolučně konzervovaných molekul patogenů označovaných jako „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP). PAMP jsou exogenní elicitory vylučované patogeny, nebo jsou uvolňovány působením různých hydrolytických enzymů z jeho buněčných stěn (Jones a Dangl et al., 2006). Po navázání elicitoru na receptor dojde ke spuštění signální kaskády vedoucí k rezistentní reakci a spuštění bazální obranné reakci PTI (PAMP-triggered immunity). Mezi nejlépe popsané MAMPs se řadí chitin jakožto základní složka buněčné stěny hub a flagelin, peptid utvářející bičík fytopatogenních hub. (Sun et al., 2006).

Druhou část systému tvoří efekторы vyvolaná imunita ETI. Skládá se ze sady receptorů, které mají schopnost rozpoznávat efekторы, jež zablokují rozpoznání PAMP. ETI je aktivovaná v přítomnosti patogenních efektorů, které jsou v některých případech produkty genu avirulence (Avr), a je závislá na genech rezistence (R)

zprostředkovávajících odolnost vůči patogenům. Aby mohla být rostlina rezistentní, musí být gen rezistence komplementární ke genu avirulence. Pokud gen rezistence není komplementární ke genu avirulence, stává se rostlina náchylnou. Většina genů rezistence jsou intracelulární proteiny bohaté na leucin se schopností vázat nukleotidy (NB-LRR) (Jones et al., 2006). NB-LRR jsou na rozdíl od receptorů rozpoznávající PAMP umístěny především v cytosolu. Proteiny kódované geny rezistence nepůsobí přímo proti patogenům, ale slouží pouze jako receptory patogenních efektorů, které po jejich rozpoznání aktivují imunitní systém (Bent et al., 2007). Jasně demonstrujícím příkladem mechanismu překonání imunity vyvolané rozpoznáním PAMP je modelový patosystém *Arabidopsis thaliana* – *Pseudomonas syringae* pt. *tomato*. Tato bakterie vnáší do rostlinné buňky efektor AvrPtoB, který dokáže ubiquitinem označit kinázy vedoucí signál od receptoru flagelinu a nasměrovat je k degradaci pomocí UPS (Rosebrock et al., 2007).

Pouhé rozpoznání patogena rostlinu neochrání před infekcí. Přenos signálu od receptoru vede složitým systémem signálních drah, které slouží k přeprogramování transkriptomu. Klíčovou roli při přenosu signálu hrají především fytohormony a to kyselina salicylová, ethylen, oxylipiny (kyselina jasmonová) a cytokininy. Jako příklad lze uvést indukci kyseliny salicylové při napadení biotrofními patogeny, kyseliny jasmonové při útoku nekrotrofních patogenů a herbivorů a interakci těchto drah prostřednictvím signalizace ethylenu (Obr. 4) (Ma et al., 2016).



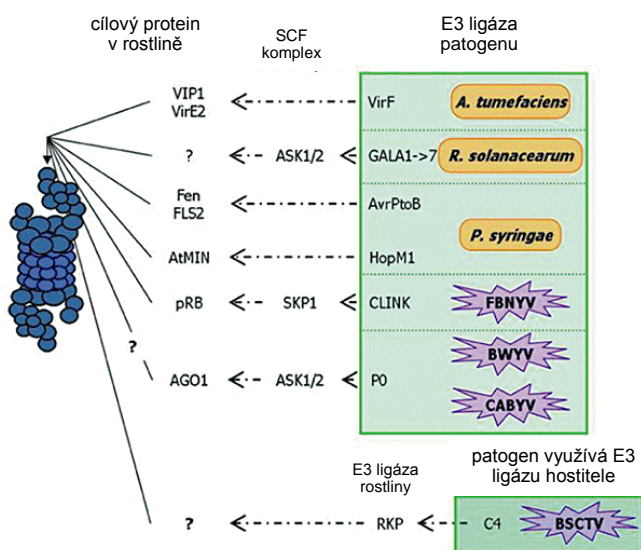
Obr. 5: Schéma znázorňující propojení signálních drah fytohormonů v obraně proti patogenům. Virulentní faktory produkované biotrofi jsou zvýrazněny modře, virulentní faktory nekrotrofů jsou zvýrazněny červeně a faktory produkované oběma jsou zvýrazněny zeleně. Neznámé procesy a mechanismy jsou znázorněny přerušovanou čarou (Ma, 2016).

### 1.2.3 Role ubiquitinů v interakci rostliny a patogena

Ochrana rostlin je zprostředkována nasazením aktivních obranných mechanismů při interakci mezi rostlinou a patogenem (Jones et al., 2001). Klíčovou roli má i cílená degradace proteinu pomocí proteasomu. Bylo popsáno, že viry mohou využít UPS ke svému prospěchu, ať se jedná o narušení drah hostitele, nebo o regulaci jednotlivých virových proteinů, které vznikají procesováním původního polyproteinu v ekvimolárním množství. V současnosti není známo, zda jsou tyto interakce důležité kroky v životních cyklech virů, nebo zda se jedná o neúspěšný pokus hostitelské buňky zabránit množení viru (Dielen et al., 2010).

Následující příklady ukazují důležitost indukované specifické E3 ligázy pro kontrolu virové infekce. U BSCTV (*Beet severe curly top virus*) bylo zjištěno, že exprese C4 proteinu, hlavního determinantu patogeneze ovlivňujícího dělení buněk, podporuje expresi RING typu E3 ligázy RKP. RKP prostřednictvím degradace inhibitorů reguluje buněčný cyklus, takže C4 protein viru může přímo ovlivnit cyklus hostitelských buněk a usnadnit její infekci (Lai et al., 2009). Stále přibývá nových

důkazů, že rostlinné viry běžně používají strategii k uchvacování hostitelské E3 ligázy (Obr. 6).



Obr. 6: Příklady využití Ubiquitin-proteasomového systému hostitele patogenem. Toto schéma znázorňuje propojení ubiquitin ligáz, jimiž může patogen manipulovat ke svému vlastnímu prospěchu. *FBNYV* - *Faba bean necrotic yellow virus*; *BWYV* - *Beet western yellows virus*; *CABYV* - *Cucurbit aphid-borne yellow virus*; *BSCTV* - *Beet severe curly top virus* (Dielen, 2010, upraveno).

### 1.3 Cytokininy

Cytokininy jsou definovány jako rostlinné hormony, které podporují buněčné dělení. Mají klíčovou roli v regulaci růstového cyklu buňky, diferenciaci buněk a mohou ovlivňovat celou řadu vývojových procesů, jako je vývoj chloroplastů, mobilizaci živin, přerušování dormance pupenů a klíčivost semen (Sakakibara, 2006). Jsou také regulátory imunitního systému (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Cytokininy jsou  $N^6$  deriváty adeninu lišící se od sebe konfigurací postranního řetězce. Základní dvě skupiny cytokininů jsou isoprenoidní, které jsou zastoupeny zeatinem, dihydrozeatinem a isopentenyladeninem, a aromatické, reprezentované např. topoline a benzyladeninem (Frébort et al., 2011).

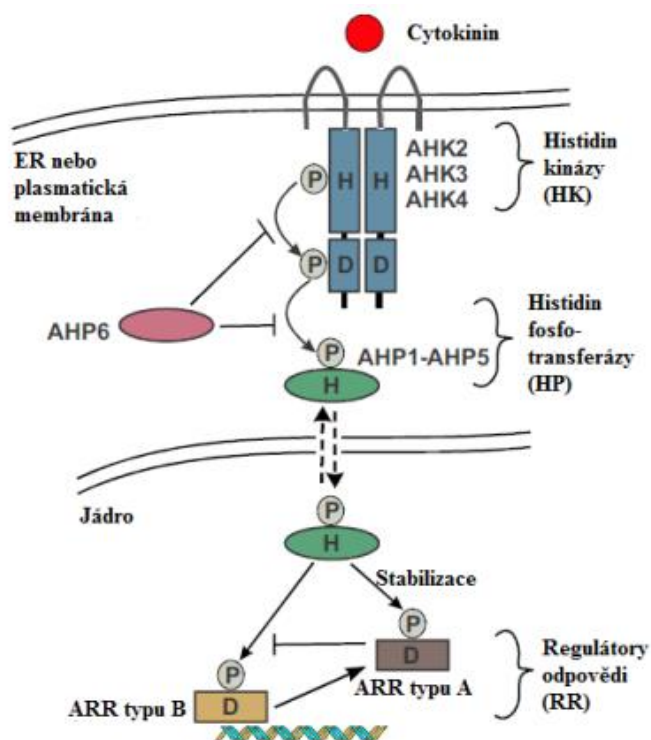
### 1.3.1 Biosyntéza a degradace cytokininů

Biosyntéza cytokininů probíhá především v meristému kořenu, odkud jsou následně rozváděny do dalších částí rostlin (Frébort et al. 2011). Prvním krokem v biosyntéze isoprenoidních cytokininů je přenos isopentenylu z dimethylallyldifosfátu na N<sup>6</sup> pozici ADP/ATP za vzniku isopentenylribotidů enzymem isopentenyltransferázou (IPT). Vzniklé isopentenylribotidy jsou trans-hydroxylovány P450 monooxygenázou CYP735A na trans-zeatinribotidy. K tvorbě *cis*-zeatin ribotidu dochází isoprenylací a následnou degradací tRNA za katalýzy tRNA-isopentenyltransferázy. Další přeměna isopentenylribotidů je možná defosforylací a deribosylizací prostřednictvím enzymu LOG (cytokinin ribosid-5'-monofosfát fosforibohydrolasy), který převádí inaktivní formu cytokininů (nukleotidů na volné báze (aktivní forma) (Kurakawa et al., 2007). Aktivní cytokinin může být inaktivován konjugací (např. N- a O-glykosylací), či degradací pomocí enzymu cytokinin dehydrogenasy. Mechanismus degradace spočívá v odštěpování N<sup>6</sup>-postranního řetězce za vzniku adeninu a aldehydu. (Schmülling *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Signalizace cytokininů

Signalizace cytokininů je proces podobný dvoustupňové dráze u bakterií a kvasinek. Jedná se o kaskádový přenos signálu z endoplasmatického retikula do jádra, který zahrnuje opakovaný přenos fosfátové skupiny mezi histidylovým a aspartylovým zbytkem. Celý proces je založen na několika po sobě jdoucích fosforylacích, které začínají u cytokininového receptoru histidinové kinázy předávajícího fosforylaci na histidin fosfotransferový protein přes aparát. K další fosforylaci dochází při translokaci fosfotransferového proteinu do jádra při předání informace regulátorům odpovědi. Posledním krokem je transkriptomická odpověď, která zároveň zahrnuje indukci negativních regulátorů cytokininové signalizace (Argueso et al., 2009).





Obr. 7: Schéma přenosu cytokininového signálu. D- zbytek kyseliny asparagové, H- zbytek histidinu, P- fosfátová skupina, ER- endoplazmatické retikulum (El-Showk, 2013, upraveno).

#### 1.4. Cytokininy a imunitní systém rostlin

Cytokininy hrají důležitou roli v modulaci rostlinné přirozené imunity. Mohou systémově vyvolat akumulaci fytoalexinů a odolnost proti patogenu prostřednictvím interakce se signální dráhou kyseliny salicylové, či přímé indukce genů pro obranné účely. Mnohé mikroby, většinou rostlinné patogeny, vylučují analogy cytokininů nebo aktivují produkci cytokininů v infikovaných částech, což vede k aberantnímu růstu a ztrátě produktivity zemědělských plodin. (Tsuda et al., 2009).

##### 1.4.1 Cytokininy a fytopatogenní viry, bakterie a houby

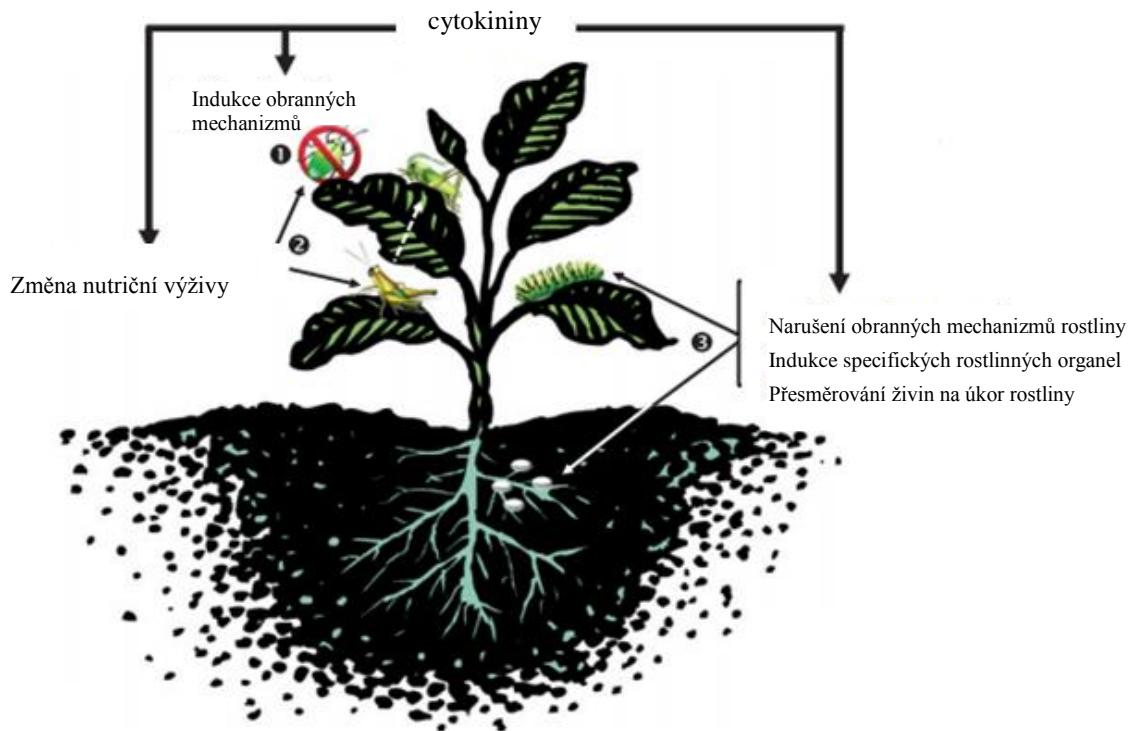
Viry mají schopnost interferovat s endogenní hladinou rostlinných hormonů a mohou tak vyvolávat celou řadu symptomů, včetně abnormálních růstových forem, jako je například tvorba hálek a obecné narušování pletiv nebo narušení fotosyntézy, jako jsou chloróza nebo tvorba zelených ostrovů (Choi et al., 2010). Fytopatogenní bakterie běžně nesou geny pro syntézu cytokininů, které vnášejí do buněk hostitele. Nejlepším příkladem je tvorba nádorů na listech bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*, které do rostliny vnášejí gen biosyntézy cytokininů isopentenyltransferázu (*ipt*) (Jameson et al.,

2000). Podobné *ipt* geny byly nalezeny v jiných bakteriích stejného rodu (*A. vitis*, *A. rhizogenes*), ale i v dalších rostlinných patogenních bakteriích (Frébort et al., 2011). Například *Rhodococcus fascians* zodpovědný za listové choroby mnoha hostitelských druhů obsahuje ortolog *ipt* známý jako *fasI* (Jameson et al., 2000). Tato bakterie vylučuje šest cytokininů, které synergicky přeměrují vývojový program vedoucí k proliferaci mladých výhonků pletiva, které se rozšiřují a bakterie je mohou kolonizovat a žít v nich (Frébort et al., 2011).

Infekce fytopatogenními houbami je často spojena se zpožděným stárnutím, akumulací živin v infikovaných místech a růstovou malformací, což naznačuje specifickou interakci s cyklem hostitelské buňky, fotosyntézou a transportem živin. Je známo, že fytopatogenní houby mají schopnost produkovat cytokininy (na rozdíl od nekrotických hub). U hemibiotroficke aktinomycety *R. fascians* bylo prokázáno, že stejně jako u některých bakterií má funkční *ipt* gen k produkci cytokininů. Možné je i nepřímé ovlivnění metabolismu cytokininů. Infekce může manipulovat fyziologii rostliny do té míry, že rostlina uvolní své vlastní cytokininy (Jameson et al., 2000).

#### **1.4.2 Cytokininy a býložravý hmyz**

Nejvíce zřejmým příkladem interakce rostlinného hmyzu a cytokininu je tvorba listových hálek. Nejedná se však o obranný mechanismus rostliny, ale o propracovanou biochemickou manipulaci s hostitelem. Listové háčky jsou výrůstky na povrchu rostlin, které jsou často extravagantně tvarované a zbarvené, naznačují hluboké přeprogramování vývojového procesu rostlin, které je způsobeno různými druhy hmyzu. Na vzniku se podílejí nejen indukované cytokininové signály, ale také další rostlinné hormony. Dalším příkladem jsou tzv. zelené ostrovy, vznikající po napadení hmyzem živícím se listovým parenchymem. Tyto ostrovy jsou nejvíce patrné na podzim, kdy dochází ke ztrátě chlorofylu s výjimkou zmíněných zelených ostrovů, které si zachovávají zelenou barvu až do léta, a s tím je spojeno i ovlivnění transportu živin. Parazitický hmyz tak může získat nějaký čas navíc k pokračování svého vývojového cyklu (Walter et al., 2008).



Obr. 8: Úloha cytokininů při interakci mezi rostlinou a patogenem (Giron, 2013, upraveno). (1) Cytokininy se podílejí na indukci obrany proti hmyzím škůdcům; (2) mohou měnit alokaci živin, což má přímý a nepřímý dopad na celou komunitu býložravého hmyzu a patogenů; (3) cytokininy lze také narušit obranné mechanismy rostliny, indukovat specifické rostlinné struktury, které mohou sloužit jako úkryt.

### 1.5 Proteomika

Pojmy „proteom“ či „proteomika“ poprvé použil v roce 1994 Marc Wilkins. Proteom je definovaný jako soubor veškerých proteinů kódující genomem organismu. Proteomika je vědní obor, který se zabývá studiem proteinů – jejich vlastností, strukturou a funkcí. Cílem proteomiky je obsáhnout všechny proteiny, které se nachází v organismu v průběhu jeho života. Proteom je dynamický a bude odrážet bezprostřední okolí, ve kterém se studovaný organismus nachází. V reakci na vnější a vnitřní podněty se proteiny mohou syntetizovat, degradovat, modifikovat posttranslační modifikací, nebo například transportovat jak v rámci buňky, tak i do extracelulárního prostoru (Zhang et al., 2013).

### **1.5.1 Příprava rostlinného proteinového vzorku**

Jednou z nejvýznamnějších procedur proteinové analýzy je náležitá příprava vzorku. Ta ve většině případů zahrnuje homogenizaci a extrakci. Nejběžnějším postupem je rozdrcení materiálu v třecí misce společně s tekutým dusíkem, který účinně zamezuje enzymatické pochody. Dalším krokem je zpravidla extrakce proteinů, během které je nutné co nejlépe oddělit proteiny od balastních látek, a která zpravidla probíhá za snížení teploty. Existují dva základní způsoby extrakce proteinů, první z nich je přímá extrakce, kdy se protein získává z homogenizovaného materiálu srážením. Příkladem je TCA/acetonová extrakce, kdy jsou ve vzniklém kyselém a hydrofobním prostředí proteiny denaturovány. Druhým způsobem je rozpuštění homogenizovaného materiálu v lyzačním pufru a následná frakcionace (Stejskal et al., 2010).

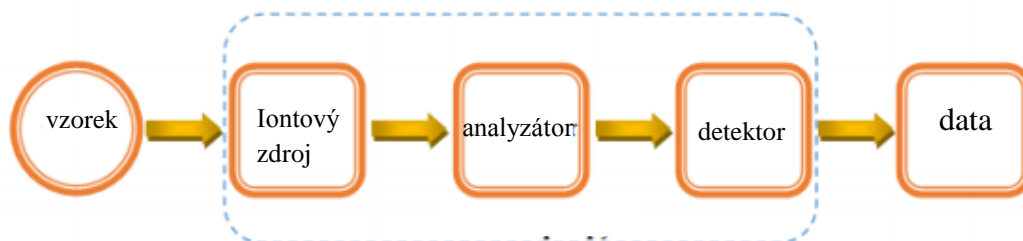
### **1.5.3 Metody frakcionace**

Metodou frakcionace získáme jednodušší směs proteinů/peptidů s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Podle typu experimentu můžeme provést frakcionaci intaktních proteinů nebo peptidů vzniklých štěpením. V dnešní době jsou přednostně využívány pokročilejší metody elektromigrační a chromatografické. K nejčastěji používané separační metodě patří kapalinová chromatografie (LC). Podstatou chromatografie je distribuce směsi mezi mobilní fází a stacionární fází. Kapalinová chromatografie používá kapalinu jako mobilní fází a stacionární fází ve formě částic umístěných zpravidla v koloně (Stejskal et al., 2010).

### **1.5.5 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)**

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která rozděluje ionty na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Analyzovány mohou být kladně i záporně nabitě ionty, které jsou po separaci detekovány. Výsledkem je hmotnostní spektrum znázorňující závislost intenzity signálu na  $m/z$ . Základní částí MS je iontový zdroj, který převádí neutrální molekuly analytu na nabitě částice, hmotnostní analyzátor sloužící k rozdělení iontů v plynné fází na základě  $m/z$  a detektor, který detekuje ionty po jejich rozdělení a zaznamená jejich relativní intenzitu. V současnosti se využívají dvě základní techniky pro ionizaci vzorku biomolekul. Ionizace elektrosprejem (ESI) ionizuje analyty v kapalně fází za atmosférického tlaku a proto je propojena s kapalinovými separačními technikami. U druhé techniky je základem laserová

desorpce/ionizace za pomoci matrice (MALDI) a analyt je převeden do plynné fáze rychlým odpařováním působením krátkým laserovým pulsem (Friedecký a Lemr et al., 2012).



*Obr. 9:* Schéma základních komponentů hmotnostního spektrometru

## 2. MATERIÁL A METODIKA

### 2.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

Pro studium vlivu inhibice proteasomu na morfologii semenáčku jsme použili rostliny *Arabidopsis thaliana* L. ekotyp Col-0 a transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* L. nesoucí transgen *CaMV35S>GR>ipt* a *CaMV35S>GR>HvCKX2* na pozadí Col-0 kde lze pomocí dexametozon(DEX)-inducibilního systému aktivovat expresi genu *ipt* či enzymu cytokinin oxidazy/dehydrogenázy CKX2 a tím ovlivnit endogenní hladinu cytokininů. Pro testování vlivu inhibitoru proteasomu a *trans*-zeatinu na dynamiku cytoskeletu jsme použili transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* L. v pozadí ekotypu Col-0 společně s kontrolou fluorescence GFP u tubulin značených linií 35S::MAP4-GFP, 35S::TUA5-GFP, 35S::TUA6-GFP pro vizualizaci mikrotubulů. Semínka pro analýzu poskytl Mgr. Jan Skalák. Semena rostlin jsme nejprve povrchově sterilizovali v 75% ethanolu po dobu 5-7 minut. Vysterilizovaná semena jsme vyseli ve sterilním prostředí flow-boxu na živném Murashige a Skoogova media s 1,2 % agarem, jehož pH jsme upravili na 7,8 pomocí 1 M KOH. Misky s vysetými semeny jsme po dobu tří dnů stratifikovali v lednici při teplotě 3-4 °C a následně kultivovali 7-14 dní při intenzitě světla 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a režimu dlouhého dne (16/8) při 21°C (den) a 19°C (noc) (box Percival AR-36L).

### 2.2 Extrakce ubiquitovaných proteinů

Vzorky klíčnicích rostlin *A. thaliana* jsme homogenizovali v tekutém dusíku a zhruba 100 mg homogenitu jsme extrahovali pomocí 1 ml vychlazeného lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-4é, 10% glycerol, pH 7,5) s přidávkem inhibitorů proteas (Sigma-Aldrich) a deubiquitinas (1 mM fenantrolin, Cayman chemicals). Následně jsme vzorky centrifugovali (14,000×g, 10 min, 4°C). Mikrozkumavky se vzorky jsme inkubovali při teplotě 4 °C po dobu 30 minut (Thermomixer, 600 RPM). Následně jsme znovu centrifugovali vzorky, supernatan jsme přesunuli do nové mikrocentrifugační zkumavky s připraveným afinitním nosičem TUBE (Agarose-TUBE1). Vzorek jsme nechali inkubovat po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C, poté znovu centrifugovali (2000×g, 4 °C, 5 min) a získaný pelet jsme promyli TBS (20mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween-20) resolubilizován a inkubován 60 min při 4 °C v elučním pufru (0,2 M glycin, pH 2,5). Následně jsme vzorek centrifugovali po dobu 5 minut a supernatan jsme odebrali, rozředili roztokem 2 M močoviny s hydrogenuhličitanem amonným a po orientačním stanovení koncentrace

proteinů (metoda dle Bradfordové) jsme štěpili trypsinem při 25 °C přes noc (Promega, 10 µl suspenze trypsinu na 500 µg proteinu).

### **2.3 Odsolení a příprava vzorku pro LC-MS analýzu**

Vzorky jsme odsolili za využití C<sub>18</sub> SPEC destičky. V prvním kroku jsme promyli destičky (2× 400 µl methanolu, 4× 400 µl H<sub>2</sub>O). Následně jsme nanесли vzorky a promyli (4× 400 µl H<sub>2</sub>O). Vzorky jsme eluovali pomocí 400 µl metanolu a nechali jsme je odpařit v SpeedVac koncentrátoru (Thermo). V posledním kroku před LC-MS analýzou jsme vzorky rozpustili ve vodném roztoku obsahující 0,1% kyseliny mravenčí a 5% acetonitril.

### **2.4 LC-MS/MS analýza a vyhodnocení dat**

Vzorky jsme analyzovali pomocí C<sub>18</sub> reverzní chromatografie (Ascentis Express Column, Sigma-Aldrich), která je napojena na nanoESI zdroj CaptiveSpray (Bruker) a UHR maXis impact q-TOF hmotnostní spektrometr (Bruker). Nalezená spektra jsme extrahovali a interpretovali (Mascot 2.4.0) proti databázi proteinů *Arabidopsis thaliana* (TAIR 10). Získaná data jsme následně vyhodnotili v programu String 9.1 (<http://string-db.org/>), kde jsme získali mapu protein-proteinových interakcí.

### **2.5 Příprava vzorků pro konfokální mikroskopie**

Pro konfokální mikroskopii jsme použili 7 dní staré rostliny, které jsme po dobu 30 min inkubovali v tekutém mediu obohaceném o (a) 20 µM cytokinin, (b) 50 µM MG-132 (c) DMSO (kontrola). Rostliny jsme následně fixovali v 1 ml PFA a 4 ml ½ MTSB o dobu 1 hodiny. Následně jsme je promyli ve 4 ml ½ MTSB po dobu 10 minut a 2x ve 4 ml PBS po dobu 10 minut. Rostliny jsme poté přenesli na sklíčko, zakonzervovali v 90 % glycerolu v TRIS pufru společně s "Prolong Antifade Reagent" od firmy Thermo Fisher. Krycí sklíčko jsme přetřeli lakem na nehty. Sklíčka jsme následně uchovali ve tmě v lednici při 4°C.

### **2.6 Konfokální mikroskopie**

Pro sledování vlivu inhibice proteasomu na dynamiku cytoskeletu jsme použili konfokální mikroskop Zeiss LSM 710 s nastaveným olejovým imerzním objektivem 63X NA 1.2 a argonovým laserem emitující světlo s vlnovou délkou 488 nm. Obrázky jsme uložili ve formátu CZI a upravili v programu ZEN lite 2011.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část této práce se zabývá studiem UPS a metodou analýzy dynamiky cytoskeletu. UPS je významný hráč při interakci mezi rostlinou a patogenem, ale i když jsou základní mechanismy směřování proteinů k degradaci již objasněny, zůstává mnoho nezodpovězených otázek. V první části této práce byla sledována interakce mezi signální dráhou hormonu cytokininu a UPS za využití základní fyziologické analýzy (sledování elongace hlavního kořene). Dále byly hledány potenciální cíle UPS pomocí proteomické analýzy. Poslední část práce využívá konfokální mikroskopii pro sledování dynamiky cytoskeletu a opět sleduje efekt cytokininu a narušení UPS. I když nebyl pro tyto převážně testovací experimenty využit žádný infikovaný rostlinný materiál, lze uvedené postupy obecně uplatnit pro analýzu interakcí mezi rostlinou a patogenem.

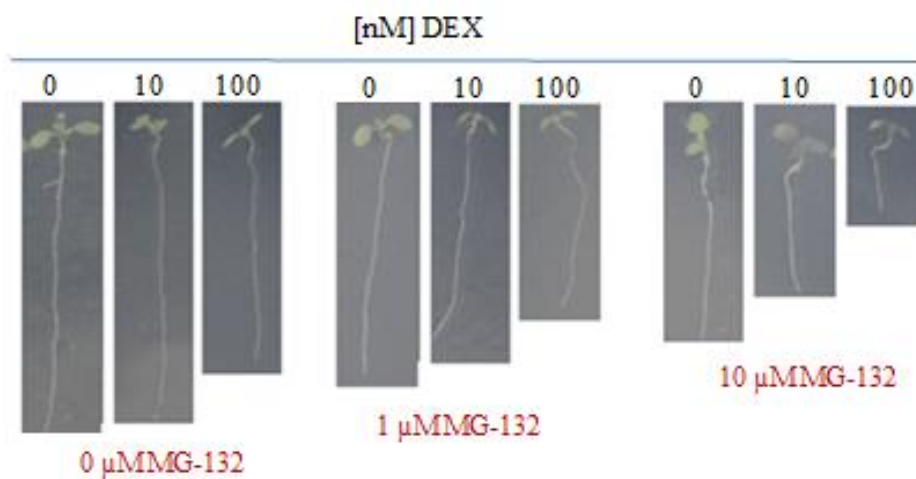
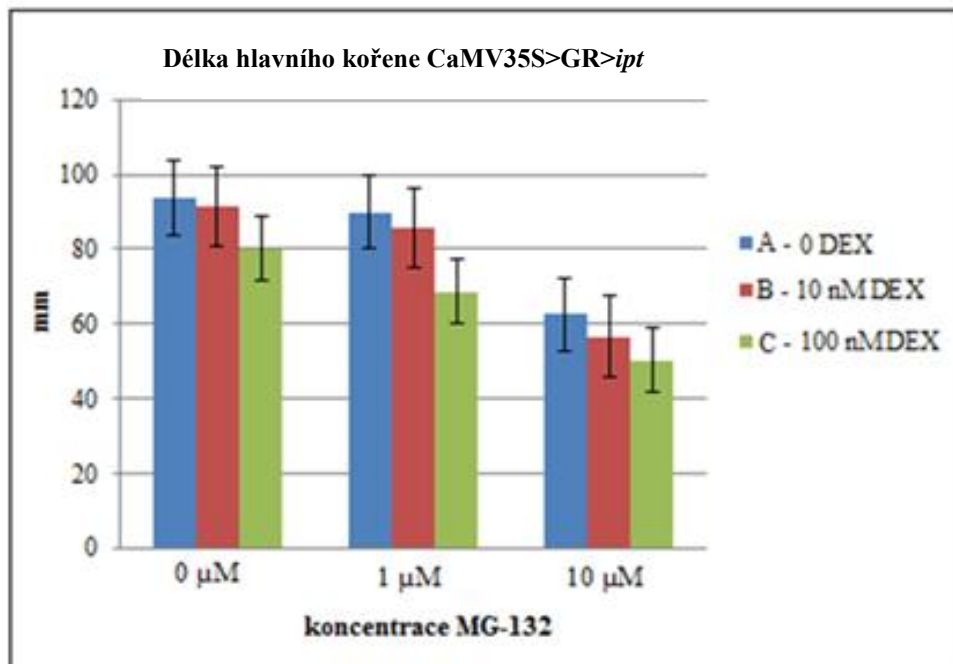
#### 3.1 Pozorování vlivu inhibitoru proteasomu na morfometrické parametry semenáčků *Arabidopsis thaliana*

Jedním z cílů práce bylo sledování účinku inhibice UPS na modelových organizmech s rozdílnou hladinou endogenních cytokininů. Jako rostlinný materiál jsme použili transgenní *Arabidopsis thaliana* nesoucí konstrukt *CaMV35S>GR>HvCKX2* a *CaMV35S>GR>ipt* jejichž expresí můžeme modulovat endogenní hladinu cytokininů. U transgenních rostlin *CaMV35S>GR>HvCKX2* se snížená hladina cytokininů projevuje rychlejším růstem hlavního kořene. Naopak u linie *CaMV35S>GR>ipt* se projevuje zvýšená hladina cytokininů pomalejším růstem hlavního kořene. Pro sledování účinků inhibice UPS byla zvolena škála koncentrace inhibitoru proteasomu MG-132, díky němuž lze zastavit degradaci ubiquitinem značených proteinů.

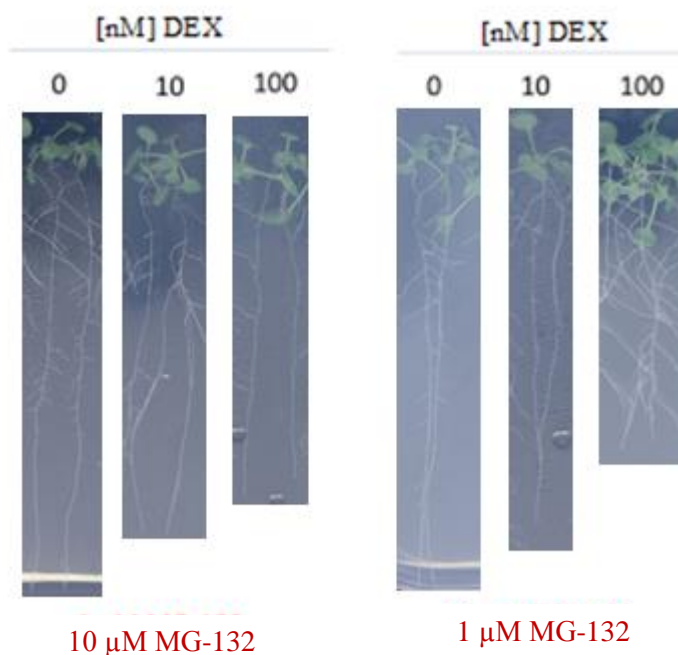
##### 3.1.1 Pozorování vlivu inhibitoru proteasomu na morfologické parametry u linie *CaMV35S>GR>HvCKX2* a *CaMV35S>GR>ipt*

Pro sledování účinku inhibitoru proteasomu MG-132 společně s dexametazonem na růst hlavního kořene jsme zvolili koncentrační škálu u dexametazonu (10-100 nM) a MG-132 (0, 1 a 10  $\mu$ M). Rostliny byly analyzovány po 7 a 14 dnech (Obr. 10, 11). U obou linií se po samotné aplikaci MG-132 zkrátil hlavní kořen o 25-30 %. Zvýšení hladiny cytokininu (linie *ipt*, Obr. 10) vedlo k významnému zkrácení kořene a přítomnost inhibitoru to ještě prohlubovala. Obdobné výsledky byly pozorovány i po dvou týdnech kultivace.



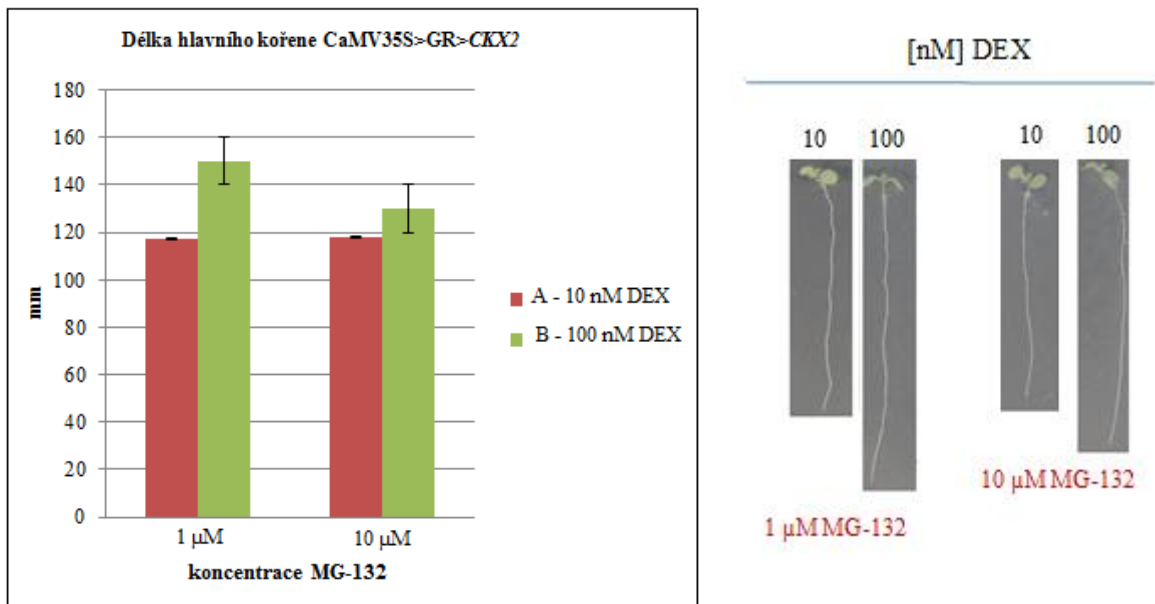


Obr. 10: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 7 denních rostlin linie se zvýšenou hladinou cytokininů. Reprezentativní fotografie klíčnicích rostlin a graf průměrných hodnot spolu se směrodatnou odchylkou.

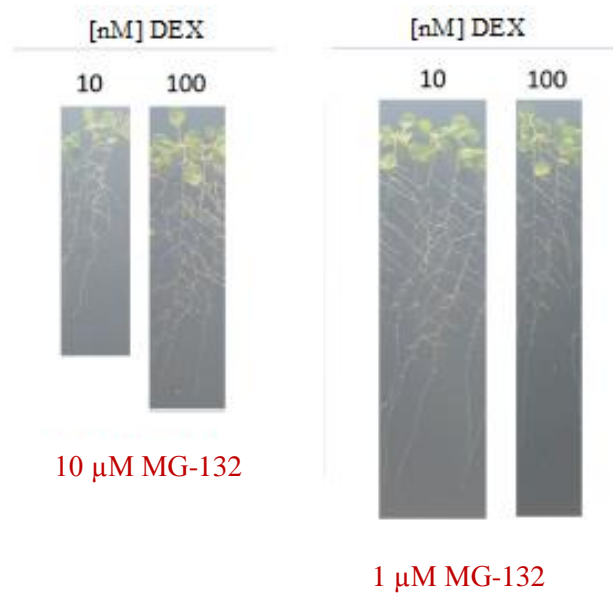


*Obr. 11: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 14denních rostlin linie se zvýšenou hladinou cytokininů. Reprezentativní fotografie 14 dnů starých rostlin.*

Transgenní linie se sníženou hladinou cytokininů (Obr. 12) má delší hlavní kořen. Aplikace nižší koncentrace inhibitoru proteasomu MG-132 se na délce hlavního kořene při aktivaci DEX-inducibilního systému vůbec neprojevila a u zvýšené koncentrace 10  $\mu\text{M}$  MG-132 byl efekt potlačen. I zde bylo hodnocení provedeno po 7 a 14 dnech s podobným výsledkem. Na základě těchto výsledků můžeme předpokládat, že negativní efekt MG-132 na elongaci hlavního kořene je zprostředkován cytokininy a pravděpodobně v ní hraje roli SCF<sup>KMD</sup> a stabilizace pozitivních regulátorů odpovědi ARR-B.



Obr. 12: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 7denních rostlin linie se sníženou hladinou cytokininů. Reprezentativní fotografie klíčnic rostlin a graf průměrných hodnot spolu se směrodatnou odchylkou.

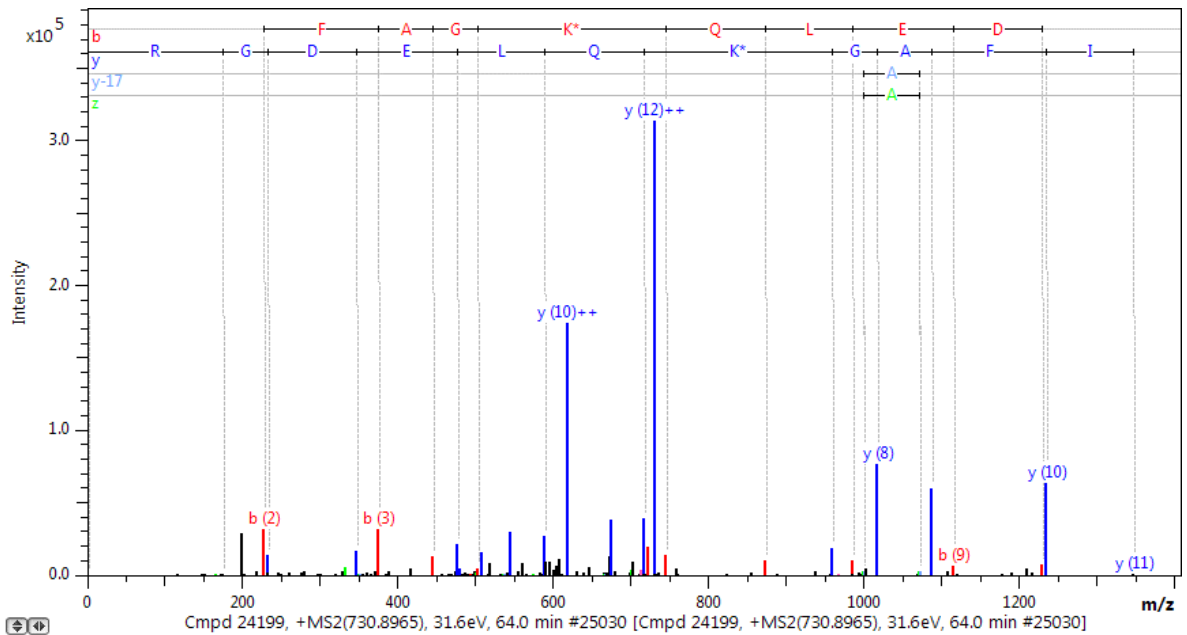


Obr. 13: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 14 denních rostlin linie se sníženou hladinou cytokininů. Reprezentativní fotografie 14 dnů starých rostlin.

### 3.2 Zachycení a identifikace ubiquitinovaných proteinů pomocí TUBE matrice

Proteasom hraje významnou roli v signalizaci a má důležitý význam pro interakci rostliny s patogenem (viz kapitola 1.2.3). Klíčové jsou však samotné proteiny, jejichž množství proteasom reguluje. Posttranslační modifikace ubiquitinem je jedním z nejdůležitějších mechanismů v regulaci stability a funkce proteinů. Samotná charakterizace ubiquitinovaných proteinů není snadná. Nejen že v případě ubiquitinace vedoucí k degradaci modifikovaný protein rychle mizí, ale v buňce je navíc přítomná i řada deubiquitinas, které navázaný řetězec uvolňují. Jako jedno z možných řešení se nabízí nedávno vyvinutá technologie, která využívá pro zachycení ubiquitin-vázací domény. Tyto proteiny jsou přirozenou součástí buňky a jsou využívány k rozpoznání ubiquitinového řetězce. Pro zvýšení efektivity jsou tyto domény řetězeny a tvoří tzv. TUBE (tandem ubiquitin binding entities). Dle dostupných informací TUBE nejen zachytí polyubiquitinovaný protein, ale zároveň chrání modifikaci před aktivitou deubiquitinas. Zde bylo testováno využito TUBE1, která má vyšší afinitu pro řetězce vázané přes lysin v pozici 63 (Parker et al., 2010).

Testovací vzorek byl připraven ze 7 dnů starých klíčnicích rostlin *Arabidopsis thaliana* dle instrukcí dodavatele afinitní matrice TUBE (viz Matriál a metody). Zachycené proteiny jsme štěpili trypsinem a separovali pomocí C18 reverzní chromatografie a analyzovali hmotnostním spektrometrem qTOF maXis Impact (Bruker). Získaná data jsme vyhodnotili v softwaru ProteinScape 3.1 s využitím vyhledávacího algoritmu Mascot (verze 2.4) a následného zpracování dat na základě 1% FDR (false discovery rate). Z tří nezávislých měření jsme identifikovali celkem 136 proteinů. Jako jediný protein s detekovanou přítomností modifikace ubiquitinem a lokalizovanou pozicí byl samotný ubiquitin (Ubiquitin 4, AT5G20620.1; Obr. 14).

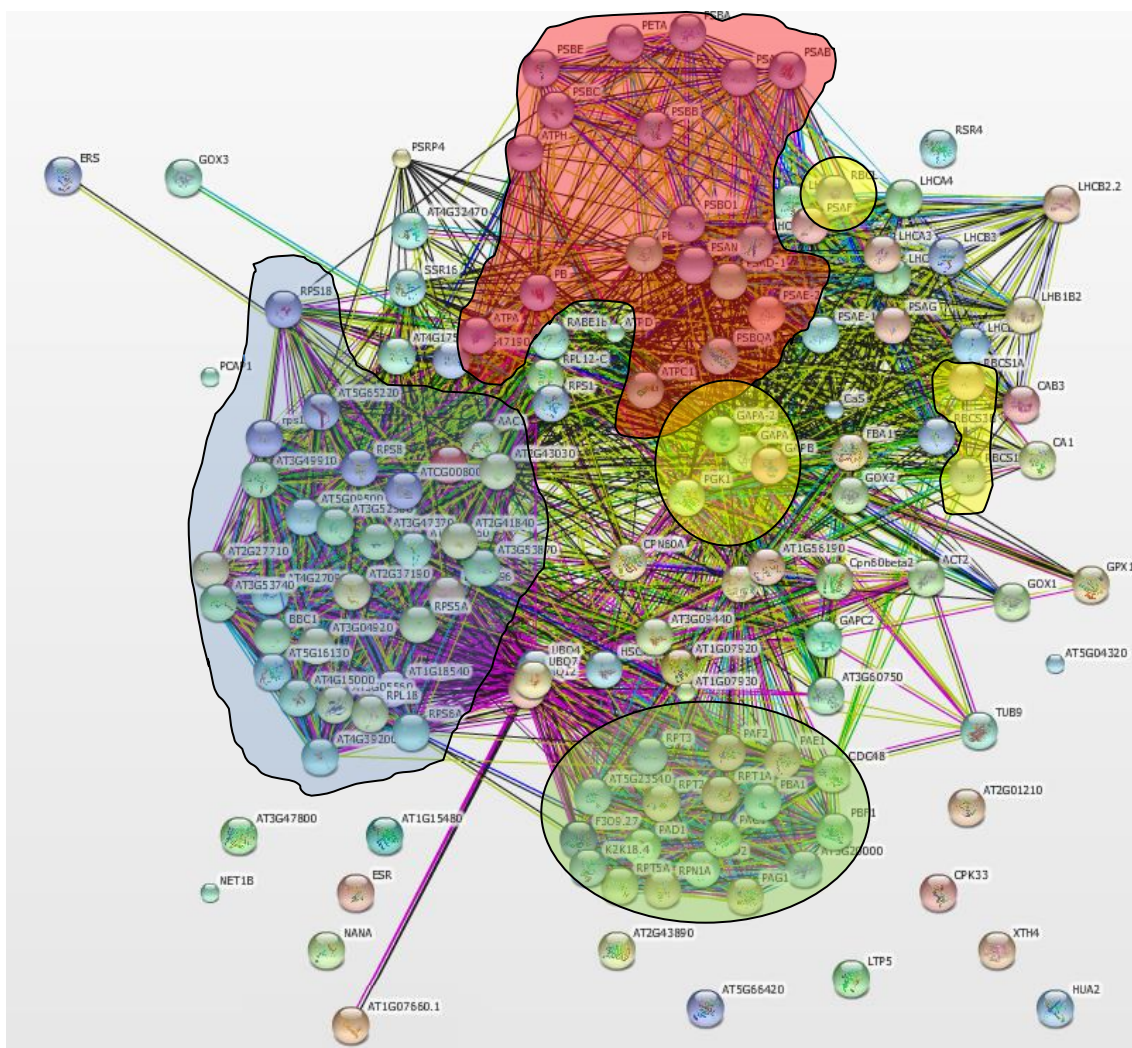


Obr. 14: Repräsentativní spektrum nalezeného peptidu nesoucího ubiquitinaci (LIFAGKQLEDGR)

### 3.2.1 Funkce proteinů zachycených pomocí TUBE1 purifikace

U většiny identifikovaných proteinů nebyla prokázána přítomnost ubiquitinace. I když nemůžeme vyloučit, že některé proteiny jsou k nosiči TUBE nespecificky navázané, samotná absence ubiquitinovaných peptidů v analýze není překvapivá. Pokrytí sekvence většiny identifikovaných proteinů je poměrně nízké (9,5 %), což samo snižuje pravděpodobnost úspěšného zachycení modifikovaného peptidu. Dále vazba ubiquitinu snižuje detekovatelnost peptidů v tryptickém digestu, protože se váže na místě, kde dochází k štěpení trypsinem (K), což může vést k vynechání štěpného místa a tvorbě příliš dlouhého peptidového štěpu. Navíc navázaný zbytek ubiquitinu (většinou diglycin GG, ale může být i LRGG) vede v MS/MS spektru k tvorbě vedlejších iontových sérií, což opět snižuje celkovou intenzitu fragmentů a snižuje šanci na úspěšné detekování. V neposlední řadě je také možné, že samotný identifikovaný protein ubiquitinaci nenesl, ale že byl v rámci protein-proteinové interakce navázan k jinému ubiquitinovanému proteinu. Jelikož je analýza protein-proteinových interakcí *in silico* i velmi jednoduchým nástrojem k základní interpretaci dat, analyzovali jsme všechny identifikované proteiny tímto způsobem pomocí nástroje String (<http://string-db.org/>) (Obr. 15). V rámci této analýzy jsme pak dále vizualizovali významně reprezentované metabolické dráhy (funkce Kegg pathways). Část proteinů

v interakční síti pak bylo možné zařadit do procesů jako je fotosyntéza, metabolismus uhlíku nebo identifikovat jako součásti proteasomu a ribozomu (Obr. 15). Mimo to bylo nalezeno také několik enzymů, které jsou zapojeny do obrany rostlin proti patogenům. Funkce jednotlivých proteinů byly zjištěny z databáze Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) a TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>).



Obr. 15: Mapa protein-proteinových interakcí. Vytvořeno pomocí programu String 9.1 (<http://string-db.org/>). Jednotlivé zvýrazněné kategorie reprezentují významně zastoupené procesy. Červené ohraničení znázorňuje proteiny zapojené do fotosyntézy, žluté znázorňuje proteiny zapojené do uhlíkového metabolismu, modré proteiny, které jsou součástí ribozomů a zelené proteiny, které jsou součástí proteasomu.

### **3.2.1.1 Proteiny fotosyntézy a metabolismu uhlíku**

Celkem 18 z identifikovaných proteinů jsou enzymy a komponenty fotosyntézy, 7 dalších pak proteiny podílející se obecně na metabolismu uhlíku. I když na základě našeho experimentu nemůžeme hledat přímou spojitost s interakcí rostlina-patogen, jsou tyto proteiny nalezené ve frakci obohacené na ubiquitinované proteiny zapojené do procesu, který v patogenezí hraje významnou roli. Již dlouhou dobu jsou známé účinky virové infekce na fotosyntézu a uhlíkový metabolismus. V případě obranné reakce a hypersensitivní odpovědi je to spojeno s cílenou tvorbou radikálů a následným vznikem chloróz. Odlišný efekt je pozorován, pokud je interakce host-patogen kompatibilní. V takovém případě vir zneužije metabolismu hostitele a ovlivní směr metabolitů tak, aby to vyhovovalo jeho potřebám. V rámci studií protein-proteinových interakcí byly v minulosti identifikovány komplexy fotosyntetických proteinů s virovými částicemi, což je důkazem, že virové proteiny mohou sami o sobě regulovat fotosyntézu, ať přímo, nebo jako součást interagujících proteinů (Alexander et al., 2015).

### **3.2.1.2 Vybrané proteiny se známou funkcí v interakci mezi rostlinou a patogenem**

Pomocí funkce GO Biological Processes jsme našli 12 proteinů, které jsou nebo mohou být zapojeny do obrany rostlin proti patogenům. Jedním z nich je elongační faktor Tu zkráceně EF-Tu (Obr. 15), jehož ortology mají schopnost vyvolat vrozenou imunitu a vyvolat rezistenci vůči patogenním bakteriím. Také mohou mít funkci v toleranci rostlin vůči vysokým/nízkým teplotám, zasolení, nedostatku vody a znečištění. EF-TU může nahradit EF-1 $\alpha$  v procesu degradaci N-terminálně blokových proteinů v proteasomu 26S (Kunze et al., 2004)

Dalšími proteiny zapojenými do imunitní odpovědi jsou glykolát oxidasy (GOX3 a GOX1), lokalizované v peroxizomech. Podílejí na lokální obranné reakci prostřednictvím produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rojas et al., 2012). Dalším identifikovaným proteinem je Heat shock 70kDa protein 1, který dle anotací může být součástí mediátorového komplexu, koaktivátoru zapojeného do regulované transkripce všech genů závislých na RNA polymeráze II. Proteiny teplotního šoku fungují nejen jako molekulární chaperony, ale experimenty ukazují, že jsou zapojeny i do signálních drah (Timperio et al., 2008).

Zbýlých nalezených 8 proteinů je podle funkce GO Biological Processes zapojeno do obrany rostlin proti virům, bakteriím, houbám a jiným patogenům, ale dosud není

známý mechanismus jejich zapojení do obrany rostlin. Mezi nalezené proteiny patří proteiny zapojené do fotosyntézy a to PS II kyslík vyvíjející komplex 1, fotosyntetický ET (electron transfer) protein C a RuBisCo aktiváza. Byl také identifikován protein glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, který je klíčovým enzymem metabolismu sacharidů zajišťující přeměnu glyceraldehyd-3-fosfátu na kyselinu 1,3-bisfosfoglycerovou. Dále byly nalezeny dva proteiny 20S proteasomová podjednotka beta-6 a 26S proteasomová regulační podjednotka N1, které jsou součástí proteasomu. Identifikován byl i protein karboxyl anhydridáza (CAS), která patří do skupiny enzymů, které katalyzují konverzi oxidu uhličitého a vody na hydrogenuhličitan a protony a podílí se tak na celé řadě fyziologických a patologických procesů (Badger et al., 1994). Poslední z této kategorie je ribozomální protein L12, který ve spojení s rRNA tvoří ribozomální podjednotku (Rodnina et al., 2011).

### **3.3 Sledování dynamiky cytoskeletu v reakci na cytokinin a po ošetření inhibitorem proteasomu**

Mikrotubuly ovlivňují morfogenezi tím, že tvoří různé geometrické struktury v buňce, které následně ovlivní tvar a další vývoj buňky. Pro vizualizaci těchto struktur byla v minulosti připravena řada transgenních organizmů nesoucí fúzní gen tubulinu s fluorescenčním proteinem. V této práci byly použity konstrukty se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Zelený fluorescenční protein (GFP) medúzy *Aequorea victoria*. Tento protein se skládá z 238 aminokyselin s molekulovou hmotností přibližně 27 kDa a při excitaci paprskem světla o vlnové délce 488 nm emituje signál s absorpčním maximem při 508 nm (Haseloff et al., 1995).

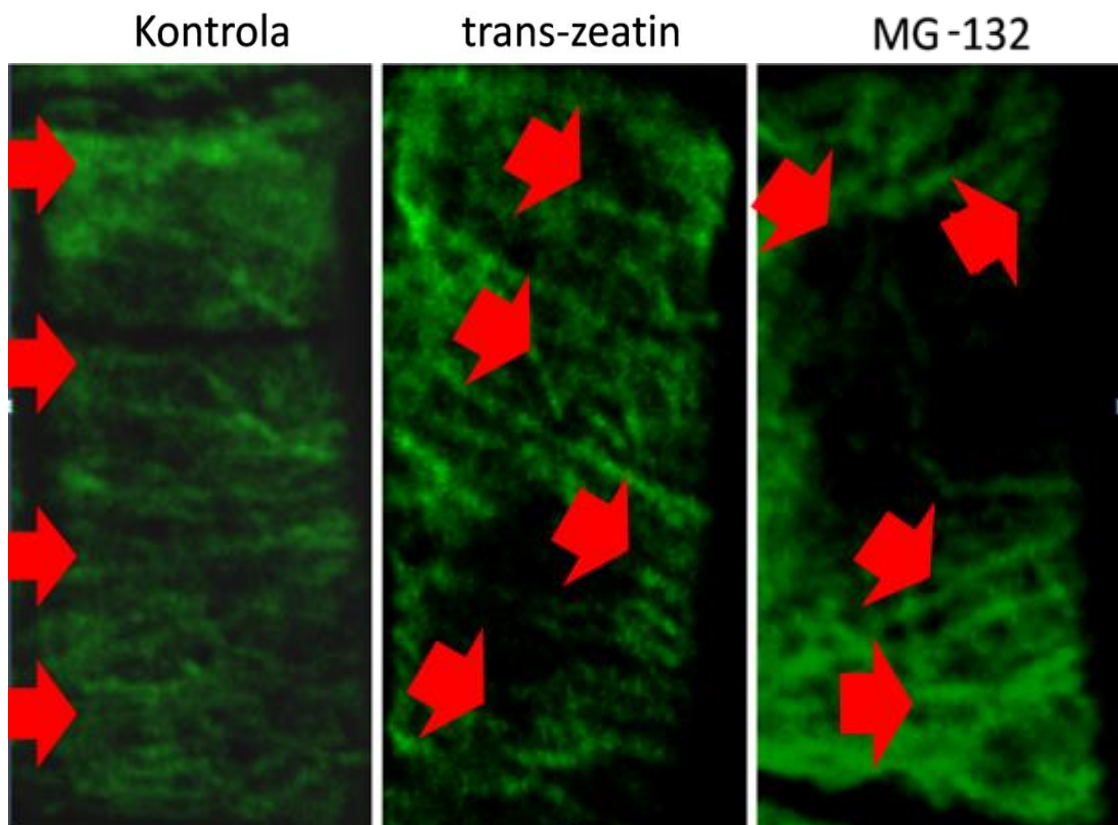
Pro sledování vlivu inhibice proteasomu a *trans*-zeatinu na dynamiku cytoskeletu jsme se rozhodli použít tři transgenní linie v modelovém organismu *Arabidopsis thaliana* v pozadí ekotypu Col-0. Pro sledování GFP signálu jsme provedli výsev rostlin in vitro společně s kontrolou fluorescence GFP u tubulin značených linií 35S::MA4-GFP, 35S::TUA5-GFP, 35S::TUA6-GFP pro vizualizaci mikrotubulů.

#### **3.3.2 Sledování vlivu inhibice proteasomu na dynamiku cytoskeletu**

7denní klíčnicí rostliny GFP-TUA6 jsme nechali po dobu 30 minut inkubovat buď s 20  $\mu$ M roztokem cytokininu, nebo 50  $\mu$ M MG132 (viz Materiál a metody). Rostlinky jsme poté zafixovali a sledovali signál TUA6 v kořeni pomocí konfokální



mikroskopie společně s kontrolním vzorkem (přídavek DMSO) (Obr. 16). Morfologie rostliny je do značné míry závislá na tvaru jednotlivých buněk a ten zase přímo souvisí s uspořádáním cytoskeletu. Cytokininová signalizace způsobuje změny v kořenové architektuře, moduluje růst a vývoj kořene. Při porovnání s kontrolním vzorkem je jasně patrné, že aplikace *trans*-zeatinu vedla k změně orientace kortikálních mikrotubulů šikmo ke směru osy růstu v epidermálních buňkách kořene (Obr. 14). To může být součástí procesu, který vede k zpomalení růstu kořene vlivem zvýšené hladiny *trans*-zeatinu nebo obecně cytokininů (viz experimenty popsané v 3.1). V případě inhibice 26S proteasomu inhibitoru proteasomu MG-132 je známo, že způsobuje dezorganizaci mikrotubulů (Sheng et al., 2006), což se potvrdilo i v našem experimentu (Obr. 16).



Obr. 16: Analýza změn struktury mikrotubulů pomocí konfokální mikroskopie. Snímky kořene *GFP-TUA6* linie vystaveného účinku cytokininů ( $20\mu\text{M}$  *trans*-zeatin) a inhibitoru proteasomu ( $50\mu\text{M}$  MG-132). Směr pozorované změny v orientaci mikrotubulů je zvýrazněna šipkou.

## 4. ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na zkoumání ubiquitin-proteasomového systému jako nedílné součásti imunitního systému rostlin i jako prostředku k úspěšné virulenci rostliny patogenem. UPS je důležitý pro celou řadu signálních drah fytohormonů a lze očekávat, že inhibice tohoto systému bude pro rostlinu velice stresující. Proteasomem zprostředkovaná degradace má mimo jiné i úlohu v cytokininové signalizaci. Růst kořenů je zpomalený v reakci na inhibitor proteasomu MG-132 a z našich výsledků vyplývá, že tento proces závisí na přítomnosti cytokininu. Aby bylo možné lépe odhalit roli UPS, je třeba znát substráty, které jsou ubiquitinovány. Proto byla v rámci této práce testována metoda izolace ubiquitinovaných proteinů pomocí TUBE matrice. Celkově bylo identifikováno 136 proteinů, ale u většiny nebylo možné potvrdit přítomnost ubiquitinace přímo z MS/MS spekter. Přesto následná analýza možných funkcí těchto proteinů napovídá, že jsou s UPS úzce provázány. Metoda TUBE bude vyžadovat další optimalizace, aby byla plně využitelná s rostlinným materiálem. Jako finální experiment této práce byl porovnán účinek cytokininu a inhibitoru proteasomu na uspořádání mikrotubulů. I když obě látky vedou k narušení struktury, analýza neukázala žádnou přímou souvislost.

## 5. POUŽITÁ LITERATURA

1. Argueso, C. T., Ferreira, F. J., & Kieber, J. J., 2009: Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, cell & environment*, 32(9): 1147-1160.
2. Badger, M. R., & Price, G. D., 1994: The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 45(1): 369-392.
3. Baugh, J. M., Viktorova, E. G., & Pilipenko, E. V., 2009: Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *Journal of molecular biology*, 386(3):814-827.
4. Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., & Roelofs, J., 2010: Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends in cell biology*, 20(7): 391-401.
5. Bent, A. F., & Mackey, D., 2007: Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45:399-436.
6. Buchanan, B. B., Gruissem, W., Vickers, K., & Jones, R. L., 2015: *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons, 1264s.
7. Černý, M., Novák, J., Habánová, H., Černá, H., & Brzobohatý, B., 2016: Role of the proteome in phytohormonal signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. V tisku, doi:10.1016/j.bbapap.2015.12.008.
8. Dielen, A. S., Badaoui, S., Candresse, T., & GERMAN-RETANA, S. Y. L. V. I. E., 2010: The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: A never-ending hide-and-seek game. *Molecular plant pathology*, 11(2): 293-308.
9. Dixon, R. A., & Lamb, C. J., 1990: Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual review of plant biology*, 41(1): 339-367.
10. El-Showk, S., Ruonala, R., & Helariutta, Y., 2013: Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*, 140(7):1373-1383.
11. Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P., 2011: Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2431-2452.

12. Friedecký, D., Lemr, K., 2012: Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Chemické Listy*, roč. 20, s. 152–157
13. Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M., & Dicke, M., 2013: Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional ecology*, 27(3): 599-609.
14. Hammond-Kosack, K., & Jones, J. D., 2000: Responses to plant pathogens. *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1102-1156.
15. Hardham, A. R., 2013: Microtubules and biotic interactions. *The Plant Journal*, 75(2), 278-289.
16. Haseloff, J., & Amos, B., 1995: GFP in plants. *Trends in genetics*, 11(8): 328-329.
17. Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C. M., & Hwang, I., 2011: Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends?. *Trends in plant science*, 16(7): 388-394.
18. Jameson, P. E., Zhang, H., Lewis, D. H., 2000: Cytokinins. Extraction, separation, and analysis. *Methods. Mol. Biol.*, 141:101-121
19. Jones, J. D., & Dangl, J. L., 2006: The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
20. Jones, J. D., & Dangl, J. L., 2006: The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323-329.
21. Komander, D., 2009: The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 37(5): 937-953.
22. Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G., 2004: The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16(12): 3496-3507.
23. Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Kyojuka, J., 2007: Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128): 652-655.
24. Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Xie, Q., 2009: RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *The Plant Journal*, 57(5): 905-917.
25. Lamb, C., & Dixon, R. A., 1997: The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology*, 48(1): 251-275.

26. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA., Krieger M., Scott MP., Zipursky SL., Darnell J., 2004: "3". Molecular cell biology. New York: W.H. Freeman and CO, 5 vyd., 66–72 s.
27. Ma, K. W., & Ma, W., 2016: Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant molecular biology*, 1-13.
28. Parker CE, Mocanu V, Mocanu M, et al. Mass Spectrometry for Post-Translational Modifications. In: Alzate O, editor. *Neuroproteomics*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 6.
29. Pickart, C. M., & Eddins, M. J., 2004: Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1695(1): 55-72.
30. Rivero, R. M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., & Blumwald, E., 2007: Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49): 19631-19636.
31. Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D., 2007: Pathological hormone imbalances. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 372-379.
32. Rodnina, M. V., & Wintermeyer, W., 2011: The ribosome as a molecular machine: the mechanism of tRNA–mRNA movement in translocation. *Biochemical Society Transactions*, 39(2):658-662.
33. Rojas, C. M., & Mysore, K. S., 2012: Glycolate oxidase is an alternative source for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during plant defense responses and functions independently from NADPH oxidase. *Plant signaling & behavior*, 7(7): 752-755.
34. Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., & Martin, G. B., 2007: A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448(7151): 370-374.
35. Sakakibara, H., 2006: Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 431-449.
36. Sheng, X., Hu, Z., Lü, H., Wang, X., Baluška, F., Šamaj, J., & Lin, J., 2006: Roles of the ubiquitin/proteasome pathway in pollen tube growth with emphasis on MG132-induced alterations in ultrastructure, cytoskeleton, and cell wall components. *Plant physiology*, 141(4): 1578-1590.

37. Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., & Manns, I. B., 2003: Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of plant research*, 116(3): 241-252.
38. Stejskal, K., 2010: Příprava proteinových vzorků z rostlinného materiálu pro LC-MS analýzu, Brno, Diplomová práce, Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká, Ústav biochemie, Vedoucí práce doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.
39. Sun, W., Dunning, F. M., Pfund, C., Weingarten, R., & Bent, A. F., 2006: Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *The Plant Cell*, 18(3): 764-779.
40. Timperio, A. M., Egidi, M. G., & Zolla, L., 2008: Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of proteomics*, 71(4): 391-411.
41. Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., & Katagiri, F., 2009: Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet*, 5(12): e1000772.
42. Vierstra, R. D., 2009: The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6): 385-397.
43. Walters, D. R., McRoberts, N., & Fitt, B. D., 2008: Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Reviews*, 83(1): 79-102.
44. Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., & Yates III, J. R., 2013: Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*, 113(4), 2343-2394.
45. Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Conaway, R. C., 2002: Structure of the Cul1–Rbx1–Skp1–F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416(6882): 703-709.

## 6. ZKRATKY

ATP - Adenosintrifosfát

Aux/IAA – transkripční represor

CKX - cytokinin oxidáza/dehydrogenáza

DELLA – negativní regulátor giberelinů

EIN3, EIL1 – transkripční faktory genů

ESI - ionizace za pomoci elektrospreje (electrospray ionization)

ETI - efekty vyvolaná imunita

FDR - False discovery rate

IPT - isopentenyltransferáza

JAZ – transkripční represor

LC-MS - hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií

LRR - leucine-rich repeat

MALDI - laserová desorpce/ionizace za účasti matrice

MG-132 – inhibitor proteasomu

mRNA - mediátorová RNA (Messenger RNA)

MS - hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)

MS/MS - tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem mass spectrometry)

NB - nukleotid vázající doména

PAMP - pathogen-associated molecular patterns

PTI - PAMP-triggered immunity

qTOF - tandemový hmotnostní spektrometr sdružující dvojici kvadrupólů a průletový hmotnostní analyzátor

SCF - Skp1-Cullin-F-box

tRNA - transkripční RNA

TUBE - tandem ubiquitin binding entities

Ub - ubiquitin

UPS - ubiquitin-proteasomový systém

## 7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Změna organizace mikrotubulů v reakci na symbiotické a patogenní organizmy.

Obr. 2: Základní struktura 26S proteasomu.

Obr. 3: Proces degradace proteinu ubiquitin-proteasomovou cestou.

Obr. 4: Signální dráhy fytohormonů propojovány SCF komplexem.

Obr. 5: Schéma znázorňující propojení signalizačních drah fytohormonů v obraně proti patogenům.

Obr. 6: Ubiquitin-proteasomový systém jako ústředním prvkem v obraně rostlin a mechanismu virulence.

Obr. 7: Schéma přenosu cytokininového signálu.

Obr. 8: Úloha cytokininů při interakci mezi rostlinou a patogenem.

Obr. 9: Schéma základních komponentů hmotnostního spektrometru.

Obr. 10: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 7denních rostlin linie se zvýšenou hladinou cytokininů.

Obr. 11: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 14denních rostlin linie se zvýšenou hladinou cytokininů.

Obr. 12: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 7denních rostlin linie se sníženou hladinou cytokininů.

Obr. 13: Vliv inhibice proteasomu na elongaci kořene 14denních rostlin linie se sníženou hladinou cytokininů.

Obr. 14: Reprezentativní spektrum nalezeného peptidu nesoucího ubiquitinaci (LIFAGKQLEDGR).

Obr. 15: Mapa protein-proteinových interakcí.

Obr. 16: Analýza změn struktury mikrotubulů pomocí konfokální mikroskopie.



## 8. PŘÍLOHY

### Posterové sdělení

Luklová M, Dobešová M, Dufek M, Zelená P, Černý M, Brzobohatý B. (2015): **Effects of proteasome inhibition on plant growth and response to hormonal stimuli.** In Černý M., Novák J., Balla J., Skalák J., Klimeš P., Procházka S., Brzobohatý B: *The 44th Conference of the European Society for New Methods in Agriculture Research, 1.-5.9. 2015.* Brno, Mendelova univerzita v Brně. s. 25. ISBN 978-80-7509-318-9.

# Effects of proteasome inhibition on plant growth and response to hormonal stimuli



Luklová Markéta, Dobešová Markéta, Dufek Martin, Pavla Zelená, Černý Martin and Brzobohatý Břetislav



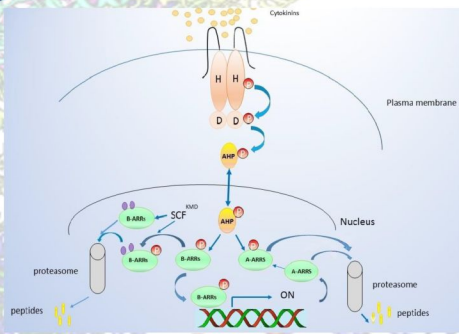
Laboratory of Plant Molecular Biology, Institute of Biophysics AS CR, v.v.i and CEITEC Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

## Abstract

The protein homeostasis in cell is maintained by transcriptional and translational control but also through the level of targeted protein degradation. The most frequent way of protein degradation in eukaryotic cell requires Ubiquitin-26S-proteasome system, UPS. More than 6 % of the *Arabidopsis* genome encodes components of the ubiquitin conjugation system and, in effect, most plant regulatory circuitry, and many steps of process execution, depend on ubiquitin modification. For example, in plant hormone signal transduction, proteasome has the key role for auxin, gibberellin, jasmonic acid or ethylene signaling. Here we employed a potent proteasome inhibitor and a transgenic *Arabidopsis* line expressing modified ubiquitin to disrupt UPS. We follow its effects on plant physiology and analyze proteome-wide responses via LC-MS proteome profiling.

## Proteasome

The proteasome (26S) is an essential component of the ATP-dependent proteolytic pathway in eukaryotic cell. It is located in the nucleus and the cytoplasm. The proteasome consists of two major sub complexes: 670 kDa proteolytic core particle and the 900 kDa regulatory particle. The 26S complex degrades proteins, that are first flagged by the ubiquitin conjugation system, which ultimately results in the attachment of a polyubiquitin chain on the target protein. The proteasome's 19S regulatory cap binds the polyubiquitin chain, denatures the protein, and feeds the protein into the proteasome's proteolytic core where the degradation of the protein occurs.



**Figure 1: Cytokinin signaling pathway.** Cytokinins signals are perceived by *Arabidopsis* histidine kinase receptors- AHK2, AHK3, and AHK4, which upon perception of the cytokinin signal autophosphorylate on a conserved His residue. The regulatory phosphoryl group is passed from receptor to a histidine-containing phosphotransfer protein (AHP), and from there to a type-B *Arabidopsis* response regulators (ARRs), which modulates gene expression, or to type A-ARRs, which act as negative regulators of the signal transduction pathway. The ubiquitin-proteasome system plays an important role in the regulation of cytokinins signaling. The family of F-box proteins, designated the KISS ME DEADLY (KMD), targets B-ARRs. It is expected that the A-ARRs are also subjects of UPS.

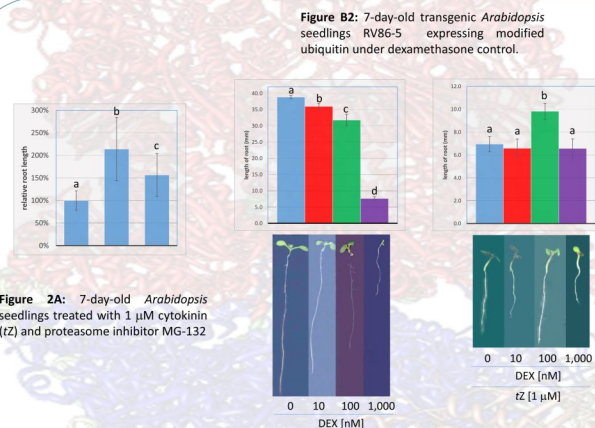
## Cytokinins

Cytokinins are plant hormones that are derivatives of the purine adenine. Cytokinins influence numerous growth and development processes in plants such as cell division, regulation of root and shoot growth and branching, chloroplast development, leaf senescence, stress response and pathogen resistance. The character of cytokinin action depends on its concentration. For example at physiological concentrations, cytokinin activates shoot apical meristem and it's growth but suppress root meristem and root growth. Cytokinin signaling is mediated by a multistep two-component circuitry through histidine (H) and aspartate (D) phosphorelay.

## Material and methods

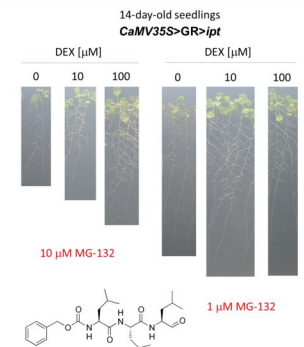
Seeds of transgenic *Arabidopsis thaliana* lines V86-5 and *CaMV35S>GR>ipt* lines, and the corresponding wild-type were surface-sterilized and sown on 1% (w/v) agar containing full Murashige and Skoog medium (pH 5.7) supplemented with dexamethasone (DEX), cytokinin *trans*-zeatin, MG-132 or mock. Seeds were stratified at 4 °C for 3d, and cultivated at 21 °C/19 °C day/night temperatures, with a 16 h photoperiod (90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> light intensity) for up to 14 days. Seedlings were monitored and then harvested, dried, then frozen and ground in liquid nitrogen.

## Results



**Figure 2A:** 7-day-old *Arabidopsis* seedlings treated with 1 μM cytokinin (tZ) and proteasome inhibitor MG-132

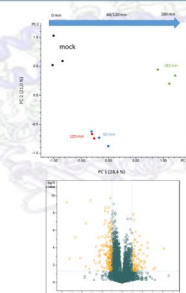
**Figure 2B:** 7-day-old transgenic *Arabidopsis* seedlings RV86-5 expressing modified ubiquitin under dexamethasone control.



**Figure 2C:** 14-day-old transgenic *Arabidopsis* plantlets expressing cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase gene under dexamethasone control treated with synthetic proteasome inhibitor MG-132.

## LC- MS analysis

The effects of proteasome inhibition were investigated via LC-MS profiling. 7-day-old *Arabidopsis* seedlings were incubated with 50 μM MG-132 for 60, 120 and 180 min. Quantitative proteomic analyses were performed using a gel-free shotgun protocol based on nano-HPLC and MS/MS. Briefly, approximately 200 mg of homogenized *Arabidopsis* seedlings were extracted by acetone/TCA and phenol extraction then digested in solution with immobilized trypsin beads. The resulting peptides were desalted, dried and dissolved in 0.5% (v/v) formic acid in 5% (v/v) acetonitrile, then analyzed by nano-flow C18 reverse-phase liquid chromatography and a Dionex Ultimate 3000 RSLC nano UPLC system directly coupled to a CaptiveSpray nanoESI source and an UHR maXis impact q-TOF mass spectrometer.



**Figure 3:** Proteome dynamics in response to proteasome inhibition. PCA analysis illustrates the inhibition progress. A pair-wise comparison showed 485 differentially abundant proteins after 120 min of MG-132 treatment.

## Conclusion

Proteasome-mediated degradation has a role in the cytokinin transduction pathway - it modulates cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. Root growth is retarded in response to a cytokinin treatment and similar effects are also observed in seedlings with a disrupted proteasome pathway which (in theory) should contain a higher level of cytokinin signaling. Here, we show that the balance between the level of proteasome inhibition and the cytokinin pool size is an important factor in this growth response. The combination of cytokinin and proteasome treatment does not potentiate the growth response, but within the nanomolar range it even alleviates the proteasome-mediated growth inhibition.