



**Narušení metabolismu proteinů a jeho efekt na signalizaci  
cytokininů**  
Diplomová práce

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

*Vypracoval:*  
Bc. Martin Dufek

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Narušení metabolismu proteinů a jeho efekt na signalizaci cytokininů vypracoval/a 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 vědom/a, 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

## **1 PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval Mgr. Martinu Černému, Ph.D. za vedení diplomové práce a také za jeho podporu, trpělivost, rady, inspiraci a diskuze při vypracování této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Janu Skalákovi za konzultace k diplomové práci.

## ABSTRAKT

Cytokininy jsou  $N^6$  substituované deriváty adeninu, které ovlivňují mnoho aspektů rostlinného růstu a vývoje. Dvoukomponentní signalizační dráha zahrnující receptor v podobě hybridní kinázy, histidinové fosfotransférové proteiny a dvě sady regulátorů odpovědi je klíčovou částí cytokininové signalizace. Nicméně nejnovější poznatky indikují podstatnou roli proteazom-ubikvitinového systému (UPS) v cytokininové odpovědi. V mé práci nazvané „Narušení metabolismu proteinů a jeho efekt na signalizaci cytokininů“ popisují hlavní mechanismy proteinové degradace a současný model metabolismu a signalizace cytokinů. V experimentální části jsem pozoroval vliv UPS-cytokininové interakce na rostlinu *Arabidopsis thaliana*. Pozoroval jsem efekt na růstovou odezvu a analyzoval pomocí LC-MS účinek inhibice proteazomu na proteom a brzkou odpověď na cytokinin. Moje výsledky a analýza dat z předchozích proteomických studií odhalují zajímavou rovnováhu mezi koncentrací cytokininu a efektem inhibice proteazomu a také velký vliv proteazomové inhibice na proteiny v odpovědi na cytokininy.

**Klíčová slova:** proteazom, ubikvitin, odpověď růstu, proteinová degradace, LC-MS, proteom

## ABSTRACT

Cytokinins are  $N^6$  substituted adenine derivatives that affect many aspects of plant growth and development. A multistep phosphorelay system, including hybrid sensor kinases, histidine-containing phosphotransfer proteins and two sets of response regulators, is the key part of cytokinin signaling. However, a recent evidence indicates a crucial role for the proteasome-ubiquitin system (UPS) in the cytokinin response. Here, in this thesis entitled 'Protein metabolism disruption and its effect on cytokinin signaling' the major protein degradation mechanisms are outlined and the present-day model of cytokinin metabolism and signaling is discussed. In the experimental part, the UPS-cytokinin interaction is probed in a growth response experiment, an LC-MS proteome analysis and by the datamining of previously published proteomics data. The results indicate an interesting dosage-dependent balance between cytokinin- and proteasome-mediated signaling, and a huge impact of proteasome inhibition on cytokinin response proteins.

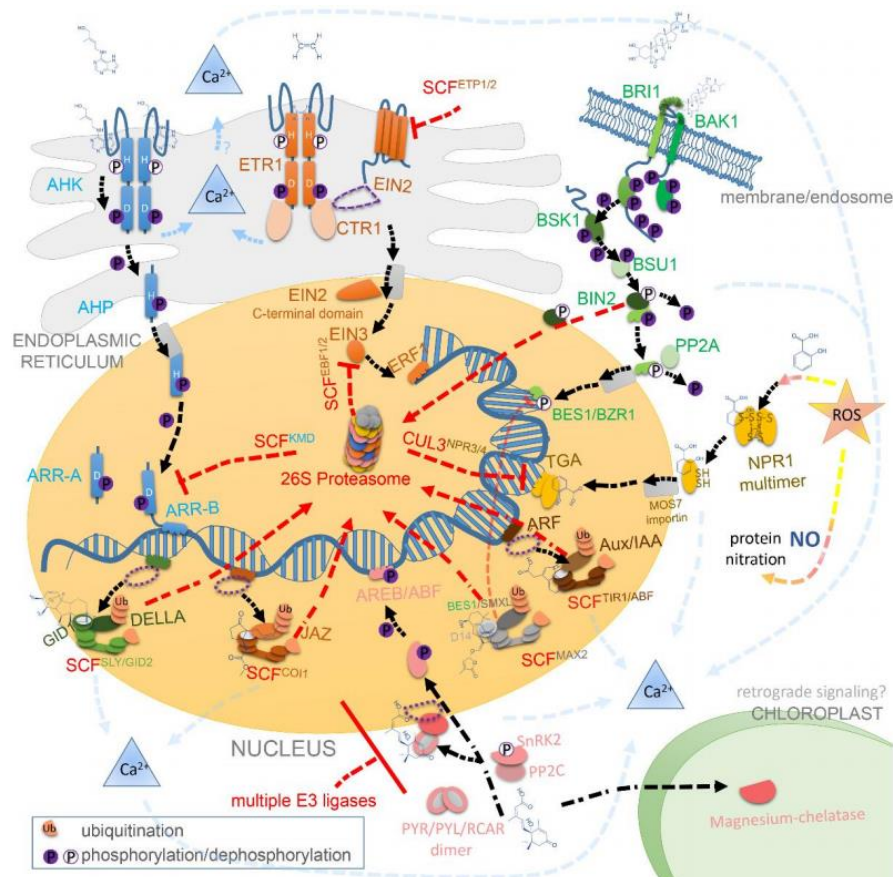
**Key words:** proteasome, ubiquitin, growth response, protein degradation, LC-MS, proteome

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>6</b>
1.1	Hlavní degradační dráhy	7
1.2	Ubikvitin-proteazomový systém	8
1.3	Autofagie	9
1.4	Porovnání UPS a autofagie	11
1.5	Pravidlo N-konce	11
1.5.1	Destabilizace N-konce a dráha pravidla Arg/N-konce	11
1.5.2	Nt acetylace a Nt-Met jako signál v dráze pravidla N-konce	13
1.6	Cytokininy	14
1.6.1	Metabolismus	14
1.6.2	Signální cesta cytokininů	16
1.6.3	Regulace signální cesty cytokininů pomocí SCF <sup>KMD</sup>	17
1.7	Proteomika	18
<b>2</b>	<b>MATERIÁL, METODIKA</b>	<b>20</b>
2.1	Kultivace	20
2.2	Extrakce proteinů	21
2.3	LC-MS analýza	23
2.4	Vyhodnocení dat	24
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKZE</b>	<b>25</b>
3.1	Role proteazomu v dlouhivém růstu hlavního kořene <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3.1.1	Vliv inhibice proteazomu na fyziologii kořínků	26
3.1.2	Vliv cytokininů a MG-132 na fyziologii kořínků	27
3.1.3	Transgenní linie s modulovanou hladinou cytokininů	28
3.1.4	Transgenní linie s inducibilním systémem pro expresi mutovaného ubikvitinu	29
3.2	Role proteomu a cílené degradace v signalizaci cytokininů	30
3.2.1	Analýza předchozích proteomických studií	30
3.3	Příprava proteinového vzorku a jeho následná analýza pomocí LC-MS	32
3.4	Překryv regulovaných proteinů	35
3.5	Přehled významných změn v proteomu <i>Arabidopsis</i> v reakci na exogenní aplikaci cytokininu a inhibici proteazomu	36
3.6	Lokalizace regulovaných proteinů	39
3.7	Analýza možné funkce nalezených proteinů	40
3.8	Nalezené hlavní regulované proteiny v překryvu obou kategorií (odpověď na cytokininu a regulace proteinů proteazomem)	42
3.8.1	Identifikované proteiny ovlivňující fenotyp	42
3.8.2	Ribozomální proteiny	42
3.8.3	Primární metabolismus	42
3.8.4	Proteazom	43
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM TABULEK</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	<b>54</b>

# 1 ÚVOD

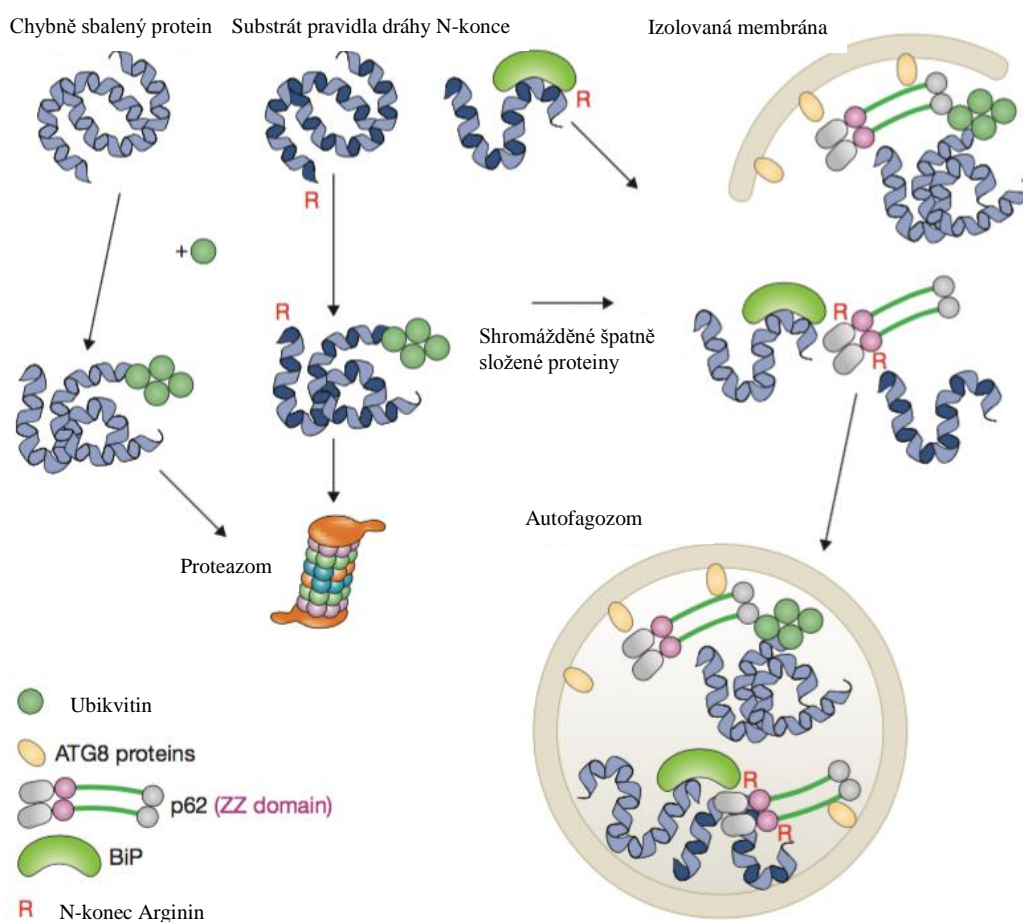
Proteiny mají mnoho různých funkcí v rostlinách, některé z nich hrají klíčovou roli v regulaci genové exprese. Mezi takové proteiny patří transkripční faktory, které se váží na DNA. V závislosti na jejich povaze mohou působit jako aktivátory, nebo represory DNA (Lee, Young, 2000). Důležitou funkci v degradaci transkripčních faktorů a tím i ovlivnění genové exprese má proteazom, který je významným hráčem ve všech signálních drahách fytohormonů (Obr.1), z nichž jsou nejvíce prozkoumány dráhy auxinů (AUX), kyselina abscisová (ABA), giberelinů (GA) a kyseliny jasmonové (JA) (Dharmasiri, Estelle, 2002). Předkládaná diplomová práce rozšiřuje a dokončuje studii účinku inhibice proteazomu, kterou jsem započal v bakalářské práci. Prvním z cílů bylo vypracování aktuální literární rešerše shrnující nejnovější poznatky v oblasti výzkumu hormonální signalizace se zaměřením na cílenou degradaci proteinů v těchto drahách. V experimentální části byl sledován účinek inhibice proteazomu a jeho efekt na signalizaci cytokininů. Hlavním cílem této práce bylo sledování změn v proteomu pomocí metody LC-MS profilování na modelové rostlině huseníček rolní s exogeně aplikovaným cytokininem a blokovanou proteazomovou dráhou.



Obr. 1.: Zjednodušený přehled fytohormonálních drah (Černý et al., 2015).

## 1.1 Hlavní degradační dráhy

Degradace proteinů v eukaryotických buňkách je zprostředkována dvěma systémy (Obr. 2). Prvním je ubikvitin-proteazomový systém (UPS), který využívá k rozpoznávání specifických substrátů ligázy. Ubikvitinací dochází k jejich modifikaci, rozpoznání a degradaci proteazomem. Druhým hlavním systémem degradace proteinů je autofagie, která pomocí dvojité membrány oddělí od cytosolu protoplast určený k degradaci. Části buňky určené k degradaci a následně fúzující s lysozomem se říká autofagozom (Clague et al., 2015).



Obr. 2.: Ubikvitin-proteazomový systém a autofagie. Obě dráhy mají společný znak, kterým rozpoznávají substráty určené k degradaci, a to přes ubikvitinový řetězec, jenž je složen z jednotlivých ubikvitinů (degronů) (Gibbs et al., 2014). V prvním případě jsou na substrát připojeny ubikvitiny pomocí ligáz, degron je následně rozpoznán proteazomem a substrát je degradován. V druhém případě je větší množství akumulovaných ubikvitinovaných proteinů zachyceno receptorem p62 a obklopeno membránou (Martens, Bachmair, 2015).

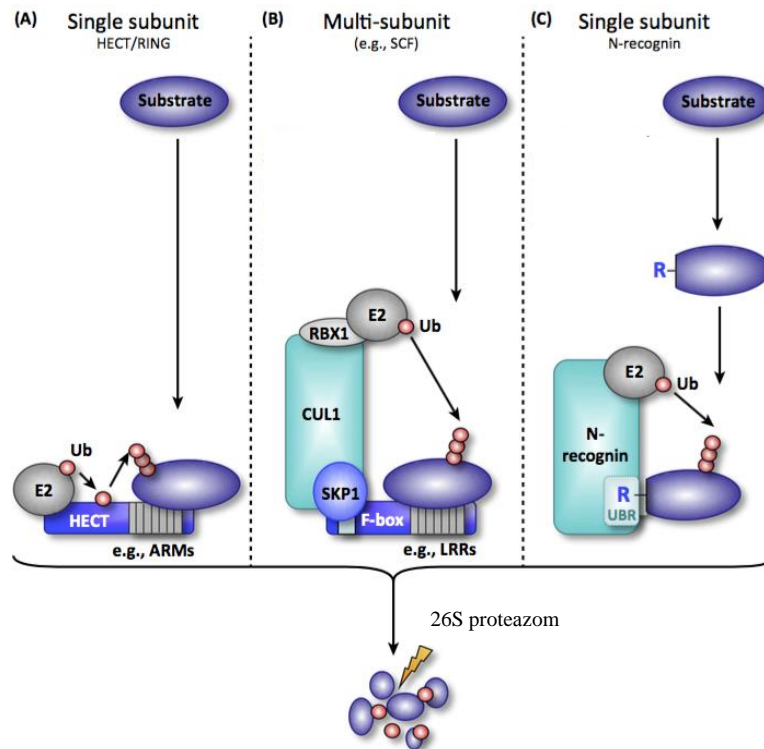
## 1.2 Ubikvitin-proteazomový systém

UPS je závislý na enzymatické kaskádě složené ze tří enzymů, E1 (aktivační) aktivuje ubikvitin, E2 (konjugační) spojuje ubikvitin k substrátu a E3 (ligační) enzym ligáza, umožňuje předání ubikvitinu z E2 na substrát.

První krok připojení ubikvitinu k dalším proteinům je závislý na ATP. Poslední zbytek aminokyseliny glycinu je v ubikvitinu připojen pomocí thioesterové vazby k zbytku cysteinu v enzymu E1. Dále dochází k přenosu aktivovaného ubikvitinu na E2 přes thioesterovou vazbu mezi glycinovým zbytkem ubikvitinu a cysteinovým zbytkem E2. Konečnou fází je vytvoření isopeptidové vazby mezi ubikvitinem a proteinem určeným k degradaci, toto navázání zprostředkovává E3 (Komander, Rape, 2012).

E3 ligázy mohou být kategorizovány na jednoduché a složité podskupiny (Obr. 3). Tyto podskupiny zprostředkovávají nejrůznější vývojové a fyziologické procesy (Gibbs et al., 2014). Zajímavostí je, že rostlinný genom kóduje mnohem větší množství E3 než ostatní říše, například lidský genom obsahuje přibližně 600 genů E3, oproti tomu modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* obsahuje přes 1000 těchto genů. Kromě single a multi podjednotky E3, které interagují se substrátem přes protein-proteinové interakce existuje další single podjednotka E3 ligázy a to N-recognin (N-rozpoznávací místo pro ubikvitin) (Obr. 3). Na rozdíl od dvou výše zmíněných, spočívá v destabilizaci Nt (N-konec), čímž je substrát vystaven enzymatickým a chemickým procesům (Varshavsky, 2011).





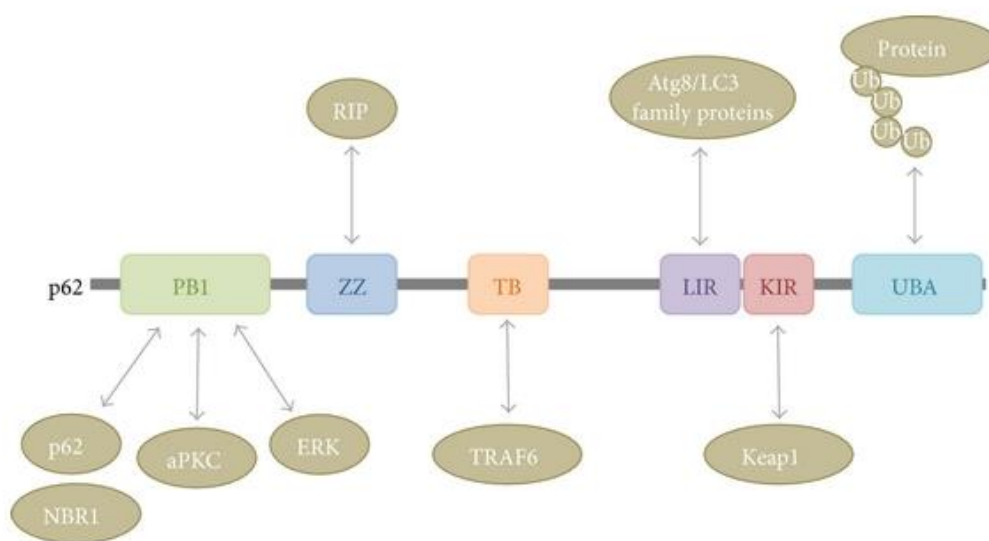
Obr. 3.: Znázornění tří typů enzymů E3. A) Single podjednotka RING a HECT E3 ligázy přímo interaguje s E2 enzymem, který přímo ubikvitinuje substrát. B) Multipodjednotka E3 ligázy vyžaduje k zprostředkování ubikvitinace několik proteinů. Například pro SCF E3 ligázu je zapotřebí F-BOX protein, který je vázán ke CUL1 pomocí adaptoru SKP1. CUL1 je spojen s RING proteinem RBX1, který na sebe váže E2. F-Box protein umožňuje vazbu jak substrátu určeného k degradaci, tak pomocí dalších interakcí proteinů také váže E2, který umožňuje ubikvitinaci substrátu. C) N-rozpoznávací místa ubikvitinu jsou specializované single podjednotky RING domény obsahující E3 ligázu, která přímo interaguje s E2 enzymem a proteinovým substrátem určeným k degradaci. Ve všech třech případech je substrát polyubikvitinován a degradován proteazomem 26S (Gibbs et al., 2014).

### 1.3 Autofagie

Proteiny, které po syntéze na ribozomech míří do organel nesou peptidový signál, který je navede na místo určení. Dráha autofagie vyžívá cesty proteinů z ribozomů do endoplazmatického retikula, kde proteiny při vstupu ztrácejí svůj peptidový signál. Takto mohou některé nově uvolněné N-terminální části sekvence, například u asparaginu, glutaminu a cysteinu, být po oxidaci vystaveny enzymu ATE1 (arginyl transferáza), který přidává na N-konec proteinů arginin. Enzym ATE1 je ovšem přítomný jen v cytoplazmě, takže proteiny endoplazmatického retikula (ER) jsou před jeho aktivitou chráněny. Některé induktory, jako

například dvouvláknová DNA (dsDNA) nebo inhibitory proteazomu mohou uvolnit proteiny ER do cytoplasmy. Mezi potenciálními substráty (proteiny) argininu jsou chaperony BiP (homologní s Hsp70). dsDNA indukuje přemístění Arg na BiP. BiP není jen autofágickým substrátem, ale jako chaperon je schopen na sebe vázat nesbalené nebo špatně sbalené proteiny (Martens, Bachmair, 2015).

Vybraný substrát je spojen se vznikajícím autofágózomem prostřednictvím receptorů, například p62 (Obr. 4). Mnoho z těchto receptorů je schopno rozpoznat ubikvitin, ale pouze za předpokladu velkého množství ubikvitinovaných proteinů. V případě malého množství ubikvitinovaných proteinů je dána přednost ubikvitin-proteazomovému systému.



Obr. 4.: Struktura proteinu p62 a jeho proteinové interakce. Protein p62 obsahuje 6 hlavních domén/motivů, které jsou nezbytné k interakci s autofagozomální dráhou. Na N-konci p62 je připojena PBI doména, která zprostředkovává homo-oligomeraci a další protein-proteinové interakce, které umožňují připojení p62 na substrát určený k degradaci. Centrální ZZ doména zinkový prst a TB doména interagují s TRAF6 a RIP proteiny, které regulují NF- $\kappa$ B dráhu. NF- $\kappa$ B je proteinový komplex, který kontroluje transkripci DNA (Perkins, 2007). LIR motiv je zodpovědný za interakci s ATG8-rodinou proteinů, jako je LC3B umístěná na nově vznikající autofagozomální membráně (Johansen, Lamark, 2011). Dále obsahuje C-konec UBA doménu vázající ubikvitin. Na konec navázání Keap1 proteinu s KIR doménou dochází ke stabilizaci dalších transkripčních faktorů (Lippai, Löw, 2014).

## 1.4 Porovnání UPS a autofagie

Autofagie je účinnější při degradaci většího substrátu, jako například u agregovaných proteinů, naproti tomu první systém je účinnější při degradaci individuálních polypeptidů (Bjørkøy et al., 2005). Komplementarita obou systémů je zapříčiněna stejným mechanismem označování substrátů, a to ubikvitinací. V případě autofagie ligáza označí velkou strukturu, například nefunkční mitochondrie nebo intracelulární bakterie, ubikvitinem (Kirkin et al., 2009).

## 1.5 Pravidlo N-konce

Dráha pravidla N-konce umožňuje cílenou proteolýzu, která je významným procesem nejen pro regulaci proteinů, ale i pro degradaci špatně složených nebo nefunkčních proteinů. Tato dráha reguluje proteiny na základě jejich stability N-konce, kde dochází nejčastěji k modifikacím typu acetylace nebo metylace.

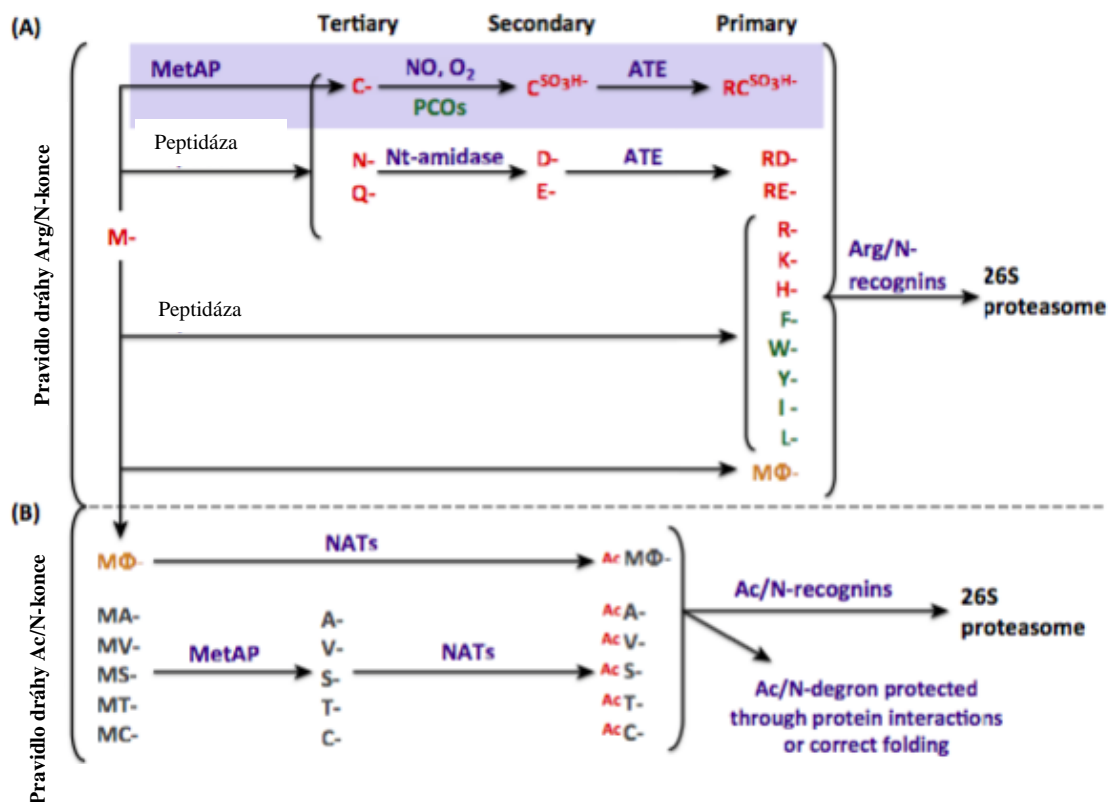
### 1.5.1 Destabilizace N-konce a dráha pravidla Arg/N-konce

Nově vznikající proteiny jsou na N-konci (Nt) zároveň syntetizovány s methioninem (Nt-Met). V průběhu post-translačních úprav je z proteinu methionin odstraněn pomocí aminopeptidáz. V případě primární destabilizace proteinu v aminokyselinovém zbytku je protein přímo vázán na ubikvitin (N-rozpoznávací místo ubikvitinu) a degradován. U eukaryotních organismů existují dvě hlavní cesty k primární destabilizaci Nt-zbytku (pravidlo N-konce). V prvním případě se jedná o rozpoznání bazických aminokyselinových zbytků argininu, lysinu, histidinu. V druhém případě jsou rozpoznány hydrofobní zbytky tryptofanu, fenylalaninu, tyrosinu, leucinu a isoleucinu (Tasaki et al., 2012).

V případě kvasinek jsou oba typy rozpoznány a vázány na UBR1 (ubikvitin rozpoznávací komponent 1). Zatímco genom savců kóduje několik N-rozpoznávacích míst pro ubikvitin (UBR1, 2, 4, 5), v rostlinách jsou dva funkční konzervované typy N-rozpoznávacích míst ubikvitinu, a to PRT1 a PRT6 identifikující dva typy aminokyselinových zbytků (Garzón et al., 2007).

Kromě primární destabilizace zbytků pravidla Arg/N-konce cestou (Obr. 5) existuje i destabilizace sekundární a terciální. V takovém případě dochází k sérií modifikací Nt před navázáním ubikvitinu. Modifikace zahrnují oxidaci cysteinu (u rostlin a živočichů) či deaminaci asparaginu (Asn) a glutaminu (Gln), a to pomocí Asn nebo Gln-specifických Nt amidáz (NTAN/NTAQ), následovanou Nt arginylací pomocí arginyl-tRNA transferázy

(ATEs), která přidává arginin (Arg) z Arg-tRNA na N-konec  $\alpha$ -aminoskupiny (Tasaki et al., 2012).



Obr. 5.: Pravidlo dráhy Arg/Ac/N-konce. A) Proteiny jsou syntetizovány s Nt-Met, ale některé Nt zbytky mohou být rozštěpeny peptidázami. Takto nově uvolněný Nt je rozpoznán Arg/N-recogninem a vázán s ubikvitinem, následně je degradován ve 26S proteazomu. Sekundární zbytky Asp (D) a Glu (E) mohou být vystaveny ATEs. Ze sekundárních zbytků se tvoří Arg/N-degrony. Asn (N) a Gln (Q) musí být v pravidle Arg/N-konce dráhy prvně deaminovány na terciálních zbytcích Asn/Gln-specifickými Nt amidázami (NTAN/NTAQ). Fialové pole znázorňuje důležitý senzor O<sub>2</sub> a NO v rámci pravidla Arg/N-konce dráhy. Methionin aminopeptidáza (MetAPs) nebo endopeptidáza (MetEPs) může odkrýt terciální zbytek Cys, ten pak může být oxidován kyslíkem a NO k tvorbě kyseliny Cys-sulfanové, nebo kyseliny Cys-sulfonové. Následně v kyselinách může dojít k sekundární destabilizaci zbytku a vzniku podobné struktury jak u Asp (D). B) Pravidlo Ac/N-konce dráhy kvasinek rozpoznává specifické Nt zbytky, a to ty, které byly acetylovány (Ac) Nt acetyltransferázou (NATs). Acetylovaný Met je cílen k degradaci pravidla Ac/N-konce dráhy pouze když je následován hydrofobními aminokyselinami (AA) (M-oranžové). Tento Nt-Met může být degradován jak pravidlem Arg/ tak i Ac/N-koncem dráhou (Gibbs et al., 2014).

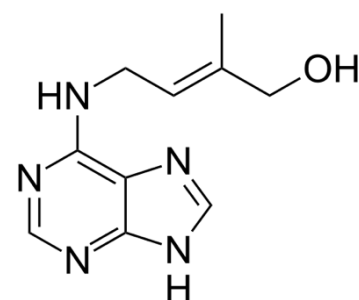
### 1.5.2 Nt acetylace a Nt-Met jako signál v dráze pravidla N-konce

Nt acetylace je ireverzibilní modifikace, která probíhá až v 90% proteinů, a je zprostředkovaná Nt-acetyltransferázou (NATs), jež katalyzuje přenos acetylové skupiny z acetyl-koenzymu A na Nt  $\alpha$ -aminoskupinu. Tého acetylaci závislé na pravidle N-konce dráhy říkáme pravidlo Ac/N-konce. Stabilizaci substrátu značně ovlivňuje cystein, který nemůže být acetylován, když je na N-konci (Nt-cys). Ovšem pokud po Nt-Cys následuje některá z aminokyselin náchylnější k acetylaci, je substrát modifikován NAT a degradován. Takto se děje především u aminokyselin methioninu, alaninu, valinu, serinu, threoninu (Shemorry et al., 2013).

Neacetylovaný Nt-Met může vést k destabilizaci aminokyselinového zbytku pokud je následován aminokyselinami s hydrofobním zbytkem, tj. leucinem, fenylalaninem, tyrosinem, tryptofanem nebo izoleucinem. Takovéto substráty jsou rozpoznány stejnými destabilizačními N-rozpoznávacími místy ubikvitinu jako u pravidla Arg/N-konce dráhy (PRT1, PRT6). Proteiny s Nt-Met + AA s hydrofobním zbytkem mohou být regulovány pravidlem Arg/ i Ac/N-koncem, závisí to hlavně na jejich acetylaci či neacetylaci. Ac-Met proteiny mají silnější vazbu mezi komplexi, zatímco neacetylované proteiny jsou náchylné k rychlejší disociaci vedoucí k celkové nestabilitě (Kim et al., 2014).

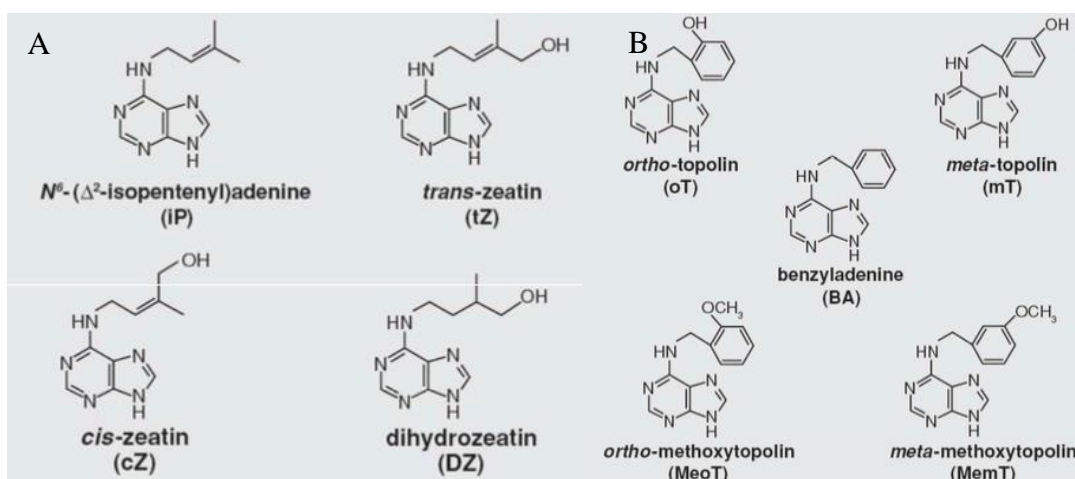
## 1.6 Cytokininy

Cytokininy (Obr. 6) jsou rostlinné hormony, které byly objeveny Millerem a Skoogem v roce 1955, ovšem geny pro biosyntézu cytokininů byly objeveny až v roce 2000. Cytokininy ovlivňují vývoj, fyziologické procesy zahrnující buněčné dělení, tvorbu vrcholu, funkci apikálního meristému, stárnutí listů, mobilizaci živin, klíčení semen, vývoj cévních svazků a kořene (Werner et al., 2001).



Obr. 6.: Cytokinin *trans*-zeatin

Cytokininy jsou z hlediska chemické stránky  $N^6$ -deriváty adeninu. Podle povahy navázaného řetězce se cytokininy dělí na aromatické a izoprenoidní (Obr. 7). Mezi aromatické patří 6-benzylaminopurin (BAP) a jeho hydroxylované deriváty (topoliny) a mezi izoprenoidní patří například isopentenyladenin a *trans*-zeatin. Mimo přirozené cytokininy nalezené v rostlinách jsou známé i syntetické cytokininy, například  $N,N'$ -difenylmočovina.



Obr. 7.: A) Izoprenoidní formy cytokininu. B) Aromatické formy cytokininů

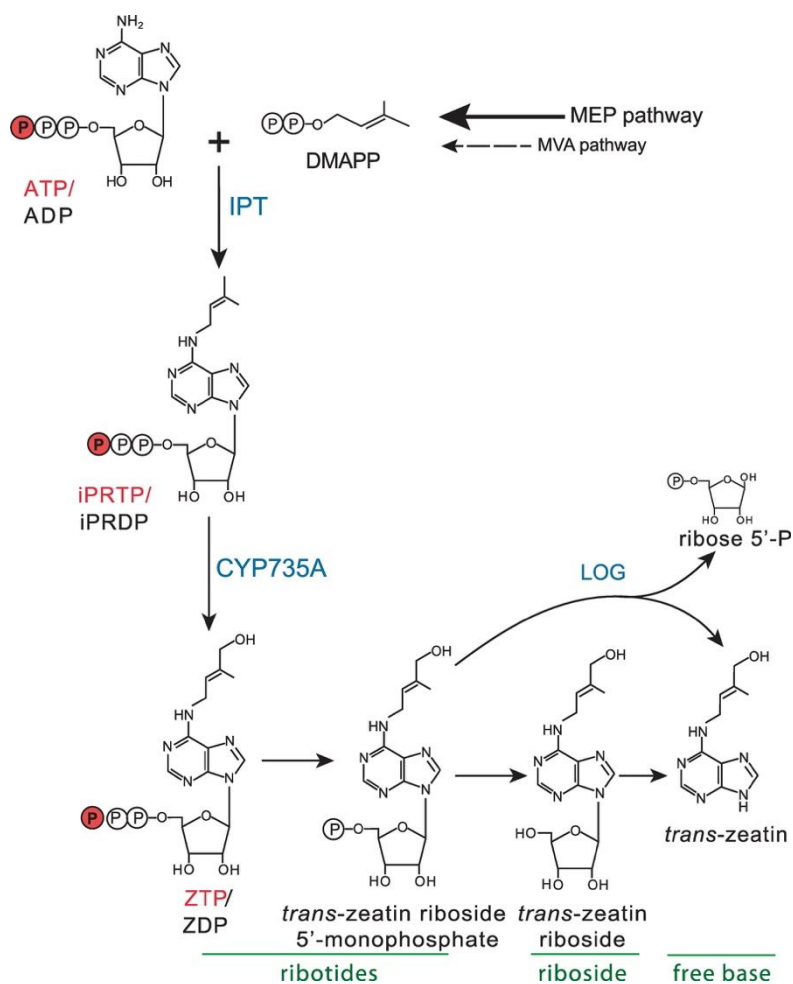
### 1.6.1 Metabolismus

Hladina a aktivita cytokininů v buňce se reguluje třemi cestami, a to jejich biosyntézou, konjugací a degradací. Biosyntéza začíná připojením isopentenylové skupiny z dimetylallyl difosfátu (DMAPP) na adenosin(tri/di)fosfát ATP/ADP (enzymem katalyzující tuto reakci je isopentenyltransferáza (IPT), tímto vzniká meziprodukt isopentenyladenosin-5-di/trifosfát (iPRTP/iPRDP) (Kieber, Schaller, 2014). Enzym cytochrom P450 monooxygenáza zprostředkuje konverzi iPRTP/iPRDP na tZ (*trans*-zeatin) ribonukleotid (Taiz, Zeiger, 2010). Následuje krok konverze ribonukleotidu na tZ, který je pravděpodobně katalyzován LOG (LONELY GUY) proteinovou rodinou (Tokunaga et. al., 2012) (Obr. 8). *Arabidopsis thaliana*

má těchto genů 7. Chybějící LOG geny mají za následek řadu poruch, jako například redukci růstu stonku a kořene, defekty ve stonkovém apikálním meristému (SAM) a květním meristému. LOG geny kódují enzymy, které konvertují neaktivní cytokininové ribonukleotidy na aktivní cytokinin (Kieber, Schaller, 2014).

Konjugace ovlivňuje aktivitu cytokininů reverzibilním nebo nereverzibilním způsobem. V případě reverzibilní konjugace dochází k *O*-glykosylaci na kyslíku postranního řetězce zeatinu a dihydrozeatinu. V případě ireverzibilní konjugace dochází k *N*-glykosylaci v pozici *N*<sup>7</sup> a *N*<sup>9</sup> purinového kruhu (Sakakibara, 2006).

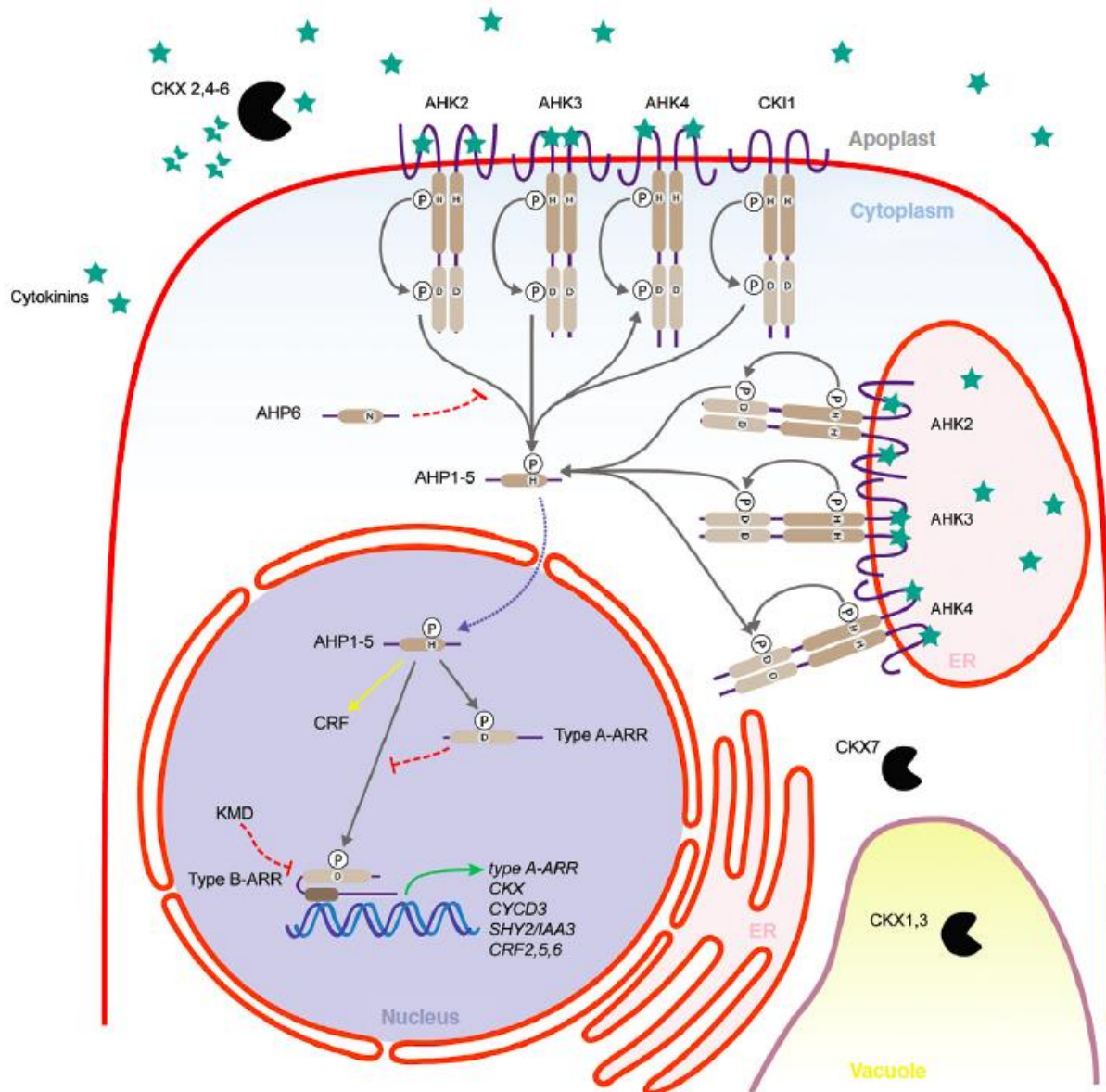
Degradaci cytokininů nevratně katalyzuje cytokinin oxidáza/dehydrogenáza (CKX). Dochází k odštěpení *N*<sup>6</sup> – postranního řetězce, čímž vznikne derivát adeninu a aldehyd odvozený od postranního řetězce.



Obr. 8.: Schéma biosyntézy *trans*-zeatinu. Převod ribonukleotidu na *tZ* pomocí LOG enzymů (Kieber, Schaller, 2014).

## 1.6.2 Signální cesta cytokininů

V dvoukomponentní signální dráze cytokininů (Obr. 9) jsou zahrnuty receptory histidinové kinázy (AHKs), histidin fosfotransferové proteiny (AHPs) a transkripční faktory ARRs (Wallmeroth et. al., 2016).

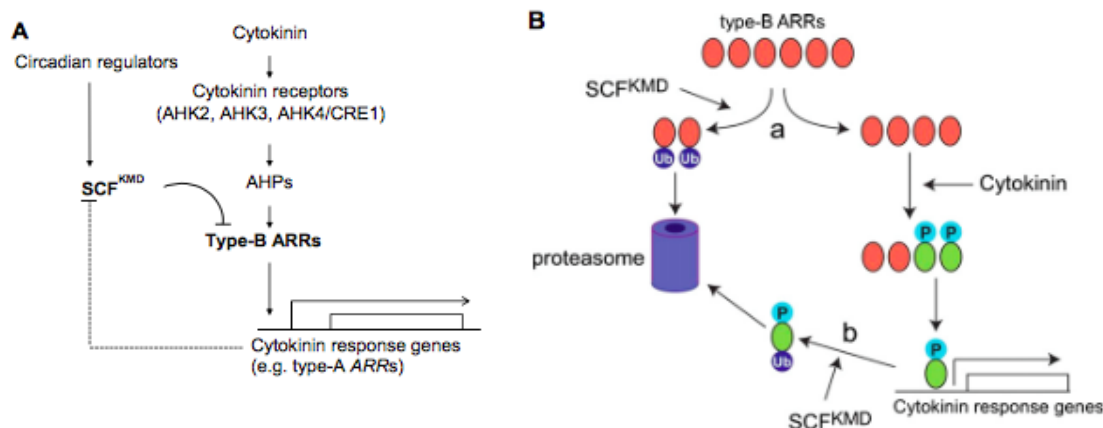


Obr. 9.: Signální cesta cytokininů. Cytokininy jsou připojeny na AHK receptory. Dochází k přenosu fosfátové skupiny do jaderné ARR. CK1 (cytokinin independent1) může uvolňovat cytokininy. CKX štěpením cytokininů reguluje jejich množství v cytosolu a apoplastu. Šedé šipky určují transport fosforu; přerušovaná modrá šipka označuje pohyb proteinů, žlutá šipka označuje posttranskripční aktivaci, CRF (transkripční faktor). Tečkovaná červená šipka označuje posttranskripční inhibici; zelená šipka označuje transkripční aktivaci (Zürcher, Müller, 2016).



### 1.6.3 Regulace signální cesty cytokininů pomocí SCF<sup>KMD</sup>

SCF<sup>KMD</sup> ovlivňuje signalizaci pomocí ubiquitin-proteazomové cesty, pomocí které degraduje ubiquitinem označené transkripční faktory typu-B ARR, přičemž samotná genová exprese KMD je pod vlivem cytokininového signálu, který tímto expresi snižuje (Obr. 10A, B) (Kim et al., 2013).



Obr. 10.: A) Schéma zapojení KMD do CK signalizace. Transkripční faktory typ-B ARR spouští genovou expresi, přičemž jsou pod kontrolou SCF<sup>KMD</sup>, který způsobuje jejich degradaci. Ovšem i samotný SCF<sup>KMD</sup> je pod redukční kontrolou, a to v závislosti na míře exprese genu odpovědi na cytokininy. B) SCF<sup>KMD</sup> kontroluje množství a aktivitu typ-B ARR. Receptory typu-B ARR jsou pomocí AHPs fosforylací aktivovány, tyto aktivované transkripční faktory spouští genovou expresi. Neaktivované typ-B ARR jsou označeny ubiquitinem a degradovány v proteazomu. Množství cytokininů určuje množství aktivních transkripčních faktorů typ-B ARR, zároveň SCF<sup>KMD</sup> kontroluje délku života aktivovaných typ-B ARR, čímž se kontroluje výstupní transkripce (Kim et al., 2013).

## 1.7 Proteomika

Pojem „proteom“ byl poprvé použit v roce 1995 jako analog pro vyjádření souboru proteinů, podobně jako byl již dříve použit pojem „genom“ pro soubor všech genů organismu (Wasinger et al., 1995). S postupným přibýváním sekvenačních dat se zjistilo, že pouhý sled nukleotidů v DNA není dostačující pro popis biologických systémů. Co se týče sledování mRNA transkriptů, ty přímo nevypovídají o množství finálního proteinu, protože o té rozhoduje stabilita mRNA, míra translace a stabilita výsledného proteinu. Protein navíc může být dále upravován posttranslačními modifikacemi, které významně ovlivní jeho funkci. Jedna genová sekvence tak může poskytnout různé genové produkty díky alternativnímu sestřihu genu a ty pak mohou být dále modifikovány na úrovni proteinu a tvořit různé proteoformy (Chandramouli, Qian, 2009; Gygi et al., 1999).

Proteom není konstantní, ale liší se na úrovni jednotlivých buněk a také v průběhu času. Proteomika není pouhý proteinový ekvivalent studia DNA, ale jako samostatná systematická věda se snaží rozluštit mechanismus kontroly genové exprese. Má za úkol srozumitelně popsat míru exprese proteinů a její případnou změnu vlivem biologických odchylek, například nemocí nebo medikamenty; dále vysvětluje různé, například posttranslační modifikace proteinů, jako je fosforylace nebo ubiquitinace. Také interpretuje pohyb proteinů v rámci jedné buňky, a to mezi jejími kompartmenty, jejich úlohu v metabolických drahách a v neposlední řadě i vzájemné proteinové interakce (Anderson, Anderson, 1998).

Pro studium proteomiky byla vyvinuta celá řada metod.

I přes nesčetné pokroky v moderních technologiích spočívajících v analýze komplexních biologických směsí, možnosti kvantifikace velké škály proteinů s vysokou citlivostí, je studium proteomiky stále limitováno svojí náročností (Asmelash, 2016).

Původní komplexní analýza proteomu probíhala, a ani v dnešní době se od ní úplně neopustilo, za pomoci 2D polyakrylamidové elektroforézy (2D PAGE). Proteiny se separují na základě jejich izoelektrické bodu (v prvním směru) a molekulové hmotnosti (v druhém směru). Oddělené proteiny se naštěpí specifickými proteázami na peptidy, které jsou identifikovány pomocí hmotnostního spektrometru, kde jsou jednotlivé naštěpené peptidy detekovány na základě poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ). Dalším možným přístupem identifikace proteinů spoléhá na western blotting za pomoci protilátek pro daný protein nebo radioaktivního značení (Blackstock, Weir, 1999). V dnešní době se pro identifikaci využívá především hmotnostní spektrometrie, která je propojena např. s reverzně fázovou kapalinovou chromatografií (dělení

proteinů na základě odlišné hydrofobicity peptidů/proteinů) nebo iontově výměnnou kapalinovou chromatografií (dělení proteinů na základě odlišného náboje).

Výsledná spektra z hmotnostního spektrometru, tzv. MS/MS spektra, jsou následně porovnána s databází a interpretována. Pro určení proteinu je zapotřebí pouze jednoho unikátního peptidu (Ong, Mann, 2005).

Podobně jako DNA čipy, stávají se populárními i proteinové čipy jako vysoce účinná metoda pro sledování interakcí, aktivity a funkce proteinů ve velkém měřítku. Na čip je nanášena fluorescenčně značená sonda umožňující laserovou detekci. Výhody lze spatřovat v rychlosti, ekonomičnosti a velké citlivosti (Chandramouli, Qian, 2009).

## 2 MATERIÁL, METODIKA

### 2.1 Kultivace

Ke studiu narušení metabolismu proteinů a jeho efektu na signalizaci cytokininů jsem použil modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana* L. Kultivaci jsem dělal v následujících krocích. Nejdříve jsem sterilizoval semena, což spočívalo v ponoření semen do 75% ethanolu po dobu 5 minut. Sterilní semena jsem ve flowboxu vyséval do kulatých (12,5cm) a hranatých (15x15cm) Petriho misek (Obr. 11). Jako živné médium jsem použil 1,2% agar s 1% Murashige – Skoog. Médium bylo upraveno 1M KOH na hodnotu pH 5,7, následně proběhlo autoklávování média. Pro zajištění sterilního prostředí a výměny plynů mezi vnějším a vnitřním prostředím byly misky oblepeny polopropustnou náplastí Medipor. Následně byla semena vernalizována, a to po dobu tří dní v lednici. Poté jsem misky přenesl do kultivačního boxu.

Klíční rostliny pro fyziologickou analýzu jsem kultivoval při standardní světelné intenzitě  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  v režimu dlouhého dne (16 hod./21 °C světlo; 8 hod./19 °C tma). V případě rostlin ošetřených pouze MG-132 se jednalo o kultivaci 14 dnů, přičemž jsem rostliny fotil 7. a 14. den V případě rostlin ošetřených tZ a tZ+MG-132 probíhala kultivace 10 dní, přičemž fotodokumentace probíhala 3.,5.,7. a 10. den. Délky kořínků jsem měřil v programu ImageJ verze 1.50a.



Obr. 11.: Petriho miska s klíčovými rostlinami po 5. dni v kultivačním boxu.

Klíční rostliny pro proteomickou analýzu jsem také kultivoval při standardní světelné intenzitě  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  v režimu dlouhého dne (16 hod./21 °C světlo; 8 hod./19 °C tma). V 7. dni jsem rostliny přenesl na dobu 120 minut na tekuté médium obsahující MG-132 v koncentraci  $50 \mu\text{M}$  a v posledních 15 minutách jsem rostliny přenesl na medium, které obsahovalo  $5 \mu\text{M}$  tZ. Po kultivaci jsem sebral rostlinný materiál a připravil jej na LC-MS analýzu.

## 2.2 Extrakce proteinů

Extrakce proteinů spočívala v několika krocích, konkrétně v rozdrcení zmražených klíčnicích rostlin, samotné extrakci proteinů pomocí aceton/TCA, resolubilizaci proteinového peletu, dále fenolovou extrakci, resolubilizaci proteinu. Následně jsem stanovil koncentraci proteinu, provedl jsem digest, odsolil jsem vzorky a nakonec jsem provedl samotnou přípravu pro LC-MS analýzu.

1. Za pomoci kapalného dusíku jsem rozdrtil zmražené sazeničky v třecí misce a pomocí aceton/TCA jsem extrahoval proteiny:
  - vzorek jsem dal do 2 ml 10% (w/v) TCA v acetonu, takto jsem vzorek ponechal přes noc při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .
  - ráno jsem vzorek centrifugoval po dobu 5 min, při 20 000 g a teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$
  - po centrifugaci jsem vzorek resuspendoval v 1,5 ml 10 % (w/v) TCA v destilované vodě
  - opět jsem provedl centrifugaci po dobu 5 min, při 20 000 g a teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$
  - po centrifugaci jsem vzorek resuspendoval v 80 % (w/v) acetonu v destilované vodě
  - provedl jsem centrifugaci po dobu 5 min, při 20 000 g a teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$
2. Resolubilizoval jsem proteinový pelet v 0,8 ml SDS pufru [2% (w/v) SDS, 30% (w/v) sacharóza, 5% (w/v) b-merkapt ethanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8,0], inkubaci jsem prováděl 30 min při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .
3. V dalším kroku jsem provedl fenolovou extrakci:
  - Do vzorku jsem přidal 0,4 ml pufru saturovaného fenolu, důkladně jsem vzorek protřepal
  - provedl jsem centrifugaci po dobu 20 min, při 20 000 g a teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$
  - Vrchní fenolickou fází, která je od zbytku oddělena sacharózovou vrstvou, jsem přenesl do nové mikrozkuhavky (objem 2,0 ml) a doplnil do 2 ml vymraženým roztokem 100 mM octanu amonného v methanolu. Takto jsem vzorek ponechal přes noc při teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

- provedl jsem centrifugaci po dobu 5 min, při 20 000 g a teplotě 4 °C
  - Proteinový pelet jsem promyl 1,0 ml 80 % (w/v) acetonu v destilované vodě .l
  - provedl jsem centrifugaci po dobu 5 min, při 20 000 g a teplotě 4 °C
4. Dále jsem resolubilizoval proteiny. Po vysušení jsem pelet rozpustil v roztoku 100 mM uhličitanu amonného a 8 M močoviny, po dobu 60 minut a při teplotě 25 °C
  5. Pro stanovení koncentrace jsem použil metodu dle Bradfordové (Bradford, 1976), (Sigma - Aldrich)
  6. Provedl jsem digest vzorku:

Vzorek jsem zředil 1:1 s 20 % (w/v) acetonitrilem ve 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Proteiny byly štěpeny trypsinem a endoproteinázou Lys - C (1 mg na 1000 mg proteinu, po dobu 12 hodin, při teplotě 30°C), (Promega)
  7. V dalším kroku jsem vzorek odsoloval:
    - použil jsem odsolovací desku C18 SPEC (Agilent)
    - promýval jsem 2x metanolem 400 µl a 4x ddH<sub>2</sub>O 400 µl
    - vzorek jsem nanesl a promyl 4×400 µl ddH<sub>2</sub>O
    - vzorek jsem vyluhoval 2×200 µl metanolem, a odpařil pomocí SpeedVac koncentrátoru (Thermo)
  8. V konečné přípravě vzorku pro LC-MS analýzu jsem vzorek rozpustil ve vodném roztoku obsahující 0,1% kyseliny mravenčí a 5% acetonitrilu.

## 2.3 LC-MS analýza

Postup LC-MS analýzy jsem shrnul do následující tabulky (Tab. 1).

Tab. 1: Postup extrakce proteinů.

Nastavení MS	C18 reverzní chromatografie (15cm, průměr 0,1mm, Ascentis Express Column, Sigma-Aldrich) napojená k nanoESI zdroji CaptiveSpray (Bruker). Ultimate 3000 RSLC pracoval s průtokem 300-500nl/min, gradient ACN byl nastaven na 4-35% během 60min. UHR-TOF měřil v MS/MS módu k identifikaci proteinů (rozsah 350-1600 m/z, sběr 0,5Hz). V průběhu měření byl použit vnitřní standard 1221,99m/z (lockmass)
Zpracování a změření MS spekter	MS spektra poskytují informace o celkové povaze vzorku. Pro recalibraci spekter (vnitřní kalibrant 1221,9m/z) jsem použil software DataAnalysis 4.1. Následovala extrakce dat, odfiltrování šumu (S/N signál:šum) a vytvoření vektorů pro každou unikátní m/z v rámci LC-S analýzy (tvz. buckety).
Statistické zpracování	Kvantifikační tabulku jsem vytvořil pomocí softwaru ProfileAnalysis 2.1., která porovnává unikátní m/z v daném čase mezi jednotlivými analyzovanými vzorky. Následovala automatická korekce retenčního času a normalizace spekter. Na konec software vytvořil list signifikantně regulovaných bucketů na základě porovnání T-testu, či PCA analýzy.
Změření a zpracování MS/MS spekter	K identifikaci peptidů se používají MS/MS spektra, pomocí nich lze určit původní složení proteinů ve vzorku. K tomu byl použit software ProteinScape 3.1 (Mascot), SearchGUI – MS Amanda, Andromeda, PeptidShaker
Parametry vyhledávání	<p>ProteinScape/Mascot 3.1 jsem nastavil na taxonom Arabidopsis thaliana (databáze TAIR 10). Enzym: Trypsin, možnost jednoho vynechání štěpícího místa. Přístroj CID: ESI-QUAD-TOF. Povolené variabilní modifikace: Acetyl (protein N-term), Deamidated (NQ), Gln-&gt;pyro-Glu (N-term Q), Gln-&gt;pyro-Glu (N-term E), Oxidace (M), fosforylace (ST). Tolerance přesnosti – 16 ppm (MS), přesnost 0,05 Da (MS/MS). Náboj peptidu: 1+, 2+ a 3+. Statistické vyhodnocení identifikace proteinu – FDR (false discovery rate) FDR&lt;1%, hledáno proti databázi vytvořené Mascotem.</p> <p>V PeptidShaker / Amanda, Andromade/ SearchGUI jsem nastavil enzym trypsin, možnost dvou vynechání štěpícího místa. Povolené variabilní modifikace: Acetylace (protein N-term K), Deamidated (NQ), Gln-&gt;pyro-Glu (N-term Q), Gln-&gt;pyro-Glu (N-term E), Oxidace (M), fosforylace (ST). Tolerance přesnosti – 20 ppm (MS), přesnost 0,1 Da (MS/MS). Náboj peptidu: 1+, 2+, 3+, 4+. Statistické vyhodnocení identifikace proteinu – FDR (false discovery rate) FDR&lt;1%, hledáno proti databázi vytvořené Mascotem.</p>

## 2.4 Vyhodnocení dat

Informace o možných funkcích proteinů jsem získal z databáze UniProt (<http://www.uniprot.org>) a Tair (<https://www.arabidopsis.org>). Informace o lokalizaci proteinů jsem určil pomocí databáze SUBA (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au>). Informace o vzájemných protein-protein interakcích jsem získal pomocí programu String 10.0. (<http://string-db.org>). Teplotní mapu jsem získal pomocí Excelu a funkce podmíněné formátování.

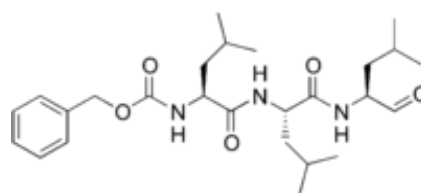


### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

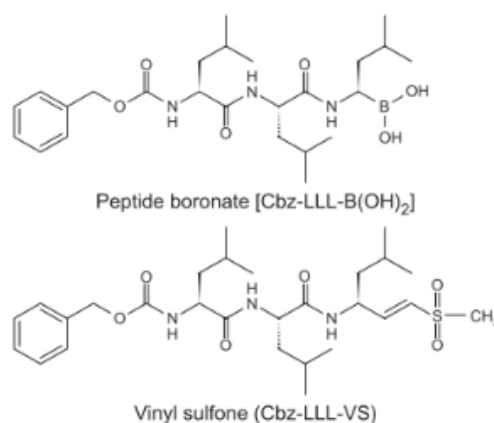
Cílem mé diplomové práce bylo zjistit vliv exogenně aplikovaného cytokininu na *Arabidopsis thaliana* s blokovanou proteazomovou dráhou. Vliv jsem pozoroval na změnách proteomu pomocí metody LC-MS profilování. Dále jsem vyhodnotil dlouhodobé účinky inhibitorů proteazomové dráhy na délku hlavního kořene. Nakonec byla využita transgenní linie s modulovanou hladinou cytokininů a transgenní linie exprimující modifikovaný ubikvitin na porovnání s modelovými rostlinami, které byly ošetřeny pouze exogenně aplikovaným cytokininem.

K inhibici proteazomové dráhy jsem použil peptidový aldehyd MG-132 (Obr. 12).

Mezi další cesty, jak inhibovat degradaci značených proteinů ubikvitinem, patří například transgenní linie s modifikovaným ubikvitinem. Ubikvitin je změněn v pozici K48, kde je místo argininu lyzin. Tato modifikace zamezuje prodlužování ubikvitinového řetězce, čímž zamezí připojení na proteazom s následnou degradací proteinu (Schlögelhofer et al., 2006). Dalším příkladem může být chemicky připravený peptid, který má modifikovanou boronátovou nebo vinylsulfonovou skupinu (Obr. 13).



Obr. 12: Molekula MG-132



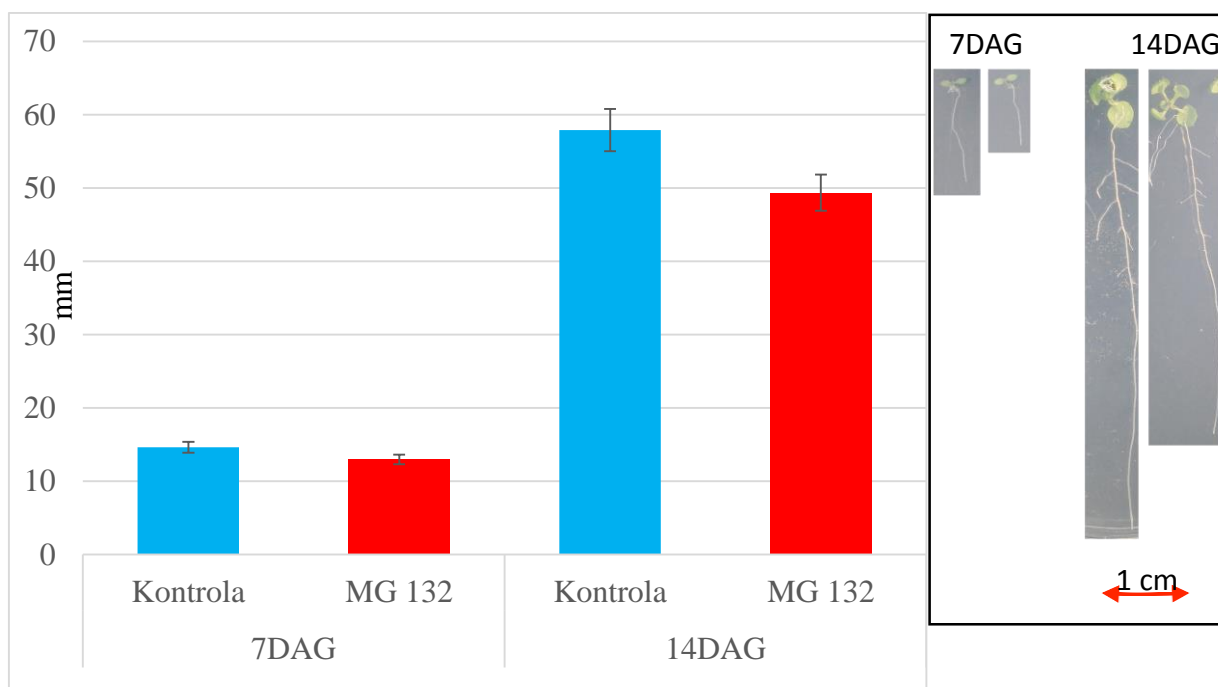
Obr. 13: Podobně fungující inhibitory jako MG-132

### 3.1 Role proteazomu v dlouhivém růstu hlavního kořene *Arabidopsis thaliana*

Jeden z nejznámějších efektů aplikace cytokininu je inhibice růstu hlavního kořene a tento jev je často využíván v charakterizaci účinků různých cytokininů či míře ovlivnění cytokininové signální dráhy. Jedná se o velmi rychlý a jednoduchý test, a proto jsem ho zvolil jako výchozí bod mé diplomové práce zabývající se souhrou mezi cytokininem a UPS.

#### 3.1.1 Vliv inhibice proteazomu na fyziologii kořínků

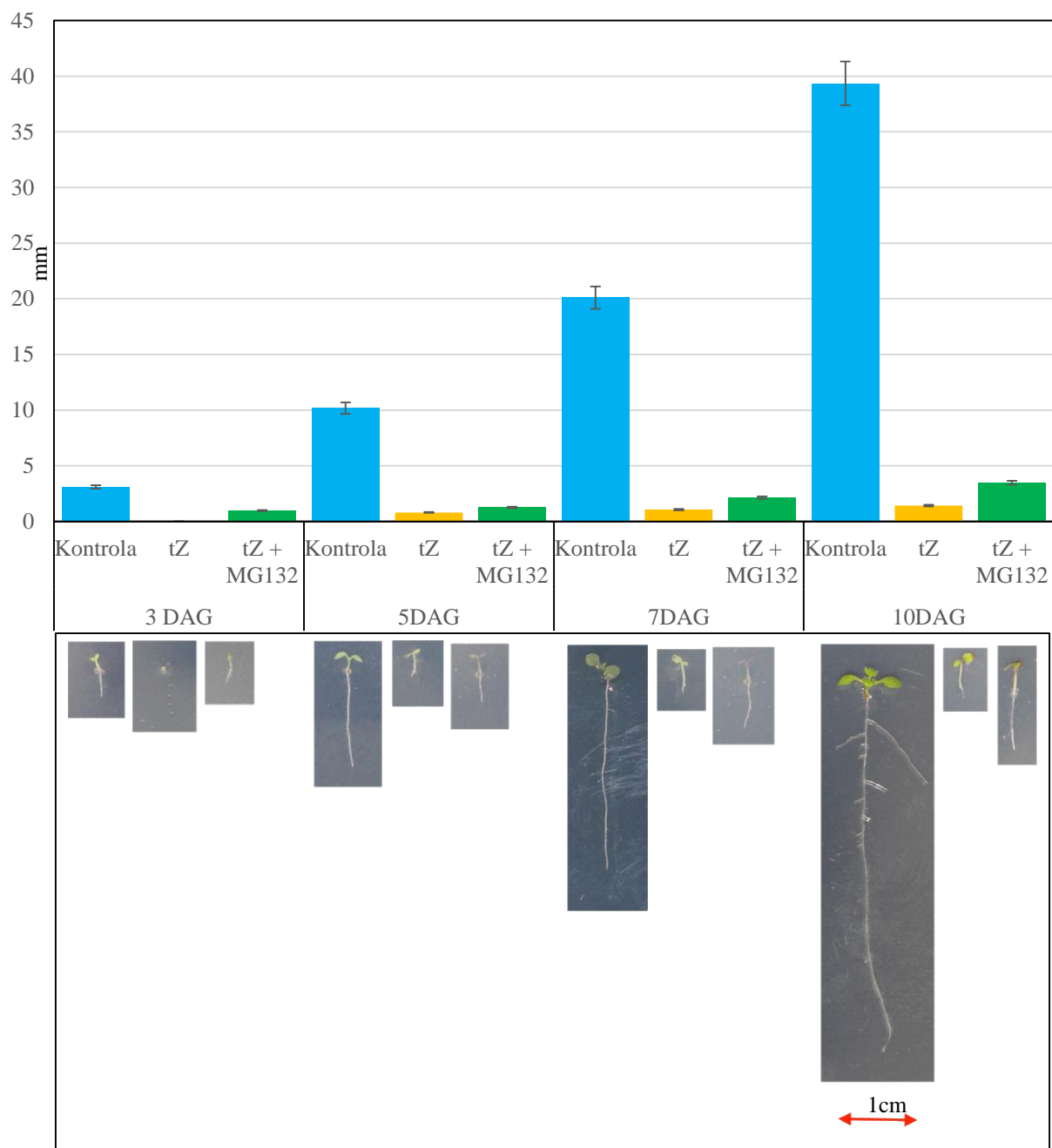
Nejprve jsem ověřil efekt inhibice proteazomu na elongaci hlavního kořene pomocí MG-132. Výchozí koncentrace byla zvolena na základě předchozích experimentů (An et al., 2010). Koncentrace a rostliny byly foceny a měřeny sedmý den a čtrnáctý den po stratifikaci (Obr. 14).



Obr. 14.: Efekt exogeně aplikovaného inhibitoru proteazomu MG-132. Reprezentativní fotografie a graf znázorňující průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou založenou na pozorování alespoň 20 jedinců. Experiment byl proveden ve dvou biologických opakováních s podobným trendem.

### 3.1.2 Vliv cytokininů a MG-132 na fyziologii kořínků

Experiment je vyhodnocován 3., 5., 7. a 10. den po vyklíčení, použitá koncentrace tZ a MG-132 je 1 $\mu$ M.

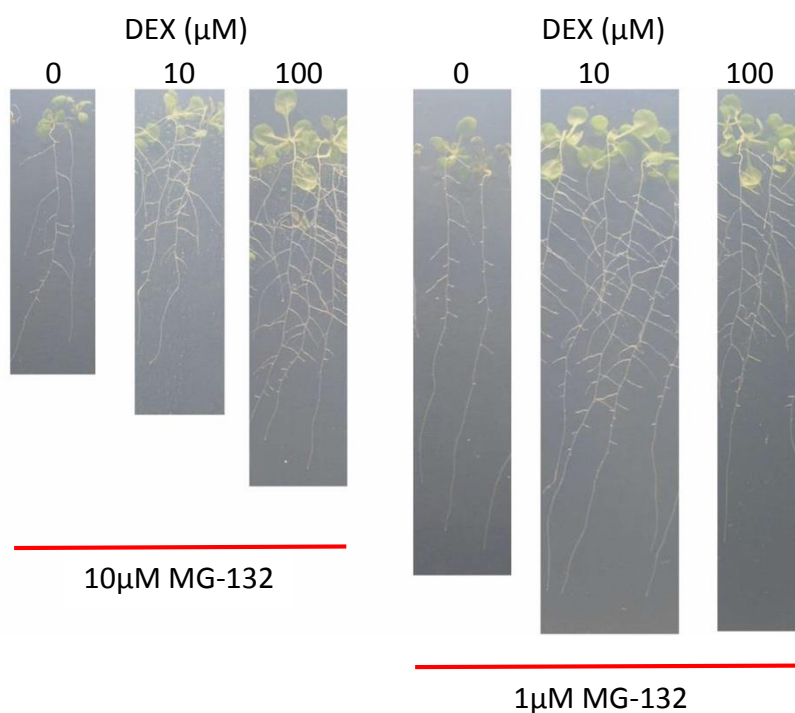


Obr. 15.: Efekt exogenní aplikace cytokininů a inhibitoru proteazomu MG-132 na délku kořínků semenáčků. Koncentrace tZ a MG-132 je 1 $\mu$ M. Reprezentativní fotografie a graf znázorňující průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou založenou na pozorování aspoň 30 jedinců. Experiment byl proveden ve dvou biologických opakováních s podobným trendem.

V prvních třech dnech došlo k vyklíčení jen kontroly a rostlinek ošetřených tZ + MG-132, samotná semena ošetřená pouze cytokininy vyklíčila až po třetím dni. Důvodem může být vyšší koncentrace tZ, jenž je v procesu klíčení negativním regulátorem (Riefler et al., 2006). Důvodem, proč vyklíčila semínka na tZ s MG-132, může být již vliv spolupráce cytokininu a proteazomu na expresi genu. Rozdíl v délce kořínků je nejznatelnější v 10. dni. Zatímco u rostlinek ošetřených jen tZ přestal kořen úplně růst vlivem vysoké koncentrace tZ, tak u rostlinek s tZ i MG-132 se koříněk stále prodlužuje (Obr. 15).

### 3.1.3 Transgenní linie s modulovanou hladinou cytokininů

14-denní transgenní *Arabidopsis thaliana* s expresí biosyntetického genu isopentenyltransferázy (Obr. 16). Gen je pod dexametasovou kontrolou. Proteazom je inhibován exogenně aplikovaným inhibítorem MG-132. Tento experiment byl realizován ve spolupráci s dalšími členy laboratoře (Luklová et al., 2015; příloha diplomové práce).



Obr. 16.: Vliv délky kořínků transgenní *Arabidopsis thaliana* na modulovanou hladinu cytokininů a inhibovaný proteazom.

### 3.1.4 Transgenní linie s inducibilním systémem pro expresi mutovaného ubikvitinu

Byla použita 7-denní transgenní *Arabidopsis thaliana* exprimující modifikovaný ubikvitin neschopný se vázat k proteazomu. Gen byl pod dexametasovou kontrolou. Průběh je podobný jako při přidavku MG-132. Experiment byl realizován ve spolupráci s dalšími členy laboratoře (Luklová et al., 2015; příloha diplomové práce).

V literární rešerši jsem vysvětlil mechanismus degradace proteinů a signální dráhu cytokininů. Je zřejmé, že oba mechanismy mezi sebou úzce spolupracují. Z naměřených výsledků můžeme vyčíst vliv na fyziologii kořene působením pouze cytokininů nebo proteazomu, ale také jejich vzájemnou interakci.

Potlačení účinku cytokininů při určité koncentraci inhibitoru proteazomu MG-132 pozorujeme ve všech variantách experimentů.

Exogenní aplikace inhibitoru má stejné zkracující účinky kořene jako transgenní linie *Arabidopsis thaliana* s genem exprimujícím modifikovaný ubikvitin.

Stejné účinky na délku kořínků jsem pozoroval u rostlin s exogenně aplikovaným cytokininem a inhibitorem proteazomu v porovnání s použitím transgenní linie s modulovanou hladinou cytokininů a MG-132. V obou případech samotná inhibice proteazomu potlačuje účinek cytokininů.

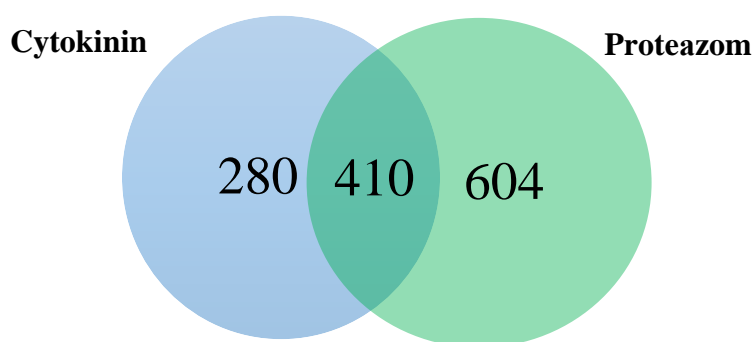
Poslední část výsledků s použitím transgenních linií byla prezentována na konferenci ESNA.

## 3.2 Role proteomu a cílené degradace v signalizaci cytokininů

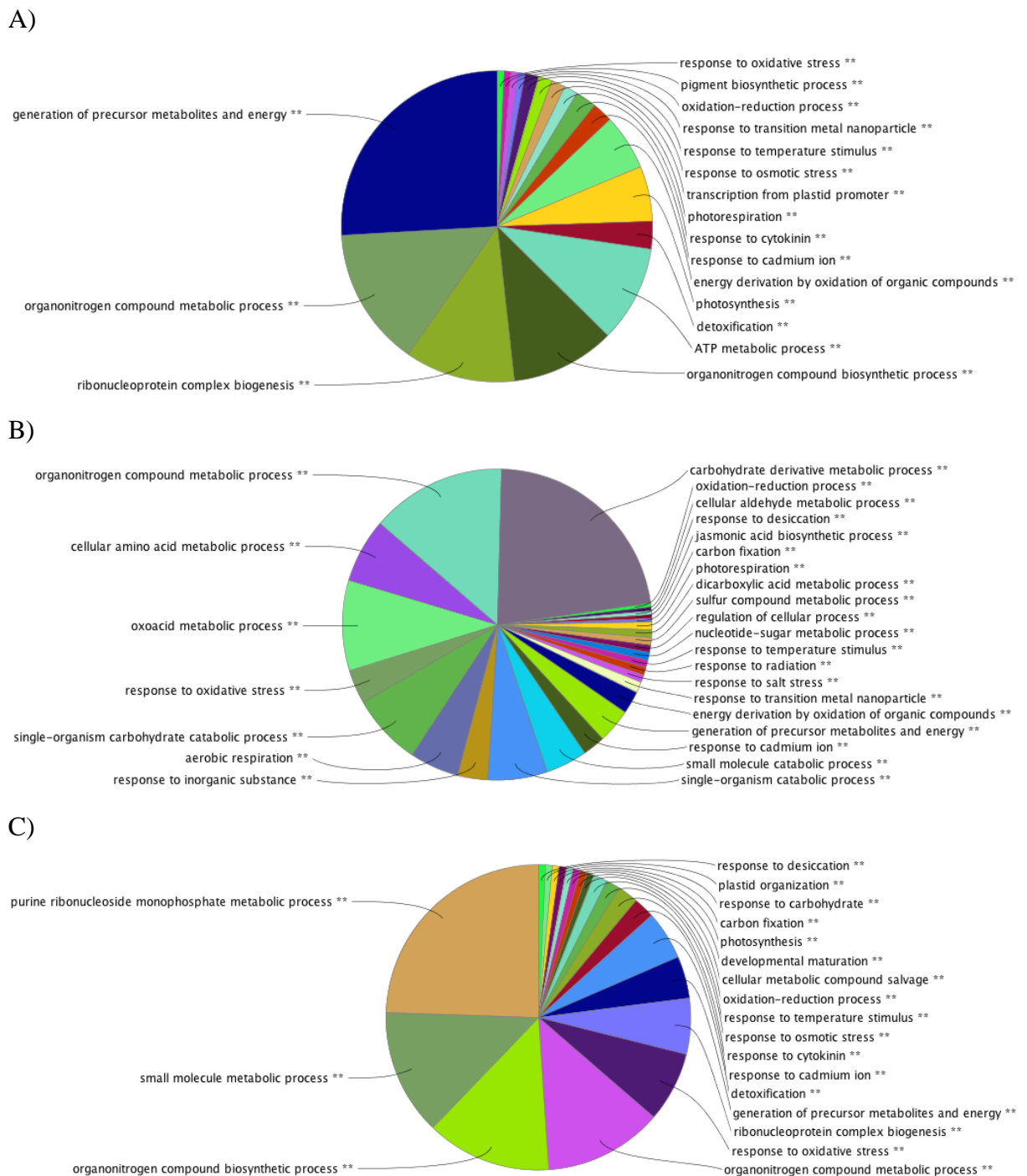
### 3.2.1 Analýza předchozích proteomických studií

Fyziologické experimenty popsané v první části jasně prokazují souhru cytokininové signální dráhy a proteazomu, což je v souladu s popsanou rolí SCF<sup>KMD</sup> v regulaci ARR typu B. V minulosti byla provedena řada studií, které sledovaly vliv cytokininu na proteom *Arabidopsis thaliana*. Využil jsem těchto dat a porovnal jsem nalezené proteiny cytokininové odpovědi a seznam proteinů, které byly v minulosti identifikovány jako ubikvitinované (Černý et al., 2016). I tato analýza naznačuje velký význam proteazomu v cytokininové odpovědi, protože z celkového počtu 690 proteinů v odpovědi na cytokinin bylo 59% nalezeno mezi ubikvitinovanými proteiny (Obr. 17). Slibné výsledky této analýzy mě motivovaly k hlubšímu prozkoumání dat, a tak jsem provedl pomocí pluginu ClueGO verze v2.2.2 softwaru Cytoscape verze 3.2.1. funkční analýzu nalezených proteinů (Obr. 18).

Hlavním cílem bylo porovnat zastoupení funkcí mezi proteiny v odpovědi na cytokinin, známými cíli ubikvitinace a překryvem těchto dvou frakcí. Zatímco pro soubor proteinů cytokininové odpovědi převládaly funkce v odpovědi na oxidační stres, biosyntézy pigmentů, odpovědi na osmotický stres, fotosyntézu, ATP syntézu, tak pro potenciálně ubikvitinované proteiny bylo nejvýznamnější zastoupení v odpovědi na zasolení, biosyntézu jasmonové kyseliny, aerobní respiraci. I když je překryv mezi oběma frakcemi významný, zastoupení funkcí 410 proteinů, které ho tvoří, se dramaticky liší od obou výchozích kategorií (metabolismus sacharidů, metabolický proces malých molekul).



Obr. 17.: Překryv regulovaných proteinů. Nalezených proteinů v odpovědi na cytokininy je 690. Proteiny, které jsou regulovány ubikvitinem, je 1014. Společných nalezených proteinů v odpovědi na cytokininy a proteinů regulovaných ubikvitinem je 410.

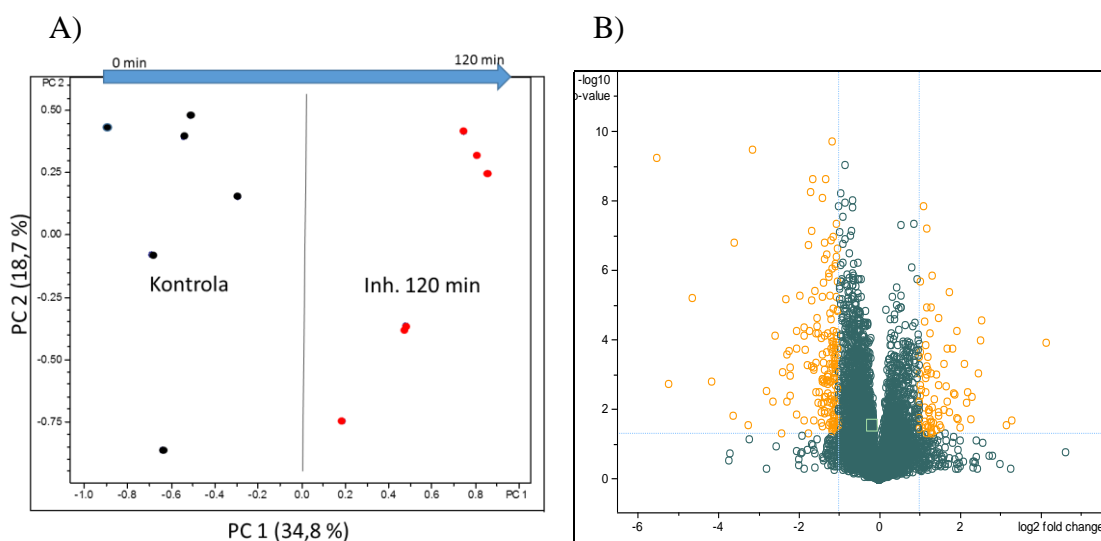


Obr. 18.: Zastoupení funkcí proteinů v odpovědi na cytokininy (A), identifikovaných cílů ubikvitinace (B) a překryvu obou kategorií (C). Vstupní data pochází z publikace Černý et al., 2016, kategorie byly vygenerovány pomocí programu Cytoscape s využitím ClueGO verze v2.2.2 a GO databáze *Arabidopsis thaliana* (GO BiologicalProcess; 18.12.2015)

### 3.3 Příprava proteinového vzorku a jeho následná analýza pomocí LC-MS

Rostlinný materiál jsem připravil pomocí acetonové a fenolové extrakce (kapitola 2.2). Následně jsem peptidy separoval pomocí C18 reverzní chromatografie systémem UHPLS Ultimate Dionex (nanoRSLC 3000). Drobné výkyvy v přesnosti měření hmotnostního spektrometru vyrovnával kalibrant (hmota 1221,99). Celková přesnost měření se tak dostala pod 1 ppm.

Provedl jsem komparativní analýzu srovnáním kontrolního bodu s vzorkem po 120 min ošetření MG-132 (Obr. 19).



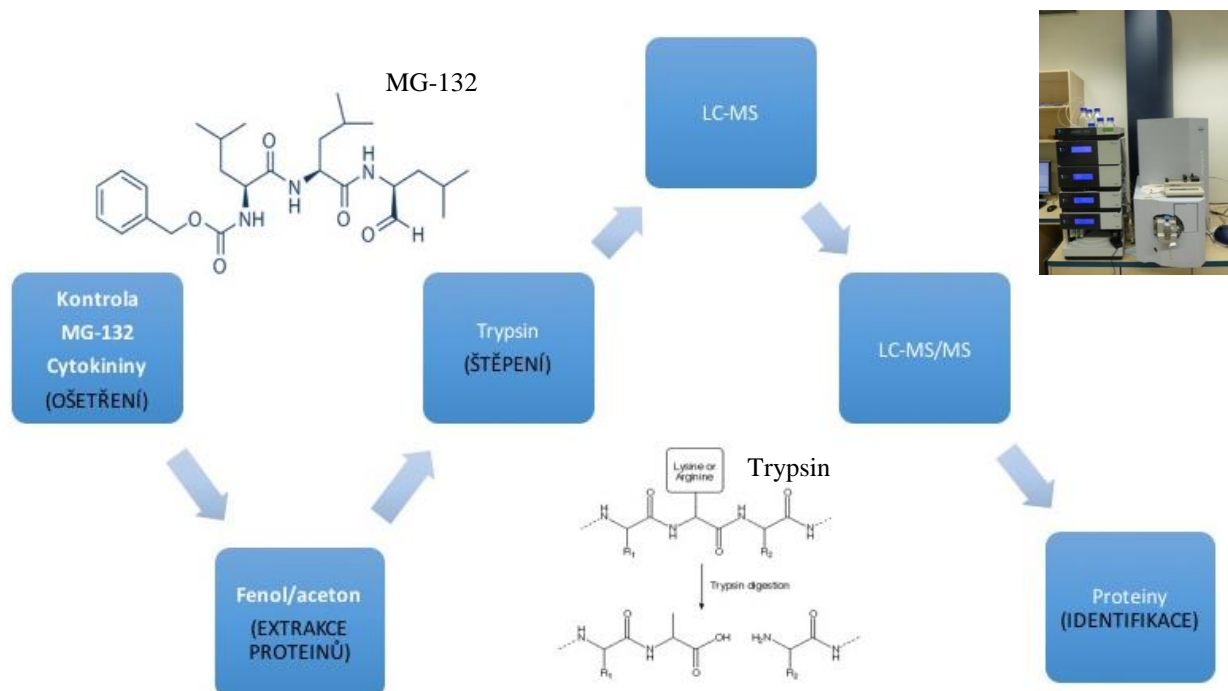
Obr. 19: PCA analýza. (A) Založená na dvou technických opakováních, každé měření v třech replikách. PC1 jasně separuje vzorky kontroly od inhibovaných. (B) Párové srovnání vzorků inhibovaných vůči kontrole. Osa x ukazuje míru rozdílu, osa y významnost (T-test), oranžově zbarvené buckety jsou statisticky významně regulované ( $p < 0,05$ ; absolutní rozdíl  $< 1,4$ ). Převzato z mé bakalářské práce (Dufek, 2014).

Navazuji na svojí bakalářskou práci, kde jsem pomocí programu Mascot našel 1401 proteinů, které byly identifikovány na základě 3929 peptidů. Bohužel výsledky z programu Mascot neodpovídali mému očekávání. Rozhodl jsem se proto vycházet z nově dostupného programu PeptidShaker, který byl publikován v Nature Biotechnology 2015. PeptidShaker integruje do počítání spekter kvantifikaci a identifikaci (NSAF), i když se nepodařilo detekovat všechny proteiny, které byly identifikovány pomocí kombinace vyhledávače Mascot a následného procesování pomocí Perkolátoru (ProteinScape 3.1), u všech identifikovaných proteinů byla zároveň provedena jejich kvantifikace, což značně usnadnilo další analýzu.



Kvantifikace, kterou jsem využil pro první analýzu, vycházela z intenzit prekursoru, tedy z MS spektra. Identifikace významné změny množství proteinu byla zjištěna na základě nalezení alespoň jednoho významně ovlivněného peptidu. Tato analýza nezohledňovala, zda daná peptidová sekvence se vyskytovala unikátně nebo se vyskytovala u více proteinů. Rovněž mohla být zatížena v přítomnosti posttranslačních modifikací, které ovlivnili zastoupení peptidů (Schulze, Usadel, 2010).

Oproti tomu kvantifikace pomocí metody NSAF vychází z množství přiřazených spekter peptidu k danému proteinu. Kvantifikace v základním přiblížení vychází z množství přiřazených spekter peptidu k danému proteinu a porovnání tohoto množství mezi dvěma různými vzorky spolu s další normalizací, která je například na úrovni porovnání velikosti proteinu, pak se stanoví poměr mezi vzorky. Tato metoda je tak lépe schopná porovnávat proteiny, u kterých dochází k modifikacím jejich peptidů právě z toho důvodu, že je tam spekter identifikovaných více. Ale je nezbytné, aby měl protein dostatečné množství peptidů, na základě kterých je identifikován (Schulze, Usadel, 2010), a proto i výsledné množství proteinů je menší než v předchozí analýze



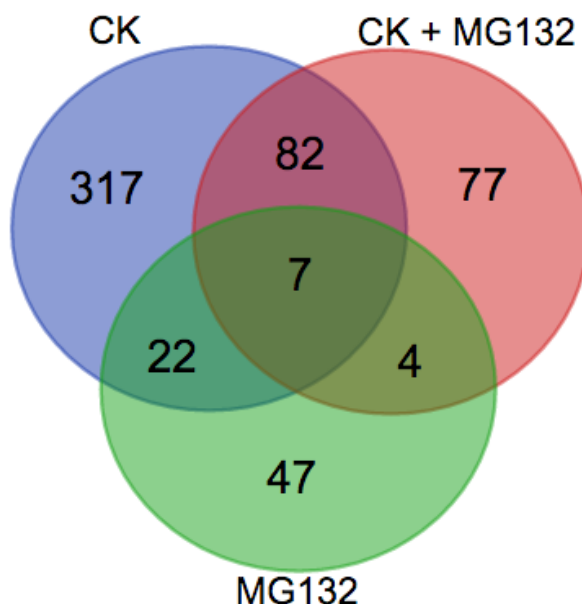
Obr. 20.: Schéma experimentu. V 7. dni jsem přenesl rostliny na 120 minut do tekutého média obsahující MG-132 v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Na posledních 15 minut jsem rostliny vystavěl působením 5  $\mu\text{M}$  tZ. Následně jsem sebral rostlinný materiál a provedl extrakci proteinů, které jsem štěpil trypsinem. Nakonec jsem provedl analýzu LC-MS/MS a vyhodnotil signifikantní proteiny.

V programu SearchGUI jsem identifikoval 1217 proteinů. Schéma experimentu je vyobrazeno na obrázku (Obr. 20). Pomocí nového způsobu a automatického opravování bylo identifikováno 678 signifikantních proteinů, naproti tomu v předchozí analýze ze Skyline bylo identifikováno 280 signifikantních proteinů. Překryv regulovaných proteinů mezi metodou NSAF (678) a MS profilování s následnou validací pomocí programu Skyline (280) je v 83 proteinů.

### 3.4 Překryv regulovaných proteinů

Pomocí programu SearchGUI a PeptidShaker jsem vyhodnotil data pro kontrolu, klíčící rostliny inhibované MG-132, rostlinky ošetřené tZ a rostlinky ošetřené MG-132 + tZ. Doba působení inhibitoru proteazomu (MG-132) byla v čase 0 a 120 minut, a to jak na semínka ošetřené cytokininy (sledována brzká odpověď na CK a to už po 15 minutách přidavku CK), tak na semínka bez ošetření. Z uvedených dat jsem udělal Vennův diagram s překryvy, lokalizace míst v buňce regulovaných a neregulovaných proteinů a nakonec teplotní mapu znázorňující, jak moc jsou proteiny podregulovány nebo naopak nadregulovány.

Vyhodnotil jsem data pomocí Vennova diagramu (Obr. 13) <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, kde jsem vložil AGI kódy jednotlivých proteinů.



Obr. 21: Překryv regulovaných proteinů. Překryv mezi proteiny nalezenými v odpovědi na cytokinin a proteiny podílejícími se v odpovědi na inhibici proteazomu je poměrně malý – pouze 7%. Nicméně souběžný účinek inhibice proteazomu a cytokininu se projevil velmi dramaticky. 428 proteinů nalezených v odpovědi na cytokinin je v přítomnosti inhibice proteazomu signifikantně ovlivněno z 40%. V případě samotné inhibice proteazomu jsem detekoval 80 významně ovlivněných proteinů. Současný přidavek MG-132 a cytokininu však většinu těchto změn skryl. Toto naznačuje, že signální dráhy cytokininu a signální dráhy vázané na proteazom, jsou vzájemně úzce propojeny a jedna ovlivňuje druhou.

### **3.5 Přehled významných změn v proteomu *Arabidopsis* v reakci na exogenní aplikaci cytokininu a inhibici proteazomu**

Průběh odpovědi na cytokininy a regulace proteinů proteazomem v časech 0 minut a 120 minut je reprezentována pomocí teplotní mapy vygenerované pomocí Excelu s funkcí podmíněného formátování (Obr. 22). V tabulce uvádím AGI kódy *Arabidopsis thaliana*, vyobrazeny jsou proteiny, které byli detekovány pouze ve všech třech variantách experimentu, a vykazovali alespoň v jedné kategorii absolutní změnu vyšší než 2. Tímto se celková sada proteinů snížila z 678 na 351.

V rámci zvolené hladiny signifikantní změny jsem našel celkem 287 proteinů, které mají opačnou regulaci v odpovědi na cytokininy v porovnání s proteiny se souběžným účinkem inhibice proteazomu a cytokininu. Z toho je 17% proteinů podregulováno a 83% proteinů nadregulováno. 64 proteinů bylo regulováno v obou případech stejně.

	CK	MG132	CK+MG-132		CK	MG132	CK+MG-132		CK	MG132	CK+MG132		CK	MG132	CK+MG132
AT1G01090.1				AT1G74060.1				AT3G13580.1				AT4G33510.1			
AT1G01170.1				AT1G76100.1				AT3G13930.1				AT4G34110.1			
AT1G01800.2				AT1G76300.1				AT3G14290.1				AT4G34120.1			
AT1G02780.1				AT1G76450.1				AT3G14420.1				AT4G34350.1			
AT1G03600.1				AT1G78320.1				AT3G14930.1				AT4G35000.1			
AT1G04690.1				AT1G78380.1				AT3G14990.1				AT4G35470.1			
AT1G05010.1				AT1G78820.1				AT3G16460.1				AT4G37930.1			
AT1G05510.1				AT1G79040.1				AT3G16520.3				AT4G37980.1			
AT1G07660.1				AT1G79230.1				AT3G17020.1				AT4G38680.1			
AT1G08200.1				AT1G80070.1				AT3G17810.1				AT4G38970.1			
AT1G08480.1				AT1G80660.1				AT3G18080.1				AT4G39260.1			
AT1G08830.1				AT2G02500.1				AT3G19450.1				AT4G39730.1			
AT1G09620.1				AT2G04170.1				AT3G20370.1				AT5G02450.1			
AT1G09640.1				AT2G04190.1				AT3G20670.1				AT5G02490.1			
AT1G09780.1				AT2G04842.1				AT3G22230.1				AT5G02500.1			
AT1G10290.1				AT2G06850.1				AT3G22460.1				AT5G02800.1			
AT1G10840.1				AT2G16360.1				AT3G23300.1				AT5G02870.1			
AT1G11750.1				AT2G17340.1				AT3G23700.1				AT5G04140.1			
AT1G12010.1				AT2G17360.1				AT3G23810.1				AT5G05780.1			
AT1G12230.1				AT2G18020.1				AT3G23990.1				AT5G07350.1			
AT1G12250.1				AT2G18960.1				AT3G24540.1				AT5G08650.1			
AT1G12410.1				AT2G19760.1				AT3G25530.1				AT5G08670.1			
AT1G12900.1				AT2G19940.1				AT3G25800.1				AT5G10240.1			
AT1G13930.1				AT2G20230.1				AT3G26450.1				AT5G10560.1			
AT1G14980.1				AT2G20580.1				AT3G26460.1				AT5G10860.1			
AT1G15690.1				AT2G21060.1				AT3G26650.1				AT5G10920.1			
AT1G15820.1				AT2G21130.1				AT3G27690.1				AT5G11420.1			
AT1G16470.1				AT2G21660.1				AT3G27830.1				AT5G13870.1			
AT1G16880.1				AT2G22450.1				AT3G27890.1				AT5G14740.1			
AT1G17100.1				AT2G24020.1				AT3G28710.1				AT5G16970.1			
AT1G17290.1				AT2G24420.1				AT3G29350.1				AT5G17170.1			
AT1G19570.1				AT2G27530.1				AT3G42640.1				AT5G17560.1			
AT1G19920.1				AT2G28190.1				AT3G46440.1				AT5G18660.1			
AT1G20580.1				AT2G30740.1				AT3G48690.1				AT5G19760.1			
AT1G20630.1				AT2G32520.1				AT3G48850.1				AT5G19940.1			
AT1G21380.1				AT2G33255.1				AT3G48930.1				AT5G20890.1			
AT1G21810.1				AT2G33800.1				AT3G49010.1				AT5G22540.1			
AT1G22410.1				AT2G33830.1				AT3G49680.1				AT5G24165.1			
AT1G22940.1				AT2G34460.1				AT3G49960.1				AT5G26280.1			
AT1G23290.1				AT2G35300.1				AT3G51190.1				AT5G27470.1			
AT1G23820.1				AT2G35840.1				AT3G52150.1				AT5G27670.1			
AT1G24510.1				AT2G36250.1				AT3G53020.1				AT5G36970.1			
AT1G26230.2				AT2G36580.1				AT3G53260.1				AT5G37640.1			
AT1G26630.1				AT2G36620.1				AT3G53580.1				AT5G38410.2			



-10 -5 -3 NR 3 5 10

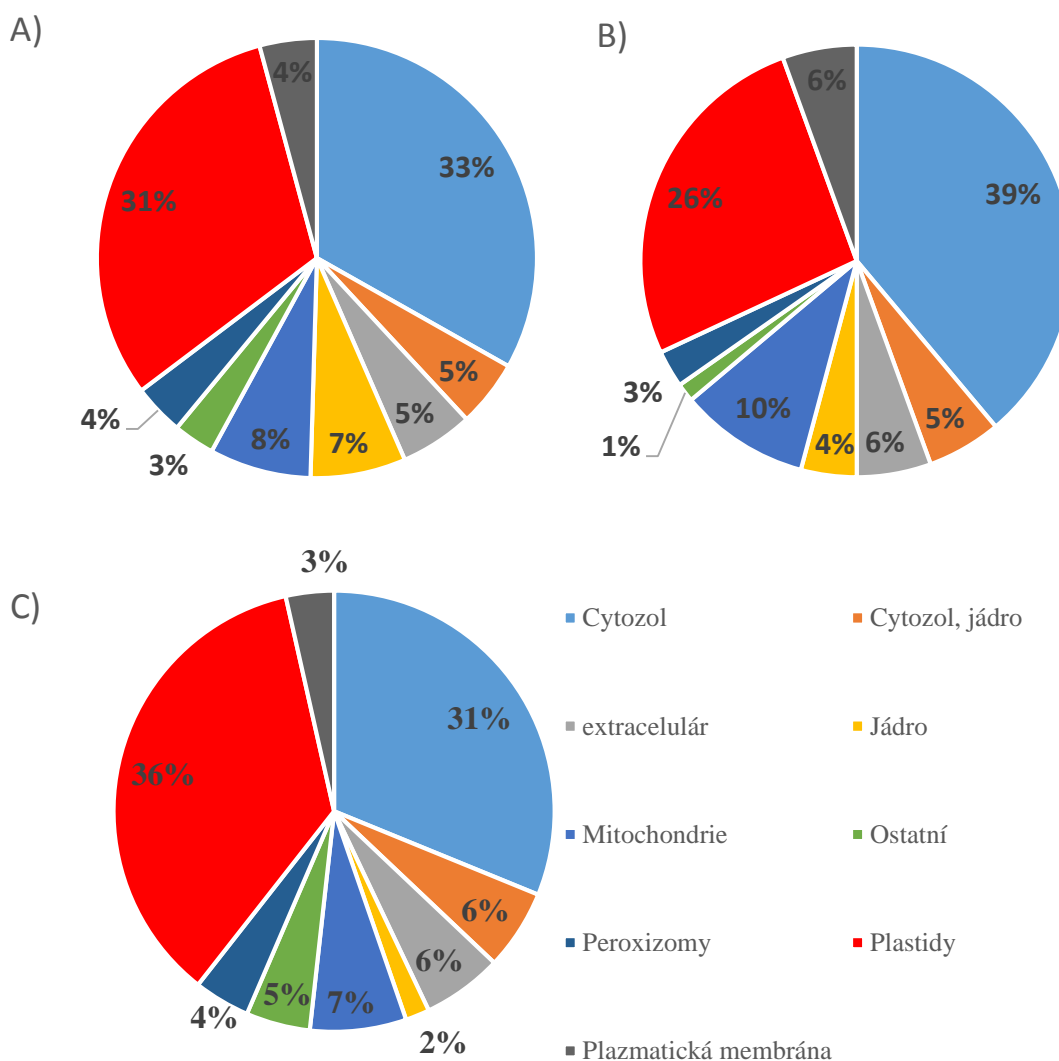
	CK	MG132	CK+MG-132		CK	MG132	CK+MG-132		CK	MG132	CK+MG132		CK	MG132	CK+MG132
AT1G26880.1				AT2G37220.1				AT3G54900.1				AT5G38470.1			
AT1G27450.1				AT2G37600.1				AT3G55360.1				AT5G38660.1			
AT1G29660.1				AT2G38140.1				AT3G55410.1				AT5G39730.1			
AT1G29670.1				AT2G39460.1				AT3G56350.1				AT5G40420.1			
AT1G30380.1				AT2G39990.1				AT3G56940.1				AT5G41520.1			
AT1G31180.1				AT2G40100.1				AT3G58450.1				AT5G41670.1			
AT1G33590.1				AT2G41530.1				AT3G58510.1				AT5G42220.1			
AT1G35160.1				AT2G41790.1				AT3G60830.1				AT5G43010.1			
AT1G43800.1				AT2G42130.1				AT3G60950.1				AT5G43640.1			
AT1G44100.1				AT2G42130.2				AT3G61260.1				AT5G43780.1			
AT1G45145.1				AT2G42130.3				AT3G61440.1				AT5G44020.1			
AT1G48350.1				AT2G42170.1				AT3G61470.1				AT5G45170.1			
AT1G48860.1				AT2G43360.1				AT3G63190.1				AT5G45930.1			
AT1G49760.1				AT2G43790.1				AT3G63490.1				AT5G47840.1			
AT1G50480.1				AT2G43945.1				AT4G01800.1				AT5G47930.1			
AT1G52230.1				AT2G44120.1				AT4G01850.1				AT5G48300.1			
AT1G53670.1				AT2G45960.1				AT4G02620.1				AT5G48480.1			
AT1G54580.1				AT2G46820.1				AT4G02930.1				AT5G48810.1			
AT1G54630.1				AT2G47470.1				AT4G04640.1				AT5G49460.1			
AT1G55020.1				AT2G47510.1				AT4G10450.1				AT5G50850.1			
AT1G55480.1				AT2G47610.1				AT4G11260.1				AT5G51970.1			
AT1G55490.1				AT2G47650.1				AT4G11720.1				AT5G53460.1			
AT1G56070.1				AT2G47730.1				AT4G12800.1				AT5G53860.4			
AT1G56450.1				AT3G01390.1				AT4G13180.1				AT5G54160.1			
AT1G57800.1				AT3G02360.1				AT4G14130.1				AT5G54640.1			
AT1G58380.1				AT3G02530.1				AT4G14210.1				AT5G54740.1			
AT1G59610.1				AT3G03960.1				AT4G14430.1				AT5G56680.1			
AT1G60680.1				AT3G04770.1				AT4G16160.1				AT5G57870.1			
AT1G60690.1				AT3G05020.1				AT4G17520.1				AT5G58140.1			
AT1G60710.1				AT3G05350.1				AT4G19210.1				AT5G59870.1			
AT1G60750.1				AT3G06860.1				AT4G21580.1				AT5G60160.1			
AT1G62380.1				AT3G08560.1				AT4G24820.1				AT5G62530.1			
AT1G63770.3				AT3G09440.1				AT4G25130.1				AT5G62670.1			
AT1G63970.1				AT3G09630.1				AT4G26750.1				AT5G65020.1			
AT1G64770.1				AT3G09680.1				AT4G27140.1				AT5G66510.1			
AT1G65700.1				AT3G09790.1				AT4G27150.1				AT5G66530.1			
AT1G66270.1				AT3G09820.1				AT4G27170.1				ATCG00120.1			
AT1G68010.1				AT3G09840.1				AT4G27440.1				ATCG00130.1			
AT1G68590.1				AT3G10060.1				AT4G27680.1				ATCG00150.1			
AT1G69526.1				AT3G10260.1				AT4G28470.1				ATCG00720.1			
AT1G69620.1				AT3G10740.1				AT4G29010.1				ATCG00830.1			
AT1G69830.1				AT3G11830.1				AT4G29680.1				ATCG01060.1			
AT1G73060.1				AT3G12930.1				AT4G30190.1				ATCG01130.1			
AT1G73970.1				AT3G13470.1				AT4G31300.1							

-10 -5 -3 NR 3 5 10

Obr. 22: Teplotní mapa regulovaných proteinů. CK - proteiny v odpovědi na cytokinin (CK vs. kontrola); MG-132 - proteiny ovlivněné inhibicí proteazomu (120 min MG-132 vs. kontrola); CK+MG-132 - efekt inhibice proteazomu na účinek cytokininu (120 min MG-132 a CK vs. kontrola); NR - nesignifikantní změna.

### 3.6 Lokalizace regulovaných proteinů

V další analýze jsem dohledal informace o lokalizaci proteinů ve variantách s proteiny v odpovědi na cytokininy, proteiny regulované proteazomem a v poslední variantě proteiny v odpovědi na cytokininy s regulací proteinů proteazomem (Obr. 23).



Obr. 23: Lokalizace identifikovaných proteinů. A) Regulované proteiny ošetřené CK bez inhibice proteazomu. B) Regulované proteiny s inhibicí proteazomu po dobu 120 min. C) Regulované proteiny ošetřené inhibicí proteazomu po dobu 120 min a CK. Lokalizaci proteinů jsem určil pomocí databáze SUBA (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au>).

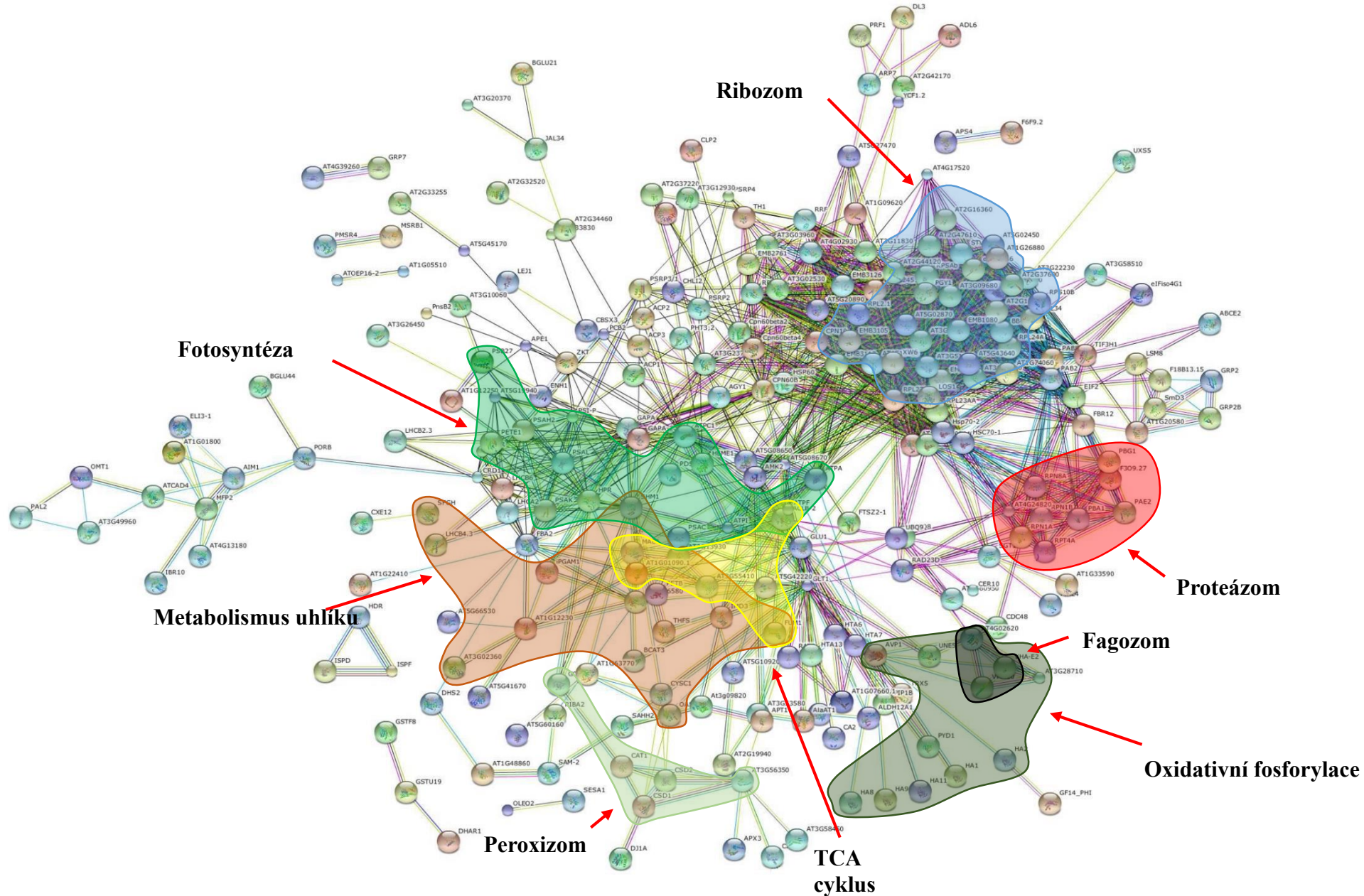
Více než polovina regulovaných proteinů má predikovanou lokalizaci v plastidech a cytozolu. Můžeme podle toho usoudit, že hlavní odpověď proteinů na cytokininy a jejich degradace proteazomem se nachází na těchto místech (Černý et. al., 2011). V případě obrázku 23A) vidíme větší procento proteinů v cytozolu, kde se nachází více proteinů v odpovědi na cytokininy. Na obrázku 23B) pozorujeme zesílenou lokalizaci v cytozolu, pravděpodobně vlivem hromadění proteinů, které nejsou degradovány inhibovaným proteazomem. Obrázek 23C) znázorňuje možný vliv spolupráce mezi proteazomem a proteiny v odpovědi na cytokininy, výsledkem je možná zesílená lokalizace regulovaných proteinů v plastidech a mírně snížená v cytozolu.

### **3.7 Analýza možné funkce nalezených proteinů**

Informace o funkci identifikovaných proteinů jsem hledal v databázi z Uniprot a TAIR. Pro první přiblížení je možné použít proteinové interakce, které napoví, v jakých procesech jsou proteiny zapojeny. K získání protein-proteinových interakcí jsem využil program String 10, v kterém jsem pomocí funkce „Enrichment“ vyhledal a následně vizualizoval hlavní skupiny proteinů podle GO (Gene Ontology) termínů a Kegg metabolických drah (Obr. 24).

Proteiny, které jsem vyhledal pomocí programu String 10 jsou z větší části všechny ve vzájemných interakcích a pomocí GO kategorií jsem zjistil, že převážná část těchto proteinů patří do procesu primárního metabolismu rostliny. Největší skupina proteinů, které mezi sebou interagují, patří do procesů probíhajících na ribozomech, dalšími hlavními skupinami jsou například proteiny zapojené do fotosyntézy, metabolismu uhlíku, proteazomu, Krebsova cyklu a fagozomu.





Obr. 24.: Schéma znázorňující protein-proteinové interakce. Jsou vyobrazeny shluky proteinů, které mají odpověď na cytokiny a jsou regulovány proteazomem. Mapu jsem vygeneroval v programu String 10 v módu evidence view.

## **3.8 Nalezené hlavní regulované proteiny v překryvu obou kategorií (odpověď na cytokininu a regulace proteinů proteazomem)**

### **3.8.1 Identifikované proteiny ovlivňující fenotyp**

Z celkových 351 identifikovaných regulovaných proteinů jsem našel 69, které mají při vyřazení fenotypový projev. Mezi nalezené mutantní fenotypy patří například abnormální kořenové vlášení, absence chloroplastu nebo dřívější kvetení. Hlavní fenotyp, který se projevuje u mutací v genech pro 20,3% všech proteinů, patří embryu s defektním vývojem. Podle studie (Bryant et al., 2011) se jedná o proteiny, které jsou kódovány jadernými geny, ale jsou lokalizovány v chloroplastech. Většina z těchto proteinů je nezbytná pro správný růst a vývoj rostliny. Tyto proteiny se účastní procesů jako je biosyntéza enzymů, modifikace proteinů a proteiny potřebné pro korektní expresi chloroplastového genomu, který je potřebný pro správný globulární vývoj embrya a pro syntézu chlorofylu (Bryant et al., 2011). Ze studie vychází, že mnou nalezené regulované proteiny, které jsou ovlivněny interakcí cytokininů s proteazomem hrají nejdůležitější role již v počátečním vývoji rostliny.

### **3.8.2 Ribozomální proteiny**

Nalezl jsem celkem 30 regulovaných proteinů, které jsou zapojeny do procesů probíhajících na ribozomech. Mezi nalezené proteiny patří například ribozomální podjednotky nacházející se v cytoplazmě 60S ribozomální protein L7-3, 40S ribozomální protein Sa-2, 60S ribozomální protein L9-2, 40S ribozomální protein S2-1, 60S ribozomální protein L13-1 a 60S kyselý ribozomální protein P0-2 (Černý et al., 2013). Různě regulované ribozomální proteiny pravděpodobně interagují se základním molekulárním mechanismem, tuto hypotézu dokazuje publikace (Horiguchi et al., 2011), která ukazuje, že ribozomální proteiny významně přispívají k rozvoji listu *Arabidopsis thaliana*.

### **3.8.3 Primární metabolismus**

Mezi hlavní proteiny primárního metabolismu patří například pyruvát dehydrogenázový komplex, 2-oxoglutarát dehydrogenáza, fumarát hydrogenáza, ATP citrát-lyáza, 6-fosfoglukonát dehydrogenáza, 2,3-bisfosfoglycerát-nezávislá fosfoglycerát mutáza 1.

Pyruvát dehydrogenázový komplex (AT1G01090.1), který se nachází v mitochondriích, katalyzuje ireverzibilní konverzi pyruvátu na acetyl-CoA a CO<sub>2</sub>. Po konverzi je acetyl-CoA využíván v citrátovém cyklu (Randall et al., 1977). Komplex obsahuje mnoho kopií tří enzymů:

pyruvát dehydrogenázu (E1), dihydrolipoamid acetyltransferázu (E2) a lipoamid dehydrogenázu (E3) (Johnston et al., 1997).

2-oxoglutarát dehydrogenáza (AT3G55410.1) se nachází v mitochondriích, kde je klíčovým enzymem, protože významně ovlivňuje metabolický tok v citrátovém cyklu. Provádí konverzi z 2-oxoglutarátu + koenzymu A + NAD(+) na sukcinyl-CoA, NADH a CO<sub>2</sub>. Enzym je složen z tří podjednotek, 2-oxoglutarát dehydrogenáza, dihydrolipoamid sukcinyltransferáza a poslední podjednotka je stejná jako u proteinu pyruvát dehydrogenázy.

ATP citrát-lyáza je primárním enzymem zodpovědným za syntézu acetyl-CoA v cytozolu, který je dále použit k syntéze mastných kyselin, biosyntéze isoprenoidů, flavonoidů a malonátových derivátů. Je důležitý pro normální růst a vývoj rostliny (Fatland et al., 2002).

6-phosphoglukonát dehydrogenáza (AT3G02360) je významným enzymem v pentózovém cyklu, v kterém katalyzuje oxidativní dekarboxylaci z 6-fosfoglukonátu na ribulozu 5-fosfát a CO<sub>2</sub> (Adams et al., 1983).

2,3-bisfosfoglycerát-nezávislý fosfoglycerát mutáza 1 (AT1G09780.1) katalyzuje v 8. kroku glykolýzy transfer fosfátové skupiny z C-3 na C-2, výsledkem je konverze z 3-fosfo-D-glycerátu na 2-fosfo-D-glycerát a to skrze intermediátu 2,3-bisfosfoglycerátu.

Dalším regulovaným proteinem, který hraje klíčovou roli v citrátovém cyklu je fumarát hydratáza (AT2G47510.1), která provádí konverzi fumarátu+H<sub>2</sub>O na malát.

Několik hlavních proteinů bylo nalezeno i v systému fotosyntézy, proteiny patřící do fotosystému II jsou například fotosystém II 10 kDa polypeptid, Fotosystém II opravný protein PSB27-H1, který opravuje a zpomaluje poškození fotosystému. Ve fotosystému I jsem našel regulované proteiny fotosystém I reakční centrum podjednotky VI-2, fotosystém I reakční centrum podjednotky psaK a fotosystém I železo-sýranové centrum jenž je apoproteinem centra fotosyntézy I umožňující fotochemickou reakci a přenos elektronu na ferredoxin.

Mezi poslední dva zajímavé regulované proteiny v primárním metabolismu patří ATP syntáza (podjednotka alfa) a ATP syntáza (gama řetězec 1). Oba proteiny se nachází v chloroplastové membráně a pomocí protonového gradientu umožňují syntézu ATP z ADP.

### 3.8.4 Proteazom

Mezi další hlavní proteiny, které jsem našel v odpovědi na cytokininy a zároveň jsou regulovány proteazomem patří:

Protein „26S proteazom ne-ATPáza regulační podjednotka 2 homolog A“ má klíčovou roli při vývoji embrya. Protein exprimují dva paralogní geny RPN1a a RPN1b (regulační částice). Ve studii vlivu toho proteinu na embryogenezi (Brukhin et al., 2005) bylo zjištěno, že při použití

mutantu v genu RPN1a dochází k letalitě embrya, ale při použití mutantu v genu RPN1b dochází k normálnímu vývoji. Dále z výsledků studie vychází, že RPN1b může být pod kontrolou genu RPN1a, proto je správné fungování genu RPN1a nezbytné pro korektní průběh embryogeneze, kde se zároveň může účastnit proces degradace specifických proteinů, zvláště cyklin B1, který vlivem mutantu RPN1a není degradován a nedochází tak k buněčnému dělení (Zhou et al., 2002).

Další nalezené proteiny jsou podjednotky proteazomu, které umožňují aktivaci ubikvitinu pomocí ATP, napojení ubikvitinu na protein určený k degradaci a samotné napojení na proteazom. Mezi ně patří například 26S proteazom ne-ATPáza regulační podjednotka 6 homolog, 26S proteáza regulační podjednotka 10B homolog A, 26S proteazom ne-ATPáza regulační podjednotka 7 homolog A, proteazom podjednotka typu alfa/beta.

Našel jsem celkem 3 regulované proteiny, které se účastní přímo procesů ve fagozomu, jedná se o proteiny V-typu proton ATPáza podjednotka F/E2/G1, které jsou součástí vakuolárního komplexu, kde mají katalytickou a hydrolitickou funkci, která způsobuje snížení pH, díky kterému je substrát určený k degradaci rozkládán (Riazanski et al., 2015).

## 4 ZÁVĚR

Proteazom má klíčový vliv na regulaci signálních drah hormonů. Mezi nejvíce prozkoumané patří dráhy auxinů, kyseliny abscisové, gibberelinů a kyseliny jasmonové. V mé diplomové práci rozšiřuji výsledky, které jsem získal v bakalářské práci. Zaobírám se vlivem vzájemné interakce signální cesty cytokininů a dráhy proteazomu. Experimentální část měla za cíl sledovat změnu proteomu *Arabidopsis thaliana* při narušení degradace proteinů pomocí proteazomové dráhy a jeho efekt na signalizaci cytokininů.

V první části experimentu jsem se zabýval účinkem proteazomu. Zjistil jsem, že při určité koncentraci inhibitoru proteazomu dochází k potlačení účinku cytokininů. Ve snaze více pochopit vztah mezi cytokininem a proteazomem jsem provedl analýzu předchozích proteomických studií, které byly v minulosti provedeny. Zjistil jsem, že z 690 proteinů v odpovědi na cytokininy bylo 59% proteinů nazeleno také mezi ubikvitinovanými proteiny. Na základě tohoto výsledku jsem provedl funkční analýzu nalezených proteinů a zjistil jsem, že dochází k interakci signální dráhy cytokininů a dráhy proteazomu u 410 proteinů. Těchto 410 proteinů je zastoupeno například v metabolismu sacharidů a malých molekul.

Jako poslední krok této práce jsem provedl analýzu efektu inhibice proteazomu na brzkou odpověď cytokininu. Z celkového množství 1217 proteinů jsem pomocí dvou nezávislých zpracování LC-MS dat identifikoval 678 množství proteinů, které vykazovaly významné změny v reakci na inhibici proteazomu či přidavek cytokininu. Hlubší analýza těchto proteinů ukázala, že se podílí převážně na primárním metabolismu a jejich mutace vede z velké části k letalitě.

Srovnání mezi vzorkem ošetřením cytokininem a kontrolním ukázalo, že inhibice proteazomu významně změní regulace u 40% proteinů v brzké odpovědi na cytokinin.

Tato práce otevírá další prostor pro hlubší analýzu interakce mezi cytokininovou signalizací a proteazomovou dráhou, ať již na základě fyziologických experimentů, nebo výsledků proteomické analýzy. Vhodným doplněním by bylo například sledování fosfoproteomu.

Tato práce by nebyla možná bez finanční podpory grantů P305/12/2144 (GAČR), TE02000177 (TAČR) a podpory MŠMT v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601).

## 5 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Adams M. J., Archibald I. G., Bugg C. E., Carne A., Gover S., Helliwell J. R., White S. W., 1983: The three dimensional structure of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase at 2.6 Å resolution. *The EMBO journal*, 2(6), 1009.

An F., Zhao Q., Ji Y., Li W., Jiang Z., Yu X., Zhang S., 2010: Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(7), 2384-2401.

Anderson N. L., Anderson N. G., 1998: Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19(11), 1853-1861.

Asmelash F., 2016: Techniques and applications of proteomics in plant ecophysiology.

Bailey-Serres J., Fukao T., Gibbs D. J., Holdsworth M. J., Lee S. C., Licausi F., van Dongen J. T., 2012: Making sense of low oxygen sensing. *Trends in plant science*, 17(3), 129-138.

Bjørkøy G., Lamark T., Brech A., Outzen H., Perander M., Øvervatn A., Johansen T., 2005: p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology*, 171(4), 603-614.

Blackstock W. P., Weir, M. P., 1999: Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in biotechnology*, 17(3), 121-127.

Bolton A. E., Hunter W. M., 1973: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a <sup>125</sup>I-containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. *Biochemical Journal*, 133(3), 529-538.

Brukhin V., Gheyselinck J., Gagliardini V., Genschik P., Grossniklaus U., 2005: The RPN1 subunit of the 26S proteasome in Arabidopsis is essential for embryogenesis. *The Plant Cell*, 17(10), 2723-2737.

Bryant N., Lloyd J., Sweeney C., Myouga F., Meinke D., 2011: Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in Arabidopsis. *Plant physiology*, 155(4), 1678-1689.

Chandramouli K., Qian P. Y., 2009: Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Human genomics and proteomics*, 1(1).

Cortleven A., Schmülling T., 2015: Regulation of chloroplast development and function by cytokinin; *Journal of Experimental Botany - Advance Access*, publikováno online na: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2015/04/03/jxb.erv132.abstract>

Černý M., Kuklová A., Hoehenwarter W., Fragner L., Novák O., Rotková G., Weckwerth W., 2013: Proteome and metabolome profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* identifying both distinct and similar responses to cytokinin down- and up-regulation. *Journal of experimental botany*, 64(14), 4193-4206.

Černý M., Novák J., Habánová H., Cerna H., Brzobohatý B., 2015: Role of the proteome in phytohormonal signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*.

Černý, M., Dyčka, F., Bobál'ová, J., & Brzobohatý, B. (2011). Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling. *Journal of experimental botany*, 62(3), 921-937.

Dharmasiri S., Estelle M., 2002: The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol. Biol.* 49, s. 401–409.

Dufek M.:2014: Efekt inhibice proteasomu na proteom *Arabidopsis thaliana*.

Fatland B. L., Ke J., Anderson M. D., Mentzen W. I., Cui L. W., Allred C. C., Wurtele E. S., 2002: Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130(2), 740-756.

Garzón M., Eifler K., Faust A., Scheel H., Hofmann K., Koncz C., Bachmair A., 2007: PRT6/At5g02310 encodes an *Arabidopsis* ubiquitin ligase of the N-end rule pathway with arginine specificity and is not the CER3 locus. *FEBS letters*, 581(17), 3189-3196.

Gibbs D. J., Bacardit J., Bachmair A., Holdsworth M. J., 2014: The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends in cell biology*, 24(10), 603-611.

Gibbs D. J., Bacardit J., Bachmair A., Holdsworth M. J., 2014: The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends in cell biology*, 24(10), 603-611.

Gygi S. P., Rochon Y., Franz B. R., Aebersold R., 1999: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 1720-1730.

Horiguchi G., Mollá-Morales A., Pérez-Pérez J. M., Kojima K., Robles P, Ponce M. R., Micol J. L., Tsukaya H., 2011: Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *The Plant Journal* 65, 724–736.

Hu R. G., Sheng J., Qi X., Xu Z., Takahashi T. T., Varshavsky A., 2005: The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. *Nature*, 437(7061), 981-986.

Johansen T., Lamark T. 2011: Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296.

Johnston M. L., Luethy M. H., Miernyk J. A., Randall D. D., 1997: Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* plastid pyruvate dehydrogenase subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1321(3), 200-206.

Kemeny D. M., Challacombe S. J., 1988: ELISA and other solid phase immunoassays: theoretical and practical aspects. John Wiley & Sons.

Kieber J. J., Schaller G. E., 2014: Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, e0168.

Kim H. J., Chiang Y. H., Kieber J. J., Schaller G. E.: 2013: SCFKMD controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 10028-10033.

Kim H. K., Kim R. R., Oh J. H., Cho H., Varshavsky A., Hwang C. S., 2014: The N-terminal methionine of cellular proteins as a degradation signal. *Cell*, 156(1), 158-169.

Kirkin V., McEwan D. G., Novak I., Dikic I., 2009: A role for ubiquitin in selective autophagy. *Molecular cell*, 34(3), 259-269.

Komander D., Rape M., 2012: The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229

Lee T. I., Young R. A.:2000: Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics*, 34(1), 77-137.

Lippai M., Lów P., 2014: The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *BioMed research international*, 2014.

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.

Martens S, Bachmair, A. 2015: How cells coordinate waste removal through their major proteolytic pathways. *Nature Cell Biology*, 17(7), 841-842.

Martens S., Bachmair A., 2015: How cells coordinate waste removal through their major proteolytic pathways. *Nature Cell Biology*, 17(7), 841-842.

Mur L. A., Mandon J., Persijn S., Cristescu S. M., Moshkov I. E., Novikova G. V., Gupta K. J., 2013: Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants*, 5, pls052.

Ong S. E., Mann M., 2005: Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*, 1(5), 252-262.

Perkins, N. D., 2007: Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(1), 49-62.

Randall D. D., Rubin P.M., Fenko M., 1977: Plant pyruvate dehydrogenase complex purification, characterization and regulation by metabolites and phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 485, 336–349.



Riazanski V., Gabdoulkhakova A. G., Boynton L. S., Eguchi R. R., Deriy L. V., Hogarth D. K., Shevchenko P., 2015: TRPC6 channel translocation into phagosomal membrane augments phagosomal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), E6486-E6495.

Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmülling T., 2006: Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, 18(1), 40-54.

Sakakibara H., 2006: Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57, 431-449.

Schlögelhofer P., Garzón, M., Kerzendorfer, C., Nizhynska, V., Bachmair, A., 2006: Expression of the ubiquitin variant ubR48 decreases proteolytic activity in Arabidopsis and induces cell death, 223(4):684-97.

Schulze W. X., Usadel B., 2010: Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annual review of plant biology*, 61, 491-516.

Shemorry A., Hwang C. S., Varshavsky A., 2013: Control of protein quality and stoichiometries by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Molecular cell*, 50(4), 540-551.

Taiz L., Zeiger E., 2010: *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. ISBN 978-0- 87893-507-9.

Tasaki T., Sriram S. M., Park K. S., Kwon Y. T., 2012: The N-end rule pathway. *Annual review of biochemistry*, 81, 261.

Tokunaga H., Kojima M., Kuroha T., Ishida T., Sugimoto K., Kiba T., Sakakibara H., 2012: Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin inactivation. *Plant J.* 69, 355–365.

Varshavsky A., 2011: The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.* 20, 1298–1345.

Wallmeroth N., Anastasia A. K., Harter K., Berendzen K. W., Mira-Rodado V., 2016): Arabidopsis response regulator 22 inhibits cytokinin-regulated gene transcription in vivo. *Protoplasma*, 1-5.

Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Humphrey-Smith I., 1995: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16(1), 1090-1094.

Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmulling T., 2001: Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10487–10492.

Zhou X. Y., Wang X., Hu B., Guan J., Iliakis G., Wang Y., March 2002: An ATM-independent S-phase checkpoint response involves CHK1 pathway. *Cancer Res.* 62 (6): 1598–603.

Zürcher E., Müller B., 2016: Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function—Advances and New Insights. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 324, 1-38.

## 6 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1.: Zjednodušený přehled fytohormonálních drah
- Obr. 2.: Ubikvitin-proteazomový systém a autofagie
- Obr. 3.: Znázornění tří typů enzymů E3
- Obr. 4.: Struktura proteinu p62 a jeho proteinové interakce
- Obr. 5.: Pravidlo dráhy Arg/Ac/N-konce
- Obr. 6.: Cytokinin trans-zeatin
- Obr. 7.: A) Izoprenoidní formy cytokininu. B) Aromatické formy cytokininů
- Obr. 8.: Schéma biosyntézy trans-zeatinu
- Obr. 9.: Signální cesta cytokininů
- Obr. 10.: A) schéma zapojení KMD do CK signalizace
- Obr. 11.: Petriho miska s klíčovými rostlinami po 5. dni v kultivačním boxu.
- Obr. 12.: Molekula MG-132
- Obr. 13.: Podobně fungující inhibitory jako MG-132
- Obr. 14.: Efekt exogenně aplikovaného inhibitoru proteazomu MG-132
- Obr. 15.: Efekt exogenní aplikace cytokininů a inhibitoru proteazomu MG-132 na délku kořínků semenáčků
- Obr. 16.: Vliv délky kořínků transgenní *Arabidopsis thaliana* na modulovanou hladinu cytokininů a inhibovaný proteazom.
- Obr. 17,21.: Překryv regulovaných proteinů
- Obr. 18.: Zastoupení funkcí proteinů v odpovědi na cytokininy (A), identifikovaných cílů ubikvitinace (B) a překryvu obou kategorií (C)
- Obr. 19: PCA analýza
- Obr. 20.: Schéma experimentu
- Obr. 22: Teplotní mapa regulovaných proteinů
- Obr. 23: Lokalizace identifikovaných proteinů
- Obr. 24: Schéma znázorňující protein-proteinové interakce

## 7 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Postup extrakce proteinů.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2D PAGE - 2D polyakrylamidová elektroforéza

ABA - kyselina abscisová

Ac – acetylace

AHK – receptory cytokininů

AHPs - histidin fosfotransferové proteiny

Arg – arginin

ARRs - transkripční faktory

Asn - asparagin

Asp – kyselina asparagová

ATE1 – arginyl transferáza

ATEs - arginyl-tRNA transferázy

ATG8 – autofágní příbuzný protein

ATP/ADP - adenosin(tri/di)fosfát

AUX - Auxin

BAP – nebzlaminopurin

Bip – chaperon z rodiny Hsp70

CK – cytokininy

CK1 – cytokinin independent1

CKX - cytokinin oxidáza/dehydrogenáza

CRF – transkripční faktor

CUL1 – cullin 1 podjednotka ligázy 3

DMAPP – dimetylallyl difosfát

DNA - deoxyribonukleová kyselina

E1/2/2 – enzym 1/2/3

ER - endoplazmatické retikulum

F-BOX - podjednotka ligázy 3

GA - Giberelin

Gln - glutamin

Glu – kyselina glutamová

GO – Gene Ontology  
HECKT E3 - podjednotka ligázy 3  
histidinových kináz (AHKs),  
IPT – Isopentenyltransferáza  
JA – Kyselina jasmonová  
LC3B – součást ATG8  
LIR – motiv na p63  
LOG – LONELY GUY  
MetAPs - methionin aminopeptidáza  
MetEPs - methionin endopeptidáza  
NATs - Nt acetyltransferáza  
NSAF - normalized spectral abundance factor  
Nt- N-konci  
NTAN/NTAQ - Asn/ Gln-specifické Nt amidázy  
p62 – receptor rozpoznávající ubikvitin  
PB1 – doména připojená k N-konci proteinu p63  
PCO - rostlinné cysteinové oxidázy  
PRT1/PRT6 - proteolýza  
RBX1 - podjednotka ligázy 3  
RIA - radioaktivní imunoesej  
RING – podjednotka ligázy 3  
SKP1 - podjednotka ligázy 3  
tZ – tranz-zeatin  
UBA – doména na C-konci proteinu p62  
UBR1 (ubikvitin rozpoznávací komponenta 1  
UPS - ubikvitin-proteazomový systém  
VII ERF - transkripční faktor odezvy etylenu  
ZZ – doména zinkový prst

## 9 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



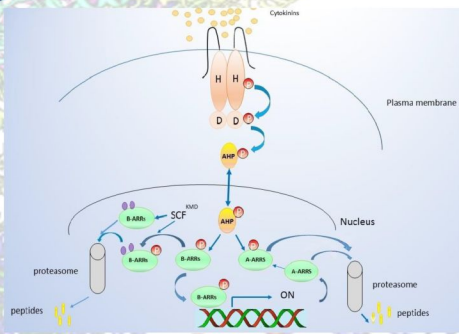
Laboratory of Plant Molecular Biology, Institute of Biophysics AS CR, v.v.i and CEITEC Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

## 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.

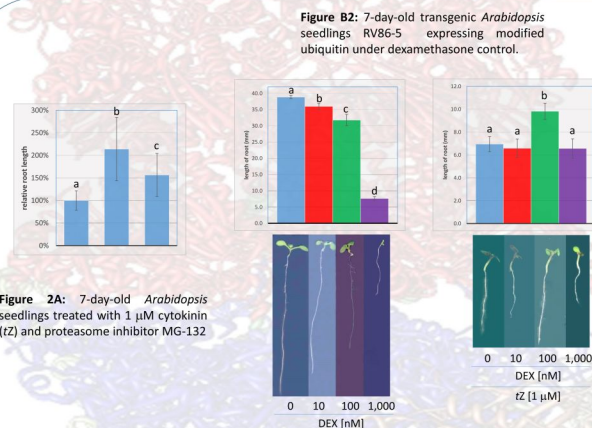
## Cytokinins

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

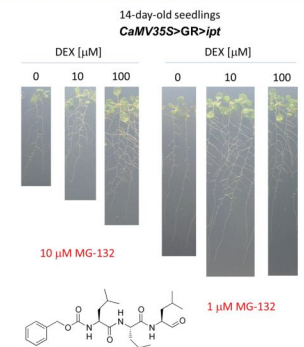
Seeds of transgenic *Arabidopsis thaliana* lines V86-5 and *CaMV35S>GR>ipt* lines, and the corresponding wild-type were surface-sterilized and sown on 1% (w/v) agar containing full Murashige and Skoog medium (pH 5.7) supplemented with dexamethasone (DEX), cytokinin *trans*-zeatin, MG-132 or mock. Seeds 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

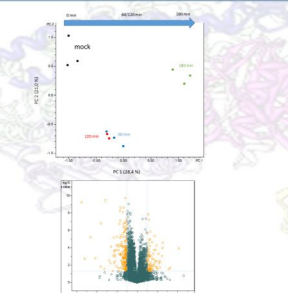
**Figure 2B:** 7-day-old transgenic *Arabidopsis* seedlings RV86-5 expressing modified ubiquitin under dexamethasone control.



**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.