



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Studium auxin-interagujících proteinů v *Arabidopsis thaliana*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Markéta Rožková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Rožková
Název práce	Studium auxin-interagujících proteinů v <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení chemické biologie
Vedoucí práce	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Tato práce pojednává o studiu auxin-interagujících proteinů v huseníčku rolním (<i>Arabidopsis thaliana</i>) vybranými proteomickými metodami. Proteiny byly izolovány pomocí nativní extrakce, která hraje klíčovou roli zejména při zachování přirozené konformace proteinů. Význam nativní extrakce byl uplatněn v dalším kroku experimentu, kterým byla afinitní chromatografie. Nativní forma proteinů byla důležitým faktorem pro přirozenou afinitu proteinů k ligandům.</p> <p>Eluované proteiny byly frakcionovány a následně identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií (ESI-QTOF). Získané informace mohou posloužit k objasnění role auxin-interagujících proteinů v mechanismu účinku auxinu na rostlinu a zároveň doplnit znalosti o vlastnostech auxinu a jeho fyziologických účincích.</p>
Klíčová slova	Auxin, <i>Arabidopsis thaliana</i> , afinitní chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Markéta Rožková
Title of thesis	Study of auxin-binding proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of chemical biology
Supervisor	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>The thesis deals with the study of auxin-binding proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i> using the chosen proteomic methods. The proteins were isolated using the native protein extraction which plays a key role especially while maintaining the natural conformations of proteins. The significance of native protein extraction was utilized in the next step of the experiment which was affinity chromatography. The native state of proteins was an important factor for natural affinity of proteins for ligands.</p> <p>The eluted proteins were fractionated and then identified using tandem mass spectrometry (ESI-QTOF). The gathered information can serve to clarify the role of auxin-binding proteins in the mechanism of effect of auxin on plant and at the same time, complement the knowledge about the characteristics of auxin and its physiological effects.</p>
Keywords	Auxin, <i>Arabidopsis thaliana</i> , affinity chromatography, mass spectrometry
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 8.8.2021

Podpis:

Poděkování

Touto cestou bych chtěla v první řadě poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Radimu Simerskému, Ph.D. za veškerý čas, trpělivost a vstřícný přístup, který mi při psaní práce věnoval. Další díky patří Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za pomoc při analýze vzorků a Mgr. Kristýně Bielešové za přípravu ligandů pro moji bakalářskou práci.

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1 Úvod a cíle práce	10
2 Teoretická část	11
2.1 Arabidopsis thaliana	11
2.2 Fytohormony	11
2.3 Auxiny	12
2.3.1 Historie objevu auxinů	14
2.3.2 Výskyt a transport auxinů	14
2.3.3 Hlavní fyziologické účinky auxinu	17
2.3.4 Biosyntéza auxinů	18
2.3.5 Regulace hladiny auxinu	19
2.3.6 Mechanismus účinku auxinů	21
2.4 Proteomika	22
2.4.1 Proteomika a její cíle	22
2.4.2 Zpracování vzorku a extrakce proteinů	23
2.4.3 Extrakce tuhou fází	24
2.4.4 Stanovení koncentrace proteinů	25
2.4.5 Vybrané proteomické metody	26
3 Experimentální část	30
3.1 Materiál a chemikálie	30
3.2 Přístrojové vybavení	31
3.3 Metody	31
3.3.1 Nativní extrakce proteinů z Arabidopsis thaliana	31
3.3.2 Kvantifikace proteinů po extrakci	32
3.3.3 Afinitní čištění proteinů	33

3.3.4	Štěpení proteinů	34
3.3.5	Přechištění a frakcionace peptidů	35
3.3.6	LC-MS/MS analýza	36
3.3.7	Zpracování dat	37
4	Výsledky a diskuse	37
4.1	Nativní extrakce a kvantifikace proteinů	37
4.2	Afinitní čištění	38
4.3	MS analýza a zpracování dat	40
5	Závěr	48
6	Seznam literatury	49

Seznam použitých zkratk

2DE – dvourozměrná elektroforéza

ABCB – přenašeč ATP-binding cassette subfamily B

ACN – acetonitril

AUX/LAX – přenašeč AUXIN1/LIKE-AUX1

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamono]-1-propansulfonát

DTT – dithiotreitol

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EI – elektronová ionizace

ESI – ionizace elektrosprejem

FA – kyselina mravenčí

FT-ICR – Fouierova transformace iontové cyklotronové rezonance

GC-MS – z angl. gas chromatography–mass spectrometry

GH3 – syntetáza z rodiny Gretchen hagen 3

IAA – kyselina indolyl-3-octová

iaaH – indol-3-acetamidhydroláza

iaaM – tryptofan-2-monooxygenáza

IAM – indolylacetamid

IAN – indol-3-acetonitril

IAOx – indol-3-acetaldoxim

IBA – kyselina indolyl-3-máselná

IGs – indol-glukosináty

IPyA – indolyl-3-pyruvát

IEF – izoelektrická fokusace

IPG – imobilizovaný pH gradient

IT – iontová past

LC – kapalinová chromatografie

LLE – extrakce kapalina-kapalina

MALDI – maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace

MS – hmotnostní spektrometrie

NIT – rostlinná nitriláza

NPA – kyselina 1-N-naftylftalamová

NRT1.1 – dusičnanový přenašeč 1.1

OxDAO – dioxygenáza pro oxidaci auxinu
OxIAA – oxindol-3-octová kyselina
PAA – kyselina fenylactová
PILS – přenašeč PIN-LIKES
PMSF – fenylmethylsulfonyl fluorid
Q – kvadrupól
Q-TOF – hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem délky letu
SDS – dodecylsírán sodný
SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíránu sodného
SPE – extrakce tuhou fází
TAA1 – tryptofanová aminotransferáza Arabidopsis 1
TAM – tryptamin
TCEP – triskarboxyethylfosfin
TEAB – bikarbonát triethylamonný
TIBA – kyselina 2,3,5-trijodbenzoová
TOF – analyzátor délky letu
VAS1 – pyridoxal-fosfát-dependentní aminotranferázy REVERSAL OF SAV3
PHENOTYPE 1
YUC – YUCCA z rodiny flavonoidních monoxygenáz

1 Úvod a cíle práce

V této bakalářské práci jsem se zabývala studiem auxin-interagujících proteinů v *Arabidopsis thaliana* využitím vybraných proteomických metod.

Prvním cílem práce byla izolace proteinů z rostlinného materiálu nativní extrakcí, jejíž význam spočívá v zachování původní struktury proteinů, což zachovává jejich přirozené interakce s ligandem. Dalším stanoveným cílem bylo purifikovat proteiny interagující s kyselinou indolyl-3-octovou (IAA) afinitní chromatografií a identifikovat je pomocí hmotnostní spektrometrie s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF a s ionizací elektrosprejem.

Auxiny jsou organické kyseliny, které jsou v rostlině zapojeny do řady významných fyziologických procesů. Nejvýznamnějším přirozeně se vyskytujícím zástupcem auxinů je kyselina indolyl-3-octová, která je v textu popisována, a s níž se pracovalo v průběhu celé této práce. Tato sloučenina obsahující aromatický skelet s karboxylovou skupinou v postranním řetězci v rostlině stimuluje dlouhivý růst, má význam ve fototropismu a gravitropismu a je nedílnou součástí apikální dominance. Všechny tyto fyziologické účinky a mnoho dalších ji činí nedílnou součástí života rostliny. Za zprostředkování odpovědi na fyziologický účinek auxinu jsou zodpovědné signální dráhy v rostlině. Základní signální dráhu auxinu tvoří komplex Transport Inhibitor Response 1/ Auxin signaling F-Box protein (TIR1/AFB) (Enders & Strader, 2015). Donedávna se také předpokládalo, že klíčovou roli v netranskripčních auxinových reakcích hraje Auxin-binding protein 1 (ABP1). Zdá se ale, že tato hypotéza byla při bližším studiu mutantu *abp1* vyvrácena. Mutantní rostliny *abp1* nevykazovaly žádné vývojové vady, což dokazuje fakt, že ABP1 nehraje klíčovou roli v signalizaci (Gao et al., 2015). Získání dalších informací o auxin-interagujících proteinech by mohlo přispět k doplnění informací o funkci těchto proteinů v rostlině.

2 Teoretická část

2.1 *Arabidopsis thaliana*

Huseníček rolní neboli *Arabidopsis thaliana* je jednoletá bylina taxonomicky zařazená do čeledi *Brassicaceae* neboli brukvovité ve skupině krytosemenných cévnatých rostlin, do níž spadají i olejniny, brokolice, zelí, hořčice a další. První zmínka o této rostlině pochází z roku 1577, kdy byla nalezena v pohoří Harz v severním Německu lékařem Johannesem Thalem, od nějž později převzala druhové jméno. Své současné jméno *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. dostala od Gustava Heynholda v roce 1942 (Krämer, 2015). Popularita této rostliny jakožto modelového organismu začala stoupat okolo roku 1980 a to díky několika vlastnostem užitečným pro genetický výzkum. Tato rostlina totiž disponuje krátkou generační dobou, malou velikostí, je relativně nenáročná na pěstební podmínky a pomocí samoopylení produkuje velké množství semen (Koorneef & Meinke, 2010).

Díky těmto vlastnostem byla zařazena do praktického výzkumu F. Laibachem, který mimo jiné zjistil počet chromozomů této rostliny ($2n=10$), což huseníček řadí v jeho rodu mezi zástupce s nejnižším počtem chromozomů. V roce 2000 byla osekvenována a zveřejněna kompletní sekvence referenčního genomu *Arabidopsis*, čítající 125 Mb a 25000 genů (Krämer, 2015; Szymańska et al., 2015). Tento poměrně malý genom činí huseníček nejpoužívanějším modelovým objektem pro výzkum. Umožňuje totiž snadno a levně vytvořit genomovou knihovnu chromozomálních fragmentů a zároveň nalézá velké využití v molekulárním klonování (Myerowitz, 1987).

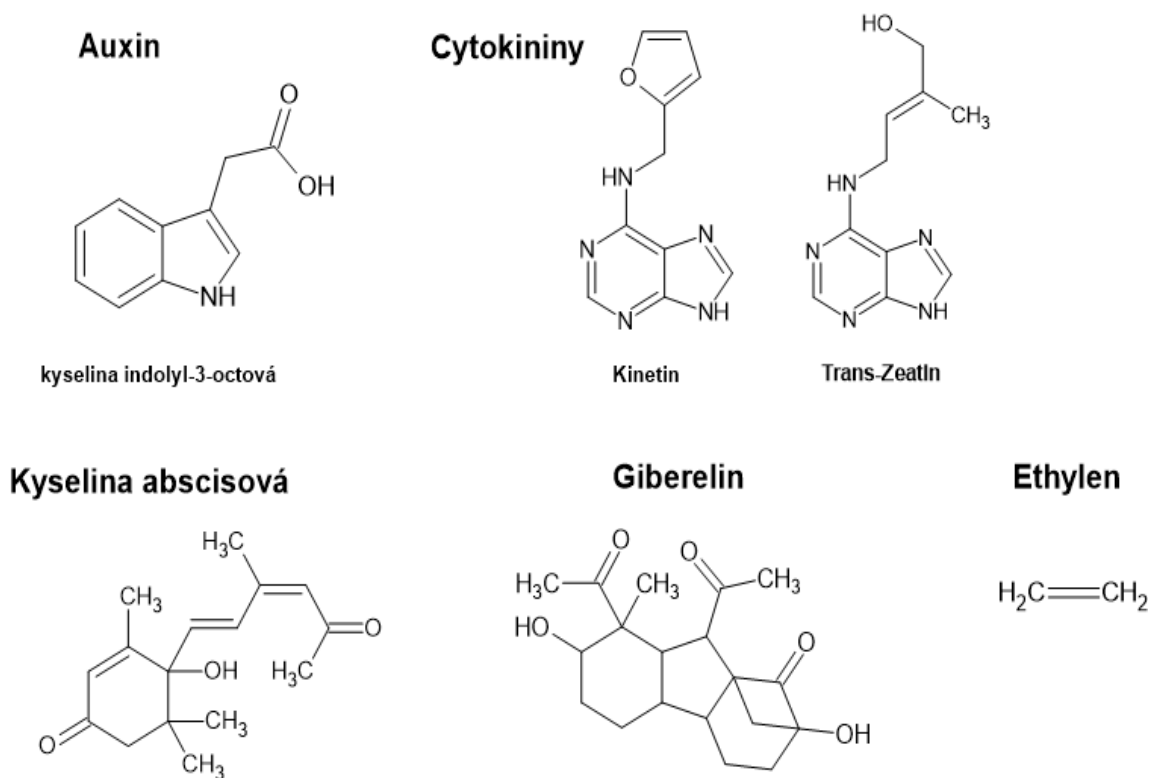
Důležité je také využití mutantů huseníčku v biologickém výzkumu, zejména pro objasnění vztahu mezi fenotypem a funkcí mutantního genu. Jako inbrední linie jsou využívány nejčastěji ekotypy Landsberg erecta (Ler), Columbia-0 (Col-0) a Wassilevskija-4 (Ws-4), jejichž semena jsou komerčně dostupná (Lloyd et al., 1986). Mimo tyto standardní ekotypy jsou dostupné sekvence více než 1000 ekotypů *A.thaliana*, a to díky projektu „1001 genomes“ (Weigel & Mott, 2009).

2.2 Fytohormony

Jedním z hlavních znaků živého organismu je růst a vývoj, který je u rostliny ovlivňován jak vnějšími, tak vnitřními faktory. Mezi vnitřní faktory ovlivňující růst a vývoj rostliny jsou řazeny mimo jiné i hormony. Jejich přítomnost v rostlině byla poprvé zaznamenána německým botanikem von Sachsem, který je popisuje jako chemické substance působící na růst rostliny (Moore, 1979).

Obecně jsou hormony přirozeně se vyskytující nízkomolekulární sloučeniny fungující jako signální látky v nízkých koncentracích a ovlivňující růst a chování organismu. Ve srovnání se živočišnými hormony jsou rostlinné hormony méně specifické. Nejsou produkovány specifickými žlázami s vnitřní sekrecí, což je pro živočišné hormony typické, ale jsou distribuovány z různých míst rostlinného organismu. Mechanismus účinku rostlinných a živočišných hormonů je však obdobný. Fytohormon se v místě účinku navazuje na receptor, čímž spouští řadu biochemických změn vedoucích k odpovědi na signál.

Fytohormony byly na základě svých vlastností, struktury a funkce klasifikovány do 6 základních skupin, a to na auxiny, cytokininy, gibbereliny, ethylen, kyselinu abscisovou a strigolaktony. V rostlině se vyskytují i další látky s regulační aktivitou, jejichž fyziologickou funkcí je signalizace při hormonálních a obranných reakcích. Jsou mezi ně řazeny brassinosteroidy, kyselina salicylová, jasmonáty, polyaminy a oxid dusnatý (Kochhar & Gujral, 2020).



Obr. 1: Strukturální vzorce jednotlivých zástupců fytohormonů

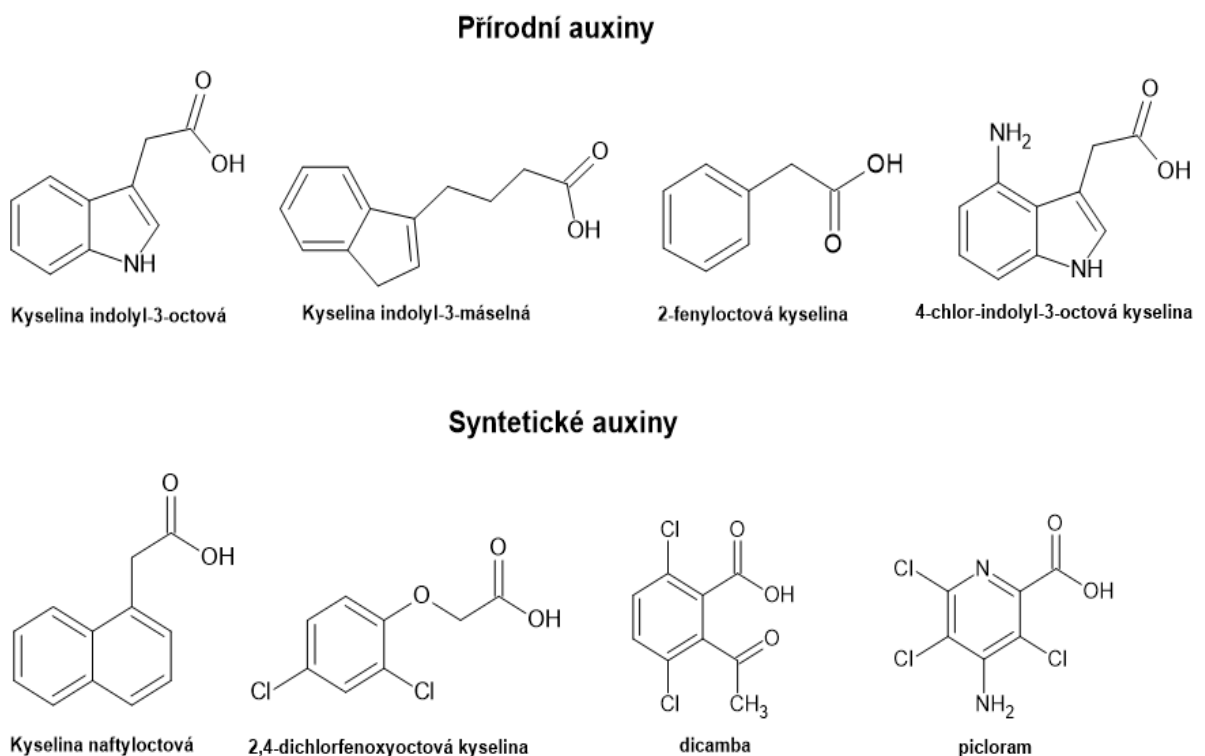
2.3 Auxiny

Jedním z nejvýznamnějších fytohormonů je auxin. Název tohoto rostlinného hormonu byl převzat z řeckého slova „*auxein*“, což v překladu znamená „*růst*“ (Moore, 1979). Auxiny

jsou skupinou organických kyselin, které jsou v rostlině zapojeny do řady důležitých fyziologických procesů a podílejí se na vývoji rostliny.

Nejvýznamnějším přirozeně se vyskytujícím auxinem je kyselina indolyl-3-octová (IAA), která byla vůbec prvním objeveným rostlinným hormonem a do roku 1993 byla považována za jediný přirozeně se vyskytující auxin. Právě v roce 1993 byla pomocí GC-MS v rostlině prokázána přítomnost kyseliny indolyl-3-máselné (IBA), čímž byla zařazena mezi přirozeně se vyskytující auxiny. Do této skupiny se dnes řadí mimo jiné i 4-chlor-indol-3-octová kyselina (4-Cl-IAA), což je vysoce aktivní halogenovaný indolový auxin, který byl identifikován zejména v rostlinách čeledi bobovitých (*Fabaceae*) a v semenech borovice. IBA i 4-Cl-IAA vykazují biologickou aktivitu až při vyšších koncentracích, než je tomu u IAA (Normanly et al., 1995).

Kromě výše jmenovaných přirozeně se vyskytujících auxinů existují ještě synteticky připravené auxiny. Mezi nejvýznamnější syntetické auxiny patří kyselina 1-naftyloctová (NAA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T), dicamba, pikloram a další.



Obr. 2: Strukturální vzorce přirozených a syntetických auxinů

2.3.1 Historie objevu auxinů

První zmínka o auxinech pochází už z roku 1881, a to z díla *The Power of Movement in Plants*, známého evolučního biologa Charlese Darwina a jeho syna Francise. V tomto díle se zabývali zejména fototropismem, tedy reakcí rostlin na světlo. Jako modelový organismus si vybrali sazenice ovsa (*Avena sativa*) a trávy chrastice kanárské (*Phalaris canariensis*). Závěrem jejich pozorování bylo, že se v rostlině nachází stimulační látka, která je distribuována do oblasti dlouhivého růstu, kde způsobuje rychlejší růst neosvětlené části rostliny (Kochhar & Gujral, 2020).

Za definitivní potvrzení existence auxinů v rostlinách se v letech 1926–1928 přičinil utrechtský student botaniky Frits W. Went, který studoval tropismy na koleoptilích ovsa (*Avena sp.*) (Macháčková, 1998). Experiment byl podle modelové rostliny pojmenován Avena test. Jeho principem je umístění agarového bloku s testovanými sloučeninami na špičku koleoptile rostliny *Avena sativa* a pozorování fyziologické odezvy v podobě zakřivení (Enders & Strader, 2015).

V roce 1931 dvojice vědců Kögl a Haagen-Smit publikovala práci popisující izolaci látky auxin A neboli kyseliny auxenotriolové z lidské moči. Roku 1933 následoval objev příbuzných látek, pojmenovaných auxin B neboli kyselina auxenolová a heteroauxin nyní známý jako kyselina indolyl-3-octová (IAA). Nutno podotknout, že izolaci auxinu A ani auxinu B se nikdy nepodařilo zopakovat (Wildman, 1997). První detekce IAA se však datuje již od roku 1885, kdy byla rozpoznána ve fermentačním médiu biochemikem Ernestem Salkowskim jako metabolický produkt bakterií v přítomnosti tryptofanu a peptonu (Arteca, 1996). Vzhledem k tomu, že byla IAA detekována v lidské moči a kvasinkách, nepředpokládalo se, že by tato sloučenina byla rostlinným hormonem. K izolaci IAA z rostliny došlo až o několik let později v roce 1941 a zasloužili se o ni Haagen-Smit a kolektiv. Trvalo více než dvacet let, než se podařilo v roce 1967 izolovat IAA z dalšího rostlinného zdroje. Touto rostlinou byla fazole mungo (*Vigna mungo* (L.)) a o izolaci se zasloužil Okamoto a kolektiv (Enders & Strader, 2015).

2.3.2 Výskyt a transport auxinů

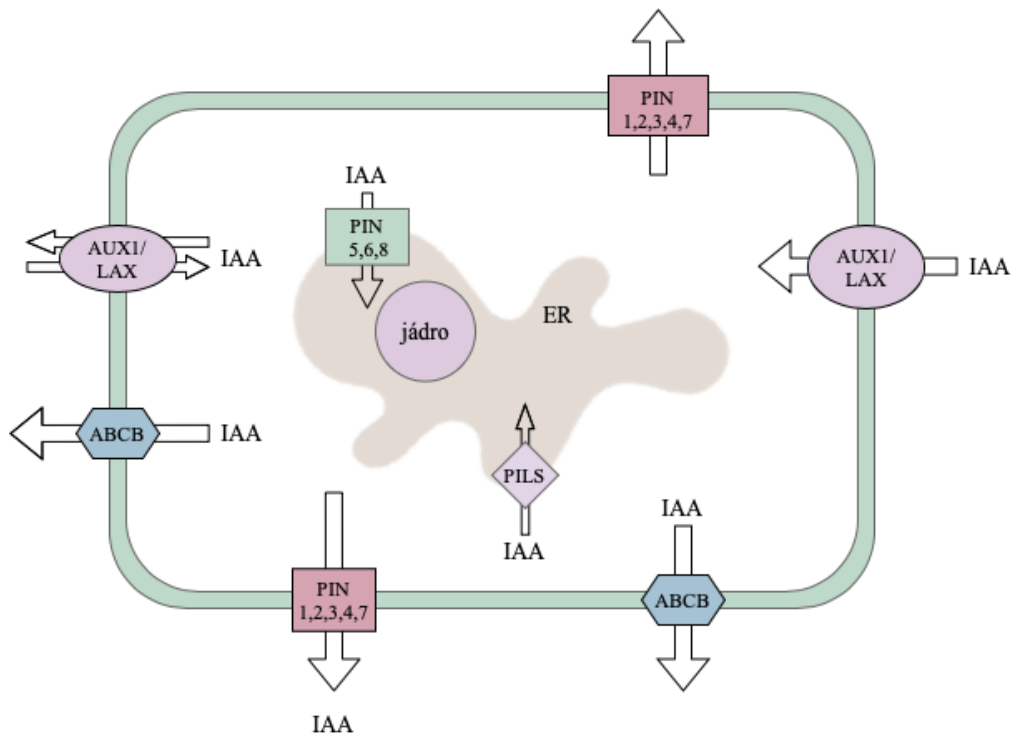
Syntéza auxinů probíhá v meristematických oblastech a oblastech orgánů, kde dochází k intenzivnímu růstu. Jedná se například o kořenové špičky, výhonky, klíčící semena, mladé listy, květenství nebo apikální pupeny rostoucích stonků. Odtud jsou pak auxiny distribuovány do všech částí rostliny.

Transport auxinu může probíhat několika způsoby. Prvním z nich je transport auxinu rostlinou pasivně floémem souběžně s asimiláty. Pokud probíhá transport naopak aktivně a specificky, jedná se o tzv. polární transport, při němž je spotřebovávána energie v závislosti na mitochondriální aktivitě. Probíhá zejména v buňkách parenchymu, které jsou vázány na vodivá pletiva (Kochhar & Gujral, 2020). Polární transport na buněčné úrovni je vysvětlen chemiosmotickou hypotézou, která je založena na chemické povaze auxinu. Tato hypotéza říká, že v apoplastu je mírně kyselé prostředí, které je způsobeno transportem protonů protonovou pumpou. V tomto kyselém prostředí se IAA vyskytuje v nedisociované formě (IAAH), jejíž charakter jí umožňuje difúzi snadno prostupovat přes plazmatickou membránu do cytoplazmy buňky. V cytosolu je vyšší pH a molekuly IAAH jsou tu disociovány do iontové formy (IAA^-), která se nemůže pasivně transportovat z buňky ven. Transport aniontů tedy probíhá pomocí specifických nosičů (Adamowski & Friml, 2015).

Přenašeči umožňujícími polární transport auxinu z buňky do buňky jsou např. AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX/LAX), ABCB transportéry (ATP-Binding Cassette subfamily B), PIN-FORMED proteiny, dusičnanový přenašeč 1.1 (NRT 1.1), PIN-LIKES přenašeče (PILS) a další. Tyto proteiny je možné rozdělit do skupin na základě jejich lokalizace v buňce. První skupina přenašečů se nachází na plazmatické membráně a spadají do ní přenašeče jako AUX/LAX, NRT1.1, ACBC a většina PIN proteinů. Pro druhou skupinu přenašečů je charakteristická lokalizace na membránových buněčných kompartmentech, kde regulují homeostázu auxinů uvnitř buňky. Do této skupiny spadají PIN proteiny s krátkými hydrofilními smyčkami, PILS a WAT1 (Zhou & Luo, 2018).

Skupina PIN-formed proteinů je rodina transmembránových přenašečů specifických pro suchozemské rostliny, které svou asymetrickou lokalizací v buňkách velmi dobře zapadají do chemiosmotické hypotézy. V *A.thaliana* bylo dosud zjištěno osm genů PIN, které se dělí podle typu transportu do kategorie PINů s „dlouhým dosahem“ a PINů s „krátkým dosahem“. Do kategorie zodpovědné za polární transport IAA neboli kategorie PIN proteinů s „dlouhým dosahem“ patří PIN 1, 2, 3, 4 a 7, které se vyskytují na plazmatické membráně. Zbývající PIN5, PIN6 a PIN8 patří do kategorie PIN proteinů s „krátkým dosahem“ a jsou lokalizovány na membráně endoplazmatického retikula, kde zajišťují výměnu auxinů mezi cytosolem a lumen endoplazmatického retikula. Proteiny PIN1-4 jsou seskupením 10 transmembránových domén uspořádaných do dvou částí po pěti alfa helixech oddělených hydrofilní smyčkou, která je lokalizovaná v cytoplazmě. PIN 5 a PIN8 se odlišují krátkými úseky hydrofilních aminokyselin umístěnými mezi jejich transmembránovými doménami (Zwiewka et al., 2019). Obecně je struktura PINů s

„dlouhým dosahem“ podobná struktura sekundárních přenašečů, které používají elektrochemický gradient pro usnadnění transportu.



Obr. 3: Transport auxinu z a do buňky přes plazmatickou membránu, na obrázku jsou uvedeny přenašeče AUX1/LAX, ABCB, PIN s dlouhým dosahem, PIN s krátkým dosahem, PILS (překresleno podle Enders & Strader, 2015).

Dalším typem auxinových transportérů jsou ABCB přenašeče, z nichž nejvýznamnější jsou ABCB1, ABCB4, ABCB19 a ABCB21. Charakteristickou schopností některých typů ABCB je kromě přenosu IAA i přenos některých syntetických auxinů. Například přenašeč ABCB4 může být zapojen do transportu NAA, ABCB19 do přenosu 2,4-D. ABCB4 a ABCB21 navíc mohou přejít z efluxní funkce na influxní v závislosti na koncentracích auxinu (Enders & Strader, 2015).

Pro inhibici auxinového efluxu neboli vyloučení auxinu z buňky, se používají kompetitivní a nekompetitivní inhibitory. Kompetitivní inhibitory, mezi něž patří například kyselina 2,3,5-trijodbenzoová (TIBA), kompetují s auxinem o vazebné místo na efluxním nosiči. Nekompetitivními inhibitory auxinového jsou například kyselina 1-N-naftylftalamová (NPA) nebo cyklopropylpropandion (CPD) (Blakeslee et al., 2005).

2.3.3 Hlavní fyziologické účinky auxinu

Auxin zásadně ovlivňuje organogenezi a morfogenezi rostlin. Jedním z nejpodrobněji popsaných fyziologických účinků auxinu je stimulace dlouhivého růstu. Auxin v závislosti na koncentraci stimuluje prodlužování buněk v koleoptile a stonkových segmentech. Koncentrace auxinu působící stimulačně na růst stonku působí současně inhibičně na prodlužování kořenových buněk. Dlouhivého růstu buněk auxin dosahuje ireverzibilní roztažností buněčné stěny, ke které dochází spíše u mladých sekundárně neztloustlých buněčných stěn. Úlohou auxinu je aktivovat protonovou pumpu v plazmatické membráně, což má za následek vylučování protonů do prostoru buněčné stěny (Kochhar & Gujral, 2020). Dochází k okyselení prostoru a vzniklé nízké pH ovlivňuje aktivitu expansinu, enzymu odpovídajícího za modifikaci buněčné stěny uvolňováním nebo narušováním vodíkových vazeb mezi celulóзовými sítěmi, čímž umožňuje zvětšení buněčné stěny (Sampedro & Cosgrove, 2005). Turgorový tlak působí na plazmatickou membránu a buněčnou stěnu a dochází ke zvětšení buňky (Kochhar & Gujral, 2020).

Jedním z dalších fyziologických účinků úzce spojeným s dlouhivým růstem je vliv auxinu na fototropismus a gravitropismus. Ohyb rostliny za světlem nebo v reakci na gravitaci je způsoben transportem auxinu z osvětlených částí rostliny do zastíněných oblastí. Tento pohyb je popsán pomocí Cholodny-Wentova modelu. Podle něj se působením světelného stimulu auxin místo bazipetálního transportu pohybuje laterálně směrem k zastíněné straně rostliny, kde způsobuje prodloužení buněk. Tím dochází k stimulaci růstu na zastíněné straně a inhibici růstu na osvětlené straně, v důsledku zakřivení směrem ke světlu (Taiz & Zeiger, 2010).

Také za ohýbání kořenů je zodpovědná změna distribuce auxinu. Ve vertikálně orientovaných kořenech vykazuje auxin stejný gradient na všech stranách kořene, zatímco na horizontálně orientovaných je gradient strmější na spodní straně kořene. Nerovnoměrné rozložení auxinu inhibuje prodloužení buněk na spodní straně kořene a kořen roste směrem dolů, zatímco stonek roste směrem nahoru (Geisler, Wang & Zhu, 2014).

Dalším důležitým fyziologickým účinkem auxinu je apikální dominance, při níž je kontrolován růst úžlabních pupenů vrcholovým výhonkem. Auxin je polárním transportem dopravován do stonku, kde inhibuje růst úžlabních pupenů sekundárními mechanismy. Odstraněním nebo poškozením vrcholového pupenu dochází k poklesu hladiny auxinů a zvýšení koncentrace cytokininů, které podporují růst úžlabních pupenů a tím mění morfologii rostliny (Barbier, Dun & Beveridge, 2017).

Auxin je zapojen do téměř každého fyziologického procesu souvisejícího s vývojem rostlin. Jedná se například o klíčení semen, vývoj květů a plodů, zkrácení internodií, partenokarpie, inhibice opadu listů a poléhání (Kochhar & Gujral, 2020).

2.3.4 Biosyntéza auxinů

Běžným prekurzorem syntézy auxinu je aromatická aminokyselina tryptofan, která je produkována v chloroplastech rostliny z konečného produktu šikimátové dráhy, chorismátu (Casanova-Sáez & Voß, 2019).

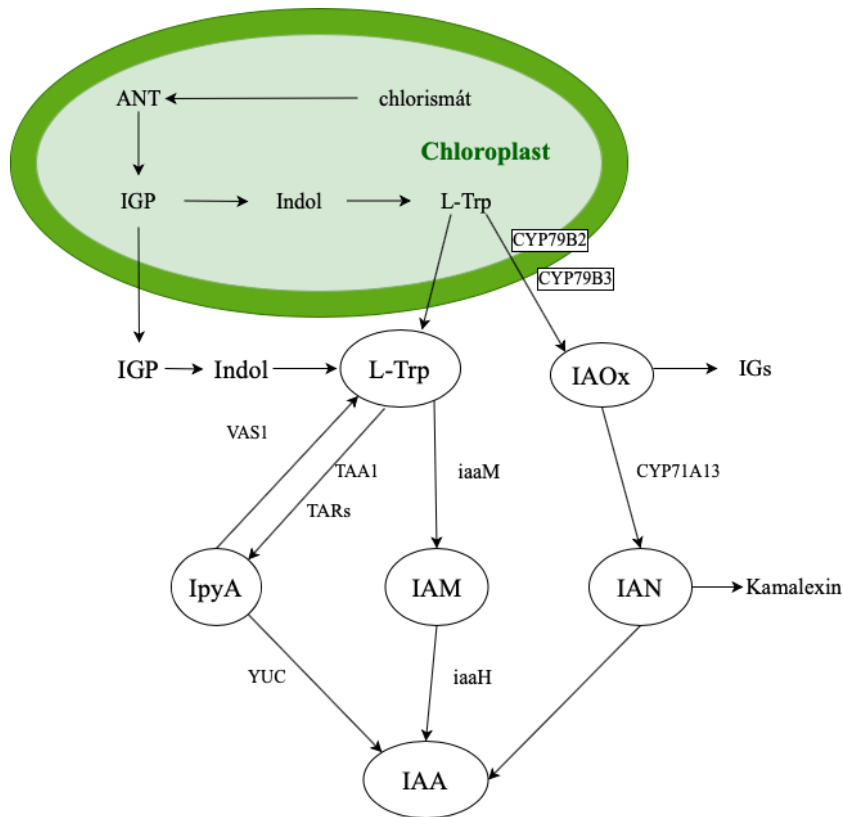
K biosyntéze vycházející z této aminokyseliny může docházet čtyřmi možnými drahami, které dostaly svůj název podle jejich klíčového meziproduktu. Těmito meziprodukty jsou indol-3-acetaldoxim (IAOx), indol-3-ylpyruvát (IPyA), indol-3-acetamid (IAM) a tryptamin (TAM) (Wang B et al., 2015). Kromě těchto drah byla navržena i cesta biosyntézy nezávislá na tryptofanu na základě experimentálních výsledků získaných ze studií na mutantech kukuřice (Taiz & Zeiger, 2010).

Nejlépe popsanou drahou je dvoustupňová indol-3-ylpyruvátová cesta. V prvním kroku této dráhy dochází ke konverzi Trp na IPyA působením tryptofanové aminotransferázy *Arabidopsis*1 (TAA1) a s ní souvisejícími proteiny (TARs). Druhý krok je zajištěn pomocí rodiny YUCCA (YUC) monooxygenáz obsahujících flavin, díky kterým dochází k přeměně IPyA na IAA. První krok této dráhy může být regulován, a to přeměnou IPyA zpět na tryptofan. Této přeměny je dosaženo působením pyridoxal-fosfát-dependentní aminotransferázy REVERSAL OF SAV3 PHENOTYPE 1 (VAS1).

Druhá dráha, jejímž meziproduktem je IAOx, je typická pro rostliny z rodu *Brassicaceae* mezi něž patří mimo jiné *Arabidopsis thaliana*. Principem dráhy je přeměna Trp na IAOx za katalýzy cytochrom P450 monooxygenázy CYP79B2 a CYP79B3. Přeměna z IAOx na IAA nebyla stále plně objasněna, ale předpokládá se, že dochází ke konverzi IAA na indol-3-acetonitril (IAN) působením CYP71A13 a následně rostlinnými nitrilázami (NIT) dochází k přeměně na IAA. Touto dráhou jsou produkovány obranné sloučeniny rostliny, jako jsou například indol-glukosináty (IGs) nebo kamalexin.

Mimo rostliny se nachází Trp-dependentní dráha i u auxin-produkujících bakterií, která má jako klíčový meziprodukt IAM. Hlavními enzymy této dráhy jsou indol-3-acetamidhydroláza (iaaH) a tryptofan-2-monooxygenáza (iaaM), které zajišťují přeměnu Trp na IAM a přeměnu IAM na IAA. Kromě bakterií byla IAM dráha popsána i u některých vyšších rostlin jako jsou tabák, kukuřice, rýže a další (Casanova-Sáez & Voß, 2019).

Poslední popsanou Trp-dependentní dráhou je tryptaminová (TAM). Principem tryptaminové biosyntézy je přeměna Trp na TAM působením Tryptofan dekarboxylázy (TDC), což je cytosolický enzym. To, jak by mohl být tento produkt převeden na IAA není zcela jasné (Mano & Nemoto, 2012).



Obr. 4: Trp-dependentní dráhy biosyntézy auxinu: První dráhou, která předchází biosyntetickým drahám auxinu je šikimátová, což je dráha zajišťující syntézu prekursoru L-Trp (popsána v zeleném poli znázorňujícím chloroplast), mimo syntézu prekursoru L-Trp dochází i k syntéze prekursoru typického pro *Brassicaceae* IAOx. Ostatní dráhy vedoucí k syntéze IAA už probíhají mimo chloroplast v cytosolu. V dráze typické pro *Brassicaceae* dochází k tvorbě ochranných látek rostliny jako IGs a kamalexin (překresleno a zjednodušeno podle Casanova Sáez & Voß, 2019).

2.3.5 Regulace hladiny auxinu

Hladina auxinu v rostlině je kromě biosyntézy regulována i přechodnou inaktivací nebo nevratnou degradací.

Rostlina může ovlivňovat hladinu auxinu přechodnou konjugací s aminokyselinami, peptidy a proteiny prostřednictvím amidových vazeb nebo s cukry esterovými vazbami. U těchto amidových konjugátů je vytvoření amidové vazby mezi IAA a AMK zajištěno syntetázami z rodiny GRETCHEN HAGEN 3 (GH3). U *Arabidopsis* bylo identifikováno 8

členů této rodiny. Jedním z nejvýznamnějších je pravděpodobně GH3.17, který upravuje hladinu IAA v reakci na stín a vyšší teploty. Kromě konjugace s auxinem mohou GH3 zajišťovat také konjugaci s dalšími fytohormony, například s kyselinou jasmonovou nebo s kyselinou salicylovou (Casanova-Sáez & Voß, 2019). Esterové konjugáty IAA-UDP-glukóza jsou vytvářeny pomocí specifických uridin-difosfátových glykosyltransferáz a byly identifikovány například u kukuřice (IAGLU) a *Arabidopsis* (UGT84B1), ale i v sóji, rýži a semenech obilovin a luštěnin (Jackson et al., 2002; Ludwig-Müller et al., 2005).

Konjugace způsobí přeměnu aktivní formy auxinu na neaktivní formu. V případě, že potřebuje hladinu aktivní formy zvýšit, lze konjugát rozpojit a převést zpět na auxin. Rozštěpení amidového konjugátu IAA-AMK je zprostředkováno aminohydrolázami IAA, mezi něž patří například IAA-Leucine RESISTANT 1 štěpící vazbu IAA s leucinem, IAA-ALANINE RESISTANT 3 štěpící vazbu IAA s alaninem a pět ILR1-LIKE hydroláz napomáhajících štěpit například vazbu IAA s fenylalaninem nebo glycinem.

Bylo prokázáno, že konjugáty mají významný vliv na vývoj rostliny. U mutantních rostlin *Arabidopsis* *ilr1*, *iar3*, *ill2*, které akumulují konjugáty IAA-Ala a IAA-Leu byly detekovány růstové defekty jako je například snížené větvení kořenů. (Rampey et al., 2004) Dalšími velmi hojnými konjugáty jsou IAA-Asp a IAA-Glu, které v rostlině působí jako katabolity. Rozklad esterových konjugátů, např. nejhojnějšího konjugátu IAA a glukózy (IAA-glc), zajišťují hydrolázy.

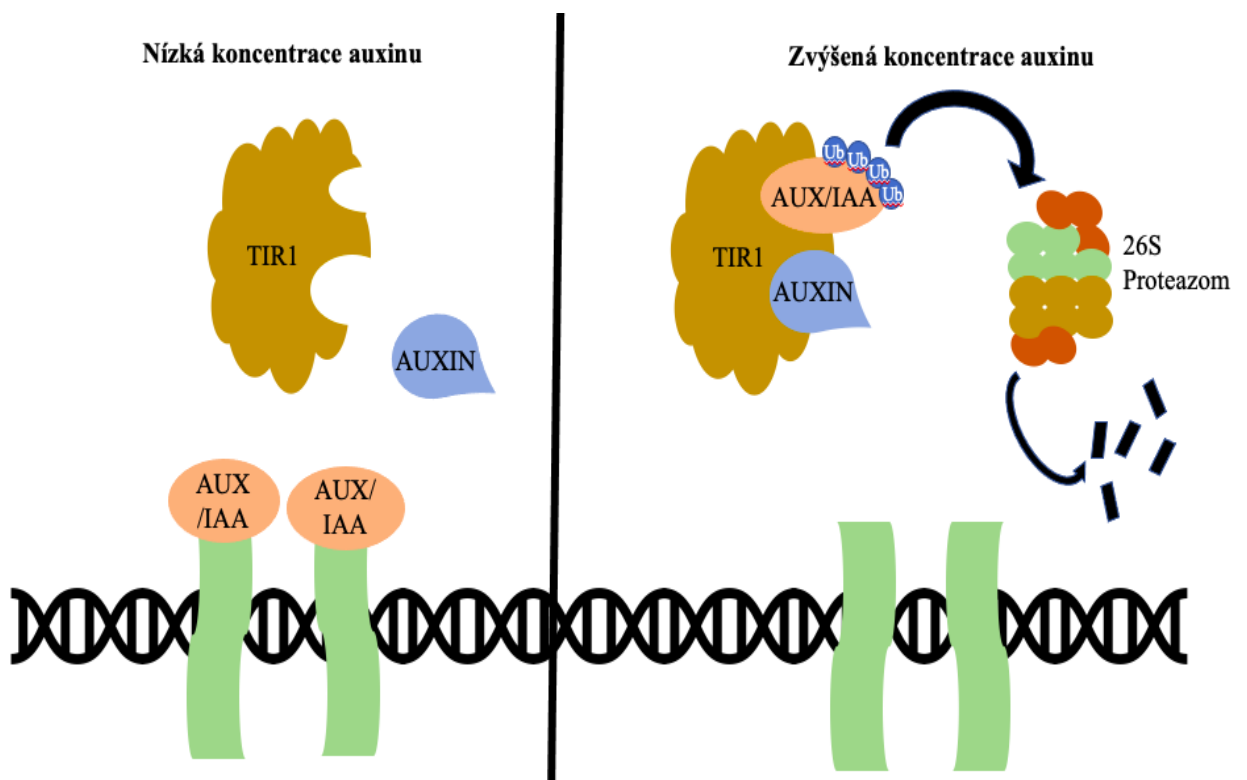
Kromě konjugace auxinu existují v rostlině i dráhy, které regulují hladinu IAA tím, že ji získávají přeměnou z IBA. Tato přeměna je zajišťována peroxizomálními enzymy v metabolické dráze připomínající β oxidaci mastných kyselin a hraje roli ve vývoji kořene. Bylo rovněž zjištěno, že i IBA tvoří konjugáty s esterem a amidem, ale dosud není objasněno, zda je neaktivní forma IBA zásobní formou IAA nebo je pouze krokem předcházejícím vznik IAA.

Ireverzibilní drahou degradace auxinu je oxidace IAA za vzniku 2-oxindol-3-oxové kyseliny (oxIAA) a její následná konjugace s glukózou (oxIAA-glc). K přeměně IAA na oxIAA dochází katalýzou dioxygenázami pro oxidaci auxinu (OxDAO), což jsou 2-oxoglutarát-dependentní Fe (II) dioxygenázy (Zhao Z et al., 2013). Byly identifikovány dva DAO homology AtDAO1 a AtDAO2 (Porco et al., 2016). Následná glykosylace na oxIAA-glc je katalyzována enzymem UGTT74D1 (Tanaka et al., 2014).

2.3.6 Mechanismus účinku auxinů

Za zprostředkování fyziologické odpovědi na auxin je zodpovědný zejména komplex Transport Inhibitor Response 1/ Auxin signaling F-Box protein (TIR1/AFB).

Signální dráha TIR1/AFB zahrnuje tři proteinové rodiny, a to proteiny F-boxu TIR1/AFB, transkripční represory Auxin/IAA (Aux/IAA) a Auxin response faktory (ARF), které regulují transkripční odpověď na auxin. Při nízkých koncentracích auxinu dochází k potlačení aktivity transkripčních faktorů ARF pomocí Aux/IAA proteinů. Pokud dochází ke zvýšení koncentrace auxinu, spojí se protein F boxu TIR1/AFB a protein Aux/IAA a vytváří společně koreceptor, který se přímo váže na auxin. Vznik tohoto komplexu podporuje jejich ubikvitinaci a následnou degradaci, protože protein F-boxu TIR1/AFB se účastní komplexu ubikvitin ligázy E3 Skp-1-Cullin-F-box (SCF). Tento komplex SCF TIR1/AFB polyubikvitinuje protein Aux/IAA, který je následně zacílen na proteazom pro degradaci, což zmírňuje represi ARF a umožňuje transkripci genů reagujících na auxin. Konkrétně v *Arabidopsis thaliana* se nachází 29 AUX/IAA a šest TIR1/AFB, které se vzájemně párují a utváří koreceptor o různé afinitě, což rostlina využívá k různému kombinování těchto párů s auxiny podle jejich typu (Enders & Strader, 2015). Kromě tohoto mechanismu *Arabidopsis* využívá dalších 22 ARF proteinů, které regulují transkripci (Giulfoyle & Hagen, 2007).



Obr. 5: Signální dráha TIR1/AFB, v levé části je vyobrazena situace při nízké koncentraci auxinu, kdy

dochází k potlačení aktivity transkripčních faktorů pomocí AUX/IAA, vpravo je vyobrazena situace při vyšší koncentraci auxinu, která způsobuje vznik komplexu TIR1/AFB a AUX/IAA, který se váže na auxin a způsobuje ubikvitinaci. Ubikvitinovaný protein AUX/IAA je zacílen na proteazom a dochází k transkripci genů reagujících na auxin. (překresleno podle Das et al., 2021)

Za alternativní signální dráhu byla donedávna považována cesta zahrnující Auxin binding protein 1 (ABP1), který byl izolován z rostlin kukuřice na základě jeho schopnosti vázat auxin. Velká část ABP1 je lokalizována na endoplazmatickém retikulu, kde má však vzhledem k pH, které zde převládá, nízkou afinitu k auxinu. Pouze malé procento ABP1 se nachází na plazmatické membráně, ke které je připojen C-terminálním peptid-vazebným proteinem (CBP1) (Enders & Strader, 2015). Donedávna se předpokládalo, že má ABP1 klíčovou roli v netranskripčních auxinových reakcích a že funguje jako pomocný receptor auxinu při aktivaci protonové pumpy v plazmatické membráně (Grones & Friml, 2015). Nedávné objevy však ukazují, že ABP1 není nezbytný pro signalizaci auxinu a nemá klíčovou roli ve vývoji rostlin. K tomuto závěru přispěl první objevený mutant *abp1*, který obsahuje delecii na 5bp v prvním exonu ABP1. Alela tohoto mutantu byla také identifikována v T-DNA *Arabidopsis* jako inzerce umístěná na 27bp v prvním exonu. Mutantní rostliny obsahující *abp1* nevykazují žádné vývojové vady, což dokazuje, že ABP1 není klíčovým faktorem v signalizaci (Gao et al., 2015).

2.4 Proteomika

2.4.1 Proteomika a její cíle

Před vznikem odvětví zabývajícího se proteomem byla veškerá pozornost věnována studiu genomu modelových organismů neboli genomice. K pochopení funkce genů je však nutné studovat i proteiny, jelikož právě ty jsou faktickým vyjádřením genetické informace. Termín „proteom“ byl zaveden roku 1994 australským doktorandem Markem Wilkinsem na konferenci v Sieně (Kovářová, 2005). K vytvoření pojmu proteom došlo spojením písmen z definice „PROTEin complement able to be ancoded by a given genOME“ nebo „PROTEin equivalent of a genOME“ (Bouchal P, Kučera I, 2002). Definicí proteomu došlo ke vzniku nové vědní disciplíny nazvané proteomika. Proteomika je dynamickým oborem, který systematicky analyzuje množství, funkci a identitu proteinů, a to za přesně definovaných podmínek.

Proteomická analýza má dále za cíl podrobnou charakterizaci proteinů, do níž můžeme zahrnout zjištění molekulové hmotnosti, primární sekvence aminokyselin, prostorovou strukturu a posttranslační modifikace proteinu.

2.4.2 Zpracování vzorku a extrakce proteinů

Příprava vzorku pro proteomickou analýzu je jednou z nekritičtějších částí proteomického výzkumu. Je nutné zajistit, aby během tohoto procesu nepodléhaly proteiny nežádoucím modifikacím a současně, aby byl jejich výtěžek dostatečný, tj. nad limitem detekce vybrané metody. Důležitá pro získání relevantních výsledků je i volba vhodného výchozího materiálu, který bude zdrojem studovaných proteinů.

Obecný postup přípravy vzorku začíná rozrušením buněk a uvolněním jejich obsahu. Výsledkem je změna fyzikálních vlastností vzorku, ale zachování jeho původního chemického složení. V proteomice jsou nejčastěji používané postupy rozrušení buňky ultrazvukem, vysokým tlakem, opakovaným zmrazováním, osmotickou lýzí, detergenty nebo mechanicky (Bodzon-Kulakowska et al., 2007).

Po homogenizaci je potřeba ze získané matrice izolovat proteiny. Tento postup se odborně nazývá extrakce a je prováděn v závislosti na charakteru zvoleného biologického materiálu. Extrakce a solubilizace proteinů je uskutečněna extrakčními roztoky, jejichž složení se odvíjí od vlastností izolovaného analytu.

Základní složkou extrakčního roztoku jsou pufrální činidla, která napomáhají udržení stabilního žádaného pH. Pro zvýšení rozpustnosti proteinů jsou do roztoku dále přidávány chaotropní látky, detergenty a redukční činidla.

Chaotropní látky v roztoku zajišťují narušení vodíkových vazeb a hydrofilních interakcí. Nejčastěji přidávanými chaotropními látkami jsou thiomočovina, močovina a guanidínhydrochlorid, které se pro zvýšení rozpustnosti proteinů kombinují. Použití močoviny a thiomočoviny je limitováno teplotou 37 °C, protože nad ní se tyto látky hydrolyzují na kyanát, popřípadě thiokyanát, které dále reagují s proteiny a mění tak jejich vlastnosti (Méchin et al., 2007). Detergenty se přidávají pro zefektivnění extrakce bílkovin, protože narušují hydrofobní interakce. Dělíme je dále na iontové (např. aniontový dodecylsulfát sodný), neiontové (např. oktylglukosid nebo Triton-X100) a zwitterionové (CHAPS). Redukční činidla v extrakčním roztoku narušují disulfidické vazby mezi cysteinovými zbytky. Nejčastěji používanými redukčními látkami jsou dithiotreitol (DTT), dithioerytol (DTE), triskarboxyethylfosfin (TCEP), β-merkapt ethanol a další.

Před přípravou extrakčního činidla je nutné zvážit kompatibilitu jednotlivých složek s dalšími kroky proteomické analýzy. Například výše zmíněný DTT je nevhodný pro použití při izoelektrické fokusaci, protože volná thiolová skupina způsobuje jeho migraci mimo gradient pH a tím snížení koncentrace redukčního činidla. Proto je v tomto případě jako alternativa k DTT používán TCEP.

Zásadním krokem v úspěšné přípravě proteinů pro proteomickou analýzu je jejich ochrana před enzymatickými reakcemi, jako jsou proteolýza nebo defosforylace. Těchto reakcí se lze vyvarovat přidáním inhibitorů proteáz (PMSF, EDTA, leupeptin, ...) a inhibitorů fosfatáz (fluorid sodný, vanadičnan sodný...) (Bodzon–Kulakowska et al., 2007).

Nativní extrakce

Specifickým typem extrakce proteinů je nativní extrakce, která se provádí za účelem izolace proteinů v nativní nezměněné formě, tedy zachování jejich terciární a kvartérní struktury. Aby proteiny nezměnily svoji konformaci a nepodléhaly modifikacím, je nutné, aby při extrakci nebyly použity ionogenní detergenty, redukční činidla nebo chaotropní látky. Vzhledem k přetrvávajícímu účinku enzymů, které by mohly extrahované proteiny štěpit, je nutné jejich aktivitu potlačit. Toho je možné docílit uchováváním vzorku na ledu po celou dobu extrakce a přidáním výše zmíněných inhibitorů proteáz (popř. fosfatáz). Význam zachování nativní konformace proteinů získaných z extrakce je zejména v použití při afinitní chromatografii, kdy zůstane zachována schopnost proteinů vytvářet specifické vazby s ligandem (Rigaut et al., 1999).

2.4.3 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází neboli solid phase extraction (SPE) je velmi oblíbená metoda extrakce, využívaná k rychlé a selektivní přípravě vzorků. Princip této metody je podobný jako extrakce kapalina-kapalina (LLE), ale s tím rozdílem, že pro rozdělení analytu nejsou použity dvě kapalná fáze, ale analyt se rozděluje mezi kapalnou (vzorek) a pevnou fází (sorbent). Mezi tuhou fází a analytem dochází ke slabým vazebným interakcím jako jsou Van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, dipól-dipól interakce nebo kation-kation interakce (Biziuk & Ferenc-Žwir, 2006). Výběr vhodné pevné fáze se odvíjí na základě žádané interakce mezi analytem a sorbentem. Mezi nejčastěji využívané sorbenty patří silikagel, často modifikovaný uhlovodíkovými řetězci C8 a C18, oxid hlinitý, polymerní sorbenty, aktivní uhlík a další (Poole, 2003). Obecný postup spočívá ve výběru vhodné pevné fáze,

aktivace sorbentu organickým rozpouštědlem, nanesení vzorku na pevnou fázi, odmytí nežádoucích složek a eluce analytu do zkumavky.

SPE je hojně využívanou metodou zejména pro svou rychlost, snadnost provedení a širokou škálu dostupných sorbentů. Při SPE se také využívají menší objemy reagensů a generují méně toxického odpadu než u LLE (Andrade-Eiora et al., 2016).

2.4.4 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace je dalším nezbytným krokem analýzy, který nám pomáhá odhalit výtěžnost extrakčních postupů a umožňuje nám provedení dalších kroků proteomické analýzy s přesně definovaným množstvím proteinů. K co nejpřesnějšímu výsledku je možné se přiblížit správnou volbou metody, která se odvíjí od aminokyselinového složení proteinů, množství dostupného proteinu, detekčního limitu metody, požadavků na přesnost a kompatibility metody se vzorkem. Koncentraci proteinu ve vzorku můžeme určit spektrofotometricky v UV oblasti nebo v přítomnosti specifického barviva, které se váže na protein. Jednou z prvních vyvinutých metod stanovení koncentrace proteinů byla Lowryho metoda, využívající biuretové reakce. Při ní dochází k reakci peptidové vazby s měďnatými ionty za alkalických podmínek. Vznikají měďné ionty, které po přidavku Folin-Ciocalteuovo činidla reagují za vzniku modrozeleného zbarvení detekovatelného při 650 až 750nm (Goldring, 2015).

V dnešní době je častěji používána Bradfordova metoda, která má kratší dobu inkubace, vyšší citlivost a méně podléhá interferenci činidel a neproteinových složek vzorků. Tato metoda je založena na kolorimetrické reakci barviva Coomassie Blue G250 a bazického aminokyselinového zbytku proteinu (nejčastěji argininu, lysinu a histidinu). Po navázání dochází ke vzniku modrého barviva, jehož množství se stanovuje změřením absorbance při vlnové délce 595nm (Kruger, 2009).

Pro přesné určení koncentrace proteinu ve vzorku se v běžné praxi využívá kvantifikačních kitů. Příkladem je široce používaný 2-D Quant Kit, u něž je stanovení založeno na specifické vazbě měďnatých iontů na protein. Postup v prvním kroku zahrnuje vysrážení proteinů, interferující látky jsou odstraněny spolu se supernatantem. Proteiny se dále resuspendují v roztoku obsahujícím měď. Měď, která se nenaváže je stanovena kolorimetricky. Míra zbarvení je tím pádem nepřímě úměrná množství proteinů ve vzorku.

2.4.5 Vybrané proteomické metody

Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je separační metoda založená na principech kapalinové chromatografie, která využívá vlastností vazeb biologicky aktivních látek, díky kterým dochází k jejich selektivnímu vyvázání z komplexní směsi. Purifikace je založena na principu interakce biomolekuly s molekulou ligandu, která je kovalentně navázána na pevný povrch a slouží jako stacionární fáze. S ohledem na charakter izolovaných biomolekul je nutné správně zvolit pevný nosič. Je nutné klást důraz na parametry, jako jsou velikost pórů, chemická a fyzikální stabilita. Je žádoucí, aby nosič selektivně zachytil požadované molekuly, ale zároveň vykazoval nízkou nescifickou adsorpci a dobré průtokové vlastnosti. Zároveň je nutné brát v potaz, že metoda většinou probíhá ve vodných roztocích, a proto je nutné dbát na hydrofilní povahu nosiče a jeho omezený náboj (Urh et al., 2009).

Velikost pórů by měla být jednotná a podle Renkinovy rovnice alespoň pětkrát větší než průměrná velikost biomolekuly (Renkin, 1954). Makroporéznost zajišťuje přístup velkých molekul k ligandům, zároveň však negativně působí na kapacitu v důsledku zmenšení povrchu a hustoty ligandu (Urh et al., 2009).

Nejčastěji se používají komerčně dostupné materiály jako agaróza, sacharóza, polyakrylamid či oxid křemičitý, ale je možné afinitní matici i vyrobit připojením ligandu k pevnému podkladu (Magdeldin, 2012). Pro připevnění ligandu k pevnému podkladu je využíváno vložení tzv. uhlovodíkového spaceru neboli raménka. Před navázáním raménka je nutné optimalizovat jeho délku a hydrofobní charakter. U spaceru je žádoucí jeho hydrofilní charakter, čímž se zabrání jeho autoagregaci a tím pádem docílí efektivnější interakce. V závislosti na reaktivních skupinách obsažených ve struktuře ligandu je volena funkční skupina, kterou bude ligand navázán. Nejčastěji se využívají primární aminové, thiolové nebo karboxylové funkční skupiny.

Celý proces afinitní chromatografie začíná aktivací nosiče, tedy jeho převedením do vhodného prostředí. Vazebné reakce probíhají za předem definovaných podmínek, kterými jsou například uchovávání za stálého míchání při teplotě 4 °C a definované hodnotě pH. Biomolekuly jako například proteiny, enzymy, protilátky a další jsou vedeny přes aktivovaný nosič s navázaným ligandem a nekovalentně, avšak specificky s ním interagují, zatímco zbylé látky jsou odstraněny. Finálním krokem afinitního čištění je eluce analytu, která se provádí oslabením interakcí, což umožní uvolnění biomolekul. K narušení vazby

může docházet specificky, kdy protein kompetuje o navázání na ligand s jinými látkami, nebo nespecificky, kdy se mění vlastnosti rozpouštědla tak, aby se snížila celková afinita a zvýšila rychlostní konstanta disociace. Nespecifické eluce se může dosáhnou například zvýšením koncentrace solí nebo změnou pH. V důsledku těchto změn se mění síla vodíkových, elektrostatických a hydrofobních interakcí při eluci (Urh et al., 2009).

Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je jednou z nejvyužívanějších metod v proteomické analýze, a to zejména pro svou vysokou citlivost, detekční limity a rychlost. Jejím základním principem je separace analytu na základě interakce nabitých molekul s elektrickým a magnetickým polem ve vakuu. Analyt vstupující z kapalinového chromatografu do iontového zdroje je ionizován a vzniklé ionty jsou separovány a detekovány na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z).

Hmotnostní spektrometrie umožňuje analyzovat peptidové směsi, které však v mnoha případech mohou být velmi komplexní a složité pro identifikaci. Proto byl vyvinut velmi důmyslný nástroj, kterým je propojení kapalinové chromatografie (LC) s MS. LC je separační metoda, založená na distribuci analytu mezi stacionární a mobilní fází, již je kapalina. Mobilní fáze prochází přes stacionární fázi a odděluje složky analytu na základě jejich afinity ke stacionární fázi. Snížením komplexity peptidové směsi se výrazně zjednoduší následující MS analýza, umožňující identifikaci proteinu. Kromě identifikace proteinů ze získaných molekulových hmotností a sumárního a strukturního složení získáváme mimo jiné i další cenné informace o proteinu, kterými jsou například jeho posttranslační, popř. chemické modifikace.

Prvním krokem po vstupu analytu z kapalinového chromatografu do iontového zdroje hmotnostního spektrometru je jejich převedení do plynné fáze a ionizace. Na základě množství dodané energie při ionizaci rozlišujeme ionizační techniky „tvrdé“, při nichž vznikají bohatá fragmentační spektra zjednodušující identifikaci molekul. S některými typy vzorků však tvrdé ionizační techniky nejsou kompatibilní, a proto se přistupuje k šetrnějším, „měkkým“ typům ionizace, které jsou hojně využívány zejména pro jejich schopnost ionizovat i velké a polární molekuly bez výraznějšího poškození. Mezi nepoužívanější typy měkké ionizace patří matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) nebo ionizace elektrosprejem (ESI), která byla využita i pro tuto práci (Friedecký & Lemr, 2012).

MALDI metoda využívá kokrystalizace peptidu s organickou molekulou, která má schopnost absorbovat energii laseru. V dalším kroku totiž dochází k ozařování krátkým laserovým pulsem, který způsobí zahřátí analytu a jeho přeměnu do plynné fáze. Náboj získává analyt od ionizované organické molekuly.

Metoda ESI k dosažení sublimace využívá rozpuštění peptidové směsi v kapalném rozpouštědle. Tato tekutina prochází kapilárou, jejíž potenciál způsobí rozptýlení této kapaliny na malé nabitě kapičky, které ve formě mlhy putují do vakuového systému. Odpařením rozpouštědla zůstává na peptidech náboj, který způsobuje ionizaci analytu. Takto ionizovaný analyt putuje na hmotnostní analyzátor, kde jsou tyto ionizované peptidy separovány na základě jejich poměru m/z , a to díky působení elektrostatického nebo magnetického pole. Cest vedoucích ke zjištění tohoto poměru analyzátozem je mnoho, ale v proteomice jsou nejpoužívanějšími průletový analyzátor (TOF), kvadrupól (Q), iontová past (IT), Fouierova transformace iontové cyklotronové rezonance (FT-ICR).

U průletového analyzátoru jsou ionty působením elektrického pole vháněny do vakuové trubice a pohybují se od zdroje směrem k detektoru. TOF detekuje čas, za který peptidové ionty urazily tuto vzdálenost a naměřená hodnota je pak funkcí druhé odmocniny m/z (Mallick & Kuster, 2010; Friedecký & Lemr, 2012).

Kvadrupól je tvořen dvěma páry rovnoběžných tyčí, na něž je přiváděno vysokofrekvenční střídavé a stejnosměrné napětí. Ionty jsou vháněny do tohoto pole a oscilují mezi jednotlivými tyčemi po spirálovité trajektorii a v závislosti na nastavené velikosti stejnosměrného napětí a amplitudě střídavého napětí v daném okamžiku může zařízením na detektor projít molekula o určité hodnotě m/z . Zbylé molekuly se vychylují a na detektor nedopadají. Detektor proměřuje hodnoty m/z propuštěných molekul, a to při kontinuální změně elektrického pole v krátkém časovém úseku (Friedecký & Lemr, 2012).

Iontové pasti zadržují ionty v poli a na základě nastavených parametrů je možné ionty příslušného poměru m/z „vypustit“ z pasti a zaostřit na detektor.

V hmotnostní spektrometrii je velké množství možností, jak lze zkombinovat ionizaci s příslušným analyzátozem. Nejčastěji využívanou kombinací ale bývá MALDI-TOF nebo ESI-IT, pro účely této práce bylo využito kombinace ESI-QTOF.

Velmi rozšířenou metodou je i zapojení více než jednoho analyzátoru do hmotnostní spektrometrie. Takovému uspořádání analyzátořů se říká tandemové a typicky se setkáváme se zapojením Q-TOF, trojitým kvadrupólem (QQQ) nebo TOF-TOF.

Posledním krokem MS je zachycení vybraných iontů detektorem, který převádí zaznamenaný signál do digitální podoby, závislé na typu použitého detektoru. Detektory

v hmotnostní spektrometrii se mohou lišit detekovanou veličinou. Princip prvního typu detektoru je založen na měření elektrického proudu, získaného dopadem iontů na dynody, jež působí jako násobiče elektrického proudu, který dopadá na detektor a je jím detekován. Kromě detekce elektrického proudu jsou hojně využívány i detektory založené na principu detekce iontů na základě velikosti jejich m/z . Výstupem detektoru je hmotnostní spektrum, znázorňující závislost intenzity signálu dopadajících iontů na velikosti m/z . Hmotnostní spektrum je pro každou sloučeninu specifické a jedinečné, čehož se využívá v identifikaci molekul analytu srovnáním se spektry v databázích (Mallick & Kuster, 2010).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a chemikálie

Pro experiment byl použit rostlinný materiál z modelového organismu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), poskytnutý pracovištěm Institute of Science and Technology Austria.

Při nativní extrakci proteinů z *A.thaliana* byl použit Tris (Serva, Německo), MgCl₂ (Fluka, Německo), NaCl (Fluka, Německo), CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Německo), Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal NP-40 (Sigma-Aldrich, Německo), fenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich, Německo), Roche inhibitor cocktail complete (Roche, Švýcarsko), NaF (Fluka, Německo), Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, Německo), deionizovaná voda, tekutý dusík.

Pro kvantifikaci proteinů po extrakci byl použit 2-D Quant Kit (GE Healthcare, USA), jednorázové semi-micro kyvety (Kartell, Itálie).

Při afinitní purifikaci proteinů byl použit EtOH (Merck millipore, Německo), deionizovaná voda, Tris (Serva, Německo), MgCl₂ (Fluka, Německo), NaCl (Fluka, Německo), CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Německo), Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal NP-40 (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, Německo), HCl (Lach-ner, ČR), fenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich, Německo), NaF (Fluka, Německo), Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, Německo), Roche inhibitor cocktail complete (Roche, Švýcarsko), jednorázové chromatografické kolony Bio-Spin (BioRad, USA).

Chemikáliemi, které byly využity při štěpení proteinů jsou dithiotreitol (DTT, Serva, Německo), jodacetamid (IAM, Sigma-Aldrich, Německo), hydrogenuhličitan triethylamonný (TEAB, Sigma), trypsin (Promega, USA), kyselina mravenčí (FA, Sigma). Pro přečištění a frakcionaci proteinů byl použit acetonitril, isopropanol, NH₄HCO₃ (vše Sigma-Aldrich, Německo).

3.2 Přístrojové vybavení

- Automatické pipety (Eppendorf, Německo).
- ThermoMixer comfort (Eppendorf, Německo).
- Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko).
- pH metr pH 50 (XS instruments, Itálie).
- Centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Německo).
- Třepačka Vortex 4 basic, (IKA, Německo).
- Magnetická míchačka MS-3000 (Biosan, USA).
- Rotační míchačka multi-rotator PRS-22 (Biosan, USA).
- Spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II (WPA Biochrom, UK).
- Centrifuga CL 31R Multispeed (Thermo, USA).
- Rotační vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo).
- Systém nanokapilární chromatografie (nLC) (RSLCnano3000, Dionex, Thermo, USA) s tandemovou hmotností detekcí Q-TOF vybavenou ionizací elektrosprejem (ESI) (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo).
- Kapilární předkolona (75 μm \times 3 cm, IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 5 μm , Dr.Maisch GmbH, Německo).
- Analytická kapilární kolona (50 μm \times 20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněná reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 3 μm , Dr. Maisch GmbH, Německo).

3.3 Metody

3.3.1 Nativní extrakce proteinů z *Arabidopsis thaliana*

Extrakce byla zahájena homogenizací rostlinného materiálu. Třecí miska s tloučkem byla vychlazená a přelita tekutým N₂. Materiál o hmotnosti 1,3 g byl v třecí misce opět přelit tekutým dusíkem a následně rozdrcen na jemný prach.

Rozdrcené kořínky byly přeneseny do centrifugačních falkon s předloženým tekutým N₂. Do každé falkony byl připipetován objem 4,5 ml extrakčního pufru (viz Tab. 1) a připravený vzorek byl inkubován po dobu 30 minut na ledu za občasného míchání. Po inkubaci byly falkony vloženy do předem vychlazené centrifugy. Centrifugace probíhala po dobu 10 minut při 4 °C a při otáčkách 10 000g. Po stočení byl supernatant přepipetován do mikrozkušavek a byl znovu stočen v centrifuze na 15 minut, při teplotě 4 °C a otáčkách

25000g. Supernatant byl rozdělen na alikvoty po 500 μ l. Takto rozdělené vzorky byly zmrazeny v tekutém N₂ a uskladněny při teplotě -80 °C.

Tab. 1: Složky extrakčního pufru–pH extrakčního pufru bylo upraveno pomocí 1M HCl na hodnotu 7,9, inhibitory proteas uvedeny pod čarou byly přidány těsně před použitím pufru, kvůli jejich nízké stabilitě.

Sloučenina	Koncentrace
Tris	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	2,5 mM
CaCl ₂	2 mM
Glycerol	5 %
Igepal	0,2 %
HCl	1 M
PMSF	1 mM
NaF	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Roche	tableta/50 ml

3.3.2 Kvantifikace proteinů po extrakci

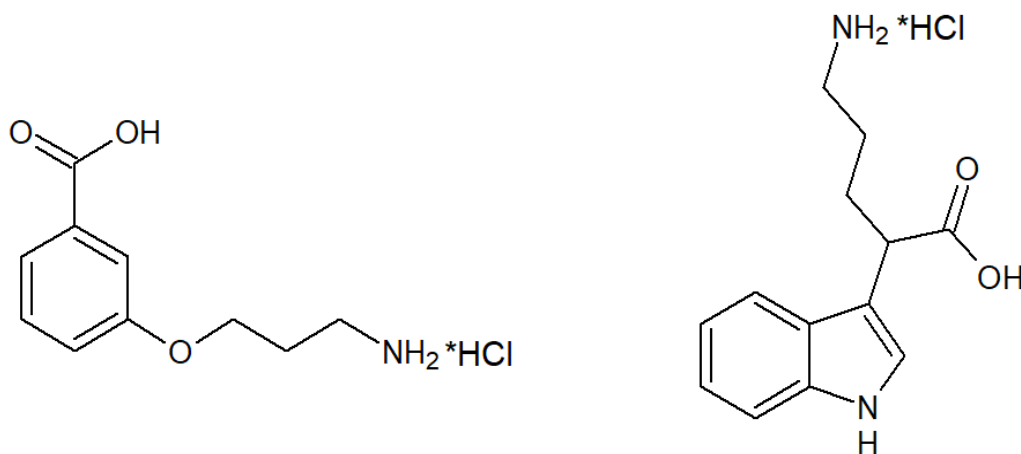
Kvantifikace extrahovaných proteinů byla provedena pomocí 2-D Quant Kitu. Do 2ml mikrozkuvek byl v duplikátu napipetován proteinový standard a vzorek (2×15 μ l, 2×30 μ l). Ke vzorku a standardům bylo připipetováno 500 μ l Precipitantu. Takto připravené vzorky a standard byly následně zvortexovány a bylo k nim připipetováno 500 μ l co-Precipitantu. Vzorky a standard byly opět zvortexovány a centrifugovány 5 minut při 15000g. Po centrifugaci byl supernatant dekantován a byl proveden short-spin mikrozkuvek. Následně byl odpipetován zbytek roztoku a do všech mikrozkuvek vyjma blanku bylo připipetováno 100 μ l Copper Solution a 400 μ l H₂O. Do všech mikrozkuvek byl poté přidán 1 ml Work Color Reagent a vzorky byly promíchány. Poté probíhala inkubace po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Závěrem byla změřena absorbance vzorků při 480 nm.

3.3.3 Afinitní čištění proteinů

Do 2ml mikrozkuřavky bylo přepipetováno 75 μ l afinitního gelu. Bylo připipetováno 150 μ l proteinového extraktu odpovídající 300 μ g proteinů a 150 μ l inkubačního pufru. Po napipetování proběhla inkubace po dobu 2 h za stálého obracení při 6 °C. Tento postup byl proveden ve čtyřech variantách, ve kterých byly použity různé matrice a zároveň se lišily přítomností kompetitoru:

- 1) Blank pulldown: sloužil jako kontrolní pulldown, jako matrice byla použita C3-benzoová kyselina a v tomto pulldownu nebyl použit žádný kompetitor.
- 2) Normální pulldown: jako matrice byl využit gel KB1 s IAA ligandem a v tomto pulldownu nebyl použit žádný kompetitor.
- 3) Pulldown s volnými nukleotidy: jako matrice byl využit gel KB1 s IAA ligandem a jako kompetitor byly přidány volné nukleotidy 1,5 mM ADP; GDP; NAD^+
- 4) Pulldown s volnou IAA: jako matrice byl využit gel KB1 s IAA ligandem, jako kompetitor byly přidány volné nukleotidy 1,5 mM ADP; GDP; NAD^+ a zároveň volná IAA o koncentraci 150 μ M.

Všechny varianty pulldownů byly provedeny ve třech opakováních.



Obr. 6: Strukturální vzorce C3-benzoové kyseliny (vlevo) a gelu KB1 (vpravo)

Po inkubaci byl vzorek přenesen na Biorad BioSpin kolonu a byl promyt inkubačním puřrem ($3 \times 1000 \mu$ l), High Salt puřrem ($3 \times 1000 \mu$ l) a Low Salt puřrem ($4 \times 800 \mu$ l). Špička Biospin kolony byla propláchnuta Low Salt puřrem (viz Tab. 2). Kolona byla vložena do tlustostěnné vialky s předloženým 62,5 μ l 1M TEAB. Proteiny byly eluovány 250 μ l 100 mM FA. Eluáty byly zmrazeny tekutým N_2 a uskladněny při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do dalšího použití.

Tab. 2: Složky inkubačního pufru, High Salt pufru, Low Salt pufru. pH těchto pufrů bylo upraveno pomocí 1M HCl na hodnotu 7,9. Inhibitory proteas byly připeptovány těsně před použitím inkubačního pufru z důvodu jejich nestability.

	Inkubační pufr	High Salt pufr	Low Salt pufr
Tris	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	100 mM	-	100 mM
NaCl	-	400 mM	-
MgCl₂	2,5 mM	2,5 mM	-
CaCl₂	2 mM	2 mM	-
Glycerol	5 %	5 %	-
Igepal	0,2 %	0,2 %	-
EDTA	-	-	0,5 μM
HCl	1 M	1 M	1 M
PMSF	1 mM	-	-
NaF	1 mM	-	-
Na₃VO₄	1 mM	-	-
Roche	Tableta/50 ml	-	-

3.3.4 Štěpení proteinů

Celý objem rozpuštěných proteinů byl převeden do tlustostěnné vialky. Ke směsi bylo připipetováno 6 μl redukčního činidla 0,5M DTT (viz Tab. 3), které zajišťuje naštěpení disulfidových můstků a udržuje protein v lineární struktuře. Vzorek byl inkubován v Thermomixeru po dobu 60 minut při 56 °C a 500rpm. Po inkubaci bylo ke vzorku připipetováno 17,5 μl alkylačního činidla 1M IAM v 0,1M TEAB. To zajišťuje navázání uhlovodíkového zbytku na SH skupinu, čímž zamezí zpětnému spojení disulfidových můstků. Opět proběhla inkubace vzorku, tentokrát 35 minut při 25 °C a 500 rpm. Pomocí pH indikátoru byla zkontrolována pH hodnota (≥ 8). Za účelem samotného štěpení proteinů bylo připipetováno 1,5 μl trypsinu. Jeho teplotním optimem je 37 °C, proto byly vzorky inkubovány při této teplotě přes noc při 500 rpm. Štěpící reakce byla zastavena přidávkem 10 μl FA. Indikátorem pro pH byla zkontrolována hodnota pH (≤ 5).

Tab. 3: Příprava redukčního a alkylačního činidla – redukční činidlo DTT bylo rozpouštěno v H₂O, alkylační činidlo IAM bylo rozpouštěno v 0,1M TEAB, které bylo přidáno těsně před použitím činidla. Roztok IAM je senzitivní, proto byl uchováván ve tmě.

	Koncentrace	Molekulová hmotnost	Navážka [mg/ml]
Redukční činidlo DTT	500 mM	154,25	77,27
Alkylační činidlo IAM	1 M	184,96	184,97

3.3.5 Přečištění a frakcionace peptidů

Přečištění a purifikace peptidů byla provedena v přítomnosti 25 mM NH₄HCO₃ o pH 10. Byla připravena série 6 pracovních roztoků o různém obsahu acetonitrilu (8–48 %) dle tabulky 4. Pomocí těchto 6 pracovních roztoků byl vytvořen gradient, který byl použit k rozdělení směsi peptidů ve vzorcích do 6 frakcí, které byly následně samostatně analyzovány pomocí LC-MS.

Tab. 4: Pracovní roztoky pro tvorbu gradientu v mikrogradientové frakcionaci.

Obsah acetonitrilu	Objem 100% acetonitrilu [μl]	Objem pufru [μl]	Odpovídá výsledné frakci
8 %	80	920	1
12 %	120	880	2
16 %	160	840	3
20 %	200	800	4
24 %	240	760	5
48 %	480	520	7

Vzorky byly před samotnou frakcionací odpařeny na vakuové odparce a následně rozpuštěny v 50 μl 5% kyseliny mravenčí.

Mikrokolonka byla nejdříve aktivována postupně pomocí Hamiltonovy pipety těmito roztoky: 1 × 20 μl 100% isopropanolu a 2 × 25 μl 80% acetonitrilu. Před samotným nanesením vzorku byla kolonka ekvilibrována na počáteční podmínky 2 × 20 μl 5% kyseliny mravenčí. Po ekvilibraci proběhlo nanesení celého vzorku v objemu 2 × 25 μl následované promytím 20 μl 5% kyseliny mravenčí. Eluce peptidů z kolony proběhla pomocí gradientu

acetonitrilu, 4 μ l od každého pracovního roztoku od nejnižšího obsahu acetonitrilu po nejvyšší. Nanášení probíhalo velmi pomalu, aby se pracovní roztoky nepromíchaly, tím byla zajištěna přesná eluce bez překryvu frakcí. Eluované peptidy byly ručně sbírány do skleněných vialek po 4 μ l. Nakonec byla mikrokolonka promyta 2 \times 20 μ l 80% acetonitrilem a připravena na další frakcionaci. Ke 4 μ l každé frakce bylo přidáno 21 μ l roztoku 5% kyseliny mravenčí a frakce byly analyzovány metodou kapilární kapalinové chromatografie na reverzní fázi spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (ESI-QTOF analyzátor). Peptidy ve frakcích byly identifikovány s následnou label-free kvantifikací.

3.3.6 LC-MS/MS analýza

Analýza vzorků byla provedena pomocí systému nanokapilární chromatografie (nLC) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF s ionizací elektrosprejem (ESI). Finální frakce jednotlivých vzorků byly vloženy do autosampleru nLC systému a byly provedeny 3 nástřiky vzorku o objemu 5 μ l. V prvním kroku byly peptidy ze vzorku zachyceny na kapilární předkoloně 75 μ m \times 3 cm naplněné reverzní fází C18, 5 μ m. Zachycené peptidy byly izokraticky promyty 20 μ l 2% FA po dobu 10 min. Přechištěné peptidy byly následně z předkolony postupně uvolňovány pomocí 80 minutové gradientové eluce (viz Tab. 5) na analytickou kapilární kolonu (50 μ m \times 20 cm, SilicaTip) naplněnou také reverzní fází C18, 3 μ m při konstantním průtoku 200 nl/min.

Peptidy eluované z analytické kapilární kolony byly ionizovány pomocí elektrospreje a analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií metodou data-dependent analysis s kolizí indukovanou fragmentací iontů v kolizní cele.

Tab. 5: Schéma gradientové eluce peptidů. Mobilní fáze A: 0,1% FA, Mobilní fáze B: 90 % ACN + H₂O okyselená na 0,1% FA

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	95	5
13	95	5
53	75	25
60	65	35
62	45	55
64	15	85

66	15	85
69	95	5
80	95	5

3.3.7 Zpracování dat

Surová data byla zpracována programem MaxQuant software v.1.6.10.43 (Tyanova et al., 2016) zahrnující prohledávací algoritmus Andromeda (Cox et al., 2011) s nastavením parametrů „Bruker TOF“ (Beck et al., 2015). Identifikace proteinů byla provedena proti referenční proteinové databázi pro *Arabidopsis thaliana*, jež byla stažena z deponitáře UniProt. Základní parametry pro Andromeda algoritmus a identifikaci proteinů byly následující: enzym – trypsin, 2x možná vynechaná místa štěpení (miss cleavage), zadané modifikace peptidů – karbamidometylace cysteinu jako fixní, N-koncová acetylace proteinů a oxidace metioninu jako variabilní a minimální délka peptidu 7 aminokyselin. Výsledky prohledávání ze všech vzorků byly spojeny a statisticky filtrovány na hladině 1% FDR (false discovery rate, Gupta et al. 2011) na úrovni spekter, peptidů a proteinů.

Na základě rozdílných koncentrací proteinů v jednotlivých pulldownech byly vyselektovány proteiny, u nichž se na základě jejich hodnot předpokládá, že interagují s auxinem. Tyto proteiny byly dále zpracovány v databázi String (<https://string-db.org>), ze které byly získány informace o lokalizaci proteinů v rámci buněčných struktur a schéma vzájemných interakcí proteinů. Další databází, ve které byly auxin-interagující proteiny zpracovány, byla databáze Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il>). Z této databáze byly získány informace o biologických procesech, do kterých jsou identifikované proteiny zapojeny.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Nativní extrakce a kvantifikace proteinů

Prvním z cílů a klíčovým krokem k úspěšné afinitní purifikaci byla nativní extrakce proteinů z rostlinného materiálu *Arabidopsis thaliana*. Díky nativní extrakci je možné získat proteiny s nezměněnou konformací, což je velmi důležitým aspektem pro zachování přirozené afinity proteinů k ligandu.

Během extrakce byl použit extrakční roztok obsahující Tris, který zde slouží jako pufrční činidlo stabilizující pH. Kromě Tris extrakční roztok obsahoval i NaCl zajišťující vhodnou iontovou sílu, H₂O působící jako rozpouštědlo, MgCl₂ a CaCl₂ sloužící jako stabilizátory proteinů. Jako neionogenní nenedenaturující detergent byl přidán Igepal. Na závěr byly přidány inhibitory proteáz a fosfatáz PMSF, NaF, Na₃VO₄ a Roche, které zabraňují enzymatickému štěpení proteinů. Tento krok byl velmi důležitý, protože naštěpené proteiny by nemohly interagovat s afinitním gelem. Dalším faktorem, který by značně přispěl ke znehodnocení výsledků, by bylo přidání ionogenních detergentů nebo chaotropních látek. Přidáním těchto látek, jako jsou například močovina, thiomočovina nebo SDS by došlo k narušení terciární, popřípadě kvartérní struktury proteinů, což je v případě této práce nežádoucí.

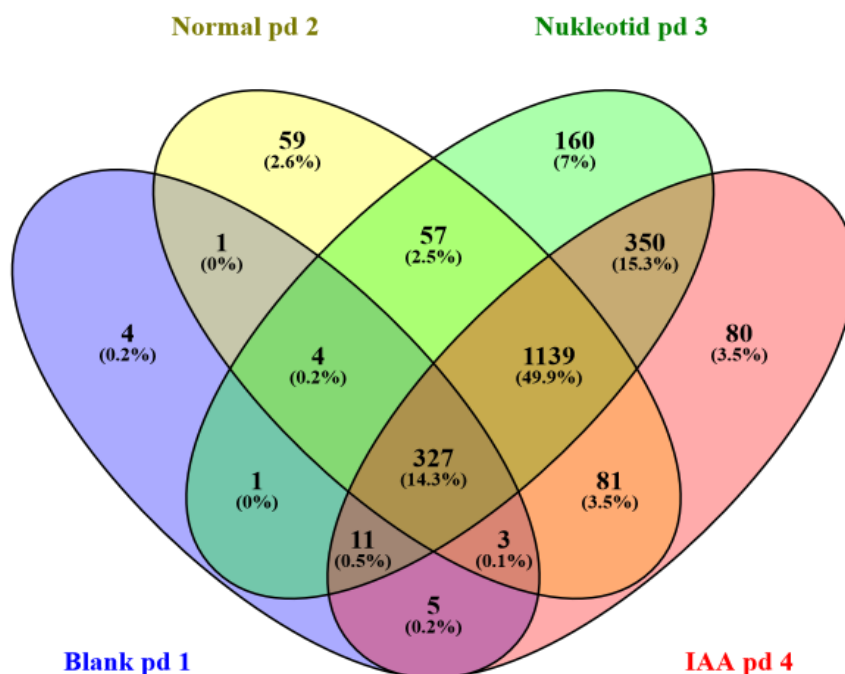
Koncentrace vyextrahovaných proteinů byla stanovena pomocí kvantifikačního kitu 2D-Quant kit. Stanovení tímto postupem je založeno na specifické vazbě měďnatých iontů na protein, nenavázaná měď je následně stanovena metodou dle Bradforda. Efektivita extrakce se může v jednotlivých případech značně lišit, proto byly proteiny stanoveny ve vzorcích o objemu 15 µl a 30 µl pro zvýšení pravděpodobnosti, že se jejich koncentrace bude nacházet v rozsahu kalibrační křivky. Tento předpoklad splnily oba vzorky, v dalších krocích experimentu tedy byla využívána průměrná hodnota těchto dvou vzorků. Z původního množství 1,3 g rostlinného materiálu byl získán proteinový extrakt o koncentraci 2,1 mg/ml. To odpovídá 7,27 mg/g živé hmoty, což je výsledek odpovídající obvyklým výtěžkům z tohoto typu rostlinného materiálu v laboratoři proteomiky LRR.

4.2 Afinitní čištění

Hlavním stanoveným cílem práce bylo úspěšně purifikovat proteiny, které specificky interagují s IAA. Pro dosažení tohoto cíle byla využita metoda afinitní chromatografie, v uspořádání čtyř na sebe navazujících experimentů – pulldownů, kombinujících různé matrice a kompetitory tak, aby došlo k omezení falešně pozitivních výsledků, které by byly způsobeny nespecificky vázícími se proteiny. V prvním kroku byl proveden kontrolní experiment (Blank pulldown), při kterém byla jako matrice využita C3-benzoová kyselina. Tento krok je důležitý pro odlišení proteinů vázajících se nespecificky například na povrch afinitních kuliček. Při druhém pulldownu byl již využit gel KB1, ale stále nebyl použit kompetitor. V tomto pulldownu došlo k navázání jak specificky interagujících proteinů, tedy proteinů s vazebným místem pro auxin, tak k interakci proteinů se širší specifitou, s vazebným místem například pro nukleotidy. Ve snaze odlišit tyto dvě skupiny proteinů byl

proveden třetí pulldown, ve kterém byly jako kompetitor přidány volné nukleotidy (ADP, GDP, NAD⁺). V nadbytku přidané volné nukleotidy naváží nespecifické proteiny s vazebným místem primárně rozeznávajícím tento typ struktur. Proteiny interagující s nukleotidy mohou tvořit značnou část vzorku. Jejich vykompetováním dojde tedy k uvolnění vazebných pozic na afinitním gelu pro proteiny, které se skutečně váží k IAA. V tomto pulldownu bylo tedy očekáváno zvýšení koncentrace specificky vázících se proteinů ve srovnání s koncentrací těchto proteinů v pulldownu č. 2. V posledním pulldownu byla mimo volných nukleotidů přidána i volná IAA, na kterou se specificky naváží auxin-interagující proteiny. Zde by tedy mělo naopak dojít ke snížení jejich koncentrace. Výsledné proteiny, u kterých se předpokládá specifická interakce s IAA, by měly splňovat tyto podmínky:

- v pulldownu č. 3 s volnými nukleotidy jako kompetitorem mají vyšší koncentraci než v pulldownu č. 2 bez kompetitoru
- jsou detekovány v malém nebo nulovém množství v pulldownu č.4 s IAA jako kompetitorem
- nenacházejí se v Blank pulldownu č.1, kde byla jako matrice využita C3-benzoová kyselina.



Obr. 7: Schéma počtu proteinů identifikovaných v jednotlivých pulldownech. Modře zvýrazněný je Blank pulldown, kde byla jako matrice využita C3-benzoová kyselina, žlutě je zvýrazněný pulldown č. 2

s matricí KB1 bez kompetitoru, zeleně je zvýrazněný pulldown č. 3 s matricí KB1 a volnými nukleotidy jako kompetitorem a červeně je označený pulldown č. 4 s matricí KB1 a IAA jako kompetitorem. Jednotlivé překryvy znázorňují proteiny detekované ve více pulldownech.

4.3 MS analýza a zpracování dat

Celkově bylo při afinitních experimentech detekováno 2349 proteinů. Z nich 356 bylo zachyceno také v Blank pulldownu, s těmito proteiny se tedy nadále nepracovalo. Ze zbylých 1993 proteinů byla následně na základě získaných dat vyselektována skupina proteinů, u nichž lze předpokládat specifickou interakci s IAA.

První část této skupiny tvořily proteiny, které nebyly identifikovány ani v jednom ze tří technických replikátů pulldownu č. 4 s kompeticí IAA, zato však byly detekovány ve všech třech opakováních pulldownu č. 3 s kompetujícími nukleotidy. Tyto podmínky splnilo 26 proteinů.

Dále byly jako IAA-interagující proteiny vyhodnoceny ty, u nichž došlo při kompetici s volnou IAA (pulldown č. 4) ke snížení koncentrace alespoň 2x ve srovnání s pulldownem č. 2 bez kompetitorů. Současně musely tyto proteiny splnit podmínku, že jejich koncentrace v pulldownu č. 3 při kompetici s volnými nukleotidy byla alespoň 2x vyšší, než v pulldownu č. 4 při kompetici s volnou IAA. V potaz byly přitom brány pouze ty proteiny, u kterých byla p-hodnota udávající spolehlivost daného srovnání nižší než 0,1. Výše popsaným podmínkám vyhovělo 36 proteinů. Dohromady tedy skupinu proteinů, u kterých lze předpokládat specifickou interakci s IAA, tvořilo 62 proteinů (viz Tab. 6) z celkem 2349 identifikovaných proteinů.

Tab. 6: Přehled identifikovaných auxin-interagujících proteinů. Gene ID – označení genu kódujícího daný protein.

Gene ID	Název proteinu
ATMRK1	Protein kinase superfamily protein
PRMT11	Protein arginine N-methyltransferase 1.1
AT1G65270	AT1G65270 protein
CINV1	Alkaline/neutral invertase CINV1
AT2G22370	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 18
AT1G72700 (ALA5)	Probable phospholipid-transporting ATPase 5 (Aminophospholipid flippase 5)
VSRI	Vacuolar-sorting receptor 1
HMT2	Homocysteine methyltransferase 2
COP13	Proteasome component (PCI) domain protein
APM1	Aminopeptidase M1 (Alpha-aminoacylpeptide hydrolase)

AT5G24810	ABC1 family protein
TIR1	Protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
ELO4	Protein KTI12 homolog
AT5G14880	Potassium transporter 8
CSN5A	COP9 signalosome complex subunit 5a
AT1G54410	Dehydrin HIRD11
AT5G49900	Non-lysosomal glucosylceramidase
AT1G33680	KH domain-containing protein
CSP3	Cold shock domain-containing protein 3
RANBP1	Ran-binding protein 1 homolog c
RSZ22	Serine/arginine-rich splicing factor RSZ22
XRN3	5'-3' exoribonuclease 3 (AtXRN3)
At3g45190	SIT4 phosphatase-associated family protein
FKBP15-1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP15-1
At3g29630	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
NOXY38	Clustered mitochondria protein homolog
RHD3	Protein ROOT HAIR DEFECTIVE 3
LCBC1	Long chain base biosynthesis protein 1
ATKRS-1	Lysine--tRNA ligase, cytoplasmic
ERD14	Dehydrin ERD14
AT1G48160	Signal recognition particle 19 kDa protein
CLC2	Clathrin light chain 2
AT2G33220	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13-B
PHT1;1	Inorganic phosphate transporter 1-1
AT2G20760	Clathrin light chain 1
MTHFR1	Methylenetetrahydrofolate reductase 1
SMT2	24-methylenesterol C-methyltransferase 2
AT5G51970	Sorbitol dehydrogenase
AT4G22310	Mitochondrial pyruvate carrier 4
AT3G23660	Protein transport protein SEC23
AT3G14840	Probable leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g14840
RABA4B	Ras-related protein RABA4b
EXO70A1	Exocyst subunit Exo70 family protein
CRL2	At2g33600 NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
NSF	Vesicle-fusing ATPase
At1g35160	14-3-3-like protein GF14 phi
AT2G07360	SH3 domain-containing protein
ALDH10A9	Betaine aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial (BADH)
TMN1	Transmembrane 9 superfamily member 1
RPN1B	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog B (
SKP1	SKP1-like protein 1A (UFO-binding protein 1)
KLCR1	Protein KINESIN LIGHT CHAIN-RELATED 1

PP2AA2	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform
TIF3H1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H
AT5G54750	Trafficking protein particle complex subunit
RPN8A	RP non-ATPase subunit 8A
AT5G67630	RuvB-like helicase
PIP2;4	Probable aquaporin PIP2-4
AT4G31490	Coatomer subunit beta-2
AT5G36230	ARM repeat superfamily protein
AT1G62730	At1g62730 (F23N19.9) (Terpenoid synthases superfamily protein)
AT4G38670	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein

Jako podporu správnosti finálního výběru lze brát fakt, že u 7 proteinů z výše zmíněných už byla jejich role v mechanismu účinku auxinu už dříve prokázáno (viz Tab. 7).

Tab. 7: Přehled identifikovaných auxin-interagujících proteinů zapojených do metabolismu auxinu

Název proteinu	Funkce v metabolismu auxinu
Probable phospholipid-transporting ATPase 5	Protein zapojený v polárním transportu auxinu
Aminopeptidase M1 (Alpha-aminoacylpeptide hydrolase)	Protein zapojený do polárního transportu auxinu
Protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1	Protein zapojený do auxin-aktivující signální dráhy
COP9 signalosome complex subunit 5a	Protein zapojený do odpovědi na působení auxinu
Exocyst subunit Exo70 family protein	Transport auxinu
SKP1-like protein 1A (UFO-binding protein 1)	Protein zapojený do auxin-aktivující signální dráhy
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	Protein zapojený do odpovědi na působení auxinu

Prvním proteinem zapojeným do fyziologických účinků auxinu je aminofosfolipidová flipasa 5 (AtALA5), což je protein zapojený do polárního transportu auxinu vyskytující se v membráně (Zhang et al., 2020).

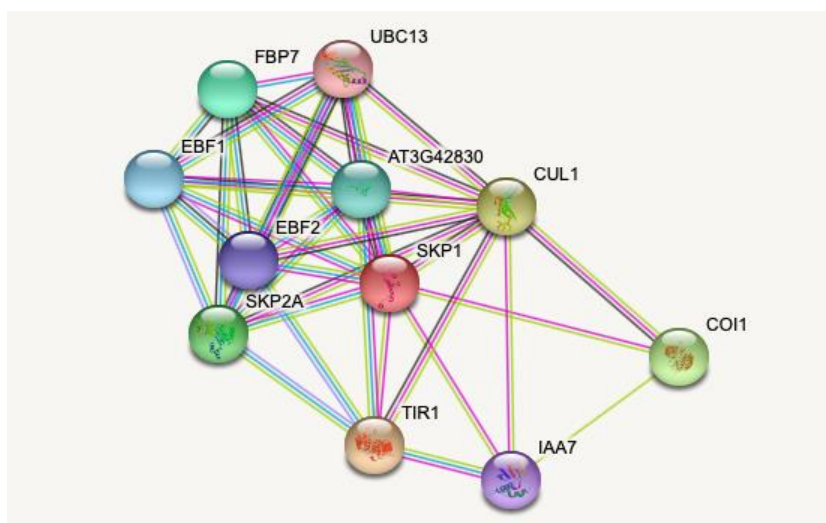
V auxinovém transportu je zapojen i další auxin-interagující protein Aminopeptidasa M1, který se váže na inhibitor transportu auxinu N-1-naftylftalamovou kyselinu (NPA), což je proces nutný pro správný průběh buněčného cyklu a vývoj embryí (Peer et al., 2009).

Třetím proteinem je TIR1, který je zapojený do signálních drah auxinu a degradace proteinů Aux/IAA. Podrobněji je jeho zapojení v procesu auxinové signalizace popsáno v kapitole 2.3.6 Mechanismus účinku.

Čtvrtý protein COP9 signalosome complex subunit 5a je podjednotka komplexu CSN, který hraje důležitou roli v procesech jako je regulace reakcí na auxin a jasmonáty. Mimo jiné komplex CSN, jehož je COP9 5a součástí, reguluje také konjugaci ubiquitinu a je zapojen do represe fotomorfogeneze (Gusmaroli et al., 2007).

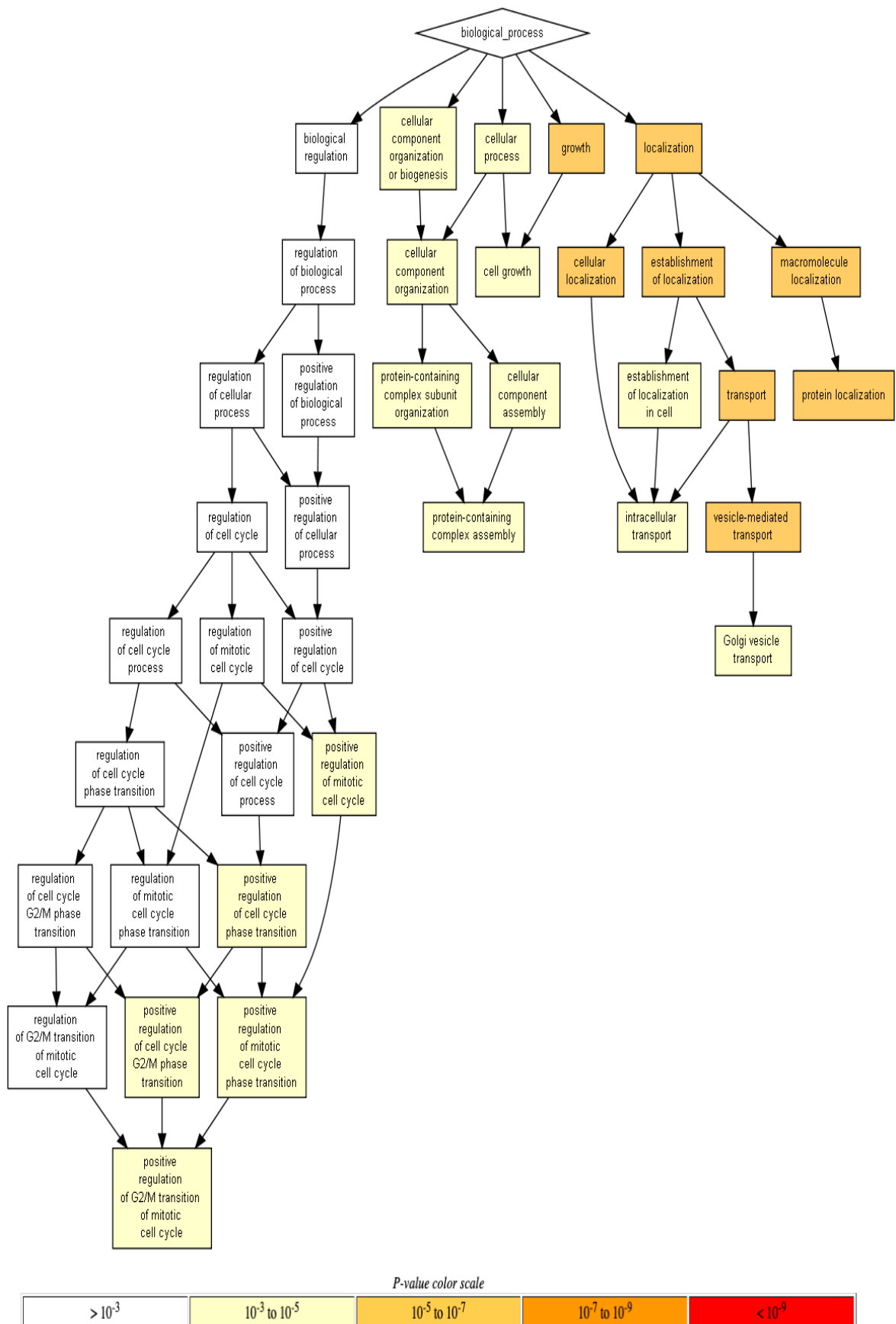
Protein Exocyst subunit Exo70 family protein je dalším proteinem zapojeným do transportu auxinu v *Arabidopsis thaliana* (Drdová et al., 2013).

SKP1-like protein 1A (UFO-binding protein 1) je součástí komplexu SCF E3 ubiquitin ligázy, kde spojuje podjednotky F-box a CUL1. Má tedy významnou roli v ubiquitinaci a degradaci proteinů. Komplex SCF (TIR1) je zapojen do signální dráhy auxinu. Další komplexy SCF poté mají funkci ve vývoji vegetativních i generativních orgánů rostliny, v regulaci reakce na jasmonáty (COI1) a dalších významných fyziologických procesech (Zhao D et al., 2003).



Obr. 8: Schéma interakcí proteinu SKP1-like protein (UFO-binding protein 1), z obrázku je znatelné propojení proteinů TIR1 (podjednotka F-boxu) a CUL1 (schéma vytvořeno v databázi String-db.org)

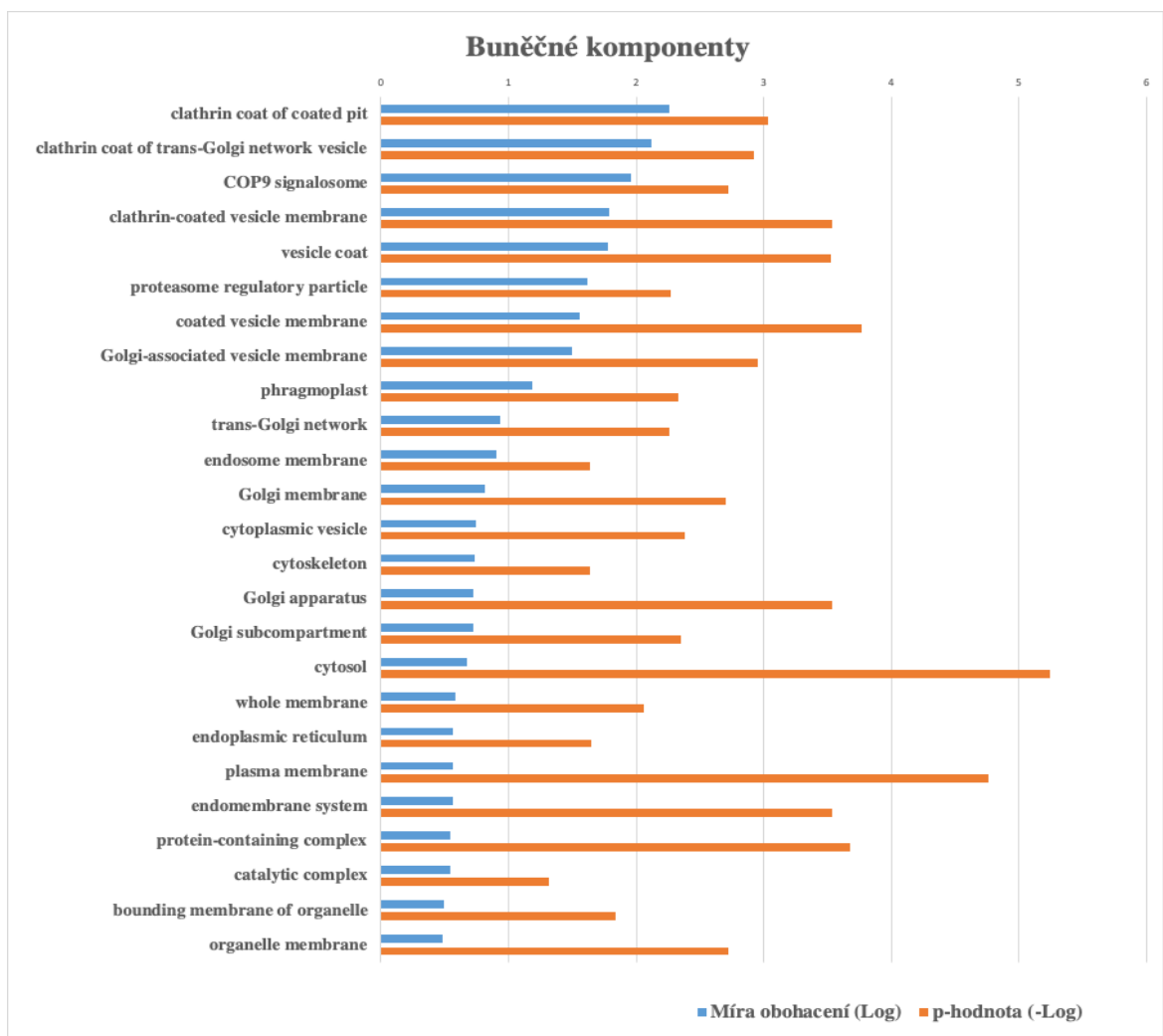
Posledním proteinem je Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H, který je součástí iniciačního translačního faktoru (eIF-3) u eukaryotických organismů. Jako jeden z iniciačních faktorů umožňuje navázání mRNA a methionyl-tRNA_i k 40S podjednotce ribozomu. Je zapojen v reakcích na působení auxinového stimulu (Kim et al., 2007).



Obr. 9: Schéma znázorňující biologické procesy, v nichž jsou zapojeny identifikované auxin-interagující proteiny (schéma získáno z databáze GOrilla).

Se záměrem blíže charakterizovat soubor 62 výsledných proteinů byla provedena analýza jejich zapojení do biologických procesů v buňce pomocí databáze Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool (GORilla). Obohaceny jsou zejména proteiny, které se podílí na buněčném růstu, zasahují do regulace buněčného dělení i do průběhu buněčného cyklu, například regulací mitózy nebo regulací přechodu z G2 do M fáze, zapojeny jsou také do transportu, především vezikulárního transportu v Golgiho aparátu (viz Obr. 9).

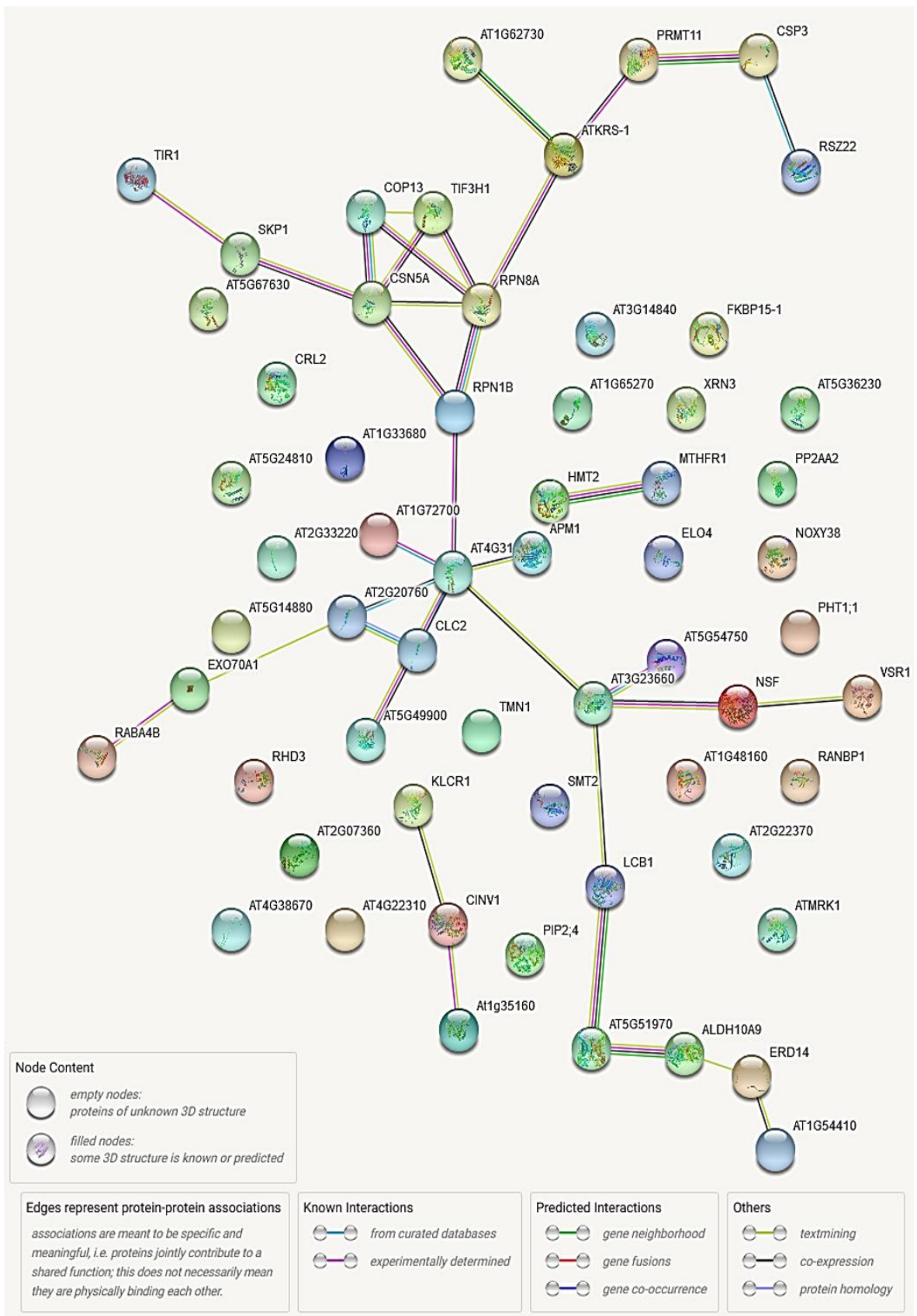
Všechny biologické procesy, na kterých se zmíněné proteiny podílí, jsou zároveň procesy, do nichž je významně zapojen i auxin. To podporuje hypotézu, že identifikované proteiny z Tab. 6 jsou doopravdy auxin-interagující, a mohou se podílet na auxinové signalizaci nebo jiných procesech zapojených v metabolismu auxinu.



Obr. 10: Graf znázorňující obohacení u buněčných komponent, jejichž součástí jsou identifikované auxin-interagující proteiny. P-hodnota znázorňuje míru spolehlivosti tohoto stanovení.

Pomocí databáze String byly získány informace o buněčných komponentech, jejichž součástí jsou identifikované proteiny. Lokalizace v buňce odpovídá i biologickým funkcím podle databáze GOrilla. Obohaceny jsou zejména proteiny, které se podílí na stavbě vezikulárních struktur spojených s Golgiho aparátem a endoplazmatickým retikulem a které odpovídají za buněčný transport. Jsou také součástí komplexu COP9 signalozomu (CSN) zapojeného do vývojových procesů spojených s reakcí na auxiny. Identifikované proteiny se podílí také na výstavbě cytoskeletu, fragmoplastu a dalších buněčných komponent (viz Obr.10).

Vzhledem k tomu, že soubor výše zmíněných 62 proteinů (viz Tab. 6) by měl obsahovat proteiny interagující s IAA, a tedy proteiny zapojené do příbuzných procesů ovlivněných auxinem, dá se předpokládat, že tyto proteiny budou ve zvýšené míře vykazovat i protein-proteinové interakce navzájem mezi sebou. Pro potvrzení této teorie byly vybrané proteiny zpracovány v databázi String-db.org, která odhalila 36 interakcí, což je signifikantně více, než by se dalo předpokládat u souboru náhodně vybraných proteinů. Souhrnně jsou pak interakce vyobrazeny na Obr. 11.



Obr. 11: Schéma vzájemných interakcí výsledných proteinů, které byly vyhodnoceny jako interagující s IAA (schéma vytvořeno v databázi String-db.org).

5 Závěr

Tato práce se zabývala studiem auxin-interagujících proteinů v modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*. Studium těchto proteinů bylo prováděno vybranými proteomickými metodami. Klíčovým krokem práce bylo purifikovat tyto proteiny pomocí afinitní chromatografie, ve které byl jako matrice použit gel KB1 s ligandem IAA.

Po afinitní purifikaci byly získané proteiny analyzovány pomocí systému nanokapilární chromatografie (nLC) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF a ionizací elektrosprejem (ESI). Z analyzovaných proteinů byly vyselektovány na základě rozdílných koncentrací při kompetici s volnou IAA a volnými nukleotidy ty, které odpovídaly předpokladům pro specifické auxin-interagující proteiny. Tyto byly dále analyzovány pomocí proteinových databází, ze kterých byly získány informace o roli těchto proteinů v biologických procesech a jejich zapojení v buněčných strukturách. Byly také odhaleny jejich vzájemné protein-proteinové interakce.

Z celkového počtu 2349 identifikovaných proteinů odpovídalo předpokladům pro auxin-interagující proteiny 62 proteinů. Tyto proteiny se nejčastěji zapojují do biologických procesů jako je vezikulární transport, buněčný růst, regulace buněčného cyklu a další. Lokalizace proteinů v buňce odpovídala procesům, do kterých se proteiny zapojují, proto se proteiny nejčastěji vyskytovaly v clathrinových obalech vezikulů, Golgiho aparátu a dalších buněčných komponentech zapojených do transportu a buněčného růstu. To, že jsou tyto proteiny zapojeny i do signálních drah dokládá fakt, že byly lokalizovány jako součást komplexu COP9 signalozomu, který je zapojen do ubiquitinace a degradace proteinů a také do odpovědi na působení auxinu a jasmonátů.

Kromě zapojení do komplexu COP9 signalozomu byl identifikován i auxin-interagující protein TIR1, který se svými protein-proteinovými interakcemi rovněž významně zapojuje do auxinové signalizace.

Dalším studiem získaných auxin-interagujících proteinů by bylo možné odhalit jejich roli ve fyziologických účincích auxinu nebo odhalit jejich zapojení do signalizace auxinu, a tím objasnit dosud neznámé mechanismy účinku auxinu v buňkách rostlin.

6 Seznam literatury

Adamowski, M., & Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *The Plant Cell*, 27(1), 20-32.

Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., & Cerdà, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 655-667.

Arteca R.N. (1996), Plant Growth Substances: Principles and Applications, Springer science & Business media, 3-7.

Barbier, F. F., Dun, E. A., & Beveridge, C. A. (2017). Apical dominance. *Current Biology*, 27(17), 864-865.

Beck, S., Michalski, A., Raether, O., Lubeck, M., Kaspar, S., Goedecke, N., ... & Mann, M. (2015). The Impact II, a very high-resolution quadrupole time-of-flight instrument (QTOF) for deep shotgun proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(7), 2014-2029.

Blakeslee, J. J., Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2005), Auxin transport. *Current opinion in plant biology*, 8(5), 494-500.

Bodzon-Kulakowska A., Bierczynska-Krzysik A., Dylag T., Drabik A., Suder P., Noga M., Jarzebinska J., Silberring J. (2007). Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 849(1-2), 1-31.

Bouchal, P., & Kucera, I. (2003). Two-dimensional electrophoresis in proteomics: Principles and applications. *Chemické listy*, 97(1), 29-36.

Casanova-Sáez, R., & Voß, U. (2019). Auxin metabolism controls developmental decisions in land plants. *Trends in plant science*, 24(8), 741-754.

- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., & Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research*, 10(4), 1794-1805.
- Das, S., Weijers, D., & Borst, J. W. (2021). Auxin Response by the Numbers. *Trends in Plant Science*, 26(5), 442–451.
- Drdová, E. J., Synek, L., Pečenková, T., Hála, M., Kulich, I., Fowler, J. E., Murphy, A. S., & Zárský, V. (2013). The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 73(5), 709–719.
- Enders, T. A., & Strader, L. C. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American journal of botany*, 102(2), 180-196.
- Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 20(41), 152-157.
- Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, D., Dai, X., Estelle, M., & Zhao, Y. (2015). Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 2275-2280.
- Geisler M., Wang B. & Zhu J. (2014), Auxin transport during root gravitropism: transporters and techniques. *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 50-57.
- Goldring, J. D. (2015). Spectrophotometric methods to determine protein concentration. *Western Blotting*, 41-47.
- Grones, P., & Friml, J. (2015). Auxin transporters and binding proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 128, 1–7.
- Guilfoyle T.J., Hagen G. (2007) Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 453–460.

- Gupta, N., Bandeira, N., Keich, U., & Pevzner, P. A. (2011). Target-decoy approach and false discovery rate: when things may go wrong. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(7), 1111-1120.
- Gusmaroli, G., Figueroa, P., Serino, G., & Deng, X. W. (2007). Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with Arabidopsis Cullin3-based E3 ligases. *The Plant Cell*, 19(2), 564-581.
- Jackson, R. G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., & Bowles, D. J. (2002). Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *The Plant Journal*, 32(4), 573-583.
- Kim, B. H., Cai, X., Vaughn, J. N., & von Arnim, A. G. (2007). On the functions of the h subunit of eukaryotic initiation factor 3 in late stages of translation initiation. *Genome biology*, 8(4), R60.
- Kochhar S.L., Gujral S.K. (2020). Plant Physiology: Theory and Applications. Cambridge University Press.
- Koornneef, M., Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909–921.
- Kovářová, H. (2005). Proteomika v postgenomové době. *Chem. listy*, 99, 886-889.
- Krämer U. (2015), The Natural History of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*, eLife, 4, e06100.
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (pp. 17–24). Springer.

- Lloyd, A. M., Barnason, A. R., Rogers, S. G., Byrne, M. C., Fraley, R. T., & Horsch, R. B. (1986). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, *234*(4775), 464-466.
- Ludwig-Müller, J., Walz, A., Slovin, J. P., Epstein, E., Cohen, J. D., Dong, W., & Town, C. D. (2005). Overexpression of maize IAGLU in *Arabidopsis thaliana* alters plant growth and sensitivity to IAA but not IBA and 2, 4-D. *Journal of plant growth regulation*, *24*(2), 127-141.
- Magdeldin, S., & Moser, A. (2012). Affinity Chromatography: Principles and Applications, Affinity Chromatography, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0325-7, InTech, 3-28.
- Macháčková I (1998) Fyziologie rostlin. Academia, ČR.
- Mallick, P., & Kuster, B. (2010). Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature biotechnology*, *28*(7), 695.
- Mano, Y., & Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of experimental Botany*, *63*(8), 2853-2872.
- Méchin V., Damerval C., Zivy M (2007) Total Protein Extraction with TCA-Acetone. In Plant Proteomics, Humana Press, 1–8.
- Meyerowitz, E. M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics*, *21*, 93–111.
- Moore T.C. (2012) Biochemistry and Physiology of Plant Hormones, Springer Science & Business Media, 28-31.
- Normanly, J., Slovin, J. P., & Cohen, J. D. (1995). Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiology*, *107*(2), 323.

- Peer, W. A., Hosein, F. N., Bandyopadhyay, A., Makam, S. N., Otegui, M. S., Lee, G. J., Blakeslee, J. J., Cheng, Y., Titapiwatanakun, B., Yakubov, B., Bangari, B., & Murphy, A. S. (2009). Mutation of the membrane-associated M1 protease APM1 results in distinct embryonic and seedling developmental defects in Arabidopsis. *The Plant cell*, *21*(6), 1693–1721.
- Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *22*(6), 362-373.
- Porco, S., Pěňčík, A., Rashed, A., Voß, U., Casanova-Sáez, R., Bishopp, A., ... & Ljung, K. (2016). Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(39), 11016-11021.
- Rampey, R. A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G., & Bartel, B. (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant physiology*, *135*(2), 978-988.
- Renkin, E. M. (1954). Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *The Journal of general physiology*, *38*(2), 225-243.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology*, *17*(10), 1030-1032.
- Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*, *6*(12), 1-11.
- Szymańska, R., Gabruk, M., & Kruk, J. (2015). Ekotypy Arabidopsis thaliana—nowe narzędzie w badaniach biochemicznych i filogenetycznych. *Postępy Biochemii*, *61*(1), 102-113
- Taiz L., Zeiger E. (2010), *Plant physiology*, 5th edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers.

- Tanaka, K., Hayashi, K. I., Natsume, M., Kamiya, Y., Sakakibara, H., Kawaide, H., & Kasahara, H. (2014). UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *55*(1), 218-228.
- Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols*, *11*(12), 2301-2319.
- Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Affinity chromatography: general methods. *Methods in enzymology*, *463*, 417-438.
- Wang, B., Chu, J., Yu, T., Xu, Q., Sun, X., Yuan, J., Xiong, G., Wang, G., Wang, Y., & Li, J. (2015). Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(15), 4821–4826.
- Weigel, D., Mott, R. (2009), The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* **10**, 107.
- Wildman, S. G. (1997). The auxin-A, B enigma: scientific fraud or scientific ineptitude?. *Plant growth regulation*, *22*(1), 37-68.
- Zhang, X., Adamowski, M., Marhava, P., Tan, S., Zhang, Y., Rodriguez, L., Zwiewka, M., Pukyšová, V., Sánchez, A. S., Raxwal, V. K., Hardtke, C. S., Nodzyński, T., & Friml, J. (2020). Arabidopsis Flippases Cooperate with ARF GTPase Exchange Factors to Regulate the Trafficking and Polarity of PIN Auxin Transporters. *The Plant cell*, *32*(5), 1644–1664.
- Zhao, D., Ni, W., Feng, B., Han, T., Petrasek, M. G., & Ma, H. (2003). Members of the Arabidopsis-SKP1-like gene family exhibit a variety of expression patterns and may play diverse roles in Arabidopsis. *Plant physiology*, *133*(1), 203-217.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., ... & Wan, J. (2013). A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Developmental Cell*, *27*(1), 113-122.

Zhou, J.J., Luo J. (2018). The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants. *International journal of molecular sciences*. 19 (9), 2759.

Zwiewka, M., Bilanovičová, V., Seifu, Y. W., Nodzyński, T. (2019). The nuts and bolts of PIN auxin efflux carriers. *Frontiers in plant science*, 10, 985.

Żwir-Ferenc, A., & Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677–690.