

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Stanovení metabolického profilu IAA v endoplazmatickém
retikulu vybraných mutantních linií *Arabidopsis thaliana***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Ludmila Včelařová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Aleš Pěňčík, Ph.D
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Ludmila Včelařová
Název práce	Stanovení metabolického profilu IAA v endoplazmatickém retikulu vybraných mutantních linií <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Aleš Pěňčík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Auxiny jako jedna z fytohormonálních rodin hrají nezastupitelnou roli v růstu a vývoji rostlin. Současné poznatky naznačují, že klíčovým parametrem regulace fyziologických procesů je subcelulární distribuce indol-3-ylactové kyseliny (IAA). Proto byla tato práce zaměřena na optimalizaci izolace subbuněčného kompartmentu endoplazmatického retikula (ER). To se považuje za vstupní bránu auxinů do jádra, kde probíhá jejich percepce. Za použití optimalizovaného protokolu byly buněčné orgány mechanicky uvolněny z rostlinného pletiva a následně bylo izolováno ER prostřednictvím diskontinuální hustotní gradientové ultracentrifugace. Purifikace a stanovení auxinů byla provedena za použití protokolu pro mikroextrakci pevnou fází pomocí plněných pipetovacích špiček (μSPE-PT) s následnou hmotnostně-spektrometrickou analýzou. Byl porovnán metabolický profil IAA v ER frakcích izolovaných z rostlin <i>Arabidopsis Col-0</i> a nadprodukující linie 35S::PIN8-GFP.</p>
Klíčová slova	Homeostáza auxinů, metabolismus auxinů, transport auxinů, PIN8, endoplazmatické retikulum, diskontinuální hustotně-gradientová ultracentrifugace, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	73
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Ludmila Včelařová
Title	Study of auxin metabolite profile in endoplasmic reticulum of selected <i>Arabidopsis</i> mutant lines
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Aleš Pěnčík, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	Auxins as one of phytohormonal group play irreplaceable role in plant growth and development. Recent results show that subcellular distribution of indol-3-acetic acid (IAA) is a key parameter of physiological processes. For this reason, thesis deals with optimisation of subcellular fractionation with focus on endoplasmic reticulum (ER). This compartment is considered to be entrance gate of auxin into nuclei, where auxin signal is perceived. ER-enriched fraction was isolated by optimized protocol employing mechanical tissue disruption with subsequent discontinuous density-gradient ultracentrifugation. Auxins were purified and quantified via in-tip micro-solid phase extraction (μ SPE PT) following mass spectrometry analysis. Determined metabolic auxin profiles of whole plants as well as ER-enriched fractions isolated from WT and overexpressing <i>Arabidopsis</i> plant line 35S::PIN8-GFP were compared.
Keywords	Auxin homeostasis, auxin metabolism, auxin transport, PIN8, endoplasmic reticulum, discontinuous density-gradient ultracentrifugation, mass spectrometry
Number of pages	73
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Aleše Pěňčíka, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Ludmila Včelařová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Aleši Pěňčíkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a věcné připomínky při vypracování této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Vladimírovi Skalickému a Mgr. Petře Jiroutové, Ph.D. za praktické ukázky používaných metod a sdílení cenných zkušeností.

Mé poděkování dále patří prof. Jiřímu Frimlovi, Ph.D. z IST Austria za poskytnutí semen *Arabidopsis thaliana* ze zásob IST Austria.

Také bych chtěla poděkovat pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů, zejména Mgr. Marii Vitáskové, Ing. Jarmile Greplové a Ing. Haně Svobodové. Můj dík patří samozřejmě též rodině.

Tato práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury Univerzity Palackého (projekt IGA_PrF_2020_021).

Obsah

1 ÚVOD A CÍLE	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2.2 Buněčné kultury	11
2.3 Rostlinná buňka	13
2.3.1 Buněčné organely.....	13
2.3.2 Endoplazmatické retikulum	17
2.4 Auxiny	19
2.4.1 Homeostáza auxinů.....	20
2.4.1.1 Biosyntéza.....	21
2.4.1.2 Metabolismus	23
2.4.1.3 Transport	24
2.4.2 Receptory a signální dráhy auxinu.....	26
2.5 Endoplazmatické retikulum a auxiny.....	27
2.6 Stanovení auxinů v ER frakci	28
2.6.1 Frakcionace organel.....	28
2.6.1.1 Homogenizace.....	29
2.6.1.2 Izolace subcelulárních organel.....	30
2.6.1.3 Identifikace a charakterizace separovaných buněčných frakcí	31
2.6.2 Příprava vzorku pro analytické stanovení auxinů.....	32
2.6.2.1 Extrakce a purifikace vzorku	32
2.6.2.3 Analytické metody	33
3 PRAKTICKÁ ČÁST	35
3.1 Biologický materiál.....	35
3.2 Pomůcky a přístroje	35
3.2.1 Pomůcky	35
3.2.2 Přístroje.....	35
3.3 Chemikálie a činidla	36
3.4 Pracovní postupy.....	38

3.4.1 Výsev <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
3.4.1.1 Příprava roztoků.....	38
3.4.1.2 Výsev semen	38
3.4.2 Genotypizace.....	39
3.4.2.1 Příprava roztoků.....	39
3.4.2.2 Extrakce gDNA.....	39
3.4.2.3 PCR.....	40
3.4.3 Odvozování buněčných suspenzí	41
3.4.3.1 Příprava roztoků.....	41
3.4.3.2 Indukce kalusu	42
3.4.3.3 Pěstování kalusu.....	42
3.4.3.4 Přenos kalusů do tekutého média.....	42
3.4.4 Fluorescenční mikroskopie	42
3.4.5 Izolace ER.....	42
3.4.5.1 Příprava roztoků.....	42
3.4.5.2 Zpracování rostlinného materiálu	43
3.4.5.3 Optimalizace otáček centrifugace	43
3.4.5.4 Izolace dle původního protokolu (Ding et al, 2012)	44
3.4.5.5 Izolace dle optimalizovaného protokolu	44
3.4.6 Western blot.....	45
3.4.6.1 Příprava roztoků.....	45
3.4.6.2 Elektroforéza.....	46
3.4.6.4 Imunodetekce	46
3.4.7 Extrakce auxinových metabolitů.....	47
3.4.7.1 Příprava roztoků.....	47
3.4.7.2 Příprava μ SPE-PT kolonek	47
3.4.7.3 Extrakce a purifikace	47
3.4.8 Parametry HPLC-MS/MS	48
4 VÝSLEDKY	49
4.1 Ověření pravosti vybraných linií.....	49
4.2 Odvozování buněčných suspenzí	50

4.3 Izolace ER.....	51
4.4 Stanovení hladin metabolitů IAA v <i>A. thaliana</i> Col-0 a 35S::PIN8-GFP	52
4.5 Metabolický profil IAA v endoplazmatickém retikulu.....	53
5 DISKUZE	55
6 ZÁVĚR	58
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

Seznam zkratek

2,4-D 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina	DAO1 dioxygenasa pro oxidaci auxinu 1
2,4-DP kyselina 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionová	DAO2 dioxygenasa pro oxidaci auxinu 2
2,4,5-T kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová	DEDCTA diethyldithiokarbamat sodný
35S::PIN5-GFP linie s genem pro PIN5 značený GFP pod kontrolou promotoru 35S	DLLME disperzivní kapalina-kapalina extrakce
35S::PIN8-GFP linie s genem pro PIN8 značený GFP pod kontrolou promotoru 35S	DTT dithiotreitol
35S::PIN5/PIN8 linie s geny PIN5 a PIN8 pod kontrolou promotoru 35S	EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová
4-Cl-IAA 4-chlor-indol-3-ylactová kyselina	eir1 mutant <i>Arabidopsis thaliana</i> defektní v genu pro PIN2
ABCB ATP-BINDING CASSETTE subfamily B	EIN2 ethylen citlivý protein 2
ABCB/PGP ATP-binding cassette subfamily B/P- glycoprotein	ER endoplazmatické retikulum
ABP1 auxin binding protein 1	ERES výstupní místa endoplazmatického retikula
abp1 mutantní <i>Arabidopsis thaliana</i> defektní v genu pro ABP1	ERGIC přechodný kompartment mezi ER a Golgiho aparátem
AcA kyselina octová	F primer – forward primer
AFB auxin signaling <i>F-Box</i>	FFE volná průtoková elektroforéza
agr1 mutant <i>Arabidopsis thaliana</i> defektní v genu pro PIN2	FW fresh weight
ANT anthranilát	GA Golgiho aparát
APS persíran amonný	GDC-H H protein glycin-dekarboxylázového komplexu
ARF auxin response factor	GFP zelený fluorescenční protein
AtPIN1 (ATIG73590) PIN-FORMED 1	GH3 <i>Gretchen Hagen 3</i>
ATP adenosintrifosfát	H3 histon H3
AUX/IAA auxin/indole-3-acetic acid	HF-LLLME mikroextrakce kapalina-kapalina-kapalina s využitím disperzních dutých vláken
AUX/LAX auxin/like-aux	IAA indol-3-ylactová kyselina
AUX1 auxin resistant 1	IAA-Glc 1-O-(2-indol-3-ylacetyl)- β -D-glukopyranóza
Bis N, N'-methylenebisakrylamid	iaaH gen kódující enzym <i>IAM hydrolasu</i>
BiP luminal binding protein	IAAla (2-(1H-indol-3-yl)acetyl)alanin
BY-2 <i>Nicotiana tabacum</i> kultivar Bright Yellow	iaaM gen kódující enzym <i>tryptophan-2-monooxygenasu</i>
C18 typ sorbentu, oktadecylová fáze vázaná na nosiči	IAAsp (2-(1H-indol-3-yl)acetyl)aspartát
CNX1/2 calnexin 1/2	IAGlu (2-(1H-indol-3-yl)acetyl)glutamat
COPI, COPII the coat protein complex I, II	IALeu (2-(1H-indol-3-yl)acetyl)leucin
CPD protein superrodiny cytochromu P450	IAM 2-(1H-indol-3-yl)acetamid
CYP79B2, CYP79B3, CYP83B1 cytochrom P450 monooxygenasy	IAN 2-(1H-indol-3-yl)acetonitril
	IAOx 2-(1H-indol-3-yl)acetaldoxim
	IAPhe (2-(1H-indol-3-yl)acetyl)fenylalanin
	IAr3 Indole-3-Acetic Acid Alanine-Resistant 3

IBA 2-(1*H*-indol-3-yl)máselná kyselina
IEF-FFE volná průtoková elektroforéza v režimu izoelektrické fokusace
IG indolglukosinoláty
ILR IAA-leucin resistant
ILR-like/ILL IAA-leucine resistant1-like
INM vnitřní jaderná membrána
IPA indol-3-propionová kyselina
IPyA 2-(1*H*-indol-3-yl)pyruvát
LHCII komplex zachycující světlo II
LAX1-3 *auxin transporter-like protein 1-3*
LLE extrakce kapalina-kapalina (*liquid-liquid extraction*)
MES kyselina 2-(*N*-morfilino)ethansulfonová
MIP molekulárně vtištěné polymery
MS hmotnostní spektrometrie
MS médium Murashige & Skoog medium
MS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie
NAA kyselina α -naftyloctová
NADPH Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NIT1-3 nitrilasa 1-3
NTR1.1 dusičnanový transportér 1.1
ONM vnější jaderná membrána
oxIAA (2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-yl)octová kyselina
oxIAA-Glc 1-*O*-(2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-ylacetyl)- β -D-glukopyranosa
PAA kyselina fenylloctová
PAT polární auxinový transport
PCR polymerázová řetězová reakce
pI izoelektrický bod
PILS PIN-LIKES, auxinové transportéry
PIN PIN-FORMED, proteinová rodina auxinových transportérů
PMME polymerní monolitová mikroextrakce
PMSF Fenylmetansulfonyl fluorid
PsbA D1 protein fotosystému II
PSI, PSII fotosystém I, II
R primer – reverzní primer
RER drsné endoplazmatické retikulum
Sec-21p gama podjednotka COP vezikulí
SER hladké endoplazmatické retikulum
SNARE proteiny rozpustné NSF vázané receptorové proteiny
SPD-XC typ sorbentu, kopolymer polystyren-divinylbenzenu
SPE extrakce pevnou fází
SPME mikroextrakce na pevné fázi
SUN proteiny Sad1/UNC-84 doménový protein
TAA tryptofan aminotransferasa
TAA1 tryptofan amiotransferasa *Arabidopsis* 1
TAM tryptamin
TBE Tris-borát-EDTA
TBS-T TRIS-pufrovaný solný roztok s přídavkem Tweenu
TE Tris-EDTA
TEMED tetramethylethylendiamin
TGN trans-Golgiho síť
TIR1 *transport inhibitor response 1*
TOF průletový analyzátor
Tris trisaminomethan
UGT74D1 enzym UDP-glucosyl transferasa 74D1
HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS/MS vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
VAS1 methionin specifická aminotrasferasa
VDAC voltage-depent anion channel
WAT1 WALLS ARE THIN 1
wav6 mutant *Arabidopsis thaliana* defektní v genu pro PIN2
WB Western blot
YUC YUCCA
YUCCA *Arabidopsis flavin monooxydase gene*
ZE-FFE volná průtoková elektroforéza v zónovém elektroforetickém režimu
 μ SPE-PT mikroextrakce pevnou fází pomocí plněných pipetovacích špiček

1 ÚVOD A CÍLE

Auxiny hrají zásadní roli v regulaci růstu a vývoje rostlin. Pro mnoho vývojových procesů kontrovaných auxinem je zásadní jeho prostorová distribuce v rámci orgánů, pletiv i jednotlivých buněk. V každé eukaryotické buňce se nachází rozsáhlá síť membránových organel, které společně tvoří její endomembránový systém. U jednoho z kompartmentů – endoplazmatického retikula (ER), které je primárně zodpovědné za syntézu proteinů a anabolismus lipidů, se v nedávné době prokázalo, že se účastní také signalizace a metabolismu fytohormonů včetně auxinů. Předpokládá se, že ER-lokalizované auxinové transportéry (PIN5, PIN6, PIN8 a PILS2, PILS5, PILS6) přispívají ke kontrole auxinové subcelulární homeostázy regulováním toků indol-3-ylactové kyseliny (IAA) mezi cytosolem a ER. Navíc, některé auxinové biosyntetické proteiny z rodiny YUCCA (např. YUCCA4) jakož i některé auxin-amidohydrolasy mohou být také lokalizovány na membráně ER a podílet se na utváření gradientů auxinu uvnitř buňky.

Hlavním cílem této diplomové práce je stanovení metabolického profilu auxinů v ER *Arabidopsis thaliana* Col-0 a mutantních linií nadprodukcujících ER-lokalizované auxinové přenašeče PIN5 a PIN8. Za tímto účelem budou odvozeny buněčné suspenzní kultury z kontrolních a mutantních linií 35S::PIN5 a 35S::PIN8-GFP, které by mohly být použity jako vhodný modelový systém pro studium regulace homeostáze auxinu na subcelulární úrovni. Dále bude optimalizován postup izolaci ER s využitím diskontinuální gradientové ultracentrifugace. V získaných ER frakcích bude stanoven metabolický profil IAA s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Arabidopsis thaliana*

Modelové organismy jsou důležitou součástí studia specifických biologických procesů v biomedicíně, environmentálním a biologickém výzkumu. Jedná se o pečlivě vybrané biosystémy, s nimiž se snadno manipuluje, jsou relativně dobře dostupné a levné. Obvykle (ne však výhradně) se jedná o organismy s krátkou generační dobou. Mezi nejcitovanější organismy v Google Scholar patří *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Caenorhabditis elegans* (Edison et al, 2016).

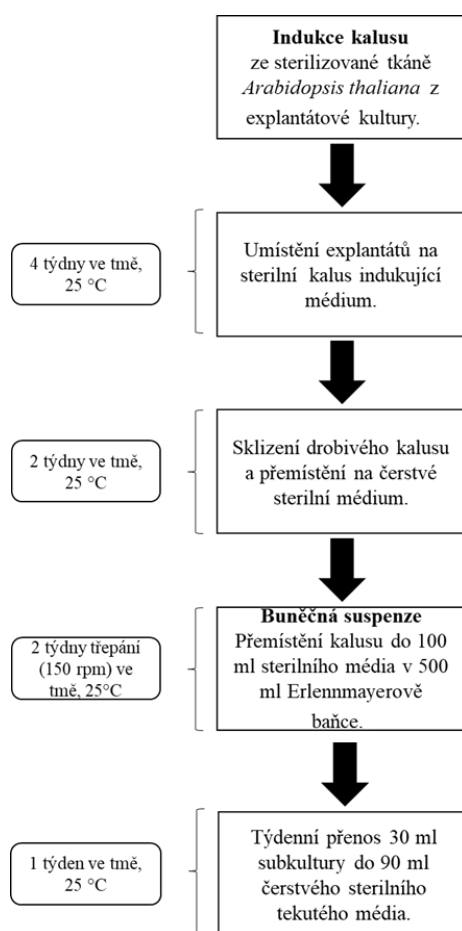
Arabidopsis thaliana (česky huseníček rolní) je malá jednoletá rostlina řadící se do taxonomické čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Poprvé byla popsána v roce 1753 Johannesem Thalem v pohoří Harz. Své současné jméno *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. získala roku 1842 od Gustava Heynholda. Prvním vědeckým pracovníkem, který v roce 1907 publikoval vlivnou cytogenetickou studii o *A. thaliana*, byl Friedrich Laibach (Krämer, 2015).

Pokud jde o její použití jako klasického a funkčního modelu v biologických vědách, představuje *Arabidopsis* ideální model z několika hlavních důvodů. Jedná se o 7 - 40 cm malou rostlinu, což umožňuje její pěstování ve velkém měřítku. Navíc má *Arabidopsis* silnou reprodukční schopnost, která umožňuje generování velkého množství semenáčků v krátkém čase, což zásadně snižuje náklady na experimenty. Další ohromnou výhodou *Arabidopsis* je schopnost autogamie. Většina přirozeně vyskytující se *Arabidopsis* je vysoce homozygotní, což usnadňuje indukci specifických mutací a konstrukci mutantů rozmanitými molekulárními, chemickými a fyzikálními metodami. Genom této rostliny je velký 125 MB a je tvořen pěti chromozomy, obsahujícími přibližně 100 miliónů párů bazí, což výrazně snižuje náklady a obtížnost sekvenování (Sivasubramanian et al, 205). Celogenomové sekvenování *Arabidopsis thaliana* jako experimentálního modelu bylo dokončeno v roce 2000 iniciativou Arabidopsis Genom Initiative (Zhu et al, 2016).

2.2 Buněčné kultury

Buněčné/tkáňové kultury jsou *in vitro* aseptické kultury buněk, tkání, orgánů nebo celých rostlin rostoucích za přísně regulovaných nutričních a environmentálních podmínek. Jedná se o všestranný nástroj při zkoumání základních vědeckých otázek, jehož výhodou je homogenita a reprodukovatelnost vygenerovaných dat (Cassells, 2012). Často jsou využívány k produkci klonů rostlin. Kontrolované podmínky poskytují kultuře příznivé prostředí pro růst a množení. Podmínky zahrnují správnou kombinaci živin, pH média, teplotu a poměr kapalného a plynného prostředí. Klíčovou vlastností rostlinných buněk, která umožnila rozvoj rostlinné biotechnologie je totipotence, což je schopnost jednotlivých somatických buněk vytvořit kompletní rostlinu.

Tkáňové kultury hrají zásadní roli pro studium základních procesů v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. První zmínky o buněčné kultuře *Arabidopsis* získané z kalusu pocházejí z 60. let 20. století. Po první regeneraci celých rostlin z explantátů listů *Arabidopsis thaliana* následované dalšími studii se *Arabidopsis* stala na základě svých výhodných vlastností nepostradatelným rostlinným modelovým organismem. K výhodným vlastnostem buněčných suspenzních kultur patří zejména schopnost produkce kompletních proteinů, které mohou být sekretovány do média, což má za následek snížení nákladů na produkci těchto proteinů. K dalším výhodám kultur patří krátká reprodukční doba, či absence environmentálních vlivů jako je počasí, přítomnost škůdců či kvalita vody, protože pěstování rostlinných buněk je prováděno za přísně definovaných a kontrolovaných podmínek. Nevýhodou kultur je náchylnost k mykotickým a bakteriálním kontaminacím, nižší výtěžek proteinů a potencionálně vyšší kapitálové náklady (Cassells, 2002; Xu & Zhang, 2014). V současnosti existuje několik protokolů pro úspěšné odvození buněčné suspenzní kultury z *Arabidopsis*, například protokol dle Barkla et al, 2013 viz Obr. 1. Buněčné suspenzní kultury se uplatňují mimo vědeckou sféru také například při výrobě léčiv, kosmetiky a potravin (Barkla et al, 2013).



Obr. 1: Schématický postup odvozování buněčné suspenze dle Barkla et al, 2013.

Rostlinné buněčné linie je možné získat relativně snadno z různých tkání různých vyšších rostlin. Jedinečné vlastnosti jako vysoké tempo růstu a vysoká homogenita se projeví u buněčné linie

Nicotiana tabacum kultivar Bright Yellow (BY-2) (Nagata et al, 1992). Rychlá akumulace biomasy a snadná transformace učinily z BY-2 buněk nejčastěji používanou linii rostlinných buněk pro produkci proteinů (Doran, 2013).

2.3 Rostlinná buňka

Buňky můžeme na základě jejich vnitřní struktury rozdělit na prokaryotické a eukaryotické. Eukaryotické buňky jsou obklopeny plazmatickou membránou a jejich vnitřní prostor je členěný do dílčích oddílů tzv. organel, oddělených od cytoplazmy membránou. Část cytoplazmy bez organel - cytosol – tvoří intracelulární vodné prostředí, v němž jsou obsaženy rozpuštěné ionty, malé molekuly a makromolekuly. Většina eukaryotických buněk (s výjimkou lidských erytrocytů) obsahují definované jádro a organely (Alberts et al, 2015; Lodish et al, 2016).

Rostlinné buňky (stejně jako buňky hub) jsou obklopené buněčnou stěnou, která ji činí relativně pevnou, umožňují tvorbu různých typů buněk potřebných k vytvoření pletiv a orgánů rostliny a také hrají zásadní roli v mezibuněčné komunikaci. Rostlinná buněčná stěna je obvykle dělena na dvě skupiny – primární buněčnou stěnu obklopující rostoucí buňky a sekundární buněčnou stěnu obsahující lignifikované zesilující struktury a obklopující specializované buňky (např. cévní svazky) (Alberts et al, 2015; Keegstra K., 2010).

2.3.1 Buněčné organely

Funkce buněk je úzce spjata s jejich vnitřní organizací, v níž mají subcelulární struktury – organely – specializované role. Organely jsou vnitrobuněčné oblasti oddělené od cytoplazmy fosfolipidovou membránou. Buněčné membrány jsou zásadní pro život buňky. Plazmatická membrána na povrchu buňky jasně definuje její hranice a odděluje cytosol a extracelulární prostředí. Membrány endoplazmatického retikula (ER), Golgiho aparátu (GA), mitochondrie a dalších organel udržují charakteristické rozdíly mezi vnitřním prostorem organel a cytosolu. Jádro, mitochondrie a chloroplasty jsou dokonce odděleny dvěma membránami (Alberts et al, 2015; Lodish et al, 2016).

Jádro

Nejvýznamnějším kompartmentem eukaryotické buňky a uložištěm genetické informace je buněčné jádro, které zabírá přibližně 10 % objemu buňky. Hlavními funkcemi jádra je replikace a následný přenos DNA genetické informace do dceřiné buňky a syntéza různých typů RNA a jejich transport do cytoplazmy. Jádro eukaryotické buňky je obklopeno jaderným obalem, který je perforován jadernými póry. Jaderné póry vytvářejí brány pro výměnu makromolekulárních látek mezi nukleoplazmou a cytoplazmou. Vnitřní a vnější membrány jaderného obalu obsahují velké množství různých proteinů, jako například proteiny SUN, které hrají zásadní roli v jaderné organizaci a funkci. Vnější jaderná membrána (ONM) je obecně považována za prodloužení ER. Vnitřní jaderná

membrána (INM) je prostoupena specifickou podskupinou proteinů, které jsou důležité pro organizaci chromatinu, jadernou morfologii a meiózu. INM a ONM jsou odděleny perinukleárním prostorem a propojeny komplexy jaderných pórů. Některé proteiny obsažené v rostlinné jaderné lamině se podílí na regulaci jaderné velikosti a morfologii. ONM přechází v ER, kterému je v této práci věnována samostatná kapitola. ER pak dále tvoří transportní síť s GA. V rostlinách se mění velikost jádra a tvar během vývoje rostliny. Jaderná morfologie je ovlivněna také okolními podmínkami, jako je například sucho (Meier et al, 2017). Obvykle největší a nejvýznamnější jaderný dílčí prostor je jádérko, v němž dochází k syntéze, sestavení a zrání ribozomů. Jádérko hraje významnou roli při zpracování dalších typů RNA včetně mRNA (Dashek & Miglani, 2016). Významnou roli hraje jádro v regulaci hladin auxinů na úrovni transkripce prostřednictvím auxinového receptoru (Kato et al, 2017).

Golgiho aparát

GA je membránová buněčná organela charakteristického tvaru tvořeného komplexem cisteren, která funguje jako posttranslační modifikační továrna a transportní centrum pro proteiny a lipidy v buňce. V rostlinné buňce je GA tvořeno soustavou cisteren, které jsou společně s ER, endozomy a vakuolami součástí biosyntetické buněčné továrny (Pereira et al, 2014). Vstupním bodem do GA je cis-pól, který je úzce spojen s ER a působí jako přijímací centrum komplexu. Trans-pól na opačné straně funguje jako exportní centrum GA. Dynamika transportu z GA se mění v závislosti na různé buněčné podněty, které mají za následek syntézu a sekreci specifických produktů GA (Dashek & Miglani, 2016; Huang & Wang, 2017; Pavelka a Robinson, 2018). Důležitou součástí GA je trans-Golgiho síť (TGN), jejímž úkolem je třídění a transport nově syntetizovaných proteinů do různých subcelulárních oddílů a příjem extracelulárního materiálu a recyklovaných molekul z endocytárního kompartmentu buňky (Rosquete et al, 2017). Konstitutivní endocytární recyklace je klíčový mechanismus, který umožňuje například regulaci aktivity PIN1 proteinů na plazmatické membráně a rychlé změny v jejich lokalizaci a tím k regulaci PAT (Feraru et al, 2012). Naložené vezikuly vystupující z ER fúzí s GA, materiál je uvolněn a postupně prochází organelou a podléhá úpravám (například glykosylaci). Transport látek z GA je umožněn různými druhy vezikul, které jsou na povrchu pokryty charakteristickými obalovými proteiny. Fúzování vezikul je řízeno hlavně SNARE proteiny (), v menší míře pak také GTPasami, které jsou zároveň determinanty typu vezikul. Rozlišujeme 3 základní typy vezikul - klaritinový, COPI a COPII vezikuly (Dashek & Miglani, 2016).

Mitochondrie

Mitochondrie jsou organely typické pro eukaryotické buňky a jejich počet v buňce se může lišit od několika stovek až po několik tisíc. Mitochondrie mají dvě membrány. Vnitřní membrána je invaginována a pro mitochondrie typické struktury – krysty, prostřednictvím kterých je zvětšena

povrchová plocha membrány. Vnější membrána obsahuje relativně málo proteinů (<100) a je propustná pro většinu sloučenin menších než 5 kDa z cytosolu do mitochondrie. Propustnost membrány je dána přítomností proteinu VDAC (voltage-dependent anion channel), známém také jako mitochondriální porin. Tento napěťově řízený kanál se kromě regulace metabolických a energetických funkcí mitochondrie podílí také na buněčné programované smrti – apoptóze (Dashek & Miglani, 2016; Taylor, 2018). Mitochondrie jsou semiautonómni orgány s vlastní DNA, syntézou proteinů a degračním mechanismem. Proteiny kódované mitochondriálním genomem prochází celou řadou posttranskripčních a posttranslačních modifikací. Rostlinný mitochondriální genom je velký přibližně 200 – 2000 kbp, přičemž většina DNA je tvořena introny a opakujícími se nekódujícími oblastmi. Mitochondriální genom kóduje pouze malou část proteinů vyskytujících se v mitochondrii, ostatní mitochondriální proteiny jsou kódovány jadernými geny a syntetizovány v cytosolu. Proteiny jsou následně transportovány do mitochondrií a spojeny s mitochondriemi syntetizovanými podjednotkami za vzniku velkých respiračních komplexů a dalších proteinů (Morley & Nielsen, 2017; Taylor, 2018). Primární funkcí mitochondrií je buněčné dýchání, při kterém jsou prostřednictvím oxidativní fosforylace katabolizovány substráty za současné syntézy adenosin trifosfátu (ATP). Rostliny pokrývají své energetické požadavky fotosyntézou, kterou mitochondriálním dýcháním pouze doplňují. Funkce mitochondrií je uzpůsobena zásadně odlišným fyziologickým situacím v prostoru (mezi tkáněmi), v čase (během cirkadiálních rytmů světlo-tma) a nepravidelnými změnami prostředí (teplotní výkyvy, napadení patogenem). Citlivá reakce mitochondrií na změny může vyvolat retrogradní signalizaci regulující expresi jaderných genů (Schwarzländer & Finkemeier, 2013).

Chloroplasty

Chloroplasty jsou orgány vyskytující se v rostlinných buňkách a buňkách eukaryotických řas a jsou podobné mitochondriím. Mohou být dlouhé až 10 μm a jsou obvykle 0,5–2 μm silné, ale jejich tvar a velikost se v různých buňkách liší (Lodish et al, 2016). Chloroplasty jsou stejně jako mitochondrie semiautonómni cytoplazmatické orgány. První fotosyntetická eukaryota vznikla před více než jednou miliardou let primárním pohlcením cyanobakteriálního endosymbionta eukaryotickým hostitelem, což vedlo ke vzniku glaukofytů, zelených a červených řas. Další linie fotosyntetizujících eukaryot se objevily po pohlcení již existujících fotosyntetizujících eukaryot, například zelených řas. V průběhu evoluce prošel genom odvozený od cyanobakterií dramatickým zmenšením. Genomy moderních chloroplastů obsahují pouze 120-130 genů, z nichž většina kóduje komponenty důležité pro expresi organel a fotosyntetický aparát. DNA je uspořádána do nukleoidů, které vykazují prokaryotické i eukaryotické rysy (Jensen & Leister, 2014). Chloroplasty jsou ohraničeny dvěma obalovými membránami, které obklopují matici, stroma a komplexní 3D síť membrán nazývaných thylakoidy. Stejně jako u mitochondrií obsahuje vnější membrána poriny a je propustná pro metabolity malé molekulové hmotnosti. Vnitřní membrána tvoří propustnou bariéru s transportními

proteiny, prostřednictvím kterých je regulován pohyb metabolitů do a z chloroplastu. Vnitřní prostředí – stroma – je vodný roztok, který zabraňuje spontánnímu transportu jednotlivých lipidů či membránových proteinů a obsahuje řadu enzymů. Thylakoidní membrána tvoří síť zploštělých disků zvaných thylakoidy, které jsou uspořádané do větších celků – gran. Thylakoidní membrány, na rozdíl od dvojité membrány na povrchu chloroplastu, obsahují zelené pigmenty (chlorofyly) a další pigmenty, které absorbují světlo. Thylakoidy poskytují funkční komplexy, které zachycují a přeměňují sluneční energii na vysoce energetické elektrony a transmembránové gradienty proteinů, které generují NADPH, ATP a O₂. Proteinové komplexy vykonávající tyto funkce jsou fotosystém I a II (PSI, PSII), komplex zachycující světlo II (LHCII), cytochrom b6f a syntasa ATP. Strukturální diference thylakoidů je důsledkem nerovnoměrného rozdělení výše zmíněných komplexů mezi thylakoidní grana a stroma. Většina PSII a LHCII se vyskytuje v thylakoidních granech a většina PSI a všech syntas ATP se nachází na thylakoidním stroma (Jensen & Leister, 2014; Lodish et al, 2016; Lindquist & Aronsson, 2018). Dle Wang et al, 2015 probíhá v chloroplastech biosyntéza tryptofanu prostřednictvím tryptofan syntasy α a β , které spolu tvoří komplex a přeměňují indol-3-glycerol fosfát na tryptofan, který může být dále transformován na IAA.

Vakuola

Většina rostlinných buněk obsahuje alespoň jednu vakuolu, která akumuluje a ukládá vodu, ionty a živiny. Vakuola má ve své membráně řadu různých membránových proteinů, které umožňují transport těchto molekul z cytosolu a jejich následnou retenci v lumenu vakuoly. Množství a velikost vakuol se liší v souvislosti na vývojovém stádiu buňky, kdy ve zralé rostlinné buňce může zabírat až 90 % jejího vnitřního prostoru. Lumen vakuol obsahuje degradační enzymy a pH jejího obsahu je kyselé, čímž může mít vakuola degradační účinek podobný lyzozomu v živočišných buňkách (Lodish et al, 2016). Během embryogeneze se objevují dva druhy vakuol - lytické vakuoly obsahující hydrolasy schopné degradovat nežádoucí buněčné látky a proteinové úložné vakuoly akumulující velké množství ochranných a skladovacích proteinů. Většina vakuolárních rozpustných proteinů je syntetizována do větších prekurzorů v ER a poté transportována do vakuol. Většina těchto prekurzorů je syntetizována na ribosomech, modifikována na ER a GA a následně transportována do specializovaných vakuol, kde plní svou funkci (Tan et al, 2019). Vakuoly pravděpodobně hrají významnou roli při regulaci auxinové homeostázi prostřednictvím ukládání IAA, IAA katabolitu oxIAA a esterového konjugátu IAA-Glc (Ranocha et al, 2013).

Endozomy a lyzozomy

Endozomy a lyzozomy hrají klíčovou roli v různých aspektech buněčné fyziologie, jako je zpracování živin, recyklace receptorů, katabolismus proteinů a lipidů a buněčná smrt. Endozomy jsou heterogenní organely, které se uplatňují při třídění a dodávce molekul z buněčného povrchu a při transportu materiálu z GA do lyzozomu nebo vakuoly (Alberts et al, 2015; Lodish et al,

2016). Bylo prokázáno, že endozomy hrají ústřední roli v klíčových rostlinných procesech, jako je diferenciace embryí, gravitropismus, diferenciace epidermis, remodelace buněčné stěny, obranné reakce proti patogenům a regulace transportu auxinů (Zeng et al, 2018). Lysozomy se nachází výhradně v živočišných buňkách, jedná se o organely uzavřené membránou, naplněné rozpustnými hydrolytickými enzymy. Lysozomy obsahují asi 40 typů hydrolytických enzymů včetně proteas, nukleas, glykosidas, lipas, fosfatas, fosfolipas a sulfatas. Všechny tyto enzymy jsou kyselé hydrolasy. Pro optimální aktivitu je nutné je aktivovat proteolytickým štěpením. Úkolem lysozomů je degradace složek zastaralých pro buňku nebo organismus. Typickým příkladem tohoto procesu je autofagie, během které je degradována zastaralá organela (Alberts et al, 2015; Lodish et al, 2016).

Peroxisomy

Peroxisomy jsou vysoce dynamické organely zapojené do celé řady rostlinných procesů včetně primárního metabolismu uhlíku, vývoje, reakce na abiotický stres a obrany proti patogenům. Jejich enzymatický obsah se v různých druzích významně liší, což ukazuje na vysokou úroveň vývojové plasticity. Jak už z názvu vyplývá, peroxizomy obsahují jeden nebo více enzymů, které využívají molekulární kyslík k odstranění atomů vodíku ze specifických organických substrátů v oxidační reakci, jejímž produktem je peroxid vodíku (H_2O_2). (Hu et al, 2012; Lodish et al, 2016). Oxidační dráhy vyskytující se v peroxizomech zahrnují β -oxidaci mastných kyselin, která je nezbytná pro embryogenezi a správný růst. Další peroxizomální enzymy například zvyšují fotosyntetickou aktivitu. Peroxisomy také přispívají k syntéze signálních molekul včetně rostlinných hormonů auxinů, kyseliny jasmonová a kyseliny salicylové. Jedním z prekurzorů auxinu IAA je kyselina indol-3-máselná (IBA). IBA je v peroxizomech přeměněna na aktivní formu IAA. Takto odvozená aktivní forma je zásadní během vývoje semenáčku, kdy ovlivňuje laterální zakořenění, tvorbu apikálních háčků a rozšíření kotyledonu a kořenových vlásků (Kao et al, 2018).

2.3.2 Endoplazmatické retikulum

ER je vysoce dynamický, proměnlivý a rozsáhlý, na jadernou membránu vázaný systém membránových struktur, nacházející se v cytoplazmě eukaryotických buněk. Jeho tvar prochází podstatnými změnami v reakci na vývojové stádium a vnější vlivy. ER je tvořeno soustavou navzájem propojených váčků a cisteren a se skládá se ze dvou paralelních membrán a lumenu. ER hraje klíčovou roli v biosyntéze a transportu proteinů a lipidů, jakož i v metabolismu celé řady látek včetně hormonů. ER je důležité pro homeostázu nesekrečních organel, jako jsou mitochondrie, peroxisomy a chloroplasty. Proteiny v ER podléhají posttranslačním modifikacím, jako je *N*- a *O*-glykosylace či tvorba vodíkových můstků (Chen et al, 2012; Spang, 2013; Hawes et al, 2015; Dashek & Miglani, 2016).

ER je možné rozdělit morfologicky i funkčně na jaderný obal a periferní ER. Periferní ER pak dále zahrnuje takzvané hladké ER (SER) a drsné ER (RER). Morfologické rozdíly mezi SER

a RER umožňují vizuální rozlišení těchto oblastí - RER má sklon k tvorbě zrnitější stavby. Struktura ER je komplexní z důvodu existence četných odlišných domén. Tyto domény jsou formovány interakcemi s cytoskeletem, proteiny stabilizujícími membránu a homeotypickým fúzním mechanismem, který umožňuje ER membráně zachovat její kontinuitu a identitu. ER obsahuje také domény, které přicházejí do styku s plazmatickou membránou, GA, endozomy, mitochondriemi, lipidovými kapičkami a peroxizomy. Tato kontaktní místa jsou hojná a rozptýlená po celé cytoplazmě (English & Voeltz, 2013).

Specializovaný kompartment ER – jaderný obal – je tvořený ONM a INM, které jsou spojeny na mnoha místech s komplexy jaderných pórů. Jaderná membrána je spojena s listy a cisternami periferního ER. Periferní ER vystupuje z vnější jaderné membrány jako propojená síť cisteren a tubulů. Cisterny jsou obvykle lokalizovány blíže k jaderné membráně, zatímco na periférii převládají tubuly (Schwarz & Blower, 2015).

RER je tvořeno ribozomálními, membránovými a lumenálními proteiny, přičemž celá řada lumenálních proteinů podléhá postranlačním modifikacím a poté jsou transportovány do cílových oblastí buňky. RER je připojeno k jaderné membráně na jednom konci a k SER na konci druhém. Na cytosolickém povrchu RER se nachází ribozomy tvořící granula. RER je tvořeno plochými cisternami, jejichž struktura je téměř shodná s vnější jadernou membránou. Ačkoliv je jaderná membrána sférická, jádro je tak velké, že jeho povrch může být považován za plochý list ER. RER vykonává všechny funkce spojené s biosyntézou membránových a sekrečních proteinů včetně jejich skládání a modifikace (Shibata et al, 2006; Mei et al, 2013; Dashek & Miglani, 2016).

SER je tvořeno dlouhými válcovitými podjednotkami s vysokým zakřivením membrány v průřezu. SER je jednoduše definováno nepřítomností membránově vázaných ribozomů. Úloha SER je dána typem buněk, ve kterých se vyskytuje. SER obecně zahrnuje oblasti, v nichž dochází k pučení a fúzi vezikul a oblasti kontaktu s membránami jiných organel. Větší a homogennější formy SER se vyskytují ve specializovaných buňkách. SER je ve své struktuře mnohem spletenější než RER (Shibata et al, 2006).

Na ER je iniciována biogeneze asi jedné třetiny buněčného proteomu. Vzniklé proteiny jsou následně transportovány do GA. Transport těchto proteinů vyžaduje aktivitu a lokalizaci proteinů, které vytváří výstupní místa ER, označují proteiny pro shromažďování nákladů a přetváří membránu do formy transportního kontejneru. Důležitými proteiny jsou také SNARE proteiny, které fungují jako adresní štítky a cílí vezikuly specificky na GA. Sekreční cesty zahrnují ER, výstupní místa ER (ERES), mezilehlé oddělení ER-do-Golgi známého také jako vezikulárně-tubulární klastry nebo pre-Golgiho meziproducty (ERGIC), Golgiho komplex a TGN (Szul & Sztul, 2011; Spang, 2013).

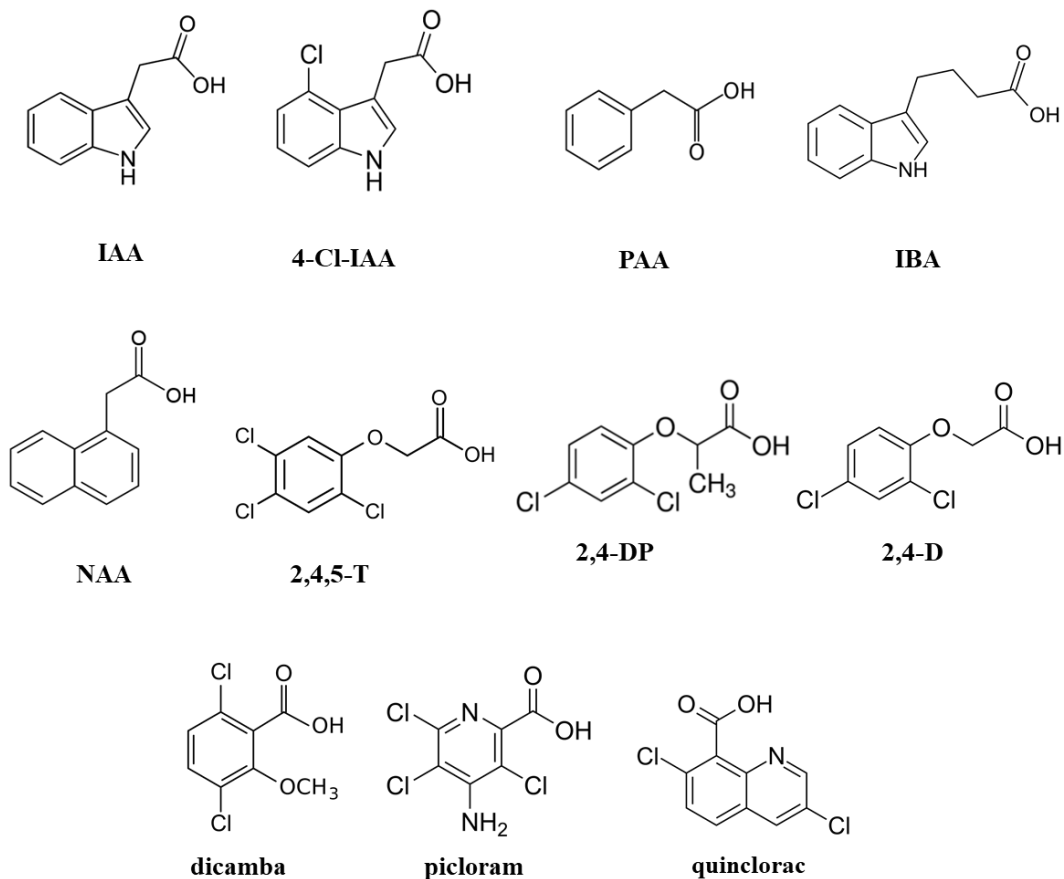
Transport proteinů z ER je umožněn akumulací proteinů COPII (coat protein II), jako je například Sar1, Sec23/24, a Sec 13/31 na specializovaných exportních oblastech ERES. Vezikuly COPII generované v ERES přepravují obsažený náklad do dalšího oddílu sekreční dráhy. Oblast ERGIC je bohatá na tubuly a vezikuly a jejím hlavním cílem je generování anterográdních nosičů pro přepravu

nákladu do GA. Z anterográdních nosičů mohou být v ERGIC tvořeny COPI vezikuly umožňující transport zpět do ER nebo aterográdní transport v Golgiho komplexu (cis-pólu GA do mediální části GA, z mediální části do cis-pólu GA, z cis-pólu do ERGIC a z ERGIC do ER). Podjednotky COPI byly identifikovány v endozomálním kompartmentu, což naznačuje, že mají roli v endocytóze (Gabriely et al, 2007; Hanton et al, 2009; Szul & Sztul, 2011).

2.4 Auxiny

Rostlinné hormony regulují řadu aspektů růstu a vývoje rostlin a reakce na biotický a abiotický stres. Hlavními skupinami hormonů produkovaných rostlinami jsou auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová, ethylen, kyselina salicylová, jasmonáty, brassinosteroidy a strigolaktony (Verma et al, 2016).

Auxiny představují skupinu organických kyselin o nízké molekulární hmotnosti obsahující jak aromatické jádro, tak postranní řetězec karboxylové kyseliny. Auxiny koordinují téměř všechny aspekty vývoje a růstu rostlin, například embryogenezi, organogenezi, pohybové odpovědi na světlo a gravitaci, apikální dominanci, či tvorbu laterálního a adventivních kořenů (De Smet et al, 2015). Přirozeně se vyskytující sloučeniny s přímou auxinovou aktivitou v rostlinách jsou kyselina indol-3-ylactová IAA, kyselina 4-chlorindol-3-ylactová (4-Cl-IAA), kyselina fenylactová (PAA) a IBA. Kromě přirozeně se vyskytujících auxinů existuje i rozmanitá skupina analogů či derivátů, které mají podobnou aktivitu a strukturu jako endogenní auxiny. K syntetickým auxinům se řadí kyselina 1-naftylactová (NAA), kyselina 2-(2,4-dichlorfenoxy) propionová (2,4-DP), kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), dicamba, pikloram a quinclorac (Obr. 2). Analogy auxinů se používají jako chemické nástroje ve vědecké a agrochemické praxi (Cao et al, 2019).



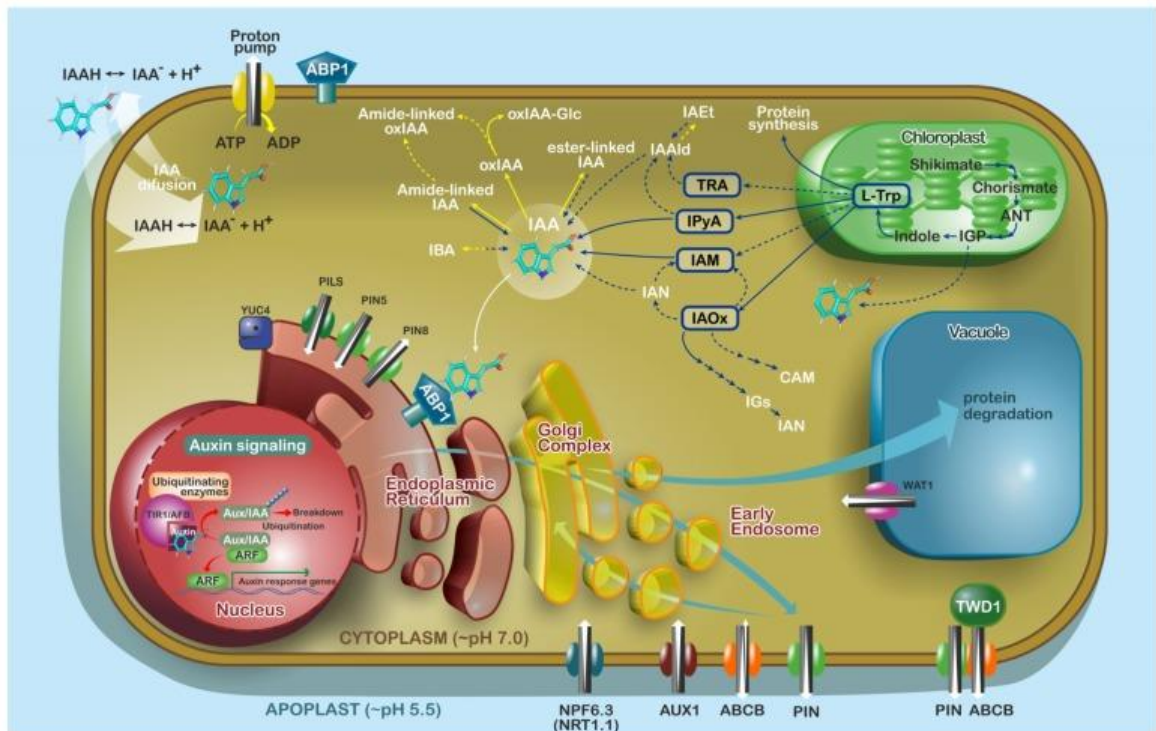
Obr. 2: Chemické struktury přírodních auxinů kyseliny indol-3-ocetové (IAA), kyseliny 4-chlorindol-3-ocetové (4-Cl-IAA), kyseliny fenylaceticové (PAA) a kyseliny indol-3-máslé (IBA) a syntetických auxinů kyseliny 1-naftalenoctové (NAA), kyseliny 2-(2,4-dichlorfenoxy) propionové (2,4-DP), kyseliny 2,4,5-trichlorfenoxyoctové (2,4,5-T), kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2,4-D), dicamba, pikloramu a quincloracu.

2.4.1 Homeostáza auxinů

Nejvýznamnějším auxinem a zdaleka nejstudovanějším rostlinným hormonem je IAA. Tento fytohormon ovlivňuje mnoho vývojových a růstových aspektů rostlin včetně tropismů, cirkadiálního rytmu, či reakcí na biotický a abiotický stres. Morfogenetické změny zprostředkované IAA jsou spouštěny prostřednictvím generování lokálního minima a maxima, jejichž tvorba je založena na přísně regulované rovnováze biosyntézy, metabolismu a transportu tohoto hormonu. Vzniklý gradient modulovaný auxinovou homeostázou hraje zásadní roli při diferenciaci rostlinných tkání, čímž je ovlivněna výsledná stavba orgánů rostlin (Zhao, 2010). Geny zapojené do těchto procesů jsou v mnoha případech navzájem propojeny zpětnovazebnými smyčkami s geny souvisejícími s auxinem, či se složkami drah jiných rostlinných hormonů (Mateo-Bonmatí et al, 2019).

2.4.1.1 Biosyntéza

Aromatické aminokyseliny tryptofan, fenylalanin a tyrozin jsou centrálními molekulami v metabolismu rostlin. Tyto aminokyseliny se uplatňují jako stavební jednotky proteinů, ale také jako prekurzory široké škály aromatických sekundárních metabolitů, či rostlinných hormonů, například auxinů. Aromatické aminokyseliny jsou syntetizovány šikimátovou dráhou, na kterou navazuje rozvětvená metabolická cesta aromatických aminokyselin, přičemž hlavním meziproductovým metabolitem je chorismát, viz Obr. 3. Doposud byly identifikovány tři enzymy biosyntézy, a to chorismátová mutasa biosyntézy fenylalaninu a tryptofanu, tryptofan syntasa biosyntézy tryptofanu a arogenát dehydratasa biosyntézy fenylalaninu (Tzin a Galili, 2010). V *Arabidopsis* probíhá biosyntéza tryptofanu v chloroplastech. První krok biosyntézy je katalyzován antranililát syntasou, který podléhá zpětnovazební inhibici tryptofanu. (Wang et al, 2015).



Obr. 3: Model buněčné a subcelulární auxinové homeostázy a signalizace v *Arabidopsis thaliana* (Skalický et al, 2018). , ABCB - auxin binding protein 1, ABP1-auxin binding protein 1, ADP – adenosindifosfát, ATP – adenosintrifosfát, AUX1 - auxin resistant 1, Aux/IAA - auxin/like-aux., CAM -camalexin, IAA – kyselina indol-3-yloctová, IAAld - indol-3-acetaldehyd , IAEt - indol 3-ethanol, IGP - 2-(1H-indol-3-yl)glycerol fosfát, IBA - 2-(1H-indol-3-yl)máselná kyselina, ARF - auxin response factor, IGs – indolglukosinoláty, IPyA - 2-(1H-indol-3-yl)pyruvát, L-Trp – L-tryptofan, oxIAA-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)octová kyselina, NPF6.3 (NRT1.1) - dusičnanový transportér 1.1, oxIAA-Glc-1-O-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)acetyl)-β-D-glukopyranosa, PILS - PIN-LIKES, PIN - PIN-FORMED, TRA - tryptamin, IAM – 2-(1H-indol-3-yl)acetamid, IAOx - 2-(1H indol-3yl)acetaldoxim, IAN - 2-(1H indol-3-yl)acetonitril, TIR1/AFB - TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX proteiny, TWD1 - TWISTED DWARF1, WAT1 - WALLS ARE THIN 1 protein, YUC4 – YUCCA4

Za hlavní cestu biosyntézy IAA v rostlinách je považována tryptofan-dependentní dráha. Z tryptofanu může být IAA syntetizována čtyřmi drahami, pojmenovanými podle klíčových meziproduktů – dráha indol-3-ylpyruvátu (IPyA), tryptaminu (TAM), indol-3-ylacetaldoximu (IAOx) a indol-3-ylacetamidu (IAM) viz Obr. 3. Na rozdíl od tryptofan-independentní dráhy jsou cesty na tryptofanu závislé mnohem lépe charakterizovány (Brumos et al, 2013).

Přeměna aminokyseliny tryptofanu na IAA prostřednictvím IPyA dráhy je dvoukrokový proces, zahrnující enzym Tryptophan Aminotransferase Arabidopsis (TAA) z rodiny tryptofan aminotransferas a YUCCA (YUC) z rodiny flavinových monooxygenas. Jedná se o nejlépe prostudovanou a hlavní endogenní cestu biosyntézy IAA v rostlinách. V *Arabidopsis* je identifikováno pět genů pro TAA a jedenáct genů pro YUC. YUC enzymy vykazují mnohem vyšší tkáňovou specifitu než enzymy TAA. Například YUC1, 2, 4 a 6 se vyskytují zejména ve výhoncích. Pro zajištění správného vývoje orgánů rostlin je zásadní prostorová koexprese určitých kombinací TAA a YUC (Cao et al, 2019). Tryptofan je nejprve konvertován na indol-3-ylpyruvát prostřednictvím reverzibilní aminotransferasové reakce za účasti TAA. IPyA je možné převést zpět na tryptofan prostřednictvím VAS1, který přenáší aminoskupinu z ethylenového biosyntetického prekurzoru methioninu (Met) na auxinový biosyntetický produkt IPyA za vzniku L-tryptofanu a 2-oxo-4-methylthiomáselné kyseliny. Následně YUC katalyzují nevratnou oxidační dekarboxylaci IPyA za vzniku IAA (Zheng et al, 2013).

V *Arabidopsis*, jakož i u dalších zástupců čeledi brukvovitých, je IAA z části produkována z tryptofanu cestou indol-3-ylacetaldoximu. IAOx se kromě syntézy IAA též uplatňuje při syntéze obranných sloučenin camalexinu a indolglukosinolátů (IG). (Nonhebel et al, 2011). Konverzi tryptofanu na IAOx katalyzuje cytochrom P450 monooxygenasa CYP79B2 a CYP79B3 (Zhao et al, 2002; Sugawara et al, 2009). Syntéza IG začíná konverzí tryptofanu na indol-3-ylacetaldoxim monooxygenasami CYP79B2 a CYP79B3. CYP83B1 následně katalyzuje přeměnu IAOx na 1-acinitro-2-indolyethan, který je prekurzorem řady IG (Pfalz et al, 2011). Hydrolýzou IG vzniká indol-3-acetonitril (IAN), který je v této dráze prekurzorem IAA. IAN je na IAA přeměněn prostřednictvím nitrilas *Arabidopsis* (NIT1, NIT2, NIT3) (Sugawara et al, 2009).

IAM dráha byla považována za dráhu syntézy auxinu u bakterií. Například v *Agrobacterium tumefaciens* je tato dráha kódována geny *iaaM* a *iaaH*. *iaaM* kóduje tryptofan monooxygenasu, která převádí tryptofan na IAM. *iaaH* pak kóduje indol-3-ylacetamid hydrolázu katalyzující syntézu IAA z IAM (Brumos et al, 2013). Později byla obdobná IAM dráha navržena u rostlin. Její existence byla následně podpořena identifikací IAM jako endogenní sloučeniny u několika druhů rostlin (Pollman et al, 2002; Sugawara et al, 2009; Novák et al, 2012). V *Arabidopsis* je IAM tvořena zejména z IAOx. Ačkoliv je několik metabolických produktů biosyntetické dráhy IAOx (IAN a TAM) sdíleno s dráhami IAM a TAM, není známé metabolické propojení těchto drah (Stepanova et al, 2011).

Tryptaminová dráha je jednou ze čtyř navrhovaných cest pro tryptofan-dependentní biosyntézu IAA. Původně bylo uváděno, že přeměna tryptaminu na N-hydroxy-tryptamin v *Arabidopsis*

je katalyzována YUC1 (Zhao, 2001). Tato hypotéza byla ovšem později vyvrácena (Tivendale et al, 2010). Později bylo prokázáno, že tryptamin není meziproduct biosyntetické dráhy katalyzované YUC, nicméně se na biosyntéze IAA podílí ve zcela nezávislé dráze. Dráha zahrnující tryptamin jako meziproduct biosyntézy je stále do značné míry neznámá (Mashiguchi et al, 2011; Brumos et al, 2013).

Syntéza IAA prostřednictvím tryptofan-independentní dráhy byla navržena na počátku 90. let 20. století na základě dat získaných z pozorování *Zea mays* (Wright et al, 2001) a *Arabidopsis* (Normanly et al, 1993) nesoucích mutaci v genech α -podjednotky či β -podjednotky tryptofan syntasy. α -podjednotka katalyzuje odstranění postranního řetězce z indol-3-glycerol fosfátu a vede indolový řetězec k β -podjednotce, kde je postranní řetězec tryptofanu vytvořen ze serotoninového substrátu (Pan et al, 1997).

2.4.1.2 Metabolismus

Vedle de novo biosyntézy je důležitým mechanismem podílejícím se na regulaci hladiny volné IAA v buňce také její deaktivace tvorbou přechodných forem (konjugátů) nebo ireverzibilní katabolickou degradací, viz Obr. 3 (Ljung, 2013).

Konjugáty představují významné množství celkové IAA ve většině rostlinných pletivech. Funkce auxinových konjugátů byla stanovena pomocí analýzy mutantů. Analýza prokázala, že konjugáty se uplatňují například při vývoji embrya a kořenové špičky prostřednictvím skladování a transportu auxinů, a také při ochraně IAA před degradací (Bandurski et al, 1995; Campanella et al, 1996). Jsou rozlišovány dva druhy auxinových konjugátů – amidové a esterové. Esterové konjugáty vznikají navázáním cukerné složky na karboxylovou skupinu prostřednictvím esterové vazby. Amidové konjugáty vznikají navázáním aminokyseliny nebo peptidů na karboxylovou skupinu prostřednictvím amidové vazby (Ludwig-Müller, 2011).

V *Arabidopsis* byly detekovány konjugáty IAA s alaninem (IAAla), aspartátem (IAAsp), leucinem (IALeu) a glutamátem (IAGlu) (Tam et al, 2000, Kowalczyk & Sandberg 2001). Tvorba amidových konjugátů je katalyzována enzymy IAA-amidosyntasami Gretchen Hagen (GH3), které byly poprvé identifikovány v sóje. V *Arabidopsis* je prozatím identifikováno 19 genů kódujících GH3 enzymy, které byly fylogeneticky rozděleny do třech skupin (I-III). Fyziologické role mnoha těchto enzymů však zůstávají nejasné (Sánchez-García et al, 2018). Zvýšené koncentrace auxinu vedou k silné indukci GH3 enzymů (Chen et al, 2010). Ty jsou zodpovědné zpětnovazebnou homeostatickou regulační smyčkou řídící IAA (Hayashi, 2012). Byla identifikována řada isoform GH3, některé konjugují IAA. Nedávná studie poukazuje, že některé formy, konkrétně GH3.17, mohou být lokalizované v cytosolu (Di Mambro et al, 2019). Tato lokalizace nebyla dostatečně prokázána a objevují se spekulace o lokalizaci GH3 na ER. Nicméně ani tato teorie nemá jednoznačnou oporu v experimentálních datech (Ludwig-Müller, 2011; Barbez & Kleine-Vehn,

2013). Většina konjugátů IAA s aminokyselinami je hydrolyzována zpět na volnou IAA prostřednictvím amidohydrolas z rodiny IAA-leucine resistant1-like (ILR1-like/ILL). Dále byla objevena amidohydrolasa IAA-leucine resistant1 (ILR1) štěpící konjugáty auxinu s leucinem. V *Arabidopsis* bylo identifikováno 7 členů ILL rodiny – ILR1, ILL1, ILL2, ILL3, IAR3 (ILL4), ILL5 a ILL6. Nejlépe charakterizovány jsou enzymy ILL1, ILL2 a IAR3. IAR3 a ILL2 vykazují nejvyšší katalytickou aktivitu s IAA-Ala jako substrátem, zatímco ILR1 je nejúčinnější při hydrolyze IAA-Leu a IAA-Phe. ILL3 a ILL6 vykazují in vitro pouze malou aktivitu (LeClere et al, 2002). IAR3, ILL2 a ILR1 jsou lokalizovány na ER (Fu et al, 2019). IAAsp a IAGlu nejsou účinně hydrolyzovány žádnou z amidohydrolas *Arabidopsis* a IAAsp a IAGlu jsou považovány za prekurzory degračních drah. K běžným esterovým konjugátům IAA patří konjugát IAA s glukózou (IAA-Glc), a IAA-myoinositol, které byly za posledních 60 let identifikovány u mnoha rostlinných druhů (Bandurski et al, 1969, Fu et al, 2019).

Hlavní katabolickou formou IAA je její oxidovaná forma oxIAA, která může být dále metabolizována konjugací s glukózou za vzniku oxIAA-Glc. Tato reakce je katalyzována glukosyltransferasou UGT74D1 (Kai et al, 2007a). oxIAA je ireverzibilní meziproductem degradace, je rychle směřována k degradaci a není spouštěčem signální dráhy auxinu (Pěňčík et al, 2013). Byly identifikovány izoformy katalyzující proces degradace auxinu, a to DIOXYGENASA PRO OXIDACI AUXINU 1 (DAO1) lokalizovaného v cytosolu a DEOXYGENASA PRO OXIDACI AUXINU 2 (DAO2). DAO1 ve spolupráci s enzymy z rodiny GH3 hrají klíčovou roli při regulaci auxinové homeostázy v *Arabidopsis*, kdy se jedná o hlavní cesty degradace IAA v *Arabidopsis*. (Porco et al, 2016).

2.4.1.3 Transport

Dalším faktorem ovlivňujícím homeostázu auxinů je jejich transport. Na základě shromážděných fyziologických, molekulárních a biochemických údajů bylo odhaleno, že distribuce auxinu v rostlině je zprostředkována dvěma fyziologicky odlišnými a prostorově oddělenými cestami. První cestou je rychlý nepolární floémový transport a druhou cestou je PAT. Floémový transport představuje způsob, jak dopravit auxin z místa jeho syntézy (např. mladého listu) do recipientních orgánů. (Michniewicz et al, 2007).

PAT umožňuje asymetrickou distribuci IAA v různých buňkách a tkáních *Arabidopsis*. Pomocí tohoto systému je tvořen auxinový gradient projevující se jako lokální minima a maxima, které jsou zásadní pro všechny aspekty vývoje rostliny. Obecně je možné rozlišit dva typy PAT – na dlouhé vzdálenosti napříč celého rostlinného těla a na krátkou vzdálenost, dodávající auxin na přesně definovaná místa v konkrétní tkáni. Transport auxinů z buňky do buňky je zprostředkován sítí auxinových přenašečů. Bylo identifikováno několik aktivních auxinových transportérů - AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX1/LAX), PIN, fosfoglykoproteiny z rodiny ABCB

(ATP-BINDING CASSETTE subfamily B) transportéry (ABCB/PGP) a PILS, dusičnanový transportér 1.1 (NTR1.1) a WALLS ARE THIN 1 (WAT1). Tyto nosiče je možné rozdělit do dvou skupin na základě subcelulární lokalizace a funkcí. Zástupci první skupiny, do které spadají přenašeče AUX/LAX, NRT1.1, ABCB a většina PIN proteinů, jsou umístěny na plazmatické membráně a fungují jako importní a exportní nosiče mezi buňkami a okolím. Do druhé skupiny patří PIN proteiny s krátkými hydrofilními smyčkami, PILS a WAT1. Tyto transportéry jsou lokalizovány na membránách buněčných kompartmentů a zajišťují intracelulární homeostázu auxinů. (Armengot et al, 2016; Zhou a Luo, 2018).

AUX/LAX je skupina influxních nosičů lokalizovaných v plazmatické membráně transportujících auxin do buňky. V *Arabidopsis* existují čtyři vysoce konzervované geny pro AUX/LAX a to AUX1, LAX1, LAX2 A LAX3. AUX1 je exprimován ve tkáních, které jsou zapojeny do vnímání gravitace, přenosu signálu a odezvy na signál. Mutace v AUX1 vede k výskytu těžce agravitropických kořenů. Na gravitropismu se AUX1 podílí z celé rodiny jako jediný (Perét et al, 2012).

ABCB proteiny jsou lokalizovány na plazmatické membráně a skládají se ze dvou propojených částí. Každá část obsahuje transmembránovou doménu a nukleotid vázající doménu. ABCB rodina má 21 členů. ABCB1, ABCB4 a ABCB19 byly charakterizovány jako auxinové nosiče. Později byly s auxinovým transportem spojeny také ABCB14 a ABCB15. (Cho & Cho, 2012).

Všechny PIN auxinové nosiče mají konzervovanou strukturu tvořenou centrální hydrofilní doménou. Činnost PIN proteinů je regulována celou řadou endogenních a exogenních stimulů. (Zhou & Luo, 2018). Prvním identifikovaným členem této rodiny byl PIN1, který byl identifikován v mutantní linii *pin1*. Na základě výrazného fenotypu mutantních rostlin *pin1*, kdy rostliny vytvořily nahé špendlíkovité květenství, které dalo této skupině nosičů jméno, byly studovány význam a funkce tohoto genu (Okada et al, 1991). Současně byl několika skupinami nezávisle na sobě pod různými jmény na základě silně agravitropického kořenového fenotypu identifikován homologní gen *AtPIN2*. Bylo vytvořeno několik mutantních linií, například *eir1* s kořenem necitlivým na ethylen, *agr1* s agravitropním růstem kořene a *wav6* s vlnitým kořenem (Chen et al, 1998; Luschnig et al, 1998; Müller et al, 1998; Utsuno et al, 1998).

V *Arabidopsis* bylo identifikováno osm PIN proteinů, které je možné rozdělit na základě délky jejich centrální hydrofilní domény na dvě skupiny – dlouhé a krátké. Dlouhé PIN proteiny je možné také klasifikovat jako kanonické a krátké jako nekanonické (Bennett et al, 2014a). Všechny PIN proteiny jsou tvořeny konzervovanou hydrofilní smyčkou mezi aminoterminálními a karboxyterminálními transmembránovými doménami.

Ke dlouhým kanonickým PIN proteinům patří PIN1-PIN4 a PIN7. Tyto proteiny jsou asymetricky umístěny na plazmatické membráně a slouží k transportu auxinu z buňky a udržování toku auxinů v určitém směru (Petrášek et al, 2006). K PIN proteinům s redukovanou délkou smyčky se řadí na ER membráně lokalizované PIN5, PIN6 a PIN8. Avšak PIN6 redukovanou pouze částečně a společně s PIN8 je lokalizován duálně na plazmatické membráně i v ER v závislosti

na fosforylačních stavech. PIN5 zprostředkovává transport auxinů do ER (Mravec et al, 2009), zatímco PIN8 zřejmě působí proti této aktivitě (Dal Bosco et al, 2012; Ding et al, 2012).

Nedávno byla objevena v *Arabidopsis* rodina auxinových nosičů PILS lokalizovaných na ER (Barbez et al 2012).

2.4.2 Receptory a signální dráhy auxinu

Studium molekulárních a genetických mechanismů signálních drah je zásadní pro pochopení růstu a vývoje rostlin. V rostlinách existují dva typy auxinových koreceptorů TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB) a AUXIN/INDOL-3-ACETIC ACID (AUX/IAA), které regulují transkripční odpovědi závislé na auxinu a AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) (Tromas et al, 2013).

Původně domnělý auxinový receptor ABP1 byl v *Arabidopsis* poprvé identifikován v roce 1992. Stejně jako jeho homolog identifikovaný v kukuřici se jedná o dimer obsahující N-terminální signální peptid s 33 aminokyselinami a C-terminální KDEL sekvence (Palme et al, 1992). KDEL je sekvence, prostřednictvím které je ABP1 zakotven v ER. Pouze malá část ABP1 je uvolněna z ER do plazmatické membrány. Hodnota pH v ER je příliš vysoká pro účinnou vazbu auxinu, takže se IAA v ER neváže na ABP1, přestože se jedná o dominantní subcelulární umístění tohoto proteinu (Bertoša et al, 2008). Objasnění fyziologických funkcí ABP1 však bylo obtížné, protože první mutant *abp1* u *Arabidopsis* nebyl zcela životaschopný. Následná sekvenace genomu tohoto mutantu odhalila mutace ve více genech, než bylo plánováno. Byl tedy navržen alternativní přístup pro narušení funkce ABP1, které však nebyly dostatečně specifické. Předpokládalo se, že ABP1 zprostředkovává rychlý účinek auxinů v celé řadě aspektů vývoje a růstu rostlin (Jones, 1994; Woo et al, 2002; Chen et al, 2014). S využitím nových mutantních linií byla důležitost ABP1 v růstu a vývoji rostlin zpochybněna, protože žádný z mutantů nevykazoval defekty růstu, vývoje či auxinové odpovědi (Gao et al, 2015). Mechanismus sekrece ABP1 z ER je stále předmětem studia (Feng & Kim, 2015).

Auxinová regulace transkripce zahrnuje aktivitu tří proteinů – transkripčního faktoru ARF a transkripčních represorů AUX/IAA a TIR1/AFB. Při nízkých hladinách IAA interagují transkripční represory AUX/IAA a ARF a potlačují jeho aktivitu. Při zvýšené hladině auxinu se váží proteiny TIR1/AFR na represory AUX/IAA a zprostředkovávají jeho polyubiquitinaci a následnou proteozomální degradaci. Pro rychlou indukci auxin responzivních genů včetně AUX/IAA je zásadní zpětnovazebná inhibice (Benjamin & Scheres, 2008). V nedávných studiích bylo prokázáno, že proteiny TIR1/AFB jsou důležité pro rychlou odpověď auxinů v kořenech a vyvíjejícím se kořenovém vlášení (Dindas et al, 2018; Fendrych et al, 2018).

2.5 Endoplazmatické retikulum a auxiny

ER hraje zásadní roli v celé řadě rostlinných procesů (viz 2.3.2). Mimo obecně známé funkce bylo prokázáno, že ER je zapojeno do signalizace a distribuce některých transportérů rostlinných hormonů jako jsou cytokininy, ethylen a auxiny. Na základě cytokininových vazebných testů, fluorescenční fúze a biochemické frakcionace bylo prokázáno, že většina cytokininových receptorů je lokalizována na ER, což naznačuje, že ER hraje ústřední roli v cytokininové signalizaci (Wulfetange et al, 2011). Dále jsou na ER *Arabidopsis* lokalizované receptory pro ethylen (Chen et al, 2002) včetně regulátoru ethylenové signalizace EIN2 (Kriechbaumer et al, 2015).

Auxiny jsou klíčové rostlinné hormony rozhodující o celé řadě růstových a vývojových procesů. Dle nových poznatků se zdá, že ER hraje důležitou roli v udržování homeostázy auxinů, viz Obr. 3. ER se uplatňuje v jejich biosyntéze, subcelulární distribuci, ale také pravděpodobně reguluje jejich signalizaci (Middleton et al, 2018). Prostřednictvím těchto klíčových procesů pak významně ovlivňuje rovnovážnou hladinu auxinů v buňce a tím následně i růst a vývoj rostlin. V současné době nejprozkoumanější biosyntetickou dráhou auxinu je TAA/YUC cesta, v níž je IAA syntetizována de novo z tryptofanu. Bylo prokázáno, že v kukuřici a *Arabidopsis* je na ER lokalizována podskupina auxinových biosyntetických enzymů TAA/YUC (Cao et al, 2019). Lokalizace biosyntetických enzymů na ER pravděpodobně souvisí s udržováním auxinové homeostáze, protože se na ER kromě těchto enzymů vyskytují auxinové transportní proteiny PIN a PILS a receptor ABP1 (Kriechbaumer et al, 2015).

Významnou úlohu hraje ER v transportu auxinů. Zvláště dynamickým a specifickým procesem je subcelulární lokalizace členů PIN přenašečů. V *Arabidopsis* bylo identifikováno osm PIN nosičů, přičemž na ER jsou lokalizovány dva zástupci – PIN5 a PIN8. Jeden zástupce PIN nosičů – PIN6 – je lokalizován jak na ER, tak na plazmatické membráně. PIN6 má v rámci buňky duální lokalizaci v plazmatické membráně a ER, kdy se účastní regulace transportu auxinu přes membránu a také udržování intracelulární homeostázy auxinu (Simon et al, 2016). PIN6, lokalizovaný v plazmatické membráně buněk, je vysoce exprimovaný v pletivech jako jsou květenství či nektarové žlázy. Subcelulární lokalizace tohoto přenašeče na ER je typická pro orgány jako jsou kořeny, ačkoliv jeho exprese je o poznání nižší. Duální lokalizace tohoto auxinového nosiče je řízena fosforylací PIN6 mitogenem aktivovaným proteinovými kinasami (Ditengou et al, 2018). Auxinový nosič PIN5 se účastní řady vývojových procesů spojených s auxinem jako je iniciace laterálních kořenů, expanze kotyledonu, časná embryogeneze, a hlavně subcelulární kompartmentalizace auxinu. Oproti ostatním PIN proteinům, mimo PIN8, se neúčastní přenosu auxinu z buňky do buňky, ale podílí se výhradně na regulaci intracelulární homeostázy a metabolismu auxinu. PIN5 zprostředkovává transport auxinu z cytosolu do lumenu ER (Mravec et al, 2009). PIN8 je jako jediný ze skupiny PIN proteinů převážně exprimován v pylové láčce *Arabidopsis*, kde hraje klíčovou roli v jejím vývoji a funkčnosti (Ding et al, 2012). U PIN8 můžeme stejně jako u PIN6 pozorovat duální lokalizaci a lze jej nalézt na ER i

plazmatické membráně. Lokalizace PIN8 se liší v souvislosti s typem buňky (Ganguly et al, 2010). Předpokládá se, že intracelulární lokalizace PIN8 ovlivňuje vývoj laterálních kořenů pravděpodobně z důvodu modulací intracelulární translokace auxinu, což znamená, že funkce PIN8 se od dlouhých PIN lokalizovaných v plazmatické membráně zásadně liší. Dlouhé PIN proteiny v membráně totiž generují lokální gradienty auxinů pro organogenezi prostřednictvím efluxu auxinů z buňky do buňky (Lee et al, 2020).

V *Arabidopsis* byla na ER lokalizována a identifikována skupina auxinových transportérů PILS (Barbez et al, 2012, Feraru et al, 2012). PILS získaly svůj název na základě podobnosti s PIN proteiny, ačkoliv následující srovnávací studie odhalila, že sdílí pouze 10-12% shodné sekvence (Feraru et al, 2012). Dle Barbez et al 2012; 2013, PILS2, PILS3 a PILS5 omezují jadernou signalizaci auxinu pravděpodobně prostřednictvím jeho hromadění v ER. Doposud nebyl zcela objasněn přesný mechanismus jejich funkce. Četnost výskytu PILS6 je snížena vysokou teplotou. Snížení PILS6 následně vede ke zvýšení jaderné signalizace auxinu a růstu kořene (Feraru et al, 2019). Exprese PILS2 a PILS3 je spouštěna světlem a spouští auxinovou signalizaci minimálního a diferenciálního růstu během vývoje apikálního háčku (Béziat et al, 2017).

Mutantní testy založené na snížené citlivosti na biologicky aktivní amidové konjugáty IAA v testech inhibice růstu kořene vedly k identifikaci specifické skupiny amidohydrolas (Bartel & Fink, 1995; LeClere et al, 2002). V ER byly lokalizovány amidohydrolasy IAR3, ILL2 a ILR1 ovlivňující auxinovou odpověď prostřednictvím regulace auxinové homeostázy v ER (Fu et al, 2019), což ve spojení s nedávno objevenými auxinovými přenašeči PIN5 a PIN8 lokalizovaných na ER (Mravec et al, 2009; Dal Bosco et al, 2012; Barbez et al, 2012) naznačovalo, že ER hraje důležitou roli v konjugačním metabolismu auxinů. Následně bylo zjištěno, že v ER dochází k hydrolýze amidových konjugátů IAA, které vznikají pravděpodobně v cytosolu v reakci katalyzované enzymy GH3 rodiny (Sanchez Carranza et al, 2016).

2.6 Stanovení auxinů v endoplazmatickém retikulu

Analytické stanovení auxinů je poměrně obtížné, protože se stejně jako ostatní rostlinné hormony, vyskytují v rostlinách ve stopovém množství. Rostliny navíc obsahují vysoké množství interferujících látek, které ztěžují detekci auxinů a jejich kvantifikaci (Fu et al, 2011; Du et al, 2012). Ke zvýšení výtěžnosti izolace a kvantifikace auxinů napomohly nové metody čištění vzorků, přidavek izotopicky značných látek jako vnitřních standardů, použití vysoce výkonných instrumentálních technik a vývoj v automatizaci laboratoří (Stuepp et al, 2016).

2.6.1 Frakcionace organel

Metabolické a regulační procesy jsou v buňkách rozděleny mezi jednotlivé organely, mezi nimiž dochází k transportu. Na jednotlivých subcelulárních podjednotkách jsou lokalizovány různé

proteinové komplexy a enzymy, pro jejichž studium je nutné separovat jednotlivé organely v co nejvyšší čistotě (Arrivault et al, 2014). Aby bylo možné buněčné organely separovat, musí být nejprve uvolněny z matrice. V případě rostlin jsou metody izolace optimalizovány na základě několika aspektů, jako je rostlinný druh, orgán či pletivo, stáří materiálu, obsah sekundárních metabolitů, složení buněčné stěny, anebo plánovaná analýza. Tyto faktory jsou zásadní pro složení pufru používaného pro izolaci, metodiku narušení buněčné stěny a izolaci jako takovou (Dashek & Miglani, 2016).

2.6.1.1 Homogenizace

Při výběru metody je nutné brát v potaz povahu rostlinného materiálu a také požadované vlastnosti výsledného lyzátu. V případě frakcionace organel je nutné dosáhnout porušení odebraného rostlinného pletiva a buněčné stěny a zároveň zabránit úplné likvidaci subcelulárního kompartmentu.

Pro narušení buněčné stěny byla zavedena celá řada metod, které obecně můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin – mechanické a nemechanické. Při mechanické homogenizaci je buněčná stěna narušena působením mechanických sil. K metodám mechanické homogenizaci patří například vysokotlaký homogenizátor, žiletka, třecí miska s tloučkem či kuličkový mlýnek. Nemechanické metody můžeme rozdělit do tří základních skupin – biologická, chemická a fyzikální. Mezi biologické metody se řadí enzymatická lýza, při které jsou například využívány enzymy štěpící buněčnou stěnu (zymolyasa, celulasa, pektolyasa, lysozym či macerozym). Metody chemické lýzy využívají k narušení buněčné stěny lyzační pufr. Využívá se alkalická lýza a lýza detergentem. Fyzikální lýza zahrnuje využití různých sil jako je teplo a ultrazvuk. Tepelná lýza může být prováděna cyklicky se opakujícím zmrazováním a rozmrazováním. Využit můžeme také vysoké teploty, kdy dochází k tepelnému poškození membrány prostřednictvím denaturace membránových proteinů, což má za následek uvolnění intracelulárních organel. Další hojně využívanou fyzikální metodou je ultrazvuková kavitace. K vytvoření zvukové vlny se využívají ultrazvukové vibrace 15 – 20 kHz. K narušení buňky může být využita osmotická lýza. Když je koncentrace solí v okolním roztoku nižší než v buňce, voda vstupuje do buňky a ta následně praská. Tato technika je vhodná zejména pro živočišnou buňku. (shrnutí v Shehadul Islam et al, 2017).

Při většině procesů homogenizace a lýzy je využívána kombinace mechanických a nemechanických metod, případně kombinaci dvou nemechanických metod. Hojně využívanou kombinací je například mletí vzorků zmrazených kapalným dusíkem v třecí misce s tloučkem. Další využívanou kombinací je například sekání rostlinného materiálu v mixéru nebo žiletkou v extrakčním pufru či velmi šetrné enzymatické štěpení buněčné stěny s následným uvolněním protoplastů.

2.6.1.2 Izolace subcelulárních organel

Izolace čistých frakcí organel je poměrně obtížná. Využívají se různé metody jako například diferenciální centrifugace, hustotní gradientová centrifugace, volná průtoková elektroforéza (FFE) a fluorescenčně aktivované třídění organel.

Diferenciální centrifugace

Diferenciální centrifugace je hojně využívanou technikou pro izolaci a čištění virů, buněk, subcelulárních organel a nukleových kyselin rozpuštěných nebo dispergovaných v rozpouštědle. Během centrifugace dochází k usazování částic těžších, než je rozpouštědlo. Hustota každé organely je určena hlavně poměrem obsahu lipidů k proteinům. Například membrány mitochondrií a ER mají vysokou hustotu kvůli vysokému obsahu bílkoviny, zatímco endozomy mají membrány bohaté na lipidy, a proto je jejich hustota nižší (de Araujo et al, 2008). Diferenciační centrifugace se skládá z jednotlivých odstředovacích kroků, během nichž se postupně zvyšují odstředivé síly a prodlužuje se doba centrifugace s cílem získat sadu peletů obohacených o různý buněčný kompartment. První frakce získaná centrifugací při 600–1000 g je typicky obohacená o jádra, chloroplasty se usazují při 2500 g, mitochondrie a peroxizomy při 3000–15000 g a zbývající kompartmenty endomembránového systému (GA, ER, vakuoly) při 100 000 g. Pomocí této metody dosáhneme pouze hrubého obohacení peletu, protože subcelulární frakce stále obsahují smíšené populace membrán (Abas & Luschnig, 2010; Livshits et al, 2015).

Hustotní gradientová centrifugace

Hustotní gradientová centrifugace využívá separaci organel v gradientu vytvořeném vrstvením roztoků o zvyšující se koncentraci. Během centrifugace dochází k sedimentaci organel vyvolané odstředivou silou. Sedimentace ustává ve chvíli, kdy se organely dostanou do izopyknického bodu, ve kterém má okolí stejnou hustotu jako je hustota organely. Gradient může být tvořen například roztoky sacharózy, Ficollu, Percollu a Metrizamidu v závislosti na typu izolované organely. Často je používán sacharózový gradient, protože sacharóza je levná a inertní. Rozlišují se dva typy gradientů využívaných pro hustotní gradientovou centrifugaci, a to gradient kontinuální a diskontinuální. V kontinuálním gradientu roste hustota lineárně, zatímco v diskontinuální gradient je tvořen jednotlivými patry roztoků, přičemž jedno patro má stejnou hustotu. Mezi dvěma patry se vytváří rozhraní, kde dochází k zafokusování populace organel. Při přípravě diskontinuálního hustotního gradientu je nutné dbát na to, aby nedošlo k promísení jednotlivých pater a rozhraní bylo zřetelné (shrnuto v Lee et al, 2010).

Free-flow elektroforéza

FFE je separační technika, při které jsou biočástice rozděleny na základě odlišného celkového náboje a hodnoty isoelektrického bodu (pI). Oproti běžné elektroforéze se liší tím, že probíhá v prostředí

bez pevné matrice (například polyakrylamid). FFE se stala zavedenou preparativní a separační metodou pro izolaci různých organel, zejména při vícestupňových separačních procesech k oddělení subpopulací organel. FFE lze použít ve dvou formátech jako FFE v zónovém elektroforetickém režimu (ZE-FFE) a FFE v režimu izoelektrické fokusace (IEF-FFE) (Islinger et al, 2018). ZE-FFE nespolehá na velikost nebo hustotu organel nýbrž na rozdíly povrchového náboje organel, který je dán obsahem fosfolipidů a proteinů. Tato metoda byla použita pro získání vysoce purifikovaného vzorku vezikul plazmatické membrány a tonoplastu *Arabidopsis thaliana* (Bardy et al, 1998). Ze současných prací byla tato metoda využita například pro oddělení plastidů od mitochondrií izolovaných z fotosynteticky aktivního materiálu, kde jsou plastidy známé jako hlavní zdroj kontaminace (Eubel et al, 2007) anebo pro úplné rozdělení endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu (Parsons et al, 2014).

Fluorescenčně aktivované třídění organel

Fluorescenčně aktivované třídění organel využívá pro detekci a třídění specificky fluorescenčně značených organel průtokový cytometr. Průtoková cytometrie je extrémně výkonná technologie umožňující chemickou a fyzikální charakteristiku částic při jejich průchodu paprskem laseru a také umožňuje separaci konkrétní populace buněk, organel či částic z heterogenní směsi. V případě třídění organel, tato technika vyžaduje jejich fluorescenční značení. V praxi lze použít komerčně dostupné organelově specifická fluorescenční barviva, fluoroforem značené protilátky proti proteinu s unikátní lokalizací tzv. markeru. Další možností je exprese markeru a signální sekvence sfúzované s fluorescenčním proteinem. Pro značení se hojně využívá zelený fluorescentní protein (GFP) a od něho odvozené fluorescenční proteiny (Zhang et al, 2008).

2.6.1.3 Identifikace a charakterizace separovaných buněčných frakcí

Konvenčními metodami charakterizace organel jsou metody založené na Western blot a enzymatických markerech. K dalším používaným metodám patří zejména metody založené na mikroskopii (například mikroskopie v tmavém poli, fluorescenční mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil), optické pinzety a kapilární elektroforéza.

Western blot

WB je důležitá technika používaná v buněčné a molekulární biologii, umožňující identifikaci specifických proteinů z komplexní proteinové směsi extrahované z buněk pomocí protilátek (Anderson et al, 2012; Mahmood & Yang, 2012).

V prvním kroku je směs proteinů separována elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Ve variantě s použitím dodecylsírany sodného (SDS) probíhá dělení proteinů na základě molekulové hmotnosti a je umožněno díky jednotnému náboji proteinů (Ornstein, 1964).

Ve druhém kroku jsou separované proteiny přeneseny v elektrickém poli z gelu na nitrocelulózovou nebo PVDF membránu. K ověření rovnoměrného přenosu na je vhodné provést nescifickou vizualizaci prostřednictvím například barvivem Ponceau S, amidočerní nebo RedAlert Western Blot Stain barvivem, které lze snadno odbarvit (Eslami & Lujan, 2010).

Posledním krokem WB je značení cílového proteinu prostřednictvím primární a značené sekundární protilátky pro vizualizaci. Aby bylo zabráněno nescifické vazbě protilátek na membránu, je nejprve prováděna inkubace membrány v roztoku sérového hovězího albuminu nebo nízkotučného sušeného mléka. (Jensen, 2012). Po blokaci následuje inkubace membrány s primární protilátkou. (Kurien et al, 2011). K nepřímé detekci cílového antigenu s navázanou primární protilátkou je využívána sekundární protilátka značená enzymem (často křenovou peroxidasou) nebo fluoroforem. Následná detekce je závislá na typu použitého značení (Bass et al, 2016).

2.6.2 Příprava vzorku pro analytické stanovení auxinů

Rostliny reagují i na nepatrné změny environmentálních podmínek jako je teplota, intenzita světla a vlhkost změnou distribuce a hladin endogenních auxinů. Proto je nutné zajistit přísnou kontrolu nejen podmínek, za kterých jsou rostliny pěstovány, ale také sběr vzorků. (Chiwocha et al, 2003, Hayat et al, 2010) Dalším klíčovým krokem přípravy vzorku je homogenizace, jejímž cílem je narušit buněčné stěny a uvolnit auxiny do extrakčního pufru (Tarkovská et al, 2014). Způsob homogenizace je závislý na typu vzorku a jeho množství. Je-li k dispozici větší množství pletiva, může být k homogenizaci použita třecí miska s tloučkem v kombinaci s tekutým dusíkem. Je-li k dispozici pouze malé množství rostlinného materiálu (v řádech mg), může být homogenizován přímo v mikrozkuhavce pomocí kuličkového vibračního homogenizátoru. Vzorek musí být během homogenizace udržován v chladu, aby bylo zabráněno chemické a enzymatické degradaci rostlinných hormonů (Wang et al, 2015).

2.6.2.1 Extrakce a purifikace vzorku

Purifikace extraktu je důležitým krokem, protože komplexní metabolity v surových rostlinných extraktech mohou ovlivnit přesnost analýzy IAA. K odstranění interferujících látek v extraktech byla pro extrakci a purifikaci vyvinuta celá řada metod. K čištění IAA byla využívána například optimalizovaná extrakce kapalina-kapalina - LLE (Absalan et al, 2008); mikroextrakce kapalina-kapalina-kapalina-kapalina - HF-LLLME (Wu & Hu, 2009) a disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina - DLLME (Gupta et al, 2011). Široce používanými metodami pro extrakci

a čištění je extrakce na pevné fázi - SPE (Dobrev et al, 2005), mikroextrakce na pevné fázi – SPME (Liu et al, 2007) a imunochemické metody založené na protilátkách. Kolony SPE a SPME naplněné matricovou sloučeninou (sorbentem) se používají k extrakci a purifikaci cílových molekul ze směsí v roztoku, protože sorbent selektivně váže určité molekuly na základě celé řady mechanismů (například adsorpce, vodíkové vazby, polární a nepolární interakce či výměna kationtů nebo aniontů). Nedávno byly pro purifikaci fytohormonů použity molekulárně vtištěné polymery - MIP (Porobić et al, 2013) a polymerní monolitová mikroextrakce – PMME (Gao et al, 2014). MIP je šetrná k životnímu prostředí, navíc je to metoda relativně levná a je vysoce tepelně a chemicky stabilní (shrnuto v Su et al, 2017).

Moderní extrakční metodu pro izolaci ftohormonů včetně auxinů ze složité rostlinné matrice představuje mikroextrakce pevnou fází pomocí plněných pipetovacích špiček (μ SPE-PT) (Pěňčík et al, 2018). Tato metoda umožňuje použití minimálního množství biologického materiálu (<5mg) FW a je vhodná pro purifikaci, koncentraci a selektivní izolaci sloučenin (Svačinová et al, 2012).

2.6.2.3 Analytické metody

Dlouhodobě preferovanými metodami pro analýzu rostlinných hormonů jsou chromatografické techniky. Stanovení je prováděno pomocí kombinace plynové či kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Kromě těchto metod jsou také využívány například tlaková kapilární elektrochromatografie, micelární elektrochemická kapilární chromatografie nebo rezonance povrchových plasmonů (Porfirio et al, 2016).

Chromatografie je metoda založená na principu rozdělení molekul ve směsi nanesené na povrch nebo do pevné látky, zatímco se pohybuje v tekuté mobilní fázi. Mobilní fázi může být kapalina nebo plyn. Nejvhodnější a nejúčinnější analytickou technologií pro studium auxinů je kombinace vysokoučinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS). Pomocí HPLC je možné provádět strukturální a funkční analýzu a purifikaci velkého množství molekul za krátký časový úsek. Při analýze prochází mobilní fáze kolonami pod atmosferickým tlakem 10 – 400 cm s průtokem 0,1-5 cm za sekundu (Coskun, 2016).

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS nebo MS²) je výkonná technika chemické analýzy, která je využívána ke kvantifikaci známých sloučenin a objasnění molekulárních struktur. Během analýzy jsou molekuly převedeny na ionty, které jsou následně rozlišeny na základě poměru hmotnosti k náboji (m/z). Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením mohou dosahovat přesnosti hmotnosti pod 5 ppm. Existuje několik typů hmotnostních spektrometrů, které mají různé výhody a nevýhody a skládají se ze třech částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Součásti jsou umístěny ve vakuu a jsou počítačově řízeny. Tandemová hmotnostní spektrometrie využívá dvou či více hmotnostních analyzátorů. Nejjednodušší sestávají ze dvou hmotnostních spektrometrů v sérii spojených komorou známou jako kolizní cela. Iontové zdroje

je možné rozdělit do několika kategorií, například ionizace elektrosprejem, ionizace laserem za přítomnosti matrice nebo chemická ionizace. Jako analyzátor je možné využít například analyzátor doby letu (TOF), Orbitrap, Fourierova transformace iontové cyklotronové rezonance, kvadrupólový analyzátor nebo iontová past (Ghaste et al, 2016).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Biologický materiál

Arabidopsis thaliana, ekotyp Columbia-0 (Col-0)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie 35S::PIN8-GFP (prof. Jiří Friml – IST Austria)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie 35S::PIN5 (prof. Jiří Friml – IST Austria)

Arabidopsis thaliana, mutantní linie 35S::PIN5/PIN8 (prof. Jiří Friml – IST Austria)

3.2 Pomůcky a přístroje

3.2.1 Pomůcky

Čtvercové Petriho misky pro výsev *Arabidopsis* - Greiner bio-one (Rakousko)

Petriho misky pro pěstování kalusu - Greiner bio-one (Rakousko)

Falkonové zkumavky 15 ml, 50 ml – VWR International (USA)

Chromatografická kolona - KINETEX 1.7 μ m C18, 50 x 2,1 mm – Phenomenex (USA)

Keramické homogenizační kuličky - Retsch (Haan, Německo)

Laboratorní sklo – odměrné baňky, Erlenmayerovy baňky, odměrné válce, kádinky, skleněné

Petriho misky – Fisherbrand (USA)

Mikrozkumavky – Eppendorf (Německo)

Miracloth – Calbiochem (USA)

Nitrocelulózová membrána – Santa Cruz Biotechnology (USA)

Oboustranné žiletky – Wilkinson Sword (Velká Británie)

Sada automatických pipet a špiček - Eppendorf TM (Německo)

Skalpel s výměnným ostřím, pinzety, kovové špachtle – VWR International (USA)

Sorbenty pro přípravu μ SPE kolonek:

SDB-XC (Empore TM, 3M TM, Německo)

C18 (Affinisep, AttractSPE TM, Francie)

Sušené odtučněné mléko – Semper (Švédsko)

Ultracentrifugační zkumavky 14 x 89 mm - Beckman Coulter (ČR)

3.2.2 Přístroje

Analytické váhy Satorius - Weighing Technology GmbH (Německo)

Autokláv Labo MLS-3781L – Sanyo (Japonsko)

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos – Thermo Fisher Scientific (USA)

Rotor úhlový jednořadový 8místný – Thermo Fisher Scientific (USA)
Rotor úhlový jednořadový 24místný – Thermo Fisher Scientific (USA)
Centrifuga MIKRO 220R Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Německo)
Rotor úhlový dvouřadový 48místný, úhel 45° Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Německo)
Detekční stanice ChemiDoc MP ImagingSystem - Bio-Rad (USA)
Elektroforetický set Mini-PROTEAN Tetra cell, PowerPac Basic Power - Bio-Rad (USA)
Elektroforéza WIDE MINI Sub – Bio-Rad Laboratories (USA)
Kulový mlýnek MM301 Retsch® & Co. KG (Německo)
Laminární box Heraguard™ ECO – Thermo Fischer Scientific (USA)
Magnetická míchačka VELP Scientifica (Itálie)
Mikroskop OLYMPUS IX51 (Japonsko)
Objektiv PLN4X/0.1 (Japonsko)
Minicentrifuga MICRO STAR 17 – VWR International (USA)
NanoDrop one – Thermo Fisher Scientific (USA)
Odstředivka MiniSpin – Eppendorf (Německo)
PCR plate spinner – VWR International (USA)
pH metr Eutech Instruments pH 700 MM 2a – Thermo Fisher Scientific (USA)
Rotační míchačka zkumavek SB Stuart® - Keison Products (Velká Británie)
Set pro WB Mini Trans-Blot Cell - Bio-Rad Laboratories (USA)
Systém HPLC-MS/MS – Agilent 1260 Infinity II s hmotnostním detektorem Agilent 6495 Triple
Quad – Agilent Technologies (Santa Clara, USA)Termomixer comfort – Eppendorf (Německo)
Thermal Cycler C1000 – Bio-Rad Laboratories (USA)
Transiluminátor Syngene InGenius3– Syngene (USA)
Ultracentrifuga CP 90 WX - Hitachi Koki (Japonsko) s výkyvným rotorem P40ST-2054 – Hitachi
Koki (Japonsko)
Wizard Advantaced IR Vortex Mixer – VELP Scientifica (Itálie)
Zařízení na úpravu vody Direct-Q® 3 UV – Millipore Corp. (Billerica, USA)

3.3 Chemikálie a činidla

2,4-D - Sigma-Aldrich (Německo)
4x Laemmliho vzorkovací pufr – Bio-Rad Laboratories (USA)
5x MyTaq™ Mix - Meridian Life Science Bioline (USA)
Aceton – Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR)
Agar – Duchefa Biochemie V.V. (Nizozemsko)
Agaróza - Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Agriesa ECL kit (Bright) – Agriesa (Švédsko)

Amoniak (25%) – Merck KGaA (Německo)
 cOmplete™, bez EDTA koktejl proteasových inhibitorů – Roche (Švýcarsko)
 DEDCTA – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
 Dihydrogenfosforečnan draselný - Sigma-Aldrich (Německo)
 Fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF) – Roche (Švýcarsko)
 Gamborg's Basal médium - Sigma-Aldrich (Německo)
 Hydroxid draselný (KOH)– Sigma-Aldrich (Německo)
 Hydroxid sodný (NaOH) – Mikrochem spol. Ltd. (Slovensko)
 Chlorid sodný (NaCl) – Lach-Ner s. r. o (ČR)
 Inositol – Sigma-Aldrich (Německo)
 Isopropanol - Sigma-Aldrich (Německo)
 Kinetin - Sigma-Aldrich (Německo)
 Kyselina chlorovodíková (38%) – Lach-Ner s. r. o (ČR)
 Kyselina octová (> 99,0%) – Sigma-Aldrich (Německo)
 MES– Carl Roth GmbH (Německo)
 Methanol (< 99,9%) – Merck KGaA (Německo)
 Murashige & Skoog medium – Duchefa Biochemie B. V. (Nizozemsko)
 MyTaq™ DNA Polymerasa - Meridian Life Science Bioline (USA)
 Primární polyklonální králičí Ab:
 Anti-BiP2 – Agrisera (Švédsko)
 Anti -V-ATPase – Agrisera (Švédsko)
 Anti-H3 – Agrisera (Švédsko)
 Anti-Sec21p – Agrisera (Švédsko)
 Anti-PsbA – Agrisera (Švédsko)
 Anti-GDC-H – Agrisera (Švédsko)
 Anti-CNX1/2 – Agrisera (Švédsko)
 Primery pro PCR:
 F primer 35S (5'-CTATCCGCAAGACCCTTC-3') – metabion international AG (Německo)
 R primer PIN5 (5'-CACTAGTCCCTGAGTCCTC-3') – metabion international AG (Německo)
 R primer PIN8 (5'-CAGAACGTAACATAACCA-3') – metabion international AG (Německo)
 F primer – CPD (5'-AAGGTCCTACTTTATGCAGAA-3') - metabion international AG (Německo)
 R primer – CPD (5'-AAAAACATAAGTGAGAAGGCCGAAT-3') - metabion international AG (Německo)
 Sacharóza – Lach- Ner s.r.o. (ČR)

Sacharóza – Sigma (Německo)

Sekundární polyklonální kozí Ab anti-rabbit IgG-HRP - Santa Cruz Biotechnology (USA)

Standardy:

IAA; [13C6]IAA – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

IAAsp; [13C6]IAAsp – OlchemIm (ČR)

IAGlu; [13C6]IAGlu – OlchemIm (ČR)

oxIAA; [13C6]oxIAA – OlchemIm (ČR)

IAA-Glc; [13C6]IAA-Glc – Laboratoř růstových regulátorů (ČR)

oxIAA-Glc; [13C6]oxIAA-Glc – Laboratoř růstových regulátorů (ČR)

Thiamin – Sigma-Aldrich (Německo)

Trisaminomethan (Tris) – Sigma-Aldrich (Německo)

Tween - Sigma-Aldrich (Německo)

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Výsev *Arabidopsis thaliana*

3.4.1.1 Příprava roztoků

Médium Murashige & Skoog:

Do kádinky bylo naváženo 4,4 g MS média a 10 g sacharózy. Všechno bylo rozpuštěno v deionizované vodě na magnetické míchačce a pH roztoku bylo upraveno pomocí 0,1 M hydroxidem sodným na pH 5,7. Objem média byl doplněn na 1000 ml. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 5 g agaru a bylo přidáno 500 ml média. Hrdlo baňky bylo důkladně překryto alobalem a médium bylo sterilizováno v autoklávu.

Sterilizační pufr: Ve falkonové zkumavce bylo smícháno 14 ml ethanolu, 6 ml deionizované vody a 10 µl Tweenu.

3.4.1.2 Výsev semen

A. thaliana (ekotyp Col-0 a mutantní linie 35S::PIN8-GFP, 35S::PIN5 a PIN5/PIN8) byly pěstovány na pevném sterilním Murashige & Skoog médiu na čtvercových plastových Petriho miskách. Před výsevem byla semena sterilizována ve sterilizačním pufru po dobu 10 min. Samotný výsev probíhal ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Pro výsev párátkem byl pufr odstraněn a k semenům byl napipetován 1 ml 96 % ethanolu, obsah byl promísen a ethanol odstraněn. Postup byl dvakrát opakován. Semena byla přenesena v přibližně 50 µl ethanolu do plastové Petriho misky na filtrační papír. Při výsevu semen pro izolaci ER byl do mikrozkuhavky napipetován 1 ml sterilizačního pufru

a semena byla 10 minut promývána. Ethanol byl pipetou odsán a semena byla promyta 96 % ethanolem. Po odsání ethanolu byla k semena čtyřikrát promyta deionizovanou vodou. Poté byla semena resuspendována v 600 μ l deionizované vody a vyseta na agarovou desku pomocí automatické pipety. Přebytečná voda byla vysušena. Uzavřené desky byly ponechány tři dny ve tmě při 4°C. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu ve vertikální poloze při 22 °C při fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma po dobu. Rostliny pro genotypizaci a izolaci ER byly pěstovány ve fytotronu po dobu deseti dní a pro stanovení IAA v klíčících rostlinách a fluorescenční mikroskopii po dobu 7 dnů.

3.4.2 Genotypizace

3.4.2.1 Příprava roztoků

Edwardsův pufr, pH 7,5: Bylo naváženo 3,15 g Tris, 0,93 g EDTA a 1,46 g NaCl. Všechno bylo rozpuštěno v 50 ml deionizované vody. Pomocí 0,1 M HCl bylo upraveno pH na hodnotu 8. Bylo přidáno 0,5 g SDS a objem byl doplněn na 100 ml.

Směs pro PCR: Pro jednu reakci byly smíchány 4 μ l 5x My TAQ pufru, 0,5 μ l 10 μ M forward primeru, 0,5 μ l 10 μ M reverse primeru, 0,1 μ l My Taq polymerasy, 13 μ l DNA-free vody a 2 μ l gDNA.

TE pufr: K 800 ml deionizované vody bylo přidáno 15,759 g HCl-Tris a 2,92 g EDTA. Vše bylo důkladně rozmícháno na magnetické míchačce a objem byl doplněn na 1 litr.

10x TBE pufr, pH: Bylo naváženo 121,1 g Tris, 61,8 g kyseliny borité a 7,4 g EDTA. Všechno bylo rozpuštěno v deionizované vodě.

1,5% agarózový gel: Do 80 ml 0,5x TBE pufru bylo naváženo 1,2 g agarózy. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Do roztoku byly následně přidány 4 μ l ethidium bromidu.

3.4.2.2 Extrakce gDNA

Byly připraveny 20 mg navážky desetidenních semenáčků *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia a mutantní linie 35S::PIN8-GFP, 35S::PIN5 a 35S::PIN5/PIN8). Mikrozkušavky byly vloženy do tekutého dusíku a následně uloženy v -80 °C. Mikrozkušavky byly umístěny na led, k navážkám bylo napipetováno 200 μ l Edwardsova pufru a bylo přidáno pět homogenizačních keramických kuliček. Vzorky byly vortexovány s homogenizačními kuličkami a centrifugovány 2 minuty při 4 °C na stolní centrifuze při maximální rychlosti. Do čistých mikrozkušavek bylo napipetováno 150 μ l supernatantu a 150 μ l isopropanolu. Vzorek byl inkubován 5 minut na ledě a následně centrifugován 5 minuty při 4 °C na stolní centrifuze při maximální rychlosti. Z mikrozkušavek byl odstraněn supernatant a pelet byl vysušen. Následně byl pelet resuspendován v TE pufru, čímž byl vytvořen zásobní roztok gDNA. Ze zásobního roztoku gDNA byly odebrány 2 μ l a smíchány s 48 μ l deionizované DNA-free vody, čímž byl vytvořen pracovní roztok DNA.

3.4.2.3 PCR

Primery pro PCR byly naředy dle pokynů výrobce na zásobní roztoky. Do nových mikrozkušavek bylo napipetováno 20 μ l primerů, která byly následně 10x zředěny přidávkem 180 μ l Nuclease-free vody. Byly připraveny mixy obsahující 5x MyTaq™ pufr, MyTaq™ polymerasu, 150 μ l Nuclease free vodu a dva druhy primerů dle Tab. 1. Mixy byly rozpipetovány do PCR destičky po 18,1 μ l. Do mixů byly připipetovány 2 μ l gDNA z *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (WT) a nadexprimujících linií 35S::PIN8-GFP, 35S::PIN5 a 35S::PIN5/PIN8 viz Tab. 2.

Tab. 1: Složení PCR mixů pro agarózovou elektroforézu. Každý mix obsahuje reverzní (R) a forward primer (F), MyTaq™ polymerasu, 5x MyTaq™ pufr a nuclease-free vodu.

	Mix 1	Mix 2	Mix 3
	F primer: 35S	F primer: 35S	F primer: CPD
	R primer: PIN5	R primer: PIN8	R primer: CPD
5x MyTaq™ Mix	32 μ l	32 μ l	40 μ l
Forward primer	4 μ l	4 μ l	5 μ l
Reverse primer	4 μ l	4 μ l	5 μ l
MyTaq™ DNA Polymerasa	0,8 μ l	0,8 μ l	1 μ l
Nuclease-free voda	104 μ l	104 μ l	130 μ l

Tab. 2: Kombinace připravených PCR mixů a gDNA. K Mixu 1, který obsahoval forward primer pro promotor 35S a reverzní primer PIN5, byla přidána gDNA z mutantní linie 35S::PIN5, z double mutantní linie 35S::PIN5/PIN8 a Col-0. K Mixu 2, který obsahoval forward primer 35S a reverzní primer PIN8, byla přidána gDNA z mutantní linie 35S::PIN5, 35S::PIN8-GFP, z double mutantní linie 35S::PIN5/PIN8 a ekotypu Columbia. K Mixu 3, který obsahoval forward primer CPD a reverzní primer CPD byla připipetována gDNA z 35S::PIN8-GFP, z double mutantní linie 35S::PIN5/PIN8 a Col-0.

Mix 1	Mix 2	Mix 3
PIN5ox	PIN5ox	-
-	PIN8ox	PIN8ox
-	PIN8ox	PIN8ox
PIN5/8ox	PIN5/8ox	PIN5/8ox
WT	WT	WT

PCR destička byla uzavřena víčkem a umístěna do termocycleru. Program PCR se skládal z úvodní denaturace při 94 °C trvající 5 minut. Následovala vlastní denaturace trvající 30 sekund a annealing při 45 °C po dobu 30 sec. Elongace probíhala při 72 °C po dobu 45 sekund. Cyklus byl opakován v 35 cyklech. Celý program byl zakončen elongací po dobu 5 minut při 72 °C a po dokončení programu byly vzorky v termocycleru udržovány při 15 °C. V průběhu PCR byl připraven agarózový gel s 0,5x TBE. Gel byl přenesen do elektroforetické vany a zalit elektroforetickým 0,5x TBE pufrém. Po PCR byly vzorky napipetovány do jamek agarózového gelu, do první a poslední jamky

byl napipetován hmotnostní marker a byla spuštěna elektroforéza při 80 V po dobu 30 minut. Agarózový gel byl vizualizován pomocí transiluminátoru.

3.4.3 Odvozování buněčných suspenzí

3.4.3.1 Příprava roztoků

Zásobní roztoky pro přípravu médií používaných pro odvození buněčných suspenzních kultur:

Inositol - 100 mg.ml⁻¹: K přípravě zásobního roztoku bylo rozpuštěno 100 mg inositolu v 1 ml deionizované vysterilizované vody.

Thiamin - 10 mg.ml⁻¹: K přípravě zásobního roztoku bylo rozpuštěno 10 mg thiaminu v 1 ml deionizované vysterilizované vody

2,4-D - 5 mg.ml⁻¹: K přípravě zásobního roztoku bylo rozpuštěno 5 mg 2,4-D v 1 ml deionizované vysterilizované vody.

Kinetin - 10 mg.ml⁻¹: K přípravě zásobního roztoku bylo rozpuštěno 10 mg kinetinu v 1 ml deionizované vysterilizované vody

KH₂PO₄ - 40 mg.ml⁻¹: K přípravě zásobního roztoku bylo rozpuštěno 40 mg KH₂PO₄ v 1 ml deionizované vysterilizované vody.

Kalus indukující médium: Bylo naváženo 0,32 g Gamborg's Basal médium, 2 g sacharózy a 0,05 g MES. Všechno bylo rozpuštěno v deionizované vodě na magnetické míchačce. pH roztoku bylo upraveno 0,1 M hydroxidem draselným na hodnotu 5,7. Objem roztoku byl v odměrné baňce doplněn na 100 ml. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,6 g agaru, bylo přidáno médium a hrdlo baňky bylo důkladně překryto alobalem. Po sterilizaci v autoklávu bylo do mírně zchlazeného média za sterilních podmínek přidáno 0,5 µl zásobního roztoku kinetinu a 10 µl zásobního roztoku 2,4-D.

Pevné MS médium pro pěstování kalusu: Bylo naváženo 2,15 g MS média a 15 g sacharózy. Všechno bylo rozpuštěno v deionizované vodě na magnetické míchačce a pH roztoku bylo upraveno 0,1 M hydroxidem draselným na hodnotu 5,8. Objem roztoku byl v odměrné baňce doplněn na 500 ml. Do média bylo přidáno 50 µl zásobního roztoku thiaminu, 500 µl zásobního roztoku inositolu, 2,5 µl zásobního roztoku KH₂PO₄ a 20 µl zásobního roztoku 2,4-D. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,3 g agaru, bylo přidáno médium a hrdlo baňky bylo důkladně překryto alobalem. Po sterilizaci v autoklávu bylo médium ponecháno k zatuhnutí na nakloněné rovině.

Tekuté médium pro odvození buněčné suspenzní kultury: Bylo naváženo 2,15 g MS média a 15 g sacharózy. Všechno bylo rozpuštěno v deionizované vodě na magnetické míchačce a pH roztoku bylo upraveno 0,1 M hydroxidem draselným na hodnotu 5,8 a objem byl v odměrné baňce doplněn na 500 ml. Do roztoku bylo přidáno 500 µl zásobního roztoku inositolu, 50 µl zásobního roztoku thiaminu, 50 µl zásobního roztoku 2,4-D, 10 µl zásobního roztoku kinetinu a 2,5 µl zásobního roztoku KH₂PO₄.

3.4.3.2 Indukce kalusu

Při práci ve sterilním prostředí byly kovové nástroje sterilizovány 96 % ethanolem a plamenem. Ze sedmidenních semenáčku *Arabidopsis* byly skalpelem za sterilních podmínek v laminárním boxu odříznuty děložní lístky a hypokotyl. Děložní lístky byly rozřezány na segmenty a společně s hypokotylem přeneseny na kalus indukující médium. Plastové misky s takto připravenými vzorky byly umístěny do fytostronu a ponechány 4 týdny při 22 °C a fotoperiodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

3.4.3.3 Pěstování kalusu

Po 4 týdnech byly vybrány nejkvalitnější kalusy a jejich nejvitalnější části byly přeneseny na pevné MS médium pro pěstování kalusů. Nástroje, které byly používány byly po každém kalusu sterilizovány v 96 % ethanolu a následně v plameni. Kalusy byly při prvních experimentech pěstovány na plastových Petriho miskách. Později byl pro pěstování kalusu zvolen šikmý agar v Erlenmayerových baňkách o objemu 150 ml. Kalusy byly umístěny do tmavé komory a pěstovány při 22 °C po dobu 4 týdnů.

3.4.3.4 Přenos kalusů do tekutého média

Z narostlých kalusů byla malá část přenesena na nové pevné MS médium pro pěstování kalusu, aby byl zajištěn stálý zdroj. Část kalusu byla přenesena do mikrozkušavky, zamrazena ponořením do kapalného dusíku a uchována v – 80°C. Zbytek kalusu byl přenesen do 3 ml média, které bylo napipetováno do jamek v šesti jamkové jednorázové destičce. Kalus byl mírně rozmáčknut pinzetou. Deska byla uzavřena, hrany byly přelepeny páskou a ponechány na třepačce při 130 rpm.

3.4.4 Fluorescenční mikroskopie

Sedmidenní semenáčky 35S::PIN8-GFP byly pinzetou přeneseny do kapky deionizované vody na podložní sklíčko. Rostliny byly překryty krycím sklem a mikroskopovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX51 nejprve v procházejícím světle pro zaostření kořenových špiček semenáčků. Následně byly kořenové špičky pozorovány s excitací při 385 nm a emisí při 438 nm.

3.4.5 Izolace ER

3.4.5.1 Příprava roztoků

ER pufr: Bylo naváženo 1,3609 g KH_2PO_4 a 0,1017 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Všechno bylo rozpuštěno v deionizované vodě na magnetické míchačce a pomocí 0,1 M roztoku KOH bylo upraveno pH na hodnotu 6,65. Objem byl doplněn na 100 ml.

Extrakční pufr: Rozpuštěním 8,56 g sacharózy v ER pufru byl připraven 0,5 M roztok. K 0,5 M roztoku sacharózy byl přidán DTT na finální koncentraci 1mM, PMSF na finální koncentraci 1 mM a jedna tableta cOplete™, bez EDTA koktejl proteasových inhibitorů.

Roztoky pro původní sacharózový gradient:

Rozpuštěním sacharózy v ER pufru byly připraveny pro první gradient roztoky o koncentraci 1,3 M; 1,1 M; 0,7 M; 0,25 M.

Roztoky pro optimalizovaný sacharózový gradient:

Roztok 1: 4,45 g sacharózy bylo rozpuštěno v 10 ml ER pufru.

Roztok 2: 3,76 g sacharózy bylo rozpuštěno v 10 ml ER pufru.

Roztok 3: 2,40 g sacharózy bylo rozpuštěno v 10 ml ER pufru.

Roztok 4: 0,86 g sacharózy bylo rozpuštěno v 10 ml ER pufru.

3.4.5.2 Zpracování rostlinného materiálu

Homogenizace pomocí žiletky

Byly naváženy 2 g desetidenních semenáčku *A. thaliana* Col-0 a mutantní linie 35S::PIN8-GFP. Rostlinný materiál by přenesen do Petriho misky umístěné na ledu. Od tohoto bodu byly všechny kroky prováděny na ledu a s vychlazenými roztoky a pomůckami. K rostlinám byly napipetovány 2 ml vychlazeného extrakčního pufru. Vzorek byl homogenizován po dobu 5 minut v Petriho misce pomocí žiletky a následně byl inkubován po dobu 3 minut na třepačce při 60 rpm. Zhomogenizovaná směs byla přefiltrována do 50 ml falkonové zkumavky přes dvě vrstvy Miraclothu, který byl navlhčen 2 ml extrakčního pufru. Miska byla od zbytků homogenizovaného materiálu vypláchnuta 2 ml extrakčního pufru. Přefiltrovaný extrakt byl zcentrifugován při 6000 g.

Homogenizace pomocí třecí misky s tloučkem

Byly naváženy 2 g rostlinného materiálu a přeneseny do vychlazené třecí misky a přelity 2 ml extrakčního pufru. Do misky bylo přidáno 100 mg jemného křemene. Rostliny byly třeny po dobu 3 minut. Následující kroky byly provedeny podle postupu popsaného výše.

3.4.5.3 Optimalizace otáček centrifugace

Byly naváženy dvakrát 2 g rostlinného materiálu. Rostlinný materiál by přenesen do skleněné Petriho misky umístěné na ledu a převrstven 2 ml extrakčního pufru. Vzorek byl homogenizován po dobu 5 minut v Petriho misce pomocí žiletky a následně byl inkubován po dobu 3 minut na třepačce při 60 rpm. Zhomogenizovaná směs byla přefiltrována do 50 ml falkonové zkumavky přes dvě vrstvy Miraclothu, který byl navlhčen 2 ml extrakčního pufru. Miska byla od zbytků homogenizovaného materiálu vypláchnuta 2 ml extrakčního pufru. Extrakty byly sloučeny do falkonové zkumavky a následně rozpipetován po 1 ml do mikrozkuvek umístěných na ledu, 1 ml extraktu byl rychle zmrazen v tekutém dusíku a následně uskladněn při -80°C. Do vychlazené centrifugy byla vložena jedna mikrozkuvka s extraktem a jedna vyvažovací mikrozkuvka s 1 ml vody. Následně byla

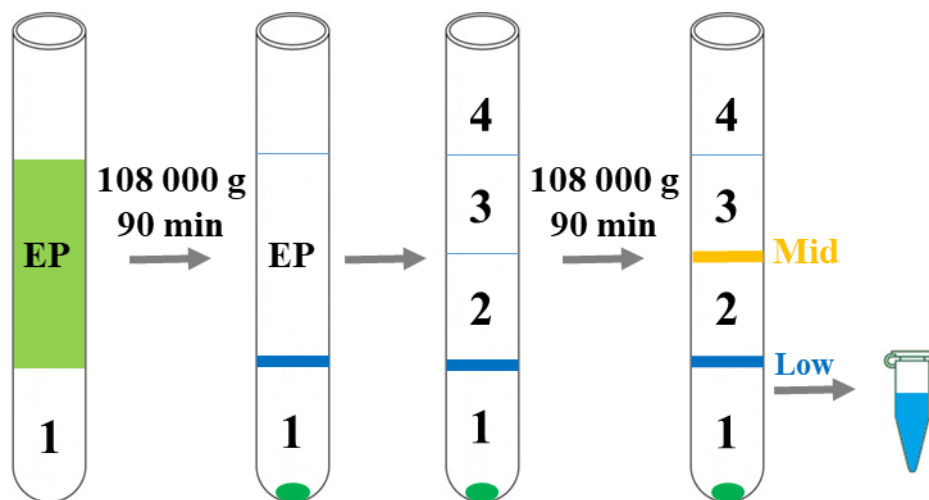
provedena deseti minutová centrifugace při 4 °C při 3000 g, 4500 g, 6000 g, 7500 g, 9000 g, 10500 g a 12000 g. Z mikrozkušavky byl pokaždé opatrně odpipetován necelý 1 ml supernatantu, který byl přenesen do čisté mikrozkušavky, rychle zmrazen v tekutém dusíku a poté uskladněn při -80°C. Následně byl vzorek rozmrazen a promísen na vortexu. Následně bylo postupováno dle kapitoly 3.4.6. Western blot.

3.4.5.4 Izolace dle původního protokolu (Ding et al, 2012)

Z centrifugovaného vzorku (z kapitoly 3.4.5.2) byl odebrán supernatant. Do ultracentrifugační zkumavky byly napipetovány 3 ml 1,3M roztoku sacharózy. Roztok byl převrstven supernatantem a centrifugován při 108 000 g po dobu 90 minut. Horní fáze byla odpipetována a vzniklá mezifáze byla převrstvena 3 ml 1,1M roztoku sacharózy, 3 ml 0,7M a 3 ml 0,25M roztoku sacharózy dle Obr. 4. Pro pipetování byla použita 1 ml pipetovací špička s odstřiženým hrotem. Napipetovaný gradient byl centrifugován při 108 000 g po dobu 90 minut. Z mezifáze byl odebrán 1 ml frakce pro Western blot do nových ultracentrifugačních zkumavek, promíchán s 0,5M roztokem sacharózy do 2/3 objemu ultracentrifugační zkumavky a centrifugován při 109 000 g po dobu 50 minut. Supernatant byl odpipetován a pelet byl resuspendován v 50 µl 0,5M roztoku sacharózy. Mikrozkušavky byla vložena do tekutého dusíku a následně uskladněna při -80°C.

3.4.5.5 Izolace dle optimalizovaného protokolu

Postup optimalizovaného protokolu byl shodný s postupem popsaným výše. Byly použity roztoky sacharózy odlišného složení dle Obr. 4. Pro stanovení metabolického profilu IAA v endoplazmatickém retikulu byl do čistých mikrozkušavek odebrán 1 ml mezivrstvy vytvořené mezi roztoky 1 a 2 (dále jako low fáze, Obr. 4). Pro stanovení metabolického profilu IAA v celkové organelové suspenzi byl do mikrozkušavky odebrán 1 ml přefiltrovaného extraktu. Mikrozkušavky byly přeneseny do tekutého dusíku a následně uskladněny v -80 °C.



Obr. 4: Schéma postupu přípravy gradientu pro izolaci endoplazmatického retikula.

3.4.6 Western blot

3.4.6.1 Příprava roztoků

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8: V 500 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 181,5 g Tris. pH roztoku bylo upraveno 1M HCl na hodnotu 8,8. Objem byl doplněn na 1 l.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8: V 500 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 61 g Tris. pH roztoku bylo upraveno 1M HCl na hodnotu 6,8. Objem byl doplněn na 1 l.

10% SDS: V 250 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 25 g SDS.

10% APS: V 250 μ l bylo rozpuštěno 0,025 g APS.

10x koncentrovaný elektroodový pufr Tris/glycin, pH8,3: V 500 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 30,3 g Tris, 144 g glycinu a 10 g SDS. pH bylo upraveno 1M HCl na hodnotu 8,3. Po rozpuštění byl objem doplněn na 1000 ml.

Akrylamid/Bis (T 30%, C 2,67%): V 50 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 29,2 g akrylamidu a 0,8 g N', N'-metylen-bis-akrylamidu. Po rozpuštění byl objem doplněn na 100 ml.

4% zaostřovací gel: Ve zkumavce bylo smícháno 6,1 ml deionizované vody, 1,3 ml zásobního roztoku akrylamid/bis, 0,1 ml SDS a 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8. Před zahájením polymerizace bylo přidáno 10 μ l TEMED, 50 μ l 10% APS.

12 % dělicí gel: Ve zkumavce bylo smícháno 3,4 ml deionizované vody, 4,0 ml zásobního roztoku akrylamid/bis, 0,1 ml SDS a 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. Před zahájením polymerizace bylo přidáno 5 μ l TEMED, 50 μ l 10% APS.

Transferový pufr, pH 8,3: V 500 ml bylo rozpuštěno 30,3 g Tris a 144 g glycinu a objem byl doplněn na 1000 ml.

1x TBS-T: V 1000 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 2,42 g Tris a 29,22 g NaCl. K roztoku bylo přidáno 500 μ l Tweenu.

Vzorkovací pufr: K 4x koncentrovanému vzorkovacímu pufru byl napipetován merkaptoethanol v poměru 1:9.

5% nízkotučné mléko v TBS-T: Ve 100 ml TBS-T bylo rozpuštěno 5 g nízkotučného mléka.

1% nízkotučné mléko v TBS-T: Ke 20 ml 5% nízkotučného mléka bylo přidáno 80 ml TBS-T.

Primární protilátky:

BiP2: Primární protilátka BiP2 byla ředěna v 1% roztoku nízkotučného mléka v poměru 1:2500.

K 42,5 ml mléka byl přidán 1 μ l primární protilátky.

V-ATPase: Primární protilátka V-ATPase byla ředěna v 1% roztoku nízkotučného mléka v poměru 1:2000. K 2 ml mléka byl přidán 1 μ l primární protilátky.

H3: Primární protilátka H3 byla ředěna v 1% roztoku nízkotučného mléka v poměru 1:5000. K 5 ml mléka byl přidán 1 μ l primární protilátky.

Sec21p: Primární protilátka Sec21p byla ředěna v 1% roztoku nízkotučného mléka v poměru 1:1000.

K 1 ml mléka byl přidán 1 μ l primární protilátky.

PsbA: Primární protilátka *PsbA* byla ředěna v 1% roztoku nízkotučného mléka v poměru 1:10 000.

K 10 ml mléka byl přidán 1 μ l primární protilátky.

GDC-H: Primární protilátka *GDC-H* byla ředěna v 1% roztoku nízkotučného mléka v poměru

1:2500. K 2,5 ml mléka byl přidán 1 μ l primární protilátky.

Sekundární protilátka: Sekundární protilátka Anti-rabbit IgG-HRP: Protilátka byla ředěna v poměru 1:5000. Ke 40 ml 1% roztoku nízkotučného mléka bylo přidáno 8 μ l sekundární protilátky.

Chemiluminesční substrát Agriosa ECL kit (Bright) – Obě složky substrátu byly smíchány v poměru 1:1.

3.4.6.2 Elektroforéza

Ke vzorku byl napipetován vzorkovací pufr v poměru 1:3. Mikrozkušavka bylo vložena do termobloku na 5 minut při teplotě 95 °C. Vzorek byl zcentrifugován při 10 000 rpm po dobu 5 minut.

Byl připraven polyakrylamidový gel, který byl tvořen 4% zaostřovacím gelem s jamkami pro vzorek a 12% dělicím gelem. Do první a poslední jamky gelu byl napipetován marker molekulových hmotností. Na gel byly nanесeny vzorky. Elektroforéza byla spuštěna nejprve 30 minut při 90 V a následně při 120 V do konce dělení.

3.4.6.4 Imunodetekce

Gel byl opláchnut po dobu 5 minut v transferovém pufru. Byla sestavena sendvičová kazeta s gelem s rozdělenými proteiny a nitrocelulózovou membránou. Souprava pro western blot byla umístěna do lednice a proteiny byly přeneseny přes noc při 90 mA na membránu.

Membrána byla obarvena v roztoku Ponceau S barviva v 5% kyselině octové a následně odbarvena v TBS-T. Nespecificky obarvené proteiny a s linie jejich migračních drah byly vyznačeny tužkou. Membrána byla inkubována po dobu 60 minut za stálého míchání v 5% roztoku nízkotučného mléka rozpuštěném v TBS-T pufru. Membrána byla rozstříhána na segment pro inkubaci s vybranými primárními protilátkami.

Primární a sekundární protilátky byly naředěny ve vhodném poměru s 1% nízkotučného mlékem rozpuštěným v TBS-T. Připravené primární protilátky byly napipetovány na dno Petriho misky vyložené parafilmem. Segmenty membrány byly inkubovány 60 minut s primární protilátkou. Každých 20 minut byly protilátky s membránou promíchány. Části membrány byly jednotlivě promývány třikrát 5 minut v TBS-T. Následně byla membrána inkubována 60 minut s naředěnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou. Nespecificky navázaná sekundární protilátka byla odmyta třikrát 10 minut v TBS-T.

Proteiny na membráně byly detekovány prostřednictvím chemiluminiscenčního substrátu v detekčním zařízení a vyhodnoceny.

3.4.7 Extrakce auxinových metabolitů

3.4.7.1 Příprava roztoků

Sodno-fosfátový pufr: Nejprve byl smícháním 57,7 ml 0,5 M dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a 42,3 ml dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) připraven 0,5 M zásobní roztok sodno-fosfátového extrakčního pufru. V odměrné baňce bylo smícháno 10 ml 0,5 M sodnofosfátového pufru s 20 mg DEDTCA. Objem roztoku byl doplněn na 100 ml.

Činidla pro $\mu\text{SPE-PT}$:

0,1 M kyselina chlorovodíková (HCl) - Na 10 ml roztoku bylo použito 9,918 ml deionizované vody a 82,8 μl 37% HCl.

0,1% kyselina octová – K 9,990 ml deionizované H_2O bylo napipetováno 10 μl kyseliny octové.

10% methanol – K 9 ml deionizované H_2O byl napipetován 1 ml methanolu.

80% methanol – Ke 2 ml deionizované H_2O bylo přidáno 8 ml methanolu.

3.4.7.2 Příprava $\mu\text{SPE-PT}$ kolonek

Z SPE disků C18 a SDB-XC byly pomocí silnější Hamiltonovy jehly vyříznuty disky. Vyříznuté disky byly pomocí slabší jehly umístěny do 200 μl špiček. Do každé špičky byly nejprve umístěny tři vrstvy SDB-XC. Následně byly do špičky umístěny tři disky sorbentu C18.

3.4.7.3 Extrakce a purifikace

Klíční rostliny *Arabidopsis thaliana*

Extrakce a purifikace vzorků byla provedena metodou $\mu\text{SPE-PT}$ (podle Pěničik et al, 2018). Z týdenních rostlin *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 a mutantní linie 35S::PIN8-GFP byly připraveny 5 mg navážky. Mikrozkušavky s odebraným rostlinným materiálem byly vloženy do kapalného dusíku a následně uloženy při -80°C . Ke každému vzorku byl přidán 1 ml vychlazeného 0,05 M sodnofosfátového extrakčního pufru, směs interních standardů (5 pmol [$^{13}\text{C}_6$]IAA, [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA, [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA-Glc, [$^{13}\text{C}_6$]IAA-Glc, [$^{13}\text{C}_6$]IAAasp a [$^{13}\text{C}_6$]IAGlu) a 5 keramických homogenizačních kuliček. Vzorky byly homogenizovány v kulovém mlýnku (10 min, 27 Hz) a 10 min inkubovány na rotační míchačce při 4°C . K usazení pevných částí a jejich oddělení od supernatantu byly vzorky centrifugovány (15 200 rpm, 4°C , 15 min). Mikroextrakční kolonky byly kondicionovány 50 μl acetonu (centrifugace - 2200 rpm, 10 min, 8°C), 50 μl methanolu (2200 rpm, 10 min, 8°C) a 50 μl redestilované vody (2200 rpm, 15 min, 8°C). Z každého vzorku bylo odebráno 200 μl , okyseleno na pH 2,7 pomocí 0,1 M HCl a nanášeno na kolonku (3400 rpm, 15 min, 8°C). Kolonky byly promyty 50 μl 0,1 M kyseliny octové (3400 rpm, 15 min, 8°C).

a následně eluovány 50 μ l 80% methanolu (3400 rpm, 15 min, 8°C). Vzorby byly odpařeny dosucha a uloženy při -20 °C. Před HPLC-MS/MS analýzou byly odparky rozpuštěny v 30 μ l 10% methanolu.

Subcelulární frakce

Vzorby nabohacených ER frakcí a celkových organelových suspenzí byly pomalu rozmrazeny na ledu, promíchány a z každého vzorku bylo do čistých mikrozkušavek přeneseno dvakrát 400 μ l roztoku. Vzorby byly centrifugovány (15 minut, 4°C a 15 200 rpm) a následně přefiltrovány přes mikrospin kolonky. Ke každému vzorku byla poté přidána směs interních standardů (5 pmol každé látky) a následně byly vzorky přečištěny pomocí μ SPE-PT výše popsáním postupem.

3.4.8 Parametry HPLC-MS/MS

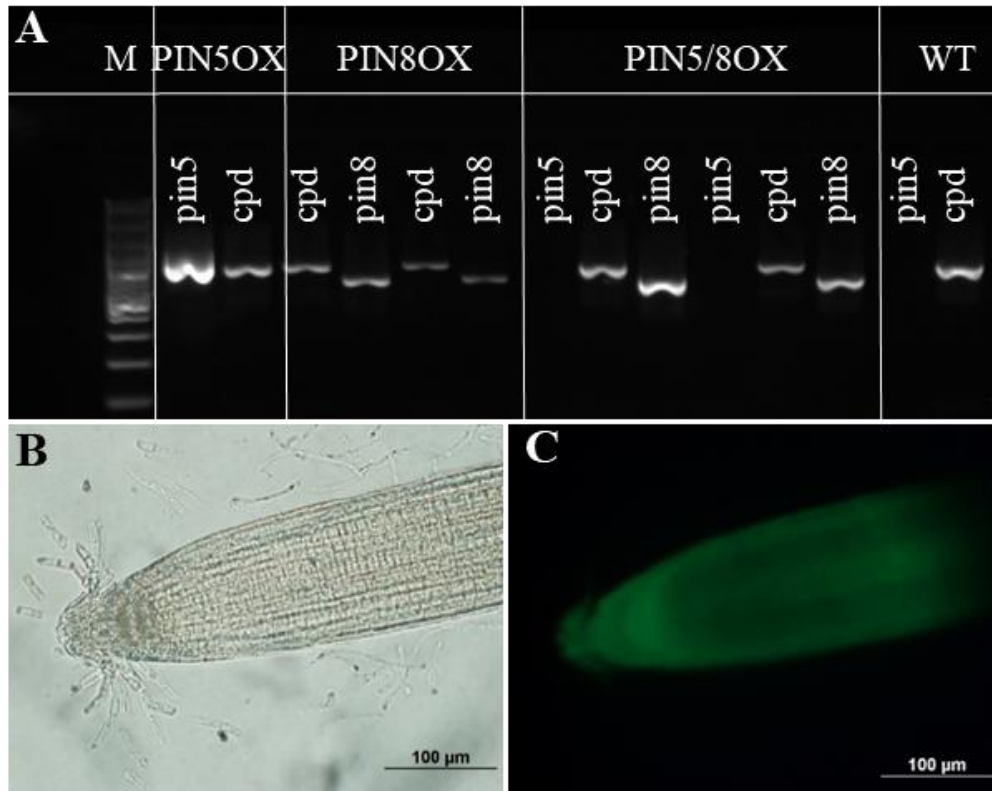
Detekce analytů byla provedena s využitím HPLC-MS/MS ionizací elektrosprejem s přepínáním mezi pozitivním a negativním módem (ESI+/-). Pro separaci byla využita chromatografická kolona KINETEX 1,7 μ m C18, 50 x 2,1 mm (Phomenex, Torrance – USA). Kolona byla temperována na 30 °C. Celkový čas analýzy činil 12 minut při průtoku 300 μ l/min. Mobilní fáze byla tvořena redestilovanou vodou (A) a methanolem (B) s přidavkem 0,1% kyseliny octové. Průběh gradientové eluce byl následující: 0 min – 10% B; 6,5 min – 36% B; 6,75 min – 100% B; 7,75 min – 100% B; 8-12 min – 10% B. Vzorby byly uloženy v autosampleru při teplotě 4 °C a celkový nástřik jednoho vzorku činil 10 μ l. Jednotlivé analyty byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru v pozitivním a negativním módu za použití optimalizovaných podmínek (Pěňčík et al, 2018).

4 VÝSLEDKY

4.1 Ověření pravosti vybraných linií

Před začátkem experimentů vedoucích ke stanovení metabolického profilu IAA v ER byla prostřednictvím genotypizace ověřena pravost poskytnutých vybraných nadexprimujících linií 35S::PIN8-GFP, 35S::PIN5 a double mutantní linie 35S::PIN5/PIN8. Desetidenní semenáčky *Arabidopsis* byly genotypizovány pomocí PCR. Ze zmíněných linií byla extrahována DNA a amplifikací vzniklé DNA produkty byly separovány a vizualizovány prostřednictvím agarózové elektroforézy a transiluminátoru. Jako pozitivní kontrola správného průběhu reakce byla použita kombinace cpd primerů s izolovanými DNA z *A. thaliana* Col-0 i nadprodukcujících linií. Z výsledného bandu produktu reakce na gelu v Obr. 5 A označeném cpd u všech testovaných DNA můžeme usuzovat, že DNA byla vyzolována v dostatečném množství a kvalitě a také že byl správně nastaven cyklus termocycleru. Pravost linií 35S::PIN5 a 35S::PIN8-GFP byla prokázána přítomností bandu produktu označeného v Obr. 5 A pin5 a pin8 u vzorků DNA 35S::PIN5 a 35S::PIN8-GFP. U double mutantní linie 35S::PIN5/PIN8 je patrné, že je přítomen pouze band produktu reakce s primerem pin8. Z toho můžeme usuzovat, že tato linie nenesou oblast kódující protein PIN5 pod kontrolou promotoru 35S. Z tohoto důvodu byla linie vyřazena z dalších experimentů. Pravost linie 35S::PIN5 sice byla ověřena, ale v této práci nebyla využita z důvodu nedostatečného množství semen.

U nadexprimujících linií může docházet k umlčení vložených genů. Proto byla následně ověřena exprese PIN8-GFP *in vivo* v kořeni desetidenních rostlin prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Z Obr. 5 B, C je patrné, že dochází k silné expresi vloženého proteinu PIN8-GFP ve všech buněčných typech kořenové špičky. Při podrobnější analýze bylo zjištěno, že protein se exprimuje nejen podél celé délky kořene, ale i v nadzemní části.



Obr. 5: (A) Ověření přítomnosti vloženého trans-genu mutantních linií *A. thaliana* (A) Detekce PCR produktu linií 35S::*PIN5* (*PIN5ox*), 35S::*PIN8-GFP* (*PIN8ox*) a 35S::*PIN5/PIN8* (*PIN5/8ox*). *cpd* představuje pozitivní kontrolu ke každé PCR. Band označený *pin5* je výsledkem reakce DNA vyextrahované z linie uvedené nad čarou s forward (F) primerem pro promotor 35S a reverzním (R) primerem *pin5*. Band označený *pin8* je výsledkem reakce DNA vyextrahované z linie uvedené nad čarou s F primerem pro promotor 35S a R primerem *pin8*. M – marker molekulové hmotnosti. (B) Detail kořenové špičky v módu světelné mikroskopie a (C) fluorescenční mikroskopie potvrzující expresi proteinu *PIN8* značeného zeleným fluorescenčním proteinem v nadexprimující linie 35S::*PIN8-GFP*.

4.2 Odvozování buněčných suspenzí

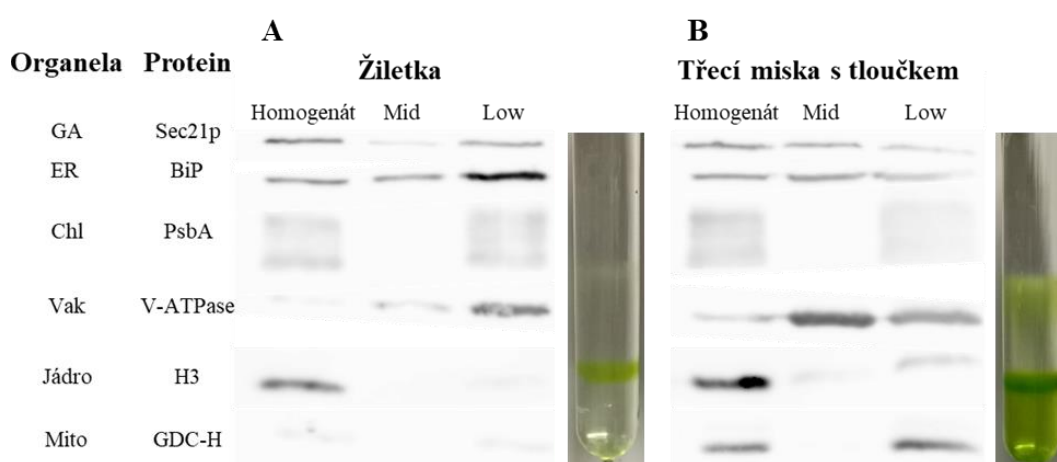
Cílem tohoto experimentu bylo získat buněčné suspenzní kultury *A. thaliana* Col-0 a nadexprimující linie 35S::*PIN8-GFP*. Nejprve byly odvozeny kalusy. Část kalusu byla převáděna do buněčné suspenzní kultury a část byla přenesena na nové pevné MS médium pro pěstování kalusu, čímž byl zajištěn stálý zdroj kalusu a ušetřen čas. Nejprve byly kalusy přenášeny do 100 ml tekutého média v 250 ml Erlenmayerově baňce a umístěny na třepačku při 130 rpm. Z kalusu se během následujícího týdne měly uvolnit buňky a za vzniku suspenzní buněčné kultury se měly samostatně dělit. Došlo však pouze ke zvětšení kalusu v tekutém médiu. Při dalším experimentu byla část nově napěstovaného kalusu přenesena do 25 ml tekutého média 100 ml Erlenmayerovy baňky. Po týdnu na třepačce došlo opět pouze k nárůstu kalusu. Při posledním pokusu o optimalizaci protokolu byla část nově napěstovaného kalusu přenesena do 3 ml média, které bylo napipetováno do jamek v šesti jamkové jednorázové destičce. Kalus byl mírně rozmáčknut pinzetou a deska byla ponechána na třepačce při 130 rpm. Snížený objem média a kultivační nádoby měl vést k častému narážení částí

kalusu do stěn nádoby a k tření mezi menšími kousky kalusu. Nicméně ani tento postup nevedl k získání suspenzní buněčné kultury.

Experiment nebyl úspěšný z důvodu nedostatečného rozbití kalusu, a hlavně četných kontaminací takřka všech dílčích kroků protokolu.

4.3 Izolace ER

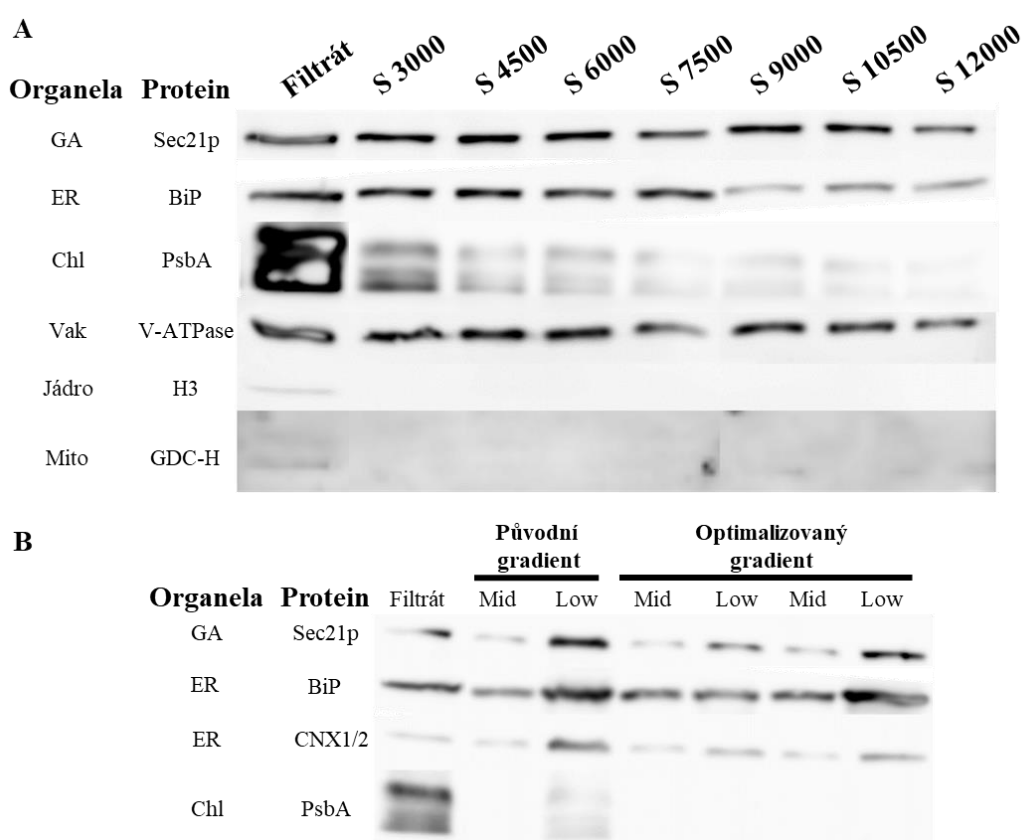
Dalším cílem této diplomové práce bylo izolovat frakci ER s co nevyšší čistotou. Nejprve byla testována efektivita homogenizace žiletkou v porovnání s homogenizací ve třecí misce s krystaly křemene. Pro porovnání výtěžku organel byla provedena izolace ER. Homogenizací ve třecí misce bylo sice uvolněno větší množství organel (Obr. 6 B), než při nasekání materiálu žiletkou (Obr. 6 A), ale následná frakcionace v gradientu neproběhla dle očekávání. V low frakci nebylo ER nabohaceno jako v případě homogenizace žiletkou. Navíc v této frakci byly detekovány další kontaminanty jako mitochondrie a jádra. V obou případech byla v low frakci prokázána přítomnost chloroplastů, vakuol a GA. Imunodetekcí izolovaných frakcí bylo prokázáno, že je vhodnější homogenizace žiletkou (Obr. 6).



Obr. 6: Porovnání efektivity homogenizace 10denních rostlin *A. thaliana*. (A) Imunodetekce vybraných markrových proteinů organel v izolovaných frakcích po homogenizaci žiletkou a (B) ve třecí misce s příslušnými fotografiemi gradientu. GA – Golgiho aparát, ER – endoplazmatické retikulum, Chl – chloroplasty, Vak – vakuola, Mit – mitochondrie.

Z fotografie gradientu (Obr. 6 A) je patrné, že v low frakci se mimo ER zafokusovaly i chloroplasty. Z tohoto důvodu byla dále optimalizována příprava vzorku před nanesením na hustotní gradient. Cílem bylo odstranit komigrující organely s ER již při úvodní centrifugaci. Proto byl proveden set centrifugací při různé odstředivé síle v rozsahu 3000 – 12000 g. Centrifugací při nižší odstředivé síle nebyla pozorována sedimentace ER, ale ve vzorku bylo zároveň obsaženo značné množství chloroplastů (Obr. 7 A). Zvýšením odstředivé síly bylo dosaženo snížení obsahu chloroplastů v supernatantu. Při centrifugační síle 9000 g a výše byl pozorován výrazný pokles signálu ER v supernatantu. Proto byl zvolen kompromis a to centrifugace při 6000 g. Vzorek byl po

první centrifugaci zcela zbaven jader, mitochondrií a značné části chloroplastů, které stále kontaminovaly ER frakci při frakcionaci organel v hustotním gradientu. Jelikož chloroplasty mají vyšší hustotu než ER (Vertommen et al, 2011), bylo otestováno snížení hustoty jednotlivých pater sacharózového gradientu. Touto úpravou gradientu bylo docíleno sedimentace chloroplastů až na dno zkumavky, jak je znázorněno ve schématu v experimentální části (Obr. 4), což mělo za následek eliminace chloroplastů v ER nabohacené frakci (Obr. 7 B). Z předběžných výsledků, bylo patrné, že snížení hustoty pater gradientu vedlo i ke změně migrace vakuol gradientem, které také kontaminovali low frakci (Obr. 7 A). Vakuoly byly více nabohaceny v mid frakci oproti původnímu gradientu (data nejsou ukázána, protože při potvrzování výsledku se vyskytl problém s detekcí vakuol). Snížení hustoty pater gradientu tedy vedlo k získání čistší frakce nabohacené o ER.

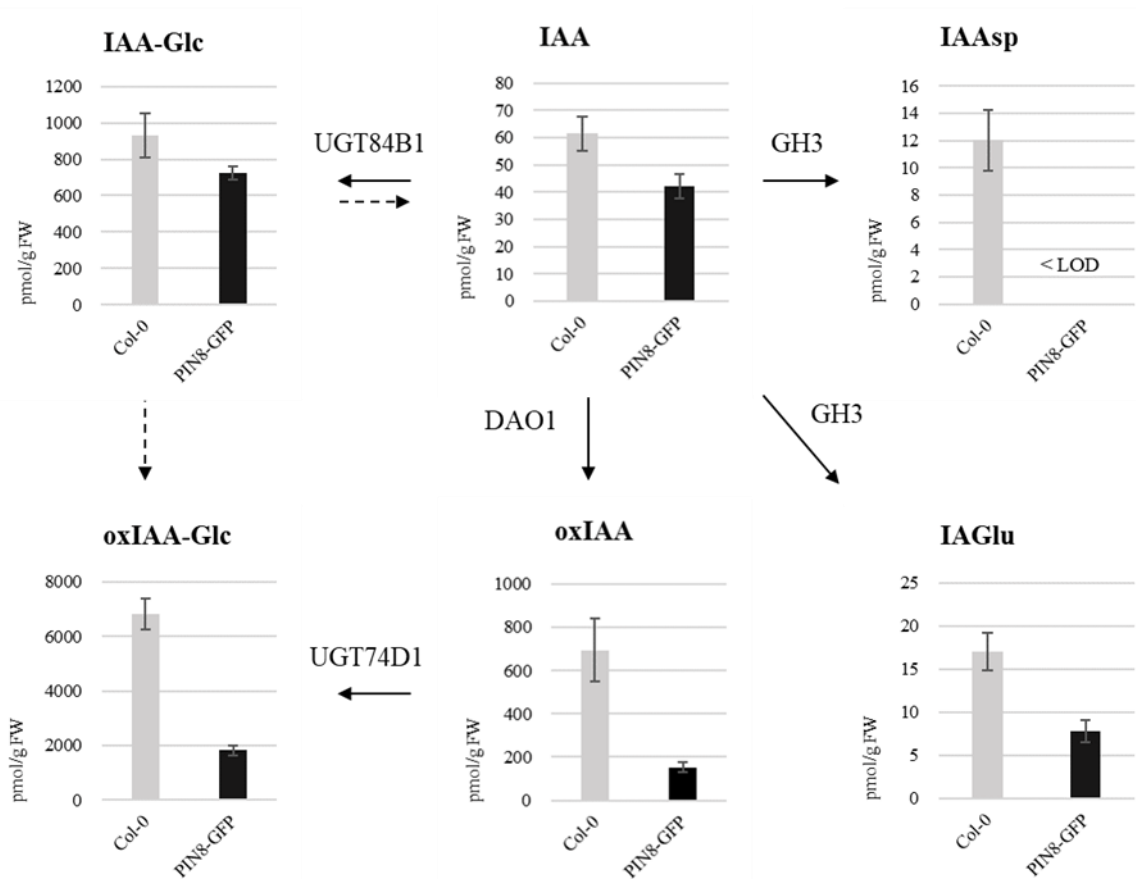


Obr. 7: Optimalizace přípravy vzorku a hustotního gradientu. (A) Imunodetekce vybraných markrových proteinů organel v supernatantech (S) po centrifugaci při různé odstředivé síle (g). (B) Porovnání frakcionace organel v původním a optimalizovaném gradientu.

4.4 Stanovení hladin metabolitů IAA v *A. thaliana* Col-0 a 35S::PIN8-GFP

Auxinové přenašeče lokalizované na membráně ER přispívají ke kontrole intracelulární auxinové homeostáze prostřednictvím regulace toku IAA mezi cytolem a lumen ER (Mravec et al, 2009; Ding et al, 2012; Barbez et al, 2013). V tomto experimentu byly stanoveny hladiny hlavních metabolitů IAA v sedmidenních rostlinách Col-0 a linie 35S::PIN8-GFP. Tato linie nadexprimuje gen kódující protein PIN8, který zprostředkovává transport IAA z ER do cytosolu, čímž ovlivňuje

jak hladinu volné IAA, tak jejích metabolitů (Ding et al, 2012). V porovnání s kontrolními rostlinami byla ve vzorcích 35S::PIN8-GFP zjištěna nižší hladina všech analyzovaných látek včetně volné IAA (Obr. 8). Hladina konjugované formy IAAsp byla v nadexprimující linii pod hranicí detekce.



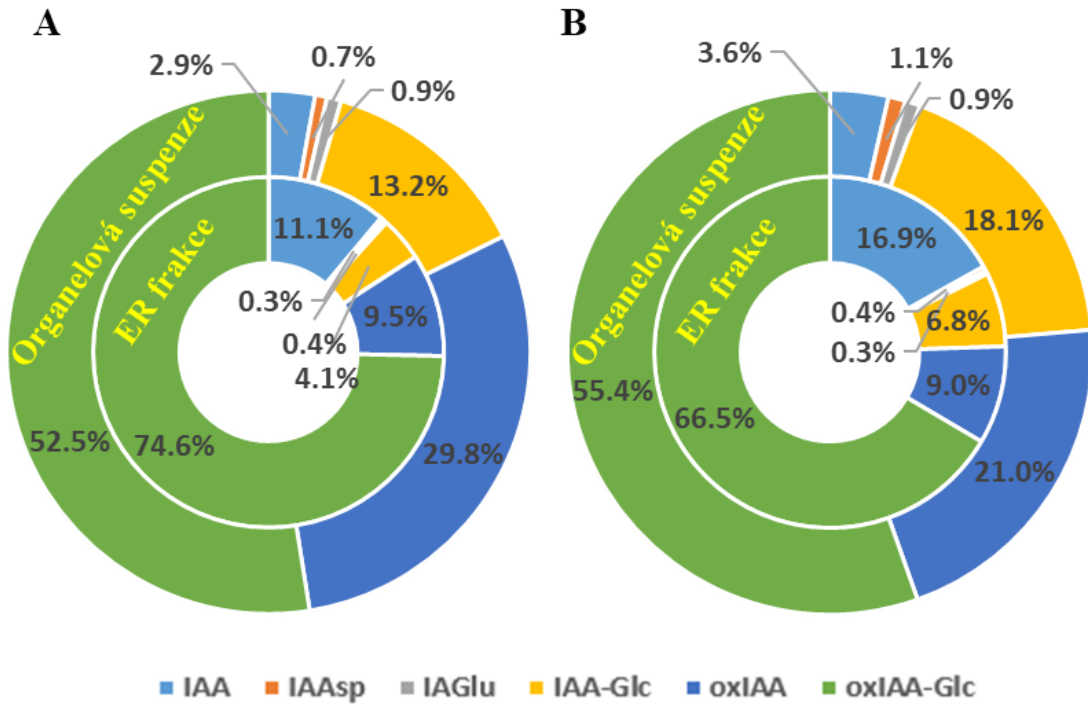
Obr. 8: Hladiny metabolitů IAA v *A. thaliana* Col-0 a linii 35S::PIN8-GFP. Šipky znázorňují směr chemických reakcí s katalyzujícími enzymy. Přerušovaná čára šipky znázorňuje doposud nedostatečně objasněné mechanismy reakce (Průměr \pm SD; $n=5$).

4.5 Metabolický profil IAA v endoplazmatickém retikulu

Optimalizovaný postup izolace ER byl dále využit pro stanovení metabolického profilu IAA v endoplazmatickém retikulu. Cílem bylo stanovit zastoupení metabolitů IAA v nabohacené ER frakci a celkové organelové suspenzi, a také porovnat profily metabolitů získané z rostlinného materiálu *A. thaliana* Col-0 a mutantních rostlin nadexprimujících ER-lokalizované transportéry auxinu PIN5 a PIN8. Linie 35S::PIN5 však nebyla do tohoto experimentu zařazena z důvodu nedostatku semen.

Rozdíl mezi ER frakcí a organelovou suspenzí byl zjištěn v zastoupení volné IAA, kdy v organelové suspenzi její podíl z celkového poolu analyzovaných látek činil v obou liniích pouze okolo 3%, kdežto v ER frakci dosahoval 11% u Col-0 a 17% v případě 35S::PIN8-GFP. Zastoupení většiny metabolitů bylo v ER frakci naopak nižší oproti organelové suspenzi. Podíl

glucosylesteru IAA klesl po nabohacení ER ve vzorku u obou genotypů přibližně na třetinu. Podobně tomu bylo v případě oxIAA, jejíž zastoupení se snížilo u 35S::PIN8-GFP více než o polovinu, u Col-0 dokonce na třetinu. Snížil se také podíl zastoupení obou detekovaných amino-konjugátů IAAsp a IAGlu taktéž u obou genotypů. Ze zjištěných výsledků je patné, že dominantní zastoupení mezi metabolity IAA u obou genotypů má glucosylester oxIAA (oxIAA-Glc), přičemž v jeho případě došlo po nabohacení ER ke zvýšení podílu vůči ostatním metabolitům IAA frakci (Obr. 9).



Obr. 9: Metabolický profil IAA v celkové organelové suspenzi a ER frakci *A. thaliana* Col-0 (A) a linii 35S::PIN8-GFP (B). ER – endoplazmatické retikulum.

5 DISKUZE

Existence tisíců veřejně dostupných transgenních linií *Arabidopsis* poskytuje jedinečnou příležitost k řešení řady důležitých biologických otázek. Nicméně běžným a dlouhodobým problémem výzkumu je kontaminace a nesprávná identifikace používaných linií, která je pracná a časově náročná. Pro ověření správnosti linie se rutinně využívá genotypizace pomocí PCR (Chastukhina et al, 2016). V našem případě byla pomocí genotypizace založené na PCR potvrzena pravost 35S::PIN8-GFP a 35S::PIN5. Pravost double mutantní linie 35S::PIN5/PIN8 prokázána nebyla, protože na výsledném gelu chyběl DNA produkt pro pin5 (Obr. 5 A), avšak z výsledků pozitivní kontroly lze usoudit, že reakce byla nastavena správně. Pro absenci bandu pro pin5 v double mutantní linii existují dvě možné vysvětlení. Je možné, že nadexprimující gen pro pin5 v rostlině není. Druhým možným vysvětlením je, že došlo k pipetovací chybě.

Buněčná kultura je velmi všestranným nástrojem při zkoumání základních vědeckých otázek. Výhodou jejich využití je jejich homogenita, uniformita a reprodukovatelnost vygenerovaných dat, ale je důležité mít na paměti, že se jedná o uměle vytvořený model. Bez ohledu na to, zda jsou kultury určeny pro výzkumnou činnost nebo komerční použití je nutné zabránit jejich mikrobiální kontaminaci, která vede ke zkreslení výsledků experimentu, ztrátě cenných experimentálních dat či znehodnocení kultury (Cassells, 2012). Mykotické a bakteriální kontaminace byly hlavním důvodem, proč bylo v našem případě opuštěno od odvození buněčných suspenzních linií a jejich následného využití při stanovení metabolického profilu v ER. Všechny roztoky a pipetovací špičky byly sterilizovány v autoklávu. Kovové nástroje byly sterilizovány ethanolem a plamenem. Veškerá manipulace s kalusy a nádobami s tekutým médiem probíhala v laminárním boxu, který byl pravděpodobně ve většině případů zdrojem kontaminací. V našem případě nebylo možné vnitřní část boxu sterilizovat UV zářením, nýbrž pouze 70% roztokem ethanolu. Navíc na pracovišti byl k dispozici pouze otevřený, frontální laminární box, který je pro manipulaci s buněčnými kulturami méně vhodný. Minoritním původcem kontaminace byl samotný kalus. Dalším problémem, se kterým jsme se v průběhu odvozování suspenzní buněčné kultury potýkali, byl nerozpadající se kalus. Řešením tohoto problému by mohlo být částečné enzymatické natrávení buněčné stěny pro uvolnění buněk či případně protoplastů s její následnou regenerací. Tato možnost byla ovšem odložena na další etapu výzkumu z důvodu nedostatku času, a hlavně s ohledem na náchylnost ke kontaminacím.

Klíčovou částí této diplomové práce byla optimalizace protokolu pro izolaci ER. Metodika izolace ER byla na pracovišti zavedena, ale biologickým materiálem, ze kterého vycházela, byly právě buněčné kultury, které se většinou pěstují ve tmě, a proto neobsahují chloroplasty. Z důvodu neúspěchu s odvození buněčných kultur z požadovaných linií byly zvoleny jako výchozí biologický materiál desetidenní rostliny *A. thaliana*. To vedlo k vyřešení několika problémů, a to způsobu homogenizace a přítomnosti chloroplastů kontaminujících ER nabohacenou frakci. Pro tento typ materiálu bylo nutné zvolit vhodnou homogenizaci. Vybrány byly dva přístupy – rozetření rostlin ve

třecí misce se zrnky jemného křemene (Keech et al, 2005) s tloučkem, nebo nasekání rostlin žiletkou (Ding et al, 2012). Homogenizace ve třecí misce vykazovala větší výtěžnost organel v homogenátu, ale pro následnou subcelulární frakcionaci v hustotním gradientu se ukázala jako nevhodná. Hlavní důvodem byla přítomnost všech detekovaných organel, které kontaminovaly low frakci (Obr. 6 B). Možným vysvětlením se jeví nadměrná homogenizace rostlinného pletiva a zároveň desintegrace membrán organel, což znemožňuje jejich frakcionaci (Song et al, 2006). Bylo zjištěno, že nasekání materiálu žiletkou je šetrnější a dostatečné. Po následné frakcionaci organel byla low frakce více obohacena o ER než při rozetření a navíc bylo detekováno méně kontaminujících organel (Obr. 6 A).

Chloroplasty zakoncentrované v low frakci stále představovaly významnou kontaminaci. Z tohoto důvodu bylo nutné optimalizovat přípravu vzorku před ultracentrifugací. Byla testována různá intenzita odstředivé síly v rozmezí 3000 – 12000 g. Na základě výsledků imunodetekce byla vybrána rychlost 6000 g. Při těchto otáčkách bylo dosaženo nejlepšího poměru mezi minimálními ztrátami ER a odstranění chloroplastů (Obr. 7 A). Signál dalších proteinových markerů organel naznačuje přítomnost kontaminujících organel jako je GA a vakuol.

Následná izolace ER byla provedena pomocí hustotního gradientu dle protokolu Ding et al, 2012 použitého ke studiu mechanismu transportu auxinů v ER. Bylo potvrzeno, že došlo k nabohacení ER v low frakci čili na rozhraní 1,1/1,3M sacharózy ER jako v původním protokolu. Na druhou stranu bylo také pozorováno významné zakoncentrování zbylých chloroplastů ve stejné frakci jako ER (obdobně jako na Obr. 7 A). Z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno snížení hustoty roztoků tvořící gradient. Záměrem bylo odstranění chloroplastů, které mají vyšší hustotu než ER (Vertommen et al, 2011). Touto změnou bylo dosaženo čistší frakce obohacené o ER, protože chloroplasty byly stočeny až na dno zkumavky. Bohužel se nepodařilo z low frakce odseparovat GA, který má podobné biochemické charakteristiky jako ER a je obtížné je separovat pouze na základě hustoty (Parsons et al, 2012). Optimalizovaný protokol byl následně využit pro metabolické profilování auxinů v ER *A. thaliana* Col-0 a 35S::PIN-GFP.

Hladiny a distribuce aktivní formy IAA jsou přísně kontrolovány syntézou, inaktivací a transportem (Korasick et al, 2013). Inaktivace auxinu probíhá prostřednictvím tvorby konjugátů s aminokyselinami či cukry, nebo oxidativní degradací za vzniku oxIAA (Obr. 8). Nejzastoupenějšími konjugáty IAA s aminokyselinami jsou v *Arabidopsis* IAAsp a IAGlu (Kowalczyk & Sandberg 2001), nejvýznamnějším cukerným esterem je IAA-Glc (Porco et al, 2016). Primární produkt degradace oxIAA může také esterovou vazbou vázat glukózou za vzniku oxIAA-Glc. Tento ester je v *Arabidopsis* nejvíce abundantním metabolitem IAA (Östin et al, 1998; Kai et al, 2007a).

Asymetrická distribuce auxinu v rostlině, která je zásadní pro řadu vývojových procesů, je do značné míry udržována pomocí PAT. Ten je zprostředkován sítí auxinových přenašečů, k nimž se řadí i PIN proteiny (Michniewitz et al, 2007). Ačkoli jsou PIN proteiny lokalizovány primárně na plazmatické membráně, kde zajišťují mezibuněčný tok auxinu, někteří zástupci rodiny PIN proteinů

- PIN5, PIN6 a PIN8 , jakož i příbuzná rodina proteinových přenašečů PIN-LIKES (PILS), jsou lokalizovány na membráně ER. Předpokládá se, že tyto nosiče přispívají ke kontrole auxinové subcelulární homeostázy regulováním toku auxinu mezi cytosolem a ER (Mravec et al, 2009; Barbez et al, 2012; Dal Bosco et al, 2012; Ding et al, 2012). Přes shodnou subcelulární lokalizaci těchto přenašečů se ukázalo, že působí antagonisticky. PIN5 a PILS zajišťují transport auxinu z cytosolu do ER, zatímco PIN8 pracuje v opačném směru (Obr. 3). Tento systém s obousměrným tokem může být důležitý při řízení dostupnosti volného auxinu pro různé buněčné procesy. Kromě toho má významný vliv na metabolismus auxinů. Analytické stanovení auxinových metabolitů ukázalo, že transgenická BY-2 kultura nadměrně exprimující gen *pin5* má sníženou hladinu IAA, zatímco koncentrace konjugátů IAAsp a IAGlu jsou výrazně vyšší oproti kontrolní kultuře (Mravec et al, 2009). Rostliny *Arabidopsis* nadprodukcující gen *pin8* naopak vykazují zvýšenou hladinu IAA a snížené hladiny oxIAA, IAAsp i IAGlu (Ding et al, 2012). Analýzy provedené v rámci této diplomové práce ukázaly, že také další významné metabolity – IAA-Glc a oxIAA-Glc, které v citovaných pracích nebyly stanovovány, dosahují v PIN8-nadprodukcující linii snížených hladin (Obr. 8). V našem případě však analýza neprokázala zvýšenou hladinu IAA v linii 35S::PIN8-GFP.

ER-specifická analýza metabolického profilu IAA ukázala významné rozdíly v relativním zastoupení aktivní IAA a jejích nejdůležitějších metabolitů. V nabohacené ER-frakci, izolované pomocí optimalizované metody s využitím ultracentrifugace v hustotním gradientu, tvořila aktivní IAA daleko vyšší podíl z celkového množství metabolitů, než u nenabohacené organelové suspenze (Obr. 9). Lze předpokládat, že aktivní forma IAA je z ER dále transportována do jádra, kde dochází k percepci auxinového signálu a následnému spuštění signální dráhy. Tento model byl již navržen Middletonem et al. (2018). Relativní zastoupení většiny metabolitů IAA je v ER frakci naopak sníženo. To by mohlo naznačovat, že k tvorbě a akumulaci metabolitů a konjugátů IAA dochází převážně v jiných částech rostlinné buňky než v ER. Analýzou metabolitů IAA ve vakuole bylo například zjištěno, že většina z celkového množství IAA je zde přítomna ve formě glykosylesteru (IAA-Glc), tedy zásobní formy, která je ve vakuole skladována a může být v případě potřeby opět hydrolyzována na aktivní formu auxinu (Ranocha et al, 2013). V relativním zastoupení metabolitů IAA v ER nebyl pozorován významný rozdíl mezi ekotypem Col-0 a linií 35S::PIN8-GFP (Obr. 9).

6 ZÁVĚR

V experimentální části byla nejprve prostřednictvím PCR ověřena identita získaných nadexprimujících linií *A. thaliana* 35S::PIN5 a 35S::PIN8-GFP a u linie 35S::PIN8-GFP byla prokázána funkčnost vložených genů značených GFP prostřednictvím fluorescenční mikroskopii.

Pokusy o odvození buněčných suspenzních linií pro izolaci ER byly z důvodu četných kontaminací a nedostatku času přesunuty do další etapy výzkumu. V návaznosti na tento fakt byla optimalizována metoda izolace ER z klíčnicích rostlin *A. thaliana*. Byla optimalizována metoda homogenizace materiálu i následná frakcionace, čímž bylo dosaženo vyšší čistoty ER nabohacené frakce ER.

V následujícím experimentu byl stanoven metabolický profil IAA v sedmidenních rostlinách *A. thaliana* Col-0 a nadexprimující linii 35S::PIN8-GFP. Bylo zjištěno, že rostliny nadměrně prodující přenašeč PIN8 mají v porovnání s Col-0 snížené hladiny všech metabolitů i aktivní formy IAA.

Optimalizovaný protokol byl použit k izolaci ER, v němž byl následně pomocí HPLC-MS/MS stanoven metabolický profil IAA. Relativní zastoupení volné IAA a jejích metabolitů bylo porovnáváno v celkové organelové suspenzi a z ní získané frakci nabohacené o ER, připravené z *Arabidopsis* Col-0 a linie 35S::PIN8-GFP. Získané výsledky povedou k hlubšímu porozumění mechanismů regulace auxinové homeostáze na subcelulární úrovni.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abas, L. & Lushing, C. (2010). Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation. *Analytical Biochemistry*, **401(2)**, 217-227.
- Absalan, G., Akhond, M., Sheikian, L. (2008). Extraction and high performance liquid chromatographic determination of 3-indole butyric acid in pea plants by using imidazolium-based ionic liquids as extractant. *Talanta*, *77(1)*, 407-411.
- Alberts, B., Johnson, A. D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell (Sixth Edition)*. Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Anderson, D. M., George, R., Noyes, M. B., Rowton, M., Liu, W., Jiang, R., Wolfe, S. A., Wilson-Rawls, J., & Rawls, A. (2012). Characterization of the DNA-binding properties of the Mohawk homeobox transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*, **287(42)**, 35351–35359.
- Armengot, L., Marqués-Bueno, M. M., Jaillais, Y. (2016). Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinase. *Journal of Experimental Biology*, **67(14)**, 4015-4037.
- Arrivault, S., Guenther, M., Florian, A., Encke, B., Feil, R., Vosloh, D., Lunn, J. E., Sulpice, R., Fernie, A. R., Stitt, M., Schulze, W. X. (2014). Dissecting the subcellular compartmentation of proteins and metabolites in arabidopsis leaves using non-aqueous fractionation. *Molecular & Cellular Proteomics*, **13(9)**, 2246–2259.
- Bandurski, R. S., Ueda, M., Nicholls, P. B. (1969). Esters of indole-3-acetic acid and myo-inositol. *Annals of New York Academy of Science*, **165**, 655–667.
- Barbez, E. & Kleine-Vehn, J. (2013). Divide Et Impera—cellular auxin compartmentalization. *Current Opinion in Plant Biology*, **16(1)**, 78-84.
- Barbez, E., Kubeš, M., Rolčík, J., Bézait C., Pěňčík, A., Wang, B., Rosquete, M. R., Zhu, J., Dobrev, P. I. Lee, Y., Zažámalová, E., Petrášek, J., Geisler, M., Friml, J., Kleine-Vehn, J. (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, **485**, 119–122.
- Barbez, E., Laňková, M., Pařezová, M., Maizel, A., Zažámalová, E., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J. (2013). Single-cell-based system to monitor carrier driven cellular auxin homeostasis. *BMC plant biology*, **13**, 20.
- Bardy, N., Carrasco, A., Galaud, J.P., Pont-Lezica, R., Canut, H. (1998). Free-flow electrophoresis for fractionation of Arabidopsis membranes. *Electrophoresis*, **19**, 1145–1153.

- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Pantoja, O. (2013). Growing Arabidopsis In Vitro: Cell Suspensions, In Vitro Culture, and Regeneration. *Methods in Molecular Biology Arabidopsis Protocols*, **1062**, 53-62.
- Bartel, B. & Fink, G. R. (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, **268(5218)**, 1745-1748.
- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, **27(1)**, 4–25.
- Benjamins, R. & Scheres, B. (2008). Auxin: The Looping Star in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 443-465.
- Bennett, T., Brockington, S. F., Rothfels, C., Graham, S. W., Stevenson, D., Kutchan, T., Rolf, M., Thomas, P., Wong, G. K., Leyser, O., Glover, B. J., Harrison, C. J. (2014). Paralogous radiations of PIN proteins with multiple origins of noncanonical PIN structure. *Molecular Biology and Evolution*, **31(8)**, 2042–2060.
- Bertoša, B., Kojić-Prodić, B., Wade, R. C., Tomić, S. (2008). Mechanism of auxin interaction with Auxin Binding Protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study. *Biophysical Journal*, **94(1)**, 27–37.
- Béziat, C., Barbez, E., Feraru, M. I., Lucyshyn, D., Kleine-Vehn, J. (2017). Light triggers PILS-dependent reduction in nuclear auxin signalling for growth transition. *Nature Plants*, **3**, 17105.
- Brumos, J., Alonso, J. M., Stepanova, A. N. (2013). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum*, **151(1)**, 3-12.
- Campanella, J. J., Ludwig-Mueller, J., Town, C. D. (1996). Isolation and characterization of mutants of Arabidopsis thaliana with increased resistance to growth inhibition by indoleacetic acid-amino acid conjugates. *Plant Physiology*, **112**, 735–745.
- Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., Cheng, J. (2019). The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **20(24)**, 6343.
- Cassells, A. C. (2012). Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: Phytopathogens, Vitro Pathogens, and Vitro Pests. *Methods in Molecular Biology*, **887**, 57–80.
- Chastukhina, I. B., Nigmatullina, L. R., Valeeva, L. R., & Shakirov, E. V. (2016). Selection of efficient Taq DNA polymerase to optimize T-DNA genotyping method for rapid detection of mutant Arabidopsis thaliana plants. *BioNanoScience*, **6(4)**, 407–410.
- Chen, Q., Westfall, C. S., Hicks, L. M., Wang, S., Jez, J. M. (2010). Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, **285(39)**, 29780–29786.

- Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T., Masson, P. T. (1998). The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95(25)**, 15112-15117.
- Chen, X., Grandont, L., Li, H., Hauschild, R., Paque, S., Abuzeineh, A., Rakusová, H., Benková, E., Perrot-Rechenmann, C., Friml, J. (2014). Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature*, **516(7529)**, 90-93.
- Chen, Y. F., Randlett, M. D., Findell, J. L., Schaller, G. E. (2002). Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, **277(22)**, 19861-19866.
- Chiwocha, S. D., Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Cutler, A. J., Loewen, M., Ross, A. R., Kermodé, A. R. (2003). A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *The Plant Journal*, **35**, 405–417.
- Cho, M. & Cho, H. (2012). The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signaling & Behavior*, **8**, e22990.
- Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, **3(2)**, 156–160.
- Dal Bosco, C., Dovzhenko A., Liu, X., Woerner, N., Rensch, T., Eismann, M., Eimer, S., Hegermann, J., Popov, I. A., Ruperti, B., Heberle-Bors, E., Touraev, A., Cohen, J. D., Palme, K. (2012). The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis, *The Plant Journal*, **71(5)**, 860-870.
- Dashek, W. V. & Miglani, G. S. (2016). *Plant cells and their organelles*. Chichester, West Sussex: Willey Blackwell.
- De Araujo, M. E., Huber, L. A., Stasyk, T. (2008). Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation. *Methods in Molecular Biology*, **424**, 317-331.
- De Smet, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Remans, T. (2015). Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in *Arabidopsis thaliana*: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, **16(8)**, 19195–19224.
- Di Mambro, R., Svolacchia, N., Ioio, R. D., Pierdonati, E., Salvi, E., Pedrazzini, E., Vitale, A., Perilli, S., Sozzani, R., Benfey, P. N., Busch, W., Costantino, P., Sabatini, S. (2019) The Lateral Root Cap Acts as an Auxin Sink that Controls Meristem Size. *Current Biology*, **29(7)**, 1199-1205.

- Dindas, J., Scherzer, S., Roelfsema, M. R. G., von Meyer, K., Müller, H. M., Al-Rashied, K. A. S., Palme, K., Dietrich, P., Becker, D., Bennett, M. J., Hedrich, R. (2018). AUX1-mediated root hair auxin influx governs SCF^{TIR1/AFB}-type Ca²⁺ signaling. *Nature Communications*, **9**(1), 1174.
- Ding, Z., Wang, B., Moreno, I., Dupláková, N., Simon, S., Carraro, N., Reemmer, J., Pěňčík, A., Chen, X., Tejos, R., Skůpa, P., Pollmann, S., Mravec, J., Petrášek J., Zažímalová, E., Honys, D., Rolčík, J., Murphy, A., Orellana, A., Geisler, M., Friml, J. (2012). ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis. *Nature Communications*, **3**, 941.
- Ditengou, F. A., Gomes, D., Nziengui, H., Kochersperger, P., Lasok, H., Medeiros, V., Paponov, I. A., Nagy, S. K., Náđai, T. V., Mészáros, T., Barnabás, B., Ditengou, B. I., Rapp, K., Qi, L., Li, Q., Becker, C., Li. C., Dóczy, R., Palme, K. (2018). Characterization of auxin transporter PIN6 plasma membrane targeting reveals a function for PIN6 in plant bolting. *New Phytologist*, **217**(4), 1610-1624.
- Dobrev, P., Havlíček, L., Vágner, M., Malbeck, J., Kamínek, M. (2005). Purification and Determination of Plant Hormones Auxin and Abscisic Acid Using Solid Phase Extraction and two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **1075**, 159–166.
- Doran, P. M. (2013). Therapeutically important proteins from in vitro plant tissue culture systems. *Current Medical Chemistry*, **20**, 1047–1055.
- Du, H., Wu, N., Fu, J., Wang, S., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2012). A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, **63**(18), 6467–6480.
- Edison, A. S., Hall, R. D., Junot, C., Karp, P. D., Kurland, I. J., Mistrik, R., Reed, L. K., Saito, K., Salek, R. M., Steinbeck, C., Sumner, L. W., Viant, M. R. (2016). The Time Is Right to Focus on Model Organism Metabolomes. *Metabolites*, **6**(1), 8.
- English, A. R. & Voeltz, G. K. (2013). Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(4), a013227.
- Eslami, A. & Lujan, J. (2010). Western blotting: sample preparation to detection. *Journal of Visualized Experiments*, **(44)**, 2359.
- Eubel, H., Lee, C. P., Kuo, J., Meyer, E., Taylor, N. L., Millar, A. H. (2007). TECHNICAL ADVANCE: Free-flow electrophoresis for purification of plant mitochondria by surface charge. *The Plant Journal*, **52**(3), 583-594.

- Fendrych, M., Akhmanova, M., Merrin, J., Glanc, M., Hagihara, S., Takahashi, K., Uchida, N., Torii, K. U., Friml, J. (2018). Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signalling. *Nature Plants*, **4(7)**, 453-459.
- Feng, M., & Kim, J. Y. (2015). Revisiting Apoplastic Auxin Signaling Mediated by AUXIN BINDING PROTEIN 1. *Molecules and Cells*, **38(10)**, 829–835.
- Feraru, E., Feraru, M. I., Barbez, E., Waidmann, S., Sun, L., Gaidora, A., Kleine-Vehn, J. (2019). PILS6 is a temperature-sensitive regulator of nuclear auxin input and organ growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116(9)**, 3893–3898.
- Feraru, E., Vosolsobě, S., Feraru, M. I., Petrášek, J., Kleine-Vehn, J. (2012). Evolution and structural diversification of PILS putative auxin carriers in plants. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 227.
- Fu, J., & Wang, S. (2011). Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, **2**, 74.
- Fu, X., Shi, Z., Jiang, Y., Jiang, L., Qi, M., Xu, T., Li, T. (2019). A family of auxin conjugate hydrolases from *Solanum lycopersicum* and analysis of their roles in flower pedicel abscission. *BMC Plant Biology*, **19**, 223.
- Gabriely, G., Kama, R., Gerst, J. E. (2007). Involvement of specific COPI subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, **27(2)**, 526-540.
- Ganguly, A., Lee, S. H., Cho, M., Lee, O. R., Yoo, H., Cho, H.-T. (2010). Differential auxin-transporting activities of PIN-FORMED proteins in *Arabidopsis* root hair cells. *Plant Physiology*, **153**, 1046–1061.
- Gao, S., Fang, J., Xu, F., Wang, W., Sun, X., Chu, J., Cai, B., Feng, Y., & Chu, C. (2014). CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE4 Integrates Cytokinin and Auxin Signaling to Control Rice Crown Root Formation. *Plant Physiology*, **165(3)**, 1035–1046.
- 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**, 2275-2280.
- Ghaste, M., Mistrik, R., & Shulaev, V. (2016). Applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) and Orbitrap Based High Resolution Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics. *International Journal of Molecular Sciences*, **17(6)**, 816.
- Gupta, V., Kumar, M., Brahmabhatt, H., Reddy, C. R. K., Seth, A., Jha, B. (2011). Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid–liquid microextraction method. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49(11)**, 1259-1263.

- Hanton, S. L., Matheson, L. A., Chatre, L., Brandizzi, F. (2009). Dynamic organization of COPII coat proteins at endoplasmic reticulum export sites in plant cells. *The Plant Journal*, **57(6)**, 963-974.
- Hayashi, K. (2012). The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiology*, **53(6)**, 965-975.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany*, **68**, 14–25.
- Hawes, C., Kiviniemi, P., & Kriechbaumer, V. (2015). The endoplasmic reticulum: A dynamic and well-connected organelle. *Journal of Integrative Plant Biology*, **57(1)**, 50–62.
- Hu, J., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R.T., Reumann, S., Zolman, B. K. (2012). Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. *The Plant Cell*, **24(6)** 2279-2303.
- Huang, S. & Wang, Y. (2017). Golgi structure formation, function, and post-translational modifications in mammalian cells. *F1000Research*, **6**, 2050.
- Islinger, M., Wildgruber, R., Völkl, A. (2018) Preparative free-flow electrophoresis, a versatile technology complementing gradient centrifugation in the isolation of highly purified cell organelles. *Electrophoresis*, **39(18)**, 2288-2299.
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record*, **295(3)**, 369–371.
- Jensen, P. E. & Leister, D. (2014) Chloroplast evolution, structure and function. *F1000Prime Reports*, **6(40)**, 2279-2303.
- Jones, A. M. (1994). Auxin-Binding Proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **45**, 393-420.
- Kai, K., Horita, J., Wakasa, K., Miyagawa, H. (2007a). Three oxidative metabolites of indol-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry*, **68**, 1651-1663.
- Kao, Y.T., Gonzales, K. L., Bartel, B. (2018). Peroxisome Function, Biogenesis, and Dynamics in Plants. *Plant Physiology*, **176(1)**, 162-178.
- Kato, H., Nishihama, R., Weijers, D., Kohchi, T. (2017). Evolution of nuclear auxin signaling: lessons from genetic studies with basal land plants. *Journal of Experimental Botany*, **69(2)**, 291-301.
- Keech, O., Dizengremel, P., Gardenström, P. (2005). Preparation of mitochondria from *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **124(4)**, 403-409.
- Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology*, **154(2)**, 483–486.
- Korasick, D. A., Enders, T. A., Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, **64(9)**, 2541–2555.

- Kowalczyk, M. & Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **127**, 1845–1853.
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, **4**, e06100.
- Kriechbaumer, V., Seo, H., Park, H.S., Hawes, Ch. (2015). Endoplasmic reticulum localization and activity of maize auxin biosynthetic enzymes. *Journal of Experimental Botany*, **66(19)**, 6009-6020.
- Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., Scofield, R. H. (2011). An overview of, Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, **717**, 55–67.
- LeClere S., Tellez R., Rampey R. A., Matsuda S. P., Bartel B. (2002). Characterization of a family of IAA- amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 20446–20452.
- Lee, H., Ganguly, A., Lee, R. D., Park, M., Cho, H. T. (2020). Intracellularly Localized PIN-FORMED8 Promotes Lateral Root Emergence in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 1808.
- Lee, Y. H., Tan, H. T., Chung M. C. M. (2010). Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *Proteomics*, **10(22)**, 3935-3956.
- Lindquist, E. & Aronsson, H. (2018). Chloroplast vesicle transport. *Photosynthesis Research*, **138(3)**, 361-371.
- Liu, H. T., Li, Y-F., Luan, T. G., Lan, C. Y., Shu, W. S. (2007). Simultaneous Determination of Phytohormones in Plant Extracts Using SPME and HPLC. *Chromatographia.*, **66**, 515–520.
- Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V., Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*, **5(1)**, 17319.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, **140**, 943-950.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, Ch. A., Amon, A., Ploegh, H., Bretscher, A., Krieger, M., Martin, K. C. (2016). *Molecular Cell Biology* (8th edition), Macmillan Education.
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1757-1773.

- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P., Fink, G. R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, **12(14)**, 2175-2187.
- Mahmood, T. & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, **4(9)**, 429–434.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., Kasahara, H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 18512-18517.
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Ljung, K. (2019). Epigenetic Regulation of Auxin Homeostasis. *Biomolecules*, **9(10)**, 623.
- Mei, Y., Thompson, M. D., Cohen, R. A., Tong, X. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress and Related Pathological Processes. *Journal of Pharmacological & Biomedical Analysis*, **1(2)**, 1000107.
- Meier, I., Richards, E. J., Evans, D. E. (2017). Cell biology of the plant nucleus. *Annual Review of Plant Biology*, **68**, 139–172.
- Michniewicz, M., Zago, M. K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, I., Heisler, M. G., Ohno, C., Zhang, J., Huang, F., Schwab, R., Weigel, D., Meyerowitz, E. M., Luschnig, C., Offringa, R., Friml, J. (2007). Antagonistic Regulation of PIN Phosphorylation by PP2A and PINOID Directs Auxin Flux. *Cell*, **130**, 1044-1056.
- Middleton, A. M., Bosco, C. D., Chlap, P., Bensch, R., Harz, H., Ren, F., Bergmann, S., Wend, S., Weber, W., Hayashi, K. I., Zurbriggen, M. D., Uhl, R., Ronneberger, O., Palme, K., Fleck, C., Dovzhenko, A. (2018). Data-Driven Modeling of Intracellular Auxin Fluxes Indicates a Dominant Role of the ER in Controlling Nuclear Auxin Uptake. *Cell Reports*, **22(11)**, 3044-3057.
- Mittal, R. D. (2015). Tandem mass spectroscopy in diagnosis and clinical research. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **30(2)**, 121–123.
- Morley, S. A. & Nielsen, B. L. (2017). Plant mitochondrial DNA. *Frontiers in Bioscience*. **22(6)**, 1023-1032.
- Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y. D., Dobrev, P. I., Schwarzerová, K., Rolčík, J., Seifertová, D., Luschnig, Ch., Benková, E., Zažímalová E., Geisler, M., Friml, J. (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, **459**, 1136-1140.

- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *The EMBO Journal*, **17(23)**, 6903-6911.
- Nagata, T., Nemoto Y., Hasezawa, S. (1992). Tobacco By-2 cell-line as the HeLa-cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology*, **132**, 1–30.
- Nonhebel H. M. (2015). Tryptophan-Independent Indole-3-Acetic Acid Synthesis: Critical Evaluation of the Evidence. *Plant Physiology*, **169(2)**, 1001–1005.
- Normanly, J., Cohen, J. D., Fink, G. R. (1993). Arabidopsis thaliana auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**, 10355-10359.
- Novák, O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T., & Ljung, K. (2012). Tissue-specific profiling of the Arabidopsis thaliana auxin metabolome. *The Plant Journal*, **72**, 523-536.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J., Shimura, Y. (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *Plant Cell*, **3(7)**, 677-684.
- Ornstein, L. (1964). DISC ELECTROPHORESIS. I. BACKGROUND AND THEORY. *Annals of New York Academy of Science*, **121**, 321-349.
- Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R. P., Sandberg, G. (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant physiology*, **118(1)**, 285–296.
- Palme, K., Hesse, T., Campos, N., Garbers, C., Yanofsky, M. F., Schell, J. (1992). Molecular analysis of an auxin binding protein gene located on chromosome 4 of Arabidopsis. *The Plant Cell*, **4(2)**, 193–201.
- Pan, P., Woehl, E., Dunn, M. F. (1997). Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends in Biochemical Sciences*, **22(1)**, 22–27.
- Parsons, H. T., Christiansen, K., Knierim, B., Carroll, A., Ito, J., Batth, T. S., Smith-Moritz, A. M., Morrison, S., McInerney, P., Hadi, M. Z., Auer, M., Mukhopadhyay, A., Petzold, C. J., Scheller, H. V., Loqué, D., Heazlewood, J. L. (2012). Isolation and proteomic characterization of the Arabidopsis Golgi defines functional and novel components involved in plant cell wall biosynthesis. *Plant Physiology*, **159(1)**, 12–26.
- Parsons, H. T., Gonzales, S., Heazlewood, J. L. (2014). Separation of the Plant Golgi Apparatus and Endoplasmic Reticulum by Free-Flow Electrophoresis. *Plant Proteomic: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Science and Business Media, **1072**, 527-53.
- Pavelka, M. & Robinson, D. G. (2003). The Golgi Apparatus in Mammalian and Higher Plants Cells: A Comparison. *Annual Plant Reviews Online*, **9**, 17-38.

- Pereira, C., Pereira, S., Pissarra, J. (2014). Delivering of Proteins to the Plant Vacuole--An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, **15(5)**, 7611–7623.
- Peret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., James, N., Casimiro, I., Perry, P., Syed, A., Yang, H., Reemmer, J., Venison, E., Howells, C., Perez-Amador, M. A., Yun, J., Alonso, J., Beemster, G. T., Laplaze, L., Murphy, A., Bennett, M. J., Nielsen, E., Swarup, R. (2012). AUX/LAX Genes Encode a Family of Auxin Influx Transporters That Perform Distinct Functions during Arabidopsis Development. *The Plant Cell*, **24**, 2874-2885.
- Petrášek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee J. J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubeš, M., Covanová, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benková, E., Perry, L., Křeček, P., Lee, O. R., Fink, G. R., Geisler, M., Murphy, A. S., Luschnig, C., Zažímalová, E., Friml, J. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, **12(5775)**, 914-918.
- Pěňčík, A., Casanova-Sáez, R., Pilarová, V., Žukauskaite, A., Pinto, R., Micol, J. L., Ljung, K., Novák, O. (2018). Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **69(10)**, 2569–2579.
- Pěňčík, A., Simonovik, B., Petersson, S. V., Henyková, E., Simon, S., Greenham, K., Zhang, Y., Kowalczyk, M., Estelle, M., Zažímalová, E., Novák, O., Sandberg, G., Ljung, K. (2013). Regulation of Auxin Homeostasis and Gradients in Arabidopsis Roots through the Formation of the Indole-3-Acetic Acid Catabolite 2-Oxindole-3-Acetic Acid. *The Plant Cell*, **25(10)**, 3858-3870.
- Pollmann, S., Muller, A., Piotrowski, M., Weiler, E. W. (2002). Occurrence and formation of indole-3-acetamide in Arabidopsis thaliana, *Planta*, **216**, 155–161.
- Porco, S., Pěňčík, A., Rashed, A., Voß, U., Casanova-Sáez, R., Bishopp, A., Golebiowska, A., Bhosale, R., Swarup, K., Peňáková, P., Novák, O., Staswick, P., Hedden, P., Phillips, A. L., Vissenverg, K., Bennett, M. J., Ljung, K. (2016). Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 11016-11021.
- Porfírio, S., Gomes da Silva, M. D. R., Peixe, A., Cabrita, M. J., Azadim P. (2010). Current analytical methods for plant auxin quantification – A review. *Analytica Chimica Acta*, **902**, 8-21.
- Porobić, I., Kontrec, D., Šoškić, M. (2013). Molecular Recognition of Indole Derivatives by Polymers Imprinted With Indole-3-Acetic Acid: A QSPR Study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**, 653–659.
- Ranocha, P., Dima, O., Nagy, R., Felten, J., Corratgé-Faillie, C., Novák, O., Morreel, K., Lacombe, B., Martinez, Y., Pfrunder, S., Jin, X., Renou, J. P., Thibaud, J. B., Ljung, K., Fischer, U.,

- Martinoia, E., Boerjan, W., & Goffner, D. (2013). Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nature Communications*, **4**, 2625.
- Rosquete, M. R., Davis, D. J., Drakakaki, G. (2017). The Plant Trans-Golgi Network: Not Just a Matter of Distraction. *Plant Physiology*, **176**(1), 187-198.
- Sanchez Carranza, A. P., Singh, A., Steinberger, K., Panigrahi, K., Palme, K., Dovzhenko, A., Dal Bosco, C. (2016). Hydrolases of the ILR1-like family of Arabidopsis thaliana modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Scientific Reports*, **6**, 24212.
- Sánchez-García, A. B., Ibáñez, S., Cano, A., Acosta, M., Pérez-Pérez, J. M. (2018). A comprehensive phylogeny of auxin homeostasis genes involved in adventitious root formation in carnation stem cuttings. *PLoS One*, **13**(4), e0196663.
- Schwarz, D. S. & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, functional and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **73**(1), 79-94.
- Schwarzländer, M. & Finkemeier, I. (2013). Mitochondrial Energy and Redox Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**(16), 2122-2144.
- Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., Selvaganapathy, P. R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel)*, **8**(3), 83.
- Shibata, Y., Voeltz, G. K., Rapoport, T. A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, **126**, 435-439.
- Simon, S., Skůpa P., Viaene, T., Zwiewka, M., Tejos, R., Klíma, P., Čarná, M., Rolčík, J., De Rycke, R., Moreno, I., Dobrev, P. I., Orellana, A., Zažímalová, E., Friml, J. (2016). PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in Arabidopsis. *New Phytologist*, **211**, 65–74.
- Sivasubramanian, R., Mukhi, N., Kaur, J. (2015). Arabidopsis thaliana: A Model for Plant Research. *Plant Biology and Biotechnology*, **2**, 1–26.
- Skalický, V., Kubeš, M., Napier, R., Novák, O. (2018). Auxin and Cytokinins – The Role of Subcellular Organization on Homeostasis. *International Journal of Molecular Science*, **19**(10), 3115.
- Song, Y., Hao, Y., Sun, A., Li, T., Li, W., Guo, L., Yan, Y., Geng, C., Chen, N., Zhong, F., Wei, H., Jiang, Y., He, F. (2006). Sample preparation protocol for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics*, **6**, 5269-5277.
- Spang, A. (2013). Retrograde traffic from the Golgi to the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(6), a013391.

- Stepanova, A. N., Yun, J., Robles, L. M., Novak, O., He, W., Guo, H., Ljung, K., Alonso, J. M. (2011). The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase Functions in the Indole-3-Pyruvic Acid Branch of Auxin Biosynthesis. *The Plant Cell*, **23**, 3961-3973.
- Stuepp, C. A., Wendling, I., Trueman, S. J., Koehler, H. S., Zuffellato-Ribas, K. C. (2017). The Use of Auxin Quantification for Understanding Clonal Tree Propagation. *Forests*, **8**, 27.
- Su, Y., Luo, W., Chen, X., Liu, H., Hu, Y., Lin, W., Xiao, L. (2017). Auxin Extraction and Purification Based on Recombinant Aux/IAA Proteins. *Biological Procedures Online*, **19**, 1.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., Kasahara, H. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106(13)**, 5430-5435.
- Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., Doležal, K. (2012). A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods*, **8**, 17.
- Szul, T. & Sztul, E. (2011). COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)*, **26(5)**, 348-364.
- Tam, Y. Y., Epstein, E., Normanly, J. (2000). Characterization of Auxin Conjugates in Arabidopsis. Low Steady-State Levels of Indole-3-Acetyl-Aspartate, Indole-3-Acetyl-Glutamate, and Indole-3-Acetyl-Glucose. *Plant Physiology*, **123**, 589-596.
- Tan, X., Li, K., Wang, Z., Zhu, K., Tan, X., Cao, J. (2019). A Review of Plant Vacuoles: Formation, Located Proteins, and Functions. *Plants (Basel)*, **8(9)**, 327
- Tarkowská, D., Novák, O., Floková, K., Tarkowski, P., Turečková, V., Grúz, J., Rolčík, J., Strnad, M. (2014). Quo vadis plant hormone analysis? *Planta*, **240**, 55–76.
- Taylor, N. L. (2018). Editorial for Special Issue „Plant Mitochondria“. *International Journal of Molecular Sciences*, **19(12)**, 3849.
- Tivendale, N. D., Davies, N. W., Molesworth, P. P., Davidson, S. E., Smith, J. A., Lowe, E. K., Reid, J. B. Ross, J. J. (2010). Reassessing the Role of N-Hydroxytryptamine in Auxin Biosynthesis. *Plant Physiology*, **154**, 1957-1965.
- Tromas, A., Paque, S., Stierlé, V., Quettier, A. L., Muller, P., Lechner, E., Genschik, P., Perrot-Rechenmann, C. (2013). Auxin-Binding Protein 1 is a negative regulator of the SCF^{TIR1/AFB} pathway. *Nature Communications*, **4**, 2496.
- Tzin, V. & Galili, G. (2010). The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis Book*, **8**, e0132.

- Utsuno, K., Shikanai, T., Yamada, Y., Hashimoto, T. (1998). Agr, an Agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant and Cell Physiology*, **39**(10), 1111-1118.
- Verma, V., Ravindran, P., Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, **16**, 86.
- Vertommen, A., Panis, B., Swennen, R., Carpentier, S. C. (2011). Challenges and solutions for the identification of membrane proteins in non-model plants, *Journal of Proteomics*, **74**(8), 1165-1181.
- 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*, **112**, 4821-4826.
- Woo, E. J., Marshall, J., Bauly, J., Chen, J. G., Venis, M., Napier, R. M., Pickersgill, R. W. (2002). Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *The EMBO Journal*, **21**(12), 2877-2885.
- Wright, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Reed, J., Kramer, C., Chang, Y., Novitzky, R., Wang, H., Artim-Moore, L. (2001). Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Reports*, **20**, 42-436.
- Wu, Y. & Hu, B. (2009). Simultaneous Determination of Several Phytohormones in Natural Coconut Juice by Hollow Fiber-Based Liquid-Liquid-Liquid Microextraction-High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **1216**, 7657-7663.
- Wulfetange, K., Lomin, S. N., Romanov, G. A., Stolz, A., Heyl, A., Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, **156**(4), 1808-1818.
- Xu, J., & Zhang, N. (2014). On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect. *Pharmaceutical Bioprocessing*, **2**(6), 499-518.
- Zeng, Y., Shen, J., Li, B., & Jiang, L. (2018). Hormone modulates protein dynamics to regulate plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**(14), 3521-3523.
- Zhang, C., Barthelson, R.A., Lambert, G.M. and Galbraith, D.W. (2008) Global characterization of cell-specific gene expression through fluorescence-activated sorting of nuclei. *Plant Physiology*, **147**, 30-40.
- Zhao, Y. (2001). A Role for Flavin Monooxygenase-Like Enzymes in Auxin Biosynthesis. *Science*, **291**, 306-309.

- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 49–64.
- Zhao, Y., Hull, A. K., Gupta, N. R., Goss, K. A., Alonso, J., Ecker, J. R., Normanly, J., Chory, J., Celenza, J. L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development*, **16**, 3100–3112.
- Zheng, Z., Guo, Y., Novák, O., Dai, X., Zhao, Y., Ljung, K., Noel, J. P., Chory, J. (2013). Coordination of auxin and ethylene biosynthesis by the aminotransferase VAS1. *Nature Chemical Biology*, **9(4)**, 244–246.
- Zhou, J. J. & Luo, J. (2018). The PIN-FORMED Auxin Efflux Carriers in Plants. *International Journal of Molecular Science*, **19(9)**, 2759.
- Zhu, L., Zhang, Y. H., Su, F., Chen, L., Huang, T., Cai, Y. D. (2016). A Shortest-Path-Based Method for the Analysis and Prediction of Fruit-Related Genes in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, **11(7)**, e0159519.