

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav molekulární biologie a radiobiologie



Jak rostlinám chutná proteinová strava
Bakalářská práce

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

Vypracovala:
Veronika Zronková

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „**Jak rostlinám chutná proteinová strava**“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych chtěla poděkovat všem, kteří mi byli nápomocní jakýmkoliv způsobem při vypracování mé bakalářské práce, zejména mému vedoucímu Mgr. Martinu Černému, Ph.D. za velkou trpělivost, cenné rady a vstřícnost. Dále bych také chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu molekulární biologie a radiobiologie Mendelovy univerzity v Brně za jejich rady a ochotu.

ABSTRAKT

Dusík je jedním z nejvíce zastoupených prvků v živých organismech. Na rozdíl od ostatních klíčových prvků je jeho anorganický zdroj omezen, a z tohoto důvodu musí být co nejvíce zásob dusíku recyklováno z dusíkatých sloučenin (včetně proteinů), které byly využity jinými organismy. Tato práce „Jak rostlinám chutná proteinová strava“ stručně shrnuje mechanismus asimilace dusíku a diskutuje o alternativních zdrojích dusíku pro rostliny. Experimentální část poskytuje důkaz o tom, že intaktní proteiny v kultivačním médiu zpomalují růst kořenů, a že součástí této odpovědi je cytokininová signalizační dráha. Aby bylo možné sledovat a pomoci objasnit tento mechanismus, bylo testováno využití proteomické analýzy rostlinného sekretu. Celkem bylo detekováno více než 300 proteinů v hydroponické kultuře *Nicotiana tabacum* a více než jedna třetina z nich byly ovlivněny vlivem cytokininů.

Klíčová slova: asimilace dusíku, sekretom, proteom, proteinová výživa

ABSTRACT

Nitrogen is one of the most abundant elements in living organisms. In contrast to other key elements, its input from inorganic sources is limited and thus the most of the nitrogen pool has to be recycled from nitrogenous compounds (including proteins) that have been used by other organisms. This thesis "How do plants enjoy protein nutrition" briefly reviews nitrogen assimilation mechanisms and discusses alternative nitrogen sources for plants. The experimental part provides evidence that an intact protein in the culture medium decreases root growth and that the cytokinin signalling participates in this response. Then, to provide tools for further elucidations of this mechanism, a method for plant secretome analyses was tested. Altogether, more than 300 proteins were detected in hydroponic-based cultures of *Nicotiana tabacum* and more than one-third of these were affected by the cytokinin treatment.

Keywords: nitrogen assimilation, secretome, proteome, protein nutrition

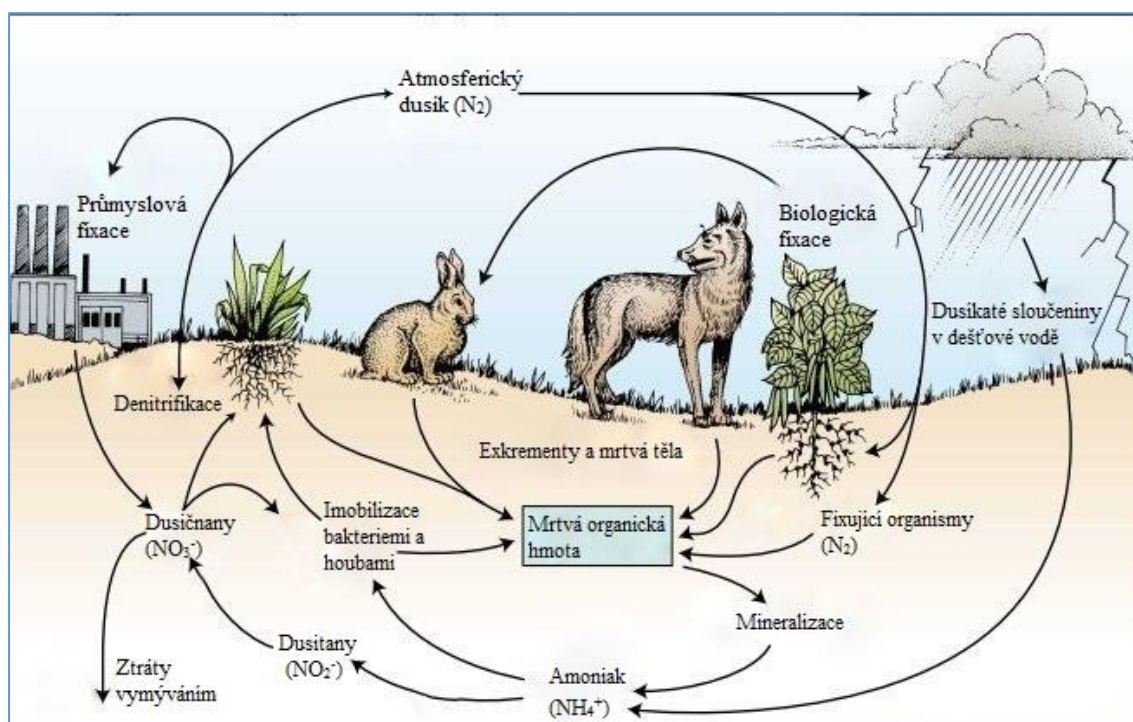
OBSAH

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
1.1	Význam dusíku pro rostliny	10
1.2	Signalizace a kontrola hladiny dusíku v rostlinách.....	12
1.3	Asimilace dusíku	13
1.4	Alternativní zdroje dusíku pro rostliny	15
1.4.1	Masožravé rostliny	15
1.4.2	Aminokyseliny	16
1.4.3	Peptidy	17
1.4.4	Proteiny	17
1.5	Sekrece proteinů.....	19
2	MATERIÁL A METODY	20
2.1	Rostlinný materiál a kultivace.....	20
2.1.1	Extrakce proteinů	21
2.1.2	Elektroforetická separace	22
2.1.3	Analýza proteomu pomocí LC-MS	22
2.1.4	Změření a zpracování MS/MS spekter	23
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
3.1.1	Efekt přidavku proteinu do kultivačního media na elongaci hlavního kořene.....	24
3.1.2	Identifikace proteinů kořenového sekretu	25
3.1.3	Predikovaná funkce a lokalizace proteinů nalezených v kořenovém sekretu.....	27
3.1.4	Efekt cytokininu na sekretované proteiny	29
4	ZÁVĚR	31
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	32
6	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ.....	36

7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	37
8	PŘÍLOHY	39

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Dusík je čtvrtý nejvíce se vyskytující prvek v živých organismech (Buchanan et al., 2015). Zatímco dusík tvoří méně než 0,1% zemské kůry, v atmosféře se molekulární dusík vyskytuje ve velkém množství a to kolem 78%. I přes toto množství dusíku je jeho obsah v zemské kůře asi 50 krát vyšší než v celé atmosféře. Většina z této formy dusíku je však navázána ve vyvěřelých a zvětraných horninách, ze kterých se nemůže uvolnit do živých organismů. Koloběh dusíku mezi geochemickými a biochemickými stavy je poměrně složitý, a proto většina dusíku využívaná živými organismy pochází z recyklace sloučenin pocházejících z jiných živých organismů (obr. 1).



Obr. 1: Koloběh dusíku v biosféře (převzato z Taiz a Zeiger, 2010).

Přijímaný dusík do zásob je vytvářen při chemických reakcích, které doprovázejí přírodní události (například oheň a blesky) nebo lidskou aktivitu (například používání spalovacích motorů a používání chemických hnojiv). Dusík se vyskytuje v přírodních ekosystémech díky biologickým procesům fixace dusíku, při kterých dochází k redukci atmosférického dusíku na amoniak. K fixaci dusíku dochází pouze u prokaryot. Amoniak produkovaný fixací dusíku je asimilován na aminokyseliny a odtud na proteiny a jiné sloučeniny obsahující dusík. Amoniak uvolňovaný z organismů nebo přidávaný jako hnojivo může být převeden na dusitanové a dusičnanové ionty pomocí nitrifikačních bakterií. Tyto ionty pak vstupují do metabolismu pomocí redukce na amonné ionty a následujícím začleněním do aminokyselin. Tento proces je znám nejen u bakterií, ale i hub a rostlin (Buchanan et al., 2015, Taiz a Zeiger, 2010). Za zmínku stojí uvést i příklad symbiozy mezi rostlinou a bakterií schopnou asimilovat dusík. Mezi nejvýznamnější soužití patří symbióza bobovitých rostlin s druhy rodu *Rhizobium* (Obr. 2). Vláknko bakterie vnikne do rostliny, kde vznikne bakteroid. Ten je spojen s vyvoláním tvorby nitrogenázy a dalších enzymů důležitých pro fixaci molekulárního dusíku (Procházka et al., 1998).



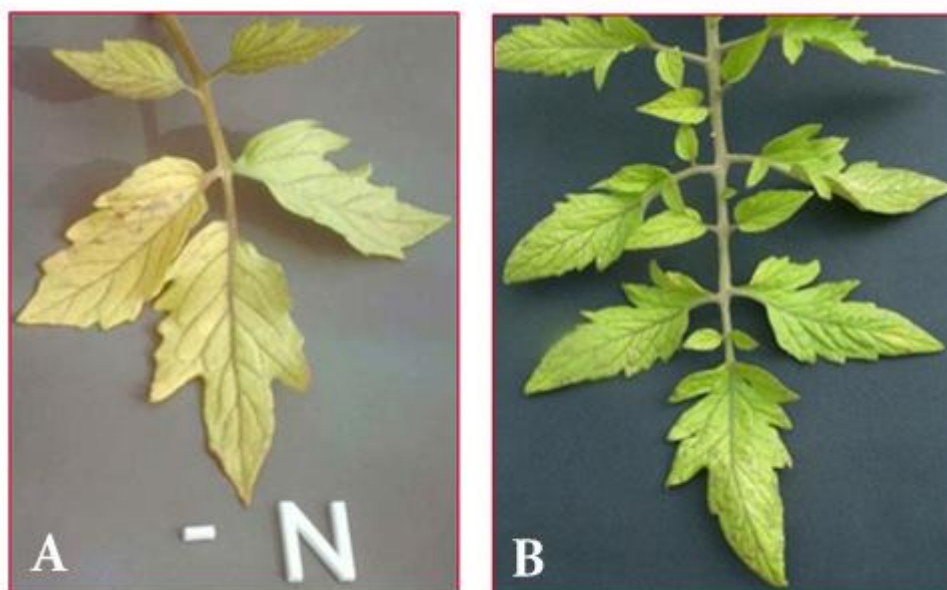
Obr. 2: *Rhizobium*. Znárodnění kořenových hlízek na sójových bobech. Tyto hlízky jsou výsledkem symbiozy *Rhizobium japonicum* (Taiz a Zeiger, 2010).

I když rostlina přijímá většinu organického dusíku formou nízkomolekulárních látek, nedávné studie ukazují, že je schopna přežít i pokud jediným zdrojem dusíku v jejím okolí jsou proteiny. Cílem bakalářské práce je studium právě této tematiky. Teoretická část shrnuje současné poznatky o metabolismu dusíku v rostlinách a experimentální část je zaměřena na metodiku vedoucí k identifikaci proteinů sekretovaných rostlinami do jejich okolí. Dílčím cílem poté bylo otestovat, zda na využití proteinové stravy má efekt rostlinný hormon cytokinin.

1.1 Význam dusíku pro rostliny

Běžná koncentrace dusíku ve zdravé mladé rostlině je 17 mM, což odpovídá 10 mg/g sušiny (Buchanan et al., 2015). Jakmile dojde ke zvýšení či snížení tohoto množství, jedná se buď o nadbytek dusíku či naopak jeho nedostatek.

Na základě změn v klimatu a způsobu pěstování rostlin dochází ke kolísání obsahu dusíku v půdě. Jelikož není dusík v půdě pevně fixován, může docházet k jeho vyplavování a následně k jeho nedostatku (Kincl a Krpeš, 2000). Vymývány jsou z půdy zejména nitráty, jelikož jsou vysoce rozpustné (Hodge, 2014). Dalším důvodem nedostatku dusíku v půdě je volatilizace. Při volatilizaci dochází k uvolnění dusíku v plynné formě do atmosféry (Procházka, 1998). Jeden z příznaků deficitu dusíku u rostlin je zakrslý růst. Jestliže jeho nedostatek přetrvává delší dobu, dochází k poklesu množství chlorofylu, což se projeví změnou barvy listů (Kincl a Krpeš, 2000). Nejdříve jsou listy bledě zelené, dále se objevují náznaky chlorózy (žloutnutí listů, Obr. 3), které v delším trvání nedostatku dusíku přejdou v opadnutí listů a to nejdříve těch starších, které se nachází ve spodní části rostliny (Taiz a Zeiger, 2010). Ze starších listů je dusík transportován do těch mladších, což dává za následek to, že se tyto symptomy u mladších listů tolik neprojevují. Nedostatek dusíku může také způsobit předčasné kvetení. Dalším příznakem trvajících nedostatku je velmi štíhlý a často zdřevnatělý stonek (Taiz a Zeiger, 2010). Změny při nedostatku dusíku jsou pozorovány i v morfologii kořenů, kdy dochází k výraznějšímu růstu do délky a kořen se málo větví. Dochází také ke snížení sušiny (Richter, 2004).

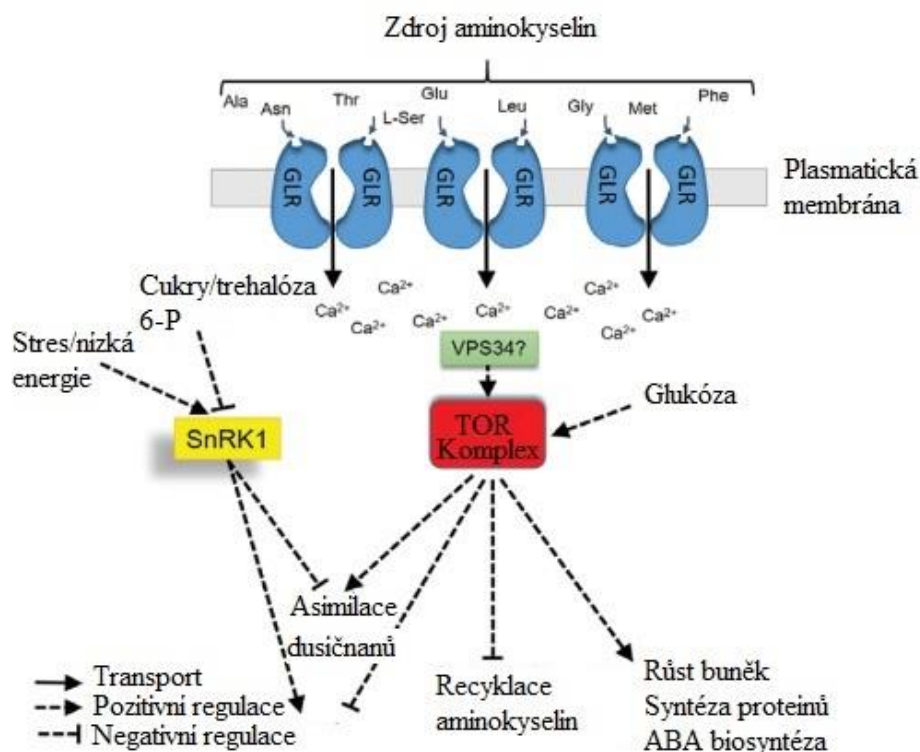


Obr. 3: Projevy nedostatku dusíku. A) deficit dusíku u listu rajčete s následným žloutnutím listu a B) zdravý list rajčete

(http://www.haifagroup.com/knowledge_center/crop_guides/tomato/plant_nutrition/nutrient_deficiency_symptoms/#{9FA58ABD-1330-401E-A26F-93596DA81BC6}).

1.2 Signalizace a kontrola hladiny dusíku v rostlinách

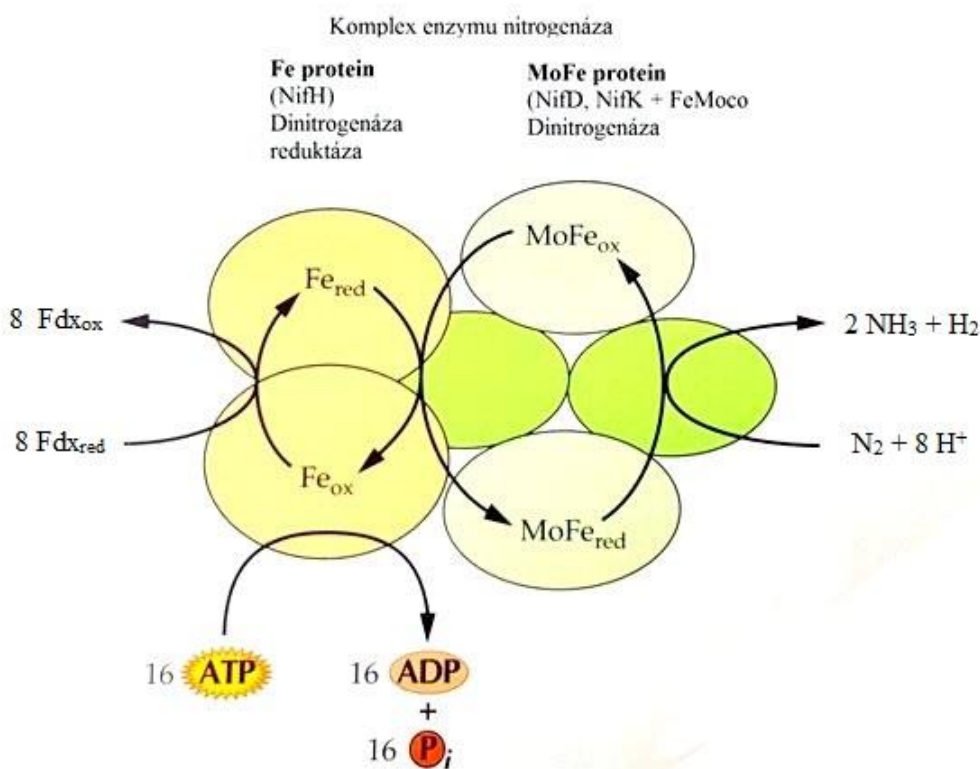
Signální dráhy, které monitorují obsah dusíku a regulují jeho asimilaci a transport, nejsou doposud zcela objasněny. Regulace aspoň některých klíčových prvků je však úzce provázána s metabolismem uhlíku. Příkladem je nitrátreduktáza, která je stimulována světlem, nadbytkem sacharózy a rostlinnými hormony cytokininy. K jejímu snížení naopak vede tma, či zvýšený obsah klíčových aminokyselin podílejících se v asimilaci dusíku (Glu, Gln). Dusičnan sám pak působí jako signální molekula a již 100 nM přídavek vede k zvýšení exprese přenašečů a enzymů jeho metabolismu (Buchanan et al., 2015). Nedávno byl také popsán TOR komplex (Target of Rapamycin), který je zřejmě hlavní receptor zodpovědný za monitorování hladiny dusíku (Obr. 4).



Obr. 4: Model aktivace TOR komplexu pomocí GLR receptorů spojených s Ca²⁺ iontovými kanály (převzato od Gend a Forde, 2017). Zkratky: GLR (glutamate-like receptors), receptory glutamátu; TOR (target of rapamycin), cíl rapamycinu; SnRK1, příbuzné kinázy, které působí z velké části antagonisticky na TOR; VPS34, třídící protein vakuol; Thr, threonin; Ala, alanin; Ans, asparagin; Glu, kyselina glutamová; Leu, leucin; Gly, glycin; Phe, fenylalanin; Met, methionin; L-Ser, L-serin; ABA, kyselina abscisová.

1.3 Asimilace dusíku

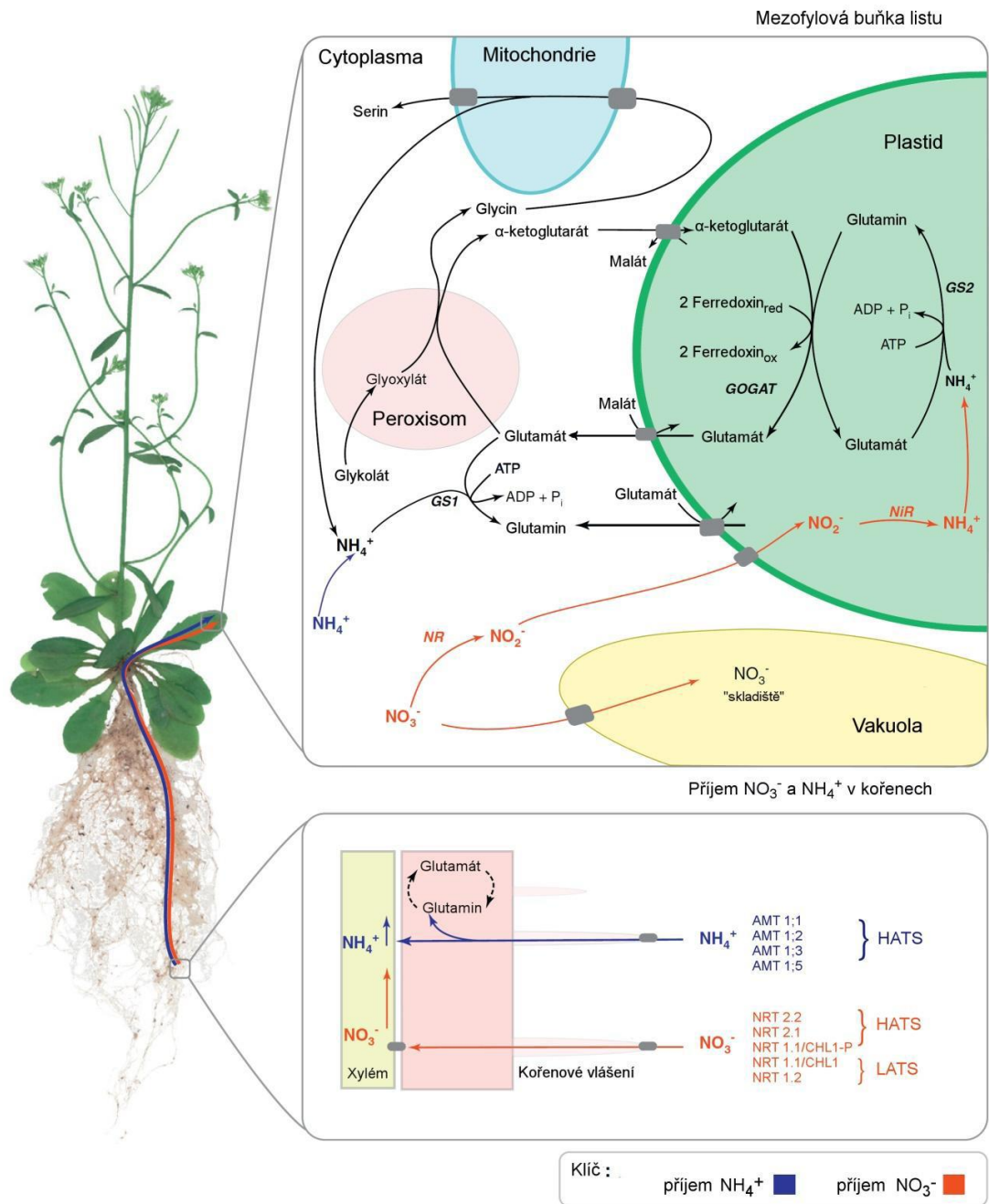
Schopnost fixace molekulárního dusíku mají mikroorganismy, které žijí buď v půdě, nebo v symbióze s rostlinami. Symbiotická fixace dusíku může zvýšit růst a výnos rostliny (Buchanan et al., 2015). Redukce vzdušného dusíku na amoniak využívá dva enzymy. Jedná se o dinitrogenázu a dinitrogenáza reduktázu. Dohromady jsou označovány jako nitrogenáza. Heterotetramer dinitrogenáza (MoFe protein) váže vzdušný dusík. Homodimer dinitrogenázareduktáza, (Fe protein), poskytuje dinitrogenáze vysoko energetické elektrony (Buchanan et al., 2015, McKee T. a McKee J. R., 2012).



Obr. 5: Nitrogenáza katalyzuje fixaci vzdušného dusíku (převzato z Mathews et al. 2012). Zkratky: ADP, adenosindifosfát; ATP, adosintrifosfát; Fdx_{ox}, ferredoxin, místo pro oxidaci dusíku; Fdx_{red}, ferredoxin, místo pro redukci dusíku; P, molekula fosfátu; Fe protein, dinitrogenáza reduktáza; MoFe protein, dinitrogenáza.

Rostliny jako autotrofní organismy jsou schopné syntetizovat organické látky z látek anorganických (Arsova et al., 2012). Primární asimilace dusíku se odehrává v kořenech. Tam buňky přijímají anorganický dusík a ten je následně přeměněn na

organický. Je to děj, který vyžaduje vysoký energetický příjem (Taiz a Zeiger, 2010). Celkově tento děj spotřebuje 12 ATP na dusík (Taiz a Zeiger, 2010, Procházka et al., 1998).



Obr. 6: Spotřeba a asimilace dusíku (převzato od Arsova et al., 2011, Běložníková, 2016). Prvním krokem je katalýza pomocí nitrátoreduktázy. Tento enzym je tvořen složkou FAD, molybdenem a cytochromem b5. Dusitan umístěný v plastidech vytváří NH_4^+ , který je následně začleněn do glutaminu pomocí glutaminsyntázy. NH_4^+ je často fixován kořeny. Zvýrazněné aminokyseliny znázorňují hlavní produkt asimilace dusíku

(Arsova et al., 2012). Příjem formy dusíku jako dusičnanu a amonné soli. Asimilace anorganického dusíku rostlinami probíhá do následujících transportních aminokyselin: glutamát, glutamin, aspartát a asparagin. Glutamin a glutamát jsou schopny rozšířit dusík do rostlinného metabolismu, jelikož jsou schopny transportovat dusík do ostatních aminokyselin, nukleových kyselin a dalších složek obsahující dusík (Buchanan et al., 2015). Zkratky: ATM, amonné transportéry; CHL, NRT, dusičnanové transportéry; HATS, vysokoafinitní transportéry; LATS, nízkoafinitní transportéry; GS1, GS2, izoformy glutaminsyntetázy; GOGAT, glutamátsyntáza; NR, nitrátreduktáz; NiR, nitritreduktáza

1.4 Alternativní zdroje dusíku pro rostliny

Pro rostliny jsou alternativní zdroje dusíku obsaženy v organických sloučeninách. Mezi tyto zdroje dusíku můžeme zařadit aminokyseliny, peptidy, ale i proteiny, které dříve nebyly považovány za přímo dostupný zdroj dusíku pro rostliny.

1.4.1 Masožravé rostliny

Masožravé rostliny se živí mixotrofně, konkrétně autotrofní formou výživy. Během této formy dochází k přiživování organickými sloučeninami živočišných těl. K tomuto trávení hmyzu dochází u rostlin různými způsoby, jako například pomocí lapacích měchýřků, tentakulí a lapacích pastí (Novák a Skalický, 2012). Listy masožravých rostlin jsou hojné na chlorofyl, tudíž i bez živočišné potravy dokážou žít autotrofně. Rostliny, které ovšem přijímají tuto živočišnou potravu, jsou schopné produkovat více semen (Němec, 1963).



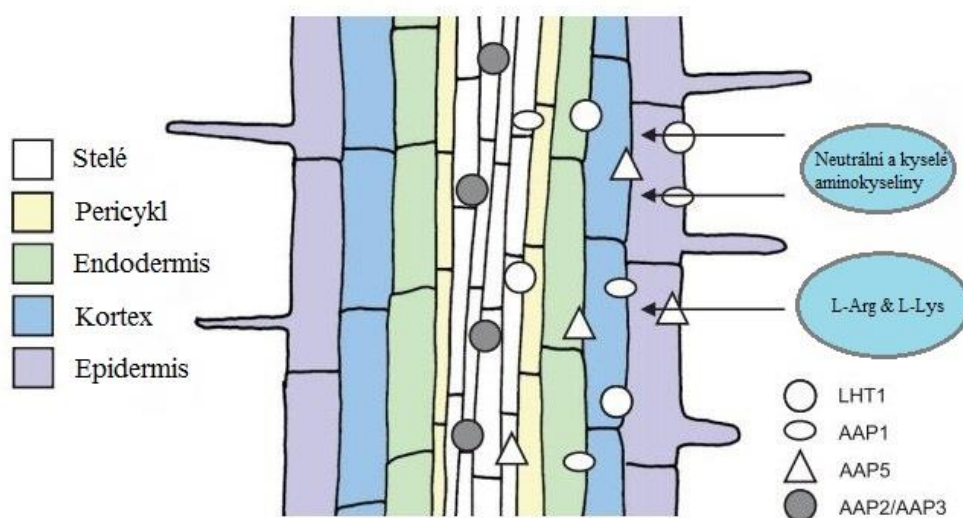
Obr. 7: Specializované orgány masožravých rostlin, A) láčkovka (*Nepenthes ventricosa x truncata*) s gravitační pastí, B) mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) se sklapovací pastí

(<http://www.masozraverostliny.info/informace/nepenthes/ventrxtru/index.html>,
<http://www.masozravky.com/>).

Pro rozklad hmyzích těl produkují masožravé rostliny sekrety, ty jsou tvořeny proteolytickými enzymy, které mají katalytickou funkci při rozkládání hmyzích těl (Procházková, 1998).

1.4.2 Aminokyseliny

Aminokyseliny mohou sloužit jako významný zdroj dusíku i při relativně nízkých koncentracích v půdním roztoku, jejich příjem však závisí na konkurenci mezi ostatními rostlinami a mikroorganismy a interakcí mezi aminokyselinami a půdou (Lipson a Näsholm, 2001, Gruffman et al., 2014). Rostliny přijímají aminokyseliny z půdy pomocí transportérů. Na Obr. 8 je znázornění transportu aminokyselin do symplastu kořenové epidermis či endodermis (Ganeteg et al., 2016). Příjem aminokyselin je rozdělen na dva transportní systémy. Jedná se o příjem kyselých/neutrálních či zásaditých aminokyselin (Svennerstam et al., 2016).



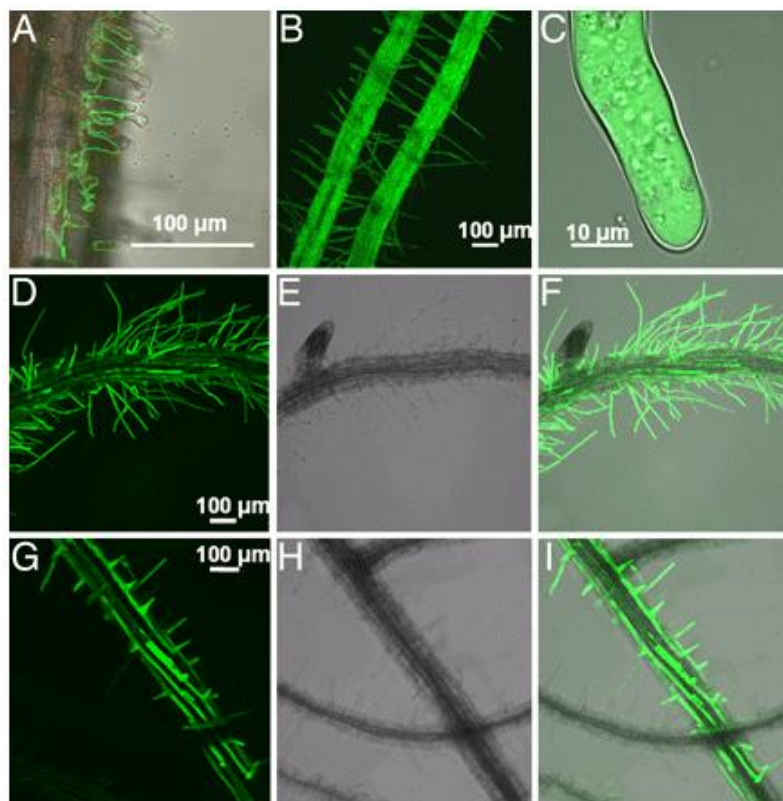
Obr. 8: Model transportu aminokyselin. Přenašeč LHT1, lysin histidin transportér; AAP5, aminokyselinová permeáza 5; AAP1, aminokyselinová permeáza 1 (Näsholm et al., 2009).

1.4.3 Peptidy

Peptidy hrají důležitou roli ve výživě kvasinek, bakterií i rostlin, které jsou schopny je využít jako zdroj dusíku (Waterworth a Bray, 2006). Do kořenů jsou peptidy přijímány a transportovány pomocí peptidových přenašečů, které jsou rozděleny do dvou tříd na základě toho, jakou délku peptidy mají. První třída transportérů (OPT) přenáší tetra- a pentapeptidy, druhá rodina (PTR) přenáší di- a tripeptidů (Waterworth a Bray, 2006, Paungfoo-Lonhienne et al., 2009). Příklad transportéru OPT nalezeného v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* je AtPTR2, který je obsažen v mnoha pletivech (Waterworth a Bray, 2006). Když byly peptidy jediným zdrojem dusíku, tak zvýšená exprese PTR5, u *Arabidospis thaliana*, vedla k většímu růstu rostliny (Paungfoo-Lonhienne et al., 2009).

1.4.4 Proteiny

Rostliny mohou využívat protein jako zdroj dusíku bez pomoci jiných organismů. Rostliny přijímají protein buď pomocí proteolytických enzymů, které rozkládají proteiny a ty následně vstupují přes kořenové vlásky v podobě peptidů nebo cestou endocytózy (Paungfoo-Lonhienne et al., 2008).

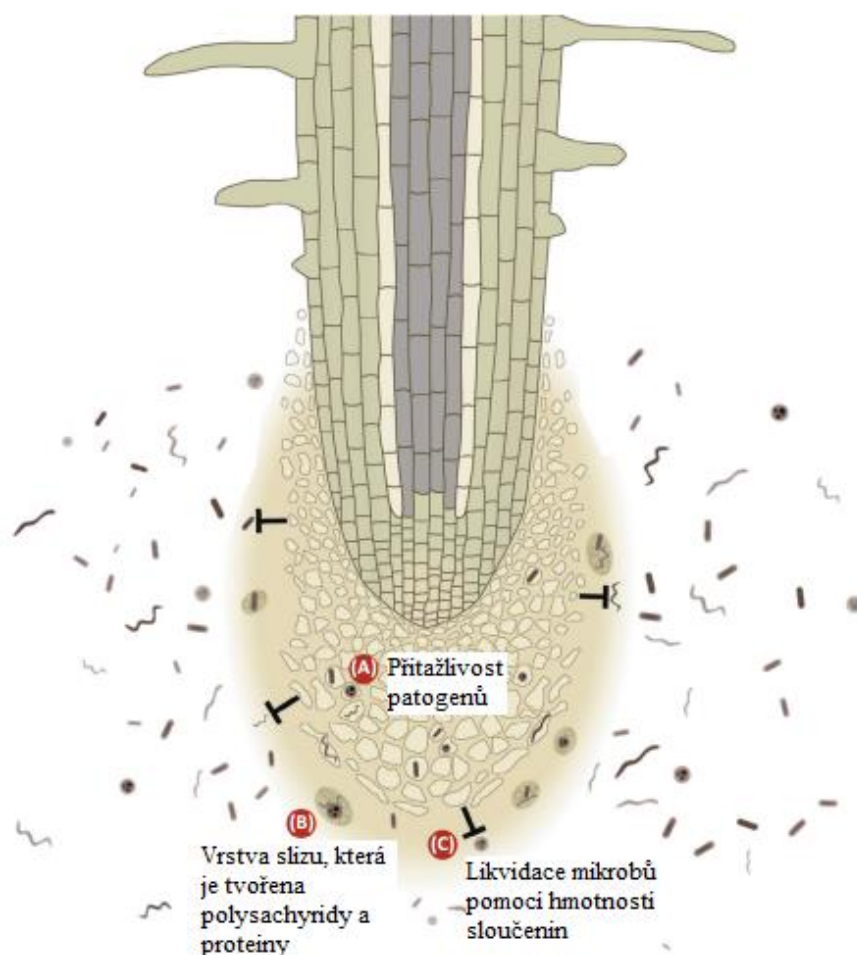


Obr. 9: Kořeny rostlin axenic *Hakea* a *Arabidopsis thaliana*. Zobrazení příjmu intaktního proteinu (Paungfoo-Lonhienne et al., 2008).

Na Obr. 9 jsou zobrazeny kořeny rostlin *Hakea* a *Arabidopsis* v kapalném médiu se zeleným fluorescenčním proteinem a vizualizací, jak kořeny tento protein přijímají. Na obr. 9 A, B, F a I je protein viditelný na povrchu kořenů. Obr. 9 C znázorňuje protein uvnitř kořenových vlásků v cytoplazmatickém toku. Uvnitř kořenových buněk je protein zobrazen na Obr. 9 F a I. Jedině v nově vytvořených postranních kořenech bez kořenových vlásků nebyl protein pozorován. Z toho vyplývá, že je příjem proteinu do jisté míry závislý na přítomnosti kořenových vlásků (Paungfoo-Lonhienne et al., 2008).

1.5 Sekrece proteinů

Sekrety rostlin jsou novou a neprozkoumanou oblastí v proteomice. Kořeny rostlin jsou v půdě vystaveny mnoha nepříznivým vlivům, jako jsou například patogenní houby, bakterie, viry a jiné. Z toho důvodu rostliny vylučují sekrety do apoplastu, aby byl kořenový systém vůči těmto nežádoucím vlivům rezistentní. Tyto vylučované látky mohou působit jako signální molekuly, stimulanty či inhibitory, ale také mají zásadní vliv pro vytváření půdního prostředí (Baetz a Martinoia, 2014, Alexandersson et al., 2013). Jakmile dojde k interakci s patogenem, Obr. 10, proteinová složka sekretu změni složení (hydrolázy, peptidázy, a peroxidázy).



Obr. 10: Kořenová špička s okolními buňkami a jejich výměšky, které napomáhají v odolnosti vůči patogenům (patogenní houby, bakterie, viry, hlístice...). (Baetz a Martinoia, 2014).

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Rostlinný materiál a kultivace

Pro analýzu účinku proteinu na dlouhivý růst kořene byla použita semena modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Důležitým krokem před samotnou kultivací je sterilizace semen. Semena Col-0 a semena mutantních rostlin *ahk2ahk3* byla povrchově sterilována v 75% ethanolu a poté ve 100% ethanolu po dobu 5 minut. Následně byla semena vyseta ve sterilním prostředí flow boxu, kde bylo připraveno 10 kulatých Petriho misek. Každá z těchto misek obsahovala ½ živné Murashige-Skoogovo médium (Duchefa) s 1% agarem (Duchefa). Před autoklávováním byl k médiu přidán roztok 1M KOH, pro úpravu pH, aby se pohybovalo v rozmezí 5,7-5,8. K vysterilizovanému médiu byl po dostatečném ochlazení přidán BSA. Komerční BSA (Sigma-Aldrich) byl přečištěn pomocí gelové filtrace (PD-10 Desalting Column – GE Healthcare Life Sciences), aby byl zbaven případných kontaminací v podobě solí, volných aminokyselin či částečně degradovaného proteinu. BSA byl připraven tak, aby finální koncentrace odpovídala 1,5 mg/ml.

Na každou misku bylo vyseto celkem 10 semen v řadě. Po vysetí semen byly misky přelepeny polopropustnou náplastí Medipor, která zajišťuje sterilitu, ale také i výměnu plynů. Po vysetí byly misky přeneseny do lednice na 3 dny, kde se nechaly semena stratifikovat. Po uplynutí 3 dnů byly misky přeneseny do kultivačního boxu (Percival Scientific, Inc), kde byly umístěny vertikálně. Kultivace rostlin probíhala při intenzitě světla $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a režimu kontinuálního světla po dobu jednoho týdne. Fotografování misek probíhalo 5. a 7. den. Následně ze získaných snímků bylo provedeno měření hlavních kořenů. K tomuto měření byl využíván volně dostupný program ImageJ. Získaná data byla následně zpracována v programu Microsoft Excel a statisticky porovnána prostřednictvím T-testu.

Vysévání semen *Nicotiana tabacum*, která byla určena pro protetickou analýzu, probíhala také ve sterilních podmínkách flow boxu jako u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Semena *Nicotiana tabacum* (SRI) byla povrchově sterilována v 75% ethanolu a poté ve 100% ethanolu po dobu 5 minut. Následné vysévání semen probíhalo ve flow boxu, kde byla nachystaná kulatá Petriho miska a v ní uložený

filtrační papír. Semena byla rozložena na filtrační papír a převrstvena 3 ml destilované vody. Poté byla miska přelepena polopropustnou náplastí Medipor a uskladněna na 2 dny do lednice, kde byla semena stratifikována při teplotě 3-4 °C. Takto nachystaná semena v Petriho miskách byla horizontálně uložena do kultivačního boxu na 2 týdny v režimu (16 hod./21 °C světlo; 8 hod./ 19 °C tma) a světelné periodě 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Po uplynutí 2 týdnů byly mladé rostliny přesazeny do sadbovací hmoty, která byla umístěna v nádobě s ½ Murashige-Skoogovým živným médiem. Poté byly rostliny vráceny opět do kultivačního média na 2 týdny. Experiment byl proveden na 10 reprezentativních rostlinách, které byly přeneseny do 15 ml zkumavek, kde bylo 10 ml ½ živného Murashige-Skoogovo média s přídavkem a bez přídavku cytokininu (10 μM thidiazuronu). Sekrety, které vylučovaly kořeny, byly po 48 hodinách odebrány.

2.1.1 Extrakce proteinů

Extrakce proteinů byla provedena dle následujících kroků. Ze sebraného sekretu byla provedena extrakce pomocí směsi acetonu/TCA. Poté byl tento roztok ponechán přes noc při teplotě -20 °C. Druhý den byla provedena centrifugace při 20 000 x g a teplotě 4 °C po dobu 5 min. Po centrifugaci byl vzorek resuspendován v 1,5 ml 10 % TCA v destilované vodě. Poté byla opět provedena centrifugace po dobu 10 min při 20 000 x g a teplotě 4 °C. Centrifugovaný vzorek byl resuspendován v 80 % acetonu v destilované vodě. Následně byla opět provedena centrifugace po dobu 5 minut, při 20 000 x g a teplotě 4 °C. Dále byla provedena resolubilizace proteinového peletu v 800 μl SDS pufru [2 % SDS, 30 % sacharóza, 5 % β -merkptoethanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8,0] a inkubace při teplotě 25 °C po dobu 30 min. Následně byla provedena fenolová extrakce. Do vzorku bylo přidáno 400 μl pufrém saturovaného fenolu a poté byl vzorek protřepán. Následně byla provedena centrifugace po dobu 20 min, při 20 000 x g a teplotě 20 °C. Ze zkumavky byla odebrána vrchní část, která byla oddělena od zbytku sacharózovou vrstvou. Tato část byla přenesena do nové mikrozkuavky o objemu 2 ml. Frakce byla doplněna na objem 2 ml vymraženým roztokem 100 mM octanu amonného v metanolu, aby došlo k vysrážení proteinů. Následně byly vzorky uschovány přes noc při teplotě -20 °C.

Druhý den byly vzorky stočeny při 20 000 x g a teplotě 4 °C 5 minut. Poté, co byl promyt proteinový pelet 1 ml 80 % acetonu, proběhla centrifugace. Následný

supernatant byl odpipetován a pelet, který zbyl, byl vysušen. K vysušenému peletu bylo přidáno 300 μ l 100 mM hydrogen uhličitanu amonného a 8 M močovina.

Dalším krokem byl digest vzorku. Vzorky byly zředěny destilovanou vodou a 10 % acetonitrilem v 50 mM hydrogenuhlčitanu amonným v poměru 1:2:1. Poté byl vzorek štěpen 20 μ l imobilizovaného trypsinu (Promega) při teplotě 30 °C.

Konečnou fází byla příprava pro LC-MS analýzu. Vzorek byl rozpuštěn ve vodném roztoku, který obsahoval 0,1 % kyselinu mravenčí a 5 % acetonitril. Výsledný štěpený roztok byl odsolen pomocí C18 SPE.

2.1.2 Elektroforetická separace

K testování dalších metod pro separaci proteinů, byla využita jednorozměrná gelová elektroforéza. Do jamky bylo nanášeno 25 μ l odsoleného vzorku. Parametry elektroforézy byly následující: 1% agarózový gel, při napětí 100 V (10min) a 150 V (60min). V jedné frakci bylo na základě předchozího měření očekáváno 20 μ g proteinu. Po skončení elektroforézy byl gel vysušen a následně nařezán na 4 rovnoměrné frakce dle velikosti proteinů. Tyto proužky byly rozřezány na malé kousky a poté vloženy do mikrozkuumavek, kde byla destilovaná voda a homogenizační kulička. S mikrozkuumavkou bylo 1 minutu třepáno a následně byla opatrně odpipetována přebytečná voda. Mikrozkuumavka byla poté ponechána otevřená po dobu 5 minut, aby se přebytečná voda odpařila. Po odpaření přebytečné vody byl ke vzorku přidán 1 μ g trypsinu a mikrozkuumavka byla přes noc umístěna do inkubátoru.

2.1.3 Analýza proteomu pomocí LC-MS

Analýza proteomu byla provedena za použití C18 reverzní chromatografie (40 cm, 0,075 mm vnitřní průměr), která byla napojena k nanoESI zdroji CaptiveSpray (Bruker) k hmotnostnímu spektrometru UHR-TOF (UHR maXisimpact Q-TOF Bruker). UltiMate3000 RSLC měl nastaven průtok na 300-500 nl/min a gradient ACN byl 4% - 40% po dobu 120 min. Spektra byla měřena pomocí spektrometru UHT-TOF (rozsah 50 - 2200 m/z, sběr MS spekter 2 Hz a 10 - 20 Hz MS/MS, s cyklačním časem 7 sekund). Pro kompenzaci drobných odchylek nám sloužil vnitřní standart 1221,99 m/z (lockmass).

2.1.4 Změření a zpracování MS/MS spekter

Změřená data, která byla získána LC-MS analýzou, byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 4.1 (Bruker). Dále byla provedena recalibrace spekter a tím byly eliminovány výkyvy v přesnosti měření. Soubory byly vyhledávány pomocí databáze Nicotiana protein (N. tabacum TN-90, Solgenomics, 7/2016) podle Sequest HT, MS Amanda a Mascot 2,4 s následujícími parametry: enzym - trypsinu, max dvě vynechaná štěpená místa; hmotnostní tolerance -35 ppm (MS) a 0,1 Da (MS/MS); modifikace - až tři dynamické změny zahrnující Met oxidace, Asn/Gln deamidace, Lys methylace, N-koncové acetylace, Ser/Thr/Tyr fosforylace.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Praktická část bakalářské práce byla rozdělena na fyziologickou a proteomickou. Ve fyziologické části bylo zabýváno změnou dlouhivého růstu kořene u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* v reakci na přítomnost proteinu v kultivačním médiu. V proteomické části byly testovány metody pro proteomickou analýzu kořenového sekretu rostlin. Kořeny rostlin jsou v průběhu života vystaveny mnohým biotickým a abiotickým stresům. Jedná se o napadající systémy sousedních rostlin a další půdní organismy, včetně bakterií, hub a hmyzu. Kvantita a kvalita sekretovaných látek kořeny závisí na rostlinném druhu, stáří jednotlivých rostlin a vnějších biotických a abiotických faktorů. Kořenové výměšky můžeme rozdělit do dvou tříd. Jedná se o sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (aminokyseliny, organické kyseliny, cukry a další metabolity) a sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností (polysacharidy, proteiny), (Haichar et al., 2014).

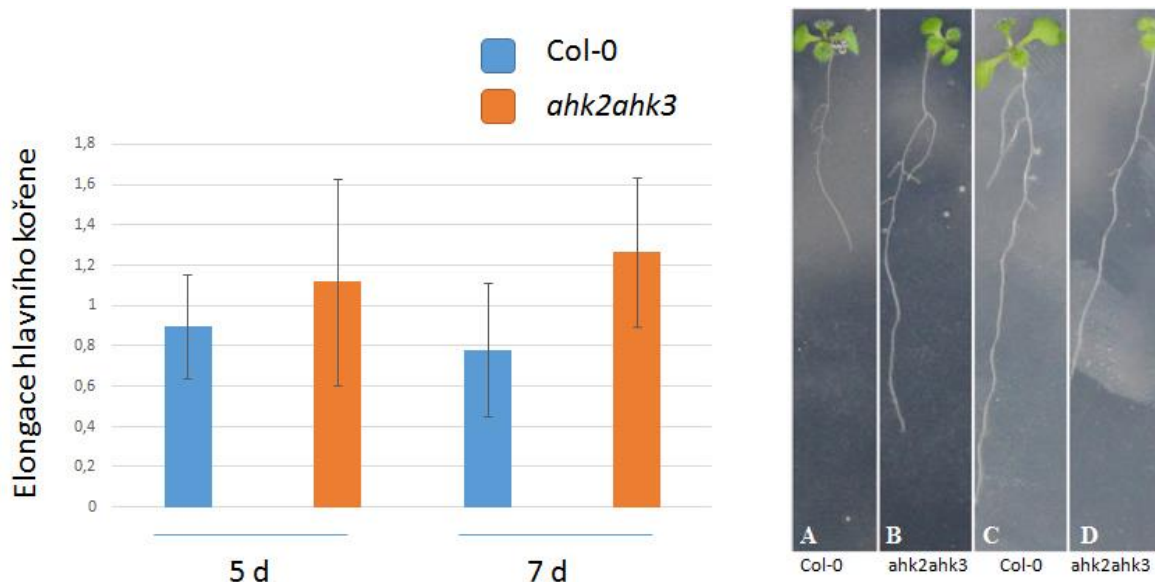
3.1.1 Efekt přidavku proteinu do kultivačního media na elongaci hlavního kořene

Jedním z cílů bakalářské práce bylo pozorování růstu kořenů *Arabidopsis thaliana* po 5 a 7 dnech a pozorování účinku na základě vlivu přidaného proteinu. Cílem fyziologické části bylo otestování, zdali pomocí našeho experimentu dosáhneme podobných výsledků, jako bylo pozorováno v článku od Paungfoo-Lonhienne et al., 2010. Také byla ověřována možná role cytokininu, který hraje roli v metabolismu dusíku, ale není známo, zdali se účastní i této dráhy.

Pro experiment proto byla použita semena Col-0 a mutantní semena *ahk2ahk3*, která má vyřazeny dva ze tří cytokininových receptorů. Tato mutantní linie patří mezi nejvýznamnější, jelikož rostliny jsou zakrslejší a mají odlišný kořen oproti kontrolním rostlinám. Jejich využití v experimentech je zejména k ověření, zda funguje specifická dráha přes cytokininové receptory (Tokunaga et al., 2012).

I když biologická variabilita vedla k nižší spolehlivosti dat (hladina signifikance $p < 0,1$), měření ukázala, že přidavek BSA skutečně ovlivňuje elongaci hlavního kořene (Obr. 11). Zatímco kontrolní rostliny Col-0 měly hlavní kořen znatelně delší, mutace v cytokininové signalizaci vedla k prodlužování v přítomnosti BSA. Ještě zajímavější však bylo srovnání mezi jednotlivými liniemi. Zatímco v pátém dnu byl poměr mezi elongací

hlavního kořene Col-0 a mutantní linie 0,9:1,1, po sedmi dnech byl patrný již signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) který přesahoval 1,5 násobek. Další časový bod již nebyl pro analýzu vhodný, protože hlavní kořen dosahoval okraje misky.

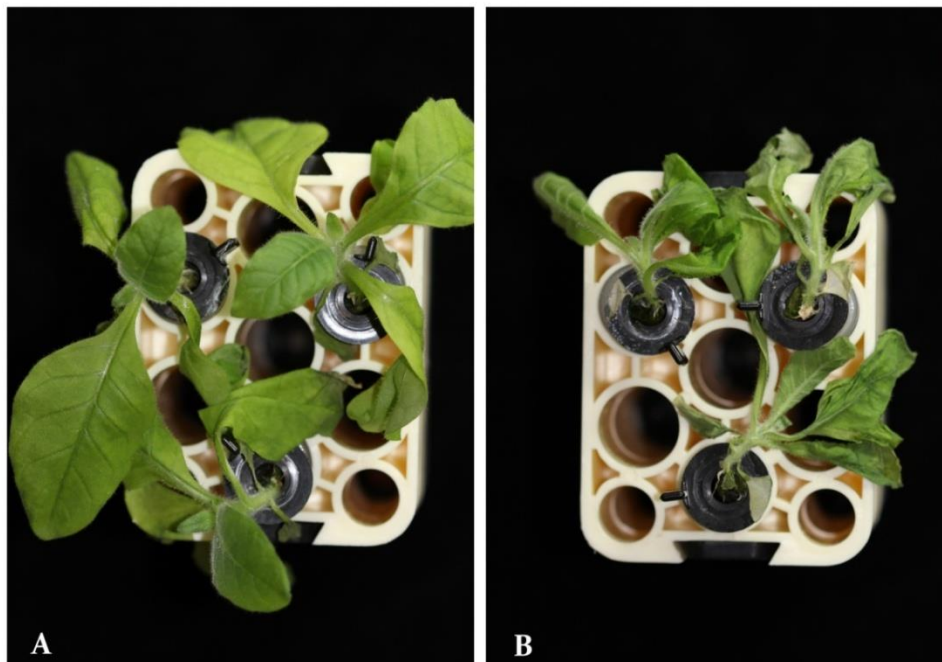


Obr. 11 Vliv přídavku BSA na elongaci hlavního kořene. Výnos je průměrný poměr se směrodatnou odchylkou vypočtený na základě pozorování 25 jedinců. Fotografie po sedmi dnech jedinců na Petriho misce s přídavkem BSA (1,5 mg/ml) A) a B), na kontrolní misce C) a D).

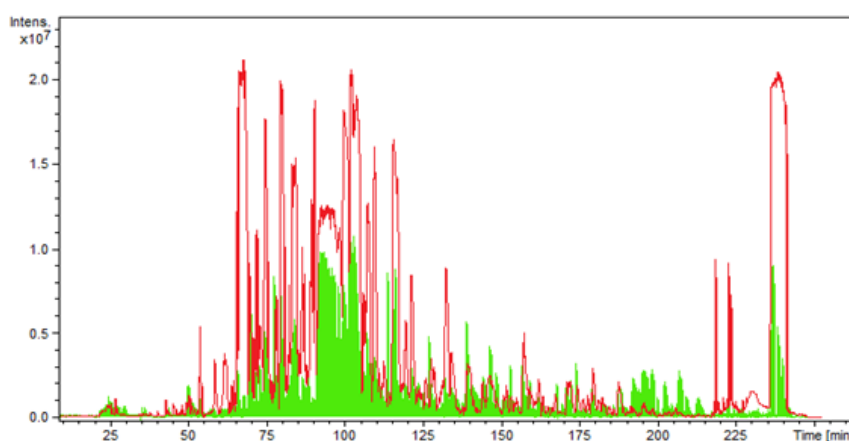
3.1.2 Identifikace proteinů kořenového sekretu

Pro pilotní experiment byly testovány dva modelové systémy, *Arabidopsis thaliana* a *Nicotiana tabacum*. Z výsledků vyplynulo, že vhodnější model pro další analýzy je *Nicotiana tabacum*. Rostliny tabáku, které byly pěstované v Murashige-Skoogovo médiu, byly porovnávány s rostlinami, které rostly v médiu s přídavkem cytokininu (10 μ M thidiazuronu). Za účelem zjištění, co rostlina sekreduje, byly využity dvě metody. Pomocí první metody byly proteiny vysráženy a extrahovány (materiál a metody 2.1.1 Extrakce proteinů). Pro analýzu byly použity dva vzorky. Každý z těchto vzorků se skládal alespoň ze tří rostlin. Aby bylo dosaženo vyššího pokrytí proteomu, byl jeden tento replikát prefrakciován pomocí jednorozměrné PAGE. Celkem bylo identifikováno 361 proteinových skupin (FDR, $< 1\%$). I přesto, že je počet PSM (peptide spectrum match) vysoký (medián > 15), všechny tyto identifikace jsou založeny pouze na jediném PSM za skupinu proteinů. Na Obr. 12 je možné pozorovat vliv cytokininu

na rostliny. Analýza proteinů byla provedena pomocí metody LC-MS (Obr. 13). Na Obr. 13 je rozložení intenzit signálu v průběhu celé analýzy.



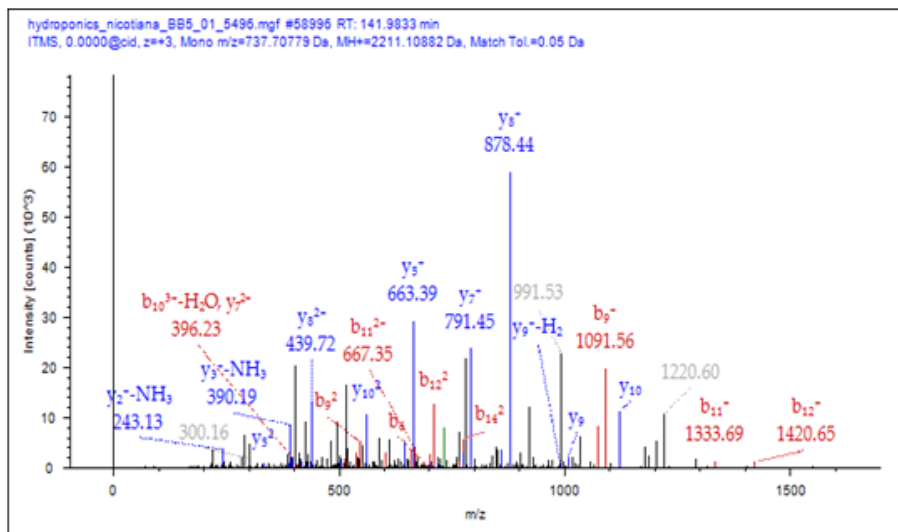
Obr. 12: Účinek cytokininu na rostlinu tabáku, obr. A) kontrola, rostlina pěstovaná v hydroponickém Murashige-Skoogovo médiu, obr. B) rostlina pěstovaná s přidavkem toxické dávky cytokininu.



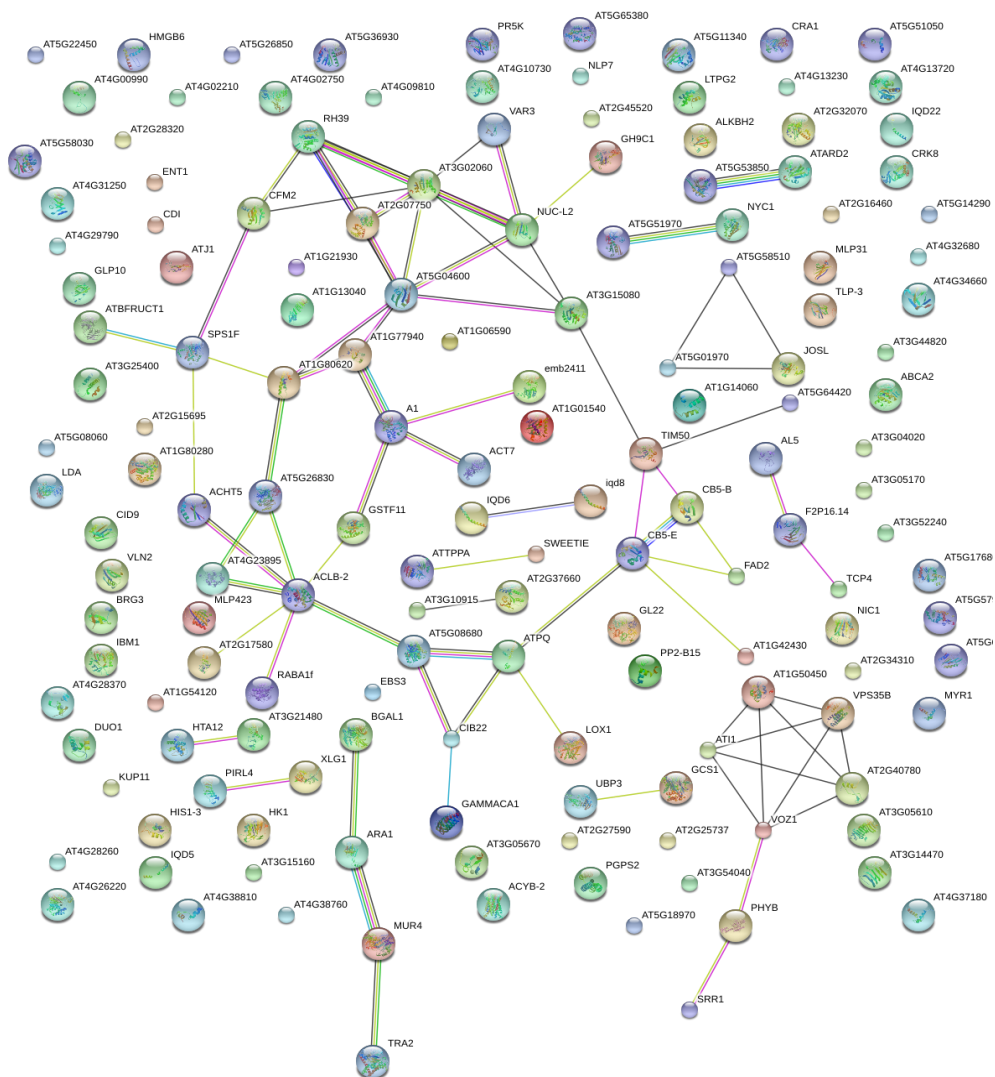
Obr. 13: Analýza kořenového exsudátu pomocí tryptického štěpení a LC-MS. Zelená - TIC (Total ion current chromatogram) pro MS/MS a červená – BPC (Base Peak Chromatogram) pro MS. Obrázek je získaný z programu DataAnalysis 4.1.

3.1.3 Predikovaná funkce a lokalizace proteinů nalezených v kořenovém sekretu

Anotace genů tabáku nejsou srovnatelné s nejlépe prostudovaným rostlinným modelem *Arabidopsis thaliana*. Proto bylo k dalším analýzám identifikovaných sekretovaných proteinů využito anotací homologních genů *Arabidopsis thaliana* (TAIR 10 databáze). Prvním cílem bylo potvrdit, zda identifikované proteiny mohou být skutečně sekretovány, protože mohly být ve vzorku nalezeny například z důvodu kontaminace, či poškození pletiv. Pro určení lokalizace identifikovaných proteinů byla použita databáze SUBA3 (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>). Experimentální data nejsou pro většinu homologů *Arabidopsis* dostupná (méně než 10%), a tedy analýza vychází pouze z dostupných predikcí. Celkově bylo zjištěno pouze šest výhradně extracelulárních proteinů, ale celkem 74 z 203 přiřazených homologů *Arabidopsis thaliana* má předpokládanou lokalizaci v extracelulárním prostoru, což naznačuje, že se skutečně podařilo zachytit (aspoň z velké části) sekretované proteiny. Dalším možným potvrzením je samotná funkce. Pomocí analýzy protein-proteinových interakcí (STRING; <http://string-db.org>) bylo odhaleno několik množin proteinů, které jsou zcela v souladu s již dříve identifikovanými proteiny ze sekretu rostlin. Jedná se o proteázy (např. DegP2 proteáza), enzymy metabolismu sacharidů (např. arabinóza kinázy 1), udržovatele buněčné stěny (např. celulóza syntáza) nebo redoxní homeostázy (například glutation transferáza), (Obr. 14).



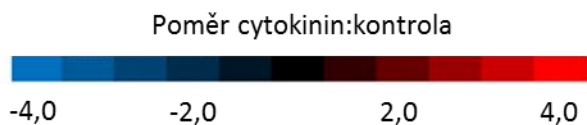
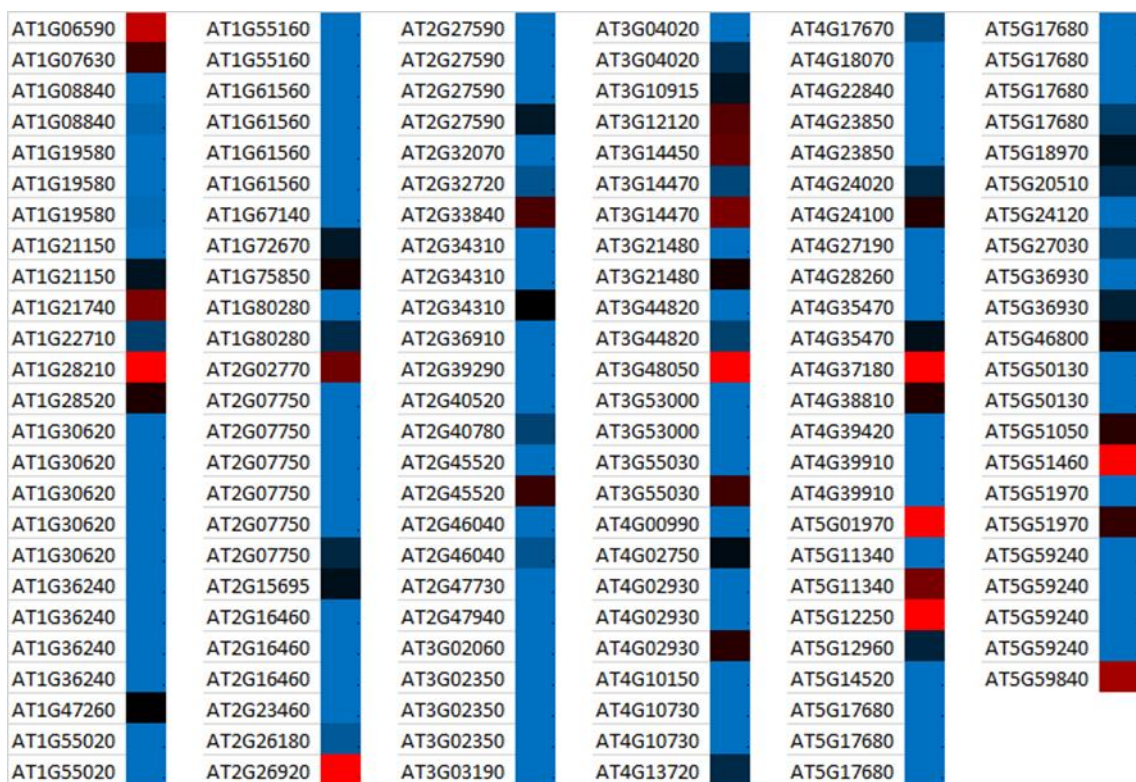
Obr. 14: Vzorové MS/MS spektrum



Obr. 15: Mapa protein-proteinových interakcí vytvořená v programu STRING 9.1 (<http://string-db.org>).

3.1.4 Efekt cytokininu na sekretované proteiny

Jedním z cílů této práce bylo pozorovat účinek rostlinného hormonu cytokininu na množství a případně typu sekretovaných proteinů. Cytokinin hraje roli v metabolismu dusíku a i fyziologické experimenty s *Arabidopsis thaliana* naznačily, že by mohl působit v případě využití proteinů jako zdroje dusíku pro růst rostlin. V rámci bakalářské práce byl proveden experiment s poměrně vysokou dávkou cytokininu (10 μ M), která při dlouhodobé expozici může být cytotoxická. I když experiment trval pouze 48 hodin, lze dle významné změny ve fenotypu usuzovat na toxické účinky. Celkově se podařilo identifikovat 321 proteinů, ale pro spolehlivější kvantifikaci (aspoň 10 přiřazených spekter) bylo možné použít jen 147. Pouze 37 z těchto proteinů nevykazovalo významné změny ve svém zastoupení (absolutní změna < 2,0), přičemž dva z nich nebyly nalezeny v kontrolních vzorcích. Významné snížení v reakci na přídavek cytokininu bylo patrné u sedmi proteinů, dalších 89 nebylo pak nalezeno vůbec (Obr. 15). Vzhledem k stavu rostlin nelze vyloučit, že tyto změny souvisí primárně s poškozením rostliny. Tomu může nasvědčovat i to, že pouze dva homology identifikovaných proteinů byly v minulosti nalezeny v odpovědi na cytokinin.



Obr. 16: Kvantitativní změny v zastoupení proteinů v kořenovém sekretu po přidavku cytokininu. Identifikované proteiny tabáku jsou označeny kódem odpovídajícím orthologu genu *Arabidopsis thaliana*.

4 ZÁVĚR

Dostatečné množství dusíku je limitující pro růst rostlin a rostlina se tak snaží využívat všechny dostupné zdroje. V této práci se podařilo prokázat, že se přídavek BSA projeví negativně na elongaci hlavního kořene. Jelikož jedním z faktorů elongace je dostupnost živin, lze toto zkrácení považovat za důkaz toho, že rostlina využívá BSA jako zdroj živin a toto je v souladu s dřívějšími publikacemi například od Paungfoo-Lonhienne et al., 2008. Využití mutantní linie *ahk2ahk3* pak ukázalo, že pro tento proces je klíčová cytokininová signální dráha. Pro odhalení dalších molekulárních mechanismů je nutné analyzovat sekret kořene a metody, které by k tomu vedly, byly naplní druhé části této práce. Rostlinné sekrety jsou důležitým nástrojem pro analýzu interakcí rostlin se svým okolím. Pro získání proteinů, které byly vylučovány kořeny tabáku, byla použita rychlá a jednoduchá metoda. Funkční analýzy a předpokládané lokalizace proteinů potvrzují, že většina z 361 identifikovaných proteinů patří mezi sekrety. Pro následující experimenty by bylo vhodné zkrátit expozici, jelikož cytokininy mají efekt na rostliny již v řádu hodin, mohla by kratší doba detekce vést k více identifikovaným proteinům. Dále by také bylo vhodné zvolit frakcionace, díky kterým by se mohlo odebírat více frakcí po kratších časových úsecích, než pouze po 48 hodinách. Lze totiž předpokládat, že sekretované proteiny mají omezenou životnost a v případě sekrece proteáz může docházet k přirozenému štěpení.

Část výsledků této práce byla prezentována na konferenci MendelNetu.

5 POUŽITÁ LITERATURA

ALEXANDERSSON, E., ASHFAQ, A., RESJÖ, S., & ANDREASSON, E. (2013). PLANT SECRETOME PROTEOMICS. *FRONTIERS IN PLANT SCIENCE*, 4, 9.

ARSOVA, B., KIERSZNIOWSKA, S., & SCHULZE, W. X. (2012). THE USE OF HEAVY NITROGEN IN QUANTITATIVE PROTEOMICS EXPERIMENTS IN PLANTS. *TRENDS IN PLANT SCIENCE*, 17(2), 102-112.

BAETZ, U., & MARTINOIA, E. (2014). ROOT EXUDATES: THE HIDDEN PART OF PLANT DEFENSE. *TRENDS IN PLANT SCIENCE*, 19(2), 90-98.

BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., & JONES, R. L. (2015). *BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS*. JOHN WILEY & SONS, s. 711.

BUCHANAN, BOB B., WILHELM. GRUISSEM A RUSSELL L. JONES. *BIOCHEMISTRY*. ROCKVILLE, MD.: AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, c2015. ISBN 09-430-8837-2. 1205, s. 787-824,

CAESAR, K., THAMM, A. M., WITTHÖFT, J., ELGASS, K., HUPPENBERGER, P., GREFFEN, C., & HARTER, K. (2011). EVIDENCE FOR THE LOCALIZATION OF THE ARABIDOPSIS CYTOKININ RECEPTORS AHK3 AND AHK4 IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*, ERR 238.

GANETEG, U., AHMAD, I., JÄMTGÅRD, S., AGUETONI-CAMBUI, C., INSELSBACHER, E., SVENNERSTAM, H., ... & NÄSHOLM, T. (2016). AMINO ACID TRANSPORTER MUTANTS OF ARABIDOPSIS PROVIDES EVIDENCE THAT A NON-MYCORRHIZAL PLANT ACQUIRES ORGANIC NITROGEN FROM AGRICULTURAL SOIL. *PLANT, CELL & ENVIRONMENT*.

GENT, L. A FORDE, B. G. (2017) HOW DO PLANTS SENSE THEIR NITROGEN STATUS? *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*. DOI: 10.1093/jxb/erx013. ISSN 0022-0957. DOSTUPNÉ Z:

[HTTPS://ACADEMIC.OUP.COM/JXB/ARTICLE/2986661/HOW](https://academic.oup.com/jxb/article/2986661/How)

GRUFFMAN, L., JÄMTGÅRD, S., &NÄSHOLM, T. (2014). PLANT NITROGEN STATUS AND CO-OCCURRENCE OF ORGANIC AND INORGANIC NITROGEN SOURCES INFLUENCE ROOT UPTAKE BY SCOTS PINE SEEDLINGS. *TREE PHYSIOL*, 34(2), s. 205-213.

HODGE, G. *PRAKTICKÁ BOTANIKA PRO MILOVNÍKY ROSTLIN: VÍCE NEŽ 3000 BOTANICKÝCH TERMÍNŮ: OBJEVUJTE A POZORUJTE*. PRAHA: GRADA, 2014. ISBN 978-80-247-5249-5. s. 92, 146

KINCL, M. A KRPEŠ, V. *ZÁKLADY FYZIOLOGIE ROSTLIN*. 2. DOPL. VYD. OSTRAVA: MONTANEX, 2000., **120** ISBN 80-722-5041-8.

LIPSON, D., &NÄSHOLM, T. (2001). THE UNEXPECTED VERSATILITY OF PLANTS: ORGANIC NITROGEN USE AND AVAILABILITY IN TERRESTRIAL ECOSYSTEMS. *OECOLOGIA*, 128(3), s. 305-316.

MATHEWS, CHRISTOPHER K. *BIOCHEMISTRY*. 4TH ED. TORONTO: PEARSON, c2013. ISBN 978-0-13-800464-4. 822-835, s. 786-824

McKEE, T., &McKEE, J. R. (2012). *BIOCHEMISTRY: THE MOLECULAR BASIS OF LIFE*. OXFORD: OXFORD UNIVERSITY PRESS. s. 497-500

MCLAREN, A. D., JENSEN, W. A., & JACOBSON, L. (1960). ABSORPTION OF ENZYMES AND OTHER PROTEINS BY BARLEY ROOTS. *PLANT PHYSIOLOGY*, 35(5), s. 549.

NÄSHOLM, T., KIELLAND, K., &GANETEG, U. (2009). UPTAKE OF ORGANIC NITROGEN BY PLANTS. *NEW PHYTOLOGIST*, 182(1), s. 31-48.

NĚMEC, B.A PASTÝRIK, L. *VŠEOBECNÁ BOTANIKA*. VYD. TŘETÍ. 1963, 554-555

NITROGEN . DOSTUPNÉ Z:

[HTTPS://WWW.CTAHR.HAWAII.EDU/MAUISOIL/C_NUTRIENTS01.ASPX](https://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/c_nutrients01.aspx)

NOVÁK, J. A SKALICKÝ M. *BOTANIKA: CYTOLOGIE, HISTOLOGIE, ORGANOLOGIE A SYSTEMATIKA*. 3. VYD. PRAHA: POWERPRINT, 2012. ISBN 978-80-87415-53-5. s. 72

PAUNGFOO-LONHIENNE, C., LONHIENNE, T. G., RENTSCH, D., ROBINSON, N., CHRISTIE, M., WEBB, R. I., ... & SCHMIDT, S. (2008). PLANTS CAN USE PROTEIN AS A NITROGEN SOURCE WITHOUT ASSISTANCE FROM OTHER ORGANISMS. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 105(11),

PAUNGFOO-LONHIENNE, C., SCHENK, P. M., LONHIENNE, T. G., BRACKIN, R., MEIER, S., RENTSCH, D., & SCHMIDT, S. (2009). NITROGEN AFFECTS CLUSTER ROOT FORMATION AND EXPRESSION OF PUTATIVE PEPTIDE TRANSPORTERS. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*, 60(9),

PROCHÁZKA, S. *FYZIOLOGIE ROSTLIN*. PRAHA: ACADEMIA, 1998. ISBN 80-200-0586-2, s. 102 – 106, 118, 217

RICHTER, R. (2004). *ASIMILACE DUSÍKU*. DOSTUPNÉ Z: [HTTP://WEB2.MENDELU.CZ/AF_221_MULTITEXT/VYZIVA_ROSTLIN/HTML/BIOGENNI_PRVKY/NASIMILACE.HTM](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/nasimilace.htm)

RICHTER, R. (2004). *SYMPTOMY NEDOSTATKU A NADBYTKU DUSÍKU*. DOSTUPNÉ Z: [HTTP://WEB2.MENDELU.CZ/AF_221_MULTITEXT/VYZIVA_ROSTLIN/HTML/BIOGENNI_PRVKY/NSYMPOTOMY.HTM](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/nsymptomy.htm)

SCHMIDT, S., NÄSHOLM, T., &RENTSCH, D. (2014). ORGANIC NITROGEN. *NEW PHYTOLOGIST*, 203(1), 29-31.

SVENNERSTAM, H., JÄMTGÅRD, S., AHMAD, I., HUSS-DANELL, K., NÄSHOLM, T., &GANETEG, U. (2011). TRANSPORTERS IN ARABIDOPSIS ROOTS MEDIATING UP TAKÉ OF AMINOACIDS AT NATURALLY OCCURRING CONCENTRATIONS. *NEW PHYTOLOGIST*, 191(2), 459-467.

TAIZ, L., & ZEIGER, E. *PLANT PHYSIOLOGY* [ONLINE]. 5. ED., INTERNATIONAL EDITION. SUNDERLAND, MASS: SINAUER, 2010 [CIT. 2017-02-25]. ISBN 978-087-8935-659. s. 73, 100, 259-272

TOKUNAGA, H., KOJIMA, M., KUROHA, T., ISHIDA, T., SUGIMOTO, K., KIBA, T., & SAKAKIBARA, H. (2012). ARABIDOPSIS LONELY GUY (LOG) MULTIPLE MUTANTS REVEAL A CENTRAL ROLE OF THE LOG-DEPENDENT PATHWAY IN CYTOKININ ACTIVATION. *THE PLANT JOURNAL*, 69(2), s. 355-365.

WATERWORTH, W. M., & BRAY, C. M. (2006). ENIGMA VARIATIONS FOR PEPTIDES AND THEIR TRANSPORTERS IN HIGHER PLANTS. *ANNALS OF BOTANY*, 98(1), s. 1-8.

ZEHNÁLEK, J., & VOJTĚCH, A. (2006). ASIMILACE DUSIČNANOVÉHO, AMONNÉHO A AMIDICKÉHO DUSÍKU U ZEMĚDĚLSKÝCH PLODIN. *CHEM. LISTY*, 100, 508-514.

6 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obr. 1: Koloběh dusíku v biosféře

Obr. 2: Rhizobium

Obr. 3: Projevy nedostatku dusíku

Obr. 4: Model aktivace TOR komplexu pomocí GLR receptorů spojených s Ca^{2+} iontovými kanály

Obr. 5: Nitrogenáza katalyzuje fixaci vzdušného dusíku

Obr. 6: Spotřeba a asimilace dusíku

Obr. 7: Specializované orgány masožravých rostlin

Obr. 8: Model transportu aminokyselin

Obr. 9: Kořeny rostlin *axenic Hakea* a *Arabidopsis thaliana*

Obr. 10: Kořenová špička s okolními buňkami a jejich výměšky

Obr. 11: Vliv přídatku BSA na elongaci hlavního kořene

Obr. 12: Účinek cytokininu na rostlinu tabáku

Obr. 13: Analýza kořenového exsudátu pomocí kryptického štěpení a LC-MS

Obr. 14: Vzorové MS/MS spektrum

Obr. 15: Mapa protein-proteinových interakcí vytvořená v programu STRING 9.1

Obr. 16: Kvantitativní změny v zastoupení proteinů v kořenovém sekretu po přídatku cytokininu

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AAP1, AAP5 Aminokyselinové permeázy (*amino acid permeases*)
- ABA Kyselina abscisová
- ACN Acetonitril
- ADP Adenosindifosfát
- ATM Amonné transportéry
- ATP Adenosintrifosfát
- BPC (*Base Peak Chromatogram*)
- BSA Hovězí sérový albumin (*Bovine serum albumin*)
- EDTA Kyselina ethylendiamintetraoctová (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
- FAD Flavinadenindinukleotid
- FDR False discovery rate
- GLR (glutamate-like receptors)
- GOGAT Glutamin: 2-oxoglutarátaminotransferáza (glutamátsyntáza)
- GS1, GS2 Izoformy glutaminsyntetázy
- HATS Vysokoafinitní transportéry
- CHL Dusičnanové transportéry
- LATS Nízkoafinitní transportéry
- LC/MS Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní chromatografií
- LHT1 Lysin histidin transportér
- MS/MS Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem mass spectrometry)
- NiR Nitritreduktáza
- NR Nitrátreduktáza
- NRT Dusičnanové transportéry
- OPT Oligopeptidové transportéry
- PSM (*Peptide spectrum match*)
- PTR Peptidové transportéry
- SDS Dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)

SDS - PAGE Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného

TCA Kyselina trichloroctová

TIC (*Total ion current chromatogram*)

TOR KOMPLEX (Target of rapamycin)

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VPS34 Třídící protein vakuol

8 PŘÍLOHY

Bugárová V., Zronková V., a Medved'ová Z. (2016): *Analysis of root secreted proteins in Nicotiana tabacum*. In POLÁK, O., CERKAL, R., BŘEZINOVÁ BELCREDI N. *MendelNet 2016 – Proceedings of international PhD Students Conference*. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, 2016, s. 956-960. ISBN 978-80-7509-443-8.

ANALYSIS OF ROOT SECRETED PROTEINS IN *NICOTIANA TABACUM*

VERONIKA BUGAROVA, VERONIKA ZRONKOVA, ZUZANA MEDVEDOVA

Department of Molecular Biology and Radiobiology

Mendel University in Brno

Zemedelska 1, 613 00 Brno

CZECH REPUBLIC

bugarova9@gmail.com

Abstract: Plant secretomics is a new and largely unexplored area of the plant proteomics. Evidence is emerging on the important role of secreted proteins in plant's interactions with its environment. Here, we tested a hydroponic-based cultivation of *Nicotiana tabacum* and analyzed root secreted proteins that accumulated within 48 h. Altogether, more than 350 proteins were detected in the hydroponic medium.

Key Words: secretome, roots, LC-MS, proteome

INTRODUCTION

In plant cells, many proteins undergo secretion to the extracellular space in order to maintain cell structure, regulate the external environment or as a part of signaling and defense mechanisms. Plant secretomes have been studied in natural conditions, during nutritional deficiency, biotic and abiotic stress or after hormone treatment (Alexandersson et al. 2013). Previous analyses of plant secretome have shown that hundreds of proteins are secreted into the apoplast. These proteins constitute the interface between the plant cell and its environment and present an excellent framework for identification of biomarkers for signal and stress cues and biotic interactions. To identify apoplastic proteins, a cell culture experiment or vacuum-assisted extraction from separated plant organs have been used. Here, to analyze proteins secreted by an intact healthy plant into its environment, we tried to extract proteins secreted by plant roots in a hydroponic culture.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Plants of *Nicotiana tabacum* (SR1) were cultivated in ½ Murashige-Skoog medium in a hydroponic culture (e.g. Skalák et al. 2016). After four weeks, plantlets were separated into 15 ml tubes with 10 ml of hydroponic medium. Root secretome was collected after 48 h.

Protein extraction

The collected secretome was precipitated by acetone/TCA, dissolved in urea and digested with 20 µl of an immobilized trypsin (Promega) (Černý et al. 2014, Novák et al. 2015). The resulting tryptic digests were desalted by C18 SPE (Černý et al. 2013).

LC-MS proteome analysis

Analyses were performed using a combination of an SDS polyacrylamide gel electrophoresis separation (PAGE) and a gel-free shotgun protocol based on nano-HPLC and MS/MS (Baldrianová et al. 2015). Briefly, tryptic digests were dissolved in 0.5% (v/v) formic acid in 5% (v/v) acetonitrile, and then analyzed by nanoflow C18 reverse-phase liquid chromatography using a 40 cm column (0.075 mm inner diameter; NanoSeparations) and a Dionex Ultimate 3000 RSLC nano-UPLC system (Thermo) directly coupled to a CaptiveSpray nanoESI source (Bruker) and an UHR maXis impact q-TOF mass spectrometer (Bruker). Peptides were eluted with up to a 120-min, 4% to 40% acetonitrile gradient. Spectra were acquired at 2 Hz (MS) and 10 to 20 Hz (MS/MS) using an intensity-dependent mode with a total cycle time of 7 s.

Protein identification

The measured spectra were extracted by Bruker's Data Analysis 4.1 and processed as described previously (e.g. Cerna et al. 2016). In brief, recalibrated MGF files were searched against *Nicotiana* protein database (*N. tabacum* TN-90, Solgenomics, 7/2016) by Sequest HT, MS Amanda and Mascot 2.4 with the following parameters: Enzyme - trypsin, max two missed cleavage sites; Mass tolerance - 35 ppm (MS) and 0.1 Da (MS/MS); Modifications - up to three dynamic modifications including Met oxidation, Asn/Gln deamidation, Lys methylation, N-terminal acetylation, Ser/Thr/Tyr phosphorylation.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of proteins secreted by tobacco roots

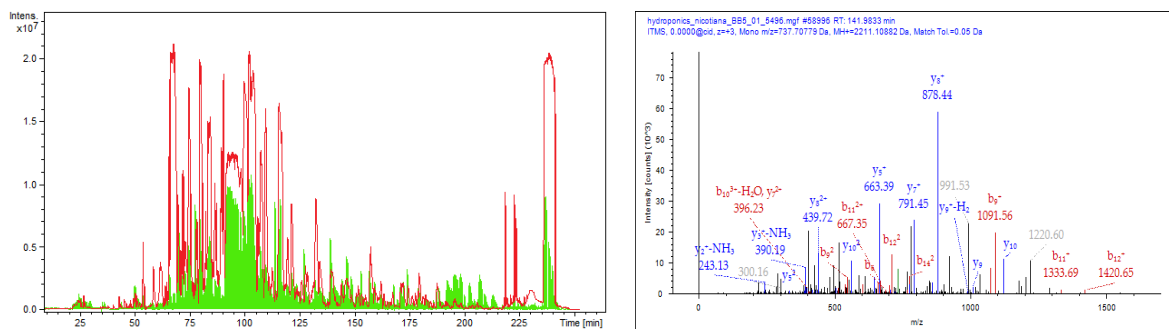
Proteins were precipitated and extracted as described in Materials and Methods. Two independent experimental replicates were analyzed, each consisting of extracts from at least three plants. Proteins were digested and analyzed by an LC-MS (Figure 1). To increase the proteome coverage, one replicate was prefractionated by one-dimensional PAGE. Altogether, 361 protein groups were identified (FDR < 1%). However, we note that even though the number of assigned peptide spectral matches (PSMs) is high (median >15), all of these identifications are based only on a single proteotypic peptide match per a protein group.

Function of proteins identified in root secretome

Annotations for tobacco genes/proteins are not comparable to those of other model plants. To elucidate functional relevance of identified secreted proteins, we employed annotations for homologous genes in *Arabidopsis thaliana* (TAIR 10 database) and analyzed the resulting dataset by STRING (<http://string-db.org>). String analysis highlighted several categories that are well in line with previously identified proteins in plants' secretome, including proteases (e.g. DegP2 protease), enzymes of carbohydrate metabolism (e.g. arabinose kinase 1), cell wall maintenance (e.g. cellulose synthase) or redox homeostasis (e.g. glutathione transferase) (Figure 2).

Figure 1 LC-MS analysis of root exudate tryptic digest

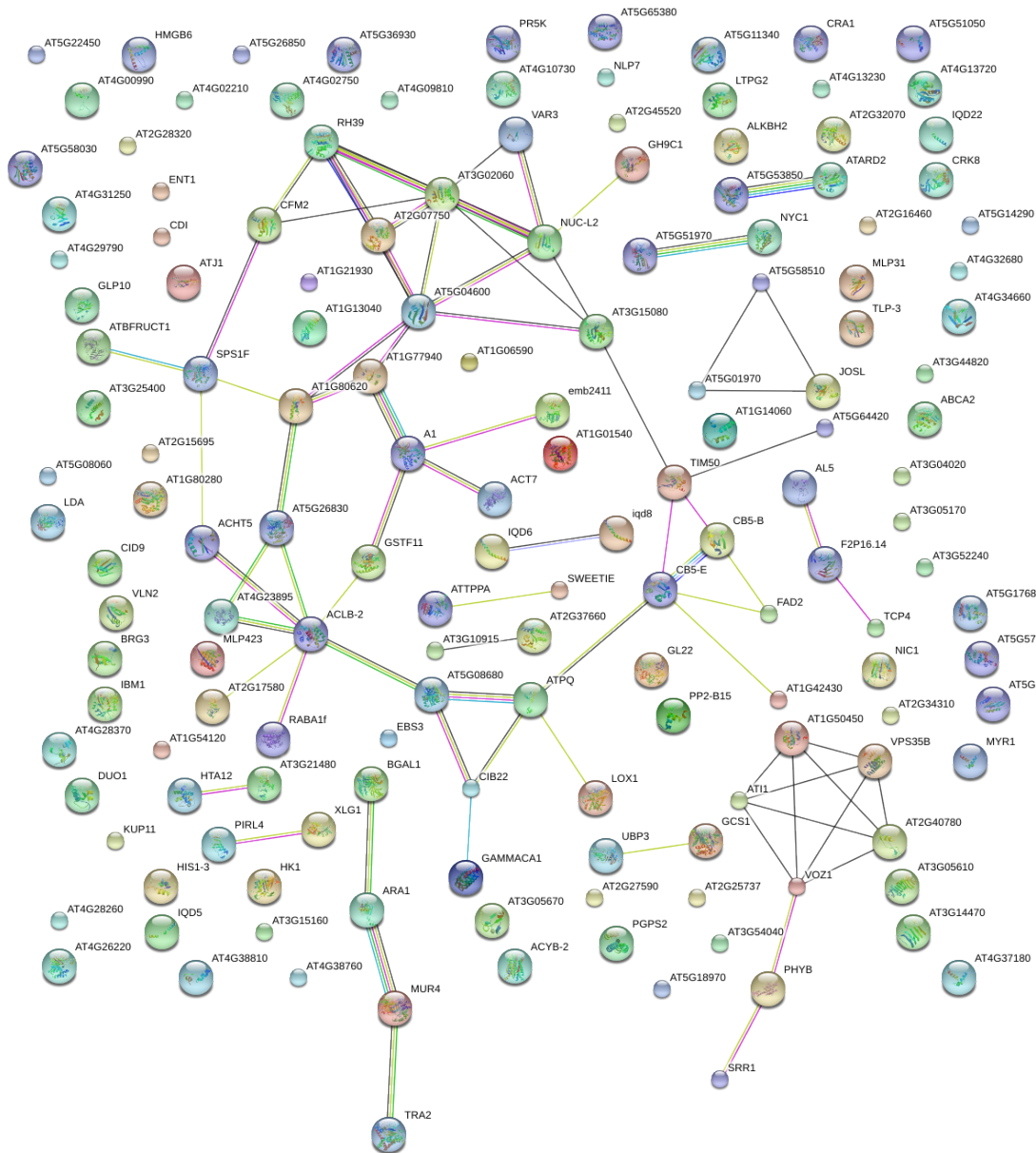
A) Representative base peak chromatogram (red) and MS/MS total ion chromatogram (green) B) Representative MS/MS spectrum



Predicted localization of identified proteins

SUBA3 *Arabidopsis* database was used to determine localization of identified proteins. The experimental evidence is lacking for most of the detected proteins (less than 10%) and thus the analysis is based only on available predictions. In total, only six exclusively extracellular proteins were found. However, 74 of 203 identified *Arabidopsis* homologues are predicted to localize (among others) into extracellular space.

Figure 2 Protein–protein interaction network constructed using STRING



CONCLUSION

Plant secretomics are an important tool to analyze plant's interactions with its environment. Here, we employed a simple and fast technique to obtain proteins secreted by tobacco roots. Methods employed in secretome analyses often result in experimental artifacts, e.g. by a cell lesion that contaminates the secretome with content of damaged cells. Here, the plants were cultivated in the same environment and thus any contamination would most likely be a result of natural process. Indeed, functional analysis and predicted localizations indicate that most of 361 identified proteins truly belong to plant secretome.

ACKNOWLEDGEMENTS

The results of this research have been acquired within CEITEC 2020 (LQ1601) project with financial contribution made by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic within special support paid from the National Programme for Sustainability II funds.

REFERENCES

- Alexandersson, E., Ali, A., Resjö, S., Andreasson, E. 2013. Plant secretome proteomics. *Frontiers in Plant Science*, 4: 9.
- Baldrianová, J., Černý, M., Novák, J., Jedelský, P.L., Divišková, E., Brzobohatý, B. 2015. Arabidopsis proteome responses to the smoke-derived growth regulator karrikin. *Journal of Proteomics*, 120: 7–20.
- Cerna, H., Černý, M., Habánová, H., Šafářová, D., Abushamsiya, K., Navrátil, M., Brzobohatý, B. 2016. Proteomics offers insight to the mechanism behind *Pisum sativum* L. response to Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV). *Journal of Proteomics*, In Press. doi:10.1016/j.jprot.2016.05.018
- Černý, M., Kuklová, A., Hoehenwarter, W., Fagner, L., Novák, O., Rotková, G., Jedelský, P.L., Žáková, K., Šmehilová, M., Strnad, M., Weckwerth, W., Brzobohatý, B. 2013a. Proteome and metabolome profiling of cytokinin action in Arabidopsis identifying both distinct and similar responses to cytokinin down- and up-regulation. *Journal of Experimental Botany*, 64(14): 4193–4206.
- Černý, M., Jedelský, P.L., Novák, J., Schlosser, A., Brzobohatý, B. 2014. Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 37(7): 1641–1655.
- Novák, J., Černý, M., Pavlů, J., Zemánková, J., Skalák, J., Plačková, L., Brzobohatý, B. 2015. Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root-to-hypocotyl ratio changes induced by shading roots of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiology*, 56(5): 1006–1018.
- Skalák, J., Černý, M., Jedelský, P., Dobrá, J., Ge, E., Novák, J., Hronková, M., Dobrev, P., Vanková, R., Brzobohatý, B. 2016. Stimulation of ipt overexpression as a tool for elucidation of the role of cytokinins in high temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(9): 2861–2873.