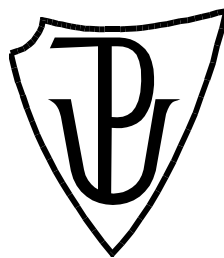


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Proteomická analýza regulace cytoskeletu v kořenech  
*Arabidopsis thaliana* pomocí cytoskeletálních inhibitorů**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Lenka Kabrdová</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.</b>
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 1.8.2014

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za odborné rady, věcné připomínky, ochotu a pomoc při zpracovávání této práce. Také bych chtěla poděkovat RNDr. S. Bekešové, Ph.D. a Ing. P. Vadovičovi, Ph.D. za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce. Dále bych ráda poděkovala Prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi DrSc. a celému oddělení buněčné biologie za umožnění vypracování experimentální části diplomové práce doplněného příjemnou atmosférou a ochotou poradit a pomoci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přáteli za podporu při studiu. Práce byla podporovaná grantem IGA projekt č. PřF\_2013\_011 ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci. Proteomická analýza MAPK mutantů *Arabidopsis*. Řešitelem projektu je Prof. RNDr. Jozef Šamaj DrSc.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Lenka Kabrdová
Název práce	Proteomická analýza regulace cytoskeletu v kořenech <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí cytoskeletálních inhibitorů.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení buněčné biologie
Vedoucí práce	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

### **Abstrakt**

Rostlinný cytoskelet je významná součást rostlinné buňky, která jí zajišťuje nejen mechanickou oporu, ale také se podílí na mnoha v ní probíhajících fyziologických procesech. Proto je důležité poznat mechanismus funkce, dynamiky a regulace cytoskeletálních částí, mikrotubulů a aktinových filament. Jedním ze způsobů zkoumání cytoskeletu je působení cytoskeletálních inhibitorů na buňky a pozorování změn mezi buňkami ovlivněnými inhibitorem a kontrolními buňkami. Mikroskopickým pozorováním *in vivo* byly sledovány účinky oryzalinu a latrunkulinu B na mikrotubuly v kořenech *Arabidopsis thaliana*. Pomocí dvou nezávislých proteomických přístupů, bezgelový a gelový, byly sledovány změny proteomu v kořenech *Arabidopsis thaliana*, které doprovázejí změny polymerizace aktinu a mikrotubulů po ošetření cytoskeletálními inhibitory. Optimalizovanou metodou 2D imunoblotování byly detekovány a separovány isoformy aktinu a sledovány posttranslační modifikace  $\alpha$ -tubulinu na základě změny isoelektrického bodu. Změny abundance  $\alpha$ -tubulinu a aktinu byly zjištěny metodou 1D imunoblotování.

Klíčová slova	Proteomika, tubulin, aktin, posttranslační modifikace, oryzalin, latrunkulin B, cytochalasin D
Počet stran	114
Počet příloh	2
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Lenka Kabrdová
Title	Proteomic analysis of cytoskeleton regulation in the roots of <i>Arabidopsis thaliana</i> using cytoskeletal inhibitors.
Type of thesis	Master
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Cell Biology
Supervisor	Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2014

### **Abstract**

The plant cytoskeleton is an important part of the plant cell which provides not only mechanical support but also contributes to many physiological processes in the cell. Therefore, it is important to understand the mechanism of function, dynamics and regulation of cytoskeletal components, microtubules and actin filaments. Cytoskeletal inhibitors proved to be a valuable tool for the examination of the cytoskeleton. Within this diploma thesis, changes of *Arabidopsis thaliana* root proteome accompanying the disturbed actin and microtubule polymerization induced by cytoskeletal inhibitors were monitored using two independent proteomic approaches, including gel free (LC-MSE) and gel based (two-dimensional electrophoresis coupled to MALDI TOF TOF). Additionally, the effects of these inhibitors on the microtubules in roots of *Arabidopsis thaliana* were observed by confocal laser scanning microscopy *in vivo*. We also used two-dimensional immunoblotting in roots treated by inhibitors for *Arabidopsis* actin and tubulin isoforms differentiation as well as for the detection of putative posttranslational modifications. The changes of  $\alpha$ -tubulin and actin abundance were detected by 1D immunoblotting .

Keywords	Proteomics, tubulin, actin, posttranslational modification, oryzalin, latrunculin B, cytochalasin D
Number of pages	114
Number of appendices	2
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Rostlinný cytoskelet</b>	<b>10</b>
2.1.1	Tubulin	10
2.1.1.1	Struktura tubulinu	11
2.1.1.2	Polymerizace a depolymerizace tubulinu, stavba mikrotubulů	12
2.1.1.3	Posttranslační modifikace rostlinného tubulinu	14
2.1.2	Aktin	17
2.1.2.1	Struktura aktinu	18
2.1.2.2	Polymerizace a depolymerizace aktinu, stavba aktinových mikrofilament	20
2.1.2.3	Posttranslační modifikace rostlinného aktinu	21
2.1.3	Propojení aktinové a mikrotubulové rostlinné cytoskeletární sítě	22
<b>2.2</b>	<b>Inhibitory</b>	<b>23</b>
2.2.1	Oryzalin	23
2.2.1.1	Subcelulární efekty oryzalinu	25
2.2.2	Latrunkulin B	27
2.2.2.1	Subcelulární efekty latrunkulinu B	27
2.2.3	Cytochalasin D	29
2.2.3.1	Subcelulární efekty cytochalasinu D	30
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Biologický materiál</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemikálie</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Přístroje</b>	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>Programy</b>	<b>34</b>
<b>3.5</b>	<b>Metody</b>	<b>34</b>
3.5.1	Příprava rostlinného homogenátu	34
3.5.1.1	Fenolová extrakce proteinů	34
3.5.1.2	Precipitace extrahovaných proteinů	35
3.5.2	Mikroskopické pozorování živých buněk pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie	35
3.5.3	LC MS (ESI) analýza (bezgelová proteomická analýza)	36
3.5.4	Proteomická analýza pomocí 2D elektroforézy (gelová proteomická analýza)	37
3.5.4.1	Barvení gelů pomocí koloidální coomassie blue a kvantifikace denzity skvrn	38
3.5.4.2	Štěpení proteinů v gelu a MALDI TOF-TOF analýza	38
3.5.5	Imunoblotování	40
3.5.5.1	1D imunoblotování	40
3.5.5.2	2D imunoblotování	41

3.5.5.3	Přenos proteinů z gelu na membránu	41
3.5.5.4	Charakteristika použitých primárních protilátek	42
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Mikroskopické pozorování mikrotubulů <i>in vivo</i> v hypokotylech <i>Arabidopsis</i> po vlivu oryzalinu a latrunkulinu B</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Proteomické analýzy</b>	<b>45</b>
4.2.1	Bezgelová proteomická analýza	45
4.2.2	Gelová proteomická analýza	53
4.2.3	Charakterizace změn proteomu kořenů <i>Arabidopsis</i> po ovlivnění oryzalinem	56
4.2.4	Charakterizace změn proteomu kořenů <i>Arabidopsis</i> po ovlivnění latrunkulinem B	57
4.2.5	Porovnání účinků oryzalinu a latrunkulinu B na proteomické úrovni	58
4.2.6	Funkce vybraných proteinů se změněnou abundancí	60
<b>4.3</b>	<b>Analýza abundance <math>\alpha</math>-tubulinu a aktinu po ovlivnění inhibitory pomocí imunoblotování</b>	<b>61</b>
4.3.1	2D imunoblotová analýza $\alpha$ -tubulinu a aktinu v kořenech <i>Arabidopsis</i> ovlivněných oryzalinem	63
4.3.2	Analýza abundance $\alpha$ -tubulinu a aktinu v kořenech <i>Arabidopsis</i> po působení cytochalasinu D	66
4.3.3	Analýza abundance alfa-tubulinu a aktinu v kořenech <i>Arabidopsis</i> po působení latrunkulinu B	69
<b>5</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	<b>87</b>

# CÍLE PRÁCE

## **Teoretická část**

Vypracování literární rešerše na téma:

Rostlinný cytoskelet

Regulace dynamiky cytoskeletu

## **Praktická část**

Mikroskopické pozorování mikrotubulů *in vivo* po vlivu oryzalinu a latrunkulinu B

Analýza změn proteomu kořenů *Arabidopsis thaliana*, které doprovázejí změny polymerizace aktinu a mikrotubulů

Monitorování změn abundance  $\alpha$ -tubulinu a aktinu po aplikaci inhibitorů pomocí 1D a 2D imunoblotování



## 1 ÚVOD

Všechny rostliny obsahují ve svých buňkách v cytoplasmě síť proteinových vláken – cytoskelet, jehož funkce jsou pro rostliny zásadní a lze je rozdělit na statické a dynamické. Mezi statické funkce cytoskeletu patří jeho vliv na buněčný tvar a vnitřní strukturu buňky. Díky své dynamické povaze je cytoskelet také zapojen do procesů spojených s pohybem, jako je například buněčné dělení, změna tvaru buňky nebo reakce na změny v okolí (Alberts *et al.*, 2008). Rostlinný cytoskelet obsahuje dvě základní části – mikrotubuly a aktinová filamenta.

Mikrotubuly složené z dimerů  $\alpha/\beta$ -tubulinu a aktinová vlákna tvořená z monomerů aktinu mohou být ovlivněny vazbou cytoskeletálních inhibitorů, které regulují jejich strukturu a dynamiku (Baluška *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2004). Užitím těchto inhibitorů, které ovlivňují cytoskeletální složky, je umožněno studium funkcí cytoskeletu porovnáním rostlin ošetřených inhibitory s kontrolními rostlinami inhibitory nedotčenými. Každý cytoskeletální inhibitor má svůj molekulární cíl, na který se váže a následně ovlivňuje cytoskelet. V této práci použitý oryzalin se specificky váže na  $\alpha$ -podjednotku tubulinu, čímž ovlivňuje stabilitu a dynamiku mikrotubulů, a tudíž i jejich subcelulární efekty (Hughdahl a Morejohn, 1993). Latrunkulin B (latB) a cytochalasin D (cytD) jsou inhibitory regulující aktinová filamenta (Katelaar *et al.*, 2003). Charakterizace specifity účinku cytoskeletálních inhibitorů je proto důležité téma pro výzkum. Pro studium vlastností cytoskeletálních inhibitorů a jejich účinků na cytoskelet lze použít proteomické metody. Bezgelovým a gelovým proteomickým přístupem je mimo jiné možné identifikovat nové proteiny, které regulují dynamiku cytoskeletu (Takáč *et al.*, 2011) nebo zkoumat změny proteomu rostlin po ovlivnění inhibitory ve srovnání s inhibitorem neovlivněnými kontrolními rostlinami (Takáč *et al.*, 2013).

Aktiny i tubuliny se mohou vyskytovat v různých isoformách, které se liší isoelektrickým bodem a nepatrně molekulovou hmotností v rámci jednoho kDa (www.tair.org). Díky svým odlišnostem mezi sebou mají vysokou variabilitu účinků, která může být ještě navýšena o jejich posttranslační modifikace (Jovanović *et al.*, 2010). Pro separaci tubulinových a aktinových isoform a také detekci posttranslačních modifikací může být použita metoda 2D imunoblotování.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rostlinný cytoskelet

Cytoskelet je považován za vnitřní lešení buňky. Dává buňce tvar, fyzickou pevnost a správnou vnitřní strukturu. Cytoskelet je dynamický útvar, který zajišťuje buňce její růst, pohyb, dělení a vnitrobuněčný transport. Je složen ze tří typů vláken: středních filament, mikrotubul a aktinových filament.

Střední filamenta jsou charakteristická jen pro živočišné buňky a jsou složena z proteinů, které vytvářejí vlákna. Střední filamenta lze najít jako jadernou laminu nebo mohou vést přes cytoplasmu do desmosomů a dávat tím buňce pevnost. Mikrotubuly zajišťují vnitřní uspořádání buňky, vnitrobuněčný transport, vytvářejí dělicí vřeténko při buněčném dělení a zajišťují tvorbu polaritu buňky (Alberts *et al.*, 2008; Blume *et al.*, 2010). Mikrotubuly ovlivňují stavbu buněčné stěny a dělení buněk prostřednictvím několika typů mikrotubulů specifických pro rostlinné systémy. Mezi tyto skupiny patří kortikální mikrotubuly, mitotické mikrotubuly a endoplasmatické mikrotubuly. Kortikální mikrotubuly jsou vysoce dynamické, ovlivňují hlavně morfologii buňky a jsou zapojeny například do určování orientace celulosových mikrofibril. Mitotické mikrotubuly se podílí na tvorbě preprofázního svazku vymezujícího rovinu následného dělení buněk, a fragmoplastu, který se podílí na tvorbě nové buněčné stěny (Ludwig *et al.*, 1987). Endoplasmatické mikrotubuly spojují jádra k vrcholové oblasti kořenových vlásků (Lloyd *et al.*, 1987) a ovlivňují jejich vrcholový růst a orientaci (Bibikova *et al.*, 1999). Aktinová vlákna tvoří buněčný kortex, který dává buňce pevnost, umožňuje změnu tvaru a pohyb. Dalšími funkcemi aktinových vláken jsou: dělení, pučení, endocytosa, transport, přenos signálů (Komis *et al.*, 2011).

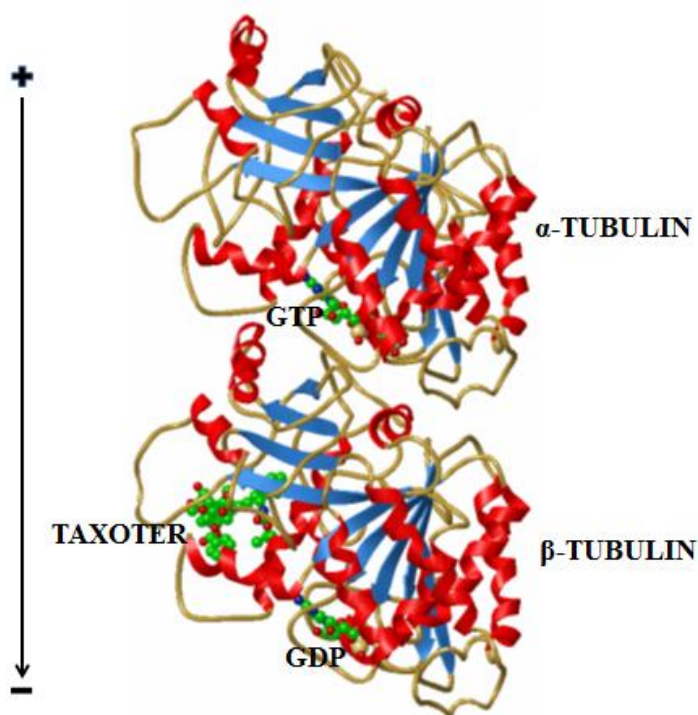
#### 2.1.1 Tubulin

Tubulin je protein o molekulové hmotnosti přibližně 50 kDa, má důležitou roli v procesu buněčného dělení, chromosomové separace, kontroly buněčné symetrie a polaritu růstu, ukládání celulosy a vnitrobuněčného přenosu. Tubulin ve formách  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  se vyskytuje ve všech eukaryotách.  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -tubuliny jsou základní stavební jednotky mikrotubul. Další formy tubulinu  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ , které ovšem nevytváří polymerní struktury, byly nalezeny v prvocích, ale nikoliv v suchozemských rostlinách a houbách (Breviario *et al.*, 2013).

Rostlinný  $\alpha$ -tubulin vykazuje vysoký stupeň homologie k  $\alpha$ -tubulinům prvoků a živočichů, což naznačuje, že strukturální protein je vysoce konzervovaný během evoluce. U *Arabidopsis thaliana* byla dokázána existence celkem 15 tubulinových genů. Do  $\alpha$ -tubulinové genové rodiny patří 6 členů, přičemž kódují pouze 4 odlišné isoformy  $\alpha$ -tubulinu.  $\alpha$ -tubulin 2 (TUA2) a  $\alpha$ -tubulin 4 (TUA4) kódují jednu isoformu, stejně jako  $\alpha$ -tubulin 3 (TUA3) a  $\alpha$ -tubulin 5 (TUA5). V genové rodině  $\beta$ -tubulinu se nachází 9 genů (Kopczak *et al.*, 1992; Snustad *et al.* 1992). Isoformy tubulinu jsou lokalizovány na specializované buňky, ale tkáňe exprimují většinou více isoform, a proto mohou být mikrotubuly tvořeny různými kombinacemi  $\alpha/\beta$ -heterodimerů tubulinu (Miller *et al.*, 2010).

### 2.1.1.1 Struktura tubulinu

$\alpha$  a  $\beta$ -tubuliny mají 40% aminokyselinovou sekvenční identitu (Nogales *et al.*, 1998). Nasyntetizované  $\alpha$  a  $\beta$ -tubulinové proteiny podstupují proces skládání za pomoci chaperoninů a kofaktorů jak v případě monomeru tak dimeru (Lewis a Cowan, 2002; Steinborn *et al.*, 2002). V roce 1998 byl představen atomový model  $\alpha/\beta$ -dimeru tubulinu na základě denzitní mapy s rozlišením 3,7 Å získané pomocí elektronové krystalografie zinkem indukovaných tubulinových listů. Denzitní mapy  $\alpha$  a  $\beta$ -tubulinu se nepatrně liší v délce a konformaci některých smyček a v lehkých posunech některých sekundárních strukturních elementů. Na Obr. 1. je páskový model  $\alpha/\beta$ -dimeru tubulinu. Struktury  $\alpha$  a  $\beta$ -tubulinu jsou si velmi podobné. Jádro každého monomeru obsahuje dvě části se strukturou  $\beta$ -listů, čtyřvláknovou a šestivláknovou, které jsou obklopeny 12  $\alpha$ -hélixy (Nogales *et al.*, 1998). Tubulin obsahuje ve své struktuře 3 hlavní domény: N-koncovou nukleotid (GTP/GDP) vázající doménu, střední doménu vázající taxol a C-koncovou ligand (proteinové motory, mikrotubuly-asociované proteiny MAP) vázající doménu (Freedman *et al.*, 2011). Každý tubulinový monomer váže guaninový nukleotid, který je nevyměnitelný, pokud je navázán na  $\alpha$ -podjednotku tubulinu nebo N stranu, a zaměnitelný v případě vazby na  $\beta$ -podjednotku tubulinu nebo E stranu (Nogales *et al.*, 1998).



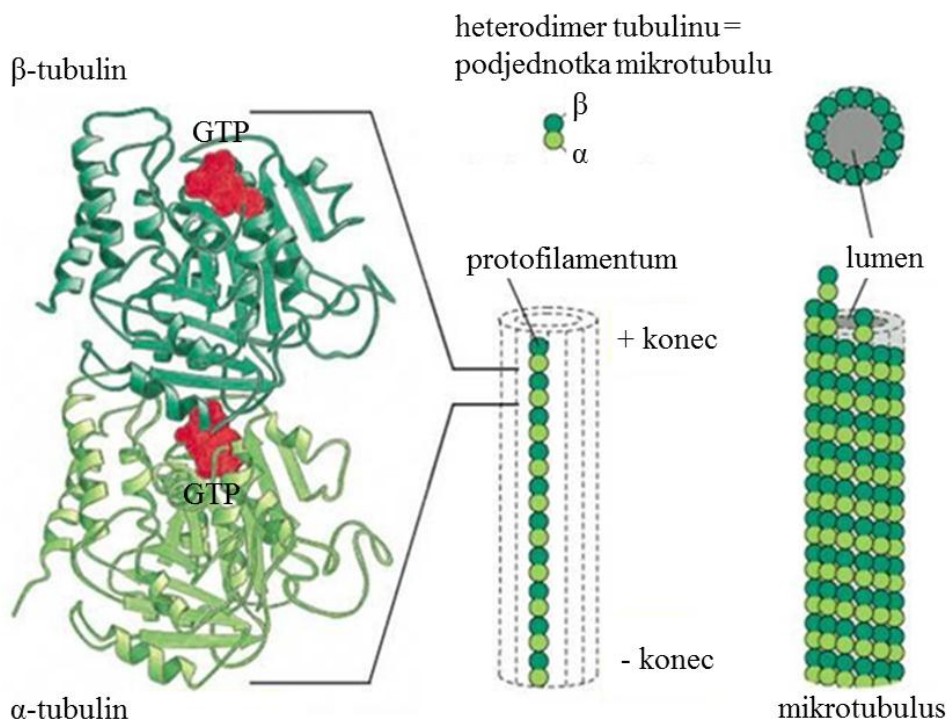
Obr. 1: Čelní pohled struktury dimeru  $\alpha/\beta$ -tubulinu.  $\alpha$ -tubulin (nahore) s navázaným GTP (zeleně) a  $\beta$ -tubulin (dole) s navázaným GDP (zeleně) a taxoterem (zeleně). Taxoter je analog taxolu, kde C-10 acetyl je nahrazen hydroxylem a C-3' a benzamid nahrazen N-t-BOC skupinou.  $\beta$ -listy jsou zobrazeny modře,  $\alpha$ -hélixy červeně. Šipka ukazuje směr protofilamanta a osu mikrotubulu. Polarita s mínus koncem nahore na  $\alpha$ -podjednotce a plus koncem dole na  $\beta$ -podjednotce je označena. Upraveno dle Nogales *et al.* (1998).

### 2.1.1.2 Polymerizace a depolymerizace tubulinu, stavba mikrotubulů

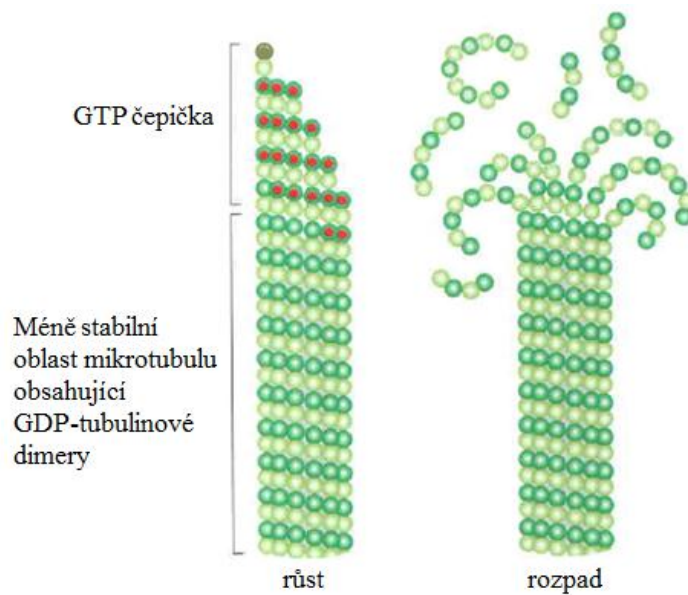
Místa začátku růstu mikrotubulů u rostlin, nukleační místa, se nachází na mikrotubulových centrech, která jsou difuzní a mobilní, a která v závislosti na stadiu buněčného cyklu a vývoji mění tvar a lokaci (Brown and Lemmon, 2007). Nukleační místa jsou tvořena  $\gamma$ -tubuliny a proteiny  $\gamma$ -tubulinového komplexu (GCP). Jednotkou nukleačního jádra je malý komplex  $\gamma$ -tubulinu obsahující jednu molekulu  $\gamma$ -tubulinu asociovanou s jednou molekulou GCP2 a jednou molekulou GCP3 (Seltzer *et al.*, 2007). U vyšších rostlin lze najít také větší komplex  $\gamma$ -tubulinu s dalšími příslušnými GCP proteiny, které jsou homologní s GCP proteiny obsaženými v komplexu  $\gamma$ -tubulinového kruhu u živočichů (Erhardt *et al.*, 2002). U *Arabidopsis* byly nalezeny GCP3 proteiny, GIP1 a GIP2, které jsou součástí  $\gamma$ -tubulinového komplexu. Tyto proteiny určují lokalizaci proteinů  $\gamma$ -tubulinového komplexu, integritu vřeténka, stabilitu a oddělování chromosomů (Janski *et al.*, 2012).

Mikrotubuly jsou složeny z tubulinů  $\alpha$  a  $\beta$ , který vytváří dimer.  $\alpha/\beta$ -tubulinové dimery jsou 8 nm dlouhé a obsahují variabilní C-koncovou doménu, která dosahuje vně

mikrotubulů. Dimery tubulinu reagují příčně i podélně za tvorby protofilamentů (Nogales *et al.*, 1999). Postranní vazby tubulinů jsou podstatně slabší než podélné vazby v rámci protofilamentů (Sept *et al.*, 2003). Následně uspořádáním protofilamentů do cylindrové struktury vznikne mikrotubulus. Mikrotubulus, který je obvykle tvořen 13 protofilamenty, má tvar trubice o průměru ~25 nm s polárními konci, což hraje roli při tvorbě a funkci mikrotubulů a také při směru transportu (Downing a Nogales, 1998; Nogales *et al.*, 1999; Obr. 2). Každý volný dimer tubulinu obsahuje ve svém nukleotid vázajícím místě navázané GTP, které je po vazbě dimeru na mikrotubulus hydrolyzováno na GDP, čímž se změní konformace a tudíž i pevnost vazby. V závislosti na rychlosti růstu a hydrolýzy GTP dochází k polymerizaci nebo depolymerizaci mikrotubulů. Pokud má navazování  $\alpha/\beta$ -tubulinu s navázaným GTP vyšší rychlost než je rychlost hydrolýzy GTP na GDP, dochází k tvorbě GTP-čepičky a růstu mikrotubulu. V opačném případě nastává rychlá degradace mikrotubulu, kdy se uvolněné tubuliny s navázaným GDP vrací zpět do cytosolu, ve kterém proběhne výměna GDP za GTP (Obr. 3; Alberts *et al.*, 2008).



Obr. 2: Tvorba mikrotubulů z dimerů tubulinu. Dimer  $\alpha/\beta$ -tubulinu (vlevo) s navázaným GTP (červeně) je základní podjednotkou mikrotubulu. Mnoho sousedních podjednotek se stejnou orientací tvoří protofilamentum s polárními konci. Mikrotubulus je tuhá dutá trubice vytvořená z 13 paralelně seřazených mikrofilament. Upraveno dle Alberts *et al.* (2008).



Obr. 3: Růst a rozpad mikrotubulů. V neporušených mikrotubulech, mikrofilamenta tvořená GDP-tubulinovými podjednotkami jsou tlačena do lineární konformace pomocí postranních vazeb v rámci mikrotubulové stěny. Stabilní mikrotubuly obsahují na plus konci GTP-čepičku tvořenou GTP-tubulinovými podjednotkami (červeně). Ztrátou GTP čepice dochází k relaxaci GDP-vázajících protofilament do zakřivené konformace, což vede k progresivnímu narušení mikrotubulů. Upraveno dle Alberts *et al.* (2008).

$\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -tubuliny jsou rozděleny do různých strukturálních rodin, ale i v rámci každé skupiny se objevují odlišnosti ve fyzikálních vlastnostech, jako v síťových elektrických nábojích, dipólových momentech a orientacích dipólového vektoru. Tyto rozdíly mohou ovlivnit stabilitu a skládání mikrotubulů v důsledku jejich působení na protein-proteinové interakce. C-konce  $\alpha$  a  $\beta$ -tubulinu, které se navzájem elektrostaticky odpuzují, existují nejméně ve dvou stabilních konfiguracích. Buď vyčnívají od tubulinového/mikrotubulového povrchu, kdy dochází k tvorbě určité vzdálenosti mezi jednotlivými tubuliny/mikrotubuly, nebo jsou zhrouceny na povrchu mikrotubul v závislosti na fyziologických podmínkách, biochemických interakcích a uspořádání tubulinových isoform (Tuszynski *et al.*, 2006).

### 2.1.1.3 Posttranslační modifikace rostlinného tubulinu

Posttranslační modifikace (PTM) značně zvyšují diversitu proteinů. Mohou být přechodné nebo trvalé. Jsou následkem cílených enzymatických reakcí nebo spontánních chemických reakcí v buňce. Modifikace postranních řetězců jsou známy u všech proteinogenních aminokyselin kromě alaninu a pyridinu, a podstupují zesíťování a/nebo modifikace na N nebo C-konci (Černý *et al.*, 2013). Rostlinný tubulin podstupuje rozmanité PTM, jako je acetylace, cyklická tyrosinace/detyrosinace, nitrotyrosinace, fosforylace či glutamylace (Hammond *et al.*, 2008). PTM jsou

považovány za mechanismy pro definování funkčně odlišných subpopulací jednoho proteinu, aniž by se musely příslušné proteiny syntetizovat *de novo* (Jovanović *et al.*, 2010). PTM tubulinu jsou evolučně konservovány. Obecně mají vliv na různé skupiny mikrotubulů. Regulují stabilitu mikrotubulů, vazbu motorových proteinů, inhibitorů a mikrotubuly-asociovaných proteinů (Rosenbaum, 2000). Smertenko *et al.* (1997) uvádí, že jedna isoforma tubulinu ( $\alpha 6$ ,  $\alpha 9$  a  $\alpha 11$ ) *Nicotiana tabacum* může nést až 3 PTM (polyglutamylace, acetylace a tyrosinace). PTM se podílejí na tvorbě vysokého stupně heterogenity náboje tubulinu v *N. tabacum*. Určité typy PTM rostlinného  $\alpha$ -tubulinu se přednostně vyskytují ve specifických tkáních, na základě tkáňově-specifického způsobu (Wang *et al.*, 2004).

Mezi PTM, které rostlinný tubulin podstupuje, patří acetylace lysinu 40 v aminokyselinové sekvenci  $\alpha$ -tubulinu (Gardiner *et al.*, 2007). Lysin 40 rostlinného  $\alpha$ -tubulinu má rozhodující vliv na udržení stability mikrotubulů a strukturální význam v procesu buněčného dělení a růstu (Xiong *et al.*, 2013). Acetylace  $\epsilon$ -aminoskupiny lysinu na N-konci proteinu odstraňuje pozitivní náboj na straně řetězce, a tudíž přímo ovlivňuje elektrostatický stav modifikovaného proteinu (Glozak *et al.*, 2005). Acetylací lysinu dochází také ke zvýšení molekulové hmotnosti o 42 Da (Xie *et al.*, 2007). Nedávná studie uvádí závislost fáze růstu na změně hladiny acetylovaného  $\alpha$ -tubulinu v *Arabidopsis*. Acetylovaný  $\alpha$ -tubulin se vyskytuje v mnoha krytosemenných rostlinách, ale může se lišit hladinou mezi různými orgány a vývojovými stádii. Acetylace  $\alpha$ -tubulinu u krytosemenných rostlin je regulována společným mechanismem, orgán-specifickým způsobem (Nakagawa *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že jednoaminokyselinová substituce lysinu 40 za arginin, který má podobnou chemickou strukturu s výjimkou nemožnosti jeho acetylace, téměř neovlivňuje fenotyp *Arabidopsis* (Xiong *et al.*, 2013). Z toho vyplývá, že acetylace lysinu 40 není zásadní pro funkci mikrotubulů, ale může být používána pro doladění jejich funkce. Rostlinné buňky mohou ovlivňovat stabilitu kortikálních mikrotubulů regulací acetylace  $\alpha$ -tubulinu. Fyziologická funkce acetylovaného  $\alpha$ -tubulinu je značně odlišná mezi rostlinnými a živočišnými buňkami (L'Hernault a Rosenbaum, 1983; Nakagawa *et al.*, 2013).

Všechny eukaryotické  $\alpha$ -tubuliny obsahují C-terminální tyrosin, který může být reverzibilně katalyticky odstraněn specifickou tubulin-tyrosin karboxypeptidasou nebo znovu napojen specifickou tubulin-tyrosin ligasou (Jovanović *et al.*, 2010). Jedná se o modifikační cyklus tyrosinace a detyrosinace C-terminálních konců  $\alpha$ -tubulinu. Tyronisovaný tubulin byl detekován ve všech skupinách mikrotubulů *N. tabacum*

(Smertenko *et al.*, 1997). Stupeň tubulinové detyrosinace souvisí se stabilitou mikrotubulů. Se zvyšujícím stupněm detyrosinace se zvyšuje stabilita mikrotubulů, proto lze detyrosinaci považovat za signál pro zvýšenou životnost mikrotubulů (Jovanović *et al.*, 2010). Kinesinové motory, které mají zhruba 2,8 krát vyšší afinitu k detyrosinovaným mikrotubulům než k jejich tyrosinovaným formám, mohou být cíle detyrosinové modifikace (Liao a Gundersen, 1998). Detyrosinace byla také prokázána ve stonkách hrachu, kde způsobila spolu s kyselinou gibberelovou reorientaci mikrotubulů a buněčnou polarizaci (Ducket a Lloyd, 1994).

Častou PTM rostlinného  $\alpha$ -tubulinu je nitrotyrosinace, která je zároveň jedním z charakteristických znaků zvýšené dynamiky mikrotubulů. Nitrotyrosinace reguluje organizaci mikrotubul v rostlinných buňkách. Tyrosinová nitrace probíhá přímou signální transdukcí oxidem dusnatým (NO), jehož vnitrobuněčné signální cíle jsou rostlinné mikrotubuly, 3-nitrotyrosin vyvolává reverzibilní inhibici růstu primárního kořenu *Arabidopsis*, způsobuje změny morfologie kořenových vlásků a organizace mikrotubulů v kořenových buňkách. Bylo zjištěno, že se 3-nitrotyrosin vyskytuje ve vysoce dynamických mikrotubulárních strukturách, jako jsou preprofázní svazky, mitotická vřeténka či fragmoplasty v suspenzní kultuře *N. tabacum* Bright Yellow-2 za fyziologických podmínek (Blume *et al.*, 2013). Nevratně nitrotyrosinový tubulin negativně ovlivňuje mikrotubuly spojené s buněčným dělením a skladbou buněčné stěny (Jovanović *et al.*, 2010).

Glutamylace C-terminálních konců  $\alpha$  i  $\beta$ -tubulinů byla detekována v buňkách *N. tabacum* (Smertenko *et al.*, 1997). Polyglutamylace ovlivňuje interakce mikrotubuly-asociovaných proteinů (Boucher *et al.* 1994), proto je možné, že polyglutamylace je důležitá v modulaci procesu, při němž se vážou další proteiny na rostlinný tubulin. Polyglutamylace TUA3 isoformem byla také dokázána v kořenech, prašnicích a pylu kukuřice (*Zea mays*).

Další PTM v rostlinách, byla detekována fosforylace. Proteinové kinasy a fosfatasy působí hlavně na serinové, threoninové a tyrosinové zbytky za vzniku fosfomonoesterů stabilních v kyselém prostředí (Černý *et al.*, 2013). Fosforylované tyrosiny lze najít v kortikálních mikrotubulech *Arabidopsis*, které byly detekovány imunofluorescencí. Tyrosiny umístěné v C-terminální oblasti  $\beta$ -tubulinových isotopů mohou být jedním z cílů pro tyrosin kinasy (Blume *et al.*, 2010). Fosforylace  $\alpha$ -tubulinu s následnou depolymerizací mikrotubulů je odpovědí na hyperosmotický stres v rýži a *Arabidopsis*. Threonin 349  $\alpha$ -tubulinu ve volném tubulinovém dimeru je identifikován jako místo



fosforylace, proto začlenění fosforylovaného dimeru do kortikálních mikrotubulů bylo inhibováno. Fosforylací  $\alpha$ -tubulinu, došlo k posunu isoelektrického bodu (pI) směrem do kyselější oblasti na hodnotu 5,5. Po odstranění stresu došlo k defosforylaci (Ban *et al.*, 2013).

### 2.1.2 Aktin

Aktin je nejhojnější protein ve většině eukaryotických buněk. Molekulová hmotnost aktinu je přibližně 43 kDa. Mezi procesy, které aktin ovlivňuje, patří determinace buněčné polarity, stanovení roviny dělení umístěním preprofázního svazku (Staehein a Hepler, 1996) tvorba a skladba buněčné stěny, prodlužování buňky (Thimann *et al.*, 1992), vrcholový růst v pylových láčkách (Pierson a Cresti, 1992) a kořenových vláscích (Miller *et al.*, 1997), transmembránový transport a lokalizace receptorů, transport mRNA v rámci buňky (Bouget *et al.*, 1996), cytoplasmatický proud nebo orientace chloroplastů v závislosti na světle (Krzyszowiec *et al.*, 2007).

Rostlinné aktinové formy jsou vysoce evolučně konservované. Obsahují 376-377 aminokyselinových zbytků, které jsou z 83-88 % identické s aktiny organismů jiných říší - zelených řas, prvoků, hub a živočichů (Meagher *et al.*, 1999).

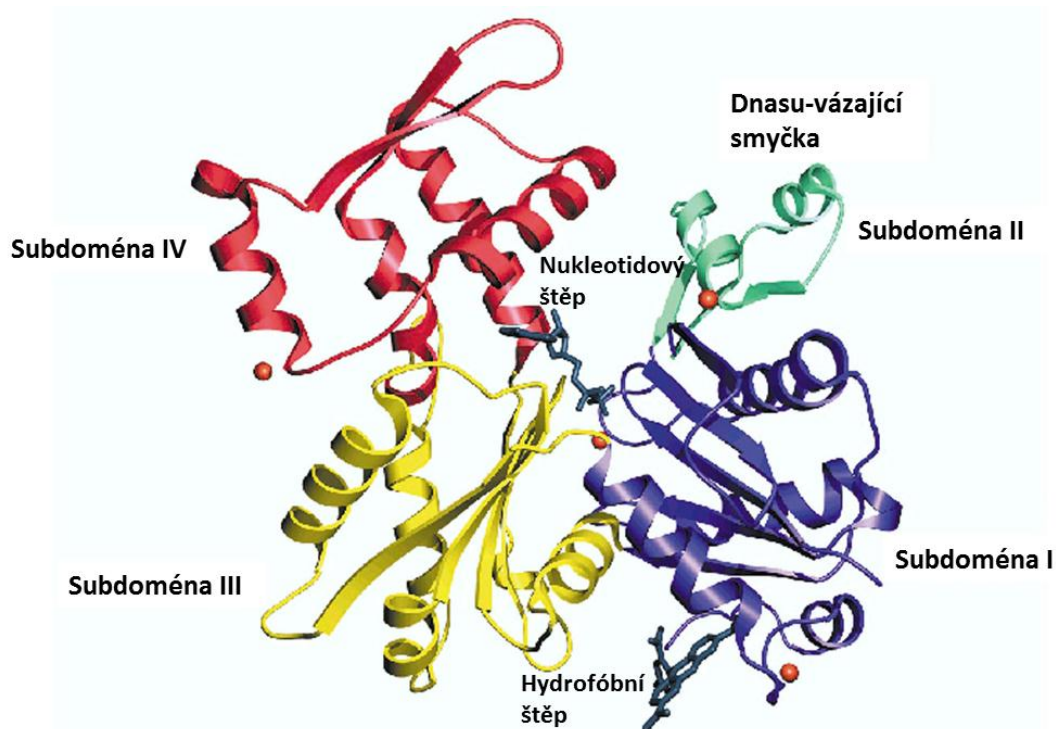
U *Arabidopsis* byla dokázána existence celkem 10 aktinových genů, které byly klonovány, sekvenovány a charakterizovány (McDowell *et al.*, 1996). Osm z nich je exprimováno v detekovatelných hladinách. Expres těchto genů se často překrývá. Koexpres proteinových isoformů ve stejných buňkách zvyšuje dynamické chování těchto proteinů. Dochází k četným nekonservativním aminokyselinovým substitucím na aktinových proteinech. Aktinové podtřídy *Arabidopsis* vykazují 7 substitucí nabitých aminokyselinových zbytků a 2 substituce  $\alpha$ -aminokyseliny s iminokyselinou prolinem, měnící peptidový řetězec, v celkem 11 pozicích. Pouze 2 z 9 pozic, kde byla provedena substituce nabitých aminokyselin, jsou konservovány. K většině aminokyselinových změn dochází mezi nejvzdálenějšími členy rodiny, zatímco nejbližší členi rodiny obsahují stejné aminokyselinové zbytky (Meagher *et al.*, 1991; McDowell *et al.*, 1996). Tyto substituce mohou ovlivnit aktin-aktinové nebo aktin-aktin vázající proteinové interakce, jako je například polymerizace aktinu nebo vazba myosinu na aktin (Bertrand *et al.*, 1989; Sheterlin a Sparrow, 1994). Rozdíly v isoelektrických bodech jednotlivých isoformů aktinu kolísají v rozsahu 0,7 pH jednotky (Meagher and McLean, 1990).

### 2.1.2.1 Struktura aktinu

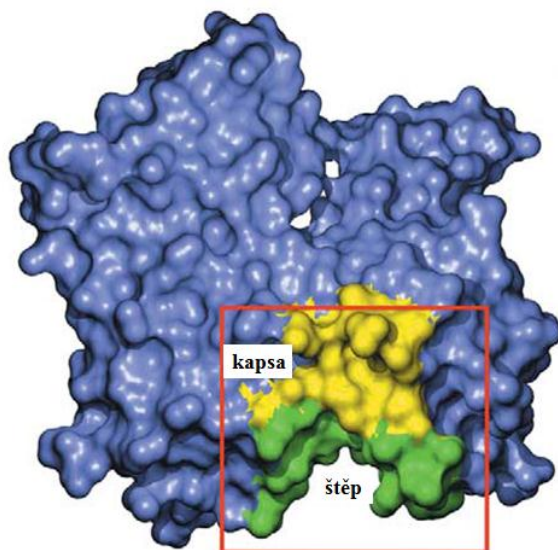
Polypeptidový řetězec, dlouhý 375 aminokyselin, je složen do dvou hlavních  $\alpha/\beta$ -domén.  $\alpha$ -doména je umístěna na vnější straně aktinových vláken, a proto se také někdy nazývá vnější, zatímco  $\beta$ -doména vnitřní (Dominguez a Holmes, 2011). Každou doménu lze ještě rozdělit na 2 subdomény. Subdoména I a III jsou strukturně podobné a pravděpodobně vznikly duplikací stejného genu (Kabsch *et al.*, 1990). Subdomény II a IV jsou velké inserty vložené do subdomén I a III v příslušném pořadí. Aktinový monomer má tvar pravoúhlého hranolu o rozměrech 55 Å x 55 Å x 35 Å (Dominguez a Holmes, 2011). Subdomény I, II a IV obsahují ve své struktuře hydrofobní jádra a fungují jako pevné nezávislé jednotky na konformační změně globulárního G-aktinu na filamentární F-aktin (Fujii *et al.*, 2010). Subdoména II obsahuje ve své struktuře DNasu-vázající smyčku, která má konformaci  $\alpha$ , pokud je aktin ve volné ADP formě. V případě aktinu ve formě komplexu, který ho stabilizuje, má DNasu-vázající smyčka konformaci  $\beta$  nebo neuspořádanou. Tyto změny konformace mohou ovlivňovat ATP-dependentní dynamiku aktinových mikrofilament (Otterbein *et al.*, 2001). Subdomény I, II a III, IV jsou v G-aktinu zkrouceny, zatímco ve formě F-aktinu mají plochou konformaci (Fujii *et al.*, 2010).

Mezi doménami aktinu jsou 2 štěpy. Horní štěp umístěný mezi subdoménami II a IV, také nazývaný nukleotid vázající štěp, váže nukleotid a dvojmocný kationt ( $Mg^{2+}$ ). Dolní štěp obsahuje aminokyselinové zbytky, které jsou převážně hydrofobní. Dolní štěp, mezi subdoménou I a III (Dominguez, 2004), zprostředkovává důležité podélné kontakty mezi aktinovými podjednotkami vláken (Oda *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2010) a představuje hlavní vazebné místo pro aktin-vázající proteiny, proto je nazýván štěp vázající cílové proteiny nebo také hydrofobní štěp. Tento štěp přednostně váže hélix proteinů, které mají konservované hydrofobní řetězce (Obr. 4; Dominguez, 2004).

Hydrofobní kapsa v subdoméně I, která se nachází u vstupu hydrofobního štěpu, zůstává dostupná pro vazbu aktin-vázajících proteinů i ve formě F-aktinu (Obr. 5). To znamená, že tato kapsa představuje primární cíl nejen pro G-aktin vázající-proteiny, ale také pro F-aktin-vázající proteiny, jako je například myosin (Dominguez, 2004).



Obr. 4: Struktura monomeru aktinu. Aktin je složen z 2 hlavních domén, které lze rozdělit na 4 subdomény (I-modře, II-zeleně, III-žlutě, IV-červeně). V subdoméně II se nachází DNasu-vázající smyčka v konformaci  $\alpha$ . Aktin ve své struktuře obsahuje 2 štěpy. Nukleotidový štěp mezi subdoménami II a IV váže nukleotid společně s  $Ca^{2+}$  iontem. Hydrofóbní nebo také cílový protein-vázající štěp mezi subdoménami I a III váže aktin-vázající proteiny. Upraveno dle Otterbein (2001).



Obr. 5: Umístění hydrofóbní kapsy ve vstupu hydrofóbního štěpu molekuly aktinu. Kapsa (žlutě) je umístěna v předním konci hydrofóbního štěpu (modře). Kapsa je přístupná jak pro G-aktinové, tak F-aktinové formy. Upraveno dle Dominguez (2004).

### 2.1.2.2 Polymerizace a depolymerizace aktinu, stavba aktinových mikrofilament

Aktin se v buňkách vyskytuje ve dvou stavech, monomerickém (globulární, G-aktin) a polymerickém (filamentární, F-aktin). Polymerizací G-aktinu vzniká F-aktin. Rovnováha mezi formou G a F-aktinu je určena hydrolýzou nukleotidů, ionty a velkým množstvím aktin-vázajících proteinů. Interakce mezi aktinovými podjednotkami jsou většinou elektrostatické nebo hydrofilní (Fujii *et al.*, 2010). G-aktin neaktivuje ATPasovou aktivitu na rozdíl od F-aktinu. Změna G-aktinu na F-aktin v procesu polymerizace aktivuje štěpení  $\gamma$ -fosfátu nukleotidu. Subdoména II, hlavně DNAsu-vázající smyčka, hraje klíčovou roli v podélných kontaktech mezi aktinovými podjednotkami vláken. Strukturní změny ve smyčce způsobí změnu konformace subdomény II, které ovlivní stav nukleotidu a následným uvolněním fosfátu z ATP dojde ke snížení stability aktinových vláken ve stavu ADP oslabením propojení mezi doménami (Graceffa a Dominguez, 2003).

Podobně jako u mikrotubulů, pokud je hydrolýza ATP rychlejší než přidávání aktinových monomerů, dochází k rozpadu aktinového vlákna. V opačném případě aktinové vlákno roste. Hydrolýza ATP ale není jediným faktorem ovlivňujícím polymerizaci či depolymerizaci aktinů. Významnou roli regulace růstu nebo rozpadu aktinových mikrofilament mají aktin-vázající proteiny (AVP). Mezi typy AVP patří: 1) protein oddělující monomery, který se váže na monomery aktinu, a tím blokuje zařazení monomeru do vlákna; 2) nukleační protein; 3) odstřihující protein, který rozstřihává aktinová vlákna na malé fragmenty, čímž zvyšuje tekutost aktinového gelu; 4) prokřížující protein nacházející se v buněčném kortexu, který kříží vlákna aktinu za tvorby husté sítě a konzistence gelu; 5) svazky tvořící protein spojující paralelní vlákna; 6) čapkový (konce blokuje) protein; 7) protein vázaný ze strany; 8) motorový protein (Alberts *et al.*, 2008).

F-aktinové elementy jsou distribuovány nejen podél mikrotubulů, ale také některá AF propojují sousední mikrotubuly (Kakimoto a Shibaoka, 1988). Dynamická aktivita aktinové sítě je významným faktorem, který přispívá k viskoelasticitě buněk. Viskoelasticitou se považuje schopnost buněk navrátit se do původního tvaru po uvolnění aplikované deformační síly (Ingber *et al.*, 1994). Proto viskoelastičita přispívá k dynamické odezvě buněk. Po deformaci cytoskeletu vnější mechanickou silou dochází k přenosu signálu informujícím o kvalitě a kvantitě síly do buněčné informační dráhy

(Wang *et al.*, 1993). Změny v rovnováze monomerů a polymerů aktinu korelují se změnami buněčného tvaru, pohybu a polaritu (Dantán-González *et al.*, 2001).

### 2.1.2.3 Posttranslační modifikace rostlinného aktinu

PTM aktinu patří mezi kovalentní způsob jeho modifikace, který nastává enzymatickou nebo neenzymatickou cestou. Mezi následky PTM aktinu patří regulace rovnováhy monomerů a polymerů aktinu, organizace aktinu a ovlivňování fyziologických i patologických procesů (Terman a Kashina, 2013). V rostlinách jsou PTM aktinu stále velmi málo prozkoumány.

Tyrosinová fosforylace rostlinného aktinu souvisí s ohýbáním řapíků rostlin. V kontakt-citlivé rostlině *Mimosa pudica* je silně fosforylován tyrosin. Změny úrovně fosforylace tohoto tyrosinu odpovídají stupni ohýbání rostlinných řapíků. Ohnutí řapíku je způsobeno rychlým smrštěním spodní strany hlavního pulvinusu, ve kterém tyrosinová fosforylace klesla a aktinová filamenta se po ohybu stala více periferní (Kameyama *et al.*, 2000). Dynamicky uspořádaný aktin ve svěracích buňkách může být fosforylován při jejich otevírání a zavírání (Eun a Lee, 1997). Signalizační cesta zavírání průduchů ve *Vicia faba* je zprostředkována protein tyrosin fosfatou (Shi *et al.*, 2005).

Transglutamylasa je vápník-dependentní enzym, který katalyzuje interakce mezi acylovými akceptory glutamylových zbytků a amino donorů, popřípadě vytváří zesíťování mezi nimi. Účinnost pylové transglutamylasy *Malus domestica* byla zkoumána na aktin, kdy došlo k tvorbě agregátu aktinu o vysoké molekulární hmotnosti. Pylová transglutamylasa může kontrolovat různé vlastnosti cytoskeletu pylových láček, jako je například seskupování aktinu nebo jeho interakce s motorovým proteinem myosinem, kdy se schopnost aktinových filament vázat myosin po ošetření transglutamylasou značně snížila, a následně regulovat rozvoj pylových láček (Del Duca *et al.*, 2009).

Další PTM modifikací, kterou rostlinný aktin podstupuje, je monoubikvitinace. Pomocí enzymu ubikvitin ligasy dochází ke kovalentnímu připojení ubikvitinu na cílový protein. K aktinové monoubikvitinaci dochází v rostlinách jako odpovědi na přítomnost patogenu nebo symbionta. Monoubikvitinované aktiny byly poprvé nalezeny v kořenových nodulech fazole (*Phaseolus vulgaris*). Tato modifikace je přechodná během vývoje nodulů (Dantán-González *et al.*, 2001). Stejná modifikace aktinu byla nalezena ve všech pletivech dalších luštěnin a rostlin infikovaných mykorhizou nebo

rostlinnými patogeny patřícími do rodu *Pseudomonas* and *Phytophthora* (Dantán-González *et al.*, 2001). Monoubikvitinace zvyšuje stabilitu aktinových mikrofilament vůči proteolytické degradaci a vyskytuje se v částech, kde je aktinový cytoskelet napojen na membrány. Monoubikvitinace je považována za mechanismus obecné odpovědi rostlin na přítomnost mikrobů (Dantán-González *et al.*, 2001).

### **2.1.3 Propojení aktinové a mikrotubulové rostlinné cytoskeletární sítě**

Aktinové a mikrotubulové cytoskeletární sítě jsou dynamické útvary zajišťující vnitrobuněčné procesy. Aktinová filamenta (AF) a mikrotubuly (MT) jsou esenciální pro rostlinný růst, morfogenezi, buněčné dělení a vezikulární transport (Sampathkumar *et al.*, 2011). Ve fixovaných tkáních rostlin jsou jemná příčná AF organizována do seřazena podobně jako příčně uspořádané MT. Ke ztrátě příčně orientovaných kortikálních AF po depolymerizaci MT došlo v buňkách *Arabidopsis* (Collings a Wasteneys, 2005).

V *Arabidopsis* byly prozkoumány interakce a kooperace AF a MT *in vivo*. Kortikální AF a MT cytoskelety interfázních buněk spolu dynamicky interagují. AF jsou závislá na pozicích a orientacích kortikálních mikrotubulů. Po depolymerizaci AF vyvolané inhibitorem a jeho následného vymytí došlo k reorganizaci a znovuseskupení AF v závislosti na MT, kde krátká AF nejprve kolokalizovala s MT a pohybovala se podél nich. Znovuseskupení AF je tedy iniciováno v místech shodných s kortikálními MT. Za absence MT k tomuto obnovení AF nedošlo (Sampathkumar *et al.*, 2011). AF-vázající proteiny, formin 4 a formin 14, kolokalizovaly s MT přes MT-vázající doménu v *Arabidopsis*, čímž určovaly aktinová nukleační místa (Deeks *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). V opačném případě, znovuseskupení MT je také závislé na přítomnosti AF, ale mechanismus je nejasný. Stabilita a aktivita nukleačních MT komplexů nebyla ovlivněna po depolymerizaci AF způsobené aplikací  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB na etiolizované hypokotylové buňky *Arabidopsis* (Nakamura *et al.*, 2010). Po působení a vymytí oryzalinu nebyl získán fyzikální důkaz o závislosti MT na AF. Jedno z možných vysvětlení je nedostatečné vymytí oryzalinu v důsledku nefunkčního aktinového cytoplasmatického proudu. Obecně lze říci, že znovuseskupení AF nebo MT po depolymerizaci je závislé na přítomnosti druhého cytoskeletárního komponentu (Sampathkumar *et al.*, 2011). Narušení AF cytD ovlivnilo organizaci MT ve vývoji cévních buněk *Zinnia elegans* (Kobayashi *et al.*, 1988).

Husté aktinové oblasti mohou určit místo zahájení vrcholového růstu a udržovat jej během morfogeneze. Nahrazují kortikální mikrotubuly, kdy je kortex upraven pro polarizovaný růst. V těchto rozsáhlých doménách kortikálního aktinu dochází k zachycení nebo tvorbě orientovaných aktinových svazků, které umísťují a přenášejí organely do kortikálních domén v místech buněčné expanze, například během vrcholového růstu kořenových vlásků. Vrcholový růst kořenového vlásku je tudíž aktin-dependentní proces (Baluška *et al.*, 2000; Ringli *et al.*, 2002).

## 2.2 Inhibitory

Cytoskeletální inhibitory jsou účinné nástroje pro studium cytoskeletu. Po aplikaci inhibitorů lze pozorovat například změny organizace, tvorby, seskupování, orientace nebo dynamiky cytoskeletálních struktur, MT a AF. Princip působení inhibitorů spočívá v umožnění nebo zabránění polymerizace či depolymerizace základních jednotek cytoskeletálních struktur.

Mezi inhibitory ovlivňující MT patří například oryzalin, taxol, propyzamid (Mathur *et al.*, 1999), kolchicin a nodazol (Nogales, 2000). Oryzalin se váže na  $\alpha$ -podjednotku tubulinového dimeru za tvorby komplexu, čímž znemožní polymerizaci tubulinu do mikrotubulu. Inhibitory ovlivňující AF jsou mimo jiné latB, cytD, Phalloidin a jasplakinolid (Mathur *et al.*, 1999). Latrunkulin se váže na aktinové monomery a následnou změnou aktinové konformace dojde k zabránění jejich polymerizace do AF (Morton *et al.*, 2000). Cytochalasin také ovlivňuje AF, ale mechanismus působení cytochalasinu je odlišný. Na rozdíl od latrunkulinu, cytochalasiny mají komplexní účinek na AF. Ovlivňují dynamické procesy na volných koncích AF spolu s dalšími aktin-vázajícími proteiny (Ayscough, 1998). LatA je účinnější než latB, a oba jsou 10-100 krát účinnější než cytochalasiny (Wakatsuki *et al.*, 2000; Spector *et al.*, 2009).

Subcelulární efekty cytoskeletálních inhibitorů na rostlinné buňky jsou ovlivňovány jejich koncentrací, dobou působení, typem, velikostí a buněčným stádiem rostlinné buňky. Ve většině případů po vymytí inhibitoru dochází k obnovení AF nebo MT.

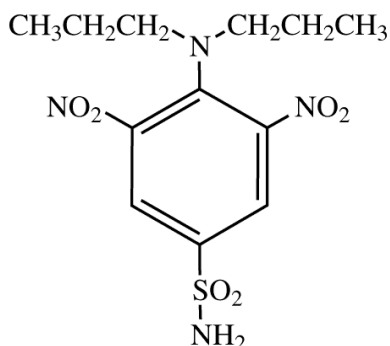
### 2.2.1 Oryzalin

Dinitroanilinové herbicidy jsou používány pro regulaci plevelů v obilovinách, olejovitých a zeleninových plodinách. Olejoviny a luštěniny jsou méně náchylné k dinitroanilinům než obiloviny a proso (Upadhyaya a Nooden, 1987). Oryzalin je preemergentní dinitroanilinový herbicid, který se používá k regulaci plevelů v půdě, ovocných sadech, vinicích a okolo okrasných rostlin. V U.S. Environmental protection

agency (EPA) je oryzalin klasifikován jako možný lidský karcinogen. Chemická struktura oryzalinu, (3,5-dinitro- $N^d,N^d$ -dipropylsulfanylamid), je zobrazena na Obr. 6 (Cox, 2001).

Oryzalin je chemická sloučenina, která se váže na rostlinný tubulin, čímž zabraňuje jeho polymerizaci. Naproti jiným mikrotubuly-depolymerizujícím činidlům (kolchicin, nodazol), které se vážou na  $\beta$ -podjednotky tubulinu (Nogales, 2000), oryzalin se váže na tubulinové  $\alpha$ -podjednotky (Anthony *et al.*, 1999). Toxicita vůči živočichům a houbám je nízká. Tato nízká toxicita spočívá v neschopnosti vazby oryzalinu na  $\alpha$ -podjednotku živočišného a houbového tubulinu (Langhans *et al.*, 2009).

Interakce oryzalinu s rostlinným tubulinem a mikrotubuly byla zkoumána v roztoku neobsahujícím sacharosu, která omezuje interakce zvýšením viskozity roztoku (Bokros *et al.*, 1993), v kultivovaných buňkách *Zea mays* (Hugdahl *et al.*, 1993). Interakce oryzalinu jsou rychlé, pH-dependentní (Morejohn *et al.*, 1987), reverzibilní a vysoce afinitní v nepřítomnosti sacharosu (Hugdahl a Morejohn, 1993). Nepolymerizovaný tubulinový dimer má mnohem vyšší oryzalin-vázající kapacitu než polymerizovaný tubulin (Hugdahl a Morejohn, 1993). Primárním účinkem oryzalinu je vazba na tubulinový dimer za tvorby tubulin-oryzalinového (TO) komplexu, který má velmi nízkou zdánlivou disociační konstantu (Strachan a Hess, 1983). Interakce oryzalinu s polymery kukuřičného tubulinu (Hugdahl a Morejohn., 1993) probíhají substechiometrickým podélným vazebným mechanismem, který inhibuje další tubulinovou polymerizaci. Navázáním TO komplexu na konce mikrotubulů dochází ke zpomalení nebo inhibici následného přidání dimeru, čímž se naruší proces polymerizace tubulinu (Strachan a Hess, 1983).



Obr. 6: Chemická struktura oryzalinu: 3,5-dinitro- $N^d,N^d$ -dipropylsulfanylamid. Upraveno dle Cox (2001).



### 2.2.1.1 Subcelulární efekty oryzalinu

Většina funkcí rostlinných mikrotubulů byla odvozena od pozorování konkrétních procesů po krátkodobém působení chemických sloučenin na rostlinné buňky způsobujících ztrátu mikrotubulů (Hugdahl a Morejohn, 1993; Baluška *et al.*, 2000). Cenné informace byly získány také použitím mutantů s postiženou skladbou tubulinových isoform jako například *lefty 1* a *lefty 2* (Abe *et al.*, 2004). Oryzalin způsobuje rychlou depolymerizaci mikrotubulů buněk kořenových špiček u jednoděložných rostlin, v případě dvouděložných rostlin je pro stejný účinek vyžadována delší doba působení. V případě mutace threoninu 239 ve vazebném místě pro oryzalin, která může nastat spontánně nebo nadměrnou expresí isoform  $\alpha$ -tubulinu, se stávají tyto rostliny oryzalin-resistentní (Langhans *et al.*, 2009). Oryzalin-senzitivní a oryzalin-resistentní rostliny mají odlišný mechanismus absorpce a akumulace herbicidu a tubulin-vázající afinitu pro oryzalin (Upadhyaya a Nooden, 1987; Hugdahl a Morejohn, 1993).

Jedním z efektů oryzalinu jsou změny tvaru a složení buněčné stěny, které byly pozorovány například u jednobuněčných zelených řas *Penium margaritaceum* (Domozych *et al.*, 2013) a tabáku (Cai *et al.* 2011). U *P. margaritaceum* došlo k tvorbě výrazného otoku buněčné stěny na místech, kde je sekretován a začleňován homogalakturonan (HG) do buněčné stěny a kde dochází k syntéze celulosových mikrofibril a propojení pektinu a celulosy. Paralelní svazky kortikálních mikrotubulů kolmé k podélné ose buňky jsou umístěny právě v této zóně. Působením oryzalinu na mikrotubuly došlo k jejich rozptýlení v cytoplasmě. Narušením mikrotubulové sítě došlo ke změně pohybu komplexů celulosových synthas a tudíž i produkce celulosy, hlavní složky buněčné stěny zajišťující její pevnost, a následné tvorbě otoku. Vytvoření otoku vede k narušení cytoplasmatického proudu a rozsáhlé periferní sítě aktinových mikrofilament zajišťující vezikulární transport komponent buněčné stěny (Domozych *et al.*, 2013). Zvýšená abundance HG, organizovaného do mřížky vnější vrstvy buněčné stěny usilující o zachování její integrity (Burton *et al.*, 2000), a naopak snížení zastoupení pektinového rhamnogalakturonanu I, jehož neutrální cukerné postranní řetězce mohou být přímo navázány na celulosu (Zykwinska *et al.*, 2007), a arabinogalaktanových proteinů byly zjištěny v buňkách ošetřených oryzalinem (Domozych *et al.*, 2013).

Oryzalin brání buněčnému dělení a elongaci, což vede k atypickému tvaru kořenů (tumour-like), které obsahují buňky s převážně isodiametrickým tvarem u *Arabidopsis*

(Baskin *et al.*, 2004). Buňky dělivé zóny kořene byly více senzitivní než elongační buňky. Na snímcích z imunofluorescenční mikroskopie byla pozorována dezorientace kortikálních mikrotubulů, které byly často fragmentované po působení oryzalinu. S rostoucí koncentrací se účinek oryzalinu zvyšuje. Nejnižší nezpochybnitelná koncentrace je  $170 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Baskin *et al.*, 1994). V kontrolních rostlinách *Arabidopsis* byly fluorescencí vizualizovány mikrotubuly paralelně k podélné ose kořenového vlásku (Traas *et al.*, 1995; Bibikova *et al.*, 1999), zatímco po působení oryzalinu kořenové vlásky vykazovaly difuzní zbarvení po celé cytoplasmě, což je typickou vlastností i dalších rostlinných buněk (Baskin *et al.*, 1994; Baluška *et al.*, 1996).

Oryzalin ovlivňuje vrcholový růst kořenových vlásků v *Arabidopsis*. Narušuje mechanismus rovného růstu vlásku a mění úhel růstu kořenového vlásku od povrchu kořene. Po aplikaci oryzalinu o koncentraci  $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na kořenové vlásky *Arabidopsis* došlo ke ztrátě jejich směru růstu a změně morfologie projevující se zvlněním kořenového vlásku. Po aplikaci  $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  oryzalinu na kořenové vlásky nebyly pozorovány značné rozdíly v rychlosti růstu, ale pouze větší zvlnění vlásku. Při vyšších koncentracích ( $2,5\text{-}10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) oryzalin způsobuje větvení kořenových vlásků vyúsťující v tvorbu dvou nebo více vrcholů (Bibikova *et al.*, 1999).

Působením oryzalinu o koncentraci  $0,1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  došlo k depolymerizaci mikrotubulů a zabránění polymerizace nových mikrotubulů ve všech stádiích mitotického cyklu v buňkách endospermu u *Haemanthus katherinae* Bak (Morejohn *et al.*, 1994). Tyto změny polymerizace mikrotubulů vedou ke změně orientace nebo kolapsu dělicího vřeténka během buněčného dělení (Komaki *et al.*, 2010). Nízké mikromolární koncentrace oryzalinu inhibují taxolem indukovanou polymerizaci tubulinu izolovaného z buněčných kultur růže. U živočišných buněk tento efekt nenastal, protože oryzalin má farmakologické účinky pouze na tubulin vyšších rostlin, respektive ovlivňuje rostlinnou dynamiku mikrotubulů (Morejohn *et al.*, 1987).

Langhans *et al.*, (2009) uvádí, že oryzalin ovlivňuje svou vazbou nejen mikrotubuly, ale také se váže na membrány. Působením oryzalinu dochází k morfologickým změnám endoplasmatického retikula (ER) a Golgiho aparátu (GA) v kořenových buňkách *Arabidopsis*. Tyto účinky nastávají již při  $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci oryzalinu a jsou reverzibilní po vymytí herbicidu. Po aplikaci oryzalinu došlo k navýšení počtu cisteren GA, ale s nižším průměrem. Mobilita ER byla omezena, ale nezabránila shlukování stohů GA po působení latB, a velmi málo byl ovlivněn ER export a přenos proteinů.

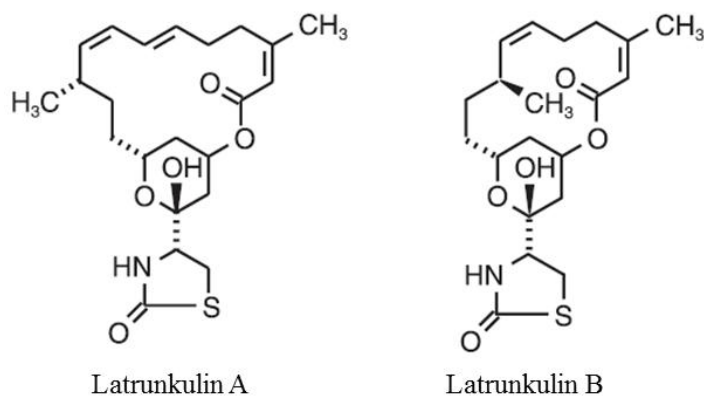
Tento mechanismus změn v endomembránách je specifický pro oryzalin, protože jiné mikrotubuly depolymerizující herbicidy nezpůsobily tyto efekty (Langhans *et al.*, 2009). Mathur *et al.* (2003) publikovali, že po 30 min působení  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  oryzalinu došlo k tvorbě pohyblivých shluků ER v epidermálních buňkách semenáčků *Arabidopsis*. Po vymytí oryzalinu se morfologie ER vrátila do původního stavu.

## 2.2.2 Latrunkulin B

Latrunkuliny jsou buněčně-permeabilní makrolidy obsahující ve své struktuře 2-thiazolidinový cyklický řetězec, který je složen z 16 členů u latrunkulinu A (latA) a 14 členů v případě latB (Obr. 7; Morton *et al.*, 2000). Latrunkuliny jsou vysoce specifické toxiny, které depolymerizují AF ve všech eukaryotických buňkách (Baluška *et al.*, 2001). LatA má déle trvající účinek, až týden po ošetření, než latB, u kterého efekt probíhá v rámci několika min až h (Spector *et al.*, 2009). LatB byl poprvé objeven v toxickém extraktu z hub Rudého moře *Negombata magnifica*, dříve *Latrunculia magnifica* (Kashman *et al.*, 1980). Obě sloučeniny, latA i latB, se vážou stejným způsobem, ale pouze na monomerní formy aktinu. Vazba latrunkulinu na monomer aktinu probíhá za tvorby komplexu latrunkulin-aktin, kde latrunkulin má funkci klínu zabraňujícího otáčení aktinových subdomén II a IV, které je nezbytné pro polymerizaci. Konformační změny aktinu po vazbě latrunkulinu nastávají spíše v konkrétních oblastech než v celkové aktinové struktuře (Morton *et al.*, 2000).

### 2.2.2.1 Subcelulární efekty latrunkulinu B

LatB způsobuje rychlou depolymerizaci F-aktinu. V kukuřičných pylových zrnech a pylových láčkách po aplikaci latB došlo k celkové přeměně F-aktinu na G-aktin (Gibbon *et al.*, 1999). Aplikace  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB způsobila rychlou úplnou depolymerizaci F-aktinu u kukuřičných kořenových vrcholů.



Obr. 7: Struktura latA vlevo a latB vpravo (Morton *et al.*, 2000).

Po aplikaci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Baluška *et al.*, 2001) a  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Sheahan *et al.*, 2004) latB na semenáčky *Arabidopsis* došlo k depolymerizaci téměř veškerého F-aktinu ve všech typech buněk. Po aplikaci latB na hypokotylové buňky *Arabidopsis* úplně vymizel aktinový cytoskelet, ale vymytím inhibitoru došlo k tvorbě krátkých AF v buněčném kortexu v místech shodných s MT (Sampathkumar *et al.*, 2011). Depolymerizace AF následovala po působení  $1-3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentrace latB v pylových láčkách *Lilium longiflorum*, kde větší účinek byl pozorován v ovlivnění růstu pylové láčky než cytoplasmatického proudu (Vidali *et al.*, 2001). V listech *N. tabacum* byl použit  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB pro F-aktinovou depolymerizaci (Brandizzi *et al.*, 2002). Kompletní depolymerizace AF v protoplastech *N. tabacum* nastala působením  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB ve většině buněk (Sheahan *et al.*, 2004). Fluorescenční mikroskopií byl pozorován difuzní obraz indikující rozpadlá aktinová filamenta v protoplastu *Arabidopsis* ošetřeném  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB (Kim *et al.*, 2005). Narušení struktury AF a inhibice elongace trichomů v listech *Arabidopsis* bez ovlivnění větvení bylo pozorováno po ošetření  $1-2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB. Po 6 h působení latB trichomové buňky vykazovaly difuzní distribuci aktinu, zatímco po 48 h byly rozpoznatelné krátké aktinové svazky (Mathur *et al.*, 1999).

LatB ovlivňuje elongaci rostlinných buněk, která je závislá na F-aktinu. Prodlužování kukuřičných kořenových vrcholů ošetřených latB je závislé na jeho koncentraci, kdy nejnižší koncentrace vyvolávající maximální účinek byla  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Baluška *et al.*, 2001). Rychlost růstu kořenových vlásků *Arabidopsis* je inhibována aktinovým antagonistou latB se vzrůstající závislostí na jeho koncentraci. Po aplikaci  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nebo vyšší koncentrace latB na kořenové vlásky byla pozorována úplná inhibice vrcholového růstu, ale změna směru růstu byla výjimečná (Bibikova *et al.*, 1999). Kromě snížení rychlosti elongace a následného zkrácení AF po ošetření  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB v rostoucích epidermálních buňkách *Arabidopsis* pozorovali Staiger *et al.* (2009) stočení vláken, což naznačuje závislost stočení aktinových vláken na jejich délce. Inhibice růstu kořenů a hypokotylů *Arabidopsis* byla způsobena  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB (Baluška *et al.*, 2001).

LatB způsobuje zakrňelost rostlin. Dlouhodobá depolymerizace F-aktinu způsobená latB vede k zakrňení *Arabidopsis* a žitných semenáčků v důsledku nemožnosti buněčné elongace. Rostlinný vývoj a morfogeneze nebyly ovlivněny absencí F-aktinu. Dlouhodobé (2 týdny) působení latB na semenáčky *Arabidopsis* během jejich celého postembryonálního vývoje způsobilo výrazné zakrňení, ale morfologicky nedošlo

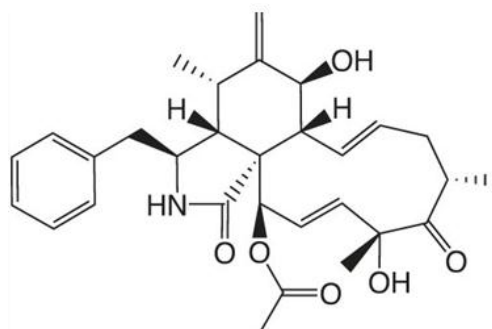
k vážným změnám (Baluška *et al.*, 2001), což naznačuje, že vzory buněčného dělení a růstové polaridy nastavené v průběhu embryogeneze nebyly ovlivněny latB (Jürgens *et al.*, 1997).

LatB v 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  koncentraci ovlivnil přenos proteinů z GA do centrální vakuoly v protoplastech *Arabidopsis*. Narušením AF inhiboval transport dvou vakuolárních reportérových proteinů, sporaminu a *Arabidopsis* aleurainu, z GA do centrální vakuoly. Také *Arabidopsis* vakuolární třídící receptor VSR-At, který je lokalizovaný hlavně v prevakuolárním prostoru, se nahromadil v GA za přítomnosti latB (Kim *et al.*, 2005). Podobné výsledky latB působení byly získány v dalších pracích se sporaminem z *Ipomoea batatas* a aleurainu z ječmenu (*Hordeum vulgare*) (Jin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Cytochalasin D

Cytochalasiny jsou metabolity hub o nízké molekulové hmotnosti kolem 0,5 kDa, které se vážou na rostoucí „plus“ konce aktinových vláken, čímž inhibují asociaci a disociaci jednotlivých monomerů aktinu. Efekty způsobené cytochalasiny jsou závislé jak na typu a hustotě buněk, tak na koncentraci a typu cytochalasinu (Wodnicka *et al.*, 1992; Wells *et al.*, 1998).

CytD je toxin pocházející z houby *Zygosporium mansonii* (Wells *et al.*, 1998), který se užívá pro cytologické a polymerizační studie aktinu. Struktura cytD je charakterizována vysoce substituovaným hydrogenovaným isoindolovým cyklickým řetězcem, který je skondenzován s makrocyclickým řetězcem (Obr. 8; <http://www.scbt.com/datasheet-201442-cytochalasin-d.html>). Vazba cytD na AF je  $\text{Mg}^{2+}$  dependentní a probíhá v poměru 1:1 za tvorby dimeru cytD-aktin s navázaným ATP, který se po hydrolyze ATP přemění na monomer cytD-aktin s navázaným ADP (Goddette a Frieden, 1986).



Obr. 8: Struktura cytochalasinu D (převzato dle [http://www.iris-biotech.de/media/catalog/product/cache/2/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/s/1s-1025\\_125.jpg](http://www.iris-biotech.de/media/catalog/product/cache/2/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/s/1s-1025_125.jpg))

### 2.2.3.1 Subcelulární efekty cytochalasinu D

CytD narušuje organizaci aktinové sítě, zvyšuje počet volných konců AF a vede k tvorbě filamentárních agregátů nebo ložisek složených z aktinových vláken (Schliwa, 1982). Je známo, že cytD snižuje celkové množství polymerizovaného aktinu v rámci buňky. CytD inhibuje spíše polymerizaci nových AF než aktivaci depolymerizace existujících AF, protože se váže na volné konce AF. Působením cytD na rozdíl od LatB nedošlo k ovlivnění klíčení a prodlužování pylové láčky kukuřičných buněk s různou citlivostí, což naznačuje, že tyto dva procesy mají odlišné mechanismy se závislostí koncentrace F-aktinu na zachování vrcholového růstu (Gibbon *et al.*, 1999). V přítomnosti cytD zůstala mikrofilamenta zachována nebo došlo k jejich reorganizaci (Collings *et al.*, 1995).

CytD ovlivňuje aktinovou strukturu také v kořenových vláscích (Miller *et al.*, 1999), přičemž aktinová filamenta vrcholu kořenového vlásku jsou více senzitivní v porovnání s bází. Působením  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytD koncentrací F-aktiny ve vrcholech kořenových vlásků zcela vymizely a byl zastaven růst, zatímco aktinové svazky v nižších polohách vlásků včetně cytoplasmatického proudu zůstaly zachovány (Miller *et al.*, 1999). Po aplikaci  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytD na kořenové vlásky *Arabidopsis* došlo k rozšíření vrcholů rostoucích kořenových vlásků, neboli zvýšení plochy buněčné expanze, a tím podpory exocytosy. Po odstranění cytD směr růstu zůstal nezměněn (Ketelaar *et al.*, 2003). Působením cytD v koncentracích vyšších než  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  došlo k zastavení cytoplasmatického proudu ve všech kořenových vláscích a inhibici růstu vlásků v důsledku kompletní depolymerizace aktinových filament v buňkách kukuřice (Baluška *et al.*, 2000) a dalších buňkách (Baluška *et al.*, 2001). K zastavení vrcholového růstu kořenových vlásků a úplné depolymerizaci AF v epidermálních buňkách kořene (kromě silných aktinových struktur v jádru) a kořenových vláscích došlo působením  $5\text{-}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytD u *Zea mays*, *Lepidium sativum* a *Arabidopsis* (Braun *et al.*, 1999).

Pomocí fluorescenčně značeného cytD byla vizualizována distribuce mikrofilamentových volných „plus“ konců ve vrcholových oblastech rostoucích kořenových vlásků, díky čemuž byla potvrzena spojitost mezi vrcholovou oblastí rostoucích kořenových vlásků luštěninových buněk s nodulačními faktory *Rhizobium* (Zepeda *et al.*, 2014), stejně jako že aktinová polymerizace řídí polární růst v buňkách kořenových vlásků *Arabidopsis*. Nejintenzivnější signál mikrofilamentových volných „plus“ konců byl pozorován v těsné blízkosti plasmatické membrány ve vrcholové oblasti kořenového vlásku (Vazquez *et al.*, 2014).

Kromě kořenových vlásků, cytD také narušuje morfologii trichomů v listech *Arabidopsis* bez vlivu na větvení. Krátké aktinové svazky byly viditelné po ošetření 1-5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytD (Mathur *et al.*, 1999).

CytD způsobil v *Zinnia elegans* změnu organizace MT v rozvíjejících se cévních buňkách, což naznačuje aktivní propojení aktinového a mikrotubulového cytoskeletu (Kobayashi *et al.*, 1988).

CytD ovlivňuje prostřednictvím působení na AF pohyb a distribuci buněčných komponent. Pohyb jader v kořenech *Arabidopsis* byl zastaven po ošetření 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytD způsobujícím inhibici polymerizace AF (Chytilova *et al.*, 2000). CytD ovlivňuje distribuci regulátoru aktinové dynamiky, profilinu (Staiger *et al.*, 2010). Profilin je G-aktin vázající protein, který byl kolokalizován s aktinem ve vrcholech kořenových vlásků (Braun *et al.*, 1999; Baluška *et al.*, 2000). Po působení 5-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytD signál vymizel, došlo k zastavení vrcholového kořenového růstu, což naznačuje vliv profilin-aktin interakcí na nakládání a lokalizaci exocytosových sekrečních vezikul (Braun *et al.*, 1999).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Biologický materiál

*Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0)

Transgenní *Arabidopsis thaliana* s fuzním konstruktem  $\alpha$ -tubulinu 6 s GFP (TUA6-GFP; Abe a Hashimoto, 2005)

#### 3.2 Chemikálie

Sigma Aldrich: hydroxid draselný (KOH), chlorid draselný (KCl), dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, hovězí sérový albumin (BSA), hydroxid sodný (NaOH), chlorid sodný (NaCl), phytigel, sacharosa, Tween-20, ethylenglykol-*bis*-(2-aminoethylether) tetraoctová kyselina (EGTA), deoxycholát sodný (C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>4</sub>), Triton X-100, diisopropylamid litný ([[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH]<sub>2</sub>NLi]), primární protilátka monoklonální anti-aktin (plant) (mouse IgG2b isotyp), (Kat.č. A 0480), sulfát amonný ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), dithiothreitol (DTT), amid kyseliny jodoctové (IAA), dodecyl sulfát sodný (SDS), bromfenolová modř, tetramethylethylendiamin (TEMED), cytochalasin D (C8273), latrunkulin B (L5288), oryzalin (36182), 2-merkptoethanol, EDTA, amfolyty, Trisem-pufrovaný fenol (pH 8,8), hovězí sérový albumin (BSA), octan amonný (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>), CHAPS, trisaminomethan hydrochlorid (Tris HCl), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), methanol (CH<sub>3</sub>OH), močovina (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), činidlo Bradfordové, kyselina octová (HCOOH), acetonitril (CH<sub>3</sub>CN), agarosa, glycin, hydrogenuhličitan amonný (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), 2-propanol, peroxidisíran amonný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, fosforečnan amonný (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Ponceau S

BioRad: akrylamid, ClarityECL substrát

Bruker Daltonics: kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové (CHCA), Peptide Calibration Standard II, trypsin

Santa Cruz

Biotechnology: sekundární protilátka anti-mouse (rabbit) IgG-HRP (Kat. č. 358914)



sekundární protilátka anti-mouse (goat) IgG-HRP (Kat. č. 2031)

Ostatní: Murashige & Skoog medium (MO221.0050), Duchefa Biochemie; hovězí hemoglobin A (HBA; UniProtKB: P01966), (Waters); hovězí hemoglobin B (HBB; UniProtKB: P02081), (Waters); PhosStop (Roche); EDTA free Complet (Roche); Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva); kyselina fosforečná (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), (Lachner); kyselina trifluoroctová (Merck Millipore), odtučněné mléko (Laktino); Imerzní olej 518F (Zeiss); Primární protilátka anti- $\alpha$ -tubulin (rat), (Serotec);

### 3.3 Přístroje

Laboratorní předvážky S1502, BEL (Itálie); analytické váhy XA110/2X, Radwag (Polsko); pH metr Cyberscan 310, Eurotech Instruments (Singapur); vortex, Labnet (USA); výkyvná třepačka MR-12, Biosan (Lotyšsko); elektromagnetická míchačka MSH-420, Boeco (Německo); třepačka s nastavitelnou teplotou inkubace ES-20, Biosan (Lotyšsko); fytotronová komora, Weiss Gallenkamp (Německo); Chemidoc MP dokumentační systém, BioRad (USA); binokulární lupa M165FC, Leica (Německo) s CCD kamerou, Leica Microsystem (Německo); konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710, Zeiss (Německo); (oba mikroskopy s analytickými programy Zeiss built-in Zen 2012 Blue a Black software); kolona SEP PAK light C18, Waters (UK); nanoAcquity ultra výkonná kapalinová chromatografie (UPLC) spojená hybridním hmotnostním spektrometrem obsahujícím kombinaci kvadrupólu a časového letového detektoru Premier (QTOF), Waters (UK); nanoAcquity UPLC kolona BEH 130 C18, 75  $\mu\text{m}$ ×150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  velikost částice, Waters (UK); PicoTip emitory (New Objective, USA); Image Scanner III, GE Healthcare (UK); MALDI-TOF-TOF hmotnostní spektrometr, Ultraflex II, Bruker Daltonics (Německo); SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit, GE Healthcare (UK); MINI-Protean II cell systém, BioRad (Německo); IPG stripy (pH 5-8) 17 cm a (pH 5-6,3) 7 cm, BioRad (USA), polyvinyliden difluoridová membrána, GE Healthcare (UK); nádržka, BioRad (USA) Chemidoc MP dokumentační systém, BioRad (USA); centrifuga, Scan Speed 1730 MR, Scala Scientific (Nizozemí); Ettan IPGphor 3, GE Healthcare (UK); spektrofotometr, Backman Coulter (USA), GelPicker, Staffmark (USA); vakuová odstředivka SpeedVac, Savant (USA); pipetové špičky Zip Tip, Merck Millipore (Germany); kotvící čipová MALDI plotnička, Bruker (Německo)

### 3.4 Programy

Zeiss ZEN software, databáze UniProt, Swiss-Prot, NCBI, Microsoft Excel, Power Point, PD-Quest, Bruker software (Flex analysis a BioTools), Mascot, MMAXS, ImageJ software

### 3.5 Metody

#### 3.5.1 Příprava rostlinného homogenátu

Semena *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0) byla povrchově sterilizována pomocí ethanolu (EtOH). Sterilizace probíhala ve třech krocích. 1) třepání 5 min v 70% EtOH, 2) 5 min ve 100% EtOH, 3) 3 x 5 min v destilované vodě (DV). Mezi každým krokem byl roztok odpipetován a napipetován nový. Vysterylizovaná semena byla nanesena na sterilní filtrační papír. Semena byla sázena na povrch pevného ½ MS média (Murashige a Skoog, 1962) obsahujícím 2,15 g MS, 10 g sacharosu a 8 g phytagelu na 1 l DV, o pH 5,8 upraveného pomocí 0,1 mol·l<sup>-1</sup> KOH. Celý proces probíhal ve sterilním laminárním boxu. Vysazená semena byla inkubována 2 d ve vodorovné poloze při 4°C pro stratifikaci a poté umístěna do fytostronu, kde byla kultivována ve vertikální poloze za standardních podmínek při 22°C, 71% vlhkosti a denním režimu 16/8 h.

Ze semen *Arabidopsis* vertikálně rostoucích na povrchu pevného ½ MS média v Petriho miskách po dobu 14 d byly získány rostliny. Na tyto rostliny bylo aplikováno tekuté ½ MS médium s roztoky inhibitorů rozpuštěnými v dimethylsulfoxidu (DMSO) (0,5 μmol·l<sup>-1</sup> latB, 2 μmol·l<sup>-1</sup> oryzalin, 0,5 μmol·l<sup>-1</sup> cytochalasin). Pro srovnání bylo aplikováno tekuté ½ MS médium s odpovídajícím objemem DMSO na rostliny, které poté sloužily jako kontroly. Pro zabránění hypoxie byly Petriho misky s rostlinami třepány při nízké rychlosti. Po 2 h byly kořeny *Arabidopsis* rychle odebrány a zhomogenizovány v tekutém dusíku při -198°C v třecí misce. Homogenát byl skladován při -80°C až do dalšího zpracování. Takto připravený homogenát byl použit pro proteomickou analýzu, 1D a 2D imunoblotování.

##### 3.5.1.1 Fenolová extrakce proteinů

Připravené zhomogenizované kořeny *Arabidopsis* byly extrahovány pomocí fenolu a precipitovány acetátem amonným v methanolu podle Hurkmann and Tanaka, (1986) a Takáč et al., (2011).

K homogenátu bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného extrakčního pufru (0,1 M Tris HCl o pH 8,8; 10 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA; 0,4% 2-merkaptoethanol; 0,9 mol·l<sup>-1</sup> sacharosa; 100

mmol·l<sup>-1</sup> KCl). Po zvortexování a inkubaci 5 min při PT a potom 10 min při 4°C bylo dále připipetováno 0,5 ml Trisem-pufrovaného fenolu o pH 8,8 a inkubováno 30 min při 4°C. Následně byla směs centrifugována při 6000 g a 4°C po dobu 5 min. Horní fenolová vrstva byla sesbírána do Eppendorf zkumavky, spodní vodná fáze s menším podílem proteinů byla reextrahována přidáním 0,5 ml Trisem-pufrovaného fenolu a centrifugována. Horní fenolová fáze byla sloučena s první oddělenou fenolovou fází.

### 3.5.1.2 Precipitace extrahovaných proteinů

Proteiny byly precipitovány přidáním pětinasobného objemu 0,1 mol·l<sup>-1</sup> octanu amonného ve 100% methanolu do fenolové fáze a uloženy na -20°C přes noc. Po centrifugaci při 12000 g 4°C po 20 min byl supernatant odstraněn a pelet promyt v octanu amonném ve 100% methanolu, dvakrát v 80% acetonu, jednou v 75% ethanolu a jednou v 80% acetonu. Veškeré použité roztoky byly vychlazeny na -20°C. Mezi jednotlivými kroky byl pelet vždy mechanicky narušen vortexováním, inkubován při -20°C po dobu 15 min a následně centrifugován při 12000 g 4°C po 10 min. Nakonec byl pelet vysušen na vzduchu po 10 min při PT. Koncentrace proteinů byly měřeny metodou Bradfordové (1976).

### 3.5.2 Mikroskopické pozorování živých buněk pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie

Pro pozorování mikrotubulů pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (KLSM) byly použity transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* s fuzním konstruktem  $\alpha$ -tubulinu 6 s GFP (TUA6-GFP; Abe a Hashimoto, 2005) exprimovaným pod 35S promotorem rostoucí ve tmě vertikálně na povrchu ½ MS média po dobu 5 d ve standardních podmínkách při 22°C, 71% vlhkosti. Poté byly intaktně přeneseny do ½ tekutého MS média na podložní sklíčko a byly přikryty krycím sklíčkem. Mezera mezi podložním a krycím sklíčkem byla vytvořena oboustrannou lepící páskou. Rostliny ošetřené inhibitory byly připraveny infiltrací roztoku 2  $\mu$ mol·l<sup>-1</sup> oryzalinu nebo 0,5  $\mu$ mol·l<sup>-1</sup> latB v tekutém ½ MS médiu do komůrek pomocí perfuze a potom inkubovány po 2 h. U kontrolních vzorků byly použity roztoky tekutého ½ MS média se stejným objemem DMSO. Vizualizace byla provedena v buňkách hypokotylu pomocí KLSM s nastavenými parametry pro detekci GFP s excitací při 488 nm v emisním spektru 500-535 nm. Všechny snímky byly pořízeny užitím 63x objektivu. Další zpracování fotek z mikroskopu bylo provedeno pomocí Zeiss ZEN softwaru a Power Pointu.

### 3.5.3 LC MS (ESI) analýza (bezgelová proteomická analýza)

Pro identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem byly extrahované a precipitované proteiny rozpuštěny v roztoku s 6,6 mol·l<sup>-1</sup> močoviny (6,6 mol·l<sup>-1</sup> močovina ve 125 mmol·l<sup>-1</sup> Tris pufro). Koncentrace proteinů byla měřena metodou Bradfordové (1976). Pro redukci, alkylaci a štěpení trypsinem bylo použito 100 µg proteinů z každého vzorku. Příprava vzorků probíhala ve 4 fázích: redukce disulfidových vazeb přidáním dithiothreitolu (DTT) (10 µl 50 mmol·l<sup>-1</sup> DTT) po 1 h při PT, alkylace pomocí amidu kyseliny jodoctové (IAA) (11 µl 100 mmol·l<sup>-1</sup> IAA) po 1 h při PT, přičemž nezreagovaný IAA byl spotřebován reakcí s nově přidaným DTT (10 µl 50 mmol·l<sup>-1</sup> DTT) pro zabránění vzniku disulfidových vazeb. Po naředění vzorku s DV pro získání koncentrace močoviny menší než 1 mol·l<sup>-1</sup> bylo provedeno štěpení proteinů pomocí roztoku trypsinu (1 µg trypsinu na 50 µg proteinů). Inkubace probíhala přes noc při 37 °C. Přidáním kyseliny octové pro snížení pH pod hodnotu 4 bylo zastaveno enzymové štěpení. Po centrifugaci byl supernatant odsolen a zakoncentrován na koloně SEP PAK light C18 podle pokynů výrobce. Vzorky byly vakuově vysušeny ve vakuové odstředivce SpeedVac při PT na pelety a uloženy na -80°C.

Takto připravené vzorky byly poslány na analýzu do Virologického ústavu Slovenské akademie věd. Analýza byla provedena podle Uváčková *et al.*, (2013). Před analýzou byly vzorky rozpuštěny na objem 100 µl v 0,1% kyseliny octové a 5% acetonitrilu (ACN). Jak u kontrolních vzorků, tak vzorků ošetřených inhibitory, byl během samotné analýzy v Trap koloně přimíchán interní standard o stejné koncentraci 1 pmol na 5 µl nástřik pro každý vzorek předštěpeného (připraveno štěpením HBA a HBB) hovězího hemoglobinu. Vzorky s interním standardem byly pak společně analyzovány pomocí nanoAcquity ultra výkonné kapalinové chromatografie (UPLC) spojené hybridním hmotnostním spektrometrem obsahujícím kombinaci kvadrupólu a časového letového detektoru Premier (Quadrupole-time-of-flight, QTOF). Peptidová směs byla nástříknuta na reverzní-fázovou kolonu (nanoAcquity UPLC kolona BEH 130 C18, 75 µm×150 mm, 1.7 µm velikost částice). Pomocí acetonitrilového gradientu (10–45% acetonitril obsahující 0,1% kyselinou mravenčí po 40 min) při průtokové rychlosti 350 nL·min<sup>-1</sup> došlo k postupné eluci peptidů na QTOF analyzátoru. Kolona byla napojena na PicoTip emitory. Pro ionizaci bylo použito nano-elektrosprejové napětí 3.4 kV, teplota byla nastavena na 70°C. Spektrální akviziční skenovací rychlost byla 1 s, kde meziskenovací zpoždění bylo 0,05 s. MS data byla sbírána ve střídavém,

nízkoenergetickém (MS) a zvýšeném energetickém (MS<sup>E</sup>) režimu, a užitá k identifikaci proteinů. Identifikace proteinů byla provedena pomocí databáze UniProt pro *Arabidopsis*. Kvantifikace proteinů byla provedena na základě srovnání s 1 pmol·l<sup>-1</sup> interním standardem hověžím hemoglobinem, podjednotky  $\alpha$ . Pro identifikaci statisticky významných odlišností v abundancích proteinů (vzorky ošetřené oryzalinem/latB versus kontrolní vzorky) byla provedena One-way ANOVA statistická analýza pomocí programu Microsoft Excel. V úvahu byly brány skvrny lišící se abundancí s hodnotou pravděpodobnosti  $P \leq 0,05$ . Vždy byly srovnávány 3 repliky vzorků.

### **3.5.4 Proteomická analýza pomocí 2D elektroforézy (gelová proteomická analýza)**

Metoda 2D elektroforéza slouží k separaci proteinů, které je dosaženo pomocí isoelektrické fokusace (IEF; dělení proteinů v rozsahu pH na základě rozdílného isoelektrického bodu) v prvním kroku a následné polyakrylamidové elektroforéze (PAGE) v druhém rozměru (dělení proteinů podle molekulové velikosti). Separované proteiny v gelu byly obarveny koloidální coomassie. Vždy byly srovnávány 3 repliky vzorků.

Při IEF byly použity 17 cm dlouhé gelové IPG stripy s rozsahem pH 5-8. Nejdříve byly stripy rehydratovány přes noc za PT v rehydratačním pufru (RP; složení RP: 8 mol·l<sup>-1</sup> močovina, 2 mol·l<sup>-1</sup> thiomočovina, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) Triton X-100) obsahujícím 50 mmol·l<sup>-1</sup> DTT a 0,5% (v/v) amfolyty. Před isoelektrickou fokusací byl vzorek, o stejném množství proteinu pro ovlivněné vzorky i pro kontroly, aplikován na strip buď metodou pohárku (tzv. cup loading) v množství 380  $\mu$ g proteinu v RP (v případě vzorků ovlivněných oryzalinem), nebo metodou papírového mostu (tzv. paper bridge) v množství 450  $\mu$ g proteinu v RP (v případě vzorků ovlivněných latB). IEF probíhala 1h při 200 V, 1h při 500 V, 1h při 1000. V dalším kroku bylo nastaveno 10000 V po dosažení 95000 Vh. Celkově bylo dosaženo 116000 Vh. První rozměr byl prováděn na přístroji Ettan IPGphor 3.

Před denaturující polyakrylamidovou elektroforézou (SDS-PAGE) byly IPG stripy s rozdělenými proteiny ekvilibrovány v ekvilibračním roztoku (6 mol·l<sup>-1</sup> močovina; 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris HCl o pH 8,8; 30% (v/v) glycerol; 2% (w/v) dodecyl sulfát sodný (SDS); 0,002% bromfenolová modř) s 1% (w/v) DTT po 15 min, a následně v ekvilibračním

roztoku s 2,5% (w/v) IAA. Potom byly stripy aplikovány na 10% rozlišovací polyakrylamidové SDS gely a upevněny roztokem agarosa (0,5% (w/v) agarosa, 0,002% (w/v) bromfenolová modř v Tris-glycin-SDS pufru ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris;  $192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  glycin; 0,1% (w/v) SDS). Proteiny byly v druhém rozměru separovány (pomocí SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit) v Tris-Glycin-SDS pufru za následujících parametrů: při 15 mA/gel po 30 min a následně elektroforéza probíhala 5 h při 30 mA/gel.

#### **3.5.4.1 Barvení gelů pomocí koloidální coomassie blue a kvantifikace denzity skvrn**

Proteiny v gelu byly obarveny pomocí koloidální coomassie blue, která byla připravena z 0,08% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G250); 1,6% (v/v) ortho-fosforečné kyseliny; 8% (w/v) sulfátu amonného a 20% (v/v) methanolu. Barvicí roztok se připravuje v několika krocích. Nejdříve se smíchá roztok A (2% ortho-fosforečná kyselina; 10% sulfát amonný), s roztokem B (5% CBB G250, důkladně promíchaný) za vzniku roztoku C (vmíchání roztoku B do roztoku A v poměru 1:50). Do barvicího roztoku byl vmíchán methanol do finální 20% (v/v) koncentrace. Takto připravený roztok byl použit na obarvení gelů přímo po SDS-PAGE přes noc. Nakonec byl gel několikrát promýván DV, dokud nedošlo k odbarvení pozadí. Všechny kroky byly prováděny za třepání při PT (Neuhoff *et al.*, 1985, upraveno A. Posh).

Gely byly skenovány pomocí Image Scanner III a následně byla provedena softwarová analýza v programu PD-Quest. Kroky pro vyhodnocování gelů byly prováděny podle Takáč *et al.*, (2013). Skvrny byly normalizovány na základě celkové denzity na gelu. Skvrny byly automaticky detekovány a propojeny v rámci replik. Nesprávně přiřazené skvrny byly manuálně upraveny pro zajištění správného zařazení. Byla provedena One-way ANOVA statistická analýza s 95% hladinou významnosti pro stanovení odlišných abundancí proteinů (vzorky ošetřené oryzalinem/latB versus kontrolní vzorky). V úvahu byly brány skvrny lišící se abundancí s hodnotou pravděpodobnosti  $P \leq 0,05$ . Pro další analýzu byly manuálně vybrány skvrny pro trávení a identifikaci.

#### **3.5.4.2 Štěpení proteinů v gelu a MALDI TOF-TOF analýza**

Statisticky významné proteiny (skvrny) získané z 2D gelů byly identifikovány hmotnostní spektrometrií s laserovou desorpcí/ionizací pomocí matrice. Před samotnou MS analýzou bylo nutné vybrané skvrny vyřezat z gelu, naštěpit na peptidy, extrahovat

z gelu, purifikovat a nanést na mikrodestičku. Všechny kroky byly prováděny s roztoky o HPLC čistotě a za PT.

Vybrané skvrny byly vyřezány pomocí speciální pinzety GelPicker a ukládány do jamek mikrodestičky, ve kterých bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  DV. Mezi každým výřezem skvrny byla pinzeta promyta EtOH a DV. Vyřezané proteiny byly třepány v 50% (v/v) ACN (v DV) po dobu 5 min. Dále byly skvrny inkubovány 30 min v 50% (v/v) ACN (ve  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydrogenuhličitanu amonném  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), 15 min 100% (v/v) ACN, dokud se nezbarvily do bíla. Pokud nedošlo ke zbělání, byly skvrny inkubovány 15 min v  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (v DV), 30 min ve  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (v 50% (v/v) ACN) a 15 min v 100% (v/v) ACN. Každá inkubace probíhala za třepání při PT a nakonec byl roztok odsán pipetou. Nakonec byly skvrny 15 min sušeny v laminárním boxu. Nachystané skvrny byly štěpeny v gelu přidáním trypsinového roztoku ( $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  v  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  obsahujícím 10% (v/v) ACN), který byl připraven podle návodu výrobce, při  $4^\circ\text{C}$  po dobu 120 min. Po té byly skvrny umístěny do vzduch-cirkulačního termostatu nastaveného na  $37^\circ\text{C}$  a nechány přes noc. Druhý den byla destička se skvrny vyndána z termostatu, nechána zchladnout a uložena na  $-20^\circ\text{C}$ .

Pro extrakci peptidů byl do každé jamky mikrodestičky napipetován  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . V každém kroku byl skvrna s příslušným roztokem inkubována při  $37^\circ\text{C}$  po 15 min za současného třepání. Dále byl přidán ACN (dvojnásobný objem gelové skvrny) a následně sesbírán supernatant. V dalším kroku byla napipetována do jamek 5% (v/v) kyselina mravenčí ( $\text{HCOOH}$ ), následně ACN (dvojnásobný objem gelové skvrny). Po té byl opět sesbírán supernatant a skompletován s již sesbíraným odpovídajícím supernatantem. Nakonec byly extrakty vysušeny ve vakuové centrifuze. Purifikace extrahovaných proteinů byla provedena pomocí pipetových špiček Zip Tip dle návodu výrobce.

Příprava a nanášení vzorku na MALDI destičku bylo provedeno podle Bruker Daltonics. Byl připraven přesycený roztok matrice (CHCA-roztok) rozpuštěním kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové (CHCA) v rozpouštěcím roztoku (85% (v/v) ACN, 15% DV, 0,1% (v/v) kyselina trifluoroctová TFA a  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosforečnan amonný  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ). Dále byl připraven roztok matrice pro standard i vzorek (STD-VZ-roztok) na celkový objem  $800 \mu\text{l}$  ( $748 \mu\text{l}$  TA95 (poměr ACN:0,1% (v/v) TFA= 95:5),  $36 \mu\text{l}$  CHCA-roztok,  $8 \mu\text{l}$  10% TFA a  $8 \mu\text{l}$   $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ).

Peptide Calibration Standard II (PCSTDII) byl rozpuštěn ve 125  $\mu\text{l}$  TA 30 (poměr ACN:0,1% (v/v) TFA = 30:70). Finální roztok pro kalibranty (KAL) byl připraven napipetováním 1  $\mu\text{l}$  PCSTDII do 200  $\mu\text{l}$  STD-VZ-roztoku. Vysušené vzorky byly rozpuštěny v 0,1% (v/v) TFA. Nanášení kapiček bylo prováděno na kotvící čipové MALDI plotniče. Na pozice pro standardy bylo napipetováno 1  $\mu\text{l}$  FRKS. Na pozice pro vzorky bylo napipetováno 0,5  $\mu\text{l}$  rozpuštěné vzorky a překryto 0,5  $\mu\text{l}$  STD-VZ-roztoku. Po zaschnutí byla provedena analýza na MALDI-TOF-TOF hmotnostním spektrometru. Akvizice v MS-režimu v rozmezí 700-3500 Da. První zpracování dat bylo provedeno užitím Bruker softwaru (Flex analysis a BioTools). Vyhledávání pomocí programu Mascot a následně také Mmass bylo provedeno s užitím MS tolerance 50 ppm. Povolen byl jeden štěp. Jako hlavní modifikace byla vybrána karbamidomethylace a vedlejší modifikace oxidace kovu. Data byla porovnávána v rámci taxonomie genu *Arabidopsis* s databází Swiss-Prot a NCBI. Jako výsledné parametry byla zvolena standardní vyhodnocení a práh významnosti  $P < 0,05$  pro proteinovou/peptidovou identifikaci.

### 3.5.5 Imunoblotování

Pro imunoblotování byly použity dvě metody separace proteinů, a to v jednom nebo dvou rozměrech.

#### 3.5.5.1 1D imunoblotování

Po homogenizaci vzorků v tekutém dusíku byl homogenát rozpuštěn v roztoku RIPA ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris/HCl, pH 7,4;  $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  KCl,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  EGTA, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% Triton X-100, 0,1% SDS, fosfatasové a proteasové inhibitory (PhosStop a EDTAfree Complete) a nechán inkubován po 30 min při 4°C. Následně byly vzorky centrifugovány při 13000 g po dobu 15 min. Koncentrace proteinů v supernatantu byla měřena metodou Bradfordové (1976). Dále byly proteiny z extraktu precipitovány (stejně množství proteinu pro všechny vzorky) ve vychlazeném na -20°C pětinasobném množství 100% acetonu po 10 min při -80°C, po té přes noc při -20°C. Druhý den byly vzorky centrifugovány při 13000 g po dobu 15 min. Pelet byl rozpuštěn v 20  $\mu\text{l}$  Laemmliho roztoku (Laemmli pufr ( $70 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-HCl o pH 6,8; 1% (w/v) SDS, 11% (v/v) glycerol; 0,005% (w/v) bromofenolová modř),  $12,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-HCl o pH 6,8; 1% (v/v) merkptoethanol). Vzorky byly povařeny 5 min při 95°C a potom centrifugovány při 13000 g po dobu 15 min. Takto připravené vzorky byly použity na



elektroforézu s 10% rozlišovacími a 4% zaostřovacími polyakrylamidovými gely na MINI-Protean II cell systému. Na 1 jamku bylo dávkováno 15  $\mu\text{g}$  proteinu. Elektroforéza byla prováděna v Tris-glycin-SDS pufru při 180 V po 1 h při 4°C.

### **3.5.5.2 2D imunoblotování**

Separace proteinů byla provedena metodou 2D elektroforézy podobným způsobem jako je uvedeno v části kapitoly 3.5.4. Pro první rozměr, isoelektrickou fokusaci, byly použity IPG stripy o rozsahu pH 5-6,3 o délce 7 cm. Každý jeden strip byl rehydratován přes noc při laboratorní teplotě roztokem RP spolu s 50  $\mu\text{g}$  proteinu. Parametry IEF byly následující: 200 Vh při 300 V, 300 Vh při 1000 V, 4500 Vh při 5000 V, 7000 Vh při 5000 V. Celkově bylo dosaženo 12000 Vh. V druhém rozměru byly použity 10% rozlišovací polyakrylamidové gely s SDS (bez zaostřovacích gelů). Experiment byl spuštěn při následujících parametrech: 15 min při 60 V, 15 min při 80 V, 2 h při 100 V a po 2 h při 120 V. Separace proteinů byla ověřena pomocí barvení gelu koloidální coomassie blue.

### **3.5.5.3 Přenos proteinů z gelu na membránu**

Z gelu byly proteiny přeneseny na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu v mokré nádržce při 100 V po dobu 1,5 h při 4°C užitím transferového pufru (25  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris, 192  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  glycin, 10% (v/v) methanol, pH 8,3). Membrány byly obarveny pomocí ponceau S (0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) kyselina octová) pro ověření odpovídajícího dávkování proteinů a následně promyty DV. Po dobu jedné h byly membrány inkubovány v blokovacím Trisem-pufrovaném solném roztoku (TBST; 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl; 1,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; pH 7,4; 1% (v/v) Tween-20), který obsahoval 4% (w/v) hovězí sérový albumin (BSA) a 4% (w/v) mléko, aby došlo k zablokování nespecifických míst na povrchu membrány. Pro imunoblotování byly použity primární protilátky ředěné v roztoku s 1% (w/v) BSA v TBST: anti- $\alpha$ -tubulin (1:5000) nebo anti-aktin (1:5000), které byly aplikovány po 1,5 h při PT. Po promytí membrány 5 x 10 min v TBST, jako sekundární protilátka byla použita protilátka anti-mouse (rabbit) s navázanou peroxidasou v roztoku s 1% (w/v) BSA v TBST v koncentracích: pro anti- $\alpha$ -tubulin (1:5000), pro anti-aktin (1:7500) po 1,5 h při PT. Potom byla membrána 5x promyta v TBST po dobu 50 min. Chemiluminiscenční signál byl vyvíjen pomocí ClarityECL substrát na Chemidoc MP dokumentačním systému

(BioRad). Kvantifikace pásů odpovídajících antigenu byla vyhodnocena denzitometricky pomocí ImageJ softwaru (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **3.5.5.4 Charakteristika použitých primárních protilátek**

#### **3.5.5.4.1 Rat anti Tubulin alpha antibody, clone YL1/2**

Immunogenem pro přípravu této protilátky byl tubulin z kvasinek. Jde o protilátku ve formě purifikovaného imunoglobulinu připraveného afinitní chromatografií. Rozpoznává alfa podjednotku tubulinu, specificky se váže na tyrosylovaný tubulin (Wehland *et al.*, 1983). Epitopem je lineární sekvence s aromatickým zbytkem na C konci, přičemž dvě sousedící aminokyseliny jsou záporně nabitě (Glu-Glu-Tyr v alfa tubulinu). Dodavatelem je Sigma Aldrich (T7451).

#### **3.5.5.4.2 Monoclonal Anti-Actin (plant) Clone 10-B3 (MabGPa)**

Imunogenem je protein ACT8 (Kandasamy *et al.*, 1999). V *Arabidopsis* tato protilátka rozpoznává všech 8 aktinových isoform (ACT1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, a 12). Přesný epitop, na který se tato protilátka váže, není znám. Protilátka je ve formě purifikovaného imunoglobulinu. Dodavatelem je Sigma Aldrich (A0480).

## 4 VÝSLEDKY

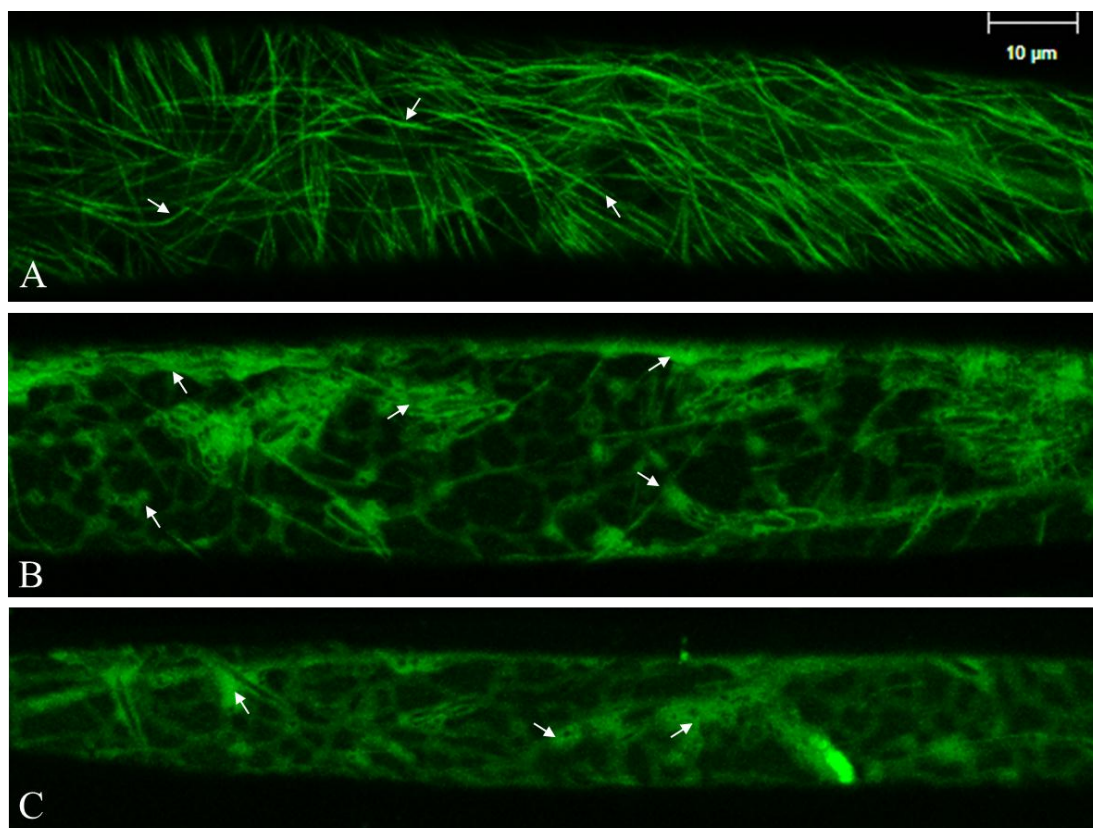
### 4.1 Mikroskopické pozorování mikrotubulů *in vivo* v hypokotylech *Arabidopsis* po vlivu oryzalinu a latrunkulinu B

Za účelem sledování účinků oryzalinu a latB na mikrotubuly bylo provedeno mikroskopické pozorování pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Pro vizualizaci mikrotubulů *in vivo* byly použity stabilně transformované rostliny *Arabidopsis* s fuzním konstruktem TUA6-GFP. Byly srovnány rostliny ošetřené  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  oryzalinem nebo  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB rozpuštěnými v DMSO po dobu 2 h s kontrolními rostlinami v odpovídající koncentraci DMSO. Vizualizace mikrotubulů byla provedena v etiolizovaných buňkách hypokotyly.

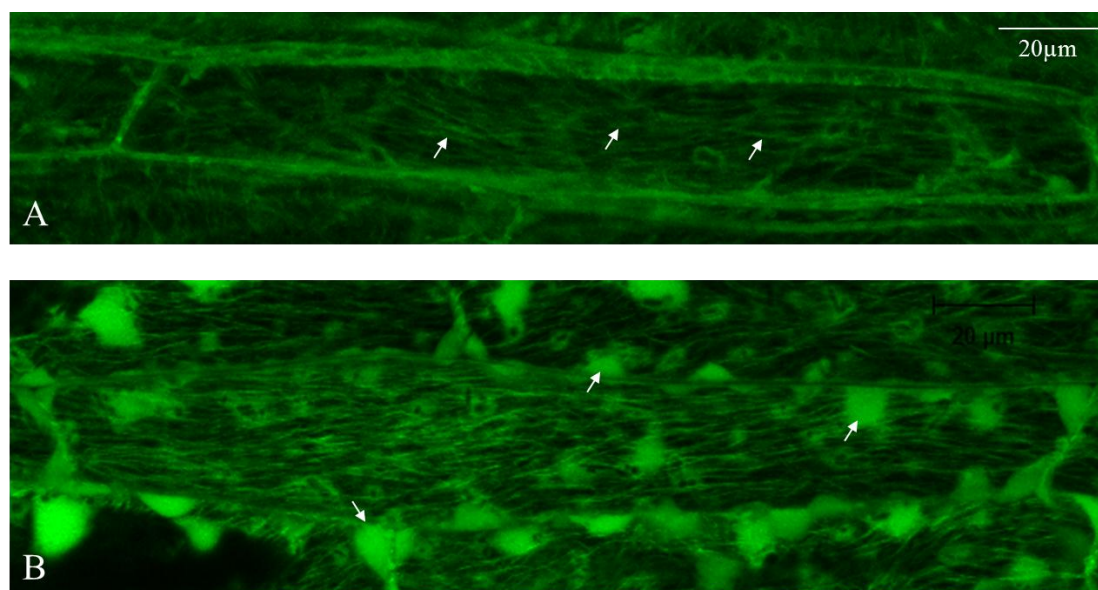
Na Obr. 9 jsou výsledky mikroskopického pozorování působení oryzalinu na mikrotubuly v hypokotylech *Arabidopsis*. V kontrolních rostlinách po 120 min působení DMSO byla vizualizována síť kortikálních mikrotubulů (Obr. 9A). Po 120 min působení oryzalinu došlo ke značnému snížení signálu TUA6-GFP způsobenému rozpadem většiny mikrotubulů a přesunem signálu do cytoplasmy (Obr. 9B). Mikrotubuly v buňkách ošetřených oryzalinem po dobu 180 min zcela vymizely a cytoplasmatický signál TUA6-GFP se zvýšil (Obr. 9C). K přesunu signálu TUA6-GFP do cytoplasmy mohlo dojít v důsledku depolymerizace mikrotubulů, kterou oryzalin způsobuje. Oryzalin vazbou na tubulin (vizualizovaný TUA6-GFP) zabránil polymerizaci tubulinů do mikrotubulů (Strachan a Hess, 1983; Hugdahl a Morejohn, 1993). Předpokládá se, že depolymerizací mikrotubulů se zvýšil počet volných tubulinů (vizualizované TUA6-GFP) v cytoplasmě a tudíž i cytoplasmatický signál TUA6-GFP.

Na Obr. 10 jsou výsledky mikroskopického pozorování působení latB na mikrotubuly v hypokotylech *Arabidopsis*. Mikrotubuly jsou vizualizovány za kontrolních podmínek po 120 min působení DMSO (Obr. 10A) a po působení latB rozpuštěným v odpovídající koncentraci DMSO po dobu 120 min, kde došlo k akumulaci signálu TUA6-GFP v shlukovitých útvarech v cytoplasmě a v blízkosti plasmatické membrány (Obr. 10B). Tento naakumulovaný signál TUA6-GFP v cytoplasmě a na plasmatické membráně by mohl být způsoben rozpadem mikrotubulů na dimery tubulinu (vizualizované TUA6-GFP) v cytoplasmě, který je spojen s rozpadem AF na monomery aktinu v cytoplasmě ovlivněné vazbou latB. Propojení MT a AF již bylo hlášeno v práci (Sampathkumar *et al.*, 2011), ale přesný mechanismus

závislosti MT na AF ještě není znám. Shlukovité útvary by také mohly být radiálně uspořádané svazky MT, které vznikly působením latB (Aspengren *et al.*, 2006).



Obr. 9: Vizualizace mikrotubulů v etiolizovaných buňkách hypocotylu transgenní *Arabidopsis* s konstruktem TUA6-GFP za A) kontrolních podmínek po 120 min vlivu DMSO, B) po 120 min působení 2 μmol·l<sup>-1</sup> oryzalinu a C) 180 min působení 2 μmol·l<sup>-1</sup> oryzalinu v odpovídající koncentraci DMSO.



Obr. 10: Vizualizace mikrotubulů v etiolizovaných buňkách hypocotylu transgenní *Arabidopsis* s fuzním konstruktem TUA6-GFP za A) kontrolních podmínek po 120 min vlivu DMSO, B) po 120 min působení 0,5 μmol·l<sup>-1</sup> latB v odpovídající koncentraci DMSO.

## 4.2 Proteomické analýzy

Pomocí dvou různých přístupů (bezgelový a gelový) proteomických analýz byly zkoumány změny proteomu kořenů *Arabidopsis*, které doprovázejí změny polymerizace aktinu a mikrotubulů po ošetření cytoskeletálními inhibitory. Vždy byly srovnávány rostliny ovlivněné cytoskeletálními inhibitory, oryzalinem ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a latB ( $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s kontrolními rostlinami. V obou metodách byly porovnávány 3 repliky. V celkovém přehledu (Tab 1.) jsou souhrnně uvedeny výstupy z obou přístupů: celkové počty skvrn na gelu, statisticky významně změněné, analyzované a identifikované skvrny metodou MALDI TOF-TOF a počty identifikovaných proteinů a proteinů se statisticky významně změněnou abundancí získané bezgelovou analýzou s identifikací pomocí LC MS (ESI). Oběma přístupy identifikováno 34 proteinů s odlišnou abundancí ve vzorcích ošetřených oryzalinem a 44 identifikovaných proteinů s odlišnou abundancí ve vzorcích ošetřených latB.

### 4.2.1 Bezgelová proteomická analýza

Metodou bezgelové proteomické analýzy byly detekovány změny abundancí proteinů ve vzorcích získaných z kořenů *Arabidopsis* ošetřených  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  oryzalinem a  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB s kontrolními vzorky. Identifikace proteinů byla provedena metodou LC MS<sup>E</sup> (ESI). Celkem bylo identifikováno v průměru 762 proteinů ze vzorků po aplikaci oryzalinu a 684 proteinů po aplikaci latB (Tab. 1).

Celkem bylo identifikováno 30 proteinů se statisticky průkazně ( $P \leq 0,05$ ) změněnou abundancí po aplikaci **oryzalinu** a klasifikováno do funkčních kategorií (Tab. 2a, b).

Tab. 1: Počty skvrn na gelu, statisticky významně změněné, analyzované a identifikované skvrny metodou 2D ELFO + MALDI TOF-TOF a počet identifikovaných proteinů a proteinů se statisticky významně změněnou abundancí získané pomocí bezgelové analýzy s MS (ESI) identifikací. Uvedeno pro vzorky získané z kořenů *Arabidopsis* ošetřených oryzalinem a latrunkulinem B

Inhibitor	Oryzalin	Latrunkulin B
<b>2D ELFO + MALDI TOF-TOF</b>		
Celkový počet skvrn na gelu	332	902
Počet statisticky významně změněných skvrn na gelu	25	81
Počet skvrn analyzovaných v MS (MALDI)	4	11
Počet skvrn identifikovaných v MS (MALDI)	4	6
<b>LC MS (ESI)</b>		
Počet identifikovaných proteinů	762	684
Počet proteinů se statisticky významně změněnou abundancí	30	33

Z toho čtyři proteiny byly identifikovány pouze v oryzalinem ošetřených vzorcích a tři proteiny jenom v kontrolních vzorcích. Identifikace proteinu jenom v jednom vzorku neznamena, že se protein v druhém vzorku nenachází. Jeho výskyt je zřejmě pod hladinou citlivosti detekce. Může to indikovat zvýšení nebo snížení abundance v daném experimentu. Nejvíce zvýšenou abudancí po vlivu oryzalinu měl enzym NADP dependent malic enzyme 3 (Q9XGZ0; 11,73 krát zvýšená abudance) a nejvíce sníženou adenosine kinase 2 (Q9LZG0; 2,98 krát snížená abudance). Více informací o identifikovaných proteinech je v příloze (Tab. 2Pa, b, c).

V Tab. 3a, b jsou uvedeny proteiny se změněnou abudancí po aplikaci **latB**. Celkem 33 proteinů bylo zařazeno do funkčních skupin. Tři proteiny se změněnou abudancí byly identifikovány pouze v kontrolních vzorcích. Jediným proteinem se zvýšenou abudancí byla S adenosylmethionin synthase 1 (P23686; 5,17 krát zvýšená abudance). Nejvíce snížená abudance byla detekována u Heat shock 70 kDa proteinu 5 (Q9S9N1; 8,68 krát snížená abudance) patřící do funkční skupiny skládání proteinů. Více informací o identifikovaných proteinech je v příložené příloze (Tab. 3Pa, b, c).

Tab. 2a: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abudancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Název	Metoda detekce	Mr teor/exp (kDa)	pI teor/exp (pH)	PLGS skóre	Pokrytí (%)	Naštěpené peptidy
<b>Signalizace</b>							
F4KGV2	14 3 3 like protein GF14 lambda	ESI-LC-MS	27,70	4,61	688,78	33,33	6
F4I1C1	14 3 3 like protein GF14 epsilon	ESI-LC-MS	28,55	4,66	400,47	21,51	5
<b>Stres spojené proteiny</b>							
P39207	Nucleoside diphosphate kinase 1	ESI-LC-MS	16,49	6,36	1482,79	57,05	6
O80852	Glutathione S transferase F9	ESI-LC-MS	24,13	6,18	19895,06	46,51	7
B9DFK6	Catalase	ESI-LC-MS	54,99	6,35	152,10	24,47	7
<b>Skládání proteinů</b>							
Q8H1B3	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37b	ESI-LC-MS	75,10	4,76	467,85	12,44	7
Q42406	Peptidyl prolyl cis trans isomerase CYP18 4	ESI-LC-MS	18,37	8,99	3934,32	43,02	4
Q9C7X7	Heat shock 70 kDa protein 18	ESI-LC-MS	68,31	5,03	3656,29	32,90	14

Tab. 2a: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Databázové číslo	Název	Metoda detekce	Mr teor/exp (kDa)	pI teor/exp (pH)	PLGS skóre	Pokrytí (%)	Naštěpené peptidy
<b>Metabolismus</b>							
Q9SJK9	Fructose biphosphate aldolase	ESI-LC-MS	38,36	7,17	4026,09	26,82	6
Q8LFV7	Phosphoglycerate kinase putative	ESI-LC-MS	42,12	5,33	1584,71	47,38	11
Q9C525	Beta glucosidase 21	ESI-LC-MS	59,63	6,58	714,61	28,24	10
Q9C8Y9	Beta glucosidase 22	ESI-LC-MS	59,74	6,79	484,47	14,50	7
Q9SR37	Beta glucosidase 23	ESI-LC-MS	59,68	6,46	14312,36	50,38	16
O04318	Nitrile specifier protein 3 UDP arabinopyranose mutase 1	ESI-LC-MS	51,20	4,86	373,90	15,63	5
Q9SRT9	Pyruvate kinase	ESI-LC-MS	40,60	5,51	354,35	22,69	6
A8MR07	Caffeoyl CoA O methyltransferase 1	ESI-LC-MS	51,86	6,24	330,58	20,46	5
O49499		ESI-LC-MS	29,14	4,96	2114,57	52,90	7
		MALDI TOF-TOF	29,13 / 33,00	4,96 / 5,30	123,00	60,00	16
Q9LZG0	Adenosine kinase 2 S	ESI-LC-MS	37,82	4,97	1404,18	33,62	7
Q9LUT2	adenosylmethionine synthase 4	ESI-LC-MS	42,77	5,42	1389,28	38,17	8
Q94CE5	Gamma aminobutyrate transaminase POP2 mitochondrial	ESI-LC-MS	55,15	7,91	624,38	31,75	7
Q94A28	Aconitate hydratase 3 mitochondrial	ESI-LC-MS	108,41	6,73	379,48	17,39	10
Q9XGZ0	NADP dependent malic enzyme 3	ESI-LC-MS	64,57	6,57	682,17	23,30	8
<b>Regulace cirkadiálního rytmu</b>							
C0Z387	AT2G21660 protein	ESI-LC-MS	10,84	4,00	1473,79	41,41	4
<b>Regulace buněčného dělení</b>							
P31265	Translationally controlled tumor protein homolog	ESI-LC-MS	18,90	4,32	1437,50	41,67	5
<b>Cytoskeletální proteiny</b>							
Q42449	Profilin 1	ESI-LC-MS	14,26	4,50	3798,22	41,22	3
P53492	Actin 7	ESI-LC-MS	41,71	5,16	950,53	36,87	9

Tab. 3a: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Databázové číslo	Název	Metoda detekce	Mr teor/exp (kDa)	pI teor/exp (pH)	PLGS skóre	Pokrytí (%)	
<b>Vezikulární transport</b>							
Q56ZI2	Patellin 2	ESI-LC-MS	75,96	4,72	497,75	27,53	13
<b>Proteolýza</b>							
Q9SEI4	26S protease regulatory subunit 6B homolog	ESI-LC-MS	45,72	5,26	582,10	19,12	6
<b>Nucleosomové skládání</b>							
P59226	Histone H3 2	ESI-LC-MS	15,26	11,71	804,50	33,82	3
Q9LZ45	Histone H2B 9	ESI-LC-MS	14,54	10,52	794,90	26,52	4
<b>Metabolismus aminokyselin</b>							
Q93ZK3	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1	MALDI TOF-TOF	84,6 / 80	6,09 / 6,9	88	36	22
Q9FPJ3	Serine hydroxymethyltransferase 4	MALDI TOF-TOF	52,1 / 55	6,8 / 7,7	80	34	15
<b>Neznámá funkce</b>							
O80950	Myrosinase-binding protein-like At2g39310	MALDI TOF-TOF	50,6 / 55	5,15 / 5,5	89	42	13

Tab. 2b: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Modifikované peptidy	Množství (ngramy)	K průměr abundance (ngramy)	O průměr abundance (ngramy)	Změna abundance	Hodnota P	Zvýšení / snížení abundance	Číslo spotu
<b>Signalizace</b>								
F4KGV2	0	2,60	3,86	6,05	1,57	0,04	zvýšení	
F4I1C1	0	8,59	5,61	9,86	1,76	0,04	zvýšení	
<b>Stres spojené proteiny</b>								
P39207	0	7,27	29,27	0,00	pouze K		snížení	
O80852	1	71,91	50,60	33,75	0,67	0,05	snížení	
B9DFK6	1	5,18	0,00	3,52	pouze O		zvýšení	
<b>Skládání proteinů</b>								
Q8H1B3	0	12,67	1,21	0,73	0,60	0,05	snížení	
Q42406	0	14,70	0,00	54,64	pouze O		zvýšení	
Q9C7X7	1	8,99	27,89	5,04	0,18	0,05	snížení	



Tab. 2b: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Databázové číslo	Modifikované peptidy	Množství (ngramy)	K průměr abundance (ngramy)	O průměr abundance (ngramy)	Změna abundance	Hodnota P	Zvýšení / snížení abundance	Číslo spotu
<b>Metabolismus</b>								
Q9SJK9	0	0,13	1,58	0,00	pouze K		snížení	
Q8LFV7	1	15,64	0,00	9,86	pouze O		zvýšení	
Q9C525	0	21,94	37,00	29,73	0,80	0,03	snížení	
Q9C8Y9	1	5,57	17,66	11,78	0,67	0,03	snížení	
Q9SR37	1	315,50	0,00	89,66	pouze O		zvýšení	
O04318	1	1,11	1,00	0,44	0,44	0,04	snížení	
Q9SRT9	0	4,92	8,19	10,90	1,33	0,02	zvýšení	
A8MR07	0	10,34	8,91	0,00	pouze K		snížení	
O49499	0	13,29	12,10	4,81	0,40	0,01	snížení	
							snížení	1
Q9LZG0	0	13,97	13,93	4,68	0,34	0,01	snížení	
Q9LUT2	0	18,73	19,38	12,17	0,63	0,04	snížení	
Q94CE5	0	12,01	22,31	13,72	0,61	0,02	snížení	
Q94A28	2	20,86	22,56	8,96	0,40	0,02	snížení	
Q9XGZ0	0	21,11	1,58	18,50	11,73	0,02	zvýšení	
<b>Regulace cirkadiálního rytmu</b>								
COZ387	0	4,43	2,10	3,87	1,85	0,04	zvýšení	
<b>Regulace buněčného dělení</b>								
P31265	0	11,19	18,06	13,37	0,74	0,00	snížení	
<b>Cytoskeletální proteiny</b>								
Q42449	0	6,88	6,83	5,12	0,75	0,01	snížení	
P53492	0	49,47	30,06	46,97	1,56	0,03	zvýšení	
<b>Vezikulární transport</b>								
Q56ZI2	1	26,79	41,88	18,91	0,45	0,03	snížení	
Q9SEI4	1	8,34	7,84	4,31	0,55	0,02	snížení	
<b>Nucleosomové skládání</b>								
P59226	0	2,34	3,77	5,13	1,36	0,05	zvýšení	
Q9LZ45	1	6,52	10,23	6,40	0,63	0,03	snížení	
<b>Metabolismus aminokyselin</b>								
Q93ZK3							snížení	3
Q9FPJ3							snížení	2
<b>Neznámá funkce</b>								
O80950							zvýšení	4

Tab. 3a: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latB získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Název	Metoda	Mr teor/exp (kDa)	pI teor/exp (pH)	PLGS skóre	Pokrytí (%)	Naštěpené peptidy
<b>Cytoskeletální proteiny</b>							
Q42449	Profilin 1	ESI-LC-MS	14257	4,50	1551,90	40,46	3
Q8RYC2	Putative actin 5	ESI-LC-MS	42090	5,02	549,75	33,33	7
P53492	Actin 7	ESI-LC-MS	41708	5,16	1670,52	41,91	9
<b>Proteiny stresové odpovědi</b>							
A8MSA4	Uncharacterized protein At4g08390	ESI-LC-MS	37771	8,13	334,92	15,85	4
C0Z387	AT2G21660 protein	ESI-LC-MS	10844	4,00	1646,65	41,41	4
Q9C525	Beta glucosidase 21	ESI-LC-MS	59625	6,58	827,18	30,53	11
O04314	Jasmonate inducible protein isolog	ESI-LC-MS	32138	5,36	3657,03	49,33	7
P94014	Germin like protein subfamily 2 member 1	ESI-LC-MS	22853	8,85	1634,62	30,59	2
P42763	Dehydrin ERD14	ESI-LC-MS	20773	5,24	1749,01	32,97	4
<b>Skládání proteinů</b>							
F4K007	Luminal binding protein 2	ESI-LC-MS	67358	4,99	2262,37	24,80	13
Q9S9N1	Heat shock 70 kDa protein 5	ESI-LC-MS	70870	5,12	1322,63	11,92	6
Q9LZ52	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e	MALDI TOF-TOF	71,7 / 72	6,03 / 6,2	74,00	46,00	29
<b>Signalizace</b>							
F4I1C1	14 3 3 like protein GF14 epsilon	ESI-LC-MS	28550	4,66	1671,74	25,50	5
Q96300	14 3 3 like protein GF14 nu	ESI-LC-MS	29805	4,55	1054,90	26,79	6
<b>Proteinová syntéza</b>							
P51407	60S acidic ribosomal protein P2 1	ESI-LC-MS	11444	4,34	4962,90	77,39	5
Q9SJ36	40S ribosomal protein S17	ESI-LC-MS	15941	10,47	797,17	15,71	2
<b>Metabolismus</b>							
Q39161	Ferredoxin nitrite reductase chloroplastic	ESI-LC-MS	65463	5,88	382,09	15,53	7
P48491	Triosephosphate isomerase cytosolic	ESI-LC-MS	27152	5,22	5773,51	66,54	9
Q1H583	GDSL esterase lipase	ESI-LC-MS	43166	6,72	1961,81	30,69	8

Tab. 3a: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latB získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Databázové číslo	Název	Metoda	Mr teor/exp (kDa)	pI teor/exp (pH)	PLGS skóre	Pokrytí (%)	Naštěpené peptidy
	2 3 biphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase 1	ESI-LC-MS	60541	5,17	1293,09	39,32	10
O04499	Probable fructokinase 2	ESI-LC-MS	35870	4,72	390,60	28,88	9
Q9LNE3	Argininosuccinate synthase chloroplastic	ESI-LC-MS	53811	6,24	155,11	21,46	6
Q9SZX3	Thiocyanate methyltransferase 1	ESI-LC-MS	27390	4,38	2335,90	42,68	6
Q0WP12	Isocitrate dehydrogenase NAD regulatory subunit 3 mitochondrial	ESI-LC-MS	39931	7,20	135,37	19,84	4
O81796	ATP synthase subunit d, mitochondrial	MALDI TOF-TOF	19,6 / 75	5,09 / 5,5	96,00	57,00	15
Q9FT52	Probable glucuronokinase 2	MALDI TOF-TOF	41,2 / 85	6,76 / 6,3	57,00	28,00	13
Q9LY82	<b>Metabolismus aminokyseliny</b>						
	S adenosylmethionine synthase 1	ESI-LC-MS	43130	5,41	718,04	35,11	8
P23686	5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	ESI-LC-MS	84303	6,06	3143,68	39,35	20
O50008	<b>Metabolismus buněčné stěny</b>						
	Pectinesterase pectinesterase inhibitor 18	ESI-LC-MS	61648	8,97	312,95	12,03	5
Q1JPL7	<b>Vezikulární transport</b>						
	Mitochondrial outer membrane porin 3	ESI-LC-MS	29193	8,77	967,31	29,93	5
Q9SMX3	V type proton ATPase subunit E1	ESI-LC-MS	26043	5,99	1061,90	39,57	8
Q39258	sec23/sec24-like transport protein	MALDI TOF-TOF	86,2 / 83	5,6 / 6,3	117,00	31,00	24
NP_193152	Putative cysteine-rich receptor-like protein kinase 39	MALDI TOF-TOF	74,3 / 75	5,57 / 6,3	47,00	21,00	15
Q9SYS7	<b>Nucleosomové skládání</b>						
	Histone H3 2	ESI-LC-MS	15258	11,71	1661,07	28,68	2
P59226							

Tab. 3a: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latB získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Databázové číslo	Název	Metoda	Mr teor/exp (kDa)	pI teor/exp (pH)	PLGS skóre	Pokrytí (%)	Naštěpné peptidy	Databázové číslo
Q9C977	Neznámá funkce Pentatricopeptide repeat-containing protein		MALDI TOF-TOF	67,6 / 70	7,5 / 6,3	53	27	15

Tab. 3b: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latB získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Modifikované peptidy	Množství (ngramy)	Kontrola průměr abundance (ngramy)	LatB průměr abundance (ngramy)	Změna abundance	Hodnota P	Zvýšení / snížení abundance	Číslo skvrny
<b>Cytoskeletální proteiny</b>								
Q42449	0	6,83	7,61	4,86	0,64	0,01	snížení	
Q8RYC2	3	4,44	5,28	1,98	0,37	0,05	snížení	
P53492	2	47,96	45,27	30,29	0,67	0,24	snížení	
<b>Proteiny stresové odpovědi</b>								
A8MSA4	0	12,01	11,32	7,48	0,66	0,05	snížení	
C0Z387	0	2,30	9,57	3,47	0,36	0,05	snížení	
Q9C525	1	4,61	20,32	6,12	0,30	0,02	snížení	
O04314	0	51,99	83,40	46,40	0,56	0,03	snížení	
P94014	0	4,33	5,13	1,99	0,39	0,05	snížení	
P42763	1	9,67	19,44	12,83	0,66	0,05	snížení	
<b>Skládání proteinů</b>								
F4K007	0	30,57	54,83	26,53	0,48	0,02	snížení	
Q9S9N1	0	2,81	6,86	0,79	0,12	0,00	snížení	
Q9LZ52							zvýšení	8
<b>Signalizace</b>								
F4I1C1	0	5,38	10,52	5,03	0,48	0,05	snížení	
Q96300	0	5,98	12,66	6,84	0,54	0,07	snížení	
<b>Proteinová syntéza</b>								
P51407	0	7,85	8,35	4,67	0,56	0,00	snížení	
Q9SJ36	0	5,73	9,00	5,14	0,57	0,01	snížení	
<b>Metabolismus</b>								
Q39161	0	15,81	16,84	9,78	0,58	0,02	snížení	
P48491	0	24,35	30,82	19,67	0,64	0,03	snížení	
Q1H583	0	20,13	34,87	21,08	0,60	0,03	snížení	
O04499	0	22,61	32,93	21,55	0,65	0,04	snížení	
Q9LNE3	1	5,27	4,24	0	pouze K		snížení	
Q9SZX3	0	7,76	17,81	4,66	0,26	0,05	snížení	
Q0WP12	0	14,58	14,94	10,68	0,71	0,05	snížení	
O81796	1	2,12	2,12	0	pouze K		snížení	
Q9FT52							snížení	5

Tab. 3b: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latB získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Databázové číslo	Modifikované peptidy	Množství (ngramy)	Kontrola průměr abundance (ngramy)	LatB průměr abundance (ngramy)	Změna abundance	Hodnota P	Zvýšení / snížení abundance	Číslo skvrny
Q9LY82							zvýšení	9
	<b>Metabolismus aminokyselin</b>							
P23686	0	6,19	1,31	6,77	5,17	0,05	zvýšení	
O50008	1	155,14	176,84	106,46	0,60	0,05	snížení	
	<b>Metabolismus buněčné stěny</b>							
Q1JPL7	0	20,07	19,31	10,62	0,55	0,03	snížení	
	<b>Vezikulární transport</b>							
Q9SMX3	0	17,09	17,15	12,79	0,75	0,01	snížení	
Q39258	0	7,96	12,66	7,61	0,60	0,03	snížení	
NP_193152							snížení	10
Q9SYS7							zvýšení	6
	<b>Nucleosomové skládání</b>							
P59226	0	3,25	3,25	0	pouze K		snížení	
	<b>Neznámá funkce</b>							
Q9C977							zvýšení	7

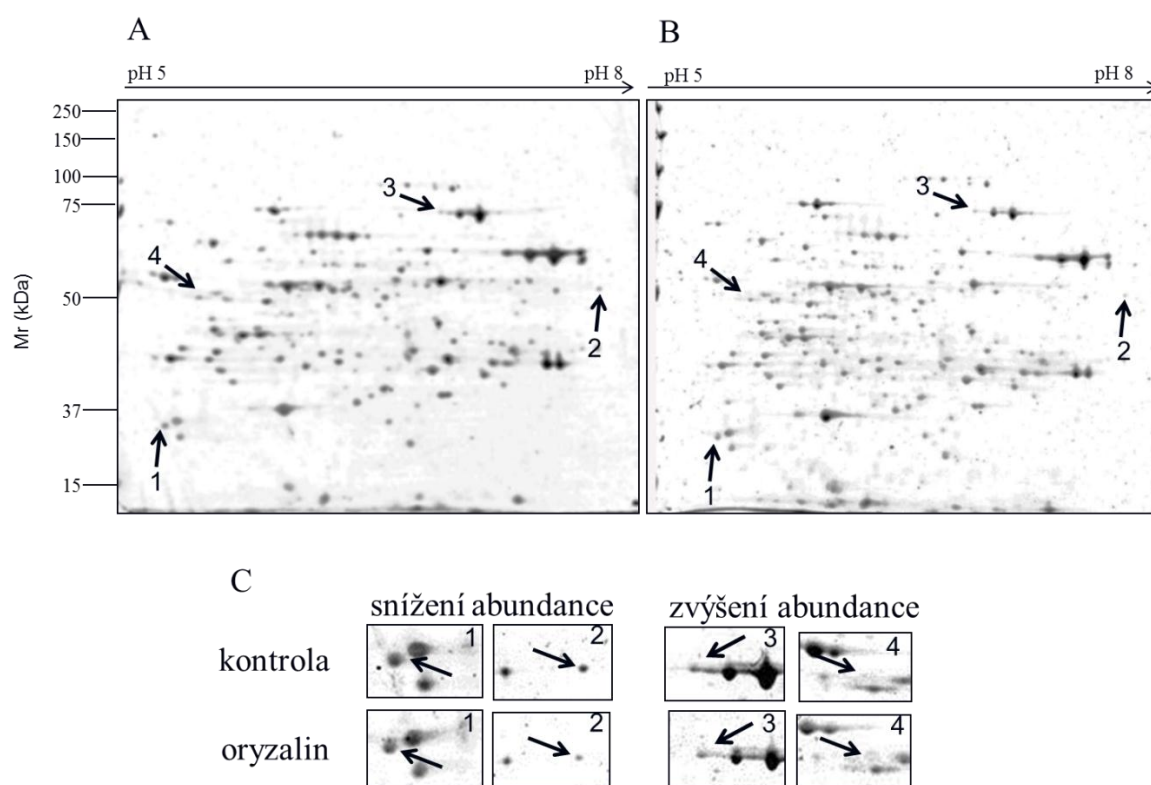
#### 4.2.2 Gelová proteomická analýza

Metodou gelové proteomické analýzy byly detekovány změny abundance proteinů ve vzorcích získaných z kořenů *Arabidopsis* ošetřených 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  oryzalinem a 0,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB s kontrolními vzorky. Identifikace proteinů byla provedena metodou MALDI TOF-TOF ve spolupráci s Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná.

V Tab. 1 je uveden celkový počet skvrn (332) na gelu získaném ze vzorků ovlivněných oryzalinem a aplikovaných na strip metodou pohárku. Z nich bylo nalezeno 25 statisticky významných skvrn, 4 nejvýznamnější ( $P \leq 0,01$ ) byly vybrány pro analýzu a následně identifikovány (Obr. 11A, B; Tab. 2). Zvětšené výřezy z 2D-gelů ukazující skvrny proteinů se změnou abundancí zjištěné 2D ELFO jsou uvedeny (Obr. 11C). Sníženou abundancí vykazovala skvrna č. 1 (Caffeoyl CoA O-methyltransferase 1) a č. 2 (Serine hydroxymethyltransferase 4). Zvýšená abundance byla zaznamenána u skvrn č. 3 (5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1) a č. 4 (Myrosinase-binding protein-like At2g39310). Počty proteinových skvrn se sníženou nebo zvýšenou abundancí jsou uvedeny v Tab. 4 a jejich grafické vyjádření na Obr. 12A.

V Tab. 1 je uveden celkový počet skvrn (902) na gelu získaném ze skvrn ovlivněných latB a aplikovaných na strip metodou papírového mostu. Odlišná metoda

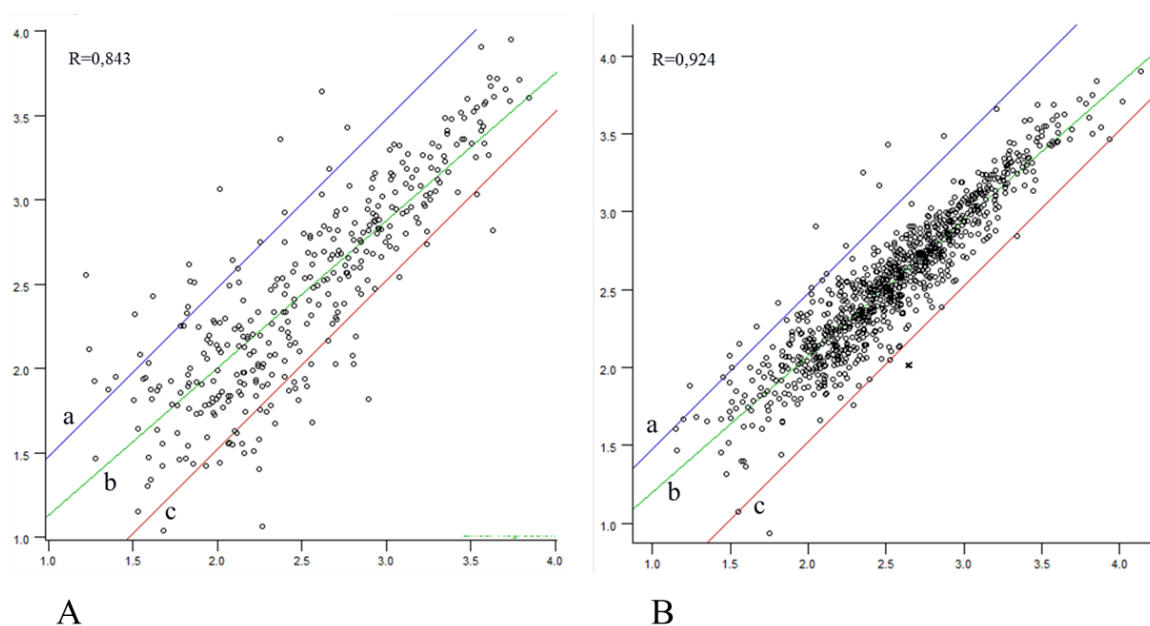
aplikace v případě oryzalinem a latB ovlivněných vzorcích ovlivnila celkový počet skvrn na gelu. Aplikace vzorků metodou papírového mostu poskytla výrazně vyšší počet skvrn na gelu. Počet statisticky významných skvrn byl 81, z toho 11 nejvýznamnějších ( $P \leq 0,01$ ) bylo analyzováno a 6 z nich identifikováno (Obr. 13A, B; Tab. 3). Zvětšené výřezy z 2D-gelů ukazující skvrny proteinů se změnou abundancí zjištěné 2D ELFO jsou uvedeny (Obr. 13C). Snížená abundance byla zjištěna u skvrny č. 5 (ATP synthase subunit d, mitochondrial). Ke zvýšení abundance došlo u skvrn č. 6 (Putative cysteine-rich receptor-like protein kinase 39), č. 7 (Pentatricopeptide repeat-containing protein), č. 8 (Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e), č. 9 (Probable glucuronokinase 2) a č. 10 (sec23/sec24-like transport protein). Počty proteinových skvrn se sníženou nebo zvýšenou abundancí jsou uvedeny v Tab. 4 a jejich grafické vyjádření na Obr. 12B. Úspěšnost identifikace proteinů ze spotů byla nízká. Metoda identifikace proteinových skvrn z 2D ELFO by se měla optimalizovat například zvolením další metody přečištění vyřezaných vzorků, použitím speciálních zkumavek pro přípravu na identifikaci pomocí MALDI TOF-TOF a chromatografická separace před MALDI TOF-TOF analýzou.



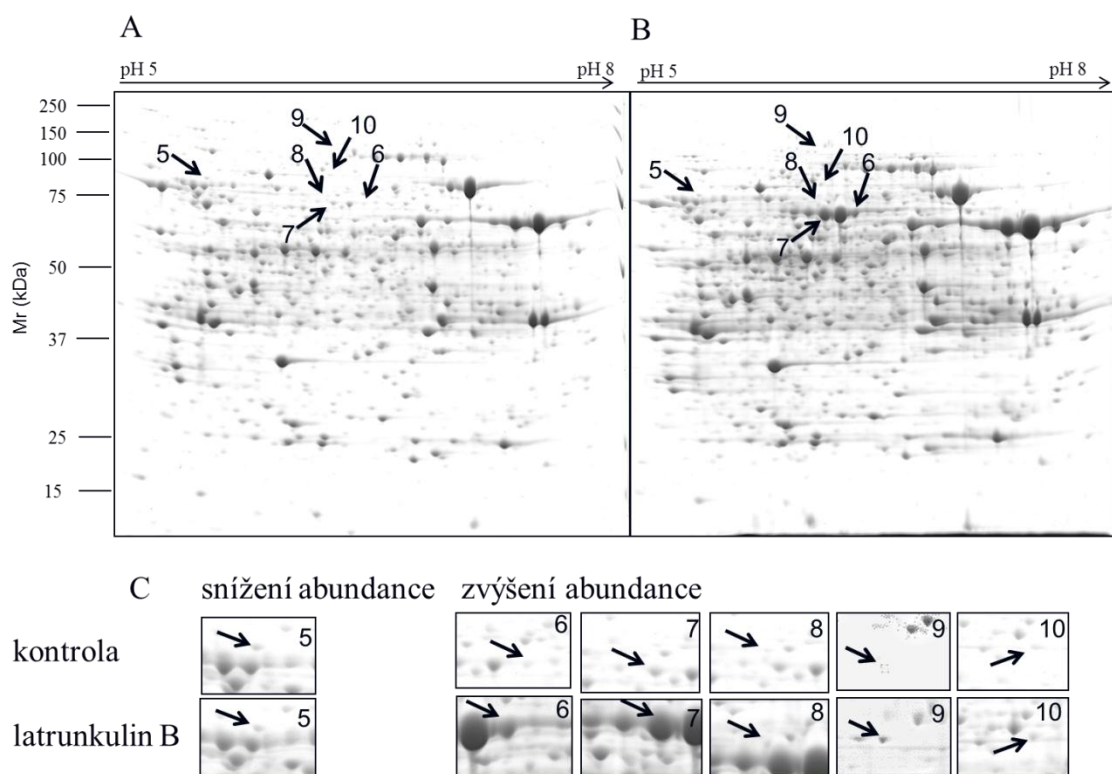
Obr. 11: Reprezentativní 2-D gely proteinových extraktů z kontrolních (A) a oryzalinem ošetřených (B) kořenů *Arabidopsis* a detaily individuálních skvrn (C). Proteiny s odlišnou abundancí jsou označeny šipkami. Čísla odkazují na proteiny v tabulce 1.

Tab. 4: Počty skvrn rozdělených podle rozdílné abundance proteinů ovlivněných oryzalinem nebo latB v kořenech *Arabidopsis*.

Metoda	Trend	Násobek změny abundance	Inhibitor	Počet proteinů
2D ELFO + MALDI TOF-TOF	Zvýšení	$\geq 3$ krát	oryzalin	21
			latB	15
		Od 1,5 do 3 krát	oryzalin	42
			latB	118
		Od 1 do 1,5 krát	oryzalin	72
	Snížení	Od 1 do 1,5 krát	oryzalin	87
			latB	341
		Od 1,5 do 3 krát	oryzalin	91
			latB	116
		$\geq 3$ krát	oryzalin	35
	latB	4		



Obr. 12: Grafické vyjádření změny abundancí skvrn získaných z kořenů *Arabidopsis* ošetřených oryzalinem (A) a latB (B) ve srovnání s kontrolami. Skvrny nad přímkou (a) mají 3 krát zvýšenou abundanci, pod přímkou (c) sníženou abundanci 3 krát. Příмка (b) značí lineární regresi.

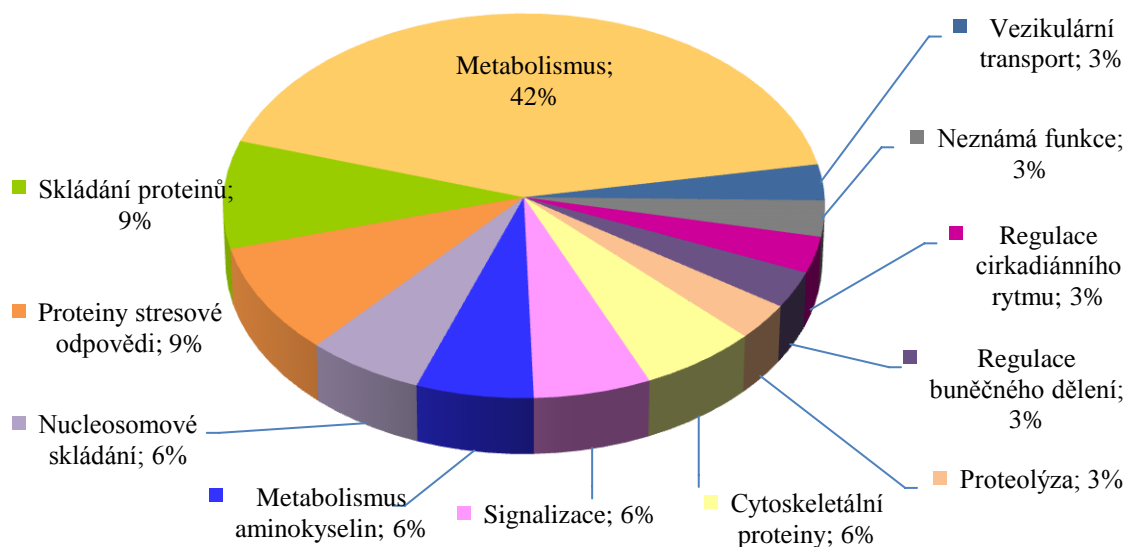


Obr. 13: Reprezentativní 2-D gely proteinových extraktů z kontrolních (A) a latB ošetřených (B) kořenů *Arabidopsis* a detaily individuálních skvrn (C). Proteiny s odlišnou abundancí jsou označeny šipkami. Čísla odkazují na proteiny v tabulce 2.

### 4.2.3 Charakterizace změn proteomu kořenů *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem

Všechny statisticky významné proteiny získané z kořenů *Arabidopsis* ovlivněných  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  oryzalinem identifikované bezgelovými a gelovými proteomickými přístupy byly klasifikovány do 12 funkčních kategorií (Obr. 13). Nejvíce ovlivněné byly metabolické proteiny (42 %) z celkového počtu proteinů se změnou abundancí způsobenou oryzalinem. Další nejvíce ovlivněné funkční skupiny byly proteiny stresové odpovědi (9 %) a proteiny podílející se na skládání proteinů (9 %). Oryzalin ovlivnil cytoskeletální proteiny (6 %) profilin 1 (Q42449; 1,33 krát snížená abundance) a aktin 7 (P53492; 1,56 krát zvýšená abundance). Další skupiny ovlivněné oryzalinem byly signální (6 %), metabolismus aminokyselin (6 %), nukleosomové skládání (6 %), proteolýza (3 %), regulace buněčného dělení (3 %), regulace cirkadiálního rytmu (3 %), vezikulární transport (3 %) a proteiny s neznámou funkcí (3 %).

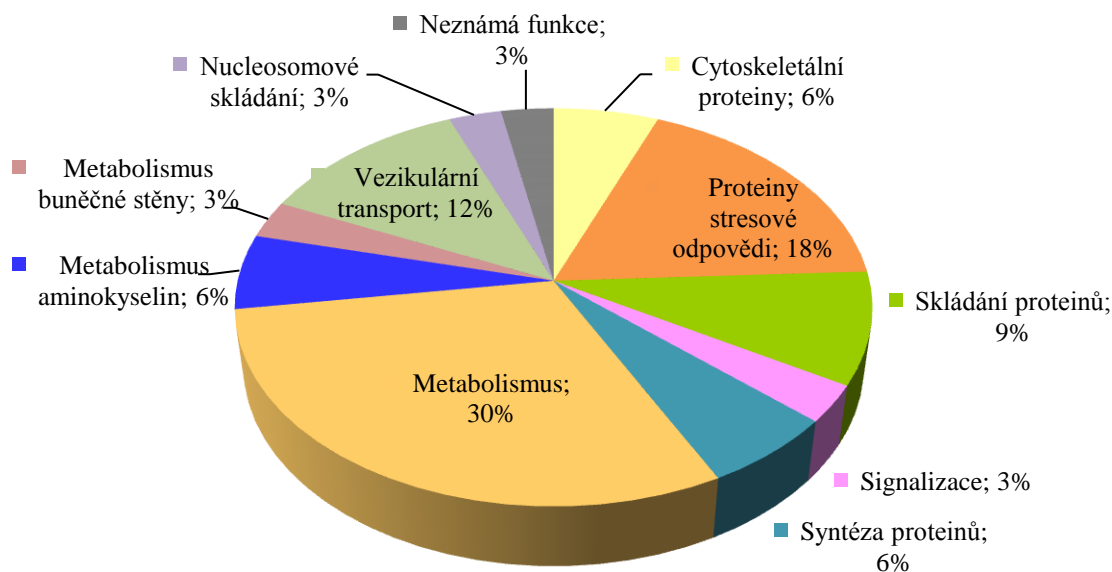




Obr. 13: Klasifikace proteinů se změnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* ošetřených oryzalinem do funkčních kategorií. Výšečový graf zobrazuje procentuální rozdělení proteinů podle funkčních tříd.

#### 4.2.4 Charakterizace změn proteomu kořenů *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B

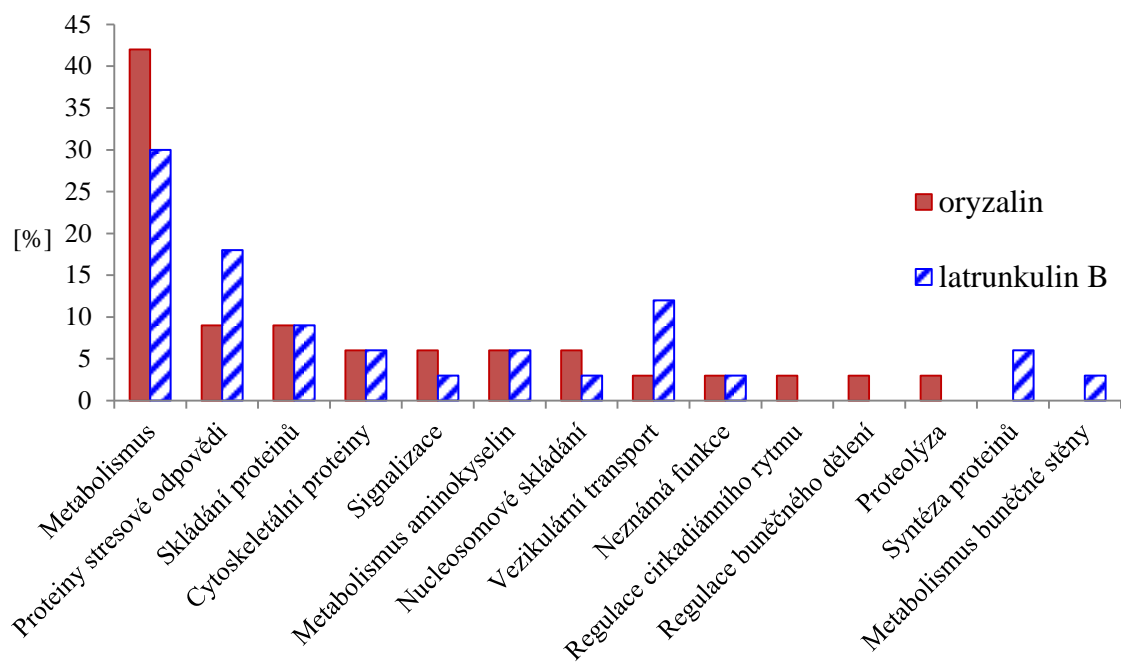
Na Obr. 14 je procentuální zastoupení statisticky významných proteinů získaných z kořenů *Arabidopsis* ovlivněných  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  latB a identifikovaných bezgelovými a gelovými proteomickými přístupy. Metabolické proteiny byly nejvíce ovlivněnou skupinou (30 %). Druhou nejovlivněnější skupinou byly proteiny stresové odpovědi (18 %). Dále proteiny zapojené do vezikulárního transportu (12 %), skládání proteinů (9 %). Jako latB ovlivněné cytoskeletální proteiny (6 %) byly identifikovány profilin 1 (1,57 krát snížená abundance) a aktin 5 (2,67 krát snížená abundance). Následují proteinové funkční skupiny metabolismu aminokyselin (6 %), syntéza proteinů (6 %), signalizace (3 %), metabolismus buněčné stěny (3 %), nukleosomové skládání (3 %) a proteiny s neznámou funkcí (3 %).



Obr. 14: Klasifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* ošetřených latrunkulinem B do funkčních kategorií. Výšečový graf zobrazuje procentuální rozdělení proteinů podle funkčních tříd.

#### 4.2.5 Porovnání účinků oryzalinu a latrunkulinu B na proteomické úrovni

Spojením dvou nezávislých proteomických analýz (bezgelové a gelové) lze srovnat vliv dvou různých cytoskeletálních inhibitorů, oryzalinu ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a latB ( $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), na změny abundance proteinů v kořenech *Arabidopsis* ošetřených těmito inhibitory. Porovnání jejich vlivu vzhledem k funkčním skupinám proteinů je uvedeno (Obr. 15). Celkový počet funkčních skupin pro proteiny ovlivněné oryzalinem byl 12, zatímco v případě latB byly ovlivněné proteiny rozděleny do 11 funkčních skupin. Jak u oryzalinu, tak u latB byly nejvíce ovlivněny metabolické proteiny. Druhou nejvíce ovlivněnou skupinou byly u obou inhibitorů proteiny stresové odpovědi. Třetí nejovlivněnější skupina se mezi inhibitory lišila, pro oryzalin náleží skupině skládání proteinů, zatímco u latB jsou to proteiny podílející se na vezikulárním transportu. Cytoskeletální proteiny měly stejné procentuální zastoupení u oryzalinu i latB. Z výsledků vyplývá, že jak oryzalin tak latB výrazně ovlivňují metabolické proteiny. Zastoupení ostatních skupin je u proteinů ovlivněných oryzalinem téměř vyrovnané, zatímco u proteinů ovlivněných latB jsou nejvíce zastoupeny skupiny proteinů stresové odpovědi, proteinů vezikulárního transportu a syntézy proteinů. Z čehož lze vyvodit, že působení latB na proteiny je více specifické než působení oryzalinu.



Obr. 15: Porovnání procentuálního zastoupení funkčních skupin proteinů se změnou abundancí vlivem oryzalinu (celistvá výplň) a latB (šrafovaně).

Celkem 4 společné proteiny, patřící do různých funkčních tříd, byly statisticky významně ovlivněny jak oryzalinem tak latB v porovnání s kontrolními vzorky s odpovídajícím objemem DMSO (Tab. 5). Z toho pouze 2 proteiny, profilin 1 (Q42449) a 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase (O50008), byly ovlivněny stejným způsobem, snížením nebo zvýšením abundance.

Tab. 5: Přehled proteinů se změnou abundancí vlivem oryzalinu anebo latB

Funkční třída	Databázové číslo	Název	Změna abundance oryzalin	Změna abundance latB
Cytoskeletální proteiny	Q42449	Profilin 1	snížení	snížení
Metabolismus AMK	O50008	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	snížení	snížení
Nukleosomové skládání	P59226	Histone H2B 9	zvýšení	snížení
Signalizace	F4I1C1	14 3 3 like protein GF14 epsilon	zvýšení	snížení

#### 4.2.6 Funkce vybraných proteinů se změnou abundancí

NADP dependentní jablečný enzym 3 (Q9XGZ0), který se nachází v cytoplasmě, měl nejvýše zvýšenou abundanci po aplikaci oryzalinu. Jeho funkcí je oxidoredukční katalýza přeměny malátu na oxalacetát v citrátovém cyklu (Wheeler *et al.*, 2005). Nejvíce sníženou abundanci po působení oryzalinu měla adenosin kinasa 2 (Q9LZG0) lokalizovaná v cytosolu a plasmatické membráně. Katalyzuje ATP-dependentní fosforylaci adenosinu nebo jiného nukleosidu na monofosfátové deriváty. Je nezbytná pro udržení methylové recyklace (Pereira *et al.*, 2007). Ke snížení abundance po aplikaci latB došlo u cytoplasmatického Heat shock 70 kDa proteinu 5 (Q9S9N1), jehož funkcí je účast na obranných reakcích a procesu skládání proteinů. Ve spolupráci s dalšími chaperony stabilizuje již existující proteiny proti agregaci a zprostředkovává skládání posttranslačně vzniklých polypeptidů jak v cytosolu, tak v organelách (Wang *et al.*, 2014). Protein s nejvíce zvýšenou abundancí po působení latB, S-adenosylmethionine synthasa 1 (P23686), katalyzuje tvorbu S-adenosylmethioninu z methioninu a ATP. Lokalizace tohoto proteinu je v cytoplasmě ([http://hamap.expasy.org/unirule/MF\\_00086](http://hamap.expasy.org/unirule/MF_00086)).

Kaffeoyl-CoA O-methyltransferasa 1 (O49499; skvrna č. 1), která methyluje kaffeoyl-CoA na feruloyl-CoA, vykazovala sníženou abundanci po aplikaci oryzalinu. Má velmi nízkou aktivitu s kyselinou kávovou a eskuletinem. Podílí se na biosyntéze skopoletinu v kořenech a je lokalizován v cytosolu (Do *et al.*, 2007). Serine hydroxymethyltransferasa 4 (Q9FPJ3; skvrna č. 2) katalyzuje interkonverzi serinu a glycinu. Nachází se v cytoplasmě ([http://hamap.expasy.org/unirule/MF\\_00051](http://hamap.expasy.org/unirule/MF_00051)). Po aplikaci oryzalinu byla její abundance snížena. Ke zvýšení abundance po aplikaci oryzalinu došlo u cytoplasmatické 5-methyltetrahydropteroyltriglutamát—homocystein methyltransferasy 1 (Q93ZK3; skvrna č. 3), která katalyzuje přenos methylové skupiny z 5-methyltetrahydrofolátu na homocystein za tvorby methioninu (Raveland *et al.*, 2004).

Ke snížení abundance cytoskeletálního proteinu profilinu 1 (Q42449) došlo po aplikaci jak oryzalinu tak latB. Profilin 1 je protein lokalizovaný v cytoplasmě a cytoskeletu. Váže se na monomerní aktin za tvorby komplexu v poměru 1:1, čímž ovlivňuje strukturu cytoskeletu. Při vysokých koncentracích zabraňuje polymerizaci aktinu. Inhibuje tvorbu inositol-trisfosfátu a diacylglycerolu vazbou na fosfatidylinositol-4,5-bisifosfát (Staiger *et al.*, 2010). Zvýšená abundance působením oryzalinu byla nalezena u cytoskeletálního aktinu 7 (P53492), který je považován za jeden z vegetativních aktinů podílející se na regulaci hormonálně indukované rostlinné

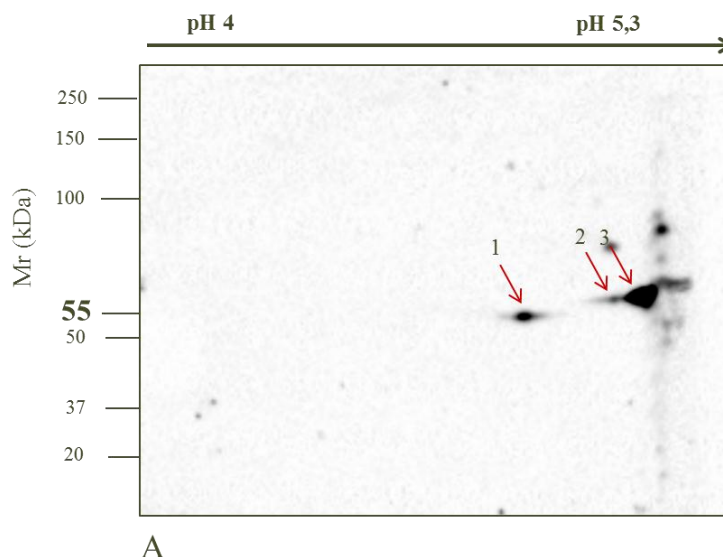
buněčné proliferace a tvorby kalusu (Kandasamy *et al.*, 2001). Působením latB byla abundance cytoskeletálního proteinu putativního aktinu 5 (Q8RYC2) snížena. Je lokalizován v cytoplasmě a cytoskeletu. Přesná funkce této formy aktinu není známá (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8RYC2>).

Podjednotka d mitochondriální ATP synthasy (Q9FT52; skvrna č. 5), vykazující sníženou abundanci po aplikaci latB, se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně. Podílí se na přenosu protonů přes membránu za tvorby ATP (Alavian *et al.*, 2014). Abundance cystein-bohatého receptoru like protein kinasa 39 (Q9SYS7; skvrna č. 6) byla zvýšena po aplikaci latB. Tento protein má kinasovou aktivitu, podílí se na fosforylaci AMK a je lokalizován v endomembránovém systému ([http://www.string-db.org/newstring.cgi/show\\_network\\_section.pl](http://www.string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl)). Vlivem latB zvýšenou abundanci měl pentatrikopeptid repetice-obsahující protein (Q9C977; skvrna č. 7) vyskytující se v mitochondrionu, kde se váže na DNA (Aphasizheva *et al.*, 2011). Ke zvýšení abundance po aplikaci latB došlo u Heat shock 70 kDa proteinu 1 neboli transkripční podjednotky mediátoru RNA polymerasy II (Q9LZ52; skvrna č. 8), který se nachází v cytoplasmě a jádře. Podílí se na obranných reakcích a hraje roli v třídění proteinů (Sung a Guy, 2003). Glukoronokinasa 2 (Q9LY82; skvrna č. 9), což je cukr-1-kinasa se substrátovou specifitou pro D-glukoronovou kyselinu a ATP, měla zvýšenou abundanci po aplikaci latB. Je zahrnuta v biosyntéze UDP-glukoronové kyseliny poskytující nukleotidové cukry pro polymery buněčné stěny a lokalizovaná v cytoplasmě (Gangl *et al.*, 2014). Ke zvýšení abundance po aplikaci latB došlo u sec23/sec24-like transportního proteinu (NP\_193152.2; AT4G14160; skvrna č. 10), který se podílí mimo jiné na vezikulárním transportu z ER do GA, vnitrobuněčném proteinovém transportu, organizaci a vezikulárním transportu GA, buněčného růstu a morfogenezi. Vyskytuje se v cytoplasmě (Lord *et al.*, 2011).

### **4.3 Analýza abundance $\alpha$ -tubulinu a aktinu po ovlivnění inhibitory pomocí imunoblotování**

Metodou 2D imunoblotování lze separovat a detekovat isoformy a také posttranslační modifikace proteinů v případě, že tyto různé formy proteinů mají různý isoelektrický bod nebo molekulovou hmotnost. Nejdříve bylo nutné tuto metodu optimalizovat. Pro detekci  $\alpha$ -tubulinu byly nejprve zvoleny gelové stripy s pH rozsahem 4-5,3. Detekce byla umožněna pomocí protilátky anti- $\alpha$ -tubulinu, která je specifická na  $\alpha$ -tubulin (instrukce výrobce). Na immunoblotu (Obr. 16) se v oblasti 55 kDa odpovídající

$\alpha$ -tubulinu ukázaly 3 skvrny v různé oblasti pH. Skvrna č. 3, která měla nejintenzivnější denzitu, migrovala do oblasti pH přibližně 5,1. Je pravděpodobné, že skvrna č. 3 představuje shluk více isoform  $\alpha$ -tubulinu. Skvrna č. 2 s nejnižší denzitou migrovala do oblasti pH o málo menší než skvrna č. 3. Posun mezi skvrnou č. 3 a 2 představuje posun pH 0,8 do kyselé oblasti. Předpokládáme, že skvrna č. 2 může být posttranslační modifikací  $\alpha$ -tubulinu způsobená fosforylací. Tuto hypotézu je nutné potvrdit nezávislými metodami, jako je například aplikace fosfatasy do extraktu na zabránění fosforylace. Pokud na imunoblotu z takto ošetřeného extraktu podobný posun v migraci skvrny nenastane, můžeme pokládat detekovanou PTM jako fosforylací. Skvrna č. 1 má v porovnání se skvrnami č. 2 a 3 nižší isoelektrický bod (4,8) a také nižší molekulovou hmotnost. Identitu této skvrny je nutné zjistit experimentálně. Hypoteticky může jít o posttranslační modifikaci, nebo více posttranslačních modifikací  $\alpha$ -tubulinu najednou, což vyžaduje další dokazování. Ostatní skvrny jsou pravděpodobně nespecifické z důvodu velkého rozdílu molekulové hmotnosti. Navíc tyto skvrny nemají ekvivalentní pás na imunoblotech zhotovených 1D imunoblotováním (například Obr. 17D, Obr. 19C a Obr. 21D). Z důvodu nedostatečné separace  $\alpha$ -tubulinu jsme rozsah pH gelového stripu upravili na na 5-6,3. Bylo dosaženo vhodné migrace  $\alpha$ -tubulinu na 2D imunoblotu (Obr. 17A). Ukázalo se, že daný rozsah pH byl vhodný pro separaci  $\alpha$ -tubulinových i aktinových isoform (Obr. 17- Obr. 22).



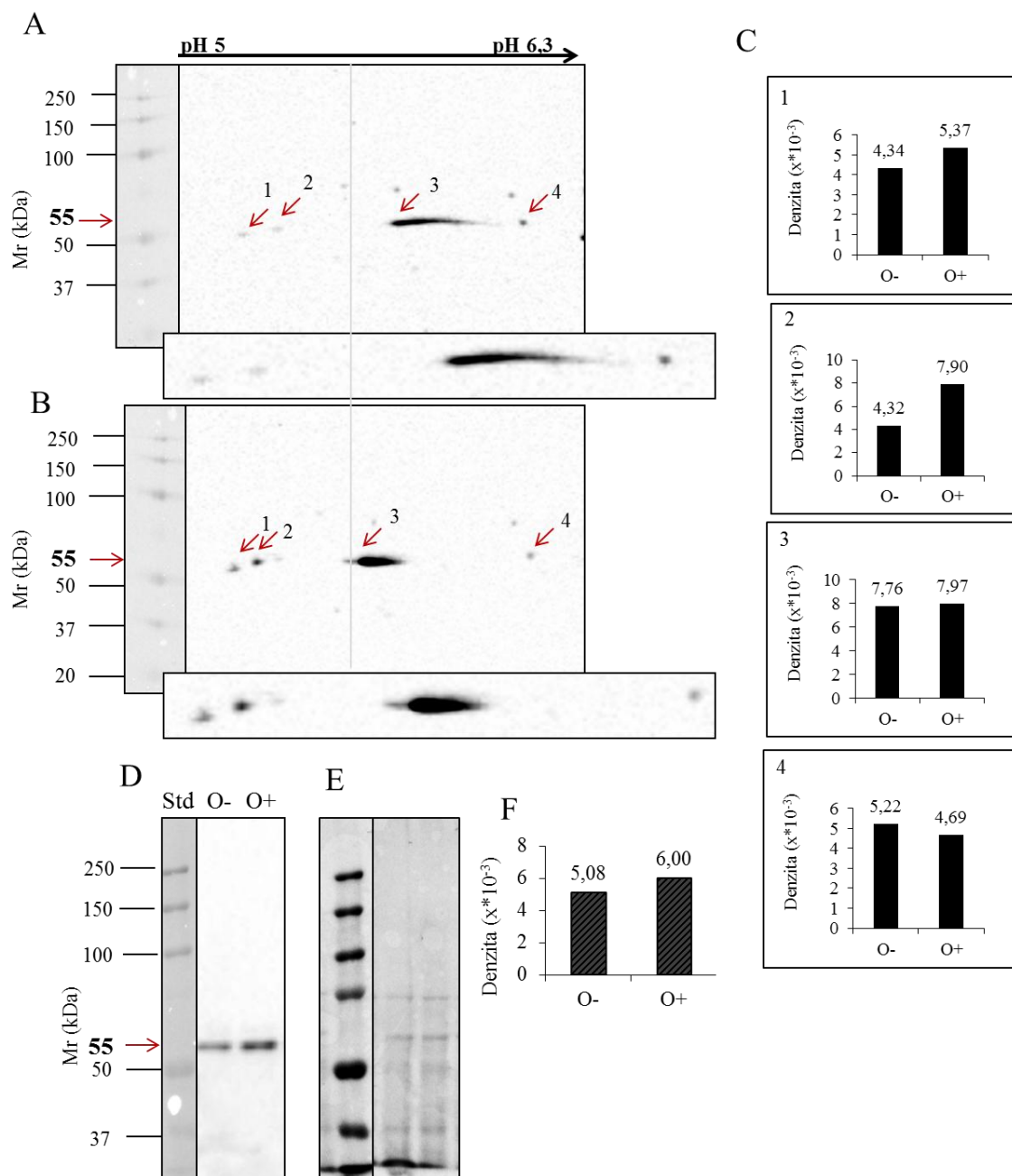
Obr. 16: 2D imunoblotová detekce  $\alpha$ -tubulinu (pomocí protilátky anti- $\alpha$ -tubulinu, rozsah pH na gelu 4 až 5,3) v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných 0,126% (v/v) DMSO.

### 4.3.1 2D imunoblotová analýza $\alpha$ -tubulinu a aktinu v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných oryzalinem

V experimentu, ve kterém byly rostliny *Arabidopsis* ovlivňovány oryzalinem, byly 2D imunoblotováním detekovány 4 skvrny s molekulovou hmotností odpovídající  **$\alpha$ -tubulinu** (Obr. 17A, B). Skvrny č. 1 a 2 mají pI 5,2 a 5,3 a skvrna č. 4 měla naměřen pI 5,9. Migrace skvrny č. 3 byla změněna vlivem oryzalinu z 5,6 (maximum denzity skvrny) na 5,4. Detail skvrny č. 3 (Obr. 17B) ukazuje, že oryzalin kromě posunu pI způsobil separaci dalšího spotu s nepatrně menším pI. Výsledky z 2D imunoblotů korespondují s tvrzením, že oryzalin způsobuje PTM  $\alpha$ -tubulinu. Došlo k migraci skvrny č. 3 představující pravděpodobně  $\alpha$ -tubulinovou isoformu, směrem do kyselé oblasti v pH poli, což naznačuje  $\alpha$ -tubulinovou fosforylací udávající proteinu záporný náboj (Obr. 17A, B). Denzitometrickým měřením intenzity signálu jednotlivých skvrn z 2D imunoblotu byla zjištěna zvýšená abundance u skvrn č. 1, 2 a 3, zatímco sníženou abundancí měla skvrna č. 4 (Obr. 17C). Tyto výsledky pozitivně korelovaly s výsledky 1D imunoblotování (Obr. 17D), což bylo potvrzeno denzitometrií (Obr. 17F). Předpokládáme, že zvýšení abundance je způsobeno rozpadem mikrotubulů vlivem oryzalinu na dimery  $\alpha/\beta$ -tubulinu, které jsou přístupnější pro vazbu  $\alpha$ -tubulin specifické protilátky anti- $\alpha$ -tubulinu. Pro kontrolu dávkování proteinů na gel byla membrána s proteiny obarvena po transferu pomocí Ponceau S (Obr. 17E).

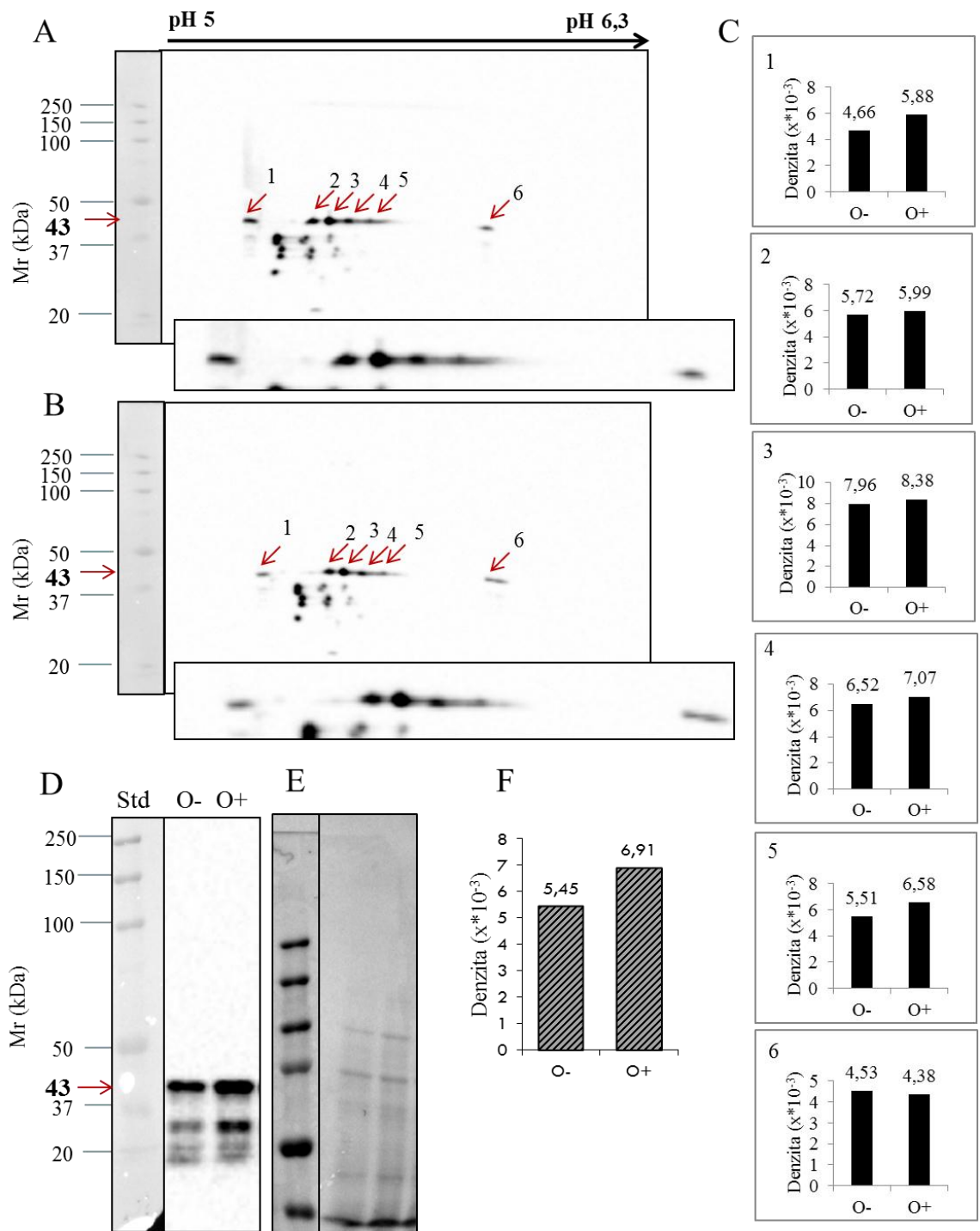
Dvourozměrným imunoblotováním pomocí protilátky anti-aktin jsme detekovali 6 skvrn s molekulovou hmotností odpovídající **aktinu** v experimentu s oryzalinem. Skvrny č. 1-6 měly hodnoty pI postupně 5,22; 5,4; 5,44; 5,49; 5,55 a 5,85 (Obr. 18A, B). Tyto skvrny můžou představovat isoformy aktinu, které mají rozličné databázové (teoretické) hodnoty isoelektrického bodu (Databáze TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Nebyly zjištěny změny v migraci aktinu v pH poli. Z denzitometrického měření intenzity signálu (Obr. 18C) na 2D imunoblotu je zjištěno ve všech skvrnách, kromě skvrny č. 6, zvýšení abundance aktinu po působení oryzalinu. Neoznačené skvrny s nižší molekulovou hmotností než 43 kDa jsou pravděpodobně nespecifické a domníváme se, že to nejsou degradační produkty aktinových isoform, protože jejich pI leží mimo hodnoty pI detekovaných isoform. Navýšení abundance aktinu po působení oryzalinu bylo pozorováno 1D imunoblotováním (Obr. 18D). Pro kontrolu dávkování proteinů na gel byla membrána s proteiny obarvena po transferu pomocí Ponceau S (Obr. 18E). Denzitometrické hodnoty intenzity signálu (Obr. 18F) naměřené z 1D imunoblotů (Obr. 18D) ukazují zvýšenou abundancí aktinu v oryzalinem

ošetřených vzorcích s 0,126% (v/v) DMSO. Zvýšení abundance aktinu může být spojeno s rozpadem mikrotubulů vlivem oryzalinu a následným narušením AF za vzniku monomerů aktinu, které jsou lépe přístupné pro specifickou protilátku pro aktin. Toto dokazuje propojení mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu. Nespecifické pásy v 1D imunoblotu mohou být způsobeny použitím nevhodného extrakčního pufru.



Obr. 17: Imunoblotová detekce  $\alpha$ -tubulinu (pomocí protilátky anti- $\alpha$ -tubulinu) v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných oryzalinem. (A, B) 2D imunoblotty (rozsah pH na gelu 5 až 6,3)  $\alpha$ -tubulinu v kontrolních kořenech (A) a v kořenech *Arabidopsis* ošetřených oryzalinem (B). (C) Odpovídající denzita izoform alfa-tubulinu, kde čísla grafů jsou shodná s čísly u šipek v 2D imunoblotu za kontrolních podmínek (O-) a ošetřených oryzalinem (O+). (D,E,F) 1D imunoblotty tubulinu (D) a odpovídající Ponceau S barvení proteinů na membráně (E) a odpovídající denzita měřená v pásech 1D imunoblotu (F).





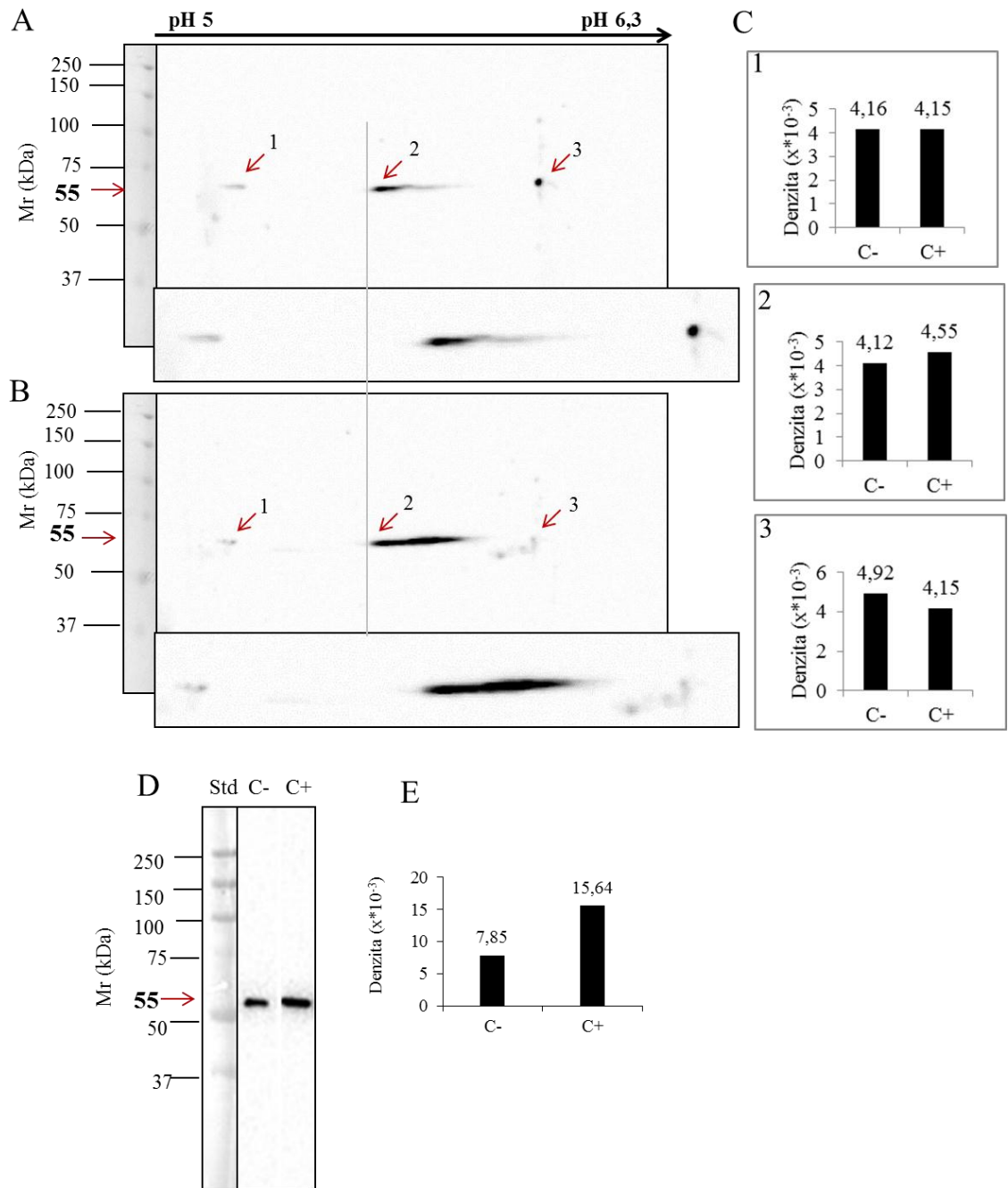
Obr. 18: Imunoblotová detekce aktinu (pomocí protilátky anti-aktin) v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných oryzalinem. (A, B) 2D imunoblotty (rozsah pH na gelu 5 až 6,3) aktinu v kontrolních kořenech (A) a v kořenech *Arabidopsis* ošetřených oryzalinem (B). (C) Odpovídající denzita isoformů aktinu, kde čísla grafů jsou shodná s čísly u šipek v 2D imunoblotu za kontrolních podmínek (O-) a po ošetření oryzalinem (O+). (D, E, F) 1D imunoblotty aktinu (D) a odpovídající Ponceau S barvení proteinů na membráně (E) a odpovídající denzita měřená v páscech 1D imunoblotu (F).

### 4.3.2 Analýza abundance $\alpha$ -tubulinu a aktinu v kořenech *Arabidopsis* po působení cytochalasinu D

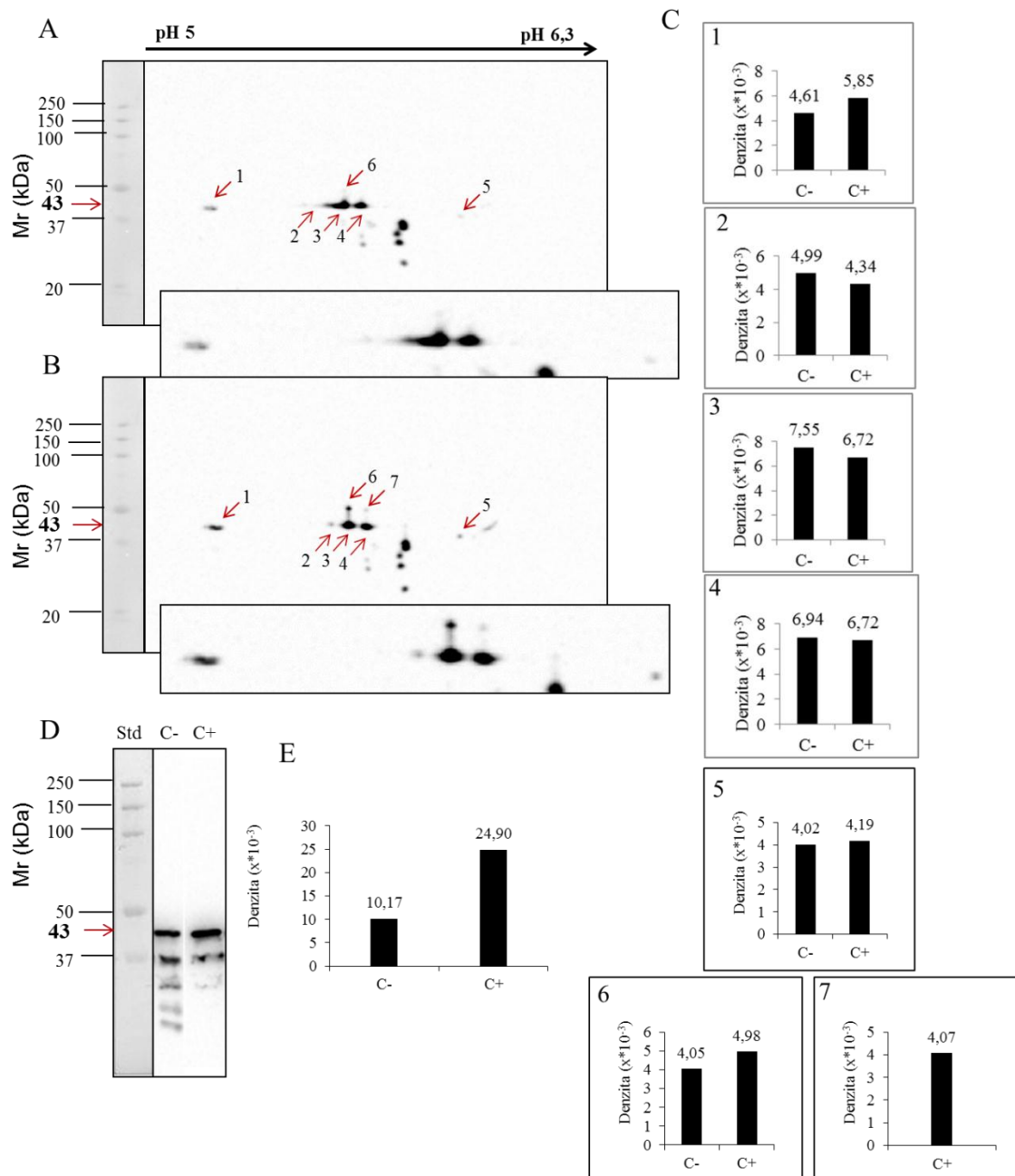
V experimentu, ve kterém byly kořeny *Arabidopsis* ovlivňovány cytD, byly metodou 2D imunoblotování detekovány 3 isoformy  $\alpha$ -tubulinu. Separace  $\alpha$ -tubulinu byla podobná, jako tomu bylo v experimentu s oryzalinem, kromě skvrny s pI 5,4, která v experimentu s cytD nebyla detekována. To naznačuje, že separace v prvním rozměru v průběhu 2D elektroforézy je klíčová pro správné vyhodnocení změn abundance, resp. PTM daného proteinu. Skvrna č. 1 měla pI 5,2. U skvrny č. 2 došlo k výraznému zvětšení denzity v cytD ošetřených vzorcích (Obr. 19A, B). Isoelektrický bod skvrny č. 2 v kontrolních vzorcích byl v místě maximální denzity 5,56, zatímco u vzorků ošetřených latB byly zjištěny 2 denzitní maxima, a to 5,56 a 5,7 – 5,8. pI pro skvrnu č. 3 je 6,0 v obou vzorcích. Denzity jednotlivých skvrn jsou zobrazeny na Obr. 19C, kde u skvrny č. 2 došlo k výraznému navýšení abundance, zatímco u skvrny č. 3 byla abundance značně snížena u vzorků ošetřených latB ve srovnání s kontrolními vzorky. Tyto změny mohou indikovat PTM  $\alpha$ -tubulinu způsobující změnu pI u skvrn. Z denzitometrických měření intenzity signálu pásů (Obr. 19E) 1D imunoblotů (Obr. 19D) je zřejmé zvýšení abundance v cytD ošetřených vzorcích s 0,126% (v/v) DMSO, což je v pozitivní korelaci s 2D imunoblotem.

Použitím protilátky anti-aktin jsme detekovali 5 skvrn s molekulovou hmotností odpovídající **aktinu**. Distribuce spotů byla částečně podobná s distribucí v předcházejícím případě (Obr. 18 A, B), což opět zvýrazňuje důležitost separace podle pI. Hodnoty pI jednotlivých skvrn byly 5,17 pro skvrnu č. 1; 5,5 pro skvrnu č. 2; 5,55 pro skvrnu č. 3; 5,61 pro skvrnu č. 4 a 5,88 pro skvrnu č. 5 (Obr. 20A, B). V porovnání s Obr. 18 A, B, byly detekovány i 2 skvrny (č. 6 a 7) s Mr o 5 kDa vyšší než skvrny aktinu a s pI shodným se skvrnami č. 3 a 4. Navíc, tyto vykazovaly velkou dynamiku ve smyslu změny denzity po ovlivnění cytD. V cytD ovlivněných vzorcích došlo k zesílení abundance skvrny č. 6 s pI 5,6 a k navýšení o skvrnu č. 7 naproti kontrolním vzorkům. Neoznačené skvrny o odlišné molekulové hmotnosti než aktinové skvrny na 2D imunoblotech jsou podobně, jako tomu bylo u Obr. 18, pravděpodobně nespecifické. Z denzitometrických měření intenzity signálu skvrn v 2D imunoblotu (Obr. 20C) vyplývá, že dochází ke snížení abundance isoform aktinu kromě skvrn č. 1, 5 a 6, ve kterých byla abundance zvýšena. Z 1D imunoblotů je patrné zvýšení abundance aktinu v cytD ovlivněných vzorcích s 0,125% (v/v) DMSO (Obr. 20D). Pásky nižší než 43 kDa jsou nespecifické. Pro optimalizaci detekce je potřeba optimalizovat extrakci proteinů.

Denzitometrické hodnoty intenzity signálu naměřené z 1D imunoblotů (Obr. 20E) vykazují zvýšenou abundanci ve vzorcích ošetřených cytD, která může být způsobena rozpadem AF na monomery aktinu vlivem cytD a následně vazbou specifické protilátky anti-aktinu na volné a lépe přístupné aktinové monomery.



Obr. 19: Imunoblotová detekce  $\alpha$ -tubulinu (pomocí protilátky anti- $\alpha$ -tubulin) v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných cytD. (A, B) 2D imunoblotty (rozsah pH na gelu 5 až 6,3)  $\alpha$ -tubulinu v kontrolních kořenech (A) a v kořenech *Arabidopsis* ošetřených cytD (B). (C) Odpovídající denzita isoformu alfa-tubulinu, kde čísla grafů jsou shodná s čísly u šipek v 2D imunoblotu za kontrolních podmínek (C-) a ošetřených cytochalasinem D (C+). (D, E) 1D imunoblotty  $\alpha$ -tubulinu (D) a odpovídající denzita měřená v páscech 1D imunoblotu (E).

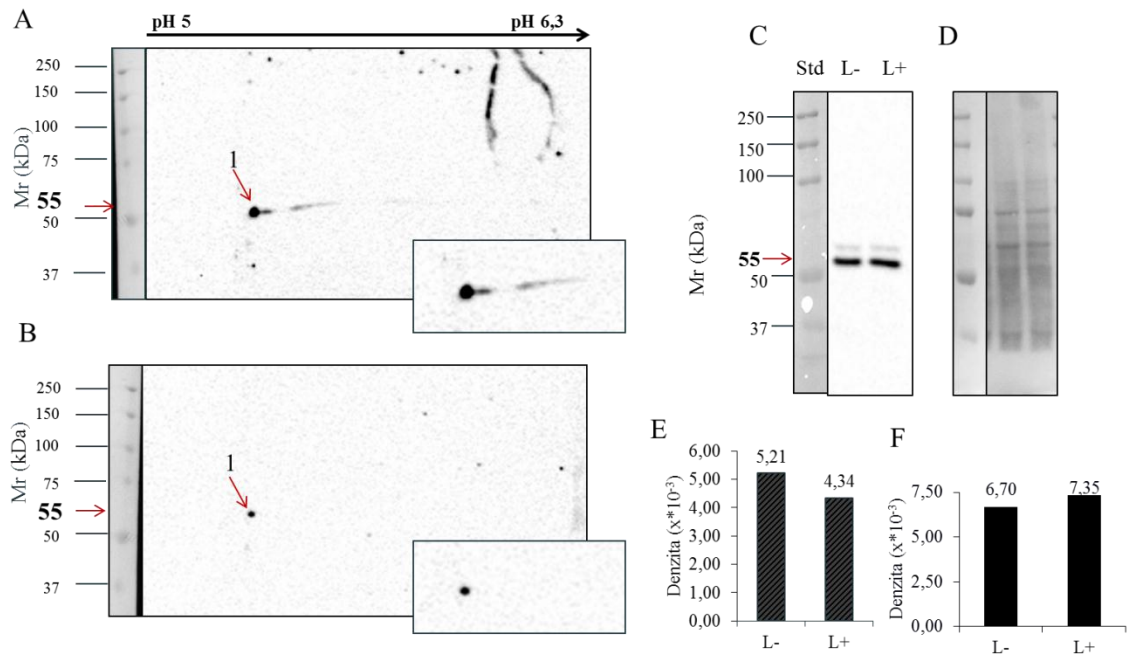


Obr. 20: Imunoblotová detekce aktinu (pomocí protilátky anti-aktin) v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných cytD. (A, B) 2D imunoblotty (rozsah pH na gelu 5 až 6,3) aktinu v kontrolních kořenech (A) a v kořenech *Arabidopsis* ošetřených cytD (B). (C) Odpovídající denzita isoformů aktinu, kde čísla grafů jsou shodná s čísly u šipek v 2D imunoblotu za kontrolních podmínek (C-) a po ošetření cytD (C+). (D, E) 1D imunoblotty aktinu (D) a odpovídající denzita měřená v páscech 1D imunoblotu (E).

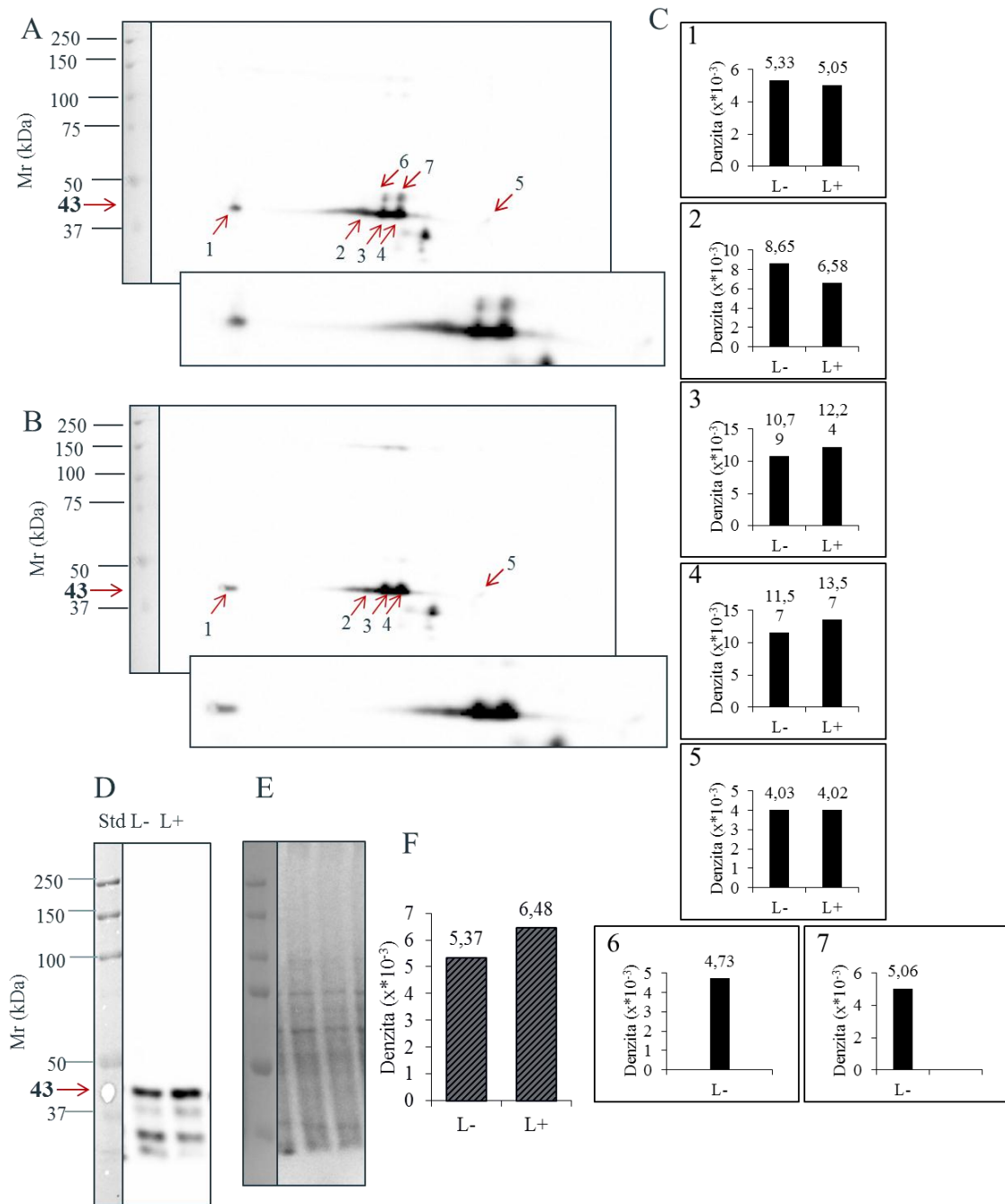
### 4.3.3 Analýza abundance alfa-tubulinu a aktinu v kořenech *Arabidopsis* po působení latrunkulinu B

Separace  $\alpha$ -tubulinu v dalším experimentu, ve kterém byly rostliny *Arabidopsis* ovlivňovány latB, nebyla dostačující, a proto je interpretace nemožná. Experiment z časových důvodů nebylo možné zopakovat. Byla detekována jedna skvrna  $\alpha$ -tubulinu s pI 5,3 (Obr. 21A, B). Z denzitometrického měření intenzity signálu (Obr. 21E) na 2D imunoblotu je patrné snížení abundance  $\alpha$ -tubulinu v latB s 0,126% (v/v) DMSO, ošetřeném (L+) vzorku. Nebyly zjištěny změny v migraci  $\alpha$ -tubulinu v pH poli. Nespecifické skvrny mohou být způsobeny nedostatečným blokováním membrány. Denzitometrické měření intenzity signálu v 1D imunoblotu (Obr. 21E) ukázalo, že abundance  $\alpha$ -tubulinu v kontrolních, po 2 hod působení 0,126% (v/v) DMSO (L-) a latB, rozpuštěným v 0,126% (v/v) DMSO, ošetřených (L+) vzorcích se nepatrně zvýšila (Obr. 21F). Pro kontrolu dávkování proteinů na gel byla membrána s proteiny obarvena po transferu pomocí Ponceau S (Obr. 21D).

Ve shodě s Obr. 20 a 18 jsme detekovali celkem 5 skvrn s Mr **aktinu** metodou 2D imunoblotování v experimentu, ve kterém byly kořeny *Arabidopsis* ovlivněny latB (Obr. 22A, B). Hodnoty pI isoform aktinu byly 5,17 pro skvrnu č. 1; 5,5 pro skvrnu č. 2; 5,55 pro skvrnu č. 3; 5,61 pro skvrnu č. 4; 5,88 pro skvrnu č. 5. Opět byly detekovány dvě skvrny s vyšší Mr (č. 6 a 7), ale se stejnou pI jakou mají skvrny 3 a 4. Ve vzorcích ošetřených latB s 0,126% DMSO, došlo k vymizení skvrny č. 6 a 7 u skvrny č. 1 k malému posunu směrem do kyselé oblasti ve srovnání s kontrolními vzorky ošetřenými 0,126% (v/v) DMSO. Z denzitometrických hodnot skvrn (Obr. 22C) naměřených z 2D imunoblotů je vidět snížení abundance u skvrn č. 1, 2 a 7 a zvýšení abundance u skvrn č. 3 a 4. Pro kontrolu dávkování proteinů na gel byla membrána s proteiny obarvena pomocí Ponceau S (Obr. 22E). Denzity aktinových pásů k příslušným 1D imunoblotům (Obr. 22D) jsou uvedeny na Obr. 22F, kdy došlo ke zvýšení abundance v latB ošetřených vzorcích, což může být způsobeno rozpadem AF vlivem latB na monomery aktinu, které jsou lépe přístupné pro vazbu protilátky anti- $\alpha$ -tubulinu.



Obr. 21: Imunoblotová detekce  $\alpha$ -tubulinu (pomocí protilátky anti- $\alpha$ -tubulin) v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných latB. (A, B) 2D imunoblotty (rozsah pH na gelu 5 až 6,3)  $\alpha$ -tubulinu v kontrolních kořenech (A) a v kořenech *Arabidopsis* ošetřených latB (B). (E) Odpovídající denzita isoformů  $\alpha$ -tubulinu v 2D imunoblotu za kontrolních podmínek (L-) a ošetřených latB (L+). (C, D, F) 1D imunoblotty tubulinu (C) a odpovídající Ponceau S barvení proteinů na membráně (D) a odpovídající denzita měřená v pásech 1D imunoblotu (F).



Obr. 22: Imunoblotová detekce aktinu (pomocí protilátky anti-aktin) v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných latB. (A, B) 2D imunoblotty (rozsah pH na gelu 5 až 6,3) aktinu v kontrolních kořenech ošetřených 2 h 0,126% (v/v) DMSO (A) a v kořenech *Arabidopsis* ošetřených latB (B). (C) Odpovídající densita isoform aktinu, kde čísla grafů jsou shodná s čísly u šipek v 2D imunoblotu za kontrolních podmínek po 2 h působení 0,126% (v/v) DMSO (L-) a po ošetření latB (L+). (D, E, F) 1D imunoblotty aktinu (D) a odpovídající Ponceau S barvení proteinů na membráně (E) a odpovídající densita měřená v pásech 1D imunoblotu (F).

## 5 DISKUSE

Cytoskeletální inhibitory oryzalin, latB a cytD se používají k modifikaci cytoskeletu, který je důležitý pro vnitřní strukturu buňky a zastává významné funkce v mnoha buněčných procesech. Využívají se v buněčné biologii a fyziologii. Každý z nich má jiný molekulární cíl, a tudíž i odlišné subcelulární efekty. Pro lepší využití těchto inhibitorů je požadována vysoká specifita účinku. Užitím proteomických analýz v kombinaci s biochemickými a buněčně biologickými metodami a farmakologickým ošetřením lze detekovat nové proteiny významné pro fyziologii buňky (Takáč *et al.*, 2013). Fyziologické účinky rostlinných inhibitorů byly pozorovány s pomocí proteomických metod v předchozích pracích (Chen *et al.*, 2006; Takáč *et al.*, 2011; Takáč *et al.*, 2012; Takáč *et al.*, 2013). V této práci jsou prezentovány proteomické změny v kořenech *Arabidopsis* ovlivněných oryzalinem a latB, analýza abundance  $\alpha$ -tubulinu a aktinu po ovlivnění inhibitory pomocí imunoblotování a mikroskopické pozorování MT *in vivo* po vlivu oryzalinu a latB.

Mikroskopickým pozorováním MT *in vivo* po vlivu oryzalinu a latB byly pozorovány účinky na MT stabilně transformované rostliny *Arabidopsis* s fuzním konstruktem TUA6-GFP. K rozpadu většiny MT v kořenech *Arabidopsis* indikovaném snížením signálu TUA6-GFP v MT došlo po 120 min působení oryzalinu, zatímco po 180 min došlo k úplnému rozpadu mikrotubulů. Navýšení cytoplasmatického signálu TUA6-GFP bylo způsobeno vyšší koncentrací TUA6-GFP v cytoplasmě vzniklého rozpadem mikrotubulů. Dezorientace a fragmentace kortikálních mikrotubulů po působení oryzalinu na kořeny *Arabidopsis* byla hlášena v práci Baskin *et al.*, (1994). Difuzní signál tubulinu v cytoplasmě kořenů *Arabidopsis* ošetřených oryzalinem byl zjištěn v dalších pracích (Baskin *et al.*, 1994; Baluška *et al.*, 1996). Naše výsledky mikroskopického pozorování slouží k potvrzení pozitivního účinku dané koncentrace oryzalinu na  $\alpha$ -tubulin v našich laboratorních podmínkách. Stejná koncentrace a čas působení byly použity pro proteomickou analýzu a imunoblotování.

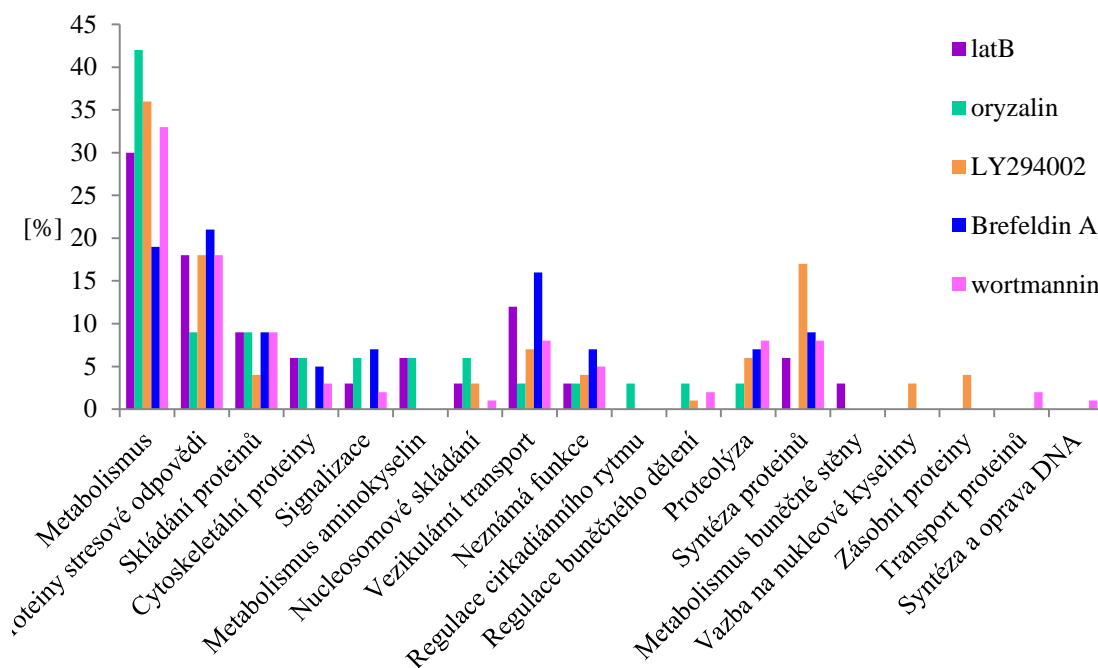
Je zajímavé, že distribuce  $\alpha$ -tubulinu byla postižena i v kořenech *Arabidopsis* ošetřených latB. Je známo, že latB způsobuje rozpad AF a difuzní distribuci aktinu (Kim *et al.*, 2006). Pozorovali jsme svazkování a zesílení signálu MT a akumulaci signálu TUA6-GFP ve shlukovitých útvarech v cytoplasmě a v blízkosti plasmatické membrány. V podobném experimentu latB o koncentraci  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ovlivnil



organizaci MT a snížil jejich hustotu (početnost) v stabilně transformovaných rostlinách *Arabidopsis* nesoucích konstrukt GFP-MAP4 (Rosero *et al.*, 2013). Shlukovité útvary nebyly pozorovány, což je pravděpodobně způsobeno jinými experimentálními podmínkami (koncentrace latB, 72h na pevném MS médiu), anebo odlišným markrovým konstruktem, který byl použit pro vizualizaci MT. Shlukovité útvary jsou pravděpodobně akumulované monomery  $\alpha$ -tubulinu.

Metabolické a fyziologické procesy, které doprovázejí subcelulární efekty inhibitorů, jsou často podceňovaným jevem. Proto jsme zvolili proteomickou analýzu na objasnění změn vyvolaných cytoskeletálními inhibitory na proteinové úrovni. Pomocí dvou proteomických analýz, bezgelovým a gelovým přístupem, byly analyzovány změny abundance proteinů po ovlivnění kořenů *Arabidopsis* oryzalinem nebo latB v porovnání s kontrolními vzorky. V 2D gelové elektroforéze byl získán výrazně odlišný počet skvrn na gelu, pro oryzalin ošetřené vzorky 332 a pro latB ošetřené vzorky 902, což bylo způsobeno různou metodou použitou při dávkování proteinu na strip. Z toho vyplývá, že výhodnější metoda dávkování proteinu na gelový strip je metoda papírového mostu (tzv. paper bridge). Při identifikaci statisticky významných skvrn ( $P \leq 0,01$ ) metodou MALDI TOF-TOF bylo úspěšně identifikováno 67 % proteinů. Pro optimalizaci metody je navrženo například další přečištění vzorků nebo separace pomocí chromatografie před samotnou analýzou.

Zařazením identifikovaných proteinů získaných z kořenů *Arabidopsis* ovlivněných oryzalinem nebo latB do funkčních skupin bylo umožněno srovnání účinků těchto inhibitorů z hlediska specifčnosti. Z výsledků vyplývá, že latB postihuje menší počet funkčních tříd proteinů než oryzalin. Stejně proteomické metody použité k rozřazení proteinů byly aplikovány v dřívějších pracích, ve kterých byly kořeny *Arabidopsis* ovlivněny brefeldinem A (Takáč *et al.*, 2011), wortmanninem (Takáč *et al.*, 2012) a LY294002 (Takáč *et al.*, 2013). Srovnání působení jednotlivých farmak podle funkčních skupin ovlivněných proteinů je na Obr. 23. Obecně jsou nejvíce ovlivněné skupiny metabolické proteiny, proteiny stresové odpovědi, vezikulární transport, syntéza proteinů a skládání proteinů.



Obr. 23: Grafické porovnání účinků v [%] zleva latB, oryzalinem, LY294002, brefeldinem A a wortmanninem ovlivněné kořeny *Arabidopsis* podle funkčních tříd proteinů se statisticky významnou změnou abundancí (Takáč *et al.*, 2011; Takáč *et al.*, 2012; Takáč *et al.*, 2013).

Celkem 4 proteiny byly statisticky významně (kromě aktinu 7 ve vzorku ošetřeném latB;  $P=0,24$ ) ovlivněny jak oryzalinem, tak latB (Tab. 5). Ale pouze dva z nich, profilin 1 (Q42449) a 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase (O50008), byly ovlivněny stejným trendem změny abundance, snížením nebo zvýšením. Profilin je aktin-vázající protein, který reguluje rychlosti polymerizace a dynamiku aktinového cytoskeletu (Staiger *et al.*, 2010). Pomocí gelových a bezgelových proteomických přístupů aplikovaných na kořeny *Arabidopsis* ovlivněných Brefeldinem A bylo objeveno, že profilin 2 je zahrnut v propojení vezikulárního transportu a aktinového cytoskeletu (Takáč *et al.*, 2011). Aktin 7 (P53492), který není statisticky průkazný ve vzorku ošetřeném latB, vykazoval odlišný trend změny abundance mezi vzorky ovlivněnými oryzalinem nebo latB s 0,126% (v/v) DMSO vzhledem ke kontrolním vzorkům s 0,126% (v/v) DMSO. Odlišná změna abundance aktinu 7 je pravděpodobně způsobena nestejnými molekulovými cíli inhibitorů,  $\alpha$ -tubulin v tubulinovém dimeru pro oryzalin (Strachan a Hess, 1983) a monomerní aktin pro latB (Morton *et al.*, 2000).

Metodou imunoblotování byla provedena analýza abundance  $\alpha$ -tubulinu a aktinu po ovlivnění inhibitory oryzalinu, latB a cytD. Pomocí 2D imunoblotování bylo dosaženo detekce isoform  $\alpha$ -tubulinu a aktinu a jejich PTM v případě různých pI bodů

a molekulových hmotností. Pro úspěšnou analýzu pomocí metody imunoblotování je důležité splnit 3 základní body: 1) dokonalou separaci isoformů proteinu v prvním rozměru, 2) použití specifické protilátky pro detekci proteinu a 3) zamezení nespecificity optimalizací extrakčního pufru, které platí pro 2D imunoblotování a pro 1D imunoblotování kromě bodu 1. Dokonalá separace v prvním rozměru může být dosažena optimalizováním parametrů při isoelektrické fokusaci. Použitím monoklonální protilátky s přesně definovanými vlastnostmi a vysokou specificitou k substrátu lze dosáhnout přesnější detekce proteinu. Při zmrazování a rozmrazování protilátky je doporučeno provést před aplikací mikrocentrifugace pro vyloučení možného výskytu precipitátu. Vhodnou volbou extrakčního pufru lze přispět k odstranění nespecifických skvrn nebo pásů. V závislosti na použité protilátce, zda rozpozná či nerozpozná i denaturované formy proteinu, se zvolí extrakční pufr obsahující nebo neobsahující detergenty.

Metodou 2D imunoblotování byly PTM proteinů detekovány na základě rozdílného pI a/nebo molekulové hmotnosti proteinu. K identifikaci PTM proteinu je nutné například použít protilátku specifickou pro předpokládanou formu PTM (Guan *et al.*, 2010) a užít MS analýzu (Ban *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2007) nebo imunofluorescenční mikroskopii (Blume *et al.*, 2010).

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části byly shrnuty dosud známé informace o rostlinném cytoskeletu se zaměřením na tubulin a aktin z hlediska jejich výskytu, struktury, polymerizace a PTM. Dále byla řešena problematika použitých cytoskeletálních inhibitorů oryzalinu, latB a cytD, jejich struktura, způsob vazby na molekulový cíl a subcelulární účinky u rostlin.

V praktické části byla provedena proteomická analýza regulace cytoskeletu v kořenech *Arabidopsis* pomocí cytoskeletálních inhibitorů. Nejdříve bylo provedeno mikroskopické pozorování pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu za účelem sledování účinků oryzalinu a latB na mikrotubuly. Oryzalin způsobuje dezintegraci MT a zvýšení cytoplasmatického signálu. LatB neovlivňuje výrazně strukturu mikrotubul, ale způsobuje akumulaci signálu ve shlucích při PM.

Pomocí dvou různých proteomických přístupů, gelového a bezgelového, byly sledovány změny proteomu kořenů *Arabidopsis*, které doprovázejí změny polymerizace aktinu a mikrotubulů po ošetření cytoskeletálními inhibitory oryzalinem a latB. Proteiny se statisticky významně změněnou abundancí byly rozděleny podle procentuálního zastoupení do funkčních skupin. Z porovnání těchto údajů bylo vyvozeno, že latB je více specifický z hlediska ovlivnění proteinů různých funkčních skupin než oryzalin.

Metoda 2D imunoblotování je vhodná pro rozdělení isoform aktinu a sledování posttranslačních modifikací na základě změny pI u  $\alpha$ -tubulinu, přičemž je nezbytné pro správnou identifikaci isoform a PTM použít další metody, jako je hmotnostní spektrometrie anebo aplikaci inhibitorů PTM.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abe T., Thitamadee S., Hashimoto T. (2004): Microtubule defects and cell morphogenesis in the *lefty1lefty2* tubulin mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 211–220.
- Abe T., Hashimoto T. (2005): Altered microtubule dynamics by expression of modified  $\alpha$ -tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, **43**, 191–204.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): *Molecular biology of the cell*. 5th ed., Garland science, New York, USA, 1601 stran.
- Alavian K.N., Beutner G., Lazrove E., Sacchetti S., Park H.A., Licznerski P., Li H., Nabili P., Hockensmith K., Graham M., Porter G.A. Jr, Jonas E.A. (2014): *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 10580-10585.
- Anthony R.G., Reichelt S., Hussey P.J. (1999): Dinitroaniline herbicide resistant transgenic tobacco plants generated by co-overexpression of a mutant alpha-tubulin and a beta-tubulin. *Nature Biotechnology*, **17**, 712–716.
- Aphasizheva I., Maslov D., Wang X., Huang L., Aphasizhev R. (2011): Pentatricopeptide repeat proteins stimulate mRNA adenylation/uridylation to activate mitochondrial translation in trypanosomes. *Molecular Cell*, **42**, 106–117.
- Aspengren S., Wielbass L., Wallin M. (2006): Effects of Acrylamide, Latrunculin, and Nocodazole on Intracellular Transport and Cytoskeletal Organization in Melanophores. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **63**, 423–436.
- Ayscough K.R. (1998): *In vivo* functions of actin-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, **10**, 102–111.
- Baluška F., Hauskrecht M., Barlow P.W., Sievers A. (1996): Gravitropism of the root of maize: a complex pattern of differential cellular growth in the cortex independent of the microtubular cytoskeleton. *Planta*, **198**, 310–318.
- Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N.H., Barlow P.W., Volkmann D. (2000): Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology*, **227**, 618–632.
- Baluška F., Jasik J., Edelman H.G., Salajova T., Volkmann D. (2001): Latrunculin B-Induced Plant Dwarfism: Plant Cell Elongation Is F-Actin-Dependent. *Developmental Biology*, **231**, 113–124.
- Ban Y., Kobayashi Y., Hara T., Hamada T., Hashimoto T., Takeda S., Hattori T. (2013):  $\alpha$ -Tubulin is Rapidly Phosphorylated in Response to Hyperosmotic Stress in Rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **54**, 848–858.
- Baskin T.I., Wilson J.E., Cork A., Williamson E. (1994): Morphology and Microtubule Organization in *Arabidopsis* Roots Exposed to Oryzalin or Taxol. *Plant and Cell Physiology*, **35**, 935–942.
- Baskin T. I., Beemster G.T.S., Judy-March J. E., Marga F. (2004): Disorganization of Cortical Microtubules Stimulates Tangential Expansion and Reduces the Uniformity of Cellulose Microfibril Alignment among Cells in the Root of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **135**, 2279–2290.
- Bertrand R., Chaussepied P., Audermard E., Kassar R (1989): Functional characterization of skeletal F-actin labeled on the NH<sub>2</sub>-terminal segment of residues 1–28. *European Journal of Biochemistry*, **181**, 747–754.
- Bibikova T.N., Blancaflor E.B., Gilroy S. (1999): Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **17**, 657–665.
- Blume Y.B., Yemets A.I., Sheremet Y., Nyporko A., Sulimenko V., Sulimenko T., Dráber P. (2010): Exposure of  $\beta$ -tubulin regions defined by antibodies on an *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells. *BMC Plant Biology*, **10**, 29.
- Blume Y.B., Krasylenko Y.A., Demchuk O.M., Yemets A.I. (2013): Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plants cells. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 1–14.

- Bokros C.L., Hugdahl J.D., Hanesworth V.R., Murthy J.V., Morejohn L.C. (1993): Characterization of the reversible taxol-induced polymerization of plant tubulin into microtubules. *Biochemistry*, **32**, 3437-3447.
- Boucher D., Larcher J.C., Gros F., Denoulet P. (1994): Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of *in vitro* interactions between the microtubule-associated protein tau and tubulin. *Biochemistry*, **33**, 12471-12477.
- Bouget F.Y., Gerttula S., Shaw S.L., Quatrano R.S. (1996): Localization of actin mRNA during the establishment of cell polarity and early cell divisions in *Fucus* embryos. *Plant Cell*, **8**, 189-201.
- Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brandizzi F., Snapp E.L., Roberts A.G., Lippincott-Schwartz J., Hawes C. (2002): Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: Evidence from selective photobleaching. *Plant Cell*, **14**, 1293-1309.
- Braun M., Baluška F., von Witsch M., Menzel D. (1999): Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta*, **209**, 435-443.
- Breviario D., Gian S., Morello L. (2013): Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. *The Plant Journal*, **75**, 202-218.
- Brown R.C., Lemmon B.E. (2007): The pleiomorphic plant MTOC: an evolutionary perspective. *Journal of Integrative Plant Biology*, **49**, 1142-1153.
- Burton R.A., Gibeau D.M., Bacic A., Findlay K., Roberts K., Hamilton A., Baulcombe D.C., Fincher G.B. (2000): Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell*, **12**, 691-705.
- Cai G., Faleri C., Del Casino C., Emons A.M.C., Cresti M. (2011): Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules. *Plant Physiology*, **155**, 1169-1190.
- Collings D.A., Wasteneys G.O., Williamson R.E. (1995): Cytochalasin rearranges cortical actin of the alga *Nitella* into short, stable rods. *Plant and Cell Physiology*, **36**, 765-772.
- Collings D.A., Wasteneys G.O. (2005): Actin microfilament and microtubule distribution patterns in the expanding root of *Arabidopsis thaliana*. *Canadian Journal of Botany*, **83**, 579-590.
- Cox C. (2001): Oryzalin. *Journal of pesticide reform*, **21**, 16-20.
- Černý M., Skalák J., Cerna H., Brzobohatý B. (2013): Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of Proteomics*, **92**, 2-27.
- Dantán-González E., Rosenstein Y., Quinto C., Sanchez F. (2001) Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 1267-1273.
- Deeks M.J., Fendrych M., Smertenko A., Bell K.S., Oparka K., Cvrcková F., Zársky V., Hussey P.J. (2010): The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. *Journal of Cell Science*, **123**, 1209-1215.
- Del Duca S., Serafini-Fracassini D., Bonner P., Cresti M., Cai G. (2009): Effects of post-translational modifications catalyzed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments. *Biochemical Journal Immediate Publication*, **418**, 651-64.
- Do C.T., Pollet B., Thevenin J., Sibout R., Denoue D., Barriere Y., Lapierre C., Jouanin L. (2007): Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta*, **226**, 1117-1129.
- Dominguez R. (2004): Actin-binding proteins-a unifying hypothesis. *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 572-578.
- Dominguez R., Holmes K.C. (2011): Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, **40**, 169-186.

- Downing K.H. a Nogales E. (1998): Tubulin structure: insights into mikrotubule properties and functions. *Current Opinion in Structural Biology*, **8**, 785-791.
- Ducket C.M., Lloyd C. (1994): Gibberellic acid-induced mikrotubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an  $\alpha$ -tubulin isotype. *Plant Journal*, **5**, 363-372.
- Erhardt M., Stoppin-Mellet V., Campagne S., Canaday J., Mutterer J., Fabian T., Sauter M., Muller T., Peter C., Lambert A.M. (2002): The plant Spc98p homologue colocalizes with  $\gamma$ -tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *Journal of Cell Science*, **115**, 2423-2431.
- Eun S.O., Lee Y. (1997) Actin Filaments of Guard Cells Are Reorganized in Response to Light and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, **115**, 1491-1498.
- ExpASy home page: [http://hamap.expasy.org/unirule/MF\\_00051](http://hamap.expasy.org/unirule/MF_00051) (27.7.2014)
- ExpASy home page: [http://hamap.expasy.org/unirule/MF\\_00086](http://hamap.expasy.org/unirule/MF_00086) (27.7.2014)
- Freedman H., Luchko T., Luduena R.F., Tuszynski J.A. (2011): Molecular dynamics modeling of tubulin C-terminal tail interactions with the microtubule surface. *Proteins*, **79**, 2968-2982.
- Fujii T., Iwane H., Yanagida T., Namba K. (2010): Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature*, **467**, 724-729.
- Gangl R., Behmüller R., Tenhaken R. (2014): Molecular cloning of a novel glucuronokinase/putative pyrophosphorylase from zebrafish acting in an UDP-glucuronic acid salvage pathway. *PLoS One*, **9**, 1-15.
- Gardiner J., Barton D., Marc J., Overall R. (2007): Potential role of tubulin acetylation and microtubule-based protein trafficking in familial dysautonomia. *Traffic*, **8**, 1145-1149.
- Gibbon B.C., Kovar D.R., Staiger C.J. (1999): Latrunculin B Has Different Effects on Pollen Germination and Tube Growth. *Plant Cell*, **11**, 2349-2363.
- Glozak M.A., Sengupta N., Zhang X., Seto E. (2005): Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, **363**, 15-23.
- Goddette D.W., Frieden C. (1986): Actin Polymerization. The Mechanism of Actin of Cytochalasin D. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 15974-15980.
- Graceffa P., Dominguez R. (2003): Crystal structure of monomeric actin in the ATP state: structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 34172-34180.
- Guan K., Yu W., Lin Y., Xiong Y., Zhao S. (2010): Generation of acetyllysine antibodies and affinity enrichment of acetylated peptides. *Nature Protocols*, **5**, 1583-95.
- Hammond J.W., Cai D., Verhey K.J. (2008): Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Cell Biology*, **20**, 71-76.
- Hugdahl J.D., Morejohn L.C. (1993): Rapid and Reversible High-Affinity Binding of the Dinitroaniline Herbicide Oryzalin to Tubulin from *Zea mays* L. *Plant Physiology*, **102**, 725-740.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986): Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plan Physiology*, **81**, 802-806.
- Chen Y., Chen T., Shen S., Zheng M., Guo Y., Lin J., Baluška F., Šamaj J. (2006): Differential display proteomic analysis of *Picea meyeri* pollen germination and pollen-tube growth after inhibition of actin polymerization by latrunculin B. *Plant Journal*, **47**, 174-195.
- Image j home page: <http://imagej.nih.gov/ij/> (25.5.2014)
- Ingber D.E., Dike L., Hansen L., Karp S., Kiley H., Maniotis A., McNamee H., Mooney D., Plopper G., Sims J., Wang N. (1994): Cellular tensegrity: Exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth migration, and tissue pattern during morphogenesis. *International Review of Cytology*, **150**, 173-224.
- Iris-biotech home page: [http://www.iris-biotech.de/media/catalog/product/cache/2/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/s/ls-1025\\_125.jpg](http://www.iris-biotech.de/media/catalog/product/cache/2/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/s/ls-1025_125.jpg) (23.6.2014).
- Janski N., Masoud K., Batzenschlager M., Herzog E., Evrard J.L., Houlné G., Bourge M., Chabouté M.E., Schmit, A.C. (2012): The GCP3-interacting proteins GIP1 and GIP2 are required for  $\gamma$ -tubulin complex protein localization, spindle integrity, and chromosomal stability. *Plant Cell*, **24**, 1171-1187.

- Jin J.B., Kim Y.A., Kim S.J., Lee S.H., Kim D.H., Cheong G.W., Hwang I. (2001): A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 1511–1526.
- Jovanović A.M., Durst S., Nick P. (2010): Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 901–909.
- Jürgens G., Grebe M., Steinmann T. (1997): Establishment of cell polarity during early plant development. *Current Opinion in Cell Biology*, **9**, 849–852.
- Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F., Holmes K.C. (1990): Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*, **347**, 37–44.
- Kakimoto T., Shibaoka H. (1988): Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast- nuclei complexes isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasma Supplementum*, **2**, 95–103.
- Kameyama K., Kishi Y., Yoshimura M., Kanzawa N., Sameshima M., Tsuchiya T. (2000): Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature*, **407**, 37.
- Kandasamy M. K., McKinney E.C., Meagher R.B. (1999): The late pollen-specific actins in angiosperms. *Plant Journal*, **18**, 681–691.
- Kandasamy M.K., Gilliland L.U., McKinney E.C., Meagher R.B. (2001): One plant actin isovariant, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation. *Plant Cell*, **13**, 1541–1554.
- Kashman Y., Groweiss A., Shmueli U. (1980): Latrunculin, a new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge. *Tetrahedron Letters*, **21**, 3629–3632.
- Ketelaar T., de Ruijter NCA, Emons AMC (2003) Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell*, **51**, 285–292
- Kim D.H., Eu Y.J., Yoo C.M., Kim Y.W., Pih K.T., Jin J.B., Kim S.J., Stenmark H., Hwang I. (2001): Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell*, **13**, 287–301.
- Kim H., Park M., Kim S.J., Hwang I. (2005): Actin Filaments Play a Critical Role in Vacuolar Trafficking at the Golgi Complex in Plant Cells. *Plant Cell*, **17**, 888–902.
- Kobayashi H., Fukuda H., Shibaoka H. (1988): Interrelation between the spatial disposition of actin filaments and microtubules during the differentiation of tracheary elements in cultured *Zinnia* cells. *Protoplasma*, **143**, 29–37.
- Komaki S., Abe T., Coutuer S., Inzé D., Russinova E., Hashimoto T. (2010): Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in *Arabidopsis*. *Journal of Cell Science*, **123**, 451–459.
- Komis G., Illés P., Beck M., Šamaj J. (2011): Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 650–657.
- Kopczak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D., Snustad D.P. (1992): The Small Genome of *Arabidopsis* Contains at Least Six Expressed  $\alpha$ -Tubulin Genes. *Plant Cell*, **4**, 539–547.
- Krzyszowiec W., Rajwa B., Dobrucki J., Gabryś H. (2007): Actin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* under blue and red light. *Biology of the Cell*, **99**, 251–260.
- L'Hernault S.W., Rosenbaum J.L. (1983): Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly. *Journal of Cell Biology*, **97**, 258–263.
- Langhans M., Niemes S., Pimpl P., Robinson D.G. (2009): Oryzalin bodies: in addition to its anti-microtubule properties, the dinitroaniline herbicide oryzalin causes nodulation of the endoplasmic reticulum. *Protoplasma*, **236**, 73–84.
- Lewis S.A., Cowan N.J. (2002) Bad chaperone. *Nature Medicine*, **8**, 1202–1203.
- Li Y., Shen Y., Cai C., Zhong C., Zhu L., Yuan M., Ren H. (2010): The type II *Arabidopsis* formin14 interacts with microtubules and microfilaments to regulate cell division. *Plant Cell*, **22**, 2710–2726.
- Liao G., Gundersen G.G. (1998): Kinesin is a candidate for crossbridging microtubules and intermediate filaments. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 9797–9803.
- Lord C., Bhandari D., Menon S., Ghassemian M., Nycz D., Hay J., Ghosh P., Ferro-Novick S. (2011): Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature*, **473**, 181–186.



- Ludwig S.R., Oppenheimer D.G., Silflow C.D., Snustad D.P. (1987): Characterization of the  $\alpha$ -tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 5833-5837.
- Mathur J., Spielhofer P., Kost B., Chua N.H. (1999): The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **126**, 5559-5568.
- Mathur J., Mathur N., Kernebeck B., Srinivas B.P., Hülkamp M. (2003) A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Current Biology*, **13**, 1991-1997.
- McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., An Y.Q., Meagher R.B. (1996): Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **142**, 587-602.
- Meagher R.B., McLean B.G. (1990): Diversity of plant actins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **16**, 164-166.
- Meagher R.B. (1991): Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants. *International Review of Cytology*, **125**, 139-163.
- Meagher R.B., McKinney E.C., Kandasamy M.K. (1999): Isovariant Dynamics Expand and Buffer the Responses of Complex Systems The Diverse Plant Actin Gene Family. *Plant Cell*, **11**, 995-1005.
- Miller D.D., de Ruijter N.C.A., Emons A.M.C. (1997): From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 1881-1896.
- Miller D.D., De Ruijter N.C.A., Bisseling T., Emons A.M.C. (1999): The role of actin in root hair morphogenesis: Studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal*, **17**, 141-154.
- Miller L.M., Xiao H., Burd B., Horwitz S.B., Angeletti R.H., Verdier-Pinard P. (2010): Methods in tubulin proteomics. *Methods in Cell Biology*, **95**, 105-126.
- Morejohn L.C., Bureau T.E., Molè-Bajer J., Bajer A.S., Fosket D.E. (1987): Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, **172**, 252-264.
- Morton W.M., Ayscough K.R., Mc Laughlin P.J. (2000): Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature Cell Biology*, **2**, 376-378.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Nakagawa U., Suzuki D., Ishikawa M., Sato H., Kamemura K., Imamura A. (2013): Acetylation of  $\alpha$ -Tubulin on Lys40 Is a Widespread Post-Translational Modification in Angiosperm. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **77**, 1602-1605.
- Nakamura M., Naoi K., Shoji T., Hashimoto T. (2004): Low Concentrations of Propyzamide and Oryzalin Alter Microtubule Dynamics in *Arabidopsis* Epidermal Cells. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 1330-1334.
- Nakamura M., Ehrhardt D.W., Hashimoto T. (2010): Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nature Cell Biology*, **12**, 1064-1070.
- Neuhoff V., Stamm R., Eibl H. (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**, 427-448, modified by A. Posch.
- Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. (1998): Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, **391**, 199-203.
- Nogales E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H. (1999): High-resolution model of the microtubule. *Cell*, **96**, 79-88.
- Nogales E. (2000): Structural insights into microtubule function. *Annual Review of Biochemistry*, **69**, 277-302.
- Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maéda Y., Narita A. (2009): The nature of the globular-to fibrous-actin transition. *Nature*, **457**, 441-550.

- Otterbein L.R., Graceffa P., Dominguez R. (2001): Thy Crystal of Uncomplexed Actin in the ADP State. *Science*, **293**, 708-711.
- Pereira L.A.R., Todorova M., Cai X., Makaroff C.A., Emery R.J.N., Moffatt B.A. (2007): Methyl recycling activities are co-ordinately regulated during plant development. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1083-1098.
- Pierson E.S., Cresti M. (1992): Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. *International Review of Cytology*, **140**, 73–125.
- Ravanel S., Block M.A., Rippert P., Jabrin S., Curien G., Rebeille F., Douce R. (2004): Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 22548-22557.
- Ringli C., Baumberger N., Diet A., Frey B., Keller B. (2002): ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **129**, 1464-1472.
- Rosenbaum J. (2000): Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Current Biology*, **2**, 801-803.
- Rosero A., Žárský V., Cvrčková F. (2013): AtFH1 formin mutation affects actin filament and microtubule dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 585–597.
- Sampathkumar A., Lindeboom J.J., Debolt S., Gutierrez R., Ehrhardt D.W., Ketelaar T., Persson S. (2011): Live Cell Imaging Reveals Structural Associations between the Actin and Microtubule Cytoskeleton in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**, 2302-2313.
- scbt home page: <http://www.scbt.com/datasheet-201442-cytochalasin-d.html> (22.6.2014).
- Seltzer V., Janski N., Canaday J., Herzog E., Erhardt M., Evrard J. L., Schmit A. C. (2007): *Arabidopsis* GCP2 and GCP3 are part of a soluble  $\gamma$ -tubulin complex and have nuclear envelope targeting domains. *Plant Journal*, **52**, 322-331.
- Sept D., Baker N.A., McCammon J.A. (2003): The physical basis of microtubule structure and stability. *Protein Science*, **12**, 2257–2261.
- Sheahan M.B., Staiger C.J., Rose R.J., McCurdy D.W. (2004): A Green Fluorescent Protein Fusion to Actin-Binding Domain 2 of *Arabidopsis* Fimbrin Highlights New Features of a Dynamic Actin Cytoskeleton in Live Plant Cells. *Plant Physiology*, **136**, 3968-3978.
- Sheterlin P., Sparrow J.C. (1994): Actin. *Protein profile*, **1**, 1-62.
- Shi W.L., Liu X., Jia W.S., Zhang S.Q. (2005) Protein Tyrosine Phosphatases Mediate the Signaling Pathway of Stomatal Closure of *Vicia faba* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, **47**, 319-326.
- Schliwa M. (1982): Action of Cytochalasin D on Cytoskeletal Networks. *Journal of Cell Biology*, **92**, 79-91.
- Sieberer B.J., Timmers A.C.J., Lhuissier F.G.P., Emons A.M.C. (2002): Endoplasmic Microtubules Configure the Subapical Cytoplasm and Are Required for Fast Growth of *Medicago truncatula* Root Hairs. *Plant Physiology*, **130**, 977-988.
- Smertenko A., Blume Y., Viklický V., Opatrný Z., Draber P. (1997): Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta*, **201**, 349–358.
- Snustad D.P., Haas N.A., Kopczak S.D., Silflow C.D. (1992): The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed betatubulin genes. *Plant Cell*, **4**: 549-556.
- Spector I., Shochet N.R., Blasberger D., Kashman Y. (2009): Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **13**, 127-144.
- Staelin L.A., Hepler P.K. (1996): Cytokinesis in higher plants. *Cell*, **84**, 821–824.
- Staiger C.J., Sheenan M.B., Khurana P., Wang X., McCurdy D.W., Blanchoin L. (2009): Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *Journal of Cell Biology*, **184**, 269-280.

- Staiger, C. J.; Poulter, N. S.; Henty, J. L.; Franklin-Tong, V. E.; Blanchoin, L. (2010): Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 1969–1986.
- Steinborn K., Maulbetsch C., Priester B., Trautmann S., Pacher T., Geiges B., Küttner F., Lepiniec L., Stierhof Y. D., Schwarz H., Jürgens G., Mayer U. (2002): The *Arabidopsis* PILZ group genes encode tubulin-folding factors orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes & Development*, **16**, 959–971.
- Strachan S.D., Hess F.D. (1983): The Biochemical Mechanism of Action of the Dinitroaniline Herbicide Oryzalin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **20**, 141–150.
- STRING home page: [http://www.string-db.org/newstring.cgi/show\\_network\\_section.pl](http://www.string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl) (27.7.2014)
- Sung D.Y., Guy C.L. (2003): Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiology*, **132**, 979–987.
- Takáč T., Pechan T., Richter H., Müller J., Eck C., Böhm N., Obert B., Ren H., Niehaus K., Šamaj J. (2011): Proteomics on brefeldin A treated *Arabidopsis* roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *Journal of Proteome Research*, **10**, 488–501.
- Takáč T., Pechan T., Šamajová O., Ovečka M., Richter H., Eck C., Niehaus K., Šamaj J. (2012): Wortmannin treatment induces changes in *Arabidopsis* root proteome and post-Golgi compartments. *Journal of Proteome Research*, **11**, 3127–3142
- Takáč T., Pechan T., Šamajová O., Šamaj J. (2013): Vesicular Trafficking and Stress Response Coupled to PI3K Inhibition by LY294002 as Revealed by Proteomic and Cell Biological Analysis. *Journal of Proteome Research*, **12**, 4435–4448.
- Terman J.R., Kashina A. (2013): Post-translational modification and regulation of actin. *Current Opinion in Cell Biology*, **25**, 30–38.
- Thimann K.V., Reese K., Nachmias V.T. (1992): Actin and the elongation of plant cells. *Protoplasma*, **171**, 153–166.
- Traas J.A., Bellini C., Nacry P., Kronenberger J., Bouchez D., Caboche M. (1995): Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature*, **375**, 673–677.
- Tuszynski J.A., Carpenter E.J., Huzil J.T., Malinski W., Luchko T., Ludueña R.F. (2006): The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *The International Journal of Developmental Biology*, **50**, 341–358.
- UniProt home page: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8RYC2> (27.7.2014)
- Upadhyaya M.K., Nooden L.D. (1987): Comparison of [<sup>14</sup>C] oryzalin uptake in root segments of a sensitive and a resistant species. *Annals of Botany*, **59**, 483–485.
- Uváčková L., Skultety L., Bekešová S., McClain S., Hajduch M. (2013): MS(E) based multiplex protein analysis quantified important allergenic proteins and detected relevant peptides carrying known epitopes in wheat grain extracts. *J. Proteome Res. Journal of Proteome Research*, **12**, 4862–4869.
- Vazquez L.A., Sanchez R., Hernandez-Barrera A., Zepeda-Jazo I., Sánchez F., Quinto C., Torres L.C. (2014): Actin polymerization drives polar growth in *Arabidopsis* root hair cells. *Plant Signal Behav.*, v tisku.
- Vidali L., McKenna S.T., Hepler P.K. (2001): Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 2534–2545.
- Wang N., Butler J.P., Ingber D.E. (1993): Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**, 1124–1127.
- Wang W., Vignani R., Scali M. (2004): Post-translation modifications of  $\alpha$ -tubulin in *Zea mays* L. are highly tissue specific. *Planta*, **218**, 460–465.
- Wang K., Zhang X., Goatley M., Ervin E. (2014): Heat shock proteins in relation to heat stress tolerance of creeping bentgrass at different N levels. *PLoS One*, **9**, 1–10.

- Wehland J., Willingham M.C., Sandoval I.V. (1983): A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization in vitro, and microtubule polymerization and organization in vivo. *Journal of Cell Biology*, **97**, 1467–1475.
- Wells C.L., van de Westerlo E.M.A., Jechorek R.P., Haines H.M., Erlandsen S.L. (1998): Cytochalasin-Induced Actin Disruption of Polarized Enterocytes Can Augment Internalization of Bacteria. *Infection and Immunity*, **66**, 2410-2419.
- Wheeler M.C., Tronconi M.A., Drincovich M.F., Andreo C.S., Fluegge U.I., Maurino V.G. (2005): A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of Arabidopsis. *Plant Physiology*, **139**, 39-51.
- Wodnicka M., Pierzchalska M., Bereiter-Hahn J., Kajstura J. (1992): Comparative study on effects of cytochalasins B and D on F-actin content in different cell lines and different culture conditions. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **30**, 107–111.
- Xie H., Bandhakavi S., Roe M.R., Griffin T.J. (2007): Preparative peptide isoelectric focusing as a tool for improving the identification of lysine-acetylated peptides from complex mixtures. *Journal of Proteome Research*, **6**, 2019-26.
- Xiong X., Xu D., Yang Z., Huang H., Cui X. (2013) A single amino-acid substitution at lysine 40 of an *Arabidopsis thaliana*  $\alpha$ -tubulin causes extensive cell proliferation and expansion defects. *Journal of Integrative Plant Biology*, **55**, 209-220.
- Zepeda I., Sánchez-López R., Kunkel J.G., Bañuelos L.A., Hernández-Barrera A., Sánchez F., Quinto C., Cárdenas L. (2014): Visualization of highly dynamic F-actin plus ends in growing phaseolus vulgaris root hair cells and their responses to *Rhizobium etli* nod factors. *Plant and Cell Physiology*, **55**, 580 – 592.
- Zykwinska A., Thibault J.F., Ralet M.C. (2007): Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1795–1802.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACN	acetonitril
AF	aktinová filamenta
AMK	aminokyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CBB G250	Coomassie Brilliant Blue G250
CHCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová
cytD	cytochalasin D
d	den
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
DV	destilovaná voda
EGTA	ethylenglykol- <i>bis</i> -(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
F-aktin	filamentární aktin
FRKS	finální roztok pro kalibrační skvrny
GA	Golgiho aparát
G-aktin	globulární aktin
GIP	GCP interaktivní protein
GCP	proteiny $\gamma$ -tubulinového komplexu
GFP	zelený fluorescenční protein
h	hodina
HG	homogalakturonan
HPLC	vysoko účinná kapalinová chromatografie
IAA	amid kyseliny jodoctové
IEF	isoelektická fokusace
IPG	isoelektrický fokusační gradient
KLMS	konfokální skenovací laserový mikroskop
latA	latrunkulin A
latB	latrunkulin B
LC	kapalinová chromatografie
MALDI	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí/ionizací pomocí matrice
MAP	mikrotubuly asociované proteiny
min	minuta
MS	hmotnostní spektrometrie
MS médium	Murashige & Skoog médium
MT	mikrotubulus
pI	isoelektrický bod
P	hodnota pravděpodobnosti
PCSTDII	Peptide Calibration Standard II
PM	plasmatická membrána
PT	pokožová teplota
PTM	posttranslační modifikace
QTOF	kvadrupólový časový letový detektor
RP	rehydratační pufr
SDS	dodecyl sulfát sodný
STD	standard
STD-VZ-roztok	roztok matrice pro standard i vzorek
TBST	Trisem-pufrovaný solný roztok
TFA	trifluoroctová kyselina
TO komplex	tubulin-oryzalinový komplex

TUA	tubulin $\alpha$
TUA6-GFP	fuzní konstrukt $\alpha$ -tubulinu 6 s GFP
UPLC	ultra výkonná kapalinová chromatografie
Vh	Volthodina
1D	jednodimenzionální
2D	dvoudimenzionální

## 9 PŘÍLOHY

Tab. 2Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Vstup (Entry)	Název	Mr (Da)	pI (pH)	PLGS skóre
A8MR07	A8MR07	A8MR07 ARATH Pyruvate kinase OS Arabidopsis thaliana GN At3g52990 PE 2 SV 1	51857	6,2417	522,2767
A8MR07	A8MR07	A8MR07 ARATH Pyruvate kinase OS Arabidopsis thaliana GN At3g52990 PE 2 SV 1	51857	6,2417	330,5766
A8MR07	A8MR07	A8MR07 ARATH Pyruvate kinase OS Arabidopsis thaliana GN At3g52990 PE 2 SV 1	51857	6,2417	320,0915
B9DFK6	B9DFK6	B9DFK6 ARATH Catalase OS Arabidopsis thaliana GN AT4G35090 PE 2 SV 1	54990	6,3549	140,5582
B9DFK6	B9DFK6	B9DFK6 ARATH Catalase OS Arabidopsis thaliana GN AT4G35090 PE 2 SV 1	54990	6,3549	203,1918
B9DFK6	B9DFK6	B9DFK6 ARATH Catalase OS Arabidopsis thaliana GN AT4G35090 PE 2 SV 1	54990	6,3549	152,1007
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	1473,793
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	515,3077
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	593,4064
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	756,9942
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	808,3845
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	1581,181
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	608,0549
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	969,986
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	455,5733
F4KGV2	F4KGV2	F4KGV2 ARATH 14 3 3 like protein GF14 lambda OS Arabidopsis thaliana GN GRF6 PE 3 SV 1	27700	4,611	444,2444
F4KGV2	F4KGV2	F4KGV2 ARATH 14 3 3 like protein GF14 lambda OS Arabidopsis thaliana GN GRF6 PE 3 SV 1	27700	4,611	901,6109
F4KGV2	F4KGV2	F4KGV2 ARATH 14 3 3 like protein GF14 lambda OS Arabidopsis thaliana GN GRF6 PE 3 SV 1	27700	4,611	1056,772
F4KGV2	F4KGV2	F4KGV2 ARATH 14 3 3 like protein GF14 lambda OS Arabidopsis thaliana GN GRF6 PE 3 SV 1	27700	4,611	747,0464

Tab. 2Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

O04318	O04318	NSP3 ARATH Nitrile specifier protein 3 OS Arabidopsis thaliana GN NSP3 PE 2 SV 1	51200	4,862	459,969
O04318	O04318	NSP3 ARATH Nitrile specifier protein 3 OS Arabidopsis thaliana GN NSP3 PE 2 SV 1	51200	4,862	363,3598
O04318	O04318	NSP3 ARATH Nitrile specifier protein 3 OS Arabidopsis thaliana GN NSP3 PE 2 SV 1	51200	4,862	561,0212
O04318	O04318	NSP3 ARATH Nitrile specifier protein 3 OS Arabidopsis thaliana GN NSP3 PE 2 SV 1	51200	4,862	373,9044
O49499	O49499	CAMT4 ARATH Caffeoyle CoA O methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN CCOAOMT1 PE 1 SV 1	29136	4,96	1438,271
O49499	O49499	CAMT4 ARATH Caffeoyle CoA O methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN CCOAOMT1 PE 1 SV 1	29136	4,96	422,5737
O49499	O49499	CAMT4 ARATH Caffeoyle CoA O methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN CCOAOMT1 PE 1 SV 1	29136	4,96	2268,122
O49499	O49499	CAMT4 ARATH Caffeoyle CoA O methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN CCOAOMT1 PE 1 SV 1	29136	4,96	2114,571
O49499	O49499	CAMT4 ARATH Caffeoyle CoA O methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN CCOAOMT1 PE 1 SV 1	29136	4,96	2226,371
O80852	O80852	GSTF9 ARATH Glutathione S transferase F9 OS Arabidopsis thaliana GN GSTF9 PE 1 SV 1	24130	6,1827	20742,8
O80852	O80852	GSTF9 ARATH Glutathione S transferase F9 OS Arabidopsis thaliana GN GSTF9 PE 1 SV 1	24130	6,1827	14571,45
O80852	O80852	GSTF9 ARATH Glutathione S transferase F9 OS Arabidopsis thaliana GN GSTF9 PE 1 SV 1	24130	6,1827	19003,65
O80852	O80852	GSTF9 ARATH Glutathione S transferase F9 OS Arabidopsis thaliana GN GSTF9 PE 1 SV 1	24130	6,1827	28194,27
O80852	O80852	GSTF9 ARATH Glutathione S transferase F9 OS Arabidopsis thaliana GN GSTF9 PE 1 SV 1	24130	6,1827	26489,2
P31265	P31265	TCTP ARATH Translationally controlled tumor protein homolog OS Arabidopsis thaliana GN TCTP PE 1 SV	18898	4,3156	2936,595
P31265	P31265	TCTP ARATH Translationally controlled tumor protein homolog OS Arabidopsis thaliana GN TCTP PE 1 SV	18898	4,3156	2224,531
P31265	P31265	TCTP ARATH Translationally controlled tumor protein homolog OS Arabidopsis thaliana GN TCTP PE 1 SV	18898	4,3156	2167,532
P31265	P31265	TCTP ARATH Translationally controlled tumor protein homolog OS Arabidopsis thaliana GN TCTP PE 1 SV	18898	4,3156	1870,759
P31265	P31265	TCTP ARATH Translationally controlled tumor protein homolog OS Arabidopsis thaliana GN TCTP PE 1 SV	18898	4,3156	1437,498



Tab. 2Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

P31265	P31265	TCTP ARATH Translationally controlled tumor protein homolog OS Arabidopsis thaliana GN TCTP PE 1 SV	18898	4,3156	1630,517
P39207	P39207	NDK1 ARATH Nucleoside diphosphate kinase 1 OS Arabidopsis thaliana GN NDPK1 PE 1 SV 1	16489	6,3636	459,4626
P39207	P39207	NDK1 ARATH Nucleoside diphosphate kinase 1 OS Arabidopsis thaliana GN NDPK1 PE 1 SV 1	16489	6,3636	1482,79
P39207	P39207	NDK1 ARATH Nucleoside diphosphate kinase 1 OS Arabidopsis thaliana GN NDPK1 PE 1 SV 1	16489	6,3636	647,7607
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	950,5334
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	1353,779
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	2777,769
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	2115,72
P59226	P59226	H32 ARATH Histone H3 2 OS Arabidopsis thaliana GN HTR2 PE 1 SV 2	15258	11,707	655,2028
P59226	P59226	H32 ARATH Histone H3 2 OS Arabidopsis thaliana GN HTR2 PE 1 SV 2	15258	11,707	2316,028
P59226	P59226	H32 ARATH Histone H3 2 OS Arabidopsis thaliana GN HTR2 PE 1 SV 2	15258	11,707	1152,581
P59226	P59226	H32 ARATH Histone H3 2 OS Arabidopsis thaliana GN HTR2 PE 1 SV 2	15258	11,707	804,4991
Q42406	Q42406	CP18D ARATH Peptidyl prolyl cis trans isomerase CYP18 4 OS Arabidopsis thaliana GN CYP18 4 PE 1 SV 1	18366	8,9852	3934,317
Q42406	Q42406	CP18D ARATH Peptidyl prolyl cis trans isomerase CYP18 4 OS Arabidopsis thaliana GN CYP18 4 PE 1 SV 1	18366	8,9852	2863,138
Q42406	Q42406	CP18D ARATH Peptidyl prolyl cis trans isomerase CYP18 4 OS Arabidopsis thaliana GN CYP18 4 PE 1 SV 1	18366	8,9852	2183,722
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	4773,629
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	2736,399
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	2277,329
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	3798,222
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	3912,407
Q56ZI2	Q56ZI2	PATL2 ARATH Patellin 2 OS Arabidopsis thaliana GN PATL2 PE 1 SV 2	75961	4,7232	217,7559
Q56ZI2	Q56ZI2	PATL2 ARATH Patellin 2 OS Arabidopsis thaliana GN PATL2 PE 1 SV 2	75961	4,7232	281,1385

Tab. 2Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q56ZI2	Q56ZI2	PATL2 ARATH Patellin 2 OS Arabidopsis thaliana GN PATL2 PE 1 SV 2	75961	4,7232	458,739
Q56ZI2	Q56ZI2	PATL2 ARATH Patellin 2 OS Arabidopsis thaliana GN PATL2 PE 1 SV 2	75961	4,7232	497,7518
Q8H1B3	Q8H1B3	MD37B ARATH Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37b OS Arabidopsis thaliana	75102	4,7562	384,1945
Q8H1B3	Q8H1B3	MD37B ARATH Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37b OS Arabidopsis thaliana	75102	4,7562	439,1141
Q8H1B3	Q8H1B3	MD37B ARATH Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37b OS Arabidopsis thaliana	75102	4,7562	539,7977
Q8H1B3	Q8H1B3	MD37B ARATH Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37b OS Arabidopsis thaliana	75102	4,7562	467,8472
Q8LFN7	Q8LFN7	Q8LFN7 ARATH Quinone oxidoreductase like protein OS Arabidopsis thaliana PE 2 SV 1	38496	8,0601	163,9854
Q8LFV7	Q8LFV7	Q8LFV7 ARATH Phosphoglycerate kinase putative OS Arabidopsis thaliana PE 2 SV 1	42121	5,3348	1120,027
Q8LFV7	Q8LFV7	Q8LFV7 ARATH Phosphoglycerate kinase putative OS Arabidopsis thaliana PE 2 SV 1	42121	5,3348	1584,713
Q94A28	Q94A28	ACO3M ARATH Aconitate hydratase 3 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN ACO3 PE 1 SV 3	1E+05	6,7258	416,815
Q94A28	Q94A28	ACO3M ARATH Aconitate hydratase 3 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN ACO3 PE 1 SV 3	1E+05	6,7258	202,5419
Q94A28	Q94A28	ACO3M ARATH Aconitate hydratase 3 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN ACO3 PE 1 SV 3	1E+05	6,7258	257,0436
Q94A28	Q94A28	ACO3M ARATH Aconitate hydratase 3 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN ACO3 PE 1 SV 3	1E+05	6,7258	379,4774
Q94A28	Q94A28	ACO3M ARATH Aconitate hydratase 3 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN ACO3 PE 1 SV 3	1E+05	6,7258	192,7222
Q94CE5	Q94CE5	GATP ARATH Gamma aminobutyrate transaminase POP2 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN POP2 PE 1	55152	7,9094	595,0137
Q94CE5	Q94CE5	GATP ARATH Gamma aminobutyrate transaminase POP2 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN POP2 PE 1	55152	7,9094	245,4632
Q94CE5	Q94CE5	GATP ARATH Gamma aminobutyrate transaminase POP2 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN POP2 PE 1	55152	7,9094	624,3783
Q94CE5	Q94CE5	GATP ARATH Gamma aminobutyrate transaminase POP2 mitochondrial OS Arabidopsis thaliana GN POP2 PE 1	55152	7,9094	319,6163

Tab. 2Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

		GATP ARATH Gamma aminobutyrate transaminase POP2 mitochondrial OS			
Q94CE5	Q94CE5	Arabidopsis thaliana GN POP2 PE 1	55152	7,9094	510,8372
		BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS			
Q9C525	Q9C525	Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	602,2482
		BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS			
Q9C525	Q9C525	Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	361,0053
		BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS			
Q9C525	Q9C525	Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	1126,879
		BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS			
Q9C525	Q9C525	Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	1201,013
		BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS			
Q9C525	Q9C525	Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	930,0093
		BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS			
Q9C525	Q9C525	Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	714,6137
		HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1			
Q9C7X7	Q9C7X7	HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1	68313	5,0349	3656,29
		HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1			
Q9C7X7	Q9C7X7	HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1	68313	5,0349	3535,434
		HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1			
Q9C7X7	Q9C7X7	HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1	68313	5,0349	2977,645
		HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1			
Q9C7X7	Q9C7X7	HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1	68313	5,0349	1633,657
		HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1			
Q9C7X7	Q9C7X7	HSP7N ARATH Heat shock 70 kDa protein 18 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 18 PE 1 SV 1	68313	5,0349	2348,319
		BGL22 ARATH Beta glucosidase 22 OS			
Q9C8Y9	Q9C8Y9	Arabidopsis thaliana GN BGLU22 PE 2 SV 1	59743	6,7892	484,4732
		BGL22 ARATH Beta glucosidase 22 OS			
Q9C8Y9	Q9C8Y9	Arabidopsis thaliana GN BGLU22 PE 2 SV 1	59743	6,7892	763,1373
		BGL22 ARATH Beta glucosidase 22 OS			
Q9C8Y9	Q9C8Y9	Arabidopsis thaliana GN BGLU22 PE 2 SV 1	59743	6,7892	1220,636
		BGL22 ARATH Beta glucosidase 22 OS			
Q9C8Y9	Q9C8Y9	Arabidopsis thaliana GN BGLU22 PE 2 SV 1	59743	6,7892	882,9164
		METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1			
Q9LUT2	Q9LUT2	METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1	42768	5,4153	671,2178
		METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1			
Q9LUT2	Q9LUT2	METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1	42768	5,4153	610,3694
		METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1			
Q9LUT2	Q9LUT2	METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1	42768	5,4153	972,0342
		METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1			
Q9LUT2	Q9LUT2	METK4 ARATH S adenosylmethionine synthase 4 OS Arabidopsis thaliana GN METK4 PE 1 SV 1	42768	5,4153	1039,677
		H2B9 ARATH Histone H2B 9 OS Arabidopsis thaliana GN At5g02570 PE 1 SV 3			
Q9LZ45	Q9LZ45	H2B9 ARATH Histone H2B 9 OS Arabidopsis thaliana GN At5g02570 PE 1 SV 3	14535	10,519	3219,835

Tab. 2Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9LZ45	Q9LZ45	H2B9 ARATH Histone H2B 9 OS Arabidopsis thaliana GN At5g02570 PE 1 SV 3	14535	10,519	794,9014
Q9LZ45	Q9LZ45	H2B9 ARATH Histone H2B 9 OS Arabidopsis thaliana GN At5g02570 PE 1 SV 3	14535	10,519	3994,614
Q9LZ45	Q9LZ45	H2B9 ARATH Histone H2B 9 OS Arabidopsis thaliana GN At5g02570 PE 1 SV 3	14535	10,519	1981,939
Q9LZG0	Q9LZG0	ADK2 ARATH Adenosine kinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN ADK2 PE 1 SV 1	37821	4,9651	1580,889
Q9LZG0	Q9LZG0	ADK2 ARATH Adenosine kinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN ADK2 PE 1 SV 1	37821	4,9651	1648,881
Q9LZG0	Q9LZG0	ADK2 ARATH Adenosine kinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN ADK2 PE 1 SV 1	37821	4,9651	656,7752
Q9LZG0	Q9LZG0	ADK2 ARATH Adenosine kinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN ADK2 PE 1 SV 1	37821	4,9651	1370,748
Q9LZG0	Q9LZG0	ADK2 ARATH Adenosine kinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN ADK2 PE 1 SV 1	37821	4,9651	1404,175
Q9LZG0	Q9LZG0	ADK2 ARATH Adenosine kinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN ADK2 PE 1 SV 1	37821	4,9651	1333,634
Q9SEI4	Q9SEI4	PRS6B ARATH 26S protease regulatory subunit 6B homolog OS Arabidopsis thaliana GN RPT3 PE 1 SV 1	45722	5,2621	189,6681
Q9SEI4	Q9SEI4	PRS6B ARATH 26S protease regulatory subunit 6B homolog OS Arabidopsis thaliana GN RPT3 PE 1 SV 1	45722	5,2621	145,9355
Q9SEI4	Q9SEI4	PRS6B ARATH 26S protease regulatory subunit 6B homolog OS Arabidopsis thaliana GN RPT3 PE 1 SV 1	45722	5,2621	285,0326
Q9SEI4	Q9SEI4	PRS6B ARATH 26S protease regulatory subunit 6B homolog OS Arabidopsis thaliana GN RPT3 PE 1 SV 1	45722	5,2621	582,0975
Q9SJQ0	Q9SJQ0	Q9SJQ0 ARATH Pyruvate kinase OS Arabidopsis thaliana GN At2g36580 PE 1 SV 2	57472	5,9161	290,4774
Q9SJQ0	Q9SJQ0	Q9SJQ0 ARATH Pyruvate kinase OS Arabidopsis thaliana GN At2g36580 PE 1 SV 2	57472	5,9161	234,7177
Q9SJQ9	Q9SJQ9	Q9SJQ9 ARATH Fructose biphosphate aldolase OS Arabidopsis thaliana GN At2g36460 PE 1 SV 1	38362	7,1711	4026,092
Q9SR37	Q9SR37	BGL23 ARATH Beta glucosidase 23 OS Arabidopsis thaliana GN BGLU23 PE 1 SV 1	59682	6,4605	14336,43
Q9SR37	Q9SR37	BGL23 ARATH Beta glucosidase 23 OS Arabidopsis thaliana GN BGLU23 PE 1 SV 1	59682	6,4605	10916,56
Q9SR37	Q9SR37	BGL23 ARATH Beta glucosidase 23 OS Arabidopsis thaliana GN BGLU23 PE 1 SV 1	59682	6,4605	14312,36
Q9SRT9	Q9SRT9	RGP1 ARATH UDP arabinopyranose mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN RGP1 PE 1 SV 1	40602	5,5095	354,3497
Q9SRT9	Q9SRT9	RGP1 ARATH UDP arabinopyranose mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN RGP1 PE 1 SV 1	40602	5,5095	201,3953
Q9SRT9	Q9SRT9	RGP1 ARATH UDP arabinopyranose mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN RGP1 PE 1 SV 1	40602	5,5095	177,9464

Tab. 2Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9SRT9	Q9SRT9	RGP1 ARATH UDP arabinopyranose mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN RGP1 PE 1 SV 1	40602	5,5095	311,7459
Q9XGZ0	Q9XGZ0	MAOP3 ARATH NADP dependent malic enzyme 3 OS Arabidopsis thaliana GN NADP ME3 PE 1 SV 1	64569	6,5684	1839,911
Q9XGZ0	Q9XGZ0	MAOP3 ARATH NADP dependent malic enzyme 3 OS Arabidopsis thaliana GN NADP ME3 PE 1 SV 1	64569	6,5684	682,1676
Q9XGZ0	Q9XGZ0	MAOP3 ARATH NADP dependent malic enzyme 3 OS Arabidopsis thaliana GN NADP ME3 PE 1 SV 1	64569	6,5684	1135,31
Q9XGZ0	Q9XGZ0	MAOP3 ARATH NADP dependent malic enzyme 3 OS Arabidopsis thaliana GN NADP ME3 PE 1 SV 1	64569	6,5684	1041,682

Tab. 2Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Peptidy	Teoretické Peptidy	Pokrytí (%)	Prekurzor RMS Mass chyba (ppm)	Produkty	Naštěpené peptidy	Modifikované peptidy	Produkty RMS Mass chyba (ppm)
A8MR07	4	30	10,3376	3,0361	14	2	0	18,214
A8MR07	8	30	20,4641	6,6907	34	5	0	23,4159
A8MR07	3	30	10,3376	8,7579	15	2	0	16,4233
B9DFK6	3	35	9,9156	7,2924	10	3	0	16,3764
B9DFK6	4	35	12,8692	6,9863	15	4	0	23,2497
B9DFK6	8	35	24,4726	6,5587	29	7	1	20,2658
C0Z387	7	10	41,4141	5,8762	31	4	0	16,3256
C0Z387	5	10	44,4444	8,7572	23	4	0	28,4895
C0Z387	5	10	27,2727	7,2092	21	3	0	16,4349
C0Z387	4	10	27,2727	6,7243	21	3	0	16,4865
C0Z387	8	10	44,4444	7,7514	31	4	0	11,1542
F4I1C1	11	26	20,7171	6,0134	42	4	0	17,5733
F4I1C1	8	26	27,0916	10,3301	33	5	0	21,1824
F4I1C1	13	26	26,6932	7,9022	54	5	0	19,4144
F4I1C1	10	26	17,5299	7,5407	22	3	0	19,4268
F4KGV2	11	22	20,7317	7,2795	35	4	0	15,8617
F4KGV2	8	22	18,6992	6,5738	31	4	0	12,9144
F4KGV2	7	22	16,6667	7,3927	28	3	0	11,4288
F4KGV2	14	22	22,7642	7,0444	35	5	0	13,6893
O04318	6	35	8,7794	7,2798	26	3	0	12,0558
O04318	5	35	16,7024	7,2689	22	5	0	19,4302
O04318	4	35	7,4946	3,5714	22	3	0	8,7269
O04318	6	35	15,6317	8,4494	23	5	1	17,3051
O49499	5	29	31,2741	11,5935	27	4	0	14,6503
O49499	3	29	23,9382	4,8934	15	3	0	20,5819

Tab. 2Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

O49499	8	29	40,5405	7,7852	50	7	0	18,538
O49499	8	29	52,8958	6,7317	44	7	0	17,707
O49499	5	29	28,1853	3,6371	30	4	0	16,0739
O80852	12	13	41,3953	8,7614	101	6	0	12,3714
O80852	15	13	39,0698	7,0719	101	6	1	10,7217
O80852	19	13	33,0233	8,1143	170	5	0	9,5732
O80852	13	13	39,0698	4,6319	123	5	0	9,6533
O80852	14	13	39,0698	7,2091	133	5	0	11,9194
P31265	8	18	33,9286	5,6733	53	4	0	12,7146
P31265	6	18	27,381	4,8856	40	4	0	13,339
P31265	7	18	33,9286	5,985	40	4	0	13,6403
P31265	10	18	38,0952	6,2325	52	5	0	11,1714
P31265	10	18	41,6667	6,6106	53	5	0	13,3298
P31265	8	18	41,6667	4,8778	52	5	0	15,2631
P39207	5	13	16,7785	6,4372	13	2	0	14,732
P39207	8	13	57,047	6,0932	27	6	0	19,9239
P39207	9	13	22,8188	7,0885	25	3	0	13,3598
P53492	13	35	36,87	7,8117	61	9	0	16,3194
P53492	14	35	34,4828	10,4587	82	9	0	18,1977
P53492	10	35	36,87	8,9856	67	8	1	16,2529
P53492	13	35	33,1565	9,2125	68	8	0	13,2088
P59226	3	12	28,6765	5,0119	13	2	0	22,3242
P59226	3	12	28,6765	3,5463	22	2	0	10,333
P59226	2	12	28,6765	1,0802	17	2	0	17,6996
P59226	4	12	33,8235	6,9253	22	3	0	20,3839
Q42406	4	13	43,0233	4,7436	41	4	0	14,5311
Q42406	4	13	43,0233	9,8865	39	4	1	17,9444
Q42406	4	13	32,5581	9,0579	39	4	0	18,9813
Q42449	2	11	22,1374	2,4156	19	2	0	14,4457
Q42449	2	11	22,1374	7,1417	16	2	0	14,2069
Q42449	3	11	32,8244	5,9	23	3	0	16,8214
Q42449	3	11	41,2214	6,9135	25	3	0	15,9776
Q42449	3	11	41,2214	5,7504	24	3	0	16,518
Q56ZI2	11	84	15,3734	8,6456	29	7	0	19,4433
Q56ZI2	8	84	14,6413	9,7741	28	5	0	20,0576
Q56ZI2	10	84	22,1083	8,8861	45	9	0	17,6841
Q56ZI2	15	84	27,5256	8,3775	58	13	1	21,5694
Q8H1B3	4	61	8,5926	11,0724	33	4	1	17,2904
Q8H1B3	7	61	13,1852	9,0138	41	5	0	18,6945
Q8H1B3	5	61	10,963	10,5794	34	5	0	21,393
Q8H1B3	9	61	12,4444	6,3929	45	7	0	22,0804
Q8LFN7	4	33	20,1133	12,2311	11	3	0	26,0646
Q8LFV7	15	29	41,6459	8,9589	76	10	0	15,5312
Q8LFV7	14	29	47,3815	9,006	77	11	1	17,7092

Tab. 2Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenek *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q94A28	8	68	12,9648	7,0062	43	7	0	16,4791
Q94A28	4	68	7,5377	3,6836	15	4	0	17,9531
Q94A28	9	68	14,1709	9,0064	43	8	0	19,2191
Q94A28	10	68	17,3869	10,0307	51	10	2	17,5377
Q94A28	6	68	9,1457	9,9009	26	6	0	22,3705
Q94CE5	2	34	11,1111	6,5449	10	2	0	13,263
Q94CE5	7	34	25,5952	9,5527	33	7	1	21,8296
Q94CE5	7	34	31,746	8,8264	34	7	0	19,3768
Q94CE5	2	34	11,5079	4,1627	15	2	0	14,7521
Q94CE5	2	34	11,5079	2,9275	15	2	0	13,8035
Q9C525	17	43	15,8397	6,6564	80	7	1	15,9464
Q9C525	16	43	24,2366	10,0117	71	8	0	19,8237
Q9C525	14	43	20,229	8,8502	67	7	1	18,4173
Q9C525	18	43	22,5191	7,5801	73	8	0	15,3953
Q9C525	16	43	21,9466	7,1736	77	9	0	20,0344
Q9C525	23	43	28,2443	7,9795	88	10	0	15,9086
Q9C7X7	20	49	32,9011	8,7685	138	14	1	15,7809
Q9C7X7	14	49	17,9903	9,2906	124	9	0	18,9121
Q9C7X7	22	49	25,9319	9,4068	150	13	0	19,3193
Q9C7X7	21	49	24,7974	7,4471	129	13	2	17,4453
Q9C7X7	21	49	22,3663	7,8347	144	11	0	17,5221
Q9C8Y9	16	42	14,5038	6,3013	79	7	1	17,945
Q9C8Y9	13	42	21,1832	9,1787	56	7	2	20,0097
Q9C8Y9	14	42	15,0763	7,562	59	5	0	14,5066
Q9C8Y9	13	42	15,2672	8,0949	64	6	0	18,2219
Q9LUT2	16	35	20,1018	8,7978	83	5	0	16,8404
Q9LUT2	8	35	21,883	9,9005	37	6	0	23,0036
Q9LUT2	13	35	31,5522	10,0688	70	7	1	17,1549
Q9LUT2	13	35	17,3028	6,5797	66	5	0	14,7491
Q9LZ45	5	13	18,1818	3,9757	37	2	0	10,6729
Q9LZ45	6	13	26,5152	8,5797	33	4	1	17,8348
Q9LZ45	4	13	26,5152	3,8838	31	3	0	15,4109
Q9LZ45	4	13	27,2727	7,4211	20	3	0	22,5623
Q9LZG0	4	27	18,2609	4,5196	27	4	0	22,8686
Q9LZG0	7	27	30,4348	7,4462	43	7	0	21,5955
Q9LZG0	5	27	24,058	7,029	27	5	0	18,6458
Q9LZG0	7	27	32,4638	6,8892	39	7	0	17,2243
Q9LZG0	8	27	33,6232	8,6178	49	7	0	20,1874
Q9LZG0	5	27	24,3478	4,1653	31	5	0	17,7018
Q9SEI4	6	35	15,1961	10,5454	27	5	0	23,8745
Q9SEI4	5	35	25	5,7171	19	4	1	19,1241
Q9SEI4	6	35	22,0588	4,1142	29	5	0	19,7434
Q9SEI4	7	35	19,1176	9,2169	26	6	1	18,5617
Q9SJQ0	7	38	13,852	8,2634	31	4	0	19,8649
Q9SJQ0	5	38	12,9032	7,6698	19	4	0	21,9174

Tab. 2Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9SJQ9	9	28	26,8156	7,3359	85	6	0	15,7089
Q9SR37	47	35	42,3664	6,9698	417	16	1	14,832
Q9SR37	40	35	43,3206	8,785	377	15	0	14,6657
Q9SR37	42	35	50,3817	7,3026	434	16	1	14,9676
Q9SRT9	6	35	22,6891	10,4252	26	6	0	17,9694
Q9SRT9	3	35	10,084	7,3709	13	3	0	21,3173
Q9SRT9	4	35	15,6863	6,1282	23	4	0	25,4667
Q9SRT9	4	35	15,6863	3,3776	23	4	0	19,0749
Q9XGZ0	9	46	20,4082	7,2087	44	6	0	19,9351
Q9XGZ0	10	46	23,2993	7,6557	48	8	0	19,8582
Q9XGZ0	11	46	21,0884	9,442	49	7	1	18,7216
Q9XGZ0	4	46	17,0068	5,55	25	4	0	17,8794

Tab. 2Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Databázové číslo	Produkty RMS RT Error (min)	Množství (fmol)	Množství (ngram)	Protein ID	Vzorek	OC	OT	Hodnota P
A8MR07	0,0208183	144,1369	7,4792	19250	OC_1	8,9107	0	
A8MR07	0,024073	199,31	10,3421	19250	OC_2			
A8MR07	0,0197679	53,3283	2,7672	19250	OC_3			
B9DFK6	0,014454	33,5998	1,8488	31932	OT_1		0 3,5156	
B9DFK6	0,0177234	390,1215	21,4665	31932	OT_2			
B9DFK6	0,0218457	94,1797	5,1823	31932	OT_3			
C0Z387	0,0224648	407,8017	4,425	32070	OT_1	2,0957	3,8683	0,04309
C0Z387	0,0253661	305,1801	3,3115	32070	OT_3			
C0Z387	0,020178	150,944	1,6379	32070	OC_1			
C0Z387	0,0218191	198,8435	2,1576	32070	OC_2			
C0Z387	0,0188626	229,6196	2,4916	32070	OC_3			
F4I1C1	0,0168346	376,0677	10,7436	32835	OT_2	5,6078	9,8588	0,04335
F4I1C1	0,020352	314,1204	8,9739	32835	OT_3			
F4I1C1	0,0187986	188,1267	5,3745	32835	OC_1			
F4I1C1	0,0240811	204,4565	5,841	32835	OC_3			
F4KGV2	0,0144453	217,7843	6,0367	40069	OT_2	3,8562	6,0487	0,04107
F4KGV2	0,0183047	218,6521	6,0607	40069	OT_3			
F4KGV2	0,016108	173,6978	4,3146	40069	OC_2			
F4KGV2	0,0205857	122,5773	3,3977	40069	OC_3			
O04318	0,0213543	8,5649	0,4388	6768	OT_1			
O04318	0,0205452	8,7143	0,4465	6768	OT_2			
O04318	0,0133876	17,3399	0,8884	6768	OC_1			
O04318	0,023461	21,5699	1,1051	6768	OC_3	0,9968	0,4427	0,03622
O49499	0,0169696	152,8931	4,4576	1677	OT_1			
O49499	0,0268097	176,9142	5,158	1677	OT_3			
O49499	0,0234378	343,4376	10,013	1677	OC_1			



Tab. 2Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

O49499	0,0214489	455,6661	13,2851	1677	OC_2	12,102	4,8078	0,01314
O49499	0,0182772	446,1839	13,0086	1677	OC_3			
O80852	0,0179312	1230,793	29,7186	4983	OT_1			
O80852	0,0177499	1564,392	37,7737	4983	OT_3			
O80852	0,0182312	1834,185	44,2881	4983	OC_1			
O80852	0,0155391	2357,541	56,925	4983	OC_2	50,596	33,746	0,05489
O80852	0,0194375	2094,602	50,5761	4983	OC_3			
P31265	0,0142597	311,5552	13,465896	10238	OT_1			
P31265	0,0154209	674,8616	12,7619	10238	OT_2			
P31265	0,0136174	469,9149	13,887927	10238	OT_3			
P31265	0,0147699	501,4603	17,833811	10238	OC_1			
P31265	0,0176741	591,5601	17,52605	10238	OC_2	18,06	13,372	0,00078
P31265	0,0197532	631,5171	18,819948	10238	OC_3			
P39207	0,0187177	369,9458	6,1041	6569	OC_1			
P39207	0,0211806	440,4908	7,2681	6569	OC_2			
P39207	0,0193874	383,5762	6,329	6569	OC_3	6,567	0	
P53492	0,018517	1185,274	49,4685	317	OT_2			
P53492	0,0187158	1065,507	44,4699	317	OT_3			
P53492	0,0206559	689,3164	28,7693	317	OC_1			
P53492	0,0170419	903,546	37,7103	317	OC_3	30,064	46,969	0,02662
P59226	0,0218805	138,45	4,831321	5126	OT_1			
P59226	0,0185616	355,6573	5,4301	5126	OT_2			
P59226	0,0142733	161,3433	3,8594095	5126	OC_2			
P59226	0,0174117	153,0755	3,6830818	5126	OC_3	3,7712	5,1307	0,04887
Q42406	0,0225069	799,8969	14,7006	2247	OT_1	0	26,295	
Q42406	0,0212067	1949,351	35,8253	2247	OT_2			
Q42406	0,0208116	1543,145	28,3601	2247	OT_3			
Q42449	0,018144	333,8432	4,7627	8224	OT_1			
Q42449	0,0177097	383,6928	5,4739	8224	OT_3			
Q42449	0,0190444	462,3924	6,5966	8224	OC_1			
Q42449	0,0177811	482,4925	6,8834	8224	OC_2	6,8297	5,1183	0,01154
Q42449	0,0193213	491,3156	7,0092	8224	OC_3			
Q56ZI2	0,0242704	84,0471	14,601158	7094	OT_1			
Q56ZI2	0,0163553	305,4762	23,2187	7094	OT_2			
Q56ZI2	0,0222492	292,3575	41,790823	7094	OC_1			
Q56ZI2	0,0208553	352,4524	41,970648	7094	OC_2	41,881	18,91	0,03344
Q8H1B3	0,0207732	8,6147	0,6474	6155	OT_2			
Q8H1B3	0,014846	10,7902	0,8109	6155	OT_3			
Q8H1B3	0,0162033	14,8767	1,118	6155	OC_2	1,2124	0,7292	0,05408
Q8H1B3	0,0177579	168,6376	1,26731	6155	OC_3			
Q8LFN7	0,0213636	121,8169	4,6925	36508	OT_2			
Q8LFV7	0,0213816	409,3155	17,2518	34761	OT_2	0	16,444	
Q8LFV7	0,0193203	370,9987	15,6368	34761	OT_3			
Q94A28	0,0164562	110,3559	11,9715	295	OT_1			
Q94A28	0,0231697	54,8076	5,9456	295	OT_3			

Tab. 2Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q94A28	0,0201785	199,7725	21,6716	295	OC_1			
Q94A28	0,022373	192,2517	20,8557	295	OC_2	22,56	8,9586	0,01694
Q94A28	0,0196011	231,8619	25,1527	295	OC_3			
Q94CE5	0,010303	90,0883	11,363593	4547	OT_1			
Q94CE5	0,0211896	186,3631	16,073725	4547	OT_3			
Q94CE5	0,0247942	217,5448	22,578686	4547	OC_1	22,311	13,719	0,02096
Q94CE5	0,0141103	268,4909	23,214425	4547	OC_2			
Q94CE5	0,0203288	243,0784	21,140805	4547	OC_3			
Q9C525	0,017752	214,1916	29,208945	1229	OT_1			
Q9C525	0,0210046	481,3389	28,7185	1229	OT_2			
Q9C525	0,0144924	335,1718	31,253188	1229	OT_3			
Q9C525	0,0218396	316,687	35,534283	1229	OC_1			
Q9C525	0,0209779	437,4633	40,891975	1229	OC_2	36,999	29,727	0,02629
Q9C525	0,0244824	367,6759	34,570792	1229	OC_3			
Q9C7X7	0,014102	131,4548	8,9858	5350	OT_1			
Q9C7X7	0,0171612	62,8508	4,2963	5350	OT_2			
Q9C7X7	0,017824	27,0919	1,8519	5350	OT_3			
Q9C7X7	0,0173988	564,3979	38,5805	5350	OC_1	27,894	5,0447	0,05477
Q9C7X7	0,0171943	251,716	17,2065	5350	OC_3			
Q9C8Y9	0,01784	93,1493	12,727416	1230	OT_1			
Q9C8Y9	0,0162641	115,99	10,836781	1230	OT_3			
Q9C8Y9	0,0223914	152,559	17,151699	1230	OC_1	17,659	11,782	0,03175
Q9C8Y9	0,0205954	193,9686	18,16683	1230	OC_2			
Q9LUT2	0,0181137	248,9868	10,6556	6233	OT_2			
Q9LUT2	0,0164672	204,6919	13,690383	6233	OT_3			
Q9LUT2	0,0175349	241,591	19,44421	6233	OC_1			
Q9LUT2	0,0174397	286,4888	19,321563	6233	OC_3	19,383	12,173	0,04162
Q9LZ45	0,018327	431,9363	6,2821	5125	OT_1			
Q9LZ45	0,0176124	448,0609	6,5167	5125	OT_3			
Q9LZ45	0,0202166	750,4021	10,914	5125	OC_1	10,231	6,3994	0,03118
Q9LZ45	0,0233448	587,7448	9,5482	5125	OC_2			
Q9LZG0	0,0169525	135,8274	5,1406	342	OT_1			
Q9LZG0	0,0195478	354,5217	13,4173	342	OT_2			
Q9LZG0	0,0192954	111,4987	4,2198	342	OT_3			
Q9LZG0	0,0218702	415,415	15,7219	342	OC_1			
Q9LZG0	0,0193096	369,0079	13,9656	342	OC_2	13,931	4,6802	0,00692
Q9LZG0	0,0212388	319,8885	12,1066	342	OC_3			
Q9SEI4	0,0211895	98,6809	4,5148	8243	OT_1			
Q9SEI4	0,0206585	89,604	4,0995	8243	OT_3			
Q9SEI4	0,0176597	160,417	7,3393	8243	OC_1	7,8402	4,3072	0,02275
Q9SEI4	0,0179689	182,3146	8,3411	8243	OC_3			
Q9SJQ0	0,0241067	32,2953	1,8573	17738	OC_2			
Q9SJQ0	0,0239696	150,9277	8,6796	17738	OC_3			
Q9SJQ9	0,0177893	3,468	0,1331	16801	OC_1	0,9952	0	
Q9SR37	0,0167406	2705,3	161,5624	1231	OT_1			

Tab. 2Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění oryzalinem získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9SR37	0,0166453	5916,144	353,3162	1231	OT_2			
Q9SR37	0,0150101	5282,935	315,5006	1231	OT_3	0	334,41	
Q9SRT9	0,0213539	121,1011	11,245655	8903	OT_1			
Q9SRT9	0,0194804	166,1792	10,551874	8903	OT_3			
Q9SRT9	0,0239737	128,1373	8,1563984	8903	OC_2			
Q9SRT9	0,0213859	128,5712	8,2321315	8903	OC_3	8,1943	10,899	0,01624
Q9XGZ0	0,0174745	183,8372	15,8778	6079	OT_2			
Q9XGZ0	0,0211039	326,7677	21,1126	6079	OT_3			
Q9XGZ0	0,0192839	28,1528	1,819	6079	OC_1			
Q9XGZ0	0,0216236	20,6351	1,3332	6079	OC_3	1,5761	18,495	0,0233

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Vstup (Entry)	Název	Mr (Da)	pI (pH)	PLGS skóre	Peptidy
A8MSA4	A8MSA4	A8MSA4 ARATH Uncharacterized protein At4g08390 3 OS Arabidopsis thaliana GN At4g08390 PE 3 SV 1	37771	8,1268	334,9229	4
A8MSA4	A8MSA4	A8MSA4 ARATH Uncharacterized protein At4g08390 3 OS Arabidopsis thaliana GN At4g08390 PE 3 SV 1	37771	8,1268	471,6593	2
A8MSA4	A8MSA4	A8MSA4 ARATH Uncharacterized protein At4g08390 3 OS Arabidopsis thaliana GN At4g08390 PE 3 SV 1	37771	8,1268	145,0634	4
A8MSA4	A8MSA4	A8MSA4 ARATH Uncharacterized protein At4g08390 3 OS Arabidopsis thaliana GN At4g08390 PE 3 SV 1	37771	8,1268	670,4619	4
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	718,6415	6
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	624,1317	3
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	1096,0000	4
C0Z387	C0Z387	C0Z387 ARATH AT2G21660 protein OS Arabidopsis thaliana GN AT2G21660 PE 4 SV 1	10844	4,0038	1646,6540	8
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	1028,4010	6
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	1643,0080	7
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	1671,7370	9

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	1132,9980	6
F4I1C1	F4I1C1	F4I1C1 ARATH 14 3 3 like protein GF14 epsilon OS Arabidopsis thaliana GN GRF10 PE 3 SV 1	28550	4,6575	882,0416	6
F4K007	F4K007	F4K007 ARATH Luminal binding protein 2 OS Arabidopsis thaliana GN BIP2 PE 3 SV 1	67358	4,9924	3206,8780	17
F4K007	F4K007	F4K007 ARATH Luminal binding protein 2 OS Arabidopsis thaliana GN BIP2 PE 3 SV 1	67358	4,9924	2262,2250	18
F4K007	F4K007	F4K007 ARATH Luminal binding protein 2 OS Arabidopsis thaliana GN BIP2 PE 3 SV 1	67358	4,9924	2262,3740	18
F4K007	F4K007	F4K007 ARATH Luminal binding protein 2 OS Arabidopsis thaliana GN BIP2 PE 3 SV 1	67358	4,9924	1834,6250	16
O04314	O04314	O04314 ARATH Jasmonate inducible protein isolog OS Arabidopsis thaliana GN T02O04 8 PE 2 SV 1	32138	5,3608	11008,6600	8
O04314	O04314	O04314 ARATH Jasmonate inducible protein isolog OS Arabidopsis thaliana GN T02O04 8 PE 2 SV 1	32138	5,3608	7980,7520	7
O04314	O04314	O04314 ARATH Jasmonate inducible protein isolog OS Arabidopsis thaliana GN T02O04 8 PE 2 SV 1	32138	5,3608	3657,0330	12
O04314	O04314	O04314 ARATH Jasmonate inducible protein isolog OS Arabidopsis thaliana GN T02O04 8 PE 2 SV 1	32138	5,3608	5776,2370	8
O04499	O04499	PMG1 ARATH 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN	60541	5,1687	1216,2200	11
O04499	O04499	PMG1 ARATH 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN	60541	5,1687	583,2095	8
O04499	O04499	PMG1 ARATH 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN	60541	5,1687	427,9761	10
O04499	O04499	PMG1 ARATH 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN	60541	5,1687	1293,0890	13
O04499	O04499	PMG1 ARATH 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN	60541	5,1687	1448,5520	9
O04499	O04499	PMG1 ARATH 2 3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase 1 OS Arabidopsis thaliana GN	60541	5,1687	1335,8640	14

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

O50008	O50008	METE ARATH 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase OS Arabidopsis thal	84303	6,0601	3552,7270	37
O50008	O50008	METE ARATH 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase OS Arabidopsis thal	84303	6,0601	3143,6820	38
O50008	O50008	METE ARATH 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase OS Arabidopsis thal	84303	6,0601	2549,1500	37
O50008	O50008	METE ARATH 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase OS Arabidopsis thal	84303	6,0601	2865,2800	24
O50008	O50008	METE ARATH 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase OS Arabidopsis thal	84303	6,0601	3048,4820	38
O50008	O50008	METE ARATH 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase OS Arabidopsis thal	84303	6,0601	1768,0680	32
O81796	O81796	IDH3 ARATH Isocitrate dehydrogenase NAD regulatory subunit 3 mitochondrial OS Arabidopsis thalian	39931	7,1999	408,8896	3
O81796	O81796	IDH3 ARATH Isocitrate dehydrogenase NAD regulatory subunit 3 mitochondrial OS Arabidopsis thalian	39931	7,1999	135,3716	4
O81796	O81796	IDH3 ARATH Isocitrate dehydrogenase NAD regulatory subunit 3 mitochondrial OS Arabidopsis thalian	39931	7,1999	96,3167	4
P23686	P23686	METK1 ARATH S adenosylmethionine synthase 1 OS Arabidopsis thaliana GN SAM1 PE 1 SV 2	43130	5,4095	375,6068	12
P23686	P23686	METK1 ARATH S adenosylmethionine synthase 1 OS Arabidopsis thaliana GN SAM1 PE 1 SV 2	43130	5,4095	831,2859	10
P23686	P23686	METK1 ARATH S adenosylmethionine synthase 1 OS Arabidopsis thaliana GN SAM1 PE 1 SV 2	43130	5,4095	718,0434	16
P23686	P23686	METK1 ARATH S adenosylmethionine synthase 1 OS Arabidopsis thaliana GN SAM1 PE 1 SV 2	43130	5,4095	1309,1560	13
P23686	P23686	METK1 ARATH S adenosylmethionine synthase 1 OS Arabidopsis thaliana GN SAM1 PE 1 SV 2	43130	5,4095	1224,6380	14
P42763	P42763	ERD14 ARATH Dehydrin ERD14 OS Arabidopsis thaliana GN ERD14 PE 1 SV 1	20773	5,2414	3045,7220	11
P42763	P42763	ERD14 ARATH Dehydrin ERD14 OS Arabidopsis thaliana GN ERD14 PE 1 SV 1	20773	5,2414	3438,2940	10

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

P42763	P42763	ERD14 ARATH Dehydrin ERD14 OS Arabidopsis thaliana GN ERD14 PE 1 SV 1	20773	5,2414	1542,2830	8
P42763	P42763	ERD14 ARATH Dehydrin ERD14 OS Arabidopsis thaliana GN ERD14 PE 1 SV 1	20773	5,2414	3476,2630	13
P42763	P42763	ERD14 ARATH Dehydrin ERD14 OS Arabidopsis thaliana GN ERD14 PE 1 SV 1	20773	5,2414	2732,4180	11
P42763	P42763	ERD14 ARATH Dehydrin ERD14 OS Arabidopsis thaliana GN ERD14 PE 1 SV 1	20773	5,2414	1749,0090	15
P48491	P48491	TPIS ARATH Triosephosphate isomerase cytosolic OS Arabidopsis thaliana GN CTIMC PE 1 SV 2	27152	5,2224	2029,6840	8
P48491	P48491	TPIS ARATH Triosephosphate isomerase cytosolic OS Arabidopsis thaliana GN CTIMC PE 1 SV 2	27152	5,2224	3389,9420	12
P48491	P48491	TPIS ARATH Triosephosphate isomerase cytosolic OS Arabidopsis thaliana GN CTIMC PE 1 SV 2	27152	5,2224	2032,7400	12
P48491	P48491	TPIS ARATH Triosephosphate isomerase cytosolic OS Arabidopsis thaliana GN CTIMC PE 1 SV 2	27152	5,2224	3445,8020	13
P48491	P48491	TPIS ARATH Triosephosphate isomerase cytosolic OS Arabidopsis thaliana GN CTIMC PE 1 SV 2	27152	5,2224	5773,5100	19
P48491	P48491	TPIS ARATH Triosephosphate isomerase cytosolic OS Arabidopsis thaliana GN CTIMC PE 1 SV 2	27152	5,2224	2904,9270	13
P51407	P51407	RLA21 ARATH 60S acidic ribosomal protein P2 1 OS Arabidopsis thaliana GN RPP2A PE 2 SV 2	11444	4,3427	2993,1850	6
P51407	P51407	RLA21 ARATH 60S acidic ribosomal protein P2 1 OS Arabidopsis thaliana GN RPP2A PE 2 SV 2	11444	4,3427	4962,9030	9
P51407	P51407	RLA21 ARATH 60S acidic ribosomal protein P2 1 OS Arabidopsis thaliana GN RPP2A PE 2 SV 2	11444	4,3427	2243,0700	6
P51407	P51407	RLA21 ARATH 60S acidic ribosomal protein P2 1 OS Arabidopsis thaliana GN RPP2A PE 2 SV 2	11444	4,3427	3688,6320	7
P51407	P51407	RLA21 ARATH 60S acidic ribosomal protein P2 1 OS Arabidopsis thaliana GN RPP2A PE 2 SV 2	11444	4,3427	3389,0230	6
P51407	P51407	RLA21 ARATH 60S acidic ribosomal protein P2 1 OS Arabidopsis thaliana GN RPP2A PE 2 SV 2	11444	4,3427	2887,9470	7
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	1670,5170	15
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	1818,0990	12
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	964,6306	10
P53492	P53492	ACT7 ARATH Actin 7 OS Arabidopsis thaliana GN ACT7 PE 1 SV 1	41708	5,1583	891,2047	11

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

P59226	P59226	H32 ARATH Histone H3 2 OS Arabidopsis thaliana GN HTR2 PE 1 SV 2	15258	11,7072	1112,0190	1
P59226	P59226	H32 ARATH Histone H3 2 OS Arabidopsis thaliana GN HTR2 PE 1 SV 2	15258	11,7072	416,5550	3
P59226	P59226	H32 ARATH Histone H3 2 OS Arabidopsis thaliana GN HTR2 PE 1 SV 2	15258	11,7072	1661,0700	3
P94014	P94014	GL21 ARATH Germin like protein subfamily 2 member 1 OS Arabidopsis thaliana GN GLP4 PE 2 SV 2	22853	8,8458	1301,8670	1
P94014	P94014	GL21 ARATH Germin like protein subfamily 2 member 1 OS Arabidopsis thaliana GN GLP4 PE 2 SV 2	22853	8,8458	1634,6230	2
P94014	P94014	GL21 ARATH Germin like protein subfamily 2 member 1 OS Arabidopsis thaliana GN GLP4 PE 2 SV 2	22853	8,8458	435,5176	2
P94014	P94014	GL21 ARATH Germin like protein subfamily 2 member 1 OS Arabidopsis thaliana GN GLP4 PE 2 SV 2	22853	8,8458	647,3560	1
Q0WP12	Q0WP12	HOL1 ARATH Thiocyanate methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN HOL1 PE 1 SV 1	27390	4,3810	631,9817	6
Q0WP12	Q0WP12	HOL1 ARATH Thiocyanate methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN HOL1 PE 1 SV 1	27390	4,3810	2335,8950	9
Q0WP12	Q0WP12	HOL1 ARATH Thiocyanate methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN HOL1 PE 1 SV 1	27390	4,3810	2797,4080	9
Q0WP12	Q0WP12	HOL1 ARATH Thiocyanate methyltransferase 1 OS Arabidopsis thaliana GN HOL1 PE 1 SV 1	27390	4,3810	2317,8360	6
Q1H583	Q1H583	GDL18 ARATH GDSL esterase lipase At1g54000 OS Arabidopsis thaliana GN At1g54000 PE 2 SV 1	43166	6,7158	1740,1510	7
Q1H583	Q1H583	GDL18 ARATH GDSL esterase lipase At1g54000 OS Arabidopsis thaliana GN At1g54000 PE 2 SV 1	43166	6,7158	1732,2050	9
Q1H583	Q1H583	GDL18 ARATH GDSL esterase lipase At1g54000 OS Arabidopsis thaliana GN At1g54000 PE 2 SV 1	43166	6,7158	2239,0370	9
Q1H583	Q1H583	GDL18 ARATH GDSL esterase lipase At1g54000 OS Arabidopsis thaliana GN At1g54000 PE 2 SV 1	43166	6,7158	2262,9470	9
Q1H583	Q1H583	GDL18 ARATH GDSL esterase lipase At1g54000 OS Arabidopsis thaliana GN At1g54000 PE 2 SV 1	43166	6,7158	1961,8130	10
Q1JPL7	Q1JPL7	PME18 ARATH Pectinesterase pectinesterase inhibitor 18 OS Arabidopsis thaliana GN PME18 PE 1 SV 3	61648	8,9724	401,7847	2
Q1JPL7	Q1JPL7	PME18 ARATH Pectinesterase pectinesterase inhibitor 18 OS Arabidopsis thaliana GN PME18 PE 1 SV 3	61648	8,9724	312,9544	6

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q1JPL7	Q1JPL7	PME18 ARATH Pectinesterase pectinesterase inhibitor 18 OS Arabidopsis thaliana GN PME18 PE 1 SV 3	61648	8,9724	402,9427	6
Q1JPL7	Q1JPL7	PME18 ARATH Pectinesterase pectinesterase inhibitor 18 OS Arabidopsis thaliana GN PME18 PE 1 SV 3	61648	8,9724	519,7398	4
Q39161	Q39161	NIR ARATH Ferredoxin nitrite reductase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN NIR1 PE 1 SV 1	65463	5,8784	230,4573	6
Q39161	Q39161	NIR ARATH Ferredoxin nitrite reductase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN NIR1 PE 1 SV 1	65463	5,8784	382,0851	9
Q39161	Q39161	NIR ARATH Ferredoxin nitrite reductase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN NIR1 PE 1 SV 1	65463	5,8784	392,6242	5
Q39161	Q39161	NIR ARATH Ferredoxin nitrite reductase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN NIR1 PE 1 SV 1	65463	5,8784	528,3947	5
Q39258	Q39258	VATE1 ARATH V type proton ATPase subunit E1 OS Arabidopsis thaliana GN VHA E1 PE 1 SV 2	26043	5,9945	222,8102	9
Q39258	Q39258	VATE1 ARATH V type proton ATPase subunit E1 OS Arabidopsis thaliana GN VHA E1 PE 1 SV 2	26043	5,9945	505,8206	10
Q39258	Q39258	VATE1 ARATH V type proton ATPase subunit E1 OS Arabidopsis thaliana GN VHA E1 PE 1 SV 2	26043	5,9945	892,2733	19
Q39258	Q39258	VATE1 ARATH V type proton ATPase subunit E1 OS Arabidopsis thaliana GN VHA E1 PE 1 SV 2	26043	5,9945	667,3644	10
Q39258	Q39258	VATE1 ARATH V type proton ATPase subunit E1 OS Arabidopsis thaliana GN VHA E1 PE 1 SV 2	26043	5,9945	1061,9000	21
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	3606,1920	2
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	4666,8110	2
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	1551,8980	3
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	2792,8510	2
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	1800,5600	3
Q42449	Q42449	PROF1 ARATH Profilin 1 OS Arabidopsis thaliana GN PRO1 PE 1 SV 1	14257	4,5044	1718,2080	3
Q56XI5	Q56XI5	Q56XI5 ARATH Cysteine proteinase RD21A OS Arabidopsis thaliana GN At1g47128 PE 2 SV 1	47803	4,7891	924,2776	8



Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q56XI5	Q56XI5	Q56XI5 ARATH Cysteine proteinase RD21A OS Arabidopsis thaliana GN At1g47128 PE 2 SV 1	47803	4,7891	334,1629	4
Q56XI5	Q56XI5	Q56XI5 ARATH Cysteine proteinase RD21A OS Arabidopsis thaliana GN At1g47128 PE 2 SV 1	47803	4,7891	1591,4130	9
Q56XI5	Q56XI5	Q56XI5 ARATH Cysteine proteinase RD21A OS Arabidopsis thaliana GN At1g47128 PE 2 SV 1	47803	4,7891	1373,4770	8
Q8RYC2	Q8RYC2	ACT5 ARATH Putative actin 5 OS Arabidopsis thaliana GN ACT5 PE 5 SV 1	42090	5,0193	549,7455	7
Q8RYC2	Q8RYC2	ACT5 ARATH Putative actin 5 OS Arabidopsis thaliana GN ACT5 PE 5 SV 1	42090	5,0193	1008,6970	4
Q8RYC2	Q8RYC2	ACT5 ARATH Putative actin 5 OS Arabidopsis thaliana GN ACT5 PE 5 SV 1	42090	5,0193	194,1662	3
Q8RYC2	Q8RYC2	ACT5 ARATH Putative actin 5 OS Arabidopsis thaliana GN ACT5 PE 5 SV 1	42090	5,0193	86,8157	2
Q96300	Q96300	14337 ARATH 14 3 3 like protein GF14 nu OS Arabidopsis thaliana GN GRF7 PE 1 SV 1	29805	4,5460	1074,2880	7
Q96300	Q96300	14337 ARATH 14 3 3 like protein GF14 nu OS Arabidopsis thaliana GN GRF7 PE 1 SV 1	29805	4,5460	856,6605	11
Q96300	Q96300	14337 ARATH 14 3 3 like protein GF14 nu OS Arabidopsis thaliana GN GRF7 PE 1 SV 1	29805	4,5460	1054,9040	14
Q96300	Q96300	14337 ARATH 14 3 3 like protein GF14 nu OS Arabidopsis thaliana GN GRF7 PE 1 SV 1	29805	4,5460	1161,0260	9
Q9C525	Q9C525	BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	1028,5630	19
Q9C525	Q9C525	BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	897,2000	19
Q9C525	Q9C525	BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	827,1835	23
Q9C525	Q9C525	BGL21 ARATH Beta glucosidase 21 OS Arabidopsis thaliana GN BGLU21 PE 2 SV 1	59625	6,5768	520,7436	13
Q9LNE3	Q9LNE3	SCRK2 ARATH Probable fructokinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN At1g06030 PE 2 SV 1	35870	4,7168	390,6048	13
Q9LNE3	Q9LNE3	SCRK2 ARATH Probable fructokinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN At1g06030 PE 2 SV 1	35870	4,7168	384,8897	7
Q9LNE3	Q9LNE3	SCRK2 ARATH Probable fructokinase 2 OS Arabidopsis thaliana GN At1g06030 PE 2 SV 1	35870	4,7168	285,4737	5

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9S9N1	Q9S9N1	HSP7E ARATH Heat shock 70 kDa protein 5 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 5 PE 2 SV 1	70870	5,1178	2535,7130	11
Q9S9N1	Q9S9N1	HSP7E ARATH Heat shock 70 kDa protein 5 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 5 PE 2 SV 1	70870	5,1178	1821,6010	11
Q9S9N1	Q9S9N1	HSP7E ARATH Heat shock 70 kDa protein 5 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 5 PE 2 SV 1	70870	5,1178	1473,3390	6
Q9S9N1	Q9S9N1	HSP7E ARATH Heat shock 70 kDa protein 5 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 5 PE 2 SV 1	70870	5,1178	1285,7940	12
Q9S9N1	Q9S9N1	HSP7E ARATH Heat shock 70 kDa protein 5 OS Arabidopsis thaliana GN HSP70 5 PE 2 SV 1	70870	5,1178	1297,1260	12
Q9SIJ8	Q9SIJ8	Q9SIJ8 ARATH Adenine nucleotide alpha hydrolases like protein OS Arabidopsis thaliana GN RD2 PE 2 SV	20574	5,2978	1335,7830	3
Q9SIJ8	Q9SIJ8	Q9SIJ8 ARATH Adenine nucleotide alpha hydrolases like protein OS Arabidopsis thaliana GN RD2 PE 2 SV	20574	5,2978	1591,1110	3
Q9SIJ8	Q9SIJ8	Q9SIJ8 ARATH Adenine nucleotide alpha hydrolases like protein OS Arabidopsis thaliana GN RD2 PE 2 SV	20574	5,2978	2272,4060	1
Q9SIJ8	Q9SIJ8	Q9SIJ8 ARATH Adenine nucleotide alpha hydrolases like protein OS Arabidopsis thaliana GN RD2 PE 2 SV	20574	5,2978	611,3289	1
Q9SIJ8	Q9SIJ8	Q9SIJ8 ARATH Adenine nucleotide alpha hydrolases like protein OS Arabidopsis thaliana GN RD2 PE 2 SV	20574	5,2978	693,0344	2
Q9SJ36	Q9SJ36	RS172 ARATH 40S ribosomal protein S17 2 OS Arabidopsis thaliana GN RPS17B PE 2 SV 3	15941	10,4681	991,4548	2
Q9SJ36	Q9SJ36	RS172 ARATH 40S ribosomal protein S17 2 OS Arabidopsis thaliana GN RPS17B PE 2 SV 3	15941	10,4681	348,2204	1
Q9SJ36	Q9SJ36	RS172 ARATH 40S ribosomal protein S17 2 OS Arabidopsis thaliana GN RPS17B PE 2 SV 3	15941	10,4681	873,4359	2
Q9SJ36	Q9SJ36	RS172 ARATH 40S ribosomal protein S17 2 OS Arabidopsis thaliana GN RPS17B PE 2 SV 3	15941	10,4681	797,1688	4
Q9SJ36	Q9SJ36	RS172 ARATH 40S ribosomal protein S17 2 OS Arabidopsis thaliana GN RPS17B PE 2 SV 3	15941	10,4681	486,8546	2
Q9SMX3	Q9SMX3	VDAC3 ARATH Mitochondrial outer membrane protein porin 3 OS Arabidopsis thaliana GN VDAC3 PE 1 SV 3	29193	8,7700	967,3066	5
Q9SMX3	Q9SMX3	VDAC3 ARATH Mitochondrial outer membrane protein porin 3 OS Arabidopsis thaliana GN VDAC3 PE 1 SV 3	29193	8,7700	1268,0820	2

Tab. 3Pa: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9SMX3	Q9SMX3	VDAC3 ARATH Mitochondrial outer membrane protein porin 3 OS Arabidopsis thaliana GN VDAC3 PE 1 SV 3	29193	8,7700	972,1107	5
Q9SMX3	Q9SMX3	VDAC3 ARATH Mitochondrial outer membrane protein porin 3 OS Arabidopsis thaliana GN VDAC3 PE 1 SV 3	29193	8,7700	624,3065	5
Q9SZX3	Q9SZX3	ASSY ARATH Argininosuccinate synthase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN At4g24830 PE 2 SV 3	53811	6,2357	155,1096	8
Q9SZX3	Q9SZX3	ASSY ARATH Argininosuccinate synthase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN At4g24830 PE 2 SV 3	53811	6,2357	195,5126	7
Q9SZX3	Q9SZX3	ASSY ARATH Argininosuccinate synthase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN At4g24830 PE 2 SV 3	53811	6,2357	219,1756	6
Q9SZX3	Q9SZX3	ASSY ARATH Argininosuccinate synthase chloroplastic OS Arabidopsis thaliana GN At4g24830 PE 2 SV 3	53811	6,2357	169,2235	5
Q9T082	Q9T082	Q9T082 ARATH Putative uncharacterized protein AT4g27580 OS Arabidopsis thaliana GN AT4g27580 PE 2 SV	55888	4,9860	81,2311	6
Q9XFT0	Q9XFT0	Q9XFT0 ARATH Cytosolic phosphoglucomutase Fragment OS Arabidopsis thaliana GN PGMc PE 2 SV 2	55723	5,5248	342,6883	6
Q9XFT0	Q9XFT0	Q9XFT0 ARATH Cytosolic phosphoglucomutase Fragment OS Arabidopsis thaliana GN PGMc PE 2 SV 2	55723	5,5248	158,6592	4
Q9ZU25	Q9ZU25	MPPA1 ARATH Probable mitochondrial processing peptidase subunit alpha 1 OS Arabidopsis thaliana GN A	54367	5,8951	597,0562	10
Q9ZU25	Q9ZU25	MPPA1 ARATH Probable mitochondrial processing peptidase subunit alpha 1 OS Arabidopsis thaliana GN A	54367	5,8951	859,5228	7
Q9ZU25	Q9ZU25	MPPA1 ARATH Probable mitochondrial processing peptidase subunit alpha 1 OS Arabidopsis thaliana GN A	54367	5,8951	1838,6080	9
Q9ZU25	Q9ZU25	MPPA1 ARATH Probable mitochondrial processing peptidase subunit alpha 1 OS Arabidopsis thaliana GN A	54367	5,8951	927,3823	9

Tab. 3Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenek *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Teoretické peptidy	Pokrytí (%)	Prekurzor RMS Mass chyba (ppm)	Produkty	Naštěpené peptidy	Modifikované peptidy	Produkty RMS Mass chyba (ppm)
A8MSA4	35	15,8501	10,5897	21	4	0	19,4313
A8MSA4	35	10,0865	2,6278	13	2	0	16,3339
A8MSA4	35	17,8674	4,5973	15	4	1	18,1511
A8MSA4	35	19,5965	6,8357	24	4	1	13,5445
C0Z387	10	44,4444	9,5741	23	4	0	22,1168
C0Z387	10	44,4444	11,2256	15	3	0	25,4228
C0Z387	10	41,4141	7,1701	20	4	0	18,2093
C0Z387	10	41,4141	6,4347	38	4	0	16,1907
F4I1C1	26	25,4980	6,0478	30	5	0	17,6994
F4I1C1	26	13,5458	7,4344	36	2	0	14,7345
F4I1C1	26	25,4980	7,1825	36	5	0	18,6193
F4I1C1	26	16,7331	6,3600	36	3	0	12,8161
F4I1C1	26	23,5060	11,4029	24	4	0	22,9825
F4K007	58	24,4698	5,9254	118	11	0	14,0964
F4K007	58	25,2855	6,8691	145	12	0	18,5792
F4K007	58	24,7961	6,9562	126	13	0	15,3278
F4K007	58	17,7814	5,6076	113	11	0	15,4537
O04314	19	39,9329	7,6554	95	5	0	10,8499
O04314	19	45,9732	5,5258	54	6	0	11,6542
O04314	19	49,3289	9,9166	87	7	0	14,8886
O04314	19	49,3289	7,6098	68	7	0	14,0378
O04499	43	32,1364	5,9145	59	8	0	19,4974
O04499	43	27,2890	6,2014	44	7	1	22,0891
O04499	43	42,1903	8,2366	55	10	0	22,7313
O04499	43	39,3178	6,6453	74	10	0	15,5752
O04499	43	40,7540	6,9587	51	9	0	17,0422
O04499	43	36,8043	6,0108	69	10	0	18,4482
O50008	54	41,4379	6,4755	238	22	2	14,1883
O50008	54	39,3464	6,8909	236	20	1	14,4397
O50008	54	39,0850	7,6909	198	20	2	15,2942
O50008	54	33,9869	4,5614	166	16	1	14,7194
O50008	54	46,5359	6,4149	202	24	0	16,0884
O50008	54	36,9935	4,9697	160	20	0	18,3595
O81796	24	13,8587	5,0802	25	3	0	18,9991
O81796	24	19,8370	11,7597	17	4	1	21,4264
O81796	24	13,3152	5,2713	14	3	0	18,7025
P23686	34	20,8651	6,3860	47	5	0	13,8747
P23686	34	20,8651	8,4647	66	5	0	13,1363
P23686	34	35,1145	8,5076	86	8	0	18,4026
P23686	34	23,6641	7,1643	86	6	0	15,1386
P23686	34	26,7176	7,7621	101	6	0	15,4542
P42763	19	26,4865	7,1294	58	4	0	9,6056
P42763	19	31,8919	4,7307	66	4	0	9,1551
P42763	19	31,8919	8,0891	50	4	0	14,1608
P42763	19	31,8919	6,2686	77	4	0	11,5924

Tab. 3Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí v kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

P42763	19	31,8919	7,4350	55	4	0	11,6796
P42763	19	32,9730	6,3090	75	4	1	12,8612
P48491	20	40,9449	6,1592	63	7	0	17,3713
P48491	20	48,8189	5,7413	73	8	0	14,2286
P48491	20	45,2756	6,8839	68	7	0	15,1847
P48491	20	42,5197	5,1419	90	7	0	13,5873
P48491	20	66,5354	7,1160	123	9	0	12,9538
P48491	20	61,4173	5,0830	98	9	0	15,6101
P51407	15	65,2174	6,2327	27	4	0	12,0067
P51407	15	77,3913	5,1070	44	5	0	12,8342
P51407	15	46,9565	4,6396	26	4	0	15,6227
P51407	15	48,6957	4,0895	36	4	0	16,9118
P51407	15	64,3478	5,1058	27	3	0	12,7730
P51407	15	78,2609	4,3807	33	5	0	20,5878
P53492	35	41,9098	6,2988	73	9	2	16,7979
P53492	35	35,8090	7,8894	72	10	0	16,6133
P53492	35	31,8302	7,9635	57	7	1	14,1002
P53492	35	34,2175	5,6277	49	9	1	17,2214
P59226	12	23,5294	2,7026	13	1	0	18,1026
P59226	12	28,6765	5,8366	7	2	0	13,6774
P59226	12	28,6765	6,2354	19	2	0	11,8295
P94014	12	23,2877	5,9222	11	1	0	12,4999
P94014	12	30,5936	4,7792	19	2	0	12,4789
P94014	12	26,9406	9,0749	13	2	0	17,2611
P94014	12	23,2877	9,1071	7	1	0	14,9456
Q0WP12	20	25,6098	5,8343	25	3	0	15,6033
Q0WP12	20	42,6829	5,7335	31	6	0	18,9986
Q0WP12	20	39,4309	6,3677	41	5	0	20,2127
Q0WP12	20	33,7398	6,3716	31	4	0	16,1145
Q1H583	24	22,2506	5,8789	42	5	0	14,9447
Q1H583	24	24,8082	5,5187	57	7	1	14,1664
Q1H583	24	26,5985	9,1994	55	7	0	13,7694
Q1H583	24	26,5985	4,8343	53	7	0	15,0128
Q1H583	24	30,6905	6,7497	54	8	0	15,3252
Q1JPL7	43	2,8725	8,7656	10	1	0	10,5405
Q1JPL7	43	12,0287	10,0859	34	5	0	20,1357
Q1JPL7	43	12,2083	8,2383	35	5	1	18,3930
Q1JPL7	43	13,4650	8,2169	25	4	0	18,8050
Q39161	56	15,1877	5,3187	27	4	0	19,0931
Q39161	56	15,5290	6,5461	41	7	0	20,2985
Q39161	56	15,8703	7,6097	26	4	0	17,7367
Q39161	56	12,2867	7,5181	21	4	0	22,0171
Q39258	29	33,4783	7,6043	27	6	0	19,8389
Q39258	29	31,7391	6,6116	26	5	0	19,0320
Q39258	29	39,1304	6,0503	57	10	0	14,9599
Q39258	29	26,5217	7,8294	35	5	0	22,6931
Q39258	29	39,5652	7,1142	54	8	0	12,8000
Q42449	11	22,1374	4,1075	19	2	0	11,6715
Q42449	11	22,1374	5,6038	20	2	0	16,9865
Q42449	11	40,4580	8,6327	15	3	0	22,2031

Tab. 3Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenek *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q42449	11	33,5878	4,3817	18	2	0	16,3141
Q42449	11	41,2214	5,2544	27	3	0	16,6006
Q42449	11	41,2214	12,2450	19	3	0	16,3323
Q56XI5	27	10,6236	9,5003	38	3	0	14,5889
Q56XI5	27	8,3141	6,4307	17	2	0	8,9831
Q56XI5	27	11,3164	7,0992	53	4	0	12,3652
Q56XI5	27	11,3164	6,8379	50	4	0	14,0502
Q8RYC2	35	33,3333	5,5815	37	7	3	22,6024
Q8RYC2	35	19,8413	9,1196	24	4	0	19,7870
Q8RYC2	35	16,9312	4,0651	14	3	0	20,9376
Q8RYC2	35	11,6402	3,3125	11	2	0	26,0627
Q96300	27	21,8868	7,3877	25	4	0	8,7296
Q96300	27	35,4717	6,3072	42	7	0	18,4265
Q96300	27	26,7925	6,3746	41	6	0	15,3379
Q96300	27	24,9057	6,0685	37	5	0	14,5150
Q9C525	43	25,7634	6,2993	88	10	1	16,0543
Q9C525	43	20,6107	8,5939	79	9	0	16,9216
Q9C525	43	30,5344	8,2641	76	11	1	19,1660
Q9C525	43	12,7863	7,9270	42	6	1	14,5976
Q9LNE3	26	28,8754	8,2392	46	9	1	22,0268
Q9LNE3	26	19,4529	6,9648	23	6	0	20,1204
Q9LNE3	26	21,2766	7,1097	20	5	0	19,1879
Q9S9N1	50	9,1331	5,4876	84	5	0	13,6033
Q9S9N1	50	11,3003	6,6042	73	6	0	16,3503
Q9S9N1	50	6,6563	6,3151	59	3	0	13,9695
Q9S9N1	50	11,1455	6,3569	87	5	0	13,3019
Q9S9N1	50	15,9443	7,2395	83	7	0	18,0242
Q9SIJ8	19	21,9251	5,0369	18	3	0	18,3956
Q9SIJ8	19	17,6471	12,3882	20	3	0	15,7234
Q9SIJ8	19	9,6257	1,6289	9	1	0	13,9081
Q9SIJ8	19	9,6257	6,5822	11	1	0	18,2125
Q9SIJ8	19	16,5775	13,2263	14	2	0	18,2458
Q9SJ36	10	8,5714	3,7166	14	1	0	16,4334
Q9SJ36	10	8,5714	6,2276	7	1	0	13,2041
Q9SJ36	10	8,5714	4,4713	11	1	0	6,1273
Q9SJ36	10	15,7143	3,1519	18	2	0	18,6732
Q9SJ36	10	8,5714	1,2364	12	1	0	11,9569
Q9SMX3	20	29,9270	3,9640	35	5	0	16,0131
Q9SMX3	20	14,5985	3,6073	14	2	0	14,2624
Q9SMX3	20	32,4818	3,7908	30	5	0	13,6711
Q9SMX3	20	27,7372	7,9177	26	4	0	13,8301
Q9SZX3	53	21,4575	7,8808	30	6	0	23,1691
Q9SZX3	53	13,9676	6,2780	25	6	0	18,7587
Q9SZX3	53	16,8016	8,1766	31	5	0	21,2614
Q9SZX3	53	14,7773	4,0576	25	5	0	23,9746
Q9T082	50	16,6990	9,3609	21	5	0	21,4396
Q9XFT0	46	20,2729	8,5929	25	4	1	21,0700
Q9XFT0	46	13,2554	9,2655	20	4	0	20,5538
Q9ZU25	38	32,8032	5,6270	46	8	1	16,3142

Tab. 3Pb: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9ZU25	38	27,2366	7,7930	35	6	0	18,2651
Q9ZU25	38	30,4175	3,9134	65	7	1	15,1776
Q9ZU25	38	23,2604	5,4868	41	6	0	17,8231

Tab. 3Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF

Databázové číslo	Produkty RMS RT chyba (min)	Množství (fmol)	Množství (ngram)	Protein ID	Vzorek	Průměr množství (ngram) kontrola	Průměr množství (ngram) latB	Hodnota P
A8MSA4	0,0174	317,8569	12,0132	53664	LC1	11,3172	7,4825	0,0597
A8MSA4	0,0230	281,0256	10,6212	53664	LC2			
A8MSA4	0,0224	179,6557	6,7900	53664	LT2			
A8MSA4	0,0241	216,2991	8,1749	53664	LT3			
C0Z387	0,0226	947,5886	10,2822	32070	LC1			
C0Z387	0,0188	815,5939	8,8499	32070	LC3			
C0Z387	0,0209	426,4309	4,6272	32070	LT1			
C0Z387	0,0210	212,4133	2,3049	32070	LT3	9,5661	3,4661	0,0466
F4I1C1	0,0192	324,9044	9,2820	32835	LC2			
F4I1C1	0,0149	411,5769	11,7581	32835	LC3			
F4I1C1	0,0167	188,4437	5,3835	32835	LT1	10,5201	5,0273	0,0464
F4I1C1	0,0126	234,4144	6,6968	32835	LT2			
F4I1C1	0,0157	105,0624	3,0015	32835	LT3			
F4K007	0,0200	800,5561	53,9579	51671	LC1			
F4K007	0,0219	826,5731	55,7114	51671	LC3			
F4K007	0,0164	453,6246	30,5745	51671	LT1	54,8347	26,5260	0,0207
F4K007	0,0151	333,4915	22,4775	51671	LT3			
O04314	0,0181	2727,2330	87,7027	12558	LC1			
O04314	0,0225	2459,8690	79,1047	12558	LC3			
O04314	0,0198	2145,4620	51,9940	12558	LT2	83,4037	46,3984	0,0345
O04314	0,0219	1268,8150	40,8027	12558	LT3			
O04499	0,0257	571,7300	34,6352	7582	LC1			
O04499	0,0153	442,1244	26,7838	7582	LC2			
O04499	0,0220	617,0952	37,3834	7582	LC3			
O04499	0,0214	373,2406	22,6108	7582	LT1	32,9341	21,5466	0,0395
O04499	0,0167	403,5374	24,4462	7582	LT2			
O04499	0,0243	290,2421	17,5828	7582	LT3			
O50008	0,0217	2296,4270	193,7193	6229	LC1			
O50008	0,0226	1839,1400	155,1440	6229	LC2	176,8382	106,4594	0,0555
O50008	0,0204	2153,3670	181,6512	6229	LC3			
O50008	0,0175	1266,8730	106,8694	6229	LT1			
O50008	0,0202	1746,4520	147,3252	6229	LT2			
O50008	0,0177	772,7133	65,1836	6229	LT3			
O81796	0,0185	29,9663	1,1974	5423	LC1			
O81796	0,0198	53,0098	2,1181	5423	LC2	1,2717	0,0000	
O81796	0,0257	12,4997	0,4995	5423	LC3			
P23686	0,0161	31,0844	1,3415	6230	LC1			

Tab. 3Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

P23686	0,0219	29,6040	1,2777	6230	LC3			
P23686	0,0157	143,5021	6,1933	6230	LT1	1,3096	6,7684	0,0596
P23686	0,0207	107,3067	4,6312	6230	LT2			
P23686	0,0167	219,6719	9,4806	6230	LT3			
P42763	0,0146	751,5857	15,6228	3389	LC1			
P42763	0,0118	889,2526	18,4844	3389	LC2			
P42763	0,0160	981,4583	20,4010	3389	LC3			
P42763	0,0146	727,3557	15,1191	3389	LT1			
P42763	0,0171	658,3298	13,6843	3389	LT2			
P42763	0,0170	465,3810	9,6736	3389	LT3	19,4427	12,8257	0,0587
P48491	0,0240	1051,4750	28,5677	10396	LC1			
P48491	0,0230	1111,8750	30,2087	10396	LC2			
P48491	0,0172	1240,2510	33,6965	10396	LC3			
P48491	0,0223	737,2602	20,0307	10396	LT1			
P48491	0,0184	896,1967	24,3489	10396	LT2	30,8243	19,6666	0,0251
P48491	0,0204	538,1157	14,6201	10396	LT3			
P51407	0,0209	737,6061	8,4469	9144	LC1			
P51407	0,0209	685,1716	7,8465	9144	LC2	8,3547	4,6723	0,0018
P51407	0,0256	765,8740	8,7707	9144	LC3			
P51407	0,0174	405,0512	4,6386	9144	LT1			
P51407	0,0195	649,0425	7,4327	9144	LT2			
P51407	0,0172	410,9368	4,7060	9144	LT3			
P53492	0,0151	1149,0740	47,9577	317	LC1	45,2742	30,2912	0,2426
P53492	0,0189	1020,4800	42,5907	317	LC3			
P53492	0,0220	934,9634	39,0216	317	LT2			
P53492	0,0217	516,5975	21,5607	317	LT3			
P59226	0,0154	162,3957	2,4794	5126	LC1			
P59226	0,0245	237,4086	3,6247	5126	LC2			
P59226	0,0163	212,8623	3,2500	5126	LC3	3,1180	0,0000	
P94014	0,0176	346,6635	5,9276	4765	LC3			
P94014	0,0224	189,3671	4,3305	4765	LT1	5,1291	1,9943	0,0626
P94014	0,0148	95,9624	2,1945	4765	LT2			
P94014	0,0102	78,4541	1,7941	4765	LT3			
Q0WP12	0,0149	558,2121	15,2996	5292	LC1			
Q0WP12	0,0194	531,8392	14,5768	5292	LC3	14,9382	10,6798	0,0523
Q0WP12	0,0192	355,0789	9,7321	5292	LT1			
Q0WP12	0,0188	424,2325	11,6275	5292	LT2			
Q1H583	0,0181	692,3199	29,9042	4596	LC1			
Q1H583	0,0167	846,6204	36,5690	4596	LC2			
Q1H583	0,0165	882,8499	38,1339	4596	LC3			
Q1H583	0,0189	510,3004	22,0420	4596	LT1			
Q1H583	0,0150	465,9773	20,1275	4596	LT3	34,8690	21,0848	0,0257
Q1JPL7	0,0117	300,8616	18,5594	7523	LC2			
Q1JPL7	0,0195	325,3434	20,0696	7523	LC3	19,3145	10,6227	0,0318
Q1JPL7	0,0197	204,4944	12,6148	7523	LT1			
Q1JPL7	0,0192	195,1782	12,0401	7523	LT2			
Q39161	0,0176	272,7865	17,8689	6679	LC1			
Q39161	0,0203	241,3564	15,8101	6679	LC2	16,8395	9,7771	0,0221
Q39161	0,0194	144,8946	9,4913	6679	LT1			
Q39161	0,0153	153,6206	10,0629	6679	LT2			



Tab. 3Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenek *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q39258	0,0174	452,8721	11,8019	10873	LC2			
Q39258	0,0195	518,6396	13,5158	10873	LC3			
Q39258	0,0196	278,4456	7,2563	10873	LT1			
Q39258	0,0148	381,3112	7,9370	10873	LT2			
Q39258	0,0173	305,4427	7,9599	10873	LT3	12,6589	7,6081	0,0320
Q42449	0,0208	573,4636	8,1812	8224	LC1			
Q42449	0,0224	546,9586	7,8031	8224	LC2			
Q42449	0,0205	478,8355	6,8312	8224	LC3	7,6052	4,8613	0,0138
Q42449	0,0174	365,8515	5,2193	8224	LT1			
Q42449	0,0224	386,9969	5,5210	8224	LT2			
Q42449	0,0184	269,4112	3,8435	8224	LT3			
Q56XI5	0,0172	1346,5660	64,4129	53392	LC1			
Q56XI5	0,0163	918,7234	43,9471	53392	LC2			
Q56XI5	0,0204	513,3018	24,5538	53392	LT1	54,1800	26,2303	0,1145
Q56XI5	0,0148	583,3980	27,9068	53392	LT3			
Q8RYC2	0,0152	105,3674	4,4378	316	LC1	5,2830	1,9768	0,0645
Q8RYC2	0,0214	145,5037	6,1282	316	LC3			
Q8RYC2	0,0158	52,9951	2,2320	316	LT2			
Q8RYC2	0,0287	40,8737	1,7215	316	LT3			
Q96300	0,0168	480,0544	14,3174	9	LC1			
Q96300	0,0195	368,6673	10,9953	9	LC2			
Q96300	0,0171	200,6388	5,9839	9	LT1	12,6564	6,8354	0,0893
Q96300	0,0236	257,7371	7,6869	9	LT2			
Q9C525	0,0154	355,7935	21,2280	1229	LC1			
Q9C525	0,0211	325,4274	19,4162	1229	LC2			
Q9C525	0,0225	77,2738	4,6104	1229	LT2	20,3221	6,1187	0,0150
Q9C525	0,0219	127,8322	7,6270	1229	LT3			
Q9LNE3	0,0204	146,7431	5,2670	9611	LC1	4,2437	0,0000	
Q9LNE3	0,0235	5,2031	0,1868	9611	LC2			
Q9LNE3	0,0169	89,7211	3,2203	9611	LC3			
Q9S9N1	0,0143	102,8534	7,2938	5344	LC1			
Q9S9N1	0,0170	90,5662	6,4225	5344	LC2			
Q9S9N1	0,0129	12,3392	0,8750	5344	LT1			
Q9S9N1	0,0182	14,5139	1,0292	5344	LT2	6,8582	0,7936	0,0006
Q9S9N1	0,0163	6,7223	0,4767	5344	LT3			
Q9SIJ8	0,0154	244,4380	5,0324	18131	LC1	5,1603	3,5359	0,0578
Q9SIJ8	0,0201	256,8604	5,2881	18131	LC2			
Q9SIJ8	0,0054	183,4193	3,7762	18131	LT1			
Q9SIJ8	0,0165	199,1865	4,1008	18131	LT2			
Q9SIJ8	0,0191	132,6407	2,7307	18131	LT3			
Q9SJ36	0,0089	569,6082	9,0862	9350	LC2			
Q9SJ36	0,0178	559,1235	8,9189	9350	LC3			
Q9SJ36	0,0109	335,1829	5,3467	9350	LT1			
Q9SJ36	0,0118	359,3327	5,7319	9350	LT2	9,0026	5,1397	0,0056
Q9SJ36	0,0124	272,1005	4,3404	9350	LT3			
Q9SMX3	0,0259	585,0886	17,0909	10890	LC1	17,1461	12,7923	0,0135
Q9SMX3	0,0296	588,8669	17,2013	10890	LC3			
Q9SMX3	0,0193	420,5086	12,2834	10890	LT1			
Q9SMX3	0,0229	455,3482	13,3011	10890	LT2			
Q9SZX3	0,0209	144,0920	7,7587	904	LC2	9,3104	4,6641	0,0963

Tab. 3Pc: Detaily identifikace a kvantifikace proteinů se změněnou abundancí kořenech *Arabidopsis* po ovlivnění latrunkulinem B získané pomocí metod ESI-LC-MS a MALDI TOF-TOF (pokračování)

Q9SZX3	0,0193	223,8897	0,0000	904	LC3			
Q9SZX3	0,0195	84,2367	4,5358	904	LT1			
Q9SZX3	0,0186	51,8574	4,7923	904	LT3			
Q9T082	0,0262	104,4225	5,8396	27539	LC3			
Q9XFT0	0,0220	72,4731	4,0410	36085	LC1			
Q9XFT0	0,0216	61,1645	3,4104	36085	LC2			
Q9ZU25	0,0194	468,8145	25,5045	6335	LC1	24,6116	18,8710	0,0594
Q9ZU25	0,0231	435,9876	23,7187	6335	LC3			
Q9ZU25	0,0180	325,5141	17,7087	6335	LT1			
Q9ZU25	0,0183	368,2435	20,0332	6335	LT2			