

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL PLANT BIOLOGY

Doktorský studijní program: Anatomie a fyziologie rostlin

Ph.D. study program: Plant anatomy and physiology

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. thesis



Úloha fosforylace proteinů v progamické fázi vývoje samčího gametofytu  
tabáku

The role of protein phosphorylation during progamic phase of tobacco male  
gametophyte development

**Mgr. Jan Fíla**

Školitel / Supervisor: doc. RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha 2016



## Abstrakt v češtině

Zralý pyl tabáku obsahuje silně dehydratovanou cytoplazmu a je metabolicky neaktivní. Po rehydrataci cytoplazmy je jeho metabolismus nastartován a po dokončení aktivace vyrůstá pylovou aperturou pylová láčka. Změny v zavodnění cytoplazmy spolu s nastartováním metabolismu jsou doprovázeny regulací translace i post-translačních modifikací (zejména fosforylace) přítomných proteinů. V této disertační práci jsou prezentovány fosfopeptidy ze zralého pylu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*), pylu aktivovaného *in vitro* 5 min a pylu aktivovaného *in vitro* 30 min. Z každého stádia byl získán celkový proteinový extrakt, jenž byl naštěpen trypsinem a získaná peptidová směs byla obohacena metodou MOAC (afinitní chromatografie s využitím kovového oxidu/hydroxidu) s maticí z oxidu titaničitého. Fosfopeptidy v obohaceném eluátu byly identifikovány kapalinovou chromatografií v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC–MS/MS).

Celkem bylo identifikováno 471 fosfopeptidů, nesoucích 432 přesně lokalizovaných fosforylačních míst. Získané fosfopeptidy pocházely z 301 fosfoproteinů, které spadaly do třinácti funkčních kategorií. Převládajícími funkcemi se staly transkripce, syntéza proteinů, cílení a skladování proteinů a přenos signálu. Mnohé fosfopeptidy podléhaly koncentračním změnám mezi třemi studovanými stádii samčího gametofytu; 209 regulovaných fosforylovaných peptidů vykazovalo sedm regulačních trendů, z nichž většina patřila do skupiny zahrnující fosfopeptidy identifikované exkluzivně ve zralém pylu. Navíc bylo v získaném fosfoproteomickém datovém souboru nalezeno pět kinázových motivů obsahujících fosforylovaný serin a jeden fosfothreoninový motiv. V pylovém proteomu a v sekretomu pylových láček tabáku pak byly vyhledány kinázy, jež mají podle predikce rozpoznávat nalezené sekvenční motivy.

Souhrnně vzato se jedná o první fosfoproteomickou studii aktivovaného pylu krytosemenných rostlin (Angiospermae) a o studii značně rozšiřující identifikovanou část fosfoproteomu zralého pylu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*).

**Klíčová slova:** samčí gametofyt, aktivace pylu, oxid titaničitý, obohacování o fosfopeptidy, fosfoproteomika, kináza, fosforylační motiv

## Abstrakt v angličtině (English abstract)

Tobacco male gametophyte has a strongly dehydrated cytoplasm and represents a metabolically inactive stage. Upon cytoplasm rehydration, pollen grain becomes metabolically active and after the activation is finished, the pollen tube growth through a selected pollen aperture starts. The rehydration together with metabolic activation are accompanied by the regulation of translation and post-translational modifications (mainly phosphorylation) of the existing proteins. In this Ph.D. thesis, there were identified phosphopeptides from tobacco (*Nicotiana tabacum*) mature pollen, pollen activated *in vitro* 5 min and pollen activated *in vitro* 30 min. The total proteins from the above male gametophyte stages were extracted. The protein extract was trypsinized and the acquired peptide mixture was enriched by MOAC (metal oxide/hydroxide affinity chromatography) with titanium dioxide matrix. The enriched fraction was subjected to liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Totally, there were identified 471 phosphopeptides, carrying 432 exactly localized phosphorylation sites. The acquired peptide identifications were mapped to 301 phosphoproteins that were placed into 13 functional categories, dominant of which were transcription, protein synthesis, protein destination and storage, and signal transduction. Notable part of phosphorylated peptides were shown to be regulated during pollen activation; 209 regulated phosphorylated peptides were listed into seven groups based on their regulatory trends, majority of which were identified exclusively in mature pollen. Moreover, there were found five phosphorylation motifs with a central phosphoserine and one phosphothreonine motif, which were predicted to be recognized by several kinase families. The members of these kinase families were then found in tobacco pollen proteome and pollen tube secretome.

Collectively, this Ph.D. thesis represents the first phosphoproteomic study of any angiosperm (Angiospermae) activated pollen, and notably broadens the identified part of tobacco (*Nicotiana tabacum*) male gametophyte phosphoproteome.

**Key words:** male gametophyte, pollen activation, titanium dioxide, phosphopeptide enrichment, phosphoproteomics, kinase, phosphorylation motif

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Česká část autoreferátu .....</b>	<b>6</b>
1.1.	Úvod .....	6
1.2.	Cíle práce.....	7
1.3.	Materiál a metodika.....	8
1.4.	Výsledky a diskuse.....	9
1.5.	Závěry.....	11
<b>2.</b>	<b>Summary of the Ph.D. thesis.....</b>	<b>13</b>
2.1.	Introduction .....	13
2.2.	Aims of the study .....	15
2.3.	Material and methods .....	15
2.4.	Results and discussion.....	16
2.5.	Conclusions .....	18
<b>3.</b>	<b>Použitá literatura / References .....</b>	<b>20</b>
<b>4.</b>	<b>Životopis česky .....</b>	<b>22</b>
<b>5.</b>	<b>Curriculum vitae in English.....</b>	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>Seznam publikací / List of publications .....</b>	<b>29</b>

# 1. Česká část autoreferátu

## 1.1. Úvod

Zralý pyl tabáku představuje klidové stádium obsahující silně dehydratovanou cytoplazmu, jež je obklopena velmi tvrdou buněčnou stěnou. Po dopadu na bliznu (opylení) dochází k rehydrataci pylové cytoplazmy a po aktivaci začíná růst pylové láčky. Tyto změny jsou doprovázeny regulací translace spolu s posttranslačními modifikacemi přítomných proteinů. Ve zralém pylu je značný podíl mRNA uskladněn v translačně neaktivních EDTA/puromycin-rezistentních částicích (EPP; Honys et al., 2000, 2009). K translaci transkriptů uskladněných v těchto komplexech dochází až při růstu pylové láčky.

Druhá možnost regulace je představována fosforylací proteinů, jež je velmi dynamickou posttranslační modifikací mající úlohu v regulaci mnoha buněčných procesů (např. dynamika cytoskeletu, přenos signálu, regulace transkripce i translace a regulace buněčného cyklu). Studium fosforylace proteinů je možno zahájit buď od odhalování role jednotlivých proteinových kináz a fosfatáz, nebo od odhalování lokalizace fosforylačních míst na cílových proteinech. A právě druhá strategie obvykle využívá fosfoproteomických přístupů, při nichž bývá nezbytné aplikovat některý z obohacovacích protokolů, protože (1) jen část proteinů je v buňce fosforylována a bývají to nečíska méně abundantní proteiny; (2) část proteinu může být fosforylována, zatímco zbývající molekuly téhož proteinu mohou zůstat v nativní podobě; (3) přítomnost nefosforylovaných peptidů ve vzorku komplikuje identifikaci fosforylovaných peptidů hmotnostní spektrometrií.

K fosfoproteomickému obohacování se přistupuje buď na úrovni intaktních proteinů, nebo na úrovni peptidů (Fíla a Honys, 2012). Obohacovacími technikami užívanými ve fosfoproteomice jsou například chelatační afinitní chromatografie (IMAC; Posewitz a Tempst, 1999), afinitní chromatografie s využitím kovového oxidu/hydroxidu (MOAC; Pinkse et al., 2004; Wolschin et al., 2005), imunoprecipitace fosfotyrosinu (Pandey et al., 2000) a obohacení chemicky modifikovaných fosfopeptidů (Dunn et al., 2010).

Doposud byly publikovány tři fosfoproteomické studie samčího gametofytu. První publikovanou fosfoproteomickou studií zralého pylu krytosemenných rostlin (Angiospermae) se stal fosfoproteom huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*; Mayank et al., 2012). Mayankova studie využila kombinaci tří protokolů obohacujících o fosfopeptidy – IMAC,

MOAC a SIMAC – a vedla k identifikaci 962 fosfopeptidů, které náležely k 598 fosfoproteinům. Dalším krytosemenným druhem s identifikovanými fosfoproteiny ze zralého pylu se stal tabák virginský (*Nicotiana tabacum*; Fíla et al., 2012). K odhalení fosfoproteomu zralého pylu a pylu aktivovaného *in vitro* 30 min byla nejprve aplikována metoda MOAC obohacující o fosfoproteiny, užívající matici z hydroxidu hlinitého. V obohacené frakci bylo celkem identifikováno 139 fosfoproteinových kandidátů, jenže přesnou pozici se podařilo identifikovat u pouhého jednoho fosforylačního místa. Z tohoto důvodu byl na zralém pylu proveden paralelní experiment, v němž byl celkový proteinový extrakt přímo naštěpen trypsinem a získaná peptidová směs byla obohacena o fosfopeptidy metodou MOAC s maticí tvořenou oxidem titaničitým. Tímto přístupem se podařilo určit pozici dalších 51 fosforylačních míst ve fosfoproteinových kandidátech již identifikovaných ve zralém pylu. Třetím rostlinným druhem, jehož samčí gametofyt byl podroben fosfoproteomickým experimentům, se stal smrk Wilsonův (*Picea wilsonii*; Chen et al., 2012). Na rozdíl od předchozích dvou studií se jednalo o fosfoproteom nahosemenného druhu a fosforylace byla zkoumána v odpovědi na nedostatek klíčových živin v růstovém médiu pylových láček (oproti tomu tabák a huseníček byly zkoumány z pohledu vývoje samčího gametofytu).

U zralého pylu tabáku virginského a pylu aktivovaného *in vitro* tak doposud chyběla fosfoproteomická studie, která by odhalila větší množství přesně lokalizovaných fosforylačních míst. V našem předchozím fosfoproteomickém výzkumu (Fíla et al., 2012), který tvořil podstatnou část mé diplomové práce, byla identifikována přesná pozice fosforylačních míst pouze u několika kandidátů identifikovaných po obohacení o fosfoproteiny z celkového proteinového extraktu zralého pylu. Navíc jsme se v této práci vůbec nezabývali dynamikou fosforylace v průběhu pylové aktivace. Z tohoto důvodu byla mezi stádia samčího gametofytu zkoumaná v této disertační práci přidána také pylová zrna aktivovaná *in vitro* 5 min. Experimenty tvořící tuto disertační práci tak zcela logicky navazují na náš předchozí výzkum a velmi podstatnou měrou jej doplňují a rozšiřují.

## 1.2. Cíle práce

Tato disertační práce sestává z následujících dílčích cílů:

1. Přesná lokalizace fosforylačních míst u fosfoproteinů identifikovaných ze zralého pylu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*), pylu aktivovaného *in vitro* 5 min a pylu aktivovaného *in vitro* 30 min.

2. Zachycení změn ve fosforylaci proteinů v průběhu aktivace pylu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*).
3. Vyhledání hojně zastoupených kinázových motivů v získaném datovém souboru a porovnání nalezených motivů se zastoupenými kinázovými motivy v pylovém fosfoproteomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).
4. Vyhledání kináz rozpoznávajících nalezené sekvenční motivy v pylovém proteomu a fosfoproteomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*).
5. Vyhledání proteinových kináz v publikovaném souboru sekretomických dat tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*), a to v sekretomu pylových láček kultivovaných 24 hodin *semi in vivo* a *in vitro*.

### 1.3. Materiál a metodika

Experimenty v rámci této disertační práce byly prováděny na tabáku virginském (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun), který byl pěstován ve skleníku od dubna do září. Z těchto rostlin byl sbírán zralý pyl – každý den byla otrhávána poupata jeden den před antezí, z nichž byly vyjímány prašníky. Získané prašníky byly ponechány při pokojové teplotě jeden den, během něhož dozrály a praskly. Zralý pyl tak byl z prašníků uvolněn a filtrován přes punčochu (Petrů et al., 1964).

Zralý pyl byl uchováván při  $-20^{\circ}\text{C}$  do doby provedení následných experimentů. Aktivace pylu byla prováděna *in vitro* v minerálním médiu se sacharózou pufovaným pomocí MES (SMM-MES médium; 175 mM sacharóza, 1,6 mM kyselina boritá, 3 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,8 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{KNO}_3$ , 25 mM MES; pH 5,9; Tupý a Říhová, 1984) při  $27^{\circ}\text{C}$ . Pyl byl aktivován 5 min, nebo 30 min, vždy ve třech biologických replikách.

Zralý pyl a obě stádia aktivovaného pylu (aktivovaná 5 min a 30 min) byla podrobena extrakci celkových proteinů trichloroctovou kyselinou (TCA) v acetonu (Méchin et al., 2006). Celkové proteinové extrakty byly resuspendovány v 0,2 M guanidinium chloridu s 50 mM hydrogenuhličitanem amonným a inhibitory fosfatáz a následně byly podrobeny štěpení trypsinem (1 ng trypsinu na 50 ng proteinů) při  $37^{\circ}\text{C}$  12 hodin. Z celkové směsi peptidů byly obohaceny fosfopeptidy metodou MOAC s matricí z oxidu titaničitého (Beck et al., 2011).

Obohacené fosfopeptidy byly rozděleny kapalinovou chromatografií (LC) a poté podrobeny měření hmotnostních spekter tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Získaná spektra byla použita ke hledání homologů v databázi EST sekvencí z tabáku



virginského (*Nicotiana tabacum*; <ftp://occams.dfci.harvard.edu/pub/bio/tgi/data>; verze z 10. 4. 2011, databáze obsahovala 48961 sekvencí) softwarem Proteome Discoverer 1.3 s Mascotem. Pouze fosfopeptidy, u nichž bylo přesně lokalizováno fosforylační místo s pravděpodobností vyšší než 90% (phosphoRS), byly dále analyzovány. Aby šlo spočítat koncentraci proteinů před obohacením, byl celkový extrakt podroben štěpení trypsinem a získaná směs peptidů byla přímo rozdělena kapalinovou chromatografií (LC) a přítomné peptidy identifikovány a kvantifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS).

Jednotlivé fosfoproteiny byly rozřizeny podle funkce (gene ontology) softwarem blast2GO na základě informací získaných podle homologů z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Poté byly kategorie manuálně upraveny podle Bevana a kolektivu (1998). Následně byly v identifikovaných fosfopeptidech vyhledány fosforylační motivy softwarem Motif-X (Schwartz et al., 2009; Chou a Schwartz, 2011). Celkem byla provedena dvě hledání, jednou byly cílem motivy obsahující na prostřední pozici fosforylovaný serin, podruhé motivy s centrálním fosfothreoninem. V obou případech motiv sestával ze třinácti aminokyselin a fosforylovanou aminokyselinu nesl na své centrální pozici. Jako referenční vzorek byl použit soubor proteinových sekvencí tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) z databáze Uniprot. Kinázy rozpoznávající nalezené motivy byly hledány v pylovém proteomu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*; Ischebeck et al., 2014), v pylovém fosfoproteomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*; Mayank et al., 2012) a v pylovém proteomu huseníčku rolního (Grobei et al., 2009). Regulované fosfopeptidy byly manuálně rozděleny do sedmi skupin na základě jejich regulačního trendu. Grafické shrnutí informací o regulovaných fosfopeptidech bylo vytvořeno softwarem VANTED (Rohn et al., 2012).

#### 1.4. Výsledky a diskuse

V rámci této disertační práce bylo identifikováno 471 fosfopeptidů, které odhalily přesnou pozici 432 fosforylačních míst ve třech zkoumaných stádiích samčího gametofytu tabáku virginského (zralý pyl, pyl aktivovaný *in vitro* 5 min a pyl aktivovaný *in vitro* 30 min). Tím se značně rozšířila známá část fosfoproteomu zralého pylu tabáku virginského a počet identifikovaných fosfopeptidů se přiblížil pylovému fosfoproteomu huseníčku rolního, v němž bylo identifikováno 962 fosfopeptidů nesoucích 609 fosforylačních míst (Mayank et al., 2012).

Identifikované fosfoproteiny náležely do třinácti funkčních kategorií, z nichž nejvíce fosfoproteinů spadalo do následujících kategorií: transkripce, proteosyntéza, skladování a cílení

proteinů a přenos signálu. Za zmínku rovněž stojí velké množství proteinů bez známé funkce, zařazených do kategorií „nejasná klasifikace“ nebo „neznámý protein“. U pylového fosfoproteomu huseníčku rolního (Mayank et al., 2012) byly nejčastěji zastoupeny funkční kategorie podobné, konkrétně se jednalo o regulaci metabolismu a funkce proteinů, metabolismus, osud proteinů, proteiny vázající jiné proteiny, přenos signálu a buněčný transport.

Kvantitativní data umožnila identifikaci fosfopeptidů, jejichž koncentrace se měnila v odpovědi na pylovou aktivaci. Regulované fosfopeptidy byly rozděleny do sedmi skupin podle regulačního trendu, přičemž nejvíce fosfopeptidů bylo identifikováno exkluzivně ve zralém pylu. Mnohé z proteinů obsahovaly několik fosforylačních míst na několika různých aminokyselinách, přičemž některé z míst bylo fosforylováno, zatímco jiná místa defosforylována a naopak. Kombinací fosforylovaných aminokyselin tak vznikaly různé fosforylační vzory, které se měnily v reakci na pylovou aktivaci.

Získaná fosfoproteomická data byla dále analyzována, takže byly vyhledány sekvenční motivy, které obklopovaly identifikovaná fosforylační místa. Bylo nalezeno pět motivů s centrálním fosfoserinem a jediný s centrálním fosfothreoninem. Nejhojněji zastoupeným serinovým motivem a jediným threoninovým fosforylačním motivem bylo fosforylační místo (reprezentované fosfoserinem nebo fosfothreoninem) následované prolinem, tedy xxxxxxS\*Pxxxxx (identifikováno u 118 fosfopeptidů) a xxxxxxT\*Pxxxxx (detekováno 31×). Fosforylace cílená na aminokyselinu sousedící s prolinem je typická pro mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK) a cyklin-dependentní proteinové kinázy (CDK; Lee et al., 2011). MAPK hrají roli v mnohých fyziologických procesech, mimo jiné při pylové rehydrataci (Wilson et al., 1997), zatímco CDK regulují buněčné dělení, takže jejich role v samčím gametofytu by mohla být důležitá při pylových mitózách I a II (Hafidh et al., 2012).

Kromě výše zmiňovaných fosforylačních motivů byly nalezeny další čtyři fosfoserinové motivy, dva v kontextu kyselých aminokyselin a naopak dva zásadité. Zásaditými motivy byly xxRxxS\*xxxxxx (nalezen u 37 fosfopeptidů) a xxKxxS\*xxxxxx (identifikován 30×). Oba zásadité motivy jsou rozpoznávány Ca<sup>2+</sup>/kaldmodulin-dependentními proteinovými kinázami (CAMK2) a Ca<sup>2+</sup>-dependentními proteinovými kinázami–příbuznými kinázám nefermentujícím sacharózu (CDPK–SnRK; Lee et al., 2011). Naopak kyselými kinázovými motivy s centrálním fosfoserinem byly xxxxxxS\*DxExxx (nalezen 23×) a xxxxxxS\*xDDxxx (objeven v patnácti fosfopeptidech), které v podstatě odpovídají sekvenci xxxxxxS\*(D/E)(D/E)

(D/E)xxx, jež je rozpoznávána kaseinovou kinázou 2 (CK2; Lee et al., 2011). Členové všech těchto kinázových rodin byli nalezeni v pylovém proteomu tabáku virginského. Je vhodné podotknout, že získané sekvenční motivy spolu s kinázami, jež je rozpoznávají, byly získány na základě predikcí a *in silico* analýz. Pro spárování kinázy s příslušnými cílovými motivy (a konkrétními proteiny) bude zapotřebí provést množství následných experimentů.

V pylovém fosfoproteomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byly nalezeny pouhé dva sekvenční motivy, a to oba s centrálním fosfoserinem: xxxxxxS\*Pxxxxx a xxxRxxS\*xxxxxx (Mayank et al., 2012). K oběma sekvenčním motivům byly nalezeny kinázy v pylovém proteomu huseníčku rolního (Grobei et al., 2009): MAP kinázy, cyklin-dependentní proteinové kinázy (xxxxxxS\*Pxxxxx) a Ca<sup>2+</sup>-dependentní proteinové kinázy (xxxRxxS\*xxxxxx). Kromě toho byla v transkriptomu (Honys a Twell, 2004), proteomu (Grobei et al., 2009) a fosfoproteomu (Mayank et al., 2012) huseníčku rolního objevena celá řada dalších proteinových kináz, jež byly prezentovány v tabulce, která je součástí recentního přehledového článku (Hafidh et al., 2016a).

Kromě toho byly vyhledávány proteinové kinázy mezi sekretovanými proteiny z pylových láček tabáku virginského kultivovaných *semi in vivo* a *in vitro* (Hafidh et al., 2016b). Tyto kinázy by mohly hrát důležitou úlohu v komunikaci rostoucích pylových láček s vodícími pletivou čnělky. V sekretu byli identifikováni zástupci dvou kinázových rodin: malectin/receptorových kináz a Ca<sup>2+</sup>-dependentních kináz.

## 1.5. Závěry

Experimenty provedené v rámci této disertační práce vedly k identifikaci fosforylovaných peptidů ze tří stádií samčího gametofytu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*): zralého pylu, pylu aktivovaného *in vitro* 5 minut a pylu aktivovaného *in vitro* 30 minut. Tabák virginský se tak stal první krytosemennou rostlinou s identifikovaným fosfoproteomem aktivovaného pylu; u prvního fosfoproteomu samčího gametofytu získaného z huseníčku rolního byl analýzám podroben pouze zralý pyl (Mayank et al., 2012). Jedinými dalšími pylovými láčkami (popř. aktivovaným pylem), jež byly podrobeny fosfoproteomickým experimentům byly pylové láčky smrku Wilsonova (*Picea wilsonii*; Chen et al., 2012), který ale patří mezi nahosemenné rostliny (Gymnospermae).

Celkově bylo identifikováno 471 fosforylovaných peptidů, v jejichž sekvencích byla určena přesná pozice 432 fosforylačních míst. Znatelně se tak rozšířil počet fosfopeptidů oproti

předchozí fosfoproteomické studii, jež tvořila značnou část mé diplomové práce a v níž bylo přesně lokalizováno pouhých 52 fosforylačních míst (Fíla et al., 2012). Identifikované peptidy pocházely z 301 fosforylovaných proteinů, které byly rozděleny do třinácti funkčních kategorií. Nejhojněji zastoupenými kategoriemi se staly transkripce, translace, cílení a skladování proteinů a přenos signálu. Za zmínku rovněž stojí fosfoproteiny s neznámou funkcí nebo nejasnou klasifikací funkce, které souhrnně dosáhly pětiny identifikovaných fosfoproteinů. Značný podíl těchto proteinů poukazuje na fakt, že mnohé pylově specifické proteiny doposud nejsou prozkoumány. Právě tyto proteiny by v budoucnu mohly být žhavými kandidáty zastávajícími životně důležité funkce při vývoji samčího gametofytu.

V neposlední řadě byly v identifikovaném fosfoproteomu zralého pylu a pylu aktivovaném *in vitro* 5 min a 30 min identifikovány sekvenční motivy, které by měly být rozpoznávány jednotlivými proteinovými kinázami. Bylo nalezeno pět kinázových motivů s centrálním fosforylovaným serinem (xxxxxxS\*Pxxxxx, xxRxxS\*xxxxxx, xxKxxS\*xxxxxx, xxxxxxS\*DxExxx a xxxxxxS\*xDDxxx) a jeden s centrálním fosfothreoninem (xxxxxxT\*Pxxxxx). V pylovém proteomu a sekretu tabáku pak byly vyhledány kinázy, které by mohly zodpovídat za fosforylaci aminokyselin v těchto sekvenčních motivech.

## 2. Summary of the Ph.D. thesis

### 2.1. Introduction

Tobacco mature pollen represents a quiescent stage with an extremely desiccated cytoplasm surrounded by a very tough cell wall. After landing on the stigma (i.e. pollination), the rehydration of pollen grain cytoplasm and subsequent metabolic activation start. After these processes are finished, pollen tube grows through the selected aperture. The above mentioned processes are accompanied by translation regulation together with posttranslational modifications of the existing proteins. In mature pollen, there is a notable part of mRNAs stored in translationally inactive EDTA/puromycine-resistant particles (EPPs; Honys et al., 2000, 2009). The complexes are de-repressed and the transcripts inside them are translated during pollen tube growth.

The posttranslational modifications include protein phosphorylation that is very dynamic and usually plays a regulatory role in many cellular processes (for instance cytoskeleton dynamics, signal transduction, transcription and translation regulation, and cell cycle regulation). Protein phosphorylation can be studied from two perspectives. The first approach relies on revealing function of the particular protein kinases and phosphatases whilst the second one reveals localization of the phosphorylation sites in the target proteins. The latter strategy conventionally employs phosphoproteomic approaches, which usually include various enrichment techniques. The application of enrichment protocols is usually inevitable since (1) only a part of cellular proteome is phosphorylated at a time in a cell and often the less abundant proteins are phosphorylated; (2) a particular protein can be phosphorylated only partly and its notable part can remain in a native form; (3) non-phosphorylated peptides in the mixture with phosphopeptides make the mass spectrometry identification of phosphorylation sites more challenging.

The enrichment step can be carried out either on the level of intact proteins or on the level of peptides (Fíla and Honys, 2012). The enrichment techniques employed in phosphoproteomics are represented for instance by immobilized metal affinity chromatography (IMAC; Posewitz and Tempst, 1999), metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC; Pinkse et al., 2004; Wolschin et al., 2005), phosphotyrosine immunoprecipitation (Pandey et

al., 2000), and phosphopeptide enrichment mediated by chemical modifications (Dunn et al., 2010).

To date, there were published three male gametophyte phosphoproteomic studies. The first angiosperm phosphoproteome published was the one of *Arabidopsis thaliana* (Mayank et al., 2012). This study employed a combination of phosphopeptide enrichment techniques (IMAC, MOAC, and SIMAC) and revealed 962 phosphopeptides originating from 598 phosphoproteins. The next mature pollen phosphoproteomic study was performed on tobacco (*Nicotiana tabacum*; Fíla and Honys, 2012). The first phosphoproteomic method applied was MOAC phosphoprotein enrichment with aluminium hydroxide matrix that enriched phosphoproteins from both mature pollen and pollen activated *in vitro* 30 min. In the enriched fraction, there were identified 139 phosphoprotein candidates but the exact unambiguous position was identified only in case of one phosphorylation site. In order to improve the number of clearly positioned phosphorylation sites, the total protein extract was trypsinized and the peptide mixture was enriched by MOAC with titanium dioxide matrix. This approach enabled the identification of 51 more phosphorylation sites in the phosphoprotein candidates that were already identified in mature pollen. The third species, gametophyte of which was studied from the phosphoproteomic perspective was *Picea wilsonii* (Chen et al., 2012). This study differed from the above ones in two ways: (1) *Picea wilsonii* is a gymnosperm, and not an angiosperm, (2) protein phosphorylation in *Picea wilsonii* pollen tubes was studied in response to the lack of key nutrients in pollen tube growth media (on the other hand, in tobacco and *Arabidopsis*, protein phosphorylation during male gametophyte development was studied).

From the above paragraph, it should be obvious that a large tobacco male gametophyte phosphoproteomic study revealing exact position of phosphorylation sites was still lacking. In our previous phosphoproteomic research (Fíla et al., 2012) that became a notable part of my diploma thesis, there were unambiguously positioned only few phosphorylation sites, but exclusively from tobacco mature pollen. Moreover, up to know, the phosphorylation dynamics upon pollen activation was not studied yet. In order to achieve a more detailed information about protein phosphorylation related to pollen grain activation, 5-min pollen activation was added to the studied stages. The experiments performed within the scope of this Ph.D. thesis represent a continuation of the previous studies and logically broaden our knowledge about protein phosphorylation in tobacco male gametophyte.

## 2.2. Aims of the study

The aims of this Ph.D. thesis were composed of the following milestones:

1. Unambiguous positioning of the phosphorylation sites in phosphoproteins identified in tobacco (*Nicotiana tabacum*) mature pollen, pollen activated *in vitro* 5 min and pollen activated *in vitro* 30 min.
2. Identification of phosphopeptides that underwent abundance changes during tobacco (*Nicotiana tabacum*) pollen activation *in vitro*.
3. Determination of the dominant kinase motifs in the acquired dataset and comparison of the identified motifs with kinase motifs found in Arabidopsis mature pollen phosphoproteome.
4. Revealing kinases that recognize the identified sequence motifs in *Arabidopsis thaliana* and tobacco (*Nicotiana tabacum*) pollen proteomes and phosphoproteomes.
5. Finding protein kinases in the published set of pollen tube secretome data – in both *semi in vivo* and *in vitro* secretomes of 24-hour tobacco (*Nicotiana tabacum*) pollen tubes.

## 2.3. Material and methods

The experiments within the scope of this Ph.D. thesis were performed on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun), which were cultivated in the greenhouse from April to September. The plants served for pollen collection – the flowers one day before anthesis were collected daily, the anthers were removed from them and were let to dehisce overnight. They were dried, mature pollen was shed from them and filtered by a stocking (Petrů et al., 1964).

Mature pollen was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until subsequent experiments were carried out. Pollen activation was performed in sucrose-mineral medium buffered with MES (SMM-MES medium; 175 mM sucrose, 1.6 mM boric acid, 3 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.8 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{KNO}_3$ , 25 mM MES; pH 5.9; Tupý and Říhová, 1984) as a shaken suspension at  $27^{\circ}\text{C}$ . The pollen grains were activated *in vitro* 5 min, and 30 min, respectively, every time in three biological replicates.

Total proteins from mature pollen and both stages of activated pollen (5 min, and 30 min *in vitro* activated pollen) were extracted by trichloroacetic acid (TCA) in acetone (Méchin et al., 2006). The extracted proteins were resuspended in 0.2 M guanidinium chloride with 50 mM ammonium bicarbonate and phosphatase inhibitors, and subsequently trypsin-digested (1 ng trypsin per 50 ng proteins) for 12 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . From the complex peptide mixture, phosphopeptides were enriched by MOAC with titanium dioxide matrix (Beck et al., 2011).

The enriched phosphopeptides were separated by liquid chromatography (LC), and identified by tandem mass spectrometry (MS/MS). The acquired spectra were searched against the EST database from *Nicotiana tabacum* (<ftp://occams.dfci.harvard.edu/pub/bio/tgi/data>; version from 10/04/2011, the database contained 48,961 entries) by software Proteome Discoverer 1.3 with Mascot in order to enable their identification. Only phosphopeptides with their phosphorylation site(s) unambiguously localized with a probability higher than 90% (phosphoRS) were further analyzed. In order to quantify proteins prior to phosphopeptide enrichment, total trypsinized extract was directly separated by liquid chromatography (LC) and the peptides were identified and quantified by tandem mass spectrometry (MS/MS).

The gene ontology (describing protein function) of the identified phosphopeptides was first determined by software blast2GO according to the information about *Arabidopsis thaliana* homologues, and then manually sorted into functional categories according to Bevan et al. (1998). Subsequently, phosphorylation motifs were searched by software Motif-X (Schwartz et al., 2009; Chou and Schwartz, 2011). Two searches were performed, the first one for motifs with a central phosphoserine, and the second one looking up motifs with a central phosphothreonine. In both cases, motif length was set to thirteen amino acids with the phosphorylated amino acid occupying the central position. Tobacco protein sequences from Uniprot database served as a reference sample. The kinases recognizing the identified sequence motifs were looked up in tobacco (*Nicotiana tabacum*) pollen proteome (Ischebeck et al., 2014), *Arabidopsis thaliana* pollen phosphoproteome (Mayank et al., 2012), and *Arabidopsis thaliana* pollen proteome (Grobei et al., 2009). The regulated phosphopeptides were sorted manually into seven groups according to their regulatory trends. The graphical summary of the regulated phosphopeptides was created by VANTED software (Rohn et al., 2012).

## 2.4. Results and discussion

Within the scope of this Ph.D. thesis, there were identified 471 phosphopeptides, which revealed the exact position of 432 phosphorylation sites in three studied stages of tobacco male gametophyte (mature pollen, pollen activated *in vitro* 5 min, and pollen activated *in vitro* 30 min). The known part of tobacco mature pollen phosphoproteome was notably broadened, and the number of identified phosphopeptides was almost the same as in *Arabidopsis* pollen phosphoproteome, in which there were identified 962 phosphopeptides carrying 609 phosphorylation sites (Mayank et al., 2012).



The identified phosphoproteins belonged to thirteen functional categories, of which the most abundant ones were transcription, protein synthesis, protein destination and storage, and signal transduction. Also proteins with unknown gene ontology were dominant – they belonged to two categories: “unclassified” and “unknown function”. The functional categories of proteins identified in Arabidopsis mature pollen phosphoproteome were quite similar, particularly protein metabolism and function, metabolism, protein fate, protein binding, signal transduction, and cellular transport.

The quantitative data pinpointed phosphopeptides, concentration of which changed in reaction to pollen activation. The regulated phosphopeptides were sorted into seven groups according to their regulatory trends. Most proteins belonged to the category exclusive for mature pollen. Many proteins contained several phosphorylation sites on several amino acids, some of which were phosphorylated whilst the others dephosphorylated, and as a response to pollen activation, these phosphorylation patterns changed by both phosphorylation and dephosphorylation.

The acquired phosphoproteomics data were further analyzed. The first analysis aimed at the identification of sequence motifs, which surrounded the identified phosphorylation sites. There were identified five motifs with a central phosphoserine but only one with a central phosphothreonine. The most abundant phosphoserine motif and the only phosphothreonine motif were represented by a phosphorylation site (regardless if serine or threonine) followed by a proline, i.e. xxxxxxS\*Pxxxxx (identified in 118 phosphopeptides), and xxxxxxT\*Pxxxxx (detected 31 times). The prolyl-directed phosphorylation is typical for mitogen activated protein kinases (MAPKs), and cyclin-dependent protein kinases (CDKs; Lee et al., 2011). MAPKs play a key role in many physiological processes, including pollen rehydration (Wilson et al., 1997), whilst CDKs regulate cell division so their role could be important during pollen mitoses I and II (Hafidh et al., 2012).

There were identified four more phosphorylation motifs with a central phosphoserine, two in acidic amino acid context, and two alkaline ones. The alkaline motifs were represented by xxRxxS\*xxxxxx (identified in 37 phosphopeptides), and xxKxxS\*xxxxxx (identified 30 times). Both these alkaline motifs were recognized by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases (CAMK2), and Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases–related to sucrose non-fermenting kinases (CDPK–SnRK; Lee et al., 2011). On the other hand, acidic kinase motifs with a central phosphoserine were represented by xxxxxxS\*DxExxx (found 23 times), and xxxxxxS\*xDDxxx

(identified in 15 phosphopeptides), which in principle corresponded to xxxxxxS\*(D/E)(D/E)(D/E)xxx sequence that was recognized by casein kinase 2 (CK2; Lee et al., 2011). The members of all mentioned kinase families were identified in tobacco pollen proteome (Ischebeck et al., 2014). It is worth mentioning that the acquired kinase motifs together with kinases recognizing them, were identified according to *in silico* analyses and predictions. To link kinases with their target motifs (and target proteins), it will be necessary to carry out a number of subsequent experiments.

In *Arabidopsis thaliana* pollen phosphoproteome, there were identified only two sequence motifs, both with a central phosphoserine: xxxxxxS\*Pxxxxx, and xxxRxxS\*xxxxxx (Mayank et al., 2012). In *Arabidopsis* pollen proteome (Grobei et al., 2009), there were identified kinases recognizing both these motifs: MAP kinases, cyclin-dependent protein kinases (xxxxxxxS\*Pxxxxx), and Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases (xxxRxxS\*xxxxxx). Moreover, there were identified more protein kinases in *Arabidopsis* pollen transcriptome (Honys and Twell, 2004), proteome (Grobei et al., 2009), and phosphoproteome (Mayank et al., 2012). They were presented in the recent review article (Hafidh et al., 2016a).

Another data set subjected to kinase motif search was represented by pollen tube secretome – both from tobacco 24-hour pollen tubes cultivated *semi in vivo*, and *in vitro* (Hafidh et al., 2016b). These kinases could play an important role in communication of the growing pollen tubes with connective tissues of a pistil. In pollen tube secretome, there were identified members of two kinase families: malectin/receptor kinases and Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases.

## 2.5. Conclusions

The experiments presented within the scope of this Ph.D. thesis led to the identification of phosphorylated peptides from three stages of tobacco (*Nicotiana tabacum*) male gametophyte: mature pollen grains, pollen activated *in vitro* 5 min, and pollen activated *in vitro* 30 min. Tobacco became the first angiosperm species with phosphoproteome identified in activated pollen since the first angiosperm phosphoproteomic studies on male gametophyte were carried out exclusively on mature pollen (Mayank et al., 2012). The only alternative study performed on activated pollen or pollen tubes is the one performed on *Picea wilsonii* (Chen et al., 2012), which belongs to gymnosperms (Gymnospermae).

In total, there were identified 471 phosphorylated peptides with 432 unambiguously positioned phosphorylation sites. The number of unambiguous phosphorylation sites identified

in mature pollen increased notably since in the previous tobacco phosphoproteomic study that represented a notable part of my diploma thesis, there were identified only 52 phosphosites (Fila et al., 2012). The identified phosphopeptides originated from 301 phosphorylated proteins, which were divided into 13 functional categories. The most prominent categories were transcription, protein synthesis, protein destination and storage, and signal transduction. The proteins with unknown or unclear classification were also worth mentioning since they collectively occupied nearly one fifth of the presented phosphoproteome. It tends to speculate that these candidates represent the pollen-specific proteins, function of which remains still unknown. These proteins might represent hot candidates playing an essential role during male gametophyte development.

Last but not least, in the phosphopeptides identified in mature pollen, pollen activated *in vitro* 5 min, and pollen activated *in vitro* 30 min, there were identified sequence motifs recognized by protein kinases. There were identified five kinase motifs with a central phosphoserine (xxxxxxS\*Pxxxxx, xxRxxS\*xxxxxx, xxKxxS\*xxxxxx, xxxxxxS\*DxExxx, xxxxxxS\*xDDxxx), and one with a central phosphothreonine (xxxxxxT\*Pxxxxx). Subsequently, protein kinases recognizing these sequence motifs were found in tobacco mature pollen proteome and secretome.

### 3. Použitá literatura / References

- Beck, F., Lewandrowski, U., Wiltfang, M., Feldmann, I., Geiger, J., Sickmann, A., Zahedi, R.P.** (2011). The good, the bad, the ugly: Validating the mass spectrometric analysis of modified peptides. *Proteomics* **11**, 1099–1109.
- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., Bergkamp, R., et al.** (1998). Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **391**, 485–488.
- Dunn, J.D., Reid, G.E., Bruening, M.L.** (2010). Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **29**, 29–54.
- Fíla, J., Honys, D.** (2012). Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids* **43**, 1025–1047.
- Fíla, J., Matros, A., Radau, S., Zahedi, R.P., Čapková, V., Mock, H.-P., Honys, D.** (2012). Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated *in vitro*. *Proteomics* **12**, 3229–3250.
- Grobei, M.A., Qeli, E., Brunner, E., Rehrauer, H., Zhang, R., Roschitzki, B., Basler, K., Ahrens, C.H., Grossniklaus, U.** (2009). Deterministic protein inference for shotgun proteomics data provides new insights into *Arabidopsis* pollen development and function. *Genome Res* **19**, 1786–1800.
- Hafidh, S., Breznenová, K., Růžička, P., Feciková, J., Čapková, V., Honys, D.** (2012). Comprehensive analysis of tobacco pollen transcriptome unveils common pathways in polar cell expansion and underlying heterochronic shift during spermatogenesis. *BMC Plant Biol* **12**, 24.
- Hafidh, S., Fíla, J., Honys, D.** (2016a). Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reprod.* doi: 10.1007/s00497-015-0272-4
- Hafidh, S., Potěšil, D., Fíla, J., Čapková, V., Zdráhal, Z., Honys, D.** (2016b). Direct quantification of the pollen tube secretome identifies novel pollen tube guidance proteins following its interaction with the pistil. *Genome Biol* **17**, 81.
- Honys, D., Combe, J.P., Twell, D., Čapková, V.** (2000). The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sex Plant Reprod* **13**, 135–144.
- Honys, D., Reňák, D., Feciková, J., Jedelský, P.L., Nebesářová, J., Dobrev, P., Čapková, V.** (2009). Cytoskeleton-associated large RNP complexes in tobacco male gametophyte (EPPs) are associated with ribosomes and are involved in protein synthesis, processing, and localization. *J Proteome Res* **8**, 2015–2031.
- Honys, D., Twell, D.** (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **5**, R85.
- Chen, Y., Liu, P., Hoehenwarter, W., Lin, J.** (2012). Proteomic and phosphoproteomic analysis of *Picea wilsonii* pollen development under nutrient limitation. *J Proteome Res* **11**, 4180–4190.
- Chou, M.F., Schwartz, D.** (2011). Biological sequence motif discovery using motif-x. *Curr Protoc Bioinformatics* **13**, 15–24.

- Ischebeck, T., Valledor, L., Lyon, D., Gingl, S., Nagler, M., Meijon, M., Egelhofer, V., Weckwerth, W.** (2014). Comprehensive cell-specific protein analysis in early and late pollen development from diploid microsporocytes to pollen tube growth. *Mol Cell Proteomics* **13**, 295–310.
- Lee, T.Y., Bretana, N.A., Lu, C.T.** (2011). PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *BMC Bioinformatics* **12**, 13.
- Mayank, P., Grossman, J., Wuest, S., Boisson-Dernier, A., Roschitzki, B., Nanni, P., Nuehse, T., Grossniklaus, U.** (2012). Characterization of the phosphoproteome of mature *Arabidopsis* pollen. *Plant J* **72**, 89–101.
- Méchin, V., Damerval, C., Zivy, M.** (2006). Total protein extraction with TCA-acetone. In *Methods in Molecular Biology*; H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, and V. Méchin (eds.) Springer, pp. 1–8.
- Pandey, A., Podtelejnikov, A.V., Blagoev, B., Bustelo, X.R., Mann, M., Lodish, H.F.** (2000). Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: Identification of Vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *P Natl Acad Sci USA* **97**, 179–184.
- Petrů, E., Hrabětová, E., Tupý, J.** (1964). The technique of obtaining germinating pollen without microbial contamination. *Biol Plantarum* **6**, 68–69.
- Pinkse, M.W.H., Uitto, P.M., Hilhorst, M.J., Ooms, B., Heck, A.J.R.** (2004). Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D–nanoLC–ESI–MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem* **76**, 3935–3943.
- Posewitz, M.C., Tempst, P.** (1999). Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem* **71**, 2883–2892.
- Rohn, H., Junker, A., Hartmann, A., Grafahrend-Belau, E., Treutler, H., Klapperstueck, M., Czauderna, T., Klukas, C., Schreiber, F.** (2012). VANTED v2: a framework for systems biology applications. *BMC Syst Biol* **6**, 139.
- Schwartz, D., Chou, M.F., Church, G.M.** (2009). Predicting protein post-translational modifications using meta-analysis of proteome scale data sets. *Mol Cell Proteomics* **8**, 365–379.
- Tupý, J., Říhová, L.** (1984). Changes and growth effect of pH in pollen tube culture. *J Plant Physiol* **115**, 1–10.
- Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E.** (1997). A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* **9**, 2093–2100.
- Wolschin, F., Wienkoop, S., Weckwerth, W.** (2005). Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* **5**, 4389–4397.

## 4. Životopis česky

**Datum narození:** 25. 3. 1988

**Místo narození:** Duchcov (Ústecký kraj, Česká republika)

### **Vzdělání:**

2010–2012 – Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, magisterské studium v oboru „Anatomie a fyziologie rostlin“, diplomová práce „Hledání fosfoproteinů účastnících se aktivace pylu tabáku *in vitro*“

2007–2010 – Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, bakalářské studium v oboru „Biologie“, bakalářská práce „Obohacovací techniky užívané ve fosfoproteomice“

### **Zaměstnání:**

od r. 2007 – Laboratoř biologie pylu, Ústav experimentální botaniky, AVČR, v.v.i., Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje

### **Stáže:**

2011 – bilaterální grant DAAD/AV ČR, D8–CZ19/2011–2012, Identifikace fosfoproteinů a transkriptů účastnících se vývoje samčího gametofytu a indukce pylové embryogeneze; pobyt 1,5 měsíce na IPK v Gaterslebenu (Německo), ve skupině Aplikované biochemie, pokračovací experimenty pro první fosfoproteomickou publikaci

2010 – COST-STSM-FA0603-05564, pobyt 1 měsíc na IPK v Gaterslebenu (Německo), ve skupině Aplikované biochemie, pokračování analýz

2009 – COST-STSM-FA0603-04559, pobyt 2,5 měsíce na IPK v Gaterslebenu (Německo), ve skupině Aplikované biochemie, učení se fosfoproteomickým metodám

### **Vysokoškolská pedagogická činnost:**

od r. 2015 – přednáška MB130P58 „Svět RNA a bílkovin“, Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 50% podíl na výuce

## **Konference:**

2016 – konference COST FA1603 „The quest for tolerant varieties – Phenotyping at plant and cellular level“, WG2 Meeting, Versailles, Francie: poster „Functional analysis of the selected phosphoprotein candidates identified in male gametophyte“

2015 – 14. konference experimentální biologie rostlin, Brno, Česká republika: přednáška „Dynamika fosfoproteomu během aktivace samčího gametofytu tabáku“

2015 – konference „Joint Meeting: 2<sup>nd</sup> International Conference on Plant Biology and 21<sup>st</sup> Symposium of the Serbian Plant Physiology Society“, Petnica, Srbsko: přednáška „Searching for phosphoproteins that are crucial for tobacco pollen activation *in vitro*“

2014 – Metodické dny, Seč, Česká republika: poster „Rostlinná fosfoproteomika“

2014 – konference COST FA1603 „The quest for tolerant varieties – Phenotyping at plant and cellular level“, WG1 Meeting, Larnaca, Kypr: přednáška „Functional analysis of the selected phosphoprotein candidates identified in tobacco male gametophyte“

2013 – konference „Regulation of fertilization and early seed development“, Bath, Velká Británie; přednáška „Searching for phosphoproteins that are crucial for tobacco pollen activation *in vitro*“

2012 – konference „Everything you want to know about sex but were afraid to ask“, Porto, Portugalsko; přednáška „Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated *in vitro*“

2012 – International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, Macao, Čína-Macao; poster: „Specificity of MOAC enrichment applied for mature pollen phosphoproteomics studies“

2011 – 5<sup>th</sup> Central and Eastern Europe Proteomic Conference, Praha, Česká republika; přednáška „Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activation *in vitro*“

2011 – COST FA0603 II WG2, Dijon, Francie; přednáška „Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activation *in vitro*“

2010 – ProteomLux 2010, Lucemburk, Lucembursko; poster „Analysis of MOAC specificity for phosphoprotein enrichment“

2010 – 12. konference experimentální biologie rostlin, Praha, Česká republika; přednáška „Fosfoproteiny hrající roli při aktivaci pylu tabáku *in vitro*“

2010 – COST FA0603 II WG2, Namur, Belgie; přednáška „Analysis of the metal-oxide affinity chromatography (MOAC) specificity for phosphoprotein enrichment“

2009 – COST FA0603 II WG2, Nitra, Slovensko; poster „Impact of homogenization conditions and protein extraction on the obtained proteomic spectra of tobacco pollen“

2009 – Metodické dny, Malenovice, Česká republika; přednáška „Rostlinná fosfoproteomika“

2008 – ProteomLux 2008, Lucemburk, Lucembursko; poster „Pollen proteomic analyses – a key role of homogenization and extraction“

### **Ocenění:**

2015 – Cena prof. Lubomíra Nátra za nejlepší studentskou prezentaci na 14. konferenci experimentální biologie rostlin v Brně

2014 – vítěz soutěže Ovarová hlava 2013

2013 – Cena prof. RNDr. Jaroslava Heyrovského pro nejlepší absolventy přírodovědných oborů na Univerzitě Karlově v Praze

2013 – vítěz soutěže Ovarová hlava 2012

2012 – Cena děkana pro nejlepší absolventy v oboru Biologie na PřF UK

### **Ostatní:**

od r. 2016 – člen MC akce COST 15124 „A new Network of European BioImage Analysts to advance life science imaging (NEUBIAS)“ za Českou republiku

od r. 2014 – člen Rady pro popularizaci vědy Akademie věd České republiky

od r. 2014 – účast na popularizaci vědy Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

2012–2014 – školitel středoškolských studentů v rámci projektů Otevřená věda III, Otevřená věda IV a Otevřená věda Praha

2010–2016 – přednášení pro středoškolské studenty

2008–2014 – člen pracovní skupiny pro přípravu úkolů Biologické olympiády kategorie A, B



## 5. Curriculum vitae in English

**Date of birth:** 25<sup>th</sup> March 1988

**Place of birth:** Duchcov (Ústecký region, Czech Republic)

### **Education:**

2010–2012 – Faculty of Science, Charles University in Prague, master study, subject “Plant anatomy and physiology”, diploma thesis “Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated *in vitro*”

2007–2010 – Faculty of Science, Charles University in Prague, bachelor study, subject “Biology”, bachelor thesis “Enrichment techniques employed in phosphoproteomics”

### **Employment:**

since 2007 – Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany, AS CR, v.v.i., Rozvojová 263, Prague 6 – Lysolaje

### **International visits:**

2011 – bilateral grant DAAD/AV ČR, D8–CZ19/2011–2012, Identification of phosphoproteins and transcripts involved in male gametophyte development and pollen embryogenesis induction; 1.5 months stay at IPK in Gatersleben (Germany), Applied Biochemistry Group, the on-going experiments for the first phosphoproteomic publication

2010 – COST-STSM-FA0603-05564, 1 month stay at IPK in Gatersleben (Germany), Applied Biochemistry Group, continuation of phosphoproteomic analyses

2009 – COST-STSM-FA0603-04559, 2.5 months stay at IPK in Gatersleben (Germany), Applied Biochemistry Group, learning of the phosphoproteomic techniques

### **University teaching:**

since 2015 – subject MB130P58 „Svět RNA a bílkovin“ (in English „The world of RNA and proteins“), Department of Experimental Plant Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague, teaching of 50% lectures

### **Conferences:**

2016 – conference COST FA1603 „The Quest for Tolerant Varieties – Phenotyping at Plant and Cellular Level“, WG2 Meeting, Versailles, France: poster „Functional analysis of the selected phosphoprotein candidates identified in male gametophyte“

2015 – 14<sup>th</sup> Conference of Experimental Plant Biology, Brno, Czech Republic: lecture „Dynamika fosfoproteomu během aktivace samčího gametofytu tabáku“ (in English: „Phosphoproteome dynamics during the activation of tobacco male gametophyte“)

2015 – conference „Joint Meeting: 2<sup>nd</sup> International Conference on Plant Biology and 21<sup>st</sup> Symposium of the Serbian Plant Physiology Society“, Petnica, Serbia: lecture „Searching for phosphoproteins that are crucial for tobacco pollen activation *in vitro*“

2014 – conference „Metodical Days“, Seč, Czech Republic: poster „Rostlinná fosfoproteomika“ (in English „Plant phosphoproteomics“)

2014 – conference COST FA1603 „The Quest for Tolerant Varieties – Phenotyping at Plant and Cellular Level“, WG1 Meeting, Larnaca, Cyprus: lecture „Functional analysis of the selected phosphoprotein candidates identified in tobacco male gametophyte“

2013 – conference “Regulation of Fertilization and Early Seed Development”, Bath, United Kingdom; lecture “Searching for phosphoproteins that are crucial for tobacco pollen activation *in vitro*”

2012 – conference “Everything You Want to Know about Sex but Were Afraid to Ask”, Porto, Portugal; lecture „Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated *in vitro*“

2012 – International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, Macau, China-Macau; poster: „Specificity of MOAC enrichment applied for mature pollen phosphoproteomics studies“

2011 – 5th Central and Eastern Europe Proteomic Conference, Prague, Czech Republic; lecture „Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activation *in vitro*“

2011 – COST FA0603 II WG2, Dijon, France; lecture „Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activation *in vitro*“

2010 – ProteomLux 2010, Luxembourg City, Luxembourg; poster „Analysis of MOAC specificity for phosphoprotein enrichment“

2010 – 12<sup>th</sup> Conference of Experimental Plant Biology, Prague, Czech Republic; lecture „Fosfoproteiny hrající roli při aktivaci pylu tabáku *in vitro*“ (in English: „Phosphoproteins playing role during tobacco pollen activation *in vitro*“)

2010 – COST FA0603 II WG2, Namur, Belgium; lecture „Analysis of the metal-oxide affinity chromatography (MOAC) specificity for phosphoprotein enrichment“

2009 – COST FA0603 II WG2, Nitra, Slovakia; poster „Impact of homogenization conditions and protein extraction on the obtained proteomic spectra of tobacco pollen“

2009 – conference „Metodical Days“, Malenovice, Czech Republic; lecture „Rostlinná fosfoproteomika“ (in English „Plant phosphoproteomics“)

2008 – ProteomLux 2008, Luxembourg City, Luxembourg; poster „Pollen proteomic analyses – a key role of homogenization and extraction“

#### **Awards:**

2015 – Prof. Lubomír Nátr's Award (Cena prof. Lubomíra Nátra) for the best student presentation at the 14<sup>th</sup> Conference of Experimental Plant Biology (KEBR)

2014 – the winner of Pig Head Competition 2013 (Ovarová hlava 2013)

2013 – Prof. RNDr. Jaroslav Heyrovský's Award (Cena prof. RNDr. Jaroslava Heyrovského) for the best Masters (MSc.) absolvent of natural science in Charles University in Prague

2013 – the winner of Pig Head Competition 2012 (Ovarová hlava 2012)

2012 – Dean's Award (Cena děkana) for the best Masters absolvent of Biology in the Faculty of Science, Charles University in Prague

**Others:**

since 2016 – Management committee member of the COST Action 15124 „A new Network of European BioImage Analysts to advance life science imaging (NEUBIAS)“ nominated for the Czech Republic

since 2014 – the member of the Council for Popularization of Science of the AS CR

since 2014 – the organization of science popularization at the Institute of Experimental Botany, AS CR

2012–2014 – supervisor of Secondary Grammar School students, projects “Open Science III”, “Open Science IV” and “Open Science Prague” (Otevřená věda III, Otevřená věda IV, and Otevřená věda Praha)

2010–2016 – lectures for Secondary Grammar School students

2008–2014 – the member of the author group of the Biology Olympiad tasks

## 6. Seznam publikací / List of publications

### **Impaktované publikace: / Impacted publications:**

- počet citací (podle Web of Science) / number of citations (according to the Web of Science): 65
- h-index = 3
- Researcher ID: G-2102-2011

Hafidh S, Potěšil D, **Fíla J**, Čapková V, Zdráhal Z, Honys D (2016): Direct quantification of the pollen tube-secretome identifies novel pollen tube guidance proteins following its interaction with the pistil. *Genome Biology* 17, 81. IF<sub>2014</sub> = 10.810

**Fíla J**, Radau S, Matros A, Hartmann A, Scholz U, Feciková J, Mock HP, Čapková V, Zahedi RP, Honys D (2016): Phosphoproteomics profiling of tobacco mature pollen and pollen activated *in vitro*. *Molecular & Cellular Proteomics* 15, 1338–1350. IF<sub>2014</sub> = 6.564

Hafidh S, **Fíla J**, Honys D (2016): Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reproduction*. On-line first. doi: 10.1007/s00497-015-0272-4. IF<sub>2014</sub> = 2.607

**Fíla J**, Čapková V, Honys D (2014): Phosphoproteomic studies in Arabidopsis and tobacco male gametophytes. *Biochemical Society Transactions* 42: 383–387. IF<sub>2014</sub> = 3.194, cited 2× (WOS)

Hafidh S, Potěšil D, **Fíla J**, Feciková J, Čapková V, Zdráhal Z, Honys D (2014): In search of ligands and receptors of the pollen tube: the missing link in pollen tube perception. *Biochemical Society Transactions* 42: 388–394. IF<sub>2014</sub> = 3.194, cited 4× (WOS)

**Fíla J**, Matros A, Radau S, Zahedi RP, Čapková V, Mock HP, Honys D (2012): Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated *in vitro*. *Proteomics* 12: 3229–3250. IF<sub>2014</sub> = 3.809, cited 10× (WOS)

**Fíla J**, Honys D (2012): Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids* 43: 1025–1047. IF<sub>2014</sub> = 3.293, cited 48× (WOS)

**Fíla J**, Čapková V, Feciková J, Honys D (2011): Impact of homogenization and protein extraction conditions on the obtained tobacco pollen proteomic patterns. *Biologia Plantarum* 55: 499–506. IF<sub>2014</sub> = 1.849, cited 1× (WOS)

**Recenzovaný abstrakt / Reviewed abstract:**

**Fíla J**, Matros A, Čapková V, Mock HP, Honys D (2012): Specificity of MOAC enrichment applied for mature pollen phosphoproteomics studies. International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, doi: 10.1109/iCBEB.2012.362

**Neipaktované publikace / Other publications:**

Balážová A, Kolář F, **Fíla J**, Mikát M, Baláž V (2016): Rozmnožování z pohledu evoluce (in English: *Reproduction from the evolutionary point of view*). Academia. *In print*.

**Fíla J**, Kodejš K, Mikát M, Nunvář J, Smyčka J, Synek P, Zouhar P (2013): Komunikace (in English: *Communication*). 148 pp. [ISBN 978-80-213-2386-5]

Baláž V, Balážová A, **Fíla J**, Kolář F, Mikát M (2012): Láska, sex a něžnosti v říši živočichů a rostlin (in English: *Love, sex, and tenderness in the world of animals and plants*). 135 pp. [ISBN 978-80-213-2288-2]

**Fíla J**, Pánek T, Sekereš J (2011): Tvary v živé přírodě (in English: *Shapes of the living organisms*). 153 pp. [ISBN 978-80-213-2191-5]



