

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Proteomické přístupy ke studiu cytokinin-vazebného
proteinu z obilovin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Klásková
Studijní forma:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivo Chamrád
Termín odevzdání práce:	30. 4. 2010

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

V Olomouci dne

Bc. Jana Klásková

Prostřednictvím své diplomové práce bych ráda poděkovala vedoucímu práce Mgr. Ivu Chamrádovi za pomoc a cenné rady, které mi v průběhu experimentální činnosti poskytoval. Dále bych na tomto místě chtěla poděkovat Mgr. René Lenobelovi, Ph.D. za ochotu a zkušenosti, které jsem od něj v laboratorní praxi získala. V neposlední řadě můj dík patří kolektivu pracovníků Laboratoře růstových regulátorů, jmenovitě pak Mgr. Lukáši Spíchalovi Ph. D., Mgr. Radimovi Simerskému, Ph. D., Mgr. Lucii Švehlové, Mgr. Markétě Gemrotové, Mgr. Jaroslavu Nislerovi, také Prof. Dr. Marku Šebelovi, Ph. D z katedry biochemie a kolektivu pracovníků z Izotopové laboratoře ÚEB AV ČR.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:

Bc. Jana Klásková

Název práce:

Proteomické přístupy ke studiu cytokinin-vazebného proteinu z obilovin

Typ práce:

Diplomová

Pracoviště:

Laboratoř růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty University Palackého a Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky

Vedoucí práce:

Mgr. Ivo Chamrád

Konzultant:

Mgr. René Lenobel Ph. D., Mgr. Lukáš Spíchal, Ph. D.

Rok obhajoby práce:

2010

Abstrakt:

Cytokinin jsou rostlinné hormony, které jsou zahrnuty do regulace mnoha důležitých procesů v rostlinném růstu a vývoji. V minulosti bylo vynaloženo hodně úsilí do výzkumu těchto významných molekul, i přesto však zůstaly některé otázky nedořešeny. Mezi ně bezpochyby také spadá role cytokinin-vazebných proteinů. Jedním z nejvíce prostudovaných proteinů této skupiny je cytokinin-vazebný protein z pšeničného embrya (CBF-1). CBF-1 je trimerní protein vykazující vysokou afinitu k aromatickým cytokininům. Na základě jeho chování během embryogeneze a klíčení se předpokládá, že reguluje hladiny N⁶-benzyladeninu a jeho derivátů. Hlavním cílem diplomové práce bylo sledování dynamiky CBF-1 během klíčení použitím různých proteomických metod. Těmi byly jak moderní techniky hmotnostní spektrometrie zastoupené metodou multiple reaction monitoring, tak „klasické“ proteomické metody jako dvojdimenzionální elektroforéza. Ta byla ve spojení s Western blotem a detekcí CBF-1 specifickou protilátkou vybrána jako nezávislý postup vhodný pro kontrolu dosažených výsledků. Mimo to byl sledován také vývoj vyzebné kapacity proteinů pro cytokininy, a to pomocí rovnovážné dialýzy. Získané výsledky naznačují snížení hladiny CBF-1 během čtyř dnů klíčení na polovinu její původní hodnoty. Tyto výsledky jsou však v rozporu s již dříve publikovanými informacemi a vnášejí do problematiky CBF-1 nové otázky.

Klíčová slova:

Cytokinin-vazebný protein z pšeničného embrya, cytokininy, proteomické metody

Počet stran:	94
Počet příloh:	3
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Jana Klásková
Title:	The Proteomic Approaches in studium of cytokinin-binding protein in corns
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacky University and Institute of Experimental Botany, Academy of Science of Czech Republic
Supervisor:	Mgr. Ivo Chamrád
Advisor:	Mgr. René Lenobel Ph. D., Mgr. Lukáš Spíchal, Ph. D.
The year of presentation:	2010
Abstract:	Cytokinins are plant hormones involved in regulation of many important processes in plant growth and development. Notwithstanding much effort have been made into research of these important molecules, several outstanding issues connected with them have still remained. Undoubtedly, one of them is the exact function of cytokinin-binding proteins. One of the most examined members of this protein family is wheat cytokinin-binding protein 1 (CBF-1). CBF-1 was published to be embryo-specific trimeric protein having remarkable affinity for aromatic cytokinins. Based on its behaviour during embryogenesis and germination, CBF-1 has been assumed to act as a regulator of N⁶-benzyladenin-type cytokinin levels. The main aim of our work was to revise CBF-1 dynamics upon cereal seed germination using advanced proteomic methods. For this purpose, target proteomic approach utilizing mass spectrometry and selected reaction monitoring was used. Then, classical two-dimensional electrophoresis followed by imunodetection of CBF-1 was applied as an independent proteomic tool suitable for verifying of achieved results. Simultaneously, cytokinin-binding activity was monitored employing equilibrium dialysis. Surprisingly, data obtained from these experiments indicate that the level of CBF-1 falls to the half of its original value within first four days of germination. This finding is in contrast to information published earlier and sheds brand new light on this interesting protein.

Keywords:	Cytokinin-binding protein from wheat germ, cytokinins, proteomics approaches
Number of pages:	94
Number of appendices:	3
Language:	Czech

Obsah

Cíle práce	9
Teoretická část	10
1.1 Cytokinininy.....	10
1.2 Cytokinin-vazebné proteiny.....	11
1.2.1 Cytokinin-vazebný protein ze pšenice seté.....	13
1.3 Metody kvantitativní proteomiky.....	19
1.3.1 Dvoudimenzionální elektroforéza.....	20
1.3.2 Diferenční gelová elektroforéza.....	21
1.3.3 ICAT.....	23
1.3.4 ICPL.....	25
1.3.5 iTRAQ.....	27
1.3.6 SILAC.....	28
1.3.7 Kvantifikace s pomocí ^{18}O	29
1.3.8 AQUA.....	30
1.3.9 SRM.....	31
Experimentální část	33
2.1 Chemikálie.....	33
2.2 Přístrojové vybavení.....	34
2.3 Složení roztoků používaných pro jednotlivé experimenty.....	34
Použité experimentální metody	39
3.1 Databázové vyhledávání.....	39
3.2 Příprava rostlinného materiálu a zavedení jednotlivých extrakčních metod.....	39
3.2.1 Extrakce dodecylsíránem sodným.....	39
3.2.2 Extrakce močovinou.....	40
3.2.3 Extrakce s pomocí 10% (w/v) kyseliny trichloroctové v acetonu.....	40
3.2.4 Extrakce fenolová.....	40
3.2.5 Frakcionace proteinů na základě jejich rozpustnosti.....	41
3.3 Stanovení koncentrace proteinů.....	42
3.3.1 2-D Quant Kit.....	42
3.3.2 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	43
3.4 Techniky určené pro separaci proteinových směsí.....	44
3.4.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného ..	44
3.4.2 Dvoudimenzionální elektroforéza.....	45
3.4.2.1 Rehydratace stripů.....	45
3.4.2.2 Isoelektrická fokusace.....	45

3.4.2.3 Ekvilibrace stripů	46
3.4.2.4 SDS-PAGE	46
3.5. Detekce proteinů	47
3.5.1 Barvení proteinů dusičnanem stříbrným	47
3.5.2 Barvení proteinů barvivem Coomassie Brilliant Blue.....	47
3.6 Western blot a imunodetekce CBF-1	48
3.7 Štěpení proteinů	49
3.7.1 Štěpení proteinů v roztoku pro MRM kvantifikaci CBF-1	49
3.7.2 Štěpení proteinů v gelu	50
3.8 Příprava vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií	51
3.8.1 Čištění peptidů	51
3.8.2 Extrakce fosfopeptidů	51
3.9 Analýza hmotnostní spektrometrií	52
3.9.1 Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS.....	52
3.9.2 Identifikace proteinů pomocí LC-MS	53
3.9.3 Kvantifikace proteinů MRM metodou	54
3.10 Rovnovážná dialýza	58
3.11 Klíčení obilí pšenice seté a kukuřice seté	59
Výsledky a diskuse	61
4.1 Charakterizace cytokinin-vazebného proteinu (CBF-1)	61
4.2 Extrakce proteinů z obilí pšenice a kukuřice.....	66
4.3 Rovnovážná dialýza extrahovaného materiálu.....	75
4.4 Sledování hladiny CBF-1 při klíčení	79
Závěr	86
Literatura	88
Seznam použitých zkratk	94
Příloha	95

Cíle práce

Cíle mé diplomové práce byly stanoveny takto:

- Vypracování rešerše na téma cytokinin-vazebné proteiny se zaměřením na CBF-1
- Vypracování rešerše pojednávající o nejvýznamnějších metodách kvantitativní proteomiky
- Charakterizace CBF-1
- Zavedení extrakčních metod vhodných pro následnou proteomickou analýzu rostlinných proteinů a jejich ověření jejich použitelnosti pro studium CBF-1
- Zavedení a optimalizace rovnovážné dialýzy jako metody pro sledování vazebného potenciálu pro cytokininy v rostlinných proteinových extraktech
- Monitorování hladiny CBF-1 během klíčení
- Analýza vazebného potenciálu pro cytokininy během klíčení

Teoretická část

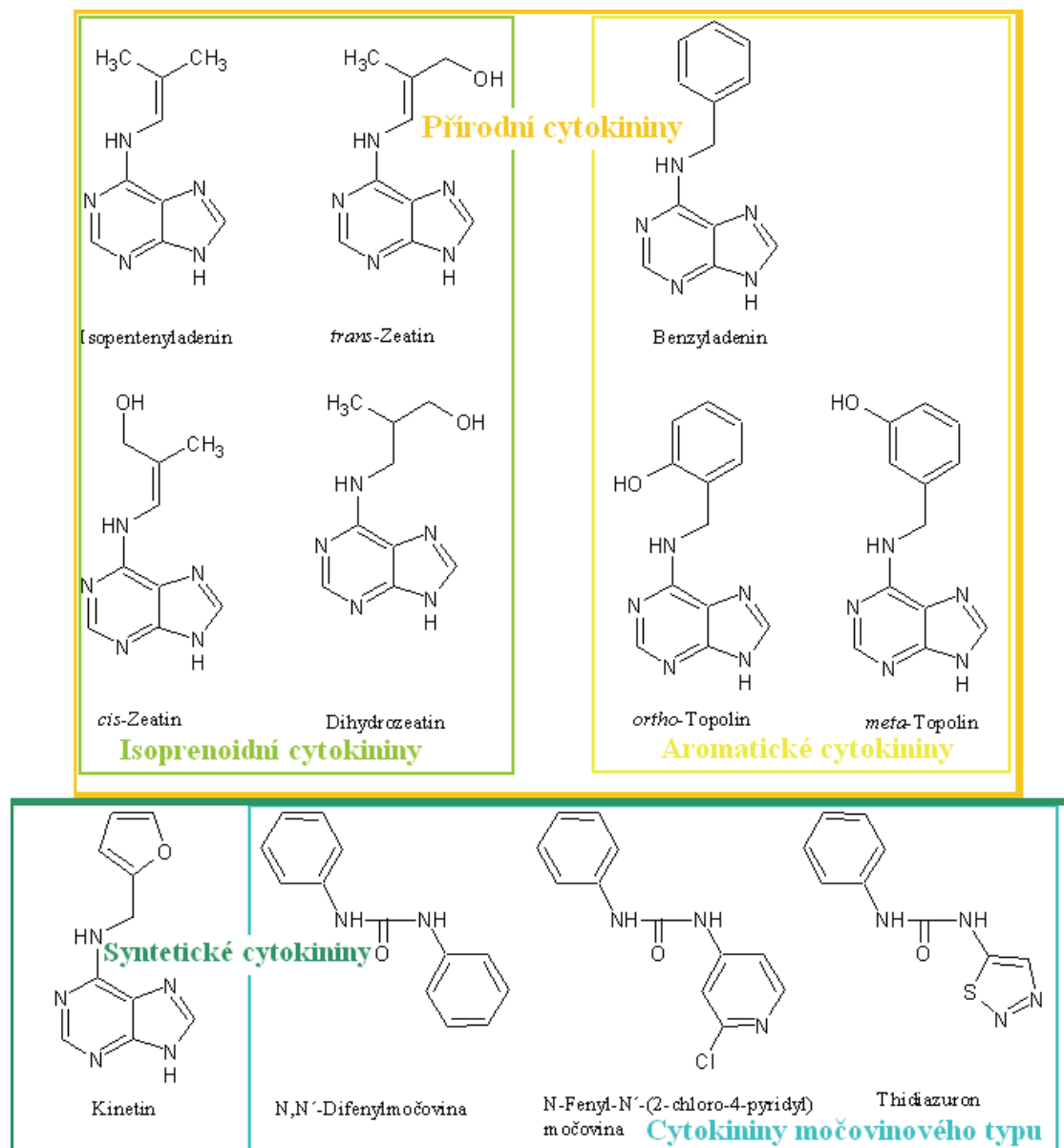
1.1 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které ovlivňují řadu rozličných dějů v rámci růstu a vývoje rostlin, například klíčení, diferenciaci nadzemní části, regulaci listové senescence, nebo regulaci přenosu nutričního signálu (Sakakibara, 2005; Samuelson & Larsson, 1993; Takei *et al.*, 2001). Při zajišťování těchto fyziologických funkcí rovněž interagují s dalšími rostlinnými hormony (Mok, 1994) a tím výrazně ovlivňují vyvážený rostlinný vývoj (Sakakibara, 2005).

Prvním identifikovaným cytokininem byl N^6 -furfuryladenin, kinetin, který byl v roce 1955 izolován v autoklávované sledí DNA jako faktor podporující buněčné dělení (Miller *et al.*, 1955). Krátce po objevu kinetinu následovaly objevy dalších cytokininů lišících se svým výskytem a strukturou (Obr. 1), jakými jsou například přírodně se vyskytující *trans*-zeatin (Letham, 1963), případně difenylmočovina (Shantz & Steward, 1955) jako synteticky připravený cytokinin. Dále byly také nalezeny cytokininy s aromatickým postranním řetězcem (Horgan *et al.*, 1973).

Všechny přírodně se vyskytující cytokininy náleží mezi N^6 -deriváty adeninu. V této poloze nesou jejich molekuly isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec, podle čehož jsou rozděleny do dvou základních skupin (Obr. 1). Výskyt isoprenoidních cytokininů je v rostlinách čtenější než u analogů s aromatickým postranním řetězcem. Strukturální změny isoprenoidního řetězce poté určují biologickou aktivitu a stabilitu daného cytokininu (Sakakibara, 2005). Řídce zastoupené aromatické cytokininy byly identifikovány u rostlinných druhů jako je topol (Strnad, 1997) či *Arabidopsis* (Tarkowska *et al.*, 2003). Tato skupina cytokininů obsahuje například benzyladenin a jeho hydroxylované deriváty, jako je *meta*-topolin a *ortho*-topolin. Není však zcela zřejmé zda se tento typ cytokininů vyskytuje běžně u dalších rostlinných zástupců (Sakakibara, 2005).

Co se struktury týče, je nutné ještě podotknout, že ve většině případů jsou přírodní cytokininy přítomny v rostlinných pletivech také jako odpovídající nukleotidy, nukleosidy a glykosidy (Sakakibara, 2005).



Obr. 1: Struktury vybraných zástupců jednotlivých typů cytokininů (upraveno podle Sakakibara, 2005).

1.2 Cytokinin-vazebné proteiny

Díky svému významu se cytokininy po dlouhá léta těšily poměrně velkému zájmu vědecké veřejnosti. Do dnešních dnů tak byla objasněna spousta otázek týkajících se například jejich biosyntézy, mechanismu jejich translokace, přenosu zprostředkovaného signálu či způsob jejich odbourávání (Sakakibara, 2005, 2006; Werner & Schmülling, 2009). Je však třeba podotknout, že i přes zmíněné významné úspěchy v oblasti těchto rostlinných hormonů stále zůstávají nedořešená témata. Mezi jedno z nich bychom mohli zařadit skupinu tzv. cytokinin-vazebných proteinů.

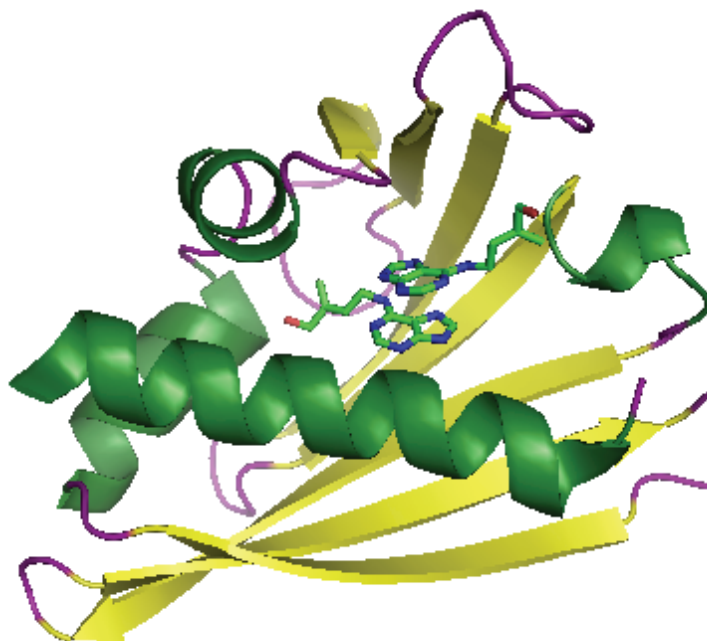
Tyto proteiny byly nalezeny většinou jako předpokládané cytokininové receptory v rozličných rostlinných orgánech a organelách (např. listy, koleoptile, hypokotyl, kotyledon, kalus a mitochondrie) u různých rostlinných druhů (kukuřice, ječmen, fazol, tabák, okurka a

mrkev), (Brinegar, 1994; Brault & Maldiney, 1999; Brault *et al.*, 1999). Jejich receptorová funkce však nikdy nebyla prokázána a jedinou společnou vlastností těchto proteinů tak zůstala jejich schopnost vázat cytokininy.

První charakterizovaný cytokinin-vazebný protein byl cytokinin-vazebný protein identifikovaný Foxem a Erionem v pšeničném embryu (Cytokinin-binding factor 1; CBF-1), (Fox & Erion, 1975). CBF-1 byl charakterizován jako pravděpodobný homotrimer, jehož tři podjednotky spolu vytváří jedno vazebné místo s K_D pro benzyladenin 5×10^{-7} M (Brinegar *et al.*, 1988). V pšeničném klíčku byly později také objeveny další cytokinin-vazebné proteiny a jejich K_D pro kinetin byly stanoveny jako 2×10^{-7} M a $1,2 \times 10^{-7}$ M. Tyto proteiny se od CBF-1 nepatrně liší svou afinitou a také molekulovou hmotností. Společným znakem těchto tří proteinů je však jejich vyšší afinita k aromatickým a syntetickým cytokininům jakými jsou benzyladenin a kinetin než pro *trans*-zeatin. Mezi další cytokinin-vazebné proteiny, u kterých byla zkoumána afinita, byly CBPs z mrkve a fazole. Oba tyto vazebné proteiny vázaly účinněji cytokininové báze než cytokininové ribosidy. Zajímavý je fakt, že vazebný protein z fazole vázal jak benzyladenin a kinetin, tak *trans*-zeatin a některé anticytokininy (Nagata *et al.* 1993). Bohužel, vzájemné porovnávání afinit dalších cytokinin-vazebných proteinů by bylo velmi obtížné, metody používané pro měření těchto interakcí byly velice odlišné (Brault *et al.*, 1997).

Další odlišnou vlastností, ve které se zástupci této skupiny proteinů liší, je jejich molekulová hmotnost. Zajímavé je, že molekulové hmotnosti nativních vazebných proteinů purifikovaných z listů ječmene (Romanov *et al.*, 1986; Kulaeva *et al.*, 1998), kukuřičných výhonků (Romanov *et al.*, 1990), tabákových listů (Yoshida & Takegami, 1977; Momotani & Tsui, 1992), semenáček fazole (Nagata *et al.*, 1993; Fujimoto *et al.*, 1998) a tabákového kalusu (Hamaguchi *et al.*, 1985) jsou mnohem nižší než molekulové hmotnosti vazebných proteinů z pšenice (CBF-1) a ovsu (Kamínek *et al.*, 2003), a pohybují se v oblasti 4-67 kDa. Nejmenší vazebné proteiny byly nalezeny právě ve zmíněném kalusu tabáku, kde je také možné nalézt větší vazebný protein s molekulovou hmotností okolo 32 kDa (Hamaguchi *et al.*, 1985). Největším z celé této skupiny proteinů je pak cytokinin-vazebný protein z etiolizovaných semenáček fazole, jehož nativní molekulová hmotnost je přibližně 200 kDa (Sakai & Kamei, 1992).

Co se týče krystalografie těchto proteinů, je nutné říct, že do dnešních dnů na tomto poli nebyly zaznamenány příliš velké úspěchy. Výjimkou je protein PR-10 z vlčího bobu žlutého (*Lupinus luteus*) a také protein VrCSBP (Obr. 2) pocházející z vigny zlaté (fazole mungo; *Vigna radiata*). Oba tyto proteiny vykazují podobné složení sekundárních struktur proteinů a přibližně stejný počet aminokyselin v řetězci. Jejich struktura obsahuje 3 α -helixy a 7 antiparalelních β -skládaných listů a obě molekuly mají délku přibližně 160 aminokyselin.



Obr. 2: Struktura cytokinin-vazebného proteinu VrCSBP z vigny zlaté (fazole mungo; *Vigna radiata*) se dvěma molekulami zeatinu (PDB ID 3COV, upraveno v PyMOLu).

I přes některé nedořešené otázky je nejstudovanějším proteinem z celé skupiny CBF-1 ze pšenice. Z tohoto důvodu je mu věnována následující kapitola.

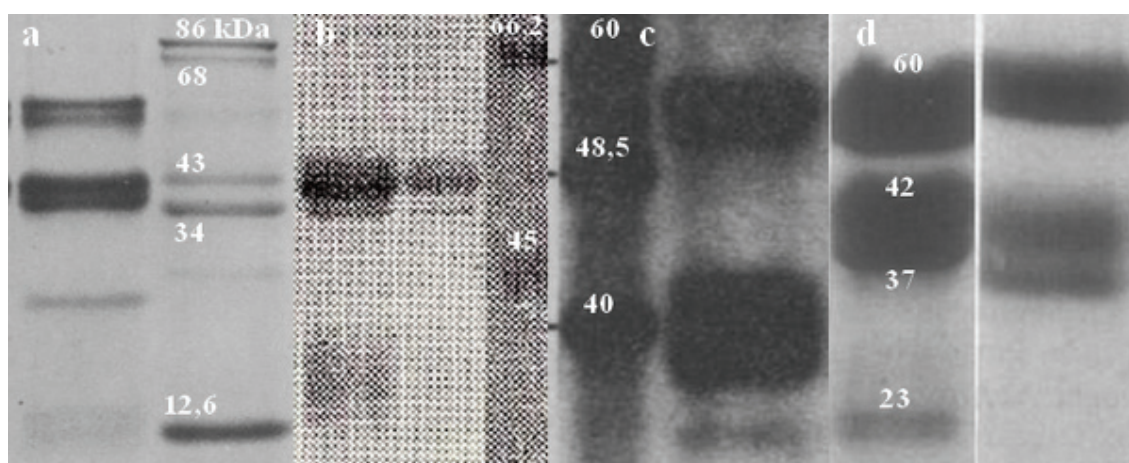
1.2.1 Cytokinin-vazebný protein ze pšenice seté

CBF-1 z pšeničného embrya se svými vlastnostmi velmi podobá zásobním proteinům typu vicilinů a jeho výskyt je specifický pro semena s vysokým obsahem dusíku (Erion & Fox, 1981; Brinegar & Fox, 1985a). Mezi jeho významné vlastnosti patří vysoká afinita k některým aktivním cytokininovým derivátům (Keim *et al.*, 1981; Polya & Bowman, 1979; Moore, 1979).

První studie o jeho vazebných vlastnostech popsali Fox a Erion (Fox & Erion, 1975). Ti původně lokalizovali výskyt tohoto proteinu na ribosomech, z jejichž frakce byl tento protein izolován. Následně však zjistili, že se CBF-1 vyskytuje nejen na ribosomech, ale také ve volné formě v postrizozomálním supernatantu, byť se jedná jen o jeho menší podíl. Dále bylo prokázáno, že spojení CBF-1 s ribozomem je výsledkem specifické interakce, a ribozomy izolované z pšeničných klíčků pomocí pufru s nízkým obsahem soli obsahují jednu molekulu CBF-1 na 80S ribozom (Fox & Erion, 1981).

Strukturním složením a určením molekulové hmotnosti tohoto proteinu se zabývalo hned několik vědeckých skupin. Podle Eriona a Foxe se jedná o protein skládající se ze tří heterogenních jednotek. Molekulová hmotnost nejmenší podjednotky byla na základě polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) určena jako 12 kDa. Další dvě podjednotky vykazovaly molekulovou hmotnost vyšší, a to okolo

40 a 60 kDa (Obr. 3a). Celková molekulová hmotnost byla stanovena na 183 kDa (Erion & Fox, 1981). Oproti tomu Brinegar a kolektiv popsali CBF-1 jako homotrimer s celkovou molekulovou hmotností 160 kDa, jehož podjednotky mají molekulovou hmotnost přibližně 54 kDa (Obr. 3b). Výskyt bandů s menší molekulovou hmotností byl těmito autory poté vysvětlován jako důsledek degradace CBF-1 při homogenizaci rostlinného materiálu (Brinegar & Fox, 1985a). Purifikací CBF-1 se také zabýval Moore, který na základě gelové chromatografie stanovil molekulovou hmotnost proteinu na 122 kDa. Po provedení SDS-PAGE zaznamenal výskyt dvou proteinů s molekulovou hmotností 40 a 56 kDa (Obr. 3c), (Moore, 1975). Naopak Polya a Davies pak stanovili molekulovou hmotnost CBF-1 přibližně na 140 kDa. Gelovou elektroforézou byly prokázány tři jeho podjednotky s molekulovou hmotností 37, 42 a 60 kDa, (Obr. 3d), (Polya & Davies, 1983).



Obr. 3: Srovnání složení CBF-1, které bylo publikováno různými autory. a= SDS-PAGE dle Eriona a Foxe, zleva CBF-1, marker molekulových hmotností; b= SDS-PAGE dle Brinegara, zleva CBF-1, marker molekulových hmotností; c= SDS-PAGE dle Moorea, zleva marker molekulových hmotností, CBF-1; d= SDS-PAGE dle Polya a Daviese, zleva marker molekulových hmotností, CBF-1 (Erion & Fox, 1981, Brinegar & Fox, 1985a, Moore, 1975, Polya & Davies, 1983).

Vzhledem ke skutečnosti, že strukturní charakterizace CBF-1 se liší tvrzením jednotlivých vědeckých skupin, zůstává otázka složení CBF-1 nedořešena a je výzvou pro další budoucí experimenty. Odlišnosti ve složení struktury CBF-1 mohou být například vysvětlitelné rozdílnými modifikacemi podjednotek tohoto proteinu. Jak bylo diskutováno posledně zmiňovanými autory, například fosforylace proteinů může pozměnit jejich pohyblivost při separaci SDS-PAGE a rozdílné stupně fosforylace mohou ovlivnit složitost jednotlivých bandů při elektroforéze (Polya & Davies, 1983).

Významným autorem, který se intenzivně zabýval studiem CBF-1 byl Brinegar, který publikoval se svými spolupracovníky v roce 1988 studii se zaměřením na charakterizaci vazebního místa proteinu. Protein z pšeničného klíčku byl kovalentně modifikován radioaktivně

značeným ligandem 2-azido- N^6 - $[^{14}\text{C}]$ benzyladeninem. Značený peptid vazebného místa byl získán po proteolytickém štěpení proteinu a následně izolován chromatografií na reverzní fázi a anexovou HPLC. Sekvenováním klasickým Edmanovým odbouráváním bylo identifikováno 11 z 12 aminokyselinových zbytků v peptidu, chybějící aminokyselina totiž nebyla HPLC analýzou osmého cyklu odbourávání identifikována. Tento výsledek tudíž naznačuje, že fotoafinitní reagent byl navázán právě na aminokyselinu v osmé pozici a identifikace jejího fenylthiohydantoin derivátu byla znemožněna. Tato hypotéza byla také podepřena detekcí uvolněné radioaktivity, která byla v osmé frakci nejvyšší (Tab. 1).

Tab. 1: Aminokyselinová sekvence značeného peptidu 2-azido- N^6 - $[^{14}\text{C}]$ benzyladeninem. ND= nedefinovaná aminokyselina (Brinegar *et al.*, 1988).

Počet cyklů	Identifikovaná aminokyselina	Uvolněná radioaktivita (cpm)
1	Ala	42
2	Phe	24
3	Leu	45
4	Gln	36
5	Pro	0
6	Ser	39
7	His	15
8	ND	1611
9	Asp	510
10	Ala	186
11	Asp	90
12	Glu	39

Analýzou FT-hmotnostní spektrometrií 10 pmol značeného peptidu bylo potvrzeno, že histidinový zbytek blízko C-konce (podtrženo) je modifikován činidlem v sekvenci Ala-Phe-Leu-Gln-Pro-Ser-His-His-Asp-Ala-Asp-Glu. Reakce 2-azido- N^6 - $[^{14}\text{C}]$ benzyladeninu s CBF-1 je tak pozoruhodně specifická. Také bylo prokázáno, že CBF-1 je složen ze tří podjednotek, ale váže pouze jednu molekulu cytokininu na molekulu proteinu. Výsledky Brinegarovy studie uvádí, že podjednotky proteinu interagují v trimerní CBF-1 do podoby vazebného místa (Brinegar *et al.*, 1988). Po provedení identifikace aminokyselinového zastoupení proteinu Brinegarem byla předpovězena jeho sekundární struktura (Fox, 1992).

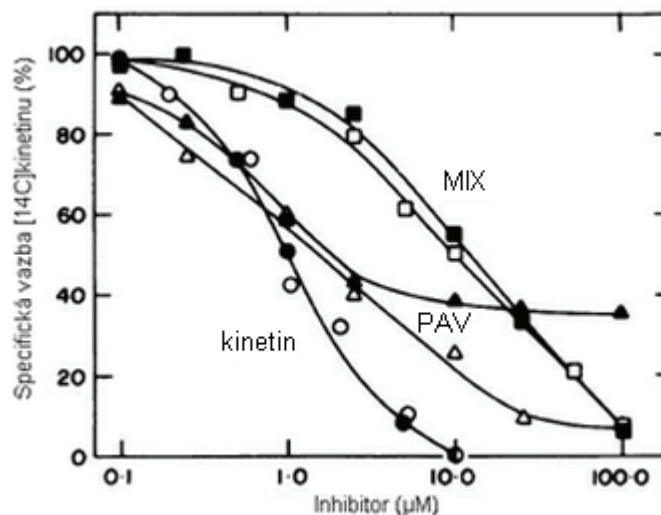
Jak už bylo zmíněno výše, CBF-1 má vysokou afinitu k některým druhům cytokininů. Tento rozpustný protein vykazuje afinitu jak pro purinové cytokininy, tak pro řadu

nepurinových sloučenin, které mohou ovlivnit cytokinin-modifikující procesy v rostlinných buňkách. Řada těchto strukturálně různorodých sloučenin, které inhibují fotosystém II v chloroplastech (fenylmočovina, karbanilát), soutěží s kinetinem o navázání do vazebného místa CBF-1. Další skupina inhibitorů (*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid, 1-methyl-3-isobutylxantin) naopak tuto vazbu kinetinu k CBF-1 inhibují. Hodnoty disociačních konstant vazebného proteinu pro kompetitivní inhibitory kinetinu jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Disociační konstanty vazebného proteinu při pH 8,0 (Polya & Bowman, 1979).

Ligand	K_D (M)
kinetin	3×10^{-7}
DCMU	4×10^{-7}
3-(4-chlorofenyl)-1,1-dimethylmočovina	3×10^{-6}
propazin	7×10^{-7}
ipazin	7×10^{-7}
atrazin	9×10^{-7}
simazin	1×10^{-5}
isopropyl- <i>N</i> -(3-chlorofenyl)karbamát	6×10^{-6}
isopropyl- <i>N</i> -fenylkarbamát	6×10^{-6}
4-chloro-2-butynyl- <i>N</i> -(3-chlorofenyl)karbamát	2×10^{-5}
1-methyl-3-isobutylxantin	5×10^{-6}
2',3'-cyklické AMP	5×10^{-5}

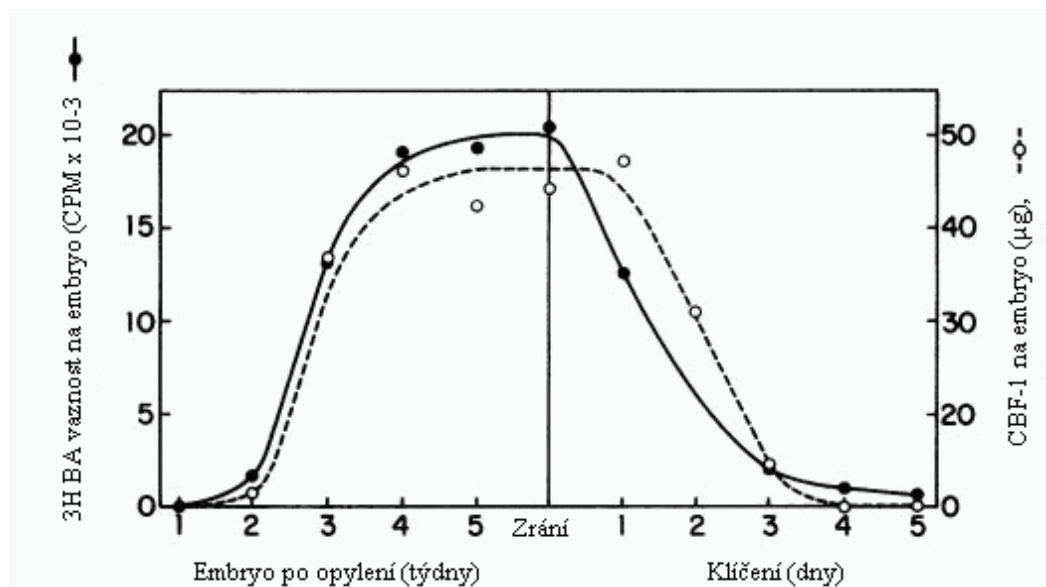
Titrační křivka kinetinu vázajícího se k CBF-1 1-methyl-3-isobutylxantinem je zobrazena na Obr. 4. Koncentrace poloviční maximální inhibice specifické vazby kinetinu při pH 5,7 a pH 8,0 jsou 10 a 13 μM. U inhibitoru papaverinu je koncentrace poloviční maximální inhibice pro kinetin při pH 5,7 a 8,0 přibližně 2 μM (Polya & Bowman, 1979).



Obr. 4: Inhibice $[^{14}\text{C}]$ kinetinu k CBF-1 kinetinem, 1-methyl-3-isobutylxantinem a papaverinem. Experiment byl sledován při pH 5,7 (světlý symbol) a 8,0 (tmavý symbol). Kinetin je na obrázku značen kolečkem, papaverin trojúhelníkem a 1-methyl-3-isobutylxantin čtverečkem (Polya & Bowman, 1979).

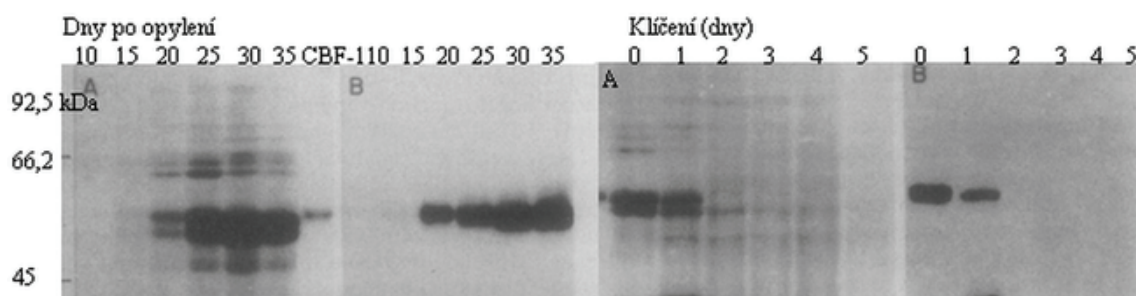
Jedním z dalších velmi zajímavých experimentů týkajících se CBF-1, který provedl Brinegar se svými kolegy, bylo monitorování jeho chování během embryogeneze a klíčení obilí pšenice.

Korelace afinity CBF-1 k benzyladeninu během embryogeneze a klíčení je zachycena na Obr. 5.



Obr. 5: Specifická vazba benzyladeninu a kvantifikace CBF-1 v extraktu vyvíjejícího se a klíčícího embrya. Afinita CBF-1 k benzyladeninu byla měřena pomocí rovnovážné dialýzy v porovnání s $[^3\text{H}]$ BAP a pomocí raketové imunoelktroforézy. Každý bod v grafu vyjadřuje průměr dvou replikátů měření vaznosti CBF-1 a BAP a nejméně tří replikátů z elektroimunodifúze (Brinegar *et al.*, 1985b).

Na samém počátku embryogeneze (do 1 týdnu po opylení embrya) není pozorovatelná vazba benzyladeninu k CBF-1. Od druhého týdne po opylení, jak embryo začíná nabývat svého charakteristického tvaru, dochází k rychlému vzestupu vazebné aktivity a ta se poté ustaluje na své maximální hodnotě během čtvrtého a pátého týdne do zrání embrya (Obr. 5). Při klíčení embrya poté naopak dochází k rapidnímu snížení vazebné aktivity a to během dvou dnů od jeho začátku. V průběhu třetího dne tohoto procesu pokračuje prudký pokles směrem k velmi nízkým hodnotám a po čtvrtém dnu klíčení se vazebná aktivita CBF-1 dostává pod limit detekce. Jak je z grafu zřejmé na Obr. 5, křivka znázorňující celkové množství CBF-1 v embryu má téměř shodný průběh s křivkou popisující vazebný potenciál pro cytokininy. Množství tohoto proteinu rychle narůstá dva až tři týdny po opylení (2 do 40 μg na embryo). Akumulace CBF-1 tak odpovídá nárůstu celkových proteinů v embryu. Ve zralém embryu přitom CBF-1 zaujímá přibližně 9 % všech rozpustných proteinů. Veškeré zmíněné údaje byly potvrzeny za pomoci



SDS-PAGE s následným Western blotem a imunodetekcí protilátkou (Obr. 6).

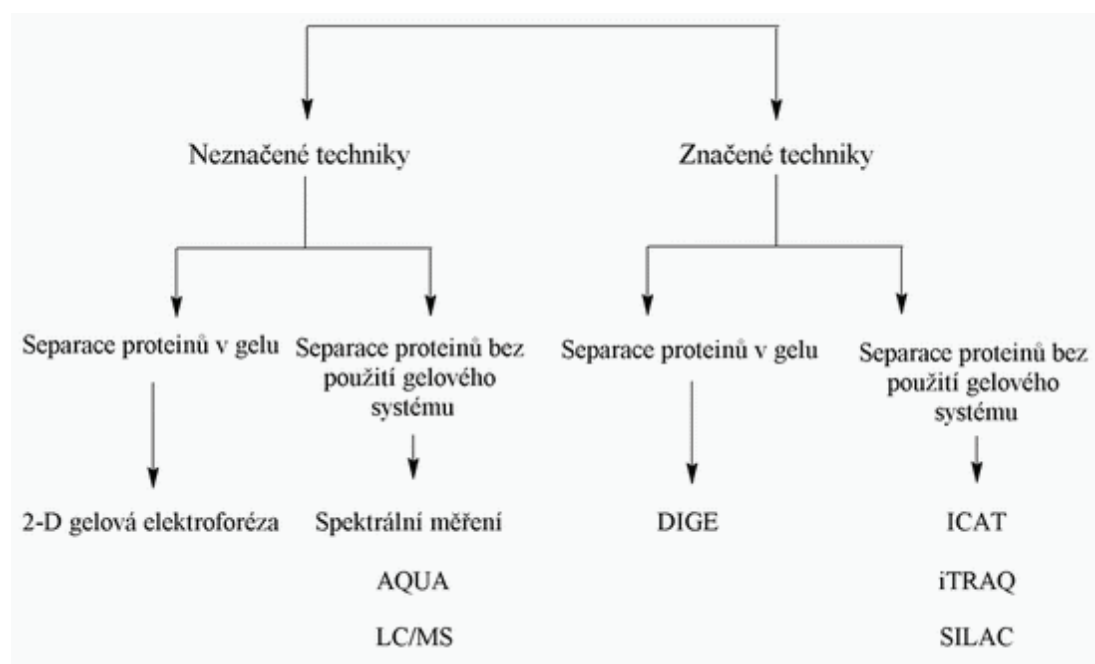
Obr. 6: Analýza extraktů z vyvíjejících se a klíčících embryí Western blotem. Extrakty byly separovány na SDS-PAGE a obarveny Coomassie Brilliant Blue (A) či blottovány na nitrocelulosovou membránu použitím anti-CBF-1 protilátky (B), (Brinegar *et al.*, 1985b).

Z provedených SDS-PAGE a Western blotu je zřejmý rapidní vzestup množství CBF-1 mezi 15. až 25. dnem po opylení. Naopak k rapidní degradaci 54 kDa polypeptidu a jiných proteinů dochází během dvou dnů klíčení. Po prvním dnu klíčení je na obrázku patrný degradační produkt v oblasti okolo 40 kDa. Ve druhém dnu tohoto procesu již 54 kDa CBF-1 zmizel, ale zbylo nepatrné množství degradačních produktů. Ve třetím dnu nebyla detekovatelná žádná reakce CBF-1 s protilátkou (Brinegar *et al.*, 1985b).

Díky zmíněným vlastnostem jako je jeho vazebná specifita a vysoký výskyt v embryu bylo usouzeno, že CBF-1 nefunguje jako cytokininový receptor v obvyklém slova smyslu. Navrhnuta byla jiná možnost, a to že CBF-1 funguje jako protein sloužící pro regulaci přístupu cytokininů do embrya během zrání a klíčení semen (Brinegar *et al.*, 1985b).

1.3 Metody kvantitativní proteomiky

Jak zvyšování počtu, tak zdokonalování technik používaných pro kvantifikaci proteinů nabývá v poslední době stále vyšší rychlosti (Lilley & Dupree, 2006). Kvantitativní proteomika tak dnes zahrnuje velkou skupinu metod, jejichž základem je značení proteinů pomocí fluoroforů či různých radioaktivních značek. Do druhé skupiny bychom pak mohli zařadit techniky, které pro kvantifikaci nevyžadují žádné značení. Každá z těchto dvou skupin pak obsahuje další metody založené jednak na separaci proteinů v gelu (dvoudimenzionální elektroforéza, diferenční gelová elektroforéza), a také metody kvantifikace proteinů bez použití gelového systému (Obr. 7), (Martyniuk & Denslow, 2009).



Obr. 7: Obecná klasifikace technik kvantitativní proteomiky (Martyniuk & Denslow, 2009).

Klasické proteomické kvantifikační metody (například dvoudimenzionální elektroforéza) poskytovaly poměrně dobrou citlivost, linearitu a dynamický rozsah, ale vykazovaly dva důležité nedostatky: vyžadovaly vysoké rozlišení separace proteinů a neumožňovaly identifikaci proteinů málo zastoupených ve vzorku. Oba tyto problémy byly vyřešeny moderními technikami hmotnostní spektrometrie ve spojení s vysoceúčinnou kapalinovou chromatografií (LC-MS). Nicméně hmotnostní spektrometrie nebyla od počátku kvantitativní metodou, protože proteolytické peptidy vykazují široký rozsah fyzi chemických vlastností jako je velikost, náboj, hydrofobicita, které vedou k velkým rozdílům v odezvě. Opravdový průlom tak do kvantitativní proteomiky přinesly až metody využívající značení stabilními izotopy, jejichž hlavním principem je vznik dvou forem peptidu („lehké“ a „těžké“), které při LC-MS analýze vykazují

shodné chování. Po provedení LC-MS analýzy těchto dvou forem peptidů je pak kvantifikace dosaženo na základě porovnání intenzit jejich signálů (Ong & Mann, 2005).

Isotopové značky mohou být zavedeny do proteinů či peptidů metabolicky, chemicky či enzymaticky (Tab. 3), případně mohou být jako vnější standard použity izotopově značené syntetické peptidy (Bantscheff *et al.*, 2007). Relativními kvantifikačními metodami poté můžeme určit změnu hladiny analytu v daném vzorku, kdežto absolutní kvantifikace umožňuje určit přesnou koncentraci proteinů či peptidů ve vzorku (Šebela, 2009).

Principy některých významných kvantifikačních metod budou rozebrány dále v samostatných kapitolách.

Tab. 3: Rozdělení kvantifikačních metod (Šebela, 2009).

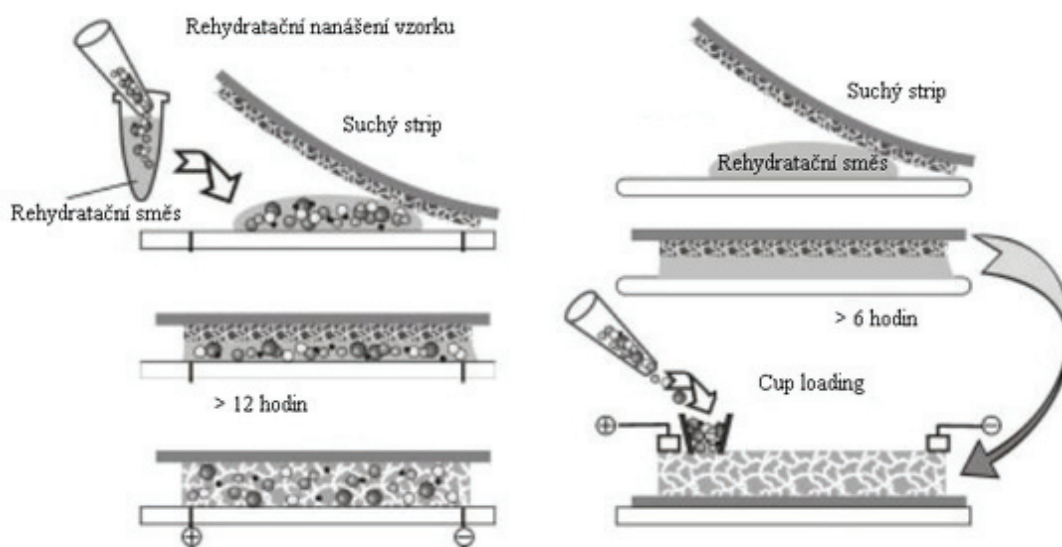
Relativní kvantifikace		Absolutní kvantifikace	
Typ značení	Příklad metody	Typ značení	Příklad metody
Metabolické (<i>in vivo</i>)	SILAC		AQUA
	¹⁵ N značení		
	¹³ C značení		
Chemické (<i>in vitro</i>)	ICAT		
	ICPL		
	PhIAT, PhIST		
	ALICE		
	iTRAQ		
Enzymatické (<i>in vitro</i>)	¹⁶ O/ ¹⁸ O inkorporace		

1.3.1 Dvoudimenzionální elektroforéza

Dvoudimenzionální elektroforéza (2-D elektroforéza) se řadí mezi techniky s vysokou rozlišovací schopností a pro separaci využívá dvou základních fyzikálně-chemických parametrů proteinů, isoelektrického bodu a molekulové hmotnosti proteinů.

Prvním rozměrem 2-D elektroforézy je isoelektrická fokusace, jejíž hlavním principem je separace proteinů podle jejich isoelektrického bodu. To je hodnota pH, při které je celkový náboj proteinu nulový, a nedochází tak k jeho migraci v elektrickém poli. První rozměr je prováděn v gelových stripech s imobilizovaným pH gradientem. Ty mohou mít různý rozsah pH (pro komerčně dodávané mezi 2,5-12) a také různou délku (běžně od 7-24 cm) (Görg *et al.*, 2009).

Aplikaci vzorku na stip je možné provádět několika způsoby, z nichž nejčastěji jsou nanášením vzorku na stip přímo v průběhu jeho rehydratace a nanášení pomocí metody „cup loading“ (Obr. 8).



Obr. 8: Dva nejčastější způsoby nanášení vzorku na gelový strip (Westermeier & Naven, 2002).

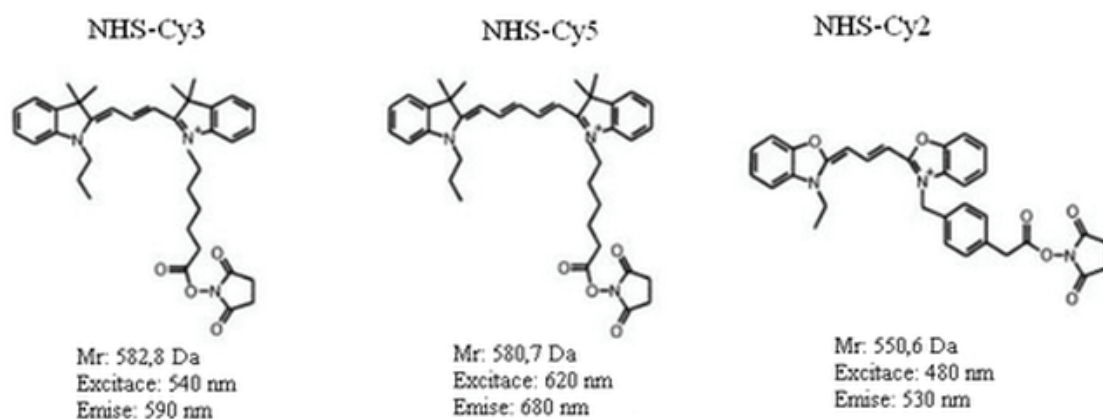
Po isoelektrické fokusaci je jako druhý rozměr provedena SDS-PAGE, pomocí níž jsou studované proteiny rozděleny podle jejich molekulových hmotností. Před vlastním provedením SDS-PAGE je nutné provést ekvilibraci stripů. Tento krok je prováděn pomocí SDS pufru, v němž dochází ke změně fokusovaných proteinů do SDS-protein komplexů, které pak nesou pouze negativní náboje. V průběhu ekvilibrace se provádí také redukce a alkylace proteinů. Tento proces slouží k zamezení částečné modifikace proteinů akrylamidem při SDS-PAGE, pro zdokonalení ostroty spotů a zlepšení identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií.

Výhodou 2-D elektroforézy je informace o postranlačních modifikacích proteinů. Mezi nevýhody bychom pak mohli zařadit limitovanou schopnost kvantifikovat proteiny, které jsou vysoce bazické či kyselé, a také ty, které mají vysokou nebo nízkou molekulovou hmotnost. Dalším problémem je analýza málo zastoupených proteinů (Martyniuk & Denslow, 2009). Většina zmíněných nedostatků však již byla v průběhu let vyřešena (například zavedením doplňkových metod jako NEPHGE pro bazické proteiny, nebo použitím stripů s úzkým rozsahem pH (Görg *et al.*, 2009), či prefrakcionací proteinů před samotnou separací (D'Alessandro *et al.*, 2010; Boschetti & Righetti, 2009), které se používají pro málo zastoupené proteiny), (Westermeier & Naven, 2002).

1.3.2 Diferenční gelová elektroforéza

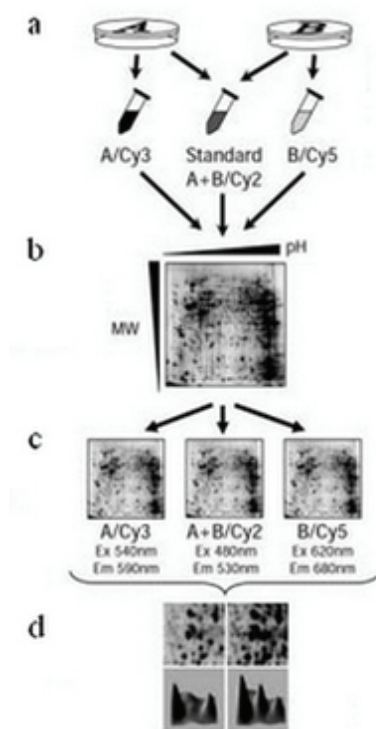
Diferenční gelová elektroforéza (Difference gel electrophoresis, DIGE) je technikou, která využívá značení komplexních proteinových směsí pomocí fluorescenčních barev před separací proteinů ve dvou rozměrech. Tato metoda využívá ke značení proteinů z rozdílných vzorků tří barev s rozdílnou excitační a emisní vlnovou délkou (Cy2, Cy3 a Cy5), (Obr. 10)

(Unlü *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2002; Gharbi *et al.*, 2002). Tyto fluorescenční barvy pro DIGE jsou N-hydroxysukcinimidylestery, které reagují nukleofilní substitucí s N-terminálními α -amino a lysinovou ϵ -amino skupinou proteinů. Dvě z těchto barev jsou používány ke značení srovnávaných vzorků (Cy3 a Cy5), třetí barva pak umožňuje použít interní standard. To vysokou měrou zlepšuje přesnost relativní kvantifikace proteinů.



Obr. 10: N-hydroxysukcinimidylestery propylu (NHS-Cy3), methylu (NHS-Cy5) a Cy2 používané pro DIGE značení (Timms & Cramer, 2008).

Značení vzorků je ukončeno přidavkem nadbytku lysinu a vzorky jsou poté redukovány. Stejně množství rozdílně značených proteinových vzorků je poté smícháno spolu se standardem a proteiny jsou separovány 2-D elektroforézou. Fluorescenční zobrazení pak umožní kvantifikovat rozdíly mezi analyzovanými vzorky. Celý proces DIGE je zobrazen na Obr. 11 (Timms & Cramer, 2008).

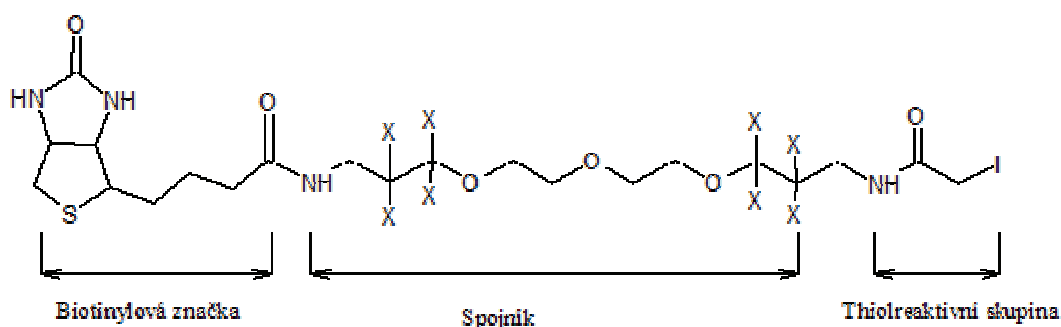


Obr. 11: Schématické zobrazení metody DIGE, a= lýze a značení pomocí NHS-Cy barev; b= smíchání vzorků a kvantifikace 2-D elektroforézou; c= fluorescenční obraz; d= analýza obrazu, (Timms & Cramer, 2008).

1.3.3 ICAT

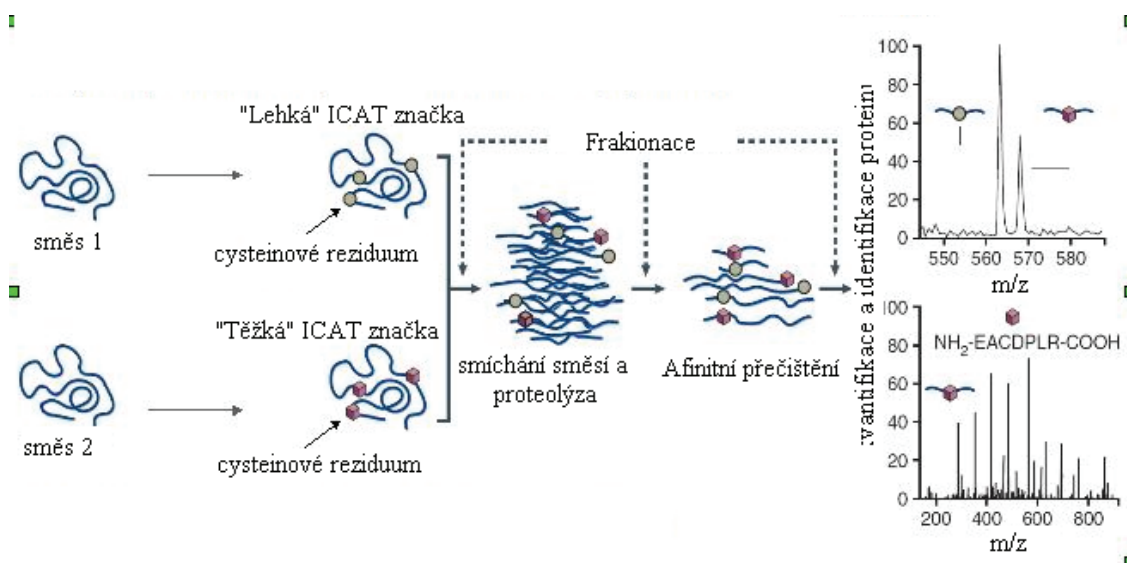
Prací, v níž bylo poprvé použito chemické značení proteinů metodou „Isotope-coded affinity tag“ (ICAT), byla publikace Gygiho a jeho spolupracovníků (Gygi *et al.*, 1999). ICAT metoda, tak jako později zmíněná metoda ICPL, jsou založeny na chromatografických intenzitách signálů intaktních peptidů a obě tyto metody nevyžadují pro kvantifikaci fragmentaci studovaných peptidů (Gouw *et al.*, 2010).

Původní ICAT reagent obsahoval biotinovou značku, spojník obsahující buď lehkou, či deuterovanou formu vodíku, a thiol reaktivní skupinu. Jelikož docházelo však k mírnému nižšímu opoždění na C18-fázi osmkrát deuterovaného ICAT reagentu oproti nedeuterované formě při kapalinové chromatografii, byla nasyntetizována nová forma reagentu s vložením kyselého štěpícího místa mezi biotinovou značkou a spojník (Obr. 12), (Šebela, 2009).



Obr. 12: ICAT reagent. V případě d8-ICAT reagentu X=deuterium. Pokud je reagent d0-ICAT, X= lehký vodík (Gygi *et al.*, 1999).

Prvním krokem této metody je značení proteinů ICAT reagentem specifickým pro volné thiolové skupiny cysteinů. Po této modifikaci dochází k proteolytickému štěpení. Naštěpené peptidy jsou následně afinitně přečištěny na avidinovém nosiči a konečná směs určená k hmotnostní analýze tak obsahuje pouze peptidy s ICAT značkou. Tato metoda umožňuje porovnání dvou vzorků. Schéma metody je zobrazeno na Obr. 13 (Šebela, 2009).



Obr. 13: Schéma ICAT metody, (Gygi *et al.*, 1999).

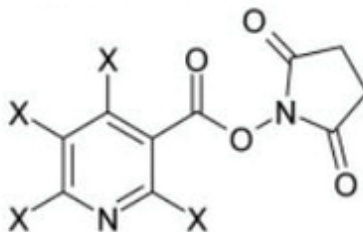
I když je cystein poměrně málo zastoupenou aminokyselinou, ICAT a další příbuzné metody významně snižují složitost proteinových směsí a to je jejich velkou výhodou. Nicméně, jak se dá logicky předpokládat, tato metoda není vhodná pro analýzu proteinů, které neobsahují cysteinová rezidua a je limitovaná také pro analýzu postranlačních modifikací proteinů (Bantscheff *et al.*, 2007). Navíc ICAT nepokrývá všechny ztráty a degradace vzorků během přípravy na hmotnostní analýzu (Šebela, 2009).

Jelikož bylo záměrem překonat problém ICAT metody, která cíleně modifikuje pouze cysteinová rezidua proteinů, byly navrženy jiné skupiny značících reagentů, jež jsou zaměřeny na N-konec peptidů a ϵ -amino skupinu lysinových zbytků. Jde o chemické značení ICPL.

1.3.4 ICPL

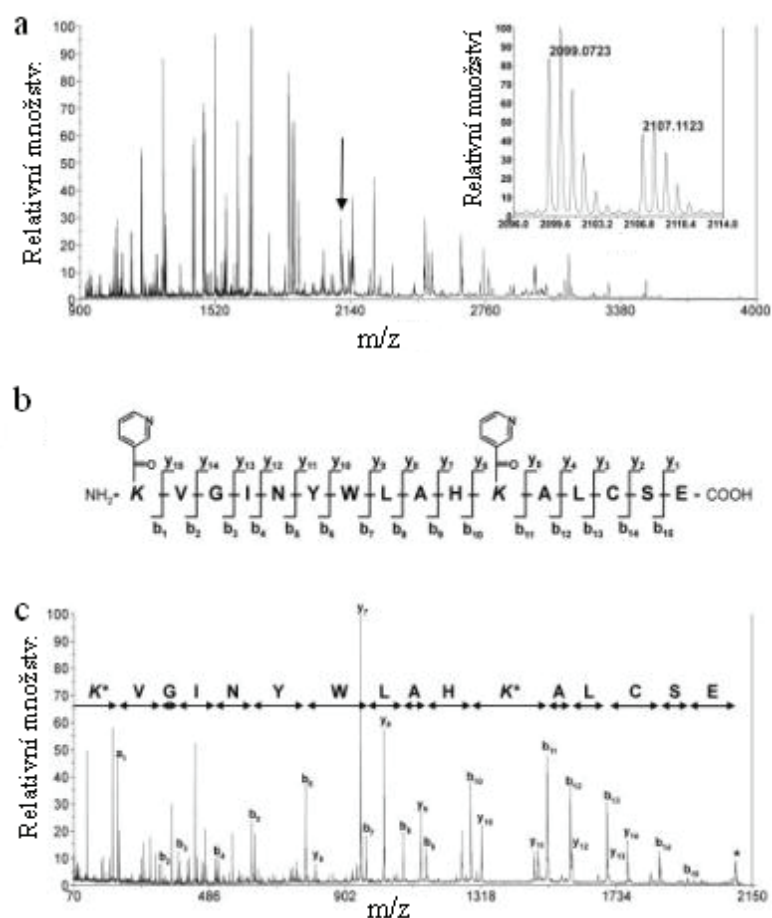
Metoda „Isotope-coded protein label“ (ICPL) umožňuje vysoce přesnou a reproduktivní kvantifikaci proteinů s výrazným sekvenčním pokrytím nepostradatelným pro studium postranlačních modifikací a isoform proteinů. Navíc je ICPL slučitelná s běžně používanými proteinovými a peptidovými separačními postupy (Schmidt *et al.*, 2005).

Pro tuto metodu je použito značení studovaných proteinů ICPL reagentem, který obsahuje buď deuterovanou („těžkou“) či nedeuterovanou („lehkou“) formu N-nikotinoyloxysukcinimidu (Nic-NHS), (Obr. 14). ICPL reagent může být také značen stabilním izotopem uhlíku ^{13}C (Šebela, 2009).



Obr. 14: ICPL reagent. V případě „lehké“ formy $\text{X} = \text{H}$, pokud je použita „těžká“ forma reagentu, $\text{X} = \text{D}$ (Schmidt *et al.*, 2005).

Základem této metody je reakce ICPL reagentu s ϵ -aminoskupinami lysinu a N-terminálními aminoskupinami peptidu, které se provádí před proteolytickým štěpením. Po něm je vzorek analyzován hmotnostní spektrometrií a kvantifikace je opět založena na srovnání intenzit „lehké“ a „těžké“ formy peptidu, který náleží danému proteinu (Šebela *et al.*, 2009). Schématické znázornění kvantitativní a kvalitativní analýzy jednoho standardního proteinu je uvedeno na Obr. 15.

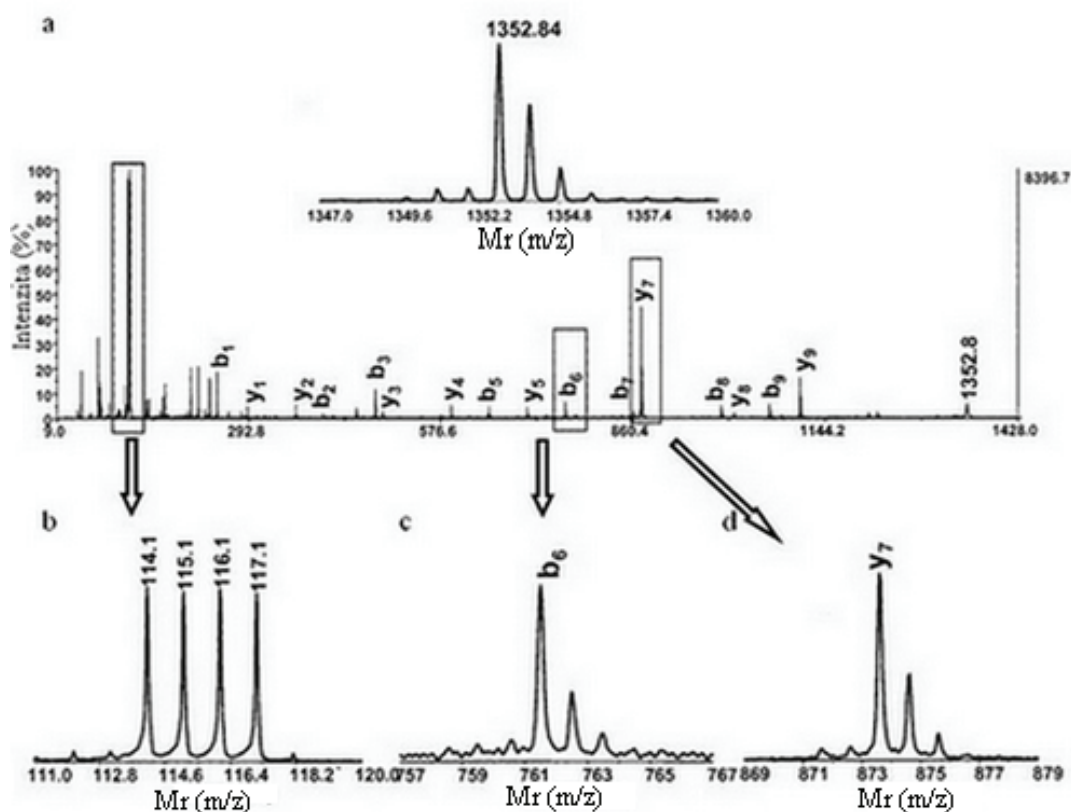


Obr. 15: Schéma hmotnostní analýzy vzorku značeného ICPL reagentem. Jako první je zachyceno hmotnostní spektrum získané ze dvou proteinových směsí, které byly alkylovány a odděleně značeny buď s deuterovanou formou (d4) reagentu, či „lehkou“ formou (d0) Nic-NHS. Vzorky byly poté štěpeny, odsoleny, smíchány a analyzovány MALDI-TOF-MS. Výřez zobrazuje pár píků náležících identickému peptidu z α -laktalbuminu s očekávaným poměrem intenzit rovným 2 (d0/d4) (a). Tento poměr byl použit k určení relativního množství proteinu ve směsi. Obrázek dále zobrazuje předpokládanou sekvenci tohoto dvojité značeného peptidu (b), a jeho fragmentační spektrum z tandemové hmotnostní analýzy, které této sekvenci odpovídá (c), (Schmidt *et al.*, 2005).

Jelikož touto metodou probíhá modifikace na lysinových reziduích, vyskytuje se problém pro štěpení proteinů trypsinem. Tudíž je pro zásadní proteolýzu nutno použít jiný proteolytický enzym. Další nevýhodou této metody je skutečnost, že nepokrývá veškeré ztráty a degradace vzorků během přípravy pro hmotnostní analýzu (Šebela, 2009).

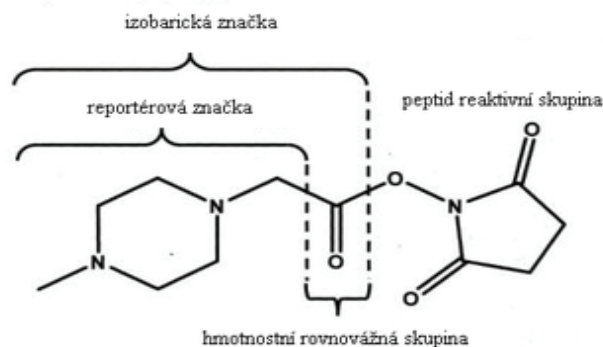
1.3.5 iTRAQ

Asi nejfrekventovanější metodou chemického značení stabilními izotopy je v současné době technika „Isobaric tag for relative and absolute quantitation“ (iTRAQ). Jádrem této metodiky je komplexní systém izobarických reagentů, které poskytují amin-derivatizované peptidy. Tyto peptidy jsou vzájemně nerozlišitelné v hmotnostním spektru, ale jejich fragmentační spektrum vykazuje intenzivní nízkomolekulární MS/MS ionty. Kvantitativní informace je pak získána srovnáním intenzit těchto tzv. reportérových skupin. Tato metoda je tak plně závislá na tandemové hmotnostní spektrometrii (Obr. 16), (Ross *et al.*, 2004).



Obr. 16: Příklad MS/MS spektra prekurzorového iontu s hodnotou m/z 1352,84 ze vzorku, který byl připraven proteolýzou a značením 4 proteinových směsí, které byly následně smíchány v poměru 1:1:1:1 (a). Zvětšena je oblast nízkých molekulových hmotností, ve které se vyskytují ionty jednotlivých reportérových skupin (b) a oblasti pro fragmentové ionty b_6 fragment y_7 (Ross *et al.*, 2004).

Samotné iTRAQ reagenty se skládají z reportérové značky (založenou na *N*-methylpiperazinu), hmotnostní rovnovážné skupiny (karbonyl) a dále peptid-reaktivní skupiny (NHS-ester), (Obr. 17).



Obr. 17: Chemické složení iTRAQ reagentu, (Ross *et al.*, 2004).

Tyto značky pak reagují, stejně jako výše zmiňované ICPL reagenty, s ϵ -aminoskupinami lysinů a N-terminálními aminoskupinami peptidů. V současné době je dostupná verze pro derivatizaci cysteinů, při které je použit iTRAQ reagent s jinou peptid reaktivní skupinou (Šebela, 2009).

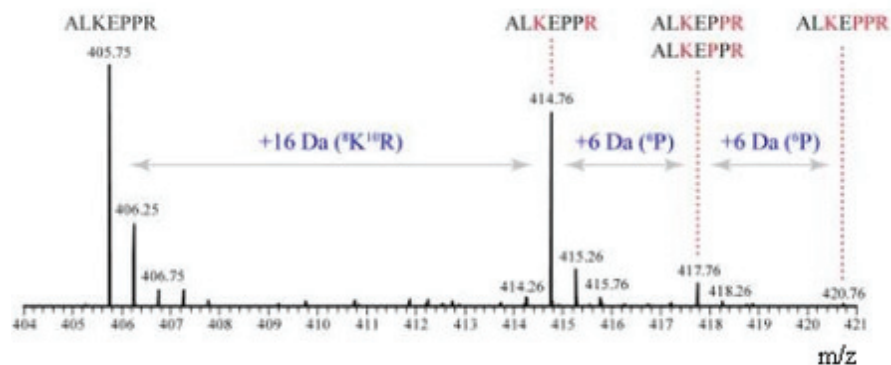
Předností této metody v porovnání s ostatními technikami využívajícími chemické značení je možnost současně analyzovat více jak 8 biologických vzorků v jednom experimentu. (Gouw *et al.*, 2010). Její nevýhodou je fakt, že kvantitativní informace jsou získány pouze pro peptidy, které byly vysaveny fragmentací. Pro kvalitní fragmentaci značených peptidů je také potřebná vyšší energie, v důsledku čehož jsou často získána horší fragmentační spektra. Navíc tato metoda nepokrývá všechny ztráty a degradace vzorků během přípravy na hmotnostní analýzu (Šebela, 2009).

1.3.6 SILAC

Další z populárních metod izotopového značení je „Stabile isotope labeling with amino acids in cell culture“ (SILAC), který našel široké uplatnění pro různé druhy živočišných buněčných linií (Gouw *et al.*, 2010).

Značení v tomto případě ale probíhá metabolicky, přesněji inkorporací izotopově značených aminokyselin, (například $^{13}\text{C}_6$ -lysin, $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -lysin, ^{13}C -arginin, $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -arginin) do všech proteinů v buňkách. Relativní kvantifikace je jako v mnoha jiných případech založena na srovnání intenzit neznačené („lehké“) a značené („těžké“) formy peptidu příslušného proteinu. Identifikace proteinů je pak prováděna „klasicky“, a to s pomocí fragmentace těchto peptidů (Bantscheff *et al.*, 2007).

Princip metody SILAC je naznačen na Obr. 18, kde je zachyceno hmotnostní spektrum neznačeného a dvakrát značeného peptidu (+ 16 Da, těžký lysin a arginin). Ve spektru se také vyskytují nežádoucí dodatkové píky v pozicích odpovídajících začlenění jednoduchého (+ 6 Da) a dvakrát (+ 12 Da) značeného prolinu (Gouw *et al.*, 2010).



Obr. 18: Hmotnostní spektrum peptidu značeného metodou SILAC. Značený arginin může být přeměněn na prolin, v peptidové sekvenci značeno červeně. Výsledkem jsou poté píky, které jsou o 6 Da vyšší než značený peptid (Gouw *et al.*, 2010).

Krijgsveld použil tento princip pro značení proteomu vyšších organismů, když značené buňky *E. coli* v médiu obohaceném ^{15}N použil jako zdroj potravy pro *C. elegans* (Krijgsveld *et al.*, 2003). Analýza proteomu použitím 2-D elektroforézy a MALDI-TOF ukázala 95% inkorporace ^{15}N v první generaci *C. elegans* a zvýšení inkorporace k 98% v druhé generaci. Autoři také úspěšně značili proteom *D. melanogaster* použitím této metody (Martyniuk & Denslow, 2009).

Proces kvantifikace proteinů metodou SILAC může být proveden použitím standardního vybavení a postupů uskutečnitelných ve většině proteomických laboratoří a může být rychle osvojen (Gouw *et al.*, 2010). Navíc tato metoda umožňuje porovnávat až 3 nezávislé vzorky a pokrývá všechny ztráty a degradace vzorků během přípravy na hmotnostní analýzu u obou vzorků současně (Šebela, 2009).

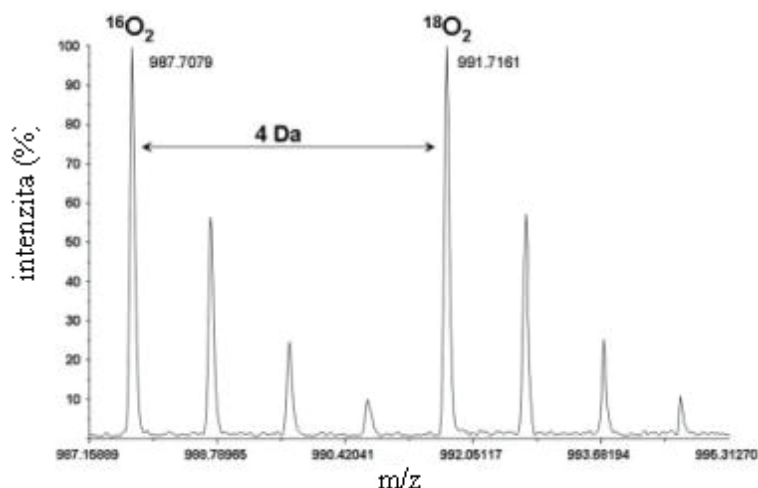
Její nevýhodou je ale použití značených aminokyselin pouze pro živočišné buněčné linie a tak nelze tuto metodu uplatnit pro jiné typy vzorků. Dále nastává také problém s překrýváním píků v hmotnostním spektru při analýze komplexních vzorků, kdy je však možná kvantifikace za pomoci ostatních peptidů daného proteinu (Šebela, 2009).

1.3.7 Kvantifikace s pomocí ^{18}O

Principem této metody je značení během proteolytického štěpení proteinu, kdy je do vznikajícího peptidu enzymaticky inkorporován ^{18}O . Metoda tak umožňuje porovnávání dvou vzorků, kdy první vzorek je štěpen v roztoku obsahujícím vodu s atomem ^{16}O . Druhý vzorek je naopak štěpen s pufrem obsahujícím H_2^{18}O . Různé proteolytické enzymy pak vnáší rozdílný počet značených atomů ^{18}O (Šebela, 2009).

Například pokud je pro proteolytické štěpení proteinu použit trypsin, dochází k výměně 2

^{16}O atomů za 2 ^{18}O atomy na C-terminálním karboxylu proteolytických peptidů s výsledným posunutím spektra o 4 Da mezi ^{16}O a ^{18}O značeným peptidem, jak zachycuje Obr. 19 (Ye *et al.*, 2009).



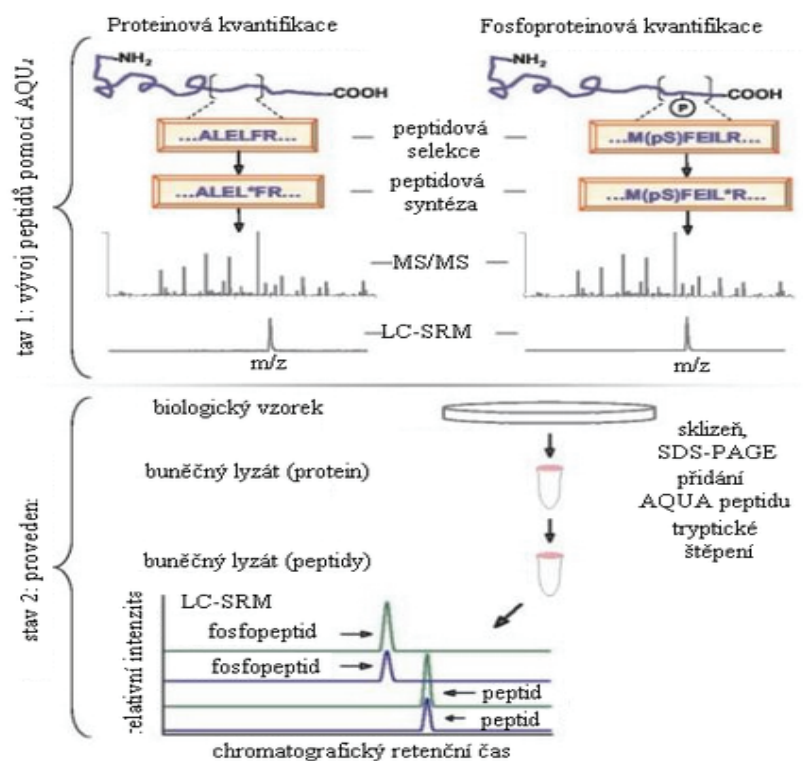
Obr. 19: Detail hmotnostního spektra naměřeného při kvantifikaci proteinů pomocí ^{18}O (Ye *et al.*, 2009).

Tato metoda však nepokrývá veškeré degradace a ztráty vzorku, které mohou nastat při jeho přípravě pro hmotnostní analýzu. Při nekompletní inkorporaci ^{18}O do molekuly vznikajících peptidů také není možná přesná kvantifikace. Proto je vždy nutná optimalizace podmínek pro dosažení kompletní inkorporace molekul ^{18}O pro každý protein (Šebela, 2009).

1.3.8 AQUA

Metoda „Absolute **q**uantification of **a**bundance“, (AQUA) je vhodná jak pro kvantifikaci proteinů, tak i jejich postranlačních modifikací. Velkou výhodou je také možnost analýzy minoritních proteinů v komplexní směsi. Metoda AQUA totiž oplývá značnou citlivostí (kvantifikovat lze i subfemtomolární množství studovaných proteinů), (Ottens *et al.*, 2007).

Kvantifikace je založena na organické syntéze izotopově (^{13}C , ^{15}N) značených peptidů, interních standardů, které odpovídají peptidům vznikajícím proteolytickým štěpením sledovaného proteinu. Peptid vhodný pro kvantifikaci je vybrán na základě předběžných experimentů, při kterých jsou optimalizovány podmínky analýzy (Šebela, 2009). Princip kvantifikace pak spočívá ve srovnání intenzit iontů vybraného peptidu a jeho interního standardu. Pro absolutní kvantifikaci daného proteinu je pak nutné nejprve sestavit kalibrační křivku připraveného standardu (Martyniuk & Denslow, 2009). Schéma metody AQUA je zachyceno na Obr. 20.



Obr. 20: Schéma metody AQUA (Gerber *et al.*, 2003).

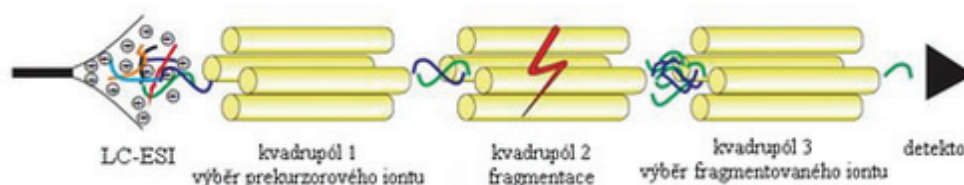
Nevýhodou metody je to, že pro proteiny, které mají být kvantifikovány, musí být známa sekvence. Tudiž AQUA neumožňuje sledovat globální změny u neznámých proteinů a peptidů ve vzorku. Navíc, vybrané peptidy by neměly obsahovat methionin a tryptofan, které se oxidují během ionizace elektrosprejem (Šebela, 2009).

1.3.9 SRM

Metoda „Selected reaction monitoring“ (SRM) jinak nazývaná také „Multiple reaction monitoring“ (MRM) byla vyvinuta jako technika, která umožňuje spolehlivou kvantifikaci i při nízkém množství analytu v proteinové směsi. Principiálně je podobná metodě AQUA, protože pro kvantifikaci cílových proteinů slouží vybrané peptidy, které vznikají jejich štěpením zvoleným proteolytickým enzymem. Není však nutné, aby byly syntetizované peptidy izotopicky značeny. Navíc pro kvantifikaci postačí i peptidy surové, nepurifikované, které jsou finančně daleko dostupnější (Picotti *et al.*, 2010).

Pro tento typ kvantifikace se používají hmotnosní spektrometry typu trojitý kvadrupól. Základem analýzy je výběr předdefinovaného prekurzorového iontu (peptidu) a jednoho jeho fragmentu dvěma filtry trojitého kvadrupólu. První a třetí kvadrupól přístroje fungují jako filtry specificky vybírající předdefinované hodnoty m/z odpovídající peptidovému iontu a specifickému fragmentu tohoto peptidu, zatímco druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela (Obr.

21). Na rozdíl od ostatních technik založených na hmotnostní analýze se při této metodě nezaznamenává plné hmotnostní spektrum analyzované směsi. Tím se zvyšuje citlivost celé analýzy o jeden až dva řády a roste i dynamický rozsah (Lange *et al.*, 2008). Série přechodů (hodnot m/z páru prekurzor/fragmentovaný iont) v kombinaci s retenčním časem cílového peptidu pak zajišťují absolutní specifitu celé analýzy.



Obr. 21: SRM/MRM analýza na přístroji typu trojitý kvadrupól. Několik analytů je eluováno z chromatografického systému. Výběr specifické m/z v prvním kvadrupólu odstraní většinu koelujících se iontů, zůstávají pouze ty, které mají specifickou molekulovou hmotnost. V druhém kvadrupólu poté dochází k fragmentaci všech dosud prošlých analytů a třetím kvadrupólem projde pouze fragmentový iont s definovanou hodnotou m/z , na obrázku značený zeleně (Lange *et al.*, 2008).

SRM může být také použita ke specificky cíleným kvantifikacím postranlačních modifikací, jakými jsou fosforylace (Unwin *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2006), ubiquitinylation (Mollah *et al.*, 2007) či acetylace (Griffiths *et al.*, 2007).

Nevýhody této techniky jsou pak zcela totožné s nevýhodami metody AQUA.

Experimentální část

2.1 Chemikálie

Agarosa (Invitrogen), aceton (Lach-Ner), acetonitril (Sigma-Aldrich), akrylamid (Serva), apoferitin (ICN Biomedicals Inc.), *N,N'*-methylenbisakrylamid (Serva), Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (Bio-Rad) a IPG Buffer pH 4-7 (GE Healthcare), bromfenolová modř (Sigma-Aldrich), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva), Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Scientific), dialyzační membrána šířka 33 mm (Sigma-Aldrich), DeStreak reagent (Amersham Biosciences), 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences), dihydrogenfosforečnan draselný (Fluka), dithiotreitol (Serva), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Fluka), dodecylsírán sodný (Serva), dusičnan stříbrný (Lach-Ner), ECL Western Blotting Substrate (Pierce), ethanol (Penta), kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich), fenol pufrovaný pomocí Tris na pH 8,0 (Sigma-Aldrich), fenylmethylsulfonylfluorid (Sigma-Aldrich), fluorid sodný (Fluka), formaldehyd (Sigma-Aldrich), glycerol (Sigma-Aldrich), glycin (Serva), hovězí pankreatický trypsin modifikovaný rafinosou poskytnutý Prof. Mgr. Markem Šebelou, Dr., hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich), hydrogenuhlíčan amonný (Sigma-Aldrich), hydroxid amonný (Merck), CHAPS (Calbiochem), chlorid draselný (Lach-Ner), chlorid hořečnatý (Lach-Ner), chlorid-chlornan sodný (komerčně dostupné SAVO), chlorid sodný (Sigma-Aldrich), chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich), kyselina chlorovodíková (Lach-Ner), iodoacetamid (Fluka), IPG stripy (GE Healthcare), izotopově značený [³H]benzyladenopurin připravený v Izotopové laboratoři ÚEB AV ČR, α -kyano-4-hydroxyskořicové kyselina (Bruker Daltonics), 2-merkptoethanol (Carl Roth GmbH+Co.KG), methanol (Lach-Ner), minerální olej (Bio-Rad), kyselina mléčná (Sigma-Aldrich), močovina (Sigma-Aldrich), kyselina mravenčí (Riedel-de Haën®), myoglobin (ICN Biomedicals Inc.), *n*-butylalkohol (Lach-Ner), nitroceluloseová membrána 30 cmx3,5m (Bio-Rad), octan amonný (Fluka), kyselina octová (Lach-Ner), kyselina orthofosforečná (Lach-Ner), ortovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich), ovalbumin (Sigma-Aldrich), oxid titaničitý (GL Sciences Inc.), peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich), Ponceau (Sigma-Aldrich), polyvinylpolypropylidon (Sigma-Aldrich), propan-2-ol (Merck), Roche Inhibitor Cocktail (Roche), sacharosa (Fluka), scintilační roztok ULTIMA GOLD (Packard BioScience), Serdolit MB-1 (Serva), síran amonný (Lach-Ner), směs proteinových standardů (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa, 161-0363, Bio-Rad), standardní směsi Glu¹-Fibrinopeptidu (Sigma-Aldrich), *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (Carl Roth GmbH+Co.KG), thiosíran disodný (Lach-Ner), kyselina trifluoroctová (Fluka), kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich), Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (Fluka), thiomčovina (Fluka), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva), Tween 20 (MP Biomedicals, Inc.), uhličitan draselný bezvodý (Fluka).

2.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy AE240 S (Mettler-Toledo, Praha, Česká republika), centrifuga mini spin (Eppendorf, Hamburg, Německo), centrifuga 5415R (Eppendorf, Hamburg, Německo), centrifugační vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Německo), elektroforetická cely Mini PROTEAN® 3 a Tetra (Bio-Rad, Philadelphia, USA), elektromagnetická míchačka (Biosan Laboratories Inc., Warren, USA), ELISA reader Sunrise® Remote (Tecan Trading AG, Männedorf, Švýcarsko), fotoaparát Camedia C-7070Wide Zoom (Olympus, Tokyo, Japonsko), hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 (Bruker Daltonics, Brémy, Německo), hmotnostní spektrometr Q-TOF Micro (Waters, Milford, USA), hmotnostní spektrometr UHR-q-TOF maXis (Bruker Daltonics, Brémy, Německo), HPLC (Waters, Milford, USA), IPGphor Ettan™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko), klima komora MLR-351H (Sanyo, Etten-Leur, Holandsko), LC/MS (Waters, Milford, USA), laminární box Horizontal Basis (Thermo Scientific, Mnichov, Německo), laminární box Steril-VBH (Schoeller, Zwolle, Holandsko), magnetické míchadlo MM4 (Lavita a.s., Radim u Kolína, Česká republika), magnetické míchadlo MR (Heidolph, Schwabach, Německo), mikrovlnná trouba ZMC19M (Zanussi, Pordenone, Itálie), míchadlo Multi-Rotar PRS-22 (Biosan Laboratories Inc., Warren, USA), mikroskop STM 723 (Kapa, Bratislava, Slovensko), nanoHPLC NanoEasy (Proxeon, Odense Dánsko), orbitální třepačka OS-10 (Biosan Laboratories Inc., Warren, USA), PCR centrifuga (MPV Med. Instruments, Varšava, Polsko), pHmetr Microprocessor pH 211 (Hanna Instruments, Damašek, Sýrie), pipety (Eppendorf, Hamburg, Německo), program pro vyhodnocení naskenovaných gelů MagicScan Version V4,6 (UMAX Technologies, Dallas, USA), předvážky 440-33N (Kern, Hampshire, Velká Británie), Q-TOF Micro MS (Waters, Milford, USA), rehydratační kazeta (Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko), skener ImageScanner II (Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko), spektrofotometr Helios Beta (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA), scintilátor LS 6500 (Beckman, Brea, USA), termoblok (Major Sciences, Saratoga, USA), thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo), transiluminátor basic 2 (KAISER, Buchen, Německo), třepačka REAX Top (Heidolph, Schwabach, Německo), třepačka Thermo-Shaker TS-100 (Biosan Laboratories Inc., Warren, USA), ultrazvuková lázeň RK 31 (Schalltec, Mörfelden, Německo), vyvolávací automat Dür XR-24 (DÜRR DENTAL, Bietigheim, Německo), zdroje vysokého napětí PowerPac™ Basic a PowerPac™ HC (Bio-Rad, Philadelphia, USA).

2.3 Složení roztoků používaných pro jednotlivé experimenty

Pufry použité pro jednotlivé extrakční postupy

SDS pufr: 40 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 50 mM DTT, směs inhibitorů cOmplete (Roche) ředěná dle návodu výrobce, 1 mM PMSF, 1 mM fluorid sodný, 1

mM ortovanadičnan sodný

Močovinový pufr: 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 2M močovina, 10% (v/v) glycerol, 65 mM DTT, směs inhibitorů cOmplete (Roche) ředěná dle návodu výrobce, 1 mM PMSF, 1 mM fluorid sodný, 1 mM ortovanadičnan sodný

Extrakce kyselinou trichloroctovou: 10% (w/v) kyselina trichloroctová v acetonu; 0,2% (w/v) DTT v acetonu

Extrakční pufr pro fenolickou extrakci: 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM chlorid draselný, 5 mM ethylendiamintetraoctová kyselina, 1% (w/v) DTT, 30% (w/v) sacharosa, směs inhibitorů cOmplete (Roche) ředěná dle návodu výrobce, 1 mM PMSF, 1 mM fluorid sodný, 1 mM ortovanadičnan sodný; fenol pufrovaný pomocí Tris na pH 8,0; 100 mM octan amonný v methanolu

KCl pufr pro frakcionační extrakci: 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM chlorid draselný, 5 mM kyselina ethylendiamintetraoctová, směs inhibitorů cOmplete (Roche) ředěná dle návodu výrobce, 1 mM PMSF, 1 mM fluorid sodný, 1 mM ortovanadičnan sodný

Techniky určené pro separaci proteinových směsí

SDS-PAGE

2x koncentrovaný vzorkovací pufr: 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-merkapt ethanol, 0,01% (w/v) bromfenolová modř

Roztoky pro přípravu gelů: akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid (T 30%, C 2,67%); 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 10% (w/v) SDS; 10% (w/v) APS; vodou saturovaný n-butanol

Elektrodový pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycín, 0,1% (w/v) SDS

2-D elektroforéza

R2D2 pufr: 5 M močovina, 2 M thiomočovina, 2% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) SB 3-10, 20 mM DTT, 5 mM TCEP, 0,5% (v/v) amfolyty 4-7, 0,25 % (v/v) amfolyty 3-10, směs inhibitorů cOmplete (Roche) ředěná dle návodu výrobce, 1 mM PMSF, 1 mM fluorid sodný, 1 mM ortovanadičnan sodný

DeStreak reagent: DeStreak 15 mg/ml

Ekvilibrační roztok: 6 M močovina, 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 1,5 M Tris/HCl pH 8,8,

0,5% (v/v) bromfenolová modř;

1% (w/v) DTT, 4% (w/v) IAM

Roztok pro fixaci IPG stripu: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) agarosa, 0,025% (w/v) bromfenolová modř

Detekce proteinů

Barvení proteinů dusičnanem stříbrným

Fixační roztok: 30% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Oplach: 20% (v/v) ethanol

Roztok pro zcitlivění gelu: 0,02% (v/v) thiosíran disodný

Barvicí roztok: 12 mM dusičnan stříbrný

Vyvolávací roztok: 3% (w/v) uhličitan draselný, 3 mM formaldehyd, 50 μ M thiosíran disodný

Stop roztok: 4% (w/v) Tris, 2% (v/v) kyselina octová

Barvení proteinů barvivem Coomasie Brilliant Blue

Zásobní roztok Coomasie Brilliant Blue: 12,5% (v/v) kyselina fosforečná, 12,5% (w/v) síran amonný, 0,15% (w/v) Coomasie Brilliant Blue G-250

Odbarvovací roztok: 10% (v/v) kyselina octová

Western blot a imunodetekce CBF-1

Blotovací pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin

Roztok Ponceau S: 0,5% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) ledová kyselina octová

PBS, pH 7,4-7,5: 8% (w/v) chlorid sodný, 0,2% (w/v) chlorid draselný, 2,9% (w/v) dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, 0,3% (w/v) dihydrogenfosforečnan draselný

PBS s Tweenem: 1x koncentrovaný PBS, 0,1% (v/v) Tween 20

5% mléko v 1x koncentrovaném PBS, 0,1% (v/v) Tween 20

0,5% (v/v) luminol, 0,5% (v/v) peroxid

Štěpení proteinů

Štěpení proteinů v roztoku pro MRM kvantifikaci CBF-1

6 M močovina, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM dithitritol, Tris/HCl pH 8,0; 200 mM IAM, Tris/HCl pH 8,0; roztok trypsinu o koncentraci 50 ng/ μ l; roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 0,2 μ g/ μ l

Štěpení proteinů v gelu

Odbarvovací roztok: 50% (v/v) acetonitril, 100 mM hydrogenuhličitan amonný

Redukční činidlo: 10 mM DTT, 100 mM hydrogenuhličitan amonný

Alkylační činidlo: 55 mM IAM, 100 mM hydrogenuhličitan amonný

Štěpící pufr: 20 ng/μl trypsin, 20 mM hydrogenuhličitan amonný, 1 mM chlorid vápenatý

Extrakční pufr: 30% (v/v) acetonitril, 5% (v/v) kyselina mravenčí

Příprava vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií

Čištění peptidů

5% (v/v) kyselina mravenčí; 50% (v/v) methanol, 2,5% (v/v) kyselina mravenčí

Extrakce fosfopeptidů

80% (v/v) acetonitril, 0,2% (v/v) trifluoroctová kyselina

80% (v/v) acetonitril, 2% (v/v) trifluoroctová kyselina

Suspenze oxidu titaničitého: 10% (w/v) oxid titaničitý, 80% (v/v) acetonitril, 0,2% (v/v) trifluoroctová kyselina

Roztok kyseliny mléčné 1: 30% (w/v) kyselina mléčná, 80% acetonitril, 0,2% trifluoroctová kyselina

Roztok kyseliny mléčné 2: 30% (w/v) kyselina mléčná, 80% acetonitril, 2% trifluoroctová kyselina

0,6% (v/v) hydroxid amonný

Analýza hmotnostní spektrometrií

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

0,1% (v/v) kyselina trifluoroctová

Roztok matrice α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny: 0,5% α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 2,5% (v/v) trifluoroctová kyselina, acetonitril

Identifikace proteinů pomocí LC/MS

0,5% (v/v) kyselina mravenčí, kalibrační roztok Glu¹-Fibrinopeptidu o koncentraci 1 pmol/μl

Pufr A: 2% (v/v) acetonitril, 0,5% (v/v) kyselina mravenčí

Pufr B: 80% (v/v) acetonitril, 0,5% (v/v) kyselina mravenčí

Kvantifikace proteinů MRM metodou

0,5 % kyseliny mravenčí

Pufr A: 2% (v/v) acetonitril, 0,5% (v/v) kyselina mravenčí

Pufr B: 80% (v/v) acetonitril, 0,5% (v/v) kyselina mravenčí

Rovnovážná dialýza rostlinného materiálu

Extrakční pufr: 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM chlorid draselný, směs inhibitorů cOmplete (Roche) ředěná dle návodu výrobce, 1 mM PMSF

Dialyzační pufr: 25 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM chlorid draselný, 2,5 mM chlorid hořečnatý, 2 mM chlorid vápenatý, 1 mM DTT

Klíčení obilíků pšenice seté a kukuřice seté

Sterilizace obilíků: 8% (v/v) chlorid-chlornan sodný

Použité experimentální metody

3.1 Databázové vyhledávání

Pro podrobnou proteomickou charakterizaci CBF-1 byla nejprve vyhledána jeho pravděpodobná sekvence. K tomu byla použita sekvence jeho vazebného místa Ala-Phe-Leu-Gln-Pro-Ser-His-His-Asp-Ala-Asp-Glu nalezeného Edmanovým sekvenováním (Brinegar *et al.*, 1988), která byla vložena do algoritmu BLAST (verze 2.2.19, **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) v databázi NCBI. Konkrétně byla použita varianta „tblastn“, která umožňuje prohledat zadanou aminokyselinovou sekvenci a převést ji do pořadí nukleotidů, a v konkrétním okně pro specifikaci organismu byla zadána pšenice setá. Získaná nukleotidová sekvence byla na závěr prostřednictvím programu BioEditu převedena do aminokyselinové sekvence proteinu a uložena ve formátu FASTA.

3.2 Příprava rostlinného materiálu a zavedení jednotlivých extrakčních metod

Jako materiál pro jednotlivé typy extrakcí byly použity obilky pšenice seté (*Triticum aestivum*) a kukuřice seté (*Zea mays*). Provedeny byly tyto extrakční postupy: extrakce pomocí dodecylsiranu sodného (SDS), močoviny (Hurkman & Tanaka, 2007), 10% (w/v) kyseliny trichloroctové (TCA) v acetonu (Carpentier *et al.*, 2005), fenolu (Isaacson *et al.*, 2006) a frakcionace proteinů na základě jejich rozpustnosti v různých pufrch (Hurkman & Tanaka, 2007).

Proteinové pelety z provedených extrakcí byly rozpuštěny v pufrch podle typu příslušné analýzy a poté byla vždy stanovena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Takto připravené a charakterizované vzorky byly rozalikvotovány a skladovány při -20 °C až do provedení příslušné analýzy.

3.2.1 Extrakce dodecylsíranem sodným

Pro tuto metodu bylo použito 50 mg obilek, které byly rozetřeny ve třecí míse pod kapalným dusíkem. Takto připravený materiál byl rozsuspendován v 800 µl SDS pufru a následně inkubován 1 hodinu za stálého míchání (1200 rpm) při 25 °C v thermomixeru Eppendorf. Nerozpuštěný materiál byl poté odstraněn centrifugací (16000 g, 4 °C po dobu 10 minut). Proteiny obsažené v získaném supernatantu byly precipitovány přidávkou vychlazeného acetonu o objemu čtyřnásobku objemu supernatantu. Pro účinnější vysrážení proteinů byl takto připravený vzorek inkubován přes noc při -20 °C. Druhý den byla provedena centrifugace (16000 g, 4 °C, 10 minut) a supernatant byl odstraněn odpipetováním. Proteinový pelet byl následně vysušen v exikátoru (Hurkman & Tanaka, 2007).

3.2.2 Extrakce močovinou

50 mg obilek bylo rozetřeno ve třetí misce pod kapalným dusíkem. Homogenizovaný materiál byl poté rozsuspendován ve 200 µl močovinného pufru. Suspenze byla v tomto pufru inkubována 1 hodinu za stálého míchání (1200 rpm) v thermomixeru Eppendorf, při 25 °C a nerozpuštěný materiál byl následně odstraněn centrifugací (16000 g, 4 °C, 10 minut). K supernatantu byl přidán vychlazený aceton o objemu čtyřnásobku objemu supernatantu a vzorek byl takto inkubován přes noc při -20 °C. Po ukončení inkubace byla provedena centrifugace (16000 g, 4 °C, 10 minut) a supernatant byl následně odstraněn. Výsledný proteinový pelet byl vysušen v exikátoru (Hurkman & Tanaka, 2007).

3.2.3 Extrakce pomocí 10% (w/v) kyseliny trichloroctové v acetonu

Pod kapalným dusíkem bylo ve třetí misce rozetřeno 50 mg obilek, ke kterým byly přidány 2 ml vychlazeného roztoku 10% (w/v) TCA v acetonu s 0,2% (w/v) dithiotreitolu (DTT). Rozetřený materiál byl v tomto roztoku rozsuspendován pomocí pipety a inkubován přes noc při -20 °C. Poté byla provedena centrifugace (16000 g, 4 °C, 30 minut), supernatant byl odpipetován a k rozetřeným obilkám byl přidán 1 ml vychlazeného acetonu s 0,2 % (w/v) DTT. Vzorek byl promíchán a inkubován 1 hodinu při -20 °C. Opět byla provedena centrifugace (16000 g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl odpipetován a k proteinovému peletu byl přidán 1 ml vychlazeného acetonu s 0,2% (w/v) DTT. Vzorek byl důkladně promíchán vortexováním a naposledy centrifugován (16000 g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl odpipetován a pelet byl následně vysušen v exikátoru (Carpentier *et al.*, 2005).

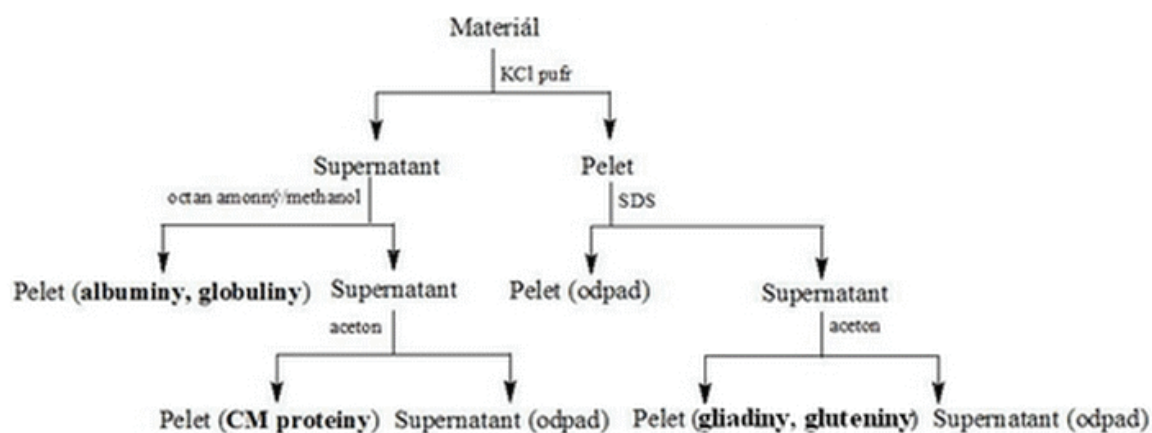
3.2.4 Extrakce fenolická

150 mg obilek bylo rozetřeno ve třetí misce pod kapalným dusíkem a poté k nim bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného extrakčního pufru a vzniklá směs byla míchána 30 sekund. Poté bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného fenolu pufrovaného pomocí Tris na pH 8,0 a vzorek byl dále míchán po dobu 15 minut při 4 °C. Následně byla provedena centrifugace (6000 g, 4 °C, 5 minut). Fenolická (horní) fáze byla přemístěna do čisté 2 ml mikrozkušavky. K ní bylo opět napipetováno 0,5 ml vychlazeného extrakčního pufru, vzniklá směs byla míchána po dobu 30 sekund a poté centrifugována (6000 g, 4 °C, 5 minut). Fenolická fáze byla přemístěna do čisté 2 ml mikrozkušavky a orientačně byl změřen její objem. Pro precipitaci proteinů byl k fenolické fázi přidán vychlazený roztok 100 mM octanu amonného v methanolu o objemu pětinašobku objemu fenolické fáze a vzorek byl pro účinnější precipitaci inkubován přes noc při -20 °C. Následující den byl vzorek centrifugován (16000 g, 4 °C, 10 minut) a supernatant byl poté odpipetován. K proteinovému peletu byl přidán vychlazený methanol o objemu dvojnásobku objemu fenolické fáze a vzorek byl jemně promíchán vortexováním. Opět byla provedena centrifugace (16000 g, 4 °C, 10 minut) a supernatant byl odpipetován. Toto promytí

proteinového peletu vychlazeným methanolem bylo zopakováno a následně provedeno ještě jedenkrát, tentokrát s použitím vychlazeného acetonu. Promytý proteinový pelet byl na závěr vysušen v exikátoru (Isaacson *et al.*, 2006).

3.2.5 Frakcionace proteinů na základě jejich rozpustnosti

50 mg obílek bylo podrceno ve třecí misce pod tekutým dusíkem a rozsuspendováno ve 200 µl chlazeného KCl pufru. Vzniklá suspenze byla inkubována s občasným promícháním 5 minut při 4 °C. Poté byla provedena centrifugace (14500 g, 4 °C, 15 minut) a supernatant (KCl-rozpustná frakce) byl přepipetován do čisté 2 ml mikrozkušavky. Pelet (KCl-nerozpustná frakce) byl rozsuspendován v 800 µl SDS pufru a inkubován 1 hodinu za stálého míchání (1200 rpm) v thermomixeru Eppendorf při 25 °C. Následně byla provedena centrifugace (16000 g, 25 °C, 10 minut) a získaný supernatant byl poté přepipetován do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Proteiny rozpuštěné v SDS pufru byly precipitovány přidávkou čtyřnásobného množství vychlazeného acetonu a inkubovány přes noc při -20 °C. Po ukončení inkubace byl vzorek centrifugován (14500 g, 4 °C, 15 minut), supernatant byl odstraněn pipetováním a pelet byl propláchnut pomocí 800 µl vychlazeného acetonu. Proteinový pelet byl poté vysušen v exikátoru. K supernatantu z prvního kroku (KCl- rozpustná frakce) byl přidán roztok 100 mM octanu amonného v methanolu o objemu pětinasobku objemu supernatantu. Takto byl vzorek inkubován přes noc při -20 °C. Následně byla provedena centrifugace (14500 g, 4 °C, 15 minut) a pelet obsahující methanol-nerozpustné proteiny byl promyt vychlazeným acetonem a vysušen v exikátoru. Proteiny obsažené v supernatantu (methanol-rozpustná frakce) byly precipitovány přidáním 4,8 ml vychlazeného acetonu, centrifugovány a získaný pelet byl promyt vychlazeným acetonem a vysušen v exikátoru (Hurkman & Tanaka, 2007). Obr. 22 představuje schéma celé frakcionace.



Obr. 22: Schéma frakcionace proteinů na základě jejich rozpustnosti. Tento extrakční postup vede k získání tří samostatných frakcí bohatých na albuminy a globuliny, CM proteiny a gliadiny a gluteniny (upraveno podle Hurkman & Tanaka, 2007).

Obr. X: Schéma frakcionace proteinů na základě jejich rozpustnosti. Tento extrakční postup vede k získání tří samostatných frakcí bohatých na albuminy a globuliny, CM proteiny a gliadiny a gluteniny (upraveno podle Hurkman & Tanaka, 2007).

3.3 Stanovení koncentrace proteinů

3.3.1 2-D Quant Kit

Na počátku celého postupu byla připravena kalibrační řada za pomoci roztoku BSA o koncentraci 2 mg/ml (Tab. 4), který je součástí použitého setu. Pro stanovení koncentrace proteinů bylo vždy použito 2,5 μ l od každého vzorku, přičemž samotné stanovení bylo vždy provedeno ve třech opakováních.

Tab. 4: Příprava kalibrační křivky. Do zkumavky s daným číslem bylo pipetováno uvedené množství roztoku BSA.

Číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6
Objem roztoku BSA (μ l)	0	5	10	15	20	25
Množství proteinu (μ g)	0	10	20	30	40	50

Po přípravě kalibrační řady bylo do každé mikrozkušavky přidáno 500 μ l precipitačního

roztoku a vzniklá směs byla jemně promíchána a inkubována při laboratorní teplotě 3 minuty. Do všech mikrozkušavek bylo poté přidáno 500 µl ko-precipitačního roztoku, vzorky byly jemně promíchány a následně centrifugovány (10000 g, 25 °C, 5 minut). Supernatant byl odpipetován a k peletům bylo následně napipetováno 100 µl roztoku obsahujícího měďnaté ionty a 400 µl destilované vody. Po důkladném promíchání byl do všech vzorků přidán 1 ml pracovního roztoku, skládajícího se z reagentu A a reagentu B v objemovém poměru 100 : 1. Poté byly vzorky inkubovány 20 minut při 25 °C. Po uplynutí stanovené doby byla na spektrofotometru změřena absorbance při 480 nm, jako blank byla použita destilovaná voda.

3.3.2 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové

Pro zhotovení standardních roztoků hovězího sérového albuminu (BSA) byl použit jeho zásobní roztok o koncentraci 2 mg/ml, který je součástí použitého setu. Jednotlivé standardní roztoky byly poté připraveny ředěním, které je popsáno v níže uvedené tabulce (Tab. 5).

Tab. 5: Příprava standardních roztoků BSA. Standardní roztoky A-C byly připraveny pomocí zásobního roztoku BSA (ZR), ostatní vznikly ředěním těchto roztoků.

Mikrozkušavka	Objem destilované vody (µl)	Objem (µl) a zdroj roztoku BSA	Finální koncentrace BSA (µg/ml)
A	0	300 ZR	2 000
B	125	375 ZR	1 500
C	325	325 ZR	1 000
D	175	175 B	750
E	325	325 C	500
F	325	325 E	250
G	325	325 F	125
H	400	100 G	25
I	400	0	0

Pro stanovení proteinů bylo použito 5 µl standardu BSA či roztoku vzorku, přičemž samotné stanovení bylo pro každý vzorek provedeno ve třech opakováních. Jako blank pro vzorky sloužil příslušný pufr, v kterém byly tyto vzorky rozpuštěny. Připravené standardní roztoky BSA a vzorky byly nejprve napipetovány do jednotlivých jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky a následně k nim bylo přidáno 250 µl činidla Bradfordové (Bradford, 1976). Destička byla poté vložena do thermomixru Eppendorf nastaveného na 25 °C, promíchána (350 rpm, 5 sekund) a následně inkubována při výše uvedené teplotě 10 minut. Po uplynutí požadované doby byla mikrotitrační destička opět promíchána (350 rpm, 25 °C, 5 sekund) a absorbance při 595 nm byla změřena pomocí Elisa readeru.

3.4 Techniky určené pro separaci proteinových směsí

3.4.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného

Vypočtené objemy jednotlivých vzorků byly nejprve napipetovány do 0,5 ml mikrozku mávek. Pokud se jednalo o vzorky proteinů rozpuštěné ve vodných pu frech, byly tyto vzorky smíchány s 2 x koncentrovaným redukčním vzorkovacím pu frem. V případě, že se jednalo o proteiny již dříve rozpuštěné v redukčním vzorkovacím pu fru (např. proteinové pelety po příslušných extrakcích), následovala přímo jejich krátká centrifugace (10000g, 25 °C, 5 minut). Poté byla provedena inkubace při 95 °C po dobu 5 minut a opětovná centrifugace (10000g, 25 °C, 5 minut).

Pro separaci proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) byly nejprve podle následujícího postupu připraveny polyakrylamidové gely.

Tab. 6: Složení gelů pro SDS-PAGE. Uvedená množství jednotlivých komponent slouží pro přípravu 2 polyakrylamidových gelů.

12% dělicí gel					
Destilovaná voda (ml)	Akrylamid/bis (ml)	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)	10% (w/v) SDS (ml)	TEMED (μl)	10% (w/v) APS (μl)
3,4	4	2,5	0,1	5	50
4% zaostřovací gel					
Destilovaná voda (ml)	Akrylamid/bis (ml)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (ml)	10% (w/v) SDS (ml)	TEMED (μl)	10% (w/v) APS (μl)
6,1	1,3	2,5	0,1	10	50

Po napipetování příslušných objemů jednotlivých komponent dělicího gelu (Tab. 6), zatím bez přídavku TEMEDu a APS, bylo provedeno odvzdušnění vzniklé směsi. Poté byl k roztoku připipetován TEMED a polymerace gelu byla zahájena přídavkem APS (Tab. 3). Následně byl roztok rychle promíchán a napipetován do prostoru mezi skla upevněná v nalévacích stojanech, načež byl roztok převrstven vodou saturovaným n-butanolem. Po ukončení polymerace byl n-butanol odsán pomocí filtračního papíru a podle stejného postupu byl připraven roztok pro zaostřovací gel (Tab. 3). Po zahájení polymerace byl tento roztok opět rychle promíchán a napipetován mezi skla na povrch dělicího gelu. Na závěr byl mezi skla vložen hřebínek sloužící k vytvoření jamek pro vzorky. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byla

skla s připravenými gely vložena do elektroforetické cely, která byla poté naplněna elektrodovým pufrem. Připravené proteinové vzorky byly následně aplikovány do jamek zaostřovacího gelu, elektroforetická cela byla připojena ke zdroji vysokého napětí a separace byla zahájena s nastavením napětí na 90 V. Po doputování zóny bromfenolové modři do dělícího gelu bylo napětí nastaveno na 120 V (Laemmli, 1970).

3.4.2 Dvoudimenzionální elektroforéza

3.4.2.1 Rehydratace stripů

Požadované množství IPG stripů s rozsahem pH 3-10 a délkou 7 cm bylo ponecháno volně na skleněné podložce při laboratorní teplotě po dobu 5 min, aby došlo k jejich rozmrazení. Mezitím byla rehydratační kazeta vyvážena pomocí vodováhy a do jednotlivých jamek této kazety bylo následně napipetováno 130 μ l R2D2 pufru. Po rozmrznutí IPG stripů byla z jejich povrchu odstraněna krycí plastová fólie a stripy byly gelovou stranou položeny do jamek rehydratační kazety obsahujících R2D2 pufr tak, aby v prostoru mezi pufrem a stripem nevznikly vzduchové bubliny. V jamce byl následně strip převrstven 2,5 ml minerálního oleje. Strip byl v rehydratační kazetě poté ponechán přes noc.

3.4.2.2 Isoelektrická fokusace

Rehydratovaný IPG strip byl vyjmut z rehydratační kazety, opláchnut destilovanou vodou a opatrně osušen filtračním papírem. Poté byl strip položen do IPGphoru a na jeho + konec byl přitlačen kalíšek určený pro nanášení vzorku. Následovala kontrola těsnosti kalíšku, která byla provedena pomocí minerálního oleje. Pokud bylo vše v pořádku (minerální olej z kalíšku nevytékal, ani do něj z vnějšího prostředí neprosakoval), bylo do kalíšku aplikováno 75 μ l vzorku. Vzorek spolu s IPG stripem poté byly převrstveny 100 μ l, resp. 4,3 ml minerálního oleje. Následně byly připraveny elektrodové papírky. Na jeden bylo napipetováno 150 μ l deionizované vody a tento papírek byl umístěn na + konec stripu. Na druhý papírek bylo aplikováno 150 μ l roztoku přípravku DeStreak. Následně byl papírek položen na - konec stripu. Na elektrodové papírky byly poté přiloženy elektrody, na IPGphoru byl navolen program, který zachycuje Tab. 7, a byla zahájena isoelektrická fokusace. Po skončení fokusace byly stripy okapány na filtračním papíře, uloženy do ekvilibrační kazety a až do dalšího použití skladovány při -80°C.

Tab. 7: Jednotlivé kroky isoelektrická fokusace stripů.

Krok	Typ	Napětí (V)	Čas (min)
1	izokratický	100	30
2	izokratický	300	30
3	izokratický	500	30
4	gradientový	3000	90
5	izokratický	3000	6000 Vhr
6	gradientový	500	5

3.4.2.3 Ekvilibrace stripů

Pro ekvilibraci stripů byl nejprve připraven ekvilibrační roztok obsahující 1% (w/v) DTT a také ekvilibrační roztok se 4% (w/v) iodoacetamidem (IAM). Následně byly z hlubokomrazicího boxu vytaženy IPG stripy, které byly ponechány 10 minut při laboratorní teplotě. Do příslušného počtu jamek čisté ekvilibrační kazety bylo poté napipetováno 2,5 ml ekvilibračního roztoku s 1% (w/v) DTT. Stripy byly opláchnuty destilovanou vodou a uloženy do jamek ekvilibrační kazety tak, aby volně plavaly pod hladinou roztoku DTT. V tomto roztoku byly IPG stripy inkubovány za stálého míchání po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby byl do dalších jamek napipetován ekvilibrační roztok obsahující 4% (w/v) IAM, stripy byly do tohoto roztoku přemístěny a inkubovány za stálého míchání dalších 15 minut. Před ukončením alkylation byl do 100 ml odměrného válce připraven elektrodový pufr. Po skončení alkylation byly stripy vytáhnuty z jamek a opláchnuty v připraveném pufru. Následně byly okapány na filtrační papír a umístěny mezi skla na povrch polyakrylamidového gelu (viz. níže).

3.4.2.4 SDS-PAGE

Pro druhý rozměr 2-D elektroforézy byly připraveny 12 % polyakrylamidové gely bez použití zaostřovacích gelů (Tab. 8).

Tab. 8: Složení gelů pro SDS-PAGE. Uvedená množství roztoků slouží pro přípravu 2 gelů o rozměru 8 x 6 cm.

12% dělicí gel					
Destilovaná voda (ml)	Akrylamid/bis (ml)	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)	10% (w/v) SDS (ml)	TEMED (μl)	5% (w/v) APS (μl)
3,4	4	2,5	0,1	5	50

Po napipetování příslušných objemů jednotlivých komponent roztoku pro přípravu dělicích gelů (vyjma TEMEDu a APS) byla směs odvzdušněna ve vakuu. Následně byl do

roztoku přidán TEMED a pro zahájení polymerace APS. Roztok byl rychle promíchán a napipetován mezi skla upevněná v nalévacích stojanech, v kterých byl roztok převrstven vodou saturovaným n-butanolem. Po ukončení polymerace byl n-butanol odsán pomocí filtračního papíru. Nad povrch připraveného gelu byl umístěn ekvilibrovaný IPG strip a oba jeho plastové konce byly odštíženy nůžkami. Dále byl připraven filtrační papírek s markerem molekulových hmotností a také byla rozežráta 0,5% (w/v) agarosa s přídavkem 0,025% (w/v) bromfenolové modři (BPB). Prostor mezi polyakrylamidovým gelem a IPG stripem byl následně zaplněn tímto roztokem (cca 550 μ l) a strip byl rychle a opatrně posunut laboratorní špachtlí na povrch gelu. Mezi skla byl pinzetou vložen také filtrační papírek s markerem molekulových hmotností, a to těsně vedle zanořeného stripu. Po ztuhnutí agarosy byla sestavena elektroforetická cela a do ní byly gely s aplikovanými IPG stripy vloženy. Následně byl vnitřní prostor cely naplněn elektrodovým pufrem a byla zahájena samotná elektroforetická separace. Pro tu byly na zdroji vysokého napětí nastaveny následující parametry: proud 5 mA/gel po dobu prvních 45 minut, po zbytek separace byl poté nastaven proud 10 mA/gel.

Po skončení separace byly proteiny buď detekovány příslušným barvením, nebo byl proveden Western blot.

3.5 Detekce proteinů

3.5.1 Barvení proteinů dusičnanem stříbrným

Po celou dobu barvení byly roztoky s gely míchány na laboratorné třepačce. Na každý gel bylo použito 100 ml příslušného roztoku. Prvním krokem v procesu barvení byla fixace gelů, která byla prováděna přes noc. Následně byl fixační roztok vyměněn za nový a fixace pokračovala další hodinu. Poté byly gely postupně promyty ve 20% (v/v) ethanolu a destilované vodě, přičemž každý promývací krok trval 10 minut a byl proveden dvakrát. Dalším krokem byla 1 minutu trvající inkubace gelů v 0,02% (w/v) thiosíranu sodném, po které následoval oplach gelů destilovanou vodou prováděný dvakrát po dobu 1 minuty. Následně byly gely 20 minut barveny v roztoku 12 mM dusičnanu stříbrného. Po této době byly gely krátce (10 sekund) promyty v destilované vodě a vloženy do vyvolávacího roztoku. V tom byly gely inkubovány do doby, než dosáhlo zbarvení proteinových bandů (spot) optimální intenzity. Gely byly poté přeneseny na 30 minut do stop roztoku a posledním krokem celého postupu byl proplach gelů destilovanou vodou (Chevallet *et al.*, 2006).

3.5.2 Barvení proteinů barvivem Coomassie Brilliant Blue

Přibližně 15 minut před ukončením SDS-PAGE byl připraven barvicí roztok smícháním zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue (CBB) a methanolu v objemovém poměru 4:1. Barvicí roztok byl následně promíchán na elektromagnetické míchačce. Po ukončení

elektroforetické separace byly gely velmi krátce opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do barvicího roztoku CBB. Skleněná nádoba s gelem byla položena na laboratorní třepačku, kde byly gely za stálého míchání inkubovány přes noc. Po ukončení barvení byl gel opláchnut destilovanou vodou a umístěn do odbarvovacího roztoku. Ten byl podle potřeby vyměňován za nový. Po ukončení inkubace v odbarvovacím roztoku byl gel vložen do destilované vody a několikrát v ní krátce promyt (Candiano *et al.*, 2004).

3.6 Western blot a imunodetekce CBF-1

Nejméně 30 minut před provedením této metody byla přichystána nitrocelulosaová membrána, která byla ponořena do blotovacího pufru. V něm byla membrána ponechána až do zahájení finálních příprav pro samotné blotování. Ihned po ukončení elektroforetické separace byla připravena blotovací kazeta skládající se ze 2 porézních podložek, 2 filtračních papírů, polyakrylamidového gelu obsahujícího rozdělené proteiny a nitrocelulózové membrány. Kazeta byla sestavena v plastové nádobě za přítomnosti menšího množství blotovacího pufru. Na spodní, černou část kazety byla položena porézní podložka, na kterou byl vložen filtrační papír. Po nasáknutí filtračního papíru blotovacím pufrem byl na jeho povrch položen gel. Následně byla na gel umístěna membrána, filtrační papír a porézní podložka a před zavřením kazety byly z jejího vrstveného obsahu vytlačeny vzduchové bubliny. Nakonec byla kazeta uzavřena přitlačením červené strany na vnitřní vrstvený obsah a zasunuta do nosiče určeného pro Western blot tak, aby černá část kazety byla otočena k černé části nosiče. Takto připravená blotovací aparatura byla následně umístěna do elektroforetické cely a zalita blotovacím pufrem. Za aparaturu byl do cely vložen chladicí blok a cela byla umístěna na elektromagnetickou míchačku. Zdroj vysokého napětí byl nastaven na konstantní proud 290 mA po dobu 2 hodin a byl zahájen přenos proteinů. Aby nedocházelo k přehřívání blotovací aparatury, byl přibližně po 1 hodině chladicí blok vyměněn za nový. Po ukončení přenosu proteinů byla aparatura rozebrána a membrána byla nabarvena roztokem barviva Ponceau S. Poté bylo přebytečné barvivo z membrány opláchnuto destilovanou vodou a membrána byla vysušena na filtračním papíře. Příslušná část membrány vybraná pro imunodetekci CBF-1 byla vyříznuta skalpelem a zcela odbarvena v roztoku PBS. Následně byla přenesena do roztoku 5% (w/v) mléka s 0,1% (v/v) Tweenem, ve kterém byla inkubována 1 hodinu. Po zablokování byla membrána opláchnuta v roztoku PBS. Mezitím byla pro detekci CBF-1 přichystána primární polyklonální protilátka Rabbit Sera AFL, která byla 1000 x naředěna v 5% (w/v) mléku s 0,1% (v/v) Tweenem (objem roztoku protilátky byl zvolen podle rozměru membrány). Membrána byla po opláchnutí v roztoku PBS krátce okapána na filtračním papíře a poté byla vložena do uzavíratelné plastové nádoby. Následně na ní byl nanesen roztok zředěné primární protilátky a s ním byla membrána inkubována přes noc při 4 °C. Následující den byla membrána promývána nejprve 5 minut v roztoku PBS, dále 5 minut v roztoku PBS s 0,1% (v/v) Tweenem, 5 minut v

roztoku PBS a na závěr opět 10 minut v roztoku PBS. Během posledního oplachu byla stejným způsobem jako primární protilátka připravena sekundární polyklonální protilátka SWAR/Px. Propláchnutá membrána byla krátce okapána na filtračním papíře a položena do plastové nádoby. Na membránu byl napipetován roztok sekundární protilátky a takto byla provedena inkubace při laboratorní teplotě 1 hodinu. Po uplynutí této doby byla membrána opět intenzivně promývána, a to 10 minut v roztoku PBS, 5 minut v roztoku PBS s 0,1% (v/v) Tweenem a na závěr 5 a 10 minut v roztoku PBS. Po promytí membrány byla provedena detekce chemiluminiscencí se zviditelněním na filmu. Detekce byla provedena ve tmě ve fotokomoře, kde byla membrána položena na podložku s plastovou fólií. Pro samotnou detekci byl použit chemiluminiscenční substrát ECL. Po nanesení tohoto roztoku na membránu byla provedena inkubace při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Přebytek roztoku byl odsán filtračním papírem a na membránu byla položena potravinová fólie. Na závěr byla provedena expozice na film (délka expozice byla zvolena dle potřeby).

3.7 Štěpení proteinů

3.7.1 Štěpení proteinů v roztoku pro MRM kvantifikaci CBF-1

Pro MRM kvantifikaci CBF-1 byly proteiny z výchozího materiálu (50 mg obilí pšenice seté (*Triticum aestivum*) nebo kukuřice seté (*Zea mays*) extrahovány pomocí pufru obsahujícího močovinu (detailní postup viz. kapitola 3.2.2 Extrakce močovinou). Získané proteinové pelety byly poté rozpuštěny v Tris/HCl pufru, pH 8,0 s 6 M močovinou a v takto získaných vzorcích byla stanovena koncentrace proteinů za pomoci 2-D Quant Kitu (kapitola 3.3.1. 2-D Quant Kit). Pro všechny vzorky byl pak vypočítán objem příslušného vzorku obsahující 100 µg proteinů a tento objem byl napipetován do 1,5 ml mikrozkušavky. K tomuto množství vzorku bylo připipetováno 5 µl roztoku BSA o koncentraci 0,2 µg/µl (celkově tedy 1 µg BSA) a vzorek byl doplněn Tris/HCl pufrem, pH 8,0 s 6 M močovinou do celkového objemu 100 µl. Vzorky byly promíchány a krátce centrifugovány na PCR centrifuze. Ke vzorkům bylo připipetováno 5 µl roztoku DTT a vzorky byly následně promíchány a znovu krátce centrifugovány na PCR centrifuze. Následně byly vzorky vloženy do thermomixeru Eppendorf a inkubovány při 56 °C, 30 minut. Po uběhnutí stanovené doby byly vzorky ochlazeny pod tekoucí vodou a ke každému z nich bylo přidáno 20 µl roztoku IAM. Vzorky byly poté promíchány a krátce centrifugovány na PCR centrifuze. Následná inkubace s IAM probíhala 30 minut při 25 °C za tmy. Poté bylo ke každému vzorku napipetováno 20 µl roztoku DTT a vzorky byly promíchány a krátce centrifugovány na PCR centrifuze. Opětovná inkubace s DTT probíhala stejně jako v prvním případě 30 minut při 56 °C. Pro naředění močoviny bylo ke vzorkům přidáno 755 µl destilované vody a poté 100 µl roztoku trypsinu. Vzorky byly na závěr opět promíchány a krátce centrifugovány v PCR centrifuze. Takto přichystané vzorky byly vloženy do thermomixeru

Eppendorf a inkubovány přes noc při 37 °C.

Další den byly vzorky okyseleny pomocí 50 µl kyseliny mravenčí, promíchány a krátce centrifugovány v PCR centrifuze. Následně byly ze vzorku odpipetovány dva alikvoty o objemu 105 µl a ty byly přečištěny na reverzní (C18) fázi (postup viz, níže). Zbytek vzorku byl zamražen při -20 °C.

3.7.2 Štěpení proteinů v gelu

Celý proces štěpení byl prováděn ve flow-boxu pro zamezení kontaminace vzorku. Gel s nabarvenými proteiny byl opláchnut v destilované vodě a poté umístěn na skleněnou podložku na transiluminátor. Příslušné bandy (spoty) byly skalpelem vyříznuty a umístěny do 1,5 ml mikrozkušavky. Poté byl(a) vyříznutý(á) band (spota) skalpelem rozdělen(a) na menší kousky a zkumavka obsahující gelové kousky byla krátce centrifugována v PCR centrifuze. Ke kouskům gelu bylo následně připipetováno 100 µl odbarvovacího roztoku a v něm byly gelové kousky inkubovány 15 minut za stálého míchání (1000 rpm) v thermomixeru Eppendorf při 25 °C. Supernatant byl poté odpipetován do odpadu a celý odbarvovací krok byl proveden ještě jednou. Do mikrozkušavky s kousky gelu byl poté přidán acetonitril o čtyřnásobku objemu gelových kousků. Následně byla provedena inkubace po dobu 5 minut za stálého míchání (1400 rpm) v thermomixeru Eppendorf při 25 °C. Po skončení inkubace byl acetonitril odstraněn pipetováním a dehydrované kousky gelu byly vysušeny při laboratorní teplotě ve flow-boxu. Pro provedení redukce bylo do mikrozkušavky ke gelovým kouskům napipetováno 100 µl redukčního činidla a v něm byly gelové kousky inkubovány 30 minut v thermomixeru Eppendorf při 56 °C. Poté byl supernatant odpipetován do odpadu a opět byla provedena dehydratace kousků gelu. Ke gelovým kouskům bylo dále přidáno 100 µl alkylačního činidla s následnou inkubací 20 minut ve tmě v thermomixeru Eppendorf při 25 °C. Po skončení alkylation byla provedena dehydratace kousků. V závěru celého postupu byly kousky gelu promyty ve 100 µl roztoku pufru používaného pro enzymatické štěpení (inkubace trvající 15 minut za stálého míchání, 1400 rpm při 25 °C) v thermomixeru Eppendorf. Na samotný závěr byla zopakována rehydratace a pro vlastní enzymatické štěpení bylo použito 30 µl štěpícího pufru obsahujícího trypsin, který byl přidán k dehydratovaným gelovým kouskům. V tomto roztoku byla provedena dehydratace kousků gelu při 4 °C inkubací trvající 45 minut. Vlastní enzymatické štěpení probíhalo v thermomixeru Eppendorf přes noc při 37 °C.

Extrakce peptidů byla provedena přidáním 100 µl extrakčního pufru ke kouskům gelu, načež byly kousky sonikovány 1 minutu v ultrazvukové lázni. Po této době byla provedena centrifugace v PCR centrifuze a gelové kousky byly inkubovány 30 minut za stálého míchání (1400 rpm) v thermomixeru Eppendorf při 37 °C. Vzorky byly opět krátce centrifugovány v PCR centrifuze a supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkušavky. Ke kouskům gelu bylo dále připipetováno 100 µl extrakčního pufru a celý postup extrakce byl znovu opakován.

Výsledný supernatant byl přidán k supernatantu z prvního kroku a získaný extrakt byl odpařen ve vakuové centrifugační odparce (Schevchenko *et al.*, 2006).

3.8 Příprava vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií

3.8.1 Čištění peptidů

Pro čištění peptidů byly použity zastřižené špičky GELoader Tips, do kterých byla vložena C18 fáze a které byly upevněny do 1,5 ml mikrokumavek. Špičky byly poté i s mikrozkušavkami umístěny do stolní centrifugy. K odparkům bylo přidáno 50 µl 5% (v/v) mravenčí kyseliny a vzniklá směs byla inkubována 5 minut za stálého míchání (1400 rpm) v thermomixeru Eppendorf při 25 °C. Po inkubaci byla dále provedena sonikace po dobu 5 minut a po jejím uplynutí byla směs krátce centrifugována v PCR centrifuze. Nad reverzní fázi bylo poté napipetováno 40 µl propan-2-olu a poté byla provedena centrifugace (4000 rpm, 25 °C, 5 minut). Následně byla reverzní fáze ekvilibrována 40 µl kyseliny mravenčí, opět s pomocí krátké centrifugace (2000 rpm, 25 °C, 5 minut). Tento krok byl zopakován ještě jednou. Špička s reverzní fází byla poté upevněna do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, do špičky byl napipetován připravený vzorek a byla provedena centrifugace (1000 rpm, 25 °C, 10 minut). Reverzní fáze byla následně za pomoci centrifugace (2000 rpm, 25 °C, 10 minut) promyta 40 µl kyseliny mravenčí. Špička s reverzní fází byla přemístěna do čisté 0,5 ml mikrozkušavky a mikrozkušavka obsahující veškerý roztok, který při nanášení vzorku a promývání reverzní fáze protekl, byla uskladněna při -20 °C. Zachycené peptidy byly pomocí centrifugace (2000 rpm, 25 °C, 10 minut) eluovány 40 µl roztoku methanolu a kyseliny mravenčí. Eluce byla následně zopakována. Po provedení eluce byly vzorky odpařeny ve vakuové centrifugační odparce a odparky byly až do analýzy hmotnostní spektrometrií uskladněny při -20 °C (Rappsilber *et al.*, 2007).

3.8.2 Extrakce fosfopeptidů

Pro extrakci fosfopeptidů byl použit oxid titaničitý. Nejprve byla ale do zastřižených špiček GELoader Tips vložena C8 reverzní fáze a takto připravené špičky byly upevněny do 1,5 ml mikrokumavek. Špičky byly i s mikrozkušavkami umístěny do stolní centrifugy. Na analytických vahách bylo poté odváženo 30 mg oxidu titaničitého, který byl rozsuspendován ve 300 µl roztoku acetonitrilu s kyselinou mravenčí. 30 µl této suspenze bylo napipetováno do špiček nad C8 reverzní fázi a byla provedena centrifugace (2000 rpm a 25 °C, trvající 5 minut). Poté byla usazená suspenze oxidu titaničitého promyta 40 µl roztoku kyseliny mléčné 1 s 5 minutovou centrifugací při 2000 rpm a 25 °C. K odparkům peptidů po enzymatickém štěpení bylo napipetováno 40 µl roztoku kyseliny mléčné 2, vzniklá směs byla poté promíchána vortexováním a krátce centrifugována na PCR centrifuze. Následně byla směs sonikována po

dobu 5 minut, promíchána a krátce centrifugována na PCR centrifuze. Rozpuštěné vzorky byly přepipetovány do připravených a promytých mikrokolonek a byla provedena centrifugace (1000 rpm a 25 °C, 10 minut). Poté byly mikrokolonky postupně promyty 40 µl roztoku kyseliny mléčné 1, 40 µl roztoku 80% (v/v) acetonitrilu s 0,2% (v/v) trifluoroctové kyseliny a 30 µl destilované vody. Každé z těchto promytí bylo provedeno s pomocí 10 minut trvající centrifugace při 2000 rpm a 25 °C. Pro eluci peptidů byla použita čistá 0,5 ml mikrozkušavka, do které bylo předem napipetováno 30 µl 5 % (v/v) kyseliny trifluoroctové. Vlastní eluce byla provedena 50 µl 0,6% (v/v) hydroxidu amonného. Po napipetování tohoto objemu hydroxidu do mikrokolony byla provedena centrifugace (2000 rpm a 25 °C, 10 minut). Na závěr byla mikrokolona promyta 30 µl 80% (v/v) acetonitrilu s 0,2% (v/v) trifluoroctové kyseliny, opět za pomoci 10 minutové centrifugace při 2000 rpm a 25 °C (Rappsilber *et al.*, 2007). Obě získané frakce (obsahující fosorylované a nefosorylované peptidy) byly po odpaření na vakuové centrifugační odparce přečištěny způsobem popsáným v kapitole 3.8.1 Čištění peptidů (viz. výše).

3.9 Analýza hmotnostní spektrometrií

3.9.1 Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Pro analýzu MALDI-TOF MS byl připraven terčík MSP 96, který byl jemně mechanicky očištěn od předchozích vzorků a prachu jemným ubrouskem a následně opláchnut pod tekoucí vodou. Poté byl 15 minut sonikován v ultrazvukové lázni ve 100 ml roztoku 50% (v/v) methanolu a nakonec osušen proudem dusíku. K odparkům vzorků po přečištění bylo přidáno 10 µl roztoku 0,1% (v/v) kyseliny trifluoroctové a byla provedena sonikace trvající 5 minut. Po sonikaci byly vzorky centrifugovány na PCR centrifuze. 0,6 µl roztoku připraveného vzorku bylo napipetováno na terčík. K roztoku vzorku bylo následně připipetováno 0,6 µl roztoku matrice (α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny). Terčík byl ponechán při laboratorní teplotě několik minut, aby došlo ke kokrytalizaci nanesených vzorků s matricí. Pro kalibraci přístroje byla na terčík stejným způsobem nanесena směs peptidových standardů. Po jejich zaschnutí byla destička vložena do přístroje. Pro analýzu byl použit přístroj MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 vybavený zdrojem iontů microScout a 337 nm dusíkovým laserem. Přístroj byl nastaven v reflekttronovém módu pro pozitivně nabitě ionty. Parametry přístroje pro následující analýzu byly stanoveny takto: akcelerační elektrické napětí 19 kV, extrakční napětí 16,1 kV, napětí aplikované na čočky bylo 9,1 kV a reflekttronové napětí bylo nastaveno na 20 kV s opožděnou dobou extrakce 250 ns. Pro identifikaci proteinu bylo na přístroji nastaveno 100-200 laserových střel. Nejprve byla provedena kalibrace přístroje a poté bylo měřeno hmotnostní spektrum nanesených vzorků. Získaná spektra byla zpracována programem flexAnalysis 2.4 a analyzována softwarem Biotools 3.2. Identifikace byla provedena

proti uživatelské databázi obsahující vyhledané proteinové sekvence CBF-1 a jeho homologů, sekvenci trypsinu, BSA a sekvence lidských keratinů použitím algoritmu Mascot běžícím na lokálním serveru Mascot Server 2.2. Parametry pro vyhledávání byly: kladně nabitě inoty nesoucí jeden náboj; karbamidomethylace cysteinu jako fixní modifikace; oxidace methioninu jako variabilní modifikace; proteolytický enzym trypsin; jedno vynechané štěpení; hmotnostní tolerance 100 ppm.

3.9.2 Identifikace proteinů pomocí LC-MS

Připravené vzorky byly analyzovány UHR-MS maXis systémem spojeným s kapilární kapalinovou chromatografií vybavenou automatickým dávkovačem vzorků. Před měřením vzorků byl MS systém kalibrován použitím standardní směsi Glu¹-Fibrinopeptidu. Přechištěné a odpařené vzorky byly rozpuštěny v 10 µl 0,5% (v/v) kyseliny mravenčí. Následně byly vzorky nastříknuty v objemu 4 µl do nano-LC systému a přímo naneseny na nanokapilární kolonu o rozměru 75 µm x 100 mm plněnou 5 µm C18 AQ částicemi. Kolona byla poté ekvilibrována pufr A 20 minut s průtokem 350 nl/minutu. Peptidy byly poté separovány binárním gradientem dlouhým 90 minut. Pro analýzu byl navolen gradient: 0 – 5 min pufr A, 5 – 10 min lineární zvýšení pufru B až k 10%, 10 – 90 min lineární zvýšení pufru B až k 60 %, 90 – 95 min konstantní hodnoty B při 60 %, 95 – 100 min lineární snížení k 0 % B, 100 – 120 min reekvilibrace kolony pro uvedení analýzy. Separované peptidy byly eluovány do MS systému a při MS analýze byly ionty tříděny v MS modu v rozsahu 350 – 2000 m/z za 0,5 s cyklu. MS/MS data byla pořízena v rozsahu 80-2000 m/z pro pět nejintenzivnějších iontů s nábojem 2 a 4 s cyklem trvajícím 1 s pro analýzu vybraného iontu. Všechny prekurzorové ionty skenované v MS/MS modu byly vyloučeny z další fragmentace další 2 minuty s hmotnostním rozsahem 1,5 Da.

Surová data byla zpracována softwarem Mascot Distiller 2.2, který vygeneroval datový soubor mgf obsahující seznam odpovídajících prekursorů a jejich fragmentů. Identifikace proteinů byla provedena na základě algoritmu Mascot běžícím na lokálním serveru Mascot Server 2.2 proti uživatelské databázi obsahující všechny nalezené proteinové sekvence náležící CBF-1 a jeho homologům. Tato databáze byla doplněna také sekvencemi dalších doprovodných proteinů, jakými jsou například lidské keratiny, trypsin či BSA. Parametry pro vyhledávání byly následující: proteolytický enzym trypsin; jedno vynechané štěpení; fixní modifikace karbamidomethylace cysteinu; variabilní modifikace oxidace methioninu a deaminace asparaginu a guanidinu. Pro analýzu byla nastavena hmotnostní tolerance v MS módu 50 ppm a v MS/MS módu 0.05 Da, typ instrumentu: ESI-Q-TOF.

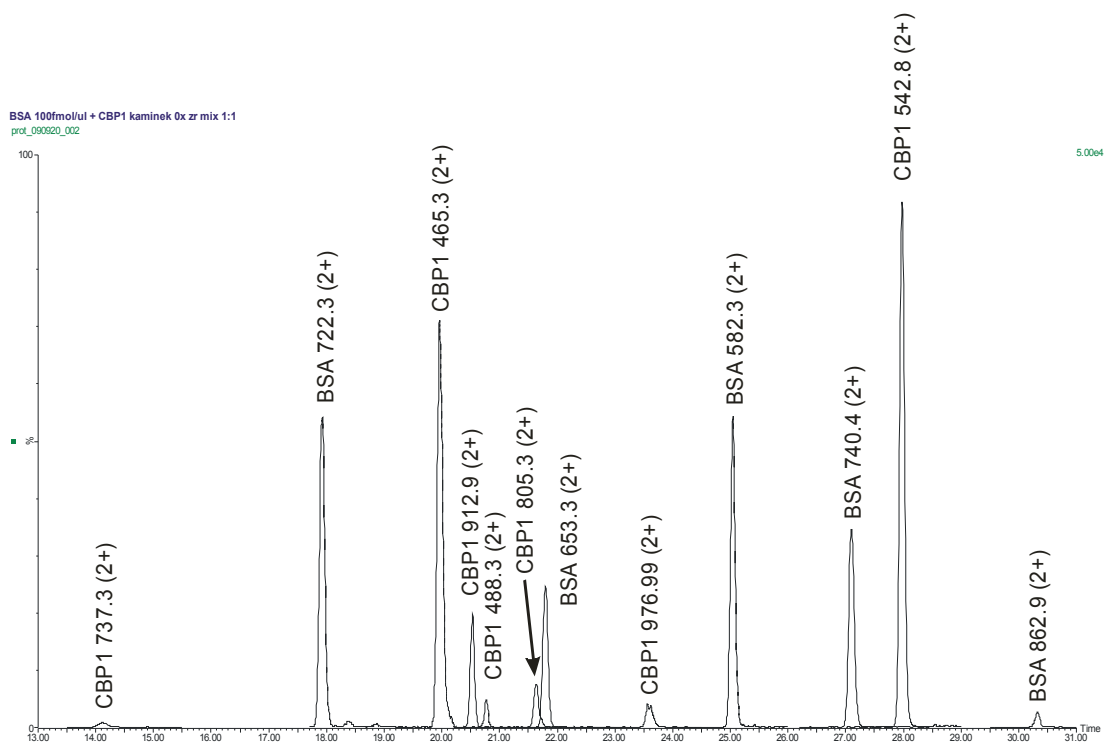
Veškerá měření na hmotnostním spektrometru provedl Mgr. René Lenobel, Ph.D.

3.9.3 Kvantifikace proteinů MRM metodou

Relativní kvantifikace CBF-1 z pšenice a CBP z kukuřice byly provedeny metodou “Multiple reaction monitoring” (MRM) s využitím hmotnostního analyzátoru typu trojitého kvadrupólu. Tato metoda umožňuje přímé měření obsahu sledovaného proteinu v komplexním proteolyticky naštěpeném extraktu proteinů bez jakékoliv předchozí purifikace žádaného proteinu. Metoda byla předem vyvinuta a optimalizována Mgr. René Lenobelem, Ph.D. na extrahovaném CBF-1 proteinu.

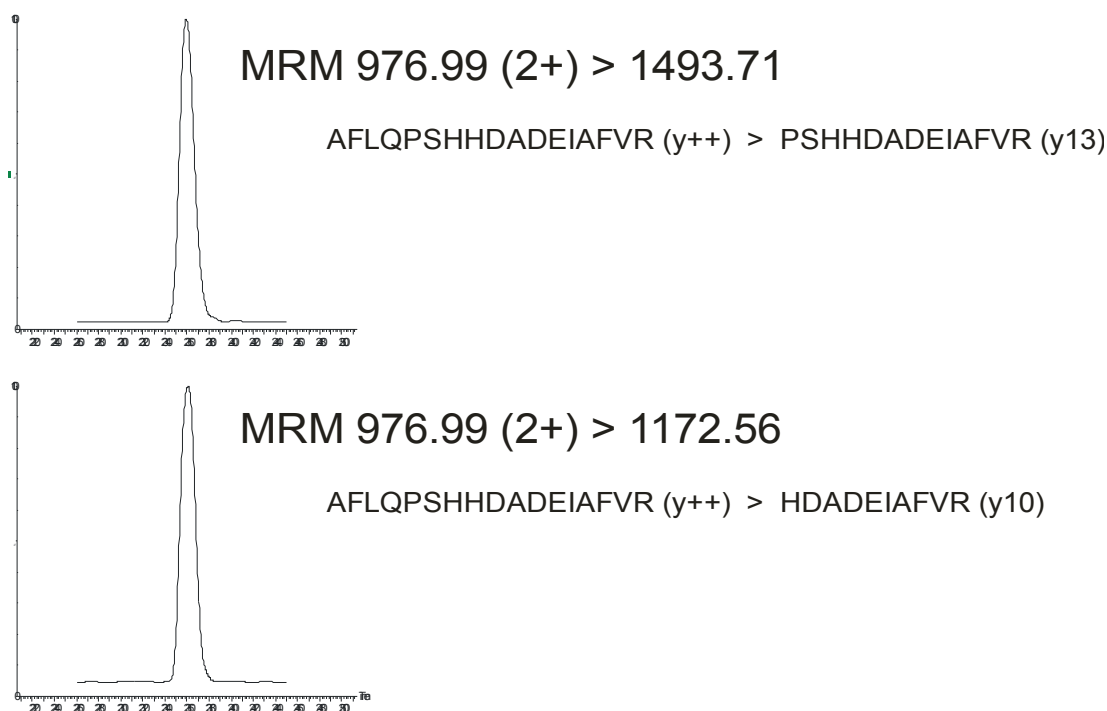
Naštěpené a přečištěné lyzáty proteinových extraktů pšenice a kukuřice byly analyzovány pomocí kapilární kapalinové chromatografie spojené s nanoESI zdrojem a trojitým kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Vzorky byly rozpuštěny v 15 μ l 0,5 % kyseliny mravenčí (FA). 5 μ l rozpuštěného vzorku bylo nanášeno na analytickou kolonu obsahující reverzní fázi 150 $\times$ 0,3 mm plněnou 4 μ m částicemi (Jupiter 4U Proteo 90^a, Phenomenex). Dělení peptidů probíhalo 45 min s gradientovou elucí o těchto parametrech: 0-5 min 98% pufr A a 2% pufr B; následoval lineární nárůst na 50% pufru B do 30 min; další lineární nárůst pufru B na 80% během následujících 2 min; udržování 80% pufru B po dobu 3 min následovaný rychlým lineárním poklesem na počáteční podmínky chromatografie (98% A, 2% B) během 2 min. Do 45 min probíhala ekvibrace kolony na počáteční podmínky pro následnou analýzu. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byl nastaven na 4 μ l za minutu.

Stanovení obsahu proteinu CBF-1 ve vzorcích pšenice bylo prováděno na základě měření 8 přechodů pro 4 vybrané peptidy z CBF-1 a 8 přechodů pro 4 vybrané peptidy z BSA (interní standard). Ve vzorcích kukuřice bylo stanovení obsahu proteinu prováděno podobně na základě měření 10 přechodů pro 5 vybraných peptidů z CBF-1 homologu a 8 přechodů pro 4 vybrané peptidy z BSA (interní standard). Příklad kompletního chromatogramu analyzovaných peptidů z pšenice v rámci gradientové eluce je zobrazen na Obr. 23.



Obr. 23: Schéma gradientové separace vybraných 5 peptidů pro CBF-1 a 5 peptidů pro BSA (IS) na reverzní fázi pomocí kapilární chromatografie. Detekce a kvantifikace byla prováděna pomocí specifických MRM přechodů pro jednotlivé peptidy (viz. Tab), přičemž každý peptid je měřen na dvou nezávislých přechodech (viz. Obr. 24).

Všechny přechody jsou definovány tak, že prekurzorem je vždy dvojnásobně nabitý ion specifický pro daný peptid (Q1 kvadrupól, hmotnostní filtr pro výběr hmoty pro kolizní celu), a jeho dva významně intenzivní fragmenty vznikající po fragmentaci v kolizní cele, které jsou detekovány na Q2 kvadrupólu (Obr. 24).



Obr. 24: Ukázka chromatogramů pro CBF-1 vazebný peptid pro jednotlivé přechody.

Přehledy vybraných prekurzorů, jejich odpovídajících fragmentů a nastavených kolizních energií jsou zobrazeny v tabulce 9 pro CBF-1 z pšenice a tabulce 10 pro CBP homolog z kukuřice. Další nastavení hmotnostního analyzátoru byly následující: napětí na kapiláře 3500 V; napětí na vstupní štěrbině 32 V; napětí na extrakční štěrbině 3 V; teplota iontového bloku 150 °C; tlak dusíku pro nanosprej 2 bary; průtok kolizního plynu 0.15 ml/min; nastavení kolizní energie pro MS mód 2 V; nastavení kolizní energie pro MSMS mód 20 V.

Relativní obsah proteinů CBF-1 (pšenice) a CBF-1 homologu (kukuřice) byl stanoven z poměru součtu ploch odpovídajících peptidů pro jednotlivé proteiny vztažené na součet ploch peptidů interního standardu (BSA). Poměry odpovídající relativnímu obsahu proteinů byly následně vyneseny do grafu.

Veškerá měření na hmotnostním spektrometru provedl Mgr. René Lenobel, Ph.D.

Tab. 9: Seznam definovaných přechodů pro vybrané peptidy z CBF-1 a BSA včetně kolizní energie potřebné pro fragmentaci peptidu na vybrané fragmenty.

Protein / Peptid	MRM	prekursor > fragment ion	Kolizní energie
CBF1: AFLQPSHHDAEIAFVR	1	976.99 > 1172.57	28 V
CBF1: AFLQPSHHDAEIAFVR	2	976.99 > 1493.71	28 V
CBF1: VAYLDAAPR	1	488.27 > 414.25	28 V
CBF1: VAYLDAAPR	2	488.27 > 529.27	28 V
CBF1: EGEGVLVLLR	1	542.80 > 500.36	29 V
CBF1: EGEGVLVLLR	2	542.80 > 613.44	29 V
CBF1: SKGEGEIEASEEQIR	1	912.88 > 1124.52	40 V
CBF1: SKGEGEIEASEEQIR	2	912.88 > 1237.61	40 V
BSA: LVNELTEFAK	1	582.29 > 708.39	28 V
BSA: LVNELTEFAK	2	582.29 > 951.48	28 V
BSA: YICDNQDTISSK	1	722.30 > 1007.46	32 V
BSA: YICDNQDTISSK	2	722.30 > 1167.49	32 V
BSA: HLVDEPQNLIK	1	653.33 > 956.50	28 V
BSA: HLVDEPQNLIK	2	653.33 > 1055.57	28 V
BSA: LGEYGFQNALIVR	1	740.37 > 813.49	30 V
BSA: LGEYGFQNALIVR	2	740.37 > 1017.58	30 V

Tab. 10: Seznam definovaných přechodů pro vybrané peptidy z homologu CBF-1 (kukuřice) a BSA včetně kolizní energie potřebné pro fragmentaci peptidu na vybrané fragmenty.

Protein/Peptid	MRM	prekursor > fragment ion	Kolizní energie
CBF1H: VFLAGTNSALQK	1	624.84 > 818.44	32 V

CBF1H: VFLAGTNSALQK	2	624.84 > 889.47	32 V
CBF1H: GEITTASEEQIR	1	667.33 > 832.42	32 V
CBF1H: GEITTASEEQIR	2	667.33 > 933.46	32 V
CBF1H: LLAFGADEEQQVDR	1	795.89 > 1018.44	33 V
CBF1H: LLAFGADEEQQVDR	2	795.89 > 1146.50	33 V
CBF1H: VVMLLSPVVSTSGR	1	722.89 > 802.44	33 V
CBF1H: VVMLLSPVVSTSGR	2	722.89 > 889.47	33 V
CBF1H: LLDMDVGLANIAR	1	700.87 > 813.49	33 V
CBF1H: LLDMDVGLANIAR	2	700.87 > 1174.59	33 V
BSA: LVNELTEFAK	1	582.29 > 708.39	28 V
BSA: LVNELTEFAK	2	582.29 > 951.48	28 V
BSA: YICDNQDTISSK	1	722.30 > 1007.46	32 V
BSA: YICDNQDTISSK	2	722.30 > 1167.49	32 V
BSA: HLVDEPQNLIK	1	653.33 > 956.50	28 V
BSA: HLVDEPQNLIK	2	653.33 > 1055.57	28 V
BSA: LGEYGFQNALIVR	1	740.37 > 813.49	30 V
BSA: LGEYGFQNALIVR	2	740.37 > 1017.58	30 V

3.10 Rovnovážná dialýza rostlinného materiálu

Pro experiment byl navážen 1 g obílek, které byly rozdrceny v třecí misce pod kapalným dusíkem. Materiál byl poté rozdělen do dvou 2 ml mikrozkušavek a do každé byl napipetován 1 ml extrakčního pufru. V tom byly rozetřené obilky rozsuspendovány pomocí pipety a inkubovány 30 minut za stálého míchání při 4 °C. Poté byla provedena centrifugace (16000 g a 4 °C, 15 minut) a supernatant byl odpipetován do čisté zkumavky. Pro určení koncentrace proteinů ve vzorku byla použita metoda Bradfordové (viz kapitola 3.3.2. Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové), jako blank byl použit extrakční pufr. Zvolené množství proteinů

obsažené v daném vzorku (0,5, 1, 2,5 nebo 5 mg) bylo poté ředěno do dialyzačního pufru na celkový objem 900 µl. Pro sledování vaznosti proteinu byl také ředěním do dialyzačního pufru přichystán roztok izotopicky značeného [³H]benzyladeninu ([³H]BAP) požadované koncentrace (1, 3, 6, 9 nebo 12 nM), případně roztok obsahující jak [³H]BAP, tak neznačený benzylaminopurin (oba o koncentraci 6 nM).

Pro provedení rovnovážné dialýzy byla připravena dialyzační aparatura skládající se z pěti kotoučů, které obsahují dva samostatné prostory, mezi něž byla vložena celulosová membrána. Do jedné části kotouče bylo napipetováno 900 µl roztoku vzorku, do druhé části 900 µl roztoku [³H]BAP (nebo roztoku obsahující jeho směs s obyčejným benzylaminopurinem, viz. výše). Aparatura byla následně vložena do stojanu a inkubována za neustálého míchání přes noc při 4 °C. Následující den byly roztoky z jednotlivých prostorů vypuštěny do mikrozkmavek a do scintilačních vialek bylo napipetováno 200 µl z každého roztoku. K tomuto množství byly připipetovány 2 ml scintilačního roztoku, vzorky byly promíchány a vloženy do stojanu. Na závěr byl stojan umístěn do scintilátoru, kde byla následně měřena radioaktivita v jednotlivých vzorcích.

3.11 Klíčení obilek pšenice seté a kukuřice seté

Celý experiment byl rozdělen do 5 dnů, tzn. 5 časových bodů, přičemž samotné klíčení probíhalo po dobu 4 dnů. V prvním dnu experimentu byly provedeny všechny potřebné přípravy (viz. níže) a také byly jako reference (čas klíčení označovaný dále jako T0) odebrány obilky v suchém stavu. Dále již byl po 24 hodinách odebírán klíčící materiál.

Na počátku experimentu bylo naváženo potřebné množství obilek (cca. 7 g pro jeden časový bod) pšenice seté (*Triticum aestivum*) a kukuřice seté (*Zea mays*).

Obilky pak byly sterilizovány chlorid-chlornanem sodným o dvojnásobném objemu vzhledem k množství obilek po dobu 2 minut a poté propláchnuty 50 ml sterilní destilované vody. Od této chvíle byly pro práci s obilkami striktně dodržovány sterilní podmínky, tzn. veškerý materiál a chemikálie používané pro experimenty byly předem sterilizovány a manipulace s obilkami probíhala v laminárním boxu. Po sterilizaci byla semena rovnoměrně rozložena na filtrační papír navlhčený destilovanou vodou umístěný v 18 cm Petriho misce. Ta pak byla uzavřena, přelepena prodyšnou páskou a umístěna do klima komory, ve které byl nastaven následující režim: světlo o intenzitě 5000 lx po dobu 16 hodin, zbývajících 8 hodin tma, teplota 25 °C, relativní vlhkost vzduchu 60 %.

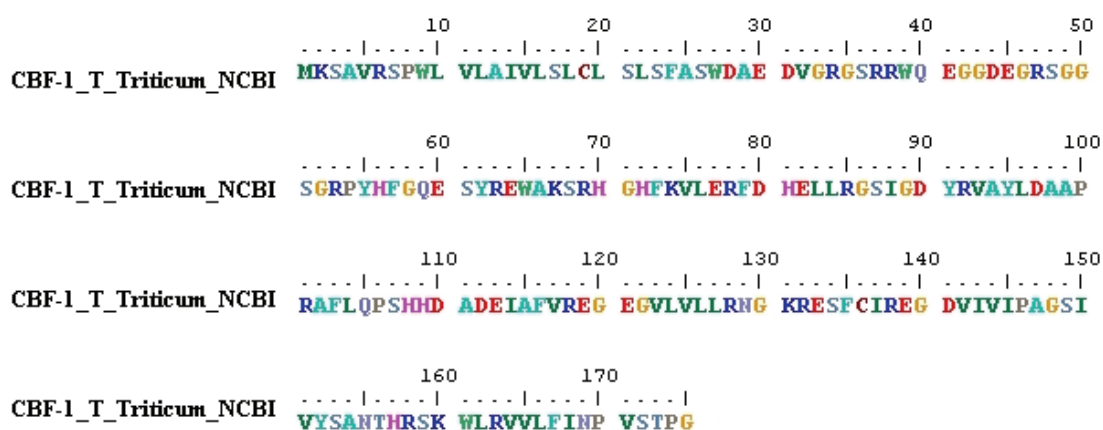
Jak již bylo uvedeno výše, klíčící obilky pak byly odebírány po dobu následujících 4 dnů vždy po 24 hodinách. Při každém odběru byla stanovena klíčivost (poměr počtu klíčících obilek k celkovému počtu obilek) a morfologické změny obilek byly zdokumentovány pomocí mikroskopu s integrovaným fotoaparátem. Obilky pak byly rozděleny do mikrozkmavek a skladovány při -80 °C.

Paralelně byl prováděn také experiment sloužící ke stanovení křivky klíčení. Ten spočíval ve sledování hmotnosti obilek ve zvolených časových bodech, kdy byla každá obilka zvlášť zvážena na analytických vahách. Pro každý časový bod bylo připraveno 30 obilek, způsob přípravy a podmínky klíčení jsou uvedeny výše. Hmotnost obilek byla stanovena na počátku klíčení (obilky v suchém stavu, bod 0) a v průběhu první hodiny klíčení byly obilky odebírány a váženy v patnáctiminutových intervalech. Po dobu následujících 8 hodin byl sběr materiálu a stanovení hmotnosti prováděn vždy po uplynutí 1 hodiny, dalšími časovými body bylo 24, 48, 72 a 96 hodin.

Výsledky a diskuse

4.1 Charakterizace cytokinin-vazebného proteinu (CBF-1)

Za pomoci již dříve publikované sekvence vazebného místa CBF-1 (Ala-Phe-Leu-Gln-Pro-Ser-His-His-Asp-Ala-Asp-Glu), (Brinegar *et al.*, 1988) byla prostřednictvím algoritmu BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, jednoduché prohledávání) nalezena v databázi NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) část sekvence pravděpodobně patřící studovanému cytokinin-vazebnému proteinu o velikosti 175 aminokyselin (Obr. 25).



Obr. 25: Částečná sekvence vazebného místa CBF-1 nalezená pomocí algoritmu BLAST v databázi NCBI.

Pro mnohočetné vyhledávání byla Mgr. Chamrádem použita databáze SwissProt, do které byla zadána výše uvedená část sekvence CBF-1. Výsledkem vyhledávání studované sekvence bylo pouze pět sekvencí, jedna pro kukuřici setou (*Zea mays*), další pro rýži setou (*Oryza sativa*). Další sekvence náležící pravděpodobně CBF-1 našel Mgr. David Kopečný, Ph. D. v databázi The Gene Index Project (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>). Výsledkem jeho vyhledávání byly tři sekvence pro pšenici setou a jedna pro kukuřici setou. Sekvence přiřazená kukuřici setě se zcela shodovala s částečnou sekvencí pro kukuřici již dříve nalezenou Mgr. Chamrádem. Nalezené sekvence jsou uvedeny v příloze diplomové práce. Pro vzájemné porovnání všech těchto sekvencí bylo použito mnohočetného porovnávání pomocí programu Toffee (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>). Nejprve bylo vyhodnoceno skóre pro všechny nalezené sekvence, které bylo stanoveno na 91. Poté bylo provedeno srovnání sekvencí pouze pro pšenici setou. Toto skóre bylo vyhodnoceno programem jako 96. Tyto výsledky vypovídají o vysoké homologii všech nalezených sekvencí. Vazebné místo u vyhledaných výsledků zůstává konzervováno pouze s výjimkou náhrady druhého His za Tyr, tedy: Ala-Phe-Leu-Gln-Pro-Ser-His-**His/Tyr**-Asp-Ala-Asp-Glu. Tato změna His za Tyr může být zdůvodněna například možnou

mutací sekvence, která poté setrvala v evolučním vývoji těchto proteinů. Výskyt většího množství forem studovaného proteinu je možné přisuzovat hexaploidnímu genomu pšenice (He *et al.*, 2003).

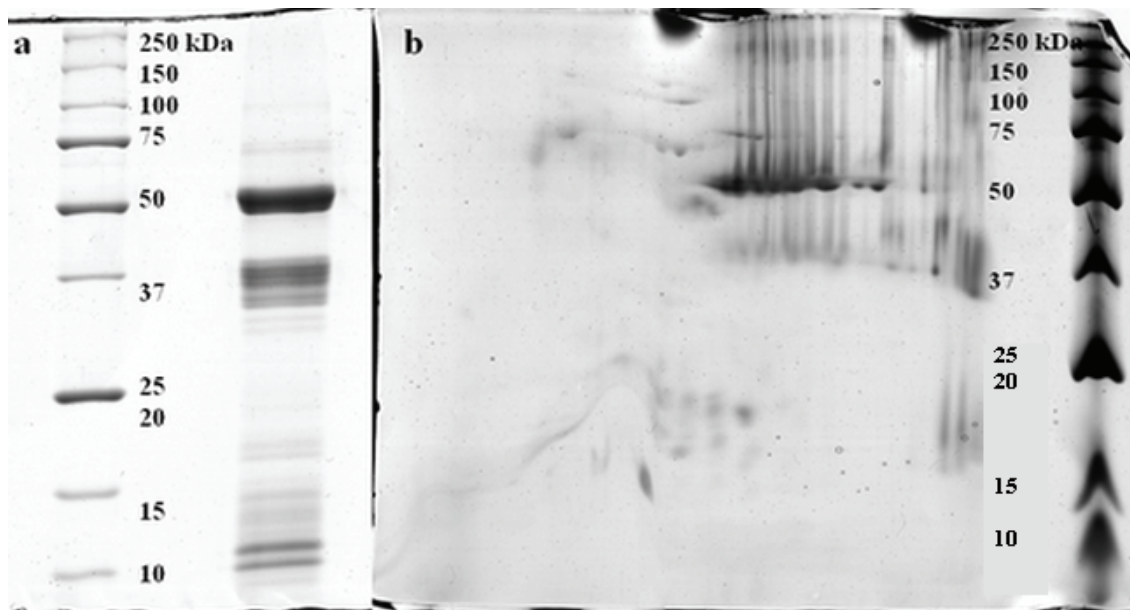
Pro určení důležitých fyzikálně-chemických parametrů byly všechny nalezené sekvence analyzovány s pomocí aplikace ProtParam, která je volně přístupná na ExPASy Proteomics Serveru (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Tato aplikace umožnila stanovení molekulové hmotnosti (bez případných posttranslačních modifikací), pI a aminokyselinového zastoupení. Tyto charakteristiky jsou pro čtyři z nalezených sekvencí zobrazeny v Tab. 11.

Tab. 11: Vyhodnocení aminokyselinového zastoupení u nalezených sekvencí náležících patrně CBF-1. V tabulce jsou uvedeny také předpokládané hodnoty Mr a pI. Hodnoty v prvním sloupci označeném jako CBF-1 jsou převzaty z publikace autorů Eriona a Foxe (Erion & Fox, 1981). Další sekvence jsou označovány za pomoci svých identifikačních čísel z příslušných databází. Modře jsou zvýrazněny nejvíce zastoupené aminokyseliny.

	CBF-1 (Erion & Fox, 1981)	Q7M1Z8	TC332797	TC286909	TC295889
Mr (kDa)	53 kDa	49,9	48,2	46,0	44,9
pI	/	6,2	8,2	7,8	7,3
Zastoupení jednotlivých aminokyselin (%)					
Ala	6,6	6,9	5,0	4,4	4,6
Arg	10,6	8,7	12,5	12,3	13,2
Asn	/	2,2	1,4	1,5	1,5
Asp	7,6	4,2	4,2	4,7	4,6
Cys	0,7	1,3	1,2	1,5	1,5
Gln	/	3,6	4,7	3,9	4,1
Glu	17,2	10,0	11,1	10,3	11,5
Gly	12,0	9,3	10,8	12,3	10,9
His	3,4	2,9	3,8	4,4	3,8
Ile	2,6	3,3	4,5	3,4	3,3
Leu	5,4	7,1	5,9	5,6	5,9
Lys	3,4	4,2	3,3	2,9	2,8
Met	0,6	2,0	1,2	1,2	1,3
Phe	4,4	4,7	4,0	4,9	5,3
Pro	3,5	4,0	3,1	3,2	3,3
Ser	7,5	10,9	9,9	10,5	10,2
Thr	4,1	3,3	2,8	2,9	2,8
Trp	/	1,1	1,2	1,2	1,3
Tyr	2,8	2,0	2,6	2,2	2,0
Val	7,6	8,2	6,8	6,6	6,1

Po provedení *in-silico* analýzy bylo nutné získané informace ověřit experimentálně. Pro jednotlivé experimenty byl používán CBF-1 purifikovaný Ing. Kamínkem z Ústavu experimentální botaniky v Praze (Kamínek *et al.*, 2003). S tímto proteinem byla nejprve provedena SDS-PAGE s detekcí separovaných proteinů barvivem Coomassie Brilliant Blue (Obr. 26a). Na gelu zachyceném na uvedeném obrázku byla patrná přítomnost intenzivního bandu s velikostí cca. 50 kDa. Zřejmý byl také výskyt dalších bandů v oblasti okolo 37 kDa a 10 kDa. Tyto výsledky byly ve shodě s výsledky dřívějších studií CBF-1, kdy byly po SDS-

PAGE purifikovaného proteinu na gelu detekovány bandy o podobných velikostech (Erion & Fox, 1981; Brinegar & Fox, 1985c). 50 kDa band byl poté přiřazen CBF-1, zbývající bandy byly označeny za jeho degradační produkty (Brinegar *et al.*, 1988). Je pravděpodobné, že i v mém případě došlo díky poměrně velkému stáří vzorku k částečnému rozkladu CBF-1, který se projevil výskytem těchto fragmentů, a také tím, že studovaný protein již nevykazoval žádnou vazebnou aktivitu. Pro podrobnější charakterizaci CBF-1 byla dále provedena separace proteinu pomocí 2-D elektroforézy se stripy s pH rozmezím 3-10 (Obr. 26b).

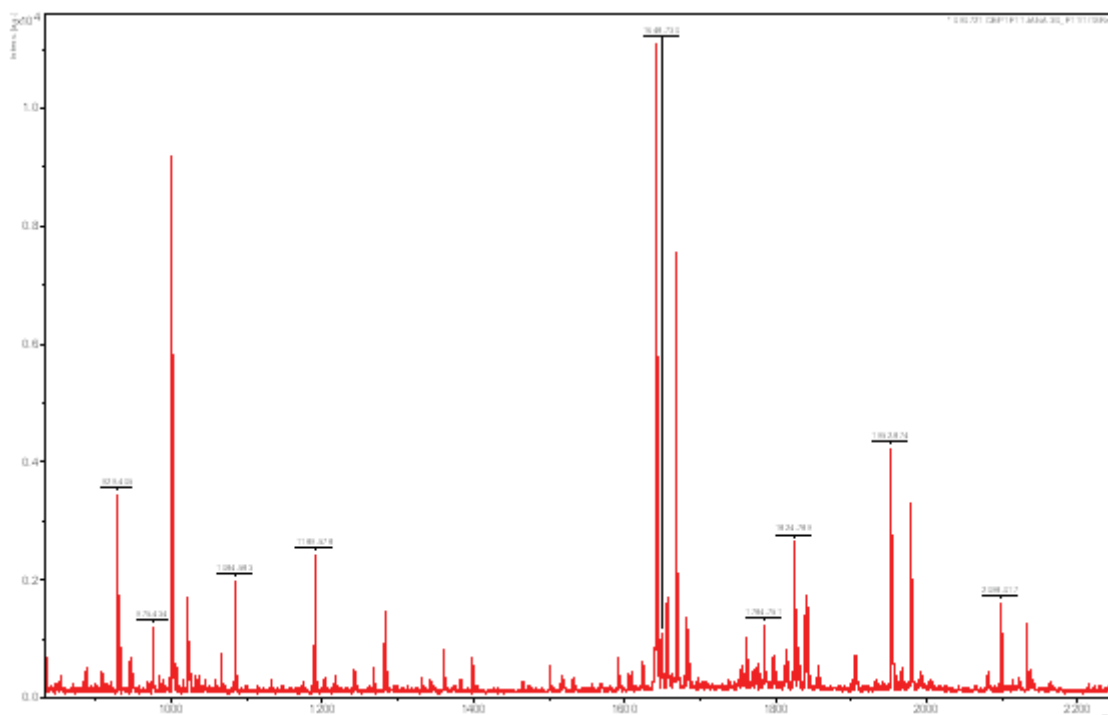


Obr. 26: Elektroforetická separace CBF-1. Pro SDS-PAGE (a) bylo na gel nanášeno 5 μ g vzorku, pro 2-D elektroforézu (b) potom 12,5 μ g. V obou případech byly proteiny detekovány pomocí barviva CBB.

Na gelu byl po 2-D elektroforéze barvením detekován souvislý pás spot v oblasti pH mezi 7 a 9 a molekulové hmotnosti okolo 50 kDa. Pokud by všechny tyto spoty náležely CBF-1, existovaly by pro vysvětlení tohoto jevu dvě teorie. První z nich by byl výskyt několika forem proteinu, které by se lišily v aminokyselinovém složení a tudíž i pI. Tato varianta je, z důvodů které byly zmíněny výše, velmi pravděpodobná a nahrával pro ni i fakt, že bylo pro CBF-1 nalezeno hned několik vysoce homologních sekvencí. Druhým zdůvodněním, které však nebylo možné zanedbat, pak byl výskyt mnohočetných posttranslačních modifikací. Vzhledem k tomu, že nedošlo ke změně molekulové hmotnosti, ale především pI, by do úvahy připadaly hlavně fosforylace. Tuto možnost také podporovala skutečnost, že fosforylace serinů již dříve byla u CBF-1 publikována (Polya & Davies, 1983).

Pro potvrzení identity CBF-1, ověření nalezených sekvencí a také hypotéz ohledně výskytu jeho několika forem byla provedena jeho identifikace hmotnostní spektrometrií za pomoci databáze obsahující všechny nalezené sekvence. Protein detekovaný na SDS-PAGE gelu v oblasti okolo 50 kDa (předpokládaný CBF-1) byl vyříznut, proteolyticky naštěpen trypsinem a

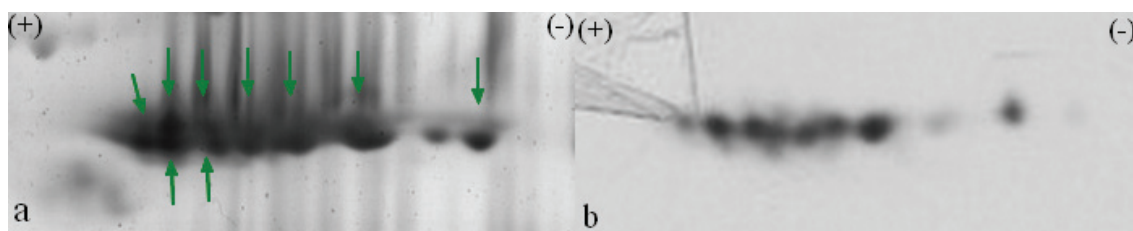
identifikován na hmotnostním spektrometru s konfigurací MALDI-TOF.



Obr. 27: Analýza CBF- 1 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Na obrázku je zachyceno hmotnostní spektrum peptidů získaných trypsinovým štěpením CBF-1. Píky peptidů, které byly přiřazeny CBF-1, mají uvedený údaj o molekulové hmotnosti.

Naměřená data byla po analýze zpracována programem flexAnalysis 2.4 a vyhodnocena algoritmem Mascot běžícím na lokálním serveru Mascot Server 2.2. Vyřiznutý band byl na základě 11 peptidů úspěšně identifikován jako CBF-1 (přiřazená sekvence wheatTC332797) s hodnotou skóre 88 a pokrytím sekvence 33 % (Obr. 27).

Také jednotlivé spoty detekované na 2-D gelu byly vyřiznuty a po trypsinovém štěpení podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru. Tentokrát se ale jednalo o tandemový hybridní přístroj Q-TOF s vysokým rozlišením spojený se systémem pro HPLC chromatografií. V rámci tohoto experimentu byly všechny vyřezané spoty identifikovány jako CBF-1, přičemž přiřazeny byly třem nalezeným sekvencím ze pšenice. Pokrytí sekvencí se pohybovalo v rozmezí 6 až 22 % s nejvyšším skóre 546. Pro jasnější představu jsou na Obr. 28 označeny jednotlivé spoty, které byly z gelu po 2-D elektroforéze vyřiznuty.



Obr. 28: Detail jednotlivých spot separovaných 2-D elektroforézou. Tyto spoty byly buď obarveny barvivem CBB a následně identifikovány hmotnostní spektrometrií (a; nanášeno bylo 12,5 µg proteinu, označeny jsou všechny spoty, které byly z gelu vyříznuty a dále analyzovány) a nebo detekovány za pomoci specifické protilátky po Western blotu (b; nanášeno bylo 22,5 µg proteinu).

Podle těchto výsledků se hodnoty pI jednotlivých spot shodují s jejich polohou na výsledném 2-D gelu. Pás spot byl totiž detekován v oblasti pH 7-9. pI první označené spoty byla po analýze stanovena jako 7,27. Hodnota pI dalších spot narůstala až k poslední označené spotě, jejíž hodnota pI byla 8,23.

Jako nezávislá metoda pro ověření výsledků identifikací byl po separaci zkoumaného proteinu 2-D elektroforézou proveden také Western blot s následnou imunodetekcí primární polyklonnální protilátkou specifickou pro vazebné místo CBF-1, kterou na zakázku vyrobila firma CloneStar Brno. Výsledek tohoto experimentu je zobrazen na Obr. 28b. Jak je z obrázku patrné, detekovaný pás spot je totožný s pásem spot detekovaných barvením dusičnanem stříbrným. Tento experiment tak potvrdil výsledky dříve provedených identifikací.

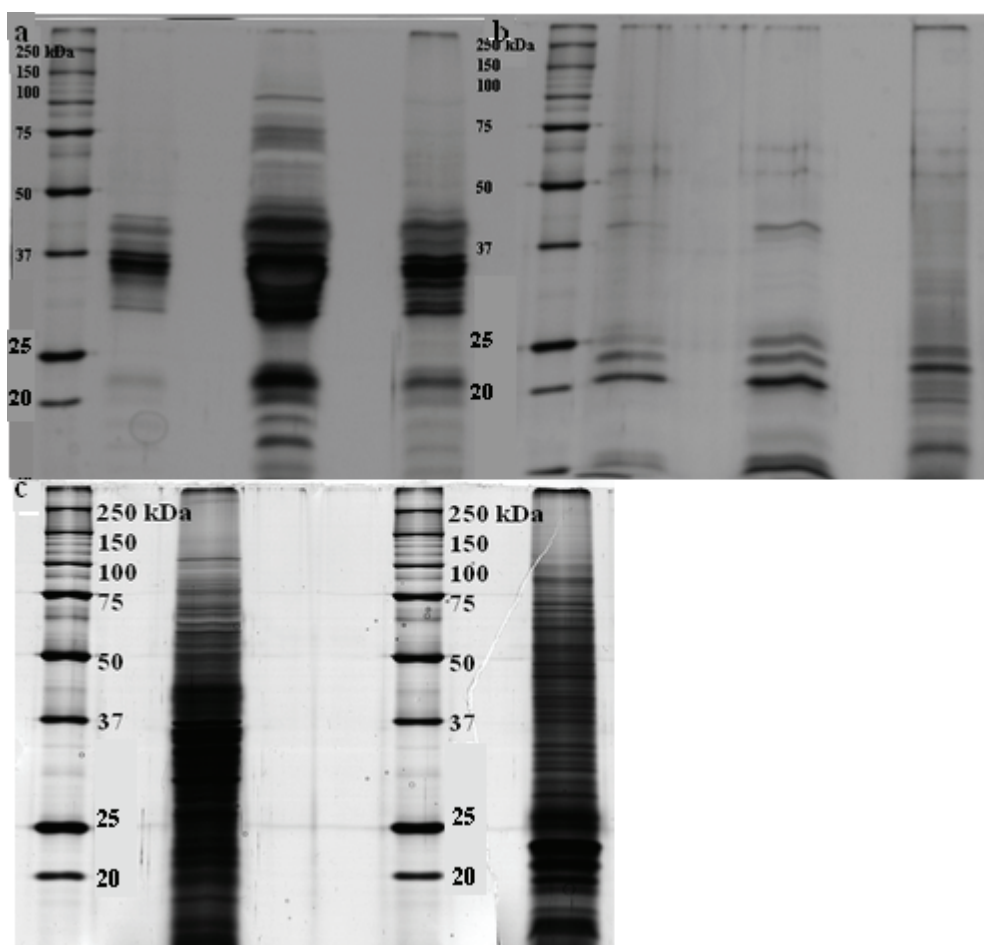
Na základě publikace Polya a Daviese, kteří se zabývali nedořešenými otázkami týkající se CBF-1 a vysvětlovali rozdílná fakta publikovaná o jeho struktuře fosforylačními modifikacemi serinů (Polya & Davies, 1983), byla také provedena proteomická analýza možných fosforylací tohoto proteinu. K tomuto účelu byl opět použit hmotnostní spektrometr Q-TOF s vysokým rozlišením spojeným se systémem pro HPLC chromatografii. Žádné fosforylace však nebyly prokázány. Nedá se ale zcela vyloučit, že CBF-1 může být v rostlinách fosforylačně modifikován. Vzhledem ke všem výše uvedeným výsledkům však byly jako důvod výskytu pásu spot náležících CBF-1 vyloučeny jeho fosforylace.

4.2 Extrakce proteinů z obilí pšenice a kukuřice

Kromě charakterizace CBF-1 bylo jedním z dalších cílů mé diplomové práce monitorovat hladiny tohoto vazebného proteinu v průběhu klíčení pšenice. Po zjištění, že by se homolog CBF-1 mohl vyskytovat i u kukuřice, byla do plánovaných experimentů zahrnuta i tato obilovina. Jako nástroj vhodný pro sledování obsahu CBF-1 pak byla vybrána metoda MRM kvantifikace a jako nezávislá technika vhodná pro ověření získaných dat také 2-D elektroforéza.

Než však mohlo být přikročeno k samotným analýzám, musely být nejprve vyzkoušeny a zavedeny metody extrakce proteinů z rostlinného materiálu.

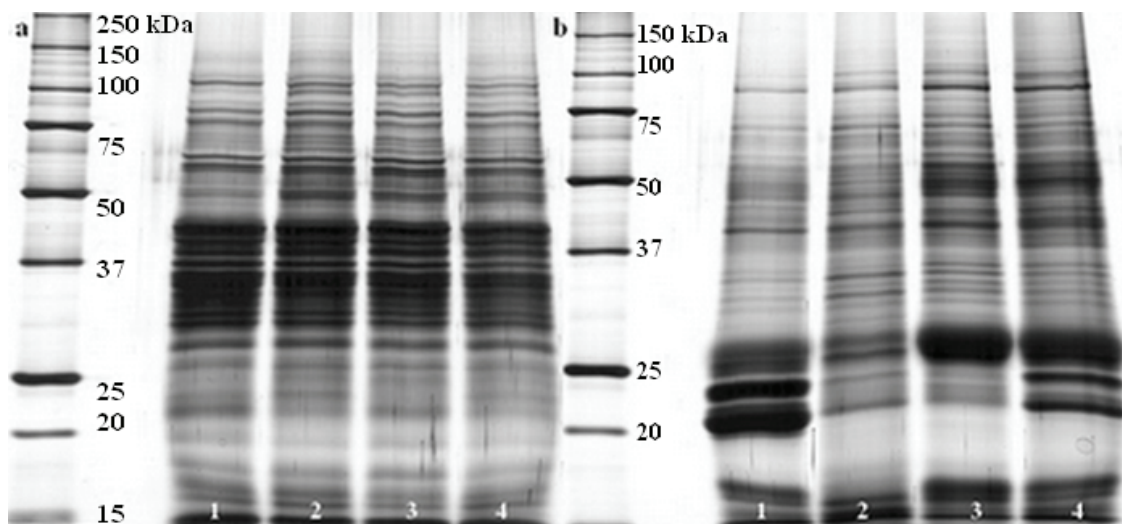
Pro tento účel byly na základě studia literatury zvoleny následující metody: extrakce TCA v acetonu, fenolická extrakce, extrakce močovinou a extrakce dodecylsíránem sodným. První testovanou extrakční technikou byla tedy metoda TCA v acetonu (Obr. 29a). Ta byla poprvé publikována Damervalem (Damerval *et al.*, 1986) před více než dvaceti lety, ale i přes své relativní stáří dodnes patří k nejčastěji používaným metodám přípravy rostlinných proteinů pro následnou proteomickou analýzu. Mezi její hlavní výhody patří rychlost, jednoduchost,



efektivnost a také nevratná inhibice většiny proteas.

Obr. 29: SDS-PAGE proteinů z obilek extrahovaných metodou trichloroctové kyseliny v acetonu. Na obrázku a) zleva: marker molekulových hmotností; efekt přidavku 15 %, 10 % a 5 % (w/w) polyvinylpolypyrrolidonu při extrakci kukuřičných proteinů; na obrázku b) zleva: marker molekulových hmotností; efekt přidavku 15 %, 10 % a 5 % (w/w) polyvinylpolypyrrolidonu při extrakci pšeničných proteinů. Na posledním zachyceném gelu (c) je poté znázorněn výsledek extrakce proteinů bez přidavku polyvinylpolypyrrolidonu, zleva marker molekulových hmotností, extrakt z obilek pšenice, opět marker molekulových hmotností a extrakt z obilek kukuřice. Pro každý vzorek bylo na gel nanášeno 5 μ g proteinů.

Jednou z testovaných modifikací této extrakční metody byl přídavek polyvinylpyrrolidonu (PVPP), který je nerozpustný ve vodě a váže vodíkovými můstky fenoláty z rostlinných extraktů s účinností odstranění těchto látek okolo 90 % (Toth & Pavia, 2001). Po jeho použití při extrakci a následném provedení SDS-PAGE připravených vzorků však byla z gelu patrná výrazná redukce v zastoupení separovaných proteinů v některých oblastech. Stejný experiment byl proveden také u extraktů obilí kukuřice a opět došlo ke stejnému jevu (Obr. 29a,b). Vzhledem k tomuto pro naše účely negativnímu účinku PVPP bylo od jeho použití při extrakci 10% (w/v) TCA v acetonu ihned upuštěno a dále byl tento typ extrakce prováděn bez jakýchkoliv modifikací podle protokolu optimalizovaného pro malá množství výchozího materiálu (Carpentier *et al.*, 2005). Výsledné gely s detekovanými proteiny po SDS-PAGE jsou zobrazeny na Obr. 29c.

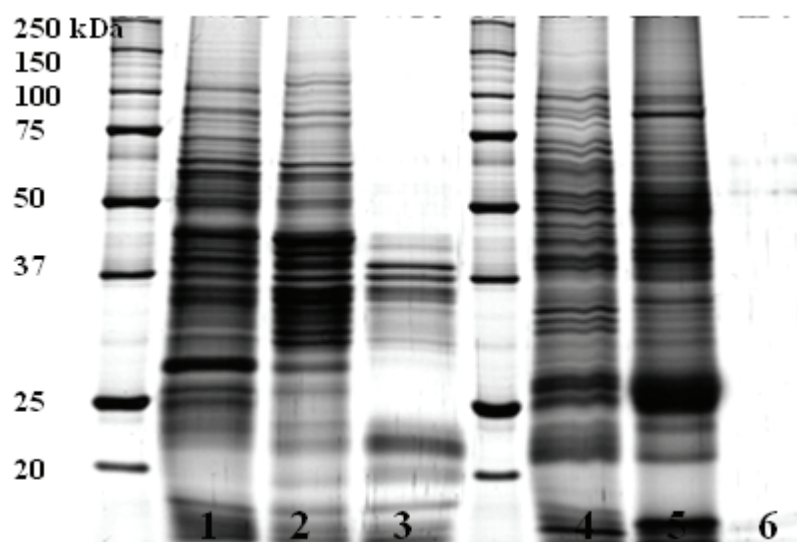


Obr. 30: Srovnání vyzkoušených extrakčních metod. Na obrázku je zachycen výsledek separace pšeničných (a) a kukuřičných (b) proteinů získaných fenolovou extrakcí (1), extrakcí TCA v acetonu (2), extrakcí za použití močoviny (4) a extrakcí pomocí SDS. Pro každý vzorek bylo do jamky gelu aplikováno 5 µg proteinů.

Další vyzkoušenou extrakcí byla extrakce fenolová. Tato extrakční metoda však vykazuje jisté negativní vlastnosti v porovnání s extrakční metodou TCA v acetonu. Jedná se o zdlouhavý postup extrakce, navíc je hlavní komponenta tohoto postupu toxická a korozivní. Zbývajících variantami použitých extrakčních technik byly metody využívající močovinu a SDS. U obou těchto metod je hlavní výhodou krátká doba celého postupu. Extrakce všemi těmito metodami vedla k uspokojivému výsledku a nebyla nutná žádná další optimalizace postupu. Pro srovnání jsou na Obr. 30 zachyceny gely po SDS-PAGE separaci extraktů obilí pšenice a kukuřice. Pro vzorky ze pšenice byly mezi jednotlivými extrakčními metodami detekovatelné pouze malé odlišnosti. Tyto změny jsou jak kvalitativního charakteru (změny v zastoupení jednotlivých

bandů, jsou například viditelné v oblastech mezi 20 a 25 kDa či 50 a 75 kDa), tak charakteru kvantitativního (změna intenzity se vyskytuje například u bandu o molekulové hmotnosti 50 kDa). Naopak u vzorků kukuřice je mezi použitými extrakčními technikami na první pohled zřejmá výrazná odlišnost. Je patrné, že některé proteiny jsou extrahovány jednou metodou, další však nikoli.

Poslední testovanou metodou byla extrakce na základě rozdílných rozpustností proteinů v

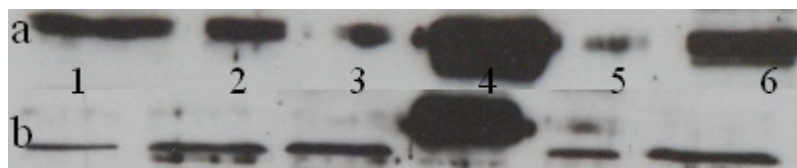


pufrech (Obr. 31). Nevýhodou této extrakční metody je větší časová náročnost.

Obr. 31: Výsledek SDS-PAGE po extrakci obiliek frakcionačním postupem. Na gel byly jak pro pšenici (levá část gelu), tak pro kukuřici naneseny postupně frakce albuminů a globulinů (1 a 4), gliadinů a gluteninů (2 a 5) a CM proteinů (3 a 6). Na gel bylo vždy nanášeno 5 μ g proteinů pro každý ze separovaných vzorků.

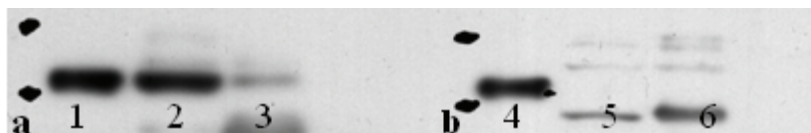
První získanou frakcí byla frakce skládající se převážně z albuminů a globulinů (Obr. 31(1,4)), mezi které by měl patřit i studovaný CBF-1. Další skupinou extrahovaných proteinů byla frakce gliadinů a gluteninů (Obr. 31(2,5)). Poslední izolovanou proteinovou frakcí byla skupina řídce zastoupených CM proteinů (u vzorků z kukuřice nebylo téměř možné tyto proteiny detekovat), (Obr. 31(3,6)).

Po každou extrakci byl navíc pro porovnání obsahu CBF-1 proveden Western blot s následnou imunodetekcí tohoto proteinu. Na gel bylo vždy nanášeno 5 μ g proteinového extraktu a pro detekci byla použita specifická protilátka zmiňovaná již dříve (viz. předcházející kapitola). Pro snadnější orientaci byl na gel aplikován také CBF-1. Výsledky detekce CBF-1 jsou zobrazeny na Obr. 32.



Obr. 32: Western blot pro vzorky extrahované ze pšenice (a) a kukuřice (b). Na gel byl aplikován vzorky po extrakci TCA v acetonu (1), fenolickou extrakci (2), extrakci pomocí SDS (3), močoviny (5) a také frakce albuminů a globulinů extrahovaná KCl pufrům (6). Mezi tyto vzorky byl do jamky označené jako 4 aplikován také pšeničný CBF-1 poskytnutý Ing. Kamínkem.

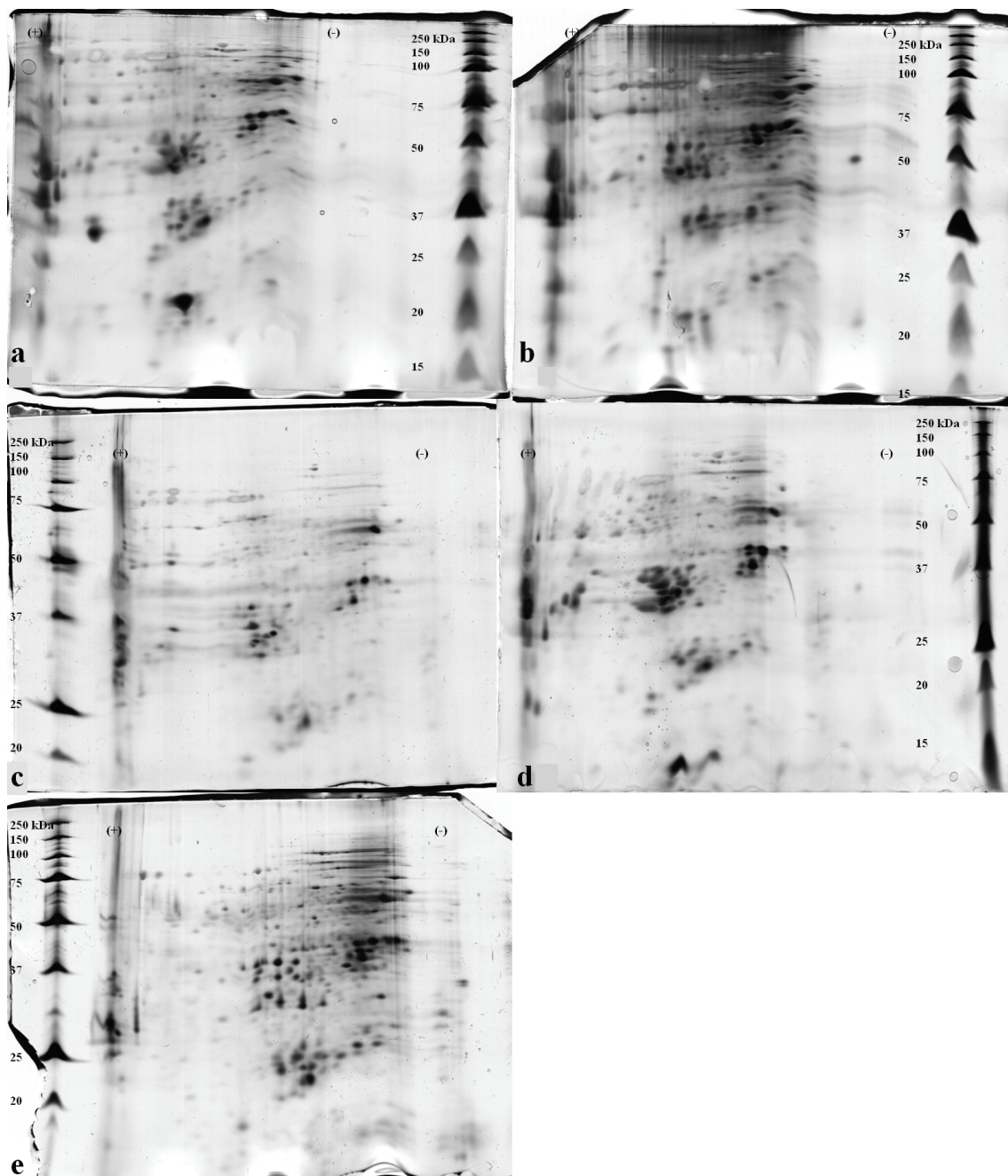
Z obrázku je zřejmá přítomnost specifického bandu v oblasti okolo 50 kDa u všech provedených extrakcí. V případě vzorků pšenice je, jak bylo předem předpokládáno, nejintenzivnější band u vzorku extrahovaného frakcionačním způsobem. Naopak nejmenší intenzitu bandu vykazují vzorky extrahované s použitím SDS a močoviny. Také u vzorků z kukuřice byly u všech provedených extrakčních metod detekovány specifické bandy homologu CBF-1, které tak potvrdily jeho přítomnost u této obilniny. Co se účinnosti extrakce týče, nebyl u vzorků z kukuřice detekován podobný trend jako u vzorků z pšenice. Všechny detekované bandy totiž vykazovaly přibližně stejnou intenzitu. Snad jediné metoda využívající SDS v opakovaných experimentech prokázala zvýšenou schopnost extrahovat studovaný protein (z uvedeného obrázku tento fakt bohužel není vidět).



Obr. 33: Imunodetekce CBF-1 po frakcionaci proteinů z obilí pšenice (a) a kukuřice (b). Na obrázku jsou zachyceny frakce albuminů a globulinů (1 a 4), gliadinů a gluteninů (2 a 5) a CM proteinů (3 a 6). Do prvních jamek před tyto frakce byl vždy nanesen pšeničný CBF-1 poskytnutý Ing. Kamínkem.

Na Obr. 33 je poté zachycen Western blot pro jednotlivé skupiny proteinů izolované frakcionačním způsobem. Uvedený obrázek velice hezky dokládá, že u pšenice byl hlavní podíl CBF-1 extrahován do první frakce, tedy mezi albuminy a globuliny. Tento fakt je ve shodě s vlastnostmi CBF-1, který byl již v minulosti popsán jako globulární protein (Moore, 1979). U kukuřice byl ale homolog CBF-1 překvapivě extrahován spíše mezi gliadiny a gluteniny, tedy za použití pufru obsahujícího detergent (v tomto případě SDS). Lze jen spekulovat o poněkud hydrofobnějším charakteru kukuřičného CBF-1, ale tato skutečnost bude muset být v budoucnu potvrzena dalšími experimenty.

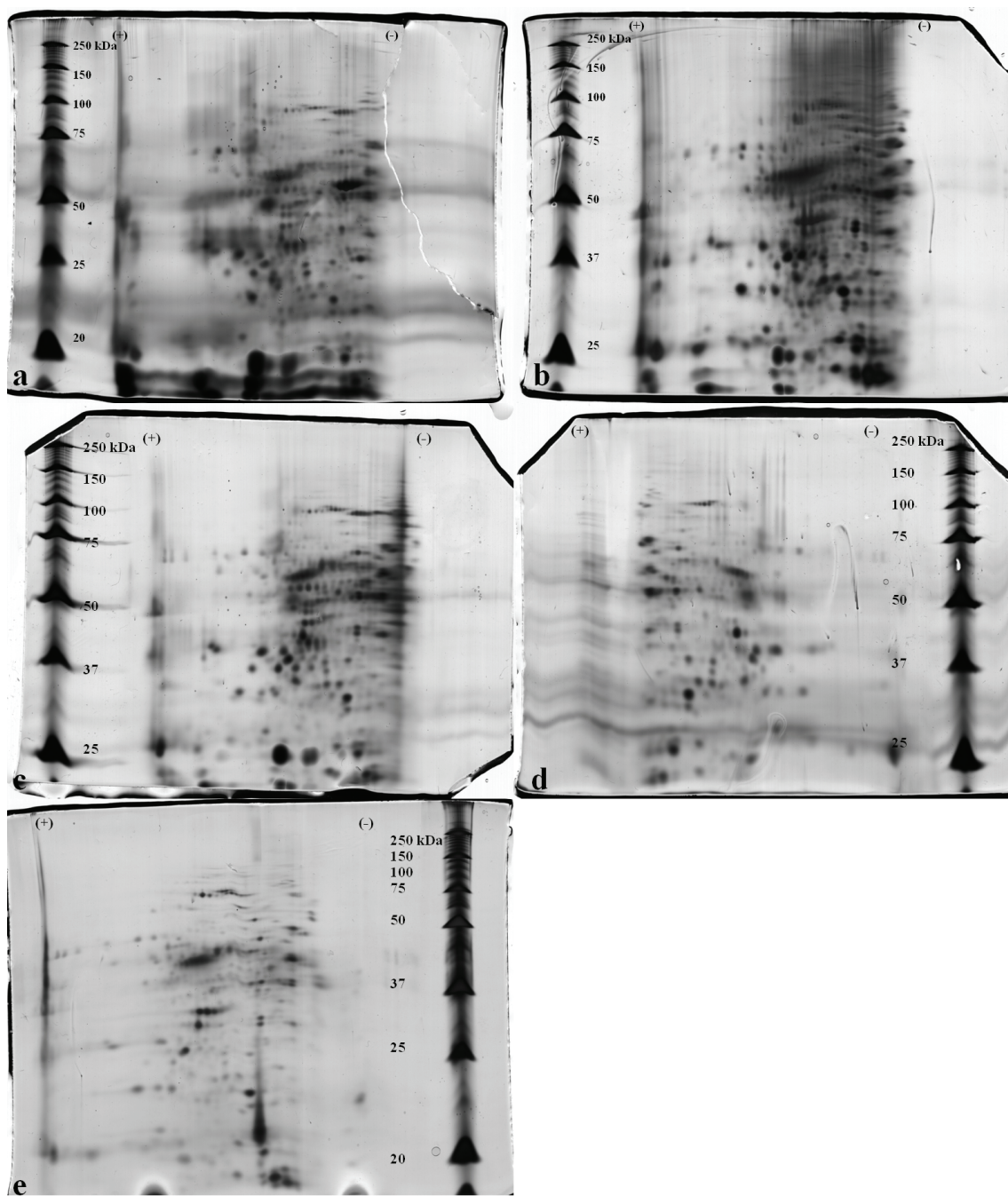
Další proteomickou metodou používanou v mé diplomové práci byla 2-D elektroforéza. Pro tu byly používány 7 cm stripy s pH rozmezím 3-10. Nejprve byly metodou 2-D elektroforézy separovány vzorky pšenice. Výsledné gely jsou vyobrazeny na Obr. 34.



Obr. 34: 2-D elektroforéza proteinů z obilí pšenice izolovaných extrakcí TCA v acetonu (a), fenolickou extrakcí (b), extrakcí založenou na SDS (c), případně močovíně (d) a také frakcionačním postupem s pomocí KCl pufru (frakce albuminů a globulinů; e). Gely byly barveny stříbrem, separováno bylo celkově 12,5 μ g proteinu.

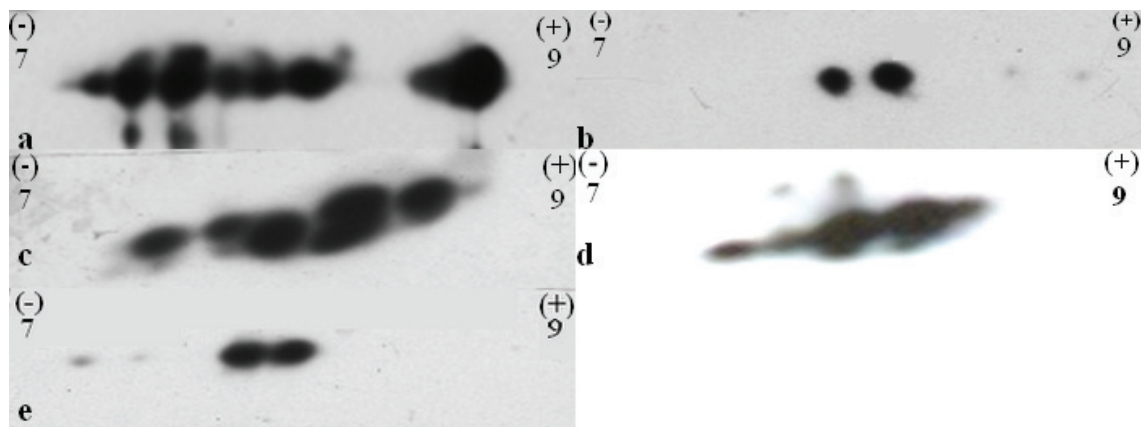
2-D elektroforéza umožnila oproti jednoduché SDS-PAGE rozeznat opravdu markantní rozdíly v jednotlivých extrakčních metodách, jak je hned na první pohled z Obr. X zřejmé. Pro

demonstraci těchto rozdílů jsem zvolila plochu gelu v oblasti mezi 50 a 75 kDa a v rozmezí pH přibližně 7 až 9. U extrakce 10% (w/v) TCA v acetonu je možné rozeznat skupinu několika ostrých spot. Tyto spoty se v přibližně stejném množství vyskytují také u fenolické extrakce, projevuje se zde však horší kvalita celé separace způsobená patrně přítomností kontaminantů. Naopak u metody SDS, močovinové a frakcionační se počet spot v této oblasti výrazně liší (oproti dvěma předchozím technikám je redukován). Výsledky těchto experimentů se rámcově shodovaly s výsledky publikovanými Hurkmanem a Tanakou (Hurkman & Tanaka, 2006), kteří provedli srovnání všech zmíněných extrakčních metod pro 2-D elektroforézu proteinových vzorků pocházejících z endospermu pšeničných obilí. Jediná z metod, která se svými výsledky od poznatků uváděných v této publikaci mírně lišila, byla extrakce fenolická. U vzorků z kukuřice poskytly z kvalitativního hlediska velmi podobné výsledky extrakce 10% (w/v) TCA v acetonu, extrakce fenolická a extrakce pomocí SDS (pro srovnání bychom mohli opět použít například oblast mezi 50 a 75 kDa a v rozmezí pH přibližně 7 až 9). Zbývající techniky pak přinesly zcela odlišné výsledky (Obr. 35).



Obr. 35: 2-D elektroforéza proteinů z obilek kukuřice. Tyto vzorky byly získány extrakcí TCA v acetonu (a), fenolickou extrakcí (b), extrakcí založenou na SDS (c), případně močovíně (d) a také frakcionačním postupem s využitím KCl pufru (frakce albuminů a globulinů; e). Gely byly k barveny stříbrem, separováno bylo celkově 12,5 μ g proteinu.

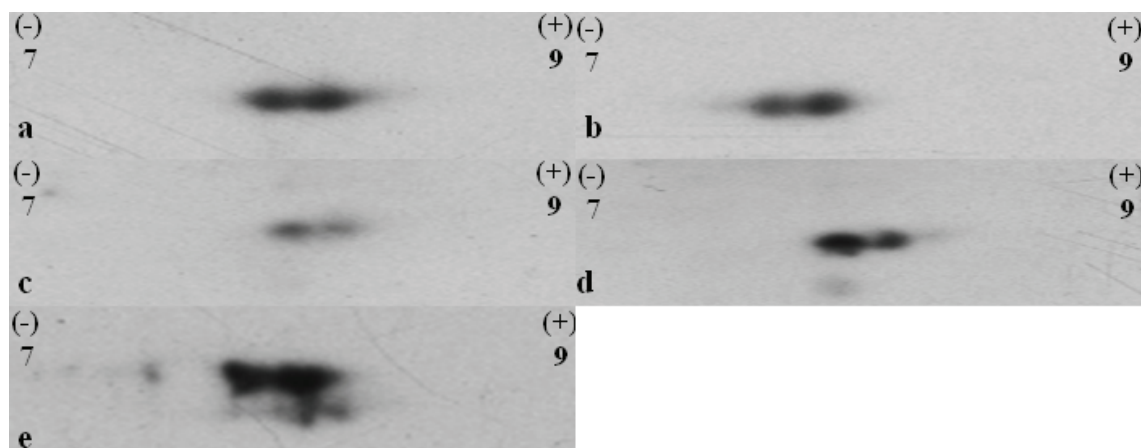
Po provedení druhého rozměru byl pro každý typ extrakce proveden také Western blot na nitrocelulosové membráně s vizualizací CBF-1 specifickou protilátkou. U každého blotu je poté zobrazena orientace stripu a přibližný rozsah pH, v kterém byly spoty detekovány.



Obr. 36: Western blot extraktů obilek pšenice; (a) extrakce TCA v acetonu, (b) extrakce fenolická, (c) extrakce SDS, (d) extrakce močovinná, (e) extrakce fracionační. Pro experiment bylo vždy použito 22,5 µg proteinu.

Na Obr. 36 je série blotů pro extrakty ze pšenice. Jak je z filmů na první pohled zřejmé, jednotlivé metody se liší množstvím detekovatelných spot patřících CBF-1. Největší množství specifických spot poskytla metoda TCA v acetonu, sérii několika spot bylo možné detekovat také u metod s využitím SDS a pomocí močoviny. Odlišného výsledku bylo dosaženo u extrakce fenolické a fracionační. Z filmů jsou patrné pouze dvě spoty patřící CBF-1.

Dále byl proveden Western blot extraktů kukuřice. Filmy po vyvolání jsou zachyceny na Obr. 37. U těchto vzorků pak nebyly znatelné rozdíly mezi jednotlivými extrakčními metodami. Na každém filmu byly detekovány pouze dvě spoty, které se u jednotlivých extrakcí lišily pouze svou intenzitou. Tento výsledek byl poměrně překvapivý, protože pro kukuřičný homolog CBF-1 byla nalezena pouze jediná sekvence. Přesto varianta, že také u pšenice existuje více homologů CBF-1, nemůže být zcela vyloučena. Experimenty, které by tuto možnost potvrdily nebo vyvrátily, však již byly nad rámec této práce.



Obr. 37: Western blot extraktů obilek kukuřice; (a) extrakce TCA v acetonu, (b) extrakce fenolická, (c) extrakce SDS, (d) extrakce močovinná, (e) extrakce fracionační. Pro tuto analýzu bylo použito 22,5 µg

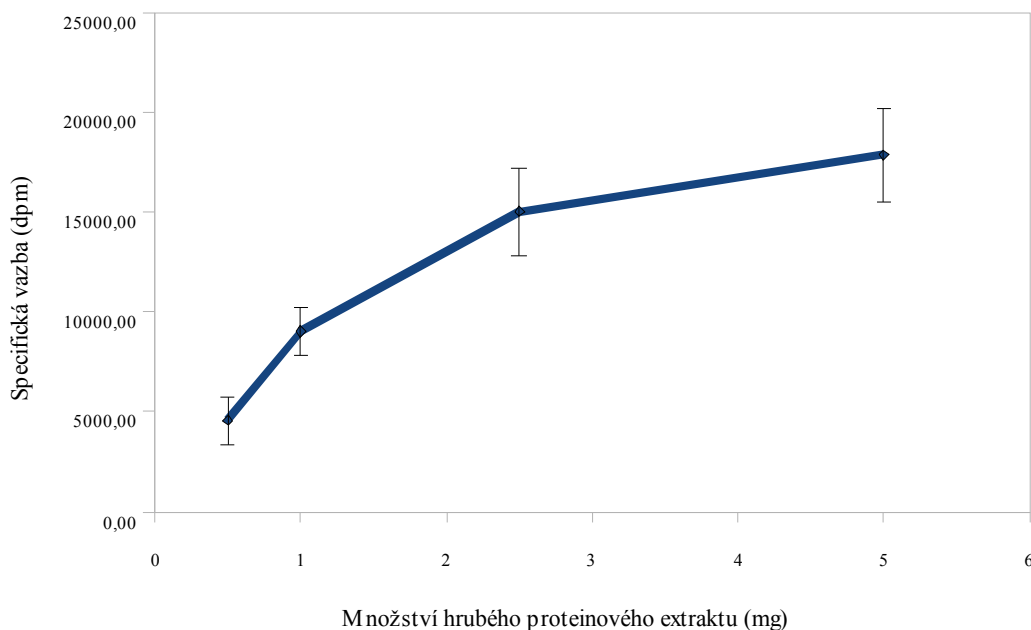
proteinu.

Jelikož byl dříve proveden Western blot samotného CBF-1 (viz. kapitola 4.1 Charakterizace cytokinin-vazebného proteinu) a výsledný film obsahoval větší množství spot shodných se spotami detekovanými po extrakci metodou TCA v acetonu, byla tato metoda vybrána jako vhodná ke zpracování daného materiálu pro pozdější imunodetekci studovaného proteinu po 2-D elektroforéze následované Western blotem. Při tomto výběru byl brán zřetel hlavně na výsledky dosažené u vzorků pšenice, protože u kukuřice nebyl pozorován mezi testovanými metodami téměř žádný rozdíl. Extrakce využívající močovinu byla poté zvolena k izolaci proteinů pro MRM kvantifikaci a extrakce pomocí pufru s obsahem KCl pro rovnovážnou dialýzu.

4.3 Rovnovážná dialýza extrahovaného materiálu

Dalším cílem mé diplomové práce bylo na našem pracovišti zavést a optimalizovat metodu rovnovážné dialýzy pro sledování vazebné kapacity rostlinných proteinů extrahovaných z obilek vůči cytokininům. Pro tuto metodu byl používán radioaktivní standard [^3H]benzyladenin ([^3H]BAP) s následujícími parametry: 0,5 mCi v 0,5 ml MeOH, 37,4 Ci/mmol. Koncentrace roztoku standardu byla přepočtena na základě výše uvedených jednotek jako 26,7 μM .

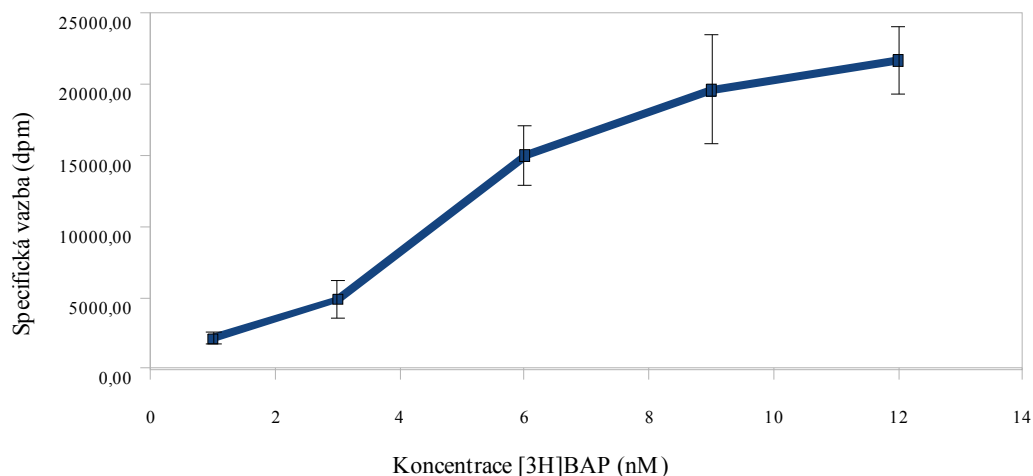
Aby bylo možné pomocí rovnovážné dialýzy spolehlivě sledovat změny ve vazebné kapacitě proteinů, bylo nutné zavést podmínky poskytující co nejlepší odezvy měřeného signálu. Nejprve bylo proto předmětem mého zájmu stanovit optimální množství hrubého proteinového extraktu obilek pšenice. Z tohoto důvodu byl proveden experiment, kdy byla specifická vazba cytokininů sledována při aplikaci různého množství proteinů za fixní koncentrace [^3H]BAP (6 nM), (Obr. 38).



Obr. 38: Závislost velikosti specifické vazby cytokininů na množství nanesených proteinů extrahovaných z pšeničných obilek.

Z uvedeného vynesení grafu je velmi dobře patrný narůstající trend měřeného signálu se zvětšujícím se množstvím proteinů. Tento trend se projevuje výrazně až do množství 2,5 mg hrubého extraktu, při dalším zvýšení nanášky proteinů na 5 mg již není vzrůst měřeného signálu tak velký. Na základě poměru velikosti odezvy měřeného signálu ku množství aplikovaných proteinů pak byla jako ideální nanáška poskytující dostatečnou odezvu umožňující statistické vyhodnocení výsledků vybrána hodnota 2,5 mg proteinů.

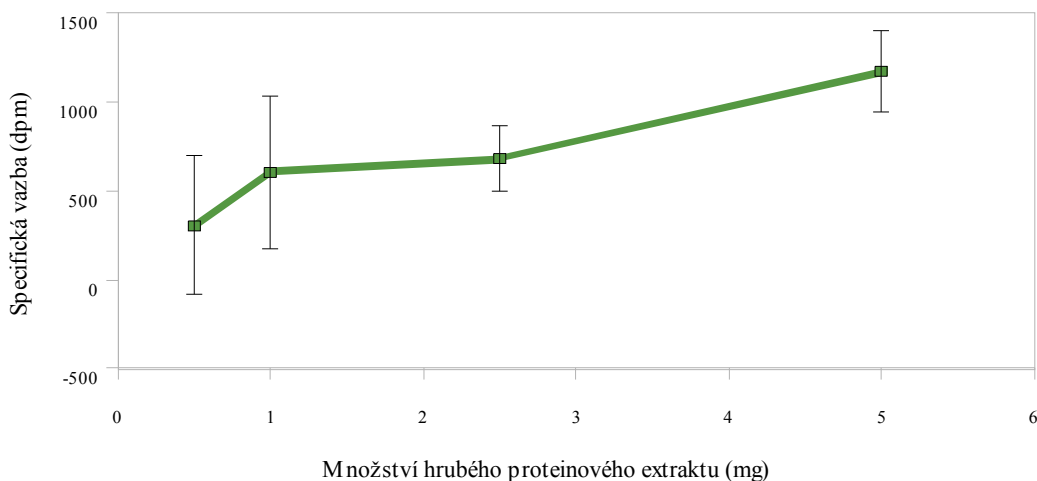
Cílem dalšího experimentu bylo proměřit závislost specifické vazby cytokininů na koncentraci [^3H]BAP při stejném množství aplikovaných pšeničných proteinů. Pro tento experiment bylo na základě studia literatury vybráno 5 koncentrací značeného standardu v rozsahu od 1 do 12 nM (přibližně v tomto rozmezí se pohybovaly koncentrace používané různými autory pro obdobná měření vazebné kapacity), (Obr. 39).



Obr. 39: Závislost měřené radioaktivity na vzrůstající koncentraci značeného ligandu.

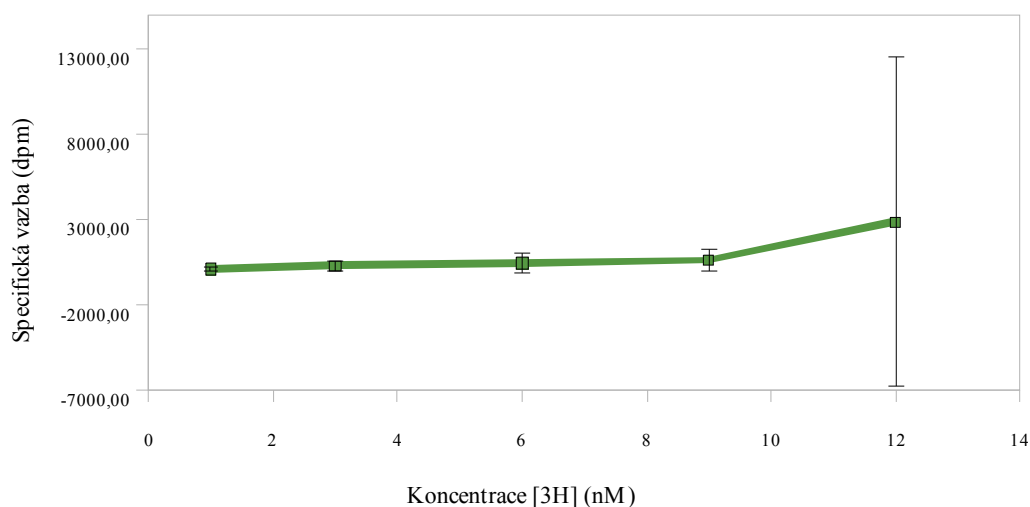
Výsledný graf má charakter sigmoidní křivky. Z grafu pak vyplývá, že koncentrace 6 nM leží zhruba v 50 % rostoucí části křivky, a proto byla tato koncentrace zvolena pro kompetiční testy specifity dané interakce a také pro sledování vazebné kapacity v dalších experimentech.

Oba tyto experimenty byly zopakovány také pro vzorky získané extrakcemi proteinů kukuřice. Při těchto experimentech byly zachovány stejné parametry jako v případě dialýz proteinů pšenice. Graf závislosti radioaktivity na množství hrubého extraktu obilok kukuřice je znázorněn na Obr. 40.



Obr. 40: Závislost odezvy na množství aplikovaného hrubého kukuřičného extraktu.

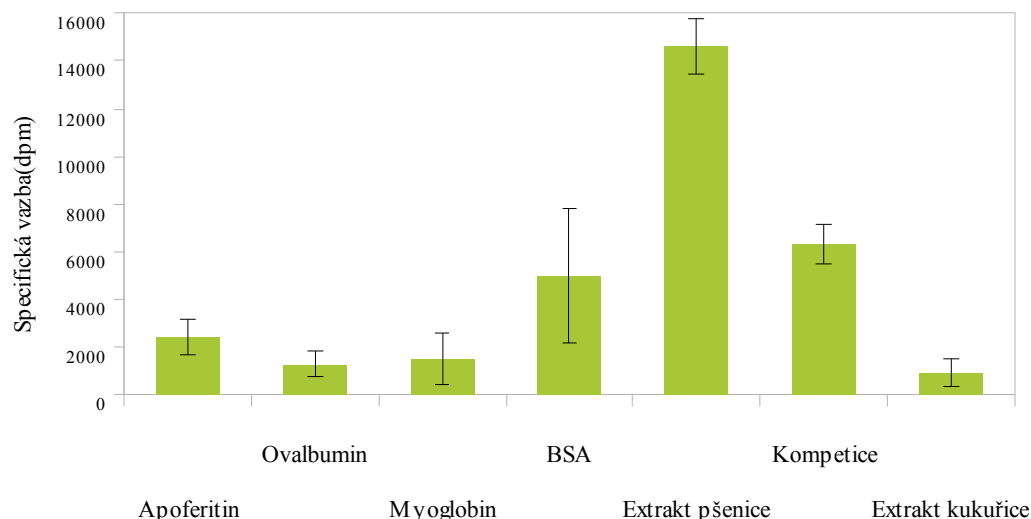
Výsledek druhého z experimentů provedeného s měnící se koncentrací značeného ligandu u kukuřičných vzorků je zobrazen na Obr. 41.



Obr. 41: Závislost radioaktivity na vzrůstající koncentraci standardu.

Na základě získaných výsledků je zřejmé, že u zpracovaných vzorků nedošlo ke specifické vazbě proteinu a $[^3\text{H}]\text{BAP}$. Tato data však byla poměrně překvapivá, protože homolog CBF-1 byl v extraktech z kukuřičných obilek provedením Western blotu s následnou imunodetekcí specifickou protilátkou prokázán (viz výsledky předcházející kapitola). Vysvětlením těchto rozporuplných výsledků by mohla být nedostatečná extrakce proteinu použitým pufrům z důvodu nepřítomnosti detergentu. Tento pufr totiž obsahoval pouze KCl a jak je dobře patrné na Western blotu po frakcionační extrakci (Obr. 33), (viz Western blot extrakce frakcionační) že kukuřičný homolog CBF-1 byl daleko lépe extrahován pufrům obsahujícím SDS. Použití některého z neionogenních detergentů zachovávajících přirozenou aktivitu proteinů (například Triton X-100, Nonidet P-40 nebo n-dodecyl- β -D-maltosid) by tak mohlo přinést zvýšení efektivity extrakce CBF-1 a tudíž i změnu v měřeném signálu. Vzhledem k omezenému časovému rozsahu mé práce však nebyl experiment, jehož hlavní náplní by bylo ověřit vliv přítomnosti detergentu na vazebnou kapacitu proteinových extraktů z kukuřice, proveden.

Pro potvrzení specifity interakce sledované v daných vzorcích byl uskutečněn kompetiční test založený na měření radioaktivity proteinových vzorků, které byly dialyzovány proti roztoku obsahující jak zančený ligand, tak obyčejný benzyladenin (oba ve stejné koncentraci, 6 nM). Do tohoto experimentu byly také zařazeny některé standardní proteiny (Obr. 42).



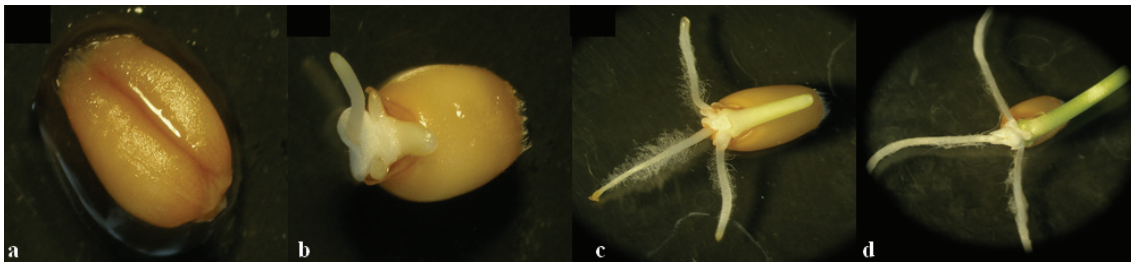
Obr. 42: Sloupkový graf závislosti měřené radioaktivity na typu vazebného proteinu. Množství aplikovaných proteinů bylo u tohoto experimentu pro všechny typy proteinů shodné - 2,5 mg.

Na základě získaných údajů je zřejmé, že myoglobin, apoferitin a ovalbumin vykazují jen velmi malou odezvu měřeného signálu. Ke specifické vazbě použitého ligandu u nich totiž nedochází. Velmi zajímavá je poté vyšší hodnota naměřené radioaktivity u posledního použitého standardního proteinu, kterým byl BSA. Jak bylo ale prokázáno u jeho lidského homologue, sérový albumin má v rámci své struktury dvě primární a celou řadu sekundárních vazebných míst. Těmito místy je pak schopen vázat širokou škálu nízkomolekulárních ligandů (Curry, 2009; Ghuman *et al.*, 2005), mezi něž se řadí také purinové báze a příslušné nukleosidy (Sulkowska & Michnik, 1997). Oproti myoglobinu, apoferitinu a ovalbuminu se tak zvýšené hodnoty měřeného signálu daly očekávat. Nejvyšší odezvu vykazuje podle očekávání hrubý extrakt obiliek pšenice. Tento výsledek je s největší pravděpodobností způsoben specifickou vazbou [^3H]BAP studovaným proteinem. Na základě kompetičního testu pak byla specifita této interakce přesvědčivě prokázána. Přídavek neznačeného ligandu totiž způsobil pokles naměřené hodnoty na cca. 50 % původního signálu, což přesně odpovídá teoretickým předpokladům. Do grafu je také pro srovnání zanesena hodnota měřeného signálu vzorků z kukuřice. Ta byla stejně jako u přecházejících experimentů minimální, srovnatelná s hodnotami signálu standardních proteinů. Jak bylo diskutováno výše, je možné, že během zpracování obiliek nebyla extrakce studovaného proteinu dostatečná.

4.4 Sledování hladiny CBF-1 při klíčení

Jak již bylo zmíněno dříve, hlavním předmětem mého zájmu bylo monitorování hladiny CBF-1 během klíčení. To bylo sledováno po dobu prvních čtyř dnů, během kterých byly obilky umístěny v klimakomoře s nastaveným režimem 16 hodin světlo o intenzitě 5000 lx, 8 hodin tma. Obilky byly po uplynutí požadované doby od začátku klíčení sklizeny a jejich fenotypické

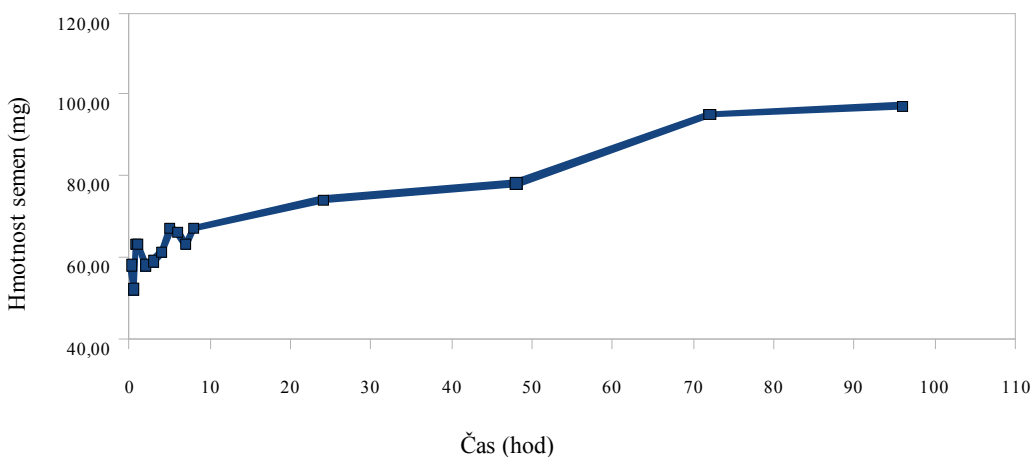
změny byly zdokumentovány (Obr. 43).



Obr. 43: Strukturální změny obilek pšenice během čtyř dnů klíčení. (a) klíčení obilky po prvním dnu inkubace, (b) klíčení obilky po druhém dnu inkubace, (c) klíčení obilky po třetím dnu inkubace, (d) klíčení obilky po čtvrtém dnu inkubace.

Z obrázků jsou znatelné výrazné změny struktury obilek pšenice již po prvním dnu klíčení. Klíčení obilek bylo zahájeno výraznou absorpcí vody suchým semenem, tzv. imbibicí, která pokračovala rozšířením embrya a jeho rapidním nabytím hmotnosti. Po prvním dnu klíčení bylo viditelné protržení plášťové vrstvy embrya následované proniknutím radikuly, která je základem budoucího kořene (Obr. 43a). Po dalším dnu inkubace je zřejmé výrazné prodloužení radikuly a vznik základu pro budoucí stonk na opačné straně radikuly (Obr. 43b). Celkové uspořádání tohoto systému je rovnoměrné do úhlu 360° . Na konci sledované periody dochází již k menšímu prodloužení systému s diferenciací stonkové části (Obr. 43d).

Ve zvolených časových bodech byla navíc zaznamenána průměrná hmotnost obilek. Výsledky byly následně zaneseny do grafu (Obr. 44).

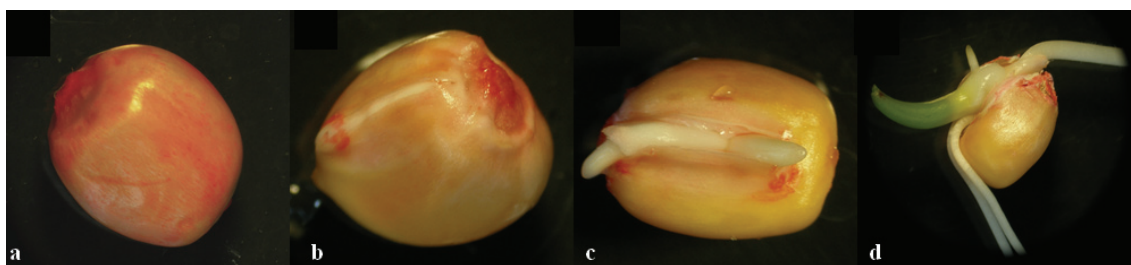


Obr. 44: Graf závislosti hmotnosti obilek na době od zahájení klíčení. V grafu nejsou zanesené směrodatné odchylky z důvodu větší přehlednosti, hlavně u počátečních bodů křivky.

Křivka na obrázku 44 vykazuje pozvolný sigmoidní charakter. Absorpce vody semenem

lze rozdělit na tři části. Pro první část křivky je charakteristická prudká absorpce vody, kdy je přírůstek hmotnosti obilky znatelný již po patnácti minutách. Tyto parametry jsou charakteristické pro tzv. imbibiční fázi klíčení, která je následovaná neměnnou fází. Pro tuto část je typická nevýrazná absorpce vody, která je pozorovatelná přibližně mezi 24. a 48. hodinou klíčení. Poslední fází je opět zvýšená absorpce vody semenem, která ukončuje křivku klíčení (Kucera *et al.*, 2005).

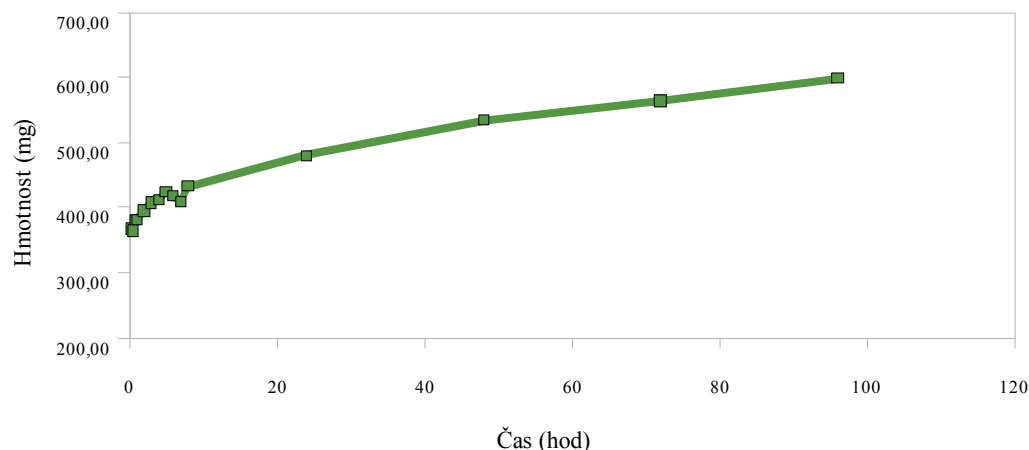
Tento experiment byl zopakován také pro obilky kukuřice. Opět byla provedena čtyřdenní inkubace obilky za stejných podmínek jako v předcházejícím experimentu. Po uplynutí požadované doby byly obilky sledovány pod mikroskopem a vyfotografovány (Obr. 45).



Obr. 45: Strukturální změny obilky kukuřice během čtyř dnů klíčení. (a) klíčení obilky po prvním dnu inkubace, (b) klíčení obilky po druhém dnu inkubace, (c) klíčení obilky po třetím dnu inkubace, (d) klíčení obilky po čtvrtém dnu inkubace.

Z uvedené série obrázků jsou opět viditelné typické fenotypické změny obilky během klíčení. Tento proces probíhá u kukuřice pomalejší rychlostí. Trend klíčení je stejný jako v případě obilky pšenice. Z fotografie je zřejmá rapidní imbibice již v prvním dni klíčení. V této fázi dochází k rapidnímu nárůstu hmotnosti semene opět již po patnácti minutách klíčení (Obr. 46). Druhý den je pozorovatelný náznak protržení plášťové vrstvy embrya, ale zatím bez proniknutí radikuly. Tento děj je typický pro třetí den inkubace, kdy lze detekovat i základ stonku. K nejvýraznějším fenotypickým změnám pak dochází během čtvrtého dne klíčení, kdy lze jednoduše rozeznat stonkovou část od části radikuly. V porovnání s obilkami pšenice není zřejmé pravidelné uspořádání systému. Systém utváření budoucího kořene a stonku je zcela náhodný.

Pro stanovení křivky klíčení byly obilky v příslušných intervalech od počátku klíčení zváženy a jejich průměrná hmotnost byla zaznamenána do grafu (Obr. 46).



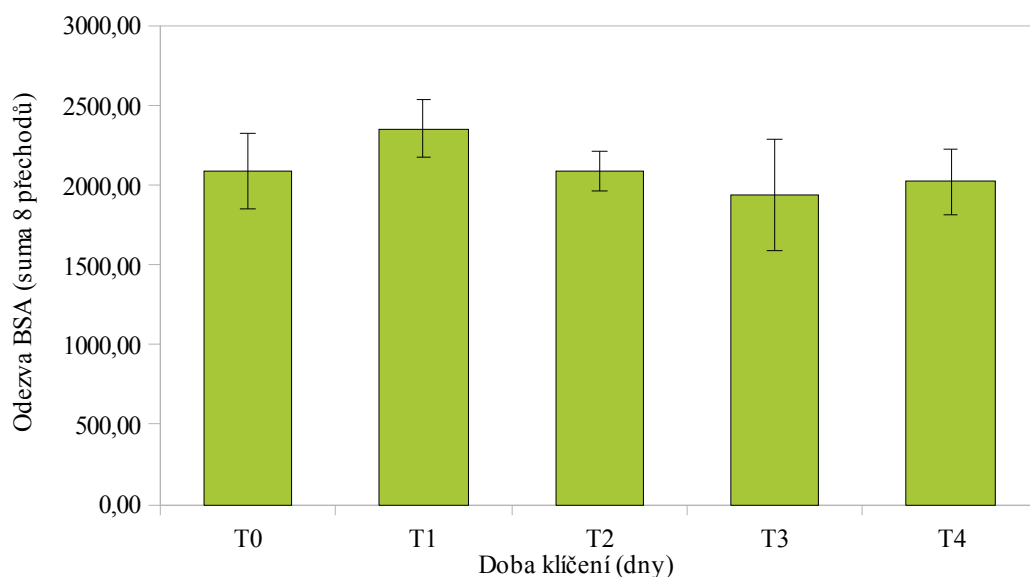
Obr. 46: Křivka klíčení obilek kukuřice. V grafu nejsou zanesené směrodatné odchylky z důvodu přehlednosti počátečních bodů křivky.

Křivka grafu na Obr. 46 nevykazuje typický charakter pro křivku klíčení. Z grafu je zřejmé pozvolné zvyšování hmotnosti semen až do posledního sledovaného bodu bez přítomnosti neměnné fáze.

Po každém uplynutém dni klíčení byla také vypočtena klíčivost obilek obou druhů rostlinného materiálu. V případě obilek pšenice se klíčivost během čtyř inkubačních dnů pohybovala v rozmezí 94 až 98 %. U obilek kukuřice pak byla klíčivost vždy okolo 95 %.

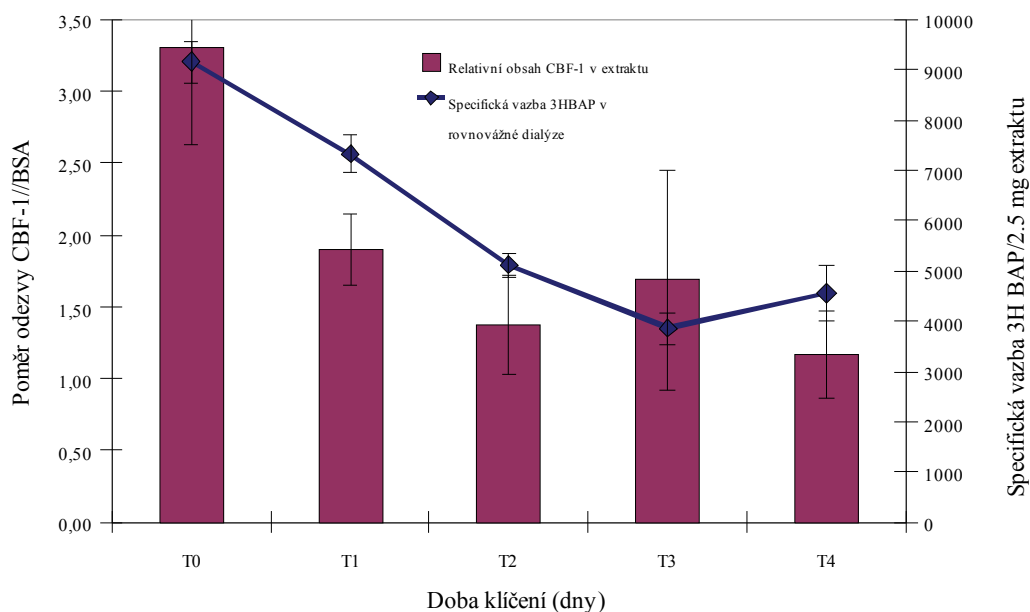
Pro monitorování hladiny CBF-1 byla použita metoda MRM kvantifikace a pro sledování vazebné kapacity rovnovážná dialýza. Jak už bylo zmíněno dříve, bod T0 značí obilky na počátku klíčení, tedy ještě v suchém stavu. Během čtyř inkubačních dnů byly postupně odebírány jednotlivé vzorky, které byly následně přichystány pro jednotlivá měření.

Pro MRM analýzu byl jako interní standard zvolen BSA, který se přidával ještě před štěpením k jednotlivým extraktům a jehož hladina tak byla pro všechny analyzované vzorky přibližně stejná (Obr. 47). Z toho důvodu bylo možné porovnávat měnící se hladinu sledovaného proteinu CBF-1 jako změnu poměru odezvy jeho peptidů vztaženou k odezvě peptidů patřících BSA. Současně s tímto experimentem byla vždy provedena rovnovážná dialýza pro stanovení vazebné kapacity proteinů ve stejných vzorcích. Graf monitorující výsledky z obou měření je zachycen na Obr 48.



Obr. 47: Odezva BSA v měřených vzorcích pšenice.

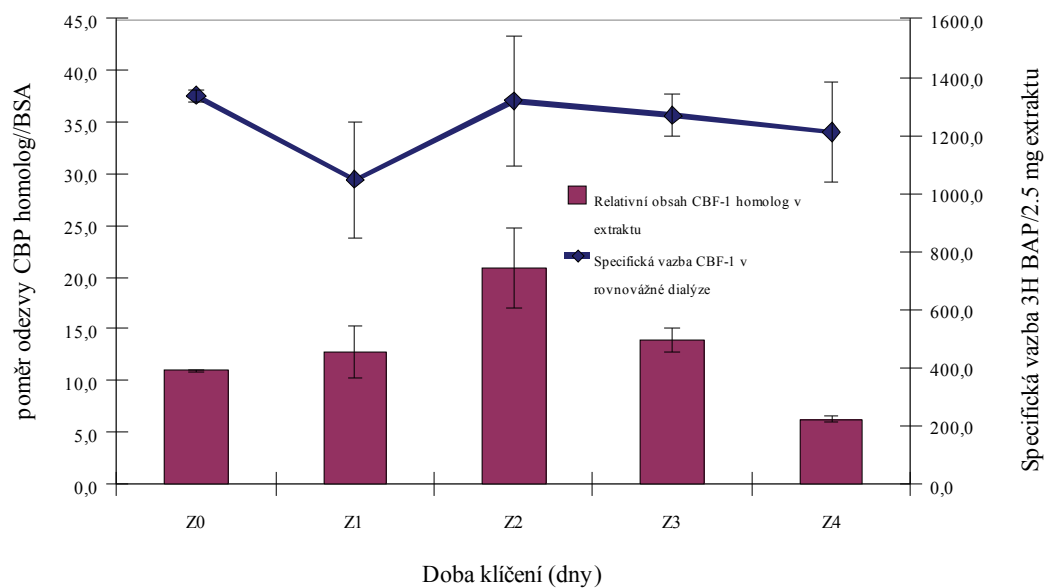
Na základě výsledků rovnovážné dialýzy je zřejmý pokles měřeného signálu, nikoli však k nulovým hodnotám, jak bylo očekáváno podle dříve publikovaných výsledků (Brinegar *et al.*, 1985b). Je zřejmé, že se vazebná kapacita po třetím dni ustálí na cca. polovinu své výchozí hodnoty. Výsledky z této nezávislé metody se zcela shodují s výsledky naměřenými pomocí hmotnostní spektrometrie. Na Obr. 48 je zřejmý pokles odezvy CBF-1/BSA během čtyřdenní inkubace, přičemž trend tohoto poklesu je shodný s poklesem vazebné kapacity. Hladina CBF-1 tak v průběhu čtyř sledovaných dní spadne na polovinu, ale dále se již výrazně nemění. Výsledky původí studie Brinegara a spolupracovníků přitom udávají, že již během prvního dne klíčení dochází ke zantelnému poklesu množství CBF-1 (viz kapitola 1.2.1 Cytokinin-vazebný protein ze pšenice seté), a během dalších dvou dnů již tento protein v obilce nelze detekovat (Brinegar *et al.*, 1985b). Jako možné vysvětlení může být vzata do úvahy nepřítomnost inhibitorů proteas v používaných extrakčních pufrech, která je díky značné proteolytické aktivitě vyskytující se v tomto typu vzorků zcela nezbytná.



Obr. 48: Relativní kvantifikace obsahu CBF-1 proteinu v obilkách pšenice během klíčení. Kvantifikace je prováděna jako poměr obsahu CBF-1 k internímu standardu BSA. Relativní obsah CBF-1 je doplněn grafem specifické vazby $[^3\text{H}]$ BAP změřené pomocí rovnovážné dialýzy s 2,5 mg proteinů v extraktu na reakci.

Pro vzorky kukuřice nevyšly výsledky rovnovážné dialýzy tak příznivě jako v předcházejícím případě. Jak už bylo zmíněno dříve, vazba $[^3\text{H}]$ BAP nebyla u extraktů z kukuřice prokázána ani v předcházejících experimentech (viz kapitola 4.3 Rovnovážná dialýza extrahovaného materiálu), a stejné výsledky se projevíly také u dialýzy pro klíčící obilky. I v tomto případě byly naměřené jen velmi malé odezvy měřeného signálu. Možné příčiny tohoto jevu již byly zevrubně diskutovány výše. MRM analýza poté potvrdila přítomnost homologu CBF-1 u kukuřice a tím i výsledky dosažené v průběhu zavádění extrakčních metod. Z grafu na Obr. 49 je zřejmý nárůst naměřené odezvy CBF-1/BSA s vyvrcholením v druhém dnu inkubace. V dalších inkubačních dnech hodnota této odezvy klesá, ne však k nulové hodnotě. Tímto profilem se kukuřičný homolog CBF-1 liší od proteinu ze pšenice, k vysvětlení tohoto rozdílu však budou potřeba ještě mnohé další experimenty.

V původním plánu bylo také ověřit všechny dosažené výsledky další nezávislou metodou, kterou měla být 2-D elektroforéza následovaná Western blotem a imunodetekcí CBF-1 specifickou protilátkou. Z časových důvodů však tento experiment již nebyl proveden.



Obr. 49: Relativní kvantifikace obsahu homologu CBF-1 v obilkách kukuřice během klíčení. Kvantifikace je prováděna jako poměr obsahu homologu CBF-1 k internímu standardu BSA. Relativní obsah CBF-1 homologu je doplněn grafem specifické vazby $[3H]BAP$ změřené pomocí rovnovážné dialýzy s 2,5 mg proteinů v extraktu na reakci.

Závěr

Problematika cytoklininů je jedním ze stěžejních výzkumných témat Laboratoře růstových regulátorů. Velkou tradici zde má hlavně kvantitativní analýza těchto rostlinných hormonů založená na technikách moderní hmotnostní spektrometrie. V poslední době však na pracovišti dochází k odklonu od této úzké specializace, zaváděno je stále více rozličných metodik a zřetelná je také snaha o spolupráci jednotlivých výzkumných skupin, které pak mohou nabídnout zcela odlišný náhled na stejnou tematiku. S tím také souviselo znovuotevření výzkumu cytokinin-vazebného proteinu CBF-1, na kterém se nyní podílí proteomická skupina vedená Mgr. René Lenobelem, Ph.D. a tým zaměřený na výzkum regulací funkce cytokininů Mgr. Lukáše Spíchala, Ph.D. Výběr tohoto tématu pak byl založen na již několikrát zmiňované skutečnosti, že ačkoliv byl CBF-1 v průběhu 70. a 80. let minulého století poměrně intenzivně studován, zůstalo u něj několik nevyřešených otázek. Má diplomová práce byla proto zaměřena z velké části metodicky, a to na zavedení několika proteomických metod a otestování jejich vhodnosti pro výzkum CBF-1. I přesto však mnou provedené experimenty přinesly celou řadu nových, zajímavých poznatků.

Prvním z cílů experimentální části mé práce byla podrobnější charakterizace studovaného proteinu. V této fázi se podařilo najít částečnou sekvenci CBF-1, která se stala základem pro pozdější vyhledání několika úplných aminokyselinových sekvencí pro tento protein. Překvapivým zjištěním bylo, že byly tyto sekvence nalezeny také u jiných rostlinných druhů než pšenice, a to u rýže a kukuřice. Ta byla proto zahrnuta jako výchozí materiál i do dalších plánovaných experimentů. Identita sekvencí ze pšenice byla následně potvrzena i experimentálně.

Dalším krokem bylo vyzkoušení a následné zavedení několika technik pro extrakci rostlinných proteinů. Všechny tyto metody se ukázaly být použitelné pro analýzu CBF-1 a 3 z nich poté našly své uplatnění i v pozdějších experimentech. Byly to metoda TCA v acetonu pro 2-D elektroforézu, extrakce využívající močovinu pro MRM kvantifikaci a extrakce pomocí pufru s obsahem KCl pro rovnovážnou dialýzu.

Pro studium vazebného potenciálu proteinů pro cytokininy pak byla na našem pracovišti v rámci mé diplomové práce zavedena a optimalizována výše uvedená metoda rovnovážné dialýzy. Tato metoda pak poskytla velmi uspokojivé výsledky při studiu vzorků pocházejících z obilí pšenice. Bohužel, u proteinových extraktů z kukuřice se žádnou vazebnou aktivitu nepodařilo zjistit.

Experimentem, který měl funkčnost všech zavedených metod prověřit v praxi, bylo monitorování hladiny a vazebné kapacity CBF-1 během klíčení. Pro tento účel byla použita relativní kvantifikace studovaného proteinu metodou MRM, jejíž výsledky se zcela ideálně

shodovaly s výsledky rovnovážné dialýzy a do studia tohoto vazebného proteinu vnesly několik nových pohledů.

Stanovené cíle, které byly předmětem mé diplomové práce, byly splněny.

Literatura

- Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007), Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1017-1031.
- Bjellqvist B. Ek. K., Righetti P. G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W. (1982), *J. Biochem. Bioph. Meth.* **6**, 317-339.
- Boschetti E., Righetti P. G. (2009) The art of observing rare protein species in proteomes with peptide ligand libraries, *Proteomics* **9**, 1492-510.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brault M., Maldiney R. (1999) Mechanism of cytokinin action, *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 403-412.
- Brault M., Maldiney R., Miginiac E. (1997) Cytokinin-binding proteins, *Physiol. Plantarum* **100**, 520-527.
- Brault M., Caiveau O., Pédrón J., Maldiney R., Scotta B., Miginiac E. (1999) Detection of membrane-bound cytokinin-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* cells, *Europ. J. Biochem/FEBS* **260**, 512-519.
- Brinegar A. Ch., Cooper G., Stevens A., Hauer Ch., Shabanowitz J., Hunt D. F., Fox J. E. (1988) Characterization of a benzyladenine binding-site peptide isolated from a wheat cytokinin-binding protein: Sequence analysis and identification of a single affinity-labeled histidine residue by mass spectrometry, pp. 5927-5931, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**.
- Brinegar A. Ch., Fox J. E. (1985a) Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology **4**, pp. 91-100.
- Brinegar A. Ch., Stevens A., Fox J. E. (1985b) Biosynthesis and degradation of a wheat embryo cytokinin binding protein during embryogenesis and germination, *Plant Physiol.* **79**, 706-710.
- Brinegar A. Ch., Fox J. E. (1985c) Resolution of the subunit composition of a cytokinin-binding protein from wheat embryos, *Biol. Plant.* **27**, 100-104.
- Brinegar A. Ch. (1994) Cytokinin binding proteins and receptors, *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, pp. 217-232, Boca Raton.
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G. M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P. G. (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis* **25**, 1327-1333.
- Carpentier S. C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for

- two-dimensional gel electrophoresis analysis, *Proteomics* **5**, 2497-2507.
- Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Nat. Protoc.* **1**, 1852-1858.
- Curry S. (2009) Lessons from the Crystallographic Analysis of Small Molecule Binding to Human Serum Albumin, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**, 342–357.
- D'Alessandro A., Righetti P. G., Zolla L. (2010) The red blood cell proteome and interactome: An update, *J. Proteome Res.* **9**, 144-163.
- Damerval C., de Vienne D., Zivy M., Thiellement H. (1986), Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increased level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins, *Electrophoresis* **7**, 52-54.
- Erion J. L., Fox J. E. (1975) Cytokinin-binding protein from higher plant ribosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun* **64**, 694-700.
- Erion J. L., Fox J. E. (1981) Purification and properties of a protein which binds cytokinin-active 6-substituted purines, *Plant Physiol.* **67**, 156-162.
- Fox J. E. (1992) Molecular modeling of cytokinins and the CBF-1 receptor, *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*, pp. 127-132, SPB Academic Publishingbv, The Hague.
- Fujimoto Y., Nagata R., Fukasawa H., Yano K., Azuma M., Iida A., Sugimoto S., Shudo K., Hasimoto Y. (1998) Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*), *Europ. J. Biochem/FEBS* **258**, 794-802.
- Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Krischner M. W., Gygi S. P. (2003), Absolute quantitation of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6940-6945.
- Gharbi S., Gaffney P., Yang A., Zvelebil M. J., Cramer R., Waterfield M. D., Timms J. F. (2002) Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system, *Mol. Cell Proteomics* **2**, 91-98.
- Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I., Bhattacharya A. A., Otagiri M., Curry S. (2005) Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin, *J. Mol. Biol.* **353**, 38–52.
- Görg A., Drews O., Lück C., Weiland F., Weiss W. (2009) 2-DE with IPGs, *Electrophoresis* **30**, 122-132.
- Gouw J. W., Krijgsveld J., Heck A. J. R. (2010) Quantitative Proteomics by Metabolic Labeling of Model Organisms, *Mol. Cell Proteomics* **9**, 11-24.
- Griffiths J.R., Unwin R.D., Evans C.A., Leech S.H., Corfe B.M., Whetton A.D. (2007) The application of a hypothesis-driven strategy to the sensitive detection and location of acetylated lysine residues, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1423–1428.
- Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R. (1999) Quantitative

- analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat. Biotechnol.* **17**, 994-999.
- Hamaguchi N., Iwamura H., Fujita T. (1985) Fluorescent anticytokinins as a probe for binding, *Eur. J. Biochem.* **153**, 565-572.
- He P., Friebe B. R., Gill B. S., Zhou J. M. (2003) Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat, *Plant Mol. Biol.* **52**, 401-414.
- Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G., Wareing P. F. (1973) A new cytokinin from *Populus robusta*, *Tetrahedron Lett.* **14**, 2827-2828.
- Hurkman W. J., Tanaka Ch. K. (2007) Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis, *J. Chromatogr. B* **849**, 344-350.
- Isaacson T., Damasceno C. M., Saravanan R. S., He Y., Catalá C., Saladié M., Rose J. K. (2006) Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues, *Nat. Protoc.* **1**, 769-774.
- Kamínek M., Trčková M., Fox J. E., Gaudinová A. (2003) Comparison of cytokinin-binding proteins from wheat and oat grains, *Phys. Plant.* **117**, 453-458.
- Keim P., Erion J. L., Fox J. E. (1981) The current status of cytokinin-binding moieties, pp. 179-190, Springer-Verlag, Berlin.
- Keim P., Fox J. E. (1980) Interaction of radiolabeled cytokinin photoaffinity probe with receptor protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1325-1334.
- Kucera B., Cohn M. A., Leubner-Metzger G. (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination, *Seed Sci. Res.* **15**, 281-307.
- Kulaeva O. N., Zagranichnaya T. K., Brovko F. A., Karavaiko N. N., Selivanka S. Y., Zemlyachenko Y. Va, Hall M., Lipkin V. M., Boziev K. M. (1998) A new family of cytokinin receptors from cereals, *FEBS Lett* **423**, 239-242.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Lange V., Picotti P., Domon B., Aebersold R. (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial, *Mol. Syst. Biol.* **4**, 1-14.
- Letham D. S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*, *Life Sci.* **8**, 569-573.
- Lilley K. S., Dupree P. (2006) Methods of quantitative proteomics and their application to plant organelle characterization, *J. Exp. Bot.* **7**, 1493-1499.
- Martyniuk Ch. J., Denslow N. D. (2009) Towards functional genomics in fish using quantitative proteomics, *Gen. Comp. Endocr.* **164**, 135-141.
- Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1329-1334.
- Mok M. C. (1994) Cytokinins and plant development-an overview, pp. 155-166, CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Mollah S., Wertz I.E., Phung Q., Arnott D., Dixit V.M., Lill J.R. (2007) Targeted mass spectrometric strategy for global mapping of ubiquitination on proteins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3357–3364.
- Momotani E., Tsuji H. (1992) Isolation and characterization of a cytokinin-binding protein from water-soluble fraction of tobacco leaves, *Plant Cell Physiol.* **33**, 407-412.
- Moore F. H. (1979) A cytokinin-binding protein from wheat germ. Isolation by affinity chromatography and properties, *Plant Physiol.* **64**, 594-599.
- Nagata R., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K. (1993) Cytokinin-specific binding protein in etiolated mung bean seedlings, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 543-549.
- Ong S. E., Mann M. (2005), Mass spectrometry based proteomics turns quantitative, *Nat. Chem. Biol.* **1**, 252-262.
- Ottens A. K., Golden E. C., Bustamante L., Hayes R. L., Denslow N. D., Wang K. K. (2007), Proteolysis of multiple myelin basic protein isoforms after neurotrauma: characterization by mass spectrometry, *J. Neurochem.* **104**, 1404-1414.
- Picotti P., Rinner O., Stallmach R., Dautel F., Farrah T., Domon B., Wenschuh H., Aebersold R. (2010) High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes, *Nat. Methods* **7**, 43-48.
- Polya G. M., Bowman J. A. (1979) Ligand Specificity of a High Affinity Cytokinin-binding Protein, *Plant Physiol.* **64**, 387-392.
- Polya G. M., Davies J. R. (1983) Resolution and properties of a protein kinase catalyzing the phosphorylation of a wheat germ cytokinin-binding protein, *Plant Physiol.* **71**, 482-488.
- Polya G. M., Davis A. W. (1978) Properties of a high affinity cytokinin-binding protein from wheat germ, *Planta* **139**, 139-148.
- Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips, *Nat. Protoc.* **2**, 1896-1906.
- Razem F. A., Luo M., Liu J.-H., Abrams S. R., Hill R. D. (2004) Purification and characterization of a barley aleurone abscisic acid-binding protein, *J. Biol. Chem.* **279**, 9922-9929.
- Righetti P. G., Burdon R. H., van Knippenberg P. H. Ed. (1990), Immobilized pH gradients: theory and methodology, Eds.; Elsevier: New York, pp. 17.
- Romanov G. A., Taran V. Ya., Chvojka L., Kulaeva O. N. (1986) Specific binding of a zeatin to a protein fraction of barley leaves and purification of cytokinin-binding proteins, *Soviet Plant Physiol.* **33**, 75-85.
- Romanov G. A., Taran V. Ya., Venis M. A., (1990) Cytokinin-binding protein from maize shoots, *Plant Physiol.* **136**, 208-212.
- Ross P. L., Huang Y. N., Marchese J. N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainowski N.,

- Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlett-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D. J. (2004), Multiplexed protein quantitation in *Sacharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents, *Mol. Cell Proteomics* **3**, 1154-1169.
- Sakai S., Kamei N. (1992) Purification of soluble cytokinin-binding protein from etiolated mung bean seedlings. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 504-507.
- Sakakibara H. (2005) Cytokinin biosynthesis and regulation, *Vitam. Horm.* **72**, 271-287.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation, *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431-439.
- Samuelson M. E., Larsson C-M. (1993) Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium, *Plant Sci.* **93**, 77-84.
- Shantz E. M., Steward F. C. (1955) The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6351-6353.
- Schevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J. V., Mann M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.* **1**, 2856-2860.
- Schmidt A., Kellermann J., Lottspeich F. (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels, *Proteomics* **5**, 4-15.
- Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins, *Physiol. Plant.* **101**, 674-688.
- Sulkowska A., Michnik A. (1997) Interaction of purine bases and nucleosides with serum albumin, *J. Mol. Struct.* **410-411**, 27-29.
- Šebela M. (2009) Kvantifikace v proteomice, Přednášky z proteomiky.
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator, *Plant Cell Physiol.* **42**, 85-93.
- Tarkowska D., Dolezal K., Tarkowski P., Åstot C., Holub J., Fuksova K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M. (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC·(+)ESI·MS and capillary liquid chromatography/frit·fast atom bombardment mass spectrometry, *Physiol. Plant.* **117**, 579-590.
- Timms J. F., Cramer R. (2008) Difference gel electrophoresis, *Proteomics* **8**, 4886-4897.
- Toth G. B., Pavia H. (2001) Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP), *J. Chem. Ecol.* **27**, 1899-1910.
- Unlü M., Morgan M. E., Minden J. S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts, *Electrophoresis* **18**, 2071-2077.
- Unwin R.D., Griffiths J.R., Leverentz M.K., Grallert A., Hagan I.M., Whetton A.D. (2005) Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high

- sensitivity, *Mol. Cell Proteomics* **4**, 1134–1144.
- Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development, *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.
- Westermeyer R., Naven T. (2002) Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis.
- Williamson B.L., Marchese J., Morrice N.A. (2006) Automated identification and quantification of protein phosphorylation sites by LC/MS on a hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer, *Mol. Cell Proteomics* **5**, 337–346.
- Ye X., Luke B., Andresson T., Blonder J. (2009) ¹⁸O Stable Isotope Labeling in MS-based Proteomics, *Prog. Brain Res.* **8**, 136-144.
- Yoshida K., Takegami T. (1977) Isolation of cytokinin-binding proteins from tobacco leaves by bioaffinity chromatography and its partial characterization, *J. Biochem.* **81**, 791-799.
- Zhou G., Li H., DeCamp D., Chen S., Shu H., Gong Y., Flag M., Gillespie J., Hu N., Taylor P., Buck M. E., Liotta L. A., Petricoin III E. C., Zhao Y. (2002) 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers, *Mol. Cell Proteomics* **1**, 117-124.

Seznam použitých zkratek

APS	Peroxodisíran amonný
AQUA	Absolute quantification of abundance
BPB	Bromfenolová modř
BSA	Hovězí sérový albumin
CBB	Coomasie Brilliant Blue G-250
CBF-1	Cytokinin-vazebný protein z pšeničného embrya
DTT	Dithiothreitol
2-D elektroforéza	Dvoudimenzionální elektroforéza
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FA	Kyselina mravenčí
[³ H]BAP	[³ H]benzyladenin
IAM	Iodoacetamid
ICAT	Isotope-coded affinity tag
ICPL	Isotope-coded protein label
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
MRM	Multiple reaction monitoring
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného
SILAC	Stabile isotope labeling with amino acids in cell culture
SRM	Selected reaction monitoring
TCA	Kyselina trichloroctová
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

wheat19.6kDa

MKSAVRSPWLVLAIVLSLCLSLSFASWDAEDVGRGSRRWQEGGDEGRSGGSGRPYHFG
QESYREWAKSRHGHFKVLERFDHELLRGSIGDYRVAYLDAAPRAFLQPSHHDADEIAFV
REGEGVLVLLRNGKRESFCIREGDVIVIPAGSIVYSANTHRSKWLRVVLFINPVSTPG

riceQ8L8I0

MAKKKTSSSMARSQLAALLISLCFLSLASNAVGWSRRGEQEEEDERRRHGGEGGRPYH
LGEESFRHWTRTRHGRFSVLERFPDEQVVGAAVGGYRVAVLEAAPRAFLQPSHYDADE
VFYVKEGEGVIVLLREGRRESFCVREGDAMVIPAGAIVYSANTHSSKWFRVVMMLNPV
STPGHFEEYFPVGGDRPESFFSAFSDDVLQAAFNTRREELEKVFERQREGGEITTAPEEQI
RELSKSCSRGGGGGGSGSEWEIKPPSLTGKSPYFSNNHGKLFELTGDECRHLKKLDLQIGL
ANITRGSMIAPNYNTRATKLAVVLQSGGYFEMACPHVSGGGSSERREREREHGRRREE
EQGEEEHGERGEKARRYHKVRAQVREGSVIVIPASHPATIVASEGESLAVVCFFVGANH
DEKVFLAGRNSPLRQLDDPAKKLVFGGSAAREADRVLAAQPEQILLRSPHGRGSVSDM

riceQ852L2

MAKKKTSSSMARSQLAALLISLCFLSLASNAVGWSRRGEREEEDERRRHGGEGGRPYH
LGEESFRHWTRTRHGRFSVLERFPDEQVVGAAVGGYRVAVLEAAPRAFLQPSHYDADE
VFYVKEGEGVIVLLREGRRESFCVREGDAMVIPAGAIVYSANTHSSKWFRVVMMLNPV
STPGHFEEYFPVGGDRPESFFSAFSDDVLQAAFNTRREELEKVFERQREGGEITTAPEEQI
RELSKSCSRGGGGGGSGSEWEIKPSSLTGKSPYFSNNHGKLFELTGDECRHLKKLDLQIGL
ANITRGSMIAPNYNTRATKLAVVLQSGGYFEMACPHVSGGGSSERREREREHGRRREE
EQGEEEHGERGEKARRYHKVRAQVREESVIVIPASHPATIVASEGESLAVVCFFVGANHD
EKVFLAGRNSPLRQLDDPAKKLVFGGSAAREADRVLAAQPEQILLRGPHGRGSVSDM

zeaQ7M1Z8

MKVPVLLLLVSLCFLALAWQTDTESGSGRPYHYGEESFRHWTRSRQGRFRVLERFTH
ELLEDVGNRYVAELEAAPRAFLQPSHYDADEVFVKEGEGVIVLLRGGKRESFCVRE
GDVMVIPAGAVVYSANTHQSEWFRVVMLLSPVVSTSGRFEEFFPIGGESPESFLSVFSDD
VIQASFNTRREEWEKVFEKQSKGEITTASEEQIRELSRSCSRGGRSSRSEGGDSGSSSSK
WEIKPSSSLTDKKPTHSNSHGRHYEITGDECPHLRLLDMDVGLANIARGSMMAPSYNTR
ANKIAIVLKGQGYFEMACPHVSGGRSSPRRERGHGREEEEEEREEQGGGGGQKSRSYR
QVKSRIREGSVIVIPAGHPTALVAGEDKNLAVLCFEVNASFDDKVFLAGTNSALQKMDR
PAKLLAFGADEEQQVDRVIGAQKDAVFLRGPQSHRVSSV

riceA3ANJ6

MAQHTRGEREEEDERRRHGGEGGRPYHLGEESFRHWTRTRHGRFSVLERFPDEQVVG
AAVGGYRVAVLEAAPRAFLQPSHYDADEVFYVKEGEGVIVLLREGRRESFCVREGDAM
VIPAGAIVYSANTHSSKWFRVVMLLNPVSTPGHFEEYFPVGGDRPESFFSAFSDDVLQA
AFNTRREELEKVFERQREGGEITTAPEEQIRELSKSCSRGGGGGSGSEWEIKPSSSLTGKSP
YFSNNHGKLFELTGDECRHLKKLDLQIGLATSPAAAATLRWRAHTCPGGGSSERRERER
EHGRRREEEQGEEHGERGEKARRYHKVRAQVREESVIVIPASHPATIVASEGESLAVVC
FFVGANHDEKVFLAGRNSPAEAARRPGQEARVRRLRGEGSGPRARRAAGADLAARPA
RPRQRLRHVTRRDDVPCTRRAAEQLCDREE

riceA2XMU4

MARSQLAALLISLCFLSLASNAVGSRRGEREEEDERRRHGGEGGRPYHFGEESFRHW
TRTRHGRFSVLERFPDEQVVGAAVGGYRVAVLEAAPRAFLQPSHYDADEVFYVKEGEG
VIVLLREGRKESFCVREGDAMVIPAGAIVYSANTHSSKWFRVVMLLNPVSTPGHFEEYF
PVGGDRPESFFSAFSDDVLQAAFNTRREELEKVFERQREGGEITTAPEEQIRELSKSCSR
GGGGGSGSEWEIKPSSSLTGKSPYFSNNHGKLFELTGDECRHLKKLDLQIGLANITRGSMI
APNYNTRATKLAVVLQGGSGYFEMACPHVSGGGSSERREREREHGGRRREEEQGEEHGE
RGEKARRYHKVRAQVREGSVIVIPASHPATIVASEGESLAVVCFFVGANHDEKVFLAGR
NSPLRQLDDPAKKLVFGGSAAREADRVLAAQPEQILLRGPHGSGSVSDM

wheatTC332797

MKSAVRSPWLVLAIVLSLCLSLSFASWDAEDVGRGSRRWQEGGDEGRSGGSGRPYHFG
QESYREWAKSRHGHFKVLERFDHELLRGSIGDYRVAYLDAAPRAFLQPSHHDADEIAFV
REGEGVLVLLRNGKRESFCIREGDVIVIPAGSIVYSANTHRSKWLRVVMFINPVSTPGRF
QEFLIGSGDERPQSFLSVFSDEVIQAALNTRREDVDRVFESKSKGEGEIEASEEQIREL
SRSCSRGGRGGGGSGSEKEDIQPRSLTGEKPRYSNKHGRFHQITGDQCHHLRKLDMDV
TLVNITRGSMTALKYTTRSTRIYVVVEGRDGYFEMACPHISSSGRSERREHEQEREREH
GQGRRSEEREREQGRGRSEEREQEQRQEEEQGHGREQEKSRYRQVRAQIKVGSVI
VLPAGHPATFV

wheatTC286909

MKSTVVRSPWLALALVLSLCLSLSFASWDAEDVGRGSRRWQEGGDDEGRSGSGSGRP
YHFGESFREWAKSRHGHFKVLERFDHELLRGSIGDYRVACLDAAAPRAFLHPSHYDAD
EIAFVREGEGVLVLLRNGKRESFCVREGDVFPAGSIVYSANTHRSKWFRVVMMLNPV
STPGSFQEFSPIGFGGEQPQSFFSVFSDEVIQAAFNTRQREDVDRVFQRKSRGEGPISEGS
EEQIRELSRSCSRGGRGGGGGGSGSEKEDIQPRSLTGEKPRYSNKHGRFHQITGDQCHHLR
KLDMDVTLVNITRGSMTALRYTTRSTRIYIVVEGRDGYFEMACPHVSSSGRSERREHEQ
EREREHGHGRRSEERGQEHGRRSEEEHGHGGEQEKSRYRQVRAQIKGGVGDR

wheatTC295889

MKSTVVRSPWLALALVLSLCLSLSFASWDAEDEGRGSRRWQEGGDERRSGESGRPYHF
GEESFREWAKSRHGHFKVLERFDHELLRGSIGDYRVACLDAAAPRAFLQPSHYDADEIAF
VREGEGVLVLLRNGKRESFCVREGDVFPAGSIVYSANTHRSKWFRVVMMLNPVSTPG
SFQEFSPIGFGGEQPQSFFSVFSDEVIRAAFNTRQREDVDRVFQRKSRGEGPISEGSEEQI
RELSRSCSRGGRGGGGGGSGSEKEDIQPRSLTGEKPRYSNKHGRFHQITGDQCHHLRKLD
MDVTLVNITRGSMTALRYATRSTRIYIVVEGRDGYFEMACPHVSSFGRSERREHEQERE
REHGHGRRSEEREREHGQGR
RSEERKDEQGRQEEEQGR