



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Optimalizace protokolu extrakce a štěpení
rostlinných proteinů před LC-MS analýzou**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Ivan Petřík
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	24. 7. 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Ivan Petřík
Název práce	Optimalizace protokolu extrakce a štěpení rostlinných proteinů před LC-MS analýzou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Sekce biochemie a biofyziky Univerzity Palackého Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Již řadu let se v rostlinné proteomice za účelem separace a kvantifikace proteinů používá dvoudimenzionální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2DE). Moderním trendem je však přechod na tzv. „gel-free“ metody, které se spoléhají na kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Ta umožňuje nejen separaci a kvantifikaci, ale i současnou identifikaci proteinů. Tato diplomová práce se zaměřuje na aplikaci LC-MS/MS v rostlinné proteomice, přičemž teoretická část komentuje vývoj technologií, které jsou používány pro analýzu rostlinných proteinů a v experimentální části je řešena optimalizace přípravy vzorku rostlinných proteinů pro LC-MS/MS analýzu.
Klíčová slova	rostlinná proteomika, „gel-free“, proteinová extrakce, precipitace, proteolytické štěpení, fosforylace, afinitní chromatografie, oxid titaničitý, LC-MS, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Počet stran	84
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's name	Bc. Ivan Petřík
Title of thesis	Optimization of extraction and digestion protocol for LC-MS analysis of plant proteins
Type of thesis	diploma
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics Biochemistry and Biophysics Section, Palacký University Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural research
Supervisor	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	For many years, two-dimensional gel electrophoresis (2DE) has been well established in plant proteomics as a protein separation and quantification method. However, modern proteomics tends to gel-free technologies such as a liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), because it enables parallel protein separation and quantification as well as identification. This diploma thesis deals with LC-MS/MS application in plant proteomics. The theoretical part summarizes the progress of plant proteomics technologies, while the experimental part describes the optimization of the protocol of plant protein preparation for LC-MS/MS analysis.
Keywords	plant proteomics, „gel-free“ protein extraction, precipitation, proteolytic digestion, phosphorylation, affinity chromatography, titanium dioxide, LC-MS, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Number of pages	84
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ivan Petřík

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu Mgr. Ivo Chamrádovi, Ph.D. za přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytoval po celou dobu řešení diplomové práce. Dále děkuji Mgr. René Lenobelovi, Ph.D. za veškerou pomoc s LC-MS/MS analýzami a zpracováním dat. Mé poděkování patří také celému kolektivu Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná za příjemné pracovní prostředí.

OBSAH

Cíle práce.....	8
1 Teoretická část.....	9
1.1 Proteomika - od elektroforézy k hmotnostní spektrometrii	9
1.2 Rostlinná proteomika	11
1.2.1 Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2DE).....	11
1.2.2 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)	15
1.2.3 Kvantifikace proteinů s využitím MS.....	17
2 Experimentální část	24
2.1 Použité chemikálie.....	24
2.2 Použité vybavení a materiál	25
2.3 Použité přístrojové vybavení	26
2.4 Použité roztoky	26
2.5 Metody	30
2.5.1 Extrakce proteinů z rostlinných buněk	30
2.5.2 Precipitace proteinů	32
2.5.3 SDS-PAGE	33
2.5.4 Štěpení proteinů.....	35
2.5.5 Odsolení peptidů a jejich frakcionace	36
2.5.6 Příprava standardního HeLa lyzátu	38
2.5.7 Obohacení fosfopeptidů ve vsádkovém uspořádání	40
2.5.8 Obohacení fosfopeptidů v kolonkovém uspořádání	42
2.5.9 Obohacení fosfopeptidů v hybridním uspořádání	43
2.5.10 LC-MS/MS analýza.....	44
2.5.11 Zpracování dat	45
2.6 Výsledky a diskuze	47
2.6.1 Experimentální strategie	47

2.6.2 Srovnání metod pro přípravu rostlinných proteinů před LC-MS/MS analýzou.....	48
Závěr.....	65
Seznam zkratek.....	67
Seznam použité literatury	69

CÍLE PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny takto:

- Vypracovat odbornou rešerši na téma analýzy rostlinných proteinů proteomickými metodami.
- Provést srovnávací studii nejčastěji používaných metod pro přípravu proteinů před LC-MS analýzou.
- Na základě získaných výsledků vybrat a doporučit metodický postup přípravy rostlinných proteinů pro LC-MS analýzu.
- Sestavit pracovní protokol vhodný k rutinní přípravě vzorku rostlinných proteinů pro LC-MS analýzu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Proteomika - od elektroforézy k hmotnostní spektrometrii

Proteomika je vědecká disciplína, která se zabývá studiem biologických procesů na úrovni proteinů a spolu s genomikou a transkriptomikou se tak podílí na řešení mnoha otázek v buněčné biologii. Obecným cílem proteomiky je analýza proteinů z hlediska jejich identity, funkce a kvantity, což poskytuje cenné informace o proteinových sekvencích, vyšších proteinových strukturách, míře exprese, posttranslačních modifikacích (PTM) nebo protein-proteinových interakcích. Vedoucí technologii vhodnou k plnění těchto úkolů představuje v dnešní době hmotnostní spektrometrie. Její masivní rozvoj spolu s rozvojem měkkých ionizačních technik a nanokapilární kapalinové chromatografie umožnil analýzu proteinů a peptidů v komplexních biologických vzorcích s velmi vysokou citlivostí, která dosahuje řádově až 10^{-15} mol (Mallick a Kuster, 2010).

Proteomika se však nespolečá jen na tuto technologii. Dodnes využívá biochemické metody, které byly zavedeny před několika desetiletími, nicméně stále plní svůj účel. Jedná se především o techniky separace a kvantifikace (Obrázek 1). Laemmli v roce 1970, kdy ještě nebyl znám pojem proteomika (byl zaveden až roku 1997; James, 1997), představil metodu, která byla modifikací známých variant gelové elektroforézy. Použil zde silný aniontový detergent dodecylsulfát sodný, který zajistil, že byla proteinům rozvolněna jejich trojrozměrná struktura a byl jim udělen jednotný záporný náboj. Po vložení napětí pak proteiny migrovaly od anody ke katodě skrze póry polyakrylamidového gelu rychlostí nepřímo úměrnou jejich velikosti (Laemmli, 1970). Tím dal Laemmli vznik metodě, která je známá jako elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE). S jejím využitím byly k dnešnímu dni uskutečněny tisíce prací z různých odvětví od biochemie, přes molekulární biologii, genetiku, forenzní vědy až po proteomiku.

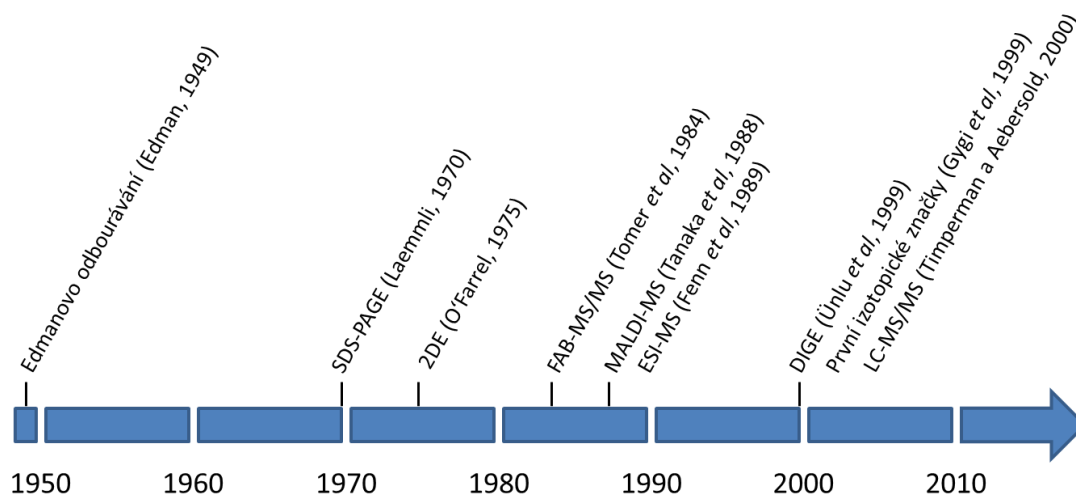
O několik let později byl v důsledku požadavku na lepší rozlišení přidán gelové elektroforéze nový rozměr. Kombinací SDS-PAGE a izoelektrické fokusace (IEF) vznikla zcela nová separační metoda, dvoudimenzionální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2DE; O'Farrel, 1975). Proteiny jsou při ní nejprve rozděleny podle jejich izoelektrického bodu a následně v druhém rozměru podle

velikosti. Toto uspořádání umožnilo relativně levnou separaci s vysokým rozlišením, a tím pádem např. analýzu izoform či PTM a současnou relativní kvantifikaci. Po mnoho let byla ke kvantifikaci v proteomice používána pouze metoda 2DE a její modifikace, diferenční gelová elektroforéza (DIGE) (Pandey a Mann, 2000), které se ještě během několika let dočkaly značných vylepšení a optimalizací (Görg et al, 2004; Schulenberg a Patton, 2004). Je však nutné podotknout, že tyto metody neposkytují žádné informace o identitě proteinů.

Do 80. let 20. století se pro proteinovou identifikaci používalo Edmanovo odbourávání (Edman, 1949), které bylo během následujících dvou desetiletí postupně nahrazeno stále se rozvíjející MS (Obrázek 1). V roce 1984 bylo představeno peptidové sekvenování pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) s ionizací urychlenými atomy (fast atom bombardment; FAB; Tomer *et al*, 1984). Výrazný posun v tomto směru nastal s příchodem měkkých ionizačních technik, jako jsou ionizace laserem za účasti matrice (Tanaka *et al*, 1988) a ionizace elektrosprejem (Fenn *et al*, 1989), která našla své využití ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC; Wolters *et al*, 2001). Pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) byla umožněna jednak separace, jednak rychlá identifikace (Timperman a Aebersold, 2000) a s příchodem izotopového značení byly její možnosti rozšířeny navíc o kvantifikaci (Beynon a Pratt, 2005; Julka a Regnier 2005). Vzhledem k těmto přednostem dnes LC-MS/MS představuje jednu z nejpoužívanějších analytických metod a postupně nahrazuje metody založené na 2DE (Roe a Griffin, 2006).

Výše uvedené metody byly v proteomice aplikovány v řadě studií a na několika modelových organismech od kvasinek, přes lidské buněčné linie až po rostliny. S využitím LC-MS/MS systému byly např. na modelu *Saccharomyces cerevisiae* provedeny dvě velké studie, v nichž autoři přinesli cenné informace o kvasinkovém proteomu a přispěli k pochopení proteinové ubikvitinilace jako jedné z PTM (Peng *et al*, únor 2003; Peng *et al*, srpen 2003). V další práci se Sugiyama a spolupracovníci zabývali studiem proteinových PTM u buněčné linie HeLa a s pomocí afinitní chromatografie s následnou LC-MS/MS analýzou odhalili více než 1 500 fosforylovaných peptidů v komplexním biologickém vzorku (Sugiyama et al, 2007). Z oblasti rostlinné proteomiky byla zase publikována práce na modelu *Arabidopsis thaliana*, ve které byly s využitím gelové elektroforézy a následné MS analýzy identifikovány stovky jaderných proteinů, z nichž několik desítek bylo spojeno s expresí při abiotickém stresu (Bae *et al*, 2003).

Další části rešerše jsou zaměřeny na rostlinnou proteomiku a technologie, které jsou k jejímu studiu používány.



Obrázek 1 Vývoj technik ve 2. polovině 20. století, které byly klíčové pro rozvoj proteomiky.

1.2 Rostlinná proteomika

Jedna z prvních proteomických prací na rostlinném materiálu se zabývala identifikací proteinů na thylakoidní membráně chloroplastů sinic. K tomuto účelu používala ultracentrifugaci v gradientu sacharózy jako metodu separace buněčných organel a gelovou elektroforézu pro separaci proteinů s následnou identifikací pomocí Edmanova odbourávání (Norling *et al*, 1998).

Od té doby byl v rostlinné proteomice zaznamenán výrazný technologický posun a to především v metodách identifikace, které, jak už bylo naznačeno v úvodní kapitole, se dnes spoléhají téměř výhradně na MS. Pro separaci a kvantifikaci jsou pak využívány buďto metody založené na 2DE, které mají převahu nebo na LC v kombinaci s izotopovým značením. V následujících kapitolách je těmto technologiím věnován prostor s ohledem na technické detaily a aplikaci v praxi.

1.2.1 Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2DE)

Od 70. let minulého století se pro separaci proteinů používá dvoudimenzionální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2DE). Během ní dochází k rozdělení proteinů

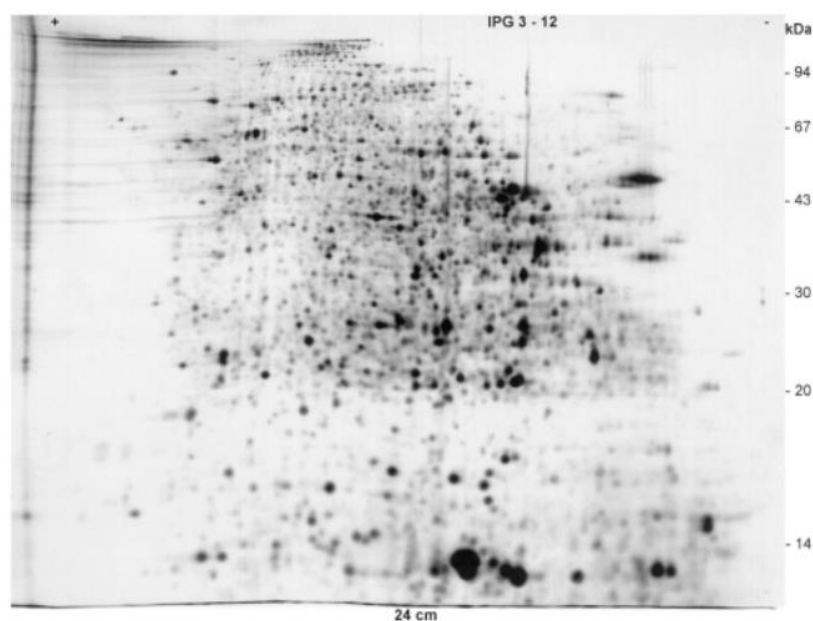
nejprve podle jejich izoelektrického bodu (pI) izoelektrickou fokusací (IEF) a následně podle molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (Kenrick a Margolis, 1970). Proteiny jsou poté vizualizovány barvicími technikami jako je např. barvení dusičnanem stříbrným (Wray *et al.*, 1981) nebo Coomasie brilliant blue (Cabral a Gottesman, 1978) a identifikovány pomocí MS.

Jedny z prvních prací využívaly k analýze proteinů nativní IEF následovanou nativní PAGE. Výsledkem těchto experimentů byly 2D mapy, které měly ve srovnání s dnešními technologicky pokročilejšími variantami 2DE relativně nízké rozlišení (Dale a Latner, 1969; Wrigley, 1970). Pokrok nastal s použitím chaotropních činidel a detergentů, které zajistily vyšší rozpustnost proteinů při separaci. O'Farrell díky této modifikaci odhalil v komplexním lyzátu *Escherichia coli* až 4× více proteinů než s pomocí dosud používané 2DE za nativních podmínek. Stále nevyřešeným problémem však zůstával nestabilní pH gradient, který byl tvořen z nosných amfolytů. Kromě značné nestability byl technicky omezen také rozsahem, který nepřekračoval hodnotu 7,5. To znamenalo problém pro alkalické proteiny, které nebyly v gelu vůbec analyzovány (O'Farrell, 1975).

Toto omezení bylo vyřešeno až s příchodem imobilizovaného pH gradientu (IPG), který využíval derivát akrylamidu, jehož pH bylo regulováno poměrem navázaných karboxy- a aminoskupin. Tato technologie prošla v průběhu několika dalších let značným technologickým vývojem a byla přivedena až do dnešní podoby, kdy jsou IPG komerčně dostupné ve formě proužků s různým rozsahem pH gradientu od základního (3 až 12; Obrázek 2), po různé formy specializovaných, které slouží k separaci extrémně bazických nebo alkalických proteinů. Volba pH gradientu pak závisí na komplexitě vzorku a požadavku analýzy (Görg *et al.*, 2000; Wildgruber *et al.*, 2002; Drews *et al.*, 2004).

Výhodou této technologie, pro kterou je používána dodnes, je relativně vysoké rozlišení, možnost analýzy proteinových izoform nebo potenciálních PTM. I přesto zde existují jistá omezení. Jedno z nich souvisí např. s IEF separací hydrofobních membránových proteinů, které mají tendenci agregovat při vstupu do IPG proužku (Molloy *et al.*, 1998, Santoni *et al.*, 2000). Na druhou stranu však byly publikovány práce, ve kterých byly představeny modifikace 2DE, díky kterým byly tyto proteiny úspěšně separovány (Prime *et al.*, 2000; Borner *et al.*, 2003). Kritickým krokem 2DE separace se ukázal být také přechod proteinů mezi první a druhou dimenzí. Bylo prokázáno, že při tomto kroku dochází k výrazným ztrátám, protože až 20 % veškerých

proteinů adsorbuje na povrch matrice IPG proužku a ztrácí tak svou elektroforetickou mobilitu (Zuo a Speicher, 2000). Dalším omezením 2DE je relativně nízká reprodukovatelnost SDS-PAGE, která vede k obtížnému srovnání výsledků mezi separacemi provedenými ve dvou různých 2D gelech (Berth *et al*, 2007, Heinemeyer *et al*, 2009). Řešení tohoto problému bylo umožněno s příchodem DIGE.



Obrázek 2 Analýza 2DE komplexní směsi proteinů z myších jater. První dimenze IPG 3-12, druhá dimenze SDS-PAGE (T: 13%), barveno dusičnanem stříbrným. Převzato z Görg *et al*, 2000.

Dvoudimenzionální diferenční gelová elektroforéza (DIGE)

V roce 1997 byla představena modifikace 2DE (Ünlu *et al*, 1997). Autor zde použil fluorescenční značení dvou proteinových vzorků dvěma různými fluorescenčními značkami a takto upravené je separoval ve stejném 2D gelu. Gel byl poté naskenován a analyzován na základě odlišných excitačních a emisních vlnových délek. Tato technika byla nazvána jako dvoudimenzionální diferenční gelová elektroforéza (DIGE). Její výhodou je, že vzorky jsou separovány za stejných podmínek, čímž je zajištěno, že tentýž protein pocházející z různých vzorků bude gelem migrovat stejně. To výrazně usnadňuje komparativní analýzu. Zároveň je metoda DIGE vhodná pro „multiplexing“, protože je s její pomocí možné analyzovat až tři vzorky v jednom gelu (Karp *et al*, 2004; Timms a Cramer, 2008).

Velkým rozdílem mezi konvenčním 2DE a DIGE je technické uspořádání experimentu, kdy při DIGE je barvení proteinů prováděno před samotnou separací. K tomuto účelu se často používají syntetické deriváty cyaninu označené zkratkami Cy2, Cy3 a Cy5, které, jak už bylo zmíněno výše, se liší svými excitačními a emisními vlnovými délkami (Ndimba *et al*, 2005; Kieffer *et al*, 2008; Alvarez *et al*, 2009). Volba barvičky závisí na množství separovaných vzorků. Ve většině publikovaných studií bylo použito tzv. minimální barvení, při kterém se molekuly barviva Cy2, Cy3 a Cy5 vážou na postranní řetězce lyzinu. Ve výsledku je takto vzhledem k nízké koncentraci barviva označeno jen 3-5 % proteinů, což je však pro samotnou detekci dostačující (Di Carli *et al*, 2009). Další možností je tzv. saturační barvení, které se spoléhá na kovalentní vazbu barviv Cy3 a Cy5 konjugovaných s maleimidem a thiolovou skupinou cysteinu. Vzhledem k relativně nízkému zastoupení cysteinu v proteinech se tato barviva pro saturaci reaktivních skupin musí přidávat v nadbytku (Shaw *et al*, 2003; Marouga *et al*, 2005). Podmínkou pro uskutečnění vazby ať už při minimálním nebo saturačním značení je zpřístupnění reaktivních skupin. Proto jsou proteiny před značením denaturovány a protonovány (pH mezi 8,0 a 8,5; Timms a Cramer, 2008). Kromě cyaninových derivátů byly použity také další fluorofory jako např. Alexa Fluor, které oproti výše zmíněným vykazují lepší fluorescenci a jsou také fotostabilnější (Riederer *et al*, 2008), ale na druhou stranu jsou nákladnější a vzhledem ke svému zápornému náboji mohou nespecificky interagovat s opačně nabitými molekulami, jako např. sodnými kationty (Panchuk-Voloshina *et al*, 1999). Stejně tak je možné použít fluorofory DY-680 a DY-780 konjugované s imidem kyseliny maleinové, jejichž vlnové délky spadají do infračervené oblasti spektra. Ty však vyžadují použití až 4× vyššího množství proteinů ve vzorku (Riederer a Riederer, 2007; Riederer, 2008).

Výhodou DIGE oproti konvenční 2DE je použití vnitřního standardu, který představuje soubor všech analyzovaných proteinů. Vzniká smísením všech vzorků v definovaném poměru a při minimálním značení je mu přiřazena zvláštní barva. Pro každý analyzovaný protein tak existuje standard, pomocí kterého lze vyjádřit jeho relativní zastoupení (Marouga *et al*, 2005; Alban *et al*, 2003).

S technikou DIGE jsou také spojená některá omezení. V první řadě se jedná o limity související s 2DE, jako je rozsah molekulových hmotností, extrémní hodnoty pH nebo dynamický rozsah koncentrací (Gygi *et al*, 2000). Dále jsou to problémy týkající se fluorescenčního značení, kdy jednotlivé cyaninové barvičky vykazují různou afinitu k cílovým místům, přestože mají podobnou chemickou strukturu (Timms a Cramer,

2008). V některých případech může také docházet ke snížené fluorescenci některých proteinových spotů navzdory tomu, že na 2DE byly tyto spoty výrazné. To pravděpodobně souvisí s relativně nízkým obsahem lysinu, případně cysteinu, v aminokyselinové sekvenci proteinů v těchto spotech obsažených (Marouga *et al*, 2005).

I přes tyto technické překážky si metoda DIGE našla v rostlinné proteomice své místo. S jejím využitím byla od jejího vzniku až do současnosti provedena celá řada prací. Příkladem může být studie, která se zabývala vlivem kadmia na růst a vývoj hydroponických kultur listů topolu. Separované proteiny zde byly následně identifikovány pomocí MS/MS (Kieffer *et al*, 2008). V jiné práci byl zkoumán vliv hyperosmotického stresu na expresi proteinů v buňkách *A. thaliana*. Analýzou pomocí DIGE byla u 9 % proteinových spotů odhalena různá míra exprese. Hmotnostní analýzou těchto spotů byly následně identifikovány proteiny účastníci se glykolýzy a citrátového cyklu, protonové pumpy, „heat-shock“ proteiny, proteolytické enzymy nebo enzymy, které jsou součástí metabolických drah purinů (Ndimba *et al*, 2005). Kolektiv autorů Alvarez *et al* publikoval v roce 2009 studii, ve které sledoval vliv kadmia na expresi proteinů v kořenech brukve sítinovité (*Brassica juncea*). V kombinaci s LC-MS/MS objevili skupinu proteinů exprimovanou přímo v odpovědi na stres (Alvarez *et al*, 2009).

1.2.2 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

Jak již bylo naznačeno v úvodu této řady, MS se v proteomice stala přední metodou proteinové identifikace. Ta probíhá buďto přímo na úrovni proteinů nebo ve většině případů na úrovni peptidů, kde v zásadě existují dva přístupy - tzv. peptidové mapování („peptide mass fingerprinting“; PMF) a peptidové sekvenování („peptide sequencing“; PS) (Obrázek 3).

Principem PMF je naštěpení proteinu specifickou proteasou, jako je např. trypsin, které je následované MS analýzou získané peptidové směsi. Výsledkem analýzy je pak spektrum specifické pro daný protein a na základě shody je identifikován příslušný protein. Výhodou tohoto přístupu je jednoduchá a rychlá identifikace proteinu. S využitím 2DE a PMF byly např. analyzovány proteiny exprimované při teplotním stresu v semenáčcích rýže. Byly tak odhaleny např. molekulární chaperony, proteiny účastníci se biosyntézy buněčné stěny, antioxidantní proteiny nebo proteiny spojené

s energetickým metabolismem a řada dalších regulačních proteinů (Cui *et al*, 2005; Lee *et al*, 2007).

Ne všechny ionty zjištěné v hmotnostním spektru však mohou být přiřazeny určitému proteinu. Důvodem může být nepřítomnost sekvence příslušného proteinu v databázi, přítomnost jiných proteinů a tudíž i peptidů ve vzorku nebo PTM daného peptidu. Z toho plyne, že pomocí PMF nelze identifikovat proteiny v komplexních směsích, ale pouze individuálně, a navíc není možné získat detailní informace o peptidech, jako je např. jejich sekvence nebo PTM (Sagliocco *et al*, 1996).

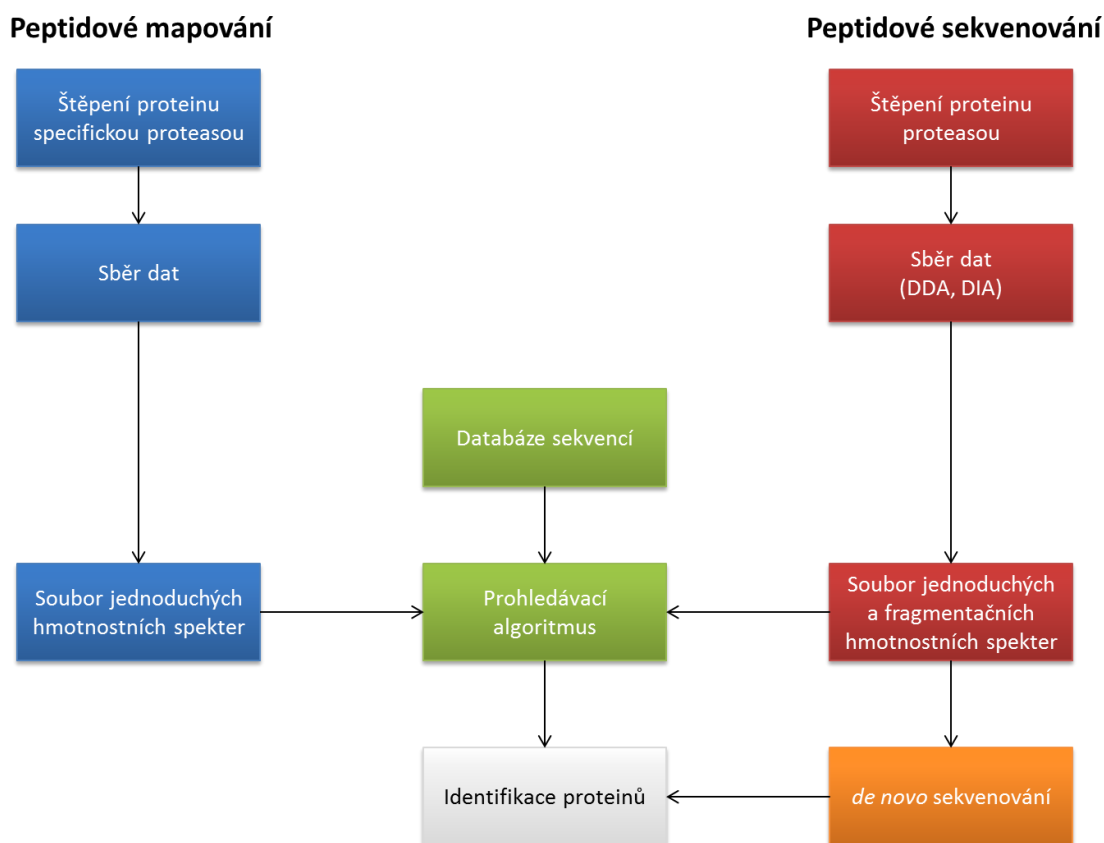
Analýzu komplexních vzorků společně s identifikací peptidů umožňuje až druhý výše uvedený přístup. Při PS jsou proteiny stejně jako v předchozím případě naštěpeny proteolytickým enzymem, přičemž použitá proteasa může být i nespecifická (chymotrypsin, elastasa, pepsin) a získaná peptidová směs je následně podrobena MS/MS analýze (Taylor *et al*, 1997). Ta se skládá z několika dílčích kroků. V prvním kroku jsou peptidy analyzovány z hlediska jejich molekulové hmotnosti, následně jsou fyzikální nebo chemickou cestou fragmentovány a poté jsou vyhodnoceny molekulové hmotnosti vzniklých fragmentů. Data mohou být sbírána dvěma různými způsoby. Tzv. analýza závislá na datech (data dependent analysis; DDA; Sandhu *et al*, 2008) vybírá k fragmentaci podle nastavených kritérií každý peptid zvlášť a individuálně hodnotí jeho fragmentační spektrum. Druhým způsobem je analýza nezávislá na datech (data independent analysis; DIA; Finamore *et al*, 2010), při které dochází k fragmentaci několika peptidů současně a vzniklá komplexní fragmentační spektra jsou pak vyhodnocena na základě dekonvoluce.

K tomuto typu analýzy je zapotřebí tandemový hmotnostní spektrometr, který má dva analyzátory, přičemž jsou možné různé kombinace od trojitého kvadrupólu, hybridního analyzátoru typu Q-TOF až po moderní lineární iontovou past s iontovou cyklotronovou rezonancí či Orbitrapem.

Sekvenci peptidu je možné určit buďto z databáze pomocí prohledávacích algoritmů jako jsou např. Mascot (Perkins *et al*, 1999) či Andromeda (Cox *et al*, 2011) nebo sekvenováním *de novo*, kde lze aminokyselinovou sekvenci odečíst z fragmentačních spekter (Obrázek 3).

Pomocí PS byly identifikovány na membránách chloroplastů *A. thaliana* proteiny s několika funkcemi od iontových transportérů po enzymy účastnící se metabolismu lipidů (Ferro *et al*, 2003). Dále byly u *A. thaliana* studovány také signální dráhy spojené s oxidem dusnatým, přičemž pozornost zde byla zaměřena na nitrosylaci

cysteinových zbytků (Lindermayr *et al*, 2005). V nedávné době byla publikována studie, která se zabývá rezistencí transgenních rostlin tabáku vůči bakteriálním infekcím. Autoři zde s využitím DIA a kvantifikačních metod identifikovali a kvantifikovali peptidy z rodiny defensinů a lipidových přenašečů s antibakteriálním účinkem (Weinhold *et al*, 2015).



Obrázek 3 Schéma identifikace proteinů metodou PMF a PS.

Výše zmíněné příklady ukazují, že možnosti MS jsou skutečně široké a v kombinaci LC-MS/MS nabízí současnou separaci, identifikaci a kvantifikaci.

1.2.3 Kvantifikace proteinů s využitím MS

V relativně nedávné době bylo v proteomice vyvinuto několik metod kvantifikace proteinů, které jsou založeny na MS bez použití gelové elektroforézy. Technologie k tomu určené spadají do dvou kategorií. Velkou oblibu si získala kvantifikace pomocí značení proteinů stabilními izotopy, která již byla zmíněna v úvodu

této práce. Druhou významnou skupinou jsou tzv. „label-free“ metody kvantifikace bez značení. Následující podkapitoly jsou věnovány jejich principům, technickým detailům a využití v rostlinné proteomice (Zhu *et al*, 2010).

Značení stabilními izotopy

Užitečným nástrojem pro kvantitativní proteomiku se ukázala být inkorporace stabilních izotopů do proteinové struktury. Proteiny značené těžkou značkou mají totiž oproti svým protějškům značeným lehkou značkou stejné fyzikálně chemické vlastnosti s výjimkou hmotnosti a tak mohou být po smísení použity jako interní standard nebo referenční vzorek. Relativní kvantita proteinu je poté odečtena z podílu intenzit peptidů s těžkou a lehkou značkou v MS spektru. V dnešní době je známa celá řada metod izotopového značení, které lze rozdělit do dvou základních skupin lišících se principem inkorporace.

Prvním z nich je *in vivo* metabolické značení. Při něm jsou dvě populace buněčných kultur pěstovány ve dvou růstových médiích, kde jedno z nich obsahuje izotopicky značenou živinu nebo aminokyselinu. Ta se do organismu inkorporuje vlivem jeho metabolické aktivity (Oda *et al*, 1999; Krijgsvelde *et al*, 2003). V rostlinné proteomice byla např. s využitím izotopu dusíku ^{14}N a ^{15}N studována exprese membránových proteinů v buněčné suspenzi *A. thaliana* po expozici těžkými kovy. Bylo zjištěno, že některé membránové proteiny jako amoniové transportéry nebo ABC transportéry byly u exponovaných buněk přítomny až v 5× vyšších hladinách, než u buněk kontrolních (Lanquar *et al*, 2007). Další studie, ve které byl pro kvantifikaci použit izotop dusíku, se zabývala časnou senescencí listů mutantů *A. thaliana*. S jejím přispěním bylo odhaleno několik proteinů účastnících se regulace fotosyntézy a proteinů souvisejících s ochranou proti oxidativnímu stresu, jejichž nadměrná aktivita nebo naopak snížená exprese vedla k časnější senescenci (Hebeler *et al*, 2008).

Izotopová značka může být do proteinu inkorporována také pomocí značené aminokyseliny (stable isotope labeling by amino acids in cell culture; SILAC; Oda *et al*, 1999). Tato metoda je v kvantitativní proteomice velmi rozšířená a používaná na buněčných kulturách mnoha modelových organismů, jako jsou *Saccharomyces cerevisiae* (De Godoy *et al*, 2008), *Caenorhabditis elegans* (Larance *et al*, 2011), *Drosophila melanogaster* (Hilger *et al*, 2009), ale i lidských buňkách. Jedna z nejnovějších prací popisuje použití SILAC ke studiu exprese virových proteinů

lidského cytomegaloviru v embryonálních fibroblastech (Chai *et al*, 2015). Využití SILAC u rostlin se však setkává s řadou problémů. Rostliny jako autotrofní organismy totiž jako zdroj uhlíku využívají oxid uhličitý, který pak využívají k syntéze uhlikatých molekul včetně proteinů. To vede k problematické inkorporaci izotopicky značených aminokyselin do struktury rostlinných proteinů (Ong *et al*, 2002). Gruhler a spolupracovníci provedli za pomoci SILAC kvantitativní analýzu izoform glutathion S-transferasy v buněčné kultuře *A. thaliana*, přičemž dosáhli průměrně 75% účinnosti inkorporace $^{13}\text{C}_6$ značeného argininu (Gruhler *et al*, 2005). V nedávné době však byla úspěšně představena modifikace SILAC s izotopicky značeným argininem a lysinem na semenáčcích *Arabidopsis*. Místo L-argininu byl v kultivačním médiu použit jeho $^{13}\text{C}_6$ izotopicky značený analog a L-lyzin byl nahrazen deuterovaným L-lyzin-2-hydrochloridem. Díky tomu bylo dosaženo více než 95% účinnosti značení, což otevírá další možnosti využití této metody v rostlinné proteomice (Lewandowska *et al*, 2013).

Vedle *in vivo* metabolického značení si svůj význam v kvantitativní proteomice získala chemická *in vitro* modifikace. Ta má ve srovnání s metabolickým značením tu výhodu, že je vhodná pro použití na kterémkoliv zdroji biologického materiálu. Principiálně je založna na chemické reakci izotopicky značeného reagentu s proteinem nebo častěji s peptidem v komplexní směsi, přičemž jednotlivě značené vzorky jsou následně spojeny a analyzovány v jednom směsném vzorku pomocí MS. V rostlinné proteomice se uplatnily především dvě metody *in vitro* značení, a to pomocí izotopicky kódovaných afinitních značek (*i*sotope-*c*oded *a*ffinity *t*ag; ICAT; Gygi *et al*, 1999) a izobarických značek pro relativní a absolutní kvantifikaci (*i*sobaric *t*ag for *r*elative and *a*bsolute *q*uantification; iTRAQ; Zieske, 2006).

První jmenovaná se skládá z reaktivní skupiny, která zajišťuje připojení značky k cysteinovému zbytku, dále z raménka obsahujícího vybraný izotop ($^1\text{H}/^2\text{H}$ nebo $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) a nakonec biotinu, který po štěpení proteinu slouží k selekci modifikovaných peptidů pomocí afinitní chromatografie s avidinem. Následně je provedena LC-MS analýza a je hodnocen poměr značených peptidů (Gygi *et al*, 1999). S pomocí ICAT byly v minulosti např. provedeny studie míry proteinové exprese v zrnech pšenice v souvislosti s delecí chromozomu 1B (Islam *et al*, 2003), změny v distribuci proteinů v chloroplastech kukuřice (Majeran *et al*, 2005) nebo studie nitrosylace cysteinových zbytků u *A. thaliana* (Fares *et al*, 2014). Vzhledem k tomu, že se ICAT značka váže na

postranní řetězce cysteinů, jsou ze značení vyloučeny peptidy, které tuto aminokyselinu neobsahují.

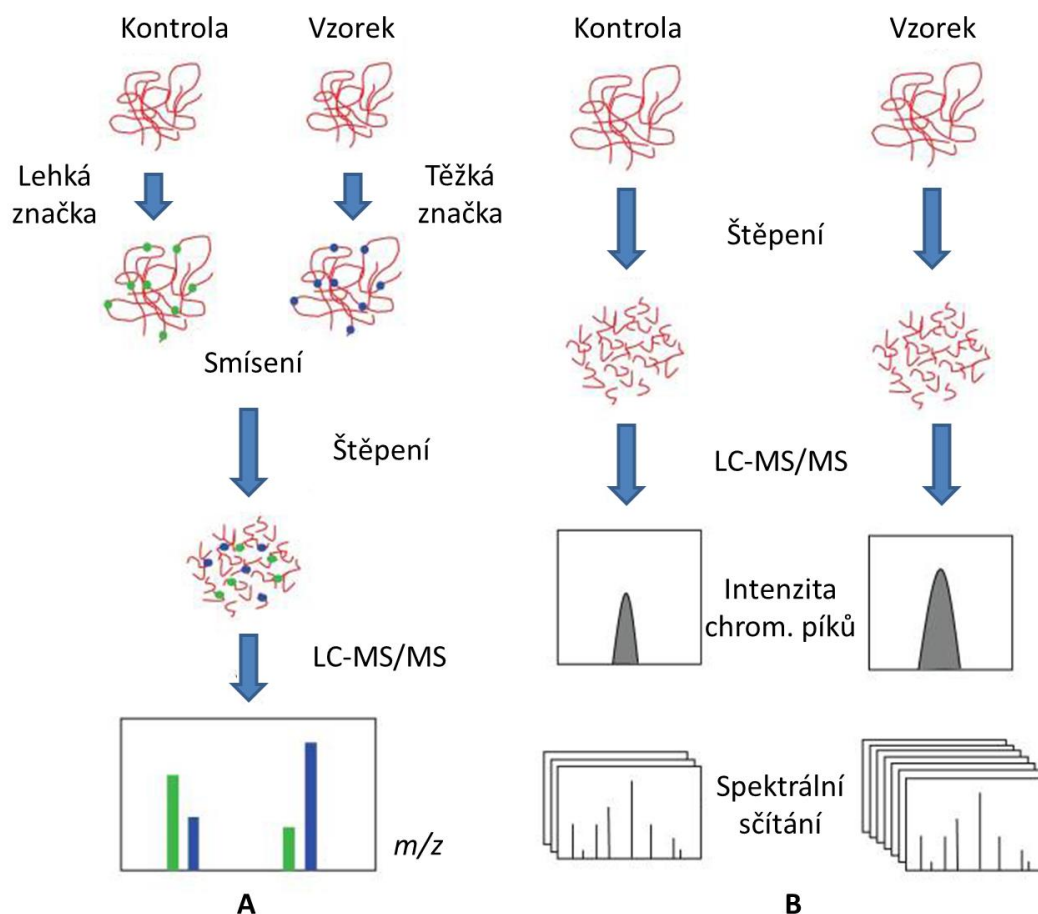
Modernější technologie iTRAQ spadá do kategorie izobarického značení. Je zde použit soubor izobarických značek, neboli značek se stejnou molekulovou hmotností, které se vážou na N-terminální konce a postranní aminy peptidů. Každá značka se skládá ze tří částí. Reakční skupina zprostředkovává vazbu s peptidem, reportérová skupina obsahuje vybraný izotop a po odštěpení v procesu fragmentace poskytuje příslušný nízkomolekulární signál v MS/MS spektru. Mezi nimi je umístěna balanční skupina, která rovněž obsahuje izotop, ale za účelem vyrovnání molekulové hmotnosti značky. Takto lze použít až osm odlišných variant značky, které se liší molekulovou hmotností reportérové a balanční části. Označené peptidy jsou následně spojeny a stejně jako v předchozím případě analyzovány v jednom nástřiku. Informace o kvantitě je odečtena z intenzity nízkomolekulárního reportérového iontu. Výhodou této metody je, podobně jako u DIGE, možnost „multiplexingu“ (Zieske, 2006). V nedávné době byla např. věnována pozornost halofilní rostlině *Thellungiella halophila*, která je v biologii známa pro svou toleranci k solím a je používána jako modelový organismus. S využitím iTRAQ byla provedena komparativní studie mezi jejím proteomem a proteomem *Arabidopsis* a byly odhaleny proteiny, které za tuto schopnost zodpovídají (Pang *et al*, 2010). Stejně tak další studie se zabývala proteomem lničky seté (*Camelina sativa*), která je tak jako *T. halophila* blízce příbuzná *Arabidopsis* a má velký hospodářský význam jako biopalivo. Metodou iTRAQ zde byly identifikovány proteiny, které jsou zapojeny do metabolismu a řídí tak odpověď rostliny na stres (Alvarez *et al*, 2015).

Předchozí metody však mají svá omezení, jako je časová náročnost, vysoká cena izotopických značek, nutnost použít vyšší koncentraci proteinů nebo neúplná chemická reakce při značení (Zhu *et al*, 2010). Tyto nedostatky daly v kvantitativní proteomice vzniknout metodám, se kterými je možné dosáhnout výsledků rychleji a snadněji. Jsou to tzv. „label-free“ techniky, které ke kvantifikaci proteinů využívají pouze systém LC-MS/MS vybavený ESI ionizací (Old *et al*, 2005; Patel *et al*, 2009).

„Label-free“ kvantifikace

Pro kvantifikaci bez izotopového značení bylo v proteomice zavedeno několik metod. Všechny vychází z proteinové extrakce, štěpení proteolytickým enzymem a separace komplexní peptidové směsi pomocí LC. Identifikace a kvantifikace proteinů a

peptidů je pak provedena na základě MS/MS analýzy. Narozdíl od značení stabilními izotopy, kde kvantifikace probíhá ve směsných vzorcích, je při lable-free kvantifikaci každý vzorek analyzován zvlášť (Obrázek 4; Patel *et al*, 2009). Metody vychází ze dvou základních principů.



Obrázek 4 Obecné schéma kvantifikace **A)** s použitím izotopické značky, **B)** bez značení. Převzato z Zhu *et al*, 2010.

První je založen na korelaci mezi intenzitou nebo plochou píku v extrahovaném iontovém chromatogramu a množstvím peptidů, resp. proteinů ve vzorku. To je umožněno tím, že každý peptidový iont je definován určitým retenčním časem a hodnotou m/z . Jeho množství pak odpovídá intenzitě nebo ploše píku v chromatogramu. Tento přístup byl poprvé aplikován na vzorku myogloginu, kde vztah mezi plochou píku a koncentrací myogloginových peptidů měl lineární charakter. Variační koeficient r^2 zde dosahoval 0,991, což dokazuje vysokou míru přesnosti. Ve stejné práci byla metoda testována také na komplexním vzorku lidského séra, přičemž myoglobin o

známé koncentraci byl zde přidán jako interní standard pro normalizaci vypočtených ploch signálů (Chelius *et al*, 2002; Bondarenko *et al*, 2002). Tato metoda však naráží na některá úskalí. Prvním je již zmíněná nutnost interního standardu pro normalizaci. Zároveň je u této metody kladen důraz na vysokou reprodukovatelnost LC-MS instrumentace a použití algoritmů, které umožňují automatické přiřazení chromatografických píků (Wiener *et al*, 2004; Muellner *et al*, 2008).

Další přístup, tzv. spektrální sčítání, je založen na srovnávání počtu identifikovaných MS/MS spekter, které náleží příslušnému peptidu. Čím vyšší je množství proteinu ve vzorku, tím vyšší je počet přílušných MS/MS spekter. Bylo zjištěno, že tato metoda poskytuje oproti relativní kvantifikaci podle intenzity chromatografického píku vyšší opakovatelnost, přesnost a dynamický rozsah (Zybailov *et al*, 2005; Old *et al*, 2005). Zároveň ke svým výpočtům nevyžaduje výpočetní algoritmy jako u předchozí metody. Je však nutné použití statistických a normalizačních metod k dosažení spolehlivé a přesné detekce změn proteinového zastoupení v komplexní směsi. Důvodem je např. fakt, že velké proteiny poskytují vyšší počet peptidů a tedy i spekter (Dong *et al*, 2007; Florens *et al*, 2006).

Label-free proteomika umožňuje také stanovení absolutní hladiny proteinů. Ta se podle původní publikace vyhodnocuje na základě indexu PAI (protein abundance index), který je definovaný jako počet identifikovaných peptidů dělený počtem peptidů, které mohou být teoreticky získány po štěpení proteinu trypsinem (Rappsilber *et al*, 2002). Přestože hodnota PAI pro každý protein úzce souvisí s jeho množstvím, nevyjadřuje přímo jeho molární koncentraci. Bylo však zjištěno, že látkové množství peptidů vykazuje lineární závislost s dekadickým logaritmem látkového množství analyzovaných proteinů. Proto byla zavedena nová veličina emPAI (exponentially modified PAI), která je vyjádřena jako $10^{\text{PAI}} - 1$. Při známé koncentraci veškerých analyzovaných proteinů lze podle emPAI příslušného proteinu stanovit jeho látkové množství (Ishihama *et al*, 2005; Shinoda *et al*, 2009).

V rostlinné proteomice byla „label-free“ kvantifikace zavedena teprve nedávno. Pomocí spektrálního sčítání byly studovány např. změny proteinové exprese v kořenových nodulech tolice pobřežní (*Medicago truncatula*) z čeledi bobovitých během sucha. Autorům se podařilo v těchto nodulech identifikovat téměř 400 rostlinných proteinů, což představuje nejrozsáhlejší nodulární proteom (Larrainzar *et al*, 2007). V další práci byla věnována pozornost proteinům ve stromatu chloroplastů *A. thaliana*. Byl zde objeven a kvantifikován nadbytek proteas, deormylas, molekulárních

chaperonů a membránových proteinů účastnících se třídění buněčných komponent (Zybailov *et al*, 2008). Jedna z nejnovějších prací pojednává o významu proteinů *Mahonia bealei* v souvislosti s produkcí alkaloidů a jejich farmakologického využití. Prostřednictvím absolutní kvantifikace byl v kořenech této rostliny odhalen nadbytek enzymů jako např. S-adenosylmethionin syntetasa nebo S-tetrahydroprotoberberin oxidasa, které se účastní biosyntézy řady alkaloidů jako např. kolumbamin, palmatin či berberin (Zhu *et al*, 2015).

Přesto, že by se na základě výše uvedených příkladů mohlo zdát, že kvantifikace proteinů s využitím MS je v rostlinné proteomice běžně užívanou metodou, nebyla zde dosud tak dobře zavedena jako v jiných odvětvích proteomiky (Li *et al*, 2007; Zhai *et al*, 2008; Cabezón *et al*, 2009) a pro její účely zde stále převažuje konvenční metoda 2DE (Watson *et al*, 2004; Hajduch *et al*, 2005; Sheffield *et al*, 2006; Alam *et al*, 2013). Jak vyplývá z prohledávání databáze Web of Science, do současnosti bylo publikováno přibližně stokrát více článků odpovídající heslu „proteom *Arabidopsis* a 2DE“ než článků, které souvisí s proteomem *Arabidopsis* a izotopovým značením nebo kvantifikací bez značení (www.webofknowledge.com). Tento fakt staví vědeckou komunitu před velkou výzvu aplikovat LC-MS/MS instrumentaci v široké míře i pro analýzu rostlinných proteinů.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

BioRad (USA)

Blue Protein Ladder, akrylamid (AA), N^ε,N^ε-metylenbisakrylamid (BIS)

Bruker Daltonics (USA)

BSA standardní peptidy

Fluka (USA)

2-propanol, deionizovaná voda, tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP), thiomčovina, chlorid draselný, uhličitan draselný, tetramethylethylendiamin (TEMED), uhličitan triethylamonný (TEAB)

GE Healthcare (Velká Británie)

2-D Quant Kit

GL Sciences (Japonsko)

Titansphere TiO₂ 10 μm

Invitrogen (USA)

Quant-iT Protein Assay Kit

Lachner (Česká republika)

Chlorid sodný, chlorid hořečnatý, dusičnan stříbrný, thiosíran sodný pentahydrát, kyselina octová, sacharóza

Merck (Německo)

Methanol, hydroxid amonný, ethanol, *n*-butanol, chloroform, MS voda

MP Biomedicals (USA)

Trypsin, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Novagen (Německo)

Benzonasa

Roche (Švýcarsko)

cOmplete EDTA free

Serva (Německo)

3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát (Chaps), dodecylsulfát sodný (SDS), glycin, persíran amonný (APS)

Sigma (USA)

3-(decyldimethylamonio)-1-propansulfonát (DDPS), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), aceton, acetonitril (ACN), butyrát sodný, deoxycholát sodný, dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fluorid sodný, β -glycerolfosfát, hydrogenuhličitan amonný, IGEPAL CA 630, iodoacetamid (IAM), kyselina L-glutamová, kyselina trifluoroctová (TFA), kyselina trichloroctová (TCA), kyselina mravenčí (FA), močovina, molybdenan sodný, tartarát sodný, vanadičnan sodný, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), formaldehyd, β -merkптоethanol, octan amonný, triethylamonium bikarbonát, amfolyty pH 4-7, amfolyty pH 3-10, bromfenolová modř, glycerol, pufovaný fenol/Tris pH 8,0

2.2 Použité vybavení a materiál

Třecí miska s tloučkem, tekutý dusík, mikrozkuhavky (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml; Eppendorf; Německo), pipety Eppendorf Research (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l; Eppendorf; Německo), špičky (Eppendorf; Německo), pipeta Hamilton-Bonaduz Schweiz 100 μ l (Hamilton; USA), Hamiltonovy jehly (průměr 16G a 22G; Hamilton; USA), 3M Empore C8 High Performance extrakční disk (3M; USA), 3M Empore High Performance C18 extrakční disk (3M; USA), 3M Empore High Performance SCX

extrakční disk (3M; USA), C18 Macrospin Columns (Harvard Apparatus; USA), kalibrované pH papírky (pH 0,0-14,0; 0,0-6,0; 7,0-14,0; Sigma; USA), vertikální elektroforéza s příslušenstvím (BioRad; USA), vialky s kónickým dnem (Waters; USA), Total Recovery vialky (Waters; USA), 4 - 15% gradientové polyakrylamidové gely (BioRad; USA), centrifugační membránové filtrační jednotky Amicon Ultra 0,5 ml cutt-off 30 kDa (Millipore; USA)

2.3 Použité přístrojové vybavení

Thermomixer Eppendorf Comfort (Eppendorf; Německo), centrifuga IEC CL31R Multispeed (Thermo Scientific; USA), centrifuga Eppendorf 5430 (Eppendorf; Německo), vakuová odparka Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf; Německo), sonifikační lázeň K-2L (Kraintek; Česká republika), vortex mixer Stuart SA8 (Bibby Scientific; Velká Británie), předvážky (Vibra; Japonsko), analytické váhy Radwag X (Radwag; USA), rotační míchačka Multi Bio RS-24 (Biosan; USA), magnetická míchačka MS-3000 (Biosan; USA), pH metr pH50 (MS instruments; Velká Británie), reader ELISA destiček Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek; USA), spektrofotometr WPA Lightwave II (Biochrom; USA), termoblok (Major Science; USA), scanner pro snímání gelů ImageScanner (Biosciences; Velká Británie)

2.4 Použité roztoky

Odstranění sekundárních metabolitů extrakcí TCA v acetonu

Precipitační roztok: 10% TCA/aceton (w/v); 0,2% DTT (w/v)

Promývací roztok: 0,2% DTT/aceton (w/v)

Odstranění sekundárních metabolitů fenolickou extrakcí

Extrakční pufr: 50mM Tris/HCl pH 8,5; 100mM KCl; 5mM EDTA; 30% sacharóza (w/v)

Precipitační roztok: 100mM octan amonný/methanol

Extrakce proteinů

SDS pufr: 40mM Tris/HCl pH 7,5; 2% SDS (w/v); 10% glycerol (v/v); směs inhibitorů (viz níže)

Modifikovaný RIPA pufr: 25mM HEPES/NaOH pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% IGEPAL CA 630 (v/v); 0,1% deoxycholát sodný (w/v); 0,1% SDS (w/v); 1mM MgCl₂ (w/v); směs inhibitorů (viz níže)

R2D2 pufr: 5M močovina; 2M thiomočovina; 2% Chaps (w/v); 2% DDPS (w/v); 0,5% amfolyty pH 4-7 (v/v); 0,25% amfolyty pH 3-10 (v/v); 1mM TCEP; směs inhibitorů (viz níže)

Směs inhibitorů: 1mM DTT; 1mM PMSF; 1x Roche EDTA free; 1mM Na₃VO₄; 10mM NaF; 5mM β-glycerolfosfát; 1mM Na₂MoO₄; 4mM tartatát sodný; 10mM butyrát sodný

SDS-PAGE

5% zaostřovací gel: 5,7 ml deionizované vody; 1,7 ml AA/BIS (T 30%, C 2,67%); 2,5 ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8; 0,1 ml 10% SDS; před použitím 10 μl TEMED; 50 μl 10% APS

12% dělicí gel: 3,4 ml deionizované vody; 4 ml AA/BIS (T 30%, C 2,67%); 2,5 ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8; 0,1 ml 10% SDS; před použitím 10 μl TEMED; 50 μl 10% APS

2x koncentrovaný redukční pufr: 125mM Tris/HCl pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) bromfenolová modř; 10% (v/v) β-merkapt ethanol

Elektrodový pufr: 25mM Tris/HCl pH 8,3; 192mM glycin; 0,1% (w/v) SDS

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

Barvení proteinů dusičnanem stříbrným

Zcitlivující roztok: 0,02% Na₂S₂O₃ · 5H₂O (w/v)

Barvicí roztok: 0,1% AgNO₃ (w/v)

Vyvíjecí roztok: 3% K₂CO₃ (w/v); 3mM formaldehyd; 50 μM Na₂S₂O₃

Stop roztok: 4% Tris (w/v); 20% kyselina octová (v/v)

Štěpení proteinů v mikrozkuhavce

Močovinový pufr: 6M močovina; 2M thiomočovina; 100mM TEAB pH 8,5

Redukční činidlo: 25mM TCEP; 100mM TEAB pH 8,5

Alkylační činidlo: 330mM IAM; 100mM TEAB pH 8,5

Roztok trypsinu: trypsin 5 µg/ul v 0,1% FA

Štěpení proteinů na centrifugačním membránovém filtru (Filter aided sample preparation; FASP)

Promývací pufr 1: 100mM Tris/HCl pH 8,5; 8M močovina

Redukční pufr: 100mM Tris/HCl pH 8,5; 8M močovina; 100mM DTT

Alkylační pufr: 100mM Tris/HCl pH 8,5; 8M močovina; 50mM IAM

Promývací pufr 2: 50mM NH₄HCO₃

Štěpící pufr: 50mM NH₄HCO₃; trypsin 62,5 ng/µl

Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání MacroSpin

Promývací roztok: 2% TFA (v/v); 0,4% FA (v/v)

Eluční roztok: 2% TFA (v/v); 70% ACN (v/v)

SCX frakcionace

Nanášecí roztok: 1% TFA (v/v)

Promývací roztok: 0,2% TFA (v/v)

Eluční roztok 1: 50mM octan amonný (w/v)

Eluční roztok 2: 75mM octan amonný (w/v)

Eluční roztok 3: 125mM octan amonný (w/v)

Eluční roztok 4: 200mM octan amonný (w/v)

Eluční roztok 5: 300mM octan amonný (w/v)

Eluční roztok 6: 80% ACN (v/v); 5% NH₄OH (v/v)

Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip

Promývací roztok: 5% TFA (v/v)

Eluční roztok: 2,5% FA (v/v); 50% methanol (v/v)

Obohacení fosfopeptidů

Plnicí roztok: 30% ACN (v/v); 0,5% TFA (v/v)

Nanášecí roztok: 65% ACN (v/v); 2% TFA (v/v); saturovaná kyselina glutamová

Promývací roztok 1: 65% ACN (v/v); 0,5% TFA (v/v)

Promývací roztok 2: 65% ACN (v/v); 0,1% TFA (v/v)

Promývací roztok 3: 40% ACN (v/v)

Eluční roztok: 40% ACN; 1% NH₄OH (v/v)

Mobilní fáze pro LC-MS

Pufr A: 0,4% FA (v/v)

Pufr B: 0,4% FA; 80% ACN (v/v)

2.5 Metody

2.5.1 Extrakce proteinů z rostlinných buněk

Homogenizace rostlinného materiálu

Kultura buněk *A. thaliana Landsberg erecta* byla po sedmidenní kultivaci zfiltrována, vysušena v Büchnerově nálevce a důkladně rozetřena v třecí misce pod tekutým dusíkem na jemný prášek. Vzniklý buněčný homogenát byl zmražen v tekutém dusíku.

Odstranění sekundárních metabolitů extrakcí TCA v acetonu

Do vychlazené 2ml mikrokumavky bylo naváženo 50 mg buněčného homogenátu. Navážka byla rozsuspendována ve 2 ml vychlazeného precipitačního roztoku a inkubována přes noc v -20 °C.

Následující den byl vzorek centrifugován 10 minut při 25 000 g a 4 °C. Poté byl odpipetován supernatant, pelet byl rozsuspendován v 1 ml vychlazeného promývacího roztoku a vzorek byl znovu centrifugován za stejných podmínek. Promytí bylo dvakrát opakováno. Po posledním odsátí supernatantu byl zbytek roztoku odpařen ve vakuové odparce (Carpentier *et al*, 2005).

Odstranění sekundárních metabolitů fenolickou extrakcí

Do vychlazené 2ml mikrokumavky bylo naváženo 150 mg buněčného homogenátu a k navážce bylo přidáno 0,5 ml extrakčního pufru. Vzorek byl 30 sekund vortexován a poté bylo k suspenzi přidáno 0,5 ml pufrovaného fenolu. Následovala inkubace 15 minut při 4 °C za stálého míchání (15 rpm) na rotační míchačce. Po uplynutí inkubační doby byl vzorek centrifugován 5 minut při 6 000 g a 4 °C. Ze vzorku byla odpipetována horní, fenolická, fáze obsahující proteiny a přenesena do nové 2ml mikrokumavky. K ní bylo poté přidáno 0,5 ml extrakčního pufru, vzorek byl po dobu 30 sekund vortexován a následně centrifugován 5 minut při 6 000 g a 4 °C. Horní, fenolická, fáze byla přenesena do nové 2ml mikrokumavky a pipetou byl změřen její objem. Proteiny v ní obsažené byly vysráženy přidávkem precipitačního roztoku v 5-násobném objemovém nadbytku. Směs byla promíchána pipetováním a inkubována přes noc v -20 °C.

Následující den byl precipitát centrifugován 10 minut při 25 000 g a 4 °C. Poté byl odpipetován supernatant a pelet byl rozsuspendován ve 100% methanolu ve 2-násobném nadbytku objemu původní fenolické fáze. Vzorek byl centrifugován za stejných podmínek a následně byl stejným způsobem promyt ještě dvakrát. Po odstranění supernatantu byl pelet rozsuspendován v acetonu, jehož objem byl dvakrát větší než objem získané fenolické fáze. Opět následovala centrifugace a od peletu byl odpipetován supernatant. Zbytek acetonu byl odpařen ve vakuové odparce (Isaacson *et al*, 2006).

Extrakce proteinů

Do vymražené 2ml mikrozkušavky bylo naváženo 50 mg buněčného homogenátu. Tento vzorek a vzorky připravené fenolickou a TCA extrakcí byly rozsuspendovány v lyzačních pufrech SDS (Hurkman a Tanaka, 2007), RIPA (Alcaraz *et al*, 1990) a R2D2 (Méchin *et al*, 2003). Takto vzniklo 9 různých variant (Tabulka 1).

Tabulka 1 Schéma extrakce proteinů. Varianta NO představuje vzorek bez předchozího odstranění sekundárních metabolitů, TCA vzorek získaný extrakcí TCA v acetonu a FEN je vzorek zpracovaný fenolickou extrakcí. Každá varianta byla rozsuspendována v lyzačním pufru SDS, modifikovaném RIPA a R2D2. U každé varianty je v závorkách uvedena původní navážka buněčného homogenátu.

Vzorek	SDS	RIPA	R2D2
NO (50 mg)	800 µl	800 µl	200 µl
TCA (50 mg)	800 µl	800 µl	200 µl
FEN (150 mg)	800 µl	800 µl	200 µl

Vzniklé extrakty byly míchány v termomixeru 1 hodinu při 1 200 rpm a laboratorní teplotě. Vzorky byly poté centrifugovány 15 minut při 30 000 g a laboratorní teplotě. Supernatant obsahující rozpuštěné proteiny byl přenesen do nové 2ml mikrozkušavky a pipetováním byl změřen jeho objem. Extrahované proteiny byly kvantifikovány a použity k dalším experimentům. Část vzorku byla separována pomocí SDS-PAGE, část precipitována a naštěpena v mikrozkušavce a část naštěpena metodou FASP (viz níže).

Kvantifikace proteinů 2D-Quant Kitem

Smísením reagentu A s reagentem B v poměru 100:1 bylo připraveno 24 ml pracovního roztoku. Do 2ml mikrozkušavky bylo vždy v duplikátu napipetováno 5 μ l příslušného vzorku. Dále byla do 2ml mikrozkušavek napipetována kalibrační řada standardního roztoku bovinního sérového albuminu (BSA; 2 mg/ml) obsahující 0 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g a 50 μ g proteinů.

Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 0,5 ml precipitantu. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 0,5 ml koprecipitantu. Vzorky byly promíchány rychlým převrácením, inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě a centrifugovány 5 minut, při 10 000 g a laboratorní teplotě. Supernatant byl okamžitě dekantován do odpadu a mikrozkušavky byly krátce centrifugovány. Zbýlý supernatant byl ihned odpipetován do odpadu.

K precipitátu bylo přidáno 0,1 ml roztoku mědi a 0,4 ml deionizované vody a vzorky byly důkladně zvortexovány. Poté byl přidán 1 ml pracovního roztoku a vzorky byly promíchány rychlým převrácením. Následovala inkubace po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

Na spektrofotometru byla změřena absorbance při vlnové délce 480 nm. Jako „blank“ byla použita deionizovaná voda. Ze závislosti absorbance na množství proteinového standardu BSA byla odvozena koncentrace a množství proteinů v jednotlivých vzorcích.

2.5.2 Precipitace proteinů

Precipitace proteinů acetonem

Extrahované proteiny (5 μ g pro SDS-PAGE, 50 μ g pro štěpení v mikrozkušavce) byly precipitovány přídatkem vychlazeného acetonu ve 4-násobném objemovém nadbytku. Precipitát byl zvortexován a inkubován v -20 °C do druhého dne.

Vzorek byl poté centrifugován 15 minut při 30 000 g a 4 °C. Aceton byl odpipetován do odpadu a pelet byl rozsuspendován v 0,5 ml čistého vychlazeného acetonu. Vzorek byl centrifugován 10 minut při 10 000 g a 4 °C. Takto byly proteiny promyty ještě jednou. Po odstranění supernatantu byl zbytek acetonu odpařen ve vakuové odparce.

Precipitace proteinů pomocí systému chloroform/methanol

K extrahovaným proteinům (5 µg pro SDS-PAGE) byl přidán stejný objem chloroformu a 4-násobný objem methanolu. Směs byla zvortexována a byla k ní přidána deionizovaná voda ve 3-násobném objemu. Směs byla centrifugována 1 minutu při 25 000 g a laboratorní teplotě. Ze vzorku byla opatrně odstraněna horní organická fáze tak, aby nebyly odpipetovány precipitované proteiny na fázovém rozhraní. Byly přidány 3 objemy čistého methanolu, směs byla zvortexována a centrifugována 2 minuty při 25 000 g a laboratorní teplotě. Supernatant byl odpipetován do odpadu a zbytek methanolu byl odpařen ve vakuové odparce (Wessel a Flügge, 1984).

Precipitace proteinů TCA

Extrahované proteiny (5 µg pro SDS-PAGE) byly sraženy přidavkem roztoku koncentrované TCA v objemu odpovídajícím 10 % objemu proteinového extraktu. Vzorek byl zvortexován a inkubován 30 minut při 4 °C.

Poté byl centrifugován 15 minut při 30 000 g a 4 °C. Ze vzorku byl opatrně odpipetován supernatant a k precipitovaným proteinům bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného acetonu. Vzorek byl zvortexován a centrifugován 10 minut při 10 000 g a 4 °C. Takto byly proteiny promyty ještě jednou. Supernatant byl odpipetován do odpadu a zbytek acetonu byl odpařen ve vakuové odparce (Porath *et al*, 1960).

2.5.3 SDS-PAGE

Příprava vzorku

Do 1,5ml mikrokumavek byly napipetovány lyzáty získané proteinovou extrakcí (varianty NO, TCA, FEN) v objemech obsahujících 5 µg proteinů. Objemy byly doplněny do 30 µl přidavkem 2x koncentrovaného redukčního nanášecího pufru. K proteinům získaných precipitací pomocí acetonu, systému chloroform/methanol a TCA (5 µg) bylo přidáno 15 µl 2x koncentrovaného redukčního nanášecího pufru. Všechny vzorky byly důkladně promíchány vortexováním a denaturovány v termobloku 5 minut při 95 °C. Poté byly znovu zvortexovány a krátce centrifugovány.

Příprava gelu

Do kádinky byl namíchán roztok akrylamidu pro přípravu 12% dělicího gelu podle Tabulky 2. Za pomalého míchání na magnetické míchačce bylo k roztoku přidáno 5 μ l TEMED a 50 μ l 10% APS (w/v). Ihned poté bylo 4,5 ml roztoku přeneseno mezi skla pro nalévání gelů a převrstveno *n*-butanolem. Po 30 minutách byl z povrchu dělicího gelu odsán *n*-butanol. Mezitím byl do další kádinky namíchán roztok akrylamidu pro přípravu 5% zaostřovacího gelu (Tabulka 2). Poté k němu bylo za pomalého míchání na magnetické míchačce přidáno 10 μ l TEMED a 50 μ l 10% APS (w/v). Roztok byl okamžitě navrstven na dělicí gel až po okraj skel a mezi skla byl opatrně vsazen hřebínek. Po 45-minutové polymeraci byl gel připraven k dalšímu použití. Pro následnou elektroforetickou separaci byly použity jednak takto vyráběné gely a jednak gradientové polyakrylamidové gely dodávané výrobcem (viz materiál a popisy příslušných obrázků).

Tabulka 2 Příprava polyakrylamidových gelů. Pro 12% dělicí gel byl použit pufr 1,5M Tris/HCl pH 8,8. Pro 5% zaostřovací gel byl použit pufr 0,5M Tris/HCl pH 6,8.

Gel	Deionizovaná voda	AA/BIS (T 30%; C 2,67%)	Pufr *	10% SDS
5%	5,7 ml	1,7 ml	2,5 ml	0,1 ml
12%	3,4 ml	4,0 ml	2,5 ml	0,1 ml

Elektroforetická separace

Před použitím byl z gelu vysunut hřebínek, skla s hotovým gelem byla upevněna do elektroforetické cely a cela byla vložena do elektroforetické vaničky. Prostor elektroforetické cely byl zaplněn 1x koncentrovaným elektrodovým puffem až po okraj. Stejný pufr byl nalit i do vaničky po rysku značící optimum pro daný počet gelů. Do jamek gelu byly nanесeny 3 μ l proteinového markeru molekulové hmotnosti a všechny připravené vzorky.

Cela byla uzavřena, připojena ke zdroji elektrického napětí, na panelu bylo nastaveno konstantní napětí 100 V a byla zahájena elektroforetická separace. Elektroforéza byla ukončena přibližně po 90 minutách ve chvíli, kdy se do elektrodového puffu začala vyplavovat bromfenolová modř značící čelo mobilní fáze.

Gel byl vyjmut ze skel, přenesen do nádoby s 50 ml fixačního roztoku a za pomalého míchání byl inkubován do druhého dne.

Barvení proteinů dusičnanem stříbrným

Fixační roztok byl slit do odpadu. Gel byl 2× proplachován v lázni s 20% ethanolem po dobu 10 minut. Poté byl přenesen do nádoby s deionizovanou vodou a v ní byl 2× proplachován také po dobu 10 minut.

Gel byl poté za pomalého míchání postupně inkubován nejprve 1 minutu ve zcitlivujícím roztoku, poté 2× 1 minutu v deionizované vodě a nakonec 20 minut v barvicím roztoku.

Po ukončení barvení byl gel krátce opláchnut v deionizované vodě a převeden do nádoby s vyvíjecím roztokem, ve kterém byl inkubován za pomalého míchání do zviditelnění proteinových pásů. Ve chvíli, kdy byly proteinové pásy dostatečně zbarvené, byl gel převeden do nádoby se stop roztokem a v něm inkubován 30 minut. Poté byl 15 minut proplachován v deionizované vodě (Chevallet *et al.*, 2006). Následně byl pořízen obrázek gelu pomocí scanneru určeného ke skenování gelů.

2.5.4 Štěpení proteinů

Štěpení proteinů v mikrozkušavce

K precipitovaným proteinům (50 µg) bylo přidáno 20 µl močovinného pufru. Proteiny byly rozpouštěny v termomixeru po dobu 2 hodin při 1 400 rpm a laboratorní teplotě a poté převedeny do vialky s kónickým dnem.

K proteinům bylo přidáno 5 µl redukčního činidla (výsledná koncentrace 5 mM), vzorek byl promíchán a redukován 45 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 5 µl alkylačního činidla (výsledná koncentrace 55 mM), vzorek byl promíchán a alkylován 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě.

Vzorek obsahující redukované a alkylované proteiny byl zředěn přídatkem 170 µl MS vody. Poté bylo zkontrolováno pH pomocí kalibrovaných pH papírků a v případě potřeby upraveno pomocí 1M TEAB pufru (požadované rozmezí 7,5 - 8,5). Nakonec bylo přidáno 0,5 µl roztoku trypsinu (2,5 µg; poměr trypsin:proteiny 1:20) a proteiny byly štěpeny v termostatu 16 hodin při 37 °C. Získaná komplexní peptidová směs byla poté odsolena na C18 reverzní fázi v uspořádání Macrospin (viz níže).

Štěpení proteinů na centrifugačním membránovém filtru (Filter Aided Sample Preparation; FASP)

Extrahované proteiny (50 µg) byly nanášeny na centrifugační membránový filtr (cut-off 30 kDa) upevněný ve sběrné mikrozkušavce. Vzorek byl centrifugován 10 minut při 14 000 g a laboratorní teplotě a tím zakoncentrován na 30 µl. Poté bylo ke vzorku nanášeno 200 µl redukčního pufru. Vzorek byl důkladně promíchán pipetováním a redukován 30 minut při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace 15 minut při 14 000 g a laboratorní teplotě.

Ke vzorku bylo napipetováno 200 µl promývacího pufru 1. Vzorek byl důkladně promíchán a centrifugován 15 minut při 14 000 g a laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 200 µl alkylačního roztoku, vzorek byl promíchán a alkylován 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po ukončení alkylace byl vzorek opět centrifugován 15 minut při 14 000 g a laboratorní teplotě.

Dále bylo přidáno 100 µl promývacího pufru 1, vzorek byl promíchán a znovu centrifugován za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Sběrná zkumavka byla vyprázdněna a promývání bylo provedeno ještě jednou.

Poté byl vzorek promíchán se 100 µl promývacího pufru 2 a centrifugován tentokrát 10 minut při 14 000 g a laboratorní teplotě. Tento krok byl proveden ještě jednou. Na závěr bylo ke vzorku přidáno 40 µl štěpícího pufru (2,5 µg trypsinu; poměr trypsin:proteiny 1:20) a vzorek byl inkubován 16 hodin při 37 °C.

Následující den byl centrifugační membránový filtr přemístěn do nové sběrné mikrozkušavky a centrifugován 10 minut při 14 000 g a laboratorní teplotě. Poté bylo nanášeno 40 µl promývacího pufru 2, vzorek byl promíchán a znovu zcentrifugován (Wiśniewski *et al*, 2009). Získaná komplexní peptidová směs byla poté odsolena na C18 reverzní fázi v uspořádání Macrospin (viz níže).

2.5.5 Odsolení peptidů a jejich frakcionace

Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Macrospin

Peptidy získané štěpením proteinů v mikrozkušavce a uspořádání FASP byly okyseleny přidávkem 5 µl 30% TFA tak, aby pH bylo menší, než 5. Na Macrospin kolonku upevněnou ve 2ml mikrozkušavce bylo nanášeno 200 µl methanolu a byla

provedena centrifugace 1 minutu při 200 g a laboratorní teplotě. Tento krok byl zopakován.

Na aktivovanou kolonku bylo nanášeno 200 µl promývacího roztoku a byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Tento krok byl rovněž zopakován. Poté byl nanášen vzorek a kolonka byla centrifugována 1 minutu při 100 g a laboratorní teplotě. Následně byla kolonka dvakrát promyta 200 µl promývacího roztoku a centrifugována 1 minutu při 200 g a laboratorní teplotě.

Eluce byla provedena nanášením 200 µl elučního roztoku a následnou centrifugací 2 minuty při 100 g a laboratorní teplotě. Eluční krok byl zopakován ještě jednou.

Eluát byl odpařen ve vakuové odparce a rozpuštěn v MS vodě tak, aby teoretická koncentrace peptidů byla 0,5 µg/µl (při uvažovaném výtěžku štěpení 40 %). Pro LC-MS analýzy pak byl připraven vzorek o teoretické koncentraci peptidů 125 ng/µl ve 20 µl 5% FA. Část vzorku (15 µg) byla použita k SCX frakcionaci.

SCX frakcionace

K 15 µg komplexní peptidové směsi získané proteolytickým štěpením byl přidán nanášecí roztok tak, aby celkový objem činil 50 µl. Z 3M Empore SCX disku byly Hamiltonovou jehlou (16 G) vyseknuty 2 frity a vpraveny do 200µl špičky zkrácené na jejím širším konci. Takto připravená SCX Stage Tip kolonka byla upevněna v 2ml mikrozkušavce.

Kolonka byla nejprve navlhčena 40 µl 100% ACN a centrifugována 2,5 minuty při 2 000 g. Následně byla ekvilibrována přidáním 40 µl nanášecího roztoku a centrifugována za stejných podmínek. Kolonka byla poté přenesena do čisté 2ml mikrozkušavky obsahující 20 µl 25% FA. Na kolonku bylo nanášen celý vzorek a byla provedena centrifugace 5 minut při 1 000 g. Kolonka byla následně promyta 40 µl promývacího roztoku, poté opět centrifugována a přenesena do nové 2ml mikrozkušavky obsahující 20 µl 25% FA.

Na kolonku bylo napipetováno 40 µl elučního roztoku 1 a byla provedena centrifugace 5 minut při 1 000 g. Tento krok byl zopakován a kolonka byla přenesena do nové 2ml mikrozkušavky obsahující 20 µl 25% FA. Peptidy byly takto eluovány z kolonky ještě elučním roztokem 2 až 6, sbírány do příslušných zkumavek a získané

frakce byly zakoncentrovány ve vakuové odparce. Následovalo odsolení na C18 reverzní fázi ve Stage Tip uspořádání.

Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip

K zakoncentrovanému vzorku bylo přidáno 50 μ l 5% FA (v/v). Vzorek byl 5 minut sonikován, důkladně zvortexován a krátce centrifugován.

Z 3M Empore disku C18 byly pomocí Hamiltonovy jehly o průměru 16 G vyseknuty dvě fritky a vpraveny do zastřižené 200 μ l špičky. Špička byla upevněna do 1,5ml mikrozkušavky. Kolonka byla aktivována přidávkem 50 μ l 2-propanolu a centrifugována 3 minuty při 4 000 g. Aktivace byla zopakována. Kolonka byla poté ekvilibrována 50 μ l 5% FA (v/v) a centrifugována 5 minut při 2 000 g. Ekvilibrace byla rovněž zopakována.

Špička byla upevněna do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Na kolonku byl nanesen vzorek a byla provedena centrifugace po dobu 7,5 minuty při 1 000 g. Kolonka s naneseným vzorkem byla poté promyta 50 μ l 5% FA (v/v) a centrifugována 5 minut při 2 000 g. Krok promytí byl proveden ještě jednou.

Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Eluce byla provedena přidávkem 50 μ l elučního roztoku a následnou centrifugací 7,5 minuty při 1 000 g. Eluční krok byl zopakován a eluát byl přenesen do skleněné Total Recovery vialky. Vzorek byl následně zakoncentrován ve vakuové odparce na minimální objem a rozpuštěn ve 20 μ l 5% FA (v/v).

2.5.6 Příprava standardního HeLa lyzátu

Extrakce a kvantifikace proteinů

K buňkám linie HeLa S3 (pelet o objemu cca 40 μ l) bylo přidáno 0,5 ml modifikovaného RIPA pufru. Pelet byl rozsuspendován pomocí 100 μ l Hamiltonovy pipety tak, že byl desetkrát nasát a vypuštěn. Poté bylo přidáno 200 U benzonasy, suspenze byla promíchána a inkubována 15 minut na ledu. Následně bylo přidáno dalších 200 U benzonasy a inkubace na ledu pokračovala dalších 15 minut. Vzorek byl centrifugován 15 minut při 15 000 g a 4 °C. Supernatant obsahující proteiny byl převeden do čisté mikrozkušavky a centrifugován dalších 30 minut při 30 000 g a 4 °C.

Supernatant byl přepipetován do čisté mikrozkušavky a proteiny byly kvantifikovány pomocí 2D-Quant Kitu (viz výše).

Precipitace

Pipetováním byl změřen přibližný objem buněčného lyzátu, proteiny byly precipitovány acetonem a promyty podle postupu popsaného výše. Přebytečný aceton byl odpařen ve vakuové odparce.

Štěpění

K precipitovaným proteinům byl přidán močovinový pufr v poměru 0,1 ml/mg proteinů. Vzorek byl inkubován v termomixeru po dobu 2 hodin při 1 400 rpm a laboratorní teplotě. Rozpuštěné proteiny byly poté rozděleny po 500 µg (50 µl) do vialek s kónickým dnem.

Ke každému alikvótu bylo přidáno 12,5 µl redukčního činidla (výsledná koncentrace 5 mM), vzorek byl promíchán a inkubován 45 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 12,5 µl alkylačního činidla (výsledná koncentrace 55 mM), vzorek byl promíchán a následovala inkubace 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě.

Vzorky byly zředěny přidavkem 925 µl MS vody. Poté bylo pomocí kalibrovaných pH papírků zkontrolováno pH (požadované rozmezí 7,5 - 8,5) a případně upraveno přidavkem 1M TEAB pufru. Nakonec byly přidány 2 µl roztoku trypsinu (10 µg; poměr 1:50) a vzorky byly inkubovány 16 hodin při 37 °C.

Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi (Macrospin)

Získané vzorky peptidů byly okyseleny přidavkem 10 µl 30% TFA (v/v) tak, aby pH bylo menší, než 5. Okyselené vzorky byly zakoncentrovány ve vakuové odparce na objem 400 µl. Poté bylo provedeno odsolení na kolonkách Macrospin podle postupu popsaného v kapitole Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Macrospin.

Kvantifikace peptidů (Quant-iT Protein Assay Kit)

Smísením reagentů A a B v poměru 1:200 bylo připraveno 2,5 ml pracovního roztoku Quant-iT Protein Assay Kit. Standardní peptidy BSA (500 pmol) byly rozpuštěny v 500 µl MS vody tak, aby koncentrace peptidů odpovídala 1 pmol/µl (tj.

67,024 ng/μl). Vzorek byl zředěn 50× v MS vodě. Do 96-jamkové desky určené k měření fluorescence bylo napipetováno 5 μl zředěného vzorku ve čtyřech opakováních a standardní peptidy BSA v množství 200 a 400 ng ve dvou opakováních. Jako blank bylo do desky napipetováno 5 μl destilované vody ve dvou opakováních. Ke vzorkům, standardu a blanku bylo přidáno 200 μl pracovního roztoku. Deska byla inkubována 10 minut při 25 °C ve tmě. Poté byla změřena fluorescence při vlnové délce 470/570 nm a senzitivitě 75. Ze závislosti RFU na množství peptidů standardu BSA bylo odvozeno množství peptidů ve vzorku.

Pro ověření kvality štěpení byla provedena analýza pomocí LC-MS/MS. Pro tento účel byl použit kvantifikovaný vzorek zředěný pomocí 5% FA (v/v) na výslednou koncentraci 125 ng/μl v celkovém objemu 20 μl.

Alikvotace

Vzorek byl rozaliquotován po 165 μg do skleněných vialek s kónickým dnem. Alikvóty byly zakoncentrovány ve vakuové odparce, uskladněny v -80 °C a připraveny k dalšímu použití.

2.5.7 Obohacení fosopeptidů ve vsádkovém uspořádání

Příprava vzorku

K peptidům komplexního lyzátu (165 μg) bylo přidáno 165 μl nanášecího roztoku (výsledná koncentrace 1 μg/μl). Vzorek byl důkladně promíchán pipetováním, 5 minut sonikován a krátce centrifugován.

Příprava a ekvibrace oxidu titaničitého

Do 2ml mikrozkušavky bylo naváženo 5 mg oxidu titaničitého. Navážka byla pipetováním důkladně rozsuspendována v 1 ml plnicího roztoku. Suspenze byla 5 minut sonikována, následně byla krátce vortexována a ihned poté bylo 50 μl (250 μg) převedeno do čisté 2ml mikrozkušavky. Následovala centrifugace 2 minuty při 10 000 g a laboratorní teplotě. Poté byl pomocí GE Loader špičky odsát supernatant a k usazenému oxidu titaničitému bylo přidáno 100 μl nanášecího roztoku. Suspenze byla promíchávána v termomixeru 10 minut při 1 400 rpm a laboratorní teplotě a následně znovu zcentrifugována. Ze zkumavky byl opět opatrně odpipetován supernatant.

Nanesení vzorku a promývání

K ekvilibrovanému oxidu titaničitému bylo naneseno 50 μl vzorku (50 μg peptidů na 250 μg oxidu titaničitého; poměr 1:5). Vzorek byl inkubován za stálého míchání v termomixeru 30 minut při 1 000 rpm. Následně byl centrifugován 2 minuty při 10 000 g a od peletu byl odstraněn supernatant. Oxid titaničitý s naneseným vzorkem byl pipetováním rozsuspendován ve 100 μl promývacího roztoku 1 a přenesen do čisté 2ml mikrozkušavky. Ta byla poté promíchána v termomixeru 15 vteřin při 1 400 rpm a centrifugována 2 minuty při 10 000 g. Od sorbentu byl opatrně odsát supernatant a vzorek byl rozsuspendován ve 100 μl promývacího roztoku 2. Vzorek byl opět míchán v termomixeru 15 vteřin při 1 400 rpm a centrifugován za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a ke vzorku bylo přidáno 100 μl deionizované vody. V ní byl vzorek rozsuspendován, promíchán 15 vteřin při 1 400 rpm a opět centrifugován 2 minuty při 10 000 g. Od vzorku byl odpipetován supernatant.

Eluce

K promytému oxidu titaničitému bylo napipetováno 100 μl elučního roztoku. Vzorek byl inkubován v termomixeru 15 minut při 1 000 rpm. Poté byl vzorek centrifugován 2 minuty při 10 000 g a supernatant byl přenesen do čisté 2ml mikrozkušavky. Eluát byl okyselen přidavkem 5 μl 100% FA, promíchán vortexováním a zakoncentrován ve vakuové odparce. Mezitím bylo k oxidu titaničitému přidáno dalších 100 μl elučního roztoku a vzorek byl podruhé eluován za stálého míchání v termomixeru po dobu 30 minut při 1 000 rpm. Poté byl supernatant přenesen do mikrozkušavky k původnímu eluátu a okyselen dalšími 5 μl 100% FA. Eluát byl promíchán vortexováním a zakoncentrován na minimální objem ve vakuové odparce (Engholm-Keller *et al*, 2012).

Zakoncentrované fosfopeptidy byly rozpuštěny v 50 μl 5% FA (v/v) a vzorek byl odsolen podle postupu popsaného v kapitole Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip.

2.5.8 Obohacení fosfopeptidů v kolonkovém uspořádání

Příprava vzorku

K peptidům komplexního lyzátu (165 µg) bylo přidáno 165 µl nanášecího roztoku (koncentrace 1 µg/µl). Vzorek byl důkladně promíchán pipetováním, 5 minut sonikován a krátce centrifugován.

Příprava a ekvibrace TiO₂ Stage Tip

Z 3M Empore disku C8 byla pomocí Hamiltonovy jehly o průměru 22 G vyseknuta fritka a vpravena do špičky pro pipetování objemu 1 - 10 µl. Špička byla upevněna do 2ml mikrozkušavky. Do čisté 2ml mikrozkušavky bylo naváženo 5 mg oxidu titaničitého a navážka byla pipetováním rozsuspendována v 1 ml plnicího roztoku. Suspenze byla 5 minut sonikována, poté důkladně promíchána na vortexu a 50 µl (250 µg) bylo ihned přeneseno do připravené špičky s C8 fritkou. Kolonka byla centrifugována 10 minut při 500 g. Poté bylo na kolonku nanášeno 20 µl nanášecího roztoku. Následovala centrifugace 4 minuty při 100 g. Na kolonku bylo přidáno dalších 20 µl nanášecího pufru a byla zopakována centrifugace za stejných podmínek.

Nanesení vzorku a promývání

Ekvilibrovaná kolonka byla upevněna do čisté 2ml mikrozkušavky. Na oxid titaničitý bylo nanášeno 50 µl vzorku (50 µg peptidů na 250 µg oxidu titaničitého; poměr 1:5) a kolonka byla centrifugována 30 minut při 40 g. Poté bylo na kolonku napipetováno 20 µl promývacího roztoku 1. Následovala centrifugace 4 minuty při 100 g. Na kolonku bylo nanášeno 20 µl promývacího roztoku 2 a vzorek byl opět centrifugován 4 minuty při 100 g. Poté bylo na kolonku napipetováno 20 µl promývacího roztoku 3 a následně byla provedena centrifugace 6 minut při 100 g.

Eluce

Promytá kolonka byla upevněna do nové 2ml mikrozkušavky obsahující 10 µl 25% FA. Na oxid titaničitý bylo nanášeno 40 µl elučního roztoku a vzorek byl centrifugován 10 minut při 100 g. Eluát byl poté zakoncentrován ve vakuové odparce na minimální objem (Rappsilber *et al.*, 2007). Získaný odparek byl rozpuštěn v 50 µl 5%

FA (v/v) a vzorek fosfopeptidů byl odsolenen podle postupu popsaného v kapitole Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip.

2.5.9 Obohacení fosfopeptidů v hybridním uspořádání

Příprava vzorku

K peptidům komplexního lyzátu (165 μg) bylo přidáno 165 μl nanášecího roztoku (výsledná koncentrace 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Vzorek byl důkladně promíchán pipetováním, 5 minut sonikován a krátce centrifugován.

Příprava Stage Tip

Z 3M Empore disku C8 byla pomocí Hamiltonovy jehly o průměru 22 G vyseknuta fritka a vpravena do špičky pro pipetování objemu 1 - 10 μl . Špička byla upevněna do 2ml mikrozkušavky.

Příprava a ekvibrace oxidu titaničitého

Do 2ml mikrozkušavky bylo naváženo 5 mg oxidu titaničitého. Navážka byla pipetováním důkladně rozsuspendována v 1 ml plnicího roztoku. Suspenze byla 5 minut sonikována, následně byla krátce vortexována a ihned poté bylo 50 μl (250 μg) převedeno do čisté 2ml mikrozkušavky. Následovala centrifugace 2 minuty při 10 000 g a laboratorní teplotě. Poté byl pomocí GE Loader špičky odsát supernatant a k usazenému oxidu titaničitému bylo přidáno 100 μl nanášecího roztoku. Suspenze byla promíchávána v termomixeru 10 minut při 1 400 rpm a laboratorní teplotě a následně znovu zcentrifugována. Ze zkumavky byl opatrně odpipetován supernatant.

Nanesení vzorku

K ekvilibrovanému oxidu titaničitému bylo přidáno 50 μl vzorku (50 μg peptidů na 250 μg oxidu titaničitého; poměr 1:5). Vzorek byl inkubován za stálého míchání v termomixeru 30 minut při 1 000 rpm. Suspenze byla následně převedena na připravenou Stage Tip kolonku a centrifugována 4 minuty při 100 g.

Promývání vzorku

Na kolonku bylo napipetováno 20 μl promývacího roztoku 1 a vzorek byl centrifugován 4 minuty při 100 g. Poté bylo nanášeno 20 μl promývacího roztoku 2 a vzorek byl opět centrifugován 4 minuty při 100 g. Následně bylo na kolonku napipetováno 20 μl promývacího roztoku 3 a byla provedena centrifugace 6 minut při 100 g.

Eluce

Promytá kolonka byla upevněna do nové 2ml mikrozkušavky obsahující 10 μl 25% FA. Na oxid titaničitý bylo nanášeno 40 μl elučního roztoku a vzorek byl centrifugován 10 minut při 100 g. Eluát byl poté zakoncentrován ve vakuové odparce na minimální objem (Engholm-Keller *et al*, 2012). Získaný odparek byl rozpuštěn v 50 μl 5% FA a bylo provedeno odsolení na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip podle postupu popsaného výše.

2.5.10 LC-MS/MS analýza

Analýza vzorků byla provedena pomocí systému nanokapilární chromatografie (nLC) (nanoEASY, Proxeon, Nizozemí, Bruker Daltonics, Německo) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF s ionizací elektrosprejem (ESI) (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo). Vzorky byly vloženy do autosampleru nLC a do nLC systému byl nastříknut vzorek. Objem nástřiku byl v případě vzorku komplexní směsi peptidů *A. thaliana* (blok C, viz níže) a vzorku HeLa lyzátu určeného pro kontrolu štěpení 2 μl . U vzorků s obohacenými fosfopeptidy bylo nástřikováno 7 μl . Peptidy byly zachyceny na nanokapilární předkoloně (75 $\mu\text{m} \times 3 \text{ cm}$, IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 5 μm , Dr. Maisch GmbH, Německo). Kolona byla izokraticky promyta 10 μl 2% FA a peptidy byly poté postupně uvolňovány pomocí 125minutové gradientové eluce (Tabulka 3) na analytickou nanokapilární kolonu (50 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněnou reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 3 μm , Dr. Maisch GmbH, Německo) při konstantním průtoku 80 nl/min.

Peptidy byly po eluci z analytické nanokapilární kolony ionizovány elektrosprejem a analyzovány pomocí tandemové hmotnostní analýzy metodou data-dependent analysis s kolizí indukovanou fragmentací peptidů v kolizní cele.

Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; capillary voltage 1900 V; Dry gas: 2,5 l/min; Dry temperature: 160 °C); Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 5 eV; collision energy 8 eV; Collision RF 1200 Vpp; Ion cooler RF 350 Vpp; transfer time 85 μs; pre-puls storage 7 μs); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; 4 precursor ions; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 5000 cts; active exclusion po 3 spektrech po dobu následujících 9 s; excluded mass rozsah prekurzorů 50-350 Da and 1500-2200 Da). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 50-2200 m/z s dobou sběru (acquisition time) 500 ms pro MS a 250-750 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru (Petřík, bakalářská práce 2013).

Tabulka 3 Schéma nLC gradientu pro eluci peptidů z reverzní nanokapilární kolony. Pufr A: 0,4% FA ve vodě, Pufr B: 0,4% FA v 80% ACN

Čas	Pufr A (%)	Pufr B (%)
0	98	2
3	92	8
50	82	18
79	72	28
85	68	32
93	55	45
99	35	65
100	5	95
105	5	95
108	98	2
124	98	2

2.5.11 Zpracování dat

Surová data byla zpracována programem DataAnalysis v. 4.2 (Bruker Daltonics, Německo) a převedena do formátu mgf (Mascot generic files) obsahujícího seznamy měrných hmotností prekurzorů a jejich fragmentační spektra. Data pak byla prohledána s využitím algoritmu MASCOT (in-house mascot server, Matrix Science, England, UK), přičemž pro vzorky z *A. thaliana* byl použit soubor sekvencí *A. thaliana* reference proteome z databáze UniProt (leden 2014, počet sekvencí 31 520) a pro vzorky

z buněčné linie HeLa soubor *Homo sapiens* reference proteome (leden 2015, počet sekvencí 69 693). Obě tyto databáze byly doplněny o sekvence nejčastějších kontaminantů a obrácené verze všech sekvencí z výše uvedených souborů, které sloužily k výpočtu FDR („false discovery rate“; míra falešně pozitivních výsledků). Všechna data byla postupně prohledána dvakrát. Pro první prohledávání byla použita relativně široká tolerance povolených odchylek jak pro prekurzorové (50 ppm), tak pro fragmentové ionty (0,1 Da). Vysoce spolehlivé identifikace peptidů pak byly použity k přepočtu hmot prekurzorových i fragmentových iontů nezávislou lineární regresí, která minimalizovala odchylku mezi změřenými a teoretickými hmotami. K tomuto účelu byl použit skript pro hromadné zpracování dat vyvinutý Mgr. Martinem Rausem, Ph.D. na Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Technologického centra Centra regionu Haná. Takto rekalibrovaná data byla použita ke druhému prohledávání s užší tolerancí 7 ppm pro prekurzorové a 0,04 Da pro fragmentové ionty.

Ostatní nastavení vypadalo následovně: použitá proteasa ke štěpení: trypsin; maximální povolený počet vynechaných štěpných míst (miss cleavage) 1; povolené modifikace peptidů: karbamidomethylace cysteinů jako pevná (fixed), acetylace lyzinů, acetylace N-konců proteinů, oxidace methioninu, fosforylace serinu, threoninu a tyrosinu byly nastaveny jako variabilní; povolené odchylky pro MS prekurzorů: 10 ppm a pro MS/MS fragmentace peptidů 0,1 Da; minimální skóre pro identifikaci peptidů 15, minimální délka peptidu 7 aminokyselin; significance threshold $p < 0,05$.

Získaný seznam peptidů byl podroben analýze vlastností pomocí aplikace Protein Cutter (Raus *et al*, 2013), přičemž zájmovými vlastnostmi byl izoelektrický bod (pI), hydrofobicita („Gravy index“) a délka peptidového řetězce (počet aminokyselin).

2.6 Výsledky a diskuze

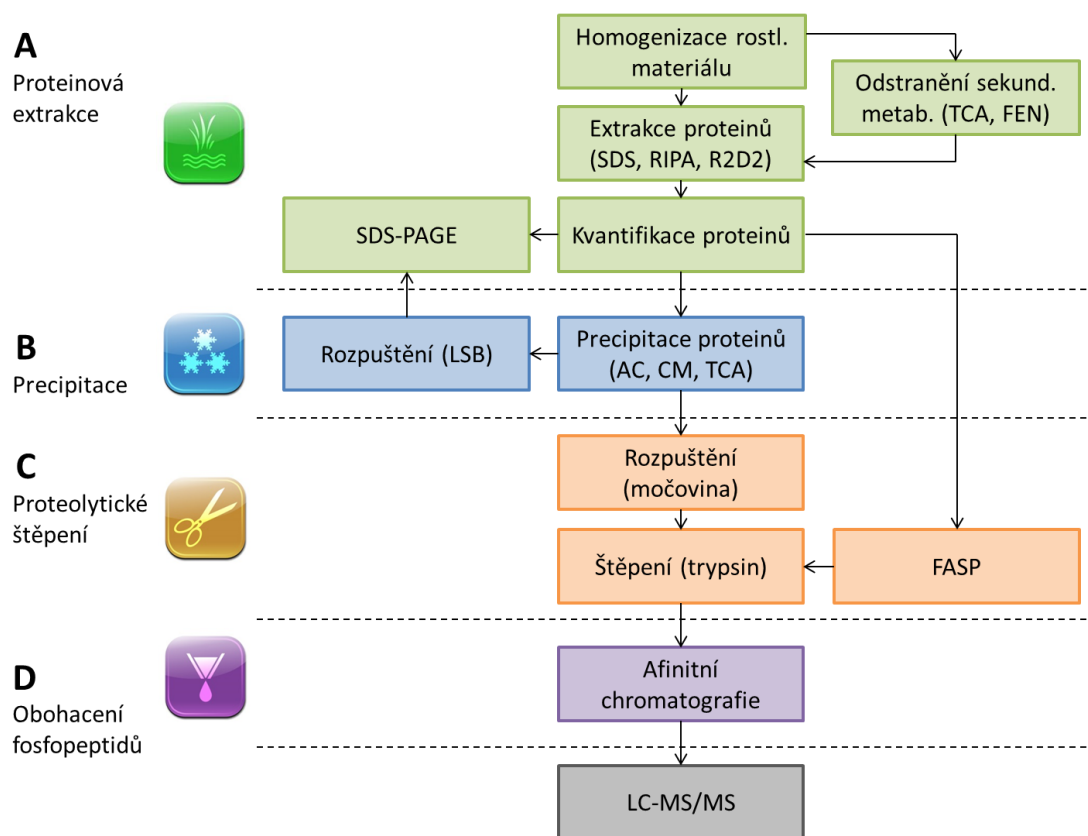
2.6.1 Experimentální strategie

Proteomická analýza se v dnešní době spoléhá na přístupy založené na hmotnostní spektrometrii. Velmi oblíbenou metodou pro studium proteinů se stalo především spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). S jeho využitím byla uskutečněna celá řada prací, které se zabývají studiem proteomu prokaryotických i eukaryotických organismů (Carranza *et al*, 2010; Tunon *et al*, 2010; Baldin *et al*, 2015).

Významnou roli zde hraje příprava vzorku. Součástí přípravy může být separace proteinů pomocí elektroforetických technik, které stále dominují v rostlinné proteomice v podobě 2DE. Moderním trendem je však přechod na tzv. „gel-free“ metody, které tento krok vynechávají, poskytují tak vyšší počet peptidových i proteinových identifikací a dovolují současnou kvantifikaci proteinů (Roe a Griffin, 2006; Cañas *et al*, 2006). V tomto případě pak příprava zahrnuje extrakci proteinů, precipitaci a proteolytické štěpení. Zaměřuje-li se analýza na konkrétní subproteom, potom je posledním krokem přípravy ještě krok obohacení cílových analytů, kterými jsou posttranslačně modifikované proteiny (fosforylace, glykosylace, acetylace aj.).

Tato práce se věnuje přípravě vzorku na každé úrovni zvláště s ohledem na specifika rostlinného materiálu, přičemž jako zájmový subproteom zde figurují fosfoproteiny. Jejím cílem tedy bylo srovnat vybrané přístupy a metody extrakce proteinů, jejich precipitace, proteolytického štěpení a obohacení fosfopeptidů (Obrázek 5) a na základě získaných výsledků sestavit efektivní pracovní protokol pro přípravu vzorku rostlinných proteinů, popř. fosfoproteinů před LC-MS/MS analýzou.

Pro experimenty týkající se extrakce rostlinných proteinů, precipitace a štěpení byla vybrána buněčná linie *A. thaliana* ekotyp *Landsberg erecta*. Jedná se o známý a dobře definovaný materiál, který je dnes v proteomice považován za proteinový standard (Joyard *et al*, 2009; Chua *et al*, 2010; Chen *et al*, 2011). Pro účely obohacení fosforylovaných peptidů byla vybrána buněčná linie HeLa S3. Toto rozhodnutí plynulo jednak ze skutečnosti, že se z hlediska fosforylací rovněž jedná o známý a dobře definovaný proteomický model (Olsen *et al*, 2006; Beausoleil *et al*, 2004; Amanchy *et al*, 2005), a také proto, že poskytuje příležitost pro srovnání s výsledky dosaženými v mé bakalářské práci (Petřík, bakalářská práce 2013).



Obrázek 5 Schéma experimentů.

2.6.2 Srovnání metod pro přípravu rostlinných proteinů před LC-MS/MS analýzou

Blok A: Proteinová extrakce



Jak už bylo zmíněno výše, prvním krokem přípravy je extrakce proteinů. Ukázalo se, že limitujícím faktorem analýzy rostlinných proteinů je přítomnost interferujících látek ze skupiny sekundárních metabolitů. Tyto látky znamenají problém především pro přístupy založené na 2DE (Wang *et al*, 2008). Proto bylo vyvinuto několik technik, pomocí kterých lze tyto látky ze vzorku odstranit. Nejčastěji používanými metodami jsou extrakce pomocí TCA (Carpentier *et al*, 2005) a extrakce fenolem (Isaacson *et al*, 2006). Jedním z úkolů této práce bylo zjistit, zda je nutné provádět odstranění sekundárních metabolitů i před LC-MS analýzou (Obrázek 5).

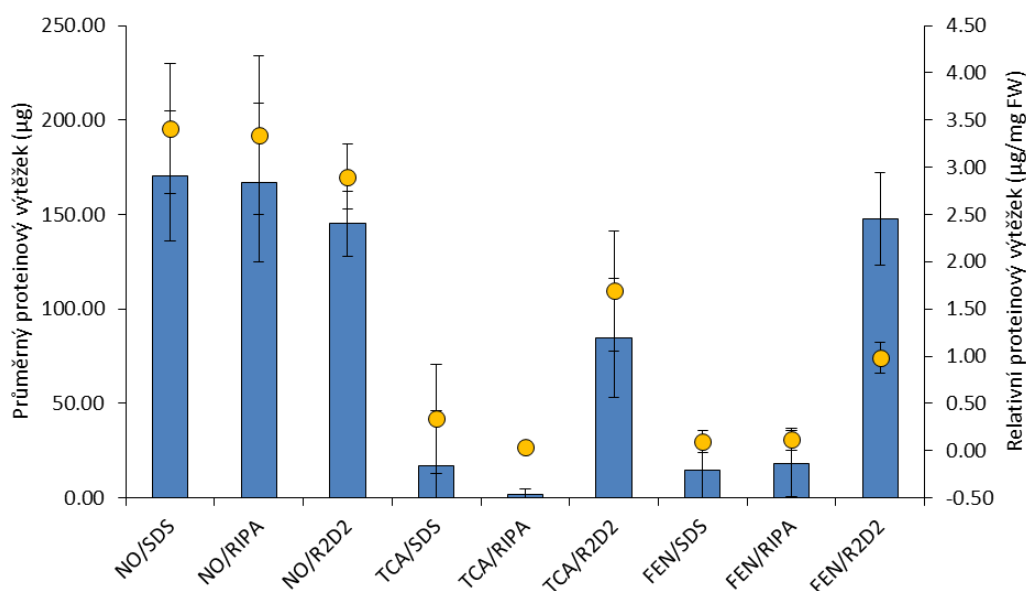
Buňky byly proto homogenizovány mechanickým třením v tekutém dusíku a poté byly vytvořeny tři sady vzorků ve třech technických opakováních s následujícím označením:

1. **NO**: obsahoval 50 mg homogenizovaného materiálu
2. **TCA**: obsahoval 50 mg homogenizovaného materiálu, ze kterého byly odstraněny sekundární metabolity extrakcí pomocí TCA v acetonu
3. **FEN**: obsahoval 150 mg homogenizovaného materiálu, ze kterého byly odstraněny sekundární metabolity fenolickou extrakcí

Z takto vytvořených vzorků byly extrahovány proteiny za použití následujících extrakčních pufrů:

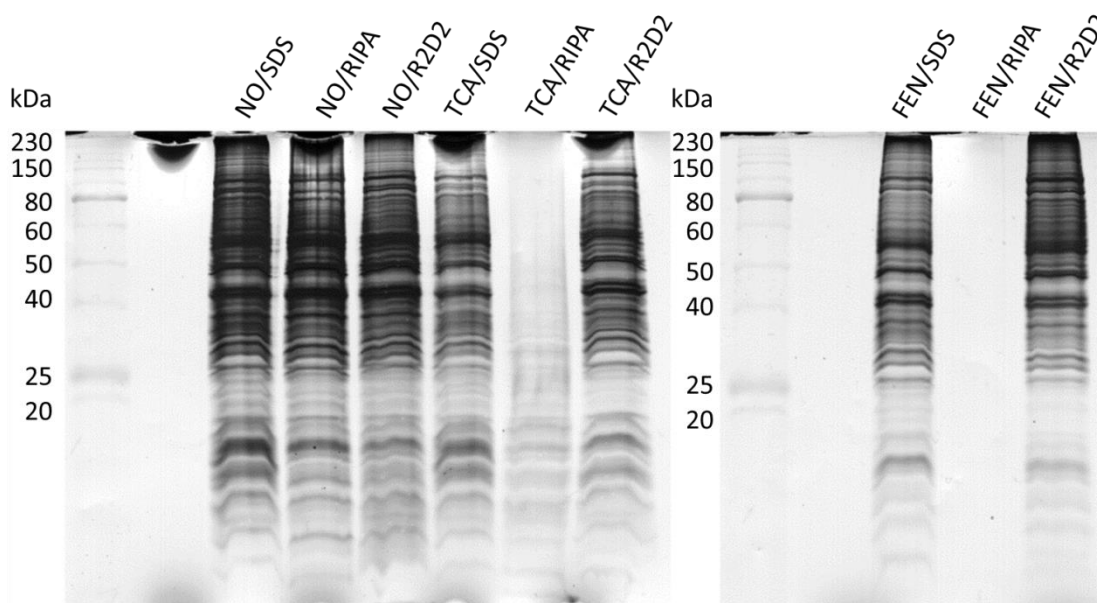
- a) **SDS**: ionogenní detergent o vysoké koncentraci
- b) **RIPA**: směs denaturujících a nendenaturujících detergentů
- c) **R2D2**: směs chaotropních činidel a zwitteriontových detergentů

Kombinací metod odstranění sekundárních metabolitů a extrakcí proteinů vzniklo 9 variant v triplicátech, celkem 27 vzorků (Obrázek 6).



Obrázek 6 Průměrné výtěžky extrakce proteinů bez (NO) a s předchozím odstraněním sekundárních metabolitů extrakcí kyselinou trichloroctovou (TCA) a fenolickou extrakcí (FEN) v kombinaci s lyzačními pufrů SDS, RIPA, R2D2. Vedlejší osa znázorňuje relativní výtěžky vztažené na miligram čerstvé hmoty.

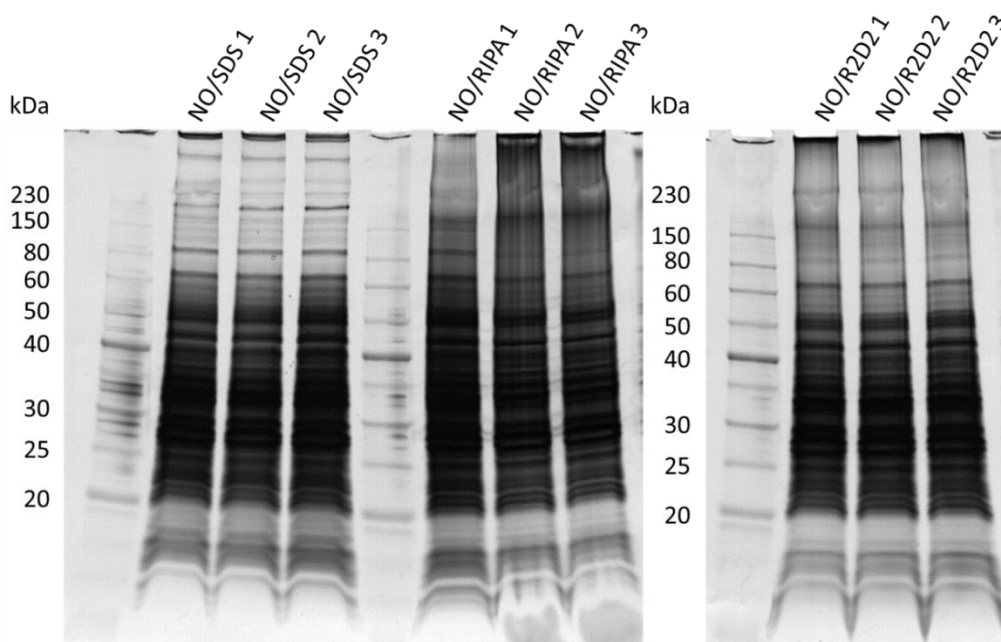
Jako první byly srovnány průměrné výtěžky jednotlivých typů extrakcí (Obrázek 6). Z naměřených výsledků vyplývá, že nejvyššího celkového průměrného výtěžku dosahovaly extrakce proteinů bez odstranění sekundárních metabolitů s využitím pufrů SDS a RIPA, které vykazovaly téměř totožná průměrná množství získaných proteinů (170 μg , resp. 167 μg). Důležitým zjištěním bylo, že RIPA pufr byl nekompatibilní jak s extrakcí pomocí TCA, u které byl pozorován v podstatě nulový výtěžek, tak s fenolickou extrakcí (Obrázek 6 a 7). Naopak relativně stabilních výsledků ve všech uspořádáních dosahoval pufr R2D2, který tak zůstal jediným pufrům, kterým lze v tomto typu experimentu rozpustit proteiny přečištěné extrakcí TCA a fenolem. Na druhou stranu je potřeba zmínit, že i tam, kde byl z hlediska celkového výtěžku srovnatelný, byl výrazně horší z hlediska výtěžku vztaheného na čerstvou hmotu (Obrázek 6).



Obrázek 7 Separace SDS-PAGE (12% gel) proteinů (5 μg) extrahovaných lyzačními pufrů SDS, RIPA a R2D2 bez (NO) a s předchozím odstraněním sekundárních metabolitů extrakcí pomocí kyseliny trichloroctové (TCA) a fenolu (FEN). U extraktů získaných kombinací TCA/SDS, TCA/RIPA a FEN/SDS, FEN/RIPA nebylo technicky možné získat 5 μg proteinů (viz Obrázek 6). Proto bylo do jamky napipetováno 15 μl extraktu doplněného 15 μl 2 \times koncentrovaného redukčního pufru na celkový (maximální) objem 30 μl . Barveno dusičnanem stříbrným.

Obrázek 7 ukazuje, že nejbohatší spektrum proteinů poskytují extrakce bez předchozího odstranění sekundárních metabolitů. Vzorky získané fenolickou extrakcí a

extrakcí TCA poskytují méně proteinů v celém spektru molekulových hmotností, především pak v oblasti <20 kDa. To je dáno tím, že použití precipitační techniky může vést k proteinovým ztrátám. Proteinové zastoupení se pak mezi lyzačními pufrů u variant bez extrakce vzájemně liší, jako je možné např. doložit mírně odlišným motivem v oblasti >80 kDa. To odpovídá očekávání, protože každý z extrakčních pufrů má jiné složení (různé detergenty, různá iontová síla apod.)



Obrázek 8 Separace SDS-PAGE (4-15% gradientový gel) proteinů (5 μ g) extrahovaných lyzačními pufrů SDS, RIPA a R2D2 bez předchozího odstranění sekundárních metabolitů ve třech technických opakováních provedených v různé dny. Barveno dusičnanem stříbrným.

Získané výsledky naznačují, že metody odstraňování sekundárních metabolitů vedou jak ke snížení proteinového výtěžku, tak negativně ovlivňují kvalitativní proteinové zastoupení. Krok odstranění byl proto z pracovního protokolu vynechán a k dalším experimentům byly používány proteiny extrahované přímo z buněčného homogenátu. Pro toto rozhodnutí mluvila i vysoká reprodukovatelnost, jak lze doložit jednak na proteinových výtěžcích (Obrázek 6, viz chybové úsečky), tak na výsledku SDS-PAGE separace vzorků získaných extrakcemi provedenými nezávisle v různé dny (Obrázek 8) a z jejich MS analýzy (viz Blok C).

Blok B: Precipitace proteinů



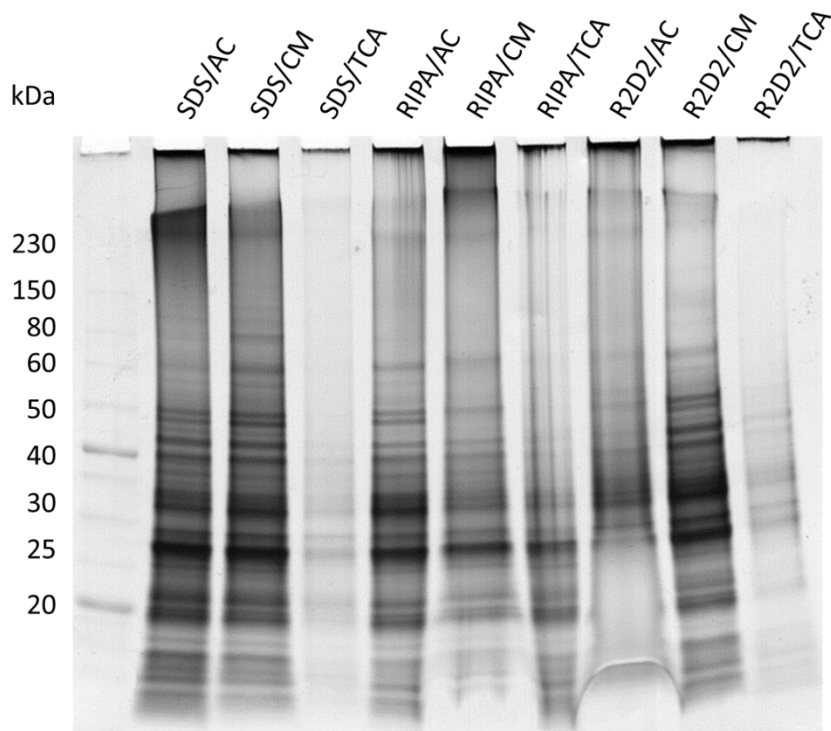
Poté, co jsou proteiny úspěšně extrahovány, je nutné provést odstranění látek pocházejících z extrakčních pufrů, které by mohly interferovat při štěpení proteinů nebo s vlastní LC-MS analýzou (inhibitory enzymů, detergenty a soli). Pro tento účel jsou dnes používány dvě metody. Starší precipitace je založená na vysrážení proteinů z roztoku a jejich následné promytí organickými rozpouštědly. Druhou modernější metodou je tzv. štěpení na centrifugačním membránovém filtru (FASP), u kterého je vynechán krok precipitace a odstranění interferujících látek je provedeno výměnou roztoků prostřednictvím polopropustné membrány (viz Blok C).

Další série experimentů tedy byla zaměřena na ověření kompatibility extrakčních pufrů s třemi precipitačními technikami, které jsou používány nejčastěji. Proteiny (5 µg) získané extrakcí SDS, RIPA a R2D2 pufrům byly vysráženy následujícími metodami:

1. **AC:** precipitace acetonem
2. **CM:** precipitační metoda, založená na definované směsi chloroformu, methanolu a vody (Wessel a Flügge, 1984)
3. **TCA:** precipitace kyselinou trichloroctovou

Tak vzniklo 9 variant v triplicátech, celkem 27 vzorků, které byly následně rozpuštěny v redukčním vzorkovacím pufru a separovány pomocí SDS-PAGE.

Je známo, že proteiny precipitované pomocí TCA se velmi špatně rozpouští v jakémkoli pufru. To dokládají i výsledky dosažené v tomto experimentu, kde byly dráhy proteinů získaných TCA precipitací v podstatě prázdné (Obrázek 9). V případě RIPA pufru v kombinaci s TCA precipitací byl navíc ve zkumavce pozorován výrazný zákal. To odpovídá očekávání, protože detergentem přítomným v RIPA pufru byl deoxycholát sodný, který jak známo precipituje v kyselém prostředí současně s proteiny (Bensadoun a Weinstein, 1976). Použití kombinace extrakce RIPA a precipitace TCA je tedy v tomto uspořádání patrně nevhodné.



Obrázek 9 Separace SDS-PAGE (4-15% gradientový gel) proteinů (5 μ g) extrahovaných lyzátními pufrů SDS, RIPA a R2D2 a precipitovaných acetonem (AC), metodou chloroform/methanolem (CM) a kyselinou trichloroctovou (TCA). Barveno dusičnanem stříbrným.

Nekompatibilitu některých extrakčních pufrů s některými precipitačními technikami dokázali i Winter a Steen, kteří se zabývali optimalizací protokolu pro proteinovou extrakci a proteolytické štěpení buněčného lyzátu HeLa S3 (Winter a Steen, 2011). Z výsledků jejich práce vyplývá, že precipitace pomocí TCA poskytuje nižší výtěžky oproti precipitaci chloroform/methanolem, což odpovídá výsledkům dosažených v této diplomové práci.

Naproti tomu varianty s acetonem a chloroform/methanolem poskytovaly relativně dobré výsledky, především pak v kombinaci s SDS pufrům. Z technického hlediska je precipitace acetonem jednodušší a méně náročná než precipitace systémem chloroform/methanol. S přihlédnutím na tyto výsledky byly pro následné proteolytické štěpení použity vzorky precipitované acetonem.

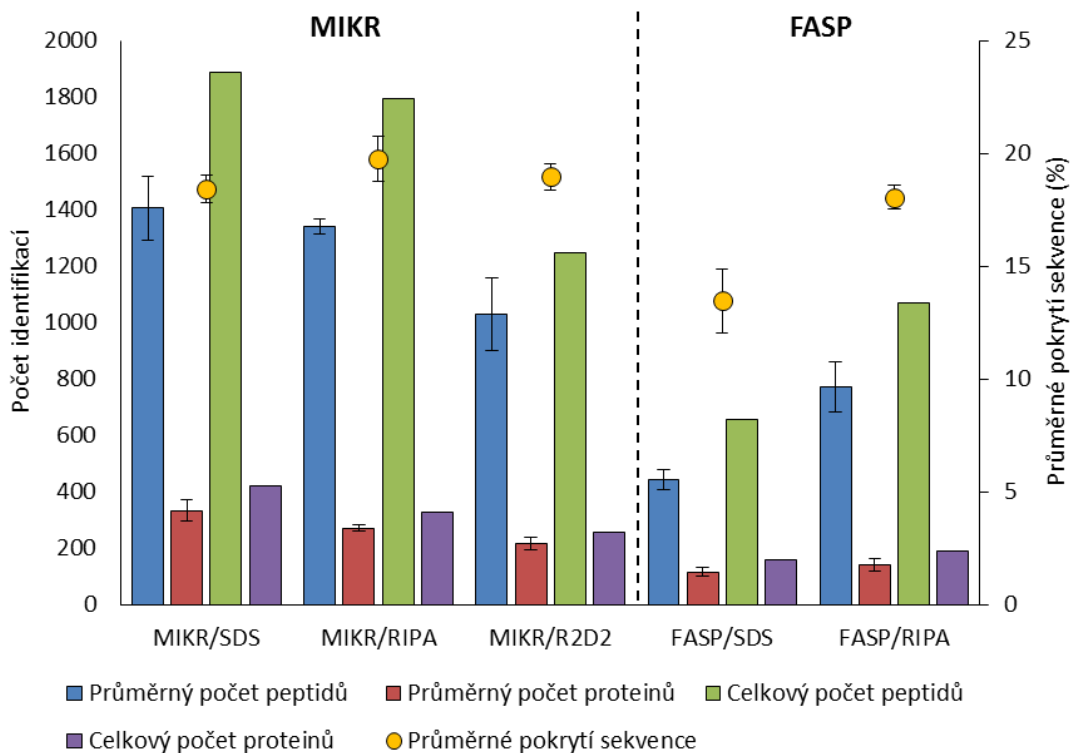
Blok C: Proteolytické štěpení



Moderní proteomika založená na LC-MS analyzuje proteiny na úrovni peptidů. Proto je jako další krok v pracovním postupu vždy zařazeno proteolytické štěpení. V případě, že mu předchází SDS-PAGE separace, může být provedeno přímo v gelu. V této práci však bylo zvoleno štěpení v roztoku, protože je méně náročné a poskytuje lepší výtěžek. Doposud bylo publikováno mnoho prací, které se věnují jeho optimalizaci (Winter a Steen, 2011; Winter *et al*, 2015) nebo vyvíjejí zcela nové varianty (Manza *et al*, 2005; Wiśniewski *et al*, 2009). V dnešní době se do popředí dostaly dva typy proteolytického štěpení, které se liší ve svém uspořádání, a které byly použity v tomto bloku experimentů (Obrázek 5):

1. **MIKR:** Prvním typem je štěpení v klasickém uspořádání v mikrozkuhavce. Proteiny (50 µg) extrahované SDS, RIPA, R2D2 pufrem (Blok A) a následně precipitované acetonem (Blok B) byly rozpuštěny v močovinovém pufru, dále redukovány, alkylovány a naštěpeny v mikrozkuhavce.
2. **FASP:** Druhou, modernější techniku, představuje štěpení na centrifugačním membránovém filtru (FASP), kde je proteolýza provedena společně s odstraněním interferujících látek pocházejících z extrakčních pufrů. Toho je dosaženo výměnou roztoků přes polopropustnou membránu bez použití precipitace, která může vést k potenciálním proteinovým ztrátám (Wiśniewski *et al*, 2009). Roztok proteinů extrahovaných SDS, RIPA a R2D2 pufrem (Blok A) byl nanesen na centrifugační membránový filtr a promyt. Redukce, alkylace a štěpení proběhlo ve stejné centrifugační membránové jednotce.

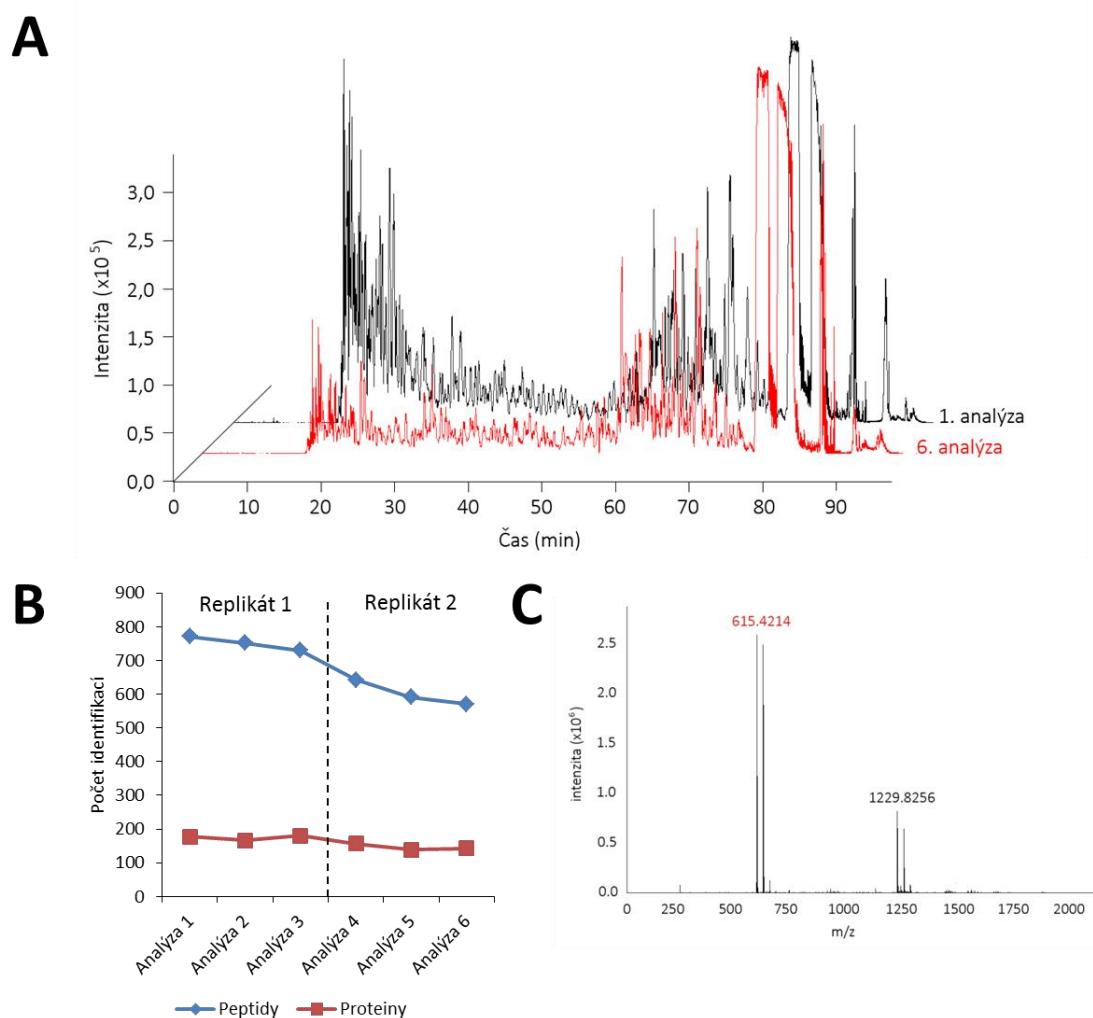
Cílem tohoto experimentů bylo srovnat tyto dvě metody z hlediska počtu identifikovaných proteinů a peptidů. Pro účel štěpení byl v obou případech použit trypsin v poměru 1:20. Kombinací metod štěpení a vzorků získaných předchozími experimenty vzniklo 6 variant v triplikátech (celkem 18 vzorků). Po štěpení byly získané peptidy odsoleny na C18 reverzní fázi a analyzovány pomocí LC-MS/MS ve 3 nezávislých analýzách s výjimkou variant MIKR/R2D2 a FASP/R2D2 (viz níže).



Obrázek 10 Průměrné a celkové počty proteinů a peptidů identifikovaných po proteolytickém štěpení v mikrozkumavce a FASP. Průměrný počet identifikací byl vypočítán z počtu identifikací ve 3 nezávislých analýzách. Celkový počet identifikací představuje množství peptidů a proteinů získané spojením výsledků těchto analýz. Vedlejší osa značí průměrné pokrytí sekvence u identifikovaných proteinů. Bylo vypočítáno z průměrných pokrytí ve 3 nezávislých analýzách.

Literatura uvádí, že metoda FASP poskytuje oproti štěpení v mikrozkumavce srovnatelný nebo vyšší počet identifikací (Wiśniewski *et al*, 2009). To se však v této práci nepotvrdilo, protože štěpením v mikrozkumavce bylo získáno 2× až 3× více identifikací než metodou FASP (Obrázek 10). Tento jev mohl být způsoben tím, že pro tyto experimenty byl použit jiný typ membránových centrifugačních filtrů, než byl doporučen v původní literatuře (ten v té době bohužel nebyl komerčně dostupný).

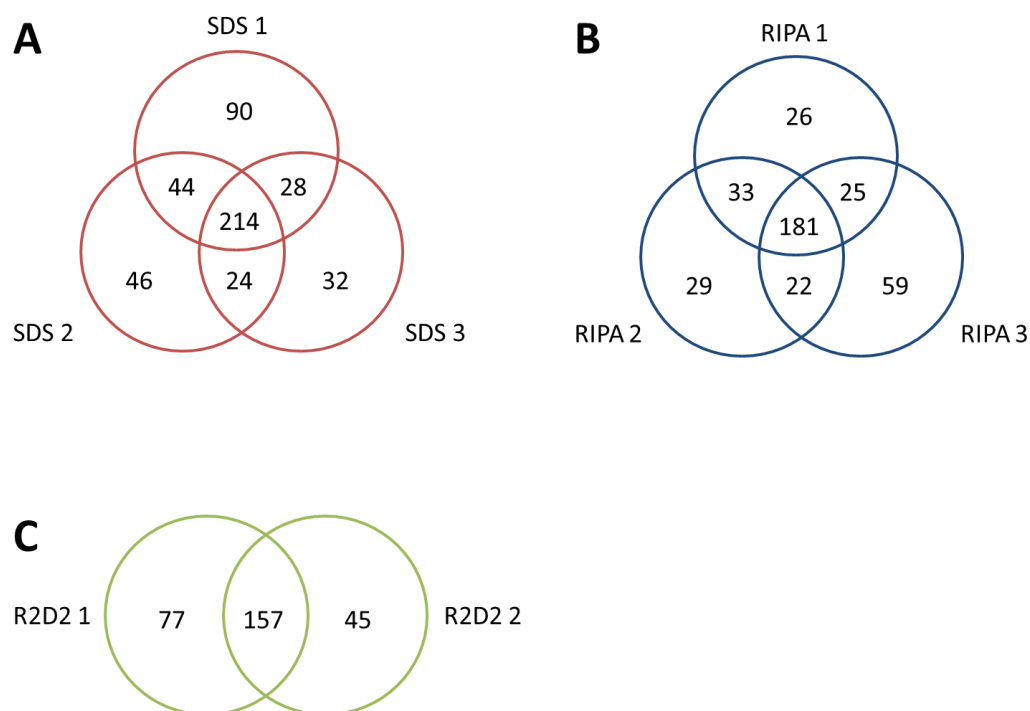
Nejvyšší počet identifikací i nejvyšší pokrytí sekvence poskytují vzorky extrahované pufrů SDS a RIPA štěpené v mikrozkumavce (Obrázek 10). Ve vzorku MIKR/SDS bylo identifikováno průměrně 1406 peptidů, 334 proteinů a průměrné pokrytí sekvence dosahovalo 19 %. Vzorek MIKR/RIPA poskytoval průměrně 1341 peptidů, 272 proteinů a téměř 20% pokrytí sekvence. Výsledky dosažené ve variantě s SDS pufrům byly tedy mírně vyšší než v případě RIPA lyzačního pufru, nicméně rozdíl nebyl statisticky významný.



Obrázek 11 **A)** Extrahovaný iontový chromatogram vzorku MIKR/R2D2 z 1. a 6. analýzy. **B)** Trend v počtu identifikací v 1. a 2. replikátu vzorku MIKR/R2D2. Oba replikáty byly analyzovány ve 3 nezávislých opakováních, přičemž analýza 1-3 náleží replikátu 1 a analýza 4-6 replikátu 2. **C)** MS spektrum ze 76. až 82. minuty extrahovaného iontového chromatogramu. Signál m/z 615,4214 odpovídá signálu detergentu Chaps, který nese 1 náboj. Signál m/z 1229,8256 představuje $1 \times$ nabitý dimer Chaps.

Při LC-MS/MS analýze vzorku extrahovaného R2D2 pufrem, precipitovaného acetonem a štěpeného v mikrozkuhavce byl od 2. analýzy pozorován jednak pokles intenzity signálu na extrahovaném iontovém chromatogramu (Obrázek 11 A) a jednak pokles počtu proteinových a peptidových identifikací (Obrázek 11 B). Výrazný signál v 76. až 82. minutě extrahovaného iontového chromatogramu odpovídá přítomnosti zwitteriontového detergentu Chaps (Obrázek 11 C), který postupně silně kontaminoval iontový zdroj a kvadrupólový analyzátor a tím ovlivnil dosažené výsledky. Ukázalo se

tak, že precipitace acetonem ani přečištění vzorku na C18 reverzní fázi nejsou schopné tento detergent zcela odstranit, což znamená velký problém pro LC-MS. Analýza třetího replikátu MIKR/R2D2 a všech replikátů FASP/R2D2 pak již nebyla provedena (Obrázek 10).

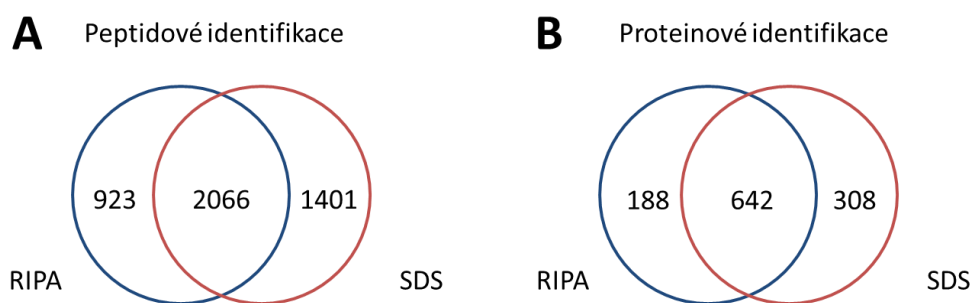


Obrázek 12 Překryv proteinových identifikací nezávislých technických replikátů. Uvedená čísla představují počet identifikací na úrovni proteinů získaných SDS (A), RIPA (B) a R2D2 (C) extrakčním pufrem po štěpení v mikrozkuhavce. Každý kroužek představuje jeden technický replikát, překrývající se části představují společně identifikované proteiny.

Kvůli zhodnocení robustnosti byla dále hodnocena reprodukovatelnost a překryv proteinových identifikací v jednotlivých replikátech variant extrakce (Obrázek 12). Ten představuje procentuální zastoupení proteinů, které byly identifikované ve všech nezávislých technických replikátech. Jak vyplývá z Obrázku 12, překryv byl pro SDS pufr stanoven na 45 % a pro RIPA na 48 %. Překryv v případě R2D2 pufru v podstatě odpovídal reprodukovatelnosti metody, která je popisována jako míra shody mezi výsledky analýzy provedené za odlišných podmínek, např. v jiném časovém období, jiným pracovníkem nebo za použití jiných přístrojů (Tabb *et al.*, 2010). Zde byla reprodukovatelnost vypočítána jako průměrná hodnota procentuálních překryvů tří párových srovnání pro SDS a RIPA pufr a jednoho párového srovnání pro R2D2 pufr. V

případě SDS pufru byla vyčíslena na 59 %, v případě RIPA pufru na 62 % a R2D2 pufru na 56 %. Tyto výsledky byly vyhodnoceny jako uspokojivé, protože reprodukovatelnost na úrovni proteinů často nedosahuje 60 %. To je dáno použitou metodou sběru dat při MS/MS analýze, kdy je výběr iontů prvním analyzátozem výrazně ovlivněn prostředím a je tedy do jisté míry náhodný (Nielson *et al*, 2011). Všechny tři varianty extrakce se tedy jeví jako dostatečně robustní pro rutinní použití.

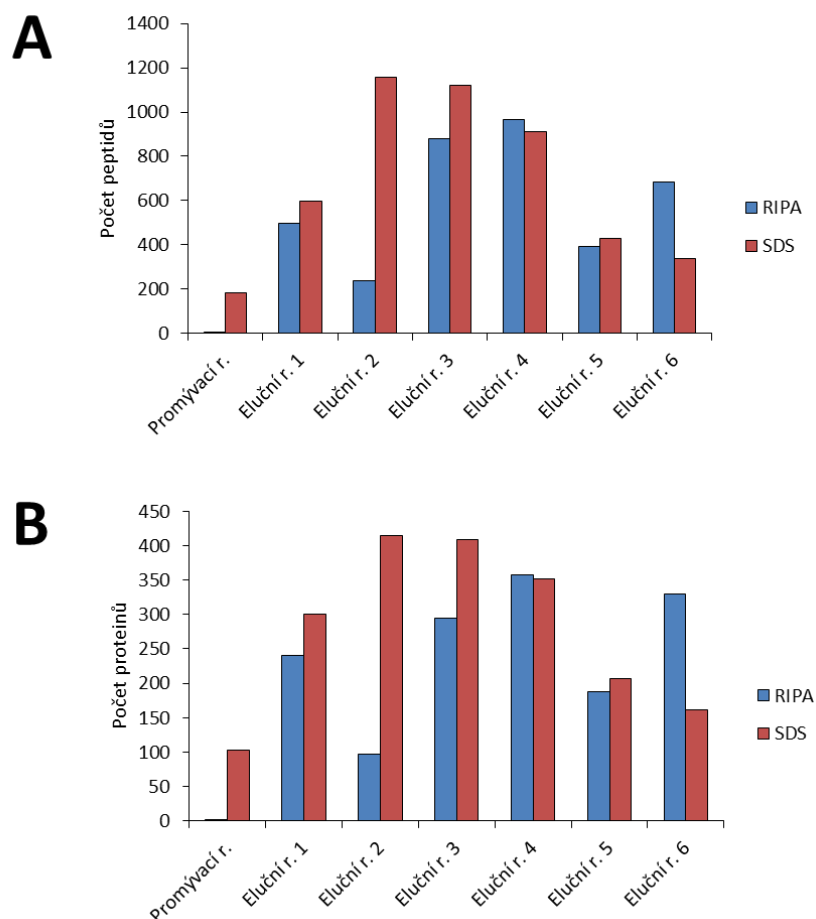
Protože vzorky extrahované pomocí SDS a RIPA pufru poskytovaly velice podobné výsledky, byla u těchto dvou variant provedena SCX frakcionace peptidů. Její výsledky byly nejprve hodnoceny z hlediska počtu a překryvu peptidových a proteinových identifikací. Bylo zjištěno, že SDS pufr poskytuje v absolutních číslech vyšší počet jak peptidových (3467), tak proteinových (950) identifikací oproti RIPA pufru, u kterého bylo identifikováno celkově 2989 peptidů a 830 proteinů. Z výsledků dále vyplývá, že 47 % peptidů a 56 % proteinů bylo extrahováno SDS i RIPA pufrům společně, přičemž ostatní peptidy a proteiny byly identifikovány ve vzorcích jednotlivých pufrů samostatně (Obrázek 13). Z toho vyplývá, že poměrně vysoké procento identifikací je vlastní jednotlivým variantám, což může znamenat, že oba pufrы jsou komplementární.



Obrázek 13 Překryv peptidových (A) a proteinových identifikací (B) vzorků MIKR/SDS a MIKR/RIPA získaných po SCX frakcionaci.

Jak je dále ukázáno na Obrázku 14, oba pufrы poskytují rozdílný počet peptidů i proteinů v jednotlivých frakcích SCX. Zatímco u SDS pufru bylo pozorováno spíše Gaussovské rozložení s vrcholem ve 3. frakci (75mM octan amonný), RIPA pufr ukazoval hned tři lokální maxima, a to ve 2., 4. a 6. frakci (50mM octan amonný, 200mM octan amonný, 80% ACN s 5% NH₄OH). Tento jev mohl být dán rozdílnými fyzikálně chemickými vlastnostmi peptidů. Z toho důvodu byly peptidy ležící mimo

překryv (Obrázek 13 A) podrobeny analýze z hlediska izoelektrického bodu, hydrofobicity (GRAVY index), délky peptidů (počet aminokyselin).



Obrázek 14 Celkový počet identifikovaných peptidů (A) a proteinů (B) získaných v jednotlivých frakcích SCX.

Izoelektrický bod peptidů má pro SCX frakcionaci zásadní význam, protože interakce s nosičem je určena jejich nábojem. Jak ukazuje obrázek 15 A, obě metody poskytují celkově spíše kyselé peptidy, nicméně u metody s RIPA puřem bylo pozorováno vyšší procentuální zastoupení bazických peptidů (29 %).

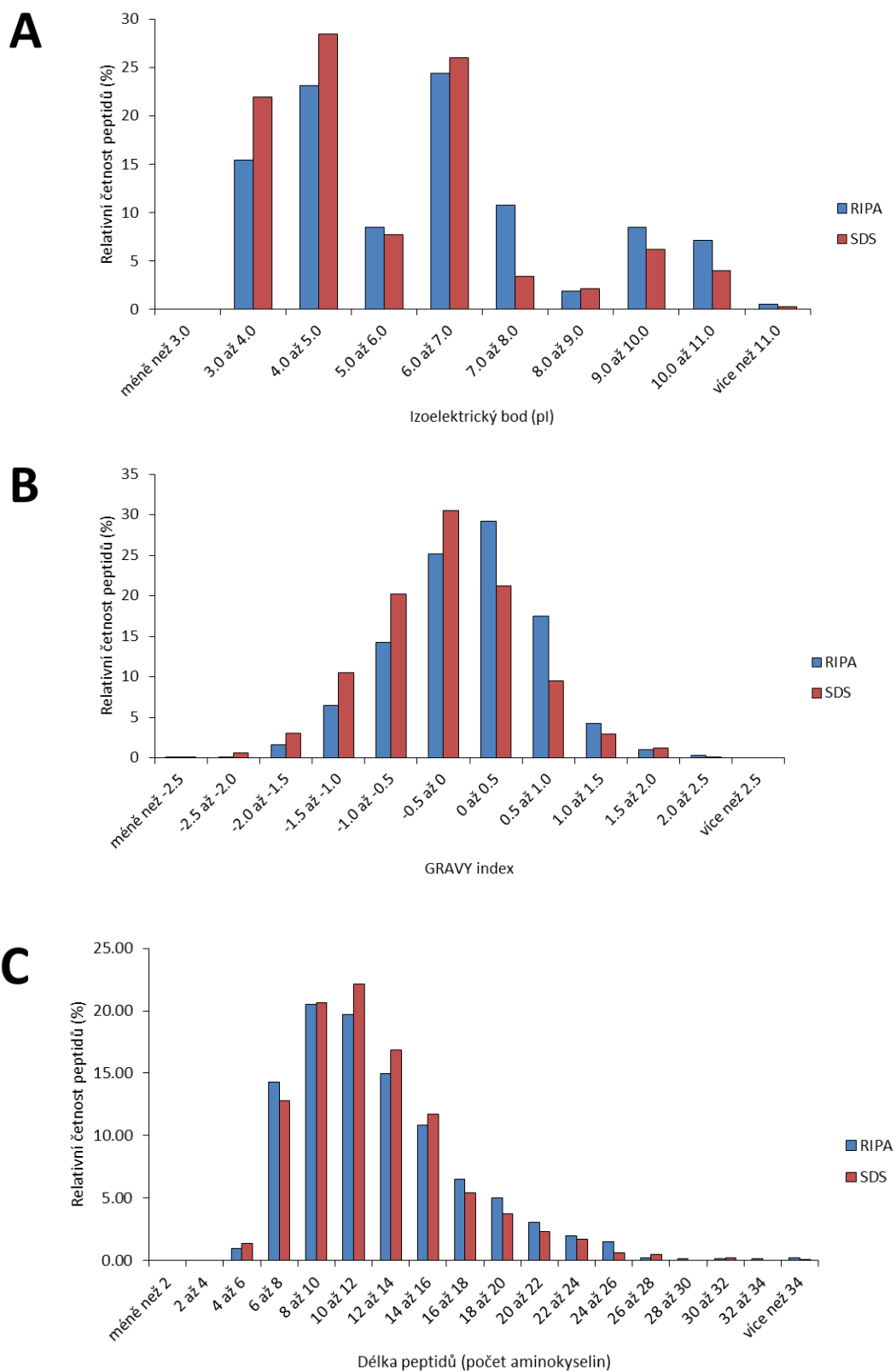
Rozdíl mezi metodami byl pozorován i při výpočtu „GRAVY indexu“ (Grand Average of Hydrophaticity). „GRAVY index“ charakterizuje peptid z hlediska jeho hydrofobicity. Peptidy s kladnou hodnotou jsou hydrofobní, zatímco peptidy se zápornou hodnotou jsou naopak hydrofilní (Haezlewood *et al*, 2003). Hodnoty GRAVY indexu peptidů identifikovaných v jednotlivých variantách měly vzhledem k relativní četnosti charakter normálního rozdělení. V případě SDS puřru měly nejvyšší zastoupení

peptidy s „GRAVY indexem“ - 0,5 až 0,0. RIPA pufr poskytoval spíše hydrofobnější peptidy, přičemž ty nejvíce zastoupené měly hodnotou 0,0 až 0,5 (Obrázek 15 B).

Dále se ukázalo, že obě metody vykazovaly nesymetrické rozdělení relativní četnosti s ohledem na délku peptidů. U metody s SDS pufrem byly nejvíce zastoupené peptidy s délkou 12 až 14 aminokyselin (23 %). Nepatrný rozdíl byl pozorován u metody s RIPA pufrem, která poskytovala nejčastěji peptidy o délce 8 až 10 aminokyselin (20 %). Mírný rozdíl v distribuci dokazuje také koeficient šikmosti, který byl v případě SDS pufru stanoven na 1,19 a v případě RIPA na 1,39 (Obrázek 15 C).

Bylo tedy zjištěno, že vlastnosti peptidů identifikovaných u metod s SDS a RIPA pufrem se mírně liší, což může opravdu vysvětlovat rozdíly v počtu peptidů a proteinů identifikovaných v jednotlivých frakcích (Obrázek 14).

Celkově lze říci, že SDS pufr dává vyšší počet identifikací a je proto pro rutinní proteinovou extrakci z rostlinného materiálu vhodnější. Nicméně vzhledem k tomu, že oba pufrы poskytují jiný set peptidů a proteinů, je vhodné pro důkladnou proteomickou analýzu zvoleného rostlinného materiálu použít jejich kombinaci.



Obrázek 15 Relativní zastoupení peptidů získaných metodou s SDS a RIPA extrakčním pufrem a ležících mimo překryv z hlediska **A**) izoelektrického bodu (pI), **B**) hydrofobicity („GRAVY index“) **C**) délky peptidů (počet aminokyselin).

Blok D: Obohacení fosfopeptidů



Předpokládaným výsledkem výše popsaného postupu je vzorek komplexní peptidové směsi, který je přímo použitelný pro analýzu pomocí LC-MS. Proteomická analýza je však v řadě případů zaměřena na konkrétní subproteom, jako je tomu např. při studiu PTM. Mezi nejvýznamnější PTM patří fosforylace. Ty plní v buňce řadu důležitých regulačních funkcí a v relativně nedávné době se staly cílem mnoha proteomických studií u rostlin (Yin *et al.*, 2014; Mithoe *et al.*, 2012; Ingelsson *et al.*, 2012). V této diplomové práci byly proto jako zájmový subproteom zvoleny fosforylované proteiny.

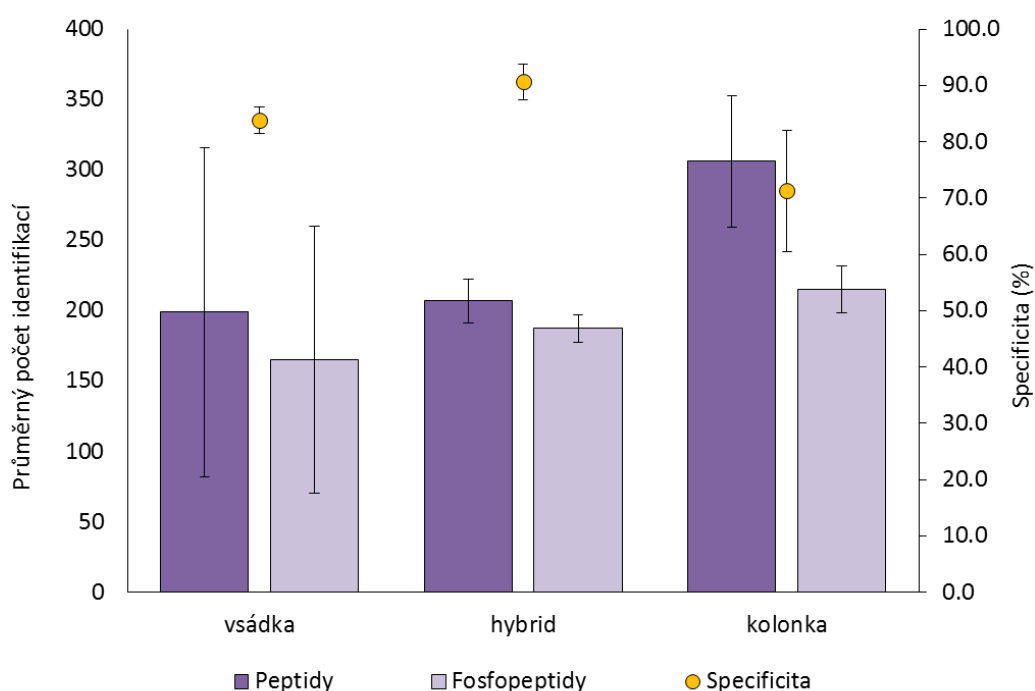
Analýza fosforylací může probíhat na úrovni proteinů, ale většinou probíhá na úrovni peptidů. Existují zde však významné limity. Je známo, že hladiny fosforylovaných proteinů jsou v buňce udržovány ve velmi nízkých koncentracích. Tato skutečnost představuje pro LC-MS analýzu velký problém, protože signály fosfopeptidů získaných proteolytickým štěpením jsou často zastíněny signály jejich nefosforylovaných protějšků (Jensen 2006).

Nezbytným krokem analýzy proteinových fosforylací je proto obohacení fosfopeptidů, při němž je z komplexní peptidové směsi izolována její fosforylovaná část. Mezi přední metody používané k tomuto účelu se dnes řadí afinitní chromatografie na oxidu titaničitém (Larsen *et al.* 2005; Aryal a Ross 2010). Častým problémem, se kterým se však tato metoda setkává, je interference s nefosforylovanými peptidy a to především s těmi, které obsahují kyselé postranní řetězce (Jensen a Larsen 2007; Petřík, bakalářská práce 2013). V řadě prací proto bylo věnováno značné úsilí pro zvýšení efektivity obohacení. Bylo zjištěno, že na účinnost obohacení má vliv přidání některých organických kyselin, které při obohacení fosfopeptidů kompetují s nefosforylovanými peptidy na vazebných místech oxidu titaničitého (Wu *et al.*, 2007; Mazanek *et al.*, 2007). Účinnost vybraných organických kyselin byla testována v rámci mé bakalářské práce (Petřík, bakalářská práce 2013). Její závěry vedly k tomu, že nejefektivnější je pro obohacení fosfopeptidů vzhledem k jeho celkovému výtěžku a specificitě použití pufracího systému obsahujícího kyselinu glutamovou.

Na základě těchto výsledků byla v této diplomové práci provedena série experimentů, které vedly k mírné optimalizaci protokolu pro obohacení fosfopeptidů. Novinkou oproti bakalářské práci bylo zavedení hybridního uspořádání. Pro obohacení tedy byla testována následující uspořádání:

1. **Vsádkové:** Celý proces obohacení probíhá v mikrozkumavce (Engholm-Keller *et al.*, 2012).
2. **Kolonkové:** Celý proces obohacení je uskutečněn prostřednictvím tzv. „Stage Tip“ kolony (Rappsilber *et al.*, 2007).
3. **Hybridní:** Ekvilibrace a nanášení probíhá vsádkově, promývání a eluce na „Stage Tip“ koloně (Engholm-Keller *et al.*, 2012).

Na každý vzorek bylo použito 50 µg komplexní směsi peptidů odvozené od buněčné linie Hela S3 a všechny 3 varianty byly vyhotoveny v triplikátu (celkem 9 vzorků). Po odsolení na C18 reverzní fázi byla pro každý vzorek provedena LC-MS/MS analýza ve 3 nezávislých opakováních.



Obrázek 16 Průměrný počet identifikovaných peptidů a fosfopeptidů obohacených ve vsádkovém, hybridním a kolonkovém uspořádání. Vedlejší osa znázorňuje průměrnou specifitu.

Ve srovnání s výsledky bakalářské práce, byl u všech variant dosažen vyšší počet identifikovaných fosfopeptidů a přibližně stejná specifita. Např. ve vsádkovém uspořádání bylo dříve dosaženo průměrného výtěžku 120 fosfopeptidů, ale v této práci byl průměrný počet identifikovaných fosfopeptidů zvýšen na 165 (Petřík, bakalářská práce 2013). Na druhou stranu zde byla pozorována vysoká variabilita mezi opakováními (Obrázek 16, viz chybové úsečky). Nejvíce fosfopeptidů sice bylo

průměrně identifikováno ve vzorcích obohacených v kolonkovém uspořádání (215), nicméně tato varianta poskytovala nejnižší průměrnou specificitu (71 %). Nejlepších výsledků bylo v tomto ohledu dosaženo v hybridním uspořádání (91 %). S přihlédnutím na relativně vysoký průměrný počet identifikací (187) a vysokou opakovatelnost (Obrázek 16, viz chybové úsečky) se hybridní metoda jeví jako robustní způsob obohacení fosfopeptidů na oxidu titaničitém.

Další plánované experimenty tentokrát již s rostlinným materiálem nebyly vzhledem k časovým možnostem a technickým problémům během řešení diplomové práce provedeny.

ZÁVĚR

Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) představuje vedoucí technologii pro analýzu proteinů. Významnou roli zde hraje příprava vzorku. Ta může zahrnovat separaci proteinů pomocí 2DE, která si v rostlinné proteomice stále udržuje velký význam. Velmi výhodným se však ukazuje přechod na tzv. „gel-free“ metody, které tento krok vynechávají a poskytují tak vyšší počet proteinových identifikací a možnost současné kvantifikace. V takovém případě se příprava vzorku spoléhá na několikastupňový proces složený z extrakce proteinů, případné precipitace, proteolytického štěpení a možného obohacení zájmového subproteomu jako jsou např. fosforylované proteiny. Tato diplomová práce se zabývala přípravou vzorku rostlinných proteinů před LC-MS/MS analýzou „gel-free“ přístupem na každém stupni zvlášť.

Pro experimenty bylo celkově spotřebováno 2,25 g buněčné suspenzní kultury *A. thaliana* a 3 mg komplexní peptidové směsi HeLa. Z tohoto materiálu bylo vytvořeno celkem 39 vzorků, což dohromady představuje 117 replikátů. S těmi bylo provedeno 63 separací SDS-PAGE, 45 afinitních chromatografií na oxidu titaničitém a 88 LC-MS/MS analýz.

Výsledky experimentů týkající se proteinové extrakce ukázaly, že je v tomto případě nevýhodné provádět odstranění sekundárních metabolitů, protože způsobuje výrazný pokles proteinových výtěžků a ovlivňuje proteinové složení získaných vzorků. Všechny tři použité extrakční pufrы byly samostatně funkční.

V dalším bloku experimentů zaměřeného na precipitaci bylo zjištěno, že precipitace pomocí TCA není kompatibilní s žádným z použitých lyzačních pufrů. Naopak výhodné se ukázalo být použití acetonu, protože je technicky nenáročné a precipitované proteiny poskytovaly po rozpuštění a rozdělení pomocí SDS-PAGE relativně bohaté proteinové spektrum.

Z toho důvodu byly proteiny precipitované acetonem použity k následné proteolýze v mikrozkuhavce. Vedle toho byla provedena série experimentů štěpení v uspořádání FASP, u kterého byl vynechán krok precipitace. Ukázalo se, že štěpením v mikrozkuhavce poskytuje 2× až 3× vyšší počet identifikací proteinů i peptidů. Při LC-MS/MS analýze bylo také zjištěno, že extrakce pomocí R2D2 lyzačního pufru byla nekompatibilní s precipitací acetonem. Při analýze vzorků totiž docházelo k silné kontaminaci LC-MS systému detergentem Chaps, který během přípravy proteinů nebyl

ze vzorku, vzhledem k jeho vlastnostem, zcela odstraněn. Nejlepších výsledků s ohledem na počet identifikací tak dosáhly vzorky extrahované SDS a RIPA lyzačním pufrem a štěpené v mikrozkuhavce.

Pro důkladnější analýzu těchto vzorků byla provedena jejich SCX frakcionace. Z výsledků vyplývá, že pro rutinní proteomické analýzy je vhodnější použít SDS lyzační pufr, protože poskytuje vyšší počet identifikací než RIPA pufr. Nicméně vzhledem k tomu, že oba pufry poskytují odlišnou sadu peptidů a proteinů, je pro rozsáhlé proteomické studie vhodné použít extrakci jak SDS, tak RIPA pufrem.

Pro obohacení fosfopeptidů byla použita afinitní chromatografie na oxidu titaničitém (Petřík, bakalářská práce 2013). Protokol byl v této diplomové práci mírně optimalizován. Bylo zavedeno hybridní uspořádání a inovace použitých roztoků, čímž bylo dosaženo jak vyšších výtěžků fosfopeptidů, tak vyšší specifity.

Závěrem může být uvedeno, že tato diplomová práce je vůbec první, ve které byla vyvinuta snaha o optimalizaci protokolu extrakce a štěpení rostlinných proteinů před LC-MS/MS analýzou a nabízí tak vědecké veřejnosti zajímavé poznatky. Vzhledem k tomu, že Oddělení proteinů a proteomiky Centra regionu Haná se zabývá téměř výhradně rostlinnou proteomikou, budou pak výsledky této práce na tomto pracovišti aplikovány přímo do praxe.

SEZNAM ZKRATEK

2DE	dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
AA	akrylamid
AC	precipitace proteinů acetonem
ACN	acetonitril
APS	persíran amonný (am ₄ persulfate)
BIS	N',N'-methylenbisakrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
Chaps	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát
CM	precipitace proteinů chloroform/methanolem
DDPS	3-(decyldimethylamonio)-1-propansulfonát
DIGE	dvoudimenzionální diferenční gelová elektroforéza
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
emPAI	„exponentially modified protein abundance index“
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FAB	ionizace urychlenými atomy (fast atom bombardment)
FASP	štěpení na membránovém centrifugačním filtru (filter aided sample preparation)
FDR	míra falešně pozitivních výsledků („false discovery rate“)
FEN	odstranění sekundárních metabolitů fenolickou extrakcí
GRAVY	hydrofobicita (Grand Average of Hydropathicity)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IAM	iodoacetamid
ICAT	izotopicky kódovaná afinitní značka (isotope-coded affinity tag)
IEF	izoelektrická fokusace
iTRAQ	izobarická značka pro relativní a absolutní kvantifikaci (isobaric tag for relative and absolute quantitation)
IPG	imobilizovaný pH gradient
LC-MS	kapilární chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	kapilární chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
LSB	redukující vzorkovací pufr (loading sample buffer)

MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MIKR	štěpení proteinů v mikrozkmavce
nLC	nanokapilární kapalinová chromatografie
NO	extrakce proteinů bez odstranění sekundárních metabolitů
PAI	„protein abundance index“
pI	izoelektrický bod
PMF	peptidové mapování (peptide <u>m</u> ass <u>f</u> ingerprinting)
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PS	peptidové sekvenování
PTM	posttranslační modifikace
RFU	relativní fluorescenční jednotka
Q-TOF	hybridní tandemová hmotnostní spektrometrie s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu
SCX	silně kyselý katex (s <u>t</u> rong <u>c</u> ation <u>e</u> xchange)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	denaturující elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SILAC	stabilními izotopy pomocí aminokyselin (s <u>t</u> able <u>i</u> sotope <u>l</u> abeling by <u>a</u> mino <u>a</u> cids)
TCA	kyselina trichloroctová; odstranění sekundárních metabolitů extrakcí kyselinou trichloroctovou; precipitace proteinů kyselinou trichloroctovou
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEAB	uhličitan triethylamonný
TEMED	tetramethylethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alam I, Sharmin S, Kim KH, Kim YG, Lee J, Lee BH. An improved plant leaf protein extraction method for high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and comparative proteomics. *Biotech Histochem.* 2013 Feb;88(2):61-75.

Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics.* 2003 Jan;3(1):36-44.

Alvarez S, Berla BM, Sheffield J, Cahoon RE, Jez JM, Hicks LM. Comprehensive analysis of the Brassica juncea root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics.* 2009 May;9(9):2419-31.

Alvarez S, Roy Choudhury S, Sivagnanam K, Hicks LM, Pandey S. Quantitative Proteomics Analysis of Camelina sativa Seeds Overexpressing the AGG3 Gene to Identify the Proteomic Basis of Increased Yield and Stress Tolerance. *J Proteome Res.* 2015 Jun 5;14(6):2606-16.

Amanchy R, Kalume DE, Iwahori A, Zhong J, Pandey A. Phosphoproteome analysis of HeLa cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res.* 2005 Sep-Oct; 4(5):1661-7.

Aryal UK, Ross AR. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010 Jan;24(2):219-31.

Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* 2003 Dec;36(5):652-663.

Baldin C, Valiante V, Krüger T, Schaffner L, Haas H, Kniemeyer O, Brakhage AA. Comparative proteomics of a tor inducible *Aspergillus fumigatus* mutant reveals involvement of the Tor kinase in iron regulation. *Proteomics.* 2015 Jul;15(13):2230-43.

Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Aug 17;101(33):12130-5.

Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*. 1976 Jan;70(1):241-50.

Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 Oct;76(6):1223-43.

Beynon RJ, Pratt JM. Metabolic labeling of proteins for proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Jul;4(7):857-72.

Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74(18):4741-4749.

Borner GH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol*. 2003 Jun;132(2):568-77.

Cabezón V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L, Gil C. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics*. 2009;9(20):4770-86.

Cabral F, Gottesman MM. The determination of similarities in amino acid composition among proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1978 Dec;91(2):548-56.

Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 Feb;4(4):295-320.

Carranza P, Grunau A, Schneider T, Hartmann I, Lehner A, Stephan R, Gehrig P, Grossmann J, Groebel K, Hoelzle LE, Eberl L, Riedel K. A gel-free quantitative proteomics approach to investigate temperature adaptation of the food-borne pathogen *Cronobacter turicensis* 3032. *Proteomics*. 2010 Sep;10(18):3248-61.

Chai F, Li HY, Wang W, Zhu XJ, Li Y, Wang S, Guo L, Zhang LK, Xiao G. Subcellular quantitative proteomic analysis reveals host proteins involved in human cytomegalovirus infection. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Aug;1854(8):967-78.

Chelius D, Bondarenko PV. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2002;1(4):317-323.

Chen Y, Pang Q, Dai S, Wang Y, Chen S, Yan X. Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. *J Plant Physiol*. 2011 Jul 1;168(10):995-1008.

Chua L, Shan X, Wang J, Peng W, Zhang G, Xie D. Proteomics study of COI1-regulated proteins in *Arabidopsis* flower. *J Integr Plant Biol*. 2010 Apr;52(4):410-9.

Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1794-805.

Cui SX, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng YS, Liu JY. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*. 2005 Aug;5(12):3162-3172.

Dale G, Latner AL. Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 1969 Apr;24(1):61-8.

De Godoy LM, Olsen JV, Cox J, Nielsen ML, Hubner NC, Fröhlich F, Walther TC, Mann M. Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature*. 2008 Oct 30;455(7217):1251-4.

Di Carli M, Villani ME, Renzone G, Nardi L, Pasquo A, Franconi R, Scaloni A, Benvenuto E, Desiderio A. Leaf proteome analysis of transgenic plants expressing antiviral antibodies. *J Proteome Res.* 2009 Feb;8(2):838-48.

Dong M-Q, Venable JD, Au N, et al. Quantitative mass spectrometry identifies insulin signaling targets in *C. elegans*. *Science.* 2007;317(5838):660–663.

Drews O, Reil G, Parlar H, Görg A. Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Proteomics.* 2004 May;4(5):1293-304.

Edman P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem.* 1949 Jul;22(3):475.

Engholm-Keller K, Birck P, Størling J, Pociot F, Mandrup-Poulsen T, Larsen MR. TiSH--a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO₂, SIMAC, and HILIC. *J Proteomics.* 2012 Oct 22;75(18):5749-61.

Fares A, Nespoulous C, Rossignol M, Peltier JB. Simultaneous identification and quantification of nitrosylation sites by combination of biotin switch and ICAT labeling. *Methods Mol Biol.* 2014;1072:609-20.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989 Oct 6;246(4926):64-71.

Ferro M, Salvi D, Brugiére S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics.* 2003 May;2(5):325-345.

Florens L, Carozza MJ, Swanson SK, et al. Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. *Methods.* 2006;40(4):303–311.

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000 Apr;21(6):1037-53.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004 Dec;4(12):3665-85.

Gruhler A, Schulze WX, Matthiesen R, Mann M, Jensen ON. Stable isotope labeling of *Arabidopsis thaliana* cells and quantitative proteomics by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Nov;4(11):1697-709.

Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999 Oct;17(10):994-9.

Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 15;97(17):9390-5.

Heazlewood JL, Howell KA, Whelan J, Millar AH. Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol*. 2003 May;132(1):230-42.

Hebeler R, Oeljeklaus S, Reidegeld KE, Eisenacher M, Stephan C, Sitek B, Stuhler K, Meyer HE, Sturre MJG, Dijkwel PP, Warscheid B. Study of early leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by quantitative proteomics using reciprocal N-14/N-15 Labeling and difference gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Jan;7(1):108-120.

Heinemeyer J, Scheibe B, Schmitz UK, Braun HP. Blue native DIGE as a tool for comparative analyses of protein complexes. *J Proteomics*. 2009 Apr 13;72(3):539-44.

Hilger M, Bonaldi T, Gnad F, Mann M. Systems-wide analysis of a phosphatase knock-down by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Aug;8(8):1908-20.

Finamore F, Pieroni L, Ronci M, Marzano V, Mortera SL, Romano M, Cortese C, Federici G, Urbani A. Proteomics investigation of human platelets by shotgun nUPLC-MSE and 2DE experimental strategies: a comparative study. *Blood Transfus.* 2010 Jun;8 Suppl 3:s140-8.

Ingelsson B, Vener AV. Phosphoproteomics of *Arabidopsis* chloroplasts reveals involvement of the STN7 kinase in phosphorylation of nucleoid protein pTAC16. *FEBS Lett.* 2012 May 7;586(9):1265-71.

Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(9):1265–1272.

Islam N, Tsujimoto H, Hirano H. Wheat proteomics: relationship between fine chromosome deletion and protein expression. *Proteomics.* 2003 Mar;3(3):307-16.

James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys.* 1997 Nov;30(4):279-331.

Jensen SS, Larsen MR. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21:3635-45.

Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jun;7(6):391-403.

Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N. Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant.* 2009 Nov;2(6):1154-80.

Julka S, Regnier FE. Recent advancements in differential proteomics based on stable isotope coding. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2005 Jul;4(2):158-77.

Karp NA, Kreil DP, Lilley KS. Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*. 2004 May;4(5):1421-32.

Kenrick KG, Margolis J. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem*. 1970 Jan;33(1):204-7.

Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, Hausman JF, Renaut J. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*. 2008 Jun;8(12):2514-30.

Krijgsveld J, Ketting RF, Mahmoudi T, Johansen J, Artal-Sanz M, Verrijzer CP, Plasterk RH, Heck AJ. Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol*. 2003 Aug;21(8):927-31.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lanquar V, Kuhn L, Lelievre F, Khafif M, Espagne C, Bruley C, Barbier-Brygoo H, Garin J, Thomine S. ¹⁵N-metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in *Arabidopsis* cells. *Proteomics*. 2007 Mar;7(5):750-754.

Larance M, Bailly AP, Pourkarimi E, Hay RT, Buchanan G, Coulthurst S, Xirodimas DP, Gartner A, Lamond AI. Stable-isotope labeling with amino acids in nematodes. *Nat Methods*. 2011 Aug 28;8(10):849-51.

Larrainzar E, Wienkoop S, Weckwerth W, Ladrera R, Arrese-Igor C, González EM. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol*. 2007 Jul;144(3):1495-507.

Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJ. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Jul;4(7):873-86.

- Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Bahk JD, Lee IJ, Lee BH. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*. 2007 Sep;7(18):3369-83.
- Lewandowska D, ten Have S, Hodge K, Tillemans V, Lamond AI, Brown JW. Plant SILAC: stable-isotope labelling with amino acids of *Arabidopsis* seedlings for quantitative proteomics. *PLoS One*. 2013 Aug 20;8(8):e72207.
- Li X, Gerber SA, Rudner AD, Beausoleil SA, Haas W, Villen J, Elias JE, Gygi SP. Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res*. 2007 Mar;6(3):1190-7.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2005 Mar;137(3):921-30.
- Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ. Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell*. 2005 Nov;17(11):3111-40.
- Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol*. 2010 Jul;28(7):695-709.
- Manza LL, Stamer SL, Ham AJ, Codreanu SG, Liebler DC. Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics*. 2005 May;5(7):1742-5.
- Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 2005 Jun;382(3):669-78.
- Mazanek M, Mituloviae G, Herzog F, Stingl C, Hutchins JR, Peters JM, Mechtler K. Titanium dioxide as a chemo-affinity solid phase in offline phosphopeptide chromatography prior to HPLC-MS/MS analysis. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1059-69.

Mithoe SC, Boersema PJ, Berke L, Snel B, Heck AJ, Menke FL. Targeted quantitative phosphoproteomics approach for the detection of phospho-tyrosine signaling in plants. *J Proteome Res.* 2012 Jan 1;11(1):438-48.

Molloy MP, Herbert BR, Walsh BJ, Tyler MI, Traini M, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Williams KL, Gooley AA. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998 May;19(5):837-44.

Mueller LN, Brusniak M-Y, Mani DR, Aebersold R. An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res.* 2008;7(1):51-61.

Ndimba BK, Chivasa S, Simon WJ, Slabas AR. Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2005 Nov;5(16):4185-96.

Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC, Haynes PA. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics.* 2011;11(4):535-53.

Norling B, Zak E, Andersson B, Pakrasi H. 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*. 1998 Oct 2;436(2):189-92.

Oda Y, Huang K, Cross FR, Cowburn D, Chait BT. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 8;96(12):6591-6.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975 May 25;250(10):4007-21.

Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, Resing KA, Ahn NG. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Oct;4(10):1487-502.

Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006 Nov 3; 127(3):635-48.

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002 May;1(5):376-86.

Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000 Jun 15;405(6788):837-46.

Pang Q, Chen S, Dai S, Chen Y, Wang Y, Yan X. Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2584-99.

Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung WY, Haugland RP. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem*. 1999 Sep;47(9):1179-88.

Patel VJ, Thalassinou K, Slade SE, Connolly JB, Crombie A, Murrell JC, Scrivens JH. A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *J Proteome Res*. 2009 Jul;8(7):3752-9.

Peng JM, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, Gygi SP. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: *The yeast proteome*. 2003 Feb; 2(1):43-50.

Peng JM, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng DM, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol.* 2003 Aug; 21(8):921-926.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999 Dec;20(18):3551-67.

Petřík I. Analýza proteinových fosforylací proteomickými metodami. Bakalářská práce. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta. 2013.

Prime TA, Sherrier DJ, Mahon P, Packman LC, Dupree P. A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis.* 2000 Oct;21(16):3488-99.

Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007;2(8):1896-906.

Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research.* 2002;12(8):1231-1245.

Raus M, Kopečný D, Šebela M. Program Application for the Prediction of Results of Protein Digestion by Proteolytic Enzymes. *Chem Listy.* 2013; 107(1):44-53.

Riederer BM. Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis. *J Proteomics.* 2008 Jul 21;71(2):231-44.

Riederer IM, Herrero RM, Leuba G, Riederer BM. Serial protein labeling with infrared maleimide dyes to identify cysteine modifications. *J Proteomics.* 2008 Jul 21;71(2):222-30.

Riederer IM, Riederer BM. Differential protein labeling with thiol-reactive infrared DY-680 and DY-780 maleimides and analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2007 Jun;7(11):1753-6.

Roe MR, Griffin TJ. Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: tools for studying biological response of proteins and proteomes. *Proteomics*. 2006 Sep;6(17):4678-87.

Sagliocco F, Guillemot JC, Monribot C, Capdevielle J, Perrot M, Ferran E, Ferrara P, Boucherie H. Identification of proteins of the yeast protein map using genetically manipulated strains and peptide-mass fingerprinting. *Yeast*. 1996 Dec;12(15):1519-33.

Sandhu C, Hewel JA, Badis G, Talukder S, Liu J, Hughes TR, Emili A. Evaluation of data-dependent versus targeted shotgun proteomic approaches for monitoring transcription factor expression in breast cancer. *J Proteome Res*. 2008 Apr;7(4):1529-41.

Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*. 2000 Apr;21(6):1054-70.

Sheffield J, Taylor N, Fauquet C, Chen S. The cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root proteome: protein identification and differential expression. *Proteomics*. 2006 Mar;6(5):1588-98.

Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, Stone T, Sweet A, Williams K, Tonge R. Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics*. 2003 Jul;3(7):1181-95.

Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y. emPAI Calc--for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*. 2010 Feb 15;26(4):576-7.

Schulenberg B, Patton WF. Combining microscale solution-phase isoelectric focusing with Multiplexed Proteomics dye staining to analyze protein post-translational modifications. *Electrophoresis*. 2004 Aug;25(15):2539-44.

Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, Nakamura A, Tomita M, Ishihama Y. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Jun; 6(6):1103-1109.

Tabb DL, Vega-Montoto L, Rudnick PA, Variyath AM, Ham AJ, Bunk DM, Kilpatrick LE, Billheimer DD, Blackman RK, Cardasis HL, Carr SA, Clauser KR, Jaffe JD, Kowalski KA, Neubert TA, Regnier FE, Schilling B, Tegeler TJ, Wang M, Wang P, Whiteaker JR, Zimmerman LJ, Fisher SJ, Gibson BW, Kinsinger CR, Mesri M, Rodriguez H, Stein SE, Tempst P, Paulovich AG, Liebler DC, Spiegelman C. Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2010; 9(2):761-76.

Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1988;2(20):151-3.

Taylor JA, Johnson RS. Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1997;11(9):1067-75.

Timms JF, Cramer R. Difference gel electrophoresis. *Proteomics*. 2008 Dec;8(23-24):4886-97.

Timperman AT, Aebersold R. Peptide electroextraction for direct coupling of in-gel digests with capillary LC-MS/MS for protein identification and sequencing. *Anal Chem*. 2000 Sep 1;72(17):4115-21.

Tomer KB, Crow FW, Gross ML, Kopple KD. Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of cyclic peptides. *Anal Chem*. 1984 May;56(6):880-6.

Tuñón J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Lorenzo O, López JA, Egido J. Proteomic strategies in the search of new biomarkers in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010 May 11;55(19):2009-16.

- Ünlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 1997 Oct;18(11):2071-7.
- Wang W, Tai F, Chen S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J Sep Sci*. 2008 Jun;31(11):2032-9.
- Watson BS, Asirvatham VS, Wang L, Sumner LW. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiol*. 2003 Mar;131(3):1104-23.
- Weinhold A, Wielsch N, Svatoš A, Baldwin T. Label-free nanoUPLC-MSE based quantification of antimicrobial peptides from the leaf apoplast of *Nicotiana attenuata*. *BMC Plant Biol*. 2015 Jan; 15(18).
- Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984 Apr;138(1):141-3.
- Wiener MC, Sachs JR, Deyanova EG, Yates NA. Differential mass spectrometry: a label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures. *Anal Chem*. 2004;76(20):6085–6096.
- Wildgruber R, Reil G, Drews O, Parlar H, Görg A. Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*. 2002 Jun;2(6):727-32.
- Winter D, Steen H. Optimization of cell lysis and protein digestion protocols for the analysis of HeLa S3 cells by LC-MS/MS. *Proteomics*. 2011 Dec;11(24):4726-30.
- Winter D, Dehghani A, Steen H. Optimization of cell lysis and protein digestion protocols for protein analysis by LC-MS/MS. *Methods Mol Biol*. 2015;1295:259-73.
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):359-62.

- Wolters DA, Washburn MP, Yates JR 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2001 Dec 1;73(23):5683-90.
- Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1981 Nov 15;118(1):197-203.
- Wrigley CW. Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis: application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. *Biochem Genet.* 1970 Aug;4(4):509-16.
- Wu J, Shakey Q, Liu W, Schuller A, Follettie MT. Global profiling of phosphopeptides by titania affinity enrichment. *J Proteome Res.* 2007 Dec; 6(12):4684-9.
- Xing X, Zhang C, Li N, Zhai L, Zhu Y, Yang X, Xu P. Qualitative and quantitative analysis of the adult *Drosophila melanogaster* proteome. *Proteomics.* 2014 Feb;14(2-3):286-90.
- Yin X, Sakata K, Komatsu S. Phosphoproteomics reveals the effect of ethylene in soybean root under flooding stress. *J Proteome Res.* 2014 Dec 5;13(12):5618-34.
- Zhai B, Villen J, Beausoleil SA, Mintseris J, Gygi SP. Phosphoproteome analysis of *Drosophila melanogaster* embryos. *J Proteome Res.* 2008 Apr;7(4):1675-82.
- Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:840518.
- Zhu W, Hu J, Wang X, Tian J, Komatsu S. Organ-specific analysis of mahonia using gel-free/label-free proteomic technique. *J Proteome Res.* 2015 Jun 5;14(6):2669-85.
- Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot.* 2006;57(7):1501-8.

Zuo X, Speicher DW. A method for global analysis of complex proteomes using sample prefractionation by solution isoelectrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis. *Anal Biochem.* 2000 Sep 10;284(2):266-78.

Zybilov B, Coleman MK, Florens L, Washburn MP. Correlation of relative abundance ratios derived from peptide ion chromatograms and spectrum counting for quantitative proteomic analysis using stable isotope labeling. *Anal Chem.* 2005;77(19):6218-24.

Zybilov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One.* 2008 Apr 23;3(4):e1994.

Databáze

www.webofknowledge.com

www.uniprot.org