



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Studium cytokinin-interagujících proteinů
v rostlinném materiálu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Vladimír Skalický
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	25. 7. 2013

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Vladimír Skalický
Název práce	Studium cytokinin-interagujících proteinů v rostlinném materiálu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, oddělení biochemie proteinů a proteomiky
Vedoucí práce	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá problematikou separace cytokinin-interagujících proteinů z rostlinného materiálu. Jako modelový materiál byla zvolena suspenzní protoplastová kultura <i>A. thaliana</i>. Prvním klíčovým krokem k úspěchu byla extrakce proteinů v nativním stavu se zachovanými vazebnými vlastnostmi. K izolaci byla následně využita afinitní chromatografie s ligandy isopentenyladeninu imobilizovanými na gelové matici v rozdílných polohách C² a N⁹. Purifikované proteiny byly dále zpracovány proteomickými metodami. Rozděleny pomocí jednorozměrné SDS-PAGE, identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií a stanoveny metodou label-free kvantifikace založenou na srovnání četnosti hmotnostních spekter detekovaných proteinů. Díky tomuto přístupu bylo možné identifikovat nové potenciální komponenty biologických procesů spojených s účinkem cytokininů na rostlinu. Tyto interakce se mohou ukázat jako velmi důležité pro bližší pochopení mechanismu fyziologických účinků těchto významných fytohormonů.</p>
Klíčová slova	Cytokininy, isopentenyladenin, extrakce proteinů, afinitní chromatografie, rostlinná proteomika
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Vladimír Skalický
Title of thesis	Study of cytokinin-interacting proteins in plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Protein Biochemistry and Proteomics
Supervisor	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>This thesis deals with separation of cytokinin-interacting proteins from plant tissue. As a model material the suspension culture of protoplasts of <i>A. thaliana</i> was chosen. The first key step was a native extraction of proteins, which is needed for successful proceeding of the following affinity purification.. Sepharose beads with immobilized C² and N⁹ ligands of isopentenyladenine were used for isolation of proteins. Purified proteins were subsequently separated by 1D SDS-PAGE, identified by MS/MS spectrometry and determined by label-free quantification. The last of the mentioned methods was based on comparing of frequency of MS/MS spectra of detected proteins. By this approach, several new potential cytokinin interactors were revealed. Because the identified proteins play a roles in biological processes influenced by cytokinin, these findings could contribute to understanding the mechanisms of physiological effects of these important plant hormones.</p>
Keywords	Cytokinins, isopentenyladenine, extraction of proteins, affinity chromatography, plant proteomic
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením
Mgr. Radima Simerského, Ph.D. s použitím literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 25. 7. 2013

.....

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu bakalářské práce Mgr. Radimu Simerskému, Ph.D. za jeho čas, cenné rady, vstřícný přístup a odborné vedení bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za změřeni vzorků a diskusi výsledků, Mgr. Ivu Chamrádovi za cenné rady a Mgr. Veronice Šubertové za pomoc v laboratoři.

V neposlední řadě také děkuji RNDr. Ondrovi Plíhalovi, Ph.D. za poskytnutý materiál a Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za přípravu ligandů.

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	8
1 Cíle práce.....	10
2 Teoretická část.....	11
2.1 Růstové regulátory.....	11
2.2 Fytohormony.....	12
2.3 Cytokininy.....	12
2.3.1 Historie a charakteristika.....	12
2.3.2 Biosyntéza a transport.....	13
2.3.3 Signalizace a receptory.....	15
2.3.4 Fyziologické účinky.....	17
2.3.5 Degradace.....	19
2.3.6 Interakce s proteiny.....	19
2.4 Vybrané proteomické metody.....	20
2.4.1 Afinitní chromatografie.....	20
2.4.2 Extrakční postupy – proteiny.....	22
2.4.2.1 Nativní extrakce.....	23
2.4.2.2 Extrakce tuhou fází.....	23
2.4.3 Gelová elektroforéza.....	24
2.4.4 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie.....	25
3 Experimentální část.....	28
3.1 Materiál a chemikálie.....	28
3.2 Přístrojové vybavení.....	29
3.3 Metody.....	30
3.3.1 Příprava afinitní matrice s ligandy iP(C ²) a iP(N ⁹).....	30
3.3.2 Charakterizace afinitních gelů.....	31
3.3.3 Nativní extrakce proteinů z protoplastů <i>A. thaliana</i>	32
3.3.4 Purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie.....	33
3.3.5 SDS-PAGE.....	34
3.3.6 Štěpení v gelu.....	34
3.3.7 Odsolení vzorků před hmotnostní analýzou.....	35
3.3.8 Nanokapilární chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.....	36
3.3.9 Zpracování dat.....	37

4	Výsledky a diskuse	39
4.1	Příprava afinitního nosiče	39
4.2	Extrakce proteinů z protoplastů <i>A. thaliana</i>	39
4.3	Purifikace proteinů na afinitním nosiči	40
4.3.1	Vizuální zhodnocení SDS-PAGE	40
4.3.2	Hmotnostní analýza a vyhodnocení izolovaných proteinů	42
4.3.3	Vliv volného iP na interakci proteinů s afinitními ligandy	46
5	Závěr	48
6	Seznam použité literatury	49

Seznam použitých zkratk

ACN – acetonitril

ADP – adenosindifosfát

AHK – arabidopsis histidinkinasa

AHP – histidin transferový protein v *A. thaliana*

ALICE – acid-labile isotope-coded extractans

ARR – regulátor odpovědi v *A. thaliana*

ATP – adenosintrifosfát

CBB - Coomassie brilliant blue

CBP – cytokinin-vazebné proteiny

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamono]-1-propansulfonát

CKX – cytokininoxidasa

DMSO – dimethylsulfoxid

DTT – dithiotreitol

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EI – elektronová ionizace

ESI – ionizace elektrosprejem

EtOH - ethanol

FA – kyselina mravenčí

GORilla – Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool

HK – histidinkinasa

Hpt – histidin transferový protein

ICAT – isotope-coded affinity tag

ICPL – isotope-coded protein label

iP – isopentelynadenin

iP (C²) – C2-(6'-aminohexylamino)isopentenylnadenin

iP (N⁹) – N9-[1'-(2'-aminoethylamino)-1'-butanon]isopentenylnadenin

iPrOH - isopropanol

IPT – izopentenyl transferasa

IT – iontová past

LC – kapalinová chromatografie

MeOH - methanol

Mgf - Mascotgenericfile

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

nLC – nanokapilární chromatografie

PhIAT – phosphoprotein isotope-coded affinity tag

PMSF – fenylmethansulfonyl fluorid

Q - kvadrupól

Q-TOF – hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem
délky letu

SDS – dodecylsírán sodný

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu
sodného

SILAC – stable isotope labeling by amino acids in cell culture

SPE – extrakce tuhou fází

TECEP – tris-(karboxyethyl)-fosfin

TRIS – 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

TOF – průletový analyzátor

1 Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma cytokininy a použité proteomické metody.
- Příprava afinitních nosičů s ligandy isopentenyladeninu.
- Seznámení se standardními metodickými postupy extrakce.
- Purifikace proteinů interagujících s cytokininy z protoplastů *Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh. pomocí afinitní chromatografie.

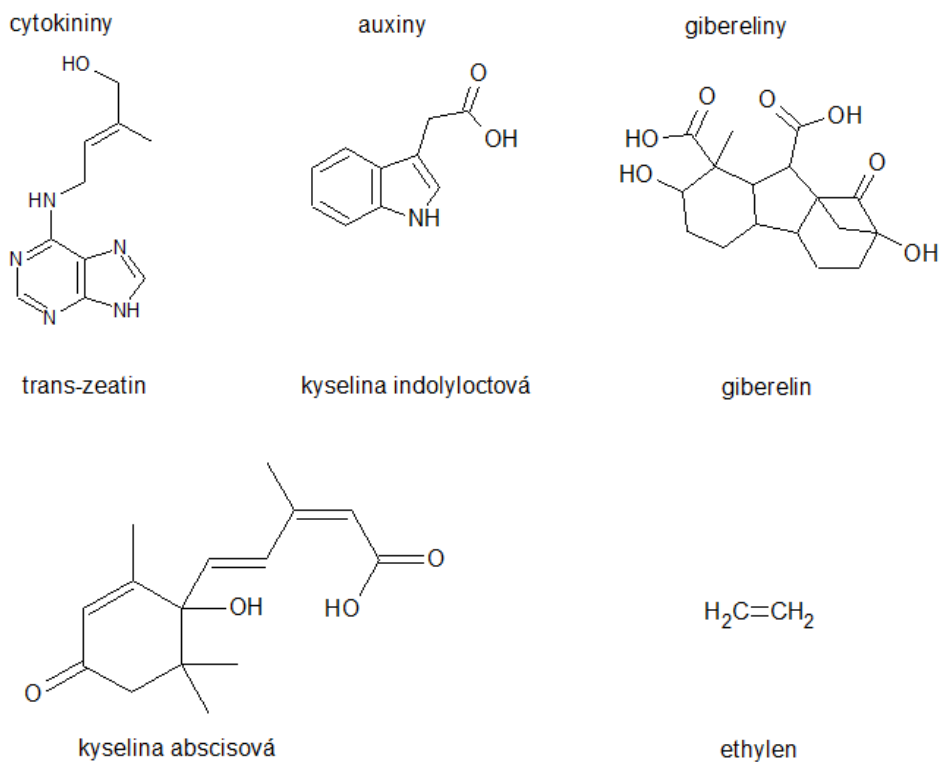
2 Teoretická část

2.1 Růstové regulátory

Vývoj rostliny je řízen vnějšími a vnitřními faktory. Mezi vnější patří např. světlo, přísun živin, délka dne a okolní teplota, mezi vnitřní zase růstové regulátory. Tyto látky slouží k zprostředkování komunikace v rostlině mezi sousedními buňkami nebo vzdálenými orgány.

Na přelomu 19. a 20. století převládal názor, že růst rostlin je převážně ovlivňován nutričními faktory. Již německý botanik Julius von Sachs (1832–1897) předpokládal existenci jakýchsi regulačních látek (morfoгенů), přenášejících chemický signál. Tato hypotéza byla zpracována a potvrzena pracemi brněnského botanika R. Dostála (1885–1973), (Macháčková I, 1998).

Obecný termín růstové regulátory nepostihuje původ látek, který může být syntetický nebo přirozený. Přirozené regulátory lze dále rozdělit do dvou základních skupin a to na rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou. Fytohormony se třídí do pěti skupin (Obr. 1): cytokininy, auxiny, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen. Do skupiny látek s regulační aktivitou patří brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová, oligosacharidy a velká skupina fenolických látek. (Macháčková I, 1998)



Obr. 1 Zástupci základních skupin fytohormonů

2.2 Fytohormony

Fytohormony disponují molekulovou hmotností do 1000 Da, čímž se řadí mezi nízkomolekulární látky. Jak bylo řečeno výše, regulují vývoj rostliny a tím určují celkový habitus rostliny. V rostlině fungují jako endogenní signální molekuly, jejichž efekt může být stimulující a zároveň inhibující v závislosti na koncentraci a místě účinku.

Fytohormony vykazují analogie i odlišnosti se živočišnými hormony. Společnými vlastnostmi jsou nízká účinná koncentrace, která se pohybuje od 10^{-6} do 10^{-9} mol/l (Pavlová L, 2005) a mechanismus účinku (Macháčková I, 1998). Odlišují se místem produkce. Pro tvorbu hormonů se v živočišné říši vyvinuly specializované orgány tzv. endokrinní žlázy. Ty a ani žádné obdobné útvary v rostlině nelze najít. Většina fytohormonů totiž vzniká ve více částech rostliny (Macháčková I, 1998). Dalším rozdílem je specifita. Jeden živočišný hormon z pravidla ovlivňuje pouze jeden proces, oproti tomu konkrétní fytohormon řídí více dějů. Například cytokininy stimulují růst prýtu a zároveň inhibují prodlužování kořenů. Dokonce i jeden fyziologický pochod bývá v rostlině řízen více hormony současně. Podle charakteru vzájemné interakce mohou fytohormony vykazovat jak synergický tak i antagonistický účinek (Macháčková I, 1998).

Regulační látky jsou v rostlinách transportovány různými cestami v závislosti na vzdálenosti. Do vzdálených míst jsou přepravovány floémem a xylémem. Samozřejmě probíhá i mezibuněčný přenos. Jejich transport je přísně regulován. (Luštinec J, Žárský V, 2005; Macháčková I, 1998)

Fytohormony přenáší signál vazbou na receptory lokalizované na cytoplazmatické membráně, v cytoplasmě nebo v jádře (Luštinec J, Žárský V, 2005). Druh přenášené informace a následnou odpověď určuje chemická struktura látky a typ receptoru, na nějž se molekula váže. Receptory jsou proteiny nebo jejich komplexy, které se vyznačují vysokou afinitou a specificitou k ligandu. Ten je po vazbě na receptor aktivuje a spouští kaskádu reakcí, jež vedou k odpovědi, např. transkripci genů (Luštinec J, Žárský V, 2005).

2.3 Cytokininy

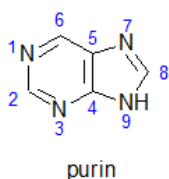
2.3.1 Historie a charakteristika

O objevení prvního zástupce cytokininů, kinetinu, se zasloužila laboratoř F. Skooga v 50. letech 20. století v USA (Macháčková I, 1998; Luštinec J, Žárský V, 2005). Poprvé byl izolován jako degradační produkt z autoklávované DNA sledího spermatu týmem C. O. Millera (Miller CO et al., 1955). V rostlinách se přirozeně nevyskytuje. První endogenní

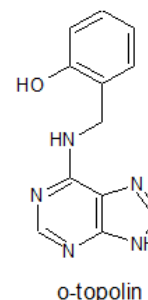
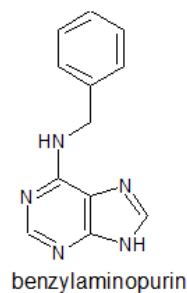
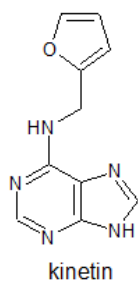
cytokinin, zeatin, byl nalezen skupinou D. S. Lethama v nezralém endospermu kukuřice (Letham DS, 1973).

Cytokininy jsou po chemické stránce N⁶-deriváty adeninu. Dělí se do dvou skupin podle charakteru postranního řetězce na aromatické a izoprenoidní (Obr. 2). Mezi aromatické patří benzyladenin, kinetin a topoliny, mezi izoprenoidní trans a cis zeatin, isopentenylaminoadenin a dihydrozeatin.

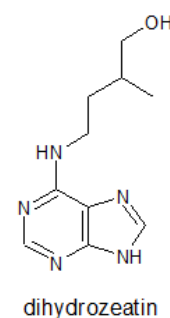
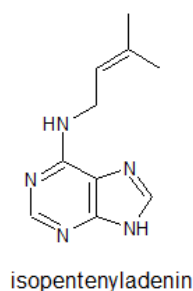
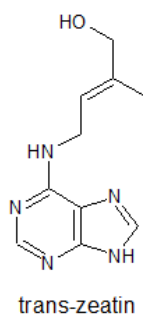
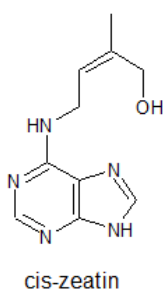
A) číslování purinu



B) aromatické cytokininy



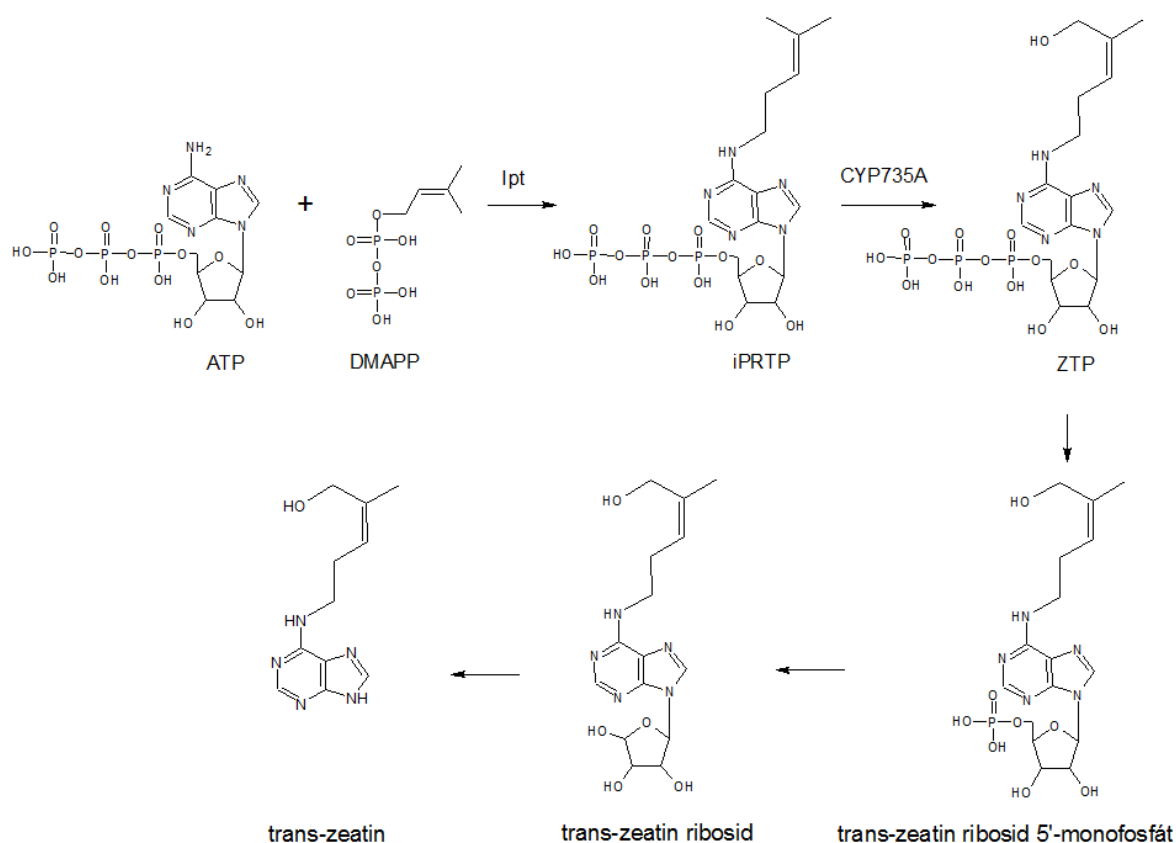
C) isoprenoidní cytokininy



Obr. 2 Strukturální vzorce purinu, aromatických a isoprenoidních cytokininů.

2.3.2 Biosyntéza a transport

Biosyntéza cytokininů (Obr. 3) probíhá na více místech v rostlině, především v mladých pletivech, kořenovém meristému a nových listech, konkrétně v plastidech (Macháčková I, 1998; Pavlová L, 2005; Taiz L, Zeiger E, 2010). Počáteční krok zprostředkovává isopentenyl transferasa (IPT), což je enzym, který připojuje izoprenoidní jednotku dimethylalyl difosfátu na ATP či ADP. Produkt je následně převeden cytochromem P450 monooxygenasou na ribosid. Cytokininy vznikají v konjugované formě v podobě nukleotidů.



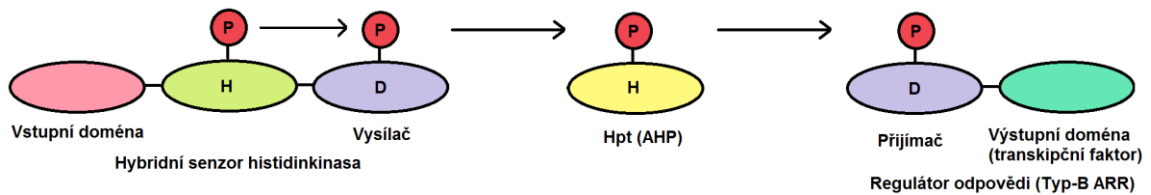
Obr. 3 Syntéza cytokininů v rostlině. První krok je reakce ATP s isoptenyl difosfátem katalyzovaná IPT za vzniku isoptenylribosidtrifosfátu (iPRTP). Ten je dále přeměněn cytochromem P450 monoxygenasou na zeatin trifosfát (ZTP). Formy trans-zeatinu se mohou vzájemně přeměňovat. Nekonjugovaný zeatin je produkován z ribosidu enzymy purinového metabolismu. Do reakce může také vstupovat ADP. (převzato z Taiz L, Zeiger E, 2010).

Cytokininů se vyskytují v rostlině ve dvou formách, volné a konjugované. Vázaná forma neprojevuje žádnou nebo velmi nízkou cytokininovou aktivitu (Macháčková I, 1998). V rostlinách vznikají tyto typy konjugátů: ribosidy, ribotidy, glukosidy nebo konjugáty s alaninem (Macháčková I, 1998; Pavlová L, 2005). Na adeninovém skeletu se může na dusík v poloze 3, 7 a 9 navázat sacharid. Konjugace cytokininů s glukózou v pozici 7 a 9 je nevratná a inaktivující. Tyto sloučeniny se nazývají N-glukosidy. Dále se vyskytují i O-glukosidy, na kterých je připojen cukerný zbytek přes hydroxylovou skupinu v postranním řetězci. Tato vazba může být zpětně štěpena za pomoci enzymu glukosidasy. Konjugovaná forma slouží k přepravě cytokininů v rostlině a jako zdroj aktivních forem. Transport z kořenů do nadzemní části, zejména do listů, je zprostředkován xylémem. Tam přecházejí do floému a následně do cílových orgánů. Aby byla obnovena biologická aktivita, je nutné odštěpit navázaný sacharid. (Macháčková I, 1998; Pavlová L, 2005; Taiz L, Zeiger)

2.3.3 Signalizace a receptory

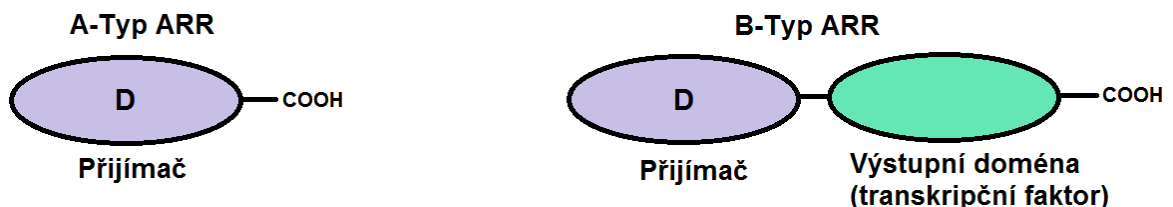
V místě účinku se cytokininy vážou na specifické receptory. Cytokininový receptor se skládá z CHASE (Cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular) vazebné domény na extracelulární straně, na kterou navazuje hydrofobní oblast kotvící protein v membráně (jedná se pouze o membránové receptory) a intracelulární doména v podobě histidinkinasy (HK).

Fosforylativní dvousložkový signální systém

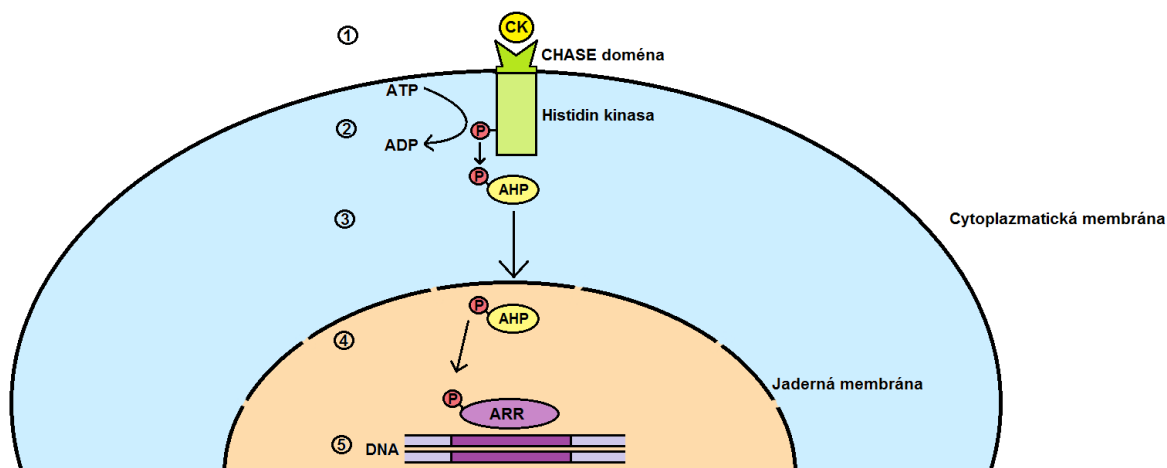


Obr. 4 Dvousložkový signální systém. Systém je složen ze senzoru receptoru histidinkinasy obsahující vstupní doménu, která detekuje signál a reguluje aktivitu HK. Další část je HK a vysílač, z něhož je přenesena fosfátová skupina na Hpt/(AHP). Hpt zprostředkovává přenos fosfátové skupiny ze senzoru na regulátor odpovědi. Ten se skládá z přijímače, na který navazuje výstupní doména, která funguje jako transkripční faktor. (vytvořeno podle Taiz L, Zeiger E, 2010)

Složky receptoru (Obr. 4) zprostředkovávají přenos fosfátové skupiny na histidin fosfotransferový protein (Hpt), který má v rostlině *A. thaliana* zkratku AHP. Tento protein přenáší fosfátovou skupinu do jádra na regulátor odpovědi (ARR – Arabidopsis response regulator) a tím ho aktivuje. Doposud byly objeveny v *A. thaliana* pouze dva typy, A a B ARR (Obr. 5). Typ-B AAR je složen z přijímače a výstupní domény, která působí po aktivaci jako transkripční faktor genu pro ARR typu-A. Ten je tvořen výhradně jen přijímací doménou a interaguje s efektoru odpovědi stimulované cytokininy (Obr. 6). Fosforylovaný typ-A ARR působí jako inhibitor cytokininového signálu ve spolupráci se zatím neznámými komponenty. Jedná se o negativní zpětnou vazbu. (Taiz L, Zeiger E, 2010; To JP et al.2004)



Obr. 5 Porovnání regulátorů odpovědi typu A a B AAR. Typ A se skládá pouze z aspartát (D) přijímací domény. Typ B obsahuje také (D) přijímací doménu, která je ale spojená s výstupní doménou stimulující transkripci typ-A ARR. (vytvořeno podle Taiz L, Zeiger E, 2010)

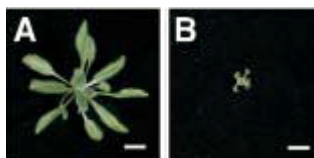


Obr. 6 Model cytokininové signalizace, který je založen na studiu v *A. thaliana*. Mechanismus je podobný i v ostatních vyšších rostlinách.

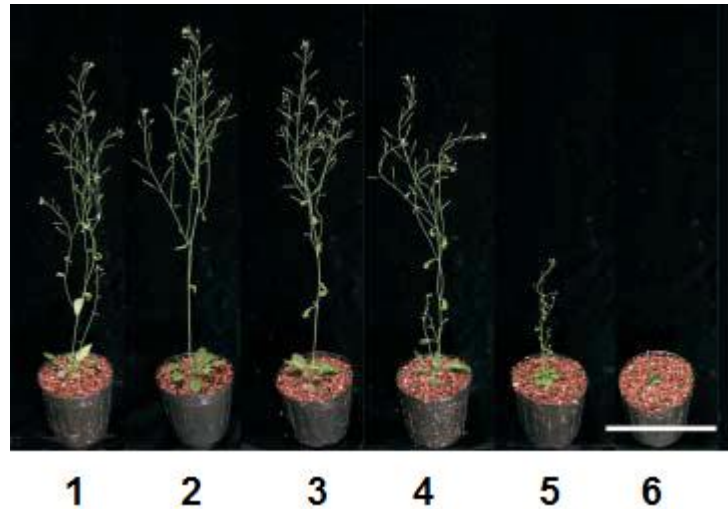
1. Cytokiny se vážou na CRE1/AHK4 nebo dalších dvou kinase senzorů AHK2 a AHK3 do extracelulární oblasti zvané CHASE doména.
2. Cytokinin vazbou na receptor aktivuje funkci HK, která přenesse fosfát z ATP na svoji vysílací doménu.
3. Následně je fosfátová skupina přenesena na histidin obsažený v AHP. Protein AHP s navázaným fosfátem se přesouvá do jádra
4. V jádře je fosfátová skupina transportována z AHP na aspartát lokalizovaný na přijímači ARR.
5. Fosforylovaný ARR indukuje transkripci genů, nebo interaguje s různými efekty zprostředkovávající změny buněčných funkcí odpovídající na cytokiny.

(zjednodušeno podle Taiz L, Zeiger E, 2010)

Doposud byly objeveny tyto cytokininové receptory: CRE1/AHK4, AHK2 a AHK3. Jednotlivé typy receptorů vážou různé druhy cytokininů s odlišnou afinitou, což vede k tvorbě rozličných signálů. Proto hrají receptory v rostlině různou funkci. Tato vlastnost byla dokázána na mutantních rostlinách *A. thaliana* s inaktivovanými geny pro jednotlivé receptory. Byly použity rostliny s mutací ve dvou a třech genech současně (Obr 7 a 8). (Higuchi M et al., 2004; Nishimura C et al., 2004)



Obr. 7 Porovnání listových růžic rostliny *A. thaliana* starých tři týdny. (A) Původní fenotyp, (B) triple mutant v genech *ahk2*, *3*, *cre1/ahk4*. Délka měřítka je 1 cm. (z Nishimura C et al., 2004.)



Obr. 8 Porovnání fenotypu mutantních rostlin *A. thaliana* s vyřazenými dvěma nebo třemi geny pro receptory ahk2, 3 a cre1 oproti přirozenému fenotypu. **1** – přirozený fenotyp ekotypu Columbia; **2** – přirozený fenotyp ekotypu WS; **3** – ahk2, cre1; **4** – ahk3, cre1; **5** – ahk2, ahk3; **6** – ahk2, ahk3, cre1. Mutanti se od přirozeného fenotypu výrazně liší svým vzhledem i vzrůstem. Délka měřítka je 10 cm. (z Nishimura C et al., 2004.)

2.3.4 Fyziologické účinky

Cytokininy jsou známy zejména jako regulátory buněčného dělení. Jejich zvýšenou koncentraci lze detekovat v mladých pletivech, meristémech. Ovlivňují buněčný cyklus aktivací kináz. Proliferační účinek je závislý i na přítomnosti auxinů. (Macháčková I, 1998; Taiz L, Zeiger E, 2010)

Cytokininy mají však i další funkce. Mezi ně patří oddálení senescence, řízení distribuce živin, inhibice apikální dominance a podpora růstu postranních pupenů, diferenciace kořenového meristému a proliferace apikálního meristému.

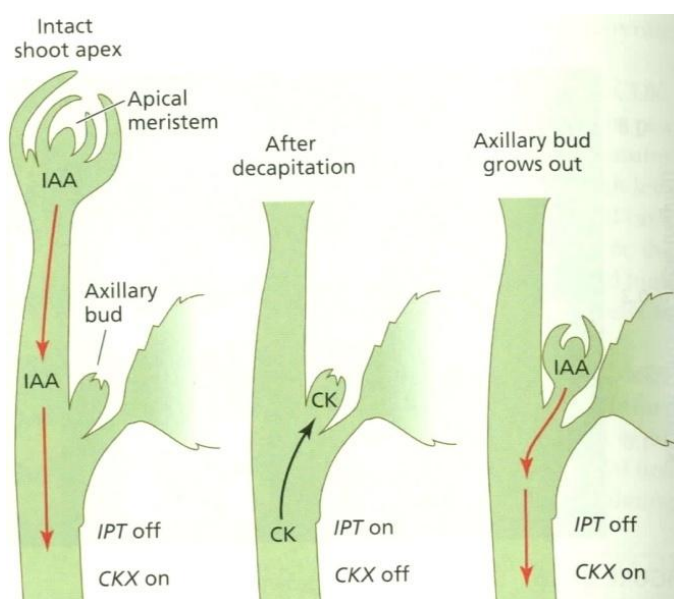
Senescence neboli stárnutí je nezvratný životní proces. Svou roli zde hrají cytokininy, které tento proces zpomalují tím, že brání rozpadu chlorofylu a nukleových kyselin (Taiz L, Zeiger E, 2010).

Jelikož cytokininy podporují buněčné dělení, je důležitá i jejich další funkce - distribuce živin v rostlině. Dělicí se buňky potřebují výživu, aby mohly proliferovat. Cytokininy způsobují transport živin floémem do míst s vysokou koncentrací těchto hormonů, protože udržují metabolickou aktivitu těchto pletiv (Macháčková I, 1998). Zpravidla to bývá z kořenů do listů. Asimiláty jsou transportovány z místa zdroje nebo jejich produkce (source) do místa využití (sink). Cytokinin-indukovaná mobilizace živin byla dokázána pokusem se značenou aminokyselinou izotopem uhlíku ^{14}C (Mothes K, Engelbracht L, 1961).

Cytokiny dále regulují procesy v součinnosti s jinými fytohormony především auxiny. Takovýmto případem je např. regulace růstu apikálních meristémů nebo apikální dominance.

Celkový habitus rostliny je ovlivněn fytohormony, které se tvoří na základě množství přijímaných živin. Dostatek živných látek ovlivňuje produkci cytokininů a v závislosti na tom i jejich poměr k auxinům v rostlině. Převaha daného fytohormonu poté určuje její vývoj. Je-li živin nedostatek, koncentrace auxinů převyší hladinu cytokininů a rostlina tvoří kořeny, aby zajistila přísun látek. Zvýšená koncentrace cytokininů indukuje růst nadzemní části.

Další kooperaci fytohormonů lze najít při růstu postranních pupenů, kdy cytokiny a auxiny působí antagonisticky (Obr. 9). Tvorba pupenů závisí na typu rostliny. Například kukuřice vykazuje silnou apikální dominanci na rozdíl od křovin, jejichž koruna je rozvětvená. Je to způsobeno auxiny, které jsou transportovány z apikálního pupenu směrem ke kořenům a potlačují růst postranních pupenů. Auxiny inhibují syntézu IPT a tak inhibují produkci cytokininů. Auxiny dále podporují tvorbu cytokinin oxidasy (CKX), jež svůj substrát degraduje. Jelikož tyto děje působí současně, auxiny udržují v postranním pupenu nízkou koncentraci cytokininů. Při odstranění vrcholového pupenu se sníží proud auxinů a v důsledku se zastavuje syntéza CKX a začne se tvořit IPT. Následně zvýšená koncentrace cytokininů působí na přilehlý pupen, který začne růst, obnoví se i proud auxinů čímž opět dojde k inhibici produkce cytokininů. (Taiz L, Zeiger E, 2010)



Obr. 9 Ukázka kooperace cytokininů a auxinů při řízení větvení stonku. Na obrázku jsou zobrazeny i enzymy, které regulují tento děj prostřednictvím syntézy, nebo degradace cytokininů. (IAA – indolyl-3-octová kyselina, CK – cytokinin). (převzato z Taiz L, Zeiger E, 2010, podle Schimizu-Sato S et al., 2008)

Dalším příkladem spolupůsobení fytohormonů je podpora kvetení, kterého se účastní cytokininy spolu s gibereliny.

2.3.5 Degradace

Koncentrace cytokininů je v různých částech rostliny odlišná, což je způsobeno především rozdíly v distribuci a degradaci. Produkce cytokininů se mění také v závislosti na fázi vývoje rostliny. Hlavní cytokinin-degradující enzym je CKX. Její funkce spočívá v odstranění postranního řetězce cytokininu na C⁶ uhlíku. Vzniká tak adenin a volný řetězec. Samotná purinová báze nemá již cytokininovou aktivitu, ale může být využita v dalších metabolických drahách jako je syntéza nukleových kyselin. CKX ale není schopná oxidovat všechny typy cytokininů, zejména O-glukosidy, cytokininy s nasyceným a aromatickým postranním řetězcem. Ty podléhají dalšímu způsobu inaktivace již zmíněné N-glykosilaci v poloze 7 a 9. Regulace hladiny cytokininů probíhá bezprostředně po jejich syntéze, nebo v místě jejich účinku. (Taiz L, Zeiger E, 2010; Macháčková I, 1998)

2.3.6 Interakce cytokininů s proteiny

Jelikož jsou cytokininy signální molekuly, interagují s proteiny nebo jejich komplexy. Příkladem mohou být výše zmíněné receptory nebo cytokinin-vazebné proteiny (CBP).

První CBP byly objeveny v zrnech pšenice J. Erionem a J. E. Foxem v roce 1975 (Kamínek M et al., 2003). Původně se předpokládalo, že se jedná o cytokininový receptor, který se nachází v listech, hypokotylu, dělohách, embryu, kalusu, buněčné suspenzi a mitochondriích napříč různými druhy jak jsou kukuřice, ječmen, pšenice, oves, tabák, fazole, okurka a mrkev (Brault M et al., 1999; Brault M, Maldiney R, 1999; Brinegar 1994). Tato teorie byla vyvrácena při objevu funkce CRE1 genu a fosforylativní kaskády.

CBP z pšeničných zrn (CBF-1) je složený ze tří stejných podjednotek o velikosti 54 kDa a je schopný vázat molekulu cytokininu (Brinegar AC, Fox JE, 1985). Dalšími vlastnostmi CBF-1 jsou vysoká koncentrace v embryu (Brinegar AC et al., 1985) a nízká afinita k isoprenoidním cytokininům oproti cytokininům s aromatickým postranním řetězcem (Keim et al., 1981).

Funkcí CBP je pravděpodobně regulace volných aromatických cytokininů, ochrana nezralých buněk před dělením. Tímto způsobem může ovlivňovat vývoj rostlin. (Kamínek M et al., 2003)

Předpokládá se, že cytokininy interagují i s dalšími proteiny. Charakter těchto interakcí a jejich význam pro fyziologické pochody v rostlině však nebyl dosud přesně objasněn.

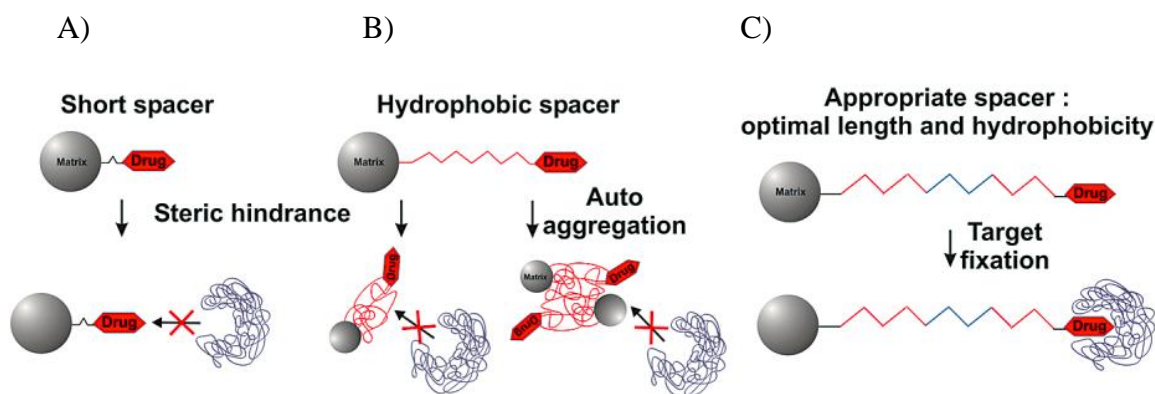
2.4 Vybrané proteomické metody

2.4.1 Afinity chromatografie

Afinity chromatografie je separační metoda sloužící k izolaci biomakromolekul, např. proteinů, enzymů nebo nukleových kyselin z komplexní směsi. Princip spočívá v nekovalentní, ale specifické interakci analytu s imobilizovaným ligandem. Jako ligand může sloužit nízkomolekulární sloučenina představující substrát, kofaktor či inhibitor funkčních makromolekul přítomných ve vzorku. (Guiffant D et al., 2007).

Jako matrice slouží většinou komerčně vyráběné preaktivované gely např. kuličky agarosy, sepharosy, a další. Ligand je vázán na kuličky gelu kovalentní vazbou prostřednictvím spojovacího raménka (tzv. spaceru nebo linkeru).

Vlastnosti spojovacího raménka jsou důležité pro funkčnost celé procedury. Především jde o délku a hydrofobní/filní povahu spaceru (Obr. 10). Pokud je raménko příliš krátké, nemůže se ze sterických důvodů ligand navázat do specifického vazebného místa separované makromolekuly (proteinu). Problémem může být také hydrofobní charakter spaceru. V takovém případě může dojít k samovolnému shlukování raménka, čímž je opět znemožněna vazba ligandu do specifického místa zkoumané látky. Ideální spacer je tedy optimálně dlouhý a obsahuje hydrofilní skupinu (Guiffant D et al., 2007).



Obr. 10 Základní úskalí spaceru. Ve variantě A je spacer příliš krátký a vzniká překážka, která brání navázání analytu. B znázorňuje samovolnému shlukování hydrofobního spaceru. Část C ukazuje ideální spacer, kdy je jeho délka optimální. Červená barva indikuje hydrofobní a modrá hydrofilní úsek. (převzato z Guiffant D et al., 2007).

Dalším kritickým krokem je derivatizace, při které je nutné zachovat biologickou aktivitu ligandu. Spacer nesmí ovlivnit přirozenou interakci mezi analytem a ligandem. Existují dva přístupy jak tento problém vyřešit.

Prvním je ko-krystalizace volného ligandu s cílovým analytem (proteinem). Ze zjištěné 3D struktury biomakromolekuly jsme schopni určit orientaci ligandu ve vazebném místě a predikovat tak vhodnou polohu navázání spaceru. Druhou možností je vytvořit několik různých derivátů ligandu a následně zjistit, zda nebyla narušena jejich aktivita, např. receptorovým testem. (Guiffant D et al., 2007).

Receptorový test spočívá v použití buněčné kultury s vneseným genem pro zkoumaný receptor, kdy po vazbě derivátu ligandu na tento receptor dojde k iniciaci syntézy reportérového genu.

Nejčastější používané spacery jsou polyethylenglykol, ethylenglykol diglycidylether, aminocaproylaminopentyloxy (Daub H, 2005). V této práci byly použity aminoalkyly konkrétně aminobutyl a aminohexyl.

S připraveným afinitním gelem je pak inkubována komplexní směs látek, v našem případě proteinů. Vzhledem k tomu, že dochází k vazbě ligandu do aktivního místa, musí být proteiny získány v nativní formě. Zbytek neinteragujících balastních látek je promyt pufrý s různým obsahem soli. Následuje vymytí analytu elučním činidlem např. kyselinou mravenčí (FA), která rozruší nativní strukturu makromolekuly. Následuje rozdělení pomocí elektroforézy, štěpení proteinů na peptidy a analytická koncovka, většinou v podobě LC-MS/MS. Díky této koncovce můžeme identifikovat analyt, který specificky interagoval s definovaným ligandem.

Hlavní výhodou této metody je možnost objevení specifické interakce biomakromolekul především proteinů a enzymů s ligandem. Ze směsi látek můžeme izolovat proteiny a enzymy na základě cílených reakcí. Nevýhodou může být snížení afinity ligandu po jeho imobilizaci.

Tato metoda je mimo jiné využívána v hledání nových léčiv. Příkladem může být imobilizace roskovitinu jako inhibitoru kinasy, enzymu katalyzujícího fosforylaci proteinů, který hraje významnou úlohu při přechodu mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu (Daub H, 2005).

2.4.2 Extrakční postupy – proteiny

Příprava vzorku je nejdůležitější a zároveň nejkritičtější krok pro získání kvalitních výsledků (Wang W et al., 2006). Extrakce (z latiny *ex* – z, *traho* - táhnout) je sled úkonů, při kterém dojde k izolaci žádaných látek z matrice v závislosti na zvolené metodě a použitých extrakčních činidlech. Extrakci charakterizuje Fickův difúzní zákon:

$$dc/dt = - (DA/h) \cdot (c_0 - c)$$

Kdy dc/dt je rychlost difúze, D je koeficient difúze závislý na teplotě a poloměru difundujících částic, A zastupuje styčný povrch, h představuje difúzní vrstvu a $(c_0 - c)$ je koncentrační spád.

Z Fickova difúzního zákona je zřejmé, že extrakce závisí na hmotnostním poměru materiálu a extrakčního činidla a velikosti částic materiálu. Pro homogenizaci lze využít vibrační kulový mlýnek, nebo rotační břitový mlýnek. S oblibou se používá i drcení materiálu zalitého tekutým dusíkem ve třecí misce. Tento způsob homogenizace je dostatečně efektivní a využitelný pro většinu účelů. Vlivem nízké teploty dusíku (-196 °C) praskají buněčné stěny a cytoplazmatické membrány. Zmrzlý materiál lze jednoduše rozdrtit tloučkem na jemný prach. Od tohoto kroku je důležité udržovat nízkou teplotu vzorku, aby nedocházelo k degradaci analytu. V praxi se využívá ledová lázeň.

Charakter extrakčního činidla je volen podle toho, jaký analyt chceme z biologického materiálu získat. Lze zde využít staré alchymické poučky: „*similia similibus solvuntur*“ To znamená, že nepolární látky jako jsou karotenoidy, se budou rozpouštět v nepolárních rozpouštědlech, (např. hexanu) a naopak polární látky se budou rozpouštět v polárních činidlech. Pro extrakci lze zvolit různá organická činidla např. metanol (MeOH), ethanol (EtOH), aceton anebo jejich směsi, např. Bielekého fáze (60% MeOH, 25% chloroform, 10% FA a 5% voda).

Dále se využívají extrakční pufrы o různém složení. Jejich výhodou je, že si můžeme zvolit pufr, jehož vlastnosti přesně odpovídají našim účelům, (např. pH, přítomnost či nepřítomnost látek ovlivňující analyt). Nevýhodou je složitější příprava.

Ke zvýšení účinnosti extrakce proteinů se do pufru přidávají látky, které je pomáhají rozpustit. Patří mezi ně chaotropní látky (močovina, thiomočovina) rušící nekovalentní vazby v makromolekule. Detergenty, které se dělí na neionizující (Triton X-100, Triton X-114, atd.) a ionizující (CHAPS, SDS, deoxycholát sodný a další). Některé tyto látky mohou mít na proteiny denaturační vliv, (např. SDS). Dále to mohou být

redukční činidla (DTT, TCEP, merkaptoethanol), která redukují disulfidické můstky a tím podporují rozpad domén. Výše zmíněné látky se používají v různých kombinacích, aby bylo dosaženo co nejlepšího účinku extrakčního pufru. (Méchin V et al., 2007)

2.4.2.1 Nativní extrakce

Nativní extrakce je metoda, při které dochází k izolaci analytu laicky řečeno v původním stavu. U proteinů by tedy měla zůstat nezměněná jejich prostorová konformace. Aby tato vlastnost proteinů byla zachována, nesmí extrakční pufr obsahovat denaturující detergenty, chaotropní činidla a jiné látky narušující terciární uskupení bílkoviny. Jelikož se zachovanou strukturou se udržuje i enzymová aktivita, je nutné po celou dobu extrakce pracovat na ledu. Nízká teplota potlačuje činnost proteas (enzymů štěpících proteiny), které by způsobovaly degradaci analytu v průběhu zpracování vzorku a při jeho uskladnění. Do extrakčního pufru se také přidávají inhibitory těchto enzymů. Při tomto postupu je zachována přirozená afinita proteinů ke specifickým ligandům, což je nezbytné pro jejich další purifikaci pomocí afinitní chromatografie. (Rigaut et al., 1999)

2.4.2.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází – solid phase extraction (SPE) je metoda, která se používá pro oddělení látek rozpuštěných v kapalině na základě chemických a fyzikálních vlastností. Proces probíhá v plastové koloně naplněné pevným sorbentem. Ten se může skládat z rozličných materiálů. Základem je pevná matrice (např. silikagel), na které je navázána látka, jež rozdělí komponenty vzorku. Jako náplň mohou sloužit nepolární uhlovodíkové řetězce většinou o 8 nebo 18 uhlících. Tato fáze se nazývá reverzní a dělí vzorek na základě hydrofobicity. Jiným dělicím kritériem může být rozdílný náboj molekuly analytu a sorbentu. Stacionární fázi se nazývá iontoměnič a tu dělíme na anexy nebo katexy podle toho, jaké ionty zadržují (katexy zadržují kationty). SPE metoda má čtyři hlavní kroky: Aktivace sorbentu, dávkování vzorku, promývání a eluce analytu. Výhodami tohoto postupu jsou jednoduché provedení, zakoncentrování, snadné skladování, práce s malými objemy, atd. Díky této metodě, jde ze vzorku vymýt látky, které ovlivňují stanovení analytu. Při extrakci proteinů se především jedná o nukleové kyseliny, lipidy, polysacharidy a fenolické sloučeniny nebo soli z použitého pufru. Tyto látky interferují při elektroforéze tím, že rozmazávají bandy nebo znemožňují detekci instrumentální metodou. (Klouda, 2004)

2.4.3 Gelová elektroforéza

Elektroforéza byla prvně využita Arnem Tiselusem v roce 1937 k separaci proteinů krevního séra na základě jejich pohybu v elektrickém poli. Od té doby vzniklo mnoho modifikací této metody.

Jedná se tedy o elektromigrační separační metodu, při které dochází k rozdělení nabitých makromolekul konkrétně nukleových kyselin a proteinů v důsledku působení elektrického pole. Makromolekuly se rozdělují v nosiči (gelu) na základě velikosti náboje a velikosti molekuly do tzv. bandů, což je ostrá oblast makromolekuly o stejné molekulové hmotnosti a náboji. Současně se vzorky se rozdělují i marker, což je směs proteinů o definované molekulové hmotnosti, které slouží jako měřítko.

Dnes se využívá plošné uspořádání gelové elektroforézy. Plošný nosič je umístěn mezi dvě elektrody, mezi kterými probíhá stejnosměrný proud. Jako nosič může sloužit polyakrylamidový gel pro proteiny a agarózový gel pro nukleové kyseliny. Tyto nosiče musí být stabilní a inertní. Hlavní charakteristikou gelu je velikost pórů. Tu můžeme ovlivnit koncentrací polymerační látky a mírou jejího zesíťování. (Pingoud A et al., 2002)

Dále se budu věnovat jen elektroforéze proteinů v polyakrylamidovém gelu označované jako PAGE. Mezi nejznámější varianty patří SDS-PAGE, nativní kapilární gelová a 2-D elektroforéza.

SDS-PAGE je metoda, kde se využívá vlastností dodecylsírany sodného (SDS). Tato látka proteiny denaturuje a současně na jejich povrchu vytvoří obal o jednotném negativním náboji. Tím pádem se proteiny rozdělují jen a pouze na základě molekulové hmotnosti. Tato metoda se hojně používá jako předseparační metoda pro hmotnostní analýzu. (Pingoud A et al., 2002)

Nativní elektroforéza probíhá bez přídavků denaturačních činidel. Proteiny se tedy rozdělují na základě molekulové hmotnosti, náboje a schopnosti prostupovat gelem, která je určena tvarem makromolekul. Metoda se využívá k separaci proteinů, u kterých potřebujeme zachovat katalytickou aktivitu, nebo k separaci proteinových komplexů.

Kapilární gelová elektroforéza probíhá v úzké kapiláře naplněné gelem. Tato procedura je citlivější než klasická elektroforéza. Využívá se pro separaci malých proteinů nebo jejich fragmentů většinou před kapalinovou chromatografií (LC).

2-D elektroforéza se skládá z dvou základních kroků. Nejprve se proteiny rozdělí v pH gradientovém gelu podle jejich izoelektrických bodů. Proteiny v gelu přejdou do takové oblasti pH, kde jejich povrchový náboj je nulový. To je první rozměr elektroforézy. Další „dimenzí“ je samotná separace pomocí SDS-PAGE. Tento směr dělení

je kolmý na směr předcházející. U této metody se předpokládá, že jedna skvrna představuje jeden typ proteinu. Tento proces se využívá k maximálnímu rozdělení směsi i analýze vzorku, kdy se porovnávají jednotlivé gely mezi sebou. (Pingoud A et al., 2002; Weiss W, Görg A, 2007)

Po proběhnutí separace je nutné proteiny v gelu detekovat. V praxi se využívají dva způsoby barvení. První je zobrazení proteinů pomocí stříbra. Tento postup je velice citlivý, ale bohužel není kompatibilní s instrumentální hmotnostní analýzou. Pro tyto účely se využívá barvení pomocí Commassie brilliant blue (CBB). Metoda je méně citlivá, zato umožňuje výše zmíněnou instrumentální analytickou koncovku. (Pingoud A et al., 2002)

2.4.4 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

LC a hmotnostní spektrometrie (MS) jsou sofistikované instrumentální analytické metody poskytující množství přesných informací o vzorku a jeho složení. LC ve spojení s MS je jednou z nejpoužívanějších analytických metod ve většině vědeckých odvětví a proteomika není výjimkou. Stalo se tak díky vysoké citlivosti, přesnosti a snadné interpretaci získaných dat (Yates JR, III, 2011).

Princip LC spočívá v rozdělení vzorku na koloně naplněnou stacionární fází (např. C8, C18). Ta je promývána mobilní fází (složené z polárních organických látek), která unáší analyt. K frakcionaci dochází na základě vzájemného působení stacionární a mobilní fáze na analyt. Charakter interakce závisí na vlastnostech použitých fází, v zásadě obdobných jako u SPE. Na konci kolony vytékají jednotlivé složky vzorku odděleně a vchází do detektoru (např. hmotnostního spektrometru). Výstupem kapalinového chromatografu je chromatogram, ve kterém je zaznamenána intenzita signálu analytu v závislosti na času eluce.

V hmotnostním spektrometru dochází k převedení analytu do plynné fáze a jeho ionizaci pomocí iontového zdroje. Ionizační techniky se dělí na tvrdé (např. EI), při nichž dochází k výrazné fragmentaci stanovovaných látek, a měkké (např. ESI), jež jsou šetrné.

Ionty jsou dále vedeny do hmotnostního analyzátoru. V této části působí na nabitý analyt elektromagnetické pole, jehož působením jsou ionty rozděleny podle poměru m/z , kdy m představuje molekulovou hmotnost a z počet elementárních nábojů. Elektromagnetické pole ovlivňuje nejvíce částice s nejmenším poměrem m/z . Celý proces probíhá ve vakuu, aby nedocházelo k nekontrolovaným fragmentacím analytu při srážkách s molekulami plynu.

V současnosti se používají tyto analyzátory: kvadrupól (Q), iontová past (IT), průletový analyzátor (TOF), které mohou být různě kombinovány. Při zapojení dvou analyzátorů hovoříme o tzv. tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS). V našem případě bylo použito spojení Q-TOF. Q je složen ze čtyř tyčí, na které je vloženo střídavé a stejnosměrné napětí a mezi kterými oscilují analyzované ionty. Rozdělení dochází na základě stability oscilace. Při určitém poměru U/V (U – napětí, V - amplituda) jsou oscilace stabilní jen pro iont s určitým podílem m/z , ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Dále v TOF analyzátoru jsou ionty urychleny napěťovým pulsem do letové trubice. Zde dochází k dalšímu rozdělení dle rychlosti na základě poměru m/z , při čemž částice s malým poměrem se pohybují rychleji.

Ionty následně dopadají na detektor, jehož výstupem je spektrum ukazující závislost intenzity signálu úměrné množství dopadajících iontů na poměru m/z . Každé spektrum je pro danou látku specifické, což napomáhá k identifikaci látek.

Metodu lze mimo jiné využít ke kvantifikaci proteinů ve vzorku, ať už absolutní nebo relativní. Při kvantitativním stanovení jsou využity izotopicky značené standardy nebo homology analytu. Pro relativní kvantifikaci, určení poměru analytu ve dvou vzorcích, se využívají různé přístupy, např. metabolické izotopové značení, enzymatické značení, chemické značení nebo v našem případě tzv. label-free kvantifikace.

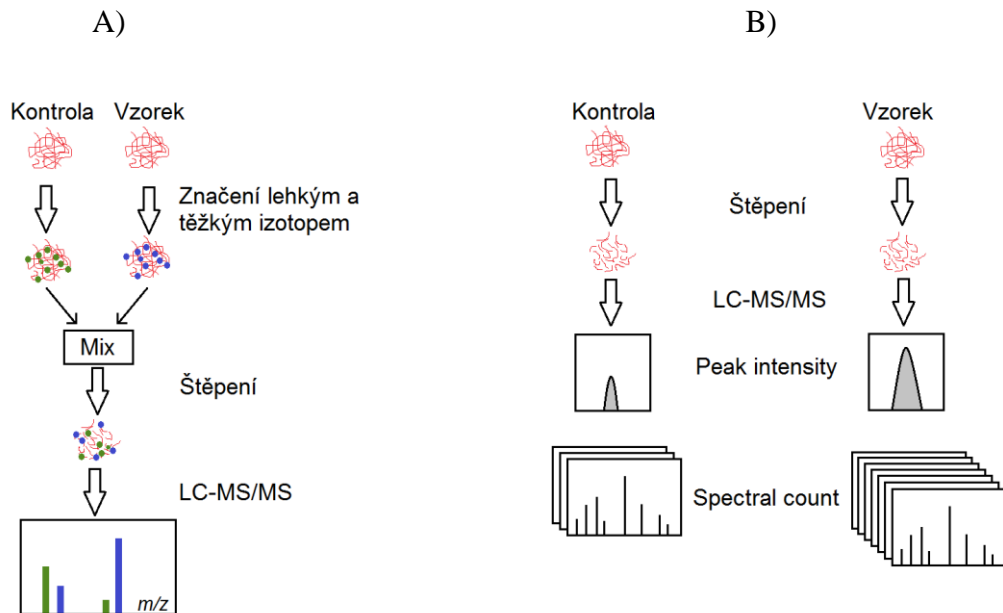
Na principu *in vivo* metabolického izotopového značení (Obr. 11) je založena např. metoda SILAC, která spočívá v pěstování biologického materiálu na dvou různých médiích. Jeden vzorek roste na standardním médiu a druhý na médiu obsahujícím izotopické ionty (např. ^{15}N), které jsou inkorporovány do proteinů. Před extrakcí proteinů dochází ke spojení kultur a vzorky jsou analyzovány společně.

Enzymatické *in vitro* značení spočívá inkorporaci izotopu ^{18}O během štěpení proteasou. I zde se vzorky před analýzou spojují v jeden.

Chemické značení, (např. ICAT, PhIAT, ICPL, ALICE), je také relativní *in vitro* kvantifikace, při kterém dochází k navázání speciální reagentie obsahující izotop/y prvků na reaktivní skupiny aminokyselin (např. -SH, -NH₂, C nebo N konec). Směs značených proteinů musí být následně přečištěna od proteinů neznačených. Limitujícím faktorem této metody je mimo jiné množství volných skupin v proteinech. (Westermeier et al., 2008)

Účelem label-free kvantifikace (Obr. 11) je stanovení množství proteinů bez použití značení. Z toho vyplývá, že se vzorky analyzují odděleně. Kvantifikace proteinů touto metodou je založena na dvou přístupech měření. Při prvním se rozdíl v koncentraci analytu stanovují na základě změny iontové intenzity, tedy výšky nebo plochy píku peptidu

ve srovnávaných vzorcích (Zhu W et al., 2010). Druhý přístup je založen na porovnání součtů identifikovaných MS/MS spekter pro daný protein v každém ze vzorků (Zhu W et al., 2010). Jelikož mezi počtem spekter a koncentrací proteinu existuje silná lineární závislost, lze hodnoty „spectral count“ jednotlivých proteinů v různých vzorcích porovnávat (Liu et al., 2004).



Obr. 11 Schéma dvou přístupů relativní kvantifikace. A) Způsob kvantifikace pomocí značení stabilních izotopů. B) Label-free postup při němž lze kvantifikovat metodou „Peak intensity“ nebo „Spectral count“. (Překresleno podle Zhu W et al., 2010)

3 Experimentální část

3.1 Materiál a chemikálie

Pro experiment byla použita suspenzní kultura protoplastů *Arabidopsis thaliana* ekotyp Landsberg erecta, (L.) Heynh, která byla poskytnuta oddělením molekulární biologie Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Kultura byla kultivována na Murashige-Skoog médiu při laboratorní teplotě a ve tmě za neustálého míchání.

Pro extrakci byly použity tyto chemikálie: deionizovaná voda, Tris (Serva, Německo), KCl (Fluka, Německo), $MgCl_2$ (Fluka, Německo), $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal NP-40 (Sigma-Aldrich, Německo), Roche inhibitor cocktail cOmplete, EDTA free (Roche, Švýcarsko), fenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich, Německo) a tekutý dusík.

Pro přípravu afinitních gelů byly uplatněny tyto chemikálie: deionizovaná voda, dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Německo), EtOH (Merck millipore, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), ethanolamin (Sigma-Aldrich, Německo), NHS-Activated Sepharose-4 FF NHS (GE Healthcare, Švédsko), hydrogenuhličitan triethylamonný (Sigma-Aldrich, Německo), ligandy C2-(6'-aminohexylamino)isopentenyladenin a N9-[1'-(2'-aminoethylamino)-1'-butanon]isopentenyladenin. Tyto ligandy byly připraveny v laboratoři růstových regulátorů (LRR) Mgr. Václavem Mikem, Ph.D.

Pro afinitní chromatografii byly užity tyto chemikálie: deionizovaná voda, Tris (Serva, Německo), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal NP-40 (Sigma-Aldrich, Německo), HCl, (Lach-ner, ČR), merkptoethanol (Sigma-Aldrich, Německo), KCl (Fluka, Německo), $MgCl_2$ (Fluka, Německo), $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, Německo), FA (Riedel-de Haën, Německo).

K provedení SDS-PAGE byly nutné tyto chemikálie: Tris-HCl pH 6,8, SDS (Serva, Německo), glycerol (Sigma-Aldrich, Německo), merkptoethanol (Sigma-Aldrich, Německo), EDTA (Sigma-Aldrich, Německo) a bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Německo), gradientový gel 4-15% (Bio-Rad, USA), Marker Precision Plus Proteins (Bio-Rad, USA), glycin (Sigma-Aldrich, Německo), Tris (Serva, Německo).

Vizualizace byla provedena pomocí těchto chemikálií: kyselina octová (Lach-ner, ČR), CBB G 250 (Fluka, Německo), $AgNO_3$ (Lachema, ČR), MeOH (Lach-ner, ČR), EtOH (Merck millipore, Německo), formaldehyd (Sigma-Aldrich, Německo), K_2CO_3 (Sigma-Aldrich, Německo), $Na_2S_2O_3$ (Sigma-Aldrich, Německo)

Ke štěpení vzorků bylo potřeba těchto chemikálií: acetonitril (ACN), (Sigma-Aldrich, Německo), $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (Fluka, Německo), Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, Německo), jodacetamid (Sigma-Aldrich, Německo), CaCl_2 (Sigma-Aldrich, Německo), trypsin (MP Biomedical, Francie), FA (Riedel-de Haën, Německo).

Pro odsolení vzorků před hmotnostní analýzou byly použity tyto chemikálie: extrakční disk C18 Empore (3M Center, USA), isopropanol (iPrOH), (Fluka, Německo), FA (Riedel-de Haën, Německo), MeOH (Merck millipore, Německo), trifluoroctová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo).

3.2 Přístrojové vybavení

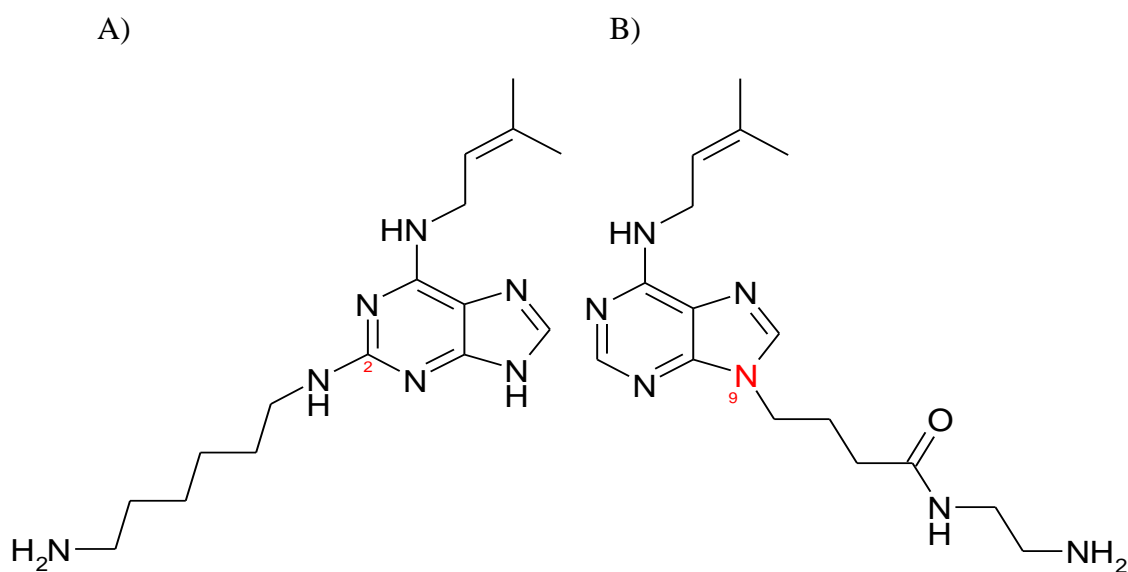
Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko),
míchačka Vortex mixer SA8 (Stuart, Velká Británie),
rotační míchačka multi-rotator PRS-22 (Biosan, USA),
centrifuga minispin (Eppendorf, Německo),
pH metr MultiCal pH 526 (WTW, Německo),
pipety (Eppendorf, Německo),
ultrazvuková lázeň Elmasonic S10 (Elma, Německo),
mikro ultracentrifuga CS 150NX (Hitachi, Japonsko),
spektrofotometr UV-1601 (Schimadzu, Japonsko)
spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek, USA),
třepačka KS 130 control (IKA, Německo),
skener Image Scanner PoverLook 1120 USG (AP Czech, ČR),
lyofilizátor Alpha 1-2(Christ, Německo),
elektroforetický set Mini-PROTEAN Tetra cell, PowerPac Basic Power (Bio-Rad, USA),
laminární flowbox biohazard (Ferrara, Itálie),
termomixer comfort (Eppendorf, Německo),
centrifuga CL 31R Multispeed (Thermo elektron corporation, USA),
rotační vakuová odpadka Concentrato plus (Eppendorf, Německo),
Systém nLC nanoEASY (Proxeon ,Nizozemí, Bruker Daltonics, Německo) s tandemovou hmotností detekcí Q-TOF vybavenou elektropray ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo).

3.3 Metody

3.3.1 Příprava afinitní matrice s ligandy iP (C²) a iP (N⁹)

Maximální vazebná kapacita 1 ml preaktivovaného Sepharose-4FF gelu je 20 μmol ligandu. Nejprve byly tedy připraveny 24 μmol roztoky ligandů (Obr. 12) v 800 μl DMSO a jejich pH bylo upraveno na pH 7 pomocí hydrogenuhličitanu triethylamonného.

Do 2 ml mikrozkuvek byl napipetován 1 ml gelu Sepharose – 4FF. Po odstranění přebytečného iPrOH byl gel postupně promyt dvakrát 900 μl 50% DMSO a dvakrát 900 μl 100% DMSO.

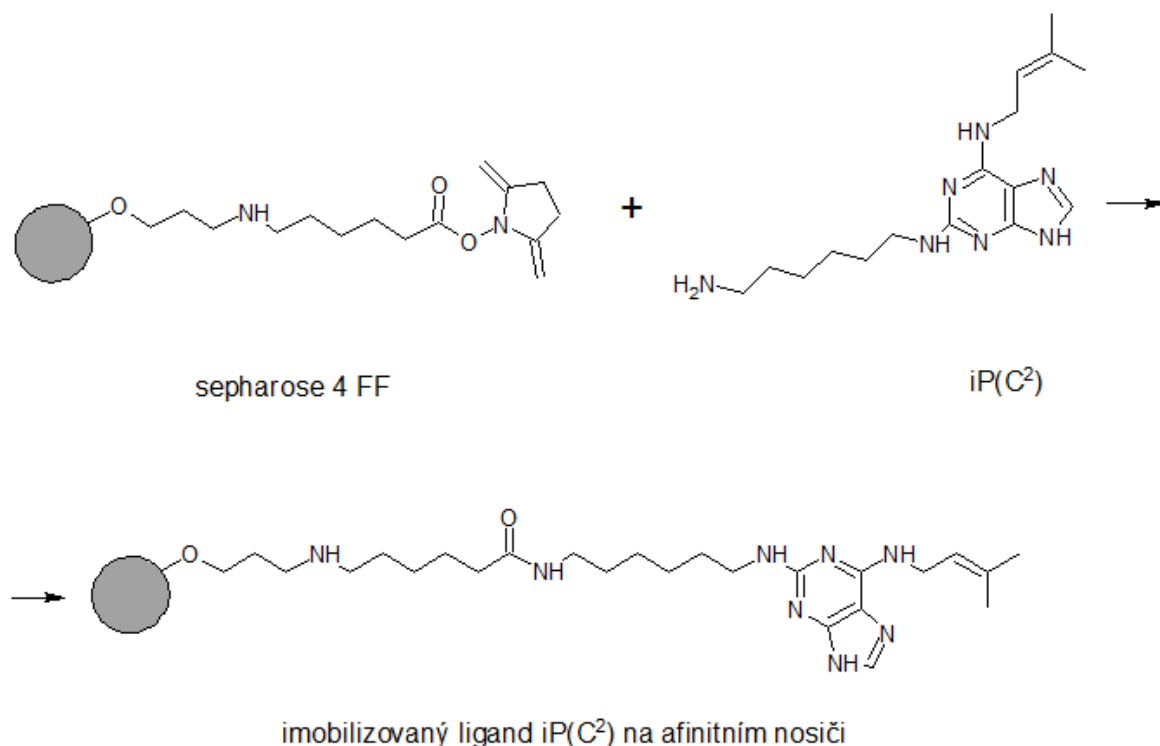


Obr. 12 Struktury ligandů A) C2-(6'-aminohexylamino)isopentenyladenin,

B) N9-[1'-(2'-aminoethylamino)-1'-butanon]isopentenyladenin

K promytým gelům byly přidány roztoky jednotlivých ligandů (Obr. 13). Reakční směs byla inkubována 4 h a následně přenesena na 3 ml kolonu s fritou. Afinitní matrice byla poté promyta vždy třikrát 2,7 ml těchto roztoků: 100% DMSO, 50% DMSO, H₂O. Aby došlo k zablokování nezreagovaných vazebných míst, byl gel inkubován přes noc za stálého míchání s 900 μl 1 mol/l ethanolaminu.

Druhý den byla připravená afinitní matrice opět promyta, vždy třikrát 2,7 ml: H₂O, 50% DMSO, 100% DMSO, 50% DMSO, H₂O, 50% EtOH a 20% EtOH. Ve 20% EtOH byly gely v poměru 1:1 skladovány do dalšího použití při 4°C.



Obr. 13 Schéma reakce, při které dochází k imobilizaci ligandu iP(C²)

3.3.2 Charakterizace afinitních gelů

Efektivita vazebné reakce byla stanovena pomocí měření absorbance standardních roztoků volných ligandů a připravených afinitních gelů.

Jako standard sloužil roztok 6 μmol ligandu rozpuštěného v 50 μl DMSO a 930 μl 50% glycerolu. Při samotném měření bylo do křemenné kyvety napipetováno 980 μl 50% glycerolu, přidáno 20 μl standardu, roztok byl pečlivě promíchán a byla změřena absorbance v rozsahu vlnových délek 200 – 300 nm. Z naměřených hodnot byla stanovena vlnová délka absorpčního maxima pro daný ligand. Při této vlnové délce pak probíhalo další měření. Pro iP (N⁹) byla $\lambda_{\text{max}} = 272,4$ nm, iP (C²) absorboval maximálně při 270,5 nm. Absorbance každého z ligandů byla při dané koncentraci změřena desetkrát. Stejně pak proběhlo měření standardů ligandů o koncentraci 3 a 1,5 μmol připravených ředěním původního standardního roztoku.

Z Lambert-Beerova zákona o tvaru:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

kde A značí absorbanci, c molární koncentraci a d tloušťku vrstvy, ve které dochází k absorpci (v našem případě = 1 cm), byl vypočítán extinkční koeficient ϵ pro každou

z koncentrací. Průměrná hodnota ϵ byla následně použita pro výpočet množství ligandu navázaného na afinitní nosič.

Absorbance afinitního gelu byla měřena podobným způsobem, jako absorbance standardů s tím rozdílem, že blank v referenční kyvetě obsahoval kromě 980 μ l 50% glycerolu také 20 μ l čistého gelu bez navázaného ligandu. Dosazením získaných hodnot do rovnice byla vypočítána efektivita vazebné reakce při přípravě afinitní matrice.

3.3.3 Nativní extrakce proteinů z protoplastů *A. thaliana*.

Po třídní inkubaci byla buněčná kultura protoplastů *A. thaliana* přefiltrována pomocí vakuové filtrační aparatury. Následně byly buňky přeneseny do předem zvážené 50 ml falkony. Materiál vážil 9,04 g.

Homogenizace vzorku proběhla ve vychlazené třecí misce pod tekutým dusíkem. Homogenát byl přesunut do 50 ml plastové falkony a přelit 13.5 ml (= 1,5 násobek navážky) vychlazeného extrakčního/inkubačního pufru (Tab. 1). Směs byla inkubována 1 hodinu na ledě za občasného míchání.

Dále byla směs přenesena rovnoměrně do čtyř tlustostěnných centrifugačních kyvet. Vzorek byl centrifugován 20 minut, při 4 °C a 37000 rcf. Po stočení byl odebrán supernatant do nových centrifugačních kyvet. Supernatant byl znovu stáčen 45 minut, při 4 °C a 178000 rcf. Supernatant byl opatrně odlit do 15 ml falkony.

Posléze byla provedena kvantifikace proteinů pomocí metody Bradfordové v mikrotitrační destičce.

Tab. 1 Složení extrakčního pufru pro nativní extrakci. pH bylo upraveno na pH 8,0 pomocí koncentrované HCl. Chemikálie v šedém poli byly přidány bezprostředně před použitím pufru.

Komponenta	Koncentrace
Tris	50 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	2.5 mM
CaCl ₂	2 mM
Glycerol	5%
Igepal NP-40	0.20%
PMSF	1 mM
Rosche inhibitor	Supp

3.3.4 Purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie

Do mikrozkuřavky bylo ke 100 μ l afinitního gelu přidáno 300 μ g proteinů, tedy 75 μ l extraktu. Objem byl do 300 μ l doplněn 225 μ l inkubačního pufru. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C za stálého míchání.

Afinitní purifikace proteinového extraktu byla provedena celkem v pěti variantách (tzv. pulldownech). Ty se lišily typem použitého ligandu a obsahem kompetitorů. Jednou z variant byla také chromatografie na nosiči kompletně blokováným ethanolaminem, který sloužil jako blank.

Přehled provedených pulldownů:

- A) inkubace s ligandem iP (N⁹) bez kompetitoru
- B) inkubace s ligandem iP (N⁹) s 10 μ mol volného iP
- C) inkubace s ligandem iP (C²) bez kompetitoru
- D) inkubace s ligandem iP (C²) s 10 μ mol volného iP
- E) inkubace s gelem blokováným ethanolaminem

Druhý den byly gely přeneseny pipetou na 3 ml kolony s fritou navlhčenou 1,5 ml inkubačního pufru. Gely byly promyty čtyřikrát 1,5 ml každého pufru: inkubačním pufrém, highsalt pufrém a nakonec lowsalt pufrém (Tab. 2). Poté byly proteiny eluovány 500 μ l 100 mmol/l FA do skleněných vialek s předloženým hydrogenuhličitanovým tetraethylamonným pufrém o objemu 125 μ l. Eluované vzorky byly rozděleny na dvě části obsahující 80 % a 20 % objemu. Následovala lyofilizace vzorků, která probíhala přes noc.

Tab. 2 Složení použitých pufrů o pH 8,0, upraveno konc. HCl.

Pufr:	Inkubační	High salt	Low salt
Komponenta	Koncentrace	Koncentrace	Koncentrace
Tris	50 mM	50 mM	50 mM
KCl	100 mM	500 mM	100 mM
MgCl ₂	2.5 mM	2,5 mM	-
CaCl ₂	2 mM	2 mM	-
Glycerol	5%	0,2%	-
Igepal NP-40	0,2%	-	-
PMSF	1 mM	-	-
Rosche inhibitor	Supp	-	-

3.3.5 SDS-PAGE

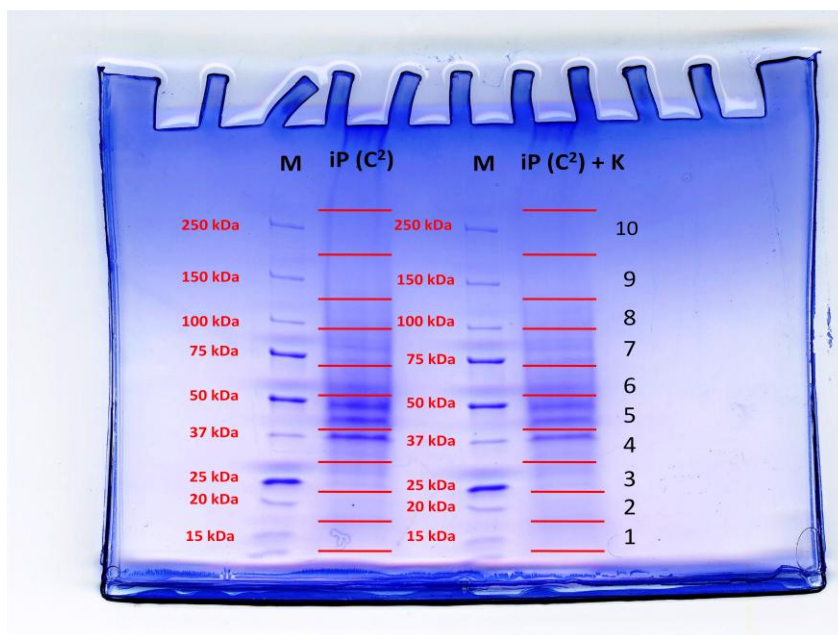
Vzorky s izolovanými proteiny byly rozpuštěny ve 25 μ l vzorkovacího pufru (Tab. 3) a následně separovány pomocí SDS-PAGE při napětí 90 V. Pro zvýšení efektivity dělení byly použity předpřipravené 4 – 15% gradientové gely firmy Bio-Rad. Frakce 20% eluátu byla barvena stříbrem a následně použita k podrobnému vizuálnímu vyhodnocení. Pro další hmotnostní analýzu byla použita 80% frakce eluátu obarvená pomocí CBB G 250.

Tab. 3 Složení 1 \times koncentrovaného vzorkovacího pufru. Ke vzorku se přidává 2 \times koncentrovaný v poměru 1:1.

Komponenta	Koncentrace
Tris-HCl pH 6,8	50 mmol/l
EDTA	12,5 mmol/l
Glycerol	10%
SDS	2%
Bromfenolová modř	0,02%
Merkaptoethanol	1%

3.3.6 Štěpení v gelu

Celý proces štěpení probíhal ve flowboxu, aby bylo zabráněno kontaminaci vzorku proteiny z okolního prostředí. Ve snaze zvýšit citlivost hmotnostní detekce byla linie každého vzorku před štěpením rozdělena na deset menších kousků (cca 7 \times 10 mm) dle schématu zobrazeného na obr. 14. Každý z nich byl nakrájen na kostičky o velikosti 1 \times 1 mm a přenesen do zvláštní 1,5 ml mikrozkušavky.



Obr. 14 Schéma řezání polyakrylamidového gelu se vzorky iP(C²), M – marker, K – kompetitor – 10 μ mol volného iP

Metodický postup štěpení vycházel z metody publikované skupinou A. Shevchenko (Shevchenko A et al., 1996). Kostky gelu byly odbarveny 600 μ l roztoku 30% ACN a 70% 100 mmol/l roztoku NH_4HCO_3 . Vzorky byly umístěny do thermomixéru a třepány 30 minut při laboratorní teplotě. Po odpipetování odbarvovacího roztoku bylo ke kostkám přidáno 600 μ l 100% ACN. Poté, co došlo ke scvrknutí kostek gelu, byl ACN odpipetována a vzorky byly zhruba 15 minut ponechány ve flowboxu k vyschnutí.

Ke vzorkům bylo napipetováno 50 μ l redukčního činidla složeného z 10 mmol/l DTT v 100 mmol/l roztoku NH_4HCO_3 . Vzorky byly inkubovány při 56 °C 30 minut. Následně byl redukční roztok odpipetován.

Mikrozkumavky byly ochlazeny na laboratorní teplotu a ke vzorkům bylo napipetováno 50 μ l čerstvě připraveného alkylačního činidla, které obsahuje jodacetamid o koncentraci 55 mmol/l v 100 mmol/l roztoku NH_4HCO_3 . Vzorky byly krátce promíchány a inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě a ve tmě. Následně byl roztok odpipetován. Vzorky byly promyty 600 μ l 20 mmol/l roztoku NH_4HCO_3 15 minut při laboratorní teplotě a 1000 rpm. Kousky gelu byly sraženy 600 μ l 100% ACN. Po sražení byl ACN odpipetován a kostky gelu byly vysušeny ve flowboxu.

Ke kostkám gelu bylo napipetováno 50 μ l trypsinu (15 ng/ μ l) v 20 mmol/l NH_4HCO_3 a 1 mmol/l CaCl_2 . Kousky byly rehydratovány v lednici 20 minut. Po té bylo do zkumavek přidáno potřebné množství roztoku trypsinu tak, aby byly kousky zcela ponořeny. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C.

Následující den byly z kousků gelu eluovány peptidy 100 μ l 5% FA a 30% ACN. Směs byla za stálého míchání inkubována 15 minut při 37 °C. Gel byl reextrahován při stejných podmínkách. Následně byly vzorky odpařeny ve vakuové odparce a rozpuštěny v 50 μ l 5% FA.

3.3.7 Odsolení vzorků před hmotnostní analýzou

Odsolení vzorků bylo provedeno podle protokolu publikovaného J. Rappsilberem (Rappsilber J et al., 2007). SPE mikrokolonky (tzv. StageTips) byly zhotoveny z pipetovacích špiček 20-200 μ l. Kovovou hamiltonkou o vnitřním průměru 1 mm byly vyseknuty dva disky sorbentu C18 a zatlačeny do špičky. Takto připravené kolonky byly zasunuty do otvoru ve víčku 1,5 ml mikrozkumavky a umístěny do centrifugy. Sorbent byl nejdříve aktivován 2 \times 50 μ l iPrOH, poté byly kolonky ekvilibrovány 2 \times 50 μ l 5% FA.

Aktivované kolony byly přemístěny do předem označených mikrozkušavek (průtok). Na kolony byl nanesen celý vzorek o objemu 50 μ l následovalo promytí 2 \times 50 μ l 5% FA. Mikrozkušavky s průtokem byly zakryty parafilmem a zmraženy v -80 °C.

Vzorky byly eluovány do čistých mikrozkušavek 2 \times 50 μ l roztoku 50% MeOH s 2,5% FA. Přesný postup extrakce je uveden v tabulce č. 4. Eluáty byly přepipetovány do čistých total recovery vialek a odpařeny ve vakuové odparce při 30 °C. Vzorky byly zamraženy v -80 °C.

Tab. 4 Postup odsolení vzorků peptidů

Aktivace a ekvibrace C18 kolony				
Krok	Roztok	Objem (μ l)	Otáčky (rcf)	Čas (min)
1	iPrOH	50	4000	2,5
2	iPrOH	50	4000	2,5
3	5% FA	50	2000	2,5
4	5% FA	50	2000	2,5
Nanesení a promytí vzorku				
Krok	Roztok	Objem (μ l)	Otáčky (rcf)	Čas (min)
1	Vzorek	50	1200	7,5
2	5% FA	50	2000	2,5
3	5% FA	50	2000	2,5
Eluce vzorku				
Krok	Roztok	Objem (μ l)	Otáčky (rcf)	Čas (min)
1	50% MeOH; 2,5% FA	50	1500	5
2	50% MeOH; 2,5% FA	50	1500	5

3.3.8 Nanokapilární chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Přečištěné a odpařené vzorky byly rozpuštěny v 21 μ l 0,1% kyselině trifluoroctové, zvortexovány a sonifikovány po dobu 5 min.

K analýze vzorků peptidů bylo použito systému nanokapilární chromatografie (nLC; nanoEASY, Proxeon, Nizozemí, BrukerDaltonics, Německo) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF vybavenou elektrospray ionizací (UHR-Q-TOF maXis, BrukerDaltonics, Německo).

Vzorky byly umístěny do autosampleru LC. Objem 7 μ l vzorku byl nastříknut do nLC systému a peptidy byly zachyceny na nanokapilární předkoloně (75 μ m \times 3 cm, IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reposil GOLD C18, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo). Po izokratickém promytí zachycených peptidů 10 μ l 2% FA byly tyto peptidy postupně eluovány pomocí 125 minutového gradientu eluce (Tab. 5) na analytickou nanokapilární kolonu (75 μ m \times 15 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA)

s reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 3 um, Dr. Maisch GmbH, Německo) při průtoku 200 nl/min. Složení mobilních fází bylo následující: pufr A – 0,4% FA v H₂O, pufr B – 0,4 % FA v 70% MeOH +20% iPrOH.

Tab. 5 Nastavení nLC 125 minutového gradientu pro eluci peptidů z reverzní nanokapilární kolony.

Čas (min)	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

Eluované peptidy byly ionizovány elektrospray ionizací a analyzovány pomocí tandemového hmotnostního spektrometru metodou „data-dependent analysis (DDA)“ 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 5 spektrech po dobu následujících 18 s; excluded mass rozsah prekurzorů 50-350 Da a 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.

3.3.9 Zpracování dat

Uložená surová data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis v4.2 (BrukerDaltonics, Německo) a byly získány soubory mgf (Mascotgenericfile; Matrix Science, England, UK) obsahující seznamy měrných hmotností prekurzorů a jejich fragmentační spektra. Aby mohly být srovnány koncentrace proteinů v celém vzorku, byly mgf soubory odpovídající jednotlivým frakcím stejného vzorku následně spojeny do jednoho kompletního mgf souboru. Do programu ProteinScapev.2.2 (BrukerDaltonics,

Německo) byly vloženy kompletní mgf soubory odpovídající jednotlivým vzorkům a použity k databázovému prohledávání pomocí Mascot algoritmu (in-house mascot server, Matrix Science, England, UK) proti databázi UniProt*ArabidopsisThaliana* ver. 201207 (33551 sekvencí, UniProtKB; www.UniProt.org). Prohledávání bylo nastaveno následujícím způsobem: použitá proteasa ke štěpení: trypsin; maximální povolený počet vynechaných štěpných míst (miss cleavage) 1; povolené modifikace peptidů: karbamidomethylace cysteinů jako pevná (fixed), acetylace N-konců proteinů, oxidace methioninu, deamidace asparaginu a glutaminu 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 $p < 0,05$. Seznamy identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích byly následně vloženy do programu MS Excel a dále editovány.

Nejprve byly vymazány identifikované proteiny, jejichž přítomnost byla způsobena kontaminací (keratiny, trypsin). Nově vzniklé seznamy byly mezi sebou porovnány.

Pro porovnání efektivity kompetice byly použity hodnoty spectral count. Za signifikantní změnu byl považován 50% rozdíl mezi počtem identifikovaných spekter. Současně byly ze seznamu vybrány pouze ty proteiny, jejichž hodnota spectral count byla vyšší než 3. Získali jsme soupis proteinů, jejichž koncentrace se výrazně lišily v porovnání mezi variantami s volným kompetitorem nebo bez něj. Tyto proteiny byly následně roztrženy do kategorií podle biologických procesů, ve kterých jsou zapojeny.

Seznam všech identifikovaných proteinů, které byly purifikovány pomocí ligandu iP(C²), byl vložen do databáze Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). Výstupem tohoto kroku bylo schéma rozdělení proteinů podle jejich výskytu v rámci buňky a biologického procesu, kterého se účastní.

Stejný seznam proteinů byl vložen i do databáze DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>), pomocí které byly proteiny rozděleny do klastrů podle funkce. Jednotlivé klastry byly seřazeny podle tzv. „enrichment score“, které udává míru spolehlivosti zařazení identifikovaných proteinů do dané kategorie. V potaz byly brány pouze klastry s enrichment score vyšším než 1,3.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Příprava afinitního nosiče

Prvním úkolem byla syntéza afinitních nosičů s ligandy cytokininu imobilizovaného přes C² uhlík a dusík N⁹. Pro určení efektivity reakce byla využita spektrofotometrie.

Byla změřena absorpční maxima daných ligandů (Tab. 6) a při zjištěných vlnových délkách byly odečteny absorbance afinitních ligandů ve třech různých koncentracích. Z naměřených hodnot absorbance a známé koncentrace standardu byl vypočítán dle Lambert-Beerova zákona extinkční koeficient pro daný ligand.

Lambert-Beerův zákon:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

(A – absorbance, ϵ – extinkční koeficient, d – tloušťka vrstvy, ve které dochází k absorpci)

Následně byla z absorbance gelů a získaného extinkčního koeficientu vypočítána koncentrace ligandu navázaného na matrici. Ta byla přepočítána na procentuální pokrytí gelu z celkové kapacity gelu (Tab. 6).

Tab. 6 Naměřená absorpční maxima a vypočítané procentuální pokrytí gelu Sepharose – 4ff daným ligandem. Kapacita gelu je 20 $\mu\text{mol/ml}$.

Ligand	λ_{max} (nm)	c ($\mu\text{mol/ml}$)	Pokrytí (%)
iP (C ²)	290,5	3,157	15,78
iP (N ⁹)	272,4	3,023	15,12

U obou ligandů bylo dosaženo přibližně 15 % pokrytí vazebných míst gelu. Tato hodnota odpovídá zhruba 3 $\mu\text{mol/ml}$ z celkové kapacity 20 $\mu\text{mol/ml}$ gelu. 3 $\mu\text{mol/ml}$ jsou všeobecně doporučeny jako optimální, protože při vyšších koncentracích imobilizovaného ligandu může docházet k zabránění vazbě analytu ze sterických důvodů (Guiffant D et al., 2007).

4.2 Extrakce proteinů z protoplastů *A. thaliana*

Druhým cílem mé práce byla nativní extrakce proteinů z kultury suspenzních protoplastů *A. thaliana* ekotypu Landsberg erecta. Výhodou protoplastové kultury ve srovnání s prací s celými rostlinkami je snadná manipulace s materiálem a jeho dobrá množivost, což usnadňuje reprodukovatelnost experimentů zejména v úvodní fázi studie. Hlavním důvodem ale byla minimální aktivita CKX v kultuře. Substrátem tohoto enzymu jsou

izoprenoidní cytokininy. Pokud by tedy extrakt obsahoval aktivní CKX, došlo by k nevratné degradaci imobilizovaných ligandů.

Základem extrakčního roztoku byl pufr obsahující tris, jenž udržuje požadované pH. Dále soli $MgCl_2$ a $CaCl_2$, jejichž kationty slouží jako kofaktory stabilizující proteiny a proteinové komplexy. Pufr také obsahoval Igepal NP-40, šetrný neionogenní detergent zvyšující rozpustnost proteinů. Aby nedošlo k enzymatickému štěpení proteinů v extraktu, byl součástí roztoku i soubor inhibitorů proteas.

Nemohli jsme použít jinak často využívaná činidla, mezi něž patří chaotropní sloučeniny, např. močovina, SDS se silně denaturujícími účinky nebo DTT jako redukční činidlo způsobující rozpad disulfidických můstků. Výše zmíněné látky napomáhají větší rozpustnosti proteinů, a tak dosažení vyššího výtěžku, bohužel současně narušují terciální strukturu proteinů.

Z materiálu o hmotnosti 9,04 g jsme získali proteinový extrakt o koncentraci 4000 $\mu g/ml$, což odpovídá 5,7 mg/g čerstvé hmoty materiálu. Hladina proteinů ve vzorku byla změřena pomocí metody Bradfordové.

Dosáhli jsme výnosu proteinů srovnatelného s extrakčními postupy prováděnými za denaturujících podmínek. Ve studii publikované T. Isacson bylo při extrakci z listů rajčat dosaženo výtěžku 6 mg/g čerstvé hmoty. Skupina W. Wang získala z listů citroníku 7,8 mg/g (Wang W et al., 2006).

4.3 Purifikace proteinů na afinitním nosiči

Získaný proteinový extrakt byl nanesen na jednotlivé afinitní gely s ligandy $iP(C^2)$, $iP(N^9)$. S každým z ligandů byly provedeny dvě varianty inkubace - s volným iP coby specifickým kompetitorem a bez kompetitoru. Jako blank byla použita matrice blokováná ethanolaminem.

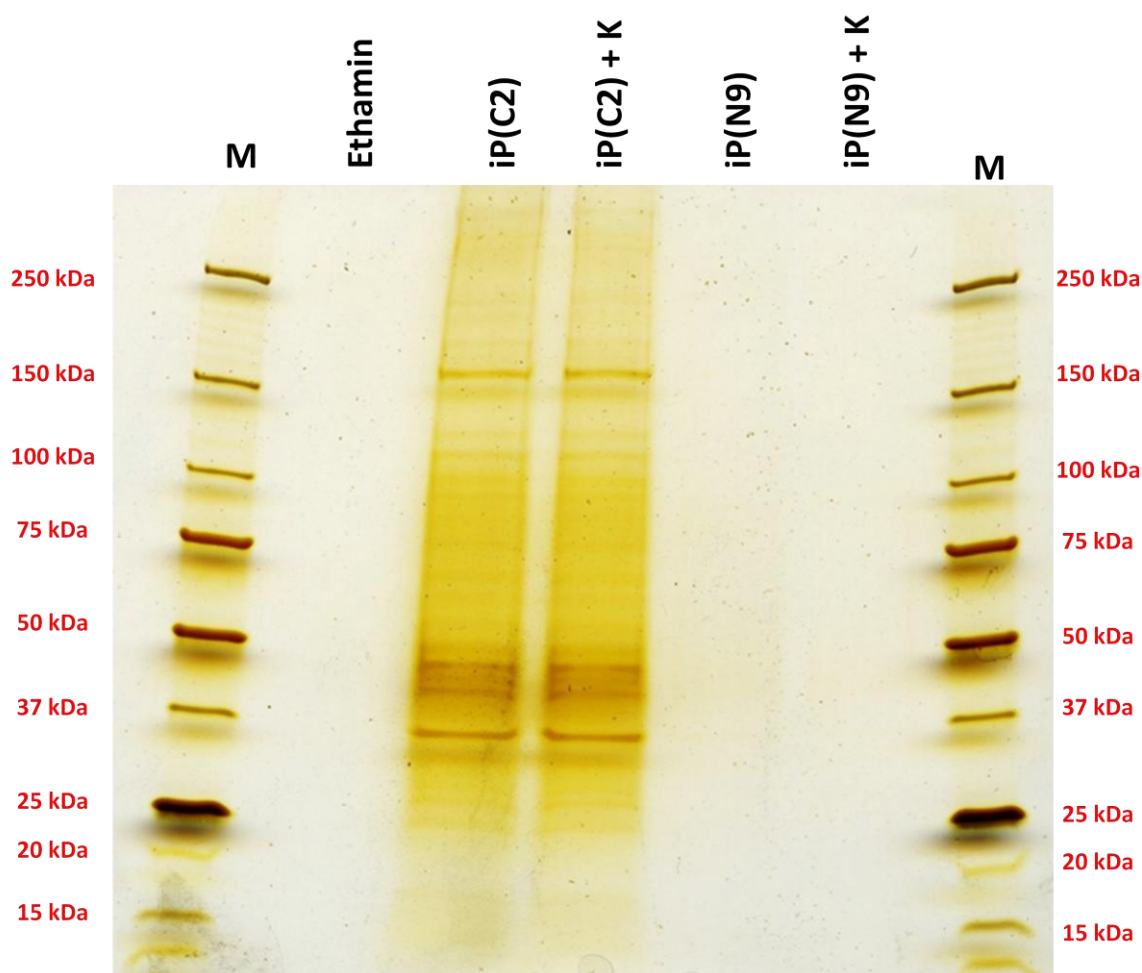
4.3.1 Vizuální zhodnocení SDS-PAGE

Pro vizuální zhodnocení interakce extrahovaných proteinů s jednotlivými ligandy byla na gradientovém gelu provedena 1-D SDS-PAGE s 20% frakcí eluátu z každého pulldownu. Rozdělené proteiny byly následně nabarveny stříbrem.

Z ilustrativního gelu jsou zřetelné rozdíly v interakci proteinů s ligandy $iP(C^2)$, $iP(N^9)$ a blankem (Obr. 15). Podle předpokladů byla interakce s gelem blokováným ethanolaminem pod hranicí detekovatelnosti. Tuto skutečnost potvrdila i následná

hmotnostní analýza. Velmi bohatá skupina proteinů interagovala s ligandem iP vázaným na nosič v poloze C², nízké množství proteinů se naopak zachytilo na ligand iP(N⁹). Rozdíly mezi variantami s volným kompetujícím iP a bez kompetitoru lze pouze vizuálně obtížně porovnat. Podrobné srovnání poskytla detekce zachycených proteinů pomocí MS.

Látky s podobnou chemickou strukturou se do specifického místa váží se stejnou orientací (Daub H, 2005). Z toho vyplývá, že vazba ligandu iP(C²) do specifického místa je snadnější než u ligandu iP(N⁹). Důvodem může být lepší dostupnost vazebných míst pro ligand iP(C²) vzhledem k jeho vhodnější orientaci na linkeru. Je pravděpodobné, že raménko ligandu iP(N⁹) částečně brání k ideálnímu navázání proteinů ze sterických důvodů, čímž snižuje jejich afinitu k ligandu.

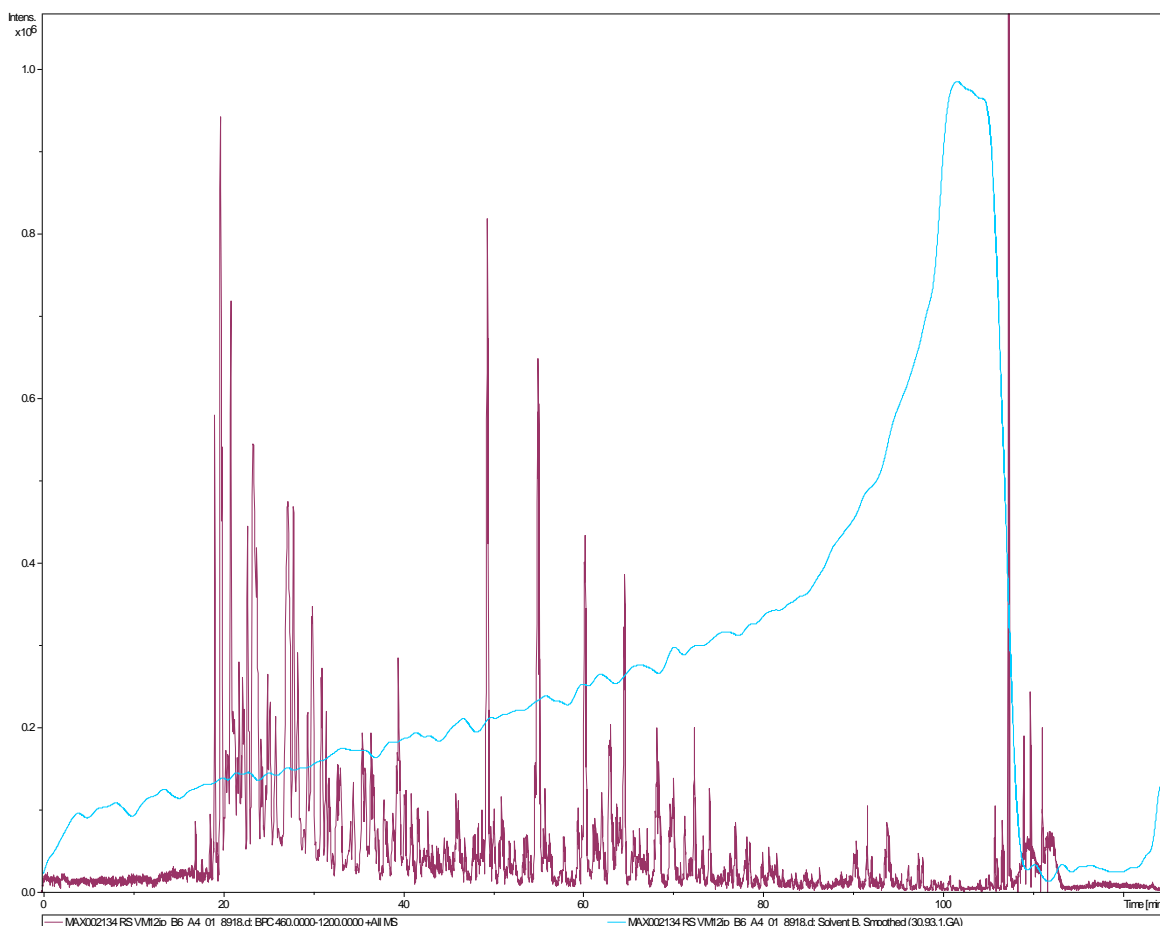


Obr. 15 SDS-PAGE proteinů izolovaných pomocí afinitní chromatografie. Na gel byly naneseny 20% frakce eluátu. Proteiny byly detekovány stříbrem.

4.3.2 Hmotnostní analýza a vyhodnocení izolovaných proteinů

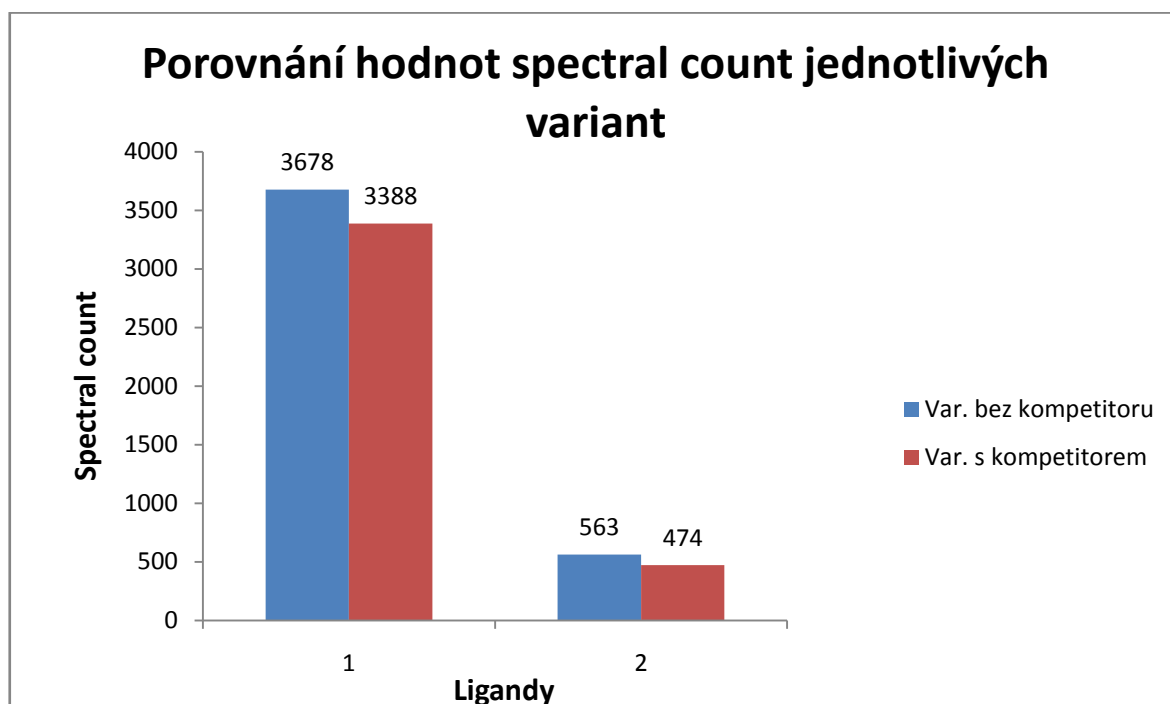
Pro hmotnostní analýzu byla použita 80% frakce eluátu rozdělená na gradientovém gelu pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly obarveny barvivem CBB, které je kompatibilní s použitou analytickou koncovkou. Pro vyšší citlivost měření byla každá linie pulldownu rozřezána na deset kousků (Obr. 14). Proteiny v jednotlivých dílcích gelu byly samostatně naštěpeny a před analýzou odsoleny.

K identifikaci a label-free kvantifikaci izolovaných proteinů byl využit systém nLC s tandemovou hmotnostní detekcí. Na chromatografické koloně s reverzní fází došlo k separaci peptidů, které byly po eluci následně ionizovány pomocí elektrospray iontového zdroje. Záznam eluce je vyobrazen na chromatogramu na Obr. 16. Peptidy byly analyzovány na tandemovém hmotnostním spektrometru Q-TOF.



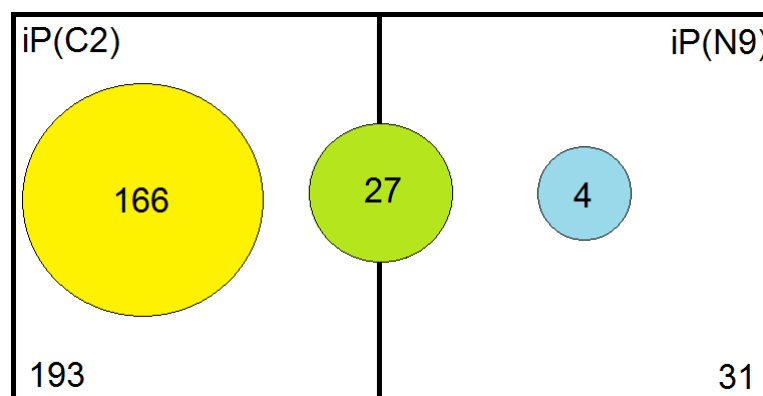
Obr. 16 Chromatografický záznam separace peptidů extrahovaných z 6. dílku linie iP(C²) na gradientovém gelu (fialová čára). Modrá čára udává složení mobilní fáze a ukazuje vzrůstající gradient podílu pufru B.

Naměřená data potvrdila, že na ligand iP(C²) se navázalo podstatně více proteinů než na iP(N⁹). Z počtu detekovaných spekter je taky patrný pokles množství zachycených proteinů ve variantách s přidavkem volného iP coby kompetitoru (Obr. 17).



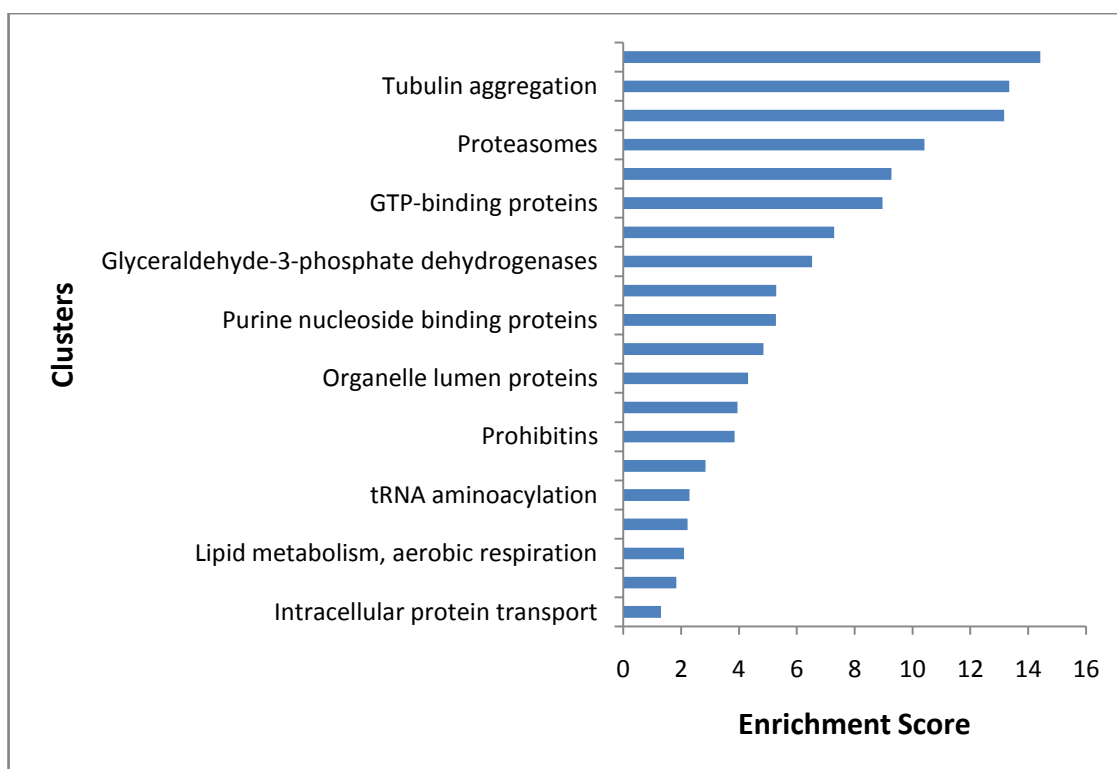
Obr. 17 Z grafu lze vyčíst hodnoty spectral count všech peptidů izolovaných při jednotlivých variantách afinitní purifikace. Sloupec 1 představuje ligand iP(C²) a sloupec 2 iP(N⁹).

Soubor proteinů izolovaných pomocí iP imobilizovaného přes C² byl značně pestřejší než skupina proteinů purifikovaných přes iP(N⁹). Obsahoval totiž 193 různých proteinů, zatímco ve druhé skupině jich bylo identifikováno pouze 31. Z celkového počtu nalezených proteinů se 27 vázalo na oba ligandy. Tyto výsledky jsou pro názornost shrnuty ve schématu na Obr. 18.

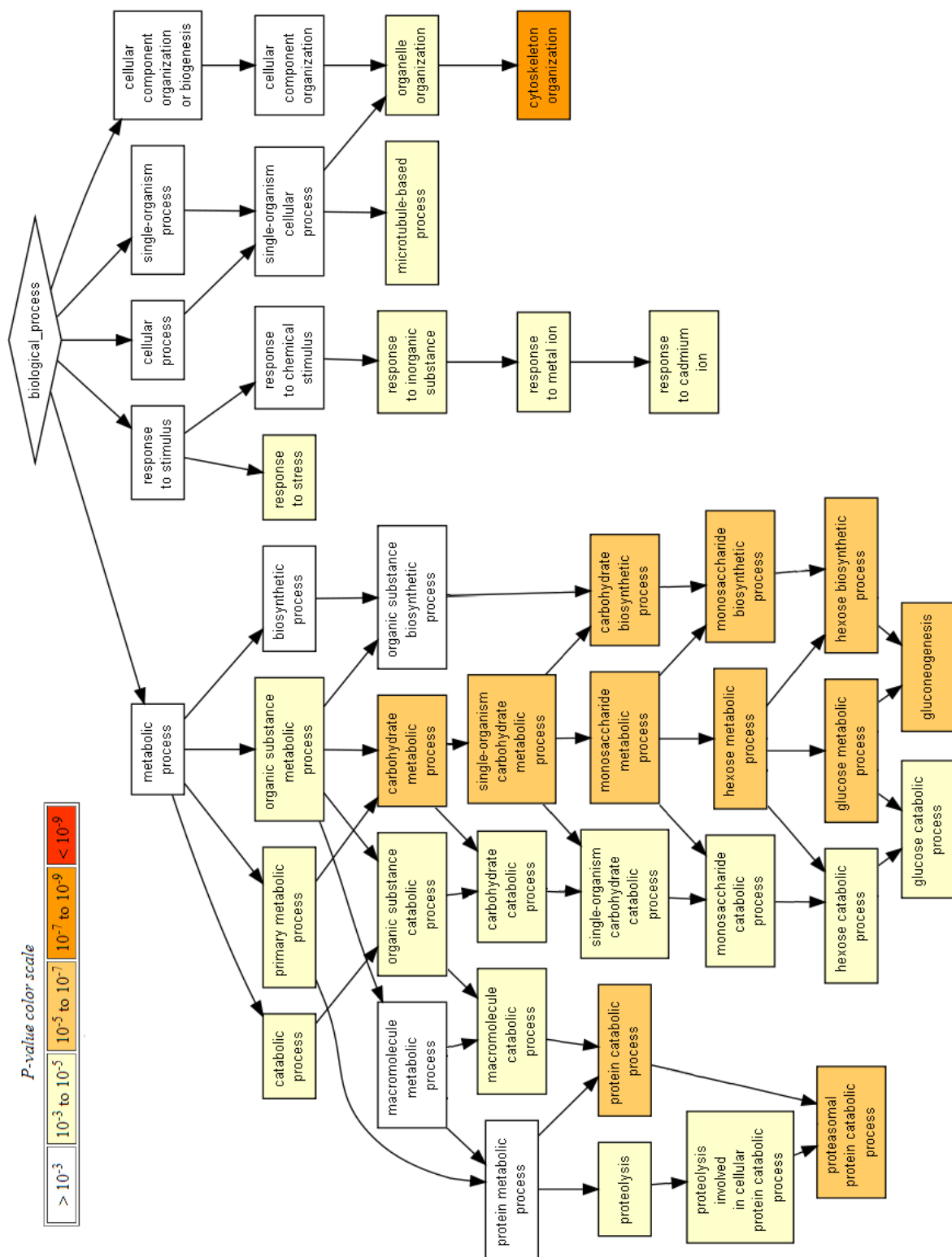


Obr. 18 Schéma rozdělení vazebných interakcí. V dolních rozích je celkový počet identifikovaných proteinů pro daný ligand. Ve žlutém a modrém kruhu je součet proteinů vázajících se pouze na daný ligand. V zeleném kruhu je počet proteinů interagujících s oběma ligandy.

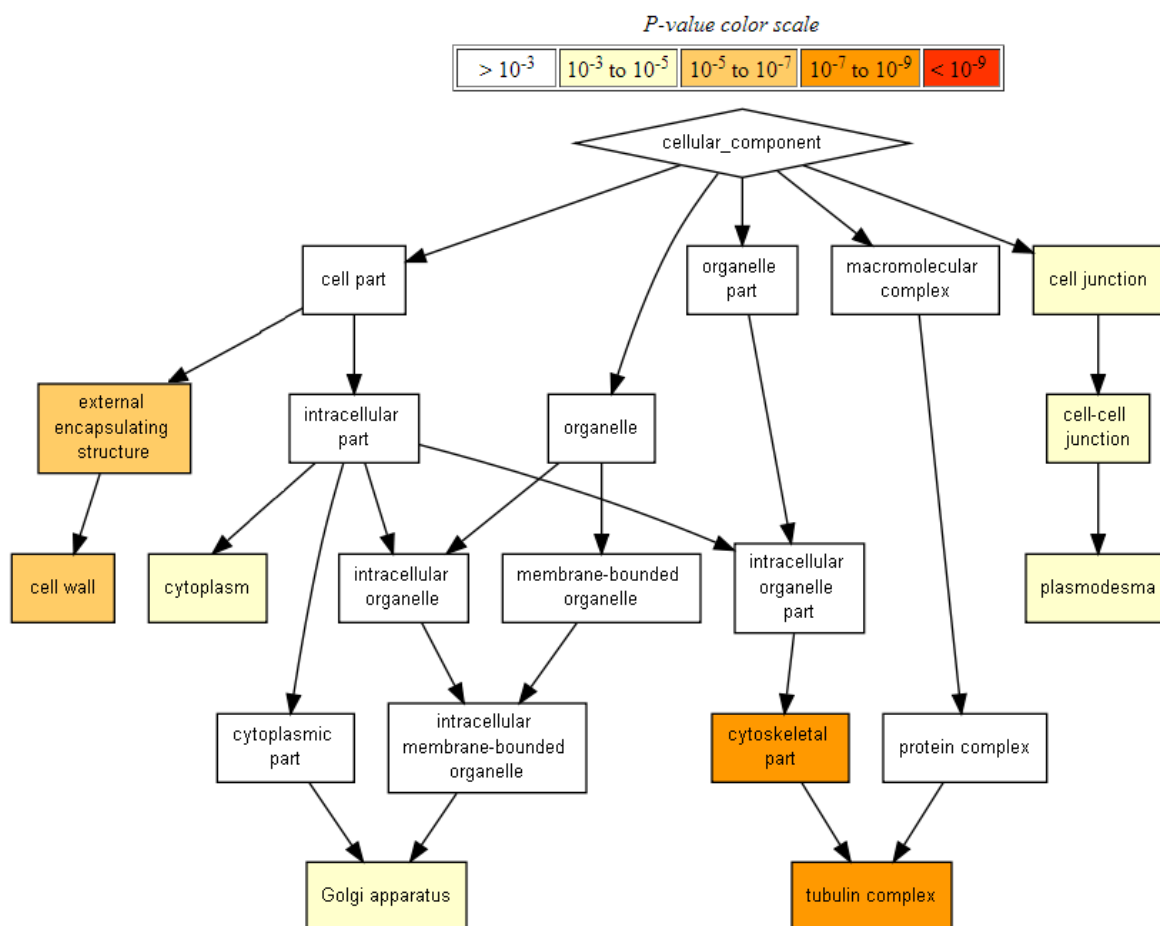
Po vložení seznamu proteinů do databáze Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool (GORilla) a DAVID Bioinformatics Resources 6.7 jsme zjistili, že cytokinin-interagující proteiny purifikované na afinitním mosiči s ligandem $iP(C^2)$ se podílejí zejména na organizaci cytoskeletu, účastní se metabolismu cukrů, lipidů a proteinů. Svou roli hrají i při intracelulárním transportu, reakci na stres a skládání proteinů (Obr. 19 a Obr. 20). Z těchto procesů je patrná i jejich lokalizace v buňce (Obr. 21)



Obr. 19 Rozdělení proteinů interagujících s ligandem $iP(C^2)$ do funkčních klastrů pomocí databáze DAVID Bioinformatics Resources.



Obr. 20 Schéma rozdělení proteinů izolovaných ligandem iP(C²) podle buněčných procesů, v nichž jsou zapojeny (GORilla).



Obr. 21 Schéma rozdělení proteinů navázaných na ligand iP(C²) podle místa výskytu v rámci buňky (GORilla).

4.3.3 Vliv volného iP na interakci proteinů s afinitními ligandy

Při porovnání variant bez a s kompetitorem jsme pozorovali, signifikantní snížení nebo naopak nárůst koncentrace určitých proteinů. Jako statisticky významné byly brány v potaz případy, kdy došlo k poklesu či nárůstu koncentrace o 50 % a více. Tyto jevy se objevily u obou ligandů.

V pulldownech s volným iP bylo pozorováno 43 proteinů, které byly v nadbytku oproti variantám bez kompetitoru. Soudíme, že by tento jev mohl být způsoben vyvázáním proteinů s vyšší afinitou k imobilizovanému ligandu iP. Na neobsazená místa se následně navážou proteiny s nižší afinitou. Jde pouze o domněnku, protože tento již dříve pozorovaný fenomén zatím nebyl objasněn.

Lze předpokládat, že proteiny specificky interagující s iP budou vykazovat větší afinitu k volnému cytokininu než k imobilizovanému ligandu. Proto jsme těmto proteinům věnovali zvláštní pozornost.

Ve variantách s kompetitorem došlo k vytěsnění celkem 35 proteinů. Tyto proteiny jsou zapojeny v organizaci cytoskeletu, metabolických drahách sacharidů, lipidů a proteinů, vezikulárním transportu, odpovědi na stres atd. (Tab. 7). Tyto poznatky podporují závěry studie skupiny I. Chamráda, která purifikovala proteiny pomocí afinitního gelu s imobilizovaným benzyladeninem. Cytokinin-interagující proteiny izolované na tomto nosiči také souvisely zejména s organizací cytoskeletu, metabolismem sacharidů a odpovědí na abiotické stimuly. (Chamrád I, et al., submitted). Vzhledem k pozorováním ukazujícím na vliv cytokininů na tyto fyziologické procesy existuje reálná šance, že skupina námi identifikovaných proteinů obsahuje proteiny skutečně specificky interagující s cytokininy.

Tab. 7 Seznam proteinů, které byly vytěsněny při kompetici ligandu s volným iP. Proteiny jsou rozděleny do skupin podle buněčných procesů, do nichž jsou zapojeny.

Ligand	Biologický proces	Protein
C2	organizace cytoskeletu	AT4G14960 protein
N9		Actin-1 Tubulin beta-9 chain
C2	metabolismus cukrů	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-2, mitochondrial Fructose-bisphosphate aldolase Phosphoglucomutase
N9		At1g16300 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial
C2	metabolismus tuků	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha, chloroplastic Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase
N9		-
C2	metabolismus proteinů	60S ribosomal protein L12-3 40S ribosomal protein S14-2 Elongation factor Tu, mitochondrial Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G Cysteine proteinase RD21a 26S protease regulatory subunit S10B homolog B 26S proteasome regulatory subunit N8
N9		26S protease regulatory subunit 6A homolog A 26S proteasome regulatory subunit 4 homolog B
C2	buněčný transport	Ras-related protein RABA1f Coatomer subunit gamma Nuclear transport factor 2B Coatomer subunit epsilon-1
N9		-
C2	odpověď na stres	Polyadenylate-binding protein RBP47B
N9		Heat shock 70 kDa protein 3
C2	skládání proteinů	Chaperonin CPN60-like 1
N9		Heat shock 70 kDa protein 3
C2	buněčný cyklus	-
N9		Cell division control protein 48 homolog A
C2	fotosyntéza	-
N9		Protochlorophyllide reductase B, chloroplastic
C2	nespecifikováno	Probable rhamnose biosynthetic enzyme 1 At5g54100 AT3g17020/K14A17_14 Heat intolerant 1 protein COP9 signalosome complex subunit 5b
N9		-

5 Závěr

Výzkum v oblasti fytohormonů, konkrétně cytokininů, stále není uzavřenou záležitostí. Zdaleka nejsou objasněny všechny mechanismy, procesy a interakce související s těmito rostlinnými hormony.

Problematika hledání a identifikace nových potenciálních vazebných partnerů s aromatickými cytokininy je již řešena delší dobu proteomickou skupinou v čele s Mgr. Reném Lenobelem, Ph.D. Objevení nových proteinů interagujících s cytokininy může napomoci k odhalení mechanismů důležitých fyziologických účinků na molekulární úrovni.

Tato bakalářská práce se zabývala purifikací cytokinin-interagujících proteinů z rostlinného materiálu, konkrétně ze suspenzní kultury protoplastů modelové rostliny *A. thaliana*. Základem tohoto výzkumu byla příprava afinitních gelů s imobilizovanými molekulami isoprenoidního cytokininu isopentenyladeninu (iP). Byly vybrány dva ligandy, deriváty iP, které vykazovaly cytokininovou aktivitu. Každý z nich byl na matici navázán přes jiný atom (C^2 a N^9). Vazba v protilehlých oblastech molekuly byla zvolena, protože doposud není přesně známo, s jakou orientací se cytokininy na proteiny vážou.

Dalším krokem nezbytný pro úspěšné provedení experimentů bylo získání dostatečného množství proteinů v nativní konformaci. Pro ověření správného provedení procedury purifikace afinitní chromatografií jsme použili metodu SDS-PAGE. Separované proteiny byly následně rozštěpeny a identifikovány pomocí MS/MS „bottom up“ metodiky a stanoveny label-free kvantifikací.

Z našich pozorování vyplývá, že ligand připojený k afinitní matici přes uhlík C^2 je vhodnější pro purifikaci cytokinin-interagujících proteinů, protože se pomocí takto imobilizovaného iP separovalo podstatně více proteinů. Otázkou zůstává, nakolik specifická je vazba proteinů s tímto ligandem.

Pomocí databáze jsme určili biologické procesy, do kterých se identifikované cytokinin-interagující proteiny zapojují. Překvapením bylo, že značná část proteinů se podílí na organizaci cytoskeletu. Dále se purifikované proteiny účastní metabolických pochodů sacharidů, tuků a bílkovin, odpovědi na abiotický stimul a buněčného transportu.

Naše poznatky otevřely řadu nových otázek a hypotéz. V budoucnu by mělo proběhnout ověření specifity vazby identifikovaných proteinů s iP a hledání nových potenciálních cílů zbývajících izoprenoidních cytokininů.

Doufám, že moje bakalářská práce přispěla k dalšímu krůčku poznání na poli vědy.

6 Seznam použité literatury

Brault M, Caiveau O, Pedron J, Maldiney R, Sotta B, Miginiac E (1999) Detection of membrane-bound cytokinin-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* cells. *Europ J Biochem/FEBS* 260, 512 – 519

Brault M, Maldiney R (1999) Mechanism of cytokinin action. *Plant Physiol Biochem* 37, 403 – 412

Brinegar AC (1994) Cytokinin binding proteins and receptors. In Mok DWS, Mok MC (eds) *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Pp 217 – 232. CRC press, USA

Brinegar AC, Fox JE (1985) Resolution of the subunit composition of a cytokinin-binding protein from wheat embryos. *Biol Plant* 27, 100 – 104

Brinegar AC, Stevens A, Fox JE (1985) Biosynthesis and degradation of a wheat embryo cytokinin-binding protein during embryogenesis and germination. *Plant Physiol* 79, 706 – 710

Daub H (2005) Characterisation of kinase-selective inhibitors by chemical proteomics. *Biochim Biophys Acta* 1754, 183-190

Guiffant D, Tribouillard D, Gug F, Galons H, Meijer L, Blondel M, Bach S (2007) Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnol J* 2, 68 – 75

Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinokazi K, Kato T, Tabata S et al. (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8821 – 8826

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2008) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44 – 57

Chamrád I, Simerský R, Kania J, Mik V, Švehlová L, Šebela M, Strnad M, Lenobel R (submitted), Chemical proteomic analysis of aromatic cytokinin molecular partners in wheat.

- Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catala C, Saladie M, Rose JKC (2006) Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc* 1, 769 – 774
- Kamínek M, Trčková M, Fox JE, Guadinová A (2003) Comparison of cytokinin-binding proteins from wheat and oat grains. *Physiol Plant* 117, 453 – 458
- Keim P, Erion J, Fox JE (1981) The current status of cytokinin-binding moieties. In: Guern J, Peaud-Lenoël C (eds): *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins*. Pp 179 – 190. Springer-Verlag, Německo
- Klouda P (2003) Hmotnostní spektrometrie. In: *Moderní analytické metody*. Pp. 50 – 53. Pavel Klouda, ČR
- Letham DS (1973) Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry* 12, 2445 – 2455
- Liu H, Sadygov RG, Yates JR III (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* 76, 4193 – 4201
- Luštinec J, Žárský V (2006) Fytohormony. In: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Pp. 191 – 196. Karolinum, ČR
- Macháčková I (1998) Růstové regulátory. In: Leinerová E (ed): *Fyziologie rostlin*. Pp. 240 – 285. Academia, ČR
- Méchin V, Damerval C, Zivy M (2007) Total Protein Extraction with TCA-Acetone. In: Thiellement H, Zivy M, Damerval C, Méchin V (eds): *Plants proteomics: Methods and Protocols*. Pp. 1 – 8. Human Press Inc., USA
- Miller CO, Skoog F, von Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 77, 1392 – 1392
- Mothes K, Engelbrecht L (1961) Kinetin-induced transport substances in excised leaves in the dark. *Phytochemistry* 1, 58 – 62
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1365 – 1377

- Pavlová L (2005) Fytohormony a regenerace rostlin. In: Fyziologie rostlin, 1 edice. Pp. 234 – 241. Karolinum, ČR
- Pingoud A, Urbanke C, Hoggett J, Jeltsch A (2002) Electrophoresis. In: Biochemical Methods: a concise guide for students and researchers, Pp. 106 – 137. Wiley-VCH, Německo
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nat Protoc 2, 1896 – 1906
- Rigaut G, Shevchenko A, Ruty B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat Biotechnol 17, 1030 – 1032
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. Anal Chem 68, 850 – 858
- Schimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H (2008) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. Plant Mol Biol 69, 429 – 435
- Taiz L, Zeiger E (2010) Cytokinins: Regulators of Cell Division. In: Plant physiology, 5. edice. Pp. 621 – 648. Sinauer Associates, USA
- To JP, Haberer G, Ferreira FJ, Deruere J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. Plant Cell, 16, 658 – 671
- Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M (2006) A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissue for proteomic analysis. Electrophoresis, 27, 2782 – 2786
- Weiss W, Görg A (2007) Two-Dimensional Electrophoresis for Plant Proteomics. In: Thiellement H, Zivy M, Damerval C, Méchin V (eds): Plants proteomics: Methods and Protocols. Pp. 121 – 143. Human Press Inc., USA
- Westermeier R, Naven T, Höpker H-R (2008) Proteomics in practice. Wiley-VCH, GER.

Yates JR, III (2011) A century of mass spektrometry: from atoms to proteomes.
Nat Methods, 8, 633 – 637

Zhu W, Smith JW, Huang Ch-M (2010) Mass spectrometry-Based Label-Free Quantitative
Proteomics. J Biomed Biotechnol, 2010, 1 – 6