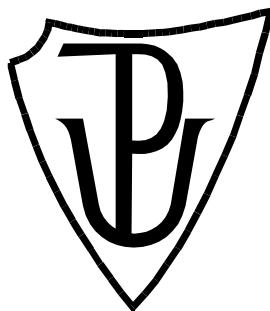


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Príprava dvojrozmerných polyakrylamidových gélov z proteínových extraktov koreňov Lucerny siatej

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Jakub Petrovaj
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný obor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok:	2019

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých zdrojov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúci zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

Moje poďakovanie patrí vedúcemu mojej práce doc. Ing Tomášovi Takáčovi, Ph.D., za jeho cenné rady a pripomienky, trpezlivosť a za čas, ktorý mi ochotne venoval pri vypracovaní bakalárskej práce. Rád by som poďakoval aj pánovi prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi DrSc. a oddeleniu bunkovej biológie v Centre regiónu Haná pre biotechnologický a zemědělský výskum za príjemné pracovné prostredie a možnosť pracovať v ich laboratóriách. V neposlednom rade ďakujem mojej rodine za podporu pri písaní tejto bakalárskej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Jakub Petrovaj
Názov práce	Príprava dvojrozmerných polyakrylamidových gélov z proteínových extraktov koreňov Lucerny siatej
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Proteomika je disciplína zaoberajúca sa analýzou kompletného proteínového zloženia biologického materiálu. Dvojrozmerná elektroforéza je v proteomike bežne používanou separačnou metódou, často využívanou aj na detekciu fosforylácie. Dôležitým predpokladom úspešnej separácie bielkovín pomocou dvojrozmernej elektroforézy je extrakcia. V predloženej bakalárskej práci sme sa zaoberali optimalizáciou extrakčného protokolu pre proteíny z koreňových pletív lucerny siatej. Optimalizovaním obsahu proteínov a prípravou čerstvého farbiva sa docielilo detekcie pomerne vysokého počtu škvŕn. Zistili sme tiež, že už 30 minútové ovplyvnenie rastlín lucerny peroxidom vodíka vyvoláva značné kvalitatívne a kvantitatívne zmeny v proteínových škvŕnách na dvojrozmerných géloch. Stresom indukovaná mitogénom aktivovaná proteínkináza (SIMK) je kináza dôležitá pre rôzne stresové odpovede lucerny. Kombináciou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania s použitím primárnej protilátky rozpoznávajúcej blízky heterológ SIMK u Arabidopsis, MPK6, sme detegovali spolu 6 škvŕn s molekulovou hmotnosťou zhodnou so SIMK. Špecificita týchto škvŕn musí byť experimentálne testovaná. Použitím jednorozmernej elektroforézy a imunoblotovania sme zistili, že SIMK nemení výrazne svoju abundanciu v odpovedi na 30 minútové pôsobenie peroxidu vodíka. Detekcia fosforylácie SIMK pomocou fosfošpecifickej protilátky však ukázala výraznú fosforyláciu. Výsledky naznačujú, že SIMK môže byť v rastlinách lucerny zapojená do signalizácie oxidatívneho stresu, napríklad pri soľnom strese alebo imúnnej odpovedi.

Kľúčové slová	Dvojrozmerná elektroforéza, SIMK, imunoblotovanie, oxidatívny stres, fosforylácia, proteomika
Počet stran	64
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Petrovaj
Title	Preparation of two-dimensional polyacrylamide gels from <i>Medicago sativa</i> root protein extracts
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Proteomics is a powerful method involved in identification of a protein composition of complex biological samples. Two-dimensional electrophoresis is a common separation technique used in proteomics, which is often exploited also to identify protein phosphorylation. Proper protein separation on twodimensional gels is preconditioned by efficient extraction. Within this thesis we aimed to optimize the protein extraction from root tissues of alfalfa. We have found, that 100 μ g protein load and usage of fresh staining solution appeared as important determinators of the gel quality. We have also found that a 30 minutes long hydrogen peroxide treatment lead to significant qualitative and quantitative changes in two-dimensional gel spot patterns. A stress induced mitogen activated protein kinase (SIMK) is a kinase important for induction of multiple stress responses in alfalfa. According to our results, SIMK is phosphorylated in response to hydrogen peroxide (as found by immunoblotting using phosphospecific antibody), while its abundance does not substantiately change. Combining two-dimensional electrophoresis with imunoblotting (using primary antibody recognizing a close heterologue of SIMK in *Arabidopsis* called MPK6) did not show obvious differences between control and hydrogen peroxide treatment. In conclusion, our results show that SIMK may be involved in oxidative stress signalling in alfalfa, likely induced by salt stress or immune response.

Keywords	Two-dimensional electrophoresis, SIMK, immunoblotting, oxidative stress, phosphorylation, proteomics
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Slovak

Ciele práce

- Vypracovanie literárnej rešerše obsahujúcej kľúčové slová: Lucerna siata, proteomika, dvojrozmerná elektroforéza, metódy extrakcie proteínov, mitogénom aktivované proteínkinázy, súčasný stav proteomickej analýzy lucerny siatej.
- Získanie praxe v činnostiach spojených s kultiváciou rastlín a dvojrozmernou elektroforézou.
- Optimalizácia fenolovej extrakcie proteínov z koreňov lucerny siatej.
- Príprava a vyhodnotenie dvojrozmerných polyakrylamidových gélov.
- Detekcia abundancie SIMK proteínu v kontrolných a peroxidom ovplyvnených rastlinách lucerny siatej.
- Detekcia SIMK proteínu lucerny siatej dvojrozmernou elektroforézou v kombinácii s immunoblotovaním.
- Detekcia fosforylácie MAPK pomocou imunoblotovania s použitím fosfošpecifickej protilátky.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	9
2.1	Lucerna siata a jej využitie	9
2.2	Proteomika	10
2.2.1	Bottom up a top down proteomické prístupy.....	10
2.2.2	Kvantitatívna proteomika.....	11
2.2.3	Cielená proteomika	12
2.3	Metódy extrakcie proteínov pre proteomické analýzy z celkového proteómu .	13
2.3.1	Extrakcia kyselinou trichlóroctovou v kombinácii s acetónom.....	13
2.3.2	Fenolová extrakcia	14
2.4	Dvojrozmerná elektroforéza	16
2.4.1	Využitie dvojrozmernej elektroforézy na určovanie post-translačných modifikácií bielkovín	17
2.4.2	Dvojrozmerná elektroforéza v kombinácii s imunoblotovaním	17
2.4.3	Modrá natívna polyakrylamidová gélová elektroforéza	18
2.5	Súčasný stav proteomickej analýzy lucerny siatej.....	20
2.6	Fosforylácie bielkovín	24
2.7	Mitogénom aktivované proteínkinázy	25
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
3.1	Materiál	27
3.1.1	Použitý biologický materiál	27
3.1.2	Použité chemikálie	27
3.1.3	Použité prístroje	29
3.1.4	Použité protilátky	30
3.2	Metódy	30
3.2.1	Príprava rastlinného materiálu	30
3.2.2	Ovplyvnenie rastlín oxidatívnym stresom	30
3.2.3	Extrakcia proteínov pre dvojrozmernú elektroforézu	31
3.2.4	Meranie koncentrácie bielkovín.....	32
3.2.5	Dvojrozmerná elektroforéza	32
3.2.6	Imunoblotovanie dvojrozmerných gélov	33
3.2.7	Extrakcia proteínov a príprava vzorky pre SDS-PAGE	35
3.2.8	SDS-PAGE a imunoblotovanie.....	36
3.2.9	Počet biologických replík	36
4	VÝSLEDKY	37
4.1	Príprava dvojrozmerných gélov z koreňov lucerny a arábkovky	37
4.2	Porovnanie dvojrozmerných gélov z proteínových extraktov rastlín lucerny vystavených peroxidu vodíka	38
4.3	Imunoblotová analýza SIMK pomocou SDS-PAGE.....	40
4.4	Detekcia SIMK pomocou imunoblotovania s použitím dvojrozmerných gélov	41
4.5	Detekcia fosforylácie MAPK pomocou imunoblotovania s použitím fosfošpecifickej protilátky	45
4.6	Predikcia fosforylačných miest a ich kináz v aminokyselinovej sekvencii SIMK proteínu	46
5	DISKUSIA	49
6	ZÁVER.....	53
7	LITERATÚRA.....	54
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	63

1 ÚVOD

Lucerna siata je významná plodina s vysokou nutričnou hodnotou a schopnosťou obohacovať pôdu o dusík prostredníctvom symbiotických interakcií s baktériami. Meniace sa klimatické podmienky silno ovplyvňujú jej najcennejšie vlastnosti vrátane produkcie biomasy. Z tohoto dôvodu je potrebné vynakladať úsilie na zlepšovanie jej vlastností akými sú interakcie so symbiotickými baktériami s vlastnosťami viazať dusík, nutričného zloženia a na zvyšovanie jej odolnosti voči abiotickým a biotickým stresom. K tomuto môže výrazne napomôcť štúdium signalizácie mitogénom aktivovanými proteín kinázami (MAPK), pretože tieto sú významné predovšetkým v odolnosti voči stresom. V procese signalizácie hrá dôležitú úlohu aj fosforylácia, ktorá zabezpečuje prenos signálu. Proteomika je považovaná za biotechnologickú metódu, ktorá umožňuje kvantitatívne a kvalitatívne analyzovať bielkovinové zloženie biologického materiálu, čo môže poslúžiť ako indikátor endogénnych procesov. V rámci proteomických analýz je dvojrozmerná elektroforéza tradičnou separačnou technikou. Okrem zistenia proteomického profilu je v kombinácii s imunoblotovaním efektívnou metódou zisťovania post-translačných modifikácií, ako napríklad fosforylácia.

Lepšie poznanie MAPK lucerny a aplikácia proteomických metód môžu byť sľubným základom pre biotechnologické aplikácie v zlepšovaní dôležitých poľnohospodárskych vlastností lucerny.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Lucerna siata a jej využitie

Lucerna siata (*Medicago sativa*) je modrofialovo kvitnúca trváca strukovina pochádzajúca z malej a strednej Ázie. Kvitnutie tejto rastliny sa uvádza od mája do septembra (Deyl a Hisek, 2001). Strukoviny, taktiež známe ako bôboviny, sú veľmi rozmanitou a ekonomicky dôležitou skupinou rastlín. Lucerna je výborným zdrojom sacharidov, bielkovín, minerálov a vitamínov (Tharanathan a Mahadevamma, 2003; Hao *et al.*, 2008; NLO, 2010). Obsahuje 15 až 22% surovej bielkoviny na báze sušiny, ako aj všetky makro a stopové minerály a všetky vitamíny rozpustné v tukoch a vo vode (Scholtz, 2008). Vďaka týmto nutričným vlastnostiam je vhodná na kŕmenie hydiny a ošípaných (Adapa *et al.*, 2007). Lucerna sa používa hlavne na výrobu sena a siláže, ale môže sa používať aj na účely pastvy, pretože má vysoký výťažok, kvalitu a širokú prispôsobivosť rôznym klimatickým podmienkam a pôdnym typom (NLO, 2010).

Práve kvôli intenzívnemu poľnohospodárskemu využitiu nachádza lucerna siata význam aj vo vede a stala sa tak modelovou rastlinou pre štúdium biológie strukovín, ako je sója (*Glycine max*), alebo druhy rodu *Trifolium* (Singh *et al.*, 2007). Väčšina členov tejto obrovskej rodiny má schopnosť fixovať atmosférický dusík prostredníctvom endosymbiotickej asociácie s rhizobiálnymi baktériami. Pri tejto symbióze strukoviny prechádzajú noduláciou, procesom tvorby koreňových uzlín (Jones *et al.*, 2007). Baktériám druhu *Rhizobium* sa darí vo vnútri týchto uzlín a fixujú atmosférický dusík výmenou za zdroj uhlíka, ktorý im poskytuje rastlina (Venkateshwaran a Ané, 2011). Lucerna má schopnosť fixovať 200–300 kg dusíka na jeden hektár pôdy (Slavík, 2000). Lucerna je tiež schopná vytvárať symbiotické asociácie s arbuskulárnymi mykoríznyimi hubami, ktoré uľahčujú získavanie rôznych živín (fosfor, dusík atď.) a poskytujú určitú ochranu pred environmentálnymi stresmi (Ben Laouane *et al.*, 2019). Lucerna sa stala stredobodom moderného poľnohospodárstva a civilizácie tiež kvôli jej schopnosti rásť v pôdach s vyčerpaným dusíkom a dopĺňať dusík. Sú snahy a štúdie na zlepšovanie jej nutričných vlastností a odolnosti voči vonkajším nepriaznivým podmienkam, ktoré na vývoj a výnos majú veľký vplyv (Scholtz, 2008; Ovečka *et al.*, 2014). V súčasnosti je taktiež veľký záujem o pochopenie molekulárnych dráh a udalostí, ktoré umožňujú lucerne rozpoznať jej symbionty, vyvinúť koreňové uzliny a efektívnejšie fixovať dusík (Oldroyd a Downie, 2008).

2.2 Proteomika

Termín proteomika bol prvýkrát použitý koncom 90-tych rokov, konkrétne v roku 1997 (James, 1997). Proteomika sa zaoberá analýzou kompletného proteínového obsahu bunky, tkaniva alebo organizmu pod špecifickým, definovaným súborom podmienok (Yu *et al.*, 2010). Proteóm je súbor všetkých proteínov obsiahnutých v organizme (Clark a Pazdernik, 2013). Pretože sa proteíny menia v závislosti na rôznych podmienkach, proteóm má dynamický charakter a tak sa prispôsobuje novým podmienkam a prostrediu. Mení sa v závislosti na stupni vývoja organizmu v čase, podmienkach, ktorým je organizmus vystavený a na konkrétnom stave, v akom sa proteíny z hľadiska pomeru syntézy a proteolýzy vyskytujú (Clark a Pazdernik, 2016). Proteomika tak umožňuje identifikovať proteínové zloženie biologického materiálu, definovať kvantitatívne a kvalitatívne zmeny abundancie veľkého počtu proteínov, post-translačné modifikácie v odozve na rôzne podnety, ale aj proteín-proteínové interakcie (Baginsky, 2009). Štúdium proteómov, ktorý podlieha sústavnému progresu, bežne zahŕňa vysokovýkonné metódy založené na hmotnostnej spektrometrii (MS) pre identifikáciu a kvantifikáciu proteínov (Gautron *et al.*, 2011). Tento posun bol významne ovplyvnený vývojom v MS a bioinformatických metód. MS je v súčasnosti štandardom pre kvantitatívne merania v proteomike (Bantscheff *et al.*, 2007).

2.2.1 Bottom up a top down proteomické prístupy

Z hľadiska cieľov proteomickej analýzy sa proteomické prístupy rozdeľujú na tzv. „bottom up“ a „top down“. Líšia sa pracovnými postupmi, náročnosťou prípravy vzorky, MS, bioinformatickým spracovaním dát, ale predovšetkým získanými informáciami.

Tzv. prístup zdola nahor tzv. „bottom up“ sa široko používa na vysokovýkonnú identifikáciu proteínov a určenie podrobností ich sekvencie a posttranslačných modifikácií (Aebersold a Mann, 2003). Pri tomto prístupe sa proteíny, ktoré sú predmetom záujmu, štiepia proteázou, ako je napríklad trypsín, a výsledné peptidy sa analyzujú ionizáciou elektrosprejom (ESI) alebo laserovou desorpčnou ionizáciou s podporovanou maticou (MALDI). Najprv sa stanovujú hmotnosti intaktných tryptických peptidov. Potom sú tieto peptidové ióny fragmentované v plynnej fáze, čím sa získajú informácie o ich sekvencii a modifikáciách. Touto metódou je možné identifikovať veľké množstvá proteínov v zmesi (Zhang a Shi, 2018). Prístup zdola nahor je obzvlášť užitočný na identifikáciu proteínov, pretože peptidy sa ľahšie solubilizujú a separujú, narozdiel od rodičovských proteínov. Okrem toho je možné mnoho peptidov ľahko analyzovať

hmotnostnou spektrometrickou analýzou, pričom sa získajú užitočné fragmentačné dáta, ktoré často poskytujú dostatočné informácie na identifikáciu rodičovského proteínu. Nevýhodou je, že sa strácajú cenné informácie o celistvosti sekvencie a iba malá frakcia peptidov je normálne detegovaná a poskytuje užitočné fragmentačné rebríky tzv. „fragmentation ladders“ (Ogorzalek *et al.*, 2005).

Pri prístupe zhora nadol tzv. „top down“ sa intaktné proteínové ióny zavádzajú do plynnej fázy pomocou ESI a následne sa fragmentujú v hmotnostnom spektrometri, čím sa získajú molekulové hmotnosti proteínových i fragmentových iónov. Ak sa pozoruje dostatočný počet informatívnych fragmentových iónov, táto analýza umožní 100% pokrytie sekvencie, poskytnúť úplný opis primárnej štruktúry proteínu, alternatívnych zosterihov, charakterizovať všetky proteoformy, ako aj akékoľvek alternatívne varianty spájania či korelácie, ktoré existujú medzi týmito modifikáciami (Smith a Kelleher, 2013).

2.2.2 Kvantitatívna proteomika

Proteomika založená na kvapalinovej chromatografii a hmotnostnej spektrometrii (LC-MS/MS) zásadne zmenila spôsob, akým sa biologické systémy skúmajú kvôli svojej schopnosti merať tisíce proteínov a posttranslačných modifikácií (PTM) paralelne. Umožňuje to skúmanie na všetkých úrovniach biologickej komplexnosti, od proteínových komplexov až po celé populácie jedincov (Mallick a Kuster, 2010). Zatiaľ čo pred niekoľkými rokmi väčšina proteomických experimentov iba vymenovala proteínové zložky biologického systému, kvantitatívne merania sú v tejto dobe v centre prakticky každej proteomickej štúdie (Bantscheff *et al.*, 2007). Pre presnú kvantifikáciu je preto všeobecne potrebné porovnať kvantitu každého peptidu jednotlivo medzi vzorkami. To sa dá technicky dosiahnuť mnohými spôsobmi.

Jeden zo hlavných spôsobov je založený na teórii stabilného izotopového značenia a uvádza, že stabilný izotopovo značený peptid je chemicky identický s jeho natívnym náprotivkom, a preto sa tieto dva peptidy tiež chovajú identicky počas chromatografickej a/alebo hmotnostnej spektrometrickej analýzy. Vzhľadom na to, že hmotnostný spektrometer dokáže rozpoznať hmotnostný rozdiel medzi značenými a neoznačenými formami peptidu, kvantifikácia sa dosiahne porovnaním ich príslušných intenzít signálu. (Ong a Mann, 2005). Stabilné značenie izotopov aminokyselinami (SILAC) bolo zavedené do proteomiky v roku 1999 tromi nezávislými laboratóriami (Gygi *et al.*, 1999;

Oda *et al.*, 1999; Paša-Tolić *et al.*, 1999) a odvtedy sa v tejto oblasti široko rozšírilo. Izotopové značky môžu byť zavedené ako vnútorný štandard do aminokyselín (i) metabolicky, (ii) chemicky a (iii) enzymaticky alebo alternatívne ako externý štandard s použitím obohatených syntetických peptidov (Ong a Mann, 2005).

Nedávno sa objavili alternatívne stratégie, často označované ako kvantifikácia bez značenia. Metódy bez značenia sa zameriavajú na porovnávanie dvoch alebo viacerých experimentov (i) porovnaním intenzity spektrometrického signálu pre akýkoľvek daný peptid alebo (ii) použitím získaných spektier v párovaní s peptidom/proteínom ako ukazovateľom ich príslušného množstva vo vzorke tzv. „label free“ (Old *et al.*, 2005)

2.2.3 Cílená proteomika

Schopnosť detegovať a kvantifikovať proteíny alebo súbory proteínov s vysokou presnosťou vo viacerých vzorkách je základnou úlohou v biologickom a biomedicínskom výskume. V poslednej dobe sa monitorovanie vybraných reakcií (SRM) ukázalo ako sľubná technika pre presnú kvantifikáciu cieľových proteínov (Kuhn *et al.*, 2004; Picotti *et al.*, 2009; Anderson a Hunter, 2006) vzhľadom na jeho vysokú citlivosť (Onisko *et al.*, 2007), dynamický rozsah (Stahl-Zeng *et al.*, 2007), špecificitu (Lange *et al.*, 2008) a reprodukovateľnosť (Addona *et al.*, 2009). Pôvodne bolo toto monitorovanie aplikované na meranie malých molekúl ako sú metabolity alebo farmaceutiká (Zweigenbaum a Henion, 2000). SRM je technika hmotnostnej spektrometrie na detekciu a kvantifikáciu špecifických, vopred určených analytov so známymi fragmentačnými vlastnosťami v komplexnom prostredí.

SRM sa najčastejšie používa v kombinácii kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS), kde kapilárna chromatografická kolóna je zapojená v rade k elektrosprejovému ionizačnému (ESI) zdroju hmotnostného spektrometra. SRM využíva jedinečnú schopnosť trojitých kvadrupólových (QQQ) hmotnostných spektrometrov. Kvadrupóly pôsobia ako hmotnostné filtre a selektívne monitorujú špecifický molekulový ión analytu a jeden alebo niekoľko fragmentových iónov generovaných z analytu kolíznou disociáciou. Prvý filter vyberie cieľové ióny pre izoláciu v Q1 (t.j. selekcia prekursorových iónov), izolované ióny sa potom podrobia disociácii kolíziou v Q2 a vyberú sa špecifické ióny na detekciu v Q3 (t.j. selekcia fragmentových iónov) (de Hoffmann a Stroobant, 2007). To, že sa SRM stala mocnou metódou cíleného detegovania a kvantifikácie je vo veľkej miere spôsobené pokrokom

v prístrojovej technike a vývojom softvérov (MacLean *et al.*, 2010; Cham Mead *et al.*, 2010; Brusniak *et al.*, 2011).

2.3 Metódy extrakcie proteínov pre proteomické analýzy z celkového proteómu

Najkritickejším krokom proteomickej analýzy je príprava a extrakcia vzorky. V tomto ohľade zahŕňa proteomická analýza rastlinných pletív množstvo praktických výziev, ktoré sú typicky problematickejšie ako u iných organizmov. Okrem toho, že majú relatívne nízke koncentrácie proteínov, rastlinné pletivá sú často bohaté na proteázy a zložky, ktoré silne zasahujú do elektroforetickej separácie a analýzy proteínov na géli, vrátane polysacharidov bunkovej steny, zásobných látok, lipidov, terpénov, organických kyselín, fenolových zlúčenín a širokého spektra sekundárnych metabolitov (Granier, 1988; Gegenheimer, 1990; Tsugita a Kamo, 1999). Niektoré fenolické látky sa po oxidácii môžu ireverzibilne viazať s proteínmi napríklad chinóny, sa na proteíny viažu kovalentnou väzbou (Loomis, 1990). Takéto kontaminanty sú zvláštnym problémom pre 2-DE často vedúce k horizontálnym a vertikálnym pruhom, rozmazaniu a zníženiu počtu zreteľne rozlíšiteľných proteínových škvŕn. Cieľom extrakcie je zabezpečiť oddelenie týchto interferujúcich a neproteínových zložiek od proteínov a doceliť tak veľký počet vysoko-rozlišiteľných škvŕn. Medzi najčastejšie metódy extrakcie proteínov z rastlinných vzoriek patria extrakcia trichlóroctovou kyselinou v kombinácii s acetónom a fenolová extrakcia.

2.3.1 Extrakcia kyselinou trichlóroctovou v kombinácii s acetónom

Vyzrážanie proteínov z homogenizovaného pletiva alebo buniek pomocou TCA (10% w/v) v acetóne. TCA/acetón je často používaný spôsob extrakcie proteínov, ktorý pôvodne vyvinuli Damerval *et al.* (1986) na extrakciu bielkovín kľíčencov pšenice. Protokol je založený na denaturácii proteínov v kyslých a hydrofóbných podmienkach, ktoré pomáhajú koncentrovať proteíny a odstraňovať kontaminanty. Zrážanie TCA/acetónom alebo zrážanie metanolom a octanom amónnym sa považujú za nevyhnutnosť pri zaobchádzaní s odolnými pletivami, aby sa získal vysoko kvalitný bielkovinový profil pre 2-DE (Carpentier *et al.*, 2005).

Extrakcie TCA/acetónom je použiteľná pre rastlinný materiál rôzneho pôvodu. Rastlinné pletivá sú bohaté na proteázy, čo pri extrakcii spôsobuje proteolytickú degradáciu proteínov (Saravanan a Rose, 2004). Avšak homogenizácia rastlinných pletív

TCA/acetónom (predchladenom na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) takmer okamžite inaktivuje proteázy a vyzráža proteíny. Tento prístup je veľmi cenený pre inhibíciu proteáz (Damerval *et al.*, 1986) ale aj fenoloxidáz a peroxidáz (Granier, 1988; Saravanan a Rose, 2004), čím sa zvyšuje koncentrácia bielkovín a odstraňujú kontaminanty, hoci niektoré polymérne kontaminanty sú často koextrahované. Toto je zvláštny problém, ktorý sa týka pletív bohatých na polysacharidy rozpustných bunkových stien a polyfenolické zlúčeniny. Následná resolubilizácia proteínov v resolubilizačnom pufri obsahujúcom chaotrópy a detergenty, napríklad močovinu, nie je sprevádzaná žiadnou reaktiváciou proteáz (Damerval *et al.*, 1986, Granier, 1988; Saravanan a Rose, 2004). Výsledné precipitáty z precipitácie TCA/acetónom však môžu byť ťažko rozpustné (Chen a Harmon, 2006), takže sa musí použiť účinný resolubilizačný pufor, aby sa zabezpečila účinná resolubilizácia vyzrážaného proteínu.

Užitočnosť tejto metódy bola preukázaná napríklad v experimente Wu a Wanga (1984) u vyvíjajúcich sa peľníc petúnie a *V. faba*, ktoré majú vysokú proteolytickú aktivitu. Táto metóda je tiež vhodná na analýzu celkových proteínov z listov petúnie (*Petunia parodii*), bôbu záhradného (*Vicia faba*) a z kalusov pupenca roľného (*Convolvulus arvensis*) (Wu a Wang, 1984). Tento protokol bol úspešne použitý s pletivami z mladých rastlín; zistilo sa však, že nie je najlepšou voľbou pre zložitejšie rastlinné pletivá ako napríklad olivové listy (Wang *et al.*, 2003), meristémy jablkových klíčencov (Carpentier *et al.*, 2005) alebo mezokarp pomaranču (Saravanan a Rose, 2004).

2.3.2 Fenolová extrakcia

Hurkman a Tanaka (1986) navrhli extrakčnú metódu na báze fenolu na izoláciu membránových proteínov rastlín. Ako alternatívna metóda k extrakcii TCA/acetónom sa táto metóda široko používa na úplnú extrakciu proteínov z rastlinných tkanív (Rahman *et al.*, 2016; Takáč *et al.*, 2017). Táto metóda spočíva v počiatočnom rozpustení bielkovín v extrakčnom pufri na báze Trisu, ktorý obsahuje vysokú koncentráciu sacharózy. Následne sú z tejto tzv. vodnej fázy bielkoviny viazané a rozpustené vo fenole, ktorý sa oddelí centrifugáciou. Z fenolovej fázy sú bielkoviny potom vyprecipitované metanolom (Hurkman a Tanaka, 1986).

Bolo publikované, že rozpustnosť bielkovín je zvýšená pridaním SDS a elektródového pufri k vzorke v prípade olív (Wang *et al.*, 2003). Carpentier *et al.*, (2005) však nepovažoval SDS za prospešný kvôli denaturácii. Preto by mal byť prínos použitia

SDS empiricky vyhodnotený pre každý konkrétny prípad. Najdôležitejšími faktormi pre úspešnú použitie fenolovej extrakcie sú (i) udržiavanie vzoriek pri nízkej teplote pri prvom extrakčnom kroku a (ii) starostlivé obnovenie fenolovej fázy po centrifugácii (Faurobert *et al.*, 2006).

Fenol môže minimalizovať degradáciu proteínov spôsobovanú endogénnou proteolytickou aktivitou (Schuster a Davies, 1983). Mnohé štúdie ukázali, že extrakcia fenolom poskytuje uspokojivé výsledky v odolných rastlinných pletivách, ktoré sú bohaté na zložky narúšajúce elektroforézu. Príkladom sú zrelé bobule hrozna (Vincent *et al.*, 2006), avokádo, mezokarp pomaranču (Saravanan a Rose, 2004), banány (Song *et al.*, 2006), meristémy jablkových klíčencov, listy klíčencov zemiakov (Carpentier *et al.*, 2005), dokonca aj rezistentné pletivá ako je drevo (Mijnsbrugge *et al.*, 2000). Extrakcia fenolom sa tiež používa aj na extrakciu proteínov z olivových listov, ktoré obsahujú veľké množstvo polyfenolických látok, čo vedie k podstatnému zvýšeniu kvality proteínového extraktu (Wang *et al.*, 2003). Okrem toho sa zistilo, že proteínové extrakty z paradajok a banánových plodov pripravené týmto spôsobom sú porovnateľné s proteínovým zrážaním s acetónom (Carpentier *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006)

Negatívom všetkých týchto extrakčných metód je vysoká strata proteínov a obtiažna a znížená reproducibilita výsledkov kvôli veľkému počtu krokov. Vysoká strata proteínov býva spôsobená hlavne veľkým množstvom premývacích krokov. Problémom u proteómu zo zelených pletív je enzým RUBISCO (ribulóza bisfosfát karboxyláza/oxygenáza), ktorý je najrozšírenejším proteínom na svete (Ellis, 1979). V niektorých druhoch môže obsahovať viac ako polovicu celkového proteínu listov. Jeho prítomnosťou sa počas elektroforetickej separácie listových proteínov podstatne znižuje počet detegovateľných proteínových škvŕn. Tým, že je veľmi abundantný v zelených častiach rastlín častokrát prekryva proteíny nachádzajúce sa v oblasti jeho molekulovej hmotnosti (50kDa). Z tohto dôvodu bolo vyvinutých hneď niekoľko viacstupňových techník ako selektívne odstrániť enzým rubisko v predfrakčionačnom kroku (Kim *et al.*, 2001).

Celkovo je protokol fenolovej extrakcie v porovnaní s extrakciou TCA/acetónom účinnejší a efektívnejší tým, že dokáže minimalizovať degradáciu proteínov, prítomnosť interferujúcich a neproteínových látok a tak zvýšiť kvalitu extraktu. Jeho toxicita a

časovo náročný charakter by sa mali zväžiť pri navrhovaní postupu pripravovania vzorky (Saravanan a Rose, 2004).

2.4 Dvojrozmerná elektroforéza

Dvojrozmerná polyakrylamidová gélová elektroforéza (2-DE) je separačná metóda bežne používaná ako účinný nástroj na separáciu a frakcionáciu komplexných proteínových zmesí z pletív, buniek alebo iných biologických vzoriek (Rabilloud a Lelong, 2011). Vyextrahované proteíny sú najprv rozdelené na polyakrylamidovom géle pomocou izoelektrickej fokusácie podľa ich izoelektrického bodu (prvý rozmer) a potom v 90° uhle na základe rozdielnej molekulovej hmotnosti (druhý rozmer). Jedna z prvých správ o úspešnej 2-DE, ktorá spojila denaturujúcu IEF s SDS-PAGE bola publikovaná v roku 1974 (MacGillivray a Rickwood, 1974) ale vedecká komunita ju relatívne nespozorovala. Táto technika sa stala obľúbenejšou a komplexnejšou až po prvotných zlepšeniach a modifikácii 2-DE s vysokým rozlíšením (O'Farrell, 1975). Modifikácia, ktorú vytvoril O'Farrell (1975), umožnila 2-DE technike dosiahnúť rozlíšenie až 5000 škvŕn reprezentujúcich proteíny v rovnomernom 2-rozmernom rozložení a umožnila presné oddelenie proteínových škvŕn s vysokou presnosťou.

Hlavnou výhodou 2-DE je jej schopnosť poskytnúť globálny prehľad o proteóme biologickej vzorky v danom čase, za daných podmienok, tým že sa na jednom géle simultánne rozprestrú stovky až tisíce proteínov. Ďalšou výhodou je aj to, že zmenu abundancie je možné pozorovať aj empiricky ako zmenu denzity škvŕny na géle. Vyžaduje si však vzorku bez interferujúcich látok, s vysokou čistotou (Rahman *et al.*, 2016). Prítomnosť nečistôt znižuje kvalitu. Stretáva sa aj z ťažkosťami, napríklad pri separácii môžu chýbať niektoré typy membránovo viazaných (hydrofóbných) a extrémnych proteínov. Podobne sú na tom aj vysoko kyslé alebo zásadité proteíny, ktoré sa nedajú ľahko extrahovať ani solubilizovať (Wilkins *et al.*, 1998). Pri trende rastúceho vývoja bezgélových hmotnostno-spektroskopických metód, je 2-DE stále považovaná za jednu z vedúcich techník v proteomických a proteínových štúdiách. Pomocou hmotnostnej spektrometrie (Penque, 2009) a „western blottingu“ (Anderson a Anderson, 1977) poskytuje prvý krok pre ďalšiu analýzu tých proteínových škvŕn, ktoré sú štruktúrne pozmenené alebo majú zvýšenú či zníženú abundanciu.

2.4.1 Využitie dvojrozmernej elektroforézy na určovanie post-translačných modifikácií bielkovín

Analýza post-translačných modifikácií proteínov (PTM) sa stala dôležitou témou pre štúdium bunkovej biológie, liečby a prevencie chorôb. 2-DE poskytuje priame pozorovanie proteínových PTM v géloch, ako aj ich relatívny výskyt. Na tento účel by sa mohli použiť verejne dostupné webové nástroje, ako napríklad ProMoST (Halligan *et al.*, 2004) a JVirGel (Hiller *et al.*, 2003). Okrem toho boli vyvinuté špecifické farbivá na monitorovanie PTM a stali sa široko používanými v štúdiách proteómov. Vieme, že najlepšie preskúmanou PTM u rastlín je fosforylácia (Grimsrud *et al.*, 2010).

Pre výskum fosfoproteómov existujú molekulárne sondy a farbivo Pro-Q® (diamantová fosfoproteínová gélová farba), ktorá poskytuje presnú metódu selektívneho farbenia fosfoproteínov v polyakrylamidových géloch (Ge *et al.*, 2004). Podobne aj pre glykoproteomiku existujú komerčne dostupné fluorescenčné farbivá. Lissamín rhodamín B sulfonyl hydrazín (LRSH) sa zaviedol na špecifické farbenie glykoproteínov. Toto zafarbenie sa prenáša na Schiffove bázy, ktoré táto farbička spontánne vytvára s molekulami obsahujúcimi aldehydické alebo ketónové skupiny (Chiang, *et al.*, 2011). Na charakterizovanie PTM sú používané aj konvenčné metódy. Ide o obohacovanie imobilizovanou živicom, stratégiu naviazania lektínov, techniky využívajúce enzýmy alebo o 2-DE v kombinácii s imunoblotovaním (Farley a Link, 2009).

2.4.2 Dvojrozmerná elektroforéza v kombinácii s imunoblotovaním

Na detekciu fosforylovaných proteínov možno použiť rôzne techniky (Yan *et al.*, 1998). V mnohých prístupoch sa detekcia fosforylovaných proteínov separovaných na 2-D géloch dosahuje inkubáciou buniek s [³²P] alebo [³³P] ortofosforečnanom (Djafarzadeh a Niggli, 1997; Immler *et al.*, 1997). Keď sa však na detekciu fosfoproteínov použije rádioaktívne značenie, musí sa zväžiť, že konštitutívne fosforylované proteíny s pomalými rýchlosťami premeny fosfátov, ktoré obsahujú len malé množstvá rádioaktívneho fosfátu, môžu byť nedostatočne detegované. Okrem toho je potrebné opatrne porovnávať pomery fosforylovaných treonínových, serínových a tyrozínových zvyškov. Podobne aj tu, rôzne rýchlosti metabolickej fosforylácie/defosforylácie spôsobujú nerovnomerné inkorporovanie [³²P] do rôznych typov aminokyselín (Cooper *et al.*, 1983).

Použitie poly- a monoklonálnych protilátok cielených proti fosfoaminokyselinám predstavuje alternatívny postup na detekciu fosforylovaných proteínov na membráne. Táto metóda je extrémne citlivá, pretože protilátky majú schopnosť detegovať aj veľmi malé množstvá (fmol) epitopu (Yan *et al.*, 1998). Protilátky rozpoznávajúce fosfotyrozín (P-Tyr), fosfotreonín (P-Thr) a fosfoserín (P-Ser) boli vytvorené prepojením fosfoaminokyseliny, obsahujúcu haptén, na hemocyanín alebo hovädzí sérový albumín (BSA) (Heffetz *et al.*, 1991; Wang, 1988; Kamps, 1991). Protilátky P-Tyr, P-Thr a P-Ser sú komerčne dostupné a najmä P-Tyr protilátky sú teraz široko používané. Zistilo sa, že rôzne P-Tyr protilátky sa viažu v podstate na rovnaké proteíny v imunoblotovacej analýze, nezávisle od presnej povahy imunogénu, proti ktorému boli protilátky vyvolané (Kamps, 1991). Zistila sa nízka až žiadna krížna reaktivita s nefosforylovaným tyrozínom, fosfotreonínom, fosfoserínom, AMP alebo ATP (Wang, 1988).

Fosforylačne špecifické protilátky však nemôžu detegovať určité fosforylované proteíny v dôsledku sterickej prekážky rozpoznávacieho miesta, čo platí najmä pre protilátky P-Thr a P-Ser. Okrem toho nedostatok antigénosti spôsobený P-Thr a P-Ser zabraňuje dôkladnej detekcii fosforylácie treonínu a serínu v proteínoch. Stáva sa stáva, že P-Thr a P-Ser môžu byť identifikované špecificky v kontexte väčšieho epitopu (Shen *et al.*, 1998).

2.4.3 Modrá natívna polyakrylamidová gélová elektroforéza

Tzv. modrá natívna polyakrylamidová gélová elektroforéza (Blue Native PAGE) bola prvotne zavedená Schaggerom a von Jagowom (1991). Slúžila ako technika na separáciu enzymaticky aktívnych mitochondriálnych membránových komplexov v hmotnostnom rozsahu 100 kDa až 10 MDa (Schägger a von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994). Používa sa na izoláciu membránových proteínových komplexov z biologických membrán (Kugler *et al.*, 1997; Schägger, 2001) a homogenizátov celých buniek a tkanív (Acin-Perez *et al.*, 2004); pre klinickú diagnostiku ľudských mitochondriálnych porúch (Camacho-Carvajal *et al.*, 2004); určenie oligomérnych stavov proteínov (Schägger *et al.*, 1994); pre 2D kryštalizáciu a elektrónovú mikroskopiu (Poetsch *et al.*, 2000); testy aktivity v géli (Zerbetto *et al.*, 1997), na natívne elektroblotovanie a imunodetekciu (Carrozzo *et al.*, 2006) a mnoho ďalších úloh. Je pohodlnou a lacnou technikou založenou na niekoľkých jednoduchých princípoch.

Detergent by nemal narušovať stabilitu komplexu a proces elektroforézy, preto sa na solubilizáciu biologických membrán používajú neiónové detergenty. Rutinne používané zahŕňajú n-dodecyl-maltozid, Triton X100 a digitonín. Voľba špecifického neiónového detergentu závisí od detergentnej stability proteínových komplexov, ktoré sú predmetom záujmu. Jedným z najmiernejších detergentov je digitonín. Po solubilizácii biologických membrán a centrifugácii sa k supernatantu pridá aniónové farbivo Coomassie blue G-250. Toto farbivo je dostatočne rozpustné vo vode, ale môže sa tiež viazať na membránové proteíny kvôli svojim hydrofóbnym vlastnostiam (Eubel *et al.*, 2005). Viazanie veľkého počtu molekúl farbiva spôsobuje posun náboja na proteínoch. To má za následok, že aj bázické proteíny migrujú k anóde pri pH 7,5 počas BN-PAGE (Schägger *et al.*, 1994). Migrácia proteínov sa postupne spomaľuje so zvyšujúcou sa vzdialenosťou a s klesajúcou veľkosťou pórov gradientového gélu. Jednotlivé proteíny sa musia zastaviť takmer úplne, keď sa priblížia špecifickému veľkostne závislému miestu v géli (Wittig *et al.*, 2006).

Pretože sa negatívne nabité povrchy proteínov navzájom odpudzujú, značne sa znižuje tendencia membránových proteínov vytvárať agregáty. Okrem toho povrchové oblasti membrán strácajú po naviazaní farbiva svoj hydrofóbný charakter, ktorý premieňa membránové proteíny na proteíny rozpustné vo vode. To znamená, že v géloch BN nie je potrebný žiadny detergent, keďže farbivo Coomassie obsadzuje proteínové povrchy. Preto je riziko denaturácie proteínov citlivých na detergenty počas BN-PAGE minimalizované. Natívne proteíny a komplexy migrujú ako modré pásy cez BN gély. To uľahčuje vyrezanie špecifických pásov a izoláciu natívnych proteínov modro zafarbených elektroelúciou (Wittig *et al.*, 2006).

BN-PAGE sa často používa ako prvý rozmer vo viacrozmerých experimentoch. Pre druhý rozmer môže byť prúžok BN-gélu vyrezaný a umiestnený horizontálne na gél druhého rozmeru. Na uľahčenie prenosu proteínových komplexov/proteínov do gélu druhej dimenzie môže byť prúžok umiestnený medzi sklenené dosky druhého gélu na jeho počiatočnej zostave. V závislosti od typu použitého druhého rozmeru môže byť BN-gélový prúžok upravený pred zostavením druhých rozmerov s rôznymi činidlami (Wittig, *et al.*, 2006). Napríklad sa k gélovému prúžku pridávajú malé množstvá detergentu a tým sa identifikujú interakční partneri a ich stechiometrický pomer (Eubel, *et al.*, 2003). Inkubáciou v pufri s SDS a 2-merkaptotanolom sa zaistí úplná denaturácia proteínových komplexov. V druhom rozmere sú komplexy separované ako jednotlivé

komponenty. BN-PAGE môže tiež kombinovať s IEF/SDS-PAGE, čo vedie k 3D gélovému systému, ktorý umožňuje veľmi vysoké rozlíšenie proteínových vzoriek (Wittig, *et al.*, 2006).

2.5 Súčasný stav proteomickej analýzy lucernej sietej

Doterajšie výskumy sa predovšetkým sústreďovali na proteomické analýzy *Medicago truncatula*, ale napriek tomu bolo publikovaných niekoľko proteomických prác venujúcich sa lucernej sietej. Pár z nich sa zameralo vo svojom výskume na bunkovú stenu, jej syntézu (Printz *et al.*, 2015) a jej proteíny (Watson *et al.*, 2004). Tieto výskumy boli podnietené tým, že sa záujem o používanie lignocelulózovej biomasy v priemysle zvýšil. Kvôli zlepšeniu stráviteľnosti je lucerna siata cieľovým druhom na genetickú modifikáciu dráhy lignínu (Guo *et al.*, 2001).

Aguilar *et al.*, (2009) praktizovali vtedy novo-publikovanú 3-DE techniku (Gu a Glatz, 2007), na molekulárnu charakterizáciu proteínových extraktov z lucernej sietej, obsahujúci umelo pridaný rekombinantný proteín. Táto technika spája aplikáciu vodného dvojfázového delenia na meranie hydrofobicity proteínov podľa rozdeľovacieho koeficientu (K_p) a 2-DE na vyhodnotenie molekulovej hmotnosti (M_r) a izoelektrického bodu (pI) jednotlivých proteínov (Gu a Glatz, 2007). Jednou z najdôležitejších charakteristík produkcie proteínov rastlinami je možnosť produkovania glykozylovaných foriem rekombinantných proteínov. Možnosť komerčnej produkcie glykoforiem v živom rastlinnom systéme má obrovský potenciál vzhľadom na zvýšenie biologickej aktivity molekuly a zníženie výrobných nákladov (Fischer a Emans 2000).

Väčšina z nich sa ale venovala analýze odpovedi lucernej sietej na abiotické stresy, napríklad sucho (Aranjuelo *et al.*, 2011; Aranjuelo *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2016), vysoké teploty (Li *et al.*, 2013), chlad (Chen *et al.*, 2015), zasolenie (Yacoubi *et al.*, 2011; Yacoubi *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2018), kadmium (Dai *et al.*, 2017) a ostmotický stres (Zhang a Shi, 2018). V odpovediach na všetky spomínané stresy mali pozmenenú abundanciu najmä proteíny zodpovedné za stres a obranu, detoxifikáciu, transláciu a transkripciu, transdukciu signálu, metabolizmus, transport látok a zásobné proteíny. Zistilo sa, že pri analýzach nadzemnej časti boli najviac ovplyvnené proteíny ako rubisco, nitrogenáza, proteíny Calvinovho cyklu (Aranjuelo *et al.*, 2011) či proteíny spojené s fotosyntézou (Chen *et al.*, 2015). V semenách a koreňoch to boli zasa proteíny zodpovedné za bunkové delenie a rast, dozrievanie semien, signalizáciu vápnikom, biosyntézu abscisovej kyseliny (Yacoubi *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2016).

Z metodického hľadiska bola najčastejšie používaná metóda extrakcie pomocou TCA-A či jej modifikácie (Tab. 1). Najpoužívanejší rehydratačný pufoer sa skladal buď z 8M močoviny alebo kombinácie 7M močoviny a 2M thiomčoviny (Tab. 1). Desať z trinástich výskumov pri svojich pokusoch zvolilo gélovú metódu separácie bielkovín (Tab. 1). Hoci je všeobecne známe, že farbenie striebrom má vyššiu citlivosť (0,1ng) ako farbenie pomocou Coomassie brilliant blue (0,1mg) v analýzach lucernej siete sa každé ujalo presne u polovice (Tab. 1). Pri zostávajúcich troch výskumoch sa zvolila bezgélová metóda (Tab. 1). Všetky naštiepené proteíny boli označené iTRAQ značkami pomocou iTRAQ Reagent-8plex Multiplex Kitu (Tab. 1). Následne boli tieto peptidy rozdelené na chromatografických kolónach a eluované rôznymi koncentračnými gradientmi ACN (Tab. 1). Po rozdelení sa peptidy analyzovali MS/MS. Je zaujímavé, že bezgélové metódy sú práve jednými z najnovších v oblasti proteomického výskumu lucernej siete (Tab. 1).

Tab. 1 Súhrn súčasných proteomických analýz lucernej siete

Citácia	Vzorka	Metóda extrakcie	Rehydratačný pufoer	Gélová-bezgélová metóda + stĺpec/ chromatografia	Spoty/ Peptidy MS+ prístroj
Watson <i>et al.</i> , 2004	Stonkové pletivo	CaCl ₂ alebo LiCl + octan sodný	8 M močovina, 4% CHAPS, 20 mM DTT, 0.2% BioLyte	2-DE + farbenie striebrom, 11cm prúžok, pH 3-10	143
Aguilar <i>et al.</i> , 2009	Prvé stonky a listy pred zakvitnutím	A-pufoer s fosfátom sodným B-MgSO ₄ -pufoer C-Tris-borát-EDTA (TBE) extrakčný pufoer	8 M močovina, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% BioLyte	vodné dvojfázové delenie + 2-DE = 3D + CBB, 11cm prúžok, pH 3-10	55
Yacoubi <i>et al.</i> , 2011	Semienka +semienka inkubované v PEG	Voda + inhibítor proteáz+ 64 U DNáza I + 8 U RNázaA	10 min po extrakcii pridali 20mM DTT pomiešali a centrifugoali=konečný extrakt	2-DE + farbenie striebrom,	521
Aranjuelo <i>et a.</i> , 2011	Listy	TCA-A	5 M močovina, 2 M thio-mčovina, -2% CHAPS -2% N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulphonate, -20 mM DTT, -5 mM TCEP -0.5% IPG pufoer (pH 4-7)	2-DE + farbenie striebrom, 18cm prúžok, pH 4-7, 20x20 cm gél	178

Tab. 2 Súhrn súčasných proteomických analýz lucernej sietej (*pokračovanie*)

Yacoubi <i>et al.</i> , 2013	Semienka +semienka inkubované v PEG	Voda + inhibítor proteáz+ 64 U DNáza I + 8 U RNázaA	10 min po extrakcii pridali 20mM DTT pomiešali a centrifugovali, = konečný extrakt	2-DE + farbenie striebrom,	110 a 115
Aranjuelo <i>et al.</i> , 2013	Nodulové vzorky	TCA-A	[5 M močovina, 2 M thio-močovina, -2% CHAPS, -2% N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulphonate, -20 mM DTT, -5 mM TCEP -0.5% IPG pufor (pH 4-7)]	2-DE + farbenie striebrom, 18cm prúžok, pH 4-7, 20x20 cm géľ	787
Li <i>et al.</i> , 2013	Listy	TCA-A	7 M močovina, 2 M thio-močovina, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% Amfolyty	2-DE + CBB, 17cm prúžok, pH 3-10	96
Chen <i>et al.</i> , 2015	Listy	TCA-A + β -mercapto- etanol	7 M močovina, 2 M thio-močovina, 4% (CHAPS), 40 mM (DTT), 1% (PMSF)	2-DE + CBB, 24cm prúžok, pH 4-7	498 a 516
Printz <i>et al.</i> , 2015	Stonka	TCA-A/ fenol/SDS	7 M močovina, 2 M thio-močovina, 30mM Tris, 2%(CHAPS)	2-DIGE + CBB, 24cm Imobiline dry prúžok, pH 4-7	3000 Gély skenované s Typhoon FLA 9500 (GE-Health-care), Kvantitatívna analýza so softvérom De-Cyder
Rahman <i>et al.</i> , 2016	Korene	Fenolová extrakcia	8 M močovina, 1% CHAPS, 0.5% IPG pufor (pH 4-7), 20 mM DTT, malé množstvo BFB	2-DE + CBB IPG dry prúžok, pH 4-7	400

Tab. 3 Súhrn súčasných proteomických analýz lucerny siatej (pokračovanie)

Dai <i>et al.</i> , 2017	Korene	„Plant Total Protein Extraction Kit“, Inhibitory proteáz + chaotróp	7 M močovina, 2 M thio-močovina, 40mM Trizma 1% (C7BzO), Koktail inhibítorov proteáz	Bezgélová analýza. iTRAQ, NX-C18 stĺpec. RP-frakcionačná chromatografia-HPLC. Peptidy eluované s 5-15% B(20mM mravenčan amónny v 90% ACN, pH 10) 15min, 15-45% B v 30min, 90% B 10min. prietok 0.2ml/min	2377 Nano-LC-MS/MS LTQ-Obritrap XL hmotnostný spektrometer (Thermo fisher scientific)
Zhang and Shi, 2018	Korene	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 30% sacharóza	8 M močovina + ožarovanie ultrazvukom	Bezgélová analýza. iTRAQ, SCX Ultremex SCX stĺpec. Ultimate 3000 HPLC systém. Peptidy eluované s A (25mM NaH ₂ PO ₄ v 25% ACN, pH 2.7) 10min , od 5 do 60%B (25 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 M KCl v 25% ACN, pH 2.7) na 27 min. Potom eluované s 60 do 100% B asi 1 min - prietok 1ml/min	1901 LC-MS/MS TripleTOF 5600+ Systém (SCIEX, United States)
Long <i>et al.</i> , 2018	Celé klíčence	7 M močovina, 2 M thio močovina-, 4% CHAPS, 1% Koktail inhibítorov proteáz,	7 M močovina 2 M thio-močovina, 4% CHAPS, 1% Koktail inhibítorov proteáz, 25 mM DTT, 50 mM IAA	Bezgélová analýza. iTRAQ, SCX PolySulfoethyl stĺpec HPLC systém. Peptidy eluované s A (2% ACN pH 10) a B (98% ACN pH 10). Aplikovaný gradient: 5 min, 5-8% B; 30 min, 8-18% B; 27 min, 18-32% B; 2 min, 32-95% B; 4 min, 95% B; 4 min, 95-5% B prietok 0.7ml/min	4699 LC-MS/MS Q-Exactive mass spectrometer (Thermo,USA)

2.6 Fosforylácie bielkovín

V prirodzených poľných podmienkach sú plodiny často vystavené rôznym abiotickým stresom, ako sú sucho, teplo a zima, záplavy, ktoré sa môžu v nasledujúcich desaťročiach zvýšiť v dôsledku globálnej zmeny klímy (dos Reis *et al.*, 2012; Romero-Puertas *et al.*, 2013). Tieto abiotické stresy negatívne ovplyvňujú rast, vývoj a produktivitu plodín (Wang a Frei, 2011). Za stresových podmienok plodiny reagujú prispôbovaním ich metabolických kaskád kvôli prežitiu a aklimatizácii (dos Reis *et al.*, 2012). Tieto aspekty zahŕňajú zmeny na úrovni transkripcie (Larkindale a Vierling, 2007; Qin *et al.*, 2008) a translácie (Nanjo *et al.*, 2010; Nanjo *et al.*, 2011; Ghosh a Xu, 2014). Je dobre zdokumentované, že zmeny v expresii génov na úrovni transkripcie majú nízku koreláciu so zmenami na úrovni proteínov (Lan *et al.*, 2012; Vogel a Marcotte, 2012; Vélez-Bermúdez a Schmidt, 2014). Na rozdiel od transkriptov sú proteíny priamymi efektormi odpovede stresu na rastliny. Okrem zmien v množstve bielkovín, strese môže spôsobiť aj ich rôzne posttranslačné modifikácie.

Posttranslačné modifikácie (PTM) vedú k chemicky rôznym formám proteínov, tzv. proteoformám (Smith a Kelleher, 2013). Rôzne proteoformy môžu byť zapojené do rôznych proteínových komplexov (Zhang *et al.*, 2016) alebo majú zmenenú stabilitu (Nelson a Millar, 2015), štruktúrne konformácie (Cho *et al.*, 2011) či aktivity (Huang *et al.*, 2018). V súčasnosti bolo zistených a čiastočne charakterizovaných viac ako 300 typov PTM a ich počet sa stále zvyšuje (Silva-Sanchez *et al.*, 2015). Fosforylácia proteínov je zatiaľ najlepšie charakterizovaná PTM v rastlinách. Napríklad pre koreňové proteíny *Medicago truncatula* bolo proteomicky identifikovaných približne 3 404 fosforylačných miest (Grimsrud *et al.*, 2010).

Chemicky je fosforylácia je substitúcia OH skupiny PO_3 skupinou, pričom donorom fosfokupiny je ATP a reakcia si vyžaduje prítomnosť horčíka. Fosforylácia je katalyzovaná kinázami a je to reverzibilná reakcia. Opakom fosforylácie je defosforylácia a je katalyzovaná fosfatázami, pričom dochádza k zmene ADP na ATP. Najčastejšie fosforylovanou aminokyselinou je serín a menej sú fosforylované treonín a tyrozín. U rastlín patria k najmenej fosforylovaným aminokyselinám histidín a aspartát. Fosforylácia bielkovín môže viesť k aktivácii ale aj inaktivácii signálnych dráh alebo biochemických procesov. Na bielkovinovej úrovni dochádza po fosforylácii k špecifickým štruktúrnym zmenám, ktoré aktivujú alebo inaktivujú danú bielkovinu.

Naviazanie fosfoskupiny môže indukovať relokalizáciu proteínu alebo dokonca jeho degradáciu (Cohen, 2002)

Fosforylácia proteínov bola zvyčajne identifikovaná biochemickými prístupmi, vrátane *in vitro* kinázových testov s použitím rádioaktívnych izotopovo značených substrátov, Western blot analýz s využitím fosfošpecifických protilátok (Zhu *et al.*, 2000; Reimer *et al.*, 2002). Moderné metódy detekcie fosforylácie spočívajú v hmotnostne spektrometrických metódach. Tieto si vyžadujú iniciálne zahustenie fosfoproteínov, prípadne fosfopeptidov (po štiepení). Následne sú individuálne fosforylačné miesta identifikované fragmentáciou iónov napr. v iónových pasciach zaradených v hmotnostných spektrometroch (Gautron *et al.*, 2011).

2.7 Mitogénom aktivované proteínkinázy

Kaskády mitogénom aktivovaných proteínkináz (MAPK) sú multi-enzýmovými komplexmi pre prenos signálu v eukaryotoch (Komis *et al.*, 2018). Hrajú významnú úlohu pri adaptačných procesoch rastlín. Sériou fosforylačných procesov sprostredkovávajú intracelulárny prenos a amplifikáciu extracelulárnych stimulov, čo vedie k indukcii vhodných biochemických a fyziologických bunkových odpovedí (Colcombet a Hirt, 2008). MAPK moduly sú majú úlohu v reakciách na stresové stimuly, hormonálnej signalizácii (Liu, 2012; Sinha *et al.*, 2011), regulácii bunkového delenia, rastu, diferenciácie a programovanej bunkovej smrti (Franklin-Tong a Gourlay, 2008; Müller *et al.*, 2010; Sasabe a Machida, 2012), ako aj v symbiotických a patogénnych biotických interakciách (Rasmussen *et al.*, 2012; Tena *et al.*, 2011). Hoci MAPK indukujú globálne zmeny v expresii génov v strednodobom až dlhodobom horizonte, v krátkodobom horizonte ovplyvňujú aj cytoplazmatickú infraštruktúru a jej funkciu (Šamajová *et al.*, 2013).

MAPK dráhy sa skladajú z troch proteínkináz: MAPK, MAPK kináz (MAPKK), MAPKK kináz (MAPKKK). Sú iniciované MAPK kinázou kinázou (MAPKKK), ktorá reverzibilne fosforyluje MAPK kinázu (MAPKK) a tým spôsobuje fosforyláciu mitogénom aktivovanej proteínkinázy (MAPK). Serín/treonín MAP3K fosforyluje serínové alebo treonínové zvyšky v konzervatívnom motíve S/T-X₃₋₅-S/T nachádzajúcom sa v aktivačnej slučke príslušnej MAP2K. Dvojito špecifická MAP2K potom fosforyluje treonínové a tyrozínové zvyšky konzervatívneho T-X-Y motívu v aktivačnej slučke MAPK (Pitzschke, 2015). Tým sa aktivuje MAPK, ktorá je schopná regulovať činnosť

širokého rozsahu substrátov vrátane transkripčných faktorov (Komis *et al.*, 2018), cytoskeletálnych proteínov (Beck *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013) a ďalších proteínkináz (Popescu *et al.*, 2009). Tvorba a integrita špecifickej MAPK kaskády môže byť sprostredkovaná skeletovými proteínmi tzv. „scaffold“, zdieľanými dokovacími doménami a adaptérmí alebo kotviacimi proteínmi (Whitmarsh a Davis 1998; Bardwell *et al.*, 2001; Takekawa *et al.*, 2005).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Použitý biologický materiál

Rastliny lucerny siatej (*Medicago sativa*) kultivar Europe a rastliny arábkovky (*A.thaliana*) ekotyp Columbia (Col-0).

3.1.2 Použité chemikálie

2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

2-propanol (PENTA)

40 % Akrylamid 37, 5:1 (Biorad)

4x Laemmli pufor (Biorad)

5x Bradford protein reagent (Biorad)

Acetón (Sigma-Aldrich)

Agaróza (Sigma-Aldrich)

Akrylamid (Sigma-Aldrich)

Amid kyseliny jódooctovej (IAA) (Sigma-Aldrich)

Bis-akrylamid (Sigma-Aldrich)

Blotting Grade Bloker (Biorad)

Brómfenolová modrá (BFB) (Sigma-Aldrich)

Clarity ECL Western Blotting substrate (Biorad)

Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets) (Roche)

Coomassie brilliant blue r-250 (CBB) (Biorad)

Dimethyl (3-(propyl)azaniumylpropán)-1-sulfonát (CHAPS) (Sigma-Aldrich)

Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)

Etanol (PENTA)

Fenol pufrovaný Trisom pH 8,8 (Sigma-Aldrich)

Fluorid sodný (Sigma-Aldrich)

Gellan gum (Alfa-Aesar)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

Glycín (Sigma-Aldrich)

HEPES (Duchefa)

Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)

Chlorid draselný (Sigma-Aldrich)

Chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)

IPG Buffer pH 3-10 (amfolity) (GE Healthcare)

Kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)

Kyselina etylénglykoltetraoctová (EGTA) (Sigma-Aldrich)

Kyselina fosforečná (Sigma-Aldrich)

Kyselina chlórovodíková (Sigma-Aldrich)

Metanol (Sigma-Aldrich)

Minerálny olej (Biorad)

Močovina (Sigma-Aldrich)

Murashige a Skoog médium (Duchefa)

Octan amónny (Sigma-Aldrich)

Peroxodisíran amónny (APS) (Biorad)

Phostop (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) (Roche)

Ponceau S (Sigma-Aldrich)

Prenosový transferový pufor (Biorad)

Sacharóza (Sigma-Aldrich)

Síran amónny (Sigma-Aldrich)

Tetrametyletyléndiamín (TEMED) (Sigma-Aldrich)

TGX Stain free FastCast Acrylamide Kit 10 % (Biorad)

TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10% (Biorad)

Tiomočovina (Sigma-Aldrich)

Tris (Sigma-Aldrich)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

Tween-20 (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Použité prístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Aparatúra pre SDS-PAGE (Biorad)

BIO-RAD Protean IEF Cell 526BR Electrophoresis Unit (GE Healthcare)

Centrifúga (Allegra 64R, Beckmann Coulter)

Digestor (Merci)

GE Image Scanner III (GE Healthcare)

Ettan IPG Phor 3 (GE Healthcare)

Flowbox (Merci)

ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad)

Infinite M Nano (TECAN)

pH meter (PC 2700, Eutech – Instruments)

Rocker-Shaker MR-12 (Biorad)

Simplicity UV Water Purification Systems (Merck Millipore)

Thermoshaker TS-100 (BioSan)

Trans Blot Turbo Transfer System (Biorad)

Vortex-2-Genie (Scientific Industrie)

3.1.4 Použité protilátky

Goat anti-rabbit IgG konjugovaná s HRP (Sigma-Aldrich)

Rabbit anti-MPK6 (Sigma-Aldrich)

Rabbit anti-pTEpY (phospho-p44/42, pERK; Cell Signaling; Danvers, ME, USA)

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava rastlinného materiálu

Sterilizácia semien lucerny siatej prebehla v troch krokoch. Všetky kroky boli robené asepticky v sterilnom boxe. V prvom kroku boli semená inkubované v 96 % etanole po dobu 1 minúty. V druhom kroku boli semená inkubované v sterilizačnom roztoku (3,3 ml 10% hypochlorid sodný, 1,7 ml 70% etanol, 1 kvapka Tween 20) dvakrát po dobu 4 minút. Následne po druhom kroku boli semená premyté 5x sterilnou destilovanou vodou. Po premytí boli semená inkubované minimálne 1,5 hodiny v sterilnom boxe pri izbovej teplote. Po inkubácii boli semená nasadené na MS médium (30 g/l sacharóza, 4,3 g/l MS basal salt mixture, 4,5 g/l Gellan gum, pH (5,7)) a uchované v chladničke v tme na 1 noc pri 4 °C kvôli prelomeniu dormancie a synchronizácii klíčenia. Ďalší deň boli semená v Petriho miskách vyložené do fytotronu na 8 dní a kultivované pri dennom režime 16/8h (svetlo/tma) a pri teplote 21 °C.

Sterilizácia semien arábkovky prebehla v troch krokoch. Všetky kroky boli robené asepticky v sterilnom boxe. V prvom kroku boli semená inkubované v 70 % etanole po dobu 5 minút. V druhom kroku boli semená premyté 3x sterilnou destilovanou vodou. Následne po druhom kroku boli semená nanosené na sterilný filtračný papier kde boli ponechané k uschnutiu. Po uschnutí boli semená nasadené na ½ MS médium (10 g/l sacharóza, 2,15 g/l MS basal salt mixture, 1 g/l MES, 6 g/l Gellan gum, pH (5,8)) a uchované v chladničke v tme na 1 noc pri 4 °C. Ďalší deň boli semená vyložené do fytotronu a kultivované 8 dní pri rovnakých podmienkach ako pre lucernu.

3.2.2 Ovplyvnenie rastlín oxidatívnym stresom

Oxidatívny stres bol indukovaný tekutým MS médiom s prídavkom 20mM peroxidu vodíka. Roztok s peroxidom vodíka (25ml) bol aplikovaný na povrch Petriho misky s osem dňovými rastlinami lucerny siatej cv. Europe tak aby boli celé rastliny úplne ponorené v roztoku. Pre zabránenie hypoxie boli Petriho misky s rastlinami položené na kývačku, pričom boli miešané pri pomalom kývaní. Takýmto spôsobom sa zabránilo

trvalému ponoreniu rastlín v roztoku. Rastliny boli vystavené roztoku 30 minút pri laboratórnych podmienkach. Rastliny, ktoré neboli vystavené 30 minútovej inkubácii v 20mM peroxide vodíka slúžili ako tzv. suché kontroly. Tieto dve skupiny rastlín boli podrobené biochemickej analýze.

3.2.3 Extrakcia proteínov pre dvojrozmernú elektroforézu

Na extrakciu boli použité 8 dňové korene kontrolných rastlín lucerny siatej cv. Europe a arábkovky ekotyp Columbia (Col-0), 8 dňové oxidatívnym stresom ovplyvnené rastliny a kontrolné rastliny lucerny siatej cv. Europe. Pomocou fenolovej extrakcie s následnou precipitáciou octanom amónnym v metanole sme získali bielkoviny (Hurkman a Tanaka, 1986; Takáč *et al*, 2011). Rastliny alebo korene odobraté z MS média a ½ MS média boli zhomogenizované na jemný prášok v trecej miske s tekutým dusíkom. Zhomogenizovaný prášok bol prenesený do plastovej skúmavky kde bolo k nemu pridaných 0,5 ml extrakčného pufru (0,9 mol/l sacharóza, 0,1 mol/l Tris-HCl (pH 8,8), 10 mmol/l EDTA, 0,1 mol/l KCl, destilovaná voda). Následne prebehla 15 minútová inkubácia na ľade, po čom bolo k zmesi pridaných s 0,5 ml Trisom pufrovaného fenolu (pH 8,8). Po inkubácii bola zmes vortexovaná a inkubovaná 30 minút pri 4 °C. Následne boli vzorky centrifugované 5 minút, pri 6000 g a 4 °C. Pri centrifugácii došlo k oddeleniu ľahšej fenolovej fázy, obsahujúcej bielkoviny, od ťažšej tzv. vodnej fázy, obsahujúcej kontaminanty. Do novej skúmavky bola odobraná ľahšia fenolová fáza. K vodnej fáze bolo znova pridaných nových 0,5 ml Trisom pufrovaného fenolu o pH 8,8. Zmes bola znova vortexovaná a centrifugovaná 5 minút, pri 6000 g a 4 °C. Následne sa zasa odobrala vrchná fenolová fáza. K obojm zmiešaním fenolovým fázam sa pridal 5 násobný objem 0,1 mol/l acetátu amónneho v 100 % metanole a bielkoviny boli precipitované cez noc pri -20 °C.

Následne bola suspenzia centrifugovaná 20 minút, pri 13000 g a 4 °C. Odstránil sa supernatant a k peletu (precipitátu) bol pridaný 1 ml na -20 °C vychladeného 0,1 mol/l acetátu amónneho v 100 % metanole. Po pridaní acetátu sa špičkou pipety zaistilo dostatočné narušenie precipitátu. Následne bola vzorka vortexovaná (kvôli ďalšiemu rozrušeniu peletu) a suspenzia inkubovaná 15 min pri -20 °C. Po inkubácii nasledovala centrifugácia (10 min, 13000 g, 4 °C) a podobným spôsobom bol pelet premytý 2x 80 % acetónom, 1x 70 % etanolom a 1x 80 % acetónom (roztoky boli vychladené pri -20 °C). Po poslednom premytí boli proteínové pelety ponechané v digestore 10 minút pri izbovej teplote k vysušeniu. Bielkoviny boli následne rozpúšťané v 125 µl rehydratačného pufru

(8 mol/l močovina, 2 mol/l thiomčovina, 2 % (v/v) CHAPS, 2 % (v/v) Triton X-100, 50 mmol/l DTT, destilovaná voda) jednu hodinu pri izbovej teplote.

3.2.4 Meranie koncentrácie bielkovín

Stanovovanie koncentrácie proteínov bolo robené pomocou Bradfordovej metódy (Bradford, 1976) v 96 jamkových mikrotitračných doštičkách. 300 μ l reakčná zmes bola pripravená z 239 μ l destilovanej vody, 60 μ l 5x Bradford protein reagent a 1 μ l bielkovinového extraktu. Pomocou spektrofotometra s monochromátorom Infinite M Nano (TECAN) bola meraná absorbanca pri 595 nm. Koncentrácie bielkovín boli stanovené pomocou kalibračnej krivky pripravenej použitím známych koncentrácií albumínu (Bovine serum Albumin).

3.2.5 Dvojrozmerná elektroforéza

Na separáciu bielkovín pomocou izoelektrickej fokusácie (prvý rozmer 2-D elektroforézy) boli použité 2 rôzne prístroje, a to Protean IEF Cell 526BR Electrophoresis Unit (BioRad). Rehydratácia IPG prúžkov bola robená aktívne v Protean IEF Cell 526BR Electrophoresis Unit alebo pasívne v plastovom stojane s dráhami v tzv. IPG boxe (GE Healthcare) cez noc (16 hod). Súprava výrobcu GE Healthcare (IPG Phor III, IPG box) aktívnu rehydratáciu gélového prúžku neumožňuje. Pri pasívnej rehydratácii bolo 125 μ l proteínového extraktu (s obsahom proteínov 100 μ g) obohateného o 5 % (v/v) amfolity (pH 3-10) a 0,002 % (w/v) BFB nanosené do dráhy IPG boxu v dĺžke 7 cm. Na extrakty boli opatrne položené gélové prúžky (7 cm, pH 5-8; 3-10; Biorad) gélovou stranou nadol tak, aby bol gél v kontakte s extraktom po celej dĺžke. Po 12-15 h boli rehydratované gélové prúžky vložené na keramickú platňu (v požadovanej pólovej orientácii) v prístroji Ettan IPG Phor 3. Gélové prúžky boli zaliate minerálnym olejom kvôli zabráneniu odparovania a na ich konce boli pridané vlhké filtračné papiere tak, aby sa čiastočne prekryli gél. Na tieto konce sa následne pripojili elektródy.

Po napojení elektród bol spustený prvý rozmer (IEF) dvojrozmernej elektroforézy, ktorý trval približne 6 hodín. Parametry IEF boli: 1hod. od 150 V do dosiahnutia 150 VH, 1hod. 500 V do dosiahnutia 500 VH a 3hod. a 45min. 4000 V do dosiahnutia 15000 VH, pri izbovej teplote. Pri aktívnej rehydratácii IEF prebiehala v rovnakom prístroji (Protean IEF Cell) ako samotná rehydratácia. Podmienky pre IEF boli rovnaké ako pri pasívnej rehydratácii. Najprv bol do dráhy pre gélový prúžok aplikovaný bielkovinový extrakt, na ktorý bol položený prúžok v správnej pólovej orientácii. Následne bol prúžok s extraktom

zaliaty minerálnym olejom a prekrytý špeciálnym krytom na Protean IEF Cell. Celá táto doštička musela byť správne pólovo umiestnená.

Po IEF boli gélové prúžky opláchnuté v SDS elektródovom pufri (14,4 g/l glycín, 3g/l TRIS, 0,1 % (w/v) SDS, destilovaná voda) a inkubované v ekvilibračnom pufri (6 mol/l močovina, 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,8), 2 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) glycerol, 0,002 % (w/v) BFB, destilovaná voda) po dobu 15 minút s prídavkom 1 % (w/v) DTT kvôli odstráneniu disulfidických väzieb redukciou a po dobu 15 minút s 2,5 % (w/v) IAA kvôli ich stabilizácii ich alkyláciou. Po inkubáciách boli gélové prúžky vložené medzi sklá elektroforetickej aparatury MiniProtean Tetra Cell priamo na rozdeľovací polyakrylamidový gél (10% (w/v) akrylamide 37,5:1) alebo na 10 % tzv. Stain-free gél (TGX Stain-Free, Biorad). Boli vkladané tak, aby nedošlo k vzniku vzduchových bublín medzi prúžkom a gélom. Prúžky boli na SDS-PAGE géli stabilizované nanesením 0,5 % agarózy. Štandard bol nanesený na filtračný papier v tvare obdĺžníka s rozmermi 0,3 x 0,2 cm a vložený vedľa IPG prúžku na gél.

SDS-PAGE bola spustená hneď po polymerizácii agarózy v prostredí SDS elektródového pufru pri 60 V (20min), 120 V (20min) , 160 V (kým bielkoviny nedosiahli spodný okraj gélu); 1,5 hodiny pri izbovej teplote. Po prebehnutí SDS-PAGE boli polyakrylamidové gély vybrané z elektroforetickej aparatury a premyté 3 x 5 min. destilovanou vodou v plastových miskách. Následne boli gély zafarbené koloidnou brilantovou modrou (CBB) (roztok A (350 ml destilovaná voda, 40 g síran amónny, 8 ml kyselina fosforečná) + roztok B (0,5 g Coomassie G250, 10 ml destilovaná voda) + 20% metanol pred použitím) minimálne 2 hodiny. Farbenie prebiehalo v miskách na kývačke (Rocker Shaker, Biorad) pri nízkej rýchlosti kývania. Po viditeľnom zafarbení proteínov boli gély premývané s destilovanou vodou pri vysokej rýchlosti kývania. Premýtie vodou bolo robené minimálne 5 krát kvôli odfarbeniu pozadia gélov. Keď boli gély premyté nasledovalo skenovanie pomocou skenera pri 600 dpi (ImageScanner).

Počet spotov bol na vybraných 2-DE géloch analyzovaný softvérom (PDQuest Advanced 2-D Gel Analysis Software).

3.2.6 Imunoblotovanie dvojrozmerných gélov

Dvojdimenziálne gély so vzorkami pochádzajúcimi zo stresom ovplyvnených rastlín a kontrolných rastlín lucerny, cv. Europe boli použité na detekciu SIMK pomocou imunoblotovania . Transfer proteínov z gélu na PVDF membránu bol robený podľa

Kurien *et al.*, (2015) pomocou tzv. polosuchej metódy s použitím prístroja TransBlot Turbo Transfer System (BioRad). Membrána (9 x 7 cm) bola rehydratovaná 1 minútu v 100 % metanole a následne inkubovaná 5 minút v tzv. transferovom pufri (Tab.2). Rovnako boli v transferovom pufri inkubované aj filtračné papiere. 5 minút po inkubácii bol na dno transferovej kazety navrstvený filtračný papier, na ktorý sa položila PVDF membrána. Vytvorené bubliny medzi filtračným papierom a membránou boli eliminované tlakom plastového valčeka. Na membránu bol opatrne položený gél a na ňu ďalšia vrstva filtračného papiera. Vzduch bol opäť vytlačený tlakom valčeka. Následne bola kazeta uzavretá. Prenos trval 10 minút pri 10 mA. Pre vizualizáciu proteínov boli membrány po prenose inkubované v roztoku Ponceau S (0.2 % Ponceau S, 5% kyselina octová) a následne dokumentované pomocou digitálneho fotoaparátu. Membrány pripravené zo Stain Free gélov boli dokumentované na dokumentačnom prístroji Chemidoc (BioRad) podľa inštrukcií výrobcu. Po inkubácii v Ponceau S boli membrány trikrát premyté v destilovanej vode po dobu 5 min. a ponechané v blokovacom roztoku (4 % (w/v) BSA Bovine Serum Albumin a 4 % (w/v) Blotting Grade Blocker v TBS-T (Tab. 3) cez noc pri 4 °C pri pomalom kývaní. Na ďalší deň boli 3,5 hodiny inkubované pri laboratórnych podmienkach s primárnou protilátkou pri nízkej rýchlosti kývania (anti-MPK6, králičia monoklonálna protilátka; riedená 1:8000 v 1 % BSA).

Protilátka anti-MPK6 je protilátka rozpoznávajúca MPK6 z *Arabidopsis thaliana*. Tým, že má vysokú homológiu so SIMK rozpoznáva v lucerne satej SIMK proteín. Po inkubácii v roztoku primárnej protilátky boli membrány premývané 5 x 7 minút v TBS-T pri vysokej rýchlosti kývania. Membrány boli po premytí inkubované 1,5 hodiny v laboratórnych podmienkach so sekundárnou protilátkou pri nízkej rýchlosti kývania (anti-rabbit IgG, konjugovaná s chrenovou peroxidázou; riedená 1:5000 v 1 % BSA). Po inkubácii so sekundárnou protilátkou boli membrány zasa premývané 5 x 7 minút v TBS-T pri vysokej rýchlosti kývania. Na detegovanie chemiluminescenčného signálu bol použitý tzv. „Enhanced chemiluminescence“ (ECL, Biorad) substrát. Následne sme chemiluminiscenčný signál detegovali na dokumentačnom prístroji ChemidocTM (Biorad). Pomocou programou ImageLab a ImageJ bola kvantifikovaná intenzita škvŕn.

Tab. 2 Zloženie transférového pufru

Zloženie	Objem (100ml)
5x Transfer buffer (Biorad)	20 ml
96 % etanol	20 ml
destilovaná voda	60 ml

Tab. 3 Zloženie trisom pufovaného fyziologického roztoku s Tweenom 20 (TBS-T)

Zloženie 1x TBS-T	Objem (1000ml)
50 mM Tris	6,55 g
150 mM NaCl	8,76 g
destilovaná voda	500 mL
0,1M HCl	pH na 7,6
destilovaná voda	doplniť do 1L
Tween 20	1ml

3.2.7 Extrakcia proteínov a príprava vzorky pre SDS-PAGE

Na detekciu SIMK proteínov a fosforylovaných proteínov s fosforylačným motívom pTEpY pomocou SDS-PAGE boli použité stresom ovplyvnené rastliny a kontrolné rastliny lucerny siatej cv. Europe. Rastliny boli homogenizované v tekutom dusíku a extrahované v tzv. E-extrakčnom pufore (50 mmol/l HEPES, 75 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l NaF, 10 % (v/v) glycerol, obohatený o inhibítory proteáz (Complete; Roche) a fosfatáz (Phostop; Roche) a 1 mmol/l DTT). Použitím vortexu bol bielkovinový extrakt viackrát pomiešaný a potom ponechaný 30 minút na ľade. Následne prebehla centrifugácia 15 minút, pri 13000 g a 4 °C. Pomocou odsoľovacích ultrafiltrov (kolóniek) Amicon (Millipore) boli supernatanty dvakrát zahustené prečistené od zložiek menších ako 10 kDa. Extrakty boli v kolónach podrobené centrifugácií 10 minút, pri 14000 g a 4 °C. Po centrifugácii bol retentát prenesený do novej mikroskúmavky. Bol k nemu pridaný 4x Laemmli pufor a 5 % (v/v) 2-

merkaptoetanol tak, aby bolo výsledné zloženie Laemmli pufru 4:1. Vzorky boli povarené 10 minút pri 95 °C. Takto denaturované proteínové extrakty boli potom ponechané v digestore na vychladnutie. Po vychladnutí boli vzorky pripravené na rozpipetovanie do gélu.

3.2.8 SDS-PAGE a imunoblotovanie

Pred napipetovaním vzoriek bola elektroforetická aparátúra s gélom zaliata SDS elektródovým pufrom. Do dráh 10 % Stain Free gélu boli následne napipetované vzorky (15 µg bielkovín) a spustila sa elektroforéza 1 hodinu, 180 V pri izbovej teplote. Po skončení SDS-PAGE bol gél opatrne položený na už inkubované filtračné papiere a membránu podobne ako v kapitole 3.2.6. Na detekciu fosforylovaných proteínov s fosforylačným motívom pTEpY museli byť membrány po odfovení alebo inkubácii v Ponceau S inkubované v blokovacom roztoku (5 % (v/v) BSA v TBS-T) cez noc pri 4 °C. Na druhý deň boli inkubované cez noc pri 4°C s primárnou protilátkou pri nízkej rýchlosti kývania (anti-pTEpY, králičia polyklonálna protilátka (Sigma-Aldrich); riedená 1:750 (v/v) v 5 % BSA). Po inkubácii v primárnej protilátke boli membrány podrobené imunoblotovaniu podobne ako v kapitole 3.2.6. Na detekciu SIMK proteínov boli membrány podrobené blokovaniu a imunoblotovaniu rovnako ako v kapitole 3.2.6.

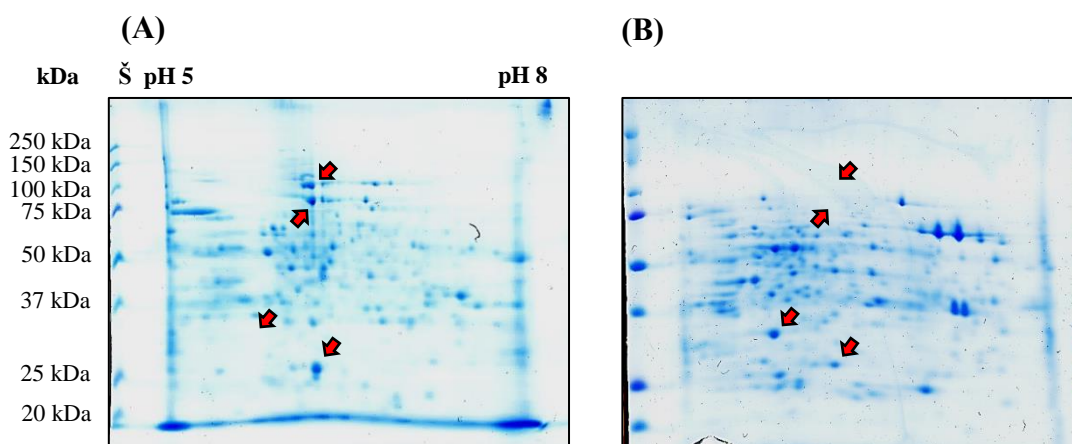
3.2.9 Počet biologických replík

Dvojrozmerné gély z koreňov lucerny boli zhotovené v 3 biologických opakovaníach. Dvojrozmerné gély z rastlín lucerny boli zhotovené z 2 biologických replík. Imunoblotovanie s použitím jednorozmerných a dvojrozmerných gélov bolo zhotovené v 2 biologických replikách. Imunoblotovanie s použitím fosfošpecifickej protilátky bolo urobené v 2 technických replikách.

4 VÝSLEDKY

4.1 Príprava dvojrozmerných gélov z koreňov lucerny a arábkovky

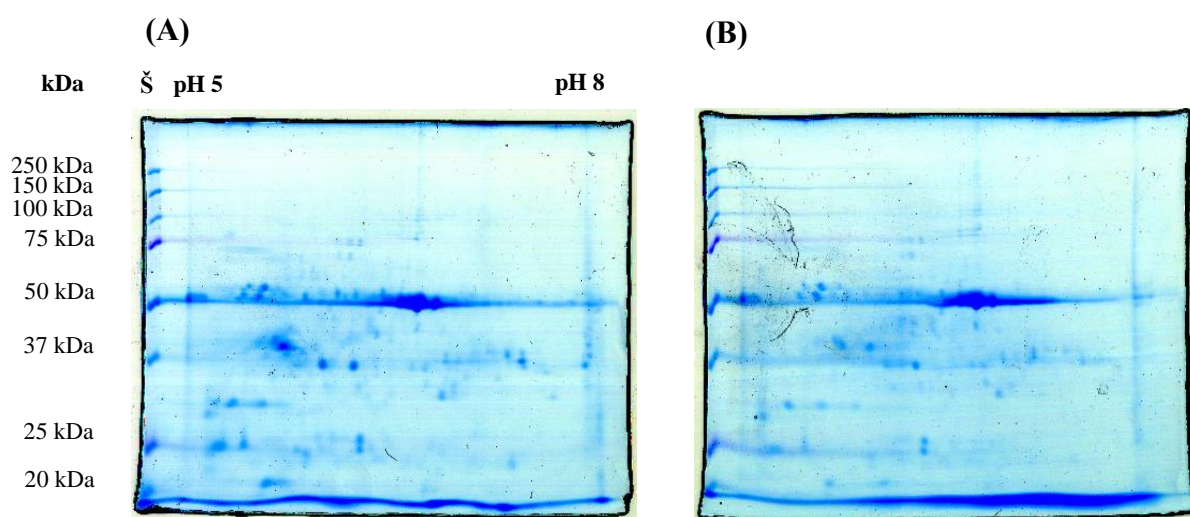
V priebehu optimalizácie extrakčného postupu sme testovali rôzne obsahy proteínov vo vzorke. Najkvalitnejší signál bielkovín bol pozorovateľný pri nanáške 100 μg proteínov. Pripravili sme tak dvojrozmerné gély s použitím gélových prúžkov o dĺžke 7cm a s izoelektrickým fokusačným rozmedzím pH 5-8. Ku kvalite signálu tiež pomohlo použitie čerstvého roztoku CBB. Gély farbené pomocou CBB pri vykazovali 251 škvŕn pre lucernu siatu. Pri porovnaní Obr. 1A a 1B vidieť, že usporiadanie bielkovinových škvŕn na géloch z koreňových extraktov lucerny a arábkovky sú odlišné. Napríklad proteínová škvŕna v kyslej oblasti (šípka – približné Mr 33,4 kDa a pI 5,8) z Obr. 1B. sa na Obr. 1A nenachádza. Naopak dve škvŕny z hornej časti gélu (približné Mr 108 kDa a pI 6,24; približné Mr 88 kDa a pI 6,25) na Obr. 1A sa vôbec nenachádzajú na Obr. 1B. Avšak na géloch sa vyskytovali aj proteínové škvŕny s podobnými charakteristikami. Ako napríklad proteínová škvŕna v spodnej časti gélu (približné Mr 28,6 kDa a pI 6,28) označená šípkou.



Obr.1: Reprezentatívny obrázok dvojrozmerného gélu zhotoveného z bielkovinových extraktov koreňov (100 μg): (A) lucerny siatej cv. Europe, (B) arábkovky ekotyp Col-0 rastúcich v kontrolných podmienkach. Šípky poukazujú na pozície spoločných a unikátnych proteínových škvŕn pre jednotlivé rastliny. Použitý 7cm IPG prúžok s gradientom pH 5-8. Gély boli farbené pomocou koloidnej briliantovej modrej (CBB). Š – proteínový štandard, kDa - molekulová hmotnosť.

4.2 Porovnanie dvojrozmerných gélov z proteínových extraktov rastlín lucerny vystavených peroxidu vodíka

Exogénne ovplyvnenie rastlín peroxidom vodíka je využiteľné na indukciu oxidatívneho stresu. V tomto systéme dochádza k oxidatívne stresu predovšetkým v apoplaste. Nakoľko je peroxid vodíka schopný transportu cez plazmatickú membránu, nemožno vylúčiť akumuláciu peroxidu vodíka aj v intracelulárnom priestore. Naším ďalším cieľom bolo porovnať dvojrozmerné gély pripravené z celých rastlín lucerny vystavených peroxidu vodíka (20mM, 30 min.) s gémi, ktoré boli pripravené z kontrolných rastlín. Výsledné kvalitatívne a kvantitatívne rozdiely medzi gémi boli vyhodnotené pomocou softvéru PDQuest (BioRad). Pri nanáške 100 µg proteínov na 7cm IPG prúžok bolo na výslednom dvojrozmernom polyakrylamidovom géle farbenom CBB (Obr. 2B) možné detegovať **212** a **217** škvŕn (Obr. 2A) (Tab. 4). Pre porovnanie výsledkov bol tento pokus zopakovaný a následne vyhodnotený pomocou softvéru PDQuest. V druhom biologickom opakovaní boli pre separáciu proteínov v druhom rozmere na rozdiel od prvého biologického opakovania použité Stain-free gély, na ktorých bolo detegovaných **191** a **183** škvŕn v prospech kontrolných rastlín (Tab. 4). Tento rozdiel je možné pripísať odlišnej citlivosti vizualizácie proteínov. Ako hlavný gél (tzv. master gel) pre softvérovú analýzu bol zvolený gél (Obr. 2B). Spoty na jednotlivých géloch mali rôzne abundancie (Tab. 5). Bolo zistené, že tento výsledok môže poukazovať na 7 originálnych/unikátnych



Obr.2: Reprezentatívne dvojrozmerné gély zhotovené z proteínových extraktov celých rastlín (100 µg) lucerny siatej cv. Europe: (A) ovplyvnených 20 mM peroxidom vodíka po dobu 30 minút (B) kontrolných rastlín. Bol použitý 7cm IPG prúžok s gradientom pH 5-8. Gély boli farbené pomocou koloidnej brilantovej modrej (CBB). Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť.

proteínových škvŕn z bielkovinových extraktov kontrolných rastlín lucerny a na 5 originálnych/unikátnych proteínových škvŕn z celoproteínových extraktov peroxidom ovplyvnených rastlín lucerny. Pre určenie identity jednotlivých spotov by bolo potrebné tento výsledok ďalej analyzovať, napríklad pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Tab. 4 Počet bielkovinových škvŕn a percentuálna úspešnosť zhody zo softvérovej analýzy dvojrozmerných gélov (vrátane biologických opakovaní) pripravených z rastlín lucerny vystavených peroxidu vodíka a kontrolných rastlín

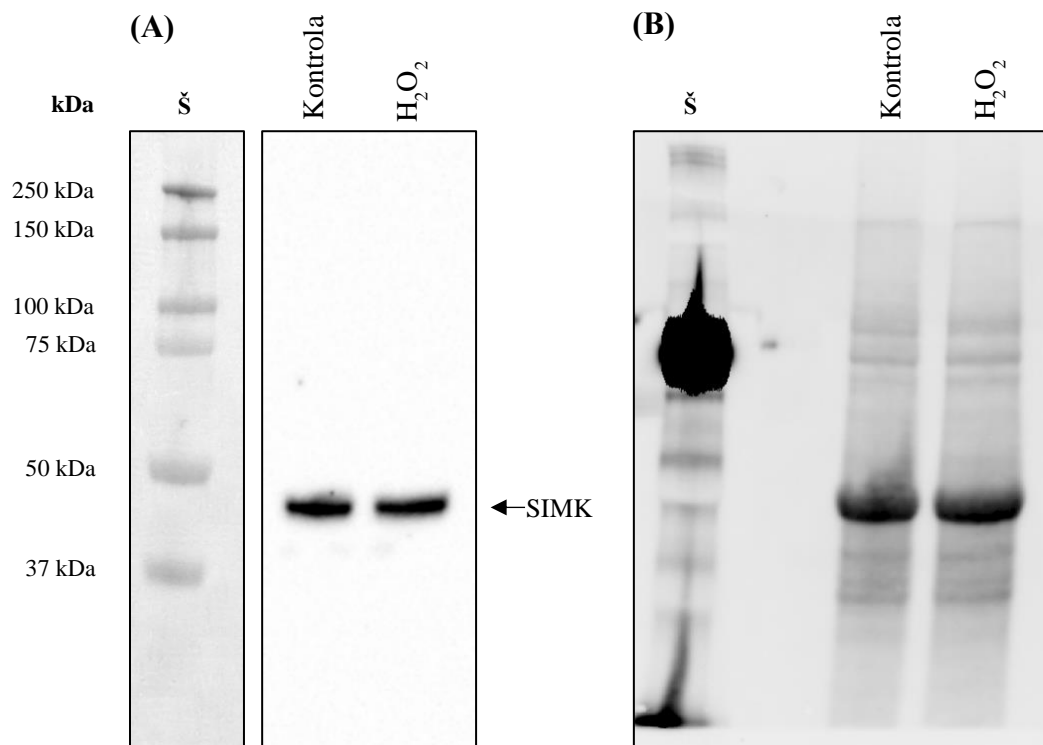
Gél	Počet škvŕn	Škvŕny zhodné s hlavným gélom	Percento zhody 1	Percento zhody 2	Korelačný koeficient
Kontrola, opakovanie 1	212	203	95%	70%	1.000
Kontrola, opakovanie 2	191	152	79%	53%	0.490
H ₂ O ₂ , opakovanie 1	217	169	77%	59%	0.624
H ₂ O ₂ , opakovanie 2	183	119	65%	41%	0.537

Tab. 5 Kvalitatívne a kvantitatívne rozdiely medzi gélmami z kontrolných a H₂O₂-ovplyvnených rastlín lucerny satej

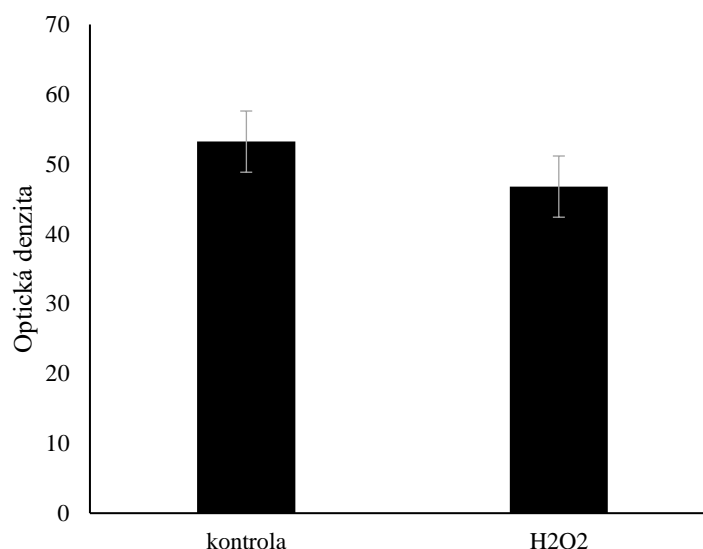
Rozdiel	počet
škvŕny prítomné v kontrolných géloch a neprítomné v testovaných géloch	7
škvŕny prítomné v testovaných géloch a neprítomné v kontrolných géloch	5
škvŕny s menej ako 1.5 násobne zvýšenou abundanciou	24
škvŕny s 1.5 až 3 násobne zvýšenou abundanciou	35
škvŕny s viac ako 3 násobne zvýšenou abundanciou	21
škvŕny s menej ako 1.5 násobne zníženou abundanciou	27
škvŕny s 1.5 až 3 násobne zníženou abundanciou	38
škvŕny s viac ako 3 násobne zníženou abundanciou	32

4.3 Imunoblotová analýza SIMK pomocou SDS-PAGE

Cieľom nasledujúceho experimentu bolo zistiť abundanciu proteínu SIMK u lucerny po ovplyvnení peroxidom vodíka. Pre imunodetekciu SIMK sme v našej práci využili primárnu monoklonálnu protilátku anti-MPK6 rozpoznávajúcu MPK6 v arábkovke a SIMK v lucerne. Separáciou kontrolných a stresom ovplyvnených vzoriek pomocou SDS PAGE a následným imunoblotovaním bol identifikovaný výrazný pás v oblasti s molekulovou hmotnosťou 46 kDa prislúchajúci SIMK proteínu (Cardinale *et al.*, 2000;) (Obr. 3). Intenzita pásu sa medzi vzorkami nelíšila (Obr. 4).



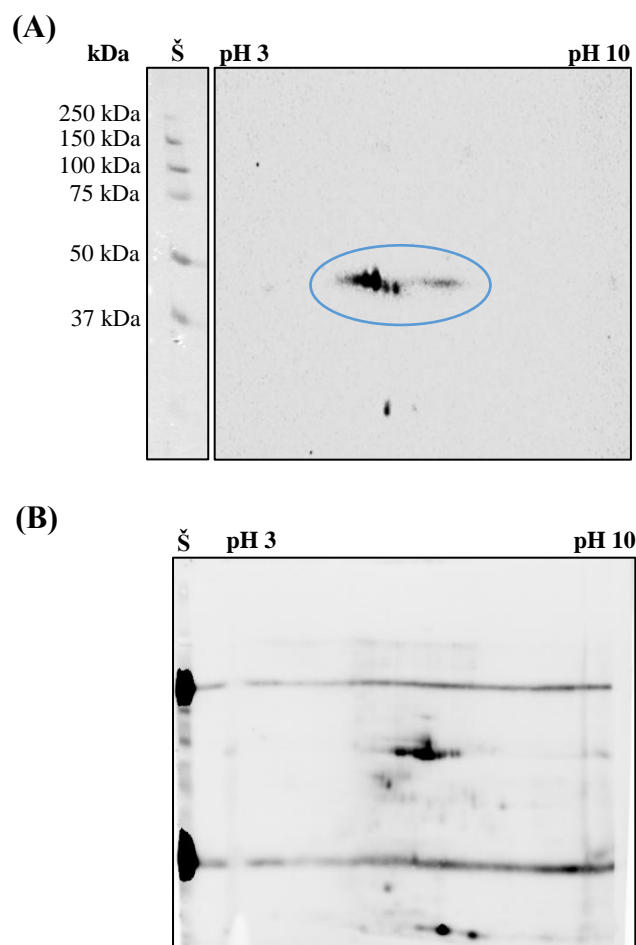
Obr. 3: Imunoblotová analýza stresom indukovanou mitogénom aktivovanej proteínkinázy (SIMK) v rastlinách lucerny. (A) Imunoblot z celorastlinných proteínových vzoriek rastlín lucerny ovplyvnených 20mM peroxidom vodíka po dobu 30 minút a kontrolných rastlín z SDS-PAGE gélu. (B) vizualizácia bielkovín na polyvinilidín difluoridovej (PVDF) membráne po prenose pomocou ChemiDoc™. Šípka ukazuje na špecifický proteínový pás znázorňujúci SIMK proteín. Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť.



Obr. 4: Kvantifikácia denzity pásu z obrázku 3A. Graf ukazuje priemer z 2 opakovaní. Chybové úsečky predstavujú štandardnú odchýlku. Densita pásu z biologických replík bola normalizovaná podľa celkovej denzity pásov na imunoblote.

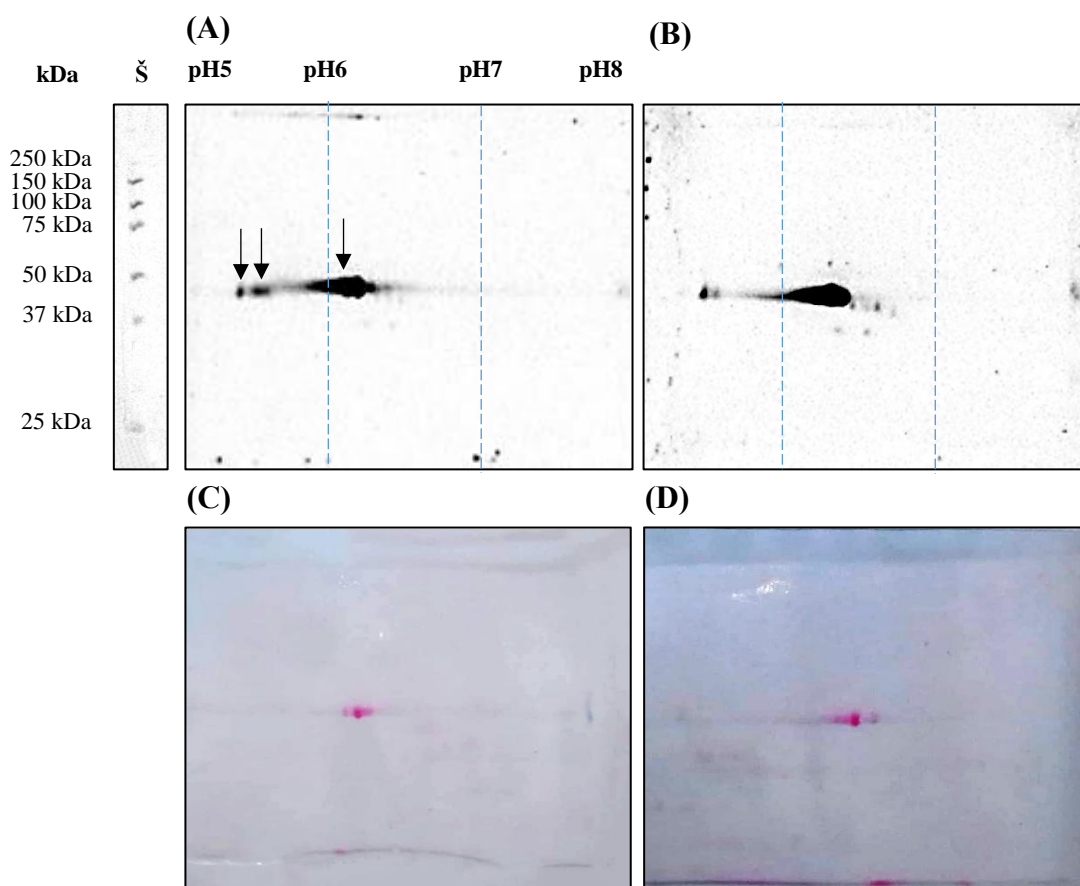
4.4 Detekcia SIMK pomocou imunoblotovania s použitím dvojrozmerných gélov

Imunodetekcia na dvojrozmerných géloch je metóda umožňujúca detekciu izoformiem a posttranslačných modifikácií bielkovín. Bielkovinové izoformy sa líšia najčastejšie v izoelektrickom bode a zmenu v pI spôsobujú aj posttranslačné modifikácie. V prvom kroku sme použili IPG prúžky s rozsahom pI 3-10, aby sme identifikovali pI, v ktorom sa signál pochádzajúci z protilátky nachádza. Táto prvotná analýza ukázala, že signál sa nachádzal v rozmedzí pI 5-8. Molekulová hmotnosť (46kDa) zodpovedá molekulovej hmotnosti SIMK (Obr. 5). Tiež sa nám podarilo dosiahnuť vysokú špecificitu vo vertikálnom rozmere, pretože sa na membráne nenachádza žiadny nešpecifický signál s inou molekulovou hmotnosťou ako 46 kDa. Z týchto dôvodov sme sa za použitia rovnakého postupu dvojrozmernej elektroforézy rozhodli v ďalších analýzach použiť IPG prúžky s rozsahom pI 5-8. Tento rozsah by mal zabezpečiť účinnejšiu separáciu signálu z imunodetekcie SIMK.



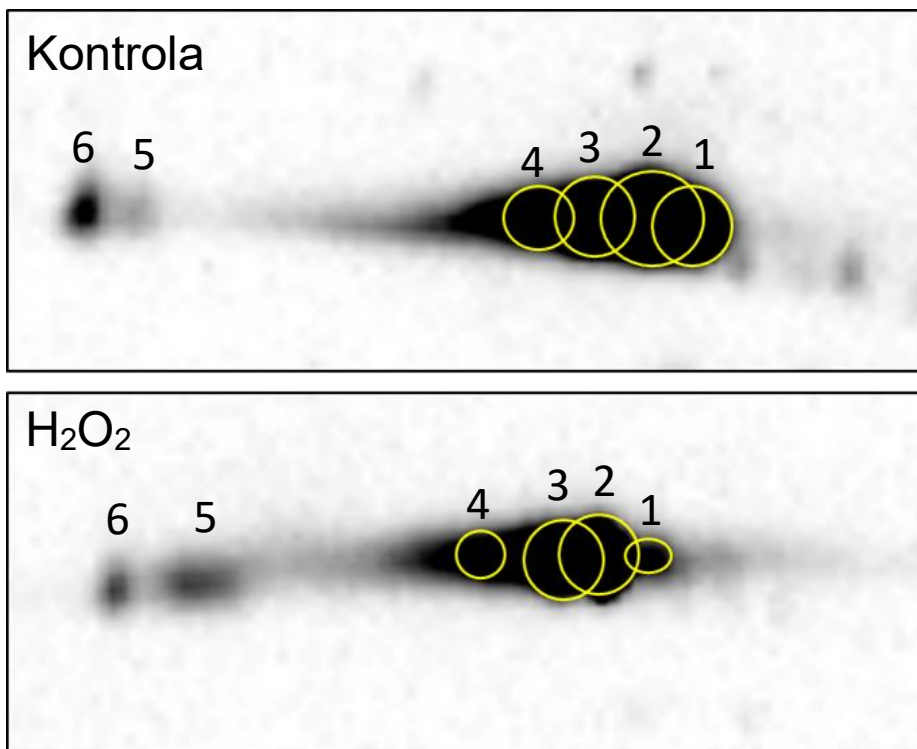
Obr. 5: Imunoblot z dvojrozmerného gélu: (A) pripravený z proteínového extraktu celých rastlín lucernej sietej cv. Europe ovplyvnených 20mM peroxidom vodíka po dobu 30 minút použitím anti-MPK6 protilátky, (B) vizualizácia bielkovín na polyvinilidín difluoridovej (PVDF) membráne po prenose pomocou ChemiDoc™. Elipsa na obrázku (A) znázorňuje chemiluminiscenčný signál. Použitý 7cm IPG prúžok s gradientom pH 3-10. Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť.

Na PVDF membránach z dvojrozmerných gélov s pH 5-8 sme pomocou tejto protilátky detegovali v lucerne (celé rastliny) 3 škvrny s rôznou denzitou (Obr. 6A, B). Všetky škvrny sa nachádzali v oblasti 46 kDa, čo sa podobne ako v predchádzajúcich prípadoch zhoduje s molekulovou hmotnosťou SIMK. Hodnota pI detegovaných škvŕn na oboch géloch bola 5,4, 5,5 a najzásaditejšia škvrna sa nachádzala v rozmedzí od 5,9 do 6,5 (Obr. 7A,B). Detailným pozorovaním signálu bolo rozpoznateľných spolu 6 škvŕn na oboch imunoblotoch, z ktorých 4 (s pI 5,9-6,5) sa prekrývali (Obr. 4). Vypočítaná hodnota izoelektrického bodu SIMK je 5,52 (Obr. 8). Experimentálne a teoretické hodnoty pI sa však môžu líšiť. Nakoľko v in vivo podmienkach môže dochádzať k rôznym modifikáciám. Najviac sa však s teoretickou hodnotou pI zhodovali škvrny v kyslej





Obr. 6: (A) Imunoblot z dvojrozmerného gélu pripravený z proteínového extraktu celých rastlín lucerny siatej cv. Europe ovplyvnených 20mM peroxidom vodíka po dobu 30 minút použitím anti-SIMK protilátky, (B) Imunoblot z dvojrozmerného gélu pripravený z proteínového extraktu kontrolných rastlín lucerny, (C) a (D) vizualizácia bielkovín na polyvinilidín difluoridovej (PVDF) membráne po prenose pomocou Ponceau S. Šípky ukazujú na proteínové škvrny detegované pomocou anti-MPK6 protilátky. Použitý 7cm IPG prúžok s gradientom pH 5-8. Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť.

oblasti gélu (Obrázok 7, škvrny 5 a 6). Škvrny s rovnakou Mr ale kyslejším pI naznačujú, že by mohlo ísť o fosforyláciu SIMK proteínu (Obr. 7). Na základe týchto výsledkov nie je možné jednoznačne povedať že spoty 2-6 predstavujú fosforyláciu SIMK a spot 1 je nefosforylovaný proteín. Je však zjavné, že sme detegovali nižšiu abundanciu spotu č. 1 a vyššiu abundanciu spotu č. 5 po ovplyvnení rastlín peroxidom vodíka (Obr. 7).



Obr. 7: Detail chemiluminiscenčného signálu anti-MPK6 protilátky z obrázkov 6A a B.



 Bioinformatics Resource Portal
 Home | [Contact](#)

Compute pI/Mw

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```

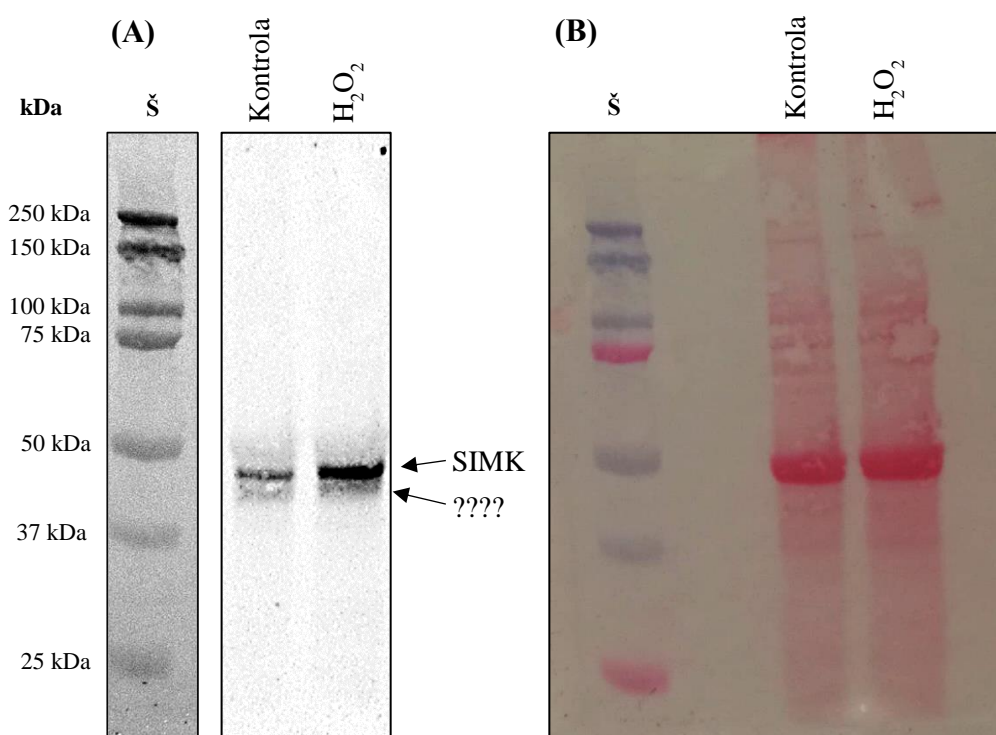
100 200 300 400 500 600
MEGGGAPPAD TVMSDAAPAP PQMGIENIPA VLSHGGRFIQ YNIFGNIFEV TAKYKPPIMP
700 800 900 1000 1100 1200
IGKGAYGIVC SAHNETNEH VAVKIANAF DNKIDAKRTL REIKLLRHMD HENVVAIRDI
1300 1400 1500 1600 1700 1800
VPPQREVEN DVYIAYELMD TDLHQIIRSN QALSEEHCQY FLYQILRGLK YIHSANVLHR
1900 2000 2100 2200 2300 2400
DLKPSNLLLN ANCDLKICDF GLARVTSETD FMTEYVTRW YRAPELLNS SDYTAIDVW
2500 2600 2700 2800 2900 3000
SVGCIFMELM DRKPLFPGRD HVHQLRLLME LIGTPSEDDL GFLNENAKRY IRQLPPYRRQ
3100 3200 3300 3400 3500 3600
SFQEKFPVH PEAILVEKM LTFDPRKRIT VEDALHPYL TSLHDISDEP VCMTPFSDFD
3700 3800
EQHALTEEQM KELIYREALA FNPEYQQ
    
```

Theoretical pI/Mw: 5.52 / 44401.79

Obr. 8: Výpočet izoelektrického bodu (pI) SIMK proteínu na základe jeho aminokyselinovej sekvencie pomocou ExPASy Compute pI/Mw. Rámček ohraničuje teoretickú hodnotu izoelektrického bodu (pI) a molekulovej hmotnosti (Mw).

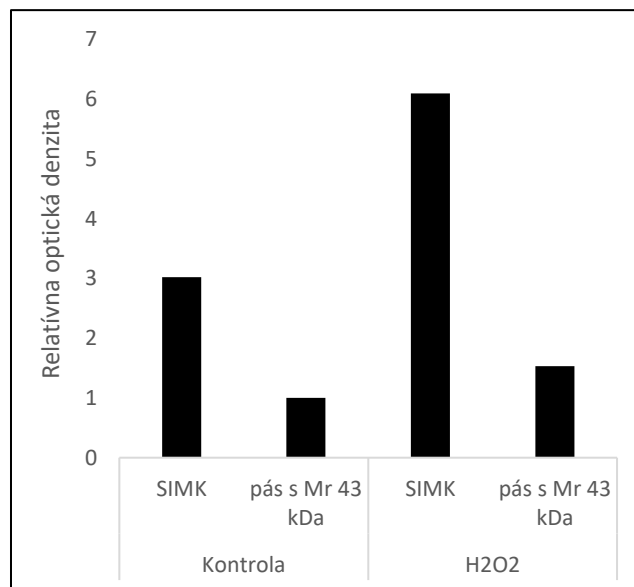
4.5 Detekcia fosforylácie MAPK pomocou imunoblotovania s použitím fosfošpecifickej protilátky

Cicavčia polyklonálna protilátka rozpoznávajúca fosforylovanú ERK1/2 (phospho-p44/42, pERK) pTEpY je široko používanou protilátkou, ktorá u rastlín rozpoznáva fosforylované MAPK s fosforylačným motívom pTEpY. U lucerny sú jej použitím detegované 2 pásy, z ktorých 1 (s vyššou molekulovou hmotnosťou) prislúcha fosforylovanej SIMK (Bekešová *et al.*, 2015). Podobne sme aj my detegovali 2 špecifické pásy (Obr. 9). Spodný pás s Mr 43 kDa zatiaľ nebol identifikovaný. Intenzita týchto pásov bola rôzna vo vzorke zo stresom ovplyvnených a kontrolných rastlín (Obr. 10). Signál SIMK pochádzajúci zo vzorky stresom ovplyvnených rastlín bol dvojnásobne vyšší



Obr. 9: Imunoblotová analýza fosforylovaných mitogénom aktivovaných proteínkináz (MAPK) rastlín lucerny siatej cv. Europe. (A) Imunoblot z celorastlinných proteínových vzoriek rastlín lucerny ovplyvnených 20mM peroxidom vodíka po dobu 30 minút a kontrolných rastlín z SDS-PAGE gélu. (B) vizualizácia bielkovín na polyvinilidín difluoridovej (PVDF) membráne po prenose pomocou Ponceau S. Horná šípka ukazuje na špecifický proteínový pás znázorňujúci stresom indukovanú mitogénom aktivovanú proteínkinázu (SIMK). Šípka pod ňou znázorňuje neznámy proteín. Š – proteínový štandard, kDa – molekulová hmotnosť.

(Obr. 10B). Tieto signály potvrdzujú, že SIMK je v rastlinách lucerny silnejšie fosforylovaná v podmienkach oxidatívneho stresu než v kontrolných podmienkach.



Obr. 10: Relatívna optická denzita bielkovinových pásov z obrázku 9.

4.6 Predikcia fosforylačných miest a ich kináz v aminokyselinovej sekvencii SIMK proteínu

Pomocou serverov GPS v3.0 (Xue *et al.*, 2011) a NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 2004) boli predikované najpravdepodobnejšie miesta fosforylácie v aminokyselinovej sekvencii SIMK proteínu. Špecifické miesta fosforylácie sú uvedené v tabuľkách 3 a 4. Fosforylovanými aminokyselinami boli serín, tyrozín a treonín. Pomocou softvéru GPS v3.0 boli podľa najvyšších skóre najpravdepodobnejšími kinázami pre fosforyláciu SIMK TKL, kinázy spojené s fosforyláciou tyrozínu a AGC kinázy (Tab. 6). NetPhos 3.1 softvérom boli podľa najvyšších skóre najpravdepodobnejšími kinázami pre fosforyláciu SIMK PKA, PKC, PKG kinázy (Tab. 7). Softvérové analýzy teda predikovali aj rovnaké kinázy, AGC, účastniace sa na fosforylácii SIMK proteínu. Očakávaním fosforylačným motívom MAPK je motív pTEpY (Pitzschke, 2015), ktorý sa nachádza aj v aminokyselinovej sekvencii SIMK na miestach 213-215 a 339-341.

Tab. 6: Predikcia najpravdepodobnejších kináz pre fosforyláciu SIMK z GPS v3.0

Pozícia	Kód	Kináza	Peptid	Skóre
14	S	TKL	PPADTVMSDAAPAPP	37,87
215	Y	TK/Ret	ETDFMTEYVVTRWYR	22,197
215	Y	TK/Ret/RET	ETDFMTEYVVTRWYR	22,197
366	T	AGC/DMPK	DFEQHALTEEQMKEL	18,597
14	S	AGC/RSK/RSKp70/RPS6KB1	PPADTVMSDAAPAPP	16,927
221	Y	TK/Ret	EYVVTRWYRAPELLL	16,786
221	Y	TK/Ret/RET	EYVVTRWYRAPELLL	16,786
301	S	AGC/DMPK/ROCK/ROCK1	LPPYRRQSFQEKFPH	16,171
14	S	AGC/DMPK/ROCK/ROCK1	PPADTVMSDAAPAPP	15,157
160	Y	TK/Tec/BTK	LSEEHCQYFLYQILR	15,022
33	S	CMGC/CDK/CDK7	ENIPAVLSHGGRFIQ	14,677
207	S	AGC/SGK/SGK1	FGLARVTSETDFMTE	13,731
301	S	AGC/PKC/PKCa/PRKCA	LPPYRRQSFQEKFPH	12,661
149	S	AGC/PKC/PKcd/PRKCQ	DLHQIIRSNQALSEE	11,859
209	T	STE/STE11	LARVTSETDFMTEYV	11,725
274	T	CMGC/CDK/CDK2/CDK2	LLMELIGTPSEDDL	11,721
77	T	CAMK/CAMKL/AMPK	CSAHNSETNEHVAVK	10,568
385	Y	TK/Src/SrcB/HCK	ALAFNPEYQQ*****	10,52
301	S	AGC/PKC/PKCa	LPPYRRQSFQEKFPH	10,39
330	T	Other/AUR/AurB	FDPRKRITVEDALAH	9,941

Tab. 7: Predikcia najpravdepodobnejších kináz pre fosforyláciu SIMK z NetPhos 3.1

Pozícia	Kód	Kináza	Peptid	Skóre
51	T	PKC	IFEV T AKYK	0.842
99	T	PKC	DAK R TLREI	0.799
301	S	PKA	YRRQ S FQEK	0.718
301	S	PKG	YRRQ S FQEK	0.673
301	S	RSK	YRRQ S FQEK	0.629
274	T	CKII	ELIG T PSED	0.624
354	T	cdk5	PVC M TPFSF	0.618
207	S	PKA	ARV T SETDF	0.616
207	S	RSK	ARV T SETDF	0.607
322	T	PKC	EK M LTFDPR	0.604
133	Y	GFR	FNDV Y IAYE	0.600
290	Y	EGFR	NAK R YIRQL	0.595
385	Y	EGFR	FNPE Y QQ--	0.595
233	Y	EGFR	NSSD Y TAAI	0.587
233	Y	SRC	NSSD Y TAAI	0.587
354	T	p38MAPK	PVC M TPFSF	0.582
366	T	CKII	QH A L T EEQM	0.578
366	T	CKI	QH A L T EEQM	0.576
209	T	CKII	VT S ETDFMT	0.565
230	S	cdc2	LLN S SDYT	0.562

5 DISKUSIA

Jedným z cieľov predkladanej bakalárskej práce bolo optimalizovať fenolovú extrakciu proteínov z koreňových pletív lucerny siatej. Fenolová extrakcia je známa ako najvhodnejšia extrakčná metóda pre pletivá obsahujúce relatívne veľké množstvo interferujúcich látok, ktoré môžu negatívne ovplyvniť elektroforézu (Saravanan a Rose, 2004; Wang *et al.*, 2006). Výsledkami sme dokázali, že optimalizáciou obsahu proteínov a použitím čerstvého CBB v extrakčnom protokole (Hurkman a Tanaka, 1986) boli gély kvalitnejšie a so zvýšenou intenzitou jednotlivých spotov. Použitie bielkovinového extraktu s vysokým obsahom proteínov (100 µg) bolo efektívnejšie než extrakty s nižším obsahom (80 a 50 µg). Po 2-DE sme softvérovo detegovali 251 škvŕn. Avšak v porovnaní s podobným experimentom ale inou rastlinou, napríklad Takáč *et al.*, (2011) s nanáškou 50 µg identifikovali v koreňových proteínoch arábkovky Thalovej 453 škvŕn, sme ich detegovali menej. Menší počet detegovaných spotov môže byť spôsobený iným druhom rastlín, nedostatočnou solubilizáciou hydrofóbných proteínov (Baggerman *et al.*, 2005) alebo vysokou prítomnosťou málo abundantných proteínov, ktoré nebolo možné farbením vo vzorke zachytiť (Gygi *et al.*, 2000). Pre zvýšenie počtu spotov v budúcich 2-DE experimentoch z lucerny siatej bude potrebné efektívnejšie odstrániť interferujúce látky ktoré sa prejavujú výrazným pozadím. Odstránenie pozadia môže spôsobiť väčšiu citlivosť detekcie bielkovinových škvŕn.

V druhej časti experimentov sme sa venovali vplyvu peroxidu vodíka na kvalitatívne a kvantitatívne zmeny v proteóme celých rastlín lucerny siatej v porovnaní s kontrolnými rastlinami pomocou dvojrozsmernej elektroforézy. Oxidačný stres býva indukovaný biotickými (Kiirika *et al.*, 2014) a abiotickými faktormi ako sú stres zo sucha (Zhang a Shi, 2018), ťažkých kovov (Tamás *et al.*, 2017), zasolenia a osmotického stresu (Leshem *et al.*, 2007; Martiniere *et al.*, 2019) či mechanického poranenia (Soares *et al.*, 2009). Hlavnou zložkou každej bunkovej odpovede je produkcia reaktívnych foriem kyslíka (ROS), v rôznych fázach stresovej odpovedi (Apel a Hirt 2004; Mittler, 2017). Proteíny menia svoju abundanciu kvôli rôznym obranným mechanizmom. V *M.truncatula* bolo študovaných viacero ovplyvnení oxidačným stresom. Napríklad počas mikrobiálnej invázie hostiteľská rastlina produkuje ROS, najmä H₂O₂, kumuluje ho a spôsobuje v mieste infekcie smrť buniek (Puppo *et al.*, 2013). Zistilo sa, že pri poranení listov dochádza v apoplaste k rapídne zvýšeniu ROS signalizácie a mobilizácii poranením regulovaných proteínov (WRP). Značné zmeny v abundancii sú však často

pozorovateľné najskôr po 6h (28 rôzne abundančných proteínov) od poranenia a najlepšie viditeľné a *de novo* prítomné proteíny sú až po 72h (Soares *et al.*, 2009). V našom prípade už krátkotrvajúce stresové podmienky (30 min.) vyvolali dostatočne pozorovateľné zmeny na géloch. Detegovali sme 80 škvŕn zo zvýšenou abundanciou a 97 škvŕn zo zníženou abundanciou a 7 unikátnych škvŕn pre kontrolné vzorky a 5 unikátnych škvŕn pre oxidatívne stresované vzorky. MS metódy by mohli podobne ako v experimente Rahman *et al.*, (2016) odhaliť ďalšie a presnejšie identifikácie jednotlivých proteínov.

Imunoblotovaním pomocou SDS-PAGE sme mali za cieľ zistiť abundanciu SIMK proteínu v kontrolných a peroxidom ovplyvnených rastlinách lucerny siatej. Bolo publikované, že SIMK je aktivovaná (fosforylovaná) vplyvom prekursoru etylénu (Ouaked *et al.*, 2003), ťažkých kovov (Jonak *et al.*, 2004), soľného stresu (Munnik *et al.*, 1999) a hubových elicítov (Cardinale *et al.*, 2000). Naša analýza použitím peroxidu vodíka je podľa našich vedomostí prvou takéhoto druhu. Signál SIMK proteínu, ktorý sme získali bol rovnaký aj u kontrolných aj u peroxidom vodíka ovplyvnených rastlín. Šamaj *et al.*, (2002) pozorovali rovnakú bazálnu prítomnosť SIMK proteínu v kontrolných vzorkách koreňov použitím polyklonálnej protilátky M23. M23 protilátka špecificky rozpoznáva heptapeptid FNPEYQQ, zodpovedajúci C-terminálnemu koncu SIMK sekvencie (Cardinale *et al.*, 2000), a špecificky rozpoznáva SIMK, ale nie iné súvisiace MAPK (Munnik *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2000). Signál s rovnakou intenzitou v peroxidom ovplyvnených vzorkách mohol byť spôsobený krátkym stresovým pôsobením. Je známe že prvotnou reakciou MAPK na stresové podmienky je ich aktivácia pomocou fosforylácie. Táto fosforylácia nastáva často v priebehu niekoľkých minút, pričom už po 30 minútach sú defosforylované (Colcombet a Hirt, 2008). Následne je spustená ich transkripcia a translácia. Z týchto dôvodov SIMK nemenila v našich experimentoch svoju abundanciu.

V práci sme použili tiež kombináciu metód dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania. Detekcia SIMK pomocou dvojrozmernej elektroforézy a imunoblotovania bola úspešná. Pri detekcii sme využívali 2 druhy IPG prúžkov pH 3-10, pH 5-8. Po výsledkoch z prvotných analýz sme sa rozhodli pokračovať s IPG prúžkami pH 5-8. Výsledkom bolo dosiahnutie 3 škvŕn na oboch géloch s odlišným pI. Odlišné pI môže byť spôsobené napríklad rôznymi izoformami jedného proteínu (Iacovides *et al.*, 2013) alebo posttranslačnými modifikáciami (Urasaki *et al.*, 2016). Naša imunoblotová analýza ukázala spolu 6 škvŕn pre anti-MPK6 protilátku v pletivách

lucerny. Aj keď na základe jednorozmernej SDS-PAGE môžeme predpokladať špecificitu tejto protilátky, špecificitu škvrn pre SIMK lucerny bude potrebné ďalej dokázať. Ideálnym nástrojom by bola línia s chýbajúcou expresiou SIMK, ktorú by bolo možné pripraviť napríklad CRISPR/CAS9 metódou (Gao, 2018).

V porovnaní so SIMK, u MPK3 proteínu arábkovky bola pozorovaná dvojitá fosforylácia na dvojrozmerných géloch po ovplyvnení peroxidom vodíka, pričom v kontrolných podmienkach bola detegovaná len jedna škvrna (BP-Dávid Lukáč, 2018). Ak predpokladáme že všetky škvrny z nášho dvojrozmerného gélu zodpovedajú SIMK, je možné, že aj v našich kontrolných rastlinách bola SIMK takmer kompletne fosforylovaná. Alebo môžeme hypotetizovať že SIMK sa u lucerny vyskytuje v trvale fosforylovanom stave. Škvra 1 bola detegovaná ako menej abundantná a škvrna 5 ako škvrna s vyššou abundanciou v peroxidom ovplyvnených rastlinách. Práve táto zmena môže predstavovať prípadnú fosforyláciu špecifickú pre oxidatívny stres. Avšak toto tvrdenie si vyžaduje dôkladný experimentálny dôkaz. Takým by mohlo byť použitie podobnej vzorky akú sme použili v našom experimente, ale po ko-inkubácii s fosfatázou (Bekešová *et al.*, 2015). Fosfatáza spôsobí odštiepenie všetkých fosfoskupín z proteínov, vrátane SIMK. Na membráne by sa potom objavila len nefosforylovaná SIMK. Prítomnosť väčšieho počtu škvrn v kyslej oblasti môže indikovať viacnásobnú fosforyláciu. Môžeme predpokladať, že naviazanie každej individuálnej fosfoskupiny znamená ďalší pokles pI SIMK. To by znamenalo, že SIMK môže byť fosforylovaná na rôznych miestach svojej aminokyselinovej sekvencie.

SIMK proteín je podľa serverov GPS v3.0 (Xue *et al.*, 2011) a NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 2004) fosforylovaný najčastejšie na serínových, tyrozínových a treonínových zvyškoch. Medzi hlavné kinázy ktoré ho fosforylujú patria tyrosínové kinázy (TK, RET) a kinázy z rodiny ACG kináz (pomenovaná podľa hlavných zástupcov PKA, PKC, PKG). Tieto kinázy patria do veľkej rastlinnej kinázovej rodiny AGC, ktorej niektoré kinázy sa zúčastňujú regulácie transportu auxínov (Zourelidou *et al.*, 2009).

Pri detekcii fosforylácie použitím fosfošpecifickej protilátky sme detegovali u lucerny 2 pásy. Tieto pásy podľa publikovaných dát (Bekešová *et al.*, 2015) prislúchajú SIMK a neznámemu proteínu. V našom prípade bol signál porovnávaný medzi kontrolnými a peroxidom ovplyvnenými rastlinami. Zistili sme, že signál 1. pásu (SIMK signál) je oveľa silnejší vo vzorke ovplyvnených rastlín. Podobne sa Takáč *et al.*, (2016)

podarilo v koreňoch arábkovky (Col-0) detegovať 2 špecifické pásy. Prvý prislúchal MPK6 (SIMK homológ v lucerne siatej) a druhý MPK3. Potvrdili tak prítomnosť bazálnej fosforylácie aj v podmienkach nespôsobujúcich stres. Náš experiment tiež evidoval slabý fosforylačný signál aj v kontrolných podmienkach. Týmto zisteniami v našom experimente môžeme vyvodiť záver, že SIMK proteín u lucerny podlieha silnejšej fosforylácii v podmienkach peroxidom vytvoreného oxidatívneho stresu než v kontrolných podmienkach a taktiež, že aj MAPK lucerny majú bazálnu hladinu fosforylácie. Fosforylovaná SIMK sa teda môže podieľať aj na signalizácii H_2O_2 počas imunitnej/obrannej odpovedi no toto ale treba experimentálne dokázať.

6 ZÁVER

V predkladanej bakalárskej práci sme sa zaoberali problematikou fenolovej extrakcie koreňových proteínov, optimalizácii extrakčnej metódy, príprave a vyhodnoteniu gélov. Pozorovali sme kvalitatívne a kvantitatívne zmeny v proteómoch celých rastlín lucerny siatej pomocou dvojrozmernej elektroforézy vplyvom peroxidu vodíka oproti kontrolným rastlinám. Ďalej sme v celorastlinných extraktoch lucerny siatej porovnávali a detegovali prítomnosť SIMK proteínu vo vzorkách peroxidom ovplyvnených rastlín a kontrolných rastlín. Na detekciu sme použili aj SDS-PAGE v kombinácii s imunoblotovaním aj dvojrozmernú elektroforézu v kombinácii s imunoblotovaním. Nakoniec sme sa zaoberali fosforyláciou SIMK proteínu pomocou fosfošpecifickej protilátky.

Zistili sme, že pri optimalizovaní obsahu proteínov a príprave čerstvého koloidného farbiva CBB sa docielilo kvalitnejších gélov. Pri príprave gélov z celorastlinných extraktov rastlín ovplyvnených peroxidom vodíka sme detegovali značné kvalitatívne a kvantitatívne zmeny. Detekcia SIMK bola úspešná aj pomocou SDS-PAGE aj dvojrozmernou elektroforézou v kombinácii s imunoblotovaním. Naša analýza použitím peroxidu vodíka je podľa našich vedomostí prvou takéhoto druhu. Prítomnosť SIMK bola potvrdená aj v kontrolných aj v peroxidom ovplyvnených celorastlinných vzorkách lucerny. Pomocou dvojrozmernej elektroforézy v kombinácii s imunoblotovaním použitím anti-MPK6 sme identifikovali 6 škvŕn. Škvŕna 1 a 5 mali rôznu abundanciu, ktorá by mohla predstavovať špecifickú fosforyláciu pre oxidatívny stres. Detekcia fosforylácie bola úspešná pomocou fosfošpecifickej protilátky anti-pTEpY.

Dokázali sme, že SIMK je v rastlinách lucerny siatej silnejšie fosforylovaná v podmienkach oxidatívneho stresu než v kontrolných podmienkach. Získanými výsledkami môžeme poukázať na potrebu ďalšieho študovania SIMK aktivácie v podmienkach oxidatívneho stresu pre zlepšenie porozumenia jej úlohe v stresovej odpovedi.

7 LITERATURA

- Acin-Perez R., Bayona-Bafaluy M.P., Fernández-Silva P., Moreno-Loshuertos R., Pérez-Martos A., Bruno C., Moraes C.T., Enríquez J.A. (2004): Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular Cell* **13**, 805–815.
- Adapa P., Schoenau G., Tabil L., Sokhansanj S., Singh A. (2007): Compression of fractionated sun-cured and dehydrated alfalfa chops into cubes – specific energy models. *Bioresource Technology* **98**, 38–45.
- Addona T. A., Abbatiello S. E., Schilling B., Skates S. J. *et al.*, (2009): Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nature Biotechnology* **27**, 633–641.
- Aebersold R., Mann M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207.
- Aguilar O., Glatz C.E., Palomares M.R. (2009): Characterization of green-tissue protein extract from alfalfa (*Medicago sativa*) exploiting a 3-D technique. *Journal of Separation Science* **32**, 3223–3231.
- Anderson L., Hunter C.L. (2006): Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 573–588.
- Anderson N.L., Anderson N.G. (1977): 2 dimensional separation of human-serum proteins, use of antibodies for identification, and optical methods for gel intercomparison. *Federation proceedings* **36**:1063.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373–399.
- Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Avice J.C., Nogués S. (2011): Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **62**, 111–123.
- Aranjuelo I., Tcherkez G., Molero G., Gilard F., Avice J.-C., Nogués S. (2013): Concerted changes in N and C primary metabolism in alfalfa (*Medicago sativa*) under water restriction. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1–17.
- Baggerman G., Vierstraete E., De Loof A., Schoofs L. (2005): Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **8**, 669–677.
- Baginsky S. (2009): Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 93–120.
- Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1017–1031.
- Bardwell A.J., Flatauer L.J., Matsukuma K., Thorner J., Bardwell L. (2001): A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 10374–10386.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* **22**, 755–771.
- Bekešová S., Komis G., Křenek P., Vyplelová P., Ovečka M., Luptovčiak I., Illés P., Kuchařová A., Šamaj J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Frontiers in Plant Science* **6**:336.
- Ben Laouane R., Meddich A., Bechtaoui N., Oufdou K., Wahbi S. (2019): Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia symbiosis on the tolerance of *Medicago sativa* to salt stress. In: *Gesunde Pflanzen*, Springer, Berlin/Heidelberg, 1–12.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Gammeltoft S., Brunak S. (2004): Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633–1649.
- Bradford M.M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.

- Brusniak M.Y., Kwok S.T., Christiansen M., Campbell D., Reiter L., Picotti P., Kusebauch U., Ramos H., Deutsch E.W., Chen J., Moritz R.L., Aebersold R. (2011): ATAQS: a computational software tool for high throughput transition optimization and validation for selected reaction monitoring mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* **12**:78.
- Camacho-Carvajal M., Wollscheid B., Aebersold R., Steimle V., Schamel W.A. (2004): Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 176–182.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36734–36740.
- Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B. (2005): Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *PROTEOMICS* **5**, 2497–2507.
- Carrozzo R., Wittig I., Santorelli F.M., Bertini E., Hofmann S., Brandt U., Schägger H. (2006): Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Annals of neurology* **59**, 265–275.
- Clark D. P., Pazdernik N.J. (2013): Proteomics: The global analysis of proteins. In: *Molecular Biology*, Chapter e15, 2nd ed. (David P. Clark, Nanette J. Pazdernik eds.), Academic Press, Elsevier, London, UK, e309–e314.
- Clark D. P., Pazdernik N.J. (2016): Proteomics. In: *Biotechnology*, Chapter 9, 2nd ed. (David P. Clark, Nanette J. Pazdernik eds.), Academic Cell, Elsevier, London, UK, 295–333
- Cohen P.T. (2002): Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *Journal of cell science* **115**, 241–256.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217–226.
- Cooper J.A., Sefton B.M., Hunter T. (1983): Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Methods in Enzymology* **99**, 387–402.
- Dai C., Cui W., Pan J., Xie Y., Wang J., Shen W. (2017): Proteomic analysis provides insights into the molecular bases of hydrogen gas-induced cadmium resistance in *Medicago sativa*. *Journal of Proteomics* **152**, 109–120.
- Damerval C., De Vienne C., Zivy M., Thiellement H. (1986): The technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* **7**, 52–54.
- de Hoffmann E., Stroobant V. (2007): *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, s.502.
- Deyl M.; Hisek K. (2001): *Naše květiny*. 3, Praha: Akademia, 690 s.
- Djafarzadeh S., Niggli V. (1997): Signaling pathways involved in dephosphorylation and localization of the actin-binding protein cofilin in stimulated human neutrophils. *Experimental Cell Research* **236**, 427–435.
- dos Reis S.P., Lima A.M., de Souza C.R.B. (2012): Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 8628–8647.
- Ellis R.J. (1979): The most abundant protein in the world. In: *Trends in biochemical sciences*. (Ellis R.J. ed.), Cell Press, Massachusetts, USA, **4**, 241–244.
- Eubel H., Jänsch L., Braun H.P. (2003): New insights into the respiratory chain of plant mitochondria: supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiology* **133**, 274–286.
- Eubel, H., Braun, H. -P., and Millar, A. H. (2005): Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods* **1**:11.
- Farley A.R., Link A.J. (2009): Identification and quantification of protein posttranslational modifications. *Methods in Enzymology* **463**, 725–763.
- Faurobert M., Pelpoir E., Chaïb J. (2006): Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. In: *Plant Proteomics. Methods in Molecular Biology*, (Thiellelement H., Zivy M., Damerval C., Méchin V., eds.), Humana Press, Springer, New York City, USA, **355**, 9–14.

- Fischer R., Emans N. (2000): Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* **9**, 279–299.
- Franklin-Tong V.E., Gourlay C.W. (2008): A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochemical Journal* **413**, 389–404.
- Gao C. (2018): The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 275–276.
- Gautron J., Réhault-Godbert S., Nys Y., Mann K., Righetti P.G. (2011): Use of high-throughput technology to identify new egg components. In: *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*. (Yves Nys, Maureen Bain, Filip Van Immerseel eds.), Woodhead Publishing, Elsevier, Sawston, UK, 133–150.
- Ge Y., Rajkumar L., Guzman R. C., Nandi S., Patton W. F., Agnew B. J. (2004): Multiplexed fluorescence detection of phosphorylation, glycosylation, and total protein in the proteomic analysis of breast cancer refractoriness. *Proteomics* **4**, 3464–3467.
- Gegenheimer P. (1990): Preparation of extracts from plants. In: *Methods in enzymology*, Chapter 14 (Deutscher M.P. ed.), Science direct, Elsevier, London, UK, **182**, 174–193.
- Ghosh D., Xu J. (2014): Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Frontiers in Plant Science* **5**:6.
- Granier F. (1988): Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **9**, 712–718.
- Grimsrud P. A., den Os D., Wenger C.D., Swaney D.L., Schwartz D., Sussman M.R., Ane J.-M., Coon J.J. (2010): Large-scale phosphoprotein analysis in *Medicago truncatula* roots provides insight into in vivo kinase activity in legumes. *Plant Physiology* **152**, 19–28.
- Gu Z., Glatz C.E. (2007): A method for three-dimensional protein characterization and its application to a complex plant (corn) extract. *Biotechnology and Bioengineering* **97**, 1158–1169.
- Guo D., Chen F., Wheeler J., Winder J., Selman S., Peterson M., Dixon R.A. (2001): Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases. *Transgenic Research* **10**, 457–464.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R. (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9390–9395.
- Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R. (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **17**, 994–999.
- Halligan B.D., Ruotti V., Jin W., Laffoon S., Twigger S.N., Dratz E.A. (2004): ProMoST (Protein Modification Screening Tool): a web-based tool for mapping protein modifications on two-dimensional gels. *Nucleic Acids Research* **32**, 638–644.
- Hao C.-C., Wang L.-J., Dong L., Ozkan N., Wang D.-C., Mao Z.-H. (2008): Influence of alfalfa powder concentration and granularity on rheological properties of alfalfa-wheat dough. *Journal of Food Engineering* **89**, 137–141.
- Heffetz D., Fridkin M., Zick Y. (1991): Generation and use of antibodies to phosphothreonine. *Methods in Enzymology* **201**, 44–53.
- Hiller K., Schobert M., Hundertmark C., Jahn D., Munch R. (2003): JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Research* **31**, 3862–3865.
<http://link.springer.com/10.1007/s10343-019-00461-x>
- Huang J., Willems P., Van Breusegem F., Messens J. (2018): Pathways crossing mammalian and plant sulfenomic landscapes. *Free Radical Biology and Medicine* **122**, 193–201.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986): Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant physiology* **81**, 802–806.
- Cham Mead J.A., Bianco L., Bessant C. (2010): Free computational resources for designing selected reaction monitoring transitions. *Proteomics* **10**, 1106–1126.
- Chen J., Han G., Shang C., Li J., Zhang H., Liu F., Wang J., Liu H., Zhang Y. (2015): Proteomic analyses reveal differences in cold acclimation mechanisms in freezing-tolerant and freezing-sensitive cultivars of alfalfa. *Frontiers in Plant Science* **6**:105.
- Chen S.X., Harmon A.C. (2006): Advances in plant proteomics. *Proteomics* **6**, 5504–5516.

- Chiang Y.-H., Wu Y.-J., Lu Y.-T., Chen K.-H., Lin T.-C., Chen Y.-K.H., Li D.-T., Shi F.-K., Chen C.-C., Hsu J.-L. (2011): Simple and specific dual-wavelength excitable dye staining for glycoprotein detection in polyacrylamide gels and its application in glycoproteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, Article ID 780108, 1–8.
<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/780108/>
- Cho E.J., Yuen C.Y.L., Kang B.-H., Ondzighi C.A., Staehelin L.A., Christopher D.A. (2011): Protein disulfide isomerase-2 of *Arabidopsis* mediates protein folding and localizes to both the secretory pathway and nucleus, where it interacts with maternal effect embryo arrest factor. *Molecules and Cells* **32**, 459–475.
- Iacovides D.C., Johnson A.B., Wang N., Boddapati S., Korkola J., Gray J.W. (2013) Identification and quantification of AKT isoforms and phosphoforms in breast cancer using a novel nanofluidic immunoassay. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**, 3210–3220.
- Immler D., Gremm D., Kirsch D., Spengler B., Presek P., Meyer H.E. (1997): Identification of phosphorylated proteins from thrombin-activated human platelets isolated by two-dimensional gel electrophoresis by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Electrophoresis* **19**, 1015–1023.
- James P. (1997): Protein identification in the post-genome era: The rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics* **30**, 279–331.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol* **136**, 3276–3283.
- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. (2007): How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium - Medicago* model. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 619–633.
- Kamps M.P. (1991): Generation of anti-phosphotyrosine antibodies for immunoblotting. *Methods in Enzymology* **201**, 101–110.
- Kiirika L. M., Schmitz U., Colditz F. (2014): The alternative *Medicago truncatula* defense proteome of ROS—defective transgenic roots during early microbial infection. *Frontiers in Plant Science* **5**:341.
- Kim S.T., Cho K.S., Jang Y.S., Kang Y.K. (2001): Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* **22**, 2103–2109.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 237–265.
- Kugler M., Jansch L., Kruff V., Schmitz U.K., Braun H.P. (1997): Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gelelectrophoresis. *Photosynthesis Research* **53**, 35–44.
- Kuhn E., Wu J., Karl J., Liao H., Zolg W., Guild B. (2004): Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics* **4**, 1175–1186.
- Lan P., Li W., Schmidt W. (2012): Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient *Arabidopsis* roots reveals multiple levels of gene regulation. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**, 1156–1166.
- Lange V., Picotti P., Domon B., Aebersold R. (2008): Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology* **4**:222.
- Larkindale J., Vierling E. (2007): Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology* **146**, 748–761.
- Leshem Y., Seri L., Levine A. (2007): Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant Journal* **51**, 185–197.
- Li W., Wei Z., Qiao Z., Wu Z., Cheng L., Wang Y., Khan R.H. (2013): Proteomics analysis of alfalfa response to heat stress. *Plos one* **8**:e82725
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082725>
- Liu Y. (2012): Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Reports* **31**, 1–12.

- Long R., Gao Y., Sun H., Zhang T., Li X., Li M., Sun Y., Kang J., Wang Z., Ding W., Yang, Q. (2018): Quantitative proteomic analysis using iTRAQ to identify salt-responsive proteins during the germination stage of two *Medicago* species. *Scientific Reports* **8**:9553. <http://www.nature.com/articles/s41598-018-27935-8>
- Loomis W.D. (1990): Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. In: *Methods in enzymology*, Chapter 54 (Fleischer S., Packer L. eds.), Academic Press, Elsevier, New York, USA, **31**, 528–544.
- MacGillivray A.J., Rickwood D. (1974): The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. *European Journal of Biochemistry* **41**, 181–90.
- MacLean B., Tomazela D.M., Shulman N., Chambers M., Finney G.L., Frewen B., Kern R., Tabb D.L., Liebler D.C., MacCoss M.J. (2010): Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–968.
- Mallick P., Kuster B. (2010): Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature Biotechnology* **28**, 695–709.
- Martiniere A., Fiche J.B., Smokvarska M., Mari S., Alcon C., Dumont X., Hematy K., Jaillais Y., Nollmann M., Maurel C. (2019): Osmotic stress activates two reactive oxygen species pathways with distinct effects on protein nanodomains and diffusion. *Plant Physiology* **179**, 1581–1593.
- Mijnsbrugge K.V., Meyermans H., van Montagu M., Bauw G., Boerjan W. (2000): Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta* **210**, 589–598.
- Mittler R. (2017): ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**, 11–19.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* **61**, 234–248.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt H. (1999): Distinct osmosensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyperosmotic stress. *The Plant Journal* **20**, 381–388.
- Nanjo Y., Skultety L., Ashraf Y., Komatsu S. (2010): Comparative proteomic analysis of early-stage soybean seedlings responses to flooding by using gel and gel-free techniques. *Journal of Proteome Research* **9**, 3989–4002.
- Nanjo Y., Skultety L., Uváčková E., Klubicová K., Hajduch M., Komatsu S. (2011): Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *Journal of Proteome Research* **11**, 372–385.
- Nelson C.J., Millar A.H. (2015): Protein turnover in plant biology. *Nature Plants* **1**:15017
- NLO (2010): National lucerne organization of South Africa, www.lusern.org
- O’Farrell P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry* **250**, 4007–4021.
- Oda Y., Huang K., Cross F.R., Cowburn D., Chait B.T. (1999): Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6591–6596.
- Ogorzalek Loo R.R., Hayes R., Yang Y., Hung F., Ramachandran P., Kim N., Gunsalus R., Loo J.A. (2005): Top-down, bottom-up, and side-to-side proteomics with virtual 2-D gels. *International Journal of Mass Spectrometry* **240**, 317–325.
- Old W. M., Meyer-Arendt K., Aveline-Wolf L., Pierce K. G., Mendoza A., Sevinsky J. R., Resing K. A., Ahn N. G. (2005): Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**, 1487–1502.
- Oldroyd G.E.D., Downie J.A. (2008): Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 519–546.
- Ong S.E., Mann M. (2005): Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology* **1**, 252–262.

- Onisko B., Dynin I., Requena J.R., Silva C.J., Erickson M., Carter J.M. (2007): Mass spectrometric detection of attomole amounts of the prion protein by nanoLC/MS/MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **18**, 1070–1079.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* **22**, 1282–1288.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Smékalová V., Luptovciak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Skultety L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seeding susceptibility caused by overexpression of Medicago SIMKK in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2335–2350.
- Paša-Tolić L., Jensen P.K., Anderson G.A., Lipton M.S., Peden K.K., Martinovic S., Tolic N., Bruce J.E., Smith R.D. (1999): High throughput proteome-wide precision measurements of protein expression using mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 7949–7950.
- Penque, D. (2009): Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. *Proteomics – Clinical Applications* **3**, 155–172.
- Picotti P., Bodenmiller B., Mueller L.N., Domon B., Aebersold R. (2009): Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell* **138**, 795–806.
- Pitzschke A. (2015): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* **20**, 49–55.
- Poetsch A., Neff D., Seelert H., Schägger H., Dencher N.A. (2000): Dye removal, catalytic activity and 2D-crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1466**, 339–349.
- Popescu S.C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S.P. (2009): MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* **23**, 80–92.
- Printz B., Guerriero G., Sergeant K., Renaut J., Lutts S., Hausman J.-F. (2015): Ups and downs in alfalfa: Proteomic and metabolic changes occurring in the growing stem. *Plant Science* **238**, 13–25.
- Puppo A., Pauly N., Boscari A., Mandon K., Brouquisse R. (2013): Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**, 2202–2219.
- Qin D., Wu H., Peng H., Yao Y., Ni Z., Li Z., Zhou C., Sun Q. (2008): Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics* **9**, 432.
- Rabilloud T., Lelong C. (2011): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics* **74**, 1829–1841.
- Rahman M.A., Yong-Goo K., Iftekhar A. LIU G.-she, Hyoshin L., Joo L.J., Byung-Hyun L. (2016): Proteome analysis of alfalfa roots in response to water deficit stress. *Journal of Integrative Agriculture* **15**, 1275–1285.
- Rasmussen M.W., Roux M., Petersen M., Mundy J. (2012): MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**:169.
- Reimer U., Reineke U., Schneider-Mergener J. (2002): Peptide arrays: from macro to micro. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 315–320.
- Romero-Puertas M.C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L.M. (2013): Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in Plant Science* **4**:373.
- Saravanan R.S., Rose J.K.C. (2004): A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**, 2522–2532.
- Sasabe M., Machida Y. (2012): Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* **69**, 913–918.
- Shen M., Stukenberg P.T., Kirschner M.W., Lu K.P. (1998): The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes & Development* **12**, 706–720.

- Schägger H. & von Jagow G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* **199**, 223–231.
- Schägger H. (2001): Blue native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods in Cell Biology* **65**, 231–244.
- Schägger H., Cramer W.A. & von Jagow G. (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **217**, 220–230.
- Scholtz G.D.J. (2008): *A grading system for Medicago sativa hay in South Africa*. Ph.D. thesis, The University of the Free State, Bloemfontein.
- Schuster A., Davies E. (1983): Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls. *Plant physiology* **73**, 822–827.
- Silva-Sanchez C., Li H., Chen S. (2015): Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics. *PROTEOMICS* **15**, 1127–1141.
- Singh R.P., Dhania G., Sharma A., Jaiwal P.K. (2007): Biotechnological approaches to improve phytoremediation efficiency for environment contaminants. In: *Environmental bioremediation technologies*. (Singh S.N., Tripathi R.D. eds.), Springer, Berlin/Heidelberg, 223–258.
- Sinha A.K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 196–203.
- Slavík B. (2000): *Květena České republiky. 4*, Praha: Academia, 529 s.
- Smith L.M., Kelleher N.L. (2013): Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nature Methods* **10**, 186–187
- Soares N.C., Francisco R., Vielba J.M., Ricardo C.P., Jackson P.A. (2009): Associating wound-related changes in the apoplast proteome of *Medicago* with early steps in the ROS signal-transduction pathway. *Journal of Proteome Research* **8**, 2298–2309.
- Song J., Braun G., Bevis E., Doncaster K. (2006): A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis* **27**, 3144–3151.
- Stahl-Zeng J., Lange V., Ossola R., Eckhardt K., Krek W., Aebersold R., Domon B. (2007): High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**, 1809–1817.
- Šamaj J., Ovecka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal* **21**, 3296–3306.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**, 140–148.
- Takáč T., Šamajová O., Pechan T., Luptovčiak I., Šamaj J. (2017): Feedback microtubule control and microtubule-actin cross-talk in *Arabidopsis* revealed by integrative proteomic and cell biology analysis of KATANIN 1 mutants. *Molecular & Cellular Proteomics* **16**, 1591–1609.
- Takáč T., Vadovič P., Pechan T., Luptovčiak I., Šamajová O., Šamaj J. (2016): Comparative proteomic study of *Arabidopsis* mutants mpk4 and mpk6. *Scientific Reports* **6**:28306. <https://www.nature.com/articles/srep28306>
- Takekawa M., Tatebayashi K., Saito H. (2005): Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Molecular Cell* **18**, 295–306.
- Tamás L., Mistrík I., Zelinová V. (2017): Heavy metal-induced reactive oxygen species and cell death in barley root tip. *Environmental and Experimental Botany* **140**, 34–40.
- Tena G., Boudsocq M., Sheen J. (2011): Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 519–529.
- Tharanathan R.N., Mahadevamma S. (2003): Grain legumes – a boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* **14**, 507–518.
- Tsugita A., Kamo M. (1999) 2-D electrophoresis of plant proteins. In: *Methods in Molecular Biology*. (Link A.J. ed.), Humana Press, Springer, New York City, USA, **112**, 95–97.

- Urasaki Y., Fiscus R.R., Le T.T. (2016): Molecular classification of fatty liver by high-throughput profiling of protein post-translational modifications. *The Journal of Pathology* **238**, 641–650.
- Vélez-Bermúdez I.C., Schmidt W. (2014): The conundrum of discordant protein and mRNA expression. Are plants special? *Frontiers in plant science* **5**:619.
- Venkateshwaran M., Ané J.-M. (2011): Legumes and nitrogen fixation: Physiological, molecular, evolutionary perspectives, and applications. In: *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*, (Malcolm J. Hawkesford, Peter Barraclough eds.), John Wiley & Sons, New Jersey, USA, **20**, 457–478.
- Vincent D., Wheatley M.D., Cramer G.R. (2006): Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters. *Electrophoresis* **27**, 1853–1865.
- Vogel C., Marcotte E.M. (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* **13**, 227–232.
- Wang J.Y. (1988): Antibodies for phosphotyrosine: analytical and preparative tool for tyrosyl-phosphorylated proteins. *Analytical Biochemistry* **172**, 1–7.
- Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresti M. (2003): Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**, 2369–2375.
- Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M., (2006): A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* **27**, 2782–2786.
- Wang Y., Frei M. (2011): Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **141**, 271–286.
- Watson B.S., Lei Z., Dixon R.A., Sumner L.W. (2004): Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* **65**, 1709–1720.
- Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 481–485.
- Wilkins M.R., Gasteiger E., Sanchez JC., Bairoch A., Hochstrasser D.F. (1998): Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* **19**, 1501–1505.
- Wittig I., Braun H. P., Schagger H. (2006): Blue-native-PAGE. *Nature protocols* **1**, 416–428.
- Wu F.-S., Wang M.-Y. (1984): Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. In: *Analytical Biochemistry*. (Wu F.-S., Wang M.-Y. eds.), Elsevier, London, UK, **139**, 100–103.
- Xue Y., Liu Z., Cao J., Ma Q., Gao X., Wang Q., Jin C., Zhou Y., Wen L., Ren J. (2011): GPS 2.1: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Engineering Design and Selection* **24**, 255–260.
- Yacoubi R., Job C., Belghazi M., Chaibi W., Job D. (2011): Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. *Journal of Proteome Research* **10**, 3891–3903.
- Yacoubi R., Job C., Belghazi M., Chaibi W., Job D. (2013): Proteomic analysis of the enhancement of seed vigour in osmoprimed alfalfa seeds germinated under salinity stress. *Seed Science Research* **23**, 99–110.
- Yan J.X., Packer N.H., Gooley A.A., Williams K.L. (1998): Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *Journal of Chromatography A* **808**, 23–41.
- Yu L.R., Stewart N.A., Veenstra T.D. (2010): Proteomics: The deciphering of the functional genome. In: *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*. (Geoffrey S. Ginsburg, Huntington F. Willard eds.), Academic Press, Elsevier, London, UK, 89–96.
- Zerbetto E., Vergani L., Dabbeni-Sala F. (1997): Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **18**, 2059–2064.
- Zhang C., Shi S. (2018): Physiological and proteomic responses of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties to PEG-induced osmotic stress. *Frontiers in Plant Science* **9**:242

- Zhang T., Chen S., Harmon A.C. (2016): Protein-protein interactions in plant mitogen-activated protein kinase cascades. *Journal of experimental botany* **67**, 607–618.
- Zhu H., Klemic J.F., Chang S., Bertone P., Casamayor A., Klemic K.G., Smith D., Gerstein M., Reed M.A., Snyder M. (2000): Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature Genetics* **26**, 283–289.
- Zourelidou M., Muller I., Willige B.C., Nill C., Jikumar Y., Li H., Schwechheimer C. (2009): The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **136**, 627–636.
- Zweigenbaum J., Henion J. (2000): Bioanalytical high-throughput selected reaction monitoring-LC/MS determination of selected estrogen receptor modulators in human plasma: 2000 samples/day. *Analytical chemistry* **72**, 2446–2454.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2-DE	dvojrozmerná elektroforéza
AGC	rodina kináz obsahujúca PKA, PKC, PKG
AMP	adenozínmonofosfát
ATP	adenozíntrifosfát
BFB	brómfenolová modrá
BN-PAGE	modro natívna polyakrylamidová gélová elektroforéza
BSA	hovádzí sérový albumín
CAS9	„CRISPR-associated 9“
CBB	coomassie brilliant blue r-250
CRISPR	„clustered regularly interspaced short palindromic repeats“
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
EGTA	kyselina etylénglykoltetraoctová
ERK	„extracelullar signal regulated kinase“
ESI	ionizácia elektrosprejom
MALDI	laserová desorpčná ionizácia s podporou matrice
HEPES	2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazín-1-yl]etánsulfónová kyselina
CHAPS	dimethyl (3-(propyl)azaniumylpropán)-1 sulfonát
IAA	amid kyseliny jódooctovej
IEF	izoelektrická fokusácia
IPG	imobilizovaný pH gradient
LC-MS	kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou
LRSH	lissamín rhodamín B sulfonyl hydrazín
MAPK	mitogénom aktivovane proteínkinázy
MAPKK	mitogénom aktivovane proteínkinázy kinázy
MAPKKK	mitogénom aktivovane proteínkinázy kinázy kinázy
MPK3	mitogénom aktivovaná proteínkináza 3
MPK6	mitogénom aktivovaná proteínkináza 6
PAGE	polyakrylamidová gélová elektroforéza
PKA	proteínkináza A
PKC	proteínkináza C
PKG	proteínkináza G
P-Ser	fosfoserín
pTEpY	fosfotreonín-hocijaká aminokyselina-fosfotyrozín
P-Thr	fosfotreonín
PTM	posttranslačné modifikácie
P-Tyr	fosfotyrozín
PVDF	polyvinilidín difluorid
Q	kvadрупól
QQQ	trojitý kvadрупól
ROS	reaktívne formy kyslíka
RUBISCO	ribulóza bisfosfát karboxyláza/oxygenáza
S	serín
SDS	dodecylsulfát sodný
SILAC	stabilné izotopové značenie aminokyselinami
SIMK	stresom indukované mitogénom aktivované proteínkinázy
T	treonín

TBS-T	trisom pufovaný fyziologický roztok s Tweenom
TCA	trichlóroctová kyselina
WRP	poranením regulované proteíny
X,E	hocijaká aminokyselina
Y	tyrozín