

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza jaderných proteinů ječmene s využitím
chemické modifikace cysteinu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Markéta Budínská
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla mnohokrát poděkovat mému školiteli prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za cenné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zdeňku Perutkovi za pomoc v laboratoři a všem ostatním pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum za vstřícný a přátelský přístup.

Děkuji také své rodině za neocenitelnou podporu během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Budínská
Název práce	Jaderné proteiny ječmene s využitím chemické modifikace cysteinu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Jaderné proteiny jsou životně důležitou součástí eukaryotických buněčných jader. Jsou zapojeny do procesů strukturální a funkční organizace, genové exprese a buněčného dělení. Jaderná proteomika představuje užitečný přístup pro studium mechanismů, které jsou základem odpovědi rostliny na abiotický stres, zahrnujících protein-proteinové interakce, enzymové aktivity a posttranslační modifikace. Rostlinný jaderný proteom však nebyl doposud dostatečně prozkoumán. Cílem této práce bylo otestovat metodu identifikace jaderných proteinů ječmene pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím chemické modifikace cysteinu. Pro tento účel byla nejprve provedena optimalizace protokolu pro modifikaci cysteinu alkylačními činidly 2-bromethylaminem, 3-brompropylaminem a *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem. Na základě výsledků MALDI-TOF/TOF analýz byl odvozen optimální protokol modifikace, který byl následně použit v dalším experimentu při identifikaci proteinů z G1 a G2 jader ječmene. Proteiny alkylované 2-bromethylaminem byly separovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsírany sodného a podrobeny trypsinovému štěpení. Vzniklé peptidy byly po separaci kapalinovou chromatografií identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií ESI-MS/MS. Ve vzorku G1 jader bylo identifikováno celkem 252 proteinů, z nichž u 11 došlo k aminoethylaci cysteinu. Ve vzorku G2 jader bylo identifikováno celkem 442 proteinů, kdy byl aminoethylovaný cystein nalezen u 86 z těchto proteinů. V práci byla také potvrzena schopnost trypsinu štěpit v místě aminoethylovaného cysteinu.

Klíčová slova	modifikace cysteinu, aminoethylace, bromethylamin, jaderné proteiny, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	135
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Markéta Budínská
Title	Analysis of barley nuclear protein using chemical modification of cysteine
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2020

Abstract

Nuclear proteins are a vital component of eukaryotic cell nuclei. They are involved with structural and functional organization of nucleus, gene expression and cell division. Nuclear proteomics is a useful approach for studying the mechanisms underlying plant responses to abiotic stresses, including protein-protein interactions, enzyme activities, and post-translational modifications. However, the plant nuclear proteome has not been well explored. The aim of this work was to test the method of nuclear protein identification by mass spectrometry using chemical modification of cysteine. The protocol of the modification of cysteine with alkylating agents 2-bromomethylamine, 3-bromopropylamine and *N*-(iodoethyl)-trifluoroacetamide was first optimized for this experiment. Based on the results of the MALDI-TOF/TOF analysis, the optimal protocol was derived, and this protocol was used in another experiment to identify proteins from G1- and G2-phase nuclei of barley. The alkylated proteins with 2-bromomethylamine were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and digested with trypsin. The isolated peptides were separated by liquid chromatography and identified by tandem mass spectrometry ESI-MS/MS. There were 252 proteins identified in the sample from G1-phase nuclei, 11 of these proteins was aminoethylated. In the sample from G2-phase nuclei were 442 proteins identified and 86 from these proteins had aminoethylated cysteine in amino acid sequence. The ability of trypsin to cleave at the site of aminoethylated cysteine was confirmed in this work.

Keywords	modification of cysteine, aminoethylation, bromoethylamine, nuclear proteins, mass spectrometry
Number of pages	135
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	9
2	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Modifikace cysteinů	10
2.1.1	Aminoethylace cysteinů	11
2.1.1.1	Modifikace thiolů <i>N</i> -(jodethyl)-trifluoracetamidem	12
2.1.1.2	Modifikace thiolů 2-bromethylaminem	12
2.1.2	Využití aminoethylace cysteinů při identifikaci proteinů	13
2.1.3	Chemická modifikace pro studium aktivního místa enzymů	14
2.2	Rostlinné jaderné proteiny	15
2.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.2.2	Rýže	17
2.2.3	Cizrna	17
2.2.4	Kukuřice	18
2.2.5	Sója	18
2.2.6	Ječmen setý	19
2.2.6.1	Analýza jaderného proteomu ječmene	19
2.2.6.1.1	Průtokový cytometrie a její využití při purifikaci jader	20
2.2.6.2	Databáze UNcleProt	21
2.3	Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie	22
2.3.1	Identifikace proteinů tandemovou hmotnostní spektrometrií peptidů	24
2.3.2	Příprava proteinových vzorků pro MS analýzu	26
2.3.2.1	Lýza buněk a extrakce proteinů	27
2.3.2.2	Deplece a obohacení proteinů	28
2.3.2.3	Odsolování proteinů	29
2.3.2.4	Příprava peptidů	29
2.3.2.4.1	Štěpení v roztoku	30
2.3.2.4.2	Štěpení v gelu	31
2.3.2.5	Frakcionace peptidů	32
3	Experimentální část	33
3.1	Materiál a metody	33
3.1.1	Použité chemikálie	33
3.1.2	Použité přístroje	34
3.1.3	Biologický materiál	35
3.1.4	Ostatní materiál	35
3.1.5	Použité metody	35
3.1.5.1	Alkylace cysteinů v roztoku činidlem <i>N</i> -(jodethyl)-trifluoracetamidem	35
3.1.5.2	Alkylace cysteinů v roztoku činidly 2-bromethylaminem a 3-brompropylaminem	35
3.1.5.3	Alkylace cysteinů v gelu činidly 2-bromethylaminem a 2-jodacetamidem	36
3.1.5.4	Extrakce a alkylace jaderných proteinů ječmene 2-bromethylaminem	37
3.1.5.5	Odsolení proteinů alkylovaných v roztoku	37
3.1.5.6	Stanovení koncentrace proteinů	37
3.1.5.7	Příprava SDS-PAGE a průběh separace	38
3.1.5.8	Barvení gelů barvivem Coomassie Brilliant Blue	39
3.1.5.9	Štěpení proteinů v gelu	39
3.1.5.10	Extrakce peptidů	40
3.1.5.11	Odsolení peptidových vzorků	40
3.1.5.12	Separace nanoLC a příprava vzorků pro MALDI-MS/MS analýzu	41
3.1.5.13	MALDI-MS/MS analýza	42
3.1.5.14	nanoLC-ESI-MS/MS analýza	42
3.1.5.15	Zpracování dat	43
4	Výsledky	44

4.1	Koncentrace proteinů	44
4.2	Optimalizace protokolů pro modifikaci cysteinů	45
4.2.1	Modifikace BSA v roztoku 2-bromethylaminem a N-(jodethyl)-trifluoracetamidem	45
4.2.2	Modifikace BSA v roztoku 2-bromethylaminem a 3-brompropylaminem	47
4.2.3	Modifikace proteinových standardů v gelu 2-bromethylaminem a 2-jodacetamidem	48
4.2.4	Vyhodnocení modifikace proteinových standardů v gelu 2-bromethylaminem v PEAKS Studio 8.0	59
4.3	Analýza jaderných proteinů ječmene	60
4.3.1	Analýza proteinů z buněčných jader ječmene tříděných v G1 fázi buněčného cyklu	61
4.3.2	Analýza proteinů z bučných jader ječmene tříděných v G2 fázi buněčného cyklu	64
4.4	Analýza proteinů z mazového povlaku tvarůžku	71
5	Diskuze	75
6	Závěr	84
7	Literatura	85
8	Seznam použitých zkratk	91
9	Přílohy	93
9.1	Příloha 1 - Tabulky všech identifikovaných jaderných proteinů ječmene z G1 a G2 fáze buněčného cyklu a proteinů izolovaných z mazového povlaku tvarůžku	93

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Zpracování rešerše o aminoethylaci cysteinu a jejím využití pro analýzu proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie peptidů
- Vypracování protokolů pro modifikaci modelových proteinů s činidly bromethylaminem a *N*-(jodethyl)-trifluoroacetamidem

Experimentální část:

- Použití protokolů a jejich optimalizace s modelovými proteiny
- Porovnání protokolů pro štěpení v roztoku a polyakrylamidovém gelu
- Příprava proteinových extraktů z buněčných jader ječmene a jejich separace
- Aminoethylace jaderných proteinů ječmene, štěpení trypsinem (hovězí, vepřový, rekombinantní vepřový, modifikovaný hovězí), hmotnostní spektrometrie peptidů.
- Zpracování a vyhodnocení dat z hmotnostní spektrometrie.

1 ÚVOD

Proteiny jsou vedle DNA a RNA nejhojnější složkou buněčného jádra, kde vykonávají řadu funkcí, včetně sestavování dlouhých molekul DNA do podoby kondenzovaného chromatinu, replikace a opravy DNA, regulace genové exprese, syntézy molekul RNA a jejich modifikací. Jaderné proteiny se dále podílejí na udržení vnitřní architektury jádra, jaderném transportu a dělení buněk (Blavet *et al.*, 20016).

Ačkoliv je rostlinný genom dobře prozkoumán na úrovni DNA, informací o jaderných proteinech je stále málo (Yin a Komatsu, 2016). Tato skutečnost vedla ke vzniku Mezinárodního konsorcia pro rostlinná jádra, jejíž členové mají za cíl podrobnou charakterizaci specifických jaderných proteinů, aby získali více informací o tom, jak je rostlinný genom v jádře organizován a jak funguje (Graumann *et al.*, 2014).

Ječmen představuje po pšenici, kukuřici a rýži nejprodukovanější plodinu na světě (Langridge, 2018). Dnes je využíván zejména jako krmivo pro hospodářská zvířata a pro výrobu sladu (Ullrich, 2011). Dále je ječmen společně s rýží oblíbeným modelovým organismem při studiích v oblasti šlechtění rostlin, genetiky, cytogenetiky, fyziologie aj., a také slouží jako vhodný model pro studium jaderných proteomů rostlin (Petersen a Munck, 1993; Blavet *et al.*, 2016).

Nepostradatelným krokem při charakterizaci a identifikaci proteinů v bottom-up proteomice je štěpení proteinů. Běžnou technikou s použitím enzymů je štěpení proteinů u bazických aminokyselinových zbytků trypsinem, který štěpí za lysinem a argininem, pokud nenásleduje prolin (Sechi a Chait, 1998). Nicméně neobvyklé složení některých proteinů (např. hordeinů), které ve své aminokyselinové sekvenci obsahují malé množství argininu a lysinu v kombinaci s vysokým obsahem prolinu a glutaminu, komplikuje jejich identifikaci tímto proteomickým přístupem, jelikož trypsinové štěpení produkuje jen velmi malý počet peptidů, které jsou vhodné pro následnou MS analýzu (Řehulková *et al.*, 2009). Za účelem zvýšení počtu štěpných míst pro trypsin lze využít modifikaci cysteinů alkylačními činidly, např. 2-bromomethylaminem nebo *N*-(jodethyl)-trifluoroacetamidem. Protože příslušnou modifikací vzniká aminoethylovaný cystein, který se od lysinu liší pouze v nahrazení methylové skupiny atomem síry, je pak trypsin schopný štěpit modifikovaný protein na C-konci aminoethylovaného cysteinu (Hermanson, 2013). Výsledkem modifikace a následného trypsinového štěpení je tak vyšší počet detegovaných tryptických peptidů, které usnadňují a zlepšují identifikaci proteinů pomocí MS (Řehulková *et al.*, 2009).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Modifikace cysteinů

Již několik let je v proteomice předmětem zájmu mimo jiné studium vlivu změn chemického složení proteinů na jejich chemické, fyzikální, biologické a imunologické vlastnosti. Skutečnost, že proteiny jsou velmi náchylné vůči vystavení chemickým činidlům a snadno se tak mění jejich chemická struktura, způsobuje v řadě prováděných experimentů značné problémy. Nicméně s dostatečnými znalostmi, použitím sofistikovaných analytických metod a vhodných chemických činidel představuje chemická modifikace proteinů v dnešní době jeden z nejužitečnějších přístupů identifikace proteinů a studia mnoha jejich vlastností (Han *et al.*, 1987; Crankshaw a Grant, 1996). V průběhu let tak bylo publikováno množství studií orientovaných na chemické modifikace proteinů a jejich využití.

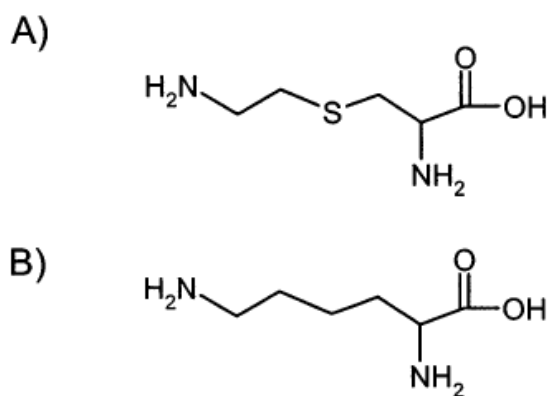
Pravděpodobně nejvýhodnějším cílem chemické modifikace je ze všech proteinogenních aminokyselin cystein, jehož thiolové skupiny díky své nukleofilní povaze představují jednu z nejreaktivnějších funkčních skupin v proteinech. Thiolové postranní řetězce v proteinu snadno podléhají oxidaci, alkylaci, acylaci či arylaci (Han *et al.*, 1987; Chalker *et al.*, 2009).

Modifikace cysteinových postranních řetězců v proteinech a peptidech se obecně využívá zejména z důvodu potřeby redukce disulfidové vazby a stabilizace vzniklých SH skupin, které urychlují proteolytické štěpení. Dalším způsobem využití modifikace je zavedení reportérové molekuly (např. fluorescenční značky) do proteinů při metodách hybridizace. V neposlední řadě se využívá alkylace cysteinových zbytků pro usnadnění charakterizace a identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (Crankshaw a Grant, 1996; Chalker *et al.*, 2009).

Proces modifikace cysteinových zbytků v proteinech či peptidech zahrnuje obvykle 4 kroky: (1) příprava vzorku (např. pufování, denaturace, redukce); (2) reakce s nadbytkem činidla; (3) odstranění nezreagovaného činidla; a (4) přečištění a odsolení vzorku. Při správném pH a délce reakce je modifikace cysteinových zbytků obvykle velmi specifická. V roztoku se reakce obvykle provádí za denaturačních podmínek z důvodu lepší přístupnosti cysteinů, které mohou být v nativním proteinu hůře přístupné (Crankshaw a Grant, 1996).

2.1.1 Aminoethylace cysteinů

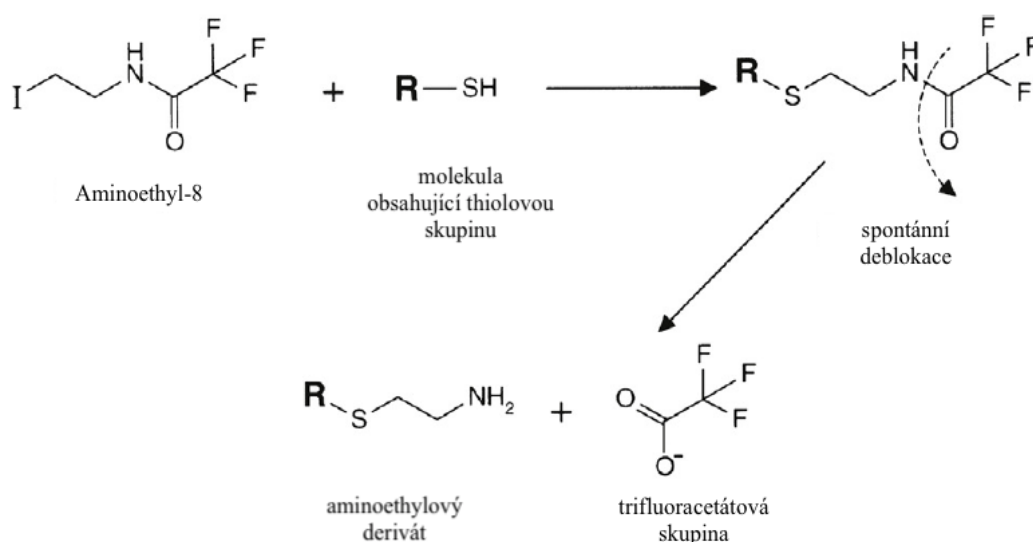
Jako první popsal možnost využití aminoethylace cysteinů Lindley (1956). Hlavní myšlenkou bylo vytvoření nového štěpného místa pro trypsin napodobením struktury lysinu modifikací redukovaných cysteinů v proteinech činidlem 2-bromethylaminem. Jelikož při této reakci vzniká aminoethylovaný cystein (též pseudo-lysin nebo γ -thialysin), který se od lysinu liší pouze v nahrazení methylové skupiny atomem síry (Obr. 1), je trypsin schopný štěpit modifikovaný protein na C-konci aminoethylovaného cysteinu. Stejný postup alkylace demonstrovali Tietze *et al.* (1957) na molekule insulinu, který byl po ošetření 2-bromethylaminem úspěšně štěpen trypsinem, nicméně s malým výtěžkem peptidů. Raftery a Cole (1963; 1966) použili pro aminoethylaci cysteinů za mírných podmínek (pH 8.6, laboratorní teplota) jak 2-bromethylamin, tak ethylenimin a zjistili, že za těchto podmínek je reakce s ethyleniminem rychlejší a po štěpení vykazuje větší výnosy peptidů. Ethylenimin byl však označen jako vysoce kancerogenní látka, a proto byl později částečně nahrazen *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem, který byl poprvé použit kolektivem Schwartz *et al.* (1980). V dnešní době se tak pro aminoethylaci cysteinů nejčastěji využívá *N*-(jodethyl)-trifluoracetamid a 2-bromethylamin, u kterého je však nutná pečlivá kontrola pH v průběhu reakce (Thevis *et al.*, 2003).



Obr. 1: Chemická struktura S-aminoethyl cysteinu (A) a lysinu (B; převzato z Thevis *et al.*, 2003).

2.1.1.1 Modifikace thiolů *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem

Konverze thiolových skupin cysteinu nebo jiných molekul na aminoskupinu může být provedena aminoethylací *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem, který je komerčně dostupný pod názvem Aminoethyl-8™ (Schwartz *et al.*, 1980). Haloalkylová skupina tohoto činidla specificky reaguje s thioley za vzniku aminoalkylového derivátu. Za vhodných podmínek reakce trifluoracetátová skupina chrání aminoskupinu spontánně hydrolyzuje, čímž dochází k deblokaci volného primárního aminu bez potřeby další reakce (Obr. 2; Hermanson, 2013).



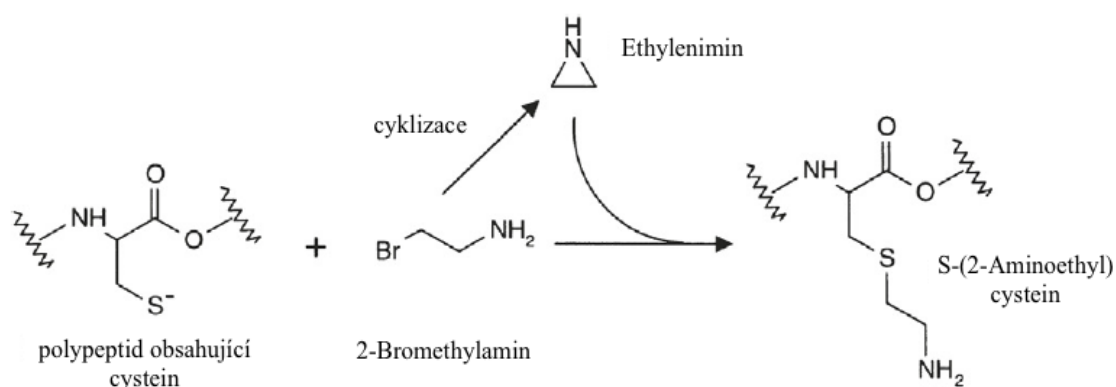
Obr. 2: Reakce *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidu s thioley (převzato z Hermanson, 2013).

2.1.1.2 Modifikace thiolů 2-bromethylaminem

Modifikace thiolových skupin v proteinech činidlem 2-bromethylaminem může probíhat dvěma způsoby. V prvním případě thiolátový anion cysteinu napadá α uhlík 2-bromethylaminu, čímž dochází k uvolnění halogenu a vytvoření thioetherové vazby (Obr. 3; Lindley, 1956). Tento přímočarý reakční mechanismus je podobný modifikaci thiolů pomocí jodacetátu (Hermanson, 2013).

Při druhé, dvoukrokové reakci je 2-bromethylamin za alkalických podmínek nejprve přeměněn na ethylenimin, a to intramolekulární reakcí aminové skupiny s α uhlíkem, což vede k uvolnění halogenu a tvorbě cyklu (Cole, 1967). Ethylenimin poté reaguje s thioley

za vzniku aminoalkylového derivátu (Obr. 3). Tato dvoukroková reakce je však pomalejší než přímá aminoethylace 2-bromethylaminem nebo ethyleniminem (Hermanson, 2013).



Obr. 3: Reakce 2-bromethylaminu s thioley (převzato z Hermanson, 2013).

2.1.2 Využití aminoethylace cysteinů při identifikaci proteinů

Pro rychlou identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) lze kromě tandemové MS využít také starší metody peptidového mapování (PMF), která je založena na předpokladu, že specifickým štěpením určitého proteinu získáme soubor peptidů, který je pro tento protein unikátní. Nepostradatelným krokem při PMF je tedy štěpení neznámého proteinu vysoce specifickou proteasou, nejčastěji trypsinem, který štěpí za lysinem (K; Lys) a argininem (R; Arg), pokud nenásleduje prolin (P; Pro). Výsledné peptidy jsou poté analyzovány pomocí MALDI-MS za účelem stanovení molekulových hmotností vzniklých peptidů, které jsou porovnávány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* štěpením proteinů přítomných v dané databázi, a na základě nejlepší shody je identifikován protein (Aebersold a Mann, 2003; Thiede *et al.*, 2005).

Přestože se identifikace proteinů pomocí PMF jeví jako velmi úspěšná, mohou být výsledky získané touto metodou někdy nejednoznačné. Tento problém je nejčastěji způsoben izolací směsí proteinů či malým množstvím izolovaného proteinu ve vzorku (Sechi a Chait, 1998; Řehulková *et al.*, 2009). V takovém případě je vhodné pro spolehlivou identifikaci proteinů získat další informace o analyzovaném vzorku, a tyto informace pak použít pro zúžení okruhu vyhledávání proteinu v databázi (Yates, 1998). Doplnující informace lze získat například fragmentační analýzou vybraných peptidů pomocí tandemové MS (Qin *et al.*, 1997), či dříve často používanou sekvenční analýzou peptidů Edmanovou degradací (Jensen *et al.*, 1996). Takto získané informace o analyzovaném vzorku sice zlepšují spolehlivost vyhledávání, ale způsob identifikace

proteinů je pak složitější a časově náročnější, než je tomu v případě jednoduchého peptidového mapování (Sechi a Chait, 1998).

Alternativním způsobem, jak zlepšit kvalitu identifikace proteinů pomocí PMF, je zvýšení počtu peptidů, které jsou po tryptickém štěpení extrahovány z gelu. U proteinů, u kterých je známo, že ve své aminokyselinové sekvenci obsahují cystein, lze za tímto účelem využít jednoduché metody derivatizace redukováných cysteinových zbytků vhodnými alkylačními činidly. Aminoethylací vzniká thialysin, který je trypsinem rozpoznáván jako nové potencionální štěpné místo. Při následné MS analýze je tak detekován větší počet peptidů, který vede k většímu sekvenčnímu pokrytí analyzovaných proteinů a tím pádem k jejich snadnější identifikaci (Crankshaw a Grant, 1996; Sechi a Chait, 1998; Řehulková *et al.*, 2009)

2.1.3 Chemická modifikace pro studium aktivního místa enzymů

Konverze cysteinových zbytků na γ -thialysin vhodnými alkylačními činidly nachází uplatnění nejen při vytvoření nových tryptických štěpných míst pro usnadnění analýzy proteinové sekvence. Novější aplikací je tzv. „chemical modification rescue“ (CMR), kdy dochází k obnovení aktivity mutantního enzymu aminoethylací cysteinu, který byl předtím vložen do aktivního místa tohoto enzymu namísto lysinu (Smith a Hartman, 1988; Hopkins *et al.*, 2005). Tento přístup se využívá ke studiu role a odhalení důležitosti lysinu v aktivním místě enzymu a byl použit např. na cysteinem substituovaných zbytcích lysinu v aktivním místě 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym-A-reduktasy (Bochar *et al.*, 1999), 8-oxoguanin-DNA-glykosidasy (Nash *et al.*, 1997), aspartataminotransferasy (Planas a Kirsch, 1991), ribulosa-1,5-bisfosfatkarboxylasy/oxygenasy (Smith a Hartman, 1988) či fruktosa-1,6-bisfosfaldolasy (Hopkins *et al.*, 2002). Nicméně obnovená enzymová aktivita mutantních enzymů se v těchto studiích zřídka kdy přiblížila úrovni aktivity divokých typů enzymů (1–10 %). Tento fakt byl přičítán nižší pK_a γ -thialysinu oproti lysinu (Gloss a Kirsch, 1995). Alternativním vysvětlením neúplného obnovení katalytické aktivity je nekompletní aminoethylace požadovaných cysteinů v aktivním místě enzymu (Hopkins *et al.*, 2005).

2.2 Rostlinné jaderné proteiny

Navzdory rozdělení evolučních linií před několika miliony let jsou si všechny eukaryotní buňky strukturně podobné. Jejich řídicím centrem je jádro, které obsahuje většinu genetické informace a reguluje většinu důležitých buněčných procesů (Petrovská *et al.*, 2016). Vedle DNA a RNA jsou nejhojnější skupinou molekul přítomných v jádře jaderné proteiny (NP; Sutherland *et al.*, 2001). Tyto proteiny jsou jeho životně důležitou součástí a mají velký vliv na způsob uložení genetické informace, na replikaci, transkripci, rekombinaci a opravu DNA (Petrovská *et al.*, 2016). Jaderné proteiny se dále podílejí na udržení vnitřní architektury jádra, na jaderném transportu a na dělení buněk (Blavet *et al.*, 2016).

Přestože hrají jaderné proteiny nezastupitelnou roli v mnoha buněčných procesech, jsou tyto proteiny, s výjimkou histonů a několika málo dalších proteinů, u rostlin velmi málo prozkoumané (Yin a Komatsu, 2016). Tato skutečnost vedla ke vzniku Mezinárodního konsorcia pro rostlinná jádra, jejíž členové mají za cíl podrobnou charakterizaci specifických jaderných proteinů, aby získali více informací o tom, jak je rostlinný genom v jádře organizován a jak funguje (Graumann *et al.*, 2014).

Doposud nebyl zcela charakterizován žádný rostlinný jaderný proteom (Petrovská *et al.*, 2016). První informace o proteinovém složení rostlinných jader byla získána při studiu modelových organismů s již analyzovaným genomem, *Arabidopsis thaliana* a rýže. Při dalších studiích byly popsány některé jaderné proteiny cizrny, kukuřice, sóji, ječmene, pšenice, rajčete, brambor, jablka, byliny *Xerophyta viscosa*, feferonky a tolice pobřežní (Yin a Komatsu, 2016). Hlavním cílem většiny těchto studií byla analýza změn ve složení jaderného proteomu v reakci na abiotický a biotický stres. Tyto studie mohou významně přispět k odhalení klíčových proteinů vystupujících v reakci rostliny na stresové faktory. Proteiny, u kterých se prokáže, že odpovídají za toleranci vůči abiotickému či biotickému stresu, mohou sloužit jako markery daného stresového stavu, a tuto skutečnost lze využít při šlechtění rostlin, případně při zlepšování již stávajících odrůd (Gong *et al.*, 2015).

2.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Výzkum jaderného proteomu v rostlinách započal v roce 2003, když Bae *et al.* (2003) identifikoval pomocí 2DE gelové elektroforézy a MALDI-TOF MS 158 jaderných proteinů modelového organismu *Arabidopsis thaliana*. Cílem studie bylo charakterizovat rostlinný jaderný proteom a jeho změny v reakci na teplotní stres. Identifikované proteiny byly zapojeny do procesů signalizace a regulace genů, translace, replikace, oprav DNA a téměř 1/3 z těchto proteinů byla spojována s reakcí rostliny na stres, kterým bylo v tomto případě vystavení rostliny 4 °C po dobu 6 h.

Úspěch v podobě sekvenční analýzy genomu *Arabidopsis* umožnil provést první proteomickou studii jaderné matrix. Pomocí 1DE a ESI spojené s tandemovou MS bylo identifikováno 36 proteinů, mezi nimiž byla řada homologů jaderných proteinů *Arabidopsis*, jako jsou fibrillariny, nukleolin, IMP4, Nop56, Nop58 či histondeacetylase. Dále byly identifikovány homology proteinů přítomných v jadérku nebo jaderné matrix lidských buněk, např. eEF-1, HSP/HSC70 a DnaJ (Calikowski *et al.*, 2003).

V další studii identifikoval kolektiv Jones *et al.* (2009) 345 jaderných proteinů *Arabidopsis*. Zároveň byla charakterizována nová fosforylační místa na proteinech podílejících se na jaderném transportu, remodelaci chromatinu, transkripci, či na proteinech účastnících se sestřihu pre-mRNA. Kromě toho autoři identifikovali několik proteinů zapojených do přenosu vezikul Golgiho aparátu, které s největší pravděpodobností přispívají ke tvorbě buněčné destičky v průběhu cytokineze.

Další studie zabývající se proteomem *Arabidopsis* byla zaměřená na analýzu jaderných proteinů asociovaných s chromatinem. Autoři identifikovali 879 proteinů, z nichž 198 byly fosfoproteiny účastnící se procesů remodelace chromatinu, regulace transkripce a zpracování RNA (Bigeard *et al.*, 2014).

Pendle *et al.* (2005) provedl analýzu proteomu jadérka *Arabidopsis*, při které identifikovali 217 nukleolárních proteinů. Po porovnání nukleolárních proteinů *Arabidopsis* a lidských nukleolárních proteinů autoři u *Arabidopsis* identifikovali proteiny se stejnou funkcí jako u lidí, proteiny specifické pro rostliny, proteiny s neznámou funkcí a také proteiny, které se nacházejí v jadérku rostlin, ale nikoliv v jadérku buněk lidského těla.

Nejnovější informace o jaderném proteomu *Arabidopsis* přinesla studie autorů Goto *et al.* (2019), kteří v jaderné frakci kultivovaných buněk *Arabidopsis* identifikovali pomocí LC-MS/MS 1539 proteinů a 2 nové proteiny jaderného obalu. V této studii byla

dále zjištěna lokalizace 25 proteinů pomocí fúze s GFP, přičemž 23 z těchto proteinů bylo lokalizováno buď v jádru nebo v endoplasmatickém retikulu asociovaném s jaderným obalem.

2.2.2 Rýže

Jaderný proteom rýže, která je jednou z nejčastěji studovaných hospodářských plodin, byl poprvé popsán v práci Khan a Komatsu (2004). Použitím metod Edmanovy degradace a MS bylo identifikováno 190 NP, přičemž nejvyšší procento identifikovaných proteinů tvořily proteiny podílející se na přenosu signálu a regulaci genů.

V chromatinu z jader rýže bylo pomocí MS identifikováno 269 proteinů, včetně 11 variant histonu H2A (Tan *et al.*, 2007). Tento fakt poukazuje na možné rozdíly mezi chromatinem rostlin a savců, jelikož u savců je známo pouze 6 variant tohoto histonu (Bernstein a Hake, 2006).

Po odstranění abundantních zásobních proteinů bylo v jaderném extraktu z endospermu identifikováno 468 NP, zahrnující transkripční faktory, kinetochorové proteiny či enzymy modifikující histony (Li *et al.*, 2008).

Vliv stresových podmínek na jaderný proteomický profil byl zkoumán zejména u rostlin vystavených podmínkám nedostatku vody. Proteomická analýza odrůdy rýže tolerantní vůči suchu odhalila 109 proteinů, jejichž obsah se měnil při reakci na daný stres (Choudhary *et al.*, 2009; Narula *et al.*, 2019).

2.2.3 Cizrna

Výsledky studie zabývající se NP cizrny a jejich porovnání s modelovými organismy ukazují, jak je rostlinný jaderný proteom rozmanitý a velmi málo prozkoumaný. Pomocí 2DE a nanoLC-MS/MS analýzy bylo identifikováno 150 NP, z nichž je velká část zapojena do procesů signalizace a regulace genů (36 %) a DNA replikace a transkripce (17 %). Srovnání získaných dat s dostupnými informacemi o jaderném proteomu *Arabidopsis* a rýže ukázalo, že pouze 8 proteinů je společných pro všechny tři organismy, 11 společných proteinů pro cizrnu a rýži a pouze 6 identických proteinů pro rýži a *Arabidopsis*. Další analýza *in silico* potvrdila skutečnost, že přibližně 70 % identifikovaných NP cizrny je jedinečných nebo nových ve srovnání s NP *Arabidopsis* a rýže (Pandey *et al.*, 2006).

V další studii zabývající se analýzou proteomu dvou kultivarů cizrny, citlivé a tolerantní vůči dehydrataci, bylo pomocí LC-MS/MS identifikováno 75 odlišně exprimovaných proteinů zapojených do různých metabolických a regulačních drah (Subba *et al.*, 2013). Při studiu fosfoproteomu cizrny bylo identifikováno 107 zřejmě jaderných proteinů, jejichž největší část představují stresové a nukleotidy vázající proteiny (Kumar *et al.*, 2014).

2.2.4 Kukuřice

Další studie zabývající se změnami ve složení proteinů při vystavení rostlině abiotickému stresu byla provedena v roce 2008 na kukuřici (Casati *et al.*, 2008). Výsledkem porovnání jaderného proteomu kukuřice před a po vystavení UV-B světla byla identifikace 98 proteinů, které byly odlišně exprimovány při (rozdílných) daných podmínkách. Největší funkční skupinu proteinů tvořily na DNA se vázající proteiny a proteiny interagující s chromatinem, včetně jaderných histonů.

Guo *et al.* (2014) zkonstruovali referenční mapu jaderného proteomu kukuřice z bazální oblasti listů sazenic. Po izolaci jader gradientovou centrifugací a po separaci 2DE se v této práci pomocí MALDI-TOF-MS podařilo identifikovat 163 proteinů, z nichž je ¼ spojována s funkcí RNA a dalších proteinů, včetně aktivace aminokyselin, zahájení proteosyntézy, degradace proteinů, sbalování proteinů či posttranslačních modifikací.

2.2.5 Sója

Kromě studií zabývajících se analýzou změn ve složení jaderného proteomu vlivem abiotického stresu byly provedeny také studie sledující změny proteomu v reakci na biotické faktory, jako jsou houbové nebo virové patogeny. Tímto směrem byl veden screening jaderného proteomu sóji, která byla infikována rzí. Autoři této studie identifikovali pomocí metody LC-MS 4975 proteinů z preparátů jader ze sójových listů. Identifikované proteiny ovšem nepocházely pouze z jádra, ale zahrnovaly také cytoplazmatické proteiny. Autoři taktéž odhalily, že řada proteinů je po infekci patogenem v jádře posttranslačně modifikována (Cooper *et al.*, 2011; Yin a Komatsu, 2016).

2.2.6 Ječmen setý

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jednoděložná rostlina náležící do čeledi *Poaceae* (lipnicovitě), kmen *Triticeae*. Jedná se o první domestikovanou plodinu, která dnes po boku pšenice, kukuřice a rýže patří mezi nejdůležitější pěstované plodiny (Langridge, 2018). Z oblasti Blízkého východu, kde se ječmen vyvíjel, se postupně rozšířil téměř do celého světa – dnes je úspěšně pěstován od subtropických až po subarktické regiony (Laštovičková a Bobálová, 2012). Důvodem obrovského rozšíření ječmene je jeho tolerance vůči klimatickým extrémům (např. sucho, zima). Ječmen je také považován za obilovinu, která je velmi tolerantní k alkáliím a solím, naopak kyselé a mokré půdy nejsou pro jeho pěstování vhodné (Stølen a Andersen, 1978; Nilan a Ullrich, 1993).

Ačkoliv byl ječmen v minulosti hlavní složkou potravy lidí, kteří žili v oblastech, kde se ječmen vyvíjel, dnes je pro potravinové účely využíváno pouze 5 % jeho celosvětové produkce (Langridge, 2018). V posledních letech se však objevuje snaha zařadit tuto obilovinu zpátky do jídelníčku, neboť řada vědeckých studií prokázala řadu pozitivních účinků ječmene na lidský organismus (Zavřelová, 2014). Podle Ullrich (2011) se v současné době ječmen využívá zejména jako krmivo pro hospodářská zvířata (55-60 %) a pro výrobu sladu (30–40 %). Ječmen také nachází využití v lihovarnictví při výrobě whisky (Langridge, 2018). Dále je ječmen společně s rýží oblíbeným modelovým organismem při mnoha studiích v oblasti šlechtění rostlin, genetiky, cytogenetiky, fyziologie či biotechnologie, a také slouží jako vhodný model pro studium jaderných proteomů rostlin, jelikož se jedná o diploidní samoopylující druh s množstvím dostupných genetických zdrojů (Petersen a Munck, 1993; Blavet *et al.*, 2016).

2.2.6.1 Analýza jaderného proteomu ječmene

Při analýze jaderných proteinů zůstává všeobecným problémem vysoké riziko kontaminace vzorku nejadernými proteiny. Tradiční vícekrokový frakcionační přístup, při kterém jsou jádra purifikována centrifugací v hustotním gradientu, je pracný a náchylný ke kontaminaci cytoplasmatickými proteiny. Z tohoto důvodu je potřeba vyvinout nový přístup pro purifikaci jader, který tato rizika minimalizuje (Petrovská *et al.*, 2014; Petrovská *et al.*, 2015).

S tímto problémem si poradil kolektiv vědců Petrovská *et al.* (2014), který pro purifikaci jader z kořenových špiček ječmene před proteomickou analýzou využil metody

průtokové cytometrie (FCM). Ve spojení se separací proteinů pomocí SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného), štěpením proteinů v gelu, frakcionací peptidů nanoLC v reverzní fázi s následnou MS a MS/MS analýzou bylo v G1 jádrech identifikováno 803 proteinů. Následně bylo stejným postupem pomocí nanoLC-ESI-MS a MS/MS v G2 jádrech identifikováno ~ 2000 proteinů (Blavet *et al.*, 2016). Tyto předběžné výsledky naznačují, že postup purifikace jader ve spojení se separací proteinů/peptidů s následnou MS analýzou umožní komplexní charakterizaci rostlinného jaderného proteomu (Petrovská *et al.*, 2014).

2.2.6.1.1 Průtoková cytometrie a její využití při purifikace jader

Průtoková cytometrie je široce využívaná metoda umožňující multiparametrickou analýzu fyzikálně-chemických vlastností mikroskopických částic, nejčastěji buněk, které protékají speciální celou konstruovanou tak, aby v daný moment protékala celou právě jedna buňka z analyzované suspenze. Tyto částice jsou poté jedna za druhou ozařovány úzkým paprskem světla o určité vlnové délce. Při dopadu paprsku na částici dochází k přímému rozptylu světla (FSC), který koreluje s velikostí částice, a bočnímu rozptylu (SSC), který odráží charakter částice, její vnitřní strukturu a granularitu. Téměř současně světlo z laseru excituje všechny fluorofory asociované s buňkou, čímž dochází k emisi fluorescence. Jelikož buňka sama o sobě fluoreskuje málokdy, používají se pro sledování požadovaných znaků fluorescenční protilátky. Všechno světlo, rozptýlené i emitované, je poté zachycováno detektorem a zpracováváno elektronickou součástí FCM. Tento přístup se nazývá imunofenotypizace a lze jej využít pro typizaci jakékoliv buňky. Také lze sledovat míru syntézy DNA, RNA, intenzity buněčného cyklu a apoptózy (Jayat a Ratinaud, 1993; Adan *et al.*, 2015).

Dalším možným využitím průtokové cytometrie je třídění buněk. Před samotným tříděním dochází k imunofenotypizaci a za laserovou celou dochází k rozprášení suspenze tak, aby každá kapka nesla jen jednu buňku. Počítač vyhodnotí přítomnost daných znaků a dá každé buňce jinak silný impulz, čímž řídí míru jejich vychýlení z hlavního proudu a kapky s různými impulzy jsou zachyceny do oddělených nádob. Takto se dají třídit nejenom celé buňky, ale také organely, nebo jen chromozomy (Macey, 2007, Adan *et al.*, 2015). Této možnosti FCM bylo využito při purifikaci jader ječmene před proteomickou analýzou. Principem je obarvení izolovaných jader z kořenových špiček ječmene fluorescenčním barvivem DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), které se

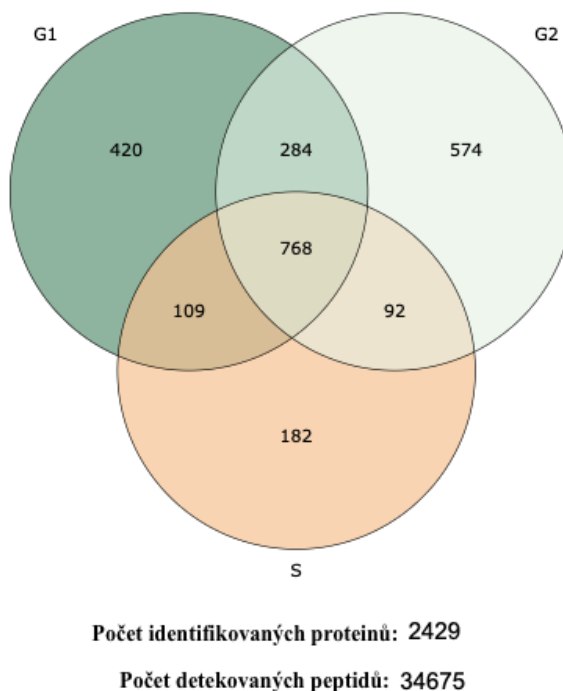
přednostně váže na dvouřetězcovou DNA v oblasti bohaté na AT páry (Traganos, 2009). Při průchodu FCM je každá jednotlivá částice ozářena sadou laserů o specifických vlnových délkách a sleduje se vyzářená fluorescence, jejíž intenzita odpovídá relativnímu množství DNA. Jelikož se množství DNA během života buňky cyklicky mění, lze tímto způsobem třídit jádra dle fáze buněčného cyklu. K separaci jader od buněčného detritu slouží měření přímého (FSC) a bočního (SSC) rozptylu (Petrovská *et al.*, 2014).

2.2.6.2 Databáze UNcleProt

Díky novému přístupu purifikace jader průtokovou cytometrií před proteomickou analýzou došlo časem k velkému zvýšení celkového počtu identifikovaných NP ječmene. Pro uspořádání takového množství dat se tedy stalo nezbytné vyvinout databázový systém těchto jaderných proteinů. Úkolu se chopila skupina autorů Blavet *et al.* (2016), která vytvořila databázi UNcleProt („Universal Nuclear Protein database of barley“), která na základě proteomických dat získaných z analýzy jader purifikovaných metodou FCM poskytuje informace o identifikovaných proteinech.

Databáze obsahuje 2429 proteinů z jader z G1, S a G2 fáze buněčného cyklu, které byly identifikovány na základě 34 675 peptidů identifikovaných pomocí MALDI-MS a ESI-MS a přiřazených k odpovídajícím proteinovým sekvencím (Obr. 4). Většina identifikovaných proteinů má schopnost vázat se na DNA a nukleové kyseliny a podílí se na procesech souvisejících s DNA (Blavet *et al.*, 2016).

UNcleProt je první vyhrazená databáze obsahující rostlinné jaderné proteiny identifikované během různých fází buněčného cyklu. Tento soubor informací může přispět k pochopení rostlinných NP a jejich funkcí, a kromě další výhod může tato databáze usnadnit funkční analýzu dosud necharakterizovaných jaderných proteinů (Blavet *et al.*, 2016).



Obr. 4: Vennův diagram počtu identifikovaných proteinů ječmene (převzato z Blavet *et al.*, 2016).

2.3 Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

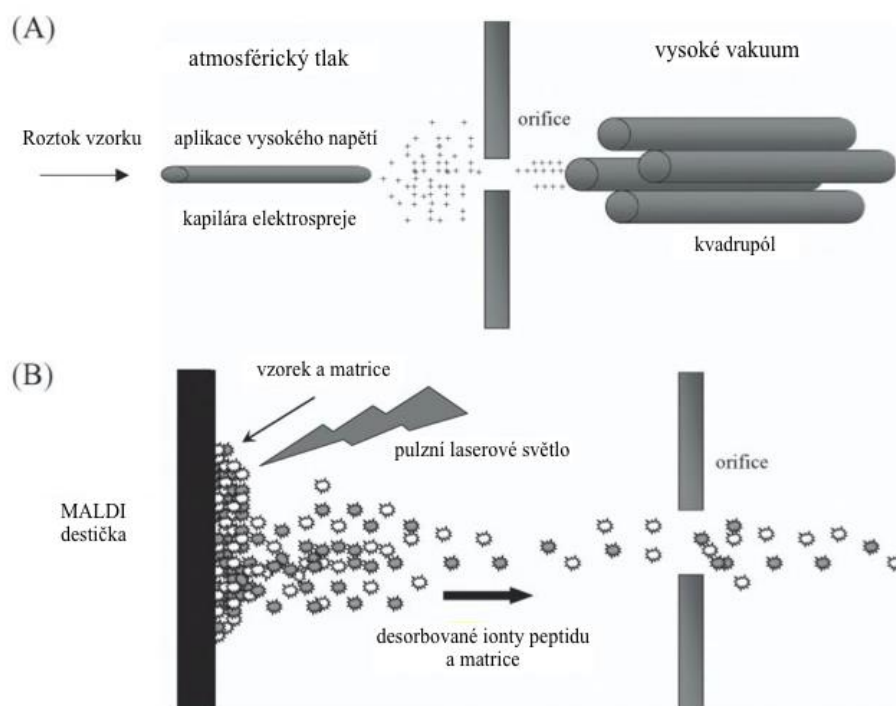
Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která slouží k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) a k následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Díky své vysoké citlivosti, selektivitě a přesnosti se MS stala jednou z nejučinnějších analytických metod a její využití roste v mnoha vědeckých odvětvích, zejména pak v oblasti proteomiky, kde slouží jako metoda identifikace, charakterizace a kvantifikace proteinů (Bischof *et al.*, 2012; Rogers a Bomgarden, 2016)

Typický hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních prvků: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru dělicího ionizované analyty dle jejich m/z a detektoru (Karpievitch *et al.*, 2010). V rámci iontového zdroje jsou molekuly vzorku pomocí vhodné ionizační techniky ionizovány. Pro ionizaci proteinů a peptidů se využívají tzv. měkké ionizační techniky, které nezpůsobují jejich fragmentaci. Jedná se zejména o ionizaci pomocí laseru za účasti matrice (MALDI) a ionizaci elektrosprejem (ESI; Obr. 5; Aebersold a Mann, 2003). V případě použití techniky MALDI je analyt nejprve smíchán s vhodnou matricí, která snadno absorbuje energii laseru, poté aplikován na

MALDI destičku a ponechán společně krystalizovat. Jako matrice se v proteomice obvykle používá kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) nebo kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (kyselina sinapová). Po kokrystalizaci vzorku s matricí a umístění destičky do hmotnostního spektrometru dochází vlivem krátkého laserového pulzu (2–200 Hz) k zahřívání a desorpci matrice a analytu do plynné fáze. Současně dochází k ionizaci matrice, která předává náboj analytu. Při tomto procesu dochází ke vzniku převážně jednonásobně nabitých iontů (Yates *et al.*, 2009; Friedecký a Lemr, 2012; Dvořáková *et al.*, 2014). Na rozdíl od MALDI, ESI ionizuje analyt v roztoku, tím pádem je obvykle spojován online se separačními technikami, např. s kapalinovou chromatografií (LC-ESI) či kapilární elektroforézou (CE-ESI). Pro ionizaci vzorku je na nerezovou nebo jinak vodivě potaženou jehlu, kterou vzorek protéká, aplikováno vysoké napětí. Toto napětí vede k vytvoření nabitých kapiček analytu obalených rozpouštědlem. Během velmi krátkého času je rozpouštědlo z nabitých kapiček postupně odpařováno obvykle proudem plynu o zvýšené teplotě, což postupně vede k uvolnění vytvořených iontů, které jsou elektricky usměřovány na vstup do hmotnostního analyzátoru (Friedecký a Lemr, 2012; Dvořáková *et al.*, 2014). Tato ionizační technika poskytuje vícenásobně nabité ionty (Yates *et al.*, 2009).

Separace iontů v hmotnostním analyzátoru probíhá za vysokého vakua a je založena na různých fyzikálních zákonech (Yates *et al.*, 2009). Iontová past (IT), Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance (ICR) separují ionty na základě jejich m/z rezonanční frekvence. Kvadrupól (Q) využívá stability iontů s danou m/z při aplikování konkrétních hodnot napětí na elektrody v daný časový okamžik. Analyzátor doby letu (TOF) využívá čas letů iontů (Dvořáková *et al.*, 2014).

Po separaci v hmotnostním analyzátoru dopadají vybrané ionty na detektor, který zaznamenává počet iontů pro jednotlivé m/z hodnoty, a signál je převeden do digitálního formátu. Nejčastěji se využívají detektory, které jsou založeny na přímém měření elektrického proudu, který vzniká při srážce iontu s dynodou a následně je zesilován pomocí násobičů. Obvykle se používají elektronové násobiče, které amplifikují elektrony pomocí sady dynod nebo kontinuálním dynodovým elektronovým násobičem (Friedecký a Lemr, 2012). Výsledkem měření je pak hmotnostní spektrum, kde jsou zaznamenány jednotlivé naměřené měrné hmotnosti a jejich intenzity (Dvořáková *et al.*, 2014).



Obr. 5: Princip ionizace elektrosprejem (A) a ionizace pomocí laseru za účasti matrice (B; převzato z Veenstra, 2006).

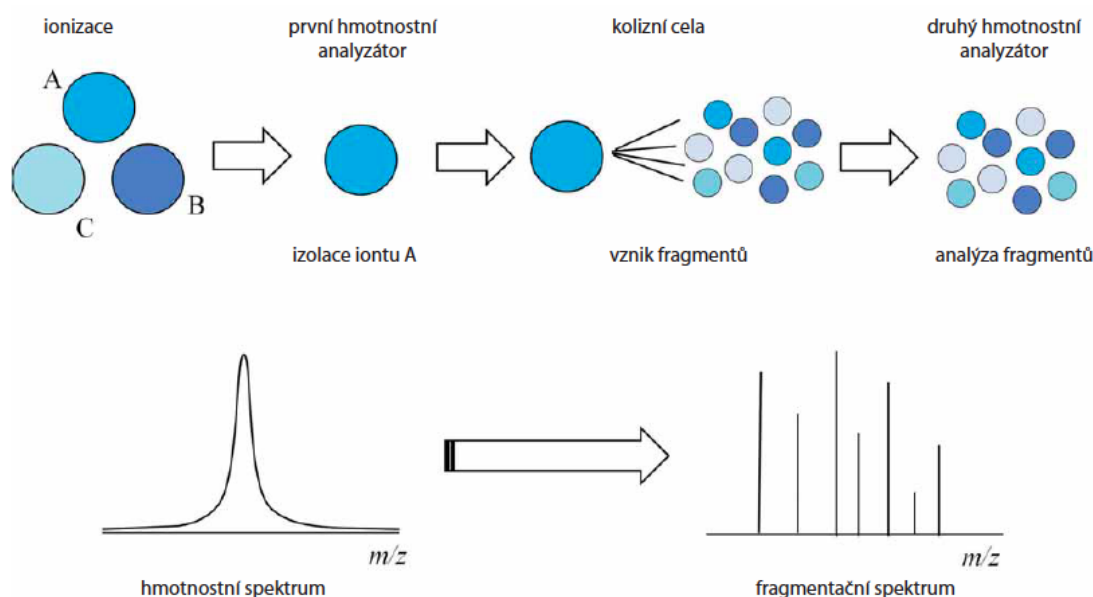
2.3.1 Identifikace proteinů tandemovou hmotnostní spektrometrií peptidů

Jeden z nejčastějších způsobů identifikace proteinu je založen na měření hmotnostního spektra jeho peptidových fragmentů, které jsou výsledkem štěpení enzymem, nejčastěji trypsinem (Soares *et al.*, 2012). Získané hmotnostní spektrum peptidů představuje specifickou charakteristiku proteinu a označuje se jako peptidová mapa nebo peptidový „fingerprint“ (Blackstock a Weir, 1999). Poté je sbírka naměřených molekulových hmotností porovnána s *in silico* hodnotami odvozenými ze sekvencí v proteinové nebo genomové databázi, a na základě shody experimentálních a teoretických databázových hodnot m/z se dá ke spektru s určitou jistotou přiřadit protein. Nicméně v některých případech nelze protein identifikovat pouze z hmotnostního spektra peptidů (Dvořáková *et al.*, 2014). Naštěstí dnešní dostupná vybavení umožňují získat další data z peptidových spekter, díky kterým je možná jednoznačná identifikace analyzovaného proteinu. Místo spoléhání se na přesnou molekulovou hmotnost specifického peptidu lze jednotlivé peptidové ionty, které vstupují do prvního hmotnostního analyzátoru, izolovat a dále fragmentovat v kolizní cele např. pomocí CID (kolizí indukovaná disociace), jejímž principem je srážka vybraného iontu s kolizním plynem (např. helium, dusík nebo argon;

Veenstra, 2006). Další způsoby fragmentace iontů využívané v komerčně dostupných MS přístrojích jsou např. disociace přenosem elektronu (ETD) nebo disociace záchytem elektronu (ECD; Soares *et al.*, 2012). Po fragmentaci vybraného peptidového prekurzoru jsou vzniklé fragmenty separovány a měřeny v druhém hmotnostním analyzátoru, kde je naměřeno fragmentační spektrum peptidu, které je poté použito pro získání částečné nebo úplné informace o aminokyselinové sekvenci. Tento proces se běžně označuje jako tandemová MS nebo MS/MS, též MS² (Obr. 6; Martin *et al.*, 1987).

Fragmentační spektra peptidů se poté analyzují pomocí speciálních vyhodnocovacích programů, přičemž nejvíce rozšířené je databázové vyhledávání, při kterém jsou experimentální hmotnostně spektrometrická data porovnávána s *in silico* generovanými MS/MS spektry z databáze, a na základě přiřazení jedné či více sekvencí se identifikuje daný protein (Chamrad *et al.*, 2004). Pro tyto účely lze použít vyhledávací algoritmy, jako jsou Mascot či Sequest. Při vyhledávání je velmi důležité správné zadání všech kritérií, které se týkají přípravy vzorku, chemických modifikací, které se mohou vyskytovat během měření a tím ovlivňovat *m/z* hodnotu iontů (např. acetylace, oxidace, karbamidometylace), všech specifikací MS (typ fragmentace, ionizace, analyzátoru atd.) a vybrat databázi, např. NCBI nebo SwissProt (Dvořáková *et al.*, 2014).

Takto získané informace o aminokyselinové sekvenci slouží nejen k identifikaci proteinu, ale navíc umožňují lokalizovat posttranslační nebo chemické modifikace na úrovni AK zbytků (Soares *et al.*, 2012).

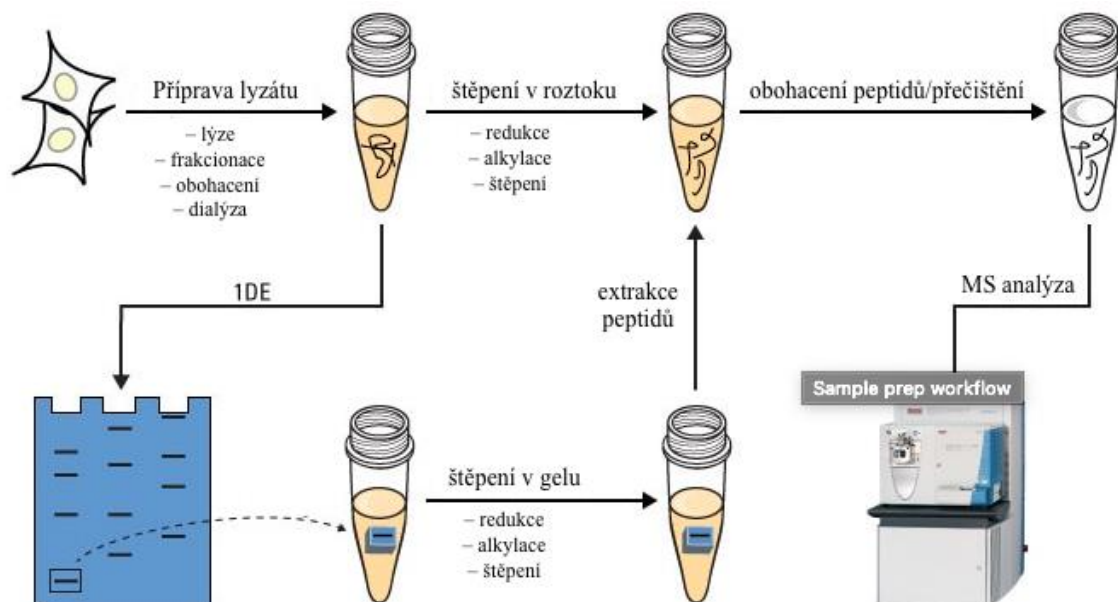


Obr. 6: Princip tandemové hmotnostní spektrometrie (převzato z Dvořáková *et al.*, 2014).

2.3.2 Příprava proteinových vzorků pro MS analýzu

Přestože se MS instrumentace v posledních dvou dekadách rapidně zlepšila, MS výsledky jsou do značné míry stále závislé na přípravě a kvalitě vzorku. Ionizace vzorku a měření hmotnosti jsou citlivé na různé interference, zahrnující pufrы, soli, polymery, detergenty a jiné. Tyto kontaminanty také zhoršují výkonnost MS systému, což vyžaduje časově náročnou údržbu a často i nákladné opravy pro obnovení správné funkce přístroje (Rogers a Bomgarden, 2016). Z tohoto důvodu musí být kontaminanty ze vzorků včas odstraněny. Dalším úskalím přípravy vzorku je složitost proteomu, která neumožňuje vynalézt jednu standardní univerzální metodu pro přípravu proteinových vzorků pro MS analýzu. Protokoly pro přípravu se liší v závislosti na typu vzorku, experimentálních cílech a použité analytické metodě. Při navrhování strategie přípravy vzorků se musí zohledňovat hned několik faktorů, jako je původ vzorku, chemická a strukturní heterogenita proteinů, buněčné nebo subcelulární umístění sledovaného proteinu, či požadovaný výtěžek proteinu. Proto musí být každý pracovní postup přípravy vzorků pro MS analýzu, který obvykle zahrnuje metody extrakce proteinů ze vzorku, odstranění kontaminant a vysoce abundantních proteinů, štěpení proteinů a frakcionace peptidů (Obr. 7), upraven tak, aby bylo dosaženo maximálního sekvenčního pokrytí sledovaných proteinů a zároveň nedošlo k poškození MS přístroje. (Karpievitch *et al.*, 2010; Bischof *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Nejběžnějším pracovním postupem hmotnostní spektrometrie pro komplexní vzorky proteinů stále zůstává analýza peptidů, které se snadněji frakcionují pomocí LC než proteiny (Bischof *et al.*, 2012). Peptidy zároveň ionizují a fragmentují efektivněji než celé proteiny, což má za následek spektra, která jsou snadněji interpretovatelná. Příprava peptidů typicky zahrnuje redukci a alkylaci cysteinů, štěpení vzorku na peptidy, odsolení peptidů a konečnou analýzu těchto peptidů pomocí MS či MS/MS (Rogers a Bomgarden, 2016).



Obr. 7: Pracovní postup přípravy vzorku na MS analýzu (převzato z thermofischer.com).

2.3.2.1 Lýza buněk a extrakce proteinů

Lýza buněk je prvním krokem při extrakci a solubilizaci proteinu. Pro dosažení nejlepšího možného výtěžku a čistoty proteinu byla vyvinuta řada technik pro různé organismy, typy vzorků, subcelulární frakce či specifické proteiny. Vzhledem k rozmanitosti tkání, buněk či složení buněčné membrány (nebo buněčné stěny) mohou být pro extrakci buněčných proteinů vyžadovány jak fyzikální lýza, tak metody založené na použití detergentů (Rogers a Bomgarden, 2016).

Fyzikální lýza je běžná metoda pro rozrušení buněk a extrakci buněčného obsahu. Vyžaduje však specializované vybavení a protokoly, které jsou obtížně reprodukovatelné z důvodu variability zařízení (např. různá nastavení homogenizátorů či sonikace). Nevýhodou samotné metody fyzikální lýza je také neschopnost solubilizovat proteiny asociované s membránou (thermofischer.com).

Naopak metody založené na využití detergentu nejen že buňky lyzují, ale také solubilizují proteiny. Pro solubilizaci membránových proteinů lze využít silných denaturačních činidel (např. močovina, guanidin) nebo iontových detergentů (např. SDS, deoxycholát sodný (SDC)). Jejich působením však dochází k denaturaci proteinů a k rozrušení protein-proteinových interakcí (Rogers a Bomgarden, 2016). Naopak neiontové nebo zwitteriontové detergenty (např. Triton X-100, digitonin nebo CHAPS) jsou méně denaturující než iontové detergenty a mají omezené schopnosti narušovat

protein-proteinové interakce (Feist a Hummon, 2015). Tyto detergenty mají zároveň menší hodnotu CMC („Critical Micelle Concentration“, kritická koncentrace micel) a k solubilizaci proteinů je dostačující nižší koncentrace detergentů (Seddon *et al.*, 2004; Feist a Hummon, 2015). Bohužel mnoho detergentů využívaných pro solubilizaci proteinů způsobuje během MS analýzy řadu problémů (kontaminace LC a MS přístroje, snížení citlivosti přístroje aj.) pokud nejsou ze vzorku zcela odstraněny (Rogers a Bomgarden, 2016).

Při buněčné lýze dochází k narušení buněčných kompartmentů, což může vést k aktivaci endogenních proteas či fosfatas. Tyto enzymy mohou způsobit degradaci či nechtěnou úpravu extrahovaných proteinů, proto je nutné k lytickým činidlům přidat inhibitory těchto enzymů (thermofischer.com).

Pokud je cílem buněčné lýzy purifikace nebo testování funkce konkrétního proteinu, musí být věnována speciální pozornost účinkům lyzačních činidel. Některé detergenty deaktivují funkci konkrétních enzymů nebo narušují proteinové komplexy. Nicméně použitím vhodných pufrů, detergentů, solí a redukčních činidel lze buněčnou lýzu optimalizovat tak, aby bylo dosaženo nejlepších možných výsledků extrakce pro konkrétní typ buňky nebo proteinovou frakci (Rogers a Bomgarden, 2016).

2.3.2.2 Deplece a obohacení proteinů

Složitost vzorku negativně ovlivňuje schopnost detegovat, identifikovat a kvantifikovat proteiny s nízkou abundancí pomocí MS, jelikož peptidy z vysoce abundantních proteinů mohou maskovat detekci peptidů pocházejících z málo abundantních proteinů. Čím více je tedy vzorek zjednodušen a čím více je snížen dynamický rozsah koncentrací proteinů, tím větší bude schopnost detegovat proteiny přítomné ve vzorku ve velmi nízkých koncentracích (Zhang *et al.*, 2013).

Strategie deplece a obohacení byly vyvinuty pro odstranění vysoce abundantních proteinů a izolaci cílových proteinů ze vzorku. Metoda deplece se častěji využívá pro snížení složitosti biologických vzorků, jako je krev či sérum, které obsahují vysoké koncentrace albuminu a imunoglobulinů (Anderson a Anderson, 2002). Pro odstranění těchto a dalších vysoce abundantních proteinů se využívají imunoafinitní techniky jako je imunoprecipitace a koimunoprecipitace (ten Have *et al.*, 2011). Významnou nevýhodou tohoto přístupu je však skutečnost, že tyto abundantní proteiny často

interagují s proteiny s nízkou koncentrací, což může mít za následek odstranění i těchto proteinů (Rogers a Bomgarden, 2016)

Jedna z metod obohacení proteinů je subcelulární frakcionace, která separuje proteiny dle jejich lokalizace v konkrétním buněčném kompartmentu či organele. Subcelulární frakcionace využívá centrifugace v hustotním gradientu sacharosy, pomocí které mohou být separovány vezikuly a organely včetně jádra, mitochondrií či chloroplastů od cytosolových a vezikulárních proteinů (Huber *et al.*, 2003). Další technika obohacení proteinů je založena na posttranslačních modifikacích (PTM) proteinů jako je fosforylace a glykosylace. Takto modifikované proteiny mohou být obohaceny metodou chelatační afinitní chromatografie (IMAC) nebo použitím PTM–specifických protilátek (Rogers a Bomgarden, 2016).

2.3.2.3 Odsolování proteinů

Metody extrakce, frakcionace, obohacení sledovaných proteinů a odstranění abundantních proteinů mají často za následek přítomnost solí, pufrů, detergentů a jiných kontaminantů ve vzorku, které nejsou kompatibilní s MS analýzou. Cílem purifikace je tedy jejich odstranění. Jelikož jsou tyto látky oproti proteinům relativně malé, je výhodnější a snazší je odstranit ještě před štěpením proteinů (Rogers a Bomgarden, 2016). Pro tyto účely slouží hned několik metod zahrnujících chromatografii, dialýzu, precipitaci proteinů a další (Evans *et al.*, 2009; Gundry *et al.*, 2009).

2.3.2.4 Příprava peptidů

Jakmile jsou proteiny ve vzorku solubilizovány, existují 3 obecné přístupy přípravy směsi peptidů (peptidových fragmentů): štěpení v roztoku, štěpení v gelu a příprava vzorku za pomoci filtru (FASP). Všechny tyto metody odstraňují detergenty a další malé molekuly, redukují a alkylují proteiny, štěpí proteiny na peptidy a připravují tyto peptidy na MS analýzu (Rogers a Bomgarden, 2016).

Rozhodnutí provést štěpení v roztoku nebo v gelu závisí na řadě faktorů, jako je množství a komplexnost vzorku. Štěpení v roztoku se volí tehdy, pokud je množství vzorku malé, jelikož by při extrakci peptidů z gelové matrice mohlo dojít k významné ztrátě peptidů. Štěpení v roztoku je také vhodné pro málo až středně komplexní vzorky. Výhodou štěpení v gelu je skutečnost, že SDS-PAGE kombinuje denaturaci proteinů

s jejich separací, což umožňuje pozorovat relativní množství proteinů ve vzorku. Pokud jde o dobu zpracování, štěpení v roztoku se jeví jako rychlejší metoda, jelikož je vynechán krok SDS-PAGE (thermofischer.com).

Pro štěpení proteinů před MS analýzou se nejčastěji využívá trypsin z důvodu jeho vysoké aktivity, selektivity a relativně nízké ceny. Při štěpení proteinů trypsinem vznikají peptidy s lysinovým nebo argininovým zbytkem na karboxylovém konci (Olsen *et al.*, 2004). Tyto aminokyseliny na konci každého tryptického peptidu zlepšují ionizaci a MS/MS fragmentaci pro peptidovou analýzu. Přestože je trypsin nejpoužívanějším enzymem pro štěpení proteinů, některé proteinové sekvence nejsou trypsinem efektivně štěpeny, nebo tyto sekvence neobsahují bazické aminokyseliny dostatečně daleko od sebe pro vytvoření dostatečně dlouhých peptidů, které mohou být poté použity pro spolehlivou identifikaci proteinů. Efektivita štěpení trypsinem je malá v tom případě, že za lysinem nebo argininem následuje prolin. V případě opakujících se AK zbytků (př. KK, RK), nebo v přítomnosti posttranslačních úprav (např. methylace, acetylace), může dojít k vynechání možného štěpení (Benore-Parsons *et al.*, 1989). Některé tryptické peptidy mohou být také příliš malé nebo nejsou jedinečné pro daný protein. Problémem jsou však i příliš velké a hydrofobní peptidy, které nelze identifikovat LC-MS. Tyto krátké nebo extrémně dlouhé neidentifikované peptidy vedou k neúplnému sekvenčnímu pokrytí proteinu, což může mít za následek neúspěšnou identifikaci proteinu. Pro širší pokrytí proteinové sekvence se tak často využívá kombinace výsledků s použitím různých proteas (např. ArgC, AspN, chymotrypsin, GluC, LysC, LysN), které při štěpení generují jiné peptidové fragmenty než při použití trypsinu (Bischof *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

2.3.2.4.1 Štěpení v roztoku

Metoda štěpení proteinů v roztoku vyžaduje oproti štěpení proteinů v gelu méně kroků přípravy a lze ji upravit pro analýzu vzorků obsahujících méně než 10 µg a více než 1 mg proteinů. Pro tuto metodu jsou proteiny nejprve denaturovány za vyšší teploty pomocí detergentů nebo použitím chaotropů jako je močovina či guanidin. Poté jsou disulfidové vazby mezi cysteinovými zbytky redukovány a alkylovány (Medzihradszky, 2005).

Přestože se močovina jako chaotropní činidlo používá řadu let, nedoporučuje se z důvodu možné karbamylace proteinů (Kollipara a Zahedi, 2013). Solubilizace a denaturace proteinů pomocí SDS nebo SDC je účinnější než při použití močoviny. Výhodou těchto činidel je také skutečnost, že snáší zahřívání vzorků během redukce

disulfidových vazeb (Rogers a Bomgarden, 2016). Jakmile jsou provedeny kroky redukce a alkylace, vzorek obsahuje soli, detergenty, chaotropy, redukční a alkylační činidla v takových koncentracích, že inaktivují trypsin. Proto by měly být ze vzorku ještě před proteolytickým štěpením odstraněny (Medzihradszky, 2005). K tomuto účelu se využívá řada metod jako je dialýza, gelová elektroforéza a nejčastěji metoda srážení kyselinou nebo organickým rozpouštědlem (Yeung *et al.*, 2008). Většinu detergentů lze odstranit srážením proteinů přídavkem vymraženého acetonu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; Barritault *et al.*, 1976).

Pro trypsinové štěpení je protein rozpuštěn v pufovaném roztoku o $\text{pH}=8.0$ (např. 50-100mM hydrogenuhličitan amonný) a štěpení probíhá po dobu 4–16 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a míchání. Po štěpení mohou být peptidy odsoleny např. pomocí extrakce na pevné fázi s využitím materiálu C18 (Rogers a Bomgarden, 2016).

2.3.2.4.2 Štěpení v gelu

Separace proteinů pomocí SDS-PAGE s následným štěpením v gelu představuje postup, který je alternativou k denaturaci, redukci, alkylosti a štěpení proteinů v roztoku. Jedná se o jednoduchou a levnou metodu s relativně vysokým rozlišením separace proteinů, při které mohou být proteiny separovány buď v jedné dimenzi (1D) na základě velikosti (přibližně odpovídá molekulové hmotnosti), nebo dvourozměrnou elektroforézou (2D), při které jsou proteiny nejdříve děleny na základě jejich izoelektrického bodu a v druhé dimenzi podle velikosti (Rabilloud *et al.*, 2010). Jelikož však 2D PAGE není kompatibilní se solmi a iontovými detergenty, využívá se 1D PAGE, která tyto a mnohé další kontaminanty, které by mohly interferovat s LC-MS analýzou, úspěšně odstraní. Další výhodou gelové frakcionace je zjednodušení vzorku a oddělení vysoce abundančních proteinů od proteinů s nižší abundancí (Rogers a Bomgarden, 2016).

Po gelové elektroforéze jsou separované proteiny detegovány a vizualizovány barvivem Coommasie Blue nebo stříbrným barvením bez glutaraldehydu. Barevné pásy obsahující požadované proteiny jsou vyříznuty a odbarveny, proteiny v nich jsou redukovány a alkylovány, aby bylo dosaženo co nejefektivnějšího štěpení proteinů a následné extrakce peptidů (Gundry *et al.*, 2009).

Disulfidové vazby brání kompletnímu rozvinutí proteinu a limitují tak proteolytické štěpení. Z tohoto důvodu jsou tyto disulfidy v přítomnosti dalších denaturantů (např. SDS, močovina, guanidin či zvýšená teplota) redukovány buď dithiothreitem (DTT) nebo tris(2-karboxyethyl)fosfinem (TCEP). Redukované cysteiny jsou poté alkylovány

jodacetamidem, kyselinou jodoctovou, chloracetamidem či 4-vinylpyridinem, aby bylo zabráněno zpětnému formování disulfidových vazeb (Sechi a Chait, 1998; Nielsen *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013). Po doporučené době alkylace by mělo být alkylační činidlo odstraněno nadbytkem DTT, aby se zabránilo vedlejším reakcím a nadměrné alkylaci proteinu. Po redukci a alkylaci jsou proteinové pásy štěpeny vhodnou proteasou. Peptidy z gelu jsou následně extrahovány standardními technikami (Gundry *et al.*, 2009). Přestože je štěpení v gelu technikou náchylnou na neúplné nebo méně reprodukovatelné štěpení a výtěžnost peptidů je oproti štěpení v roztoku menší (50–70 %), gelová elektroforéza stále zůstává důležitou technikou přípravy vzorků před MS analýzou (Rogers a Bomgarden, 2016).

2.3.2.5 Frakcionace peptidů

Po štěpení proteinů získáme vzorek, který je bohatou směsí peptidů lišících se fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako je polarita, velikost a náboj. Těchto rozdílných vlastností se využívá k rozdělení komplexní směsi peptidů na méně komplexní frakce, přičemž platí, že čím kvalitnější frakcionace, tím více proteinů může být identifikováno následnou MS analýzou (Dvořáková *et al.*, 2014).

Pro separaci peptidové směsi získané po enzymovém štěpení se před MS či MS/MS analýzou obvykle využívá kapalinová chromatografie (Karpievitch *et al.*, 2010). Mechanismus separace této metody je založen na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní (eluent) a stacionární (sorbent). Eluent po nadávkování vzorku na separační kolonu unáší molekuly ze vzorku, které více či méně interagují se sorbentem, čímž se zpožďují ve svém transportu kolonou, a tím se vzájemně dělí. Nejčastěji používanými kolonami jsou kolony s reverzní fází (RP), s kationtově výměnnou fází (SCX), kolony založené na hydrofilní interakci (HILIC) nebo na elektrostaticky odpuzované hydrofilní interakci (ERLIC; Yates *et al.*, 2009).

Separace peptidů probíhá v případě MALDI-TOF MS „offline“, kdy jsou separované peptidy nejprve nakapány na destičku spolu s MALDI matricí a až poté připraveny na MS analýzu. Naopak v případě ESI-MS se jedná o „online“ separaci a separované peptidy ihned vstupují do hmotnostního spektrometru (Mitulovic a Mechtler, 2006).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Použité chemikálie

- 2-bromethylamin (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-jodacetamid (Sigma-Aldrich, USA)
- 3-brompropylamin (Sigma-Aldrich, Německo)
- acetonitril (Merck, Německo)
- akrylamid a methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Benzonasa (Sigma-Aldrich, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Německo)
- CuSO₄ (Lachema, Československo)
- DL-dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich, Německo)
- dodecylsírán sodný (SDS; Serva, Německo)
- glycin (Sigma-Aldrich, Německo)
- guanidin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo)
- H₃PO₄ (Sigma-Aldrich, Německo)
- HCl (Lach-ner, ČR)
- hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Německo)
- isopropanol (Merck, Německo)
- kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA; Bruker Daltonik, Německo)
- kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina octová (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina trifluoroctová (TFA; Merck, Německo)
- Laemmliho vzorkový pufr (Bio-Rad, USA)
- methanol (Merck, Německo)
- MgCl₂ (Fluka, Švýcarsko)
- močovina (Sigma-Aldrich, Německo)
- *N*-(jodethyl)-trifluoroacetamid (Apollo Scientific, UK)
- *n*-butanol (Merck, Německo)
- *N*-ethylmorfolin (Sigma-Aldrich, Německo)
- NH₄H₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Německo)

- NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich, Německo)
- octan amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik, Německo)
- persíran amonný (APS; Bio-Rad, USA)
- Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color (Bio-Rad, USA)
- roztok kyseliny bicinchoninové (Sigma-Aldrich, Německo)
- SOLu-trypsin (Sigma-Aldrich, Německo)
- TCEP (Sigma-Aldrich, Německo)
- tetramethylethylendiamin (TEMED; Merck, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MP Biomedicals, Francie)
- Unstained Broad Range SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, USA)
- β-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Použité přístroje

- analytické váhy (Radwag, Polsko)
- centrifuga Ministar (Eppendorf, Německo)
- digitální pH metr (Multical WTW, Německo)
- elektromagnetická míchačka C-MAG HS4 (IKA, Německo)
- hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker Daltonik, Německo)
- hmotnostní spektrometr s iontovou pastí ETD amaZon speed s iontovým zdrojem CaptiveSpray (Bruker Daltonik, Německo)
- kapalinový chromatograf BioLogic DuoFlow™ Medium-Pressure Chromatography systém s detektorem QuadTec (Bio-Rad, USA)
- laminární box (Merci, Česká republika)
- skener ImageScanner II se softwarem LabScan 5.0 (Amersham Biosciences, USA)
- spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, UK)
- termostat Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
- třepačka KS 130 control (IKA, Německo)
- ultrazvuková lázeň K2-L (Kraintek, ČR)
- vakuová centrifuga Concentrator plus (Eppendorf, Německo)
- vakuová pumpa (KNF LAB, Francie)
- vortex (Chromservis, ČR)

- zařízení pro elektroforézu Mini Protean II (Bio-Rad, USA)
- zdroj pro elektroforézu PowerPac Universal (Bio-Rad, USA)

3.1.3 Biologický materiál

Jádra ječmene tříděná v G1 a G2 fázi buněčného cyklu poskytla Dr. Beáta Petrovská z Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci. Proteiny z tvarůžku separované v gelu byly poskytnuty vedoucím práce.

3.1.4 Ostatní materiál

- kolona HiTrapTM desalting (Amersham Biosciences, Švédsko)
- MALDI destička MTP AnchorChipTM 800-384 (Bruker Daltonik, Německo)
- pipetové špičky ZipTip C18 (Merck Millipore, Irsko)

3.1.5 Použité metody

3.1.5.1 Alkylace cysteinů v roztoku činidlem *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem

Postup práce byl proveden dle protokolu vypracovaného autory Crankshaw a Grant (1996). Byl připraven vzorek hovězího sérového albuminu (BSA) rozpuštěním 5 mg proteinu v 5 ml 0,2 mol·l⁻¹ ethylmorfolinacetátového pufru (pH 8.1), který obsahoval 6 mol·l⁻¹ guanidin. Z důvodu potřeby redukce disulfidových můstků bylo k takto připravenému vzorku přidáno 250 μl ethylmorfolinacetátového pufru (pH 8.1) obsahujícího 0,1 mol·l⁻¹ dithiothreitol (DTT) a vzorek byl inkubován 30 min při 60 °C. Po inkubaci a následném ochlazení byly z mikrozkuhavky odebrány 3 ml vzorku, ke kterým bylo postupně přidáno 105,7 mg *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidu rozpuštěného v 600 μl methanolu tak, že ke vzorku byl nejprve přidán poloviční objem alkylačního činidla, a po hodinové inkubaci při 50 °C byl přidán zbytek alkylačního činidla. Poté byl vzorek inkubován další hodinu při 50 °C. Pro zastavení reakce bylo poté ke směsi přidáno 10 μl 2 mol·l⁻¹ kyseliny octové. Takto modifikovaný protein byl následně odsolen na kapalinovém chromatografu BioLogic DuoFlow (podkapitola 3.1.5.5).

3.1.5.2 Alkylace cysteinů v roztoku činidly 2-bromethylaminem a 3-brompropylaminem

Postup práce byl proveden dle protokolu vypracovaného autory Crankshaw a Grant (1996). Byly připraveny 2 vzorky rozpuštěním vždy 5 mg BSA v 1270 μl roztoku $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 8.2) obsahujícím $0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT a $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guanidin. Následovala inkubace obou vzorků 1 h při $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Po redukci disulfidových vazeb bylo k prvnímu vzorku přidáno 254 μl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3-brompropylaminu rozpuštěného v $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris pufu (pH 8.2), který obsahoval $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guanidin, a ke druhému vzorku 254 μl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-bromethylaminu rozpuštěného ve stejném pufu. Po přidání alkylačních činidel následovala dvouhodinová inkubace vzorků při $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve tmě. Pro odstranění nadbytku nezreagovaného alkylačního činidla bylo poté k oběma vzorkům pipetováno 305 μl roztoku $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT a $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guanidinu v $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 8.2). Takto modifikované proteiny byly následně odsoleny na kapalinovém chromatografu BioLogic DuoFlow (podkapitola 3.1.5.5).

3.1.5.3 Alkylace cysteinů v gelu činidly 2-bromethylaminem a 2-jodacetamidem

Pro optimalizaci modifikace cysteinu v gelu byly jako modelové proteiny použity proteinové standardy pro elektroforézu Unstained Broad Range SDS-PAGE Standards. Proteinové standardy byly smíchány s Laemmliho pufrem v poměru 1:20 (v/v) a zahřáty na $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Poté byly separovány pomocí SDS-PAGE a vizualizovány s použitím barviva CBB-R250 (viz podkapitoly 3.1.5.7 a 3.1.5.8). Následovala příprava vzorků pro štěpení trypsinem v gelu (viz podkapitola 3.1.5.9). Po vyřezání, odbarvení a vysušení příslušných gelových pásů acetonitrilem byly proteiny redukovány přidávkem 170 μl roztoku $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 8.2), který obsahoval $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guanidin a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT. Po vysušení kousků gelu následovala alkylace cysteinů $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-bromethylaminem, který byl rozpuštěn ve 170 μl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 (inkubace 2 h při laboratorní teplotě) nebo ve 170 μl roztoku $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 8.2) obsahujícího $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guanidin (inkubace 2 h při laboratorní teplotě, resp. při $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Další vzorky proteinových standardů byly alkylovány $55 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-jodacetamidem, který byl

rozpuštěn ve 170 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4HCO_3 (inkubace 20 min při laboratorní teplotě). Takto alkylované proteiny byly připraveny na štěpení trypsinem.

3.1.5.4 Extrakce a alkylace jaderných proteinů ječmene 2-bromethylaminem

Jaderné proteiny ječmene byly extrahovány z 10 milionů jader frakcionovaných průtokovou cytometrií v G2 a G1 fázi buněčného cyklu. Jádra byla suspendována ve 40 μl Benzonasového pufru (0,05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, 0,002 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , pH 8.0) a sonikována 15 minut. Následovala inkubace 5 hodin při 70 $^\circ\text{C}$ a 900 rpm. Ke vzorku bylo po jeho inkubaci a ochlazení přidáno 20 μl roztoku 8 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močoviny a 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT v reakčním pufru, a vzorek byl dále inkubován 1 hodinu při 25 $^\circ\text{C}$ a 950 rpm. Poté bylo zahájeno štěpení DNA přidáním 0,5 μl roztoku Benzonasy (inkubace přes noc při 25 $^\circ\text{C}$). Druhý den následovala redukce disulfidových vazeb přidávkem 15 μl 0,005 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCEP v 0,05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 8.0), zkumavky byly na 45 min přeneseny do termostatu vyhřátého na 25 $^\circ\text{C}$ a třepány při 400 rpm. Po redukcí bylo ke vzorkům přidáno 15 μl roztoku 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-bromethylaminu v 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 8.0) a vzorky byly alkylovány 2 hodiny při laboratorní teplotě. Takto připravené jaderné proteiny byly dále separovány pomocí SDS-PAGE (podkapitola 3.1.5.7).

3.1.5.5 Odsolení proteinů alkylovaných v roztoku

Alkylované vzorky BSA byly přečištěny a odsoleny na kapalinovém na chromatografu s UV-VIS detektorem s využitím chromatografické kolony HiTrapTM naplněné Sephadexem G-25. Prvním krokem bylo promytí systému a ekvilibrování kolony 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanem amonným (pH 6.0). Pracovní průtoková rychlost byla 2 ml/min. Následovalo nanesení vzorku do 2 ml smyčky, odkud byl během automatické metody dávkován na kolonu. Odsolený protein byl sbírán v jedné frakci na základě chromatogramu zaznamenávaného detekcí absorpance při vlnové délce 280 nm. Odsolené vzorky BSA byly dále zpracovány pomocí SDS-PAGE (podkapitola 3.1.5.7).

3.1.5.6 Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů v odsolených vzorcích byla použita spektrofotometrická metoda s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda). Jejím principem je tvorba komplexu proteinů s Cu^{2+} ionty a jejich následná redukce na Cu^+ ionty díky přítomnosti peptidové vazby. Kyselina bicinchoninová tvoří s měďnými ionty v alkalickém prostředí stabilní modro-fialový komplex, jehož intenzita zabarvení je přímo úměrná množství proteinů ve vzorku (Smith *et al.*, 1985).

Nejprve byl připraven pracovní roztok BCA smícháním činidla A (disodná sůl BCA, Na_2CO_3 , NaHCO_3 a vlnan sodno-draselný) a činidla B (4% CuSO_4) v poměru 50:1 (v/v). Poté byla připravena kalibrační řada proteinového standardu BSA. Do zkumavek byly napipetovány 2 ml činidla BCA a 5–50 μl proteinového standardu o koncentraci 1 mg/ml (řada 5, 10, 20, 30, 40 a 50 μg). Slepý vzorek obsahoval pouze 2 ml činidla BCA. Zkumavky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla měřena absorbance kalibrační řady při 562 nm v plastových kyvetách. Dále byly do zkumavek pipetovány 2 ml činidla BCA, které byly smíchány se vzorky (5–15 μl). Všechny vzorky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě a poté byla měřena jejich absorbance na spektrofotometru Lightwave II (Biochrom, Velká Británie) při 562 nm proti slepému vzorku.

3.1.5.7 Příprava SDS-PAGE a průběh separace

Pro přípravu 4% zaostřovacích a 10% separačních gelů (Tab. 1) byly nejprve smíchány zásobní roztoky AA/BIS (30%/0,8%) a Tris-HCl s deionizovanou vodou. Tato směs byla odvzdušněna v odsávací baňce pomocí vakuové pumpy, a to z důvodu odstranění rozpuštěného kyslíku blokujícího polymeraci. Po odvzdušnění byly ke směsi přidány zbývající komponenty polyakrylamidového gelu, dodecylsírán sodný (SDS), *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin (TEMED) a peroxodisíran amonný (APS), kterým je započata polymerační reakce. Polymerace probíhala ve sklech s 1 mm mezerou, gely byly připraveny v diskontinuálním uspořádání podle Laemmliho (Laemmli, 1970). Po skončení polymerace byla skla s gely přemístěna do elektroforetické komůrky a zalita Tris-glycinovým elektrodoým pufrem (pH 8.3). Poté byly na gel nanесeny standardy Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color (5 μl) a vzorky, jejichž množství bylo určeno individuálně dle koncentrace proteinů v daném vzorku, a které byly

připraveny smícháním s Laemmliho pufrem v poměru 1:1 (v/v) a povařením 5 min při 100 °C. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 130 V. Po doputování bromfenolové modři cca 1 cm od spodního okraje gelu byla elektroforéza ukončena, skla s gely byla opláchnuta deionizovanou vodou a gely barveny přes noc v barvicí směsi (podkapitola 3.1.5.8).

Tab. 1: Objemy látek pro přípravu zaostřovacích a separačních gelů.

Složka gelu	Zaostřovací gel [4%]	Separací gel [10%]
AA/BIS [30%/0,8%]	0,65 ml	3,4 ml
Tris-HCl [1,5 mol·l ⁻¹ , pH 8,8]	–	2,5 ml
Tris-HCl [0,5 mol·l ⁻¹ , pH 6,8]	1,25 ml	–
Destilovaná voda	2,95 ml	3,8 ml
SDS [10%]	0,10 ml	0,10 ml
APS [10%]	0,06 ml	0,05 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml

3.1.5.8 Barvení gelů barvivem Coomassie Brilliant Blue

Separované proteiny byly vizualizovány barvením gelů přes noc v Petriho miskách barvivem Coomassie Brilliant Blue-R-250 nebo barvivem Bio-Safe Coomassie Stain G-250.

V případě použití barviva Coomassie Brilliant Blue-R-250 bylo následné odbarvení gelů provedeno roztokem s obsahem 5% (v/v) methanolu a 7% (v/v) kyseliny octové. Při použití barviva Bio-Safe Coomassie Blue G-250 stačí pro odbarvení gelu deionizovaná voda. Po odbarvení byly gely skenovány pomocí skeneru ImageScanner II a počítačového programu LabScan 5.0.

3.1.5.9 Štěpení proteinů v gelu

Obarvené proteinové pásy byly skalpelem vyříznuty z polyakrylamidového gelu a přeneseny do 0,5 ml mikrozkušavek, kde byly rozřezány na kousky zhruba o velikosti 1 mm³. Gelové kousky byly poté odbarveny přidáním 180 µl směsi 0,1 mol·l⁻¹ NH₄HCO₃ s čistým acetonitrilem (ACN) v poměru 1:1 (v/v). Po odbarvení gelu (cca 45 min) byl roztok odpipetován a gelové kousky vysušeny ACN. Dále byly (v případě analýzy modifikace cysteinových zbytků) proteinové standardy v gelu redukovány přidávkem 170 µl roztoku 0,5 mol·l⁻¹ Tris (pH 8.2), který obsahoval 6 mol·l⁻¹ guanidin a 0,01 mol·l⁻¹

DTT. Tato směs byla inkubována 30 min v termostatu Thermomixer comfort při 56 °C a třepání 800 rpm. Po redukcí byla směs zchlazena v ledové lázni, roztok byl odpipetován a gelové kousky byly opět dehydratovány ACN. Po odstranění ACN následovala (amino)alkylace cysteinů, jejíž postup je popsán výše (podkapitola 3.1.5.3). Po alkylovaní byl roztok odpipetován a gelové kousky byly promyty 180 µl 0,1 mol·l⁻¹ NH₄HCO₃ z důvodu odstranění nadbytku nezreagovaného alkylačního činidla. Po 15 minutách byl roztok NH₄HCO₃ odpipetován a nahrazen 180 µl ACN pro vysušení. Postup redukce a alkylovaní byl vynechán u vzorků, které byly alkylovány v roztoku. Gelové kousky byly dále rehydratovány 50 µl pufru, který obsahoval 0,05 mol·l⁻¹ NH₄HCO₃ a 1,5 µmol·l⁻¹ trypsin. Po difúzi trypsinu do gelových kousků (cca 45 min) při 4 °C (ledová lázeň) byl přebytečný roztok odpipetován a nahrazen 25 µl 0,025 mol·l⁻¹ NH₄HCO₃. Poté byly vzorky inkubovány v termostatu při 37 °C přes noc (Shevchenko *et al.*, 2006).

3.1.5.10 Extrakce peptidů

Po štěpení proteinů byla extrakce peptidů z gelových kousků zahájena přidávkem 150 µl extrakčního pufru, který obsahoval 5% kyseliny mravenčí a acetonitril v poměru 1:2 (v/v; Shevchenko *et al.*, 2006). Tato směs byla inkubována při 37 °C a 800 rpm po dobu 45 min. Poté byly vzorky centrifugovány a pipetovány do prázdných 0,5 ml mikrozkušavek. Následovalo odpaření supernatantu ve vakuové centrifuze Speedvac při 45 °C (2 h). Po odpaření supernatantu byly peptidy buď po rozpuštění v 0,1% (v/v) trifluoroctové kyselině (TFA) dále zpracovávány, nebo uchovávány při -20 °C.

3.1.5.11 Odsolení peptidových vzorků

K odsolení peptidů byly použity pipetovací špičky s reverzní chromatografickou fází ZipTip C18. Nejprve bylo do mikrozkušavek obsahujících vysušené peptidy přidáno 10,6 µl roztoku 0,1% (v/v) TFA, a pro snadnější rozpuštění peptidů byly tyto mikrozkušavky umístěny na 5 minut do ultrazvukové lázně. Poté bylo potřeba kondicionovat špičky do stavu, ve kterém probíhá odsolení optimálním způsobem. Za tímto účelem se provedlo zvlhčení sorbentu ve špičkách pomocí „pre-wet“ roztoku, který obsahuje 50% acetonitril (ACN) a 0,1% TFA, v/v. Následovala ekvilibrace reverzní fáze 0,1% (v/v) roztokem TFA. Do takto připravené špičky se 15× nasál roztok s peptidy (objem 10,6 µl) a poté byla špička 5× promyta v ekvilibrační směsi. Následovala eluce

zachycených peptidů opakovaným nasátím a vypuštěním elučního roztoku (10×), který obsahoval 75% ACN a 0,1% TFA, v/v. Takto odsolené vzorky byly dále odpařeny ve vakuové centrifuze při 45 °C.

3.1.5.12 Separace nanoLC a příprava vzorků pro MALDI-MS/MS analýzu

Pro separaci nanoLC byly vzorky odsolených peptidů nejprve rozpuštěny v 15 µl 0,1% (v/v) TFA, sonikovány 5 minut v ultrazvukové lázni a poté pipetovány do skleněných vialek („total recovery“) určených pro separaci peptidů na Dionex UltiMate 3000 RSLCnano kapalinovém chromatografu, který byl ovládán prostřednictvím softwaru HyStar 3.2. Pro zakoncentrování vzorků před samotnou separací byly tyto vzorky pomocí autosampleru injektovány na Nano Trap předkolonku (100 µm × 20 mm, naplněnou 5 µm C18 částicemi sorbentu Acclaim PepMap100) v množství 5 µl, kde byly dále promývány nanášecím solventem při průtoku 10 µl/min. Poté byly zachycené peptidy vymývány na dělicí C18 kolonu (75 µm × 150 mm, naplněnou 2 µm C18 částicemi sorbentu Acclaim PepMap100) při průtoku 300 nl/min. Doba jedné analýzy byla 70 minut. Složení mobilních fází: A: 0,05% (v/v) TFA; mobilní fáze B: 80% (v/v) ACN a 0,05% (v/v) TFA; nanášecí solvent: 2% (v/v) ACN a 0,05% (v/v) TFA. Eluce z obou kolon byla provedena postupně se zvyšujícím gradientem mobilní fáze B: 0 min, 4% B; 7 min, 4% B; 48 min, 60% B; 51 min, 96% B; 56 min, 96% B; 59 min, 4% B; 70 min, 4% B. Výstup z analytické kolony byl připojen na sběrač kapkových frakcí Proteineer FcII, který zachytával eluát. Od 20. minuty separace byly postupně zachytávané frakce smísены s matricí (viz níže) a každých 17 sekund byly pomocí sběrače frakcí automatizovaně nanášeny na AnchorChipTM destičku. Každý vzorek byl tímto způsobem rozseparován na 120 frakcí. Následovalo ruční pipetování kalibračního peptidového standardu II (viz níže) do daných pozic na AnchorChipTM destičce (Petrovská *et al.*, 2014).

Roztok matrice byl připraven smísením 748 µl roztoku 95% ACN obsahujícího 0,1% TFA (v/v) s 50 µl nasyceného roztoku matrice CHCA, která byla rozpuštěná v roztoku 90% ACN s obsahem 0,1% TFA (v/v), s 10 µl 10% (v/v) TFA a 10 µl 0,1 mol·l⁻¹ NH₄H₂PO₄. Pro externí kalibraci bylo z roztoku obsahujícího 748 µl 85% ACN s 0,1% TFA, 50 µl saturované CHCA rozpuštěné v 90% ACN s obsahem 0,1% TFA (v/v), 8 µl

10% (v/v) TFA a 8 μ l 100mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ odebráno 300 μ l, ke kterým byly přidány 2 μ l kalibračního standardu Peptide Calibration Standard II.

3.1.5.13 MALDI-MS/MS analýza

Po kokrytalizaci matrice se standardy byla AnchorChipTM destička zasunuta do přístroje ultrafleXtreme pro měření MS a MS/MS spekter. Hmotnostní spektrometr byl pro měření ovládán prostřednictvím softwaru flexControl 3.4, data byla zpracována pomocí flexAnalysis 3.4 a automatizovaná měření vzorků separovaných nanoLC byla ovládána softwarem WarpLC 1.3 (všechny softwary pocházejí od firmy Bruker Daltonik, Německo). Každá pozice na destičce byla excitačním laserem s frekvencí 2000 Hz ozářena 2500 \times . Získaná spektra byla automaticky zpracována softwarem, který pro měření MS/MS spekter vybral z jedné pozice destičky maximálně 10 prekurzorů. Výběr prekurzorů pro měření MS/MS spekter byl řízen dle následujících kritérií: poměr signál/šum: >7; rozmezí m/z prekurzorů: 800–3000; intenzita píku prekursoru: >800; minimální m/z fragmentu >250; faktor kvality signálu: >30; zapnuto použití LIFT cely pro urychlení fragmentových iontů při měření v MS/MS módu (Perutka *et al.*, 2019). Naměřená MS/MS data byla exportována ve formátu MGF do programu ProteinScape 3.1 (Bruker Daltonik), případně PEAKS Studio 8.0 (Bioinformatics Solutions, Kanada) a využita k prohledávání v lokálně instalované databázi aminokyselinových sekvencí SwissProt (verze prosinec 2019). Program ProteinScape k tomu využíval databázového prohledávače Mascot Server 2.4 (Matrix Science, UK).

3.1.5.14 nanoLC-ESI MS/MS analýza

Při ESI MS/MS analýze jaderných proteinů ječmene bylo totožným způsobem jako v případě nanoLC-MALDI MS/MS 5 μ l vzorku odsolených peptidů v 0,1% (v/v) TFA separováno na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate3000 RSLC nano, tentokrát spojeném s hmotnostním spektrometrem amaZon speed ETD prostřednictvím iontového zdroje CaptiveSpray. Byly použity stejné kolony a průtokové rychlosti jako v případě nanoLC-MALDI separací. Mobilní fázi A byla 0,4% (v/v) kyselina mravenčí, mobilní fázi B roztok 90% (v/v) ACN s 0,4% (v/v) kyselinou mravenčí a nanášecím solventem 2% (v/v) kyselina mravenčí. Pro měření MS/MS spekter byly prekurzory fragmentovány kolizně indukovanou disociací, a tyto fragmenty byly dále identifikovány. Kolizním

plynem bylo helium. Hmotnostní spektrometr byl ovládán prostřednictvím softwarů trapControl 7.2 a HyStar 3.2, data byla zpracována pomocí DataAnalysis 4.2 (všechny softwary pocházejí od firmy Bruker Daltonik, Německo) a uloženy jako soubory ve formátu MGF (Perutka *et al.*, 2019) pro databázové vyhledávání pomocí programů ProteinScape nebo PEAKS Studio (viz výše, podkapitola 3.1.4.13).

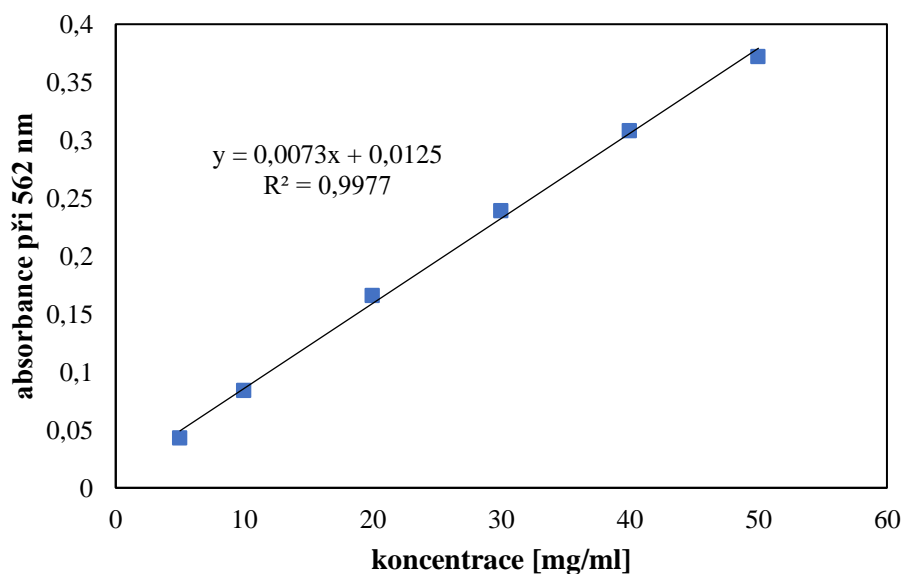
3.1.5.15 Zpracování dat

Získaná data z MS měření byla v programu ProteinScape 3.1 a PEAKS Studio 8.0 prohledávána vůči databázi SwissProt. V případě analýzy jaderných proteinů ječmene bylo prohledávání omezeno pouze na proteiny ječmene (*Hordeum vulgare*), při optimalizaci protokolu pro modifikaci cysteinu neomezeně pro všechny organismy. Dalším parametrem vyhledávání bylo zadání trypsinu jako proteasy. Jako pevná modifikace byla nastavena buď aminoethylace cysteinu v případě použití 2-bromethylaminu, aminopropylace cysteinu v případě použití 3-brompropylaminu, nebo karbamidomethylace cysteinu v případě použití 2-jodacetamidu. Jako možná modifikace AK byla zadána oxidace methioninu. Pro data z MALDI-MS/MS analýzy byla pro vyhledávání stanovena tolerance hmotnosti prekurzorového iontu na 25 ppm, pro fragmentové ionty pak 0,5 Da. V případě dat z ESI MS/MS analýzy byla pro vyhledávání stanovena tolerance hmotnosti prekurzorového iontu na 50 ppm, pro odpovídající fragmenty 0,1 Da.

4 VÝSLEDKY

4.1 Koncentrace proteinů

V rámci optimalizace protokolu pro modifikaci cysteinů byla pomocí spektrofotometrické metody s kyselinou bicinchoninovou stanovena koncentrace proteinů ve vzorcích modifikovaného BSA odsolených na kapalinovém chromatografu Biologic DuoFlow. Tyto vzorky byly dále separovány pomocí SDS-PAGE a podrobeny MALDI-MS/MS analýze. Výsledná hodnota koncentrace proteinů byla vypočtena pomocí kalibrační přímky získané z měření absorbance koncentrační řady proteinového standardu (Obr. 8). Hodnoty koncentrace proteinů v odsolených vzorcích jsou uvedeny v Tab. 2.



Obr. 8: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.

Tab. 2: Koncentrace proteinů v odsolených vzorcích (BSA + BrEt= vzorek BSA modifikovaný 2-bromethylaminem; BSA + BrPr= vzorek BSA modifikovaný 3-brompropylaminem; BSA + IETFACAM= vzorek BSA modifikovaný *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem).

vzorek	koncentrace [mg/ml]
BSA + BrEt	1,1
BSA + BrPr	1,0
BSA + IETFACAM	1,3

4.2 Optimalizace protokolů pro modifikaci cysteinu

V této části diplomové práce bylo provedeno ověření a optimalizace protokolů pro modifikaci cysteinu na modelových proteinech, a to konkrétně na BSA a na proteinových standardech pro elektroforézu. Byla použita činidla 2-bromethylamin, 3-brompropylamin, *N*-(jodethyl)-trifluoracetamid a 2-jodacetamid. Vzorky byly analyzovány pomocí MALDI-MS/MS a k vyhodnocení MS/MS dat bylo využito softwaru PEAKS Studio 8.0 nebo softwaru ProteinScape 3.1. Poté byl na základě porovnání výsledků modifikace v roztoku a v gelu, výsledků při použití rozdílných alkylačních činidel a také výsledků modifikace při rozdílných podmínkách (teplota, prostředí), odvozen optimální protokol pro modifikaci cysteinu, který byl následně použit při analýze jaderných proteinů ječmene.

4.2.1 Modifikace BSA v roztoku 2-bromethylaminem a *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem

Pro porovnání účinnosti alkylačních činidel v roztoku byl jako modelový protein vybrán hovězí sérový albumin. Pro alkylation BSA před SDS-PAGE byla použita činidla 2-bromethylamin, který byl rozpuštěn v roztoku Tris, který obsahoval guanidin, a *N*-(jodethyl)-trifluoracetamid (IETFACAM) rozpuštěný v max. 10% methanolu. V případě IETFACAM byl vzorek BSA rozpuštěn v roztoku ethylmorfolinacetátu obsahujícím guanidin. Po alkylation a separaci proteinů pomocí SDS-PAGE následovalo štěpení proteinů trypsinem, extrakce peptidů z gelu a nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS analýza peptidů, při které byla měřena MS spektra a následně MS/MS spektra vybraných prekurzorů. Naměřená MS/MS data byla exportována do programu PEAKS Studio 8.0 a využita k prohledávání v databázi SwissProt. V případě BSA modifikovaného 2-bromethylaminem bylo identifikováno 18 peptidů o délce 8–22 aminokyselin obsahujících aminoethylovaný cystein (thialysin). U 7 z těchto peptidů představoval thialysin nové štěpné místo pro trypsin (Tab. 3). Jako vedlejší modifikace byla pozorována oxidace methioninu. Při použití činidla IETFACAM byly úspěšně identifikovány 4 peptidy o délce 9–21 aminokyselin, u kterých došlo k aminoethylaci cysteinu. Nové štěpné místo pro trypsin vzniklo pouze u 1 z těchto peptidů (Tab. 4).

Tab. 3: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení BSA s modifikací cysteinu 2-bromethylaminem provedenou v roztoku (0,5 mol·l⁻¹ Tris, pH 8.2, obsahující 6 mol·l⁻¹ guanidin).¹

č.	Sekvence peptidu	Mr	Délka
1	C.HGDLLE <u>C</u> ADDR.A	1285.5720	11
2	K.DDPH <u>A</u> CYSTVFDK.L	1539.6664	13
3	K.TVMENFVAFVDK <u>C</u> .C	1560.7316	13
4	K.SLHTLFGDEL <u>C</u> .V	1404.7072	12
5	K.GLVLIAFSQYLQQ <u>C</u> PFDEHVK.L	2477.2776	21
6	K.EYEATLE <u>E</u> .C	1128.4645	9
7	K.LFTFHAD <u>I</u> .T	1108.5375	9
8	K.SLHTLFGDEL <u>C</u> .K	1276.6122	11
9	F.SQYLQQ <u>C</u> PFDEHVK.L	1763.8301	14
10	K.YNGVFQ <u>E</u> .C	1001.4277	8
11	M.P <u>C</u> TEDYLSLILNR.L	1578.8075	13
12	K.LKPDNTL <u>C</u> DEFK.A	1561.7810	13
13	K.LFTFHAD <u>I</u> CTLPDTEK.Q	1892.9342	16
14	K.TVMENFVAFVDK <u>C</u> .C	1544.7367	13
15	K.DAIPENLPPLTADFAEDKD <u>V</u> C.K.N	2443.1941	22
16	R.RP <u>C</u> FSALTPDETYVPK.A	1865.9346	16
17	D.PNTL <u>C</u> DEFK.A	1108.5222	9
18	K.DAIPENLPPLTADFAEDKD <u>V</u> C.K	2315.0991	21

Tab. 4: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení BSA s modifikací cysteinu *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem provedenou v roztoku (0,2 mol·l⁻¹ *N*-ethylmorfolinacetát, pH 8.1, obsahující 6 mol·l⁻¹ guanidin).²

č.	Sekvence peptidu	Mr	Délka
1	K.LFTFHAD <u>I</u> .T	1108.5375	9
2	K.GLVLIAFSQYLQQ <u>C</u> PFDEHVK.L	2477.2776	21
3	K.LKPDNTL <u>C</u> DEFK.A	1561.7810	13
4	K.YICDNQDTISSK.L	1428.6555	12

¹ Podtržen je aminoethylovaný cystein (+43.04) a methionin, u kterého došlo k oxidaci (+15.99).

² Podtržen je aminoethylovaný cystein (+43.04).

4.2.2 Modifikace BSA v roztoku 2-bromethylaminem a 3-brompropylaminem

V programu ProteinScape 3.1 byly vyhodnoceny výsledky modifikace cysteinů v roztoku činidly 2-bromethylaminem a 3-brompropylaminem v přítomnosti guanidinu. Po alkylationi a separaci proteinů pomocí SDS-PAGE následovalo štěpení proteinů trypsinem, extrakce peptidů z gelu a nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS analýza peptidů. Po aminopropylaci a následném trypsinovém štěpení bylo identifikováno 12 peptidů obsahujících modifikovaný cystein o délce 8–21 aminokyselin (Tab. 5). Při použití 2-bromethylaminu jako alkylačního činidla bylo výsledkem štěpení modifikovaného BSA 7 peptidů s aminoethylovaným cysteinem o délce 9–21 aminokyselin (Tab. 6). Jak při použití 2-bromethylaminu, tak 3-brompropylaminu byly v obou případech identifikovány 4 peptidy, které obsahovaly modifikovaný cystein na svém konci, což ukazuje, že při použití těchto alkylačních činidel může vzniknout nové štěpné místo pro trypsin.

Tab. 5: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení BSA s modifikací cysteinů 3-brompropylaminem provedenou v roztoku (0,5 mol·l⁻¹ Tris, pH 8,2, obsahující 6 mol·l⁻¹ guanidin).³

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
ALBU_BOVIN	Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)	40.0	K.YNGVFQEC.C	1015.4433	23.2
			K.LFTFHADIC.T	1122.5532	41.6
			K.EYEATLEEC.C	1142.4802	27.8
			C.HGDLLECADDR.A	1299.5877	55.7
			K.SLHTLFGDELCK.V	1418.7228	45.0
			K.DDPHACYSTVFDK.L	1553.6820	60.0
			K.LKPDNTLCDEFK.A	1575.7967	41.7
			R.MPCTEDYLSLILNR.L	1723.8637	50.3
			R.MPCTEDYLSLILNR.L	1739.8586	76.8
			R.RPCFSALTPDETYVPK.A	1879.9502	30.8
			K.LFTFHADICTLPDTEK.Q	1906.9499	34.2
			K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVC.K	2329.1148	29.7

³ Podtržen je aminopropylovaný cystein (+57.06) a methionin, u kterého došlo k oxidaci (+15.99).

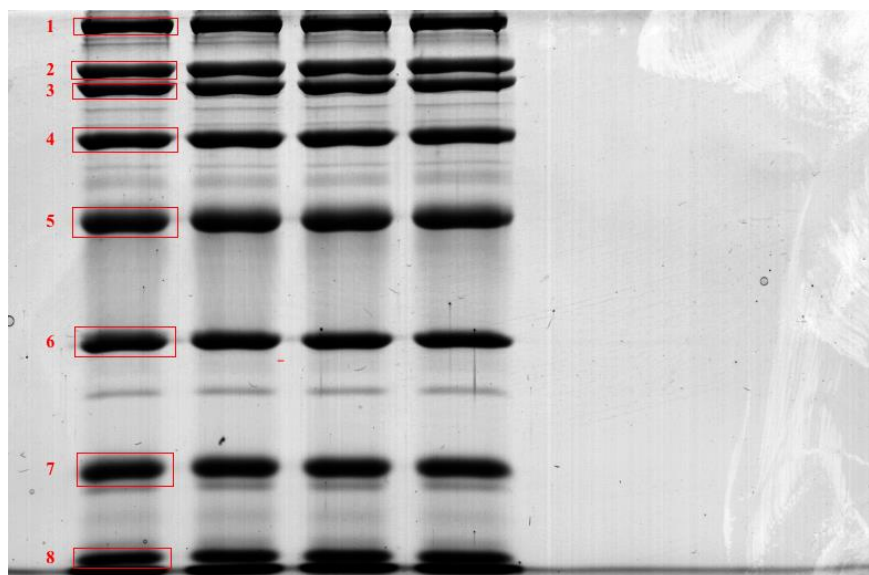
Tab. 6: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení BSA s modifikací cysteinu 2-bromomethylaminem provedenou v roztoku (0,5 mol·l⁻¹ Tris, pH 8.2, obsahující 6 mol·l⁻¹ guanidin).⁴

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
ALBU_BOVIN	Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)	38.6	K.LFTFHADIC.T	1108.5376	45.3
			K.SLHTLFGDELCK.K	1276.6122	58.9
			K.SLHTLFGDELCK.V	1404.7071	50.0
			K.TVMENFVAFVDKCC.C	1560.7316	60.4
			K.LKPDPNLTCDEFK.A	1561.7810	51.8
			K.LFTFHADICTLPDTEK.Q	1892.9342	26.8
			K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVC.K	2315.0991	44.8

4.2.3 Modifikace proteinových standardů v gelu 2-bromomethylaminem a 2-jodacetamidem

Pro srovnání protokolů pro modifikaci cysteinu v gelu bylo použito 8 proteinových standardů pro elektroforézu Unstained Broad Range SDS-PAGE Standards o přibližné koncentraci 4 mg proteinu/200 µl, které byly po separaci pomocí SDS-PAGE (Obr. 9) alkylovány 2-bromomethylaminem, který byl rozpuštěn v NH₄HCO₃ nebo v roztoku Tris, který obsahoval guanidin. Další vzorky proteinových standardů byly alkylovány 2-jodacetamidem, který byl rozpuštěn v roztoku NH₄HCO₃. Po alkylation následovalo štěpení proteinů trypsinem, extrakce peptidů z gelu a nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS analýza peptidů. Po štěpení modifikovaných proteinových standardů 2-bromomethylaminem v gelu bylo v programu ProteinScape 3.1 identifikováno 0–26 peptidů o délce 7–29 aminokyselin (Tab. 7–9). Kromě peptidů s koncovými bazickými aminokyselinami (K, R) byly identifikovány taktéž peptidy obsahující na svém konci aminoethylovaný cystein (thialysin). Při použití jakéhokoliv zde uvedeného protokolu modifikace cysteinů a následném trypsinovém štěpení nedošlo k úspěšné identifikaci peptidů obsahujících modifikovaný cystein u proteinového standardu karboanhydrasy, a to z důvodu nepřítomnosti cysteinu v AK sekvenci tohoto enzymu. Neúspěšná identifikace modifikovaných peptidů byla také v případě PS myosinu.

⁴ Podtržen je aminoethylovaný cystein (+43.04) a methionin, u kterého došlo k oxidaci (+15.99).



Obr. 9: Proteinové standardy Unstained Broad Range SDS-PAGE Standards separované pomocí SDS-PAGE s použitím 4% zaostřovacího a 10% separačního polyakrylamidového gelu (1= myosin (200kDa); 2= β -galaktosidasa (116,25 kDa); 3= fosforylasy B (97,4 kDa); 4= BSA (66,2 kDa); 5= ovalbumin (45 kDa); 6= karboanhydrasa (31 kDa); 7= trypsinový inhibitor (21,5 kDa); 8= lysozym (14,4 kDa)). Standardy byly aplikovány v množství 5 μ l na jamku.

Při porovnávání množství identifikovaných modifikovaných peptidů u všech proteinových standardů alkylovaných 2-bromethylaminem za různých podmínek se ukázalo, že k nejefektivnější aminoethylaci cysteinu došlo v přítomnosti guanidinu a při laboratorní teplotě (Tab. 7), kdy bylo identifikováno 56 modifikovaných peptidů, z nichž 19 (34 %) obsahovalo aminoethylovaný cystein na svém konci. Tato skutečnost dokazuje, že vzniklý thialysin představuje nové štěpné místo pro trypsin. Z identifikovaných peptidů obsahujících modifikovaný cystein pocházelo nejvíce peptidů z BSA (26). Úspěšná identifikace modifikovaných peptidů byla kromě BSA také v případě β -galaktosidasy (11 peptidů), fosforylasy B (6), ovalbuminu (6), trypsinového inhibitoru (4) a lysozymu (3).

Při modifikaci cysteinů 2-bromethylaminem v přítomnosti NH_4HCO_3 (Tab. 8) nebyly identifikovány žádné modifikované peptidy rovnou u tří proteinových standardů (myosin, β -galaktosidasa, karboanhydrasa). U zbylých proteinových standardů byl počet identifikovaných modifikovaných peptidů velmi nízký. Celkem bylo po použití tohoto protokolu modifikace cysteinů a trypsinovém štěpení identifikováno 14 peptidů, přičemž u 6 (43 %) z těchto peptidů představoval vzniklý thialysin nové štěpné místo pro trypsin. Při vyhodnocení těchto výsledků došlo při identifikaci proteinu také k přiřazení lysozymu

pocházejícího ze slepičího (*Gallus gallus*) vejce sekvenci lysozymu z křepela kalifornského (*Callipepla californica*). Tyto dva proteiny však mají totožnou sekvenci. Po aminoethylaci v přítomnosti guanidinu a teplotě 60 °C (Tab. 9) a následném trypsinovém štěpení bylo nejvíce modifikovaných peptidů identifikováno u proteinového standardu BSA (12 peptidů). Větší množství peptidů obsahujících modifikovaný cystein (8) bylo identifikováno také u proteinového standardu β -galaktosidasy. Tyto výsledky korespondují s faktem, že BSA a β -galaktosidasa obsahují ve své AK sekvenci ve srovnání se zbylými proteinovými standardy největší počet cysteinů (35, resp. 16), u kterých tak může dojít k aminoethylaci. Naopak u lysozymu nebyl identifikován žádný modifikovaný peptid. Také pokrytí sekvence tohoto proteinu bylo ve srovnání se zbylými výsledky velmi nízké. Důvodem byla pravděpodobně pozdě ukončená elektroforéza, následkem čehož došlo ke ztrátě proteinu. Ve srovnání s výsledky aminoethylace v přítomnosti hydrogenuhličitanu amonného a laboratorní teploty bylo v tomto případě identifikováno větší množství modifikovaných peptidů u proteinových standardů β -galaktosidasy (8), fosforylasy B (2), BSA (12) a ovalbuminu (6). Celkem bylo v tomto případě aminoethylace s následným trypsinovým štěpením PS úspěšně identifikováno 30 modifikovaných peptidů, kdy u 10 (33 %) z těchto peptidů představoval vzniklý thialysin nové štěpné místo pro trypsin.

Při použití 2-jodacetamidu jako alkylačního činidla (Tab. 10) bylo po trypsinovém štěpení proteinových standardů identifikováno celkem 19 modifikovaných peptidů, avšak nejednalo se o peptidy obsahující aminoethylovaný cystein na svém konci. Důvodem je skutečnost, že takto modifikovaný cystein není rozpoznáván trypsinem jako nové potenciální štěpné místo. Objevovaly se tak pouze peptidy s koncovými bazickými aminokyselinami argininem a lysinem. Nejvyšší počet modifikovaných peptidů byl identifikován u PS β -galaktosidasy (6). Úspěšná identifikace modifikovaných peptidů byla kromě β -galaktosidasy také v případě BSA (4 peptidy), fosforylasy B (3), ovalbuminu (2), trypsinového inhibitoru (2) a lysozymu (2). Dále byly tyto výsledky porovnány s výsledky trypsinového štěpení po alkylaci cysteinů 2-bromethylaminem za stejných podmínek, tzn. v přítomnosti NH_4HCO_3 a při laboratorní teplotě (Tab. 11). V případě použití 2-jodacetamidu došlo oproti použití 2-bromethylaminu k modifikaci u všech identifikovaných peptidů, které obsahovaly cystein. Dá se tedy říci, že účinnost 2-jodacetamidu je vyšší než účinnost ostatních alkylačních činidel použitých v této diplomové práci.

Tab. 7: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v Tris pufu v přítomnosti guanidinu a při laboratorní teplotě.⁵

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
MYH4_RABIT	Myosin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	44.7	–	–	–
BGAL_ECOLI	β -galaktosidasa (<i>E. coli</i>)	60.5	R.YHYQLVWC.Q K.AAGHYQAEAAALLQC.T R.AVLEAEVQMC \underline{G} ELR.D K.WLSLPGETRPLIL \underline{C} .E R.IIFDGVNSAFHLWC.N R.CSHYPNHPLWYTLC.D R.FAWFPAPEAVPESWLEC.D R.CSHYPNHPLWYTLC \underline{D} R.Y R.AVVELHTADGTLIEAEAC \underline{D} VGFR.E K.SVDPSRPVQYEGGGADTTATDIIC \underline{P} MYAR.V K.SVDPSRPVQYEGGGADTTATDIIC \underline{P} MYAR.V	1153.5379 1487.7191 1589.7905 1639.9120 1663.8181 1818.8334 2020.9393 2089.9615 2458.2162 3112.4594 3128.4543	46.2 68.2 72.3 42.8 84.2 69.6 74.9 40.9 68.0 59.8 29.7
PYGM_RABIT	Fosforylase B (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	57.5	K.FG \underline{C} RD \underline{P} V \underline{R} .T R.QLLN \underline{C} LHVITLYNR.I R.WLVLC \underline{N} PGLAEIIAER.I K.IC \underline{G} GWQMEEADDWLR.Y K.T \underline{C} AYTNHTVLPEALER.W K.IC \underline{G} GWQMEEADDWLR.Y	991.5022 1741.9661 1839.0077 1850.8080 1859.9200 1866.8029	18.1 38.4 78.5 64.4 85.0 30.9
ALBU_BOVIN	Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)	61.4	R.L \underline{C} VLHEK.T K.YNGVFQEC.C K.LFTFHADIC.T K.EYEATLEEC.C C.HGDLLEC \underline{A} DDR.A K.SLHTLFGDEL \underline{C} K.V	883.4950 1001.4277 1108.5376 1128.4645 1285.5721 1404.7071	27.7 33.1 64.9 58.7 94.7 74.0

Tab. 7: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v Tris pufu v přítomnosti guanidinu a při laboratorní teplotě.⁵ (pokračování)

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
ALBU_BOVIN	Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)	61.4	K.YICDNQDTISSK.L	1428.6555	84.6
			C.CHGDLLECADDR.A	1431.6235	20.2
			K.DDPHACYSTVFDK.L	1539.6664	79.2
			K.TVMENFVAFVDKC.C	1544.7367	88.3
			K.TVMENFVAFVDKC.C	1560.7316	93.2
			K.LKPDNTLCDEFK.A	1561.7810	78.9
			C.AADDKEACFAVEGPK.L	1592.7505	35.7
			K.AFDEKLFTFHADIC.T	1698.8076	46.1
			R.MPCTEDYLSLILNR.L	1709.8481	117.8
			R.MPCTEDYLSLILNR.L	1725.8430	103.3
			K.DDPHACYSTVFDK.LK.H	1780.8454	66.1
			C.HGDLLECADDRADLAK.Y	1783.8523	78.6
			R.RPCFSALTPDETYVPK.A	1865.9346	50.4
			R.NECFLSHKDDSPDLPK.L	1886.8833	70.8
			K.LFTFHADICTLPDTEK.Q	1892.9342	53.7
			K.LKPDNTLCDEFKADEK.K	2004.9826	57.7
			K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVC.K	2315.0991	29.9
			K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVC.K.N	2443.1941	65.5
			K.GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK.L	2477.2777	88.5
			K.QNCQFEKLGEGYGFQNALIVR.Y	2514.2325	37.2
OVAL_CHICK	Ovalbumin (<i>Galus galus</i>)	41.7	R.ADHPFLFC.I	991.4586	47.0
			R.ADHPFLFCIK.H	1232.6376	67.0
			R.YPILPEYLQC.V	1280.6475	71.7
			R.YPILPEYLQCVK.E	1507.8109	64.6
			R.LYAEERYPILPEYLQC.V	2042.0183	75.0
			R.LYAEERYPILPEYLQCVK.E	2269.1817	20.1

Tab. 7: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v Tris pufu v přítomnosti guanidinu a při laboratorní teplotě.⁵ (pokračování)

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
CAH2_BOVIN	Karboanhydrasa (<i>Bos taurus</i>)	66.2	–	–	–
ITRB_SOYBN	Trypsinový inhibitor (<i>Glycine max</i>)	21.5	K.FDSFAVIMLC.V	1187.5719	54.0
			K.FDSFAVIMLC.V	1203.5668	68.0
			K.CGDIGISIDHDDGTR.R	1615.7260	89.5
			K.CGDIGISIDHDDGTRR.L	1771.8271	61.6
LYSC_CHICK	Lysozym (<i>Gallus gallus</i>)	29.3	R.WWCNDGR.T	978.4130	21.12
			R.GYSLGNWVC.A	1040.4750	55.3
			R.CKGTDVQAWIR.G	1318.6816	95.9

Tab. 8: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v roztoku hydrogenuhličitanu amonného a při laboratorní teplotě.⁶

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
MYH4_RABIT	Myosin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	45.8	–	–	–
BGAL_ECOLI	β -galaktosidasa (<i>E. coli</i>)	49.3	–	–	–

⁵ Podtržen je aminoethylovaný cystein (+43.04) a methionin, u kterého došlo k oxidaci (+15.99).

Tab. 8: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v roztoku hydrogenuhličitanu amonného a při laboratorní teplotě.⁶ (pokračování)

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
PYGM_RABIT	Fosforylase B (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	52.6	K.ICGGWQMEEADDWLR.Y	1850.8080	57.5
ALBU_BOVIN	Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)	42.2	K.LFTFHADIC.T K.SLHTLFGDELCK.V K.LKPDPTLCDEFK.A K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCCK.N	1108.5376 1404.7071 1561.7810 2443.1941	65.6 64.8 58.8 57.9
OVAL_CHICK	Ovalbumin (<i>Gallus gallus</i>)	41.2	R.ADHPFLFC.I R.YPILPEYLQC.V R.LYAEERYPILPEYLQC.V	991.4586 1280.6475 2042.0183	46.2 58.4 31.8
CAH2_BOVIN	Karboanhydrasa (<i>Bos taurus</i>)	65.4	–	–	–
ITRB_SOYBN	Trypsinový inhibitor (<i>Glycine max</i>)	44.4	K.FDSFAVIMLC.V K.FDSFAVIMLC.V K.LVFCPQQAEDDK.C K.CGDIGISIDHDDGTR.R K.CGDIGISIDHDDGTRR.L K.LVFCPQQAEDDKCGDIGISIDHDDGTR.R	1187.5719 1203.5668 1434.6813 1615.7260 1771.8271 3032.3968	26.6 29.9 84.4 101.0 20.2 62.6
LYSC_CALCC	Lysozym (<i>Callipepla californica</i>)	33.3	R.WWCNDGR.T	978.4130	41.2

⁶ Podtržen je aminoethylovaný cystein (+43.04) a methionin, u kterého došlo k oxidaci (+15.99).

Tab. 9: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v Tris pufu v přítomnosti guanidinu a při teplotě 60 °C.⁷

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
MYH4_RABIT	Myosin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	41.5	–	–	–
BGAL_ECOLI	β-galaktosidasa (<i>E. coli</i>)	46.6	R.YHYQLVWC.Q K.AAGHYQAEAAALLQC.T R.AVLEAEVQMC ^G GELR.D R.IIFDGVNSAFHLWC.N R.CSHYPNHPLWYTL ^C .D R.CSHYPNHPLWYTL ^C DR.Y R.AVVELHTADGTLIEAEAC ^D DVGFR.E K.SVDPSRPVQYEGGGADTTATDII ^C PMYAR.V	1153.5379 1487.7191 1589.7905 1663.8181 1818.8334 2089.9615 2458.2162 3112.4594	27.3 61.6 42.0 86.1 34.7 24.8 30.8 23.7
PYGM_RABIT	Fosforylase B (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	51.4	K.FG ^C RDPVR.T K.T ^C AYTNHTVLPEALER.W	991.5022 1859.9200	26.3 34.0
ALBU_BOVIN	Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)	43.7	K.LFTFHADIC.T K.SLHTLFGDEL ^C K.V K.TVMENFVAFVDK ^C .C K.LKPDPNTLC ^C DEFK.A C.AADDKEAC ^F AVEGPK.L K.AFDEKLFTFHADIC.T K.DDPHAC ^Y STVFDK ^L K.H R.NE ^C FLSHKDDSPDLPK.L K.LFTFHADIC ^T LPDTEK.Q K.LKPDPNTLC ^C DEFKADEK.K K.DAIPENLPPLTADFAEDKDV ^C K.N K.AFDEKLFTFHADIC ^T LPDTEK.Q	1108.5376 1404.7071 1544.7367 1561.7810 1592.7505 1698.8076 1780.8454 1886.8833 1892.9342 2004.9826 2443.1941 2483.2043	50.7 77.0 44.6 42.9 56.9 95.5 53.4 51.2 73.9 75.6 48.2 26.3

Tab. 9: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v Tris pufu v přítomnosti guanidinu a při teplotě 60 °C.⁷ (pokračování)

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr	Skóre
OVAL_CHICK	Ovalbumin (<i>Gallus gallus</i>)	38.9	R.ADHPFLFC.I	991.4586	41.8
			R.ADHPFLFCIK.H	1232.6376	29.9
			R.YPILPEYLQC.V	1280.6475	27.7
			R.YPILPEYLQCVK.E	1507.8109	37.9
			R.LYAEERYPILPEYLQC.V	2042.0183	22.1
			R.LYAEERYPILPEYLQCVK.E	2269.1817	22.0
CAH2_BOVIN	Karboanhydrasa (<i>Bos taurus</i>)	60.4	–	–	–
ITRB_SOYBN	Trypsinový inhibitor (<i>Glycine max</i>)	33.3	K.CGDIGISIDHDDGTR.R	1615.7260	48.1
			K.LVFCPQAEDDKCGDIGISIDHDDGTR.R	3032.3968	107.7
LYSC_CHICK	Lysozym (<i>Gallus gallus</i>)	19.0	–		

⁷ Podtržen je aminoethylovaný cystein (+43.04).

Tab. 10: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-jodacetamidem v gelu. Alkylace probíhala v roztoku hydrogenuhličitanu amonného ve tmě a při laboratorní teplotě.⁸

Přístupový kód	Název proteinu	Pokrytí sekvence [%]	Sekvence peptidu	Mr
MYH4_RABIT	Myosin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	21.0	–	–
BGAL_ECOLI	β-galaktosidasa (<i>E. coli</i>)	42.0	R.AVLEAEVQMC <u>G</u> ELR.D R.AVVELHTADGTLIEAEAC <u>D</u> VGFR.E R.CSHYPNHPLWYTL <u>C</u> DR.Y R.QFC <u>M</u> NGLVFADR.T R.IGLN <u>C</u> QLAQVAER.V R.YHYQLVW <u>C</u> QK.-	1603.7698 2472.1955 2117.9200 1456.6591 1470.7613 1423.6707
PYGM_RABIT	Fosforylase B (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	18.0	K.ICGGWQMEEADDWLR.Y R.IN <u>M</u> AHL <u>C</u> IAGSHAVNGVAR.I R.QLLN <u>C</u> LHVITLYNR.I	1864.7872 2005.9938 1755.9454
ALBU_BOVIN	Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)	27.0	K.GLVLIAFSQYLQ <u>C</u> PFDEHVK.L R.MPCTEDYLSLILNR.L R.RP <u>C</u> FSA <u>L</u> TPDETYVPK.A K.LFTFHAD <u>I</u> CTLPDTEK.Q	2491.2570 1723.8273 1879.9138 1906.9135
OVAL_CHICK	Ovalbumin (<i>Gallus gallus</i>)	40.0	R.YPILPEYLQ <u>C</u> VK.E R.ADHPFL <u>F</u> CIK.H	1521.7901 1246.6169
CAH2_BOVIN	Karboanhydrasa (<i>Bos taurus</i>)	30.0	–	–
ITRB_SOYBN	Trypsinový inhibitor (<i>Glycine max</i>)	28.0	R. <u>C</u> PLTVVQSR.N K. <u>C</u> GDIGISIDHDDGTR.R	1058.5543 1629.7053
LYSC_CHICK	Lysozym (<i>Gallus gallus</i>)	42.0	R.GYSLGNWV <u>C</u> AAK.F R.WW <u>C</u> NDGR.T	1324.6234 992.3923

⁸ Podtržen je karbamidometylovaný cystein (+57.07) a methionin, u kterého došlo k oxidaci (+15.99).

Tab. 11: Porovnání výsledků identifikovaných peptidů po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromomethylaminem a 2-jodacetamidem. V obou případech probíhala alkylace v roztoku NH_4HCO_3 a při laboratorní teplotě.⁹

<i>In-gel</i> alkylace s 2-jodacetamidem		<i>In-gel</i> alkylace s 2-bromomethylaminem	
β-galaktosidasa; pokrytí sekvence: 42 %		β-galaktosidasa; pokrytí sekvence: 49.3 %	
<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>	<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>
1603.7698	R.AVLEAEVQMC <u>G</u> ELR.D	-	-
2472.1955	R.AVV <u>E</u> LHTADGTLIEAEACD <u>V</u> GFR.E		
2117.9200	R.CSHYPNHPLWYTL <u>C</u> DR.Y		
1456.6591	R.QFC <u>M</u> NGLVFADR.T		
1470.7613	R.IGLNC <u>Q</u> LAQVAER.V		
1423.6707	R.YHYQLVW <u>C</u> QK.-		
Fosforylase B; sekvenční pokrytí: 18.0 %		Fosforylase B; sekvenční pokrytí: 52.6 %	
<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>	<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>
1864.7872	K.ICGGWQMEEADDWLR.Y	1850.8080	K.ICGGWQMEEADDWLR.Y
2005.9938	R.IN <u>M</u> AHL <u>C</u> IAGSHAVNGVAR.I		
1755.9454	R.QLLN <u>C</u> LHVITLYNR.I		
Sérový albumin; pokrytí sekvence: 27.0 %		Sérový albumin; pokrytí sekvence: 27.0 %	
<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>	<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>
2491.2570	K.GLVLIAFSQYLQ <u>C</u> PFDEHVK.L	1108.5376	K.LFTFHAD <u>C</u> .T
1723.8273	R.M <u>P</u> CTEDYLSLILNR.L	1404.7071	K.SLHTLFGDEL <u>C</u> K.V
1879.9138	R.R <u>P</u> CFSALTPDETYVPK.A	1561.7810	K.LKPD <u>P</u> NTL <u>C</u> DEFK.A
1906.9135	K.LFTFHAD <u>C</u> TLDPTEK.Q	2443.1941	K.DAIPENLPPLTADFAEDKD <u>V</u> <u>C</u> K.N
Ovalbumin; pokrytí sekvence: 40.0 %		Ovalbumin; pokrytí sekvence: 41.2 %	
<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>	<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>
1521.7901	R.YPILPEYL <u>Q</u> <u>C</u> VK.E	1280.6475	R.YPILPEYL <u>Q</u> <u>C</u> .V
1246.6169	R.ADH <u>P</u> FL <u>F</u> <u>C</u> IK.H	991.4586	R.ADH <u>P</u> FL <u>F</u> <u>C</u> .I
		2042.0183	R.LYAEERYPILPEYL <u>Q</u> <u>C</u> .V
Trypsinový inhibitor; pokrytí sekvence: 28.0 %		Trypsinový inhibitor; pokrytí sekvence: 44.4 %	
<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>	<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>
1058.5543	R. <u>C</u> PLTVVQSR.N	1187.5719	K.FDSFAVIM <u>L</u> <u>C</u> .V
1629.7053	K. <u>C</u> GDIGISIDHDDGTR.R	1615.7260	K. <u>C</u> GDIGISIDHDDGTR.R
		1203.5668	K.FDSFAVIM <u>L</u> <u>C</u> .V
		1434.6813	K.LV <u>F</u> <u>C</u> PQQAEDDK.C
		1771.8271	K. <u>C</u> GDIGISIDHDDGTRR.L
		3032.3968	K.LV <u>F</u> <u>C</u> PQQAEDDK <u>C</u> GDIGISIDHDDGTR.R
Lysozym; pokrytí sekvence: 42.0 %		Lysozym; pokrytí sekvence: 33.3 %	
<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>	<i>Mr</i>	<i>Peptid</i>
992.3923	R.WW <u>C</u> NDGR.T	978.4130	R.WW <u>C</u> NDGR.T
1324.6234	R.GYSLGNW <u>V</u> CAAK.F		

⁹ Podtržen je karbamidometylovaný cystein (+57.07) v případě použití 2-jodacetamidu, aminoethylovaný cystein (+43.04) v případě použití 2-bromomethylaminu a methionin, u kterého došlo k oxidaci (+15.99).

4.2.4 Vyhodnocení modifikace proteinových standardů v gelu 2-bromethylaminem v PEAKS Studio 8.0

Data z MS/MS analýzy peptidů, které vznikly trypsinovým štěpením proteinových standardů alkylovaných v gelu činidlem 2-bromethylaminem v přítomnosti guanidinu a při teplotě 60 °C, byly vyhodnoceny také softwarem PEAKS Studio 8.0. Výsledkem prohledávání v databázi SwissProt byla identifikace 24 peptidů obsahujících aminoethylovaný cystein, přičemž 4 z nich obsahovaly tento cystein na svém konci (Tab. 12). Stejně jako v případě vyhodnocení dat programem ProteinScape 3.1 nebyly v programu PEAKS Studio 8.0 identifikovány žádné modifikované peptidy u proteinových standardů myosinu a karboanhydrasy. Neúspěšná byla také identifikace modifikovaných peptidů pocházejících z lysozymu. Naopak počet úspěšně identifikovaných modifikovaných peptidů pocházejících z PS β -galaktosidasy (8 peptidů), fosforylasy B (1), BSA (10), ovalbuminu (2) a trypsinového inhibitoru (3) byl přibližně stejný jako při použití programu ProteinScape 3.1.

Tab. 12: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v přítomnosti guanidinu a při teplotě 60 °C.¹⁰

	Sekvence peptidu	Mr	Délka
Myosin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)			
	–	–	–
β-galaktosidasa (<i>E. coli</i>)			
1	R.IIFDGVNSAFHLW <u>C</u> .N	1663.8181	14
2	R.AVVELHTADGTLIEAE <u>A</u> CDVGFR.E	2458.2161	23
3	K.AAGHYQAEAA <u>L</u> LQC.T	1487.7191	14
4	R.QFCM <u>N</u> GLVFADR.T	1443.6638	12
5	R.AVLEAEVQM <u>C</u> GELR.D	1589.7905	14
6	R.IGLN <u>C</u> QLAQAER.V	1457.7660	13
7	R.CSHYPNHPLWY <u>T</u> LC <u>D</u> R.Y	2117.9563	16
8	R.QFCM <u>N</u> GLVFADR.T	1470.6748	12
Fosforylasy B (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)			
9	K.TCA <u>Y</u> TNHTVLPEALER.W	1859.9199	16
Sérový albumin (<i>Bos taurus</i>)			
10	K.LFTFHADICTLPDTEK.Q	1892.9342	16
11	K.AFDEKLFTFHAD <u>I</u> C.T	1698.8075	14
12	K.LKPDPNTL <u>C</u> DEFKADEK.K	2004.9825	17
13	K.SLHTLFGDE <u>L</u> CK.V	1404.7072	12
14	K.DDPHAC <u>Y</u> STVFDK <u>L</u> K.H	1780.8453	15
15	R.NEC <u>F</u> L <u>S</u> HKDDSPDL <u>P</u> K.L	1886.8832	16
16	K.LKPDPNTL <u>C</u> DEFK.A	1561.7810	13

Tab. 12: Peptidy identifikované po trypsinovém štěpení proteinových standardů, u kterých došlo k modifikaci cysteinu 2-bromethylaminem v gelu. Alkylace probíhala v přítomnosti guanidinu a při teplotě 60 °C.¹⁰ (pokračování)

	Sekvence peptidu	Mr	Délka
17	K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK.N	2443.1941	22
18	K.LFTFHADIC.T	1108.5375	9
19	K.SLHTLFGDELCK.V	1420.7020	12
Ovalbumin (<i>Gallus gallus</i>)			
20	R.YPILPEYLQCVK.E	1507.8108	12
21	R.ADHPFLFCIK.H	1232.6376	10
Karboanhydrasa (<i>Bos taurus</i>)			
	–	–	–
Trypsinový inhibitor (<i>Glycine max</i>)			
22	K.LVFCPQQAEDDKCGDIGISDHDDGTR.R	3032.3967	27
23	K.LVFCPQQAEDDK.C	1435.6653	12
24	K.CGDIGISDHDDGTR.R	1615.7260	15
Lysozym (<i>Gallus gallus</i>)			
	–	–	–

4.3 Analýza jaderných proteinů ječmene

V další části práce následovala analýza jaderných proteinů ječmene z G1 a G2 fáze buněčného cyklu, u kterých byla provedena aminoethylace cysteinů v roztoku činidlem 2-bromethylaminem v přítomnosti guanidinu a při laboratorní teplotě. Tyto podmínky aminoethylace byly odvozeny na základě výsledků optimalizace modifikace cysteinu s modelovými proteiny. Jaderné proteiny byly analyzovány MS/MS peptidů s využitím nanoLC-ESI-MS/MS systému s hmotnostním spektrometrem amaZon speed ETD (iontová past). Naměřená MS/MS data byla exportována ve formátu MGF do programů ProteinScape 3.1 a PEAKS Studio 8.0 a využita k prohledávání v databázi aminokyselinových sekvencí proteinů ječmene, pocházející ze širší databáze SwissProt. Identifikace bylo docíleno na základě přiřazení fragmentačních vzorů MS/MS spekter peptidovým sekvencím příslušejícím konkrétním proteinům z databáze. Pro získání dalších informací o identifikovaných proteinech, jako je molekulová hmotnost, hodnota isoelektrického bodu, počet cysteinů a obsah polárních a nepolárních aminokyselin, byl použit program Protein Cutter (<https://software.cr-hana.upol.cz/proteincutter/index.php>). AK sekvence proteinů byly staženy z portálu UniprotKB (<http://www.uniprot.org/>).

¹⁰ Podtržen je aminoethylovaný cystein (+ 43.04).

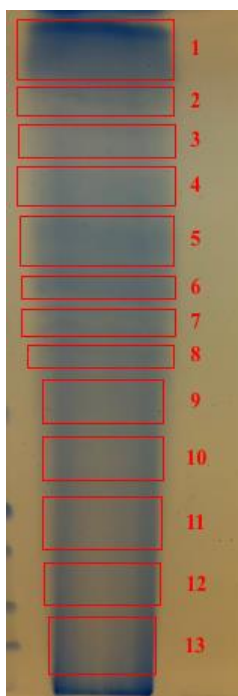
Informace o buněčné lokalizaci proteinu byla získána z databáze UniProtKB. Při neuvedeném údaji byla dohledávána na základě sekvenční homologie s použitím programu BLAST a databáze konzervovaných domén (CDD, The Conserved Domains Database).

4.3.1 Analýza proteinů z buněčných jader ječmene tříděných v G1 fázi buněčného cyklu

Extrahované a případně i modifikované proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 10). Následně bylo z gelu vyřezáno celkem 13 pásů, a proteiny z těchto gelových pásů byly podrobeny proteolytickému štěpení trypsinem. Vzniklé peptidy byly odsoleny na pipetových špičkách s reverzní chromatografickou fází ZipTip C18 a podrobeny nanoLC-ESI-MS/MS analýze.

Pomocí programu ProteinScape 3.1 bylo identifikováno 153 proteinů na základě identifikace 629 peptidů (Přílohová tab. I). V Tab. 13 jsou uvedeny pouze proteiny, v jejichž aminokyselinové sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Jedná se o 10 proteinů, u kterých bylo identifikováno celkem 11 modifikovaných peptidů, přičemž v jednom případě znamenal aminoethylovaný cystein vznik nového potvrzeného štěpného místa pro trypsin. Společnou vlastností těchto proteinů je převažující obsah polárních aminokyselin, naopak v případě molekulové hmotnosti (15–72 kDa), isoelektrického bodu (*pI* 4,8–10,7) a množství cysteinů (1–13) se tyto proteiny výrazně liší.

MS/MS data byla vyhodnocena také v programu PEAKS Studio 8.0. Bylo identifikováno 601 peptidů pocházejících ze 160 proteinů (Přílohová tab. II). V Tab. 14 jsou uvedeny pouze proteiny, v jejichž aminokyselinové sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Jedná se pouze o 2 proteiny, u kterých byly identifikovány 2 modifikované peptidy, nicméně ani v jednom případě se aminoethylovaný cystein nenacházel na konci peptidu. V tomto případě tedy aminoethylace cysteinu nevedla ke vzniku nového štěpného místa pro trypsin. Na základě informací získaných z programu Protein Cutter bylo zjištěno, že u těchto dvou modifikovaných proteinů převládá obsah polárních aminokyselin nad nepolárními. Naopak v případě molekulové hmotnosti (15,6–60 kDa), hodnoty isoelektrického bodu (*pI* 8,6–9,6) či počtu cysteinů v AK sekvenci (1–5) se tyto proteiny výrazně liší.



Obr. 10: Vzorek proteinů z G1 jader ječmene separovaných po extrakci pomocí SDS-PAGE s využitím 4% zaostřovacího a 10% separačního gelu. Ohraničení označuje vyřezané části gelu (celkem 13 pásů). Vzorek byl aplikován v množství 20 μ l na jamku.¹¹

¹¹ Z důvodu nefunkčnosti skeneru v době zpracování vzorků byl snímek gelu pořízen mobilním telefonem.

Tab. 13: Identifikované proteiny z G1 jader ječmene, v jejichž sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace ¹²
1	A0A287SS50_HORVV	Uncharacterized protein	500.9	10	1	0	cytoplasma
2	A0A287WS67_HORVV	Uncharacterized protein	497.7	8	1	0	(jádro)
3	A0A287HC21_HORVV	Nop domain-containing protein	491.0	12	1	0	jádro
4	A0A287WL41_HORVV	Uncharacterized protein	186.5	4	1	0	cytosol
5	A0A287SV42_HORVV	Uncharacterized protein	166.9	3	1	0	(ribozom)
6	F2DJI3_HORVV	Predicted protein	155.9	2	1	0	jádro
7	A0A287G428_HORVV	MCM domain-containing protein	119.9	1	2	0	(jádro)
8	A0A287FPI1_HORVV	Uncharacterized protein	99.8	2	1	1	(jádro)
9	A0A287K7H1_HORVV	Ribosomal_S7 domain-containing protein	94.5	2	1	0	(ribozom)
10	A0A287VHX9_HORVV	Uncharacterized protein	94.2	1	1	0	neznámá
				celkem:	11	1	

Tab. 14: Identifikované proteiny z G1 jader ječmene, v jejichž sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace
1	A0A287HC63_HORVV	Nop domain-containing protein	199.65	11	1	0	ribozom
2	A0A287K7H1_HORVV	Ribosomal_S7 domain-containing protein	102.77	2	1	0	ribozom
				celkem:	2	0	

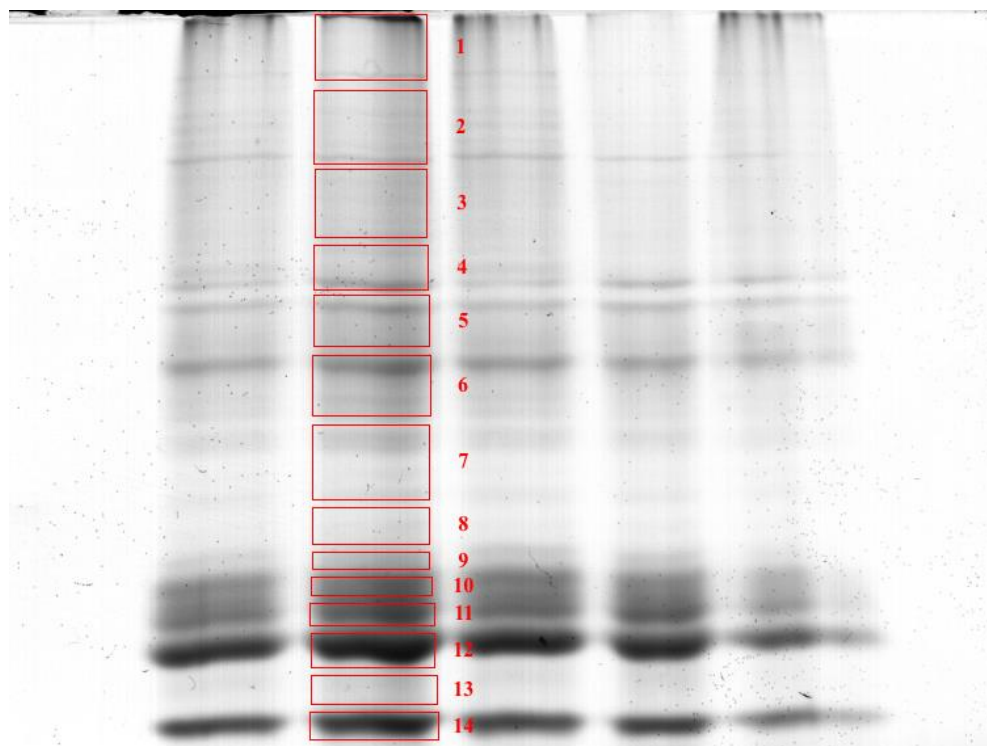
¹² Informace o buněčné lokalizaci proteinu byla získána z databáze UniProtKB. Při neuvedeném údaji byla dohledávána na základě sekvenční homologie s použitím programu BLAST a CDD. Lokalizace dohledána tímto způsobem je uvedena v závorce.

4.3.2 Analýza proteinů z buněčných jader ječmene tříděných v G2 fázi buněčného cyklu

Extrahované a případně i modifikované jaderné proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 11). Následně bylo z gelu vyřezáno celkem 14 pásů, a proteiny z těchto gelových pásů byly podrobeny proteolytickému štěpení trypsinem. Vzniklé peptidy byly odsoleny na pipetových špičkách s reverzní chromatografickou fází ZipTip C18 a podrobeny nanoLC-ESI-MS/MS analýze.

V programu ProteinScape 3.1 bylo na základě identifikace 1617 peptidů identifikováno 313 proteinů (Přílohová tab. III). U 60 z těchto proteinů byla prokázána modifikace cysteinu, když byl aminoethylovaný cystein nalezen u 79 peptidů (Tab. 15). U 30 peptidů představoval vzniklý thialysin nové štěpné místo pro trypsin. Na základě informací získaných z programu Protein Cutter bylo stejně jako v případě G1 proteinů zjištěno, že ve všech identifikovaných modifikovaných proteinech převládá obsah polárních aminokyselin nad nepolárními. Naopak v případě molekulové hmotnosti (12,4–304,2 kDa), hodnoty isoelektrického bodu (pI 4,8–12,3) či počtu cysteinů v AK sekvenci (1–50) se tyto proteiny výrazně liší.

MS/MS data byla vyhodnocena také v programu PEAKS Studio 8.0. Bylo identifikováno 1505 peptidů pocházejících z 223 proteinů (Přílohová tab. IV). V Tab. 16 jsou uvedeny pouze proteiny, v jejichž aminokyselinové sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Jedná se o 34 proteinů, u kterých bylo identifikováno celkem 43 modifikovaných peptidů, přičemž v 22 případech znamenal aminoethylovaný cystein vznik nového potvrzeného štěpného místa pro trypsin. Společnou vlastností těchto proteinů je převažující obsah polárních aminokyselin, naopak v případě molekulové hmotnosti (12,5–96 kDa), hodnoty isoelektrického bodu (4,8–11,1) a množství cysteinů (1–26) se tyto proteiny výrazně liší.



Obr. 11: Vzorek proteinů z G2 jader ječmene separovaných po extrakci pomocí SDS-PAGE s využitím 4% zaostřovacího a 10% separačního gelu. Ohraničení označuje vyřezané části gelu (celkem 14 pásů). Vzorek byl aplikován v množství 20 μ l na jamku.

Tab. 15: Identifikované proteiny z G2 jader ječmene, v jejichž sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace ¹³
1	A0A287HAK5_HORVV	Nop domain-containing protein	1680.6	24	2	0	jádro
2	A0A287HC63_HORVV	Nop domain-containing protein	1190.2	23	2	1	(ribozom)
3	A0A287V6Y4_HORVV	Uncharacterized protein	1121.1	18	1	0	jádro
4	A0A287HHC4_HORVV	PUA domain-containing protein	976.9	20	2	0	jádro
5	A0A287PQV9_HORVV	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	933.7	17	1	0	ribozom
6	A0A287WS67_HORVV	Uncharacterized protein	885.8	15	1	0	(jádro)
7	A0A287V4M4_HORVV	Uncharacterized protein	792.6	17	1	1	jádro
8	A0A287V449_HORVV	Uncharacterized protein	781.7	16	1	1	jádro
9	A0A287EV33_HORVV	Chromatin-remodeling complex ATPase	629.2	15	1	0	jádro
10	A0A287L367_HORVV	Uncharacterized protein	495.6	8	1	1	(jádro)
11	A0A287GM61_HORVV	Ubiquitin-like domain-containing protein	432.1	9	2	1	ribozom
12	F2EFR1_HORVV	40S ribosomal protein S6	348.3	7	1	1	ribozom
13	A0A287S913_HORVV	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	342.0	8	1	1	ribozom
14	A0A287URE6_HORVV	TPR_MLP1_2 domain-containing protein	339.5	5	1	1	jádro
15	A0A287J4J0_HORVV	Ribosomal_S17_N domain-containing protein	323.4	6	3	2	ribozom
16	A0A287MDR1_HORVV	DEK_C domain-containing protein	315.0	6	3	0	jádro
17	A0A287UM83_HORVV	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein	313.4	7	1	1	(ribozom)
18	A0A287N719_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	304.4	5	2	2	neznámá
19	M0YT85_HORVV	Uncharacterized protein	289.8	4	1	0	(jádro)
20	A0A287M2L0_HORVV	S5 DRBM domain-containing protein	285.9	6	1	0	cytosol
21	M0VTB0_HORVV	RNA cytidine acetyltransferase	274.1	7	1	1	jádro
22	M0XEX8_HORVV	Uncharacterized protein	265.5	6	1	1	jádro, cytosol
23	A0A287J817_HORVV	Uncharacterized protein	263.6	2	1	0	jádro
24	A0A287TGY2_HORVV	Uncharacterized protein	251.6	5	1	0	jádro, cytosol
25	A0A287LUR3_HORVV	Uncharacterized protein	251.5	4	1	1	neznámá
26	A0A287JEP8_HORVV	Uncharacterized protein	250.3	6	3	3	neznámá

Tab. 15: Identifikované proteiny z G2 jader ječmene, v jejichž sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace ¹³
27	F2D510_HORVV	40S ribosomal protein S24	248.7	5	1	0	ribozom
28	A0A287L0L6_HORVV	HTH arsR-type domain-containing protein	232.8	1	1	1	jádro
29	A0A287JBT0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	222.1	4	2	0	jádro
30	M0YAU1_HORVV	Brix domain-containing protein	204.6	5	1	0	jádro
31	A0A287QCP7_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	197.4	5	1	1	(jádro)
32	M0XU84_HORVV	UDP-glucose 6-dehydrogenase	178.9	2	1	0	(cytosol)
33	A0A287QB82_HORVV	LisH domain-containing protein	175.8	4	1	0	jádro
34	A0A287NZ18_HORVV	MIF4G domain-containing protein	164.7	4	2	0	(jádro)
35	A0A287GL78_HORVV	Uncharacterized protein	163.4	4	1	1	neznámá
36	F2EB15_HORVV	Predicted protein	160.9	3	1	1	jádro
37	M0XHX4_HORVV	RRM domain-containing protein	159.1	4	2	0	(jádro)
38	A0A287E7R4_HORVV	Ribosomal_L28e domain-containing protein	158.5	2	1	0	(jádro)
39	A0A287R382_HORVV	Ribosome assembly factor mrt4	156.2	3	1	1	jádro
40	A0A287QV04_HORVV	Uncharacterized protein	155.6	4	2	1	jádro
41	A0A287WL41_HORVV	Uncharacterized protein	145.9	1	1	0	cytosol
42	A0A287NL24_HORVV	DEAD domain-containing protein	142.1	4	1	1	neznámá
43	A0A287LGA7_HORVV	KRR1 small subunit processome component	131.3	2	1	1	jádro
44	A0A287HN23_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	122.1	1	1	0	neznámá
45	A0A287LVR5_HORVV	Uncharacterized protein	108.2	2	1	0	(cytoskelet)
46	F2E1C6_HORVV	Predicted protein	103.5	2	1	0	jádro
47	M0XWD1_HORVV	RRM domain-containing protein	101.8	2	1	0	jádro
48	A0A287E8A7_HORVV	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	101.4	2	2	0	cytosol
49	A0A287HY84_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	94.2	2	2	1	jádro
50	A0A287E1H8_HORVV	Uncharacterized protein	93.5	1	1	1	jádro
51	F2CVE1_HORVV	Predicted protein	90.4	1	1	0	jádro

Tab. 15: Identifikované proteiny z G2 jader ječmene, v jejichž sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace ¹³
52	A0A287LZ83_HORVV	DNA_pol_B_exo1 domain-containing protein	87.4	1	1	0	(jádro)
53	A0A287VI52_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	84.7	2	1	0	(jádro)
54	A0A287PSK9_HORVV	Exostosin domain-containing protein	77.9	1	1	0	neznámá
55	A0A287ESJ7_HORVV	Uncharacterized protein	73.8	1	1	0	cytoskelet
56	A0A287JV32_HORVV	Uncharacterized protein	73.8	1	1	0	neznámá
57	A0A287RYA7_HORVV	Uncharacterized protein	73.6	2	1	0	neznámá
58	A0A287JBC6_HORVV	PPC domain-containing protein	72.7	1	1	0	(jádro)
59	A0A287LSL5_HORVV	Uncharacterized protein	67.8	2	1	0	neznámá
60	A0A287DX42_HORVV	Uncharacterized protein	65.9	2	1	1	neznámá
				celkem:	77	30	

¹³ Informace o buněčné lokalizaci proteinu byla získána z databáze UniProtKB. Při neuvedeném údaji byla dohledávána na základě sekvenční homologie s použitím programu BLAST a CDD. Lokalizace dohledána tímto způsobem je uvedena v závorce.

Tab. 16: Identifikované proteiny z G2 jader ječmene, v jejichž sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0.

č.	Přístupový kód	Protein	Skóre	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace ¹⁴
1	A0A287HC21_HORVV	Nop domain-containing protein	253.63	21	2	1	jádro
2	A0A287GJ75_HORVV	Nop domain-containing protein	253.53	22	2	1	jádro
3	A0A287HAK5_HORVV	Nop domain-containing protein	251.32	17	1	0	jádro
4	A0A287SS50_HORVV	Uncharacterized protein	243.78	16	1	0	cytoplasma
5	A0A287P8H2_HORVV	Uncharacterized protein	229.49	14	1	1	(jádro, cytosol)
6	A0A287WS02_HORVV	Uncharacterized protein	218.48	13	1	1	(jádro)
7	A0A287HH01_HORVV	PUA domain-containing protein	202.46	16	2	0	(jádro)
8	A0A287HHC4_HORVV	PUA domain-containing protein	201.92	16	2	0	jádro
9	A0A287NVX2_HORVV	Nop domain-containing protein	192.73	10	1	0	neznámá
10	A0A287E4A5_HORVV	DNA helicase	185.42	15	2	2	jádro
11	A0A287JEF8_HORVV	Adenosylhomocysteinase	177.1	15	1	1	cytosol
12	A0A287JES9_HORVV	Adenosylhomocysteinase	172.26	12	1	1	cytosol
13	A0A287U6A1_HORVV	Uncharacterized protein	171.39	11	1	1	ribozom
14	A0A287G411_HORVV	DNA helicase	167.13	13	2	1	jádro
15	A0A287RRJ0_HORVV	HATPase_c domain-containing protein	164.63	14	1	1	(cytosol)
16	A0A287UM83_HORVV	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein	163.31	9	1	1	(ribozom)
17	A0A287FRQ6_HORVV	Uncharacterized protein	151.77	9	1	1	(jádro)
18	A0A287GM61_HORVV	Ubiquitin-like domain-containing protein	150.41	8	2	0	ribozom
19	M0XEX8_HORVV	Uncharacterized protein	147.11	8	1	1	jádro, cytosol
20	A0A287MDR1_HORVV	DEK_C domain-containing protein	143.72	7	1	0	jádro
21	A0A287U2E9_HORVV	40S ribosomal protein S24	142.35	5	1	0	ribozom
22	A0A287GJ71_HORVV	ATP synthase subunit beta	140.75	9	1	1	mitochondrie
23	A0A287JBT0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	139.81	9	1	1	jádro
24	A0A287X8K8_HORVV	40S ribosomal protein S24	139.57	6	1	1	ribozom
25	M0XVQ1_HORVV	PUM-HD domain-containing protein	128.77	6	1	0	neznámá

Tab. 16: Identifikované proteiny z G2 jader ječmene, v jejichž sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace ¹⁴
26	A0A287S943_HORVV	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	122.34	7	1	1	cytosol
27	F2EFR1_HORVV	40S ribosomal protein S6	121.58	6	1	1	ribozom
28	A0A287E9F9_HORVV	Uncharacterized protein	116.22	4	1	0	neznámá
29	A0A287J4T4_HORVV	Ribosomal_S17_N domain-containing protein	112.47	7	2	1	ribozom
30	A0A287KYK4_HORVV	DNA helicase	95.8	8	1	0	jádro
31	A0A287LAY1_HORVV	Uncharacterized protein	91.68	3	1	0	ribozom
32	A0A287JEI4_HORVV	Uncharacterized protein	87.59	5	1	1	(jádro)
33	A0A287P4C4_HORVV	40S ribosomal protein S7	78.51	5	1	0	ribozom
34	A0A287SM27_HORVV	Uncharacterized protein	78.23	2	2	1	(jádro)
				celkem:	43	22	

¹⁴ Informace o buněčné lokalizaci proteinu byla získána z databáze UniProtKB. Při neuvedeném údaji byla dohledávána na základě sekvenční homologie s použitím programu BLAST a CDD. Lokalizace dohledána tímto způsobem je uvedena v závorce.

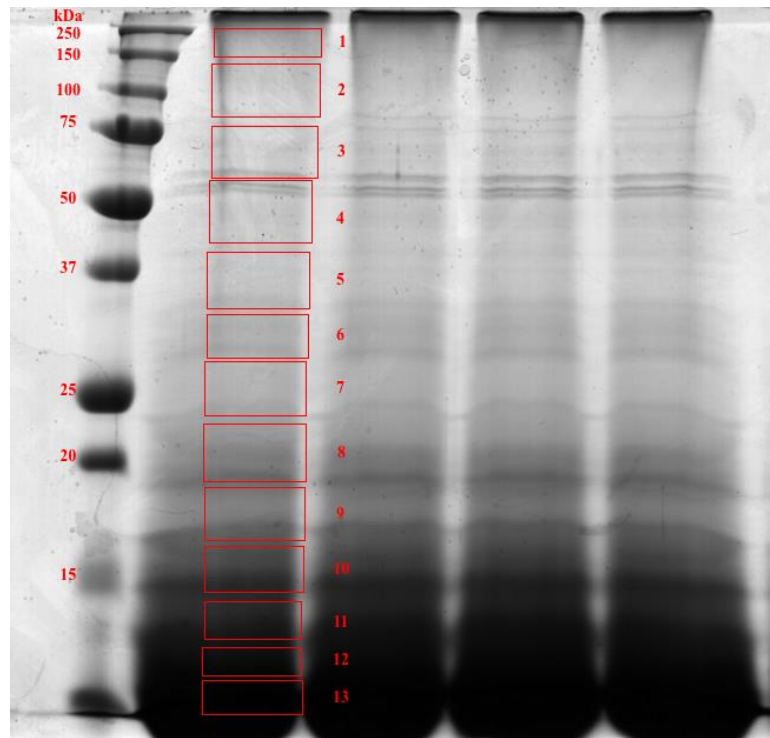
4.4 Analýza proteinů z mazového povlaku tvarůžku

V rámci této diplomové práce byl postup modifikace cysteinu činidlem 2-bromethylaminem v přítomnosti guanidinu a při laboratorní teplotě vyzkoušen také na proteinech izolovaných z povlaku tvarůžku. Důvodem byla dostupnost extraktu v laboratoři z jiného projektu. Po separaci izolovaných proteinů pomocí SDS-PAGE (Obr. 12) následovalo štěpení proteinů trypsinem, extrakce peptidů z gelu a nanoLC-ESI-MS/MS analýza peptidů s využitím hmotnostního spektrometru amaZon ETD.

V programu ProteinScape 3.1 bylo na základě identifikace 187 peptidů identifikováno 46 proteinů (Přílohová tab. V). U 9 z těchto proteinů byla prokázána modifikace cysteinu, když byl aminoethylovaný cystein nalezen u 12 peptidů (Tab. 17). Ve 3 případech se vzniklý thialysin nacházel na konci sekvence peptidu. Na základě informací získaných z programu Protein Cutter bylo zjištěno, že ve všech identifikovaných modifikovaných proteinech převládá obsah polárních aminokyselin nad nepolárními. Naopak v případě molekulové hmotnosti (16,1–78 kDa), hodnoty isoelektrického bodu (pI 4,4–10,2) či počtu cysteinů v AK sekvenci (1–35) se tyto proteiny výrazně liší. Identifikované modifikované proteiny pocházely převážně z organismu *Bos taurus* (5 proteinů), dále z *Ovis aries* (2), *Sus scrofa* (1) a *Schizosaccharomyces pombe* (1).

MS/MS data byla vyhodnocena také v programu PEAKS Studio 8.0. Bylo identifikováno 26 proteinů na základě identifikace 217 peptidů (Přílohová tab. VI). V Tab. 18 jsou uvedeny pouze proteiny, v jejichž aminokyselinové sekvenci byl nalezen aminoethylovaný cystein. Jedná se o 6 proteinů, u kterých bylo identifikováno celkem 13 modifikovaných peptidů, přičemž v 6 případech znamenal aminoethylovaný cystein vznik nového potvrzeného štěpného místa pro trypsin. Společnou vlastností těchto proteinů je převažující obsah polárních aminokyselin, naopak v případě molekulové hmotnosti (16,2–78 kDa), hodnoty isoelektrického bodu (4,6–8,6) a množství cysteinů (3–35) se tyto proteiny výrazně liší. Identifikované modifikované proteiny pocházely převážně z organismu *Bos taurus* (4 proteinů) a po jednom proteinu z organismu *Ovis aries* a *Bos mutus grunniens*.

K dispozici byla také data z ESI-MS/MS analýzy proteinů z povlaku tvarůžku po alkylationi 2-jodacetamidem, která byla vyhodnocena v programu PEAKS Studio 8.0. Na základě identifikace 345 peptidů identifikováno 59 proteinů (Přílohová tab. VII). U 22 z těchto proteinů byla prokázána modifikace cysteinu, když byl karbamidomethylovaný cystein nalezen u 62 peptidů (Tab. 19).



Obr. 12: Vzorek proteinů izolovaných z povlaku tvarůžku separovaných pomocí SDS-PAGE s využitím 4% zaostřovacího a 10% separačního gelu. Ohraničení označuje vyřezané části gelu (celkem 13 pásů). V levém sloupci se nachází proteinový standard Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color (5 μ l).

Tab. 17: Identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, u kterých došlo k aminoethylaci cysteinu. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst
1	ALBU_BOVIN	Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4	18	1	1
2	LACB_BOVIN	Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGB PE=1 SV=3	14	1	0
3	CASA2_BOVIN	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S2 PE=1 SV=2	11	1	1
4	ALBU_SHEEP	Serum albumin OS=Ovis aries OX=9940 GN=ALB PE=1 SV=1	9	1	1
5	TRFL_BOVIN	Lactotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	11	2	0
6	LALBA_BOVIN	Alpha-lactalbumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LALBA PE=1 SV=2	7	3	0
7	RS27B_SCHPO	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27b OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=ubi5 PE=1 SV=2	4	1	0
8	CASA2_SHEEP	Alpha-S2-casein OS=Ovis aries OX=9940 GN=CSN1S2 PE=2 SV=1	2	1	0
9	LALBA_PIG	Alpha-lactalbumin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LALBA PE=1 SV=2	1	1	0
celkem:				12	3

Tab. 18: Identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, u kterých došlo k aminoethylaci cysteinu. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Počet peptidů	Počet modifikovaných peptidů	Počet nových štěpných míst
1	ALBU_BOVIN	Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4	19	1	0
2	LACB_BOVIN	Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGB PE=1 SV=3	24	1	1
3	LALBA_BOSMU	Alpha-lactalbumin OS=Bos mutus grunniens OX=30521 GN=LALBA PE=2 SV=1	13	7	4
4	ALBU_SHEEP	Serum albumin OS=Ovis aries OX=9940 GN=ALB PE=1 SV=1	9	1	0
5	TRFL_BOVIN	Lactotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	9	2	0
6	CASA2_BOVIN	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S2 PE=1 SV=2	15	1	1
celkem:				13	6

Tab. 19: Identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, u kterých došlo ke karbamidomethylaci cysteinu. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů
1	ALBU_BOVIN	Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4	292.12	29	9
2	TRFL_BOVIN	Lactotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	248.97	17	8
3	LACB_BOVIN	Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGB PE=1 SV=3	235.54	15	3
4	LALBA_BOVIN	Alpha-lactalbumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LALBA PE=1 SV=2	229.67	14	7
5	TRFL_CAPHI	Lactotransferrin OS=Capra hircus OX=9925 GN=LTF PE=1 SV=1	195.18	10	5
6	PERL_BOVIN	Lactoperoxidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=LPO PE=1 SV=1	194.98	11	4
7	CASA2_BOVIN	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S2 PE=1 SV=2	186.85	17	5
8	PIGR_BOVIN	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Bos taurus OX=9913 GN=PIGR PE=2 SV=1	170.24	6	2
9	ALBU_FELCA	Serum albumin OS=Felis catus OX=9685 GN=ALB PE=1 SV=1	163.76	5	1
10	ACON_YEAST	Aconitate hydratase mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ACO1 PE=1 SV=2	149.94	4	1
11	MFGM_BOVIN	Lactadherin OS=Bos taurus OX=9913 GN=MFGE8 PE=1 SV=2	147.36	6	1
12	CO7_BOVIN	Complement component C7 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C7 PE=2 SV=1	125.85	4	2
13	CO3_BOVIN	Complement C3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C3 PE=1 SV=2	125.11	4	3
14	TRFE_BOVIN	Serotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=TF PE=2 SV=1	124.87	5	2
15	TSP1_BOVIN	Thrombospondin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=THBS1 PE=2 SV=2	107.30	3	1
16	TRFL_HORSE	Lactotransferrin (Fragment) OS=Equus caballus OX=9796 GN=LTF PE=1 SV=1	107.28	4	2
17	IMDH_STRPY	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Streptococcus pyogenes OX=1314 GN=guaB PE=1 SV=2	105.26	2	1
18	RL4_PSYCK	50S ribosomal protein L4 OS=Psychrobacter cryohalolentis (strain K5) OX=335284 GN=rplD PE=3 SV=1	104.44	3	1
19	TSP1_MOUSE	Thrombospondin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Thbs1 PE=1 SV=1	100.26	3	1
20	ACON_SCHPO	Aconitate hydratase mitochondrial OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=SPAC24C9.06c PE=3 SV=2	93.03	2	1
21	VTDB_BOVIN	Vitamin D-binding protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=GC PE=2 SV=1	92.29	3	1
22	LALBA_PIG	Alpha-lactalbumin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LALBA PE=1 SV=2	75.38	3	1
				celkem:	62

5 DISKUZE

První experiment této diplomové práce byl zaměřen na porovnání protokolů modifikace cysteinu v proteinech v roztoku a gelu, modifikace různými alkylačními činidly a modifikace při rozdílných podmínkách (teplota, prostředí; Tab. 20). Pro porovnání a optimalizaci protokolů modifikace cysteinu v roztoku a v gelu byly vybrány modelové proteiny BSA a proteinové standardy pro elektroforézu. Po porovnání výsledků alkylace BSA v roztoku a gelu se ukázalo, že počet modifikovaných peptidů získaných po alkylaci v gelu byl vyšší než po alkylaci v roztoku. Důvodem může být fixace proteinu v gelu. Na rozdíl od modifikace v roztoku, při které mohou být cysteiny obsažené v AK sekvenci daného proteinu nedostupné z důvodu interakce s dalšími látkami obsaženými v roztoku, je protein v gelu stabilizován, čímž je usnadněna reakce modifikačního činidla s daným proteinem. Může tedy docházet k modifikaci většího počtu cysteinů, což po štěpení trypsinem dává vznik většímu množství peptidů díky novým štěpným místům. Nicméně analýza výsledků také ukázala, že při provedení modifikace proteinů až po SDS-PAGE separaci je alkylace cysteinu doprovázena dalšími vedlejšími modifikacemi. Cystein může být např. modifikován během elektroforézy nezreagovaným akrylamidem, kdy vzniká nežádoucí akrylamidový adukt Cys-S- β -propionamid (Patterson a Aebersold, 1995). Tato modifikace se obvykle považuje za nežádoucí, jelikož komplikuje analýzu proteinů separovaných právě elektroforézou. Snížení rizika vzniku akrylamidových aduktů lze dosáhnout dvěma způsoby, a to provedením modifikace proteinů před elektroforetickou separací, nebo použitím Tris-tricinového systému pufrů namísto Tris-glycinového. Použitím Tris-tricinového systému pufrů se snižuje riziko nežádoucích modifikací proteinů ze dvou důvodů. Zaprvé, při použití Tris-tricinového systému pufrů lze dosáhnout úspěšné separace proteinů použitím nižšího % akrylamidu, než je požadováno při separaci proteinů o stejném rozlišení v Tris-glycinovém gelu. Druhým důvodem je použití Tricine vzorkového pufru namísto Laemmliho vzorkového pufru (pH 6.8), který se svým pH (8.45) blíží optimu redukce a alkylace (pH >8; Sechi a Chait, 1998; Thevis *et al.*, 2003). Při modifikaci cysteinu v roztoku byla pozorována jako vedlejší modifikace pouze oxidace methioninu (+15.99).

Tab. 20: Porovnání použitých protokolů modifikace cysteinu v roztoku a v gelu, modifikace rozdílnými alkylačními činidly a modifikace při rozdílných podmínkách (teplota, prostředí).¹⁵

Protokol č.	Alkylační činidlo	Prostředí pro alkylation	Teplota	Alkylation v gelu/roztoku	Identifikované proteiny a počet identifikovaných modifikovaných peptidů							
					Myosin	β -gaktosidasa	Fosforylase B	BSA	Ovalbumin	Karboanhydrasa	Trypsinový inhibitor	Lysozym
1	BrEt	0,5 mol·l ⁻¹ Tris/6 mol·l ⁻¹ guanidin	lab.	gel	0	11	6	26	6	0	4	3
2	BrEt	0,1 mol·l ⁻¹ NH ₄ HCO ₃	lab.	gel	0	0	1	4	3	0	6	1
3	BrEt	0,5 mol·l ⁻¹ Tris/6 mol·l ⁻¹ guanidin	60 °C	gel	0 (0)	8 (8)	2 (1)	12 (10)	6 (2)	0 (0)	2 (3)	0 (0)
4	IAM	0,1 mol·l ⁻¹ NH ₄ HCO ₃	lab.	gel	0	6	3	4	2	0	2	2
5	BrEt	0,5 mol·l ⁻¹ Tris/6 mol·l ⁻¹ guanidin	60 °C	roztok				7 (18)				
6	BrPr	0,5 mol·l ⁻¹ Tris/6 mol·l ⁻¹ guanidin	60 °C	roztok				12				
7	IETFACAM	0,2 mol·l ⁻¹ N-ethylmorfolinacetát/ 6 mol·l ⁻¹ guanidin	50 °C	roztok				(4)				

¹⁵ Čísla bez závorčky znamenají počet modifikovaných peptidů identifikovaných v programu ProteinScape 3.1, v závorce je uveden počet modifikovaných peptidů identifikovaných v programu PEAKS Studio 8.0.

Dalším cílem tohoto experimentu bylo porovnat výsledky modifikace cysteinu při rozdílných podmínkách. Při použití guanidinu jako prostředí pro alkylyaci byl po tryptickém štěpení identifikován vyšší počet peptidů obsahujících modifikovaný cystein než při použití hydrogenuhličitanu amonného. Důvodem je skutečnost, že guanidin jakožto chaotropní látka způsobuje denaturaci proteinu, při které dochází k rozrušení disulfidových můstků a tím ke zpřístupnění cysteinů pro alkylační činidlo. Takový cystein může být alkylován a rozpoznáván pak trypsinem jako nové potenciální štěpné místo. V rámci porovnávání účinnosti modifikace cysteinů při rozdílných podmínkách byl vyhodnocován také vliv teploty, při které alkylace probíhala. Při využití vyšší teploty alkylace (60 °C), která podporuje denaturaci proteinu, byl po trypsinovém štěpení očekáván výrazně vyšší počet identifikovaných peptidů obsahujících aminoethylovaný cystein než při použití laboratorní teploty. Ve skutečnosti se počty identifikovaných modifikovaných peptidů získaných po alkylyaci při rozdílné teplotě a následném trypsinovém štěpení výrazně nelišily. Tyto výsledky tedy ukázaly, že jakmile alkylace probíhala v přítomnosti guanidinu, který působil jako dostatečné denaturační činidlo, neměla teplota, při které alkylace probíhala, vliv na denaturaci proteinů a tím na zpřístupnění cysteinů alkylačnímu činidlu.

Další část experimentu byla zaměřena na porovnání účinnosti alkylačních činidel *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidu, 2-bromethylaminu a 3-brompropylaminu na modelovém proteinu BSA. Během alkylace BSA *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem došlo k problému s precipitací činidla, jakmile bylo toto činidlo přidáno ke vzorku BSA rozpuštěného v příslušném pufru. Z tohoto důvodu nedošlo k alkylyaci cysteinů obsažených v BSA a MS analýza tak neukázala žádné rozdíly mezi vzniklými peptidy mého vzorku a kontrolního vzorku BSA. Tento problém byl vyřešen při opakování experimentu, kdy byl pro rozpuštění *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidu použit namísto startovního 10% methanolu methanol v takovém objemu, aby jeho koncentrace byla po přidání pouze polovičního množství alkylačního činidla (z celkového potřebného objemu činidla) větší nebo rovna 10 %. Následnou MS/MS analýzou byly identifikovány jednak peptidy, které vznikly štěpením trypsinem v klasickém místě jeho štěpení, tedy za argininem a lysinem (nenásleduje-li prolin), a také peptidy, které vznikly štěpením trypsinem v místě modifikovaného cysteinu. Počet těchto peptidů byl však téměř o polovinu menší, než počet peptidů vzniklých štěpením BSA modifikovaného činidly 3-brompropylaminem a 2-bromethylaminem, jak se zmiňuje dále. V druhé části tohoto experimentu proběhla alkylace BSA již zmíněnými činidly 3-brompropylaminem a 2-bromethylaminem. Postup

přípravy vzorku, který následoval po aminoethylaci a aminopropylaci BSA byl stejný jako u vzorku modifikovaného činidlem *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem. Nicméně počet peptidů identifikovaných po trypsinovém štěpení MS/MS analýzou byl při použití těchto alkylačních činidel výrazně vyšší, což si vysvětlují menší ztrátou proteinu během přípravy vzorku na štěpení a poté během přípravy na MS/MS analýzu, a lepší účinnosti alkylačních činidel 3-brompropylaminu a 2-bromethylaminu. Z důvodu náročné přípravy a práce s činidlem *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem a nedostatečnému množství získaných peptidů obsahujících modifikovaný cystein tímto činidlem, jsem v další práci s *N*-(jodethyl)-trifluoracetamidem nepokračovala.

Výsledkem aminoethylace cysteinu je vznik nových potenciálních míst pro štěpení trypsinem. Nicméně, u zjištěných případů modifikace cysteinu, ať už získaných v roztoku nebo v gelu, nedošlo automaticky ke štěpení proteinů ve všech těchto modifikovaných místech. Důvodem může být nepřístupnost těchto míst díky strukturním zábranám či výskytu prolinu nebo kyselé aminokyseliny (Asp) v sousedství.

Na základě získaných informací z analýzy modelových proteinů, u kterých byla provedena modifikace cysteinu různými alkylačními činidly při různých podmínkách, byl odvozen optimální protokol aminoethylace cysteinu, který byl v dalším experimentu využit při analýze jaderných proteinů ječmene. Jako alkylační činidlo byl použit 2-bromethylamin a aminoethylace probíhala v přítomnosti guanidinu a při laboratorní teplotě. Dále bylo zapotřebí rozhodnout, zda provést modifikaci jaderných proteinů v roztoku či v gelu. Přestože z předchozích výsledků vyplývá skutečnost, že alkylační reakce s 2-bromethylaminem je úspěšná v obou případech, z důvodu možného rizika zablokování části volných cysteinových zbytků nezreagovaným akrylamidem probíhala aminoethylace jaderných proteinů v roztoku, tedy před separací proteinů pomocí SDS-PAGE (Řehulková *et al.*, 2009).

Pro analýzu jaderných proteinů ječmene byly využity vzorky jader tříděných v G1 a G2 fázi buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie (Tab. 21). Na základě naměřených MS/MS dat exportovaných do programů ProteinScape 3.1 a PEAKS Studio 8.0 bylo provedeno prohledávání v databázi SwissProt s omezením pouze na proteiny ječmene (*Hordeum vulgare*). U vzorku G1 jader bylo identifikováno celkem 252 proteinů, přičemž 61 proteinů bylo identifikováno jak v programu ProteinScape 3.1, tak v programu PEAKS Studio 8.0. Relativně malý průnik identifikovaných proteinů mezi ProteinScape a PEAKS je pravděpodobně zapříčiněn použitím odlišných algoritmů pro vyhledávání, které využívají zmíněné programy, a které jsou jinak kvalitní a spolehlivé.

Ze všech identifikovaných proteinů se podařilo prokázat přítomnost aminoethylovaného cysteinu u 11 proteinů, v jednom případě znamenal takto vzniklý thialysin nové potvrzené štěpné místo pro trypsin. S cílem ověřit, zda skutečně všechny identifikované proteiny pocházejí z jádra, byly tyto proteiny ručně prohledány v databázi UniProt. Lokalizace v jádře byla potvrzena u 26 % proteinů, další byly identifikovány jako proteiny vyskytující se v cytosolu, mitochondrii, jako součást ribozomu či cytoskeletu. Z těchto informací vyplývá, že purifikace jader průtokovou cytometrií sice snižuje, ale úplně nevylučuje riziko kontaminace nejadernými proteiny. Nicméně skutečnost, že byly ve vzorku G1 jader nalezeny také proteiny, které tvoří strukturní složku ribozomu, nebo proteiny vázající se na ribozomy, je pravděpodobně způsobená nikoliv kontaminací vzorku, ale přítomností ribozomálních podjednotek v jádře, respektive v jadérku, kde probíhá jejich syntéza předtím, než jsou transportovány do cytoplasmy, kde dochází k vytvoření funkčního ribozomu seskupením malé a velké ribozomální podjednotky (Kressler *et al.*, 2010).

Dále bylo 33 % identifikovaných proteinů ve vzorku G1 jader v databázi UniProt označených jako proteiny s neznámou subcelulární lokalizací, což pravděpodobně souvisí se skutečností, že je jaderný proteom ječmene velmi málo prozkoumán. Za účelem dohledání buněčné lokalizace alespoň u proteinů, u kterých došlo k aminoethylaci cysteinu, byly AK sekvence těchto proteinů vloženy do programu BLAST, který umožňuje srovnávání zadané sekvence se sekvencemi v databázi a nalézt tak proteiny s vysokou homologií. Prohledáním domén těchto homologních proteinů, u kterých je známa funkce nebo vazebná schopnost, bylo možné určit buněčnou lokalizaci téměř všech identifikovaných modifikovaných proteinů. Bylo zjištěno, že tyto domény jsou součástí ribozomálních proteinů, transkripčních faktorů, proteinů zajišťujících sestřih pre-mRNA nebo proteinů tvořících strukturní složku jaderného póru, což představuje důkaz, že se skutečně jedná o jaderné proteiny.

Ve srovnání s prací Petrovská *et al.* (2014), ve které autoři identifikovali přes 800 proteinů v G1 jádrech, byl počet identifikovaných proteinů v této práci relativně nízký. Hlavním důvodem je skutečnost, že v této práci proběhlo jednorázové měření na iontové pasti, zatímco v případě práce Petrovská *et al.* (2014) jsou výsledky analýzy kombinací měření na ESI-Q/TOF a MALDI-TOF/TOF.

Průběh analýzy proteinů z jader tříděných v G2 fázi byl stejný jako v předchozí analýze G1 proteinů. Na základě změřených dat bylo provedeno prohledávání v databázi SwissProt s omezením pouze na proteiny ječmene. Tímto způsobem se v programech

ProteinScape 3.1 a PEAKS Studio 8.0 podařilo identifikovat celkem 442 proteinů, přičemž 94 z těchto proteinů bylo identifikováno v obou programech. U 86 identifikovaných proteinů byl v AK sekvenci nalezen aminoethylovaný cystein, v případě 50 identifikovaných modifikovaných peptidů se nacházel thialysin na konci sekvence peptidu. Tato skutečnost dokazuje, že vzniklý thialysin představuje nové štěpné místo pro trypsin. Stejně jako v případě G1 proteinů bylo dalším cílem analýzy určit lokalizaci všech identifikovaných proteinů. 33 % proteinů je v databázi UniProt anotováno jako jaderné proteiny, další proteiny jsou lokalizovány do cytosolu, mitochondrie nebo jako součást ribozomu a cytoskeletu buňky. Jak už bylo zmíněno, přítomnost proteinů, které jsou součástí ribozomu, nebo proteinů vázajících ribozomy je pravděpodobně způsobená přítomností ribozomálních podjednotek v jádru. U 38 % identifikovaných proteinů je dle databáze UniProt buněčná lokalizace neznámá. I v tomto případě byla snaha dohledat buněčnou lokalizaci alespoň u proteinů, u nichž došlo k aminoethylaci cysteinu, a to pomocí programu BLAST a prohledávání domén homologních proteinů se známou funkcí nebo vazebnou schopností. Podobně jako v případě modifikovaných G1 proteinů, se podařilo dohledat buněčnou lokalizaci u většiny identifikovaných modifikovaných proteinů. Bylo zjištěno, že tyto domény jsou součástí ribozomálních proteinů, transkripčních faktorů, proteinů zajišťujících sestřih pre-mRNA nebo proteinů nezbytných pro přesný přenos chromosomů během buněčného dělení.

Po porovnání výsledků z analýzy proteinů ve vzorcích jader tříděných v G1 a G2 fázi se ukázalo, že 76 identifikovaných proteinů bylo nalezeno v obou vzorcích. Z celkového počtu 4352 identifikovaných peptidů, byl aminoethylovaný cystein potvrzen u 3,1 % peptidů, ve 39 % potvrzených modifikovaných peptidech znamenal aminoethylovaný cystein nové štěpné místo pro trypsin. V databázi UNcleProt, která je první vyhrazenou databází obsahující rostlinné jaderné proteiny identifikované během různých fází buněčného cyklu, bylo snahou ověřit, zda souhlasí identifikace jednotlivých identifikovaných proteinů s příslušnou fází buněčného cyklu. Nicméně z důvodu nekompatibility přístupových kódů z databází UniProt a UNcleProt, která je způsobená stářím údajů v databázi UNcleProt, nebylo toto ověření možné.

Tab. 21: Porovnání výsledků analýzy proteinů z buněčných jader ječmene tříděných v G1 a G2 fázi buněčného cyklu.

G1 jádra		G2 jádra	
ProteinScape 3.1	PEAKS Studio 8.0	ProteinScape 3.1	PEAKS Studio 8.0
počet identifikovaných proteinů		počet identifikovaných proteinů	
153	160	314	222
celkový počet peptidů		celkový počet peptidů	
629	601	1617	1505
počet modifikovaných proteinů		počet modifikovaných proteinů	
10	2	60	34
počet modifikovaných peptidů		počet modifikovaných peptidů	
11	2	77	43
počet nových štěpných míst		počet nových štěpných míst	
1	0	30	22

V posledním experimentu této práce byl postup aminoethylace cysteinu 2-bromethylaminem vyzkoušen na vzorku proteinů izolovaných z mazového povlaku tvarůžku, který byl k dispozici v laboratoři z jiného projektu. Po nanoLC-ESI-MS/MS analýze bylo na základě naměřených MS/MS dat exportovaných do programů ProteinScape 3.1 a PEAKS Studio 8.0 provedeno prohledávání v databázi SwissProt. Tímto způsobem bylo identifikováno celkem 55 proteinů. Ze všech identifikovaných proteinů se podařilo prokázat aminoethylovaný cystein v sekvenci 13 proteinů, u 7 peptidů pocházejících z modifikovaných proteinů znamenal thialysin nové štěpné místo pro trypsin.

Pro tuto práci byly k dispozici také výsledky analýzy proteinů izolovaných z povlaku tvarůžku, u kterých byla provedena modifikace 2-jodacetaminem. Toto činidlo se při přípravě vzorku na MS analýzu využívá především pro stabilizaci zredukovaných cysteinů, čímž je zabráněno jejich opětovnému spojení disulfidovým můstkem, které komplikuje proteolytické štěpení (Hermanson, 2013). V tomto případě sloužily výsledky analýzy po alkylaci 2-jodacetamidem jako kontrola. nanoLC-ESI-MS/MS analýzou s následným prohledáváním naměřených MS/MS spekter bylo v databázi SwissProt programem PEAKS Studio 8.0 identifikováno celkem 58 proteinů na základě identifikace 342 peptidů, přičemž u 62 peptidů byla potvrzena karbamidomethylace cysteinu. Po porovnání těchto výsledků s výsledky po aminoethylaci proteinů z tvarůžku 2-bromethylaminem vyhodnocených taktéž v programu PEAKS Studio 8.0 se ukázalo,

že účinnost alkylace 2-jodacetamidem je vyšší než v případě použití 2-bromethylaminu. Počet identifikovaných peptidů, u kterých došlo ke karbamidomethylaci cysteinu, byl 10násobně vyšší než počet peptidů obsahujících aminoethylovaný cystein. Ukázalo se však, že v případě použití 2-bromethylaminu došlo k identifikaci proteinu α -laktalbuminu (*Bos mutus grunniens*) díky 4 novým štěpným místům v místě vzniklého thialysinu, která v případě použití 2-jodacetamidu nebyla možná. Dále byly v případě modifikovaného proteinu β -laktoglobulinu (*Bos taurus*), identifikovaného v obou případech, tzn. jak po alkylationi 2-bromethylaminem, tak 2-jodacetamidem, hodnoty sekvenčního pokrytí podobné, ale v případě použití 2-bromethylaminu došlo k identifikaci některých jiných částí AK sekvence tohoto proteinu. Nicméně s výjimkou proteinu α -laktalbuminu (*Bos mutus grunniens*), nevedla aminoethylace cysteinů při analýze proteinů z tvarůžku ke zvýšení počtu detegovaných tryptických peptidů, a tím ke zvýšení počtu identifikovaných proteinů.

Mezi proteiny izolovanými z mazového povlaku tvarůžku, které byly identifikovány po alkylationi 2-jodacetamidem, byly nalezeny proteiny pocházející z organismů *Giraffa camelopardalis* (žirafa severní), *Equus caballus* (kůň domácí) a *Mus musculus* (myš domácí). Sekvence těchto proteinů byly vloženy do programu BLAST, kde bylo zjištěno, že mají tyto proteiny vysokou homologii s proteiny z tura (*Bos taurus*), které se ve tvarůžcích z mléka běžně vyskytují. Po porovnání sekvencí identifikovaných peptidů z těchto organismů se sekvencemi *Bos taurus* homologů bylo dokázáno, že se nejedná o nesmyslné identifikace, ale o přiřazení homologním proteinům.

Ve vzorcích proteinů izolovaných z povlaku tvarůžku byly mimo proteiny pocházející z organismů *Bos taurus* nebo *Ovis aries* identifikovány také proteiny různých mikroorganismů. Jedná se např. o proteiny bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, která se v mlékárenském průmyslu běžně využívá jako startovací kultura při výrobě jogurtů, používá se však i při výrobě sýrů švýcarského a italského typu (Fox *et al.*, 2017). Další detegované proteiny pocházely z bakterie *Bifidobacterium adolescentis*, která patří do skupiny bakterií označované jako probiotika. Tyto bakterie jsou přirozeně přítomny v trávicím traktu zdravého člověka, kde podporují pravidelné trávení a udržují a rozvíjí správnou a zdravou střevní mikroflóru. Zdrojem probiotik jsou především jogurty, vyskytují se však i v určitých typech sýrů. Pokud jsou však tyto bakterie do sýru přidány, musí být kontrolován jejich vliv na zrání a chuť sýra (Fox *et al.*, 2017). Identifikované proteiny pocházely také z kvasinky *Debaryomyces hansenii*, která přeměňuje laktát na acetát, a která se při výrobě některých zrajících sýrů (např. Cheddar)

využívá jako sekundární kultura, zajišťující charakteristickou chuť sýra (Ferreira a Viljoen, 2003). Jako sekundární kultura se při výrobě některých zrajících sýrů (např. Roquefort, Camembert, Cabrales) využívá také kvasinka *Kluyveromyces lactis*, jejíž proteiny byly ve vzorcích proteinů izolovaných z povlaku tvarůžku také detegovány (Fox *et al.*, 2017).

6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla zpracována literární rešerše na téma využití modifikace cysteinu, konkrétně aminoethylace cysteinu pro analýzu proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie peptidů. Další část byla věnována rostlinným jaderným proteinům a popisu přípravy vzorku na MS analýzu.

V praktické části byla nejprve provedena optimalizace protokolu pro aminoethylaci cysteinu na modelových proteinech, konkrétně na BSA a proteinových standardech pro elektroforézu. Na základě výsledků analýzy modelových proteinů, u kterých byla provedena modifikace cysteinu, byla ověřena schopnost trypsinu štěpit protein v místě aminoethylovaného cysteinu. Dále byl na základě těchto výsledků odvozen optimální protokol modifikace cysteinu, který byl v dalším experimentu použit při analýze proteinů z buněčných jader ječmene tříděných v G1 a G2 fázi buněčného cyklu. Pro aminoethylaci cysteinu byl vybrán 2-bromethylamin na základě vyššího počtu identifikovaných proteinů a snadnější přípravy činidla oproti *N*-(jodethyl)trifluoracetamidu. Aminoethylace probíhala v přítomnosti guanidinu jakožto denaturačního činidla, který způsobuje rozvolnění proteinů a tím zpřístupnění cysteinu alkylačnímu činidlu. Z důvodu minimalizace rizika zablokování části volných cysteinových zbytků nezreagovaným akrylamidem probíhala aminoethylace v roztoku.

Ve vzorcích proteinů extrahovaných z G1 a G2 jader bylo identifikováno 252 respektive 442 proteinů, přičemž 76 z těchto proteinů bylo identifikováno v obou vzorcích. Z celkového počtu 4354 identifikovaných peptidů, byl aminoethylovaný cystein potvrzen u 3,1 % peptidů, ve 39 % potvrzených modifikovaných peptidech znamenal aminoethylovaný cystein nové štěpné místo pro trypsin.

V posledním experimentu byl postup aminoethylace vyzkoušen na vzorku proteinů izolovaných z mazového povlaku tvarůžku. nanoLC-ESI-MS/MS analýzou bylo identifikováno celkem 55 proteinů. Porovnáním výsledků s kontrolou, při které byly proteiny izolované z mazového povlaku tvarůžku alkylovány 2-jodacetamidem se ukázalo, že v tomto případě nevedla aminoethylace cysteinu ke zvýšení počtu detegovaných tryptických peptidů, a tím ke zvýšení počtu identifikovaných proteinů.

Z výsledků získaných v této diplomové práci lze usoudit, že metoda aminoalkylace cysteinu je praktičtější pro práci s jednotlivými proteiny než se směsmi. Její použití je tedy vhodnější pro specifické případy, např. pro štěpení proteinů, které ve své AK sekvenci neobsahují příliš štěpných trypsinových míst.

7 LITERATURA

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2015): Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews In Biotechnology* **37**(2), 163-176.
- Aebersold, R., Mann, M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**(6928), 198-207.
- Anderson, N. L., Anderson, N. G. (2002): The Human Plasma Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**(11), 845-867.
- Bae, M. S., Cho, E. J., Choi, E. -Y., Park, O. K. (2003): Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant Journal* **36**(5), 652-663.
- Barritault, D., Expert-Bezancon, A., Guerin, M. F., Hayes, D. (1976): The Use of Acetone Precipitation in the Isolation of Ribosomal Proteins. *European Journal Of Biochemistry* **63**(1), 131-135.
- Benore-Parsons, M., Seidah, N. G., Wennogle, L. P. (1989): Substrate phosphorylation can inhibit proteolysis by trypsin-like enzymes. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **272**(2), 274-280.
- Bernstein, E., Hake, S. B. (2006): The nucleosome: a little variation goes a long. *Biochemistry And Cell Biology* **84**(4), 505-507.
- Bigeard, J., Rayapuram, N., Bonhomme, L., Hirt, H., Pflieger, D. (2014): Proteomic and phosphoproteomic analyses of chromatin-associated proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **14**(19), 2141-2155.
- Biological Discovery. Vol. 1, (Veenstra T. D., Yates, J. R., eds.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 3-19.
- Bischof, S., Grossmann, J., & Gruissem, W. (2012). Proteomics and its application in plant biotechnology. In: *Plant Biotechnology and Agriculture*. (Altman, A., Michael, P., eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 55-65.
- Blackstock, W. P., Weir, M. P. (1999): Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends In Biotechnology* **17**(3), 121-127.
- BLAST:https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (15.-20.4.2020)
- Blavet, N., Uřinová, J., Jeřábková, H., Chamrád, I., Vrána, J., Lenobel, R., Beinhauer, J., Šebela, M., Doležel, J., Petrovská, B. (2017): UNcleProt (Universal Nuclear Protein database of barley): The first nuclear protein database that distinguishes proteins from different phases of the cell cycle. *Nucleus* **8**(1), 70-80.
- Bochar, D. A., Taberner, L., Stauffacher, C. V., Rodwell, V. W. (1999): Aminoethylcysteine can replace the function of the essential active site lysine of *Pseudomonas mevalonii* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Biochemistry* **38**, 8879-8883.
- Calikowski, T. T., Meulia, T., Meier, I. (2003): A proteomic study of the arabidopsis nuclear matrix. *Journal Of Cellular Biochemistry* **90**(2), 361-378.
- Casati, P., Campi, M., Chu, F., Suzuki, N., Maltby, D., Guan, S., Burlingame, A. L., Walbot, V. (2008): Histone Acetylation and Chromatin Remodeling Are Required for UV-B-Dependent Transcriptional Activation of Regulated Genes in Maize. *The Plant Cell* **20**(4), 827-842.
- Cole, R. D. (1967): S-Aminoethylation. In: *Methods in Enzymology* 11. (Hirs, C. H. W. ed.), Academic Press, New York, USA, 315-317.
- Cooper, B., Campbell, K. B., Feng, J., Garrett, W. M., Frederick, R. (2011): Nuclear proteomic changes linked to soybean rust resistance. *Molecular bioSystems* **7**(3), 773-783.
- Crankshaw, M. W., Grant, G. A. (1996): Modification of Cysteine. *Current Protocols In Protein Science* **3**(1), 15.1.1-15.1.18.
- Dvořáková, P., Hernychová, L., Vojtěšek, B. (2014): Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klinická Onkologie* **27**, 104-109.
- Evans, D. R. H., Romero, J. K., Westoby, M. (2009): Concentration of Proteins and Removal of Solutes. In: *Guide to Protein Purification* 2. vydání. (Burgess, R., Deutscher, M., eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 97-120.

- Feist, P., Hummon, A. (2015): Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *International Journal Of Molecular Sciences* **16**(2), 3537-3563.
- Ferreira, A., Viljoen, B. C. (2003): Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal Of Food Microbiology* **86**(1-2), 131-140.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2017): *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, New York, USA.
- Friedecký, D., Lemr, K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**(41), 152-157.
- Gloss, L. M., Kirsch, J. F. (1995): Decreasing the Basicity of the Active Site Base, Lys-258, of *Escherichia coli* Aspartate Aminotransferase by Replacement with γ -thialysine. *Biochemistry* **34**(12), 3990-3998.
- Gong, F., Hu, X., Wang, W. (2015): Proteomic analysis of crop plants under abiotic stress conditions: where to focus our research?. *Frontiers In Plant Science* **6**, 1-5.
- Goto, C., Hashizume, S., Fukao, Y., Hara-Nishimura, I., Tamura, K. (2019): Comprehensive nuclear proteome of *Arabidopsis* obtained by sequential extraction [Online]. *Nucleus* **10**(1), 81-92.
- Graumann, K., Bass, H. W., Parry, G. (2014): SUNrises on the International Plant Nucleus Consortium. *Nucleus* **4**(1), 3-7.
- Gundry, R. L., White, M. Y., Murray, C. I., Kane, L. A., Fu, Q., Stanley, B. A., Van Eyk, J. E. (2009): Preparation of proteins and peptides for mass spektrometry analysis in a bottom-up proteomic workflow. In: *Current protocol in Molecular biology*. (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., eds.), John Wiley, Hoboken, USA, 10.25.1-10.25.23
- Guo, B., Chen, Y., Li, C., Wang, T., Wang, R., Wang, B., Hu, S., Du, X., Xing, H., Song, X., Yao, Y., Sun, Q., Ni, Z. (2014): Maize (*Zea mays L.*) seedling leaf nuclear proteome and differentially expressed proteins between a hybrid and its parental lines. *Proteomics* **14**(9), 1071-1087.
- Han, K. K., Delacourte, A., Hemon, B. (1987): Chemical modification of thiol group(s) in protein: Application to the study of an ti-microtubular drugs binding. *Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **88**(4), 1057-1065.
- Hermanson, G. T. (2013): Functional Targets for Bioconjugation. In: *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 127-228.
- Hopkins, C. E., Hernandez, G., Lee, J. P., Tolan, D. R. (2005): Aminoethylation in model peptides reveals conditions for maximizing thiol specificity. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **443**(1-2), 1-10.
- Hopkins, C. E., O'connor, P. B., Allen, K. N., Costello, C. E., Tolan, D. R. (2002): Chemical-modification rescue assessed by mass spectrometry demonstrates that γ -thia-lysine yields the same activity as lysine in aldolase. *Protein Science* **11**(7), 1591-1599.
- Huber, L. A., Pfaller, K., Vietor, I. (2003): Organelle Proteomics. *Circulation Research* **92**(9), 962-968.
- Chalker, J. M., Bernardes, G. J. L., Lin, Y. A., Davis, B. G. (2009): Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology. *Chemistry - An Asian Journal* **4**(5), 630-640.
- Chamrad, D. C., Körting, G., Stühler, K., Meyer, H. E., Klose, J., Blüggel, M. (2004): Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics* **4**(3), 619-628.
- Choudhary, M. K., Basu, D., Datta, A., Chakraborty, N., Chakraborty, S. (2009): Dehydration-responsive Nuclear Proteome of Rice (*Oryza sativa L.*) Illustrates Protein Network, Novel Regulators of Cellular Adaptation, and Evolutionary Perspective. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**(7), 1579-1598.
- Jayat, C., Ratinaud, M. H. (1993): Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. *Biology Of The Cell* **78**(1-2), 15-25.

- Jensen, O. N., Vorm, O., Mann, M. (1996): Sequence patterns produced by incomplete enzymatic digestion or one-step Edman degradation of peptide mixtures as probes for protein database searches. *Electrophoresis* **17**(5), 938-944.
- Jiang, X., Shamshurin, D., Spicer, V., Krokhin, O. V. (2013): The effect of various S-alkylating agents on the chromatographic behavior of cysteine-containing peptides in reversed-phase chromatography. *Journal Of Chromatography B* **915-916**, 57-63.
- Jones, A. M. E., MacLean, D., Studholme, D. J., Serna-Sanz, A., Andreasson, E., Rathjen, J. P., Peck, S. C. (2009): Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*. *Journal Of Proteomics* **72**(3), 439-451.
- Karpievitch, Y. V., Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D., Dabney, A. R. (2010): Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *The Annals Of Applied Statistics* **4**(4), 1797-1823.
- Khan, M. M. K., Komatsu, S. (2004): Rice proteomics: recent developments and analysis of nuclear proteins. *Phytochemistry* **65**(12), 1671-1681.
- Kollipara, L., Zahedi, R. P. (2013): Protein carbamylation: In vivo modification or in vitro artefact?. *Proteomics* **13**(6), 941-944.
- Kressler, D., Hurt, E., Baßler, J. (2010): Driving ribosome assembly. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research* **1803**(6), 673-683.
- Kumar, R., Kumar, A., Subba, P., Gayali, S., Barua, P., Chakraborty, S., Chakraborty, N. (2014): Nuclear phosphoproteome of developing chickpea seedlings (*Cicer arietinum L.*) and protein-kinase interaction network. *Journal Of Proteomics* **105**, 58-73.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langridge, P. (2018): Economic and Academic Importance of Barley. In: *The Barley Genome*. (Stein, N., Muehlbauer, G. J., eds.), Springer, Berlin, Germany, 1-10.
- Laštovičková, M., Bobálová, J. (2012): MS based proteomic approaches for analysis of barley malt. *Journal Of Cereal Science* **56**(3), 519-530.
- Li, G., Nallamilli, B. R. R., Tan, F., Peng, Z. (2008). Removal of high-abundance proteins for nuclear subproteome studies in rice (*Oryza sativa*) endosperm. *Electrophoresis* **29**(3), 604-617.
- Lindley, H. (1956): A New Synthetic Substrate for Trypsin and its Application to the Determination of the Amino-acid Sequence of Proteins. *Nature* **178**(4534), 647-648.
- Macey, M. G. (2007): Principles of flow Cytometry. In: *Flow cytometry: Principles and Applications* (Macey, M. G., ed.), Springer, 1-15.
- Martin, S. A., Rosenthal, R. S., Biemann, K. (1987): Fast atom bombardment mass spectrometry and tandem mass spectrometry of biologically active peptidoglycan monomers from *Neisseria gonorrhoeae*. *The Journal of biological chemistry* **262**(16), 7514-7522.
- Medzihradzsky, K. F. (2005): In-Solution Digestion of Proteins for Mass Spectrometry. In: *Mass Spectrometry: Modified Proteins and Glycoconjugates* (Burlingame, A. L., ed.), Elsevier, 50-65.
- Mitulovic, G., Mechtler, K. (2006): HPLC techniques for proteomics analysis--a short overview of latest developments. *Briefings In Functional Genomics And Proteomics* **5**(4), 249-260.
- Narula, K., Choudhary, P., Ghosh, S., Elagamey, E., Chakraborty, N., Chakraborty, S. (2019): Comparative Nuclear Proteomics Analysis Provides Insight into the Mechanism of Signaling and Immune Response to Blast Disease Caused by *Magnaporthe oryzae* in Rice. *Proteomics* **19**(3).
- Nash, H. M., Lu, R., Lane, W. S., Verdinel, G. L. (1997): The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution. *Chemistry & Biology* **4**(9), 693-702.
- Nielsen, M. L., Vermeulen, M., Bonaldi, T., Cox, J., Moroder, L., Mann, M. (2008): Iodoacetamide-induced artifact mimics ubiquitination in mass spectrometry. *Nature Methods* **5**(6), 459-460.
- Nilan, R. A., Ullrich, S. E. (1993): Barley: taxonomy, origin, distribution, production, genetics, and breeding. In: *Barley: Chemistry and Technology* (MacGregor, A. W., Bhatta, R. S., eds.), American Association of Cereal Chemists, Saint Paul, USA, 1-30.

- Olsen, J. V., Ong, S. E., Mann, M. (2004): Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**(6), 608-614.
- Pandey, A., Choudhary, M. K., Bhushan, D., Chattopadhyay, A., Chakraborty, S., Datta, A., Chakraborty, N. (2006): The Nuclear Proteome of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Reveals Predicted and Unexpected Proteins. *Journal Of Proteome Research* **5**(12), 3301-3311.
- Patterson, S. D., Aebersold, R. (1995): Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis*, **16**(1), 1791-1814.
- Pendle, A. F., Clark, G. P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y. W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A. I., Brown, J. W. S., Shaw, P. J. (2005): Proteomic Analysis of the *Arabidopsis* Nucleolus Suggests Novel Nucleolar Functions. *Molecular Biology Of The Cell* **16**(1), 260-269.
- Perutka, Z., Šufeisl, M., Strnad, M., Šebela, M. (2019): High-proline proteins in experimental hazy white wine produced from partially botrytized grapes. *Biotechnology And Applied Biochemistry* **66**(3), 398-411.
- Petersen, P. B., Munck, L. (1993): Whole-crop utilization of barley, including potential new uses. In: *Barley: Chemistry and Technology* (MacGregor, A. W., Bhatti, R. S., eds.), American Association of Cereal Chemists, Saint Paul, USA, 437-474.
- Petrovská, B., Jeřábková, H., Chamrád, I., Vrána, J., Lenobel, R., Uřinová, J., Šebela, M., Doležel, J. (2014): Proteomic Analysis of Barley Cell Nuclei Purified by Flow Sorting. *Cytogenetic And Genome Research* **143**(1-3), 78-86.
- Petrovská, B., Šebela, M., Doležel, J. (2015): Inside a plant nucleus: discovering the proteins. *Journal Of Experimental Botany* **66**(6), 1627-1640.
- Petrovská, B., Šebela, M., Doležel, J. (2016): Discovering the World of Plant Nuclear Proteins. In *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells* (Rose, R. J., ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, 22-36.
- Planas, A., Kirsch, J. F. (1991): Re-engineering the catalytic lysine of aspartat aminotransferase by chemical elaboration of a genetically introduced cysteine. *Biochemistry* **30**, 8268-8276.
- Protein Cutter: <https://software.cr-hana.upol.cz/proteincutter/index.php> (15.4.2020)
- Qin, J., Fenyö, D., Zhao, Y., Hall, W. W., Chao, D. M., Wilson, C. J., Young, R. A., Chait, B. T. (1997): A Strategy for Rapid, High-Confidence Protein Identification. *Analytical Chemistry* **69**(19), 3995-4001.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C. (2010): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal Of Proteomics* **73**(11), 2064-2077.
- Raftery, M. A., Cole, R. D. (1963): Tryptic cleavage at cysteinyl peptide bonds. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **10**(6), 467-472.
- Raftery, M. A., Cole, R. D. (1966): On the aminoethylation of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 3457-3459.
- Rogers, J. C., Bomgarden, R. D. (2016): Sample Preparation for Mass Spectrometry-Based Proteomics; from Proteomes to Peptides. In: *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*. (Mirzaei, H., Carrasco, M., eds.), Springer, Berlin, Germany, 43-62.
- Řehulková, H., Marchetti-Deschmann, M., Pittenauer, E., Allmaier, G., Řehulka, P. (2009): Improved identification of hordeins by cysteine alkylation with 2-bromoethylamine, SDS-PAGE and subsequent in-gel tryptic digestion. *Journal Of Mass Spectrometry* **44**(11), 1613-1621.
- Seddon, A. M., Curnow, P., Booth, P. J. (2004): Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* **1666**(1-2), 105-117.
- Sechi, S., Chait, B. T. (1998): Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification. *Analytical Chemistry* **70**(24), 5150-5158.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., Mann, M. (2006): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**(6), 2856-2860.
- Schwartz, W. E., Smith, P. K., Royer, G. P. (1980): *N*-(β -iodoethyl)trifluoroacetamide: A new reagent for the aminoethylation of thiol groups in proteins. *Analytical Biochemistry* **106**(1), 43-48.

- Smith, H. B., Hartman, F. C. (1988): Restoration of activity to catalytically deficient mutants of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase by aminoethylation. *Journal of Biological Chemistry* **263**(10), 4921-4925.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**(1), 76-85.
- Soares, R., Pires, E., Almeida, A., Santos, R., Gomes, R., Koči, K., Franco, C., Coelho, A. V. (2012): Tandem Mass Spectrometry of Peptides. In: *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. (Prasain, J., ed.), InTech, 35-56.
- Stølen, O., Andersen, S. (1978): Inheritance of tolerance to low soil pH in barley. *Hereditas* **88**(1), 101-105.
- Subba, P., Kumar, R., Gayali, S., Shekhar, S., Parveen, S., Pandey, A., Datta, A., Chakraborty, S., Chakraborty, N. (2013): Characterisation of the nuclear proteome of a dehydration-sensitive cultivar of chickpea and comparative proteomic analysis with a tolerant cultivar. *Proteomics* **13**(12-13), 1973-1992.
- Sutherland, H. G. E., Mumford, G. K., Newton, K., Ford, L. V., Farrall, R., Delleire, G., Cáceres, J. F., Bickmore, W. A. (2001): Large-scale identification of mammalian proteins localized to nuclear sub-compartments. *Human Molecular Genetics* **10**(18), 1995-2011.
- Tan, F., Li, G., Chitteti, B. R., Peng, Z. (2007): Proteome and phosphoproteome analysis of chromatin associated proteins in rice (*Oryza sativa*). *Proteomics* **7**(24), 4511-4527.
- ten Have, S., Boulon, S., Ahmad, Y., Lamond, A. I. (2011): Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - The user's guide. *Proteomics* **11**(6), 1153-1159.
- ThermoFischer.com: <https://www.thermoFischer.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/sample-preparation-mass-spectrometry.html#protein> (12.2.2020)
- ThermoFischer.com: <https://www.thermoFischer.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-buffer-exchange.html> (10.2.2020)
- Thevis, M., Ogorzalek Loo, R. R., Loo, J. A. (2003): In-Gel Derivatization of Proteins for Cysteine-Specific Cleavages and their Analysis by Mass Spectrometry. *Journal Of Proteome Research* **2**(2), 163-172.
- Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., Jungblut, P. R. (2005): Peptide mass fingerprinting. *Methods* **35**(3), 237-247.
- Tietze, F., Gladner, J. A., Folk, J. E. (1957): Release of C-terminal S-(β -aminoethyl)-cysteine residues by carboxypeptidase-B. *Biochimica et Biophysica Acta* **26**(3), 659.
- Traganos, F. (2009): Flow Cytometry: Principles and Applications. *Cancer Investigation* **2**(2), 149-163.
- Ullrich, S. E. (2011): Significance, Adaptation, Production, and Trade of Barley. In: *Barley: Production, Improvement, and Uses*. (Ullrich, S. E., ed.), Blackwell Publishing Ltd., UK, 3-13.
- UniProtKB: <http://www.uniprot.org> (1.-30.4.2020)
- Veenstra T. D. (2006): Mass spectrometry: The foundation of proteomics. In: *Proteomics for Yates, J. R. (1998): Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. Journal of Mass Spectrometry* **33**(1), 1-19.
- Yates, J. R., Ruse, C. I., Nakorchevsky, A. (2009): Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review Of Biomedical Engineering* **11**(1), 49-79.
- Yeung, Y. G., Nieves, E., Angeletti, R. H., Stanley, E. R. (2008): Removal of detergents from protein digests for mass spectrometry analysis. *Analytical Biochemistry* **382**(2), 135-137.
- Yin, X., Komatsu, S. (2016): Nuclear Proteomics Reveals the Role of Protein Synthesis and Chromatin Structure in Root Tip of Soybean during the Initial Stage of Flooding Stress. *Journal Of Proteome Research* **15**(7), 2283-2298.
- Yin, X., Komatsu, S. (2016): Plant nuclear proteomics for unraveling physiological function. *New Biotechnology* **33**(5), 644-654.
- Zavřelová, M. (2014): Složení zrna ječmene z hlediska potravinářského využití. *Kvasný Průmysl* **60**(5), 127-130.

Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., Yates, J. R. (2013): Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* **113**(4), 2343-2394.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
AK	aminokyselina
APS	peroxodisíran amonný
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
CID	kolizně indukovaná disociace
CMC	kritická micelární koncentrace
CMR	„chemical modification rescue“
DAPI	4',6-diamino-2-fenylindol
DTT	DL-dithiotreitol
ECD	disociace záchytem elektronu
ERLIC	hydrofilní interakční chromatografie s elektrostatickou repulzí
ESI	ionizace elektrosprejem
ETD	disociace přenosem elektronu
FCM	průtoková cytometrie
FSC	přímý rozptyl (z <i>angl.</i> „forward scatter“)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonát
CHCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
ICR	iontová cyklotronová resonance
IT	iontová past
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
MALDI	desorpční ionizace laserem za účasti matrice
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
nanoLC	nanoprůtoková kapalinová chromatografie
NP	jaderné proteiny
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pK_a	disociační konstanta
PMF	metoda peptidového mapování
Q	kvadrupól

RP	reverzní (obrácená) fáze
rpm	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SSC	boční rozptyl (z <i>angl.</i> „side scatter“)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TOF	analyzátor doby letu
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objemový podíl

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1 – Tabulky všech identifikovaných jaderných proteinů ječmene z G1 a G2 fáze buněčného cyklu a proteinů izolovaných z mazového povlaku tvarůžku

Přílohová tabulka I: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
1	A0A287J3E0_HORVV	Histone H4	961.0	16	0	0	jádro
2	F2CXB9_HORVV	Histone H2B	836.2	13	0	0	jádro
3	F2DQB4_HORVV	Histone H2B	811.1	13	0	0	jádro
4	A0A287HAK5_HORVV	Nop domain-containing protein	786.7	15	0	0	jádro
5	A0A287PQV9_HORVV	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	672.7	14	0	0	ribozom
6	F2D884_HORVV	Predicted protein	550.7	11	0	0	cytoplasma
7	A0A287GKL9_HORVV	Uncharacterized protein	520.5	9	0	0	neznámá
8	A0A287SS50_HORVV	Uncharacterized protein	500.9	10	1	0	cytoplasma
9	A0A287WS67_HORVV	Uncharacterized protein	497.7	8	1	0	neznámá
10	A0A287HC21_HORVV	Nop domain-containing protein	491.0	12	1	0	jádro
11	A0A287V6Y4_HORVV	Uncharacterized protein	489.8	11	0	0	jádro
12	A0A287VWP0_HORVV	Histone H2A	428.0	8	0	0	jádro
13	A0A287U6A1_HORVV	Uncharacterized protein	406.5	7	0	0	ribozom
14	F2D483_HORVV	40S ribosomal protein S8	397.1	6	0	0	ribozom
15	A0A287P7S8_HORVV	Histone H2A	367.1	8	0	0	jádro
16	A0A287VVI0_HORVV	Histone domain-containing protein	360.7	8	0	0	jádro
17	A0A287XKD7_HORVV	Histone H2A	354.5	6	0	0	jádro
18	A0A287SQ55_HORVV	Histone H2A	348.9	7	0	0	jádro
19	A0A287RRJ0_HORVV	HATPase_c domain-containing protein	348.3	6	0	0	neznámá
20	A0A287U805_HORVV	Gp_dh_N domain-containing protein	348.1	7	0	0	neznámá
21	A0A287FAD4_HORVV	Uncharacterized protein	334.5	6	0	0	ribozom

Přílohová tabulka I: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
22	F2DIR3_HORVV	40S ribosomal protein S4	322.3	9	0	0	ribozom
23	A0A287EJ86_HORVV	Histone H2A	319.4	6	0	0	jádro
24	A0A287GJ86_HORVV	ATP synthase subunit beta	311.2	7	0	0	neznámá
25	A0A287M5E2_HORVV	Fructose-bisphosphate aldolase	305.1	6	0	0	cytosol
26	F2EAU8_HORVV	Predicted protein	300.6	6	0	0	cytosol
27	A0A287FRQ6_HORVV	Uncharacterized protein	299.8	7	0	0	neznámá
28	A0A287F0S7_HORVV	Uncharacterized protein	293.4	4	0	0	ribozom
29	A0A287V449_HORVV	Uncharacterized protein	290.6	8	0	0	jádro
30	A0A287SHU0_HORVV	Elongation factor 1-alpha	282.3	6	0	0	neznámá
31	M0Y9M2_HORVV	Ribosome biogenesis regulatory protein	274.4	6	0	0	jádro
32	A0A287ENJ8_HORVV	Ribosome biogenesis regulatory protein	273.6	6	0	0	jádro
33	A0A287N4Z0_HORVV	Tubulin alpha chain	270.1	7	0	0	cytoskelet
34	A0A287HHC4_HORVV	PUA domain-containing protein	267.7	6	0	0	jádro
35	A0A287WXF2_HORVV	Ribosomal_S13_N domain-containing protein	266.9	5	0	0	jádro, cytosol
36	A0A287V765_HORVV	Histone H2A	263.9	4	0	0	jádro
37	M0X5Z0_HORVV	Uncharacterized protein	259.7	5	0	0	neznámá
38	A0A287SI15_HORVV	Tubulin beta chain	254.2	5	0	0	cytoskelet
39	A0A287UEY1_HORVV	S-adenosylmethionine synthase	248.0	6	0	0	neznámá
40	M0V292_HORVV	Uncharacterized protein	247.4	5	0	0	cytosol
41	A0A287E4A5_HORVV	DNA helicase	245.6	5	0	0	jádro
42	A0A287MPZ2_HORVV	S10_plectin domain-containing protein	244.3	6	0	0	neznámá
43	F2D355_HORVV	Predicted protein	240.9	6	0	0	cytosol
44	A0A287PJA9_HORVV	Histone H2B	237.6	4	0	0	jádro
45	A0A287SPG0_HORVV	S5 DRBM domain-containing protein	232.5	3	0	0	cytosol
46	A0A287TCL9_HORVV	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	224.0	4	0	0	neznámá
47	A0A287JEY7_HORVV	Adenosylhomocysteinase	223.9	5	0	0	neznámá
48	F2DBD4_HORVV	60S acidic ribosomal protein P0	222.4	5	0	0	cytosol

Přílohová tabulka I: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
49	A0A287FFF9_HORVV	Uncharacterized protein	211.5	5	0	0	cytoskelet
50	A0A287RZ19_HORVV	Uncharacterized protein	209.5	5	0	0	jádro
51	A0A287XUH7_HORVV	Histone H2A	207.4	4	0	0	jádro
52	F2CUI5_HORVV	Predicted protein	206.8	3	0	0	cytosol
53	A0A287E8G3_HORVV	Histone domain-containing protein	203.0	5	0	0	jádro
54	A0A287F9I2_HORVV	Malate dehydrogenase 1	202.2	3	0	0	neznámá
55	A0A287QLW4_HORVV	Ribosomal_L2_C domain-containing protein	200.1	3	0	0	ribozom
56	A0A287UFC5_HORVV	S-adenosylmethionine synthase	200.0	5	0	0	neznámá
57	M0W8A5_HORVV	Uncharacterized protein	198.6	5	0	0	neznámá
58	F2CSC5_HORVV	Ribosomal protein L19	191.2	3	0	0	cytosol
59	A0A287R153_HORVV	Uncharacterized protein	190.4	5	0	0	cytosol
60	F2E598_HORVV	Predicted protein	188.0	4	0	0	ribozom
61	A0A287WL41_HORVV	Uncharacterized protein	186.5	4	1	0	cytosol
62	A0A287R7R8_HORVV	Uncharacterized protein	186.0	3	0	0	ribozom
63	A0A287J8A4_HORVV	Uncharacterized protein	184.3	3	0	0	cytosol
64	A0A287Q8Z2_HORVV	Uncharacterized protein	181.0	4	0	0	neznámá
65	A0A287SMI1_HORVV	H15 domain-containing protein	180.3	4	0	0	jádro
66	A0A287DVL1_HORVV	Uncharacterized protein	177.6	4	0	0	ribozom
67	A0A287SKW7_HORVV	Histone H2A	176.8	4	0	0	jádro
68	A0A287IRS6_HORVV	Uncharacterized protein	173.3	5	0	0	jádro
69	M0WZI8_HORVV	Uncharacterized protein	167.3	3	0	0	mitochondrie
70	A0A287SV42_HORVV	Uncharacterized protein	166.9	3	1	0	neznámá
71	A0A287QR85_HORVV	Histone H2A	165.7	3	0	0	jádro
72	A0A287UM89_HORVV	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein	163.9	2	0	0	neznámá
73	A0A287THA8_HORVV	Uncharacterized protein	162.7	3	0	0	jádro
74	F2CRK3_HORVV	Predicted protein	157.5	4	0	0	cytoskelet

Přílohová tabulka I: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
75	F2DJI3_HORVV	Predicted protein	155.9	2	1	0	jádro
76	A0A287R3H4_HORVV	Ribosome assembly factor mrt4	155.6	4	0	0	jádro
77	A0A287FCA5_HORVV	Ubiquitin-like domain-containing protein	154.2	4	0	0	ribozom
78	A0A287RUX5_HORVV	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	153.9	3	0	0	neznámá
79	A0A287TTU2_HORVV	Phosphoglycerate kinase	153.5	3	0	0	neznámá
80	A0A287WTF4_HORVV	Uncharacterized protein	152.5	4	0	0	cytosol
81	A0A287VV58_HORVV	Ribosomal_S10 domain-containing protein	150.1	2	0	0	cytosol
82	F2D101_HORVV	Ribosomal protein L19	148.8	3	0	0	cytosol
83	A0A287G5M3_HORVV	Uncharacterized protein	143.0	3	0	0	ribozom
84	A0A191TDI3_HORVV	ATP synthase subunit alpha	142.7	4	0	0	mitochondrie
85	M0YH86_HORVV	14_3_3 domain-containing protein	141.1	4	0	0	neznámá
86	A0A287XYX6_HORVV	RRM domain-containing protein	136.1	2	0	0	jádro
87	A0A287NNY4_HORVV	Uncharacterized protein	133.3	2	0	0	neznámá
88	A0A287NXV6_HORVV	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit	132.5	3	0	0	jádro
89	A0A287Q7A3_HORVV	Enolase_C domain-containing protein	130.9	3	0	0	cytosol
90	M0Z1R8_HORVV	Uncharacterized protein	128.3	3	0	0	neznámá
91	A0A287FYT0_HORVV	CSD_1 domain-containing protein	126.3	3	0	0	neznámá
92	M0WIE0_HORVV	Nucleolar GTP-binding protein 1	125.9	3	0	0	jádro
93	A0A287X531_HORVV	GTP-binding nuclear protein	125.3	3	0	0	jádro
94	A0A287KGA7_HORVV	Uncharacterized protein	124.2	4	0	0	neznámá
95	A0A287IFK7_HORVV	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	123.6	2	0	0	ribozom
96	A0A287P868_HORVV	RRM domain-containing protein	122.5	2	0	0	neznámá
97	A0A287EYB0_HORVV	Ribosomal_L16 domain-containing protein	120.8	2	0	0	ribozom
98	A0A287RU74_HORVV	Uncharacterized protein	120.6	2	0	0	ribozom
99	A0A287NGJ6_HORVV	Uncharacterized protein	120.0	3	0	0	ribozom
100	A0A287G428_HORVV	MCM domain-containing protein	119.9	1	2	0	neznámá

Přílohová tabulka I: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
101	A0A287SMB0_HORVV	H15 domain-containing protein	117.2	2	0	0	jádro
102	A0A287PJJ4_HORVV	40S ribosomal protein S3a	116.4	3	0	0	neznámá
103	A0A287JG74_HORVV	Uncharacterized protein	116.0	2	0	0	ribozom
104	A0A287WYG1_HORVV	Uncharacterized protein	115.7	2	0	0	neznámá
105	A0A287TBM6_HORVV	Uncharacterized protein	114.6	2	0	0	neznámá
106	A0A287H6K1_HORVV	CP-type G domain-containing protein	114.2	2	0	0	neznámá
107	A0A287J4N0_HORVV	Ribosomal_S17_N domain-containing protein	113.3	1	0	0	ribozom
108	A0A287Y1E4_HORVV	HMG box domain-containing protein	112.7	2	0	0	jádro
109	F2D4N4_HORVV	Predicted protein	109.4	2	0	0	neznámá
110	A0A287H2A2_HORVV	40S ribosomal protein S6	108.5	2	0	0	ribozom
111	M0XLC4_HORVV	PfkB domain-containing protein	108.2	2	0	0	jádro, cytosol
112	A0A287QUE3_HORVV	KH type-2 domain-containing protein	107.2	2	0	0	ribozom
113	A0A287QL45_HORVV	RRM domain-containing protein	106.5	3	0	0	neznámá
114	F2EDY2_HORVV	Predicted protein	106.0	2	0	0	neznámá
115	A0A287GTZ8_HORVV	Uncharacterized protein	105.2	2	0	0	neznámá
116	A0A287V2I9_HORVV	AAA domain-containing protein	105.1	2	0	0	jádro
117	A0A287P8M4_HORVV	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein	102.9	3	0	0	neznámá
118	A0A287UUH6_HORVV	AAA domain-containing protein	102.4	1	0	0	neznámá
119	A0A287QAW7_HORVV	60S ribosomal protein L36	101.5	3	0	0	ribozom
120	A0A287X7Y0_HORVV	Uncharacterized protein	100.9	2	0	0	cytosol
121	A0A287U0B7_HORVV	KH domain-containing protein	100.2	2	0	0	neznámá
122	A0A287FPI1_HORVV	Uncharacterized protein	99.8	2	1	1	neznámá
123	F2E1A0_HORVV	Ribonucloprotein	99.6	2	0	0	jádro
124	A0A287H949_HORVV	Uncharacterized protein	98.0	3	0	0	neznámá
125	F2CV88_HORVV	40S ribosomal protein S26	97.2	2	0	0	ribozom
126	A0A287K7H1_HORVV	Ribosomal_S7 domain-containing protein	94.5	2	1	0	neznámá

Přílohová tabulka I: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
127	A0A287HXW6_HORVV	Uncharacterized protein	94.2	3	0	0	jádro
128	A0A287VHX9_HORVV	Uncharacterized protein	94.2	1	1	0	neznámá
129	A0A287KYI9_HORVV	DNA helicase	92.9	2	0	0	neznámá
130	F2CZ65_HORVV	Predicted protein	92.6	2	0	0	cytosol
131	A0A287X8K8_HORVV	40S ribosomal protein S24	90.9	1	0	0	ribozom
132	M0WNE6_HORVV	Uncharacterized protein	90.0	3	0	0	neznámá
133	A0A287FYI2_HORVV	DNA helicase	86.5	3	0	0	jádro
134	A0A287X6Y5_HORVV	Uncharacterized protein	84.4	1	0	0	neznámá
135	A0A287EWK4_HORVV	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	82.6	2	0	0	ribozom
136	A0A287UAY9_HORVV	Ribosomal_L14e domain-containing protein	81.8	2	0	0	ribozom
137	A0A287KNU0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	81.1	1	0	0	neznámá
138	A0A287LG02_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	79.1	3	0	0	jádro
139	A0A287SNR6_HORVV	Uncharacterized protein	79.0	2	0	0	neznámá
140	F2DJG1_HORVV	Predicted protein	77.1	2	0	0	neznámá
141	A0A287WPQ1_HORVV	60S ribosomal protein L27	76.8	2	0	0	cytosol
142	A0A287H8R8_HORVV	Uncharacterized protein	76.0	1	0	0	ribozom
143	A0A287GU54_HORVV	C2H2-type domain-containing	75.5	1	0	0	neznámá
144	A0A287UQV6_HORVV	DCD domain-containing protein	75.3	1	0	0	neznámá
145	A0A287FRF1_HORVV	RPOLD domain-containing protein	72.6	2	0	0	neznámá
146	A0A287MAH2_HORVV	Uncharacterized protein	72.2	1	0	0	neznámá
147	A0A287ISF7_HORVV	Uncharacterized protein	72.2	1	0	0	ribozom
148	M0WY98_HORVV	40S ribosomal protein S7	71.7	2	0	0	ribozom
149	A0A287ISF6_HORVV	Uncharacterized protein	71.5	1	0	0	jádro
150	A0A287SXX7_HORVV	Uncharacterized protein	68.1	2	0	0	neznámá
151	A0A287H8V0_HORVV	60S ribosomal protein L18	64.0	2	0	0	cytosol
152	M0XU84_HORVV	UDP-glucose 6-dehydrogenase	63.4	2	0	0	neznámá
153	A0A287ESH4_HORVV	Uncharacterized protein	61.9	2	0	0	neznámá

Přílohová tabulka II: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
1	A0A287PQV9_HORVV	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	250.51	11	0	0	ribozom
2	F2D884_HORVV	Predicted protein	237.05	12	0	0	cytoplazma
3	A0A287HAH9_HORVV	Nop domain-containing protein	226.1	7	0	0	neznámá
4	A0A287SS50_HORVV	Uncharacterized protein	218.59	10	0	0	cytoplazma
5	A0A287GKL9_HORVV	Uncharacterized protein	210.02	12	0	0	neznámá
6	A0A287S4U2_HORVV	Histone H4	204.65	12	0	0	jádro
7	A0A287HC63_HORVV	Nop domain-containing protein	199.65	11	1	0	neznámá
8	F2D483_HORVV	40S ribosomal protein S8	191.99	6	0	0	ribozom
9	A0A287NVX2_HORVV	Nop domain-containing protein	187.19	4	0	0	neznámá
10	A0A287V6Y4_HORVV	Uncharacterized protein	185.03	8	0	0	jádro
11	A0A287U6A1_HORVV	Uncharacterized protein	184.23	7	0	0	ribozom
12	A0A287K7W3_HORVV	Histone H2B	181.66	7	0	0	jádro
13	A0A287WS02_HORVV	Uncharacterized protein	169.59	6	0	0	neznámá
14	A0A287FRQ6_HORVV	Uncharacterized protein	167.9	6	0	0	neznámá
15	F2D189_HORVV	Predicted protein	167.9	6	0	0	neznámá
16	A0A287U800_HORVV	Gp_dh_N domain-containing protein	165.14	5	0	0	cytosol
17	M0YRV8_HORVV	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	165.14	5	0	0	neznámá
18	F2EAU8_HORVV	Predicted protein	163.78	8	0	0	cytosol
19	A0A287SQ55_HORVV	Histone H2A	158.65	7	0	0	jádro
20	A0A287F0S7_HORVV	Uncharacterized protein	157.93	5	0	0	ribozom
21	A0A287F0P6_HORVV	Ribosomal_L5 domain-containing protein	157.93	5	0	0	ribozom
22	A0A287V4M4_HORVV	Uncharacterized protein	157.82	8	0	0	jádro
23	A0A287P917_HORVV	Histone H2A	154.99	8	0	0	jádro
24	A0A287M5E2_HORVV	Fructose-bisphosphate aldolase	152.55	5	0	0	cytosol
25	A0A287SPG0_HORVV	S5 DRBM domain-containing protein	152.34	5	0	0	cytosol
26	M0X5Z1_HORVV	Uncharacterized protein	150.2	4	0	0	neznámá

Přílohová tabulka II: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
27	A0A287JEY7_HORVV	Adenosylhomocysteinase	146.87	5	0	0	neznámá
28	A0A287U1D3_HORVV	Uncharacterized protein	146.78	5	0	0	ribozom
29	A0A287R7R1_HORVV	Uncharacterized protein	143.84	7	0	0	ribozom
30	M0V292_HORVV	Uncharacterized protein	143.69	4	0	0	cytosol
31	A0A287M2L0_HORVV	S5 DRBM domain-containing protein	143.51	5	0	0	cytosol
32	A0A287WXE1_HORVV	Ribosomal_S13_N domain-containing protein	141.1	5	0	0	ribozom
33	A0A287MQ02_HORVV	S10_pectin domain-containing protein	140.57	5	0	0	neznámá
34	A0A287EVH7_HORVV	40S ribosomal protein S4	140.15	6	0	0	ribozom
35	A0A287RRB7_HORVV	HATPase_c domain-containing protein	137.57	6	0	0	cytosol
36	F2DBD4_HORVV	60S acidic ribosomal protein P0	137.53	4	0	0	cytosol
37	M0WZI8_HORVV	Uncharacterized protein	135.93	4	0	0	mitochondrie
38	A0A287HH01_HORVV	PUA domain-containing protein	135.55	4	0	0	neznámá
39	A0A287F9I2_HORVV	Malate dehydrogenase	134.79	3	0	0	neznámá
40	A0A287IKX4_HORVV	Histone H3	133.89	8	0	0	jádro
41	A0A287VJ97_HORVV	Histone domain-containing protein	133.89	8	0	0	jádro
42	A0A287THA8_HORVV	Uncharacterized protein	131.06	5	0	0	jádro
43	A0A287SHU0_HORVV	Elongation factor 1-alpha	130.55	6	0	0	neznámá
44	A0A287WL41_HORVV	Uncharacterized protein	129.1	4	0	0	cytosol
45	F2D355_HORVV	Predicted protein	127.51	6	0	0	cytosol
46	F2DJJ2_HORVV	ATP synthase subunit beta	127.09	5	0	0	mitochondrie
47	A0A287N4Z0_HORVV	Tubulin alpha chain	126.96	4	0	0	cytoskelet
48	A0A287UIJ6_HORVV	Uncharacterized protein	125.93	3	0	0	cytosol
49	A5CFY5_HORVV	Tubulin beta chain	123.96	4	0	0	cytoskelet
50	A0A287RUX0_HORVV	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	123.61	4	0	0	cytosol
51	A0A287TCL9_HORVV	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	122.19	2	0	0	neznámá
52	A0A287XZ38_HORVV	RRM domain-containing protein	120.93	2	0	0	neznámá

Přílohavá tabulka II: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
53	A0A287E4A5_HORVV	DNA helicase	120.84	6	0	0	jádro
54	A0A287TTB0_HORVV	Phosphoglycerate kinase	120.45	3	0	0	cytosol
55	F2CUI5_HORVV	Predicted protein	120.08	3	0	0	cytosol
56	A0A287E8E4_HORVV	Histone domain-containing protein	119.87	4	0	0	jádro
57	A0A287QR85_HORVV	Histone H2A	119.56	3	0	0	jádro
58	A0A287H6S9_HORVV	CP-type G domain-containing protein	117.42	4	0	0	jádro
59	A0A287E965_HORVV	Tubulin beta chain	117.12	4	0	0	cytoskelet
60	A0A287FAD4_HORVV	Uncharacterized protein	117.03	4	0	0	ribozom
61	A0A287IFH6_HORVV	Uncharacterized protein	116.6	2	0	0	ribozom
62	A0A287QWS6_HORVV	Uncharacterized protein	115.78	4	0	0	cytoskelet
63	F2DE91_HORVV	Predicted protein	115.78	4	0	0	cytoskelet
64	A0A287UEY1_HORVV	S-adenosylmethionine synthase	113.81	5	0	0	neznámá
65	A0A287EYB0_HORVV	Ribosomal_L16 domain-containing protein	113.37	3	0	0	ribozom
66	A0A287VV58_HORVV	Ribosomal_S10 domain-containing protein	112.28	3	0	0	cytosol
67	A0A287SKW7_HORVV	Histone H2A	111.93	6	0	0	jádro
68	A0A287IRQ2_HORVV	Uncharacterized protein	111.72	3	0	0	jádro
69	A0A287UFC5_HORVV	S-adenosylmethionine synthase	111.57	4	0	0	neznámá
70	F2E1A0_HORVV	Ribonucloprotein	109.7	2	0	0	jádro
71	A0A287RZ11_HORVV	Uncharacterized protein	109.67	5	0	0	jádro
72	M0VK52_HORVV	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	109.48	4	0	0	neznámá
73	A0A287E5S2_HORVV	ATP synthase subunit alpha	108.92	3	0	0	plasm. membrána
74	A0A287WY69_HORVV	Uncharacterized protein	106	3	0	0	neznámá
75	F2DIA6_HORVV	Predicted protein	106	3	0	0	neznámá
76	A0A287SP05_HORVV	Histone H2A	105.44	7	0	0	jádro
77	F2EJZ0_HORVV	Predicted protein	105.08	2	0	0	ribozom
78	A0A287RUE0_HORVV	Uncharacterized protein	105.08	2	0	0	cytosol

Přílohová tabulka II: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
79	A0A287Q7A3_HORVV	Enolase_C domain-containing protein	104.18	3	0	0	cytosol
80	A0A287Y1E4_HORVV	HMG box domain-containing protein	104.08	2	0	0	jádro
81	A0A287K7H1_HORVV	Ribosomal_S7 domain-containing protein	102.77	2	1	0	neznámá
82	A0A287XUH7_HORVV	Histone H2A	102.57	3	0	0	jádro
83	A0A287U0B7_HORVV	KH domain-containing protein	102.34	2	0	0	neznámá
84	A0A287U0C3_HORVV	Uncharacterized protein	102.34	2	0	0	neznámá
85	A0A287QUI2_HORVV	KH type-2 domain-containing protein	101.13	2	0	0	jádro, cytosol
86	A0A287SMD0_HORVV	H15 domain-containing protein	100.47	4	0	0	jádro
87	A0A287Q7S2_HORVV	Enolase_C domain-containing protein	99.95	3	0	0	cytosol
88	A0A287Q706_HORVV	Uncharacterized protein	99.95	3	0	0	cytosol
89	F2CRK3_HORVV	Predicted protein	99.39	4	0	0	cytoskelet
90	A0A287N407_HORVV	Uncharacterized protein	99.39	4	0	0	cytoskelet
91	A0A287X534_HORVV	GTP-binding nuclear protein	99.19	3	0	0	jádro
92	A0A287U0I6_HORVV	Uncharacterized protein	98.99	2	0	0	jádro
93	A0A287R153_HORVV	Uncharacterized protein	98.52	3	0	0	cytosol
94	M0WIE0_HORVV	Nucleolar GTP-binding protein 1	96.48	3	0	0	jádro
95	A0A287JGV2_HORVV	Uncharacterized protein	96.03	2	0	0	neznámá
96	F2DJI3_HORVV	Predicted protein	96	3	0	0	jádro
97	A0A287V9J1_HORVV	Uncharacterized protein	96	3	0	0	neznámá
98	A0A287DVR8_HORVV	S10_plectin domain-containing protein	95.99	2	0	0	neznámá
99	A0A287WJG0_HORVV	Uncharacterized protein	95.59	3	0	0	ribozom
100	F2DIT7_HORVV	Predicted protein	95.59	3	0	0	ribozom
101	A0A287PDY0_HORVV	Ubiquitin-like domain-containing protein	95.3	3	0	0	ribozom
102	M0Y9M2_HORVV	Ribosome biogenesis regulatory protein	94.93	3	0	0	jádro
103	A0A287SV58_HORVV	Tr-type G domain-containing protein	94.69	2	0	0	neznámá
104	A0A287SV25_HORVV	Uncharacterized protein	94.69	2	0	0	neznámá

Přílohová tabulka II: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
105	A0A287ENJ5_HORVV	Ribosome biogenesis regulatory protein	94.21	3	0	0	jádro
106	A0A287PJJ4_HORVV	40S ribosomal protein S3a	92.49	2	0	0	neznámá
107	A0A287G5M3_HORVV	Uncharacterized protein	90.15	3	0	0	ribozom
108	F2D861_HORVV	Predicted protein	90.15	3	0	0	ribozom
109	M0Z1R8_HORVV	Uncharacterized protein	88.31	2	0	0	neznámá
110	M0YH86_HORVV	14_3_3 domain-containing protein	88.01	3	0	0	neznámá
111	F2CRF1_HORVV	Predicted protein	88.01	3	0	0	neznámá
112	A0A287R7R8_HORVV	Uncharacterized protein	87.22	3	0	0	ribozom
113	A0A287X8K8_HORVV	40S ribosomal protein S24	86.92	1	0	0	ribozom
114	F2D3Q4_HORVV	Predicted protein	85.23	2	0	0	ribozom
115	A0A287UAY9_HORVV	Ribosomal_L14e domain-containing protein	85.23	2	0	0	ribozom
116	A0A287KNW4_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	85.15	2	0	0	neznámá
117	M0WTL8_HORVV	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein	85.07	3	0	0	jádro
118	A0A287EWK4_HORVV	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	84.7	2	0	0	ribozom
119	F2CSC5_HORVV	Ribosomal protein L19	83.39	3	0	0	cytosol
120	A0A287GU54_HORVV	C2H2-type domain-containing protein	81.96	1	0	0	neznámá
121	A0A287X1N7_HORVV	Uncharacterized protein	81.56	1	0	0	neznámá
122	A0A287WTF4_HORVV	Uncharacterized protein	81.48	3	0	0	cytosol
123	A0A287FRE4_HORVV	RPOLD domain-containing protein	80.73	2	0	0	neznámá
124	A0A287NXV6_HORVV	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit	80.6	1	0	0	jádro
125	A0A287L9R7_HORVV	Uncharacterized protein	80.16	1	0	0	jádro
126	F2E4X1_HORVV	Predicted protein	80.16	1	0	0	jádro
127	A0A287UUH6_HORVV	AAA domain-containing protein	79.85	2	0	0	neznámá
128	F2DRS5_HORVV	Predicted protein	79.85	2	0	0	neznámá
129	M0WNE6_HORVV	Uncharacterized protein	79.16	2	0	0	neznámá
130	M0W8A5_HORVV	Uncharacterized protein	79.1	3	0	0	neznámá

Přílohová tabulka II: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
131	A0A287R3H4_HORVV	Ribosome assembly factor mrt4	78.04	3	0	0	jádro
132	A0A287TJF3_HORVV	Histone H2A	77.37	4	0	0	jádro
133	F2CV88_HORVV	40S ribosomal protein S26	77.21	2	0	0	ribozom
134	A0A287SA03_HORVV	Uncharacterized protein	77.2	2	0	0	jádro
135	A0A287WYW8_HORVV	KH domain-containing protein	77.18	2	0	0	neznámá
136	A0A287WYS5_HORVV	Uncharacterized protein	77.18	2	0	0	neznámá
137	F2D4N4_HORVV	Predicted protein	77.05	1	0	0	neznámá
138	A0A287PS51_HORVV	Uncharacterized protein	77.05	1	0	0	jádro
139	A0A287H8R8_HORVV	Uncharacterized protein	76.04	2	0	0	ribozom
140	A0A287QLW4_HORVV	Ribosomal_L2_C domain-containing protein	75.49	3	0	0	ribozom
141	A0A287XRE2_HORVV	Phosphoglycerate kinase	75.15	2	0	0	neznámá
142	A0A287U2E9_HORVV	40S ribosomal protein S24	74.5	1	0	0	ribozom
143	A0A287IAX1_HORVV	Uncharacterized protein	73.89	3	0	0	ribozom
144	F2E6K2_HORVV	Predicted protein	73.89	3	0	0	ribozom
145	A0A287PWQ3_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	73.29	2	0	0	neznámá
146	A0A287F820_HORVV	Uncharacterized protein	73.16	1	0	0	neznámá
147	M0UFA2_HORVV	60S ribosomal protein L18	71.13	2	0	0	ribozom
148	A0A287SML4_HORVV	H15 domain-containing protein	70.1	2	0	0	jádro
149	A0A287QL44_HORVV	RRM domain-containing protein	69.54	2	0	0	neznámá
150	A0A287SNR6_HORVV	Uncharacterized protein	69.42	2	0	0	neznámá
151	F2CQF3_HORVV	Predicted protein	67.92	2	0	0	neznámá
152	A0A287MAH5_HORVV	Uncharacterized protein	67.92	2	0	0	neznámá
153	A0A287JG74_HORVV	Uncharacterized protein	66.02	2	0	0	ribozom
154	A0A287SME3_HORVV	H15 domain-containing protein	66.02	2	0	0	jádro
155	A0A287GM94_HORVV	60S ribosomal protein L18a	64.2	2	0	0	ribozom
156	A0A287KGB8_HORVV	Uncharacterized protein	61.97	3	0	0	neznámá

Přílohová tabulka II: Všechny identifikované proteiny z G1 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. *(pokračování)*

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
157	F2DYS1_HORVV	Predicted protein	61.97	3	0	0	neznámá
158	A0A287K4S5_HORVV	Uncharacterized protein	60.84	2	0	0	jádro
159	A0A287EV36_HORVV	Chromatin-remodeling complex ATPase	60.84	2	0	0	jádro
160	A0A287S983_HORVV	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	60.37	2	0	0	ribozom

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
1	A0A287HAK5_HORVV	Nop domain-containing protein	1680.6	24	2	0	jádro
2	A0A287J3C4_HORVV	Histone H4	1631.3	20	0	0	jádro
3	A0A287HC63_HORVV	Nop domain-containing protein	1190.2	23	2	1	neznámá
4	A0A287ECT8_HORVV	Cytosine-specific methyltransferase	1144.8	25	0	0	jádro
5	A0A287V6Y4_HORVV	Uncharacterized protein	1121.1	18	1	0	jádro
6	A0A287HHC4_HORVV	PUA domain-containing protein	976.9	20	2	0	jádro
7	A0A287PQV9_HORVV	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	933.7	17	1	0	ribozom
8	A0A287G0H6_HORVV	Histone H2B	917.3	14	0	0	jádro
9	A0A287SS50_HORVV	Uncharacterized protein	917.1	17	0	0	cytoplasma
10	A0A287FSN6_HORVV	Histone H2B	911.8	14	0	0	jádro
11	A0A287GQ60_HORVV	Histone H2B	904.7	14	0	0	jádro
12	F2D884_HORVV	Predicted protein	892.0	15	0	0	cytoplasma
13	A0A287WS67_HORVV	Uncharacterized protein	885.8	15	1	0	neznámá
14	A0A287GKJ5_HORVV	Uncharacterized protein	873.8	12	0	0	ribozom
15	A0A287V4M4_HORVV	Uncharacterized protein	792.6	17	1	1	jádro
16	A0A287V449_HORVV	Uncharacterized protein	781.7	16	1	1	jádro
17	A0A287RR43_HORVV	HATPase_c domain-containing protein	726.8	15	0	0	neznámá
18	A0A287G8Q8_HORVV	Histone domain-containing protein	721.9	15	0	0	jádro
19	A0A287SMD0_HORVV	H15 domain-containing protein	657.2	11	0	0	jádro
20	A0A287K4P7_HORVV	Uncharacterized protein	647.9	13	0	0	jádro
21	A0A287SMJ2_HORVV	H15 domain-containing protein	646.4	14	0	0	jádro
22	A0A287E4A5_HORVV	DNA helicase	642.0	11	0	0	jádro
23	A0A287EV33_HORVV	Chromatin-remodeling complex ATPase	629.2	15	1	0	jádro
24	A0A287SMB0_HORVV	H15 domain-containing protein	627.3	14	0	0	jádro
25	A0A287WXF2_HORVV	Ribosomal_S13_N domain-containing protein	623.9	13	0	0	jádro, cytosol

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
26	A0A287JEF8_HORVV	Adenosylhomocysteinase	622.3	12	0	0	cytosol
27	F2D483_HORVV	40S ribosomal protein S8	618.1	9	0	0	ribozom
28	A0A287TJ51_HORVV	Uncharacterized protein	596.4	9	0	0	jádro
29	M0YRV8_HORVV	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	591.7	10	0	0	neznámá
30	A0A287JES9_HORVV	Adenosylhomocysteinase	587.9	12	0	0	cytosol
31	A0A287XRN2_HORVV	Uncharacterized protein	585.0	9	0	0	neznámá
32	A0A287SMK1_HORVV	H15 domain-containing protein	580.8	11	0	0	jádro
33	A0A287UEY1_HORVV	S-adenosylmethionine synthase	570.3	10	0	0	neznámá
34	F2CRH2_HORVV	Elongation factor 1-alpha	525.1	9	0	0	neznámá
35	M0WNE6_HORVV	Uncharacterized protein	519.8	6	0	0	neznámá
36	A0A287FAD4_HORVV	Uncharacterized protein	506.8	11	0	0	ribozom
37	A0A287L367_HORVV	Uncharacterized protein	495.6	8	1	1	neznámá
38	M0Z794_HORVV	CPSF_A domain-containing protein	480.9	10	0	0	jádro
39	A0A287U0I6_HORVV	Uncharacterized protein	475.5	8	0	0	jádro
40	F2EAU8_HORVV	Predicted protein	474.4	8	0	0	cytosol
41	A0A287NGJ6_HORVV	Uncharacterized protein	472.7	9	0	0	ribozom
42	A0A287P917_HORVV	Histone H2A	470.8	8	0	0	jádro
43	A0A287U6A1_HORVV	Uncharacterized protein	466.3	8	0	0	ribozom
44	A0A287XA30_HORVV	EFG_IV domain-containing protein	457.1	7	0	0	neznámá
45	A0A287VWP0_HORVV	Histone H2A	455.9	7	0	0	jádro
46	A0A287FYI2_HORVV	DNA helicase	455.7	11	0	0	jádro
47	A0A287UEZ6_HORVV	S-adenosylmethionine synthase	445.3	9	0	0	jádro
48	A0A287IKS6_HORVV	Histone H3	439.4	9	0	0	jádro
49	A0A287UY47_HORVV	Uncharacterized protein	436.4	9	0	0	ribozom
50	A0A287RZ19_HORVV	Uncharacterized protein	434.9	12	0	0	jádro

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
51	A0A287GM61_HORVV	Ubiquitin-like domain-containing protein	432.1	9	2	1	ribozom
52	A0A287G403_HORVV	DNA helicase	417.3	7	0	0	jádro
53	A0A287XN12_HORVV	Uncharacterized protein	397.6	7	0	0	ribozom
54	A0A287JG74_HORVV	Uncharacterized protein	379.6	9	0	0	ribozom
55	A0A287KHE9_HORVV	Uncharacterized protein	375.5	5	0	0	cytosol
56	A0A287DVL1_HORVV	Uncharacterized protein	373.0	7	0	0	ribozom
57	M0VD47_HORVV	Uncharacterized protein	372.5	9	0	0	ribozom
58	A0A287H6K1_HORVV	CP-type G domain-containing protein	372.2	7	0	0	neznámá
59	M0WIE0_HORVV	Nucleolar GTP-binding protein 1	370.6	8	0	0	jádro
60	A0A287MTW9_HORVV	Histone H2A	369.6	6	0	0	jádro
61	A0A287FFF9_HORVV	Uncharacterized protein	364.4	8	0	0	cytoskelet
62	A0A287TCL5_HORVV	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	363.9	6	0	0	neznámá
63	A0A287QAX4_HORVV	60S ribosomal protein L36	362.6	8	0	0	ribozom
64	A0A287SHT8_HORVV	Tubulin beta chain	361.7	9	0	0	cytoskelet
65	A0A287EPE2_HORVV	Uncharacterized protein	359.4	8	0	0	neznámá
66	F2CSX2_HORVV	60S ribosomal protein L18a	356.8	7	0	0	ribozom
67	A0A287QLW4_HORVV	Ribosomal_L2_C domain-containing protein	356.5	8	0	0	ribozom
68	A0A287QS34_HORVV	DNA replication licensing factor MCM7	354.2	7	0	0	jádro
69	A0A287V9J1_HORVV	Uncharacterized protein	349.4	7	0	0	neznámá
70	F2EFR1_HORVV	40S ribosomal protein S6	348.3	7	1	1	ribozom
71	A0A287P3Y0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	347.3	9	0	0	neznámá
72	A0A287LTT9_HORVV	Tubulin beta chain	346.9	8	0	0	cytoskelet
73	A0A287S913_HORVV	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	342.0	8	1	1	ribozom
74	A0A287Q9M9_HORVV	Meth_synt_2 domain-containing protein	341.9	7	0	0	neznámá
75	A0A287URE6_HORVV	TPR_MLP1_2 domain-containing protein	339.5	5	1	1	jádro
76	A0A287X798_HORVV	Uncharacterized protein	337.7	7	0	0	neznámá

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
77	A0A287IJR3_HORVV	Peptidylprolyl isomerase	335.6	7	0	0	neznámá
78	A0A287EVG4_HORVV	40S ribosomal protein S4	335.3	7	0	0	ribozom
79	A0A287Q5M5_HORVV	Uncharacterized protein	332.6	8	0	0	cytoskelet
80	A0A287GJ63_HORVV	ATP synthase subunit beta	327.2	7	0	0	neznámá
81	A0A287J4J0_HORVV	Ribosomal_S17_N domain-containing protein	323.4	6	3	2	ribozom
82	F2CRK3_HORVV	Predicted protein	321.4	8	0	0	cytoskelet
83	A0A287MDR1_HORVV	DEK_C domain-containing protein	315.0	6	3	0	jádro
84	A0A287F174_HORVV	DNA helicase	314.6	5	0	0	jádro
85	A0A287UM83_HORVV	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein	313.4	7	1	1	neznámá
86	A0A287T7U3_HORVV	Histone H2A	311.4	5	0	0	jádro
87	A0A287PWT2_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	308.7	6	0	0	neznámá
88	A0A287GTZ8_HORVV	Uncharacterized protein	308.0	8	0	0	neznámá
89	A0A287EJ86_HORVV	Histone H2A	307.1	5	0	0	jádro
90	A0A287N719_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	304.4	5	2	2	neznámá
91	A0A287E0V2_HORVV	Histone H2A	303.7	5	0	0	jádro
92	A0A287RUX0_HORVV	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	300.5	4	0	0	cytosol
93	A0A287XUH7_HORVV	Histone H2A	296.4	4	0	0	jádro
94	A0A287GGY5_HORVV	Tubulin alpha chain	290.1	6	0	0	cytoskelet
95	M0YT85_HORVV	Uncharacterized protein	289.8	4	1	0	neznámá
96	A0A287WPQ1_HORVV	60S ribosomal protein L27	288.8	6	0	0	cytosol
97	A0A287M2L0_HORVV	S5 DRBM domain-containing protein	285.9	6	1	0	cytosol
98	A0A287U9N2_HORVV	Uncharacterized protein	285.5	7	0	0	neznámá
99	A0A287UAY9_HORVV	Ribosomal_L14e domain-containing protein	284.7	7	0	0	ribozom
100	A0A287SKW7_HORVV	Histone H2A	283.1	4	0	0	jádro
101	A0A287HI99_HORVV	S4 RNA-binding domain-containing protein	282.0	5	0	0	ribozom
102	A0A287IAX1_HORVV	Uncharacterized protein	280.4	6	0	0	ribozom

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
103	A0A287GU54_HORVV	C2H2-type domain-containing protein	279.0	4	0	0	neznámá
104	A0A287SPG0_HORVV	S5 DRBM domain-containing protein	278.6	6	0	0	cytosol
105	F2CSC5_HORVV	Ribosomal protein L19	274.1	8	0	0	cytosol
106	M0VTB0_HORVV	RNA cytidine acetyltransferase	274.1	7	1	1	jádro
107	F2CUI5_HORVV	Predicted protein	272.3	4	0	0	cytosol
108	A0A287UR54_HORVV	Uncharacterized protein	268.9	5	0	0	neznámá
109	M0YH86_HORVV	14_3_3 domain-containing protein	266.6	4	0	0	neznámá
110	M0XEX8_HORVV	Uncharacterized protein	265.5	6	1	1	jádro, cytosol
111	M0Z1R8_HORVV	Uncharacterized protein	264.9	6	0	0	neznámá
112	A0A287J817_HORVV	Uncharacterized protein	263.6	2	1	0	jádro
113	A0A287J037_HORVV	H15 domain-containing protein	261.6	2	0	0	jádro
114	A0A287H2A2_HORVV	40S ribosomal protein S6	261.1	6	0	0	cytosol
115	A0A287M5E0_HORVV	Fructose-bisphosphate aldolase	258.0	5	0	0	ribozom
116	M0Y9M2_HORVV	Ribosome biogenesis regulatory protein	255.2	7	0	0	jádro
117	A0A287FRQ6_HORVV	Uncharacterized protein	253.0	7	0	0	neznámá
118	A0A287TGY2_HORVV	Uncharacterized protein	251.6	5	1	0	jádro, cytosol
119	A0A287LUR3_HORVV	Uncharacterized protein	251.5	4	1	1	neznámá
120	A0A287JEP8_HORVV	Uncharacterized protein	250.3	6	3	3	neznámá
121	F2DVU2_HORVV	60S ribosomal protein L13	250.0	5	0	0	cytosol
122	F2D510_HORVV	40S ribosomal protein S24	248.7	5	1	0	ribozom
123	F2E1Y8_HORVV	Predicted protein	246.4	4	0	0	ribozom
124	A0A287W5H4_HORVV	Uncharacterized protein	245.3	5	0	0	neznámá
125	A0A287H8R8_HORVV	Uncharacterized protein	242.1	4	0	0	ribozom
126	A0A287MAI2_HORVV	Uncharacterized protein	240.5	5	0	0	neznámá
127	F2DJG1_HORVV	Predicted protein	233.8	5	0	0	neznámá
128	A0A287KGA7_HORVV	Uncharacterized protein	232.9	5	0	0	neznámá

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
129	A0A287L0L6_HORVV	HTH arsR-type domain-containing protein	232.8	1	1	1	jádro
130	M0WA37_HORVV	Uncharacterized protein	231.9	3	0	0	neznámá
131	A0A287SUY6_HORVV	PUM-HD domain-containing protein	228.5	3	0	0	neznámá
132	A0A287P2B4_HORVV	Uncharacterized protein	226.2	5	0	0	neznámá
133	A0A287PJA9_HORVV	Histone H2B	223.5	4	0	0	jádro
134	A0A287JBT0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	222.1	4	2	0	jádro
135	M0YT09_HORVV	Uncharacterized protein	222.0	6	0	0	jádro
136	A0A287E8G3_HORVV	Histone domain-containing protein	218.7	4	0	0	jádro
137	M0VYX8_HORVV	Uncharacterized protein	217.5	5	0	0	cytosol
138	A0A287GX22_HORVV	Uncharacterized protein	217.4	3	0	0	neznámá
139	A0A287SM27_HORVV	Uncharacterized protein	217.0	4	0	0	neznámá
140	A0A287MP12_HORVV	RRM domain-containing protein	216.7	4	0	0	neznámá
141	A0A287FYT9_HORVV	CSD_1 domain-containing protein	216.4	3	0	0	neznámá
142	F2D355_HORVV	Predicted protein	215.9	4	0	0	cytosol
143	A0A287X8K8_HORVV	40S ribosomal protein S24	214.4	4	0	0	ribozom
144	A0A287GN28_HORVV	Putative rRNA methyltransferase	214.0	3	0	0	jádro
145	A0A287QR85_HORVV	Histone H2A	213.8	3	0	0	jádro
146	A0A287IRS6_HORVV	Uncharacterized protein	212.7	4	0	0	jádro
147	M0XCF8_HORVV	Uncharacterized protein	211.7	6	0	0	cytosol
148	A0A191TDI3_HORVV	ATP synthase subunit alpha	211.4	5	0	0	mitochondrie
149	A0A287FBY7_HORVV	Uncharacterized protein	210.9	3	0	0	neznámá
150	A0A287RZ08_HORVV	Uncharacterized protein	210.1	3	0	0	neznámá
151	A0A287GKD2_HORVV	Uncharacterized protein	209.6	2	0	0	ribozom
152	F2EL23_HORVV	Predicted protein	208.8	5	0	0	neznámá
153	A0A287F7E0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	208.4	5	0	0	neznámá
154	F2CR48_HORVV	Predicted protein	208.0	6	0	0	jádro

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
155	A0A287NYC5_HORVV	Brix domain-containing protein	207.8	4	0	0	ribozom
156	A0A287QAB7_HORVV	TRASH domain-containing protein	206.6	6	0	0	cytosol
157	A0A287W4P4_HORVV	Uncharacterized protein	204.9	4	0	0	neznámá
158	M0YAU1_HORVV	Brix domain-containing protein	204.6	5	1	0	jádro
159	A0A287NZC1_HORVV	Uncharacterized protein	199.9	5	0	0	neznámá
160	A0A287KQS9_HORVV	Importin subunit alpha	198.8	4	0	0	neznámá
161	A0A287QCP7_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	197.4	5	1	1	neznámá
162	A0A287EAB0_HORVV	Ribosome biogenesis protein BOP1 homolog	196.7	4	0	0	jádro
163	A0A287J8A4_HORVV	Uncharacterized protein	195.4	3	0	0	cytosol
164	A0A287QL44_HORVV	RRM domain-containing protein	195.2	5	0	0	neznámá
165	A0A287KYG9_HORVV	DNA helicase	195.2	3	0	0	jádro
166	A0A287QBM3_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	192.2	4	0	0	neznámá
167	A0A287N1N8_HORVV	Pescadillo homolog	191.6	3	0	0	jádro
168	A0A287I0F3_HORVV	Ribosomal protein L15	191.2	4	0	0	ribozom
169	A0A287T864_HORVV	Uncharacterized protein	190.9	4	0	0	neznámá
170	A0A287T138_HORVV	Uncharacterized protein	189.3	5	0	0	neznámá
171	A0A287SA03_HORVV	Uncharacterized protein	188.7	5	0	0	jádro
172	F2E2F1_HORVV	Predicted protein	187.6	6	0	0	cytosol
173	A0A287WYD8_HORVV	Uncharacterized protein	187.6	4	0	0	neznámá
174	A0A287QUE3_HORVV	KH type-2 domain-containing protein	185.0	4	0	0	ribozom
175	A0A287SMY0_HORVV	Uncharacterized protein	183.9	2	0	0	neznámá
176	F2DJT7_HORVV	Predicted protein	183.7	3	0	0	jádro
177	M0XU84_HORVV	UDP-glucose 6-dehydrogenase	178.9	2	1	0	neznámá
178	A0A287RU74_HORVV	Uncharacterized protein	178.3	2	0	0	ribozom
179	M0WF37_HORVV	Uncharacterized protein	177.9	4	0	0	neznámá
180	A0A287EWL1_HORVV	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	177.7	3	0	0	cytosol

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
181	A0A287EWS1_HORVV	Importin subunit alpha	177.0	3	0	0	jádro
182	A0A287QB82_HORVV	LisH domain-containing protein	175.8	4	1	0	jádro
183	A0A287H340_HORVV	RRM domain-containing protein	175.8	2	0	0	neznámá
184	A0A287LUC7_HORVV	U3 small nucleolar RNA-associated protein 11	175.8	4	0	0	jádro
185	M0WY98_HORVV	40S ribosomal protein S7	173.2	5	0	0	ribozom
186	F2DBD4_HORVV	60S acidic ribosomal protein P0	173.1	4	0	0	cytosol
187	M0UFA2_HORVV	60S ribosomal protein L18	171.4	3	0	0	ribozom
189	A0A287N2P9_HORVV	Uncharacterized protein	170.5	3	0	0	neznámá
190	A0A287EYB0_HORVV	Ribosomal_L16 domain-containing protein	169.7	3	0	0	ribozom
191	A0A287IYX5_HORVV	Uncharacterized protein	169.4	4	0	0	neznámá
192	A0A287NUP5_HORVV	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	167.3	3	0	0	jádro
193	A0A287EA34_HORVV	GTP-binding nuclear protein	166.5	4	0	0	jádro
194	A0A287QAA5_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	165.2	3	0	0	neznámá
195	A0A287NZ18_HORVV	MIF4G domain-containing protein	164.7	4	2	0	neznámá
196	A0A287U157_HORVV	Uncharacterized protein	164.4	3	0	0	neznámá
197	A0A287H1F4_HORVV	Uncharacterized protein	164.1	4	0	0	jádro
198	A0A287K7G2_HORVV	Ribosomal_S7 domain-containing protein	163.8	3	0	0	ribozom
199	A0A287GL78_HORVV	Uncharacterized protein	163.4	4	1	1	neznámá
200	M0XZG2_HORVV	Uncharacterized protein	163.1	3	0	0	neznámá
201	A0A287I3U1_HORVV	DNMT1-RFD domain-containing protein	162.6	4	0	0	neznámá
202	A0A287NPE0_HORVV	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	162.2	3	0	0	jádro
203	F2CV88_HORVV	40S ribosomal protein S26	161.2	3	0	0	ribozom
204	F2EB15_HORVV	Predicted protein	160.9	3	1	1	jádro
205	A0A287GRR3_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	160.2	4	0	0	neznámá
206	A0A287UQV6_HORVV	DCD domain-containing protein	160.0	2	0	0	neznámá
207	M0XHX4_HORVV	RRM domain-containing protein	159.1	4	2	0	neznámá

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
208	A0A287E7R4_HORVV	Ribosomal_L28e domain-containing protein	158.5	2	1	0	neznámá
209	A0A287R382_HORVV	Ribosome assembly factor mrt4	156.2	3	1	1	jádro
210	A0A287J6G6_HORVV	Uncharacterized protein	155.7	4	0	0	cytosol
211	A0A287R153_HORVV	Uncharacterized protein	155.7	2	0	0	cytosol
212	A0A287QV04_HORVV	Uncharacterized protein	155.6	4	2	1	jádro
213	A0A287NZ38_HORVV	Nuclear/nucleolar GTPase 2	154.7	3	0	0	jádro
214	A0A287ISF6_HORVV	Uncharacterized protein	154.0	3	0	0	jádro
215	A0A287P3I8_HORVV	EF-hand domain-containing protein	150.1	1	0	0	neznámá
216	A0A287NXV6_HORVV	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit	149.6	3	0	0	jádro
217	A0A287QK38_HORVV	RRM domain-containing protein	146.6	2	0	0	neznámá
218	A0A287WL41_HORVV	Uncharacterized protein	145.9	1	1	0	cytosol
219	F2DLH6_HORVV	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	142.9	3	0	0	jádro
220	A0A287TJF3_HORVV	Histone H2A	142.1	3	0	0	jádro
221	A0A287NL24_HORVV	DEAD domain-containing protein	142.1	4	1	1	neznámá
222	A0A287XZ99_HORVV	RRM domain-containing protein	140.9	2	0	0	neznámá
223	A0A287U5U2_HORVV	Uncharacterized protein	138.0	2	0	0	jádro
224	A0A287NV53_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	137.4	2	0	0	jádro
225	A0A287MQ02_HORVV	S10_pectin domain-containing protein	137.4	3	0	0	neznámá
226	A0A287VQM4_HORVV	PINc domain-containing protein	133.3	3	0	0	ribozom
227	A0A287Q706_HORVV	Uncharacterized protein	132.0	3	0	0	cytosol
228	A0A287LGA7_HORVV	KRR1 small subunit processome component	131.3	2	1	1	jádro
229	A0A287SN31_HORVV	RRM domain-containing protein	130.7	2	0	0	neznámá
230	A0A287KNU0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	129.1	5	0	0	neznámá
231	A0A287RKP0_HORVV	Uncharacterized protein	128.4	1	0	0	ribozom
232	A0A287Q7A3_HORVV	Enolase_C domain-containing protein	128.1	2	0	0	cytosol
233	A0A287J0S9_HORVV	AAA domain-containing protein	128.0	2	0	0	neznámá

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
234	A0A287MWM4_HORVV	40S ribosomal protein S25	127.4	2	0	0	ribozom
235	A0A287F548_HORVV	RRM domain-containing protein	125.9	1	0	0	jádro
236	F2D4N4_HORVV	Predicted protein	122.6	2	0	0	neznámá
237	A0A287HN23_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	122.1	1	1	0	neznámá
238	A0A287RDZ4_HORVV	Protein kinase domain-containing protein	121.2	2	0	0	neznámá
239	A0A287T1T8_HORVV	Uncharacterized protein	120.9	1	0	0	neznámá
240	F2CZ65_HORVV	Predicted protein	120.0	3	0	0	cytosol
241	A0A287P127_HORVV	Bms1-type G domain-containing protein	119.2	2	0	0	jádro
242	A0A287ELL7_HORVV	Uncharacterized protein	118.0	3	0	0	neznámá
243	A0A287TTB0_HORVV	Phosphoglycerate kinase	116.7	3	0	0	cytosol
244	A0A287Q3J1_HORVV	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	116.7	2	0	0	jádro, cytosol
245	F2DWT3_HORVV	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	116.6	2	0	0	cytosol
246	M0WXZ5_HORVV	Uncharacterized protein	116.0	2	0	0	neznámá
247	A0A287LBV2_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	115.6	2	0	0	neznámá
248	A0A287Y1E4_HORVV	HMG box domain-containing protein	114.9	2	0	0	jádro
249	A0A287KQU9_HORVV	Peptidase S59 domain-containing protein	114.9	2	0	0	jádro
250	A0A287JMJ0_HORVV	Uncharacterized protein	114.7	3	0	0	neznámá
251	A0A287N827_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	114.0	2	0	0	jádro
252	A0A287GF18_HORVV	Flap endonuclease 1	112.1	2	0	0	jádro, mitoch.
253	A0A287N0H9_HORVV	Uncharacterized protein	109.2	2	0	0	neznámá
254	A0A287LVR5_HORVV	Uncharacterized protein	108.2	2	1	0	neznámá
255	A0A287M5L3_HORVV	Structural maintenance of chromosomes protein	108.2	3	0	0	chromosom
256	A0A287FPI1_HORVV	Uncharacterized protein	106.5	3	0	0	neznámá
257	A0A287E186_HORVV	Uncharacterized protein	105.2	2	0	0	jádro
258	A0A287JFF5_HORVV	S4 RNA-binding domain-containing protein	105.0	2	0	0	neznámá
259	F2E1C6_HORVV	Predicted protein	103.5	2	1	0	jádro

Přílohová tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
260	A0A287GMX9_HORVV	FRIGIDA-like protein	102.8	2	0	0	neznámá
261	A0A287H5C2_HORVV	Uncharacterized protein	101.9	2	0	0	neznámá
262	M0XWD1_HORVV	RRM domain-containing protein	101.8	2	1	0	jádro
263	A0A287WU57_HORVV	DNA topoisomerase I	101.6	2	0	0	chromosom
264	A0A287E8A7_HORVV	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	101.4	2	2	0	cytosol
265	A0A287FQH0_HORVV	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	100.9	2	0	0	neznámá
266	F2DLQ1_HORVV	Predicted protein	99.4	3	0	0	jádro
267	A0A287ITZ2_HORVV	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	99.0	1	0	0	neznámá
268	A0A287UUH6_HORVV	AAA domain-containing protein	98.0	2	0	0	neznámá
269	A0A287LIP0_HORVV	Uncharacterized protein	97.0	2	0	0	neznámá
270	F2DF98_HORVV	Predicted protein	97.0	2	0	0	neznámá
271	F2CWV0_HORVV	Ribosomal protein L15	96.0	2	0	0	mitochondrie
272	A0A287QC25_HORVV	RNA helicase	95.1	2	0	0	jádro
273	A0A287HY84_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	94.2	2	2	1	jádro
274	A0A287XZC4_HORVV	AAA domain-containing protein	94.2	1	0	0	cytoplasmá
275	A0A287SNS5_HORVV	Uncharacterized protein	94.1	2	0	0	neznámá
276	A0A287TBG4_HORVV	rRNA adenine N(6)-methyltransferase	93.8	2	0	0	neznámá
277	A0A287E1H8_HORVV	Uncharacterized protein	93.5	1	1	1	jádro
278	A0A287R5P7_HORVV	RPOLD domain-containing protein	93.2	1	0	0	neznámá
279	A0A287XWC0_HORVV	Uncharacterized protein	92.7	2	0	0	neznámá
280	A0A287HWT5_HORVV	Uncharacterized protein	92.4	1	0	0	neznámá
281	M0XKG5_HORVV	RuvB-like helicase	92.3	2	0	0	jádro
282	A0A287MW36_HORVV	RNA helicase	92.0	2	0	0	neznámá
283	A0A287P7X1_HORVV	N-acetyltransferase domain-containing protein	91.7	2	0	0	jádro
284	A0A287ERJ5_HORVV	Uncharacterized protein	91.4	2	0	0	neznámá
285	A0A287Q7C1_HORVV	RRM domain-containing protein	91.2	1	0	0	jádro
286	F2CVE1_HORVV	Predicted protein	90.4	1	1	0	jádro

Přílohavá tabulka III: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
287	A0A287PNE2_HORVV	Uncharacterized protein	90.4	1	0	0	jádro
288	A0A287ISH2_HORVV	Ribosomal_L23eN domain-containing protein	87.7	2	0	0	cytosol
289	A0A287LZ83_HORVV	DNA_pol_B_exo1 domain-containing protein	87.4	1	1	0	neznámá
290	A0A287UPJ5_HORVV	MACPF domain-containing protein	87.4	1	0	0	neznámá
291	A0A287TMN3_HORVV	KH domain-containing protein	86.5	2	0	0	neznámá
292	A0A287VI52_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	84.7	2	1	0	neznámá
293	A0A287VUK4_HORVV	Ribosomal_S10 domain-containing protein	84.7	1	0	0	ribozom
294	A0A287PJJ4_HORVV	40S ribosomal protein S3a	84.0	2	0	0	neznámá
295	A0A287UZ41_HORVV	Uncharacterized protein	83.2	2	0	0	neznámá
296	A0A287R8Q0_HORVV	DNA topoisomerase 6 subunit B	82.7	1	0	0	neznámá
297	A0A287S2F6_HORVV	Uncharacterized protein	82.6	3	0	0	neznámá
298	A0A287T6J9_HORVV	LsmAD domain-containing protein	78.4	2	0	0	neznámá
299	A0A287PSK9_HORVV	Exostosin domain-containing protein	77.9	1	1	0	neznámá
300	F2EB78_HORVV	Predicted protein	76.3	2	0	0	neznámá
301	F2DZM8_HORVV	Predicted protein	75.5	1	0	0	neznámá
302	A0A287X1D2_HORVV	Uncharacterized protein	74.3	1	0	0	jádro
303	A0A287SS27_HORVV	ADF-H domain-containing protein	73.9	2	0	0	neznámá
304	A0A287ESJ7_HORVV	Uncharacterized protein	73.8	1	1	0	cytoskelet
305	A0A287JV32_HORVV	Uncharacterized protein	73.8	1	1	0	neznámá
306	A0A287Q3V6_HORVV	Uncharacterized protein	73.7	1	0	0	jádro
307	A0A287RYA7_HORVV	Uncharacterized protein	73.6	2	1	0	neznámá
308	A0A287JBC6_HORVV	PPC domain-containing protein	72.7	1	1	0	neznámá
309	A0A287L9R7_HORVV	Uncharacterized protein	71.4	1	0	0	jádro
310	A0A287MPL5_HORVV	Uncharacterized protein	69.3	1	0	0	neznámá
311	A0A287LSL5_HORVV	Uncharacterized protein	67.8	2	1	0	neznámá
312	A0A287GU35_HORVV	Uncharacterized protein	66.2	2	0	0	jádro
313	A0A287DX42_HORVV	Uncharacterized protein	65.9	2	1	1	neznámá
314	A0A287RKQ2_HORVV	Uncharacterized protein	65.3	2	0	0	neznámá

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
1	A0A287PPR0_HORVV	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	261.6	16	0	0	cytosol
2	A0A287HC21_HORVV	Nop domain-containing protein	253.63	21	2	1	jádro
3	A0A287GJ75_HORVV	Nop domain-containing protein	253.53	22	2	1	jádro
4	A0A287HAK5_HORVV	Nop domain-containing protein	251.32	17	1	0	jádro
5	A0A287SS50_HORVV	Uncharacterized protein	243.78	16	1	0	cytoplasma
6	A0A287GP14_HORVV	Histone H4	234.34	14	0	0	jádro
7	A0A287P8H2_HORVV	Uncharacterized protein	229.49	14	1	1	neznámá
8	A0A287GKK0_HORVV	Uncharacterized protein	228.74	14	0	0	neznámá
9	A0A287M388_HORVV	Uncharacterized protein	220.24	13	0	0	cytoplasma
10	A0A287WS02_HORVV	Uncharacterized protein	218.48	13	1	1	neznámá
11	F2D483_HORVV	40S ribosomal protein S8	216.14	7	0	0	ribozom
12	A0A287V6Y4_HORVV	Uncharacterized protein	214.99	13	0	0	jádro
13	A0A287ECT8_HORVV	Cytosine-specific methyltransferase	214.03	22	0	0	jádro
14	A0A287V4M4_HORVV	Uncharacterized protein	211.33	18	0	0	jádro
15	A0A287V449_HORVV	Uncharacterized protein	208.21	16	0	0	jádro
16	A0A287G0H6_HORVV	Histone H2B	204.31	10	0	0	jádro
17	A0A287FQR7_HORVV	Histone H2B	202.81	10	0	0	jádro
18	A0A287HH01_HORVV	PUA domain-containing protein	202.46	16	2	0	neznámá
19	A0A287HHC4_HORVV	PUA domain-containing protein	201.92	16	2	0	jádro
20	A0A287U800_HORVV	Gp_dh_N domain-containing protein	198.81	10	0	0	cytosol
21	A0A287L367_HORVV	Uncharacterized protein	198.18	8	0	0	neznámá
22	A0A287XSX0_HORVV	Histone H2B	196.69	11	0	0	jádro
23	A0A287NVX2_HORVV	Nop domain-containing protein	192.73	10	1	0	neznámá
24	A0A287P9J5_HORVV	Uncharacterized protein	189.76	8	0	0	neznámá
25	A0A287E4A5_HORVV	DNA helicase	185.42	15	2	2	jádro
26	A0A287K4S5_HORVV	Uncharacterized protein	183.46	17	0	0	jádro

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
27	A0A287WXI0_HORVV	Ribosomal_S13_N domain-containing protein	178.36	12	0	0	jádro, cytosol
28	A0A287WXF2_HORVV	Ribosomal_S13_N domain-containing protein	178.36	12	0	0	jádro, cytosol
29	M0X5Z0_HORVV	Uncharacterized protein	178	9	0	0	neznámá
30	A0A287JEF8_HORVV	Adenosylhomocysteinase	177.1	15	1	1	cytosol
31	A0A287JES9_HORVV	Adenosylhomocysteinase	172.26	12	1	1	cytosol
32	A0A287U6A1_HORVV	Uncharacterized protein	171.39	11	1	1	ribozom
33	F2DJI3_HORVV	Predicted protein	170.18	9	0	0	jádro
34	A0A287EV33_HORVV	Chromatin-remodeling complex ATPase	168.77	15	0	0	jádro
35	A0A287MX97_HORVV	Uncharacterized protein	167.98	5	0	0	neznámá
36	A0A287G411_HORVV	DNA helicase	167.13	13	2	1	jádro
37	A0A287UEZ1_HORVV	S-adenosylmethionine synthase	167.01	7	0	0	neznámá
38	A0A287XRF0_HORVV	Uncharacterized protein	166.84	8	0	0	neznámá
39	A0A287NGL9_HORVV	Uncharacterized protein	166.05	8	0	0	cytosol
40	A0A287P564_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	165.32	13	0	0	neznámá
41	A0A287RRJ0_HORVV	HATPase_c domain-containing protein	164.63	14	1	1	neznámá
42	A0A287UM83_HORVV	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein	163.31	9	1	1	neznámá
43	A0A287VWP0_HORVV	Histone H2A	163.28	8	0	0	jádro
44	A0A287TI29_HORVV	CPSF_A domain-containing protein	163.22	12	0	0	jádro
45	A0A287GU54_HORVV	C2H2-type domain-containing protein	162.71	4	0	0	neznámá
46	A0A287EPE2_HORVV	Uncharacterized protein	162.66	10	0	0	neznámá
47	A0A287H6S9_HORVV	CP-type G domain-containing protein	159.44	8	0	0	jádro
48	F2DIR3_HORVV	40S ribosomal protein S4	158.75	9	0	0	ribozom
49	A0A287P7S3_HORVV	Histone H2A	157.86	7	0	0	jádro
50	A0A287FYG9_HORVV	DNA helicase	156.84	11	0	0	jádro
51	M0VIF1_HORVV	Uncharacterized protein	155.44	6	0	0	ribozom
52	A0A287QVI3_HORVV	Uncharacterized protein	155.2	8	0	0	cytosol

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
53	A0A287JG74_HORVV	Uncharacterized protein	154.44	7	0	0	ribozom
54	A0A287FAD4_HORVV	Uncharacterized protein	152.14	8	0	0	ribozom
55	A0A287FRQ6_HORVV	Uncharacterized protein	151.77	9	1	1	neznámá
56	A0A287FFF9_HORVV	Uncharacterized protein	151.21	6	0	0	cytoskelet
57	M0XGG9_HORVV	Uncharacterized protein	151.21	6	0	0	cytoskelet
58	A0A287F0S2_HORVV	Uncharacterized protein	150.53	6	0	0	cytosol
59	A0A287GM61_HORVV	Ubiquitin-like domain-containing protein	150.41	8	2	0	ribozom
60	A0A287RUX0_HORVV	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	150.38	5	0	0	cytosol
61	A0A287XVY8_HORVV	Histone H4	149.49	6	0	0	jádro
62	A0A287U0I6_HORVV	Uncharacterized protein	148.97	5	0	0	jádro
63	A0A287SM79_HORVV	H15 domain-containing protein	147.92	11	0	0	jádro
64	M0WIE0_HORVV	Nucleolar GTP-binding protein 1	147.87	11	0	0	jádro
65	A0A287UY47_HORVV	Uncharacterized protein	147.85	8	0	0	ribozom
66	M0XEX8_HORVV	Uncharacterized protein	147.11	8	1	1	jádro, cytosol
67	A0A287QAA5_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	146.35	4	0	0	neznámá
68	A0A287IV68_HORVV	Predicted protein	145.89	6	0	0	cytosol
69	A0A287Q5M5_HORVV	Uncharacterized protein	145.39	6	0	0	cytoskelet
70	F2D3Q4_HORVV	Predicted protein	144.7	6	0	0	ribozom
71	A0A287P673_HORVV	Elongation factor 1-alpha	144.28	11	0	0	neznámá
72	F2CSX2_HORVV	60S ribosomal protein L18a	144.05	7	0	0	ribozom
73	A0A287MDR1_HORVV	DEK_C domain-containing protein	143.72	7	1	0	jádro
74	A0A287IFH6_HORVV	Uncharacterized protein	142.74	6	0	0	ribozom
75	A0A287U2E9_HORVV	40S ribosomal protein S24	142.35	5	1	0	ribozom
76	F2EAU8_HORVV	Predicted protein	141.7	7	0	0	cytosol
77	A0A287IKX4_HORVV	Histone H3	140.99	10	0	0	jádro
78	F2CRK3_HORVV	Predicted protein	140.87	6	0	0	cytoskelet

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
79	A0A287GJ71_HORVV	ATP synthase subunit beta	140.75	9	1	1	mitochondrie
80	A0A287W5E0_HORVV	Uncharacterized protein	140.15	4	0	0	neznámá
81	A0A287JBT0_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	139.81	9	1	1	jádro
82	A0A287X8K8_HORVV	40S ribosomal protein S24	139.57	6	1	1	ribozom
83	A0A287SV58_HORVV	Tr-type G domain-containing protein	138.8	8	0	0	neznámá
84	A0A287PWT2_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	138.53	8	0	0	neznámá
85	A0A287QS34_HORVV	DNA replication licensing factor MCM7	138.32	9	0	0	jádro
86	A0A287PH36_HORVV	Histone domain-containing protein	137.68	12	0	0	jádro
87	A0A287UR54_HORVV	Uncharacterized protein	136.73	6	0	0	neznámá
88	A0A287GGY5_HORVV	Tubulin alpha chain	136.48	5	0	0	cytoskelet
89	A0A287QR85_HORVV	Histone H2A	136.01	4	0	0	jádro
90	A0A287QLG6_HORVV	Ribosomal_L2_C domain-containing protein	134.51	8	0	0	cytosol
91	A0A287QBV1_HORVV	LisH domain-containing protein	134.45	5	0	0	jádro
92	M0XA42_HORVV	Uncharacterized protein	133.69	9	0	0	neznámá
93	A0A287H8R8_HORVV	Uncharacterized protein	133.43	4	0	0	ribozom
94	A0A287MTW9_HORVV	Histone H2A	133.22	7	0	0	jádro
95	A0A287SMI1_HORVV	H15 domain-containing protein	133.11	7	0	0	jádro
96	A0A287JWA7_HORVV	Uncharacterized protein	132.22	6	0	0	ribozom
97	A0A287EA93_HORVV	Ribosome biogenesis protein BOP1 homolog	131.74	5	0	0	jádro
98	A0A287X7A3_HORVV	Uncharacterized protein	131	6	0	0	neznámá
99	M0XRQ5_HORVV	PUM-HD domain-containing protein	129.32	6	0	0	neznámá
100	A0A287RZ19_HORVV	Uncharacterized protein	129.08	10	0	0	jádro
101	A0A287SHT8_HORVV	Tubulin beta chain	128.88	9	0	0	cytoskelet
102	M0XVQ1_HORVV	PUM-HD domain-containing protein	128.77	6	1	0	neznámá
103	A0A287MPZ0_HORVV	S10_pectin domain-containing protein	128.61	4	0	0	cytosol
104	F2D5P0_HORVV	Peptidylprolyl isomerase	128.27	7	0	0	neznámá

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
105	A0A287LTT9_HORVV	Tubulin beta chain	127.76	9	0	0	cytoskelet
106	M0Z1R8_HORVV	Uncharacterized protein	127.37	4	0	0	neznámá
107	A0A287Q9M9_HORVV	Meth_synt_2 domain-containing protein	126.1	5	0	0	neznámá
108	M0YH86_HORVV	14_3_3 domain-containing protein	124.62	7	0	0	neznámá
109	A0A287GU29_HORVV	Uncharacterized protein	124.47	5	0	0	jádro
110	A0A287TPD0_HORVV	Tubulin beta chain	123.68	9	0	0	cytoskelet
111	A0A287TCE0_HORVV	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	122.77	4	0	0	neznámá
112	A0A287I0F3_HORVV	Ribosomal protein L15	122.48	4	0	0	ribozom
113	A0A287S943_HORVV	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	122.34	7	1	1	cytosol
114	F2EK54_HORVV	Histone H2A	121.91	5	0	0	jádro
115	F2EFR1_HORVV	40S ribosomal protein S6	121.58	6	1	1	ribozom
116	A0A287GX22_HORVV	Uncharacterized protein	121.27	3	0	0	neznámá
117	A0A287H2A2_HORVV	40S ribosomal protein S6	120.54	5	0	0	ribozom
118	A0A287XUH7_HORVV	Histone H2A	120.45	4	0	0	jádro
119	A0A287NJK0_HORVV	Uncharacterized protein	120.01	6	0	0	ribozom
120	F2DVU2_HORVV	60S ribosomal protein L13	119.75	5	0	0	cytosol
121	A0A287QUE3_HORVV	KH type-2 domain-containing protein	119.44	5	0	0	ribozom
122	A0A287EJ86_HORVV	Histone H2A	119.41	6	0	0	jádro
123	A0A287MGX2_HORVV	Histone H2A	118.42	4	0	0	jádro
124	F2E6K2_HORVV	Predicted protein	118.39	9	0	0	ribozom
125	M0XCF8_HORVV	Uncharacterized protein	118.38	5	0	0	cytosol
126	A0A287WXA1_HORVV	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	117.85	5	0	0	cytosol
127	A0A287RTV4_HORVV	Uncharacterized protein	117.78	4	0	0	cytosol
128	F2DLH6_HORVV	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	117.25	3	0	0	jádro
129	A0A287J8A4_HORVV	Uncharacterized protein	116.76	3	0	0	cytosol
130	A0A287PKP5_HORVV	RNA cytidine acetyltransferase	116.39	5	0	0	jádro

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
131	A0A287E9F9_HORVV	Uncharacterized protein	116.22	4	1	0	neznámá
132	M0UFA2_HORVV	60S ribosomal protein L18	116.21	5	0	0	ribozom
133	F2CV88_HORVV	40S ribosomal protein S26	116.05	3	0	0	ribozom
134	A0A287GN28_HORVV	Putative rRNA methyltransferase	115.23	6	0	0	jádro
135	A0A287TJG0_HORVV	Histone H2A	114.22	4	0	0	jádro
136	M0Y9M2_HORVV	Ribosome biogenesis regulatory protein	113.76	5	0	0	jádro
137	A0A287XJY4_HORVV	Histone H2A	113.12	6	0	0	jádro
138	A0A287PJA9_HORVV	Histone H2B	113.05	4	0	0	jádro
139	A0A287J4T4_HORVV	Ribosomal_S17_N domain-containing protein	112.47	7	2	1	ribozom
140	A0A287HI98_HORVV	S4 RNA-binding domain-containing protein	112.4	7	0	0	ribozom
141	A0A287V776_HORVV	Histone H2A	111.47	4	0	0	jádro
142	A0A287M5E0_HORVV	Fructose-bisphosphate aldolase	110.2	5	0	0	cytosol
143	A0A287F174_HORVV	DNA helicase	109.99	13	0	0	jádro
144	M0WXS7_HORVV	Histone H2A	109.09	4	0	0	jádro
145	A0A287N2R5_HORVV	Uncharacterized protein	108.88	4	0	0	neznámá
146	A0A287NXV6_HORVV	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit	107.41	2	0	0	jádro
147	M0YT09_HORVV	Uncharacterized protein	106.62	5	0	0	jádro
148	A0A287T138_HORVV	Uncharacterized protein	105.88	5	0	0	neznámá
149	A0A287J037_HORVV	H15 domain-containing protein	105.86	5	0	0	jádro
150	A0A287WYD8_HORVV	Uncharacterized protein	104.78	3	0	0	neznámá
151	A0A287X534_HORVV	GTP-binding nuclear protein	104.35	3	0	0	jádro
152	F2DWT3_HORVV	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	103.63	4	0	0	jádro, cytosol
153	A0A287FPII_HORVV	Uncharacterized protein	103.27	6	0	0	neznámá
154	A0A287EYB0_HORVV	Ribosomal_L16 domain-containing protein	102.94	4	0	0	ribozom
155	A0A287QDA6_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	102.43	5	0	0	neznámá
156	F2DBD4_HORVV	60S acidic ribosomal protein P0	101.37	4	0	0	cytosol

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
157	A0A287QBZ5_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	101.1	6	0	0	neznámá
158	A0A287K7G2_HORVV	Ribosomal_S7 domain-containing protein	101.09	3	0	0	ribozom
159	A0A287ENG4_HORVV	Ribosome biogenesis regulatory protein	100.87	7	0	0	jádro
160	A0A287IRQ2_HORVV	Uncharacterized protein	100.54	5	0	0	jádro
161	A0A287P2B4_HORVV	Uncharacterized protein	98.73	4	0	0	jádro
162	A0A287XZ38_HORVV	RRM domain-containing protein	98.36	2	0	0	neznámá
163	M0X877_HORVV	S4 RNA-binding domain-containing protein	98.18	2	0	0	jádro, cytosol
164	A0A287Y1E4_HORVV	HMG box domain-containing protein	97.73	3	0	0	jádro
165	A0A287ISF6_HORVV	Uncharacterized protein	97.62	3	0	0	jádro
166	F2CSC5_HORVV	Ribosomal protein L19	97.52	7	0	0	cytosol
167	A0A287WTF4_HORVV	Uncharacterized protein	97.12	4	0	0	cytosol
168	A0A287KYK4_HORVV	DNA helicase	95.8	8	1	0	jádro
169	A0A191TDI3_HORVV	ATP synthase subunit alpha	95.68	5	0	0	mitochondrie
170	A0A287M355_HORVV	60S ribosomal protein L36	95.55	6	0	0	ribozom
171	A0A287NTX9_HORVV	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	95.25	3	0	0	jádro
172	A0A287U0C3_HORVV	Uncharacterized protein	94.54	3	0	0	neznámá
173	A0A287PJJ4_HORVV	40S ribosomal protein S3a	94.43	4	0	0	neznámá
174	M0VW82_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	93.52	5	0	0	neznámá
175	A0A287KGA9_HORVV	Uncharacterized protein	93.34	7	0	0	neznámá
176	A0A287U945_HORVV	Uncharacterized protein	93.28	4	0	0	jádro
177	A0A287FBY7_HORVV	Uncharacterized protein	93.19	7	0	0	neznámá
178	A0A287MDN3_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	91.94	3	0	0	neznámá
179	A0A287LAY1_HORVV	Uncharacterized protein	91.68	3	1	0	ribozom
180	A0A287UQV6_HORVV	DCD domain-containing protein	90.89	4	0	0	neznámá
181	A0A287THA8_HORVV	Uncharacterized protein	90.87	9	0	0	jádro

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
182	M0WA37_HORVV	Uncharacterized protein	90.22	3	0	0	neznámá
183	A0A287Q720_HORVV	Enolase_C domain-containing protein	90.16	3	0	0	cytosol
184	A0A287RK86_HORVV	Uncharacterized protein	89.71	2	0	0	ribozom
185	M0VQD4_HORVV	RRM domain-containing protein	89.02	2	0	0	neznámá
186	A0A287WPQ1_HORVV	60S ribosomal protein L27	88.77	4	0	0	cytosol
187	A0A287JEI4_HORVV	Uncharacterized protein	87.59	5	1	1	neznámá
188	A0A287NYC5_HORVV	Brix domain-containing protein	86.63	4	0	0	ribozom
189	A0A287P4K2_HORVV	AAA domain-containing protein	86.52	2	0	0	cytoplasma
190	A0A287XCG7_HORVV	Sas10 domain-containing protein	86.09	2	0	0	neznámá
191	A0A287EWK4_HORVV	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	86.08	5	0	0	ribozom
192	A0A287W5H4_HORVV	Uncharacterized protein	85.91	5	0	0	neznámá
193	A0A287N0I1_HORVV	Ribonuclease	85.1	3	0	0	neznámá
194	A0A287JGQ2_HORVV	Uncharacterized protein	84.16	2	0	0	cytoplasma
195	A0A287SE16_HORVV	UDP-glucose 6-dehydrogenase	83.8	3	0	0	neznámá
196	A0A287QL44_HORVV	RRM domain-containing protein	83.47	5	0	0	neznámá
197	A0A287TJF3_HORVV	Histone H2A	82.39	3	0	0	jádro
198	A0A287Q706_HORVV	Uncharacterized protein	82.07	3	0	0	cytosol
199	A0A287SBF4_HORVV	Histone H2A	81.14	3	0	0	jádro
200	A0A287LBV2_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	80.89	2	0	0	neznámá
201	F2DJG1_HORVV	Predicted protein	79.83	4	0	0	neznámá
202	M0W8A5_HORVV	Uncharacterized protein	79.57	3	0	0	neznámá
203	A0A287N819_HORVV	Uncharacterized protein	79.38	2	0	0	neznámá
204	F2EH36_HORVV	Predicted protein	79.28	1	0	0	jádro
205	M0VYX8_HORVV	Uncharacterized protein	79.17	5	0	0	cytosol

Přílohová tabulka IV: Všechny identifikované proteiny z G2 jader ječmene. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst	Buněčná lokalizace podle UniProt
206	A0A287P4C4_HORVV	40S ribosomal protein S7	78.51	5	1	0	ribozom
207	A0A287SM27_HORVV	Uncharacterized protein	78.23	2	2	1	neznámá
208	A0A287MP25_HORVV	RRM domain-containing protein	78.22	3	0		neznámá
209	A0A287R602_HORVV	RPOLD domain-containing protein	77.58	2	0	0	neznámá
210	A0A287VQM4_HORVV	PINc domain-containing protein	76.95	2	0	0	neznámá
211	A0A287QUS2_HORVV	Uncharacterized protein	76.08	4	0	0	jádro
212	A0A287PMB6_HORVV	Uncharacterized protein	74.92	4	0	0	neznámá
213	A0A287PL69_HORVV	Uncharacterized protein	74.92	4	0	0	neznámá
214	A0A287XBB0_HORVV	Replication factor C subunit 1	73.98	4	0	0	jádro
215	A0A287J0L6_HORVV	AAA domain-containing protein	73.44	2	0	0	neznámá
216	A0A287LG02_HORVV	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	72.94	4	0	0	jádro
217	A0A287L9Q1_HORVV	Uncharacterized protein	72.92	2	0	0	jádro
218	A0A287URA3_HORVV	TPR_MLP1_2 domain-containing protein	72.69	2	0	0	neznámá
219	A0A287R386_HORVV	Ribosome assembly factor mrt4	71.74	4	0	0	jádro
220	F2CWV0_HORVV	Ribosomal protein L15	71.19	2	0	0	mitochondrie
221	A0A287UIU4_HORVV	DNA topoisomerase 2	70.72	4	0	0	neznámá
222	A0A287PE94_HORVV	Uncharacterized protein	70.36	4	0	0	neznámá

Přílohová tabulka V: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-bromethylamin. Vyhodnoceno programem ProteinScape 3.1

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet mod. peptidů	Počet nových štěpných míst
1	CASA1_BOVIN	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S1 PE=1 SV=2	1196.1	18	0	0
2	ALBU_BOVIN	Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4	1055.4	18	1	1
3	LACB_BOVIN	Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGB PE=1 SV=3	848.5	14	1	0
4	CASA2_BOVIN	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S2 PE=1 SV=2	663.9	11	1	1
5	LACB_CAPHI	Beta-lactoglobulin OS=Capra hircus OX=9925 GN=LGB PE=1 SV=2	622.9	10	0	0
6	ALBU_SHEEP	Serum albumin OS=Ovis aries OX=9940 GN=ALB PE=1 SV=1	526.8	9	1	1
7	TRFL_BOVIN	Lactotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	485.2	11	2	0
8	CASB_BOVIN	Beta-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN2 PE=1 SV=2	481.5	6	0	0
9	LALBA_BOVIN	Alpha-lactalbumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LALBA PE=1 SV=2	454.2	7	3	0
10	RL7_PSYCK	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Psychrobacter cryohalolentis (strain K5) OX=335284 GN=rpIL PE=3 SV=1	266.6	3	0	0
11	CASK_BOVIN	Kappa-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN3 PE=1 SV=1	246.3	4	0	0
12	TPIS_LACDA	Triosephosphate isomerase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=tpiA PE=3 SV=1	231.9	3	0	0
13	RL7_LACDA	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=rpIL PE=3 SV=1	207.8	4	0	0
14	RS27B_SCHPO	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27b OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=ubi5 PE=1 SV=2	207.3	4	1	0
15	DBH_STRMU	DNA-binding protein HU OS=Streptococcus mutans serotype c (strain ATCC 700610 / UA159) OX=210007 GN=hup PE=1 SV=1	174.6	3	0	0
16	MFGM_BOVIN	Lactadherin OS=Bos taurus OX=9913 GN=MFGE8 PE=1 SV=2	168.7	4	0	0

Přílohová tabulka V: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-bromethylamin. Vyhodnoceno programem ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst
17	G3P_LACDE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OX=1585 GN=gap PE=3 SV=1	166.8	3	0	0
18	ENO_LACDA	Enolase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=eno PE=3 SV=1	160.1	3	0	0
19	RL1_ACIAD	50S ribosomal protein L1 OS=Acinetobacter baylyi (strain ATCC 33305 / BD413 / ADP1) OX=62977 GN=rplA PE=3 SV=1	149.9	2	0	0
20	CH60_PSYA2	60 kDa chaperonin OS=Psychrobacter arcticus (strain DSM 17307 / 273-4) OX=259536 GN=groL PE=3 SV=1	143.4	3	0	0
21	PERL_BOVIN	Lactoperoxidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=LPO PE=1 SV=1	141.8	3	0	0
22	MPAC_PENBR	Non-reducing polyketide synthase mapC OS=Penicillium brevicompactum OX=5074 GN=mpaC PE=1 SV=1	140.0	3	0	0
23	BIP_DEBHA	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Debaryomyces hansenii (strain ATCC 36239 / CBS 767 / JCM 1990 / NBRC 0083 / IGC 2968) OX=284592 GN=KAR2 PE=3 SV=1	139.9	1	0	0
24	KPYK_LACDE	Pyruvate kinase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OX=1585 GN=pyk PE=1 SV=3	134.7	3	0	0
25	RL1_PSYWF	50S ribosomal protein L1 OS=Psychrobacter sp. (strain PRwf-1) OX=349106 GN=rplA PE=3 SV=1	117.6	2	0	0
26	FIBA_BOVIN	Fibrinogen alpha chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=FGA PE=1 SV=5	120.4	1	0	0
27	F12AI_BOVIN	Factor XIIa inhibitor OS=Bos taurus OX=9913 PE=1 SV=1	117.1	2	0	0
28	CASA2_SHEEP	Alpha-S2-casein OS=Ovis aries OX=9940 GN=CSN1S2 PE=2 SV=1	114.3	2	1	0
29	TSP1_BOVIN	Thrombospondin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=THBS1 PE=2 SV=2	114.3	1	0	0
30	EFTU_LACDA	Elongation factor Tu OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=tuf PE=3 SV=1	110.0	2	0	0
31	CISY_CANTR	Citrate synthase, mitochondrial OS=Candida tropicalis OX=5482 GN=CIT PE=3 SV=1	109.2	3	0	0

Přílohová tabulka V: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-bromethylamin. Vyhodnoceno programem ProteinScape 3.1. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst
32	FADB_ESCF3	Fatty acid oxidation complex subunit alpha OS=Escherichia fergusonii (strain ATCC 35469 / DSM 13698 / CDC 0568-73) OX=585054 GN=fadB PE=3 SV=1	108.7	1	0	0
33	DOM34_YEAST	Protein DOM34 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=DOM34 PE=1 SV=2	106.9	2	0	0
34	ENO_KLULA	Enolase OS=Kluyveromyces lactis (strain ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) OX=284590 GN=ENO PE=3 SV=1	106.7	2	0	0
35	RL29_PSYA2	50S ribosomal protein L29 OS=Psychrobacter arcticus (strain DSM 17307 / 273-4) OX=259536 GN=rpmC PE=3 SV=1	100.1	2	0	0
36	RL3_GLUOX	50S ribosomal protein L3 OS=Gluconobacter oxydans (strain 621H) OX=290633 GN=rplC PE=3 SV=1	99.4	2	0	0
37	AMBP_BOVIN	Protein AMBP OS=Bos taurus OX=9913 GN=AMBP PE=1 SV=2	98.0	1	0	0
38	INO80_SCHPO	Chromatin-remodeling ATPase INO80 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=ino80 PE=1 SV=4	94.9	2	0	0
39	IPSP_BOVIN	Plasma serine protease inhibitor OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA5 PE=1 SV=1	89.3	2	0	0
40	SMC4_SCHPO	Structural maintenance of chromosomes protein 4 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=cut3 PE=1 SV=2	88.4	1	0	0
41	SG1D_BOVIN	Secretoglobin family 1D member OS=Bos taurus OX=9913 GN=SCGB1D PE=3 SV=2	88.1	2	0	0
42	LALBA_PIG	Alpha-lactalbumin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LALBA PE=1 SV=2	86.4	1	1	0
43	OTC_LACRD	Ornithine carbamoyltransferase OS=Lactobacillus reuteri (strain DSM 20016) OX=557436 GN=arcB PE=3 SV=1	82.1	1	0	0
44	DAPE_PSEAB	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain UCBPP-PA14) OX=208963 GN=dapE PE=3 SV=1	76.8	2	0	0
45	CTHL4_BOVIN	Cathelicidin-4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CATHL4 PE=1 SV=1	76.8	1	0	0
46	PIGR_BOVIN	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Bos taurus OX=9913 GN=PIGR PE=2 SV=1	74.4	2	0	0

Přílohová tabulka VI: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-bromethylamin. Vyhodnoceno programem PEAKS Studio 8.0.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst
1	CASA1_BOVIN	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S1 PE=1 SV=2	250.16	34	0	0
2	ALBU_BOVIN	Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4	250.08	19	1	0
3	LACB_BOVIN	Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGB PE=1 SV=3	248.80	24	1	1
4	LALBA_BOSMU	Alpha-lactalbumin OS=Bos mutus grunniens OX=30521 GN=LALBA PE=2 SV=1	206.34	13	7	4
5	CASK_BOVIN	Kappa-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN3 PE=1 SV=1	203.46	19	0	0
6	ALBU_SHEEP	Serum albumin OS=Ovis aries OX=9940 GN=ALB PE=1 SV=1	175.84	9	1	0
7	CASB_BOVIN	Beta-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN2 PE=1 SV=2	175.64	13	0	0
8	CASB_BUBBU	Beta-casein OS=Bubalus bubalis OX=89462 GN=CSN2 PE=2 SV=1	175.64	13	0	0
9	TRFL_BOVIN	Lactotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	171.44	9	2	0
10	CASA2_BOVIN	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S2 PE=1 SV=2	169.33	15	1	1
11	RL7_LACDA	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=rpL PE=3 SV=1	127.98	5	0	0
12	ENO_LACDA	Enolase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=eno PE=3 SV=1	121.66	3	0	0
13	DBH_STRMU	DNA-binding protein HU OS=Streptococcus mutans serotype c (strain ATCC 700610 / UA159) OX=210007 GN=hup PE=1 SV=1	108.42	3	0	0
14	TPIS_LACDB	Triosephosphate isomerase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC BAA-365) OX=321956 GN=tpiA PE=3 SV=1	106.77	3	0	0
15	G3P_LACDE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OX=1585 GN=gap PE=3 SV=1	104.77	3	0	0

Přílohavá tabulka VI: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-bromethylamin. Vyhodnoceno programem PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů	Počet nových štěpných míst
16	UBI1P_CANAX	Polyubiquitin OS=Candida albicans OX=5476 GN=UBI1 PE=1 SV=1	100.45	3	0	0
17	RL7_PSYCK	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Psychrobacter cryohalolentis (strain K5) OX=335284 GN=rplL PE=3 SV=1	97.95	3	0	0
18	PIGR_BOVIN	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Bos taurus OX=9913 GN=PIGR PE=2 SV=1	96.17	4	0	0
19	RL1_ACIAD	50S ribosomal protein L1 OS=Acinetobacter baylyi (strain ATCC 33305 / BD413 / ADP1) OX=62977 GN=rplA PE=3 SV=1	96.16	2	0	0
20	PERL_BUBBU	Lactoperoxidase OS=Bubalus bubalis OX=89462 GN=LPO PE=1 SV=1	94.73	3	0	0
21	MFGM_BOVIN	Lactadherin OS=Bos taurus OX=9913 GN=MFGE8 PE=1 SV=2	88.46	3	0	0
22	RL5_MYCSK	50S ribosomal protein L5 OS=Mycobacterium sp. (strain KMS) OX=189918 GN=rplE PE=3 SV=1	88.06	2	0	0
23	KPYK_LACDE	Pyruvate kinase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OX=1585 GN=pyk PE=1 SV=3	87.49	3	0	0
24	TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa OX=9823 PE=1 SV=1	85.51	6	0	0
25	RL7_CLAMS	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus (strain ATCC 33113 / DSM 20744 / JCM 9667 / LMG 2889 / C-1) OX=31964 GN=rplL PE=3 SV=1	83.70	2	0	0
26	PYR_KLULA	Inorganic pyrophosphatase OS=Kluyveromyces lactis (strain ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) OX=284590 GN=IPP1 PE=3 SV=2	82.37	1	0	0

Přílohavá tabulka VII: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-jodacetamid. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0.

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů
1	ALBU_BOVIN	Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4	292.12	29	9
2	TRFL_BOVIN	Lactotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	248.97	17	8
3	CASA1_BOVIN	Alpha-S1-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S1 PE=1 SV=2	242.43	21	0
4	LACB_BOVIN	Beta-lactoglobulin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGB PE=1 SV=3	235.54	15	3
5	LALBA_BOVIN	Alpha-lactalbumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=LALBA PE=1 SV=2	229.67	14	7
6	CASK_BOVIN	Kappa-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN3 PE=1 SV=1	227.78	22	0
7	TRFL_CAPHI	Lactotransferrin OS=Capra hircus OX=9925 GN=LTF PE=1 SV=1	195.18	10	5
8	PERL_BOVIN	Lactoperoxidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=LPO PE=1 SV=1	194.98	11	4
9	CASB_BOVIN	Beta-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN2 PE=1 SV=2	188.86	9	0
10	CASA2_BOVIN	Alpha-S2-casein OS=Bos taurus OX=9913 GN=CSN1S2 PE=1 SV=2	186.85	17	5
11	CASB_SHEEP	Beta-casein OS=Ovis aries OX=9940 GN=CSN2 PE=1 SV=3	183.68	8	0
12	CASB_CAPHI	Beta-casein OS=Capra hircus OX=9925 GN=CSN2 PE=2 SV=1	183.68	8	0
13	RL5_PSYCK	50S ribosomal protein L5 OS=Psychrobacter cryohalolentis (strain K5) OX=335284 GN=rplE PE=3 SV=1	181.96	9	0
14	PIGR_BOVIN	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Bos taurus OX=9913 GN=PIGR PE=2 SV=1	170.24	6	2
15	ENO_LACDA	Enolase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=eno PE=3 SV=1	165.50	5	0
16	ALBU_FELCA	Serum albumin OS=Felis catus OX=9685 GN=ALB PE=1 SV=1	163.76	5	1
17	ACON_YEAST	Aconitate hydratase mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ACO1 PE=1 SV=2	149.94	4	1
18	MFGM_BOVIN	Lactadherin OS=Bos taurus OX=9913 GN=MFGE8 PE=1 SV=2	147.36	6	1

Přílohavá tabulka VII: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-jodacetamid. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů
19	ACON_CANAL	Aconitate hydratase mitochondrial OS=Candida albicans (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) OX=237561 GN=ACO1 PE=1 SV=2	136.04	5	0
20	G3P_LACDE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OX=1585 GN=gap PE=3 SV=1	127.08	5	0
21	UBI1P_CANAX	Polyubiquitin OS=Candida albicans OX=5476 GN=UBI1 PE=1 SV=1	126.11	4	0
22	CO7_BOVIN	Complement component C7 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C7 PE=2 SV=1	125.85	4	2
23	CO3_BOVIN	Complement C3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=C3 PE=1 SV=2	125.11	4	3
24	TRFE_BOVIN	Serotransferrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=TF PE=2 SV=1	124.87	5	2
25	DBH_STRMU	DNA-binding protein HU OS=Streptococcus mutans serotype c (strain ATCC 700610 / UA159) OX=210007 GN=hup PE=1 SV=1	123.22	3	0
26	CASK_CAPHI	Kappa-casein OS=Capra hircus OX=9925 GN=CSN3 PE=1 SV=2	122.44	9	0
27	F12AI_BOVIN	Factor XIIa inhibitor OS=Bos taurus OX=9913 PE=1 SV=1	120.47	5	0
28	A1AT_BOVIN	Alpha-1-antiproteinase OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINA1 PE=1 SV=1	118.69	5	0
29	XDH_BOVIN	Xanthine dehydrogenase/oxidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=XDH PE=1 SV=4	118.49	3	0
30	TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa OX=9823 PE=1 SV=1	117.69	6	0
31	TPIS_LACDB	Triosephosphate isomerase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC BAA-365) OX=321956 GN=tpiA PE=3 SV=1	117.57	3	0
32	KPYK_LACDE	Pyruvate kinase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OX=1585 GN=pyk PE=1 SV=3	116.18	3	0
33	CASK_GIRCA	Kappa-casein (Fragment) OS=Giraffa camelopardalis OX=9894 GN=CSN3 PE=2 SV=1	108.26	7	0
34	RL7_PSYCK	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Psychrobacter cryohalolentis (strain K5) OX=335284 GN=rplL PE=3 SV=1	107.75	3	0

Přílohavá tabulka VII: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-jodacetamid. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů
35	TSP1_BOVIN	Thrombospondin-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=THBS1 PE=2 SV=2	107.30	3	1
36	TRFL_HORSE	Lactotransferrin (Fragment) OS=Equus caballus OX=9796 GN=LTF PE=1 SV=1	107.28	4	2
37	RL5_MYCA9	50S ribosomal protein L5 OS=Mycobacterium abscessus (strain ATCC 19977 / DSM 44196 / CIP 104536 / JCM 13569 / NCTC 13031 / TMC 1543) OX=561007 GN=rpIE PE=3 SV=1	106.03	3	0
38	IMDH_STRPY	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Streptococcus pyogenes OX=1314 GN=guaB PE=1 SV=2	105.26	2	1
39	RL4_PSYCK	50S ribosomal protein L4 OS=Psychrobacter cryohalolentis (strain K5) OX=335284 GN=rpID PE=3 SV=1	104.44	3	1
40	RL1_ACIAD	50S ribosomal protein L1 OS=Acinetobacter baylyi (strain ATCC 33305 / BD413 / ADP1) OX=62977 GN=rpIA PE=3 SV=1	103.25	2	0
41	DNAK_PSYCK	Chaperone protein DnaK OS=Psychrobacter cryohalolentis (strain K5) OX=335284 GN=dnaK PE=3 SV=1	100.68	2	0
42	TSP1_MOUSE	Thrombospondin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Thbs1 PE=1 SV=1	100.26	3	1
43	ANT3_BOVIN	Antithrombin-III OS=Bos taurus OX=9913 GN=SERPINC1 PE=1 SV=2	95.46	2	0
44	RL7_LACDA	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=rpIL PE=3 SV=1	94.27	3	0
45	ACON_SCHPO	Aconitate hydratase mitochondrial OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=SPAC24C9.06c PE=3 SV=2	93.03	2	1
46	VTDB_BOVIN	Vitamin D-binding protein OS=Bos taurus OX=9913 GN=GC PE=2 SV=1	92.29	3	1
47	S100B_BOVIN	Protein S100-B OS=Bos taurus OX=9913 GN=S100B PE=1 SV=2	91.99	1	0
48	DNAK_LACDA	Chaperone protein DnaK OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=dnaK PE=3 SV=1	85.42	2	0

Přílohavá tabulka VII: Všechny identifikované proteiny z povlaku tvarůžku, při jejichž analýze bylo použito činidlo 2-jodacetamid. Vyhodnoceno v programu PEAKS Studio 8.0. (pokračování)

č.	Přístupový kód	Název proteinu	Skóre	Počet peptidů	Počet modf. peptidů
49	DLDH_SCHPKO	Dihydrolipoyl dehydrogenase mitochondrial OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=dld1 PE=2 SV=2	84.98	1	0
50	HFQ_ALCBS	RNA-binding protein Hfq OS=Alcanivorax borkumensis (strain ATCC 700651 / DSM 11573 / NCIMB 13689 / SK2) OX=393595 GN=hfq PE=3 SV=1	84.76	2	0
51	RS13_RENSM	30S ribosomal protein S13 OS=Renibacterium salmoninarum (strain ATCC 33209 / DSM 20767 / JCM 11484 / NBRC 15589 / NCIMB 2235) OX=288705 GN=rpsM PE=3 SV=1	82.77	2	0
52	LDHD_LACDA	D-lactate dehydrogenase OS=Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778) OX=390333 GN=ldhA PE=1 SV=3	82.22	2	0
53	G3P1_STAEQ	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 OS=Staphylococcus epidermidis (strain ATCC 35984 / RP62A) OX=176279 GN=gapA1 PE=3 SV=1	81.34	1	0
54	RS10_CLAMS	30S ribosomal protein S10 OS=Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus (strain ATCC 33113 / DSM 20744 / JCM 9667 / LMG 2889 / C-1) OX=31964 GN=rpsJ PE=3 SV=1	78.84	2	0
55	RL7_BIFAA	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Bifidobacterium adolescentis (strain ATCC 15703 / DSM 20083 / NCTC 11814 / E194a) OX=367928 GN=rplL PE=3 SV=1	77.36	2	0
56	FIBA_BOVIN	Fibrinogen alpha chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=FGA PE=1 SV=5	76.70	1	0
57	RL33_PSYA2	50S ribosomal protein L33 OS=Psychrobacter arcticus (strain DSM 17307 / 273-4) OX=259536 GN=rpmG PE=3 SV=1	76.21	1	0
58	LALBA_PIG	Alpha-lactalbumin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=LALBA PE=1 SV=2	75.38	3	1