

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Identifikace rostlinných jaderných proteinů
získaných precipitací $MnCl_2$ pomocí hmotnostní
spektrometrie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Zdeněk Perutka
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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 jsem seznámen 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 20. 7. 2015

Bc. Zdeněk Perutka

Poděkování

Velmi děkuji panu profesoru Marku Šebelovi za vedení, trpělivost, poskytnuté cenné rady a konzultace potřebné pro tvorbu této práce. Děkuji panu doktoru René Lenobelovi za změření připravených vzorků na přístroji ESI Q/TOF a poskytnutí získaných dat.

Mé poděkování patří také všem pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a pracovníkům z katedry Biochemie PřF UP za vlídný přístup při řešení experimentální části práce.

Děkuji také své rodině za podporu během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Zdeněk Perutka
Název práce	Identifikace rostlinných jaderných proteinů získaných precipitací $MnCl_2$ pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Jádro je základní složkou eukaryotických buněk, jehož hlavní funkcí je uchovávat genetický materiál. Jádro obsahuje mnoho buněčných tělísek a struktur zapojených do metabolismu nukleových kyselin. V jádře se možná nachází také téměř čtvrtina všech buněčných proteinů. Hlavní funkcí těchto proteinů je regulace metabolismu nukleových kyselin. Nejvíce jaderných proteinů tvoří transkripční faktory a regulátory. Cílem této práce bylo otestovat metodu izolace jaderných proteinů v komplexech s nukleovými kyselinami z rostlinného extraktu srážením pomocí manganatých iontů. K tomuto účelu byly použity vypěstované týdenní etiolované semenáčky hrachu (*Pisum sativum*) a čtrnáctidenní etiolované rostlinky ovsa (*Avena sativa*). Izolované proteiny byly podrobeny enzymovému štěpení v gelu a vzniklé peptidy byly identifikovány po separaci kapalinovou chromatografií pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI TOF-TOF MS/MS a ESI Q/TOF MS/MS. Identifikované proteiny byly rozřazeny do příbuzných skupin softwarovými nástroji genové ontologie. V extraktu z ovsa byly identifikovány pouze proteinové podjednotky hojně se vyskytující ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxigenasy. V extraktech z hrachu bylo identifikováno 288 proteinů, z nichž více než 25,4 % mohlo být lokalizováno přímo v jádře. Identifikováno bylo mnoho nukleoproteinů a proteinů vázajících nukleotidy. Metodou srážení extraktu Mn^{2+} je tedy možné získat precipitát obohacený o jaderné proteiny. Rostlinný materiál ovsa byl dále využit k izolaci polyaminoxidasy s cílem charakterizovat její glykosylaci.

Klíčová slova	jaderné proteiny, nukleové kyseliny, hmotnostní spektrometrie, polyaminoxidasa
Počet stran	87
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Zdeněk Perutka
Title	Identification of nuclear proteins of plant obtained by precipitation MnCl ₂ using mass spectrometry
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2015

Abstract

The nucleus is essential component of eukaryotic cells. The main function the nucleus is to store genetic material. Cell nuclei contain many nuclear bodies and structures involved in nucleic acids metabolism. About 25 % of the total cellular proteins are predicted to be localized in the nucleus. Nuclear proteins play key roles in the fundamental regulation of genome. Most numerous group of nuclear proteins are transcription factors. The aim of this work was to test the method for isolating the nuclear proteins in complexes with nucleic acids from a plant extract, by precipitation by means manganese(II) ions. Fourteen days old plants of oats and a week-old plants of pea grown in the dark were used for this experiment. The isolated proteins were subjected to enzymatic in-gel digestion, The isolated proteins were subjected to enzymatic digestion in the gel, and the obtained peptides were separated by liquid chromatography. The isolated peptides were identified by MALDI TOF-TOF MS / MS and ESI Q / TOF MS / MS. Using a software tools for gene ontology, the identified proteins were divided into groups according to their location, function and participation in biological processes. Only protein subunits of abundant ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase were identified in the oats extract. 288 proteins were identified in extracts from pea and over 25.4% of them could be located in the nucleus. Many nucleoproteins and nucleotide-binding proteins were identified. Precipitation method using Mn(II) ions can be used to obtain a precipitate enriched with the nuclear proteins. Oat plant material was further used for the isolation of polyamine oxidase for order to characterize its glycosylation.

Keywords	nuclear proteins, nucleic acids, mass spectrometry, polyamine oxidase
Number of pages	87
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce

I. V teoretické části diplomové práce bylo cílem vypracování literární rešerše o buněčném jádře, jaderných proteinech, metodách jejich izolace, proteomice a shrnutí základních informací o polyaminoxidasach.

II. V experimentální části bylo cílem vyzkoušet metodu srážení komplexů nukleových kyselin s proteiny pomocí $MnCl_2$ na rostlinném extraktu z týdenních etiolovaných semenáčků hrachu a čtrnáctidenních etiolovaných rostlinkách ovsa.

Dalším cílem bylo tyto proteiny z vzniklého precipitátu uvolnit a identifikovat pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI TOF-TOF MS/MS a ESI Q/TOF MS/MS.

Z rostlinného materiálu ovsa zbylého po srážení pomocí $MnCl_2$ byla izolována polyaminoxidasa. Cílem práce po izolaci tohoto glykoproteinu bylo charakterizovat jeho glykosylační místo a složení sacharidové části.

Obsah

TEORETICKÁ ČÁST

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Buněčné jádro	2
2.2	Jaderná tělíska	3
2.2.1	Jadérko	3
2.2.2	Cajalova tělíska	3
2.2.3	Jaderné skvrny.....	4
2.2.4	Ostatní jaderná tělíska	4
2.3	Jaderné proteiny	4
2.3.1	Regulátory transkripce	5
2.3.2	Proteiny metabolismu RNA a DNA.....	5
2.3.3	Strukturní proteiny jádra.....	6
2.3.4	Proteiny pro jaderný transport.....	6
2.3.5	Histony	6
2.3.6	Ostatní jaderné proteiny	6
2.4	Nukleoproteiny	6
2.4.1	Nukleoproteiny virů	7
2.5	Charakter proteomu buňky a jádra	8
2.6	Izolace jader a jaderných proteinů.....	8
2.7	Izolace nukleoproteinů	10
2.8	Výsledky studia rostlinných jaderných proteinů	10
2.8.1	Arabidopsis	10
2.8.2	Kukuřice	11
2.8.3	Rýže.....	11
2.8.4	Ječmen.....	12
2.9	Podstata studia jaderných proteinů.....	12
3	Proteomika	13
3.1	Historie proteomiky	13
3.2	Oblasti užití proteomiky	14
3.3	Identifikace a určení primární struktury proteinu.....	15
3.3.1	Metody chemické sekvenční analýzy.....	15
3.3.2	Hmotnostní spektrometrie	15
3.3.3	Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií.....	16
3.4	Modifikace proteinů a analýza	17
3.4.1	Fosfoproteomika	18

3.4.2 Glykoproteomika.....	19
4 Polyaminoxidasy.....	21
4.1 Polyaminoxidasy z <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
4.2 Polyaminoxidasa z kukuřice (<i>Zea Mays</i>)	22
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
5 Materiál a přístroje.....	24
5.1 Použité chemikálie	24
5.2 Použité přístroje.....	24
5.3 Rostlinný materiál	25
6 Metody.....	26
6.1 Precipitace jaderných proteinů z rostlinného materiálu pomocí MnCl ₂	26
6.2 Extrakce proteinů z precipitátu nukleoproteinů tepelnou denaturací s Laemmliho pufrem	26
6.3 SDS-PAGE extraktů z precipitátu nukleoproteinů.....	27
6.4 Barvení gelů a jejich vizualizace.....	27
6.4.1 Klasické barvení Coomassie Brilliant Blue	28
6.4.2 Barvení koloidním roztokem Coomassie Brilliant Blue	28
6.5 Štěpení proteinů v gelu.....	28
6.6 Extrakce peptidů z gelu	29
6.7 Odsolování vzorků	29
6.8 Měření MALDI-MS	29
6.9 Separace nanoLC, příprava vzorků pro MALDI-MS a MS/MS	30
6.10 Měření MALDI-MS a MS/MS	31
6.11 Separace a měření nanoLC-ESI-MS a MS/MS.....	31
6.12 Zpracování a analýza dat.....	32
6.13 Anotace proteomických dat nástroji genové ontologie.....	32
7 Metody použité pouze ke studiu OPAO.....	34
7.1 Izolace a purifikace	34
7.1.1 Nízkotlaká iontoměničová chromatografie	34
7.1.2 Střednětlaká iontoměničová a gelová permeační chromatografie	34
7.2 Určení molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu.....	36
7.2.1 Isoelektrická fokusace.....	36
7.3 Manuální separace peptidů.....	37
8 Výsledky – jaderné proteiny	38
8.1 Izolace a extrakce jaderných proteinů	38
8.2 Identifikace proteinů izolovaných z precipitátu MnCl ₂ hmotnostní spektrometrií.....	40
8.3 Analýza identifikovaných proteinů podle genové ontologie.....	59

9	Diskuse – jaderné proteiny	62
9.1	Metoda precipitace jaderných proteinů pomocí $MnCl_2$	62
9.2	Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií	63
9.2.1	Proteiny z jádra	63
9.2.2	Proteiny buněčné stěny, cytoplasmy a mimobuněčného prostoru	64
9.2.3	Ostatní proteiny metabolismu nukleotidů a nukleových kyselin	64
9.3	Srovnání softwarových nástrojů použitých pro genomovou ontologii.....	65
10	Výsledky a diskuse - OPAO	66
11	Závěr	74
	Seznam použité literatury	76
	Seznam použitých zkratk	86

1 Úvod

Jádro je regulačním centrem buňky a úložištěm molekul, které řídí buněčnou signalizaci. Přítomnost jádra je charakteristickým znakem eukaryotických buněk. V jádře jsou uloženy chromozomy a probíhají zde důležité metabolické procesy, jako jsou replikace DNA, transkripce genů, procesy úprav RNA a vznik ribosomů. Kromě genetického materiálu jádro obsahuje řadu jaderných tělísek a struktur zahrnující jadérko, Cajalova tělíska, jaderné skvrny a další (Shaw a Brown, 2004)(Wilson a Dawson, 2011).

V jádru se je možné nalézt až čtvrtinu všech buněčných proteinů plnících zde rozmanité funkce. Největší zastoupení jaderných proteinů (NP) tvoří transkripční regulátory, strukturální proteiny jaderné laminy (Udvardi et al., 2007). Nukleoproteiny jsou proteiny, z nichž většina svou asociací k nukleovým kyselinám (NK) reguluje funkci a strukturu genů. Mezi nukleoproteiny patří například histony a transkripční faktory. Tyto proteiny jsou také zapojeny do procesů buněčné signalizace a metabolismu NK a to nejen v jádře. U virů nukleoproteiny chrání jejich genetickou informaci (Dayer et al., 2015; Zhang et al., 2012).

Pro studium jaderného proteomu jsou využívány náročné metody zahrnující získání obohacených nebo zcela izolovaných frakcí těchto proteinů přímo z jader. (Petrovská et al., 2015). Metoda izolace NP pomocí srážení komplexů NK s těmito proteiny z rostlinného extraktu ionty Mn^{2+} , proto byla testována jako možná alternativa k běžně používaným postupům.

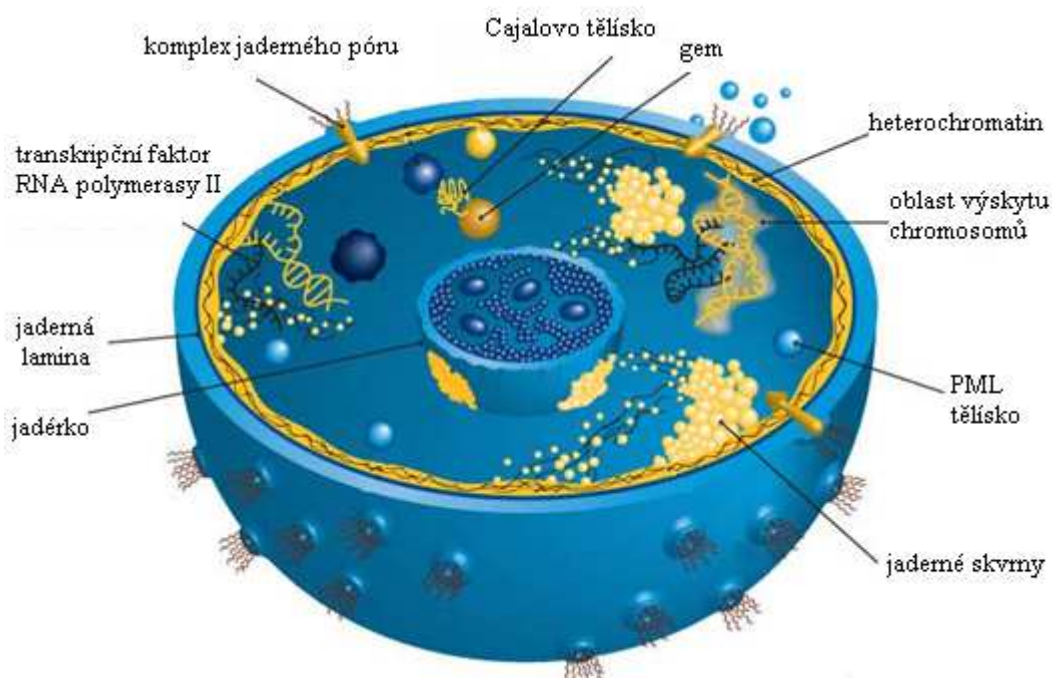
Polyaminoxidasa z ovsa setého (*Avena sativa*, OPAO) je intenzivně studovaný glykoprotein, zapojený do metabolismu polyaminů. Kompletní primární struktura OPAO není publikována. Bylo však objeveno, že obsahuje signální sekvenci pro *N*-glykosylaci (Stránská et al., 2007). Cílem práce bylo tedy zjistit, jak je tento protein glykosylovaný.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Buněčné jádro

Jádro je základní složkou rostlinných a živočišných buněk. Hlavní funkcí, rozšířenou během evoluce, je uchovávat genetický materiál oddělený od ostatních aktivních částí buňky. Tvar jádra je obvykle elipsoidní a velikostí zabírá v průměru asi 18 % celkového objemu buňky (Price et al., 1973). Poloměr velikosti jádra savců je okolo 5 μm a délka uložené DNA činí asi 2 m (Dundr a Misteli, 2001).

Jádro je organela s velmi uspořádanou a zároveň dynamickou strukturou obsahující řadu domén a jaderných tělísek zapojených do procesu replikace DNA a exprese genů (Obr. 1). Je tvořeno dvěma vzájemně propojenými částmi obsahující nukleové kyseliny a to chromatinem a jadernou matrix. Vnitřní prostor jádra je od okolí chráněn vnější a vnitřní fosfolipidovou membránou. Vnější membrána v cytosolu navazuje na endoplasmatické retikulum. Obě membrány navazují na komplexy jaderných pórů (NPC). Komplexy NPC živočichů i rostlin se skládají asi z 30 druhů proteinů nazývané nukleoporiny (Tamura et al., 2010). Velikost lidských NPC je od 80 do 130 MDa (Pascual-Garcia a Capelson, 2014). Jaderná lamina tvoří v jádru hustou proteinovou síť



Obr. 1 Jaderná tělíska a domény. Přepřacováno z abcam home page.

složenou z laminů a k nim se vážají dalších proteinů. Tyto proteiny stabilizují laminu při vazbě k chromatinu a připojují ji k vnitřní jaderné membráně (Shumaker et al., 2003). Matrix plní funkci jaderné kostry, sloužící pro uložení genomu a jeho aktivitu. Jaderná matrix je složena z jaderné laminy, komplexů jaderných pórů obklopujících jadérko a vnitřní jaderné fibrogranulární síť. Důležitými vlastnostmi jaderné matrix je odolnost proti štěpení DNAsou a její nerozpustnost při extrakci detergenty a pufrů s vysokou iontovou silou (Davey a Lord, 2003). DNA nalézající se v jádře je omotána okolo histonů a poskládána do tvaru vláken tvořící chromatin (Belmont et al., 1999). Chromatin hustě uspořádaný do formy heterochromatinu lze nalézt v okrajových částech jádra nebo v blízkosti jadérka, tedy v oblastech vykazující nízkou expresi genů. Volnější forma uspořádání chromatinu, euchromatin se naopak často vyskytuje ve volných oblastech jádra. Heterochromatin i euchromatin se v jádře stále pohybují pomocí fibrilární sítě matrix jádra, v závislosti na potřebách transkripce buňky (Calikowski et al., 2003). Velký pohyb proteinů a RNA probíhá okolo jaderných pórů. Díky organizaci jaderných proteinů je možný transport mezi jadernými kompartmenty, tvorba různých senzorů a plasticita jádra, dovolující dělení buňky. Jádro také slouží jako regulátor mnoha drah buněčné signalizace pro vjem a přenos signálů z extracelulárního i intracelulárního prostředí (Dundr a Misteli, 2001).

2.2 Jaderná tělíska

2.2.1 Jadérko

Nejdůležitější částí je jadérko, kde dochází k transkripci a procesování ribosomální RNA a jejímu začlenění do ribosomálních podjednotek před jejich exportem do cytoplazmy. Jadérko je často obaleno heterochromatinem a dochází zde k interakcím se specifickými sekvencemi DNA (Németh et al., 2010). Funkčně je jadérko zapojeno do mnoha procesů, jako vnímání stresu, stárnutí a regulace buněčného cyklu (Boisvert et al., 2007).

2.2.2 Cajalova tělíska

Cajalova tělíska, jsou organely vyskytující se volně nebo ve spojení s histony a snRNA v nukleoplasmě. Jde o shluk molekul obsahující protein coilin a faktory zapojené do biogeneze RNA (Gall, 2000). Důležitou složkou CB je „survival motor neuron protein“ (SMN), u savců nezbytný pro správnou funkci motorových neuronů. Molekuly SMN

nalézající se v nukleoplasmě v okolí CB jsou označovány jako gemy. Nefunkční SMN je příčinou onemocnění spinální svalové atrofie (Miguel-Aliaga et al., 2000).

2.2.3 Jaderné skvrny

Jaderné skvrny „speckles“ jsou útvary obsahující velké množství snRNP a dalších molekul zapojených do sestřihu mRNA. Ve formě klastrů se nalézají v jádře mimo oblasti výskytu chromatinu (Brown et al., 2008). Proteiny a jiné molekuly mohou komplex jaderných skvrn opouštět i se do něj začleňovat. Momentální lokalizace a složení skvrn odpovídá změnám transkripce mRNA.

2.2.4 Ostatní jaderná tělíska

Dalšími součástmi jádra živočišných buněk jsou „paraspeckles“ tělíska v blízkosti jaderný skvrn, objevující se v buňkách po jejich dělení bezprostředně před procesy transkripce (Fox et al., 2005). Tělíska promyelotární jaderné leukémie (PML) jejichž hlavní složkou je PML protein, působí specificky proti některým virům např. viru chřipky a potlačují růst buňky (Chelbi-Alix et al., 1998). Virová infekce je také zmiňována jako impuls pro formaci PML tělísek (Everett a Chelbi-Alix, 2007). V okolí histonových genových klastrů v S fázi buněčného dělení byly objeveny útvary nazvané tělíska histonových lokusů, obsahující faktory pro procesování histonové mRNA (Nizami et al., 2010). U rostlin byly v jádře objeveny domény obsahující fytochromy a další proteiny zapojující se do drah reakcí ovlivňovaných světlem (Ang et al., 1998).

2.3 Jaderné proteiny

Jádro obsahuje téměř všechny informace pro regulaci produkce buněčných proteinů. Možná až čtvrtina všech buněčných proteinů je lokalizována právě v jádře eukaryotických buněk a plní zde různé funkce (Kumar et al., 2002). U kvasinek tvoří jaderné proteiny 27 % z celkových proteinů v buňce (Kumar et al., 2002). Proteiny nebo celé komplexy proteinů mohou být transportovány do jádra pomocí jaderných pórů. Poté putují jádrem a hledají místa s nejvyšší afinitou pro vlastní navázání, kde mohou vykonávat svoji funkci (Dundr a Misteli, 2001). Většina proteinů je tak neustále v pohybu a v rámci jednoho místa nebo kompartmentu se zdržují nanejvýš v řádech minut (Gonzalez-Melendi et al., 2000). Tento jejich neustálý pohyb přispívá k dosažení určeného umístění pomocí difúze (Pederson, 2000). Pohyb a změny struktury jaderných tělísek, tvořených z velké části proteiny, na sebe neustále působí a ovlivňují celou organizaci prostoru jádra. Příkladem je zánik a nové uspořádání těchto tělísek během

dělení buňky (Dundr et al., 2000). Podle specifických vazebných domén a struktury NP může být určena jejich funkce a evoluční příbuznost (Fink et al., 2008).

NP zahrnují molekuly s vysokou mobilitou, jako jsou transkripční faktory, faktory pro sestřih pre-mRNA, opravné enzymy pro DNA, apoptické kaspasy a další. Při srovnání NP vyskytujících se u rostlin a živočichů byly zjištěny největší rozdíly mezi proteiny tvořícími střední filamenta jádra. Naopak proteiny účastnící se replikace a oprav DNA jsou ortologní (Narula et al., 2013).

Z celkového výčtu identifikovaných rostlinných NP je 29 % z nich zapojeno do procesů regulace transkripce a přestavby chromatinu, zatímco u živočichů tyto NP tvoří pouze 17 % jaderného proteomu. Důvodem vyššího výskytu právě těchto NP mohou být omezené možnosti rostliny přizpůsobovat se okolním vlivům z důvodu nemožnosti jejich vlastního pohybu. Metabolických dějů se u rostlin účastní okolo 42% NP (Narula et al., 2013).

2.3.1 Regulátory transkripce

Dosud nejvíce popsanou skupinu NP tvoří transkripční regulátory jako transkripční faktor TF2A. TF2A patří mezi základní transkripční faktory RNA polymerasy 2 při přepisu informace z DNA (Høiby et al., 2007). Transkripční faktory (TF) spolu s transkripčními regulátory a proteiny upravujícími strukturu chromatinu umožňují nebo zabráňují přepisu DNA (Udvardi et al., 2007). V rostlinném genomu až 7 % kódující sekvence připadá na TF, což dokazuje složitost procesu regulace transkripce u těchto organismů (Udvardi et al., 2007). Zacielení a lokalizaci TF k sekvencím genů zprostředkovávají proteiny obsažené v jaderné matrix. Proteiny matrix jádra působením na strukturu chromatinu také podporují expresi genů (Getzenberg, 1994). K významným regulačním proteinům v jádře patří histon acetyltransferasy a DNA methyltransferasy. Acetylace histonů umožňuje vyšší aktivitu transkripce. Methylace DNA znemožňuje přepis sekvencí obsahující takto modifikované C nebo A nukleotidy. Absolutní kvantifikací pomocí MS bylo zjištěno, že až 14% cytosinů u *Arabidopsis* je methylováno (Capuano et al., 2014). Regulace transkripce u živočichů i rostlin podléhá denní době dle cirkadiálního rytmu (Cavalier-Smith, 2010).

2.3.2 Proteiny metabolismu RNA a DNA

Součástí jaderného proteomu jsou také proteiny zapojené do metabolismu RNA a DNA. Mezi tyto NP jsou řazeny enzymy jako ornithinaminotransferasa,

homocysteinmethyltransferasa nebo methylenetetrahydrofolátreduktasa (Narula et al., 2013).

2.3.3 Strukturní proteiny jádra

Stabilitu struktury vnitřního prostoru jádra zajišťují laminy, hlavní komponenty jaderné laminy. Laminy lze rozdělit na 2 základní druhy: laminy typu A a typu B. Laminy typu B jsou tvořeny neustále ve všech buňkách živočichů, oproti A laminům, jejichž přítomnost je během života funkce buňky regulována (Takamori et al., 2007). K laminům se váží další protein např. MAN1 a emerin, které interagují s dalšími proteiny. Emerin najednou může být vázán k laminu, jinému strukturnímu proteinu jako je jaderný aktin nebo nesprin a k TF (Dahl et al., 2008). Aktin přítomný v jádře je zřejmě strukturně odlišný od běžného globulárního aktinu, jaderný aktin tvoří pouze krátké oligomerní řetězce polymerující do struktury nebarvitelné faloidinem (Jockusch et al., 2006).

2.3.4 Proteiny pro jaderný transport

Transport molekul dovnitř a ven z jádra přes komplexy jaderných pórů zajišťují proteiny karioferiny, vázající se na signální sekvenci přenášených molekul. Regulaci transportu zajišťuje systém Ran-GTP proteinů (Mans et al., 2004).

2.3.5 Histony

Důležitou třídu NP tvoří histony mající klíčovou roli pro udržení stability genomu. Histony jsou malé bazické proteiny, s velmi konzervativní strukturou mající charakteristickou „helix-turn-helix“ doménu tří α -šroubovic spojených smyčkami. Ze základních 5 typů, 4 tvoří základ nukleosomu, zbývající histon H1 slouží pro propojení a zhutnění struktury chromatinu (Campos a Reinberg, 2009).

2.3.6 Ostatní jaderné proteiny

V jádru byly také nalezeny chaperony, a proteiny s podpůrnou funkcí pro ostatní NP. Jadérko a ostatní jaderná tělíska obsahují mnoho proteinů asociovaných s RNA a podílejících se zpracování mRNA (Narula et al., 2013).

2.4 Nukleoproteiny

Velká část NP nebo proteinů v jádře vznikajících jsou nukleoproteiny. Nukleoproteiny (NuP) jsou hybridní molekuly, ve kterých je protein kovalentně navázán na nukleovou

kyselinu pomocí fosfodiesterové vazby na 3' nebo 5' konec řetězce DNA nebo RNA a hydroxy skupiny serinu, threoninu nebo tyrosinu daného proteinu. Mezi NuP je možné zařadit i proteiny vázající na NK se nebo interagující s nimi pouze dočasně (Zubin et al., 2002). Komplexy NuP tvoří převážnou část chromatinu a lze je nalézt ve všech živočišných i rostlinných tkáních (Chatterjea a Shinde, 2012). U vyšších organismů jsou nukleoproteiny zapojeny do udržování homeostázy DNA (Wang, 1996). Podle funkce lze NuP rozdělit do několika skupin, zahrnující polymerasy, transkripční faktory, nukleasy a další enzymy a strukturní proteiny. První skupinu NuP tvoří DNA polymerasy a RNA polymerasy katalyzující tvorbu DNA a RNA z nukleotidů. Do druhé skupiny NuP jsou zařazeny proteiny pro regulaci genů, z nichž většinu jsou transkripční faktory, velmi přesně rozpoznávající specifické sekvence DNA. Proteiny s nukleasovou aktivitou tvoří třetí skupinu NuP. Tyto enzymy hledají specifická místa na DNA a hydrolyzují fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy. Další NuP jsou zapojeny do procesů modifikace bází NK. Mezi NuP patří také chromozomální proteiny tvořící kostru chromatinu (Xiong a Sundaralingam, 2001).

2.4.1 Nukleoproteiny virů

Viry jsou obligátními parazity, kteří využívají buněčný aparát hostitele k zprostředkování vlastní replikace. NuP mají důležitou roli v procesech replikace RNA-virů, DNA-virů a bakteriofágů (Herold a Andino, 2001)(van Mansfeld et al., 1984). NuP virů primárně chrání genetickou informaci pro množení viru. U RNA virů nesoucích RNA s negativní polaritou je nukleoproteinem obalena právě molekula RNA, vzniká tak komplex nazývaný ribonukleoproteinová částice (RNP). RNP chrání RNA virů před působením nukleas hostitelské buňky a napomáhá skládání nově vzniklé RNA viru při vzniku virionů (Dayer et al., 2015). Struktura proteinové části NuP také zprostředkovává další interakci mezi zápornými náboji kostry RNA a oblastmi s kladnými náboji obsahující Lys, Arg, His nebo Gln (Albertini et al., 2006). U A viru chřipky bylo popsáno, že nukleoprotein není nezbytný pro samotnou replikaci a transkripci virové RNA, ale vystupuje zde zřejmě jako transkripční faktor (Turrell et al., 2013). Největším nukleoproteinem RNA virů je glykoprotein viru způsobujícího Ebolu složený z 739 AK s výrazně hydrofobním N-koncem a hydrofilní částí C-konce (Watanabe et al., 2006). Rostlinné DNA viry si kódují NuP, které jim umožňují transport do jádra, ale i mezi buňkami (Gafni a Epel, 2002). Jaderný člunkový protein umožňuje DNA viru vstup do jádra, díky proteinu pro endogenní transport je možná

systematická infekce okolních buněk rostliny přes plasmodesmata (Zhou et al., 2011). Oba proteiny se přímo, ale nespecificky váží k virové DNA pouze podle její velikosti a tvaru (Radhakrishnan et al., 2008).

2.5 Charakter proteomu buňky a jádra

Proteom eukaryot lze dle hodnot izoelektrických bodů obsažených proteinů rozdělit na 3 hlavní oblasti. Cytosolické proteiny s *pI* okolo 5,5, membránové proteiny kolem *pI* kolem 9 a proteiny jádra s *pI* v oblasti okolo 7 nenalézající se u prokaryot (Schwartz et al., 2001). Proteiny v jednotlivých jaderných kompartmentech se hodnotami *pI* výrazně liší. Nejvíce bazických proteinů s *pI* kolem 9,5, ale i hodnotami přes 10,5 je soustředěno v jaderných skvrnách a Cajalově tělískách. Bazická povaha proteinů právě v těchto tělískách může být opodstatněna jejich interakcí s různými RNA (Bickmore a Sutherland, 2002). Proteiny při okrajích jádra, zahrnující integrální membránové proteiny jsou naopak kyselé stejně jako většina součástí PML tělísek. V jádru a chromatinu lze nalézt proteiny jak mírně kyselé s *pI* od 5,2 po silně bazické histony a HMG proteiny (Bickmore a Sutherland, 2002).

Rozdílné hodnoty *pI* NP souvisí přímo s jejich aminokyselinovým složením. Oproti proteinům cytosolu lze v NP nalézt větší zastoupení Ser a Pro (Schwartz et al., 2001). U proteinů jaderných skvrn převažují Arg a Ser, nalézající se v doménách enzymů pro sestřih RNA (Birney et al., 1993). Membránové proteiny jádra, laminy a proteiny komplexů jaderných pórů obsahují oproti ostatním NP více nepolárních a minimum bazických AK (Bickmore a Sutherland, 2002). V proteinech chromatinu oproti Arg převažuje Lys. Modifikace reziduí Lys je rozšířeným mechanismem regulace genové exprese zprostředkované chromatinem (Roth et al., 2001).

2.6 Izolace jader a jaderných proteinů

Pro separaci a izolaci NP z rostlinného materiálu je nutné nejprve získat samotná jádra. Buněčná jádra rostlin lze získat z připravených protoplastů nebo běžných intaktních buněk izolovaných z rostlinných pletiv nebo kultur. Pro odstranění buněčné stěny je třeba použít enzymové štěpení a následně připravené protoplasty oddělit od zbylých buněk (Schirawski et al., 2000). Z tohoto důvodu se používá extrakce jader přímo z rostlinného materiálu. Izolace jader obvykle zahrnuje rozrušení pletiva a buněk, oddělení balastu centrifugací, hrubou filtraci, rozrušení membrán ostatních buněčných komponent a separaci jader gradientovou centrifugací.

Pro extrakci jader a homogenizaci výchozího materiálu se používají roztoky založené na organických pufrch jako je Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol) nebo Hepes (4-hydroxymethyl piperazin-1-ethansulfonová kyselina), stabilizující pH a zachovávající jádra v neporušeném stavu. K uvolnění jader z buněk a zabránění jejich shlukování lze použít detergenty např. Triton X-100 (Loureiro et al., 2007) dlouhodobé působení, ale může způsobit i rozklad membrány samotných jader (Carrier et al., 2011). Přídavkem sacharosy lze regulovat hustotu, pro stabilizaci chromatinu se přidávají hořečnaté ionty nebo spermin (Greilhuber et al., 2007). Pro zabránění oxidaci reziduí Cys se přidává DTT nebo β -merkaptoetanol (Sikorskaite et al., 2013).

Po extrakci jader z rostlinného pletiva se oddělí od větších složek homogenátu pomocí filtrace přes membranový filtr (póry 20-25 μ m). Po centrifugaci extraktu je získaný materiál přečištěn centrifugací v gradientu Percollu (vrstvy 40, 60, 80 % Percollu) a sacharosy. Při izolaci NP ze semen lze odstranit majoritní zásobní proteiny a škrobová zrna přepipetováním přes vrstvu bavlny (Li et al., 2008). Oddělená jádra po centrifugaci v odstředivce s výkyvným rotorem jsou obsažena v oblasti rozhraní mezi sacharosou, na dně květy a vrstvou 80 % Percollu (Henfrey & Slater, 1989). Za použití protokolu pouze s 60% Percollem a 2,5 M sacharosou za nižších otáček, je po centrifugaci jaderný materiál rozprostřen ve vrstvě Percollu nad rozhraním se sacharosou (Sikorskaite et al., 2013). Čistotu a výtěžek jader lze po obarvení suspenze propidiumjodidem nebo 4',6-diamino-2-fenylindolem (DAPI) kontrolovat fluorescenčním mikroskopem (Repetto et al., 2008); (Abdalla et al., 2010). Izolovaný jaderný materiál je možno dále, téměř dokonale separovat pomocí průtokové cytometrie (FC) s fluorescenční detekcí. Tomuto kroku však musí předcházet označení jaderné DNA pomocí interkalačních nebo na DNA specificky se vážajících barviv a odstranění interferujících fenolových látek z extraktu. Poté je možno FC získat samotná jádra ve stejné fázi buněčného cyklu bez zbytků cytoplasmy a jiného znečištění (Petrovská et al., 2014). Následujícím krokem po izolaci jader je rozrušení jaderné membrány sonikací, pipetováním nebo zahřátím a rozpuštění proteinů v lyzačním pufru s vysokým obsahem soli. Běžně jsou používány pufrы na bázi fenolu a pro následnou precipitaci aceton, metanol nebo isopropanol (Kirkland et al., 2006); (Abdalla et al., 2009). Z jaderného lyzátu se dále přidáním chloroformu vysráží RNA, která se odstraní. DNA je možno odstranit extrakcí do čistého ethanolu. Ze zbylého materiálu jsou isopropanolem vysráženy jaderné proteiny. Zbytky solí a rozpouštědel se odstraní promytím acetonem. Metodou Western blotingu za použití specifických protilátek pro jaderné a mimo

jaderné proteiny je možno zhodnotit úspěšnost purifikace. Extrakt proteinů je separován pomocí 1-D SDS-PAGE. Vzniklé linie separovaných proteinů jsou pak vhodně rozděleny na menší části a zpracovány pro analýzu hmotnostní spektrometrií (Abdalla et al., 2012; Repetto et al., 2012).

2.7 Izolace nukleoproteinů

Metody izolace NuP a následné identifikace proteinové složky mohou být založeny na interakci proteinu a specifické sekvence NK. Fragment NK je použit jako próba pro navázání interagujícího proteinu a pokud dojde k vazbě je komplex detekován metodou porovnání elektroforetické mobility (Ho et al., 2006). Proteinovou část NuP lze nespecificky izolovat fenol-chloroformovou extrakcí, kdy dojde k oddělení obou složek (Siebert a Chenchik, 1993). Pro efektivní izolaci proteinů z chromatinu byla publikována metoda modifikované imunopurifikace využívající magnetické částice pokryté molekulami králičím IgG (Lambert et al., 2009). Zachycená DNA i s komplexy NuP je oddělena z buněčného lyzátu pomocí magnetu, následně degradována použitím nukleas, oddělena jako sediment a supernatant s uvolněnými proteiny je analyzován MS. Velmi vyspělou metodou je použití magnetických karbonových nanotrubiček. Díky silné hydrofobní interakci mezi DNA a atomy uhlíku tvořící nanotrubičky lze tuto metodu využít na lyzáty celých buněk při zachování vyšší jak 90% účinnosti zachycení molekul nukleových kyselin a tedy i NuP (Zhang et al., 2012). Nanotrubičky lze navíc aplikovat i do živých buněk (Zhang et al., 2013).

2.8 Výsledky studia rostlinných jaderných proteinů

Dosavadní studium jaderného proteomu rostlin se zaměřovalo na histony, fosfoproteiny a změny přítomnosti NP v jádře v závislosti na působení různých stresových faktorů. Studie NP byly zaměřeny hlavně na rýži a experimenty na *Arabidopsis thaliana*. Pozornost se ale postupně přesouvá i k dalším důležitým plodinám jako jsou ječmen a kukuřice. Z dalších významných rostlin byly popsány některé NP rajčete (Wang et al., 2014), cizrny (Pandey et al., 2006; (Kumar et al., 2014), odolné africké byliny *Xerophyta viscosa* (Abdalla a Rafudeen, 2012) a tolíce pobřežní (*Medicago truncatula*) (Repetto et al., 2008). Studován byl také jaderný proteom sóji (Cooper et al., 2011).

2.8.1 Arabidopsis

První komplexní analýzou jaderného proteomu za použití MALDI-MS bylo identifikováno 158 proteinů po separaci 2DE zvláště v kyselá a bazická oblasti, přičemž

většina se nacházela v gelu s pH v rozmezí 4-7. Z nalezených proteinů bylo přes 39 % funkčně zapojeno do procesů přenosu signálu a regulace genů. Množství a výskyt identifikovaných proteinů byl pomocí softwaru pro porovnání 2D gelů srovnán s výsledky získanými při vystavení rostlin teplotnímu stresu, teplotě 4 °C po dobu 6 h (Bae et al., 2003). Z izolovaných jaderek s buněčné kultury *A. thaliana* bylo po jejich lýze identifikováno 217 proteinů. Podle předpokladů byla největší část z nich zapojena do procesů translace, transkripce funkcí souvisejících s ribozomy (Pendle et al., 2005). V jaderné matrix *A. thaliana* bylo identifikováno 36 proteinů (Calikowski et al., 2003). Analýzou fosfoproteomu bylo identifikováno 345 proteinů a 416 fosfopeptidů. Funkce pětiny z těchto proteinů byla dána do souvislosti s DNA (Jones et al., 2009). Sakamoto a Tagaki v rámci studie morfologie jader v oddělené lamině našli 660 proteinů (Sakamoto a Takagi, 2013). Téměř pro ¼ z nich byla softwarově dedukována spojitost s ribozomy. Extrakcí NP asociovaných s chromatinem z jaderné laminy bylo identifikováno 685 proteinů a 198 fosfoproteinů (Bigard et al., 2014).

2.8.2 Kukuřice

Dosavadní studium jaderného proteomu kukuřice bylo úzce zaměřeno na histony (Casati et al., 2008); (Kalamajka et al., 2010). Pro mutovaný druh byla popsána jedna srovnávací studie zaměřená na morfologii listů a změny v obsahu NP. Po izolaci jader gradientovou centrifugací se po separaci 2DE podařilo identifikovat 163 různých proteinů, z nichž 25 % je spojeno s funkcí RNA. Byly také zjištěny PTM identifikovaných proteinů. Třemi nejčastějšími úpravami byly fosforylace, acetylace a metylace (Guo et al., 2014).

2.8.3 Rýže

Rýže je jednou z nejintenzivněji studovaných hospodářských rostlin. Za použití Edmanovy degradace a MS bylo v roce 2004 identifikováno 190 NP. Podle funkční anotace bylo 29 % těchto NP zapojeno do procesů přenosu signálu a regulace genů. Pro 26 % NP však nebyla přiřazena žádná funkce, což může znamenat, že nejde o proteiny vyskytující se v jádře (Khan a Komatsu, 2004). V chromatinu z jader rýže bylo identifikováno 269 proteinů, mnohé z nich ve více formách (Tan et al., 2007). V jaderném extraktu z endospermu po zbavení se abundančních zásobních proteinů bylo identifikováno 468 NP (Li et al., 2008). Po izolaci jader jejich lýzou a použitím DNA afinitní chromatografie bylo identifikováno 307 proteinů asociovaných s DNA (Aki a

Yanagisawa, 2009). Dále bylo nalezeno 109 a 83 NP rýže jejichž obsah se měnil po vystavení vodnímu stresu (Choudhary et al., 2009); (Jaiswal et al., 2013). 382 NP bylo identifikováno v práci sledující změny v obsahu NP po narušení buněčné stěny (Mujahid et al., 2013).

2.8.4 Ječmen

Neméně důležitou hospodářskou plodinou je ječmen. Již v 70. letech byly sledovány změny v jaderném fosfoproteomu této plodiny během klíčení (Trewavas, 1976). První moderní studii je komplexní analýza jaderného proteomu ječmene z jader v G1 fázi buněčného cyklu. Pomocí MS bylo identifikováno 803 proteinů (Petrovská et al., 2014). Tento přístup využívající k izolaci jader průtokové cytometrie je zřejmě první komplexní studií rostlinného proteomu využívající tuto metodu. Hlavní výhodou tohoto přístupu je eliminace kontaminace izolovaných jader materiálem z ostatních buněčných struktur.

2.9 Podstata studia jaderných proteinů

Komplexní informace o rostlinných NP jsou důležité v souvislosti s organizací, regulací funkcí jaderného genomu (Zhang et al., 2012)(Narula et al., 2013). K získání ucelených informací o jeho funkci a struktuře je možné využívat systematického přístupu analýzy jaderného proteomu. K tomu mohou přispět proteomické studie zaměřené na jednotlivé jaderné kompartmenty a srovnávací studie podávající informace o NP v závislosti na fázi buněčného cyklu a typu buněk, ze kterých jsou jádra izolována (Petrovská et al., 2015; Lambert et al., 2009).

3 Proteomika

Proteomika je obor zabývající se systematickým studiem proteinů v biologickém vzorku. Přístupy proteomiky vedou k porozumění a popisu struktury a funkce proteinů v biologickém kontextu na základě výsledků získaných jejich paralelním studiem různými metodami. Název oboru proteomika je vytvořen analogicky po vzoru názvu studia genů „genomika“ (James, 1997). Pojem proteom byl poprvé použit jako označení pro soubor všech proteinů organismu, odpovídající informacím genomu, přítomných za daných podmínek (Wilkins et al., 1996). Oproti statické informaci genomu je proteom aktuálním odrazem stavu buňky. Podle momentálního stavu je proteom dynamicky obměňován s čímž je třeba při studiu počítat a zohlednit aktuální stav vnějšího i vnitřního prostředí buňky a dalších vlivů. Proteomika kromě metod identifikace jednotlivých proteinů zahrnuje i studium protein-proteinových interakcí nebo modifikací proteinů a metody jejich lokalizace. Cílem proteomiky je také vytvářet kompletní mapy výskytu proteinů. Pro tyto potřeby je proto třeba zapojení mnoha disciplín od molekulární biologie, přes biochemii po bioinformatiku.

3.1 Historie proteomiky

Za první proteomické studie je možné označit experimenty spojené se začátky využívání dvourozměrné elektroforézy pro separaci proteinů v 70. letech 20. století. Metoda 2D elektroforézy byla hlavním invencí při vzniku proteomiky. Pomocí této metody je možné rozlišit tisíce proteinů pomocí jedné analýzy (O'Farrell, 1975). Použitím velkoformátového gelu bylo rozděleno dokonce více než 10 000 polypeptidů (Klose a Kobalz, 1995). Problém však představovala jejich identifikace. Dostupnou metodou byla Edmanova degradace, ta ale byla omezena množstvím vzorku potřebného pro analýzu (Edman a Begg, 1967). Data o identifikovaných proteinech byly shromažďována a začali vznikat první databáze proteinových sekvencí. Výrazným pokrokem byla automatizace, převedení procesu Edmanovy metody do mikrouspořádání v 90. letech a možnost sekvencovat peptidy v pikomolární koncentraci (Colilla et al., 1991); (Miyashita et al., 2001).

Zásadním zlomem v identifikaci proteinů bylo zavedení hmotnostní spektrometrie do proteomiky. Citlivost přístrojů postupně převýšila možnosti Edmanovy metody a výrazně se urychlil proces jejich identifikace (Henzel et al., 1993). Rozvoji proteomiky také napomohl vývoj nových sekvencovacích metod molekulární biologie.

Informace z genomových databází, se pak staly základem pro identifikaci proteinů (Graves a Haystead, 2002).

3.2 Oblasti užití proteomiky

První oblastí aplikace proteomiky je identifikace, což lze chápat jako vytvoření databáze proteinů odpovídající informaci genomu jednotlivých organismů. Produkty genů lze díky využití softwarových metod předpovědět, výskyt intronů a posttranslačních modifikací však situaci komplikuje (Pandit et al., 2004). Identifikace produktu genu je tak i důkazem o jeho existenci (Tress et al., 2008).

Druhou oblastí využití proteomiky je sledování přítomnosti a srovnávání produkce jednotlivých proteinů v buňkách nebo tkáních za různých podmínek. Vznik daného genového produktu je rovněž možné monitorovat sledováním přítomnosti odpovídající mRNA (Gygi et al., 1999). Alternativní metody splicingu a úprav mRNA před translací však mohou vést k tvorbě různých isoform daného proteinu (i biologicky neaktivních) nebo produkt nemusí vzniknout vůbec. Aplikace tohoto přístupu proteomiky je také nutná při analýze tělních tekutin. Změny ve složení proteomu za daných podmínek mohou např. sloužit jako markery pro diagnostiku při stavu onemocnění (Tress et al., 2008).

Další oblastí studia proteomiky je funkční analýza proteinů. Funkci proteinů lze pomocí modelování a srovnání jejich AK sekvencí částečně predikovat (Pandit et al., 2004). Některé vlastnosti je, ale možné odhalit až z informací o prostorové struktuře proteinů (Hegyí a Gerstein, 1999).

Významná je aplikace proteomiky ke studiu posttranslačních modifikací proteinů. Úpravy proteinů po jejich syntéze mohou vznikat jako odpověď na různé intra i extracelulárními podněty. Použitím proteomických metod je možné na buněčné úrovni tyto změny sledovat a to i u více proteinů současně (Mann a Jensen, 2003).

Cílem proteomiky je také lokalizace proteinů uvnitř buňky. Výskyt proteinů v daném místě je důležitým regulačním mechanismem a umístění v rámci buňky má vliv na funkci (Geda et al., 2008). Lokalizací proteinů tak lze získat další informace o možnostech jejich regulace a prakticky je využít např. pro léčebné účely (Hung and Link, 2011).

Vzájemné interakce proteinů a jejich ovlivňování je součástí mnoha životně důležitých dějů v buňce (Berggård et al., 2007). Nalezení propojení mezi interagujícími proteiny je proto také zájmem studia proteomiky.

3.3 Identifikace a určení primární struktury proteinu

Sekvence aminokyselin tvoří primární strukturu proteinů. Podle sekvence AK lze také předpovídat možnosti skládání a prostorové uspořádání proteinů, což je důležité pro pochopení jejich funkcí. Z informací o primární struktuře je možné určit i další vlastnosti proteinů. Dle přítomnosti AK lze určit hodnotu izoelektrického bodu (Bjellqvist et al., 1993), přítomnost hydrofobních aminokyselin může odkazovat na zařazení proteinu do membrány (Chen a Rost, 2002). Pro určení primární struktury lze využít následující metody uvedené v přehledu.

3.3.1 Metody chemické sekvenční analýzy

Před zařazením MS do proteomiky byly proteiny separované pomocí 2D elektroforézy sekvencovány chemicky metodou Edmanovy degradace. Tento přístup však mohl být využit pouze pro proteiny případně, peptidy s volným *N*-koncem řetězce. První AK sekvenci peptidu publikovali roku 1951 F. Sanger a H. Tuppy. Vlastní metodou peptidového sekvencování, přesněji značení *N*-koncových aminokyselin, pomocí dinitrofluorbenzenu, se jim podařilo identifikovat všechny AK tvořící *B*-řetězec hovězího insulinu (Sanger a Tuppy, 1951). Dalším přínosem zmíněné práce byl popis využití proteolytických enzymů ke štěpení peptidového řetězce za použití informací ze starší publikované práce popisující jejich specifickou. Do té doby nebyly tyto vlastnosti ověřeny a kromě degradační funkce proteas se předpokládala i jejich schopnost tvorby peptidů (Stretton, 2002). Jednotlivé AK byly při jejich experimentu prvně identifikovány po nespecifickém chemickém štěpení peptidového řetězce. Pořadí a sekvence všech 30 AK byla určena až po specifickém štěpení trypsinem a chymotrypsinem.

Podobným přístupem je postupného odštěpování AK z *N*-konce peptidů podle P. Edmana (Edman a Begg, 1967). Metoda Edmanovy degradace spočívá v reakci koncové aminoskupiny peptidu s fenylisothiokyanátem a po konverzi produktu její odštěpení ve formě cyklického fenylthiohydantoinového derivátu, který je detegován chromatograficky. Dle retence v chromatogramu je určena příslušná AK. Takto se celý proces automaticky opakuje až je přečtena celá sekvence peptidu.

3.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je jedním z nejdůležitějších nástrojů pro analýzu chemického složení látek a v proteomice pro identifikaci proteinů. Principem této techniky je

separace a detekce ionizovaných molekul analytu dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Analýza proteinů hmotnostní spektrometrií byla umožněna a rozšířena s vynálezy šetrných ionizačních technik aplikovatelných na makromolekuly, a to bez jejich fragmentace.

První z těchto technik je desorpční ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)(Karas a Hillenkamp, 1988); Tanaka et al., 1988). Při této metodě je analyt smíchán s matricí, kterou je většinou malá organická molekula obsahující chromofor absorbující UV světlo. Směs je nanesena na nosič (nejčastěji kovová destička). Ten je po kokryslalizaci analytu s matricí umístěn iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Vzorek je poté ve vakuu ozářen paprskem laseru čímž dojde k odpaření jeho části a ionizaci molekul analytu předáním protonu z molekul matrice. Tímto procesem obvykle vznikají jednonásobně pozitivně nabitě molekuly peptidu či intaktních proteinů.

Druhou technikou je ionizace elektrosprejem (ESI) (Fenn et al., 1989). Tato technika se dá použít pro vzorek ve formě roztoku – např. rozpuštěný v mobilní fázi jako eluát z chromatografu. Vzorek je ionizován na výstupu z kapiláry, na níž je aplikováno velmi vysoké napětí. Roztok je tak v ústí kapiláry sprejován pod napětím do tvaru kužele. Kapičky roztoku jsou přitom sušeny proudícím plynem, čímž dochází k jejich zmenšování. Těkavé rozpouštědlo sloužící jako nosič pro analyt se rychle vypařuje a ve zmenšujících se kapičkách zůstávají molekuly analytu. Jakmile odpuzivé síly mezi molekulami překonají povrchové napětí, kapička praskne a uvolní se nabitě molekuly analytu, které jsou směřovány do analyzátoru hmotnostního spektrometru (Kearle a Verkerk, 2009).

3.3.3 Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

V proteomice se používají dvě základní strategie pro identifikaci proteinů. První a starší přístup se označuje jako „bottom-up“ proteomika, kdy analytem jsou peptidy vzniklé specifickým proteolytickým štěpením, typicky trypsinem, původně z jednoho proteinu nebo směsi. Oproti tomu „top-down“ metodou se identifikují úseky sekvencí přímou fragmentací intaktních proteinů v hmotnostním spektrometru (Resing a Ahn, 2005).

Metodou „bottom-up“ jsou informace o celých proteinech získávány nepřímo z identifikovaných peptidů většinou menších než 2 kDa (Laskay et al., 2014). Principem je například porovnání experimentálně zjištěných hodnot molekulové hmotnosti získaných peptidů s predikovanými hmotnostmi peptidů vytvořených teoretickým

štěpením každého proteinu v databázi (Henzel et al., 1993). Tento přístup je označován jako peptidové mapování nebo „peptide mass fingerprinting“. Při analýze směsi peptidů původně z více proteinů se štěpených bez separace najednou se příslušný přístup proteomiky označuje jako „shotgun“ metoda (Wu a MacCoss, 2002). Tyto složité peptidové směsi se ale musí separovat kapalinovou chromatografií. Každý peptid vzorku je v ideálním případě izolován a charakterizován tandemovou MS, kdy jsou prekurzorové peptidové ionty fragmentovány a hmotnosti fragmentů jsou zaznamenány. Podle sekvencí získaných čtením hmotnostních diferencí specifických řad fragmentů jsou pak identifikovány výchozí proteiny (Marcotte, 2007).

Přístup „top-down“ proteomiky je potenciaálně výhodnější jako zdroj informací o proteinu včetně možných posttranslačních modifikací a rozlišení jeho isoform dle znalosti jejich přesné molekulové hmotnosti. Nevýhodou oproti „shot-gun“ přístupu je zde nutná příprava čistých intaktních proteinů v dostatečné koncentraci pro fragmentaci v hmotnostním spektrometru (Gregorich et al., 2014).

Kompromisem mezi oběma zmíněnými přístupy může být analýza velkých peptidů získaných použitím specifických proteas např. membránové proteasy T (Wu et al., 2012). Vzniklé peptidy větší než 3 kDa je možné efektivně separovat LC a dle hmotností odlišit blízké isoformy proteinů a identifikovat modifikace (Garcia, 2010). Tento poměrně nový přístup je označován jako „middle-down“ proteomika.

3.4 Modifikace proteinů a analýza

Počet proteinů u všech organismů je vyšší než počet jejich genů. Nelze tedy každému genu přiřadit právě jeden protein. Příkladem může být člověk, kdy na asi 20 000 genů připadá více než 500 000 proteinových isoform (Pray, 2008). Počet genů *A. thaliana* je také okolo 25 000 a předpokládá se výskyt asi 35 000 proteinů. (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Důvody nepoměru mezi počtem genů a proteinů je způsoben úpravami genové sekvence a vznikem odlišné mRNA tzv. sestřihem „splicing“ (Tress et al., 2008). Další z hlavních příčin jsou posttranslační (= spíše kotranslační modifikace) modifikace proteinů, k nimž dochází během nebo po procesu přepisu mRNA do AK sekvence proteinu. Posttranslační modifikace jsou důležité pro stabilitu a funkci proteinů. Úpravou proteinu (např. enzymu) lze ovládat metabolické procesy nebo označit protein k degradaci. Nejběžnějšími modifikacemi proteinů jsou fosforylace, glykosylace, vazba ubikvitinu, methylace, hydroxylace, karbonylace a pro membránové proteiny přidání molekuly lipidu k jejich C-konci (Walsh et al., 2005). U mnoha

proteinů dochází k modifikaci enzymovou přeměnou aminokyseliny v řetězci např. Gln za Glu nebo Arg za citrulin (Potempa, 2012). Některé proteiny k dosažení funkčního stavu podléhají řízenému štěpení např. prekursor insulinu, molekuly obsahující odstranitelnou vloženou sekvenci inteinu nebo enzymy ve formě zymogenů (Walsh et al., 2005).

3.4.1 Fosfoproteomika

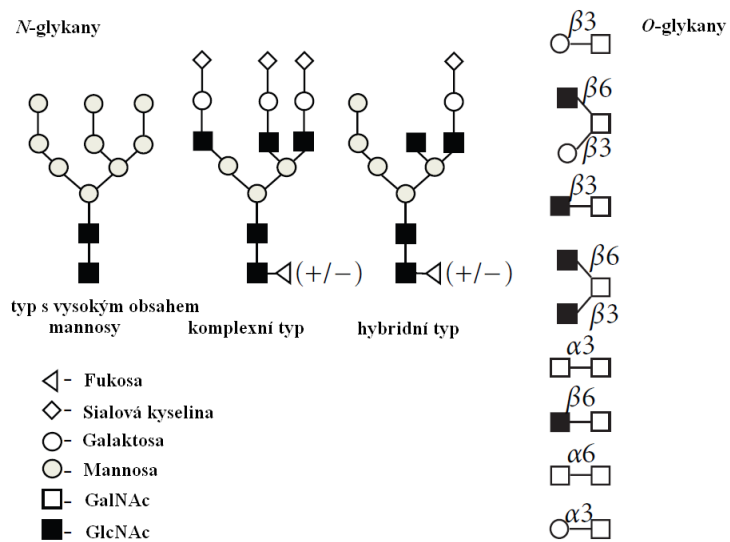
Fosforylace je jednou z nejvíce studovaných modifikací proteinů. Fosforylace je nezbytná pro funkci mnoha proteinů zapojených důležitých buněčných dějů, jako je přenos signálu, metabolismus, vývoj a kontrola buněčného cyklu aj. Primární úlohou fosforylace je podle aktuální potřeby buňky reversibilně aktivovat nebo deaktivovat různé buněčné procesy (Hunter, 1995). Fosfoproteomika studuje proteiny modifikované přidáním fosfokupin nejčastěji na Thr, Ser, Tyr proteinu u eukaryot nebo Asp, His u prokaryontních organismů (Chao et al., 2014). Proteiny mohou být fosforylovány na více místech současně a protein tak získává negativní náboje. Přidání fosfátu na molekulu proteinu zprostředkovávají proteinkinasy, odstranění se děje za účasti fosfatas (Walsh et al., 2005). Výskyt a místa fosforylace jsou identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie při srovnání hmotností získaných fragmentů peptidů s databázemi sekvencí. Výskyt fosfátu se ukáže jako definovaný hmotnostní rozdíl, typicky 80 nebo 98 Da pro 1 fosfokupinu. Hmotnostní rozdíl 80 Da odpovídá odštěpení HPO_3 , při možném následném odštěpení H_2O je hmotnostní rozdíl 98 Da (Nilsson, 2012). Pro přípravu vzorků pro analýzu fosfoproteinů se využívá různých metod. *In vitro* lze fosfoproteiny značit vnesením isotopu se značkou přímo do fosfokupiny nebo vazbou na ni. *In vivo* mohou být proteiny značeny zabudováním izotopově značené AK do sekvence. Obohacení vzorku lze provést na úrovni peptidů nebo celých proteinů. K izolaci fosfoproteinů se používá afinitní chromatografie s protilátkami k fosfotyrosinu (Rush et al., 2005) nebo chromatografických metod využívajících materiály na bázi oxidů nebo hydroxidů např. TiO_2 respektive AlOH_3 . Obě tyto látky jsou v kyselém prostředí kladně nabitě a mohou vázat záporné fosfokupiny proteinů (Larsen et al., 2005). Pro analýzu fosfopeptidů se používá chelatační chromatografie využívající imobilizovaných kovových iontů (IMAC). Běžnými chelatačními ligandy jsou kyselina iminodioctová (IDA) nebo nitriltrioctová (NTA). Imobilizovanými kovovými ionty bývají Fe^{2+} , Zr^{4+} nebo Ga^{3+} (Delom a Chevet, 2006).

3.4.2 Glykoproteomika

Glykosylace je běžná postranslační modifikace vyskytující se až u poloviny všech známých proteinů (Apweiler et al., 1999). Glykosylované proteiny, glykoproteiny studuje glykoproteomika. Glykoproteiny se skládají z 2 složek, samotného proteinu a cukerné složky. Hmotnost sacharidů přitom vzhledem k celému proteinu může být až 80 % (Inoue a Iwasaki, 1980). Převažuje-li obsah sacharidů, lze tyto látky označit jako proteoglykany. Sacharidová složka bývá k proteinu vázána přes volný dusík Asn, nebo kyslíkový atom hydroxyskupiny Ser a Thr. Lze tak rozlišit dvě hlavní skupiny *N*- a *O*-vázané glykoproteiny (Spiro, 2002)(Obr. 2). Existují však i glykoproteiny obsahující oba typy vazeb např. lidský glykoforin A (Remaley et al., 1991). Dosud bylo identifikováno 11 monosacharidů a nejméně 16 enzymů, které katalyzují vznik glykopeptidové vazby mezi těmito monosacharidy a proteinem (Spiro, 2002). Podle složení a větvení cukerného řetězce zprostředkovává glykan různé funkce. Přítomnost glykanu může být nezbytná pro správné složení proteinu a jeho funkci, glykan může svoji přítomností chránit proteinovou část před působením proteas nebo může sloužit jako identifikační značka a zprostředkovávat mezibuněčnou interakci (Lauc a Zoldoš, 2010). Nejběžnějším druhem *O*-glykosylace je vazba *N*-acetylglukosaminu (*O*-GlcNAc), *N*-acetylgalaktosaminu (*O*-GalNAc) ve formě monomeru nebo oligomeru, k nimž se poté mohou vázat další monosacharidové jednotky (Roth et al., 2012). V případě *N*-glykosylací může být složení a tvar glykanového řetězce mnohem rozmanitější. Společným rysem u eukaryot je přítomnost výchozího oligosacharidu Glc₃-Man₉-GlcNAc₂, který je dále upravován dle potřeby (Schwarz a Aebi, 2011). U rostlin se nejběžněji vyskytují 2 typy *N*-glykosylací: první jsou glykany se strukturou s 5-9 mannosovými jednotkami, druhým typem jsou komplexní glykany vzniklé odtržením a nahrazením mannosových jednotek jinými (Rayon et al., 1998).

Metody glykoproteomiky využívají podobného přístupu jako v případě fosfoproteomiky. Pro afinitní chromatografii se jako ligandy využívají rostlinné lektiny, specificky se vážající k sacharidům cukerné složky. V případě analýzy vzorků s větším výskytem *O*-glykanů lze použít aglutinin z pšeničných klíčků, který dobře váže glykany komplexního typu (Bunkenborg et al., 2004). Pro odštěpení celého cukerného řetězce se používá amoniak, hydrazin nebo specifické glykosidasy (Rademaker et al., 1998); (Roth et al., 2012). Sacharidové řetězce glykoproteinů nebo glykopeptidů je možné enzymově (tedy specificky) štěpit a určit obsah, pořadí a větvení jednotlivých

monosacharidových jednotek. Identifikace a štěpení sacharidové části lze použitím fragmentačních metod PSD nebo CID provádět i přímo v hmotnostním spektrometru (Sickmann et al., 2002).



Obr. 2 Přehled základních typů N- a O- glykanů

4 Polyaminoxidasy

Polyaminoxidasy (PAO, EC 1.5.3.13, EC 1.5.3.14, EC 1.5.3.15, EC 1.5.3.16, EC 1.5.3.17) jsou jednou ze dvou skupin enzymů katabolické přeměny polyaminů (PA). Druhou skupinu tvoří aminoxidasy obsahující měď (CuAO, EC 1.4.3.21, EC 1.4.3.22). CuAO mají dimerní strukturu a každá podjednotka obsahuje 1 atom mědi a 2,4,5-trihydroxyfenylalaninichinon jako organický kofaktor (Rosaria Medda, 1996). PAO se vyskytují ve formě monomerů. Kofaktorem PAO je nekovalentně vázaný flavin adenin dinukleotid (FAD). PAO dle typu katalyzují terminální reakci odbourání nebo reakci tzv. zpětné přeměny PA. Substráty rostlinných POAS jsou polyaminy, zvláště spermin a sperminidin (SPM, SPD)(Federico et al., 1990), které jsou při terminálním štěpení oxidovány na vnitřním dusíku N4. Produkty těchto reakcí jsou 4-(3-aminopropylamino)butanal pro SPM nebo 4-aminobutanal pro SPD. Současně také vzniká 1,3-diaminopropan a peroxid vodíku. Při zpětné přeměně polyaminů některými PAO vzniká ze SPM nebo thermosperminu kratší SPD respektive thermospermidin (Tavladoraki et al., 2006). Může probíhat i přeměna SPD na putrescin (PUT)(Ono et al., 2011).

Podle fylogenetického srovnání existuje 5 příbuzných větví rostlinných PAO lišících se substrátovou specifičností a buněčnou lokalizací (Liu et al., 2014a). Enzymy první větve preferují oxidaci thermosperminu, jsou lokalizovány v cytosolu (Takahashi et al., 2010) a byly nalezeny pouze u dvouděložných rostlin (Ono et al., 2011). Do druhé větve patří PAO z apoplastu, periferie buněk, odvozené od jednoděložných rostlin, některé pouze s minimální aktivitou za fyziologických podmínek (Liu et al., 2014b). Třetí skupinou jsou cytosolické enzymy katalyzující částečnou zpětnou přeměnu PA (Liu et al., 2014c). Čtvrtou větev tvoří PAO plně zapojené do zpětné konverze PA nalézající se v peroxisomech (Moschou et al., 2008). Zástupcem 5. větve PAO je pouze VvPAO6 z révy vinné (Agudelo-Romero et al., 2013).

Jako modelové organismy pro studium rostlinných PAO slouží *Arabidopsis thaliana*, pro dvouděložné a *Oryza sativa*, jako zástupce jednoděložných rostlin (Fincato et al., 2011); (Liu et al., 2014b). Dále byly zkoumány PAO z kukuřice, ječmene, ovsu a tabáku (Federico et al., 1989b); (Federico et al., 1990); (Radová et al., 2001)(Cervelli et al., 2006);(Yoda et al., 2006); (Stránská et al., 2007). Genová studie byla provedena pro POA v pomerančovníku (Wang a Liu, 2015).

4.1 Polyaminoxidasy z *Arabidopsis thaliana*

V genomu *Arabidopsis* bylo nalezeno 5 genů pro PAO označených *AtPAO1* – *AtPAO5*. Produkty genů *AtPAO2*, *AtPAO3* a *AtPAO4* se nacházejí v peroxisomech a umožňují zpětnou přeměnu i degradaci PA (Kamada-Nobusada et al., 2008). Tyto PAO se liší substrátovou specifičností přičemž *AtPAO2* a *AtPAO3* přeměňují SPM na SPD a SPD na PUT. U *AtPAO4* bylo detekcí reakčních produktů zjištěna 40 krát větší katalytická aktivita při přeměně SPM než SPD (Fincato et al., 2011). *AtPAO1* je cytosolický enzym vykazující nejvyšší katalytickou aktivitu pro zpětnou konverzi thermosperminu (Fincato et al., 2011) a zjištěna byla také nízká aktivita při terminální degradaci SPM na diaminopropan (Tavladoraki et al., 2006). Lokalizace v cytosolu je předpokládána i pro *AtPAO5*, která je thermosperminoxidase. Tato vysoká substrátová preference může být vysvětlena společnou produkcí tohoto enzymu s thermosperminsynthasou (Kim et al., 2014).

4.2 Polyaminoxidasa z kukuřice (*Zea Mays*)

Nejlépe prostudovaným enzymem této rodiny je kukuřičná PAO, pro niž byla určena jak primární tak terciální struktura. Enzym izolovaný ze semen kukuřice (MPAO) má monomerní strukturu glykoproteinu s molekulovou hmotností 53 kDa (Federico et al., 1989a), přičemž 2,5 – 3 % této hodnoty tvoří cukerná složka s hlavním podílem arabinosy (Suzuki a Yanagisawa, 1980); (Federico et al., 1989a). Místem *N*-glykosylace je Asn-105, což odpovídá pozici 77 bez započtení signální sekvence (Tavladoraki et al., 1998). Počátek větveného cukerného řetězce tvoří 2 *N*-acetyl-D-glukosaminy, fukosa a 2 manosové zbytky (Fiorillo et al., 2011). Molekula enzymu ve struktuře obsahuje 1 FAD (Suzuki a Yanagisawa, 1980). Protein tvoří 500 AK z nichž prvních 28 na N-konci slouží jako signální peptid pro extracelulární lokalizaci (Tavladoraki et al., 1998). Vyšší obsah lysinu v AK sekvenci má podíl na bazicitě MPAO (Suzuki a Yanagisawa, 1980). Více jak 90% proteinu bylo nalezeno ve vazbě na buněčnou stěnu, což zřejmě souvisí s jeho předpokládaným zapojením do procesů jejího zpevnování a lignifikace (Angelini et al., 1995). Pro MPAO byly nalezeny 3 velmi podobné geny, které původně zřejmě vznikly duplikací 1 původního genu (Cervelli et al., 2000). V prostorové struktuře obsahuje MPAO 13 alfa-helixů a 19 beta-vláken tvořících 2 domény tohoto enzymu (Binda et al., 1999). Charakteristickým rysem struktury MPAO je katalytický tunel ve tvaru písmene U dlouhý 30 Å, jehož koncová spodní část je umístěna v přední části isoalloxazinového kruhu flavinu a utváří katalytické centrum (Binda et al., 1999).

Experimentální část

5 Materiál a přístroje

5.1 Použité chemikálie

β -merkптоethanol (Sigma Aldrich, Německo), acetonitril (Merck Millipore, Německo), akrylamid/bisakrylamid (Sigma Aldrich, USA), APS (Fluka, Švýcarsko), Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, ČR), DNAsa1 (Sigma Aldrich, Německo), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, ČR), glycerol (Lach-Ner, ČR), glycin (Sigma Aldrich, Německo), H_3BO_3 (Sigma Aldrich, USA), HCl (Lach-Ner, ČR), isopropanol (Merck, Německo), jodacetamid (Sigma Aldrich, USA), K_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Německo), K_2SO_4 (Lachema, ČR), KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Německo), kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, Německo), kyselina octová (Sigma Aldrich, Německo), kyselina trihydrogenfosforečná (Sigma Aldrich, Německo), kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA, Bruker Daltonik, Německo), Laemmliho vzorkový pufr (Bio-Rad, USA), methanol (Merck, Německo), MgCl_2 (Fluka, Švýcarsko), $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, ČR), močovina (Sigma, Aldrich, USA), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, USA), NaNO_3 (Lachema, ČR), n-butanol (Sigma Adrich, USA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck Millipore, Německo), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Sigma Aldrich, Německo), NH_4HCO_3 (AMBIC, Sigma Aldrich, Německo), octan zinečnatý (Lachema, ČR), Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik, Německo), SDS (Serva, Německo), síran amonný (Merck, Německo), směs amfolytů pro IEF (Fluka, Švýcarsko), směs standardů MW pro gelovou permeační chromatografii (Bio-Rad, Německo), SP-Sepharose (Bio-Rad, USA), standardy pro IEF (Sigma Aldrich, Německo), TEMED (Sigma Aldrich, USA), trifluoroctová kyselina (TFA, Tris-HCl (MP Biomedicals, Francie), trypsin modifikovaný rafinosou - připravil prof. Mgr. Marek Šebela, Dr. - CRH, PŘF UP, voda pro MS (Sigma Aldrich, USA)

5.2 Použité přístroje

Analytické váhy CPA225D (Sartorius, Německo), digitální pH metr (Multical WTW, SRN), digitální předvážky (Pioneer, USA), elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo), flowbox (Faster, Itálie), hmotnostní spektrometr maXis UHR-Q-TOF (Bruker Daltonik, Německo), hmotnostní spektrometr Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker Daltonik, Německo), hmotnostní spektrometr Ultraflex extreme MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonik, Německo), homogemizátor Ultra Turrax 50T

(IKA, Německo), chlazená centrifuga 6K15 (Sigma, Německo), iluminátor UVT-40W (Herolab, Německo), kapalinový chromatograf DionexUltimate 3000 RSLC nano (Thermo Fisher Scientific, USA), kapalinový chromatograf nanoEASY (Bruker Daltonik, Německo), kapalinový chromatogram Biologic Duo-Flow (Bio-Rad, USA), MALDI terčák MSP Anchorchip 600/96 (Bruker Daltonik, Německo), MALDI terčák MTP Anchorchip 800-384 (Bruker Daltonik, Německo), membránový filtr 10 kDa (Merck Millipore, USA), peristaltická pumpa LKB P-1 (Pharmacia, Švédsko), sběrač kapkových frakcí Proteineer FCII (Bruker Daltonik, Německo), skener Umax U9908-HAR0 (Amersham Bioscience Corp, USA), skleněné vialky 1 ml (Waters, USA), skleněné vialky 2 ml (Waters, USA), spektrofotometr Lightwave 2 (Biochrom, VB, stolní centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo), termoblok Drybath Incubator (Major Science, USA), termostatovaná třepačka MS 3 basic (IKA, Německo), ultrafiltrační cela Amicon 8200 (Merck Millipore, USA), ultrazvuková lázeň K-5LM (Kraintek, Slovensko), vortex (Chromservis, Čína), zdroj pro IEF EPS 600 (Pharmacia Biotech EPS 600, Švédsko), zdroj pro SDS-PAGE Universal Powerpack, (Bio-Rad, USA), Zip-Tips C18 pipetové špičky (Merck Millipore, USA)

5.3 Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro izolaci NP z ovesa byly 14 denní etiolované rostlinky ovesa (*Avena sativa*), které byly pěstovány podle dále popsaného postupu. Semena ovesa byla ponechána přes noc naklíčit ponořením ve vodě. Pro další růst byl k zalévání připraven živný roztok obsahující 2mM K₂SO₄, 3mM MgSO₄, 8 mM CaCl₂, 4 mM NaH₂PO₄, 12 mM NaNO₃, železo ve formě FeSO₄.7H₂O do obsahu 5,6 ppm, Cu (CuSO₄.5H₂O) - 0,06 ppm, Mo (Na₂MoO₄.2H₂O) - 0,05 ppm, Zn (octan zinečnatý) - 0,07 ppm, B (H₃BO₃) - 0,7 ppm (Smith, 1983). Naklíčená semena byla vyseta do truhlíku s perlitem zalitým živným roztokem. Další růst probíhal za nepřístupu světla a teploty 25°C ve fytofotočluně. Rostlinky ovesa byly zalévány dle potřeby, aby byla zajištěna dostatečná vlhkost. Po 14 dnech růstu byly nadzemní části rostlin ovesa sklizeny, zváženy (160 g) a uloženy do mrazáku (-20°C). Za stejných podmínek byly pěstovány i rostlinky hrachu po dobu 1 týdne.

Pro izolaci OPAO byly využity materiálu ovesa zbylý z experimentu izolace NP pomocí MnCl₂ po kroku precipitace rostlinného materiálu MnCl₂.

6 Metody

6.1 Precipitace jaderných proteinů z rostlinného materiálu pomocí MnCl_2

Izolace nukleoproteinů byly obdobná v případě hrachu i ovsa. Homogenizace zmrazeného rostlinného materiálu byla provedena homogenizátorem IKA Ultra Turrax 50T v 500 ml homogenizačního pufru mixováním po dobu 5 min. Pro homogenizaci rostlinného materiálu ovsa byl použit $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ o pH 5,5 (Stránská et al., 2007). Semenáčky hrachu byly homogenizovány v $0,1 \text{ M}$ K-fosfátovém pufru připraveném KH_2PO_4 a K_2HPO_4 , ideálně pufrujícím v oblasti pH 7,0 (Šebela et al., 1997). Poté byl homogenát na 30 min uložen do lednice pro umožnění přechodu dalších proteinů z rostlinného materiálu do roztoku. Pro odstranění zbylých větších částí byl homogenát přefiltrován přes nylonovou tkaninu a centrifugován při $10\,000 \text{ g}$ a 4°C po dobu 30 min. K supernatantu byl za stálého míchání pod dobu 30 min na ledové lázni postupně přidáván roztok $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ MnCl}_2$ do výsledné koncentrace $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro vysrážení nukleoproteinů. Poté byla směs míchána dalších 30 min na ledové lázni. Po centrifugaci při $10\,000 \text{ g}$ po dobu 30 min a chlazení na 4°C , byl sediment s NP, přenesen do čisté zkumavky a zmrazen (-20°C). Sediment NP z ovsa byl před zmrazením rozpuštěn v Laemmliho pufru.

Účelem přidávání roztoku chloridu manganatého k rostlinnému extraktu bylo získání nukleoproteinů. Principem je interakce Mn (II) s fosfáty ve struktuře nukleových kyselin, jejich bázemi, ale i přímo s proteiny interagujícími s DNA (Yamagata et al., 2002). Manganaté ionty potlačují vzájemné odpuzování řetězců NA, může tak dojít k jejich těsnější kondenzaci a společné izolaci spolu s proteiny (Ma a Bloomfield, 1994).

6.2 Extrakce proteinů z precipitátu nukleoproteinů tepelnou denaturací s Laemmliho pufrům

Ze zmrazeného precipitátu z hrachu bylo odebráno množství 100 mg , jež bylo přeneseno do čisté $1,5 \text{ ul}$ zkumavky a byl přidán 1 ml Laemmliho vzorkového pufru s β -merkapt ethanolém. Obsah zkumavky byl intenzivně promíchán na vortexu a poté ponechán 30 min třepat na termostatované třepačce při 900 otáčkách za minutu a teplotě 60°C . Nukleoproteiny z ovsa již rozpuštěné v Laemmliho pufru $1:3,3$ (w/v) byly po

rozmrazení naředěny na koncentraci odpovídající nukleoproteinům z hrachu (1:10, w/v). Nerozpuštěné části byly odděleny centrifugací.

6.3 SDS-PAGE extraktů z precipitátu nukleoproteinů

Pro separaci NP z precipitátu MnCl_2 byl použit dělicí gel s 10% obsahem polyakrylamidu a 4% zaostřovací gel. Dělicí gel byl připraven smísením 4 ml směsi 30% akrylamidu a 0,8% bisakrylamidu s 2,5 ml $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufru (pH 8,8) přidáním 3,8 ml vody a 0,1 ml 10% roztoku SDS. Po 15 min míchání a odvzdušnění směsi v odsávací Erlenmeyerově baňce bylo přidáno 15 μl TEMED a 50 μl 10% APS. Obsah baňky byl rychle promíchán a směs nanášena mezi připravená skla (tloušťka gelu byla 1 mm, rozměry separačního gelu 5,5 x 9 cm). Zaostřovací gel byl připraven stejným způsobem za použití 0,65 ml směsi akrylamidu a bisakrylamidu, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pufru (pH 6,8), 2,95 ml vody, 0,1 ml 10% SDS, 15 μl TEMED a 60 μl APS. Oba gely byly ponechány tuhnout 30 min. Dělicí gel byl při tuhnutí shora převrstven *n*-butanolem, který byl před nanášením zaostřovacího gelu odstraněn. Před nanášením proteinového vzorku na gel, byl vzorek na 5 min umístěn do termostatu vyhřátého na 100°C. Následně byl vzorek nechán ochladit na laboratorní teplotu a centrifugován. Do jamek gelu bylo nanášeno 25 μl supernatantu vzorku nebo 7 μl proteinových standardů molekulových hmotností připravených podle návodu výrobce. Separace byla provedena za stálého napětí 130 V. Elektrodový pufr o pH 8,3 obsahoval 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, 192 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin a 0,1 % (w/v) SDS.

6.4 Barvení gelů a jejich vizualizace

Gely po separaci SDS-PAGE nebo IEF byly barveny běžným postupem Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo připraveným koloidním roztokem tohoto barviva v plastových Petriho miskách. Detekovatelné množství při barvení běžnou metodou je 30-100 ng proteinů. Využitím koloidního roztoku Coomassie lze detekovat koncentrace proteinů o řád nižší (Brush, 1998). Výhodou barvení koloidním roztokem je výrazné potlačení obarvení pozadí gelů po SDS-PAGE (Neuhoff et al., 1988). Obrazový záznam gelů v rozlišení 300 – 600 dpi byl proveden na skeneru Umax U9908-HAR0 (Amersham Bioscience Corp, USA) za použití softwaru ImageMaster. Získaný obraz byl poté dále upraven v softwaru XnView (verze 2.25 cs, XnSoft).

6.4.1 Klasické barvení Coomassie Brilliant Blue

Po provedení SDS-PAGE byly gely krátce opláchnuty v neionizované vodě a barveny roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 přes noc (Bennet and Scott, 1971). Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R-250 obsahoval 0,1 % (w/v) barviva Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) metanolu a 10 % (v/v) kyseliny octové. Pro odbarvení byl použit roztok obsahující 7 % (v/v) kys. octovou a 10 % (v/v) methanol. Odbarvení bylo provedeno 2 - 3x opakovaným použitím čistého odbarvovacího roztoku po dobu 1 h a poté přes noc. Odbarvené gely byly opláchnuty a minimálně 30 min rehydratovány v deionizované vodě.

6.4.2 Barvení koloidním roztokem Coomassie Brilliant Blue

Před barvením koloidním roztokem Coomasie byly gely pořádně opláchnuty deionizovanou vodou a pro barvení umístěny do čistých plastových Petriho misek. Barvicí roztok byl připraven vždy čerstvý smísením zásobního roztoku koloidního barviva s čistým methanolem v poměru 4:1 (v/v). Směs byla 15 min míchána a až poté použita. Zásobní roztok koloidní Coomassie obsahoval 2 % (v/v) kys. fosforečné, 1 % (w/v) Coomassie R-250 a 10 % (w/v) síranu amonného. Gely byly barveny přes noc. Odbarvení bylo provedeno opakovaným promýváním gelů v 5% (v/v) roztoku kyseliny octové v 30 min intervalech do odbarvení pozadí, kterého bylo dosaženo po 4-5 opakováních. Odbarvené gely byly omyty a rehydratovány neionizovanou vodou v níž byly také uchovávány v lednici.

6.5 Štěpení proteinů v gelu

Obarvené pásy v gelu tvořící dráhy vzorků nukleoproteinů byly vhodně rozděleny na 12 po sobě navazujících úseků. Tyto části gelu byly poté jednotlivě vyříznuty a nařezány na kostky o velikosti asi 1 mm³ a přeneseny do čistých 0,5 ml epinek. Gelové kousky byly následně 20 min promyty 180 µl roztoku 100mM NH₄HCO₃ (AMBIC) s čistým acetontrilem (ACN) v poměru 1:1(v/v), obsah promíchán a inkubován 30 min – 1 h. Poté byl roztok centrifugován a odpipetován a na 20 min přidán pouze čistý 100 mmol·l⁻¹ AMBIC. Následovalo odpipetování roztoku a přidavek odbarvovacího roztoku s ACN. Tyto kroky byly opakovány, dokud nebyly původně modře zabarvené gelové kousky odbarveny. Odbarvené gelové kousky byly poté dehydratovány přidáním 160 µl ACN. Po přidání ACN se gelové kousky zbarví do běla a při odpipetování ACN jsou tvrdé. Pro redukci disulfidových vazeb v proteinech bylo přidáno 100 µl roztoku 10

$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT v $100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AMBIC a zkumavky byly na 30 min přeneseny do termostatu vyhřátého na 56°C . Po provedení redukce, centrifugaci a odpipetování roztoku DTT byly gelové kousky znovu dehydratovány ACN. Po odpipetování ACN proběhla alkylace cysteinových thiolů přídatkem $100\ \mu\text{l}$ čerstvě připraveného $55\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku jodacetamidu (IAA) v $100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AMBIC. Po promíchání byla směs a ponechána 20 min ve tmě. Po proběhnutí alkylační reakce byl zbylý roztok IAA odpipetován, gelové kousky promyty $180\ \mu\text{l}$ $100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AMBIC, po centrifugaci a odpipetování roztoku dehydratovány přídatkem ACN a zcela vysušeny ve vakuové centrifuze. Pro enzymové štěpení bylo provedeno po přidání $50\ \mu\text{l}$ vychlazeného roztoku $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ trypsinu modifikovaného rafinosou v $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AMBIC (Sebela et al., 2006). Pro vsáknutí roztoku trypsinu do gelových kousků byly vzorky uloženy 40 min na ledu, poté byl přebytečný roztok odpipetován, přidán pouze čistý $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ AMBIC a vzorky ponechány štěpit přes noc při 37°C v termostatu.

6.6 Extrakce peptidů z gelu

Peptidy byly z kousků gelu extrahovány přidáním $150\ \mu\text{l}$ směsi 5% kyseliny mravenčí a ACN, 1:1, v/v, a intenzivním 30 min třepáním při 1400 rpm. Zkumavky se vzorky byly centrifugovány a roztoky přepipetovány do připravených čistých zkumavek. Následně byly extrakty vysušeny ve vakuové centrifuze. Suché extrakty byly zmrazeny při -20°C nebo ihned dále zpracovány.

6.7 Odsolování vzorků

Odsolení vzorků bylo provedeno na Zip-Tips C18 pipetových špičkách (Merck Millipore) následujícím postupem: sorbent ve špičkách byl první navlhčen nasátím vodného roztoku 0,1% TFA s 50% obsahem ACN. Po 2 opakováních byly špičky ekvilibrovány opakovaným promytím 0,1% vodným roztokem TFA, v/v. Přes sorbent špičky byl poté 15x pomalu nasáván a vypouštěn roztok analytu, tedy peptidů rozpuštěných v 0,1% (v/v) TFA. Pro vymytí solí byly špičky 5x promyty stejným roztokem jako pro ekvilibraci. Eluce peptidů byla provedena 10x opakovaným nasáváním a vypouštěním do 75% roztoku ACN s 0,1% obsahem TFA, v/v. Odsolené vzorky byly vysušeny ve vakuové centrifuze a uloženy do mrazáku (-20°C).

6.8 Měření MALDI-MS

K suchým extraktům peptidů bylo přidáno $15\ \mu\text{l}$ 0,1% (v/v) TFA a pro rozpuštění byly umístěny na 15 min do ultrazvukové lázně. Po centrifugaci bylo z vybraných vzorků

odpipetováno 0,5 µl na MALDI terčik MSP Anchorchip 600/96 (Bruker Daltonik), poté bylo přidáno 0,5 µl roztoku matrice CHCA v 2,5% (v/v) TFA a ACN, 1:2, v/v (Thomas et al., 2004). Po zaschnutí byly pro dané vzorky změřeny MS spektra na přístroji Bruker Microflex (Bruker Daltonik) v módu měření se zapnutým reflektorem s rozsahem detekce iontů od 500 do 6000 m/z. Jako externí kalibrační standard byl použit, Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik) rozpuštěný v 125 µl 0,1% (v/v) TFA.

6.9 Separace nanoLC, příprava vzorků pro MALDI-MS a MS/MS

Pro separaci nanoLC byly vysušené odsolené vzorky NP rozpuštěny v 15 µl 0,1% (v/v) TFA v ultrazvukové lázni po dobu 15 min. Následně byly přepipetovány do skleněných vialek o objemu 1 ml (Waters, USA). Pro separaci bylo z autosampleru chromatografu DionexUltimate 3000 RSLC nano (Thermo Fisher Scientific) naneseo 5 µl vzorku k zakoncentrování na C18 Nano Trap předkolonku (100 µm × 20 mm, naplněnou 5 µm C18 částicemi sorbentu Acclaim PepMap100, Thermo Fisher Scientific) při průtoku 10 µl/ min a po zachycení peptidy následně vymývány na dělicí C18 kolonu (75 µm × 150 mm, naplněnou 2 µm C18 částicemi sorbentu Acclaim PepMap100, Thermo Fisher Scientific) s průtokem 300 nl/min. Doba jedné analýzy byla 70 minut. Mobilní fáze A obsahovala 0,05 % (v/v) TFA, mobilní fáze B obsahovala 80 % ACN a 0,05% TFA, v/v. Roztok pro naneseo na předkolonu chromatografu obsahoval 2 % ACN a 0,05 % TFA, v/v. Eluce z obou kolon byla provedena postupně se zvyšujícím gradientem mobilní fáze B: 0 min, 4% B; 7 min, 4% B; 20 min 40% B; 45 min, 60% B; 48 min, 90% B; 57 min, 90% B; 59 min, 4% B; 70 min, 4% B. Během analýzy byl prostor kolon vyhříván na 40°C. Výstup z analytické kolony byl připojen na sběrač kapkových frakcí („spotter“) Proteineer FCII (Bruker Daltonik) zachytávající eluát od 20. do 54. minuty separace vzorku. Postupně zachycené frakce vzorku byly na sběrači smíseny s roztokem matrice (viz níže) na celkový objem 420 nl a každých 17 sekund automatizovaně nanášeny na terčik MTP Anchorchip 800-384 (Bruker Daltonik). Každý vzorek byl takto rozseparován na 120 frakcí. Na jeden terčik tak byly naneseo 3 vzorky. Chromatograf byl ovládán prostřednictvím softwaru HyStar 3.2 (Bruker Daltonik). Peptidové standardy byly na definové pozice terčiku naneseo manuálně napipetováním 0,5 µl připravené směsi s matricí (viz níže).

Pro separaci peptidů OPAO byla použita upravená metoda pro větší objem nanášeného vzorku 14 µl, který byl rozdělen na 340 frakcí při 6 sekundovém intervalu nanášení na MALDI terčik. Celková doba analýzy zůstala zachována. Eluce z obou

kolon byla provedena postupně se zvyšujícím gradientem mobilní fáze B: 0 min, 4% B; 7 min, 4% B; 45 min, 60% B; 48 min, 90% B; 57 min, 90% B; 59 min, 4% B; 70 min, 4% B.

Roztok matrice použitý pro sběrač byl připraven smísením roztoků 748 μl 95% ACN s 0,1% TFA (v/v) s 36 μl nasyceného roztoku matrice CHCA v 90 % (v/v) ACN, 8 μl 10% (v/v) TFA a 8 μl 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Pro externí kalibraci bylo z roztoku obsahující 748 μl 85% a ACN s 0,1% TFA (v/v) plus 36 μl nasyceného roztoku matrice CHCA v 90% (v/v) ACN, 8 μl 10% (v/v) TFA a 8 μl 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ odebráno 300 μl , ke kterým byly přidány 2 μl externího kalibračního standardu Peptide Calibration Standard II rozpuštěného v 125 μl 0,1% (v/v) TFA.

6.10 Měření MALDI-MS a MS/MS

Po dostatečném zaschnutí nanesených vzorků a standardů byla destička vložena do přístroje. Před samotným měřením byly do ovládacího softwaru flexControl 3.4, manuálně nakonfigurovány pozice 3 krajních bodů odpovídající rozložení míst pro vzorky nanesené na destičce. Manuálním měřením byla před zahájením automatického měření vzorků zkontrolována odezva přístrojová nanesené peptidové standardy. Automatizovaná měření vzorků rozdělených nanoLC bylo ovládáno softwarem WarpLC 1.3. Při měření v MS módu byla každá pozice destičky se vzorkem 2500x ozářena excitačním laserem (355nm) s frekvencí 2000 Hz. Získaná spektra byla automaticky zpracována ovládacím softwarem, který vybral maximálně 10 prekurzorů z jedné pozice destičky pro měření MS/MS spekter. Kritéria pro výběr prekurzoru pro měření MS/MS spekter byla následující: poměr signál/ šum >7 , rozmezí m/z 900-2500 intenzita píku prekurzoru > 80 , minimální m/z fragmentu > 250 , zapnuto použití LIFT cely pro urychlení sekundárních iontů při měření v MS/MS módu.

6.11 Separace a měření nanoLC-ESI-MS a MS/MS

Pro nanoLC separaci bylo použito 7 μl vzorku, který byl nanesen na předkolonu (75 $\mu\text{m} \times 30 \text{ mm}$, 5 μm C18 Reprosil GOLD 300; Dr. Maisch). Předkolona se zachyceným vzorkem byla následně promyta 15 μl 0,1% (v/v) TFA. Eluce přes analytickou kolonu (75 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$, 3 μm C18 Reprosil GOLD, Dr. Maisch) byla provedena použitím gradientu za stálého průtoku 200 nl/min . Mobilní fází A byl roztok 4% (v/v) kyseliny mravenčí, mobilní fáze B obsahovala 0,04 % kys. mravenčí, 70 % čistého methanolu a 20 % isopropanolu, v/v. Gradient mobilní fáze B byl následující; 0 min, 2% B; 3 min,

8% B; 50 min, 18% B; 79 min, 28% B; 85 min, 32% B; 93 min, 45% B; 99 min, 65% B; 100 min, 95% B; 105 min, 95% B; 108 min, 2% B; 125 min, 2% B. Z analýzy MS byly pro MS/MS analýzu vybírány 4 nejintenzivnější prekurzory, které byly fragmentovány kolizně indukovanou disociací a jejich fragmenty identifikovány. K ovládní hmotnostního spektrometru byl použit software QTOFControl 3.2 (Bruker Daltonik).

6.12 Zpracování a analýza dat

Získaná data z MS měření byla zpracována programem DataAnalysis 4.2 SP4 (Bruker Daltonik). V programu ProteinScape 3.1 (Bruker Daltonik) za využití vyhledávacího nástroje Mascot 2.2.07 (Matrix Science) byla data prohledávána vůči databázi SwissProt s omezením pouze na zelené rostliny (*Viridiplantae*) nebo neomezeně pro všechny organismy. Proteiny náležící do taxonu *Viridiplantae*, byly pak od ostatních vybrány pomocí možností nástrojů UniprotKB <http://www.uniprot.org/>. Parametry pro vyhledávání obsahovaly zadání trypsinu jako proteasy a možnost přítomnosti 2 opomenutých štěpných míst v sekvenci peptidů. Karbamidometylace cysteinu byla nastavena jako pevná modifikace, jako možná modifikace AK byla zadána oxidace methioninu. Pro data z LC-MALDI TOF/TOF analýzy byla pro vyhledávání prekurzorů zvolena tolerance hmotnosti iontu ± 25 ppm, pro fragmenty ± 0.5 Da. Náboj peptidů byl vždy +1. Data z nanoLC-ESI-Q/TOF měření byly zpracována ve dvou krocích. Pro první vyhledávání byla pro prekurzory nastavena tolerance molekulární hmotnosti ± 50 ppm, pro odpovídající fragmenty ± 0.1 Da. Ve druhém kroku byly ze získaných dat vybrány peptidy s tolerancí ± 10 ppm pro prekurzory a ± 0.05 Da pro fragmenty. Náboj peptidů mohl být +1, +2 a +3.

6.13 Anotace proteomických dat nástroji genové ontologie

Identifikované proteiny byly zařazeny do funkčních kategorií za použití pravidel systému klasifikace genové ontologie (GO) (Ashburner et al., 2000). Jako výchozí data byly použity identifikační kódy Uniprot-ID přiřazené každému proteinu po identifikaci programem MASCOT proti databázi SwissProt. Tyto kódy byly vloženy do nástroje GORetriever, který pro všechny identifikace vyhledal GO informace. Data byla následně uložena a vyhodnocena nástrojem GOSlimViewer. V nabídce GOSlim Set byla vybrána možnost „Plant“ používající GO pojmy z databáze TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Na základě GO pojmů byly identifikované proteiny

rozřazeny podle lokalizace, funkce a druhu biologických procesů, do kterých jsou zapojeny. Nástroje AgBase GORetriever a GOSlimViewer jsou součástí online softwaru AgBase verze 2.0 <http://agbase.msstate.edu/> (McCarthy et al., 2006).

Srovnání proteinů podle genové ontologie bylo provedeno také softwarem DAVID 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Jako vstupní data byly také použity identifikační kódy proteinů Uniprot-ID. Podkladem po srovnání nalezených proteinů byla zvolena možnost *A. thaliana*. Pro rozřazení identifikovaných proteinů do příbuzných skupin na základě uvedených přiřazených GO pojmů byla nastavena střední hodnota přísnosti výběru bez další změny výchozích parametrů a použit nástroj DAVID gene functional classification tool. Skupiny obsahující proteiny s nejvíce příbuznými GO termíny byly na základě modifikovaného Fischerova testu charakterizovány velikostí ukazatele P-hodnoty (Huang et al., 2009).

Pokud nebyla u proteinu nalezena informace o jeho lokalizaci, byla dohledána ručně na základě identifikačního kódu v nástroji UniprotKB <http://www.uniprot.org/>. Pro proteiny s neznámou lokalizací byly použity údaje predikované dle AK sekvence proteinů z databáze nástroje Plant-Ploc <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/> (Chou a Shen, 2007).

7 Metody použité pouze ke studiu OPAO

7.1 Izolace a purifikace

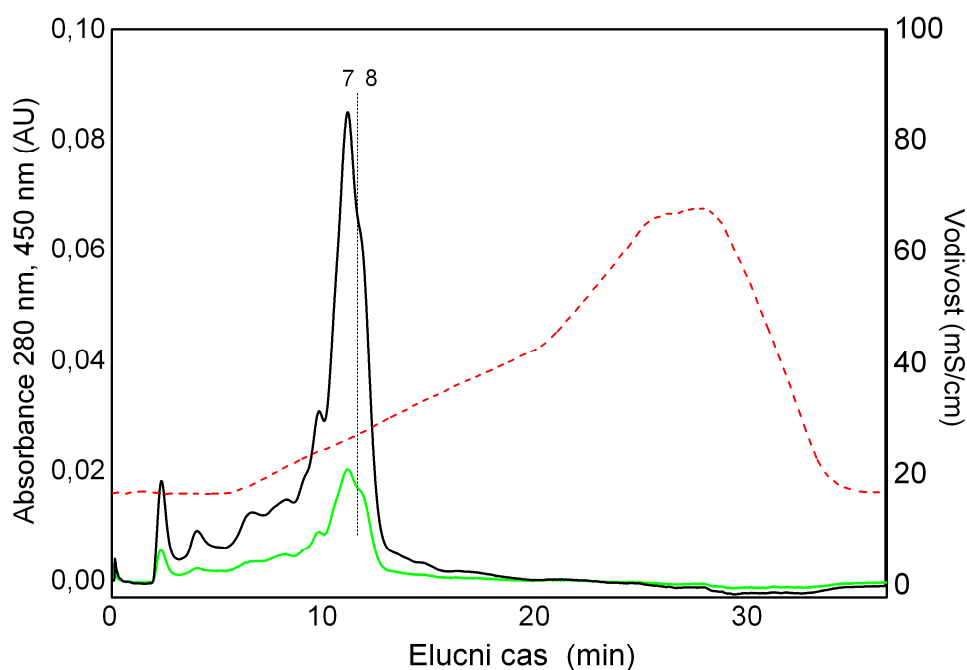
Pro purifikaci OPAO byl použit supernatant oddělený od sraženiny nukleoproteinů s MnCl_2 při extrakci NP z ovsa (viz kapitola 6.1). Tento materiál byl centrifugován (10 000 g, 4 °C) a proteiny v supernatantu byly sráženy postupným přidáváním pevného $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a roztok poté znovu centrifugován (10 000 g, 4 °C). Sediment byl rozpuštěn ve 20 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ a 10 min ponechán míchat na ledové lázni. Poté byl extrakt dialyzován 2 h proti $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ (pufr A) při 4°C a následně znovu po výměně proti stejnému pufru přes noc.

7.1.1 Nízkotlaká iontoměničová chromatografie

Dialyzovaný extrakt byl centrifugován (10 000 g, 4 °C) a supernatant poté nanesen peristaltickou pumpou na kolonu s iontoměničem Macro-Prep High Q od firmy Bio-Rad (2,5 x 25 cm) pro nízkotlakou chromatografii ekvilibrovanou pufrém A a připojenou v sérii ke koloně naplněné iontoměničem SP-Sepharose od firmy GE Healthcare (2,5 x 25 cm). Eluát byl monitorován spektrofotometrickým detektorem (280 nm) připojeným k mechanickému zapisovači. Celý objem extraktu byl nanesen na Macro-Prep High Q a kolona následně promyta 20 ml čistého pufru A. Poté byly kolony rozpojeny a byla eluce $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ s $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$ (pufr B) z SP-Sepharose. Průtok mobilní fáze byl 1,75 ml/min. Získaný eluát byl dialyzován přes noc proti pufru A.

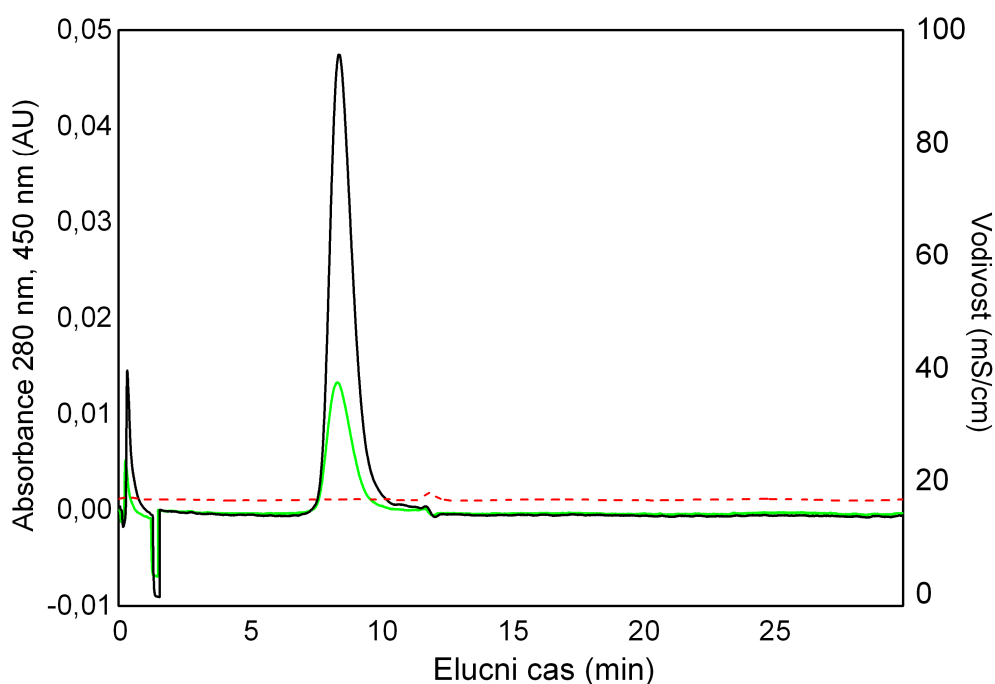
7.1.2 Střednětlaká iontoměničová a gelová permeační chromatografie

Dialyzovaný eluát z nízkotlakých kolon (65 ml) byl centrifugován při 10 000 g, 30 min, 4°C. Supernatant byl následně zahuštěn na ultrafiltrační cele Amicon s 10 kDa filtrem na objem 1,8 ml. Zahuštěný extrakt byl dále separován pomocí střednětlaké chromatografie na přístroji BioLogic Duo-Flow (Bio-Rad) na koloně Mono S HR 5/5 (GE Healthcare) ekvilibrované pufrém A. Za průtoku 1 ml/ml byl dávkováním přes 500 μl smyčku nanášen zahuštěný extrakt a dle spektrofotometrické detekce při 280 a 450 nm byly manuálně jímány jednotlivé eluované frakce. Průběh separace byl následující: 2 min 100 % pufru A, 15 min rostoucí gradient od 0 k 50 % pufru B, 5 min gradient 50 – 100 % pufru B, 3 min eluce 100% pufrém B, 5 min 100 – 0 % pufr B, 5 min promytí 100 % pufrém A.



Obr. 3 Chromatogram separace vzorku OPAO na koloně MonoS. Černá barva – absorbance při 280 nm, zelená barva - 450 nm; červeně je vyznačen záznam z vodivostního detektoru, zde odpovídá průběhu gradientu elučního pufru B. Čísly 7 a 8 jsou označeny jímáné frakce.

Získané frakce 7 a 8 (Obr. 3) byly z jednotlivých běhů separace spojeny, doplněny pufrém A na objem 20 ml a zahuštěny ultrafiltrací s použitím 10 kDa filtru. Dočištění a ověření přítomnosti hledaného proteinu bylo provedeno na koloně BioSil SEC125-5 s molekulovým sítem. Vzorky byly dávkovány po 500 μ l při průtoku 1 ml/min pufru A. Doba analýzy byla 30 min. Proteinová frakce 8 obsahující OPAO byla sbírána (Obr. 4), spojená z jednotlivých běhů separace a zahuštěna ultrafiltrací, jak je uvedeno níže. K potvrzení výskytu OPAO v příslušné frakci bylo využito měření absorpčního spektra koenzymu FAD při 450 nm a určení molekulové hmotnosti enzymu na základě kalibrování kolony sadou proteinových standardů se známou molekulovou hmotností. Molekulová hmotnost vypočtená z kalibrační řady standardů (Bio-Rad) a odpovídající času retence OPAO byla 54 kDa. Koncentrace konečného enzymového roztoku byla zjištěna spektrofotometricky měřením absorbance FAD při 450 nm ($\epsilon = 11\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, MW = 56 000 Da) a metodou Bradfordové za použití kalibrační řady standardů BSA (Stránská et al., 2007); (Bradford, 1976).



Obr. 4 Chromatogram separace frakce 8 OPAO na koloně BioSil Sec 125-5c. Černá barva – absorbance při 280 nm, zelená barva - 450 nm; červeně je vyznačen záznam z vodivostního detektoru.

7.2 Určení molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu

Pro posouzení čistoty enzymového preparátu, ověření molekulové hmotnosti, k přípravě tryptických peptidů pro MS analýzu sekvence enzymu a stejně jako detekci případných glykopeptidů byla provedena jednorozměrná SDS-PAGE za použití 10% dělicího gelu a 4% zaostřovacího gelu. Proteinové pásy byly vizualizovány s použitím Coomassie Brilliant Blue R-250. Postupy k těmto metodám jsou popsány v kapitolách 6.3 a 6.4.1.

7.2.1 Isoelektrická fokusace

Pomocí nativní isoelektrické fokusace (IEF) v 7,5% polyakrylamidovém gelu s obsahem amfolytů pro pH gradient 3-10 byla určena hodnota isoelektrického bodu OPAO (Robertson et al., 1987). Rozměry gelu byly 9 x 7,5 cm s tloušťka 1 mm. Pro kalibraci byly použity IEF standardy (Sigma Aldrich). Separace byla provedena při nelineárně se zvětšujícím napětí; počáteční napětí 100 V bylo nastaveno po dobu 30 min, dále probíhala separace 30 min při 200 V, 30 min při 300 V, 1 h při 400 V a nakonec 2 h při 500 V.

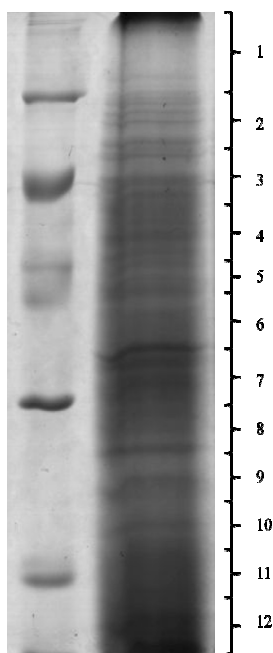
7.3 Manuální separace peptidů

Po enzymovém štěpení OPAO v gelu dle dříve popsaného postupu byla při odsolení část vzorků zachycených na ZipTip C18 špičkách eluována postupně použitím roztoků 5, 15, 25 až 75% ACN obsahujících 0,1% (v/v) TFA přesně v tomto pořadí. Cílem tohoto kroku byla separace peptidů pro získání méně komplexních vzorků pro vyhledání glykopeptidů pomocí MS.

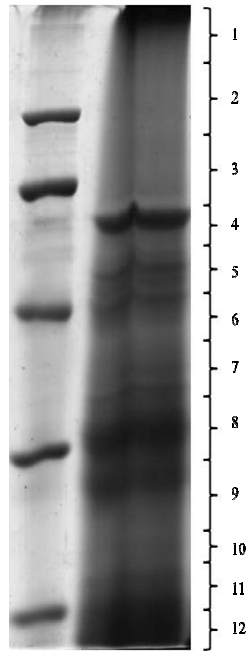
8 Výsledky – jaderné proteiny

8.1 Izolace a extrakce jaderných proteinů

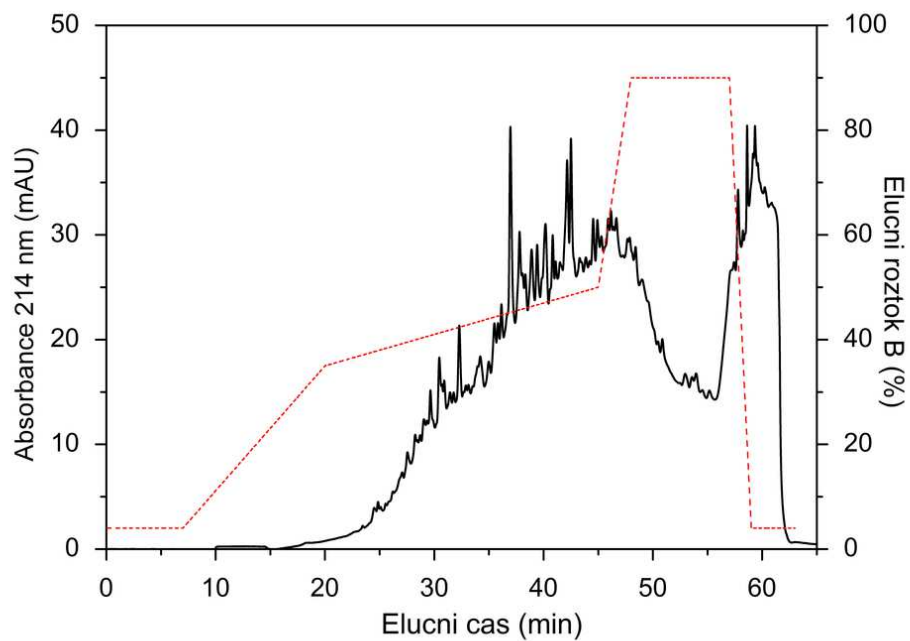
Precipitát s předpokládaným obsahem jaderných proteinů byl připraven srážením extraktu z etiolovaných semenáčků hrachu a ovsu pomocí MnCl_2 (výsledná koncentrace $7,5 \text{ mmol.l}^{-1}$). Precipitát nukleových kyselin a proteinů byl pak suspendován v Laemmliho vzorkovacího pufru. S cílem rozvolnit struktury nukleových kyselin a uvolnit proteinové složky vázané nebo zachycené v těchto komplexech byly vzorky tepelně denaturovány. Supernatant obsahující uvolněné proteiny byl rozdělen SDS-PAGE (Obr. 5 a 6). Po rozdělení na znázorněné části bylo provedení enzymového štěpení v gelu, extrakce peptidů a jejich odsolení. Byly tak připraveny vzorky pro separaci nanoLC. Následně byly separované peptidy identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající měkké ionizační techniky MALDI a hybridního TOF/TOF analyzátoru vybaveného LIFT celou (Obr. 7). Souběžně byly peptidy identifikovány na přístroji Q-TOF s kolizní celou a ionizací elektrosprejem.



Obr. 5 SDS PAGE proteinů z MnCl_2 precipitátu extraktu hrachových semenáčků. V pravém sloupci proteinový extrakt s vyznačeným rozdělením na 12 navazujících částí pro enzymové štěpení v gelu. Nalevo proteinové standardy s molekulovými hmotnostmi 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4 kDa (shora).



Obr. 6 SDS PAGE proteinů z $MnCl_2$ precipitátu extraktu ovsa. V pravém sloupci proteinový extrakt s vyznačeným rozdělením na 12 navazujících částí pro enzymové štěpení v gelu. Nalevo proteinové standardy s molekulovými hmotnostmi 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4 kDa (shora).



Obr. 7 Chromatogram separace nanoLC peptidové směsi z části č. 6 gelu (Obr. 5) vzorku precipitátu extraktu z ovsa. Černě vyznačen záznam z UV/VIS detektoru při 214 nm, červeně vyznačen průběh gradientu elučního roztoku B (80 % ACN; 0,1 % TFA)

8.2 Identifikace proteinů izolovaných z precipitátu MnCl_2 hmotnostní spektrometrií

Tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) bylo v MnCl_2 precipitátu z hrachových semenáčků identifikováno 287 rostlinných proteinů (Tab. 1). Z dat získaných MALDI TOF/TOF měření bylo identifikováno 110 proteinů. Ve stejných vzorcích bylo na ESI-Q/TOF přístroji po analýze dat nalezeno 198 proteinů, z nichž 21 bylo shodných s identifikacemi z MALDI. Z těchto 287 identifikovaných proteinů bylo 247 unikátních.

V precipitátu z ovsa byly identifikovány pouze proteinové podjednotky ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxigenasy (RUBISCO) a rostlinná β -D-glukosidasa.

Některé identifikace byly opakované, což je dáno tím, že v databázi jsou uloženy sekvenčně velmi podobné či shodné proteiny z různých rostlin. Příkladem je glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa identifikována 3 krát nebo elongační faktor 1-alfa s pětinasobnou identifikací. Proteiny vyskytující se typicky v jádře reprezentují histony, mezi kterými nechybí histon H1 a variace histonu H2A a H2B. Dalšími identifikovanými příklady typicky jaderných proteinů jsou např. DNA-dependentní RNA polymerasa, transposasa, protein reprodukčního meristému 17 obsahující B3 doménu nebo PRD protein důležitý pro rekombinaci a vznik dvouvláknových zlomů na DNA (De Muyt et al., 2007). Netypickým jaderným proteinem je glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa, enzym glykolýzy, který může být translokován do jádra během procesu programované smrti buňky (Mazzola a Sirover, 2002). Největší zastoupení z identifikovaných proteinů připadá na ribosomální podjednotky vznikající v jádře v jadérku. Celkem bylo nalezeno 47 různých proteinů tvořící různé typy ribosomálních podjednotek 40S, 60S a podjednotku 50S ribosomu chloroplastu. Další významnou skupinu tvořili proteiny zapojené do tvorby buněčné kostry zahrnující tubuliny, aktiny a proteiny T-komplexů. (Uchiyama et al., 2005). Byly identifikovány i proteiny prokazatelně se nevyskytující v jádře jako mitochondriální chaperony, heat-shock proteiny a proteiny z vakuoly, chloroplastů a jiných kompartmentů buňky, včetně proteinů zajišťující transport, což nasvědčuje možné kontaminaci izolovaného precipitátu proteiny z jiných částí buňky. Naopak výskyt některých nejaderných proteinů jako jsou např. Dna-J homologní protein, eukaryotické iniciační faktory translace, Tu elongační faktor, je v důsledku interakce a tvorby komplexu s nukleovými kyselinami, které byly použítou metodou precipitovány.

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
1	M 1433_PEA	14-3-3-like protein	29.3	4.7	85.5	2	12.3		6.92
2	M ACT_COLSC	Actin	41.7	5.2	121.4	2	6.9		2.08
3	M ACT1_DAUCA	Actin-1	42.0	5.6	264.7	6	18.9		3.38
4	M ACT2_SOLLC	Actin-51 (Fragment)	37.2	5.2	133.2	3	14.3		3.06
5	M ACT2_SOLTU	Actin-46 (Fragment)	37.1	5.2	119.4	2	11.3		2.31
6	M ACT4_TOBAC	Actin-66 (Fragment)	37.2	5.4	179.1	4	16.7		7.97
7	M ACT6_SOLTU	Actin-71	41.8	5.3	141.2	3	10.3		2.71
8	M ACT6_TOBAC	Actin-103	37.2	5.2	125.0	2	11.3		5.20
9	M ACT7_ARATH	Actin-7	41.7	5.2	150.6	3	12.7		3.10
10	M ADT2_SOLTU	ADP,ATP carrier protein, mitochondrial (Fragment)	41.8	9.7	91.2	2	6.2		9.44
11	M ALF2_PEA	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 2	38.5	6.8	101.3	2	10.3		4.26
12	M APX1_PEA	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	27.2	5.5	93.6	2	16.0		3.59
13	M ATPAM_BETVU	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	54.9	6.0	157.5	4	8.3		3.21
14	M BAS1_HORVU	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic (Fragment)	23.3	5.4	174.4	3	15.2		10.14
15	M BAS1B_ARATH	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like, chloroplastic	29.8	5.5	398.6	5	18.3		2.18
16	M BIP_SOLLC	Luminal-binding protein	73.2	5.0	296.7	6	10.8		2.26
17	M CALX_PEA	Calnexin homolog	62.5	4.7	214.0	3	6.5		3.51
18	M CDC48_CAPAN	Cell division cycle protein 48 homolog	89.3	5.1	105.2	2	3.5		1.84

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
19	M CVCA_PEA	Convicilin	66.9	6.3	121.8	2	5.3		1.35
20	M CYP1_SOYBN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1	18.2	8.7	108.7	2	15.7		17.10
21	M EF1A_MAIZE	Elongation factor 1-alpha	49.2	9.2	114.8	3	6.9		10.09
22	M EF1A_PEA	Elongation factor 1-alpha	49.3	9.0	132.8	4	6.3		7.33
23	M EF1A_SOLLC	Elongation factor 1-alpha	49.3	9.2	86.2	2	5.1		4.88
24	M EF1A1_DAUCA	Elongation factor 1-alpha	49.3	9.2	210.0	5	10.7		4.65
25	M EF1G3_ORYSJ	Elongation factor 1-gamma 3	47.4	6.1	125.3	2	7.2		1.58
26	M EFTU_PEA	Elongation factor Tu, chloroplastic	53.0	6.7	282.6	4	11.1		3.10
27	M ENPL_CATRO	Endoplasmin homolog	93.4	4.7	96.8	2	2.6		5.18
28	M ENPL_HORVU	Endoplasmin homolog	92.9	4.7	88.1	2	2.3		3.05
29	M FRI_PHAVU	Ferritin, chloroplastic	28.3	5.6	84.3	2	9.1		6.91
30	M FRI1_PEA	Ferritin-1, chloroplastic	28.6	6.1	80.6	2	7.1		3.58
31	M G3PC_PEA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	36.6	6.7	390.4	6	20.7		2.83
32	M G3PC_TOBAC	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (Fragment)	35.5	6.1	225.1	3	8.3		8.86
33	M H2A6_ARATH	Histone H2A.6	13.6	10.2	81.6	2	12.3		4.07
34	M HS903_ARATH	Heat shock protein 90-3	80.0	4.9	121.0	2	3.7		1.99
35	M HSP71_SOLLC	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	71.2	5.1	432.6	7	13.4		3.00
36	M HSP72_SOLLC	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	70.7	5.1	252.9	5	8.5		2.39
37	M HSP7N_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 18	68.3	5.2	97.1	1	2.6		2.10
38	M HSP7S_PEA	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic	75.5	5.2	295.5	6	14.4		3.06
39	M CH61_MAIZE	Chaperonin CPN60-1, mitochondrial	61.2	5.7	89.6	2	4.0		13.28

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
40	M CH62_CUCMA	Chaperonin CPN60-2, mitochondrial	61.1	6.3	98.6	2	3.7		0.52
41	M IF415_TOBAC	Eukaryotic initiation factor 4A-15	46.7	5.3	98.1	2	6.3		5.62
42	M IF5A_SENVE	Eukaryotic translation initiation factor 5A	17.3	5.6	92.1	2	18.2		3.93
43	M IMA1A_ORYSJ	Importin subunit alpha-1a	57.5	5.1	99.6	2	5.3		2.31
44	M LEGA_PEA	Legumin A	58.8	6.2	104.2	2	5.6		2.61
45	M LOX1_LENCU	Linoleate 9S-lipoxygenase	96.6	6.0	109.1	3	3.3		2.98
46	M LOX3_SOYBN	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3	96.7	6.3	99.2	2	2.8		3.78
47	M LOXA_PHAVU	Linoleate 9S-lipoxygenase 1	97.1	6.5	90.7	2	2.8		3.88
48	M MD37E_ARATH	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e	71.3	5.0	247.9	5	10.4		3.31
49	M METE_MESCR	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	84.8	5.9	109.0	3	4.6		3.61
50	M METE_PLESU	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	84.5	6.1	97.1	3	5.1		11.68
51	M METE1_ARATH	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase 1	84.3	6.1	144.7	3	5.1		3.71
52	M METK_PHALU	S-adenosylmethionine synthase	43.0	5.6	185.5	3	12.2		5.67
53	M METK1_PETCR	S-adenosylmethionine synthase 1 (Fragment)	25.6	7.9	104.9	1	6.4		0.35
54	M METK2_DAUCA	S-adenosylmethionine synthase 2	43.0	5.6	100.2	2	6.9		7.44

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
55	M	METK2_ELAUM	S-adenosylmethionine synthase 2	43.1	5.5	267.1	4	12.2	6.09
56	M	METK3_ACTCH	S-adenosylmethionine synthase 3 (Fragment)	39.5	6.2	80.2	2	10.3	0.57
57	M	PIP2_PEA	Probable aquaporin PIP-type 7a	31.0	9.1	140.0	2	11.1	1.93
58	M	PRS8A_ARATH	26S protease regulatory subunit 8 homolog A	47.2	9.0	198.1	5	14.1	5.50
59	M	RAB7_PEA	Ras-related protein Rab7	0.9	6.0	85.2	1	0.0	12.16
60	M	RBL_DICCR	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (Fragment)	49.5	6.4	101.3	2	4.9	5.99
61	M	RBL_LEPVR	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	52.8	6.1	80.1	1	2.7	7.69
62	M	RL10_EUPES	60S ribosomal protein L10	24.9	11.8	172.6	3	15.9	15.30
63	M	RL14_PEA	Probable 60S ribosomal protein L14	15.2	10.9	80.2	1	9.0	1.61
64	M	RL222_ARATH	60S ribosomal protein L22-2	14.0	9.6	94.5	1	10.5	4.98
65	M	RL9_PEA	60S ribosomal protein L9	21.7	9.3	108.6	2	11.9	8.03
66	M	RS132_ARATH	40S ribosomal protein S13-2	17.1	10.9	135.1	3	21.2	3.45
67	M	RS154_ARATH	40S ribosomal protein S15-4	17.1	10.3	183.7	4	23.7	3.64
68	M	RS23_EUPES	40S ribosomal protein S23	15.7	10.3	88.8	2	8.5	3.00
69	M	RS3A_CICAR	40S ribosomal protein S3a	29.7	9.8	92.0	2	10.3	5.11
70	M	RS7_AVIMR	40S ribosomal protein S7	21.9	10.1	104.7	2	5.3	11.39
71	M	RUBA_PEA	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	61.9	5.0	876.8	13	26.1	4.50
72	M	RUBB_PEA	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	62.9	5.8	392.7	7	16.0	4.55

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
73	M SUSY_SOYBN	Sucrose synthase	92.2	6.0	90.4	2	4.0		0.83
74	M SUSY_VICFA	Sucrose synthase	92.5	5.7	487.5	8	12.3		3.79
75	M TBA_PICAB	Tubulin alpha chain (Fragment)	12.6	4.6	132.1	1	13.3		23.65
76	M TBA_PRUDU	Tubulin alpha chain	49.5	4.9	154.4	3	8.7		5.63
77	M TBA2_GOSHI	Tubulin alpha-2 chain	49.5	4.9	208.6	4	9.6		2.81
78	M TBA5_MAIZE	Tubulin alpha-5 chain	49.6	5.0	181.8	4	9.6		3.80
79	M TBB1_AVESA	Tubulin beta-1 chain (Fragment)	43.3	4.6	85.0	3	7.3		10.65
80	M TBB3_ANEPH	Tubulin beta-3 chain (Fragment)	27.4	5.0	122.8	2	8.4		7.21
81	M TBB6_GOSHI	Tubulin beta-6 chain	50.5	4.7	138.4	3	7.1		2.76
82	M TBB9_ARATH	Tubulin beta-9 chain	49.6	4.7	103.2	2	4.5		4.53
83	M TCPB_ARATH	T-complex protein 1 subunit beta	57.2	5.6	83.4	2	4.2		7.75
84	M TCPD_ARATH	T-complex protein 1 subunit delta	57.7	7.6	123.7	1	2.4		0.74
85	M TCTP_PEA	Translationally-controlled tumor protein homolog	18.9	4.7	248.8	2	21.6		0.57
86	M VATA_BETVU	V-type proton ATPase catalytic subunit A	68.5	5.0	147.4	3	4.5		6.55
87	M VATA_DAUCA	V-type proton ATPase catalytic subunit A	68.8	5.2	142.7	3	5.0		5.58
88	M VATB2_HORVU	V-type proton ATPase subunit B 2	53.7	5.1	146.6	3	6.8		6.20
89	M VCLB_PEA	Provicilin (Fragment)	46.4	5.4	101.8	2	7.8		0.70
90	M 1433A_VICFA E	14-3-3-like protein A	29.4	4.7	105.1	3	15.3		7.75
91	M 1433B_VICFA E	14-3-3-like protein B	29.5	4.8	102.9	2	10.7		3.39

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
92	M E	ACT3_SOLLC	Actin-52 (Fragment)	37.1	5.4	118.6	2	11.3	3.84
93	M E	AMO_PEA	Primary amine oxidase	76.3	6.3	148.2	2	4.0	7.33
94	M E	ASNS2_PEA	Asparagine synthetase, root [glutamine-hydrolyzing]	65.6	5.7	82.0	2	3.6	1.41
95	M E	BIP5_TOBAC	Luminal-binding protein 5	73.7	4.9	193.3	3	6.6	2.87
96	M E	H1_PEA	Histone H1	28.0	10.5	104.5	2	4.9	9.04
97	M E	H2B2_SOLLC	Histone H2B.2	15.4	10.1	182.4	3	25.0	10.36
98	M E	HSP7E_SPIOL	Chloroplast envelope membrane 70 kDa heat shock-related protein	71.7	5.2	312.8	6	12.3	5.44
99	M E	CH62_MAIZE	Chaperonin CPN60-2, mitochondrial	60.9	5.7	109.9	2	4.0	12.40
100	M E	RAB1C_ARATH	Ras-related protein RABB1c	23.1	7.0	89.5	2	11.8	6.81
101	M E	RL17_MAIZE	60S ribosomal protein L17	19.5	10.3	112.2	2	11.7	11.62
102	M E	RS241_ARATH	40S ribosomal protein S24-1	15.4	10.7	90.1	2	8.3	5.75
103	M E	RS32_ARATH	40S ribosomal protein S3-2	27.3	9.6	103.1	2	8.8	5.55

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
104	M E	RS6_ASPOF	40S ribosomal protein S6	28.5	11.4	84.6	1	6.4	4.03
105	M E	RUBB_BRANA	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	62.4	6.6	374.1	7	13.9	9.15
106	M E	SAR1_TOBAC	GTP-binding protein SAR1	22.9	9.0	84.8	2	15.2	6.77
107	M E	TBA3_ARATH	Tubulin alpha-3 chain	49.6	5.0	238.9	5	13.1	7.89
108	M E	TBB1_PEA	Tubulin beta-1 chain	50.5	4.7	147.5	4	9.1	5.96
109	M E	TCPA_ARATH	T-complex protein 1 subunit alpha	59.2	5.9	87.9	1	2.0	7.92
110	M E	VCLC_PEA	Vicilin	52.2	5.4	112.3	2	5.4	5.46
111	E	14334_PSEMZ	14-3-3-like protein 4 (Fragments)	3,2	-	179	19	100,0	12,2
112	E	1433B_SOYBN	14-3-3-like protein B (Fragment)	27,9	-	325	28	22,7	13,6
113	E	6DCS_SOYBN	NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase	35,5	6,3	41	5	9,5	18,0
114	E	AB30G_ARATH	ABC transporter G family member 30	157,7	8,5	33	5	2,1	20,6
115	E	ACA1_ORYSJ	Calcium-transporting ATPase 1, plasma membrane-type	111,1	5,9	36	2	2,6	28,4
116	E	ACT1_SOYBN	Actin-1	41,3	5,4	235	31	22,5	13,2
117	E	ADT1_WHEAT	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial	35,9	-	128	9	6,6	15,0

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
118	E ADT3_ARATH	ADP,ATP carrier protein 3, mitochondrial	40,7	9,8	125	10	6,3		15,6
119	E AKH_DAUCA	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase, chloroplastic (Fragment)	100,2	6,1	35	4	1,2		12,7
120	E AL7A1_PEA	Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	53,8	5,6	51	3	2,4		18,5
121	E ALF1_PEA	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	38,4	6,4	73	8	11,2		16,8
122	E ALFC1_PEA	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic (Fragment)	38,6	5,6	47	5	7,9		19,1
123	E ANTA_GENTR	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	52,7	5,6	46	4	4,9		17,8
124	E APA1_ARATH	Aspartic proteinase A1	54,6	4,8	51	3	4,5		20,2
125	E AROF_ARATH	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1, chloroplastic	57,9	6,9	42	2	4,2		33,2
126	E ASNS1_LOTJA	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] 1	66,4	6,0	43	4	5,6		11,7
127	E ASSY_ARATH	Argininosuccinate synthase, chloroplastic	53,8	5,4	148	33	8,5		16,4
128	E ATPA_LOTJA	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	55,7	5,2	160	8	13,9		21,4

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
129	E ATPAM_MAIZE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55,1	5,9	390	45	21,9		14,5
130	E ATPAM_ORYSA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55,3	5,9	435	51	23,6		14,8
131	E ATPAM_PEA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55,0	6,0	530	68	29,6		14,0
132	E ATPBM_DAUCA	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	59,1	5,0	314	36	17,9		16,4
133	E ATPBM_ORYSJ	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	58,9	5,2	370	34	20,5		15,6
134	E ATPE_PEA	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic	15,2	6,6	48	4	8,8		10,2
135	E AVP_VIGRR	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump	79,9	5,3	84	4	4,6		18,0
136	E BIG_ORYSJ	Auxin transport protein BIG	551,7	5,7	53	3	0,7		23,9
137	E BIP_SPIOL	Luminal-binding protein	73,5	5,0	288	29	13,5		19,3
138	E BXL6_ARATH	Probable beta-D-xylosidase 6	87,1	6,0	46	4	2,4		14,4
139	E CALM3_ORYSI	Calmodulin-3	16,8	4,1	99	5	17,4		6,1
140	E CARDA_CYNCA	Procardosin-A	55,5	4,5	55	3	8,5		23,3
141	E CD48E_ARATH	Cell division control protein 48 homolog E	89,9	5,1	137	14	9,5		18,3
142	E CIA2_ARATH	Protein CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS 2	48,4	6,0	36	19	2,3		37,5
143	E CLPC_PEA	Chaperone protein ClpC, chloroplastic	102,6	5,7	319	20	12,6		20,2

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
144	E CLPC1_ARATH	Chaperone protein ClpC1, chloroplastic	103,4	5,9	240	17	9,1		21,6
145	E COPB2_ARATH	Coatomer subunit beta-2	106,0	5,7	46	3	3,2		18,8
146	E CVCB_PEA	Convicilin (Fragment)	46,4	-	152	16	11,1		15,0
147	E CYPH_LUPLU	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	18,3	8,7	43	4	12,8		8,3
148	E DHSA_ORYSJ	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	68,8	6,1	37	4	2,1		33,5
149	E DNAJ2_ARATH	Chaperone protein dnaJ 2	46,4	6,7	75	6	9,3		21,5
150	E DNJH_CUCSA	DnaJ protein homolog	46,0	6,1	73	5	6,8		24,8
151	E DRP1C_ARATH	Dynamamin-related protein 1C	68,7	7,3	109	6	6,7		18,7
152	E DRP1D_ARATH	Dynamamin-related protein 1D	68,3	8,1	116	11	9,5		32,0
153	E DRP2A_ARATH	Dynamamin-2A	99,1	9,1	104	11	2,5		17,9
154	E DRR3_PEA	Disease resistance response protein Pi49	16,7	4,9	94	4	18,4		8,1
155	E EF1A_VICFA	Elongation factor 1-alpha	49,2	9,2	410	49	35,1		14,6
156	E EF1D_BETVU	Elongation factor 1-delta	24,7	4,4	94	8	10,4		16,0
157	E EF1G_PRUAV	Elongation factor 1-gamma	48,0	6,1	56	3	5,9		8,2
158	E EF2_BETVU	Elongation factor 2	93,7	5,9	150	14	7,7		12,5
159	E EFR_ARATH	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR	113,3	8,3	69	9	4,6		30,7
160	E FB56_ARATH	Putative F-box protein At1g53370	43,0	9,1	32	2	2,7		6,4
161	E FBL45_ARATH	Putative F-box/LRR-repeat protein At3g18150	52,5	8,6	33	2	2,2		44,8
162	E FKB15_VICFA	FK506-binding protein 2	16,2	6,2	35	2	7,9		9,2

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
163	E FUT2_ARATH	Fucosyltransferase 2	61,5	6,8	47	3	3,2		15,1
164	E G3PC_RANAC	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	36,5	7,7	56	8	9,2		39,1
165	E GLN12_ORYSJ	Glutamine synthetase cytosolic isozyne 1-2	39,2	5,7	36	1	3,1		17,5
166	E GLNA1_PEA	Glutamine synthetase nodule isozyne	38,9	5,4	47	4	7,0		14,2
167	E GNOM_ARATH	ARF guanine-nucleotide exchange factor GNOM	162,5	5,6	34	2	1,4		36,2
168	E H2A2_PEA	Histone H2A,2	15,7	11,1	60	7	15,4		9,4
169	E H2A4_ORYSI	Probable histone H2A,4	17,0	10,7	77	8	29,4		14,4
170	E H2A5_ARATH	Probable histone H2A,5	15,9	10,5	62	7	13,3		14,1
171	E H2B3_SOLLC	Histone H2B,3 (Fragment)	15,0	-	204	31	25,5		7,4
172	E H42_WHEAT	Histone H4 variant TH091	11,5	11,3	183	12	52,4		9,7
173	E HEMH_CUCSA	Ferrochelataze-2, chloroplastická	57,2	-	59	5	2,5		5,9
174	E HS901_ARATH	Heat shock protein 90-1	80,6	5,0	369	47	11,4		16,4
175	E HSP7C_PETHY	Heat shock cognate 70 kDa protein	71,2	5,1	379	36	22,7		19,0
176	E HSP80_SOLLC	Heat shock cognate protein 80	80,1	5,0	314	37	12,4		14,6
177	E HSP83_IPONI	Heat shock protein 83	80,8	5,0	420	57	9,7		13,9
178	E CH60A_ARATH	Chaperonin CPN60, mitochondriální	61,2	5,2	147	11	13,0		22,4
179	E CH61_CUCMA	Chaperonin CPN60-1, mitochondriální	61,0	5,1	182	13	16,9		21,3
180	E CHLH_ORYSJ	Magnesium-chelataze subunit ChIH, chloroplastická	153,4	5,6	38	3	2,0		12,3
181	E ICS_CATRO	Isochorismate syntáze, chloroplastická	64,0	5,9	45	5	3,6		7,1

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
182	E IF5A2_MEDSA	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	17,3	5,4	134	9	22,0		6,1
183	E LEGA2_PEA	Legumin A2	59,2	5,3	99	6	7,7		12,2
184	E LOX2_SOYBN	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2	97,1	5,3	69	14	3,1		19,1
185	E LOXX_SOYBN	Seed linoleate 9S-lipoxygenase	96,8	5,8	77	7	2,5		19,8
186	E LPAT2_BRANA	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 2	43,7	9,2	42	9	5,9		21,5
187	E LRK54_ARATH	L-type lectin-domain containing receptor kinase V,4	73,9	6,7	43	4	2,4		7,0
188	E LYK2_ARATH	Protein LYK2	73,1	5,8	44	4	4,1		36,3
189	E METK2_PINCO	S-adenosylmethionine synthase 2	43,0	5,6	242	33	18,3		14,1
190	E MNS1_ARATH	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase MNS1	63,5	6,1	45	2	3,6		21,7
191	E NACA_PINTA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein	22,4	4,3	86	6	19,5		13,9
192	E NDK1_PEA	Nucleoside diphosphate kinase 1	16,5	5,9	256	13	39,6		3,7
193	E NDK4_SPIOL	Nucleoside diphosphate kinase 4, chloroplastic	25,7	6,5	45	2	8,9		8,2
194	E NDUA9_ARATH	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	43,9	8,9	34	2	2,5		12,9
195	E NTPA_PEA	Nucleoside-triphosphatase	50,0	7,0	38	2	5,3		31,6

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
196	E ODP22_ARATH	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	58,4	-	44	2	3,9		13,8
197	E ODPB_PEA	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	38,8	5,4	45	3	3,1		16,2
198	E P2C75_ARATH	Probable protein phosphatase 2C 75	46,0	5,5	32	1	3,1		41,6
199	E P5CS_ORYSJ	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	77,7	6,4	39	2	3,5		35,5
200	E PDIA6_MEDSA	Probable protein disulfide-isomerase A6	40,5	5,3	76	7	7,1		14,1
201	E PDX13_ARATH	Pyridoxal biosynthesis protein PDX1,3	33,2	5,8	56	4	9,4		15,7
202	E PER45_ARATH	Peroxidase 45	35,8	9,4	35	3	4,9		16,6
203	E PER50_ARATH	Peroxidase 50	36,1	9,0	39	4	7,3		7,0
204	E PER73_ARATH	Peroxidase 73	35,9	9,4	150	13	5,8		10,0
205	E PHB3_ARATH	Prohibitin-3, mitochondrial	30,4	7,2	37	5	4,0		12,6
206	E PHSL_VICFA	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic	113,5	5,2	57	3	1,6		39,2
207	E PHYA_PEA	Phytochrome A	123,9	5,9	250	17	12,0		17,8
208	E PHYA_PETCR	Phytochrome A	124,7	5,7	52	3	2,9		24,3
209	E PIN2_ARATH	Auxin efflux carrier component 2	69,3	9,4	44	7	3,6		16,7
210	E PIP25_ORYSJ	Aquaporin PIP2-5	29,7	7,0	87	6	11,3		16,7
211	E PMA1_ORYSJ	Plasma membrane ATPase	104,8	6,3	172	8	7,8		16,5

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
212	E PNC2_ARATH	Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2	35,1	9,9	39	1	2,5		10,3
213	E POR_PEA	Protochlorophyllide reductase, chloroplastic	42,9	8,9	359	47	25,8		12,4
214	E PP154_ARATH	Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g15820	97,3	8,0	37	2	2,9		18,0
215	E PP253_ARATH	Putative pentatricopeptide repeat-containing protein At3g25060, mitochondrial	67,0	7,6	37	3	6,2		23,0
216	E PRD1_ARATH	Protein PRD1	149,0	5,2	36	2	1,6		35,9
217	E PROF_BETVU	Profilin (Fragments)	2,5	-	59	3	56,5		1,6
218	E PRS4_ORYSJ	26S protease regulatory subunit 4 homolog	49,6	5,9	70	5	7,4		18,1
219	E PRS6B_ARATH	26S protease regulatory subunit 6B homolog	45,7	5,4	35	3	4,7		11,4
220	E PS10B_ARATH	26S protease regulatory subunit S10B homolog B	44,7	8,3	109	11	14,3		15,6
221	E PS6AB_ARATH	26S protease regulatory subunit 6A homolog B	47,0	4,9	35	1	4,7		22,1
222	E PSA2A_ARATH	Proteasome subunit alpha type-2-A	25,7	5,5	46	6	14,9		8,5
223	E PSA5_SOYBN	Proteasome subunit alpha type-5	26,0	4,7	84	4	10,1		10,1
224	E PSA7_CICAR	Proteasome subunit alpha type-7	27,1	6,9	158	12	19,7		16,4
225	E PSA7B_ARATH	Proteasome subunit alpha type-7-B	27,3	8,7	81	9	8,8		27,1

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
226	E PSB3B_ARATH	Proteasome subunit beta type-3-B	22,7	5,6	36	2	11,8		25,9
227	E PSB6_ARATH	Proteasome subunit beta type-6	25,1	5,5	108	6	20,6		22,6
228	E PUM13_ARATH	Putative pumilio homolog 13	59,9	7,0	68	8	1,9		5,9
229	E R10A2_ARATH	60S ribosomal protein L10a-2	24,4	9,9	96	4	10,2		9,1
230	E R10A3_ARATH	60S ribosomal protein L10a-3	24,5	9,8	43	3	8,8		8,4
231	E R15A4_ARATH	40S ribosomal protein S15a-4	14,8	9,9	403	37	45,4		7,5
232	E RAH1D_ARATH	Ras-related protein RABH1d	23,1	6,6	67	3	10,6		11,9
233	E RBL_ERYCG	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	50,4	-	113	8	9,5		14,3
234	E REM17_ARATH	B3 domain-containing protein REM17	104,8	9,4	33	3	1,0		14,6
235	E RK16_PLAOC	50S ribosomal protein L16, chloroplastic	15,4	11,7	66	2	18,5		8,3
236	E RL10_SOLME	60S ribosomal protein L10	24,7	10,6	100	8	11,4		8,3
237	E RL11_MEDSA	60S ribosomal protein L11	20,7	10,0	74	4	14,9		8,5
238	E RL12_PRUAR	60S ribosomal protein L12	17,9	9,0	92	5	14,5		4,2
239	E RL223_ARATH	60S ribosomal protein L22-3	14,0	9,6	185	25	34,7		9,1
240	E RL23_ARATH	60S ribosomal protein L23	15,0	10,5	169	6	15,7		7,3
241	E RL241_ARATH	60S ribosomal protein L24-1	18,8	10,7	76	8	12,8		18,6
242	E RL35_EUPES	60S ribosomal protein L35	14,4	11,0	73	7	10,6		4,9
243	E RL74_ARATH	60S ribosomal protein L7-4	28,4	10,0	39	4	7,8		7,7
244	E RL9_ORYSJ	60S ribosomal protein L9	21,3	9,6	132	21	17,9		9,6
245	E RL91_ARATH	60S ribosomal protein L9-1	22,0	9,5	132	14	18,0		12,9
246	E RP12A_ARATH	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit RPN12A	30,7	4,8	63	3	9,4		8,3

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
247	E RPN2_ARATH	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2	74,6	6,9	31	2	2,7		13,7
248	E RPOC1_LIRTU	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	78,3	8,9	47	7	1,5		38,6
249	E RPOC2_DAUCA	DNA-directed RNA polymerase subunit beta"	157,7	9,0	48	3	1,8		27,2
250	E RRAA3_ARATH	Regulator of ribonuclease-like protein 3	17,6	5,3	33	2	5,4		7,0
251	E RS13_PEA	40S ribosomal protein S13	17,1	10,4	192	13	29,8		7,7
252	E RS14_LUPLU	40S ribosomal protein S14	16,3	10,9	299	30	42,0		7,6
253	E RS155_ARATH	40S ribosomal protein S15-5	16,8	10,5	47	4	20,8		6,4
254	E RS15A_DAUCA	40S ribosomal protein S15a	14,8	9,9	344	40	37,7		7,3
255	E RS18_ARATH	40S ribosomal protein S18	17,5	10,5	43	5	13,8		7,3
256	E RS24_ARATH	40S ribosomal protein S2-4	30,1	10,2	54	3	5,4		12,9
257	E RS252_ARATH	40S ribosomal protein S25-2	12,1	10,7	197	21	28,7		2,3
258	E RS30_ARATH	40S ribosomal protein S30	6,9	12,2	53	1	16,1		4,6
259	E RS4_GOSHI	40S ribosomal protein S4	29,6	10,2	299	28	19,1		11,4
260	E RS5_NICPL	40S ribosomal protein S5 (Fragment)	17,1	-	106	15	15,6		8,3
261	E SAHH_MEDSA	Adenosylhomocysteinase	53,1	5,7	110	6	7,6		22,1
262	E SAR2_SOLLC	GTP-binding protein SAR2	21,9	6,4	102	6	12,4		11,1
263	E SDLCA_SOYBN	Dynamamin-related protein 12A	68,3	8,0	225	15	14,9		19,1
264	E SFR2_ORYSJ	Beta-glucosidase-like SFR2, chloroplastic	73,2	6,3	44	6	1,5		43,7
265	E SKIP1_ARATH	F-box protein SKIP1	34,5	5,6	40	2	3,0		40,9

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
266	E SKS2_ARATH	Monocopper oxidase-like protein SKS2	66,4	5,9	31	2	3,2		20,2
267	E SODC_PEA	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	15,3	5,6	73	3	23,7		9,1
268	E SODM_PRUPE	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	25,4	6,3	45	2	6,6		10,3
269	E SUS7_ORYSJ	Sucrose synthase 7	97,7	8,0	61	3	2,5		12,3
270	E TBA1_ANEPH	Tubulin alpha-1 chain	49,8	5,0	410	60	37,9		11,8
271	E TBA6_ARATH	Tubulin alpha-6 chain	49,5	4,9	544	97	41,1		12,2
272	E TBB_CICAR	Tubulin beta chain	50,5	4,8	410	59	23,8		14,5
273	E TBB2_PEA	Tubulin beta-2 chain (Fragment)	50,4	-	412	56	22,4		14,6
274	E TBB3_PEA	Tubulin beta-3 chain (Fragment)	49,5	-	402	59	23,4		14,9
275	E TCPE_ARATH	T-complex protein 1 subunit epsilon	59,3	5,5	98	7	5,4		14,5
276	E TPPI_ARATH	Probable trehalose-phosphate phosphatase I	41,9	9,4	63	4	7,9		33,7
277	E VATA_BRANA	V-type proton ATPase catalytic subunit A	68,7	5,2	309	36	13,6		15,5
278	E VATB1_ARATH	V-type proton ATPase subunit B1	54,1	5,0	193	12	14,8		19,5
279	E VATE_MESCR	V-type proton ATPase subunit E	26,1	6,5	58	4	4,4		12,2
280	E VCL1_PEA	Vicilin, 14 kDa component	14,0	5,3	226	18	41,1		6,3
281	E VCLA_PEA	Provicilin (Fragment)	31,5	-	188	24	16,7		12,1
282	E VDAC_PEA	Outer plastidial membrane protein porin	29,6	9,1	226	10	21,0		11,9
283	E Y4443_ARATH	Probable transposase-like protein At4g04430	38,9	7,1	48	4	5,7		19,9

Tab. 1 Seznam identifikovaných proteinů z precipitátu extraktu hrachových semenáčků (*pokračování*)

Číslo proteinu	Identifikační zkratka proteinu	Název proteinu	MW [kDa]	pI	Skóre	Peptidy počet	Pokrytí proteinu [%]	sekvence	RMS90 [ppm]
284	E YCF1_PELHO	Putative membrane protein ycf1	308,0	10,1	30	2	0,7		34,7
285	E YCF1_PINTH	Putative membrane protein ycf1	205,2	9,4	37	2	1,7		19,0
286	E YCF2_CARPA	Protein ycf2	269,6	8,6	36	2	1,0		12,8
287	E YCF2_IPOPU	Protein ycf2	257,8	9,2	70	3	1,5		26,7

Zkratky M a E označují metodu, kterou byl protein identifikován. M: nanoLC-MALDI TOF/TOF MS/MS, E: nanoLC-ESI Q-TOF MS/MS; Identifikační zkratka proteinu: kód proteinu v databázi Swiss-Prot/UniprotKB; MW: molekulová hmotnost proteinu; pI: vypočítaná predikovaná hodnota izoelektrického bodu proteinu, Skóre ukazuje hodnotu pravděpodobnosti přiřazení peptidů k příslušné sekvenci, pro nanoLC-MALDI TOF/TOF MS/MS byla minimální stanovena na 80, resp. 30 u nanoLC-ESI Q-TOF MS/MS, menší minimální hodnota skóre u nanoLC-ESI Q-TOF MS/MS byla zvolena díky větší přesnosti měření; Peptidy počet: počet identifikovaných peptidů ze sekvence proteinu; Pokrytí sekvence: velikost podíl identifikované části proteinová sekvence vůči celkové sekvenci; RMS90: střední kvadratická odchylka MW mezi identifikovanými peptidy a teoretickými hodnotami

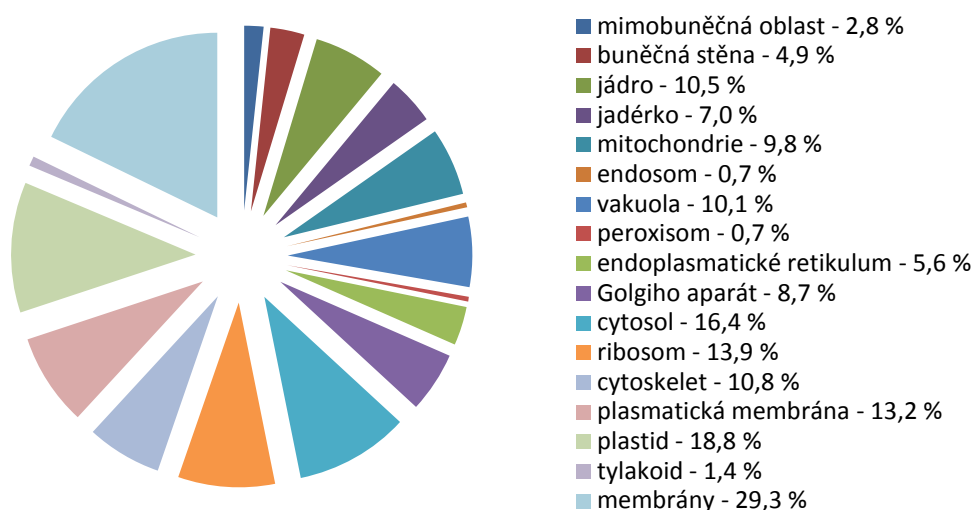
Největší podíl identifikovaných nejaderných proteinů tvoří tubuliny cytoskeletu a membránové proteiny z ostatních buněčných organel. Lze tak usuzovat na základě vysokého počtu identifikovaných peptidů náležících těmto proteinům. Identifikováno bylo i množství zásobních proteinů např. vicilin. Početné zastoupení mají velké komplexy molekulárních chaperonů z cytoplasmy, mitochondrií i chloroplastů, které mohly být koprecipitovány s NK díky své velikosti.

8.3 Analýza identifikovaných proteinů podle genové ontologie

Pro porovnání lokalizace identifikovaných proteinů, jejich funkcí a zapojení do buněčného metabolismu a dalších procesů byly použity nástroje pro genovou ontologii AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/index.cgi>) a DAVID 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) za využití přístupových kódů jednotlivých identifikovaných proteinů v databázi Swiss-Prot z portálu UniprotKB. Další informace o proteinech byly vyhledány nástroji UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) nebo pomocí dat z Plant-PLoc (Chou a Shen, 2007).

Zastoupení identifikovaných proteinů vyskytujících se v jádře a jadérku je nejméně 25,4 %. V cytosolu nezahrnujícím ostatní buněčné kompartmenty je možný výskyt 16,4 % ze všech identifikovaných proteinů, v plasmatické membráně a buněčné stěně se může nalézat 18,1 % proteinů a 2,8 % proteinů lze najít i mimo buňku (viz Obr. 8).

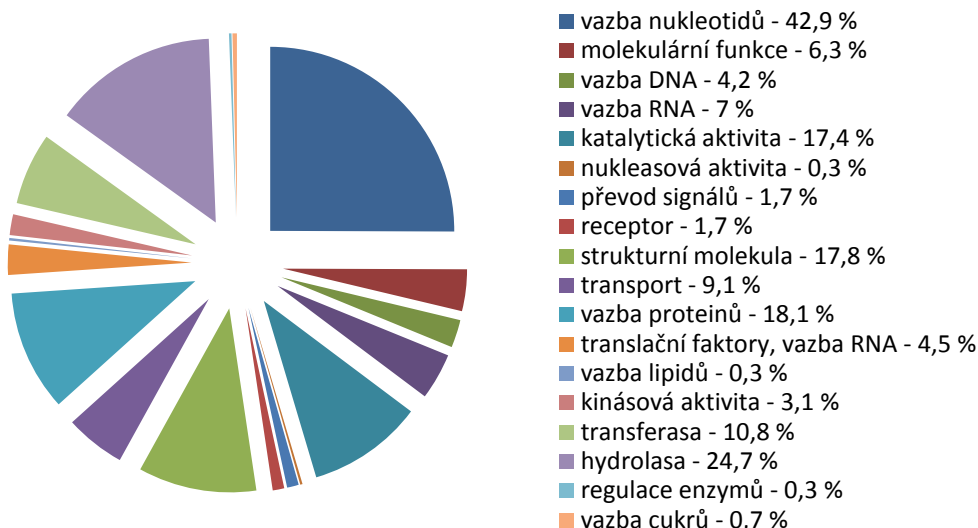
Lokalizace identifikovaných proteinů



Obr. 8 Rozdělení proteinů identifikovaných v $MnCl_2$ precipitátu extraktu hrachových semenáčků podle lokalizace v buněčných kompartmentech. Koláčový graf je založený na výsledcích analýzy GO pojmů pro jednotlivé proteiny nástrojem GOSlimViewer (<http://www.agbase.msstate.edu>).

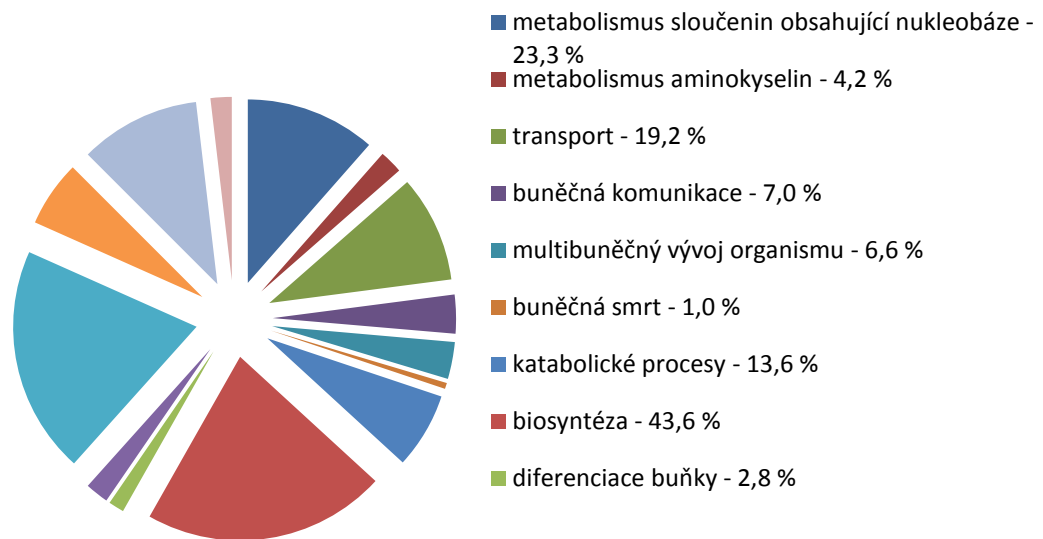
Shrnutím podle funkce má téměř polovina (42,9 %) identifikovaných proteinů schopnost vázat nukleotidy. K molekulám DNA se váže 4,2 % identifikovaných proteinů. Více než 24,7 % všech identifikovaných proteinů funguje jako hydrolasy (Obr. 9). Funkci receptoru má 1,7 % z nalezených proteinů. Podle biologické aktivity je 43,6 % proteinů zapojeno do biosyntetických procesů, 23,3 % se účastní metabolismu sloučenin obsahující nukleotidy a 19,2 % je zapojeno do transportu. Méně početné je zastoupení proteinů zapojených do procesů přenosu signálů 1,0 %, do buněčného cyklu zasahuje 2,8 % a procesu buněčné smrti se účastní 1,0 % z identifikovaných proteinů (Obr. 10). Podle softwaru DAVID byl nejvíce identifikovaným proteinům přiřazen GO pojem ribozomální protein při hodnotě-P 3,60E-27. Tomuto GO-pojmu odpovídalo 25 z 209 proteinů, které tento software rozeznal. Další nejvíce odpovídající termíny pro soubor analyzovaných proteinů v závislosti na jejich buněčné lokalizaci jsou uvedeny v grafu (Obr. 11). Při řazení dle genové ontologie může být jednomu proteinu přiřazeno více kritérií, hodnot. U některých proteinů naopak např. informace o možné lokalizaci ve více buněčných kompartmentech chybí. Konečný součet všech proteinů zařazených dle příslušných kritérií tak může být odlišný, a to i několikanásobně vyšší než počet identifikovaných proteinů.

Funkce identifikovaných proteinů



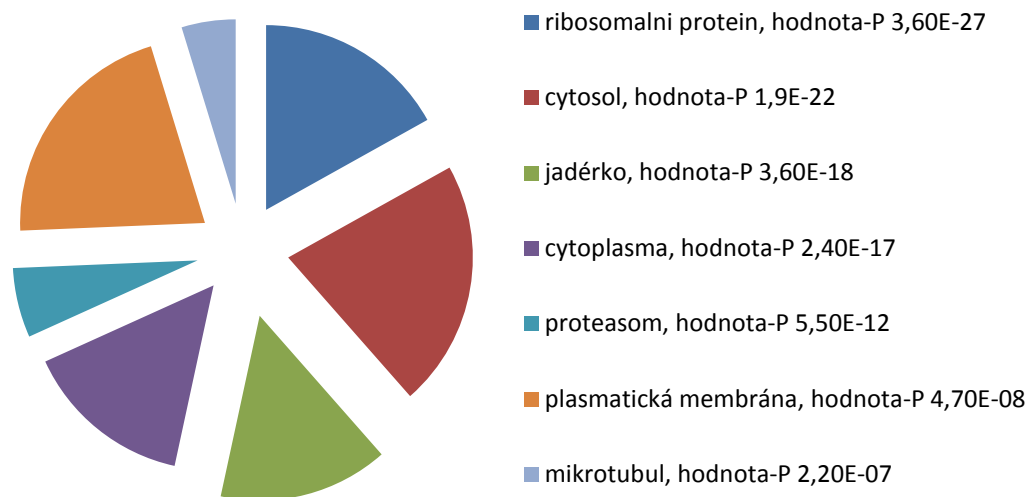
Obr. 9 Rozdělení proteinů identifikovaných v $MnCl_2$ precipitátu extraktu hrachových semenáčků podle jejich funkce. Koláčový graf je založený na výsledcích analýzy GO pojmů pro jednotlivé proteiny nástrojem GOSlimViewer (<http://www.agbase.msstate.edu>).

Biologické procesy



Obr. 10 Rozdělení proteinů identifikovaných v $MnCl_2$ precipitátu extraktu hrachových semenáčků podle jejich zapojení do různých buněčných procesů. Koláčový graf je založený na výsledcích analýzy GO pojmů pro jednotlivé proteiny nástrojem GOSlimViewer (<http://www.agbase.msstate.edu>).

Lokalizace identifikovaných proteinů dle DAVID



Obr. 11 Rozdělení proteinů identifikovaných v $MnCl_2$ precipitátu extraktu hrachových semenáčků podle lokalizace nástrojem DAVID gene functional classification tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Pro srovnání jsou k jednotlivým GO pojmům buněčných kompartmentů přidány i velikosti hodnot-P. Vybrány byly GO pojmy s hodnotami-P < E-07. Velikost hodnoty-P je nepřímo závislá na počtu identifikovaných proteinů odpovídajících danému GO pojmu.

9 Diskuse – jaderné proteiny

9.1 Metoda precipitace jaderných proteinů pomocí MnCl_2

Pro studium jaderného proteomu nebo proteinového zastoupení v chromatinu buněk se jako výchozí materiál využívají izolovaná jádra, ze kterých je různými metodami izolován chromatin následně extrahován. Při izolaci těchto proteinů je cílem izolovat celý komplex nukleových kyselin i s asociovanými proteiny s možností zachycení proteinů nalézajících se v jejich blízkosti. K tomuto kroku se používalo síťovacích činidel vytvářejících pevná spojení mezi NK a proteiny, které musely být následně zase odděleny (Collas a Dahl, 2008). Běžnou metodou je použití specifických protilátek proti histonům, které se vážou na DNA (Lambert et al., 2009). Na první pohled podobným způsobem funguje i použitá metoda precipitace jaderných proteinů a NK použitím MnCl_2 .

Možnost využití této metody pro izolaci NK byly popsány při izolaci plasmidové DNA *Enterobacter aerogenes* (Sandhya R Shenoy, 2003). Výhodné vlastnosti stojící za funkcí této látky jsou dány vazebnými možnostmi iontu Mn^{2+} . Schopnost Mn^{2+} vázat přímo báze nukleových kyselin a současně molekuly proteinů (Yamagata et al., 2002), tuto metodu odlišuje od výše zmíněných postupů a zřejmě má nemalý podíl na identifikaci mnoha cytoplasmatických proteinů, ribosomálních a ostatních proteinů zapojených do procesu translace mRNA nebo procesů dělení buňky a metabolismu nukleových kyselin, nalézajících se mimo jádro. Použití Mn^{2+} iontů do výsledné nízké $7,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ koncentrace má také pozitivní efekt na stabilitu struktury NK, kdy by při této koncentraci nemělo docházet k výrazným změnám konformace DNA (Polyanichko et al., 2004). Změny struktury DNA by mohly mít za následek disociaci navázaných proteinů. Vliv Mn^{2+} na stabilitu a obnovu konformace NK i po denuraci mírně zvýšenou teplotou je možnou příčinou mého neúspěšného pokusu s použitím DNasy I s cílem získat možné další proteiny vázané na DNA enzymovou degradací nukleové kyseliny. Tento výsledek je souladu se zjištěním Blocha a Cedara, kteří u chromatinu z erytrocytů kuřat precipitovaného $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ MnCl_2 pozorovali zvýšení odolnosti proti působení stafylokokové nukleasy o 12 % (Bloch a Cedar, 1976). Výsledek experimentu také podporuje tvrzení Lamberta a spolupracovníků, kteří se domnívají, že většina proteinů, u kterých se předpokládá asociace s DNA, se ztrácí už během přípravy vzorku, kdy příčinou je právě přítomnost velkých komplexů DNA a proteinů, které nejsou rozpuštěny a centrifugací se shlukují (Lambert et al., 2009). Mezi použitou metodou

extrakce proteinů z komplexu NK tepelnou denaturací při 60°C nebo enzymovým působením DNasy I tak byl pozorován jasný rozdíl po provedení SDS-PAGE. U extraktu ošetřeného DNasou I vůbec nedošlo k rozdělení proteinů z naneseného vzorku dle molekulové hmotnosti. Při nanesení supernatantu z extraktu nebyly pozorovány na gelu žádné proteinové pásy. Pokud byl nanesen neoddělená část extraktu, také nebyly pozorovány žádné proteinové pásy, ale byl zjištěn velký pás na rozhraní zaostřovacího a dělícího gelu. Zřejmě se mohlo jednat o shluk komplexů nedegradovaných nukleových kyselin, které by jinak po tepelné degradaci nebo působení DNasy I prošly gelem. Tato skutečnost může být vysvětlena tak, že právě díky působení Mn^{2+} došlo k těsné vzájemné asociaci NK a struktura DNA se stala pro tento enzym nepřístupnou.

9.2 Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

Po porovnání identifikovaných proteinů z měření provedených na obou použitých hmotnostních spektrometrech s MALDI a ESI ionizací, se paralelní využití obou přístrojů zdá být vhodnou volbou. Obě techniky zaznamenali pouze 21 shodných identifikací z celkového počtu 287. Většina identifikací tvořících více než 70 % byla tedy unikátní a závislá na zvoleném přístroji. Poměr identifikovaných proteinů pro oba přístroje je asi 2:1 pro ESI-Q/TOF, což je přesně opačný výsledek než hodnoty publikovány v práci Petrovská et al. pro NP ječmene. Ve zmíněné práci však byl použit jako výchozí materiál jaderná extrakt ošetřený DNasou I. Příčinou mohou být rozdílné možnosti ionizace analyzovaných peptidů oběma použitými technikami a původ identifikovaných proteinů i z mimojaderných buněčných kompartmentů (viz kapitola 2.5).

9.2.1 Proteiny z jádra

Podle distribuce identifikovaných proteinů v buňce na základě informací z GO databází bylo 29 z nich lokalizováno do jádra a dalších 20, většinou podjednotek ribozomů do jadérka. Ribozomálních proteinů bylo nalezeno celkem 47. Celkem tedy bylo identifikováno 72 proteinů s možnou lokalizací v jádře, což je čtvrtina ze všech identifikovaných proteinů. Mezi těmito proteiny jsou zařazeny např. F-box protein SKIP1, výhradně se nalézající v jádře jako součást komplexu ubikvitinligasy (Risseuw et al., 2003). V jádře se také může vyskytovat možný mediátor transkripční podjednotky 37e RNA polymerasy II „probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e protein“ zapojený do procesu modifikace AK proteinů k jejich následnému směřování do oblasti jaderného obalu (Brkljacic et al., 2009, s. 1)). V jadérku se může

vyskytovat identifikovaný aktin-7, isoforma aktinu, jehož tvorba je silně indukována vnějším působením auxinů (Kandasamy et al., 2001). Aktin-7 je také lokalizován v buněčné stěně. Primárně v jádře lokalizovaný protein je homolog E proteinu kontroly buněčného dělení 48 „cell division control protein 48 homolog E“ účastníci se procesů buněčného dělení, růstu a membránového transportu (Feiler et al., 1995).

9.2.2 Proteiny buněčné stěny, cytoplasmy a mimobuněčného prostoru

Mimo zmíněný aktin-7 byly v precipitátu buněčného extraktu hrachu identifikovány i jiné nejaderné isoformy aktinu tvořící buněčnou kostru. Proteiny buněčné kostry se mohou vyskytovat v asociaci s chromatinem, což mohlo být důvodem identifikace mnoha z nich po precipitaci $MnCl_2$. Aktin a myosin se podílejí na segregaci chromozomů v mitóze (Fabian a Forer, 2007). Mezi proteiny označenými jako cytosolické byly identifikovány molekuly s transportní funkcí dynaminu-2A a dynaminu příbuzné proteiny označené 1C a 1D. Tyto motorové proteiny s GTPasovou aktivitou se podílí na transportu mezi cytoplasmou a jádrem a účastní se cytokineze při buněčném dělení (Hong et al., 2003). Identifikována byla i podjednotka pro jádro specifických transportních proteinů importinů, rozpoznávajících NLS motiv přenášených proteinů (Jiang et al., 1998). Mimo buňku lze nalézt zmíněný „probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e protein“. Mimo podjednotek ribozómů, iniciačních a translačních faktorů byl identifikován cytosolický RNA vázající protein „putative pumilio homolog 13“. Pumilio proteiny jsou u živočichů a kvasinek zapojeny do procesů postranlačních úprav a transportu RNA, a zpracování a translaci rRNA. Jejich funkce u rostlin není dostatečně prostudována (Abbasi et al., 2011).

9.2.3 Ostatní proteiny metabolismu nukleotidů a nukleových kyselin

Podle funkce jednotlivých proteinů převažují proteiny se schopností vázat nukleové kyseliny a obecně nukleotidy. Do skupiny proteinů metabolismu bazí NK byl zařazen nalezený protein „pentatricopeptide repeat-containing protein At2g15820“ vyskytující se v chloroplastech, který je nezbytný pro oddělování a vznik proteinů komplexu fotosystémů I a II (de Longevialle et al., 2008). Z chloroplastu také pochází izolované beta podjednotky DNA řízené RNA polymerasy zprostředkovávající přepis DNA do RNA. Identifikována byla i řada enzymů katalyzujících vznik nukleosidtrifosfátů jiných než ATP např. nukleosid difosfátkinasa 1 a 4 (Finan et al., 1994). Do této skupiny bylo zahrnuto i mnoho proteinů fungujících jako molekulární pumpy, nebo transportní

proteiny využívající a vázající ATP. ATP pro degradaci využívá proteasom 26S. Tento enzym funguje také jako součást proteasomu jádra a přiřazuje se mu pozitivní působení při vzniku transkripčního preiniciačního komplexu RNA polymerázy II (Fu et al., 1999). K tomuto proteasomu degradující specificky ubikvitinylované proteiny patří i nalezený protein „26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 homolog A“ zasahující nepřímo do signální dráhy cytokininů (Smalle et al., 2002, s. 12). „ARF guanine-nucleotide exchange factor GNOM“ (GNOM) je k membránám asociovaný protein aktivující malé ARF G-proteiny, regulující vezikulární transport. Transport závislý na GNOM tak může ovlivňovat polaritu buňky, což má za následek orientovaný přenos auxinů (Steinmann et al., 1999). Transportu auxinů se účastní i nalezený „auxin efflux carrier component 2 protein“ a transmembránový „auxin transport protein BIG“. Na ochraně chloroplastové DNA proti oxidaci se podílí „2-Cys peroxidoredoxin BAS1-like protein“ (Dietz et al., 2002) , stejně může fungovat i identifikovaná protochlorofylidreduktasa. Možný větší výskyt a nalezení obou proteinů v precipitátu $MnCl_2$ zřejmě souvisí se stresem vyvolaným u použitých rostlin nedostatkem světla během jejich růstu.

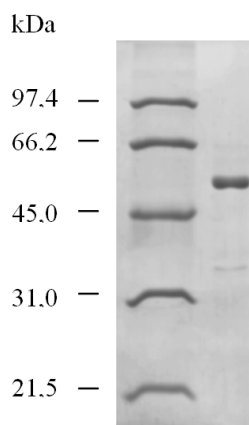
9.3 Srovnání softwarových nástrojů použitých pro genovou ontologii

Pro informace o genové ontologii identifikovaných proteinů byly použity 2 odlišné softwarové nástroje: DAVID a AgBASE. Software DAVID umožňuje řazení proteinů do skupin dle u nich nejvíce se vyskytujících GO pojmů. Výsledkem jsou hodnoty-P vypovídající s jakou pravděpodobností analyzovaný soubor proteinů odpovídá danému GO pojmu. Velmi omezujícím prvkem tohoto nástroje se však ukázala nutnost zvolit typ organismu, ke kterému se analyzovaný soubor proteinů vztahuje, např. *Arabidopsis thaliana*. Oproti tomu software AgBase řadí proteiny do skupin pouze dle příbuznosti GO pojmů bez závislosti na původu jednotlivých proteinů, což bylo pro analyzovaný soubor rostlinných proteinů velmi výhodné. Tento rozdíl v možnosti analýzy souboru identifikovaných proteinů oběma nástroji byl s největší pravděpodobností důvodem, proč software DAVID rozpoznal pouze 209 ze všech 288 identifikovaných proteinů a do skupin dle GO pojmů zařadil 68 proteinů, z nichž většinu tvořili identifikované ribosomální podjednotky. Při interpretaci dat z tohoto softwaru je proto nutno na tento postup brát zřetel. Software AgBase zařadil všechny proteiny pro které byl uveden aspoň 1 GO pojem. Výhodou AgBase je také možnost manuálního doplnění GO pojmů ke každému proteinu.

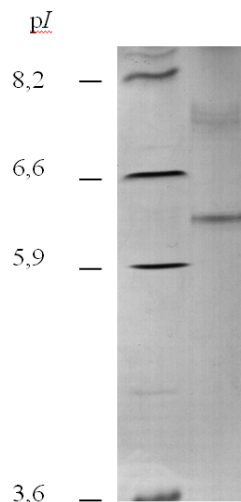
10 Výsledky a diskuse - OPAO

Pomocí mírně pozměněné dříve popsané metody izolace a purifikace byl získán enzym OPAO z nadzemní části etiolovaných rostlinek ovsa (160 g) (Stránská et al., 2007). Po finálním přečištění gelovou permeační chromatografií a zahuštění eluátu byl získán protein o koncentraci $0,31 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 4). Čistota izolovaného produktu byla ověřena SDS PAGE, kde byl pozorován výrazný pruh odpovídající molekulové hmotnosti 52,5 kDa (Obr. 12), což téměř odpovídá i vypočtené hodnotě MW 54 kDa z retenčního času po chromatografické separaci na koloně BioSil SEC125-5. Možnou kontaminaci produktu tvořil neznámý protein s MW okolo 34 kDa pozorovatelný na stejném gelu. Tento protein nebyl identifikován.

Po vizualizaci gelu po IEF byla pomocí známých hodnot *pI* standardů stanovena hodnota *pI* pro nativní OPAO na 6,5 (obr. 13).

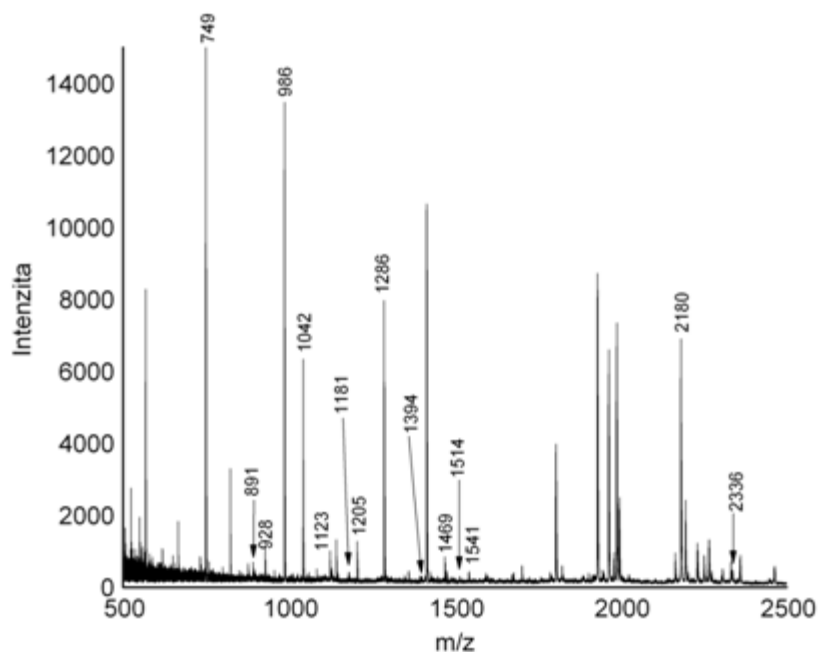


Obr. 12 SDS-PAGE OPAO. Vlevo proteinové standardy (Bio-Rad) s vyznačenými hodnotami jejich molekulové hmotnosti. Vpravo vzorek OPAO (určená MW je 52,5 kDa), množství 1,5 μg . Barveno Coomasie Brilliant Blue R-250.

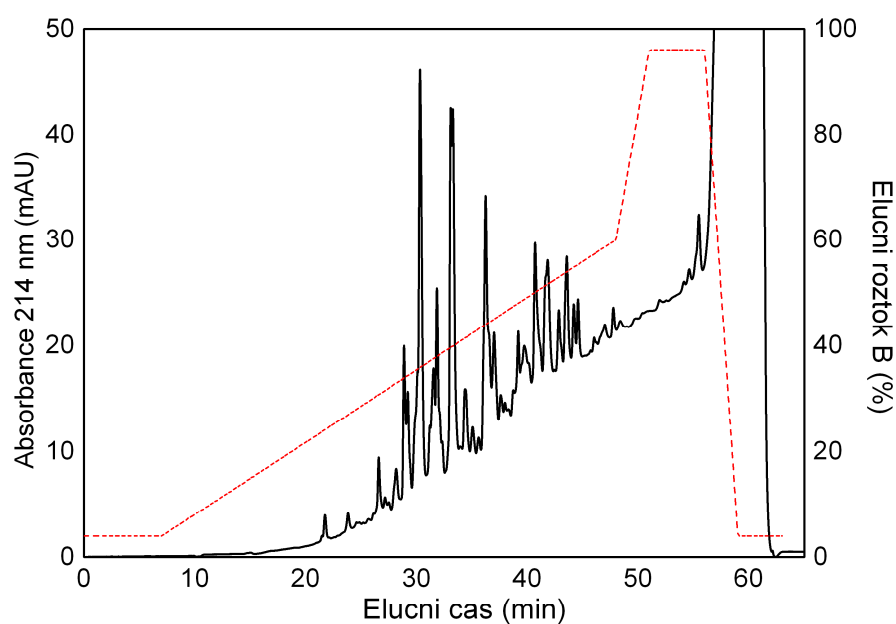


Obr. 13 Nativní IEF OPAO. Vlevo proteinové standardy pro IEF (Sigma Aldrich) s vyznačenými hodnotami jejich izoelektrického bodu. Vpravo vzorek OPAO, množství 1,5 µg. Barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Hmotnostní spektrum peptidů získaných po štěpení OPAO v gelu z SDS PAGE modifikovaným trypsinem (Sebela et al., 2006) je zobrazeno na Obr. 14. Po separaci digestu vzorku OPAO nanoLC na 340 peptidových frakcích na MALDI destičku byly MS/MS analýzou identifikovány jednotlivé peptidy na základě sekvence (Obr. 15).

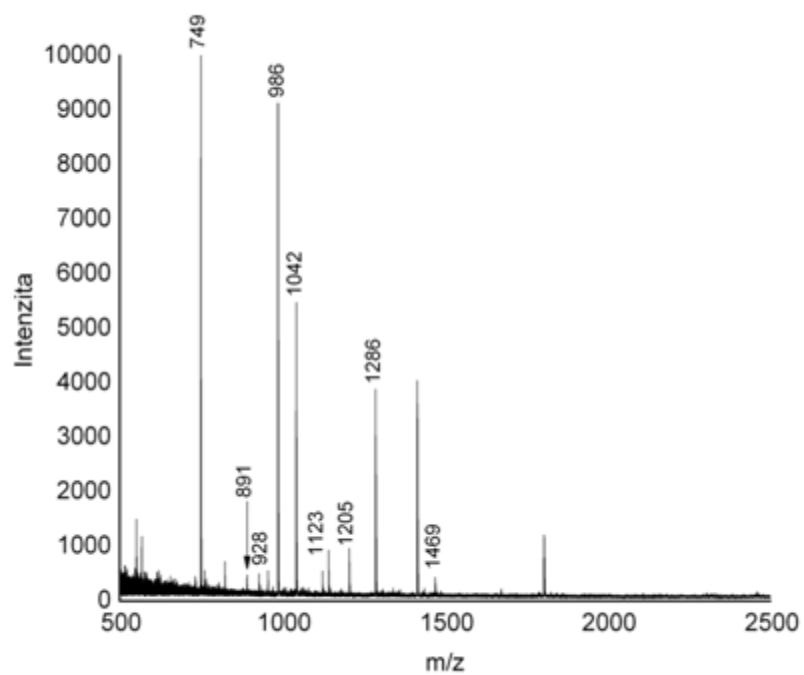


Obr. 14 Hmotnostní spektrum peptidového digestu OPAO. Popisem jsou vyznačeny identifikované peptidy OPAO s potvrzenými AK sekvencemi publikovanými v této práci. Ionty při m/z 2336; 2180; 1286 a 749 byly popsány dříve (Stránská et al., 2007)



Obr. 15. Chromatogram separace peptidové směsi OPAO pomocí nanoLC. Černě vyznačen záznam z UV/VIS detektoru při 214 nm, červeně vyznačen průběh gradientu elučního roztoku B (80 % ACN; 0,1 % TFA).

Spektrum po prohledání databáze SWISS-PROT odpovídalo nejvíce sekvenci MPAO (přístupový kód PAO_MAIZE) s pravděpodobnostním skóre 680 a 10 identifikovanými peptidy. Vyhledáváním v databázi NCBIInr byla zjištěna při vysokém skóre 904 shoda 13 nalezených peptidů se sekvencí hypotetickému proteinu OsI_33252 (gi:218184397). Z ostatních proteinů peptidovému spektru nejlépe odpovídala PAO z ječmene (gi:14485485) se skóre 649 a 10 identifikujícími peptidy. Data získaná pro identifikaci peptidů předtím manuálně předseparovaných gradientem ACN na C18 ZipTip pipetových špičkách neposkytla žádné další informace, nebyly tak identifikovány další peptidy z AK dosud neznámé sekvence OPAO. Porovnáním MS spekter frakcí eluovaných roztoky s různým obsahem ACN a následnou MS/MS analýzou s předseparací peptidů nanoLC na 120 frakcí bylo zjištěno, že všechny nalezené peptidy ze vzorku celkového digestu OPAO byly obsaženy ve frakcích s 25 % a 35 % ACN (Obr. 16). Celkem bylo identifikováno 20 peptidů v rozmezí MW od 879 do 1540 Da (Tab. 2).



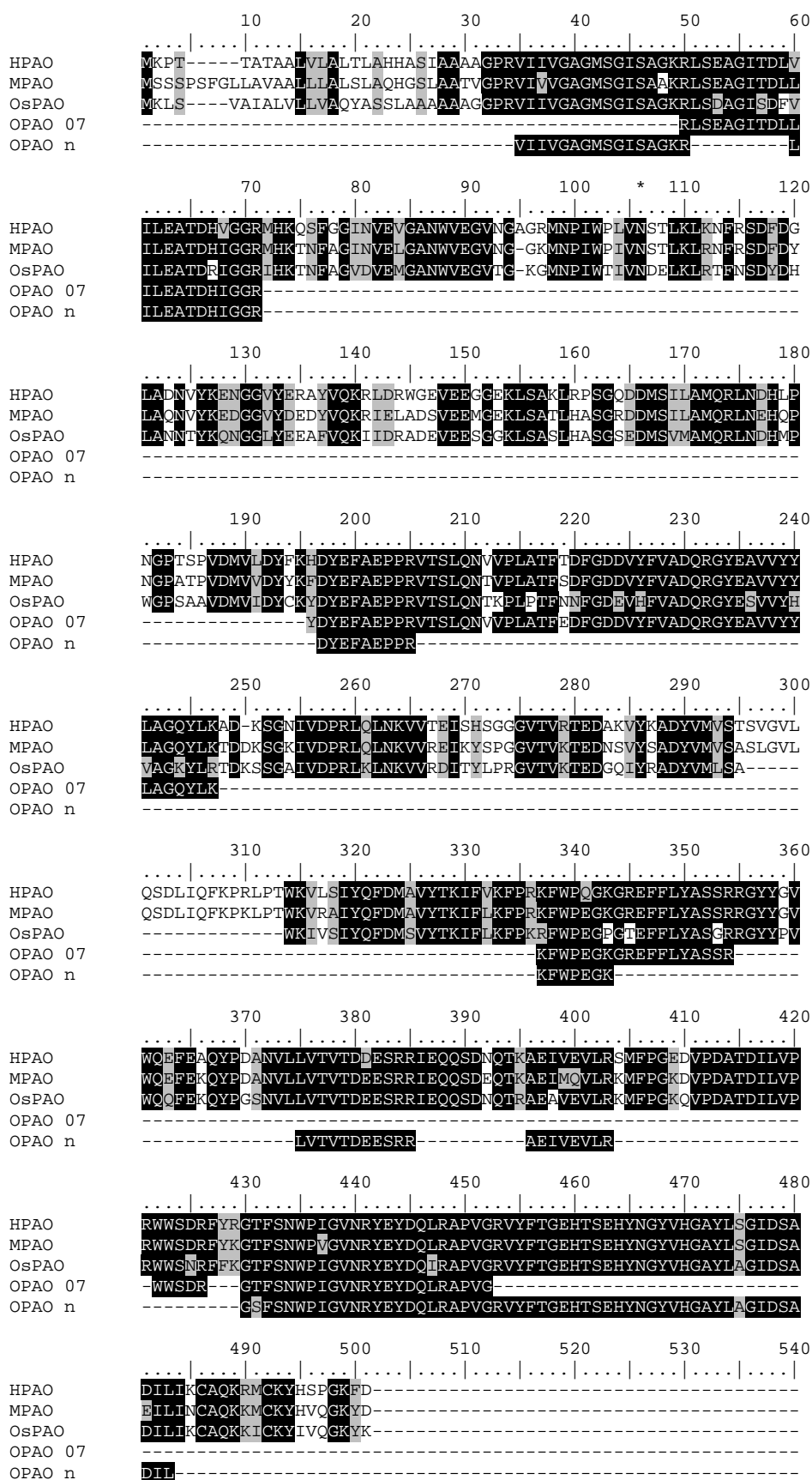
Obr. 16. Hmotnostní spektrum frakce peptidového digestu OPAO po eluci 25% roztokem ACN. Popisem jsou vyznačeny identifikované peptidy.

Tab. 2 Sekvence peptidů nalezených analýzou trypsinového digestu izolované OPAO metodou nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS a MS/MS

č.	sekvence	naměřená molekulová hmotnosť [M+H] ⁺ (Da)	vypočtená molekulová hmotnosť [M+H] ⁺ (Da)	rozdíľ (Da)	vynechaná štěpná místa
1	NGYVHGAY	880,4068	880,3875	0,0193	
2	KFWPEGK	891,4744	891,4650	0,0094	1
3	AEIVEVLR	928,5536	928,5389	0,0147	
4	YEYDQIR	986,4652	986,4505	0,0147	
5	SNWPIGVNR	1042,5487	1042,5356	0,0131	
6	DYEFAEPPR	1123,5074	1123,4982	0,0092	
7	LVTVTDEESR	1148,5890	1148,5721	0,0169	
8	ILEATDHIGGR	1181,6354	1181,6200	0,0154	
9	SNWPIGVNRY	1205,6119	1205,5989	0,0130	1
10	FTGEHTSEHY	1207,4991	1207,4942	0,0049	
11	LILEATDHIGGR	1294,7192	1294,7041	0,0151	
12	LVTVTDEESRR	1304,6878	1304,6732	0,0146	1
13	GSFSNWPIGVNR	1333,6629	1333,6575	0,0054	
14	VIIVGAGMSGISAGK VIIVGAGMSGISAGK	1359,7693	1359,7592	0,0101	
15	(oxidace)	1375,7600	1375,7541	0,0059	
16	TGEHTSEHYNGY	1394,5570	1394,5535	0,0035	
17	VYFTGEHTSEHY	1469,6314	1469,6259	0,0055	
18	VHGAYLAGIDSADIL	1514,7864	1514,7777	0,0087	
19	VIIVGAGMSGISAGKR	1515,8518	1515,8603	-0,0085	1
20	FTGEHTSEHYNGY	1541,6356	1541,6219	0,0137	

MS/MS spektra byla získána bez kolizní disociace pomocí tzv. “laser-induced metastase fragmentation“ použitím LIFT cely pro akceleraci fragmentů. Frakce eluátu kokrytalované s maticí CHCA na destičce AnchorChip 800 byly automaticky měřeny jednotlivě v MS módu a 10 nejintenzivnějších peptidových iontů z každého sumárního hmotnostního spektra bylo vybráno jako prekurzory pro následné měření v MS/MS módu. Peptidové sekvence byly určeny na základě databázového vyhledávání s MS/MS daty, případně manuální *de novo* analýzou.

Získané sekvence AK z identifikovaných peptidů byly pomocí programu BioEdit s rozšířením ClustalW naroubovány na známou AK sekvenci MPAO a porovnány se AK sekvencemi dalších rostlinných PAO (Thompson et al., 1994)(Obr. 17).



Obr. 17. Srovnání AK sekvencí PAO. K vytvoření obrázku bylo použito programu pro zpracování sekvencí BioEdit (verze 7.2.5, Ibis Biosciences)(Hall, 1999) a známých

aminokyselinových sekvencí rostlinných PAO a peptidových sekvencí OPAO získaných dříve (Stránská et al., 2007) a nyní. HPAO – *Hordeum vulgare*PAO (gi: 14485485); MPAO – *Zea mays*PAO (gi:6225822), OsPAO – *Oryza sativa*PAO (gi:218184397); OPAO 07 – *Avena sativa*PAO peptidové sekvence z článku Stránská et al. 2007; OPAO n - nově identifikované peptidové sekvence z primární struktury OPAO. Hvězdičkou je označeno místo možné glykosylace.

Výsledky získané v tomto experimentu i bez ověření enzymové aktivity dokazují, že izolovaným proteinem byla polyaminoxidasa z ovsa. Zjištěná molekulová hmotnost je velmi podobná publikovaným hodnotám 51 a 56 kDa (Sakakibara, 2014; Stránská et al., 2007). Obě práce se liší metodami izolace OPAO. Sakakibara (2014) uvádí užití pouze 1 stupňové purifikace navázáním proteinu z přefiltrovaného extraktu na částice karboxymethyl-Sephadexu, jejich následné naplnění do skleněné kolony, promytí a eluci. Postup izolace dle Stránská et al. (2007), z jejíž článku vycházela metodika izolace OPAO v této práci, oproti tomu zahrnuje 3 stupňovou purifikaci iontoměničovou chromatografií zakončenou dělením na koloně s molekulovým sítem. Federico et al. (1989b) publikoval pro OPAO MW 63 kDa. Podle podobnosti dosud známých částí AK sekvence se dala předpokládat glykosylace tohoto enzymu na Asn zbytku odpovídajícím Asn77 MPAO. Podíl sacharidů na celkové MW jiných PAO je okolo 3%, jde o data publikována pro kukuřici (Suzuki a Yanagisawa, 1980); (Federico et al., 1989a) a ječmen (Radová et al., 2001), což je v případě MPAO podíl na molekulové hmotnosti zhruba 1,5 kDa. Stejně velké zastoupení oligosacharidů se dá předpokládat i pro OPAO. Pokud je AK sekvence OPAO v okolí glykosylačního místa stejná jako MPAO, peptidům se sekvencí tohoto místa *MNPIWPIVNSTLK*; *MNPIWPIVNSTLKLR* by po štěpení trypsinem odpovídaly signály při m/z 1513,8 a 1783,2 které při analýze nebyly zaznamenány. Ale samozřejmě mohou být okolní sekvence odlišné. Glykosylace proteinu může být příčinou zjištěné zdánlivě menší MW z důvodu tvorby prostorově výhodnější kulovité struktury lépe procházející gelem při SDS-PAGE. Experimentem kdy byla OPAO ošetřena *N*-glykosidasou F byla tato úvaha potvrzena v práci od (Sakakibara, 2014), dále se však autor tomuto problému nevěnoval. Rozdílné publikované MW pro OPAO zjišťované pomocí SDS-PAGE tak mohou být způsobeny odštěpením cukerné složky nebo se může jednat o strukturně podobné isoformy enzymu. Příčinou rozdílných výsledků může být také chyba kalibrace. Přítomnost více forem OPAO může být vysvětlením, proč byly při purifikaci na Mono-S koloně zaznamenány 2 překrývající se píky 7 a 8 (obr. 1) a poté při gelové permeační chromatografií v obou případech pozorován pouze 1 pík se stejným

retenčním časem. Dle abstraktu jinak veřejně zřejmě nepublikované práce (Gardner-Johnson, 1998), kdy byla izolována cDNA kódující OPAO je vypočtená MW OPAO 53,015 Da, což představuje 470 AK a nezahrnuje 24 AK velký signální peptid. Signální peptid pro lokalizaci proteinu do apoplastu skládající se z 28 nebo 25 AK byl nalezen a popsán u MPAO i BPAO (Cervelli et al., 2004). Vypočtená MW odštěpitelné signální sekvence MPAO je 2,7 kDa (Tavladoraki et al., 1998). Z těchto informací lze odhadovat MW celého glykosylovaného proteinu na 57 kDa. Publikované hodnoty *pI* pro OPAO se velmi liší a to od 4,7 po více než 9 (Šebela et al., 2001; Sakakibara, 2014). Zjištěná hodnota *pI* 6,5 zapadá do tohoto intervalu. Optimální pH pro aktivitu OPAO je kolem 6,8 (Federico et al., 1989b). Hodnoty mírně kyselého prostředí apoplastu jsou mezi 5 – 6,5 pH (Grignon a Sentenac, 1991). Obecně však nelze říci, že existuje souvislost mezi pH optimem proteinu a hodnotou jeho *pI* (Talley a Alexov, 2010).

11 Závěr

V této práci byla otestována možnost využití MnCl_2 ke srážení NK spolu s NP z extraktu rostlinek ovsa a hrachových semenáčků. Postup byl aplikován na týdenní etiolované hrachové semenáčky i čtrnáctidenní rostlinky ovsa.

Hmotnostní spektrometrií byly identifikovány proteiny získané z extraktů z obou rostlin. Ve vzorcích z ovsa byly identifikovány pouze peptidy z komplexu RUBISCO a rostlinná β -D-glukosidasa. Převažující obsah částí RUBISCO ve všech frakcích získaných rozdělením původní směsi SDS-PAGE a jejich peptidových digestů nanoprůtokovou chromatografií znemožnil identifikaci méně zastoupených proteinů ovsa.

Z hrachových semenáčků bylo dohromady identifikováno 288 proteinů. Nástroji pro analýzu GO bylo více než 25,4 % z nich zařazeno jako proteiny z jádra. Schopnost vázat nukleotidy byla přiřazena jako funkce 42,9 % identifikovaným proteinům. Podle biologické funkce se 40,8 % proteinů účastní metabolismu makromolekul. Mezi proteiny zařazenými do těchto skupin byly nalezeny pro jádro charakteristické histony, proteiny metabolismu DNA, podjednotky ribosomů, ale i mimojaderné proteiny nacházející se v blízkosti jádra a proteiny asociované k NK z ostatních částí buňky.

Celkově nejvíce zastoupenou skupinou identifikovaných proteinů tvořily ribosomální podjednotky kterých bylo nalezeno 48. Proteinů vázajících se k DNA bylo identifikováno 12. Nalezené kontaminanty z ostatních organel tvořily především tubuliny cytoskeletu, nejaderné membránové proteiny, které byly koprecipitovány s NK díky své velikosti nebo jejich výrazně vyššímu zastoupení oproti ostatním proteinům.

Nalezením početného zastoupení jaderných proteinů a proteinů asociovaných s DNA i RNA v extraktu z týdenních etiolovaných semenáčků hrachu bylo prokázáno, že metodu srážení rostlinného extraktu MnCl_2 do výsledné $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace lze úspěšně použít k získání precipitátu obohaceného o tyto specifické proteiny.

Dále byla v této práci úspěšně izolována PAO z ovsa setého. Pomocí SDS-PAGE byla potvrzena přítomnost tohoto enzymu v konečném preparátu, prokázána jeho čistota a ověřena hodnota molekulové hmotnosti, která činí 52,5 kDa. Molekulová hmotnost byla určena i gelovou chromatografií. Použitím IEF byla zjištěna hodnota isoelektrického bodu pro tento protein, která činí 6,45.

Aminokyselinová sekvence proteinu byla analyzována hmotnostní spektrometrií štěpných peptidů po proteolytickém štěpení trypsinem. Účelem bylo též ověřit, zda je protein glykosylovaný, neboť obsahuje signální sekvenci pro *N*-glykosylaci. MS a MS/MS analýzy peptidů byly provedeny po jejich separaci na kapalinovém chromatografu (nanoprůtokový systém, kapilární kolona s C18 reverzní fází) na přístroji MALDI TOF/TOF. Žádný glykopeptid nebyl nalezen, byly však získány sekvence řady peptidů, a to jak databázovým vyhledáváním dat z MS/MS analýz, tak *de novo* sekvencování použitím software a homologním vyhledáváním. Celkem byly potvrzeny sekvence 20 peptidů v délce 117 aminokyselin, což činí zhruba 24 % celkové sekvence. Bylo zjištěno, že PAO z ovsa vykazuje vysokou homologii se sekvencemi odpovídajících enzymů z rýže, ječmene a kukuřice.

Seznam použité literatury

- Abbasi, N., Park, Y.-I., Choi, S.-B., 2011. Pumilio Puf domain RNA-binding proteins in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **6**, 364–368.
- abcam home page: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11025> (21.3.2015)
- Abdalla, K.O., Thomson, J.A., Rafudeen, M.S., 2009. Protocols for nuclei isolation and nuclear protein extraction from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* for proteomic studies. *Anal. Biochem.* **384**, 365–367.
- Abdalla, K.O., Baker, B., Rafudeen, M.S., 2010. Proteomic analysis of nuclear proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regul.* **62**, 279–292.
- Abdalla, K.O., Rafudeen, M.S., 2012. Analysis of the nuclear proteome of the resurrection plant *Xerophyta viscosa* in response to dehydration stress using iTRAQ with 2DLC and tandem mass spectrometry. *J. Proteomics* **75**, 2361–2374.
- Agudelo-Romero, P., Bortolotti, C., Pais, M.S., Tiburcio, A.F., Fortes, A.M., 2013. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* **67**, 105–119.
- Aki, T., Yanagisawa, S., 2009. Application of Rice Nuclear Proteome Analysis to the Identification of Evolutionarily Conserved and Glucose-Responsive Nuclear Proteins. *J. Proteome Res.* **8**, 3912–3924.
- Albertini, A.A.V., Wernimont, A.K., Muziol, T., Ravelli, R.B.G., Clapier, C.R., Schoehn, G., Weissenhorn, W., Ruigrok, R.W.H., 2006. Crystal Structure of the Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Science* **313**, 360–363.
- Angelini, R., Federico, R., Bonfante, P., 1995. Maize Polyamine Oxidase: Antibody Production and Ultrastructural Localization. *J. Plant Physiol.* **145**, 686–692.
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., Deng, X.-W., 1998. Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of Arabidopsis Development. *Mol. Cell* **1**, 213–222.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N., 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1473**, 4–8.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25–29.
- 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. *Plant J.* **36**, 652–663.
- Belmont, A.S., Dietzel, S., Nye, A.C., Strukov, Y.G., Tumber, T., 1999. Large-scale chromatin structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 307–311.
- Berggård, T., Linse, S., James, P., 2007. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**, 2833–2842.
- Bickmore, W.A., Sutherland, H.G.E., 2002. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW. *EMBO J.* **21**, 1248–1254.
- Bigéard, J., Rayapuram, N., Bonhomme, L., Hirt, H., Pflieger, D., 2014. Proteomic and phosphoproteomic analyses of chromatin-associated proteins from Arabidopsis thaliana. *PROTEOMICS* **14**, 2141–2155.
- Binda, C., Coda, A., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P., Mattevi, A., 1999. A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* **7**, 265–276.
- Birney, E., Kumar, S., Krainer, A.R., 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5803–5816.
- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.C., Frutiger, S., Hochstrasser, D., 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023–1031.

- Bloch, S., Cedar, H., 1976. Methylation of chromatin DNA. *Nucleic Acids Res.* **3**, 1507–1519.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A.I., 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574–585.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brkljacic, J., Zhao, Q., Meier, I., 2009. WPP-domain proteins mimic the activity of the HSC70-1 chaperone in preventing mistargeting of RanGAP1-anchoring protein WIT1. *Plant Physiol.* **151**, 142–154.
- Brown, J.M., Green, J., Neves, R.P. das, Wallace, H.A.C., Smith, A.J.H., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J., Buckle, V.J., 2008. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J. Cell Biol.* **182**, 1083–1097.
- Brush, M., 1998. Dye Hard: Protein Gel Staining Products. *The Scientist* **12**, 16.
- Bunkenborg, J., Pilch, B.J., Podtelejnikov, A.V., Wiśniewski, J.R., 2004. Screening for N-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry. *PROTEOMICS* **4**, 454–465.
- Calikowski, T.T., Meulia, T., Meier, I., 2003. A proteomic study of the arabidopsis nuclear matrix. *J. Cell. Biochem.* **90**, 361–378.
- Campos, E.I., Reinberg, D., 2009. Histones: Annotating Chromatin. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 559–599.
- Capuano, F., Mülleder, M., Kok, R., Blom, H.J., Ralser, M., 2014. Cytosine DNA Methylation Is Found in *Drosophila melanogaster* but Absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and Other Yeast Species. *Anal. Chem.* **86**, 3697–3702.
- Carrier, G., Santoni, S., Rodier-Goud, M., Canaguier, A., Kochko, A. de, Dubreuil-Tranchant, C., This, P., Boursiquot, J.-M., Cunff, L.L., 2011. An efficient and rapid protocol for plant nuclear DNA preparation suitable for next generation sequencing methods. *Am. J. Bot.* **98**, e13–e15.
- 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. *Plant Cell* **20**, 827–842.
- Cavalier-Smith, T., 2010. Origin of the cell nucleus, mitosis and sex: roles of intracellular coevolution. *Biol. Direct* **5**, 7.
- Cervelli, M., Tavladoraki, P., Di Agostino, S., Angelini, R., Federico, R., Mariottini, P., 2000. Isolation and characterization of three polyamine oxidase genes from *Zea mays*§. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 667–677.
- Cervelli, M., Bianchi, M., Cona, A., Crosatti, C., Stanca, M., Angelini, R., Federico, R., Mariottini, P., 2006. Barley polyamine oxidase isoforms 1 and 2, a peculiar case of gene duplication. *FEBS J.* **273**, 3990–4002.
- Colilla, F.J., Yadav, S.P., Brew, K., Mendez, E., 1991. Peptide maps at picomolar levels obtained by reversed-phase high-performance liquid chromatography and pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate. Microsequencing of Phenylthiocarbamyl Peptides. *J. Chromatogr.* **548**, 303–310.
- Collas, P., Dahl, J.A., 2008. Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 929–943.
- Cooper, B., Campbell, K.B., Feng, J., Garrett, W.M., Frederick, R., 2011. Nuclear proteomic changes linked to soybean rust resistance. *Mol. Biosyst.* **7**, 773–783.
- Dahl, K.N., Ribeiro, A.J.S., Lammerding, J., 2008. Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ. Res.* **102**, 1307–1318.
- Davey, J., Lord, J.M., 2003. Essential Cell Biology: Cell function. Oxford University Press.
- Dayer, M.R., Dayer, M.S., Rezatofighi, S.E., 2015. Mechanism of preferential packaging of negative sense genomic RNA by viral nucleoproteins in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Protein J.* **34**, 91–102.
- Delom, F., Chevet, E., 2006. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci.* **4**, 15.

- De Muyt, A., Vezon, D., Gendrot, G., Gallois, J.-L., Stevens, R., Grelon, M., 2007. AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **26**, 4126–4137.
- Dietz, K.J., Horling, F., König, J., Baier, M., 2002. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J. Exp. Bot.* **53**, 1321–1329.
- Dundr, M., Misteli, T., Olson, M.O.J., 2000. The Dynamics of Postmitotic Reassembly of the Nucleolus. *J. Cell Biol.* **150**, 433–446.
- Dundr, M., Misteli, T., 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* **356**, 297–
- Edman, P., Begg, G., 1967. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem. FEBS* **1**, 80–91.
- Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K., 2007. PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie, Interferons 1957-2007 – Interferons: from discovery to mechanism of action and clinical applications* **89**, 819–830.
- Fabian, L., Forer, A., 2007. Possible roles of actin and myosin during anaphase chromosome movements in locust spermatocytes. *Protoplasma* **231**, 201–213.
- Federico, R., Alisi, C., Forlani, F., 1989a. Properties of the polyamine oxidase from the cell wall of maize seedlings. *Phytochemistry* **28**, 45–46.
- Federico, R., Alisi, C., Forlani, F., Angelini, R., 1989b. Purification and characterization of oat polyamine oxidase. *Phytochemistry* **28**, 2045–2046.
- Federico, R., Cona, A., Angelini, R., Schininà, M.E., Giartosio, A., 1990. Characterization of maize polyamine oxidase. *Phytochemistry* **29**, 2411–2414.
- Feiler, H.S., Desprez, T., Santoni, V., Kronenberger, J., Caboche, M., Traas, J., 1995. The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *EMBO J.* **14**, 5626–5637.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71.
- Finan, P.M., White, I.R., Redpath, S.H., Findlay, J.B., Millner, P.A., 1994. Molecular cloning, sequence determination and heterologous expression of nucleoside diphosphate kinase from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* **25**, 59–67.
- Fincato, P., Moschou, P.N., Spedaletti, V., Tavazza, R., Angelini, R., Federico, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Tavladoraki, P., 2011. Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *J. Exp. Bot.* **62**, 1155–1168.
- Fink, J.L., Karunaratne, S., Mittal, A., Gardiner, D.M., Hamilton, N., Mahony, D., Kai, C., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Teasdale, R.D., 2008. Towards defining the nuclear proteome. *Genome Biol.* **9**, R15.
- Fiorillo, A., Federico, R., Polticelli, F., Boffi, A., Mazzei, F., Di Fusco, M., Ilari, A., Tavladoraki, P., 2011. The structure of maize polyamine oxidase K300M mutant in complex with the natural substrates provides a snapshot of the catalytic mechanism of polyamine oxidation. *FEBS J.* **278**, 809–821.
- Fox, A.H., Bond, C.S., Lamond, A.I., 2005. P54nrb Forms a Heterodimer with PSP1 That Localizes to Paraspeckles in an RNA-dependent Manner. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5304–5315.
- Fu, H., Doelling, J.H., Rubin, D.M., Vierstra, R.D., 1999. Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple-A ATPase subunits from the *Arabidopsis* 26S proteasome. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **18**, 529–539.
- Gafni, Y., Epel, B.L., 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **60**, 231–241.
- Gall, J.G., 2000. CAJAL BODIES: The First 100 Years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 273–300.
- Garcia, B.A., 2010. What Does the Future Hold for Top Down Mass Spectrometry? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 193–202.
- Gardner-Johnson, J.Y., 1998. Isolation, Sequencing, and Characterization of the Gene for Polyamine Oxidase from *Avena Sativa* L. (oats). New Mexico State University.
- Geda, P., Patury, S., Ma, J., Bharucha, N., Dobry, C.J., Lawson, S.K., Gestwicki, J.E., Kumar, A., 2008. A small molecule-directed approach to control protein localization and function. *Yeast* **25**, 577–594.

- Getzenberg, R.H., 1994. Nuclear matrix and the regulation of gene expression: Tissue specificity. *J. Cell. Biochem.* **55**, 22–31.
- Gonzalez-Melendi, P., Beven, A., Boudonck, K., Abranches, R., Wells, B., Dolan, L., Shaw, P., 2000. The nucleus: a highly organized but dynamic structure. *J. Microsc.* **198**, 199–207.
- Graves, P.R., Haystead, T.A.J., 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 39–63.
- Gregorich, Z.R., Chang, Y.-H., Ge, Y., 2014. Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **466**, 1199–1209.
- Greilhuber, J., Temsch, E.M., Loureiro, J.C.M., 2007. Nuclear DNA Content Measurement, in: Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (Ed.), *Flow Cytometry with Plant Cells*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, s. 67–101.
- Grignon, C., Sentenac, H., 1991. pH and Ionic Conditions in the Apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 103–128.
- 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**, 1071–1087.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R., 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720–1730.
- Hegyi, H., Gerstein, M., 1999. The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome 1. *J. Mol. Biol.* **288**, 147–164.
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C., 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5011–5015.
- Herold, J., Andino, R., 2001. Poliovirus RNA Replication Requires Genome Circularization through a Protein–Protein Bridge. *Mol. Cell* **7**, 581–591.
- Højby, T., Zhou, H., Mitsiou, D.J., Stunnenberg, H.G., 2007. A facelift for the general transcription factor TFIIA. *Biochim. Biophys. Acta* **1769**, 429–436.
- Hong, Z., Geisler-Lee, C.J., Zhang, Z., Verma, D.P.S., 2003. Phragmoplastin dynamics: multiple forms, microtubule association and their roles in cell plate formation in plants. *Plant Mol. Biol.* **53**, 297–312.
- Ho, S.-W., Jona, G., Chen, C.T.L., Johnston, M., Snyder, M., 2006. Linking DNA-binding proteins to their recognition sequences by using protein microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9940–9945.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57.
- Hunter, T., 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225–236.
- Chao, J.D., Wong, D., Av-Gay, Y., 2014. Microbial Protein Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* jbc.R113.520015.
- Chatterjea, M.N., Shinde, R., 2012. *Textbook of Medical Biochemistry*. JP Medical Ltd.
- Chelbi-Alix, M.K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M.H.M., de Thé, H., 1998. Resistance to Virus Infection Conferred by the Interferon-Induced Promyelocytic Leukemia Protein. *J. Virol.* **72**, 1043–1051.
- Chen, C.P., Rost, B., 2002. State-of-the-art in membrane protein prediction. *Appl. Bioinformatics* **1**, 21–35.
- 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. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**, 1579–1598.
- Chou, K.-C., Shen, H.-B., 2007. Large-scale plant protein subcellular location prediction. *J. Cell. Biochem.* **100**, 665–678.
- Inoue, S., Iwasaki, M., 1980. Characterization of a new type of glycoprotein saccharides containing polysialosyl sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 162–165.

- Jaiswal, D.K., Ray, D., Choudhary, M.K., Subba, P., Kumar, A., Verma, J., Kumar, R., Datta, A., Chakraborty, S., Chakraborty, N., 2013. Comparative proteomics of dehydration response in the rice nucleus: New insights into the molecular basis of genotype-specific adaptation. *PROTEOMICS* **13**, 3478–3497.
- James, P., 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biophys.* **30**, 279–331.
- Jiang, C.J., Imamoto, N., Matsuki, R., Yoneda, Y., Yamamoto, N., 1998. Functional characterization of a plant importin alpha homologue. Nuclear localization signal (NLS)-selective binding and mediation of nuclear import of nls proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**, 24083–24087.
- Jockusch, B.M., Schoenenberger, C.-A., Stetefeld, J., Aebi, U., 2006. Tracking down the different forms of nuclear actin. *Trends Cell Biol.* **16**, 391–396.
- Kalamajka, R., Finnie, C., Grasser, K.D., 2010. Onset of grain filling is associated with a change in properties of linker histone variants in maize kernels. *Planta* **231**, 1127–1135.
- Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H., Nishimura, M., 2008. A Putative Peroxisomal Polyamine Oxidase, AtPAO4, is Involved in Polyamine Catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1272–1282.
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301.
- Kebarle, P., Verkerk, U.H., 2009. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 898–917.
- Khan, M.M.K., Komatsu, S., 2004. Rice proteomics: recent developments and analysis of nuclear proteins. *Phytochemistry, Proteomics 2* **65**, 1671–1681.
- Kim, D.W., Watanabe, K., Murayama, C., Izawa, S., Niitsu, M., Michael, A.J., Berberich, T., Kusano, T., 2014. Polyamine Oxidase5 Regulates *Arabidopsis* Growth through Thermospermine Oxidase Activity. *Plant Physiol.* **165**, 1575–1590.
- Kirkland, P.A., Busby, J., Stevens Jr., S., Maupin-Furlow, J.A., 2006. Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins. *Anal. Biochem.* **351**, 254–259.
- Klose, J., Kobalz, U., 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**, 1034–1059.
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.-H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S., Snyder, M., 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* **16**, 707–719.
- 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. *J. Proteomics*, Special Issue: Proteomics of non-model organisms **105**, 58–73.
- Lambert, J.-P., Mitchell, L., Rudner, A., Baetz, K., Figeys, D., 2009. A Novel Proteomics Approach for the Discovery of Chromatin-associated Protein Networks. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**, 870–882.
- Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., Jørgensen, T.J.D., 2005. Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 873–886.
- Laskay, Ü.A., Srzentić, K., Monod, M., Tsybin, Y.O., 2014. Extended bottom-up proteomics with secreted aspartic protease Sap9. *J. Proteomics* **110**, 20–31.
- Lauc, G., Zoldoš, V., 2010. Protein glycosylation—an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol. Biosyst.* **6**, 2373–2379.
- 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**, 604–617.
- Liu, T., Kim, D.W., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., 2014a. *Oryza sativa* polyamine oxidase 1 back-converts tetraamines, spermine and thermospermine, to spermidine. *Plant Cell Rep.* **33**, 143–151.

- Liu, T., Kim, D.W., Niitsu, M., Maeda, S., Watanabe, M., Kamio, Y., Berberich, T., Kusano, T., 2014b. Polyamine Oxidase 7 is a Terminal Catabolism-Type Enzyme in *Oryza sativa* and is Specifically Expressed in Anthers. *Plant Cell Physiol.* pcu047.
- Liu, T., Wook Kim, D., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., 2014c. POLYAMINE OXIDASE 1 from rice (*Oryza sativa*) is a functional ortholog of Arabidopsis POLYAMINE OXIDASE 5. *Plant Signal. Behav.* **9**.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., Santos, C., 2007. Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Ann. Bot.* **100**, 875–888.
- Mann, M., Jensen, O.N., 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**, 255–261.
- Mans, B.J., Anantharaman, V., Aravind, L., Koonin, E.V., 2004. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle Georget. Tex* **3**, 1612–1637.
- Marcotte, E.M., 2007. How do shotgun proteomics algorithms identify proteins? *Nat. Biotechnol.* **25**, 755–757.
- Mazzola, J.L., Sirover, M.A., 2002. Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders? *Neurotoxicology* **23**, 603–609.
- McCarthy, F.M., Wang, N., Magee, G.B., Nanduri, B., Lawrence, M.L., Camon, E.B., Barrell, D.G., Hill, D.P., Dolan, M.E., Williams, W.P., Luthe, D.S., Bridges, S.M., Burgess, S.C., 2006. AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics* **7**, 1–13.
- Miguel-Aliaga, I., Chan, Y.B., Davies, K.E., van den Heuvel, M., 2000. Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **486**, 99–102.
- Miyashita, M., Presley, J.M., Buchholz, B.A., Lam, K.S., Lee, Y.M., Vogel, J.S., Hammock, B.D., 2001. Attomole level protein sequencing by Edman degradation coupled with accelerator mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4403–4408.
- Moschou, P.N., Sanmartin, M., Andriopoulou, A.H., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J.J., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2008. Bridging the Gap between Plant and Mammalian Polyamine Catabolism: A Novel Peroxisomal Polyamine Oxidase Responsible for a Full Back-Conversion Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **147**, 1845–1857.
- Mujahid, H., Tan, F., Zhang, J., Nallamilli, B.R.R., Pendarvis, K., Peng, Z., 2013. Nuclear proteome response to cell wall removal in rice (*Oryza sativa*). *Proteome Sci.* **11**, 26.
- Narula, K., Datta, A., Chakraborty, N., Chakraborty, S., 2013. Comparative analyses of nuclear proteome: extending its function. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Németh, A., Conesa, A., Santoyo-Lopez, J., Medina, I., Montaner, D., Péterfia, B., Solovei, I., Cremer, T., Dopazo, J., Längst, G., 2010. Initial genomics of the human nucleolus. *Plos Genet.* **6**, e1000889–e1000889.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *ELECTROPHORESIS* **9**, 255–262.
- Nilsson, C.L., 2012. Advances in Quantitative Phosphoproteomics. *Anal. Chem.* **84**, 735–746.
- Nizami, Z., Deryusheva, S., Gall, J.G., 2010. The Cajal Body and Histone Locus Body. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000653.
- O’Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021.
- Ono, Y., Kim, D.W., Watanabe, K., Sasaki, A., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., Takahashi, Y., 2011. Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. *Amino Acids* **42**, 867–876.
- Pandit, S.B., Balaji, S., Srinivasan, N., 2004. Structural and functional characterization of gene products encoded in the human genome by homology detection. *IUBMB Life* **56**, 317–331.
- Pascual-Garcia, P., Capelson, M., 2014. Nuclear pores as versatile platforms for gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev., Genome architecture and expression* **25**, 110–117.

- Pederson, T., 2000. Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. *Nat. Cell Biol.* **2**, E73–E74.
- 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. *Mol. Biol. Cell* **16**, 260–269.
- 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. *Cytogenet. Genome Res.* **143**, 78–86.
- Petrovská, B., Šebela, M., Doležel, J., 2015. Inside a plant nucleus: discovering the proteins. *J. Exp. Bot.* **66**, 1627–1640.
- Potempa, J., 2012. Posttranslational Modifications in Innate Immunity. *J. Innate Immun.* **4**, 119–120.
- Price, H.J., Sparrow, A.H., Nauman, A.F., 1973. Correlations between nuclear volume, cell volume and DNA content in meristematic cells of herbaceous angiosperms. *Experientia* **29**, 1028–1029.
- Rademaker, G.J., Pergantis, S.A., Blok-Tip, L., Langridge, J.I., Kleen, A., Thomas-Oates, J.E., 1998. Mass Spectrometric Determination of the Sites of O-Glycan Attachment with Low Picomolar Sensitivity. *Anal. Biochem.* **257**, 149–160.
- Radhakrishnan, G.K., Splitter, G.A., Usha, R., 2008. DNA recognition properties of the cell-to-cell movement protein (MP) of soybean isolate of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV-Sb). *Virus Res.* **131**, 152–159.
- Radová, A., Šebela, M., Galuszka, P., Frébort, I., Jacobsen, S., Faulhammer, H.G., Peč, P., 2001. Barley polyamine oxidase: characterisation and analysis of the cofactor and the N-terminal amino acid sequence. *Phytochem. Anal.* **12**, 166–173.
- Rayon, C., Lerouge, P., Faye, L., 1998. The protein N-glycosylation in plants. *J. Exp. Bot.* **49**, 1463–1472.
- Remaley, A.T., Ugorski, M., Wu, N., Litzky, L., Burger, S.R., Moore, J.S., Fukuda, M., Spitalnik, S.L., 1991. Expression of human glycophorin A in wild type and glycosylation-deficient Chinese hamster ovary cells. Role of N- and O-linked glycosylation in cell surface expression. *J. Biol. Chem.* **266**, 24176–24183.
- Repetto, O., Rogniaux, H., Firnhaber, C., Zuber, H., Küster, H., Larré, C., Thompson, R., Gallardo, K., 2008. Exploring the nuclear proteome of *Medicago truncatula* at the switch towards seed filling. *Plant J.* **56**, 398–410.
- Resing, K.A., Ahn, N.G., 2005. Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Lett., Molecular Mechanisms of Biological Systems. 130th Nobel Symposium* **579**, 885–889.
- Risseuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., Crosby, W.L., 2003. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **34**, 753–767.
- Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J., Reeves, H.C., 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290–294.
- Rosaria Medda, A.P., 1996. The reaction mechanism of copper amine oxidase: detection of intermediates by the use of substrates and inhibitors. *Biochemistry (Mosc.)* **34**, 16375–81.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D., 2001. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120.
- Roth, Z., Yehezkel, G., Khalaila, I., 2012. Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2012**, e640923.
- Sakakibara, H., 2014. Evaluation of Alfalfa na Oat Polyamine Oxidase: One-Step Purification an Characteristic. *Bull. Aichi Univ of Educ.* **53**, 53–58.
- Sakamoto, Y., Takagi, S., 2013. LITTLE NUCLEI 1 and 4 Regulate Nuclear Morphology in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **54**, 622–633.
- Sandhya R Shenoy, M.K., 2003. Purification of an Enterobacter aerogenes plasmid DNA using MnCl₂ as compaction agent. *Anal. Biochem.* **321**, 256–8.
- Sanger, F., Tuppy, H., 1951. The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem. J.* **49**, 463–481.

- Sebela, M., Stosová, T., Havlis, J., Wielsch, N., Thomas, H., Zdráhal, Z., Shevchenko, A., 2006. Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959–2963.
- Shaw, P.J., Brown, J.W., 2004. Plant nuclear bodies. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 614–620.
- Shumaker, D.K., Kuczmarski, E.R., Goldman, R.D., 2003. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 358–366.
- Schirawski, J., Planchais, S., Haenni, A.-L., 2000. An improved protocol for the preparation of protoplasts from an established *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture and infection with RNA of turnip yellow mosaic tymovirus: a simple and reliable method. *J. Virol. Methods* **86**, 85–94.
- Schwartz, R., Ting, C.S., King, J., 2001. Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome Res.* **11**, 703–709.
- Schwarz, F., Aebi, M., 2011. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol., Carbohydrates and glycoconjugates/Biophysical methods* **21**, 576–582.
- Sickmann, A., Mreyen, M., Meyer, H.E., 2002. Identification of Modified Proteins by Mass Spectrometry. *IUBMB Life* **54**, 51–57.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., 1993. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2019–2020.
- Sikorskaite, S., Rajamäki, M.-L., Baniulis, D., Stanys, V., Valkonen, J.P., 2013. Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods* **9**, 31.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Babiychuk, E., Kushnir, S., Durski, A., Vierstra, R.D., 2002. Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell* **14**, 17–32.
- Smith, T.A., 1983. [53] Polyamine oxidase (oat seedlings), in: Herbert Tabor, C.W.T. (Ed.), *Methods in Enzymology, Polyamines*. Academic Press, s. 311–314.
- Spiro, R.G., 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R–56R.
- Stránská, J., Šebela, M., Tarkowski, P., Řehulka, P., Chmelík, J., Popa, I., Peč, P., 2007. Inhibition of plant amine oxidases by a novel series of diamine derivatives. *Biochimie* **89**, 135–144.
- Stretton, A.O.W., 2002. The First Sequence: Fred Sanger and Insulin. *Genetics* **162**, 527–532.
- Suzuki, Y., Yanagisawa, H., 1980. Purification and properties of maize polyamine oxidase: a flavoprotein. *Plant Cell Physiol.* **21**, 1085–1094.
- Šebela, M., Luhová, L., Frébort, I., Hirota, S., Faulhammer, H.G., Stučka, V., Peč, P., 1997. Confirmation of the presence of a Cu(II)/topa quinone active site in the amine oxidase from fenugreek seedlings. *J. Exp. Bot.* **48**, 1897–1907.
- Šebela, M., Radová, A., Angelini, R., Tavladoraki, P., Frébort, I., Peč, P., 2001. FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci.* **160**, 197–207.
- Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G.H.M., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., 2010. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **29**, 955–965.
- Takamori, Y., Tamura, Y., Kataoka, Y., Cui, Y., Seo, S., Kanazawa, T., Kurokawa, K., Yamada, H., 2007. Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 1653–1662.
- Talley, K., Alexov, E., 2010. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins* **78**, 2699–2706.
- Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T., Hara-Nishimura, I., 2010. Identification and Characterization of Nuclear Pore Complex Components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online* **22**, 4084–4097.

- Tavladoraki, P., Schininà, M.E., Cecconi, F., Di Agostino, S., Manera, F., Rea, G., Mariottini, P., Federico, R., Angelini, R., 1998. Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett.* **426**, 62–66.
- Tavladoraki, P., Rossi, M.N., Saccuti, G., Perez-Amador, M.A., Polticelli, F., Angelini, R., Federico, R., 2006. Heterologous Expression and Biochemical Characterization of a Polyamine Oxidase from Arabidopsis Involved in Polyamine Back Conversion. *Plant Physiol.* **141**, 1519–1532.
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**, 796–815.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Tress, M.L., Bodenmiller, B., Aebersold, R., Valencia, A., 2008. Proteomics studies confirm the presence of alternative protein isoforms on a large scale. *Genome Biol.* **9**, R162.
- Trewavas, A., 1976. Changes in phosphorylated and unphosphorylated nuclear proteins during germination in barley. *Phytochemistry* **15**, 363–366.
- Turrell, L., Lyall, J.W., Tiley, L.S., Fodor, E., Vreede, F.T., 2013. The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* **4**, 1591.
- Udvardi, M.K., Kakar, K., Wandrey, M., Montanari, O., Murray, J., Andriankaja, A., Zhang, J.-Y., Benedito, V., Hofer, J.M.I., Chueng, F., Town, C.D., 2007. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol.* **144**, 538–549.
- Uchiyama, S., Kobayashi, S., Takata, H., Ishihara, T., Hori, N., Higashi, T., Hayashihara, K., Sone, T., Higo, D., Nirasawa, T., Takao, T., Matsunaga, S., Fukui, K., 2005. Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *J. Biol. Chem.* **280**, 16994–17004.
- van Mansfeld, A.D.M., van Teeffelen, H.A.A.M., Baas, P.D., Veeneman, G.H., van Boom, J.H., Jansz, H.S., 1984. The bond in the bacteriophage ϕ X174 gene A protein-DNA complex is a tyrosyl-5'-phosphate ester. *FEBS Lett.* **173**, 351–356.
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G.J., 2005. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 7342–7372.
- Wang, J.C., 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635–692.
- Wang, W., Liu, J.-H., 2015. Genome-wide identification and expression analysis of the polyamine oxidase gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Gene* **555**, 421–429.
- Watanabe, S., Noda, T., Kawaoka, Y., 2006. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* **80**, 3743–3751.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.-C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., 1996. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 19–50.
- Wilson, K.L., Dawson, S.C., 2011. Functional evolution of nuclear structure. *J. Cell Biol.* **195**, 171–181.
- Wu, C.C., MacCoss, M.J., 2002. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **4**, 242–250.
- Wu, C., Tran, J.C., Zamdborg, L., Durbin, K.R., Li, M., Ahlf, D.R., Early, B.P., Thomas, P.M., Sweedler, J.V., Kelleher, N.L., 2012. A protease for „middle-down" proteomics. *Nat. Methods* **9**, 822–824.
- Xiong, Y., Sundaralingam, M., 2001. Protein–Nucleic Acid Interaction: Major Groove Recognition Determinants, in: eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Yoda, H., Hiroi, Y., Sano, H., 2006. Polyamine Oxidase Is One of the Key Elements for Oxidative Burst to Induce Programmed Cell Death in Tobacco Cultured Cells. *Plant Physiol.* **142**, 193–206.
- Zhang, Y., Hu, Z., Qin, H., Wei, X., Cheng, K., Liu, F., Wu, R., Zou, H., 2012. Highly Efficient Extraction of Cellular Nucleic Acid Associated Proteins in Vitro with Magnetic Oxidized Carbon Nanotubes. *Anal. Chem.* **84**, 10454–10462.

- Zhang, Y., Hu, Z., Qin, H., Liu, F., Cheng, K., Wu, R., Zou, H., 2013. Cell Nucleus Targeting for Living Cell Extraction of Nucleic Acid Associated Proteins with Intracellular Nanoprobes of Magnetic Carbon Nanotubes. *Anal. Chem.* **85**, 7038–7043.
- Zubin, E.M., Romanova, E.A., Oretskaya, T.S., 2002. Modern methods for the synthesis of peptide–oligonucleotide conjugates. *Russ. Chem. Rev.* **71**, 239.

Seznam použitých zkratek

ACN	- acetonitril
AMBIC	- NH ₄ HCO ₃
APS	- adenosin-5'-fosfosulfát
AtPAO	- polyaminoxidasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
CB	- Cajalova tělíska
CID	- kolizí indukovaná disociace
CuAO	- aminoxidasy obsahující měď (EC 1.4.3.21, EC 1.4.3.22)
DAPI	- 4',6-diamino-2-fenylindol
DTT	- dithiothreitol
ESI	- ionizace elektrosprejem
ESI-Q/TOF	- hmotnostní spektrometr vybavený ionizací elektrosprejem, s kolizní celou, s kvadrupólovým a průletovým analyzátozem doby letu iontů
FAD	- flavin adenin dinukleotid
FC	- průtová cytometrie
Gal	- galaktosa
Glc	- glukosa
Hepes	- 4-hydroxymetyl piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HMG	- proteiny s vysokou mobilitou
IAA	- jodacetamid
IDA	- kyselina iminodioctová
IMAC	- chelatační chromatografie využívající imobilizovaných kovových iontů
MALDI	- desorpční ionizace laserem za účasti matrice
MALDI TOF-TOF	- hmotnostní spektrometr s MALDI IONIZACÍ a dvěma TOF analyzátozem
Man	- manosa
MPAO	- polyaminoxidasa z kukuřice (<i>Zea Mays</i>)
MS	- hmotnostní spektrometrie
MW	- molární hmotnost
NAc	- <i>N</i> -acetylglukosamin
nanoLC	- nanoprůtoková kapalinová chromatografie
NK	- nukleové kyseliny
NP	- jaderné proteiny
NPC	- komplexy jaderných pórů
NTA	- kyselina nitriltrioctová
NuP	- nukleoproteiny, proteiny asociované s NK
OPAO	- polyaminoxidasa z ovsu (<i>Avena sativa</i>)
PA	- polyaminy
PAO	- polyaminoxidasy
pI	- isoelektrický bod
PML	- promyelotární jaderná leukémie
PSD	- metoda fragmentace rozpadem za iontovým zdrojem
PTM	- posttranskripční modifikace
PUT	- putrescin
RNP	- ribonukleoproteinová částice

rpm	- otáčky za minutu
SNM	- survival motor neuron protein
snRNP	- malé jaderné nukleoproteiny
SPD	- spermidin
SPM	- spermin
TEMED	- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TF	- transkripční faktor
TFA	- kyselina trifluoroctová
Tris	- 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
v/v	- objem na objem
VvPAO	- polyaminoxidasa z révy vinné
w/v	- hmotnost na objem