

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Frakcionácia arabskej gummy pre nájdenie látok  
ovplyvňujúcich vývojové procesy v rastlinách**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Autor:	<b>Bc. Ivana Gašparíková</b>
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný obor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúca práce:	<b>Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.</b>
Rok:	2021

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých uvedených prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

.....

## **Pod'akovanie**

Mnohokrát ďakujem svojmu školiteľovi prof. Mgr. Marekovi Šebelovi Dr. za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť, čas a ústretovosť pri riešení tejto diplomovej práce. Tiež by som chcela poďakovať Mgr. Zdenkovi Perutkovi za pomoc v laboratóriu a všetkým zamestnancom Oddelenia biochémie proteínov a proteomiky za príjemnú atmosféru a priateľský prístup. Ďakujem svojej rodine, spolubývajúcej a kamarátom za podporu behom celého štúdia.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora	Bc. Ivana Gašparíková
Názov práce	Frakcionácia arabskej gummy pre nájdenie látok ovplyvňujúcich vývojové procesy v rastlinách
Typ práce	Diplomová práca
Pracovisko	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedúci práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

Arabská guma je výlučok stromov *Acacia senegal* alebo blízko príbuzných druhov akácií ako *Acacia seyal* rastúcich hlavne v oblasti Sahelu v Afrike. Z chemického hľadiska je arabská guma heterogénny polysacharid a tiež obsahuje malé množstvo proteínov (~ 2 %) známych ako arabinogalaktanové proteíny (AGP). AGPs sú vysoko glykozylované proteoglykany zapojené do mnohých procesov v priebehu rastu a vývoja rastliny. Pridanie arabskej gummy do indukčného média odhalilo pozitívny vplyv AGP na proces androgenézy u jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) na prašníkovej kultúre (Makowska *et al.*, 2017). Cieľom tejto práce bola frakcionácia arabskej gummy a následná identifikácia proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie pre nájdenie látok ovplyvňujúcich vývojové procesy v rastlinách. Použitím rôznych typov kvapalinovej chromatografie sa podarilo získať elučné profily vzoriek gummy a jednotlivé frakcie zozbierať. Ďalší rozmer separácie bol vykonaný pomocou elektromigračných metód SDS-PAGE a izoelektrickej fokusácie (natívnej a denaturačnej). Tieto metódy sa ukázali ako vhodné na separáciu a vizualizáciu proteínov v gély, čo umožnilo následnú identifikáciu pomocou nanoLC-MALDI MS/MS a nanoLC-ESI MS/MS. Vo vzorke arabskej gummy bola identifikovaná peroxidáza, ktorej prítomnosť bola potvrdená natívnou elektroforézou v polyakryamidom gély vizualizáciou roztokom 1-chlór-4-naftolu. Stanovenie aktivity peroxidázy bolo prevedené spektrofotometricky, meraním zmeny absorbancie premeny guajakolu na tetragajakol.

Kľúčové slová	arabská guma, <i>Acacia senegal</i> , <i>Acacia seyal</i> arabinogalaktanové proteíny, kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria
Počet strán	89
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname	Bc. Ivana Gašparíková
Title	Fractionation of arabic gum to find substances influencing developmental processes in plants
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2021

### Abstract

Gum arabic is an exudate from *Acacia senegal* trees or closely related species such as *Acacia seyal* growing principally in the African region of Sahel. Chemically, GA is heterogeneous polysaccharide and also contains a small proportion of proteins (~ 2 %) known as arabinogalactan proteins (AGPs). AGPs are highly glycosylated proteoglycans involved in many processes of plant growth and development. Supplementation of the induction medium with gum arabic revealed a positive effect of AGPs on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) another culture (Makowska *et al.*, 2017). The aim of this work was the fractionation of gum Arabic, followed by identification of proteins by mass spectrometry in order to find substances influencing developmental processes in plants. Using various types of liquid chromatography it was possible to obtain elution profiles of the gum samples and to gather the individual fractions. Another dimension of separation was performed by using SDS-PAGE electromigration methods and the isoelectric focusing (native and denaturing). These methods proved turned out to be suitable for the separation and visualization of proteins into gels, which allowed a subsequent identification by nanoLC-MALDI MS/MS and nanoLC-ESI MS/MS. The peroxidase was identified in a gum arabic sample, the presence of which was confirmed by native polyacryamide gel electrophoresis by visualization with 1-chloro-4-naphthol solution. Determination of the peroxidase activity was performed spectrophotometrically, by measuring the change in absorbance of the conversion of guaiacol to tetraguaiacol.

Keywords	arabic gum, <i>Acacia Senegal</i> , <i>Acacia Seyal</i> , arabinogalactans proteins, liquid chromatography, mass spectrometry
Numbers of pages	89
Numbers of appendices	0
Language	Slovak

# OBSAH

1 ÚVOD .....	9
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	10
2.1 Arabská guma.....	10
2.1.1 Produkcia.....	10
2.1.2 Zloženie .....	12
2.1.2.1 Akácia senegalská a Akácia egyptská .....	14
2.1.3 Funkčné vlastnosti .....	15
2.1.4 Aplikácie .....	15
2.2 Frakcionácia arabskej gummy.....	17
2.2.1 Veľkostne-vylučovacia chromatografia (SEC) .....	17
2.2.2 Hydrofóbná interakčná chromatografia (HIC) - „wattle blossom “ model .....	18
2.2.3 SEC - „twisted hairy rope“ model .....	22
2.2.4 Iónomeničová chromatografia (IEC).....	23
2.3 Arabinogalaktanové proteíny (AGP) .....	24
2.3.1 Štúdium AGP .....	24
2.3.2 Štruktúra AGP .....	25
2.3.2.1 Proteínová kostra .....	26
2.3.2.2 Sacharidová zložka .....	27
2.3.2.3 GPI-kotva.....	28
2.3.2.4 Terciárna štruktúra .....	28
2.3.3 Funkcie AGP u rastlín .....	30
2.3.3.1 Zapojenie AGP v procese androgenézy .....	31
2.4 Hmotnostná spektrometria .....	32
2.4.1 Iónové zdroje .....	32
2.4.2 Hmotnostné analyzátory .....	34
2.4.3 Detekcia a spracovanie signálu .....	34
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	36
3.1 Materiál a metódy .....	36
3.1.1 Chemikálie.....	36
3.1.2 Prístroje .....	37
3.1.3 Biologický materiál .....	38
3.1.4 Ostatný materiál .....	38
3.1.5 Použité metódy .....	39
3.1.5.1 Príprava roztokov arabskej gummy.....	39
3.1.5.2 BCA metóda .....	39

3.1.5.3	Separácia GA na kolóne Sephacryl S-200 HR .....	40
3.1.5.4	Elektroforéza SDS-PAGE a priebeh separácie .....	40
3.1.5.5	Farbenie gélov po SDS-PAGE .....	42
3.1.5.6	Štiepenie proteínov v gély .....	42
3.1.5.7	Extrakcia peptidov .....	43
3.1.5.8	Odsolenie peptidových vzoriek .....	43
3.1.5.9	Separácia peptidov nanoLC a MALDI-MS/MS analýza.....	43
3.1.5.10	nanoLC–ESI MS/MS analýza.....	45
3.1.5.11	Príprava rozpustného disulfidového gélu .....	45
3.1.5.12	Izoelektrická fokusácia (IEF).....	47
3.1.5.13	Denaturačná izoelektrická fokusácia .....	48
3.1.5.14	Farbenie gélov po IEF.....	48
3.1.5.15	Spojenie SEC a IEC chromatografie .....	49
3.1.5.16	Identifikácia peroxidázy .....	49
3.1.5.17	Spektrometrické stanovenie peroxidázovej aktivity .....	51
4	VÝSLEDKY .....	53
4.1	Koncentrácia proteínov .....	53
4.2	Separácia GA pomocou SEC .....	54
4.3	Vizualizácia proteínov pomocou SDS-PAGE a identifikácia pomocou MS.....	56
4.4	Príprava rozpustného gélu.....	61
4.5	Vizualizácia proteínov pomocou IEF.....	62
4.6	Spojenie IEC a SEC chromatografie.....	64
4.7	Identifikácia peroxidázy pomocou natívnej PAGE .....	66
4.8	Spektrometrické stanovenie peroxidázovej aktivity .....	68
5	DISKUSIA .....	70
6	ZÁVER .....	77
7	LITERATÚRA.....	79
8	ZOZNAM SKRATIEK.....	88

## **CIELE PRÁCE**

### **Teoretická časť:**

- Vypracovať literárnu rešerš o výskyte, spracovaní, vlastnostiach, zložení a použití arabskej gummy
- Frakcionácia arabskej gummy pomocou techník kvapalinovej chromatografie a ich popis
- Charakterizácia arabinogalaktanových proteínov
- Charakterizácia identifikácie proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie

### **Experimentálna časť:**

- Stanovenie koncentrácie proteínov v dostupných vzorkách arabskej gummy
- Použitie dialýzy, veľkostne-vylučovacej a iónomeničovej chromatografie pre frakcionáciu roztoku arabskej gummy
- Detekcia proteínov vo frakciách pomocou elektromigračných metód, využitie elektroforézy pre frakcionáciu
- Identifikácia proteínov vo frakciách pomocou kombinácie nano LC-ESI-MS/MS alebo nanoLC-MALDI-MS/MS



# 1 ÚVOD

Arabská alebo akáciová guma je výlučok (exudát) zo stromov *Acacia senegal* alebo blízko príbuzných druhov akácií ako *Acacia seyal*. Rastlinné gumy sú v prírodnej forme často polysacharidy alebo modifikované polysacharidy s vysokou molekulovou hmotnosťou. Rovnako tomu je aj v prípade arabskej gummy, ktorá obsahuje veľké množstvo polysacharidov (97%) a malé množstvo proteínu (< 3%) ako integrálnu časť štruktúry (Islam *et al.*, 1997). Tieto proteíny boli opísané ako arabinogalaktanové proteíny (AGP), pretože došlo k precipitácii gummy s  $\beta$ -glukozyl Yariv reagentom (Akiyama *et al.*, 1984), čo je jednou z typických vlastností AGP. Niektoré charakteristiky zloženia AGP arabskej gummy sa však výrazne odlišujú od typických AGP, napr. nízkym obsahom alanínu pripomínajú skôr inú podtriedu glykoproteínov. Objasnenie tejto veľmi komplikovanej štruktúry arabskej gummy tiež sťažuje fakt, že zloženie arabskej gummy je variabilné, závisí na lokalizácii, veku stromu, klimatických podmienkach, miesta narezania a mení sa zo sezóny na sezónu (Idris *et al.*, 1998; Lopez-Torrez *et al.*, 2015).

Vďaka neuveriteľnej rozmanitosti glykánových a proteínových reťazcov sú AGP zapojené do širokého spektra úloh v priebehu rastu a vývoja rastliny. Pozitívny efekt AGP z arabskej gummy v procese androgenézy bol demonštrovaný u jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) na prašníkovej kultúre (Makowska *et al.*, 2017). Pridanie AGP z arabskej gummy znížilo úmrtnosť buniek, zvýšilo frekvenciu mitotického delenia mikrospór, prispelo k zníženiu času potrebného pre indukciu androgenézy a tiež zvýšilo kvalitu formovaných embryí v porovnaní s kontrolou.

Pozitívny efekt arabskej gummy na proces androgenézy bol podnetom pre vypracovanie tejto diplomovej práce, identifikácia proteínov v gume by mohla prispieť k objasneniu mechanizmov vývoja rastlín procesom androgenézy, ktorá dôležitým nástrojom v genetických a šľachtiteľských programoch.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Arabská guma

Exudáty rastlín, nazývané rastlinné gummy alebo klovatiny, sú spravidla lepivé šťavy-výrony stromov a krov, ktoré samovoľne vytekajú z pletív rastlín v dôsledku pôsobenia rôznych faktorov, napr. pri napadnutí mikroorganizmami alebo pri poranení (Williams a Phillips, 2000). Na vzduchu časom tuhnú na pevné gumovité hmoty. Jednou z takýchto rastlinných gúm, získavaných prostredníctvom výronov, je arabská guma (GA, „gum arabic“).

Arabská alebo akáciová guma je prírodný biopolymér získavaný ako výlučok (exudát) zo stromov *Acacia senegal* alebo blízko príbuzných druhov akácií ako *Acacia seyal*. Tieto druhy akácií rastú hlavne v severnej Afrike, predovšetkým v oblasti Sahel, pričom hlavnými producentmi arabskej gummy sú Sudán, Nigéria a Čad (Williams a Phillips, 2000). Obchod s týmto prírodným produktom prebieha viac ako 5000 rokov, arabská guma bola využívaná už v starovekom Egypte k balzamovaniu múmií či maľovaniu hieroglyfov (Whistler a BeMiller, 1993). V súčasnej dobe má veľký význam predovšetkým v potravinárstve, avšak svoje uplatnenie našla aj v mnohých ďalších priemyselných odvetviach, napríklad pri výrobe liečiv, textílií, keramiky, kozmetiky a iných (Montenegro *et al.*, 2012).

#### 2.1.1 Produkcia

Anatomické štúdie formácie arabskej gummy boli ohlásené v publikáciách Ghosh a Purkayastha (1962) a o niečo neskôr u Joseleau a Ullmann (1990). Ghosh a Purkayastha ukázali, že guma je formovaná v cystách vo vnútornej kôre, pričom vývoju týchto cyst predchádzajú zmeny v susedných parenchymatóznych tkanivách a miznutie škrobu (Ghosh a Purkayastha, 1962). Za miesto tvorby považovali vnútorný floém. Joseleau a Ullmann rozšírili tieto štúdie o ďalšie chemické analýzy z „produktívnych“ a „neproduktívnych“ vetiev stromu. V zóne medzi vnútornou kôrou a kambiom bol pozorovaný polysacharid s extrémne vysokou molekulovou hmotnosťou a veľmi podobným zložením ako arabská guma, a preto naznačujú, že sa jedná o jej prekursor. Výsledky ukázali, že guma je produkovaná kambialnou zónou a jej tvorba nie je obmedzená len na miesto exsudácie, ale k tvorbe gummy dochádza aj v tkanivách v určitej vzdialenosti od jazvy vetvy. Štúdia Joseleau a Ullmann (1990) ďalej ukázala, že

produkcia gummy u *A. senegal* vyžaduje určitú zrelosť stromu, čo je v súlade s obchodom s gumou, kde sú len stromy staršie ako 5 rokov schopné produkovať ekonomicky významné množstvo gummy v potrebnej kvalite (Baldwin, 2002). Na biosyntézu gummy, tzv. gumózu, sú navrhnuté viaceré teórie. Jeden z názorov naznačuje, že sa jedná o patologický proces, ktorý je dôsledkom bakteriálnej alebo plesňovej infekcie poškodeného stromu (Mantell, 1954; Smith a Montgomery, 1959). Iné publikácie uvádzajú, že gumóza je súčasťou normálneho metabolizmu rastlín alebo priamo súvisí s metabolizmom škrobu a arabská guma je produkovaná ako reakcia na fyziologické poruchy vyvolané stresom (Hirst a Jones, 1958; Anderson a Dea, 1968; Joseleau a Ullmann, 1990). Predpokladá sa, že guma slúži ako prírodná „špongia“, ktorá utesňuje rany vytvorením ochranného povlaku, aby sa zabránilo lokálnej dehydratácii rastlinného tkaniva (Anderson a Dea 1968, 1971).

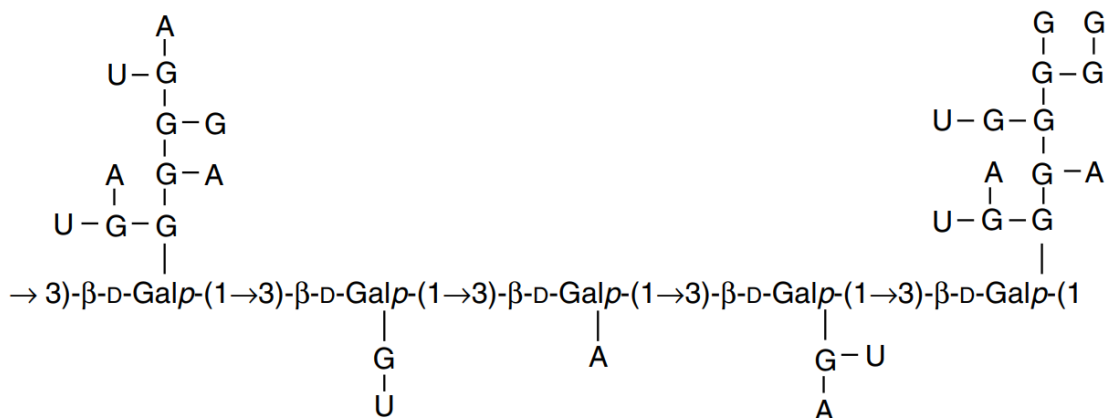
K tvorbe gummy u akácií dochádza najmä ak sú vystavené stresovým podmienkam, ako teplo, sucho, zlá úrodnosť pôdy alebo zranenie (Williams a Phillips, 2000). Z toho dôvodu je produkcia gummy stimulovaná narezávaním kôry stromov, s ktorým sa začína v období sucha, akonáhle začnú opadávať listy (november/december). Tradičným nástrojom bola sekera, avšak modernou praktikou v Sudáne je použitie ostrého oštepú na prerezanie vetvy (kmeňa) tesne pod kôru, tak aby nedošlo k poškodeniu kambiálnej zóny. Oštep sa následne posúva nahor a nadol pozdĺž vetvy, aby sa pod kôrou odhalila oblasť kambiálnej vrstvy asi 30 cm dlhá a 5 cm široká. Guma vyteká z kmeňa a vetiev ako lepivá tekutina žltej farby, ktorá na slnku tvrdne do výronov s priemernou veľkosťou 2 – 7 cm (Obr. 1). Zber prebieha po 4 – 6 týždňoch od prevedenia povrchového rezu, následne je guma zbavovaná nečistôt a prebiehajú ďalšie procesy úpravy a mletia na výsledný biely až nažltnutý prášok. Ročný výťažok jedného stromu sa obvykle pohybuje medzi 0,5 – 2 kg, avšak produkcia môže byť od niekoľkých gramov po 10 kg (Elrayah *et al.*, 2012).



Obr. 1 Výrony arabskej gummy stromu *A. senegal* (Prevzaté z *Musa et al.*, 2018).

### 2.1.2 Zloženie

Z chemického hľadiska je arabská guma komplex polysacharidov, ktorý tiež obsahuje malé množstvo proteínu (~ 2%) ako integrálnu časť štruktúry (Islam *et al.*, 1997). Hlavný reťazec je tvorený jednotkami  $\beta$ -D-galaktopyranózy spojenými  $\beta$ -(1,3)-glykozidovými väzbami s vetvením hlavne v C6 pozíciách. Vedľajšie postranné reťazce obsahujú prevažne galaktózu a arabinózu, v menšej miere ramnózu, glukurónovú kyselinu a 4-O-metylglukurónovú kyselinu (Obr. 2) (Anderson *et al.*, 1966; Street a Anderson, 1983). Experimentálne výskumy na objasnenie sacharidovej štruktúry boli vykonávané na nefrakcionovaných vzorkách, pričom využívali najmä Smithovu degradáciu (Street a Anderson, 1983; Churms *et al.*, 1983) a  $^{13}\text{C}$ -NMR (Defaye a Wong., 1986). Smithova degradácia je procedúra, ktorá zahŕňa oxidáciu jodistanom, redukciu borohydridom a kontrolovanú kyslú hydrolýzu. Série Smithových degradácií, metylácia arabskej gummy a následná metanolýza produkujú radu metylovaných cukrov, ktoré boli skúmané pomocou GLC („gas-liquid chromatography“). Počítačové modelovanie a prepočty ukazujú, že usporiadanie cukrov nie je náhodné, ale dá interpretovať do usporiadanej štruktúry, pričom glukurónová kyselina a ramnóza sú lokalizované na periférii molekuly, pretože boli eliminované prvé (Street a Anderson, 1983).



Obr. 2 Jeden z návrhov štruktúry arabskej gummy. **G** =  $\beta$ -D-Galp, **A** = L-Araf-, L-Arap-zakončujúca krátke reťaze (1 $\rightarrow$ 3)-spojených L-Araf-, alebo  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Araf- **U** =  $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcA, alebo  $\beta$ -D-GlcpA (4-OMe). Skratky: Araf (arabinofuranóza), Arap (arabinopyranóza), Rhap (ramnopyranóza), GlcA (glukurónová kyselina). Obrázok prebratý od Izydorczyk *et al.*, 2005.

Práve kyseliny glukurónová a 4-O-metylglukurónová sú zodpovedné za miernu kyslosť roztokov arabskej gummy (pH  $\sim$  4,5) (Smith, 1939). Niektoré z voľných karboxylových skupín sú čiastočne neutralizované kationmi, z ktorých sú navyše zastúpené vápnik, draslík, sodík a magnézium (Flindt *et al.*, 2005).

Arabská guma je považovaná za komplex arabinogalaktanových proteínov (AGP), pretože došlo k jej precipitácii s  $\beta$ -glukozyl Yariv reagentom (Akiyama *et al.*, 1984), čo je jednou z typických vlastností AGP. Od typických AGP (bohaté na alanín) sa arabská guma odlišuje nízkym obsahom alanínu, celkovo svojím aminokyselinovým zložením pripomína skôr extenzíny. Extenzíny sú glykoproteíny bunkovej steny s vysokým obsahom hydroxyprolínu, ktoré rovnako ako AGP zaraďujeme do rodiny glykoproteínov bohatých na hydroxyprolín. Polysacharidové reťazce a ich pripojenie k polypeptidovému však vykazujú klasické charakteristiky AGP. Na podrobnejší prehľad metodík skúmajúcich zloženie arabskej gummy, štruktúrne modely a samotný popis AGP sú zamerané kapitoly 2 a 3.

Zloženie arabskej gummy je variabilné, závisí na lokalizácii, veku stromu, klimatických podmienok, miesta narezania a mení sa zo sezóny na sezónu (Idris *et al.*, 1998; Lopez-Torrez *et al.*, 2015). Vzorky gummy pochádzajúce z rôznych stromov *A. senegal*, ktoré sa nachádzali v podobnom pôdnom prostredí a vystavené konštantným klimatickým podmienkam, vykazovali významné rozdiely vo viskozite či molekulových hmotnostiach (Anderson *et al.*, 1968).

### 2.1.2.1 Akácia senegalská a Akácia egyptská

Napriek tomu, že je zloženie arabskej gummy variabilné v závislosti na zdroji, stanovenie niektorých parametrov môže poskytnúť rýchle rozlíšenie medzi *A. senegal* (akácia senegalská) a *A. seyal* (akácia egyptská). Prvý z parametrov je obsah proteínu, ktorý je u gummy *A. senegal* vyšší než v gume *A. seyal* (~ 1,5 – 3 % oproti ~ 0,5 – 1 %), relatívne zastúpenie aminokyselín je však u oboch druhov rovnaké (Williams a Phillips 2000; Lopez-Torrez *et al.*, 2015). Obidve gummy sa vyznačujú rovnakými sacharidovými rezíduami, avšak typicky má guma *A. seyal* vyšší obsah arabinózy než galaktózy, zatiaľ čo gumu *A. senegal* charakterizuje vyšší obsah galaktózy než arabinózy (Idris *et al.*, 1998; Williams a Phillips, 2000; Lopez-Torrez *et al.*, 2015; Sanchez *et al.*, 2018). Zastúpenie sacharidov a aminokyselín je síce rovnaké, avšak v rôznych pomeroch, čo je hlavný dôvod rozdielnej špecifickej rotácie (Flindt *et al.*, 2005), ktorá je ďalším parametrom odlišujúcim tieto dva druhy. Roztoky gummy *A. senegal* sú pravotočivé ( $-30^\circ$ ), zatiaľ čo roztoky gummy *A. seyal* ľavotočivé ( $+50^\circ$ ) (Williams a Phillips, 2000). Z hľadiska štruktúrnych parametrov je molárna hmotnosť ( $M_w$ )<sup>1</sup> gummy *A. seyal* vo všeobecnosti niekoľkokrát vyššia ako gummy *A. senegal* (Williams a Phillips, 2000; Al-Assaf *et al.*, 2005b; Flindt *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2005), avšak index polydisperzity ( $M_w/M_n$ ) je vyšší pre gumu *A. senegal* než *A. seyal*, čo ukazuje na vyšší podiel molekúl s vysokou molekulovou hmotnosťou (AGP) v gume *A. senegal* (Lopez-Torrez *et al.*, 2015). *A. seyal* je charakterizovaná nižšou vnútornou viskozitou ( $\eta$ ) a nižším hydrodynamickým polomerom ( $R_h$ ) než *A. senegal*, čo ukazuje na kompaktnejšiu štruktúru gummy *A. seyal* (Lopez-Torrez *et al.*, 2015). Podľa Benthamovej taxonómie rodu *Acacia* patria tieto stromy do odlišných podrodov, kým *A. seyal* patrí do podrodu *Gummiferae*, *A. senegal* je zaradená do podrodu *Vulgares* (Bentham *et al.*, 1875). Taxonómia tohto rodu sa v priebehu rokov menila (Maslin *et al.*, 2003), avšak vo veľa prácach figuruje práve toto zaradenie (Jurasek *et al.*, 1995; Mhinzi, 2003; Al-Assaf *et al.*, 2005b; Sanchez *et al.*,

---

<sup>1</sup> Hovoríme o hmotnostne strednej molárnej hmotnosti ( $M_w$ ), ktorá vyjadruje hmotnostný stred vzťahnutý k hmotnosti makromolekúl, a teda sa približuje hodnote molárnych hmotností „veľkých“ makromolekúl (vplyv malých molekúl je nepatrný). Oproti tomu číselne stredná molárna hmotnosť ( $M_n$ ) udáva číselný stred, ktorý vychádza z počtu makromolekúl v jednotlivých frakciách, takže sa pohybuje v okolí molárnych hmotností molekúl, ktoré sú vo vzorke s najväčším výskytom. Je teda citlivá na prítomnosť „malých“ makromolekúl, ktoré sú vo vzorke zastúpené častejšie. Pre monodisperzný systém budú hodnoty  $M_w$  a  $M_n$  rovnaké. So zväčšujúcou sa šírkou distribučnej krivky molárnych hmotností sa zväčšuje rozdiel medzi hodnotou číselného a hmotnostného priemeru. Tento priemer sa označuje ako koeficient polydisperzity (index polydisperzity) a je definovaný:  $\bar{D} = M_w/M_n$  (Prokopová, 2007; Šňupárek, 2014).

2018). Väčšina prác zameraných na chemickú a fyzikálno-chemickú charakterizáciu arabskej gummy sa sústreďuje na gumu *A. senegal*.

### 2.1.3 Funkčné vlastnosti

Arabská guma sa ľahko rozpúšťa vo vode, čo vedie k získaniu čírych roztokov od bledožltej po oranžovo-hnedú farbu s pH ~ 4,5. Rozpustnosť vo vode a relatívne nízka viskozita sú vlastnosti, ktorými sa arabská guma výrazne odlišuje od iných gumm (Williams a Phillips, 2000). Väčšina gumm sa vo vode nerozpúšťa v koncentráciách vyšších ako 5 % w/v („hmotnostne-objemové percentá“) kvôli ich vysokým viskozitám, zatiaľ čo arabská guma je vo vode rozpustná až do koncentrácií 50 % w/v. Skutočnosť, že arabská guma tvorí roztoky s nízkou viskozitou napriek vysokej molekulovej hmotnosti, je dôsledkom jej kompaktnej molekulovej štruktúry. Disperzie obsahujúce < 40 % gummy sa správajú ako newtonovské kvapaliny, kým disperzie o vyššej koncentrácii ako pseudoplastické systémy (dôsledok agregácie molekúl). Hlavné príčiny agregáčného procesu môžu byť spôsobené intramolekulárnymi vodíkovými mostíkmi medzi sacharidovými časťami (Mahendran *et al.*, 2008) a/ alebo hydrofóbnymi interakciami polypeptidovej kostry a disulfidových mostíkov medzi molekulami (Renard *et al.*, 2012).

Jednou z ďalších funkčných charakteristík gummy sú jej emulzné vlastnosti. Randall *et al.*, 1998 popísali AGP komplex ako hlavnú zložku arabskej gummy zodpovednú za stabilizáciu emulzií, kde amfifilná proteínová časť AGP adsorbuje na povrch olejových kvapiek, zatiaľ čo hydrofilná sacharidová zložka je orientovaná smerom k vodnej fáze a zabraňuje agregácii kvapôčok elektrostatickým odpudzovaním.

### 2.1.4 Aplikácie

Široké uplatnenie našla arabská guma v potravinárskom priemysle ako prídavná látka registrovaná pod číslom 414 (E414). Prídavkom GA dosahujeme žiadúce vlastnosti potravín, používa sa predovšetkým ako zahusťovadlo, stabilizátor a emulgátor, a to bez efektu na chuť, vôňu a farbu potraviny. V cukrovarníctve a pekárstve sa využíva hlavne na zabránenie alebo oddialenie kryštalizácie cukru či emulgácii tuku, čo zabezpečuje jeho rovnomernú distribúciu po celom produkte. Na povrchoch vytvára hladký film, čo sa používa pri výbere poliev. Ako emulgátor sa používa aj pri výrobe nápojov, konkrétne citrusových džúsov, kolových nápojov či piva, kde má rolu aj na stabilizáciu peny. Výskumy zloženia gummy a vlastností pre použitie GA ako potravinového aditíva

prebiehajú neustále. Nedávny výskum z roku 2019, ukazuje pozitívny vplyv AGP z gummy *A. senegal* na koloidnú stabilitu červeného vína, tým že zabraňujú precipitácii farbiva (Nigen *et al.*, 2019).

Okrem potravinárstva našla arabská guma uplatnenie aj v ďalších priemyselných odvetviach, napríklad pri výrobe liečiv, textílií, keramiky, kozmetiky a iných (Montenegro *et al.*, 2012). Vo farmaceutickom priemysle sa používa ako nosič liekov, pretože je považovaná za fyziologicky neškodnú látku. Výskumy arabskej gummy dávajú do pozornosti jej úlohu antioxidantu (Trommer a Neubert, 2005; Mirghani *et al.*, 2018), vplyv na metabolizmus lipidov (Tiss *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 1992), pozitívny účinok pri liečbe obličiek (Matsumoto *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 2008) a kardiovaskulárnych (Glover *et al.*, 2009) či gastrointestinálnych ochorení (Wapnir *et al.*, 2008; Rehman *et al.*, 2003).

Pre svoje dobré spojivové vlastnosti sa využíva k výrobe lepidiel či fixatív, ako ochranné a suspenzačné činidlo pri výrobe vodových, rýchloschnúcich či typografických farieb, kde pomáha znižovať rýchlosť sedimentácie častíc. Pretože ľahko preberá vonné vlastnosti iných látok, používa sa aj ako súčasť bylinných vykurovadiel.

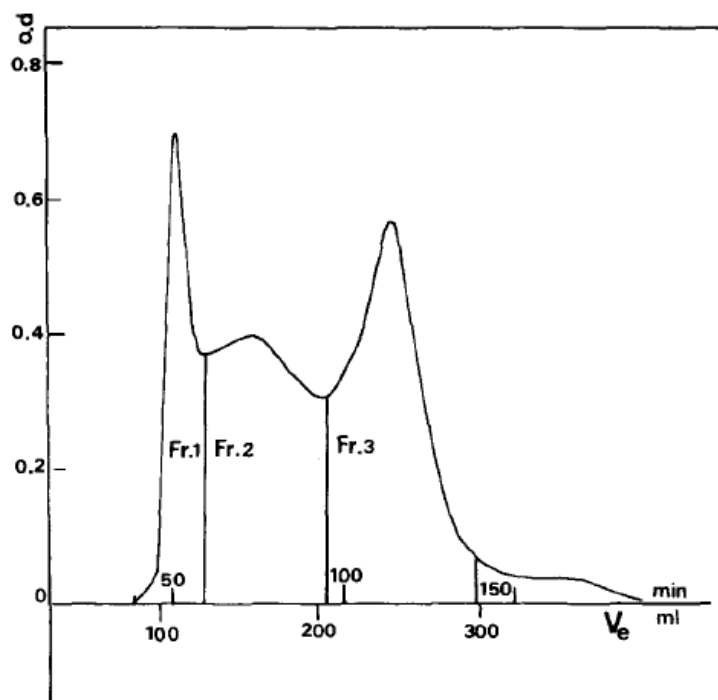


## 2.2 Frakcionácia arabskej gummy

Arabská guma je opísaná ako „heteropolymolekulárna“ zlúčenina pozostávajúca z molekúl, ktoré sa líšia v zložení monoménych jednotiek a/alebo ide o variácie v spôsobe spojenia a vetvenia monoménych jednotiek a molekuly sa líšia molekulovými hmotnosťami (Lewis a Smith, 1957; Anderson a Stoddart, 1966). Hoci pomerne skoré štúdie (Anderson a Stoddart, 1966) zloženia arabskej gummy ukázali, že guma môže byť separovaná na frakcie s odlišnými molekulovými hmotnosťami, ktoré obsahovali rôzne pomery proteínového materiálu, tieto výsledky boli zanedbané a experimentálne výskumy na objasnenie sacharidovej štruktúry boli vykonávané na nefrakcionovaných vzorkách (Street a Anderson, 1983; Churms *et al.*, 1983; Defaye a Wong., 1986). Výskumy zamerané na vplyv proteínovej zložky na celkové štruktúrne a funkčné vlastnosti gummy začali byť realizované až neskôr (Vandeveldde a Fenyo, 1985; Snowden *et al.*, 1987; Connolly *et al.*, 1988; Randall *et al.*, 1988;). Pri konečnom popise štruktúry boli dosiahnuté pokroky charakterizáciou frakcií izolovaných rôznymi separačnými technikami, ako veľkostne-vylučovacia chromatografia (SEC) (Vandeveldde a Fenyo, 1985; Randall *et al.*, 1988; Qi *et al.*, 1991), hydrofóbna interakčná chromatografia (HIC) (Randall *et al.*, 1989, Osman *et al.*, 1993) a iónová výmenná chromatografia (IEC) (Osman *et al.*, 1995). Táto kapitola pojednáva o vyššie spomínaných separačných technikách, ktoré prispeli k objasneniu štruktúry arabskej gummy, predovšetkým proteínovej časti gummy.

### 2.2.1 Veľkostne-vylučovacia chromatografia (SEC)

Veľkostne-vylučovacia chromatografia (SEC, „size-exclusion chromatography“) využíva prenikanie separovaných molekúl (na základe ich rozmerov) do kvapalnej fázy uzavretej v dutinách gélu. Pri tejto separácii sa uplatňuje „sitový efekt“, pri ktorom molekuly s rozmermi menšími ako je veľkosť dutín gélu difundujú do mobilnej fázy v dutinách gélu, čím dôjde k ich zachyteniu a systémom budú prenikať pomalšie. Väčšie molekuly, ktoré do dutín gélu nezapadnú, prechádzajú systémom spolu s mobilnou fázou, a preto sa eluujú ako prvé (Mikeš 1980, Churáček *et al.*, 1990; Motyka a Hlaváč, 2009).



Obr. 3 Elučný profil vzorky arabskej gummy *A. senegal* obdržaný pomocou vylučovacej chromatografie (SEC) na Sephacryl S-500 gély v roztoku 1 M NaCl. Vzorka 10 ml ( $c_m = 2,04\%$ ). Kolóna 2,5 x 64 cm. Prietok 132 ml/h. UV detekcia pri 214 nm. (Prevzaté z Vandeveldé a Fenyo, 1985).

Frakcionácia arabskej gummy pomocou SEC (Vandeveldé a Fenyo, 1985) poskytla separáciu gummy na tri hlavné frakcie (Obr. 3). Elučné profily vzoriek boli odlišné v závislosti od pôvodu, avšak u každej vzorky prebehla separácia v širokom rozpätí. Obdržané frakcie vykazovali rozdiely vo viskozite a obsahu dusíka. Prvé dve frakcie obsahovali väčšinu obsahu dusíka a vyznačovali sa vysokou viskozitou (frakcia 1 a 2), zatiaľ čo tretia (frakcia 3) pozostávala hlavne z polysacharidových molekúl s nízkou viskozitou. Na základe SEC bola demonštrovaná polydisperzita gummy, tzn. prítomnosť rôzne veľkých častíc a poskytla informácie o rôznej distribúcii molekulových hmotností.

### 2.2.2 Hydrofóbná interakčná chromatografia (HIC) - „wattle blossom“ model

Hydrofóbná interakčná chromatografia (HIC, „hydrophobic interaction chromatography“) je chromatografická metóda na separáciu proteínov, založená na reverzibilnej interakcii ich hydrofóbných skupín s hydrofóbnym ligandom matrice kolóny. K hydrofóbnnej interakcii dochádza v prostredí s vysokou koncentráciou iónov a iónovou silou. Elúcia jednotlivých molekúl prebieha postupne v reverznom gradiente koncentrácie iónov, teda za znižujúcej sa koncentrácie, čo oslabuje hydrofóbné interakcie

a spôsobuje uvoľnenie molekúl, pričom sa prvé uvoľňujú molekuly s najnižšou mierou hydrofóbnosti (Hjertén, 1973; Eriksson a Belew, 2011).

Pomocou HIC s použitím fenyl-sefarózovej CL-4B kolóny bola arabská guma rozdelená na štyri frakcie: frakciu arabinogalaktanov (frakcia 1), arabinogalaktanových proteínov (frakcia 2) a glykoproteínov (frakcie 3A a 3B) (Randall *et al.*, 1989). Elučný gradient bol vytvorený klesajúcou koncentráciou 4,2 mol.l<sup>-1</sup> roztoku NaCl po nulu (destilovaná voda).

Frakcia 1 obsahovala materiál, ktorý prešiel hydrofóbnou kolónou priamo (bez adsorpcie), s priemernou molekulovou hmotnosťou 2,79 x 10<sup>5</sup> Da. Táto frakcia predstavovala 88,4 % z celkovej hmotnosti gummy, obsahovala obzvlášť nízky obsah proteínov (< 1%) a bola ohlásená ako arabinogalaktany (AG). Sanchez *et al.*, 2008 použitím techniky malouhlového rozptylu elektrónov (SANS, „small-angle neutron scattering“), transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM, „transmission electron microscopy“) a mikroskopie atómových síl (AFM, „atomic force microscopy“) odvodil prvý model pre túto frakciu. Hovoríme o tzv. „disc-like“ modeli, ktorý pre frakciu 1 predpokladá morfológiu podobnú disku s priemerom 20 nm a hrúbkou menej než 2 nm, čo by mohlo vysvetľovať extrémne nízku viskozitu arabskej gummy v porovnaní s inými gumami (Williams a Phillips, 2000).

Frakcia 2, ktorá bola z kolóny eluovaná zmenou koncentrácie elučného roztoku z 4,2 na 2 mol.l<sup>-1</sup> NaCl, predstavovala 10,4 % celkovej hmotnosti gummy a obsahovala relatívne vysoký obsah proteínov (~ 10%). Táto frakcia bola označená ako komplex arabinogalaktanových proteínov (AGP) s priemernou molekulovou hmotnosťou 1,45 x 10<sup>6</sup> Da. Zníženie molekulovej hmotnosti (z ~ 1,45 x 10<sup>6</sup> na 2,8 x 10<sup>5</sup> Da) tejto frakcie po ošetrovaní proteolytickým enzýmom (pronáza) podporilo „wattle blossom“ štruktúrny model navrhnutý pre AGP (Fincher *et al.*, 1983), ktorý predpovedá niekoľko sacharidových blokov (Mw ~ 2 x 10<sup>5</sup> Da) pripojených na proteínovú kostru (Obr. 4, 5). Ošetrovaním pronázou dochádza k hydrolyze proteínu, čo vedie k uvoľneniu polysacharidových reťazcov, ktoré však stále nesú aminokyselinové rezíduá. Z dát prezentovaných v tejto štúdií bol navrhnutý model (Obr. 4), ktorý zobrazuje 5 sacharidových blokov spojených aminokyselinami, pričom sa tieto aminokyseliny musia nachádzať na okraji molekuly alebo v jeho blízkosti, pretože umožňujú molekule adsorbovať na hydrofóbne povrchy a musia byť vo forme reťazcov, pretože môžu byť degradované enzýmom. Polomer gyrácie (R<sub>g</sub>) a hydrodynamický polomer (R<sub>h</sub>) tejto

frakcie boli veľmi malé vzhľadom na vysokú molekulovú hmotnosť, čo naznačuje veľmi kompaktnú štruktúru.

Frakcie 3A a 3B, tzv. glykoproteíny (GP), ktoré boli desorbované z kolóny elúciou s destilovanou vodou, reprezentovali iba 1,24 % celkovej hmotnosti gummy a obsahovali vysoký obsah proteínov (~ 50 %). Autori odhalili prítomnosť dvoch možných typov glykoproteínov, z ktorých mal jeden priemernú molekulovú hmotnosť  $2,5 \times 10^5$  Da.

Použitie hydrofóbnej interakčnej chromatografie prinieslo dôležité výsledky aj o niekoľko rokov neskôr (Osman *et al.*, 1993), kedy bola arabská guma frakcionovaná pomocou HIC na fenyl-sefarózovej CL-4B kolóne s použitím rovnakého postupu ako u Randall *et al.*, 1989. Na rozdiel od tejto štúdie, kde bola 4,2 mol.l<sup>-1</sup> roztokom NaCl eluovaná iba jedna frakcia, boli pri použití rovnakej koncentrácie u Osman *et al.*, 1993 pozorované píky dva (frakcie 1A a 1B). U všetkých štyroch frakcií došlo k interakcii so sadou monoklonálnych anti-AGP protilátok a k precipitácii s Yariv reagentom, čo naznačuje prítomnosť AGP vo všetkých frakciách. Izolované frakcie boli následne charakterizované pomocou SEC a SDS-PAGE. Tieto techniky ukázali v jednotlivých frakciách prítomnosť rôzneho počtu molekúl, ktoré sa odlišovali veľkosťou a chemickým zložením, čo demonštruje fakt, že arabská guma pozostáva z viacerých molekulárnych frakcií ako len troch predtým opísaných (AG, AGP, GP).

Predchádzajúce štúdie naznačujú mechanizmus adsorpcie hydrofóbneho peptidového reťazca na matricu kolóny. Aminokyselinové zloženie arabskej gummy však poukazuje na hydrofilný reťazec, ktorý pozostáva predovšetkým z hydroxyaminokyselín (Tab. 1). Vo frakciách získaných pomocou HIC (Mejia Tamayo *et al.*, 2018) aminokyselinové zloženie rovnako poukazovalo na hydrofilný reťazec. Frakcia HIC-F1 obsahovala 81 % polárnych a nabitých aminokyselín, u zvyšných frakcií boli hodnoty o niečo menšie, HIC-F2 (72 %) a HIC-F3 (68 %). Mejia Tamayo *et al.*, 2018 používajú na pomenovanie frakcií, delených podľa hydrofobicity, prísnejšie pomenovanie (HIC-F1, HIC-F2 a HIC-F3) z dôvodu, že všetky tri reagovali s Yariv reagentom a obsahovali arabinogalaktanové sacharidové reťazce typu II, a teda môžu byť formálne považované za AGP. Prítomnosť iba 19 – 32 % nepolárnych aminokyselín v HIC frakciách sponchybnuje predstavu AGP ako biopolymérov s hydrofilnou sacharidovou časťou a hydrofóbnou proteínovou časťou. Samozrejme hlavne kvôli vyššiemu obsahu proteínu (~ 50 %) a vyššiemu percentu nepolárnych aminokyselín bola HIC-F3 frakcia najmenej polárna. Avšak všetky charakteristiky, ako zoskupovanie nepolárnych aminokyselín

v koncových oblastiach polypeptidov, prítomnosť sekundárnych štruktúr, slabé interakcie medzi aminokyselinami a sacharidmi v tesnej blízkosti, amfifilická štruktúra galaktanovej kostry a asociačné vlastnosti makromolekúl, môžu hrať rolu v rovnováhe medzi polárnymi a nepolárnymi vlastnosťami AGP (Chen *et al.*, 1994; Goodrum *et al.*, 2000; Renard *et al.*, 2006, 2014 ).

Tab.1 Zastúpenie aminokyselín v arabskej gume na základe výsledkov viacerých štúdií. Obsah aminokyselín je vyjadrený v nmol/mg arabskej gummy. Posledný stĺpec tabuľky zobrazuje počet rezíduí danej aminokyseliny v reťazci dlhom 1000 rezíduí. Hrubo sú zvýraznené najviac zastúpené aminokyseliny.

Aminokyselina	Mahendran <i>et al.</i> , 2008 nmol/mg	Randall <i>et al.</i> , 1989 nmol/mg	Osman <i>et al.</i> , 1995 nmol/mg	Osman <i>et al.</i> , 1995 R/1000R
<b>Hydroxyprolín (Hyp)</b>	<b>54,20</b>	<b>41,00</b>	<b>39,00</b>	252
Asparágová kyselina (Asp)	10,60	12,00	9,00	58
<b>Treonín (Thr)</b>	<b>15,90</b>	<b>12,00</b>	<b>12,00</b>	77
<b>Serín (Ser)</b>	<b>28,70</b>	<b>22,00</b>	<b>25,00</b>	161
Glutámová kyselina (Glu)	8,29	6,20	6,20	40
<b>Prolín (Pro)</b>	<b>15,60</b>	<b>13,00</b>	<b>11,00</b>	71
Glycín (Gly)	10,60	9,30	8,40	54
Alanín (Ala)	5,07	4,90	4,40	28
Valín (Val)	7,29	5,90	5,6	36
Metionín (Met)	0,11	0,3	0,30	2
Isoleucín (Ile)	2,38	2,00	1,8	12
<b>Leucín (Leu)</b>	<b>15,10</b>	<b>12,00</b>	<b>12,00</b>	78
Tyrozín (Tyr)	2,30	2,80	1,60	11
Fenylalanín (Phe)	6,33	6,00	4,70	30
Histidín (His)	10,70	8,80	8,60	56
Lyzín (Lys)	5,13	4,30	4,00	26
Arginín (Arg)	2,12	1,50	1,3	8
Proteín (%)	2,15	2,03	2,00	

### 2.2.3 SEC - „twisted hairy rope“ model

Frakcionácia arabskej gummy pomocou SEC na preparatívnej Superose 6 kolóne rozdelila GA na dve frakcie: glykoproteín arabskej gummy (GAGP, „gum arabic glycoprotein“) s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktorý korešpondoval s AGP komplexom nedávno opísaným (Randall *et al.*, 1988), a heterogénny polysacharid (GAP, „gum arabic polysaccharide“) s nízkou molekulovou hmotnosťou. Po deglykozylácií frakcie GAGP (dGAGP) pomocou kyseliny fluorovodíkovej bol odhalený proteín pozostávajúci z ~ 400 aminokyselín (~ 130 hydroxyprolinových rezíduí) s opakujúcim sa vzorom 10 – 12 zbytkov. Experimenty alkalickéj hydrolyzy použitím hydroxidu bárnateho odhalili O-glykozidové pripojenie na peptid cez hydroxyprolín. Kým 12,1 % hydroxyprolinových rezíduí nebolo glykozylovaných vôbec, 63,5 % obsahovalo krátke oligoglykozidy a 24,3 % sacharidové bloky pozostávajúce približne z 30 sacharidových rezíduí s molekulovou hmotnosťou  $4,44 \times 10^3$  Da. Qi *et al.*, 1991 na základe týchto údajov navrhli štruktúrny model „twisted hairy rope“ (Obr. 6), odvodený z jednoduchého empirického vzorca: Hyp<sub>4</sub> Ser<sub>2</sub> Thr Pro Gly Leu His, vypočítaného zo zastúpenia hlavných aminokyselín (92 mol% dGAGP tvorilo týchto sedem aminokyselín) a z Hyp-glykozidového profilu arabskej gummy získaného po alkalickéj hydrolyze. Tento model podporila transmisná elektrónová mikroskopia (TEM), ktorá zobrazuje tyčinkovité molekuly dlhé ~ 150 nm. Molekulová hmotnosť frakcie GAGP bola vypočítaná ~  $2,2 \times 10^5$  Da na základe súčtu molekulovej hmotnosti polypeptidovej kostry (~  $4 \times 10^4$  Da, hodnota stanovená pomocou GPC deglykozylovanej frakcie) a molekulových hmotností pripojených sacharidových jednotiek (~  $1,8 \times 10^5$  Da, hodnota určená pomocou GPC po alkalickéj hydrolyze celej gummy, ktorá poskytla Hyp-polysacharidy). Táto hodnota ( $2,2 \times 10^5$  Da) je však oveľa nižšia ako hodnota  $1,5 \times 10^6$  Da ohlásená pre frakciu arabinogalaktanových proteínov gummy v skorších publikáciách (Randall *et al.*, 1988, 1989).

Osman *et al.*, 1993 vo svojej publikácii vystúpili proti navrhovanému „twisted hairy rope“ modelu a argumentujú rozpor dát molekulových hmotností chybnou interpretáciou experimentov alkalickéj hydrolyzy. Vo svojej publikácii poukazujú na fakt, že autori (Qi *et al.*, 1991) pri odvodzovaní modelu nepočítali s možnosťou, že okrem štiepenia proteínových zložiek môžu byť zásadou degradované aj sacharidové reťazce, ako to ohlásili vo svojej štúdií. Následné použitie špecifického hydroxyprolinového testu na monitorovanie alkalických hydrolyzátov (Hyp-

sacharidových rezíduí) po chromatografii neumožnilo detekovať sacharidy bez hydroxyprolínu. Pretože izolovaná frakcia bola takmer určite heterogénna, je možné, že tyčinkovité molekuly pozorované pomocou TEM odpovedajú iba jednej zo zložiek. Osmanovu teóriu potvrdil Mahentran *et al.*, 2008, ktorí porovnaním GPC profilov arabskej gummy a kontrolného dextranu dokazujú, že Ba(OH)<sub>2</sub> (použitý na hydrolyzu u Qi *et al.*, 1991) hydrolyzuje okrem proteínovej zložky aj sacharidovú časť (AG).

#### 2.2.4 Iónomeničová chromatografia (IEC)

Iónomeničová chromatografia (IEC, „ion-exchange chromatography“) je založená na interakcii nabitých molekúl vo vzorke a nabitými funkčnými skupinami chromatografického sorbentu v prostredí s vhodným pH. Osman *et al.*, 1995 frakcionoval arabskú gumu pomocou aniónmeniču (anexu) na chromatografickej kolóne naplnenej DEAE (dietylaminoetyl) celulórou v 1 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátovom pufrí (pH = 7), kedy došlo k separácii molekúl podľa počtu prítomných aniónových skupín. Elúcia gummy bola dosiahnutá zvýšením iónovej sily použitím elučného pufru NaCl (0,04 – 0,29 mol.l<sup>-1</sup>). Elúcia prebieha na základe výmeny aniónu mobilnej fázy s aniónom naviazaným na aniónmeniči, pričom vysoko nabité molekuly sú eluované ako posledné.

V tejto štúdií boli separované dve vzorky arabskej gummy (A a B), pričom u oboch vzoriek sa značná časť (60 %) vôbec neviazala na kolónu (frakcia 1). Ďalšie frakcie boli získané zvyšovaním iónovej sily elučného pufru. Vzorka A, úplne eluovaná pri 0,2 mol.l<sup>-1</sup> NaCl, bola rozdelená na 5 frakcií s klesajúcim proteínovým obsahom v poradí F2 > F1 > F3 > F5 > F4. Vzorka B, úplne eluovaná pri koncentrácii 0,29 mol.l<sup>-1</sup> NaCl, bola rozdelená na 6 frakcií s klesajúcim proteínovým obsahom v poradí F1 > F6 > F3 > F2 > F4 > F5. Všetky izolované frakcie boli polydisperzné rovnako ako v ich predchádzajúcej štúdií troch frakcií získaných použitím HIC (Osman *et al.*, 1993). Zaujímavé je, že frakcie získané použitím týchto dvoch techník sa významne odlišujú. Kým HIC separuje gumu hlavne podľa prítomnosti proteínového obsahu, IEC separuje molekuly podľa počtu prítomných aniónových skupín (pravdepodobne karboxylových), ktoré reagujú s pozitívne nabitými skupinami matrice. Vo všetkých frakciách bola dokázaná prítomnosť AGP, avšak žiadna z frakcií nemala obzvlášť vysoký obsah proteínov a poradie elúcie nesledovalo proteínový obsah. Poradie elúcie nezodpovedalo ani obsahu kyseliny glukurónovej vo frakciách, čoho dôvod môže byť, že niektorým skupinám je sféricky bránené interakcii s povrchom matrice.

## 2.3 Arabinogalaktanové proteíny (AGP)

Arabinogalaktanové proteíny sú rastlinné glykoproteíny pozostávajúce z proteínovej kostry glykozylovanej sacharidovými zvyškami, ktoré obsahujú galaktózu a arabinózu ako hlavné komponenty. AGP sú podskupinou glykoproteínov bohatých na hydroxyprolín (HRGP, „hydroxyproline-rich glycoproteins“), avšak genomické informácie naznačujú prekrývanie medzi AGP a inými skupinami HRGP (Seifert a Roberts, 2007)

HRGP sú bežne delené na tri hlavné multigénové rodiny: arabinogalaktanové proteíny (AGP), extenzíny a proteíny bohaté na prolín (PRP, „proline-rich proteins“), avšak v skutočnosti existujú tiež hybridy so znakmi viacerých rodín HRGP, chimérne HRGP obsahujúce ďalšie proteínové domény, ktoré nie sú HRGP, a veľmi malé proteíny, ako napríklad arabinogalaktanové peptidy (Johnson *et al.*, 2003b).

Vo všeobecnosti AGP definujú tri kritériá: (1) prítomnosť arabinogalaktanových reťazcov zvyčajne *O*-glykozidovo pripojených na proteínovú kosť cez Hyp rezíduá, (2) proteínová kosť bohatá na Hyp/Pro, Ala, Ser a Thr a (3) schopnosť viazať triedu syntetických farbív,  $\beta$ -Yariv reagenty, predovšetkým  $\beta$ -glukozyl Yariv reagent (Yariv *et al.*, 1962; Clarke *et al.*, 1979; Fincher *et al.*, 1983). Takéto zovšeobecnenie je však príliš úzke na popis všetkých AGP, existujú prípady AGP chudobných na hydroxyprolín a do značnej miery nereaktívnych s Yariv reagentom.

AGP sa nachádzajú v plazmatickej membráne, bunkovej stene, apoplastickom priestore a v sekrétoch (napr. exudáty rán). Ak hovoríme o lokalizácii v rastlinných orgánoch, vo vyšších rastlinách sa nachádzajú v listoch, stonkách, koreňoch, častiach kvetov, semenách a vo veľkých množstvách v kmeňoch niektorých krytosemenných a nahosemenných rastlín. Vďaka neuveriteľnej rozmanitosti glykánových a proteínových reťazcov sú zapojené do širokého spektra úloh v priebehu rastu a vývoja rastliny (Ellis *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Štúdium AGP

Objasňovanie štruktúry, hľadanie funkcií a molekulárnych mechanizmov AGP je náročné z viacerých dôvodov. Jedným z problémov je komplexná povaha sacharidových reťazcov obklopujúcich proteínovú kosť, ktoré v mnohých prípadoch zabraňujú detekcii pomocou proteín-špecifických protilátok. Komplexná glykozylácia a vysoký stupeň hydroxylácie proteínovej kostry AGP neumožňuje expresiu správne glykozylovaných



rekombinantných proteínov v mikroorganizmoch, vďaka čomu by mohla byť objasnená funkcia *in vivo*. Pre tieto vysoko komplexné glykoproteíny neexistujú žiadne jednotné zaužívané protokoly na čistenie, kvantifikáciu, objasňovanie štruktúry, aktivity alebo intermolekulárnych interakcií. Generovanie hypotéz o spôsoboch ich pôsobenia častokrát vychádza z porovnávania AGP s analogickými molekulami u zvierat.

Biochemické analýzy AGP často používajú špecifické monoklonálne protilátky (mAb), medzi ktoré patria JIM8, JIM13, JIM14, LM2 a CCRC-M7 (Šamaj *et al.*, 1998, Showalter, 2001). Ďalšími dôležitými nástrojmi na štúdium AGP sú hnedo-oranžové zlúčeniny so všeobecnou štruktúrou 1,3,5-tri-(*p*-glykozyloxyfenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzén, známe pod názvami Yariv reagenty, antigény či Yariv fenylglykozidy (Yariv *et al.*, 1967). Zatiaľ čo ( $\beta$ -glukozyl) a ( $\beta$ -galaktozyl) Yariv reagenty viažu AGP,  $\alpha$ -formy a ( $\beta$ -manozyl) Yariv ich neviažu, a preto často sú používané ako negatívna kontrola (Seifert a Roberts, 2007). Odhaduje sa však, že  $\beta$ -Yariv reagenty a monoklonálne protilátky viažu 50 – 100 rôznych AGP proteínov, a teda poskytujú len globálnych pohľad na distribúciu, lokalizáciu a funkcie AGP.

Schopnosť priameho štúdia jednotlivých AGP značne rozšírilo používanie molekulárnych techník. Tieto techniky zahŕňajú transkripčnú analýzu a produkciu mutantných línií, ako napríklad T-DNA inzerčných línií, interferenčných RNA (RNAi) línií a línií nadmerne exprimujúcich jednotlivé gény. Tento prístup však so sebou nesie radu problémov, v niektorých prípadoch je fenotyp zrejмый až po produkcii línií s dvojitým knockoutom (Motose *et al.*, 2004), v iných prípadoch sú pre indukciu fenotypu vyžadované stresové podmienky (Shi *et al.*, 2003).

### 2.3.2 Štruktúra AGP

AGP sú makromolekulárne látky s vysokým obsahom sacharidov (90 – 98 %), ktoré sú zvyčajne *O*-glykozidovo naviazané na proteínovú kostru (1 – 10 %). Percentuálne zastúpenie jednotlivých častí je variabilné, dokonca aj pre AGP izolované z rovnakého tkaniva (Sommer-Knudsen *et al.*, 1996). Každý známy AGP je spracúvaný prostredníctvom sekrečnej dráhy a obsahuje na N-konci odštiepiteľnú triediacu signálnu sekvenciu. Mnohé AGP sú rozpustné proteíny, zatiaľ čo iné majú na hydrofóbnom C-konci glykozylfosfatidylozitol (GPI) lipidovú kotvu, ktorou sú ukotvené k vonkajšiemu povrchu plazmatickej membrány. AGP môžu obsahovať rozličné pridané regióny či domény, ktoré sú charakteristické len pre niektorých zástupcov.

### 2.3.2.1 Proteínová kostra

Klonovanie kódujúcich génov významne zlepšilo naše porozumenie AGP. Prvé gény proteínovej kostry boli identifikované tradičnými biochemickými postupmi, ktoré si vyžadovali purifikáciu natívnych AGP, deglykozyzáciu a Edmanovu degradáciu (Chen *et al.*, 1994; Du *et al.*, 1994). V dnešnej dobe je možná sekvenácia celých genomov, ktorá odhaľuje neuveriteľnú rozmanitosť proteínových kostier AGP. AGP môžu byť podľa štruktúry ich proteínového jadra vo všeobecnosti rozčlenené na dva typy: klasické a neklasické AGP (Showalter, 2001).

Za klasické AGP a AG peptidy môžeme považovať základné formy AGP, ktoré nemajú ďalšie domény slúžiace k iným funkciám, a teda celá proteínová kostra vystupuje ako „lešenie“ pre glykozyzáciu. Väčšina klasických AGP obsahuje proteínovú kostru s približne 100 aminokyselinovými rezíduami, zatiaľ čo kostru väčšiny AG peptidov tvorí 10 – 13 aminokyselinových rezíduí (Schultz *et al.*, 2002). Proteínová kostra je bohatá na Hyp/Pro, Ala, Ser a Thr, s dipeptidovými vzorcami Ala-Hyp, Ser-Hyp, Thr-Hyp, Val-Pro, Gly-Pro a Thr-Pro ako rozlišovacími prvkami, avšak môžu byť prítomné aj Ser-(Hyp)<sub>2-3</sub> sekvencie, ktoré sú typické u extenzínov. Do tejto skupiny tiež zaradíme podtriedu AGP bohatých na lyzín, ktoré sú charakteristické krátkym regiónom na C-konci s vysokým obsahom lyzínu (Sun *et al.*, 2005).

Na rozdiel od klasických AGP, neklasické (chimérické) AGP obsahujú rozdielne domény na ich proteínovom jadre, podľa ktorých ich môžeme klasifikovať do troch hlavných tried: „fasciclin-like“ AGP (FLA), „phytoecyanin-like“ AGP (PAG) a „xylogen-like“ AGP (XYLP). FLA obsahujú jednu alebo dve fasciclinové domény, často GPI kotvu a predpokladá sa ich zapojenie v proteín-proteín interakciách (Johnson *et al.*, 2003a). Členovia podskupiny PAG zdieľajú podobnú štruktúru ako fytocyaníny, ale v ich doméne, podobnej tej plastocyanínovej, neobsahujú aminokyseliny, ktoré viažu med' (Mashiguchi *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2015). Zástupcovia XYLP, pôvodne izolovaní z diferencovaných xylémových buniek v kultúrach *Zinnia elegans*, obsahujú navyše nešpecifické lipidové transferové proteínové domény a pôsobia ako funkčné extracelulárne proteíny v rôznych rastlinných tkanivách (Motose *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2011). Okrem toho existuje mnoho ďalších chimérických AGP, ktoré sa nedajú zoskupiť do týchto troch podskupín, a preto ich označujeme ako iné chimérické AGP (Ma *et al.*, 2017). Počet možností, ktorými sa odlišujú od klasických môže byť naozaj niekoľko, patria sem napríklad AGP chudobné na hydroxyprolín, na cysteín bohaté AGP

či AGP bohaté na asparagín (Baldwin *et al.*, 1993; Mau *et al.*, 1995; Du *et al.*, 1996). Okrem klasických a chimérických AGP niektorí zástupcovia zdieľajú charakteristiky ako AGP, tak aj extenzínov (EXT) a tých označujeme ako hybridné AGP/EXT (HAE) (Showalter *et al.*, 2010).

### 2.3.2.2 Sacharidová zložka

Sacharidová časť je zvyčajne vo forme polysacharidových reťazcov typu II AG. Tento typ II AG obsahuje kosťru z jednotiek (1→3)-β-D-galaktopyranózy, ktorá je najčastejšie O-glykozidicky pripojená na proteínovom jadre. Postranné reťazce (1→6)-β-D-galaktanu sú pripojené na atóm C6 niektorého z galaktozylových rezíduí kosťru. Tieto postranné reťazce sú väčšinou zakončené rezíduami arabinofuranózy (Araf), ramnopyranózy (Rhap) a galaktopyranózy (Galp), čo formuje neutrálny glykánový reťazec. Niektoré AG (napr. nájdené v arabskej gume) sú bohaté na glukurónovú kyselinu (alebo jej 4-O-metyléter), ktoré reťazce primárne ukončujú, a teda dávajú molekule celkový negatívny náboj. Natívne AG reťazce môžu mať veľkosť od 2 do 25 kDa (t.j. približne 30 – 120 rezíduí cukrov). Okrem AG reťazcov proteínovú kosťru niektorých AGP zdobia arabinoooligosacharidy (arabinozidy) (Qi *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 2002)

Sacharidové časti (AG/Ara-oligosacharidy) sú na proteínovú kosťru pripojené zvyčajne O-glykozidicky cez Hyp rezíduá. Hypotéza susediacich Hyp rezíduí (Kieliszewski a Lamport, 1994; Kieliszewski *et al.*, 1995) predpovedá, že bloky susediacich Hyp rezíduí (napr. Ser-Hyp<sub>3</sub>) sú arabinozylovanné oligoarabinozidmi, zatiaľ čo nesusediace Hyp rezíduá (napr. X-Hyp-X-Hyp) sú substituované AG polysacharidovými reťazcami. Hypotézu susediacich Hyp rezíduí potvrdila aj expresia hlavného AGP rajčiny (*Lycopersicon esculentum*), LeAGP-1, v tabaku (*Nicotiana tabacum*) (Zhao *et al.*, 2002). Okrem klasického pripojenia cez Hyp boli u AGP demonštrované aj pripojenia cez Ser a Thr rezíduá. Galaktozyl-O-Ser väzba bola ohlásená u AGP listov *Cannabis sativa* (Hillestad *et al.*, 1977) a reďkovky (Tsumuraya *et al.*, 1984a). V AGP zo semienok reďkovky (Tsumuraya *et al.*, 1987) a hroznových bobúľ (Saulnier a Brillouet, 1989) boli nájdené neidentifikované glykozylové rezíduá pripojené na Thr rezíduá.

Na rozdiel od dobre charakterizovanej O-glykozylácie je N-glykozylácia pomerne zriedkavá. N-glykozylácia je prítomná len v prípade, že proteínová kosťra obsahuje predpokladanú konzervovanú sekvenciu Asn-Xaa-Ser/Thr, kde Xaa môže byť každá aminokyselina okrem Pro (Lerouge *et al.*, 1998). Klasické AGP túto sekvenciu

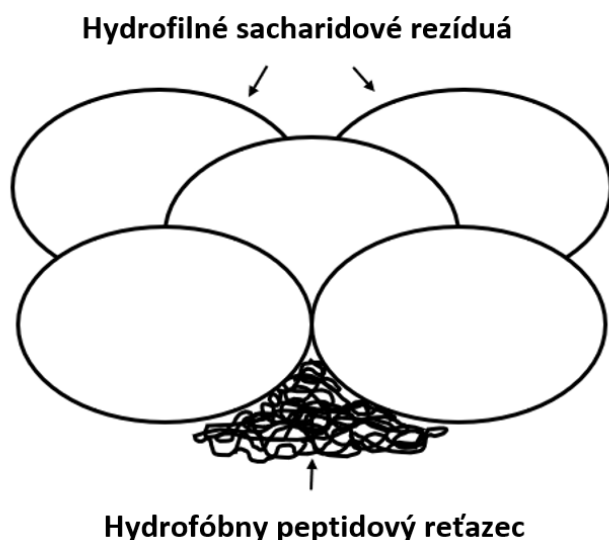
neobsahujú, avšak nachádza sa v mnohých chimérických AGP, napr. v AtFLA7 (Johnson *et al.*, 2003a) a v GaRSGP (Gal-rich stylar glycoprotein) (Sommer-Knudsen *et al.*, 1996).

### 2.3.2.3 GPI-kotva

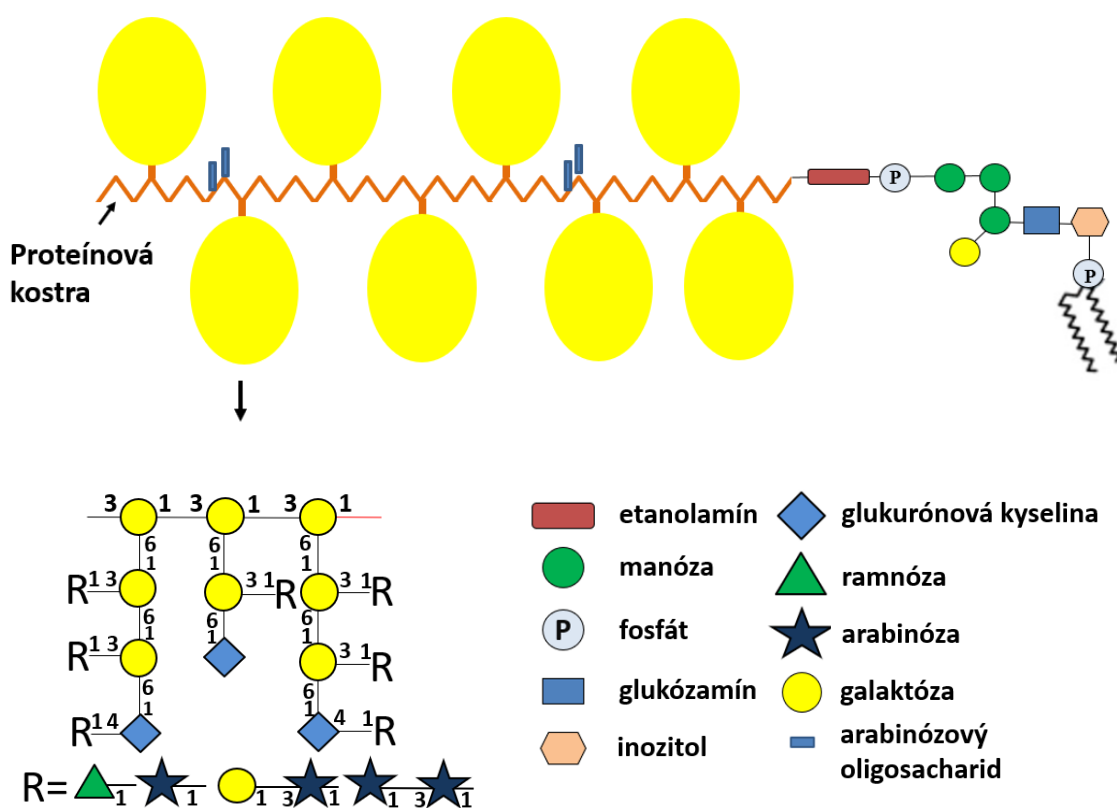
Sekvencovanie GPI kotvy z hrušky (*Pyrus communis*; Oxley a Bacic, 1999) ukázalo podobné štruktúrne motívy ako u všetkých eukaryotických GPI kotiev. C-koniec proteínového jadra je pripojený cez fosfoetanolamín na  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcNH<sub>2</sub>-oligosacharid, ktorý je pripojený na inozitolfosfoceramid (Obr. 5). Približne polovica z AGP obsahovala substituovanú Galp na C(O)4 na treťom rezíduu manózy, čo je nová štruktúra v porovnaní s inými GPI kotvami v rastlinnom kráľovstve. Ďalšou anomáliou bolo, že fosfoceramid bol zložený predovšetkým z fytosfingozínu a tetrakosanovej kyseliny (Oxley a Bacic, 1999).

### 2.3.2.4 Terciárna štruktúra

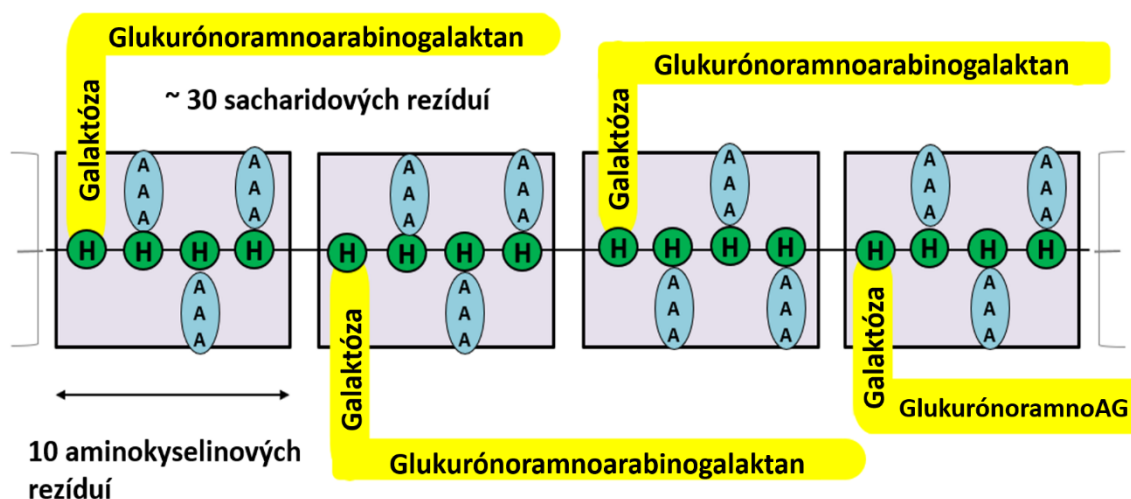
Na základe transmisnej elektrónovej mikroskopie bolo ukázané, že niektoré AGP sú globulárne, zatiaľ čo iné tyčinkovité molekuly. S týmito pozorovanými tvarmi korešpondujú dva modely „wattle blossom“ (Obr. 5) (Finsher *et al.*, 1983) a „twisted hairy rope“ model (Obr. 6) (Qi *et al.*, 1991). „Wattle blossom“ model zobrazuje polysacharidové reťazce zbalené do globulárneho tvaru klobka, ktoré sú naviazané na proteínovú kostru, čo celkovo vytvára sféroidný tvar. „Twisted hairy rope“ model predpokladá zarovnanie (stabilizáciou vodíkovými väzbami) AG reťazcov pozdĺž osy proteínovej kostry, čo tvorí molekulu ~ 150 nm dlhú s priemerom ~ 5 nm. Oba modely môžu byť správne, pretože rôzne AGP môžu mať odlišné tvary molekúl. Použitie priameho TEM zobrazenia AGP v mrkvovej kultúre (Baldwin *et al.*, 1993) či špecifických glykoproteínov (patriacich do rodiny AGP) z tabaku (Cheung *et al.*, 1995) poukazujú na skôr elipsoidné než tyčinkovité štruktúry, zatiaľ čo GAGP mal tvar tyčinky (Qi *et al.*, 1991). Tyčinkovité molekuly nie sú v súlade s rozptylom svetla a vizkozimetrickými dátami, ktoré naznačujú skôr kompaktné štruktúry (Al-Assaf *et al.*, 2005a; Flindt *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2005), avšak ich vysvetľujú ako môžu niektoré AGP penetrovať cez póry (4 – 5 nm) v primárnej stene. Počítačové modelovanie údajov NMR a kompozičné štúdie syntetického AGP z tabakových buniek BY2 odhalilo, že objemné bočné reťazce AG skutočne vytvárajú vodíkové väzby s polypeptidom, avšak omnoho zložitejším spôsobom ako sa pôvodne predpokladalo (Tan *et al.*, 2004).



Obr. 4 Schématická ilustrácia štruktúry frakcie 2 arabskej gummy. Štruktúra prezentuje tzv. „wattle blossom“ model navrhnutý pre AGP (Fincher *et al.*, 1983) s piatimi veľkými sacharidovými blokmi ( $M_w$  (bloku)  $\sim 2 \times 10^5$  Da) pripojenými na polypeptidový reťazec. (Prebrané a upravené podľa Randall *et al.*, 1989).



Obr. 5 „Wattle blossom“ model štruktúry AGP s GPI-kotvou. Tento model predpokladá približne 25 Hyp rezíduí, z ktorých väčšina nie je susediacich, a teda sa predpokladá, že budú niesť AG reťazce (typ II). V štruktúre sa môže nachádzať aj pár susediacich Hyp rezíduí nesúcich krátke arabinooligosacharidy. Celá molekula má sférický (gul'ovitý tvar). Štruktúra GPI-kotvy je pochádza z PcAGP1 hrušky (*Pyrus communis*; Oxley a Bacic, 1999). Tento model je modifikovaný od Fincher *et al.*, 1983. (Prevzaté a upravené od Ellis *et al.*, 2010).



Obr. 6 Twisted hairy rope model štruktúry GAGP („gum arabic glycoprotein“). Hypotetický blok o veľkosti 7 kDa obsahuje: 10 rezíduí aminokyselín (1 kDa), 30 rezíduí sacharidov (4,4 kDa) a tri Hyp-triarabinosidy (1,32 kDa). Glukurónoramnoarabinogalaktan tvorí galaktanová kostra s postrannými reťazcami obsahujúcimi arabinózu, rammózu a glukurónovú kyselinu. Tento model navrhol Qi *et al.*, (1991).

### 2.3.3 Funkcie AGP u rastlín

Široké spektrum úloh v mnohých biologických procesoch vyplýva z neuveriteľnej rozmanitosti glykánových a proteínových reťazcov, ako aj z tkanivového umiestnenia či zakotvenia v plazmatickej membráne pomocou GPI kotvy. Pokusy *in vitro* s rôznymi druhmi rastlín odhalili zapojenie AGP v mnohých procesoch ich vývoja, ako sú somatická embryogenéza (van Hengel *et al.*, 2002), rast a vývoj koreňov (van Hengel a Roberts, 2003), hormonálna odpoveď (Park *et al.*, 2003), signalizácia (Schultz *et al.*, 1998), diferenciácia xylému (Motose *et al.*, 2004), rezistencia voči infekcii *Agrobacterium tumefaciens* (Gaspar *et al.*, 2004), iniciácia samičej gametogenézy (Acosta-Garcia a Vielle-Calzada, 2004), odolnosť voči soli (Shi *et al.*, 2003; Lampport *et al.*, 2006), rast buniek (Lee *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007), programovaná bunková smrť (Gao a Showalter 1999; Chaves *et al.*, 2002) a vývoj peľových zŕn (Pereira *et al.*, 2006; Levitin *et al.*, 2008; Coimbra *et al.*, 2009). Nedávny výskum ukazuje vplyv AGP arabskej gummy na proces androgenézy a regeneráciu buniek v kultúre jačmeňa (Makowska *et al.*, 2017).

Keď uvažujeme o funkciách AGP, dôležitú úlohu hrá prítomnosť GPI kotvy. U rastlinných buniek sú však na rozdiel od buniek cicavcov priame medzibunkové interakcie medzi GPI-zakotvenými proteínmi nepravdepodobné kvôli hrúbke steny, ktorá je odhadnutá asi na 100 nm pre primárnu stenu (Lampport *et al.*, 2006). GPI-zakotvené

AGP a/alebo ich rozpustné formy však môžu interagovať s plazmaticky viazanými kinázovými receptormi a rozpustné formy môžu interagovať s receptormi susedných buniek, čo naznačuje je zapojenie do signálnych dráh (Schultz *et al.*, 1998).

### **2.3.3.1 Zapojenie AGP v procese androgenézy**

Androgenéza je alternatívna vývojová cesta, ktorá vedie k tvorbe rastlín s haploidným počtom chromozómov z mikrospór. Pod vplyvom exogénneho stresu mikrospóry zmenia svoj vývoj z gametickej na sporofytickú „cestu“. Výsledkom tohto preprogramovania sú haploidné (n) androgénne štruktúry, ktoré sa môžu po spontánnom či indukovanom zdvojení chromozómov vyvinúť do dihaploidných rastlín (2n) (Touraev *et al.*, 1997).

Pozitívny efekt AGP z arabskej gummy v procese androgenézy bol demonštrovaný u jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) na prašníkovej kultúre (Makowska *et al.*, 2017). V tejto štúdií došlo po exogénnej suplementácii AGP k 6,6-krát vyššej regeneračnej rýchlosti rastliny z prašníkovej kultúry oproti štandardným protokolom. Tak sa zdá, že tento efekt je výsledkom viacerých udalostí v priebehu androgenického procesu. Pridanie arabskej gummy znížilo úmrtnosť buniek, zvýšilo frekvenciu mitotického delenia mikrospór a počet viacbunkových štruktúr (MCS, „multicellular structures“) v porovnaní s kontrolou. Pozitívny efekt gummy spočíval tiež v znížení času potrebného pre indukciu androgenézy a zlepšení kvality formovaných embryí.

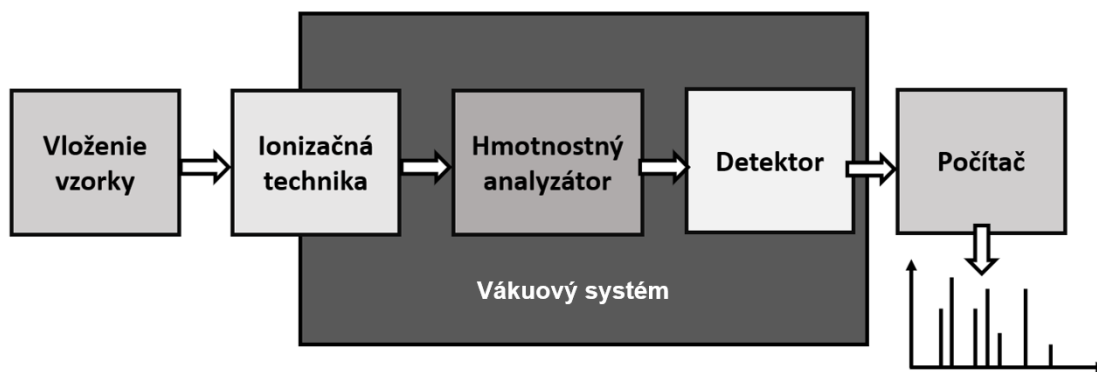
## 2.4 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria (MS, „mass spectrometry“) je fyzikálne-chemická metóda založená na interakcii nabitých častíc s elektrickým alebo magnetickým poľom vo vákuu (Friedecký a Lemr, 2012). Základný princíp MS je generácia iónov z anorganických alebo organických molekúl, separácia týchto iónov na základe ich pomeru hmotnosť/náboj ( $m/z$ ) a kvalitatívna i kvantitatívna detekcia podľa ich príslušných hodnôt  $m/z$  a množstva (Gross, 2004). V porovnaní s inými analytickými technikami medzi jej hlavné výhody patrí vysoká citlivosť, nízke detekčné limity, rýchlosť a široké spektrum možného využitia (de Hoffmann a Stroobant, 2007). MS je nepostrádateľnou analytickou technikou v oblasti proteomiky ako metóda identifikácie, charakterizácie a kvantifikácie proteínov (Dvořáková *et al.*, 2014). Veľmi efektívne techniky pre analýzu zložitých zmesí organických látok vznikli spojením MS s plynovou chromatografiou (Gohlke, 1959) a s kvapalinovou chromatografiou (Baldwin a McLafferty, 1973). V súčasnej dobe sa používa niekoľko technických prevedení, všetky hmotnostné spektrometre sa však skladajú z troch základných častí – iónový zdroj, analyzátor a detektor častíc (Obr. 7).

### 2.4.1 Iónové zdroje

Iónový zdroj je časť hmotnostného spektrometra, v ktorej dochádza k ionizácii vzorky – prevedenie neutrálnych molekúl na nabité ióny (Gross, 2004). Vo všeobecnosti ich môžeme rozdeliť do dvoch skupín na základe množstva dodanej energie pri ionizácii na tzv. „mäkké“ a „tvrdé“. Pri použití tvrdých ionizačných techník je množstvo dodanej energie dostatočne veľké, aby sa z neutrálnej molekuly vytvoril ión a vzniknuté ióny sa ďalej štiepili, čoho výsledkom je vznik bohatých fragmentačných spektier umožňujúcich identifikáciu analyzovanej zlúčeniny. Prílišná fragmentácia však môže spôsobiť úplný rozpad molekulového iónu v zdroji, čím dôjde k strate informácie o molekulovej hmotnosti (Friedecký a Lemr, 2012). Pretože sú peptidy a proteíny tepelne relatívne nestabilné molekuly, veľký význam malo v proteomike zavedenie mäkkých ionizačných techník, techniky elektrospreja (ESI, „electrospray ionization“) (Fenn *et al.*, 1989) a desorpčnej ionizácie vzorky laserom za účasti matrice (MALDI, „matrix-assisted laser





Obr. 7 Základná schéma hmotnostného spektrometra. (Prevzaté a upravené podľa Vidová *et al.*, 2008).

desorption ionization“) (Tanaka *et al.*, 1987; Karas a Hillenkamp, 1988), ktoré vzhľadom k ich relatívnej jemnosti dovoľujú ionizáciu proteínov a v podstate všetkých biomolekúl bez nadmernej fragmentácie, a teda sú tvorené prevažne ióny molekúl (Friedecký a Lemr, 2012).

V prípade ESI je vzorka rozpustená v rozpúšťadle a roztok analytu prechádza cez kapiláru, ktorá je udržiavaná pod vplyvom vysokého elektrického napätia (2 – 6 kV). Na konci kapiláry dochádza k akumulácii náboja, čím sa povrch stáva nestabilným a deformuje sa. Roztok je následne rozstrekaný kapilárou do priestoru s atmosférickým tlakom vo forme vysoko nabitých kvapôčok (aerosól). Sprejovanie je podporené koaxiálne prúdiacim zmlžujúcim plynom (napr. dusík), ktorý obteká sprejovaciú kapiláru. Rozpúšťadlo je z nabitých kvapôčok behom veľmi krátkeho času postupne odparované (obvykle prúdom plynu o zvýšenej teplote), čím sa zvyšuje ich povrchový náboj (Ho *et al.*, 2003) a dôjde k ich popraskaniu (coulombické štiepenie). Uvoľnené ióny sú následne elektrickým poľom urýchlené k analyzátoru (Banerjee a Mazumdar, 2012).

Pri technike MALDI je v prvom kroku vzorka zmiešaná s matricou (obvykle organická kyselina), ktorá ľahko absorbuje energiu laseru, a nechá sa zaschnúť. Analyt s matricou po zaschnutí vytvorí kryštalickú štruktúru (de Hoffmann a Stroobant, 2007). Ako matrica sa v proteomike obvykle používa  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyškoricová kyselina, 3,5-dimetoxi-4-hydroxyškoricová kyselina alebo 2,5-dihydroxybenzoová kyselina. Vykryštalizovaná zmes je na MALDI doštičke ožiarená laserovými pulzmi (Busch, 1995), v dôsledku čoho dochádza k excitácii matrice, ktorá spôsobí zahriatie molekúl, ich desorpciu a prevedenie do plynnej fázy. Odparujúce sa častice matrice so sebou strhávajú molekuly analytu. Excitované molekuly matrice súčasne ionizujú a predávajú náboj

analytu. Celý proces prebieha vo vákuu, aj keď je táto ionizácia realizovateľná aj za atmosférického tlaku (Friedecký a Lemr, 2012).

## 2.4.2 Hmotnostné analyzátory

Kľúčovou súčasťou hmotnostného spektrometra je analyzátor, v ktorom dochádza v prostredí vákua k separácii iónov na základe pomeru hmotnosti ku náboju ( $m/z$ ). Delenie iónov je založené na rôznych fyzikálnych princípoch, všetky však používajú elektrické (statické či dynamické) alebo magnetické pole, prípadne ich kombinácie. Existuje niekoľko typov hmotnostných analyzátorov, pričom tieto analyzátory môžu pracovať samostatne alebo v tzv. tandeme (Makarov, 2000; Aebersold a Mann, 2003). Ako prvý typ môžeme vyčleniť skenujúce analyzátory, ktoré súvisle v čase separujú a prepúšťajú ióny s určitou hodnotou  $m/z$  (kvadrupólové analyzátory). Pri druhom type analyzátorov sa presúvajú do letovej trubice všetky ióny súčasne a pre ich separáciu sa využíva rozdielny čas letu k detektoru (analyzátor doby letu – TOF). Medzi tretí zaradíme analyzátory, ktoré rozdeľujú ióny podľa ich  $m/z$  rezonančnej frekvencie (Dvořáková *et al.*, 2014; Friedecký a Lemr, 2012). Patria sem analyzátory zachytávajúce ióny v cele či pasci (iónové pasce, iónová cyklotrónová rezonancia – ICR) alebo elektrostatická iónová pasca (Orbitrap).

## 2.4.3 Detekcia a spracovanie signálu

Ióny sú po separácii v hmotnostnom analyzátore zaznamenané detektorom, kde prebieha premena energie prichádzajúcich častíc na využiteľný signál, ktorý je prevedený do digitálneho formátu. Obvyklé detektory sú tzv. elektrónové násobiče, ktoré obsahujú sadu dynód. Pri náraze iónu do prvej dynódy dôjde k emisii elektrónu, ktorý dopadom na ďalšiu dynódu vyrazí ďalšie elektróny. Vzniká elektrický prúd, ktorý je sériou dynód postupne zosilovaný. Elektrický prúd sa následne meria a je úmerný množstvu dopadnutých iónov na detektor (de Hofman a Stroobant, 2007, Ekman *et al.*, 2009). Iné detektory detekujú elektrický prúd priamym dopadom iónov (napr. Faradayova klietka) (Dass, 2007). Zvláštnu skupinu detektorov tvoria Orbitrap a ICR. U nich sú všetky ióny detekované vďaka indukcii prúdu v dôsledku oscilácie iónov v analyzátore. Frekvencia iónov o rôznej veľkosti  $m/z$  je spracovaná Fourierovou transformáciou a prevedená na hmotnostné spektrum (Dastyeh *et al.*, 2012; Friedecký a Lemr, 2012). Ióny zachytené na detektore generujú signál zaznamenávaný počítačovým systémom, ktorý zobrazuje signály (píky) v podobe hmotnostného spektra. Hmotnostné spektrum je dvojrozmerné

znázornenie intenzity (početnosť iónov, os y) v závislosti na hodnote  $m/z$  analyzovaných iónov (os x) (Gross, 2004). Vo väčšine hmotnostných spektier je početnosť iónov vyjadrená v percentách ako relatívne množstvo vzhľadom k základnému píku. Ako základný pík sa označuje pík iónu s najvyššou intenzitou v spektre (100 % relatívna intenzita). Dáta získané v oblasti hmotnostnej spektrometrie sú najčastejšie vyhodnocované s využitím proteínových databáz, ktoré je možné prehľadávať s využitím rôznych algoritmov a softwarových nástrojov za účelom identifikácie konkrétneho proteínu.

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál a metódy

#### 3.1.1 Chemikálie

- 2-jódacetamid (IAA) ( $\geq 99\%$  Sigma-Aldrich, USA)
- 2-merkaptóetanol ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- 4-chlór-1-naftol ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Švajčiarsko)
- acetonitril ( $\geq 99,9\%$ , Merck, Nemecko)
- akrylamid (AA) ( $\geq 99,9\%$ , Bio-Rad, USA)
- Bio-Safe Coomassie Stain G-250 (Bio-Rad, USA)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 ( $M_r = 854$ ,  $C_{47}H_{48}N_3O_7S_2-Na$ , Serva, Nemecko)
- dihydrogénfosforečnan amónny ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- dihydrogénfosforečnan draselný ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- DL-ditiotreitol (DTT) ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- dodecylsírán sodný ( $\geq 99,5\%$ , Serva, Nemecko)
- hovädzí sérový albumín (BSA, Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- glycín ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- guajakol (Sigma-Aldrich, Čína)
- hydrogénfosforečnan draselný ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Španielsko)
- hydrogénuhličitan amónny ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- hydroxid sodný ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyškoricová (HCCA) ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- kyselina bicínchónínová (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina chlorovodíková ( $\geq 35\%$ , Lach-ner, ČR)
- kyselina octová ( $\geq 99\%$ , Lach-ner, ČR)
- kyselina trifluóroctová (TFA) ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- Laemmliho pufr 2x koncentrovaný ( $\geq 98\%$ , Bio-Rad, USA)
- metanol ( $\geq 99,9\%$ , Merck, Nemecko)
- *N,N,N',N'*-tetrametyletyléndiamín (TEMED) ( $\geq 99\%$ , Merck, Nemecko)
- *N,N'*-metylénbisakrylamid (BIS) ( $\geq 99,9\%$ , Invitrogen, VB)

- *n*-butanol (≥ 99,5%, Merck, Nemecko)
- *n*-propanol (≥99,9%, Merck, Nemecko)
- peroxid vodíka 3 % (Coopharma, Praha)
- chrenová peroxidáza (Fluka Analytical, Švajčiarsko)
- peroxidisíran amónny (APS) (≥ 98%, Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- SOLu - trypsín (≥ 99%, Sigma-Aldrich Chemie, USA)
- tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris) (≥ 99,8%, MP Biomedicals, Francúzsko)
- močovina (Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- *N, N'*-Bis-(akryloyl)-cystamín (Merck, Nemecko)
- kyselina trihydrogénfosforečná (Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- amfolyty-Pharmalyte pH 3 – 10 (Sigma-Aldrich, Švédsko)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- chlorid sodný (≥ 99%, Sigma-Aldrich, USA)
- Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color (Bio-Rad, USA)

### 3.1.2 Prístroje

- analytické váhy (Radwag, Poľsko)
- centrifúga Ministar (Eppendorf, Nemecko)
- digitálny pH meter (Multical WTW, Nemecko)
- elektromagnetické miešadlo (IKA LAB, Nemecko)
- hmotnostný spektrometer MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker Daltonik, Nemecko)
- kvapalinový chromatograf Biologic Duoflow™ Medium-Pressure Chromatography systém (FPLC, BioRad, USA)
- kvapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Nemecko)
- laminárny box (Merci, ČR)
- peristaltické čerpadlo PCD 1082 (VWR, ČR)
- skener ImageScanner II so softwarom LabScan 5.0 (Amersham Biosciences, USA)
- spektrofotometer Lightwave II (Biochrom, Veľká Británia)
- termostat Thermomixer comfort (Eppendorf, Nemecko)
- trepačka KS 130 control (IKA Werke, Nemecko)
- ultrazvuková lázeň K2-L (Kraintek, ČR)

- UV-Vis chromatografický detektor Bilogic QuadTec™ (BioRad, Nemecko)
- vákuová centrifúga Concentrator plus (Eppendorf Nemecko)
- centrifúga LC 31R Multispeed (Thermo Electron Corporation)
- VB vákuový koncentrátor (Eppendorf, Nemecko)
- vodná lázeň digitálna SUB 6 (p-Lab, ČR)
- vortex (Chromservis, ČR)
- výveva (KNF LABOPORT, Francúzsko)
- zariadenie pre elektroforézu Mini Protean II (Bio-Rad, USA)
- zdroj pro elektroforézu EPS 600 (Amersham Pharmacia Biotech, Švédsko)

### **3.1.3 Biologický materiál**

- Gum arabic from acacia tree branched polysaccharide, Sigma; ďalej GA-S
- Guma arabska suszona rozpylowo, Pharma-Cosmetic, Fagron (Poľsko); ďalej GA-F
- Guma arabska, pre kozmetiku (Poľsko), ďalej GA-C

### **3.1.4 Ostatný materiál**

- dialyzačné celulózové črevo, priemer 25 a 100 mm (Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- MALDI doštička MTP AnchorChip 800-384 (Bruker Daltonik, Nemecko)
- MALDI doštička MSP AnchorChip 600/96 (Bruker Daltonik, Nemecko)
- pipetovacie špičky ZipTip C18 (Merck Millipore, USA)
- chromatografická kolóna Enrich™ SEC 650 10 x 300 mm (Bio-Rad, USA)
- chromatografická kolóna 10 x 30 mm (Sigma-Aldrich, USA) naplnená stacionárnou fázou Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare, Švédsko)
- chromatografická kolóna Enrich™ Q 5 x 50 mm (Bio-Rad, USA)
- centrifugačný filter Amicon Ultra-4 (Merck Millipore, USA)
- centrifugačný filter Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, USA)

### 3.1.5 Použité metódy

#### 3.1.5.1 Príprava roztokov arabskej gummy

Roztoky arabskej gummy boli pripravené rozpustením 0,5 g (5 % (w/v) roztok) a 1 g (10 % (w/v) roztok) gummy v destilovanej vode v konečnom objeme 10 ml roztoku. V našej práci boli používané 3 vzorky arabskej gummy: arabská guma od firmy Sigma (GA-S), arabská guma pre farmaceutiku (GA-F) a arabská guma pre kozmetiku (GA-C). Každá vzorka bola dialyzovaná samostatne oproti 2 l destilovanej vody cez noc v chladovej miestnosti. Dialýza je separačná technika, pri ktorej dochádza k oddeleniu látok s odlišnou molekulovou veľkosťou v roztoku cez polopriepustnú (semipermeabilnú) membránu na základe koncentračného spádu. Dialýza v biochémií umožňuje ľahké oddelenie solí od proteínov a vysokomolekulárne látky zbavuje nízkomolekulárnych nečistôt. Dialyzovaný roztok bol následne centrifugovaný 20 minút pri 10 000 g a 4 °C. Odobratím supernatantu do novej skúmavky boli vzorky pripravené na ďalšie použitie.

#### 3.1.5.2 BCA metóda

Na stanovenie celkovej koncentrácie proteínov bola použitá spektrofotometrická metóda využívajúca kyselinu bicínchonínovú (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Metóda je založená na alkalickéj redukcii meďnatého iónu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) na meďný ( $\text{Cu}^+$ ) proteínom (resp. peptidovou väzbou) a následnej chelatacii meďného iónu kyselinou bicínchonínovou. Redukované množstvo  $\text{Cu}^{2+}$  je úmerné množstvu proteínu prítomného v roztoku. Každý  $\text{Cu}^+$  ión chelatujú 2 molekuly BCA, čo spôsobuje zmenu farby zo zelenej na fialovú so silnou absorbanciou pri 562 nm.

Pracovný roztok bol pripravený zmiešaním činidla A (disodná soľ kyseliny BCA,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , vínian sodný, NaOH,  $\text{NaHCO}_3$ ) a činidla B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) v pomere 50:1. Ako štandard bol použitý BSA o koncentrácii 1 mg/ml. Kalibračná rada bola vytvorená zmiešaním 2 ml pracovného roztoku a príslušného množstva 1 mg/ml BSA (5 až 50  $\mu\text{l}$ ). Vzorky proteínov vznikli zmiešaním 2 ml pracovného roztoku a 10  $\mu\text{l}$  roztoku vzorky arabskej gummy. Nasledovala inkubácia zmesi 30 minút pri laboratórnej teplote. Po ukončení doby inkubácie bola absorbancia štandardu a vzoriek zmeraná na spektrofotometri Lightwave II pri 562 nm oproti slepej vzorke (pracovný roztok).

### 3.1.5.3 Separácia GA na kolóne Sephacryl S-200 HR

Roztok arabskej gummy bol separovaný pomocou SEC s využitím Sephacryl S-200 High Resolution kolóny s použitím destilovanej vody ako mobilnej fáze. Touto technikou dochádza k separácii látok na základe rozmerov molekúl, kedy menšie molekuly prenikajú do vnútorných priestorov gélových častíc, čím sú na kolóne zadržiavané dlhšie než veľké molekuly, ktoré sú unášané prúdom mobilnej fáze a vytekajú z kolóny skôr.

Pre frakcionáciu gummy bol na kolónu nanesený 1 ml 5 % w/v roztoku GA-F, GA-S alebo GA-C. Celá separácia prebiehala pri prietokovej rýchlosti 1 ml/min, ktorá bola dosiahnutá pomocou pripojeného peristaltického čerpadla PCD 1082. Počas separácie bola sledovaná absorbanca eluátu pri 280 nm pomocou UV-1 kontrolnej a optickej jednotky a signál bol zapisovaný rekordérom REC-112 2-CH. Eluát bol zbieraný do mikroskúmaviek v 2 minútových intervaloch. Pre predstavu o množstve proteínov bola po separácii v každej frakcii zmeraná absorbanca na spektrofotometre Lightwave II pri 280 nm oproti čistej vode. Pri výpočte sme vychádzali z predpokladu, že 1 mg/ml by poskytol pri 280 nm v 1 cm kvete hodnotu absorbanca 1.0 (Thermo Fisher Scientific, 2010).

### 3.1.5.4 Elektroforéza SDS-PAGE a priebeh separácie

SDS-PAGE je názov pre elektroforézu v polyakrylamidovom gély (PAGE, „polyakrylamide gel electrophoresis“) za prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS, „sodium dodecylsulphate“). SDS je aniónaktívny detergent, ktorý nesie pomerne vysoký náboj, a preto po väzbe na bielkovinu vyrovnáva nábojové rozdiely bielkovín, ktoré sa v gély pohybujú len podľa veľkosti. Nosičom pri SDS-PAGE je polyakrylamidový gély. Pre prípravu polyakrylamidu sa používa monomér akrylamid (AA), ktorý kopolymeráciou so sieťovacím činidlom *N,N'*-metylénbisakrylamidom (BIS) vytvára základný materiál. Jedná sa o radikálovú polymeráciu, ktorá je zahájená voľnými radikálmi vzniknutými pri rozklade persíranu amónneho (APS) pôsobením svetla, pričom sa do zmesi vždy pridáva stabilizátor voľných radikálov *N,N,N',N'*-tetrametyletyléndiamín (TEMED) (Peč, 2008).

Vzorky získané pomocou SEC boli zakoncentrované na vákuovej centrifúge Speedvac pri teplote 45 °C. K odpareným vzorkám bolo pridaných 20 µl Laemmliho pufu. Zmes bola umiestnená na 10 minút do ultrazvuku, premiešaná na vortexe a 5 minút



povarená pri 100 °C. Po ochladení v ľadovej lázni boli vzorky scentrifugované a pripravené na ďalšie použitie.

Po zostrojení aparátúry pre elektroforézu boli pripravené 10 % separačné a 4 % zaostrovacie homogénne gély (Tab. 2). Zložky gélu pre separačný gél AA/BIS, Tris/HCl a destilovaná voda boli odvdzdušené 10 minút v odsávacej banke pomocou vývevy. Po odvdzdušení boli k zmesi pridané zostávajúce komponenty SDS a TEMED. Prídavkom čerstvo pripraveného roztoku APS bola zahájená polymerácia gélu. Pripravená zmes bola ihneď po premiešaní prenesená pomocou Pasteurovej pipety do priestoru medzi sklá (1 mm), približne 2 cm od horného okraja skla. Gél bol prevrstvený *n*-butanolom. Po 15 minútach polymerácie bol *n*-butanol odstránený, povrch gélu opláchnutý destilovanou vodou a vysušený pomocou filtračného papiera. Obdobným spôsobom bol pripravený zaostrovací gél, ktorý bol po naštartovaní polymerácie prídavkom roztoku APS ku komponentom prenesený pomocou Pasteurovej pipety medzi sklá na už zpolymerovaný separačný gél. Do gélu bol vložený 10-jamkový hrebienok. Po naliatí gél tuhol 30 minút. Sklá s pripravenými gélmami boli vložené do elektroforetickej komôrky a elektródové priestory boli zaliate Tris-glycínovým elektródovým pufrom. Po vybratí hrebienka bol do jamiek pomocou pipety aplikovaný proteínový štandard (7 µl) a jednotlivé pripravené vzorky frakcií (20 µl). Proteínový štandard bol použitý Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 130 V približne 90 minút. Akonáhle vzorky doputovali ku spodnému okraju bola elektroforéza ukončená, gély boli opláchnuté destilovanou vodou a prenesené do farbiacej zmesi.

Tab. 2 Objemy chemikálií pre prípravu separačných a zaostrovacích gélov

Zložka	Separací gél (10 %)	Zaostrovací gél (4 %)
AA + BIS (30 % T, 3,3 % C)	3,4 ml	0,65 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
Destilovaná voda	3,8 ml	2,95 ml
SDS (10%)	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,050 ml	0,050 ml
APS (10%)	0,05 ml	0,06 ml

### 3.1.5.5 Farbenie gélov po SDS-PAGE

Po ukončení elektroforézy boli gély prenesené do farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 do Petriho misiek, kde boli ponechané cez noc pri miernom trepaní. Princíp farbenia spočíva vo väzbe molekúl proteínov na CBB v kyslom prostredí. Za túto väzbu sú zodpovedné primárne zásadité aminokyseliny (arginín, lyzín a histidín) proteínov. K väzbe farbiva na proteín prispievajú tiež Van der Waalsove sily a hydrofóbne interakcie (Wrolstad *et al.*, 2004). Odfarbenie gélov bolo uskutočnené roztokom obsahujúcim 5 % (v/v) metanol a 7 % (v/v) kyselinu octovú.

Ďalšie farbivo používané v tejto DP bolo Bio-Safe Coomassie Stain G-250, pri ktorom stačí na odfarbenie destilovaná voda. Po odfarbení boli gély naskenované pomocou skeneru ImageScanner II a počítačového programu LabScan 5.0.

### 3.1.5.6 Štiepenie proteínov v gély

Skalpelom vyrezané pásy boli nasekané na kocky (cca 1 mm<sup>3</sup>), prenesené do 0,5 ml mikroskúmavky a scentrifugované. K týmto kúskom bolo pridaných 180 µl odfarbovacieho roztoku 50 % acetonitrilu (ACN) v 50 mmol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a nasledovala inkubácia 45 minút. Po uplynutí doby inkubácie bola zmes odstránená a kúsky gélu boli dehydratované ACN (kúsky gélu zbeleli a držali pri sebe), scentrifugované a následne bol ACN odstránený. Pre redukciu proteínov boli kúsky gélu prekryté 150 µl roztoku 10 mmol·l<sup>-1</sup> DTT v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (7,7 mg/5 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Táto zmes bola inkubovaná 30 minút v termostate pri 56 °C za trepania. Po uplynutí doby inkubácie a vychladnutí boli eppendorfky scentrifugované, kvapalina bola odstránená a kúsky gélu boli dehydratované ACN. Alkylácia bola prevedená pridaním 150 µl 55 mmol·l<sup>-1</sup> IAA v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50 mg/5 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) a 20 minútovou inkubáciou v tme pri laboratórnej teplote. Po odpipetovaní roztoku IAA boli kúsky premyté v 150 µl 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> po dobu 15 minút, scentrifugované, kvapalina bola odstránená a kúsky dehydratované ACN. K dehydratovaným kúskom sa pridalo 40 µl pufru obsahujúceho 50 mmol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a 1,5 µmol·l<sup>-1</sup> trypsínu. Vzorky boli umiestnené na ľad (4 °C) na dobu 1 h. Prebytočný roztok trypsínu bol odobraný a nahradený 50 µl 25 mmol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Nasledovala inkubácia v termostate pri 37 °C cez noc (Shevchenko *et al.*, 2006).

### 3.1.5.7 Extrakcia peptidov

Extrakcia peptidov bola zahájená prídavkom 120  $\mu$ l extrakčného pufru (5 % kyselina mravčia/acetónitril v pomere 1:2 (v/v; Shevchenko *et al.*, 2006). Nasledovala inkubácia zmesi pri 37 °C a 1000 rpm (otáčok za minútu). Po 45 minútovej inkubácii boli vzorky scentrifugované, supernatant bol odobratý do nových 0,5 ml mikroskúmaviek a odparený na vákuovej centrifúge Speedvac pri 45 °C. Takto pripravené peptidy boli ďalej spracovávané.

### 3.1.5.8 Odsolenie peptidových vzoriek

Do odparených mikroskúmaviek s vysušenými peptidmi bolo pridaných 12  $\mu$ l roztoku 0,1 % trifluóroctovej kyseliny (TFA). Následne boli eppendorfky umiestené na 5 minút do ultrazvukovej lázne a scentrifugované. Odsolenie prebehlo pomocou pipetovacích špičiek s reverznou chromatografickou fázou ZipTip C18 v niekoľkých krokoch. Zvlhčenie sorbentu bolo uskutočnené nasatím roztoku („pre-wet“ ) obsahujúceho 50 % ACN a 0,1 % TFA do špičiek (2x). Nasledovala ekvilibrácia pomocou 0,1 % TFA (2x). Nanesenie vzorky prebehlo 15násobným nasatím roztoku peptidov do špičiek. Následne bola špička 3x premytá v ekvilibračnej zmesi. Elučný roztok obsahoval 75 % ACN a 0,1 % TFA, pričom elúcia prebehla 10násobným nasatím tohto roztoku do špičky. Takto odsolené vzorky boli odparené vo vákuovej centrifúge pri 45 °C.

### 3.1.5.9 Separácia peptidov nanoLC a MALDI-MS/MS analýza

Ako prvý krok pred spustením analýzy bolo potrebné pripraviť MALDI doštičky a odsolené peptidové vzorky. MALDI doštička bola poutieraná mokrým servítkom s 2-propanolom a ponorená do nádoby s 2-propanolom, ktorá bola vložená do ultrazvukovej lázne, kde prebiehala sonikácia po dobu 10 minút. Následne bola doštička ponorená do nádoby s roztokom TA30 (30:70 [v/v] ACN : 0.1% roztok TFA vo vode) a umiestnená do ultrazvukovej lázne na ďalších 10 minút. Nakoniec bola MALDI doštička vysušená prúdom dusíka. Odsolené a odparené vzorky peptidov boli rozpustené v 12  $\mu$ l 0,1 % TFA a na 10 minút sonikované v ultrazvukovej lázni. Po rozpustení bol celý objem prepipetovaný do sklenených vialiek určených na separáciu peptidov na kvapalinovom chromatografe Dionex UltiMate 3000 RSLCnano.

Pred samotnou separáciou boli vzorky dávkované na predkolónu Acclaim PepMap 100 C18 (100  $\mu$ m x 20 mm) pomocou autosampleru v množstve 5  $\mu$ l a premývané

nanášajúcim solventom pri prietoku 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Zachytené peptidy na predkolóne boli separované na kolóne Acclaim PepMap RSLC C18 (75  $\mu\text{m}$  x 150 mm) s prietokom 300  $\text{nl}/\text{min}$ . Doba separácie činila 70 minút. Zloženie mobilných fáz bolo nasledovné: A: 0,05 % (v/v) trifluóroctová kyselina (TFA); B: 80 % (v/v) ACN/0,05 % (v/v) TFA; nanášací solvent: 2 % (v/v) ACN/0,05 % (v/v) TFA. Elúcia bola prevedená pomocou gradientu miešaním mobilných fáz A a 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. Zachytávanie eluátu bolo prevedené pomocou zberača kvapkových frakcií Proteineer FCII. Následne bol eluát zmiešaný s matricou a nanášaný na pripravenú, vyčistenú AnchorChip<sup>TM</sup> doštičku. Matrica bola pripravená zmiešaním 748  $\mu\text{l}$  95:5 (v/v) ACN/0,1 % TFA; 50  $\mu\text{l}$  saturovaného roztoku obsahujúceho HCCA rozpustenú v 90:10 (v/v) ACN/0,1 % TFA; 10  $\mu\text{l}$  10 % TFA a 10  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Pipetovanie proteínových štandardov prebehlo manuálne. Kalibračná matrica bola pripravená zmiešaním 748  $\mu\text{l}$  TA85 (85:15 [v/v] ACN: 0,1 % TFA), 50  $\mu\text{l}$  saturovanej HCCA rozpustenej v TA90 (90:10 [v/v] ACN: 0,1 % TFA), 8  $\mu\text{l}$  10 % (v/v) TFA a 8  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Z tejto zmesi bolo odobraných 300  $\mu\text{l}$ , ku ktorým boli pridané 2  $\mu\text{l}$  kalibračného štandardu Peptide Calibration Standard II. Do pozícií pre štandardy bolo pipetovaných 0,5  $\mu\text{l}$  tejto pripravenej zmesi.

Meranie bolo prevedené na hmotnostnom spektrometre ultrafleXtreme MALDI TOF-TOF. Pri analýze bol používaný na ovládanie hmotnostného spektrometra software flexControl 3.4, dáta boli spracované pomocou flexAnalysis 3.4 a na automatické merania pomocou nanoLC bol použitý software WarpLC 1.3. Každá pozícia na doštičke bola ožiarená 2500x pri frekvencii 2000 Hz. Pre meranie MS/MS spektier bolo vybraných maximálne 10 prekurzorov, pomer signálu a šumu  $> 7$ , rozmedzie  $m/z$  prekurzorov 800 – 3000, intenzita signálu  $> 800$ , minimálna  $m/z$  fragmentu  $> 250$ , faktor kvality signálu  $> 30$ . Všetky spektrá boli merané v pozitívnom móde. Namerané MS/MS dáta boli exportované do programu ProteinScape 3.1 a následne bola prehľadávaná databáza SwissProt.

### 3.1.5.10 nanoLC–ESI MS/MS analýza

ESI MS/MS analýze predchádzala rovnako ako v predchádzajúcom prípade separácia pomocou kvapalinovej chromatografie. 5 µl vzorky odsolených peptidov v 0,1 % (v/v) TFA bolo separovaných na kvapalinovom chromatografe Dionex UltiMate 3000 RSLCnano, ktorý bol spojený s hmotnostným spektrometrom – iónovou pascou amaZon speed ETD vybavenou iónovým zdrojom CaptiveSpray. Zloženie mobilných fáz bolo: A: 0,4 % (v/v) kyselina mravčia, B: 90 % (v/v) ACN/ 0,4 % (v/v) kyselina mravčia a nanášací solvent 2 % (v/v) kyselina mravčia. Prekurzory boli fragmentované kolízne indukovanou disociáciou s héliom ako kolíznym plynom. Hmotnostný spektrometer bol ovládaný softwarom trapControl 7.2 a HyStar 3.2, dáta boli spracované pomocou DataAnalysis 4.2 (všetky softwary od firmy Bruker Daltonik) a uložené vo formáte MGF. Pomocou programov ProteinScape 3.1 a PEAKS Studio 8.0 boli prehľadávaná databáza SwissProt.

### 3.1.5.11 Príprava rozpustného disulfidového gélu

Hlavný rozdiel oproti klasickému AA/BIS gélu je, že obsahuje namiesto bisakrylamidu (BIS) jeho analóg *N, N'*-Bis-(akryloyl)-cystamín (BAC). BAC vytvára reverzibilné zosieťovanie polyakrylamínového gélu, čo zjednodušuje izoláciu makromolekúl separovaných na gély. Použitím BAC je teda možné pripraviť gél obsahujúci disulfidové -S-S- väzby, ktorý je stabilný v prítomnosti atmosférického kyslíka, ale rozpustný v prítomnosti redukčného činidla, ktoré štiepi disulfidové väzby (Hansen *et al.*, 1976).

Zásobný roztok AA/BAC bol pripravený nahradením BIS za BAC mol za mol. 30 g AA a 1,35 g BAC bolo rozpustených v destilovanej vode a doplnených do objemu 100 ml podľa Hoefler (1994). Vznikol zásobný roztok monomérov AA/BAC (31,35 %T, 4,5 % C). Koncentrácie APS a TEMED boli upravené podľa Hansen *et al.*, 1980, ktorý opísali vplyv koncentrácií týchto zlúčenín na vytvorenie rozpustného gélu (Tab. 3). Po pridaní báze TEMED bolo pH upravené pomocou HCl. Na tento experiment bol pripravený 4 % zaostrovací gél a dve varianty pre separačný gél (8 % a 10 %). Vzorky GA boli pripravené separáciou 1 ml 5 %-roztoku GA-F na Sephacryl S-200 High Resolution kolóne s použitím destilovanej vody ako mobilnej fázy. Jednotlivé frakcie boli pozbierané a odparené pri 45 °C na vákuovej centrifúge. Ku vzorkám bolo pridaných 30 µl Laemmliho pufru bez 2-merkaptóetanolu, aby nedošlo k redukcii disulfidových väzieb v gély. Následne boli vzorky zvortexované, scentrifugované a zmes bola povarená

5 minút pri 100 °C. Na jamku bolo napipetovaných 20 µl tejto zmesi. Ako proteínový štandard bol použitý Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 130 V približne 90 minút. Akonáhle vzorky doputovali ku spodnému okraju bola elektroforéza ukončená, gély boli opláchnuté destilovanou vodou a prenesené do farbiacej zmesi Coomasie Bio-Safe.

Skalpelom vyrezané bandy boli nasekané na kocky (cca 1 mm<sup>3</sup>), prenesené do 0,5 ml mikroskúmavky a scentrifugované. K týmto kúskom bolo pridaných 180 µl odfarbovacieho roztoku 50 % ACN v 50 mmol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a nasledovala inkubácia 45 minút. Po odfarbení bola zmes odstránená a kúsky gélu boli premyté 10 min v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Pre redukciu disulfidových mostíkov v gély a jeho rozpustenie bolo ku gélovým kúskom pridaných 200 µl 10 mmol·l<sup>-1</sup> DTT v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (7,7 mg DTT/5 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) alebo 200 µl 100 mmol·l<sup>-1</sup> DTT v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (17 mg DTT/ 1,1 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Mikroskúmavky boli umiestené na trepačku a inkubované v zmesi 1h. Druhý spôsob prevedenia spočíval v inkubácii zmesi v termostate pri 56 °C za trepania. Následne boli vo vzorkách štiepené proteíny, ktoré boli ďalej spracovávané.

Tab. 3 Koncentrácie APS a TEMED pre vytvorenie rozpustného gélu, navrhnutá podľa Hansen *et al.*, 1980. Hodnoty pre 8% gél boli dopočítané 0,032 % APS a 2,72 % TEMED.

Gél %	3,5	5,0	7,5	10,0	12,5
APS %	0,12	0,12	0,02	0,08	0,06
TEMED %	0,08	0,25	2,0	5,6	6,1

### 3.1.5.12 Izoelektrická fokusácia (IEF)

Izoelektrická fokusácia umožňuje delenie amfoterných látok (bielkovín a peptidov) podľa ich izoelektrických bodov, tzn. podľa distribúcie kladných a záporných nábojov v ich molekulách. Elektromigrácia prebieha v prostredí gradientu pH, ktorý je vytvorený pôsobením elektrického poľa na komplexné zmesi amfolytov, ktoré tvoria nosný elektrolyt tejto metódy. Delené látky v tomto prostredí migrujú, dokiaľ nedoputujú do tej časti separačného prostredia, v ktorej je pH rovné ich izoelektrickému bodu (Kašička, 1997)

Na prípravu gélov pre natívnu izoelektrickú fokusáciu bol použitý protokol Robertson *et al.*, 1987. V kadičke boli zmiešané 2 ml zmesi akrylamidu (30 % w/v) a bisakrylamidu (1 % w/v), 7 ml destilovanej vody, 2,4 ml 50 % (v/v) glycerolu a 0,6 ml zmesi amfolytov-Pharmalyte pH 3 – 10. Po 20 minútovom odvzdušnení roztoku pomocou vákuovej odsávacej pumpy bolo pridaných 20  $\mu$ l činidla TEMED. Polymerácia bola zahájená pridaním 50  $\mu$ l roztoku 10 % (w/v) persíranu amónneho. Roztok bol rýchlo nanesený medzi vyčistené sklá, následne bol vložený hrebienok pre vytvorenie jamiek a gél polymeroval 1h. Behom priebehu polymerácie gélu boli pripravené vzorky a proteínový štandard. Príprave vzoriek pre natívnu IEF predchádzala separácia pomocou SEC na kolóne Sephacryl S-200 (podmienky totožné ako v podkapitole 3.1.5.3) a následné zahustenie jednotlivých frakcií na vákuovej rotačnej odparke pri 45 °C. Následne bolo zmiešaných 15  $\mu$ l takto pripravenej vzorky, 15  $\mu$ l 50 % (v/v) glycerolu a 2  $\mu$ l amfolytov. Štandard bol pripravený zmiešaním 10  $\mu$ l štandardu (IEF mix 3,6 – 9,3), 10  $\mu$ l 50 % (v/v) glycerolu a 1,5  $\mu$ l amfolytov. Po ubehnutí doby polymerácie boli sklá vložené do elektroforetickej komôrky. Do anódového priestoru bol naliaty anódový roztok (20 mmol·l<sup>-1</sup> kyselina octová) a do katódového priestoru katódový roztok (25 mmol·l<sup>-1</sup> NaOH). Po vytiahnutí hrebienka bolo do jednotlivých jamiek napipetovaných 5  $\mu$ l štandardu a 20  $\mu$ l vzoriek. Elektroforetická separácia prebiehala v chladovej miestnosti najskôr 1,5 hodiny pri konštantnom napätí 200 V, ďalšiu hodinu pri 400 V a nakoniec 30 minút pri 600 V.

### 3.1.5.13 Denaturačná izoelektrická fokusácia

Denaturačná izoelektrická fokusácia bola pripravená podľa Robertson *et al.*, 1987. Zmes pozostávajúca z 2,4 ml 50 % glycerolu, 2,7 ml vody, 2 ml AA/BIS, 0,6 ml amfolytu a 6 g močoviny bola odvzdušnená pomocou vákuovej odsávacej pumpy. Nasledovalo pridanie 40  $\mu$ l Triton X-100, 20  $\mu$ l TEMED a ako posledný 25  $\mu$ l 10 % (w/v) APS. Roztok bol rýchlo napipetovaný medzi vyčistené sklá, následne bol vložený hrebienok pre vytvorenie jamiek a gél polymeroval 1h. Po ubehnutí doby polymerácie boli sklá vložené do elektroforetickej komôrky. Do anódového priestoru bol naliaty anódový roztok (25 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a do katódového priestoru katódový roztok (50 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> NaOH). Príprave vzoriek pre denaturačnú IEF aj v tom prípade predchádzala separácia pomocou SEC na kolóne Sephacryl S-200 (podmienky totožné ako v podkapitole 3.1.5.3) a následné zahustenie jednotlivých frakcií na vákuovej rotačnej odparke pri 45 °C. Takto pripravené vzorky boli následne zmiešané s lyzačným pufrom (8 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> močovina, 2 % (v/v) amfolyt, 2 % (v/v) Triton X-100, 1 % (v/v)  $\beta$ -merkaptóetanol) v pomere 1:1 a nanosené do jamiek. Elektroforéza prebiehala v chladovej miestnosti 30 minút pri konštantnom napätí 150 V a následne 2,5 h pri konštantnom napätí 200 V. Po skončení elektroforézy boli gély upláchnuté v destilovanej vode a následne podrobené farbeniu.

### 3.1.5.14 Farbenie gélov po IEF

Po separácii boli gély opatrne vybraté zo skiel a vložené do 10 % (w/v) kyseliny trichlóroctovej a 10 minút ponechané na trepačke. Po inkubácii bola kyselina odstránená a nahradená 1 % (v/v) kyselinou trichlóroctovou, v ktorej boli gély ponechané cez noc na trepačke. Na druhý deň boli gély opláchnuté v destilovanej vode a následne zafarbené použitím roztoku Commassie Bio-Safe, v ktorom boli ponechané cez noc na trepačke. Na odfarbenie gélov bola použitá destilovaná voda.



### 3.1.5.15 Spojenie SEC a IEC chromatografie

Na iónovú chromatografiu bola použitá kolóna Enrich™ Q (5 x 50 mm) s pozitívne nabitou maticou – menič aniónov (anex). Kolóna bola pripojená ku kvapalinovému chromatografu Biologic Duoflow. Ekvilibrácia kolóny prebehla v 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufrí (pH = 7) a následne bolo nanosených 500 µl 5 % (w/v) roztoku GA-F zdialyzovanej oproti 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufru (pH = 7) do injekčnej slučky. Elúcia prebehla zmenou iónovej sily pufru s použitím 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufru (pH = 7) s 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl pri prietokovej rýchlosti 1 ml/min. Podľa chromatogramu, ktorý bol získaný meraním absorbancie eluátu detektorom Biologic QuadTec pri 280 nm bolo pozbieraných 7 frakcií. Separácia bola zopakovaná 10-krát, pričom jednotlivé totožné frakcie boli pospájané. Frakcie boli zakoncentrované centrifugáciou na kolóne Amicon Ultra-4 pri 4 °C a 4000 g na výsledný objem 2 ml.

Na chromatografiu v ďalšom rozmere bola použitá kolóna Enrich™ SEC 650 (10 x 300 mm), ktorá separuje biomolekuly podľa ich molekulovej hmotnosti od 5 do 650 kDa. Kolóna bola pripojená k kvapalinovému chromatografu Biologic Duoflow. Ekvilibrácia kolóny prebehla v 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufrí (pH = 7), v ktorom bola uskutočnená celá separácia. Nasledovalo delenie zahustených frakcií získaných z iónomeničovej chromatografie. Separácia každej frakcie prebehla s použitím 500 µl roztoku pri prietoku 0,75 ml/min. Podľa chromatogramu, ktorý bol získaný meraním absorbancie eluátu detektorom Biologic QuadTec pri 280 nm boli pozbierané píky z každej frakcie. Frakcie boli následne odparené na vákuovej rotačnej odparke a separované pomocou SDS-PAGE. Proteínové pásy z gélov boli vyrezané a proteíny identifikované nanoLC-ESI-MS/MS a nanoLC-MALDI-MS/MS analýzou.

### 3.1.5.16 Identifikácia peroxidázy

Identifikácia peroxidázy bola prevedená pomocou natívnej elektroforézy v polyakrylamidovom gély. K deleniu proteínov dochádza na základe ich prirodzeného náboja a veľkosti. V tomto usporiadaní nedochádza k denaturácii proteínov a k strate enzýmovej aktivity, ktorá môže byť využitá k detekcii príslušného enzýmu v gély (Káš *et al.*, 2006).

Príprava experimentu natívnej elektroforézy je obdobná ako u denaturačnej elektroforézy, avšak bez použitia SDS ako v géloch, tak aj v elektródovom pufrí. Na identifikáciu peroxidázy bol použitý 8 % separačný a 4 % zaostrovací gél (Tab. 4).

Pre optimalizáciu metódy bolo odskúšané aj prevedenie bez zaostrovacieho gélu. Elektroforéza prebiehala za použitia Tris-glycínového pufru bez SDS 1 h pri konštantnom napätí 180 V pri 4°C.

Pred samotnou PAGE separáciou boli všetky vzorky gummy (GA-F, GA-S, GA-C) podrobené rýchlej skúmkavej reakcii, kedy bol 1 ml 10 % roztoku gummy zmiešaný s 1 ml farbiaceho roztoku (zloženie farbiaceho roztoku viz nižšie). Pre porovnanie bol zmiešaný štandard 5 µl 0,1 mg/ml chrovej peroxidázy a 2 ml farbiaceho roztoku. Ku vzniku produktov v dôsledku peroxidázovej aktivity došlo iba v skúmavke so vzorkou GA-F, preto bola táto vzorka použitá pre detekciu na gély.

Spracovanie vzorky pre natívnu elektroforézu pozostávalo z prípravy 5 % roztoku GA-F, ktorý bol následne zdialyzovaný cez noc oproti čistej vode. Po centrifugácii pri 10 000 g a 4 °C bol odobratý supernatant, ktorý bol použitý na chromatografickú separáciu. Frakcionácia bola prevedená na kolóne Sephacryl S-200 HR s použitím destilovanej vody ako mobilnej fáze. Separácia bola prevedená pri rovnakých podmienkach ako uvádzame v kapitole 3.1.5.3. Frakcionácia bola prevedená 6-krát, pričom rovnaké frakcie boli spojené. Takto pospájané vzorky boli zhustené centrifugáciou (4 °C, 4000 g) pomocou filtra Amicon Ultra-4 na výsledný objem 1,5 – 2 ml. Následne bol odobratý 1 ml z každej vzorky a odparený na vákuovej rotačnej odparke. Pred samotným použitím bolo do každej eppendorky pridaných 50 µl destilovanej vody a 50 µl 50 % glycerolu. Vzorky boli zvortexované, sonifikované na ultrazvuku 5 minút a scentrifugované. Do každej jamky bolo napipetovaných 20 µl vzorky (jamky 1 – 9). Do poslednej jamky bolo napipetovaných 20 µl nefrakcionovaného zdialyzovaného roztoku 5 % roztoku GA-F.

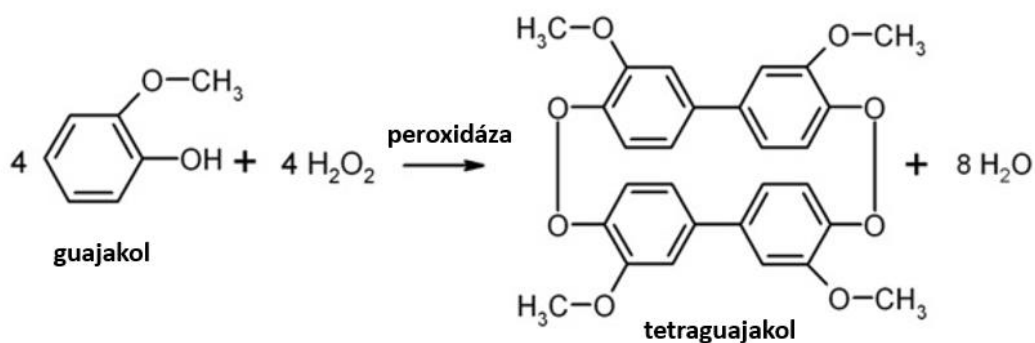
Tab. 4 Objemy chemikálií pre prípravu separačných a zaostrovacích gélov .

Zložka	Separáčny gél (8 %)	Zaostrovací gél (4 %)
AA + BIS (30 % T, 3,3 % C)	2,7 ml	0,65 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
Destilovaná voda	4,7 ml	2,95 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml
APS (10 %)	0,050 ml	0,06 ml

Detekcia enzýmovej aktivity peroxidázy v polyakrylamidových géloch bola odskúšaná farbením gélov v dvoch prevedeniach pomocou rôznych farbiacich roztokov. Po skončení elektroforézy boli gély prenesené do Petriho misiek do roztoku  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátového pufru ( $\text{pH} = 7$ ) obsahujúcom  $0,06 \%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $0,06 \text{ mg/ml}$  4-chlór-1-naftol (Zhao a Sakai, 2003), ktorý bol zahriaty na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a misky boli umiestnené na trepačku. Princíp tohto farbenia spočíva v schopnosti peroxidázy za prítomnosti peroxidu vodíka katalyzovať premenu 4-chlór-1-naftolu na modrý, nerozpustný benzo-4-chlór-cyklohexadienón. Druhý spôsob farbenia bol prevedený v roztoku  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátového pufru ( $\text{pH} = 7$ ) obsahujúcom  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  guajakol (o-metoxyfenol) (Shimoni a Reuveni, 1988), ktorý bol rovnako zahriaty na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Misky boli umiestnené na trepačku, dokiaľ nedošlo k tvorbe oranžovo-hnedého produktu – tetraguajakolu (Obr. 10).

### 3.1.5.17 Spektrometrické stanovenie peroxidázovej aktivity

Peroxidázy (EC 1.11.1.7) sú oxidoreduktázy, ktoré katalyzujú oxidáciu rôznych organických a anorganických zlúčenín, využívajúce peroxid vodíka ako akceptor elektrónov (Banci, 1997). Pre stanovenie aktivity peroxidázy je často ako donor elektrónov používaný guajakol (2-metoxyfenol). V prítomnosti peroxidázy je peroxid vodíka rýchlo rozkladaný na kyslík a vodu. Kyslík oxiduje bezfarebný guajakol na oranžovo-hnedý produkt tetraguajakol (Obr. 8) s absorpčným maximom pri  $470 \text{ nm}$ , sú však opísané aj ďalšie produkty reakcie ako 3,3'-dimetoxy-4,4'-bifenochinón (Doerge *et al.*, 1997) a iné (Tonami *et al.*, 2004). Extinkčný koeficient pre meranie produktu oxidácie guajakolu je  $4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Káš *et al.*, 2006; Petřivalský *et al.*, 2010).



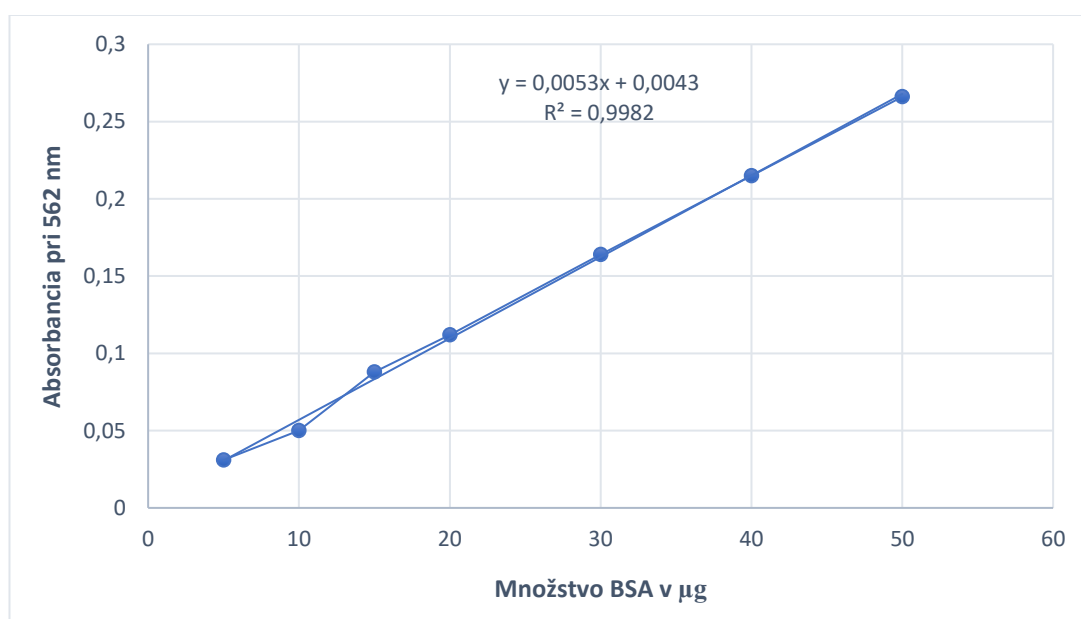
Obr. 8 Schéma peroxidázou katalyzovanej premeny guajakolu na tetraguajakol v prítomnosti peroxidu vodíka. Obrázok prebratý a upravený podľa Wilkesman *et al.*, 2014.

Na spektrofotometrické stanovenie boli pripravené zásobné roztoky  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  guajakol v  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátovom pufrí (pH = 7). Vzorok vznikli rozpustením 1 g GA (GA-F, GA-S, GA-C) v destilovanej vode a doplnením do objemu 10 ml. Vzorok boli zdialyzované cez noc oproti čistej vode, scentrifugované a supernatant bol odobratý na ďalšie spracovanie. Do 1 cm spektrofotometrickej kyvety bolo vložené elektromagnetické miešadlo pre neustále miešanie roztoku a následne bolo napipetovaných 967  $\mu\text{l}$   $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátového pufru (pH = 7), 333  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku guajakolu (výsledná koncentrácia guajakolu v kyvete  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a 500  $\mu\text{l}$  roztoku arabskej gummy. Toto zloženie roztoku nám poslúžilo ako blank. Pre zahájenie reakcie bolo pridaných 200  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$  (výsledná koncentrácia  $\text{H}_2\text{O}_2$  v kyvete  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a ihneď bolo spustené meranie. Roztoky boli pred meraním ohriate na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zmena absorbancie bola meraná pri 470 nm v 10 sekundových intervaloch v priebehu 5 minút. Látkové množstvo vzniknutého produktu bolo vypočítané pomocou Lambert-Beerovho zákona. Množstvo vytvoreného produktu pri nadbytku oboch substrátov je mierou katalytickej aktivity peroxidázy. Jednotka katal (kat) odpovedá množstvu enzýmu, ktoré katalyzuje za optimálnych podmienok premenu jedného mólu substrátu za sekundu. Špecifická aktivita (nkat/mg proteínu) daného enzýmu bola získaná podielom celkovej aktivity enzýmu v nkat/ml a koncentrácie proteínov v mg/ml. Koncentrácia proteínov v GA bola stanovená BCA metódou (viz kapitola 3.1.5.2).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Koncentrácia proteínov

Roztoky arabskej gummy vznikli rozpustením 0,5 g (5 % (w/v) roztok) a 1 g (10 % (w/v) roztok) gummy v destilovanej vode v konečnom objeme 10 ml roztoku. Vzorky boli cez noc dialyzované oproti čistej vode a v takto pripravených vzorkách bola stanovená koncentrácia proteínov pomocou spektrofotometrickej metódy s kyselinou bicínchónínovou (BCA). Hodnota koncentrácie proteínov bola vypočítaná pomocou kalibračnej priamky získanej meraním absorbancie kalibračnej rady proteínového štandardu BSA (Obr. 9). Hodnoty koncentrácie proteínov vo vzorkách sú uvedené v Tab. 5, ktorá zobrazuje priemerné hodnoty z troch meraní. Prepočet na zastúpenie proteínov (%) v jednotlivých vzorkách gummy: GA-S ~ 2,7 %, GA-F ~ 2,1 % a GA-C ~ 1,7 %. Tieto čísla boli získané z priemernej hodnoty koncentrácií proteínov v 5 % a 10 % roztoku vzťahnutých na celkovú hmotnosť gummy vo vzorkách.



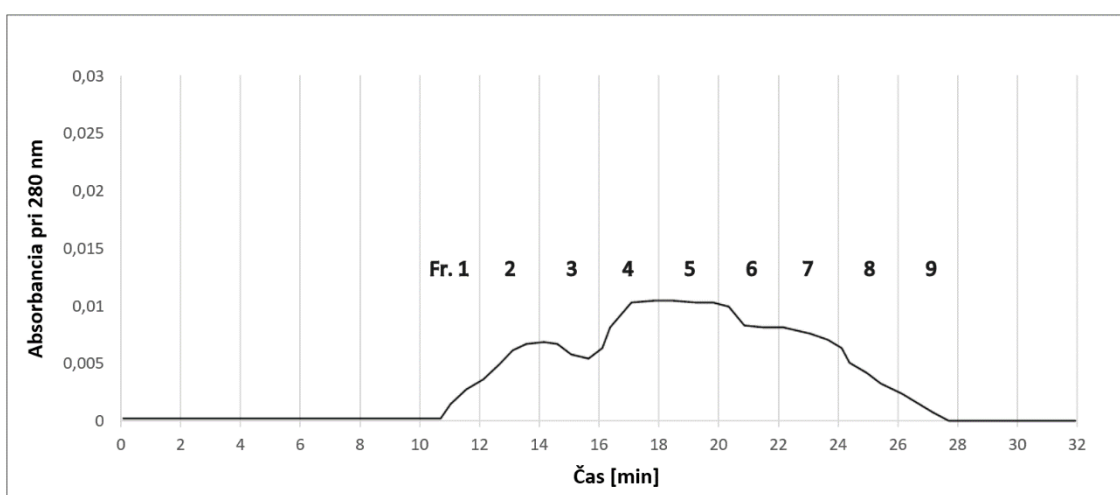
Obr. 9 Kalibračná krivka pre stanovenie koncentrácie metódou BCA.

Tab. 5 Koncentrácia proteínov vo vzorkách arabskej gummy

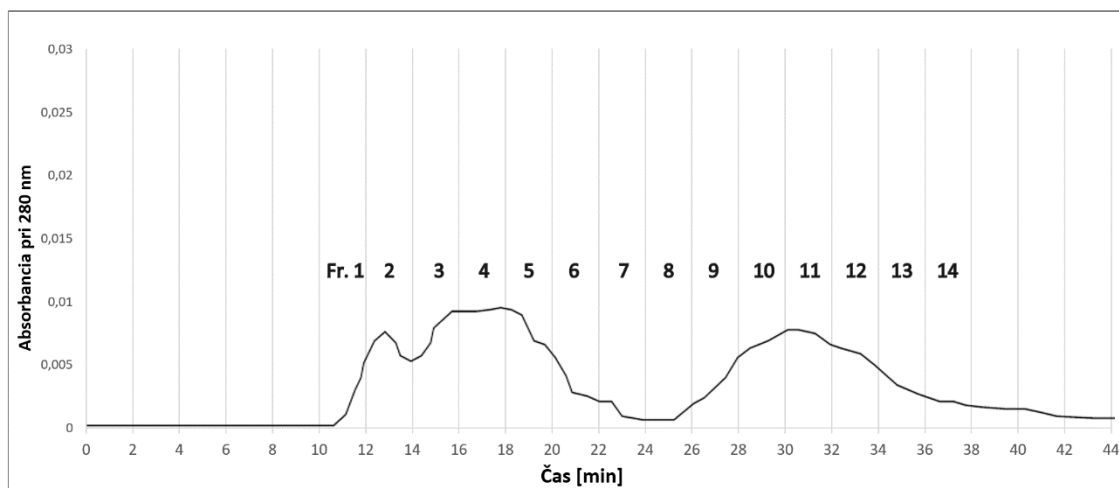
	GA-S (mg/ml)	GA-F (mg/ml)	GA-C (mg/ml)
5 % roztok	1,41 ± 0,07	1,03 ± 0,08	0,82 ± 0,04
10 % roztok	2,66 ± 0,10	2,14 ± 0,09	1,71 ± 0,13

## 4.2 Separácia GA pomocou SEC

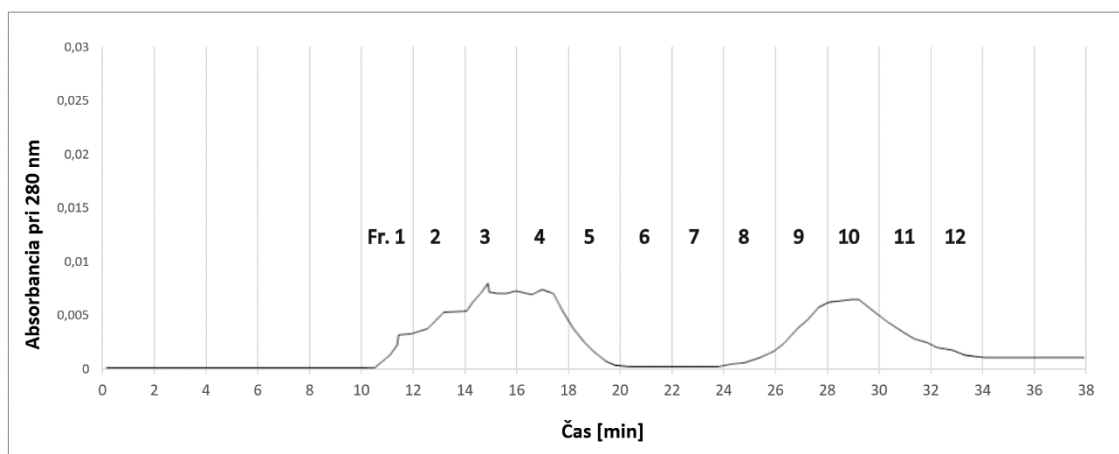
Pre frakcionáciu arabskej gummy bol na kolónu nanosený 1 ml 5 %-tného roztoku GA-F, GA-S alebo GA-C. Separácia prebehla za použitia destilovanej vody ako mobilnej fáze. Počas separácie bola sledovaná absorbancia eluátu pri 280 nm. Každá vzorka gummy mala odlišný elučný profil, ktorý bol zapisovaný pomocou rekordéru. Vzorky boli zbierané do mikroskúmaviek v 2-minútových intervaloch, čo umožnilo separáciu gummy do niekoľkých frakcií: GA-F 9 frakcií (Obr. 10), GA-S 14 frakcií (Obr. 11) a GA-C 12 frakcií (Obr. 12). Pre presnejšiu predstavu o množstve proteínov bola v každej frakcii zmeraná absorbancia na spektrofotometri pri 280 nm oproti čistej vode. Pri výpočte sme vychádzali z predpokladu, že 1 mg/ml by poskytol pri A280 hodnotu 1.0 (Thermo Fisher Scientific, 2010). Ako príklad uvádzame meranie absorbancie pre vzorku GA-F (Tab. 6) z dôvodu, že práve táto vzorka bola v nadchádzajúcich experimentoch používaná najčastejšie. Separácia arabskej gummy pomocou SEC bola uskutočnená v niekoľkonásobných opakovaniach pre ďalšie spracovanie frakcií odlišnými technikami či potrebu spájania a zahusťovania frakcií. Každá separácia rovnakej vzorky predstavovala jedinečný profil, aj keď sa tvar krivky nijako výrazne nemenil, elučné profily vykazovali mierne odlišnosti. Ako príklad uvádzame vzorku GA-F, ktorej elúcia je na obrázku (Obr. 10) dokončená zberom frakcie číslo 9. Obsah proteínov bol pri neskoršej separácii vzorky GA-F nameraný len v 8 frakciách, z toho dôvodu môžu byť pri neskorších experimentoch uvádzané výsledky 8 frakcií.



Obr. 10 Elučný profil arabskej gummy GA-F zíschaný pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne (1 x 30 cm) s použitím destilovanej vody ako mobilnej fáze. Na kolónu bol nanosený 1 ml 5 % (w/v) roztoku GA-F v destilovanej vode. Prietoková rýchlosť bola 1 ml/min. Absorbancia bola monitorovaná pri 280 nm. Separáciou bolo pozbieraných 9 frakcií označených arabskými číslicami.



Obr. 11 Elučný profil arabskej gummy GA-S získaný pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne (1 x 30 cm) s použitím destilovanej vody ako mobilnej fázy. Na kolónu bol nanesený 1 ml 5 % (w/v) roztoku GA-S v destilovanej vode. Prietoková rýchlosť bola 1 ml/min. Absorbancia bola monitorovaná pri 280 nm. Separáciou bolo pozbieraných 14 frakcií označených arabskými číslicami.



Obr. 12 Elučný profil arabskej gummy GA-C získaný pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne (1 x 30 cm) s použitím destilovanej vody ako mobilnej fázy. Na kolónu bol nanesený 1 ml 5 % (w/v) roztoku GA-C v destilovanej vode. Prietoková rýchlosť bola 1 ml/min. Absorbancia bola monitorovaná pri 280 nm. Separáciou bolo pozbieraných 12 frakcií označených arabskými číslicami.

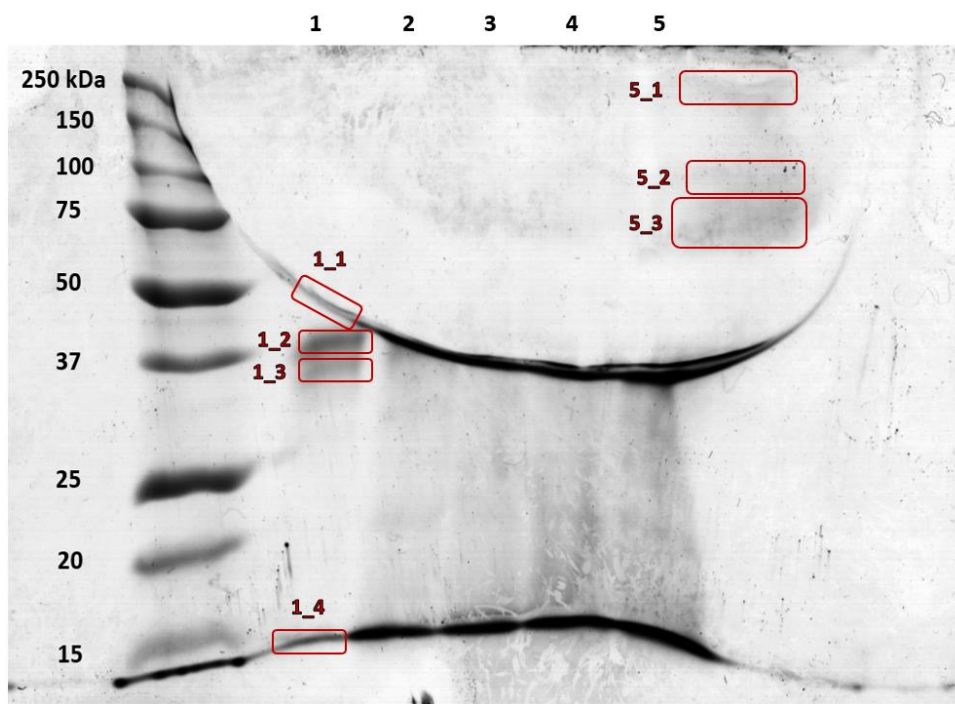
Tab 6 Hodnoty absorbancie (priemery dvoch meraní) vo frakciách GA-F získaných pomocou SEC na kolóne Sephadex 200 HR merané pri 280 nm oproti čistej vode. Na prepočet absorbancie na obsah proteínov (smerodajná odchýlka po zaokrúhlení na celé číslo) vo frakciách bol použitý predpoklad, že 1 mg/ml roztoku by poskytol pri A280 hodnotu 1.0

Číslo frakcie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Absorbancia	0,009	0,046	0,072	0,083	0,059	0,037	0,016	0,010	0,006
Odhad obsahu proteínov (µg/ml)	9 ± 2	46 ± 5	72 ± 6	83 ± 7	59 ± 6	37 ± 5	16 ± 4	10 ± 1	6 ± 1

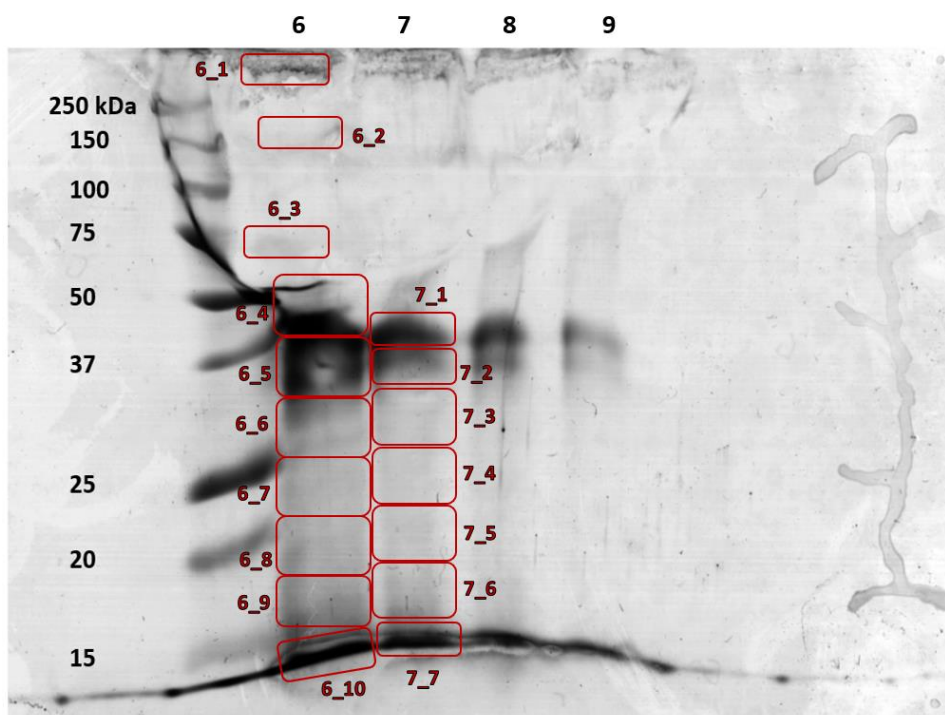
### 4.3 Vizualizácia proteínov pomocou SDS-PAGE a identifikácia pomocou MS

Pre vizualizáciu a následnú identifikáciu proteínov boli vzorky spracované pomocou SDS-PAGE, podľa vyššie popísanej metódy (Laemmli, 1970). Na polyakrylamidový gél boli nanosené vzorky GA-F (Obr. 13, 14), GA-S (Obr. 15, 16) a GA-F (Obr. 17, 18) získané frakcionáciou pomocou SEC, odparené na vákuovej rotačnej odparke a následne povarené s 20 µl Laemmliho pufru. Po ukončení elektroforézy boli proteíny v gély vizualizované pomocou farbenia s Coomassie Brilliant Blue R-250. Pre identifikáciu proteínov pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie (MS/MS) na prístroji MALDI TOF/TOF a iónovej pasci boli z gélu vyrezané jednotlivé zafarbené pásy (na obrázkoch znázornené pomocou červených rámečkov). Spracovanie gélových kúskov pre ďalšiu identifikáciu zahŕňalo odfarbenie, redukciu disulfidových väzieb pomocou DTT, alkyláciu voľných cysteínových zbytkov jódacetamidom, štiepenie proteínov trypsínom a extrakciu proteínov z gélu. Po odsolení nasledovala nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS analýza peptidov, prípadne meranie na iónovej pasci s ESI. Namerané MS/MS dáta boli exportované do programu ProteinScape 3.1 a využité k prehľadávaniu v databázy SwissProt oproti celej ríši zelených rastlín (*Viridiplantae*). Identifikované proteíny vo vzorkách gummy sú uvedené v Tab. 7, 8 a 9. Vo vzorkách bola objavená prítomnosť peroxidázy, avšak s pomerne malým vyhľadávacím skóre, preto sa v práci tiež zaoberáme jej potvrdením inými technikami. Identifikované úseky boli zväčša homológy peroxidázy A2 z chrenu (*Armoracia rusticana*), fragmentu peroxidázy 2 z cykasu japonského (*Cycas revoluta*). Prehľadávanie databázy SwissProt oproti rodu akácia neidentifikovalo žiadne sekvencie vyskytujúce sa priamo u akácií. Zaujala nás prítomnosť homológov proteínov z ananásu vo vzorke GA-F, ktorých prítomnosť bude diskutovaná neskôr.

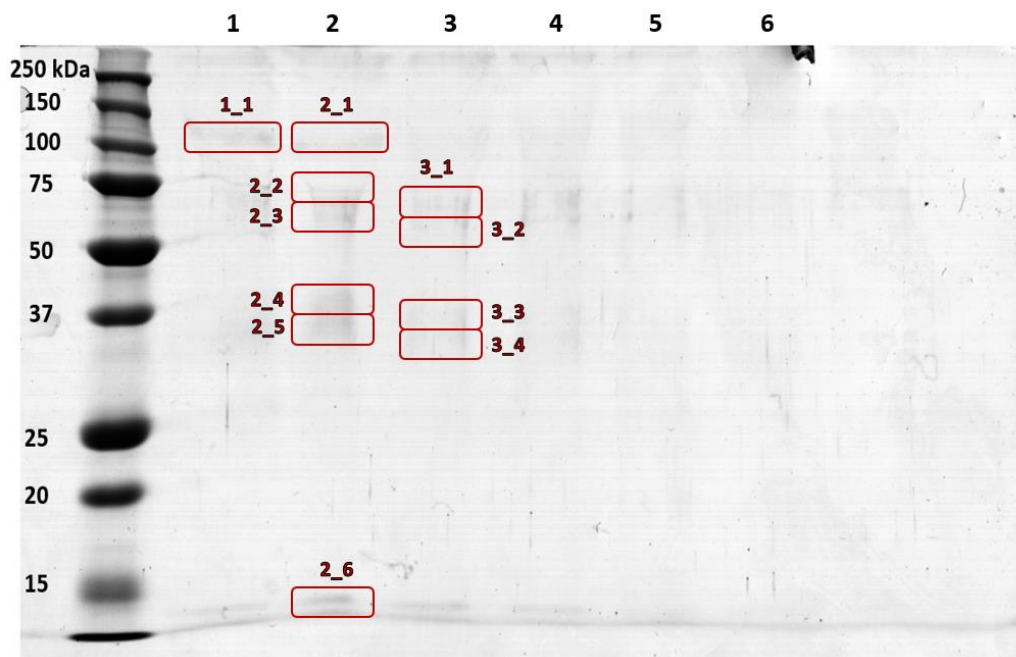




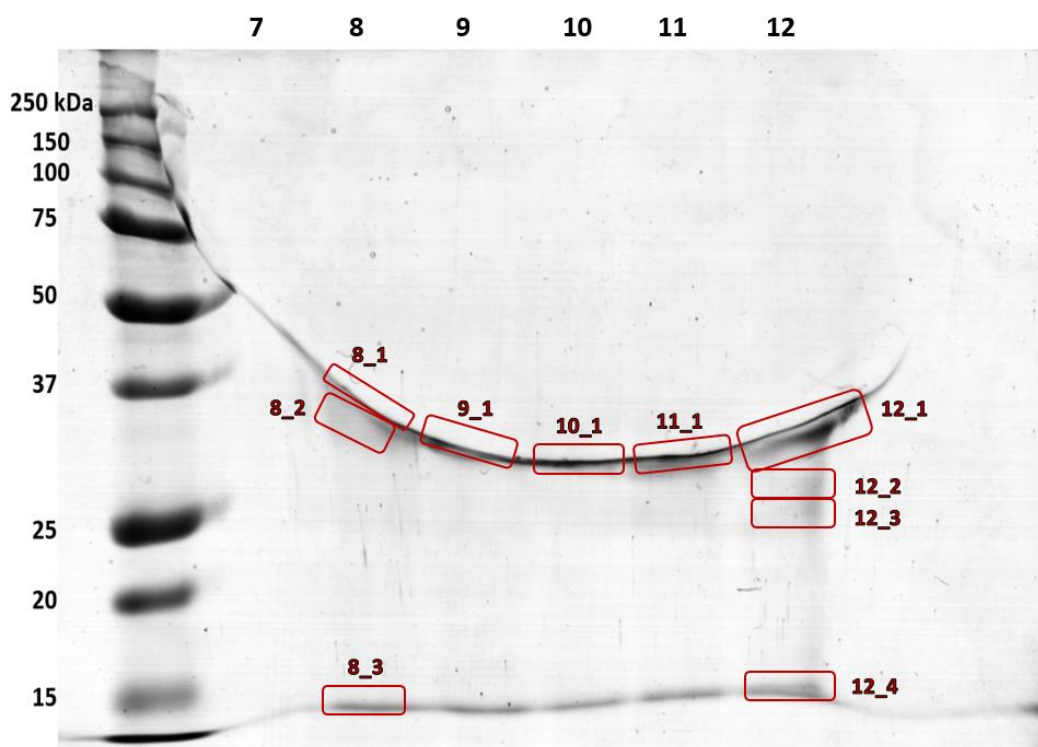
Obr. 13 Frakcie 1 – 5 GA-F získané pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne separované pomocou SDS-PAGE s použitím 10 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Štandard: 5  $\mu$ l Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.



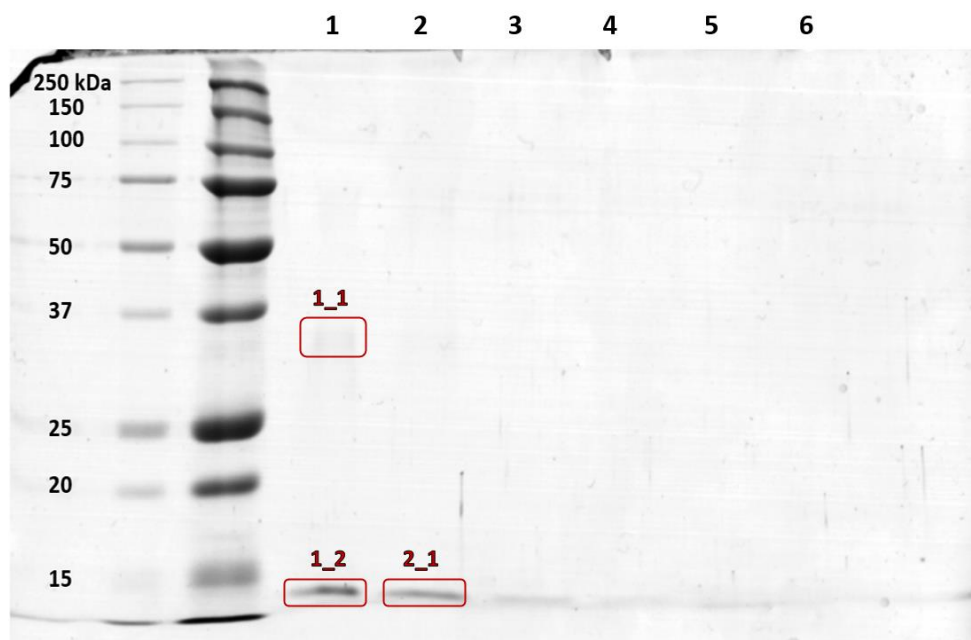
Obr. 14 Frakcie 6 – 9 GA-F získané pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne separované pomocou SDS-PAGE s použitím 10 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Štandard: 5  $\mu$ l Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.



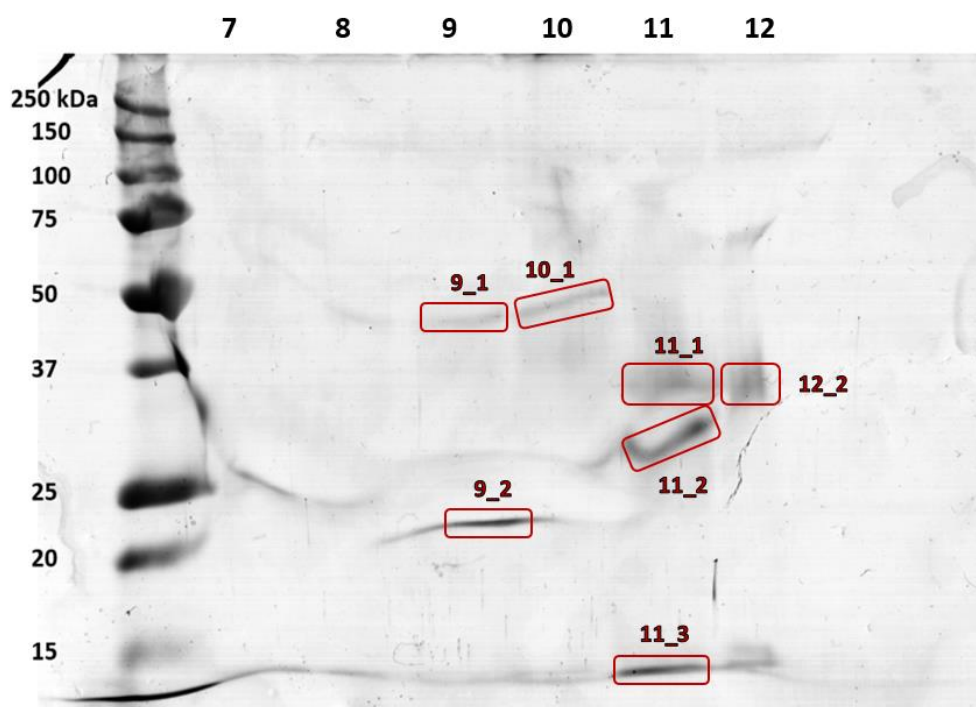
Obr. 15 Frakcie 1 – 6 GA-S získané pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne separované pomocou SDS-PAGE s použitím 10 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Štandard: 5  $\mu$ l Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.



Obr. 16 Frakcie 7 – 8 GA-S získané pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne separované pomocou SDS-PAGE s použitím 10 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Štandard: 5  $\mu$ l Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.



Obr. 17 Frakcie 1 – 6 GA-C získané pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne separované pomocou SDS-PAGE s použitím 10 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Štandard: 5  $\mu$ l Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.



Obr. 18 Frakcie 7 – 12 GA-C získané pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne separované pomocou SDS-PAGE s použitím 10% separačného a 4% zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Štandard: 5  $\mu$ l Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.

Tab. 7 Proteíny identifikované vo vzorke GA-F pomocou nanoLC ESI-MS/MS

Band	Prístupový kód	Proteín	MW [kDa]	Skóre	Počet peptidov	Pokrytie sekvencie [%]
1_3	PER2_CYCRE	Peroxidase 2 (Fragment)	1.5	54.3	1	100.0
1_4	BROM2_ANACO	Stem bromelain	22.8	328.1	6	32.1
	ANAN_ANACO	Ananain	38.2	73.3	1	3.2
5_2	PERA2_ARMRU	Peroxidase A2	31.9	63.9	1	3.0
6_3	PERA2_ARMRU	Peroxidase A2	31.9	52.5	1	3.0
6_4	PERA2_ARMRU	Peroxidase A2	31.9	59.3	1	3.0
6_5	PER2_CYCRE	Peroxidase 2 (Fragment)	1.5	104.8	1	100.0
6_6	BROM2_ANACO	Stem bromelain	22.8	156.9	3	18.4
	ANAN_ANACO	Ananain	38.2	72.9	1	3.2
	ANAN_ANACO	Ananain	38.2	61.2	1	3.2
7_2	PER2_CYCRE	Peroxidase 2 (Fragment)	1.5	115.9	1	100.0

Tab. 8 Proteíny identifikované vo vzorke GA-S pomocou nanoLC ESI-MS/MS

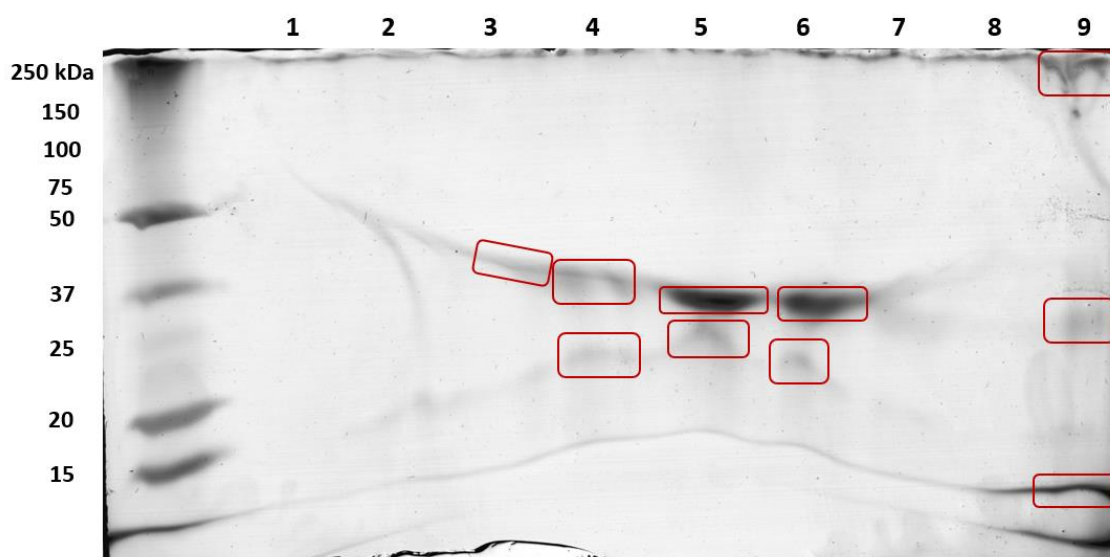
Band	Prístupový kód	Proteín	MW [kDa]	Skóre	Počet peptidov	Pokrytie sekvencie [%]
8_1	PER2_VITVI	Peroxidase 2 (Fragment)	1.3	78.3	1	100.0
	PERA2_ARMRU	Peroxidase A2	31.9	51.2	1	3.0

Tab. 9 Proteín peroxidáza identifikovaný vo vzorke GA-F pomocou nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS

Band	Prístupový kód	Proteín	MW [kDa]	Skóre	Počet peptidov	Pokrytie sekvencie [%]
6_5	PER2_CYCRE	Peroxidase 2 (Fragment)	1.5	91.8	1	100.0
7_2	PER2_CYCRE	Peroxidase 2 (Fragment)	1.5	46.7	1	100.0

#### 4.4 Príprava rozpustného gélu

Pre vizualizáciu a identifikáciu proteínov sme sa pokúsili pripraviť rozpustný gél, čo by zjednodušilo izoláciu makromolekúl separovaných na gély. Na tento experiment bol pripravený 4 % zaostrovací gél a dve varianty pre separačný gél (8 % a 10 %). Na gél boli nanesené frakcie vzorky GA-F získané pomocou SEC, odparené na vákuovej rotačnej odparke a následne povarené s Laemmliho pufrom bez 2-merkptoetanolu, aby nedošlo k redukcii disulfidových väzieb v gély. Proteíny boli na gély vizualizované pomocou farbiacej zmesi Coomasie Bio-Safe. Z hľadiska vizualizácie proteínov boli lepšie výsledky zaznamenaná použitím 8 % separačného gélu (Obr. 19). Redukcia disulfidových mostíkov v gélových kúskoch pre rozpustenie gélu bola prevedená použitím tiolového činidla DTT. Vytvoriť rozpustný gél sa nám podarilo len čiastočne. Ani u jedného z gélov k úplnému rozloženiu štruktúry nedošlo, gélové kúsky mali po použití redukčného činidla slizovitú povahu, čo sťažovalo manipuláciu (pipetovanie) a následné spracovanie. V našich čiastočne rozpustných géloch sa následnou hmotnostnou spektrometriou nepodarilo identifikovať žiadne proteíny, pravdepodobne práve kvôli malému výťažku získaného z gélu.

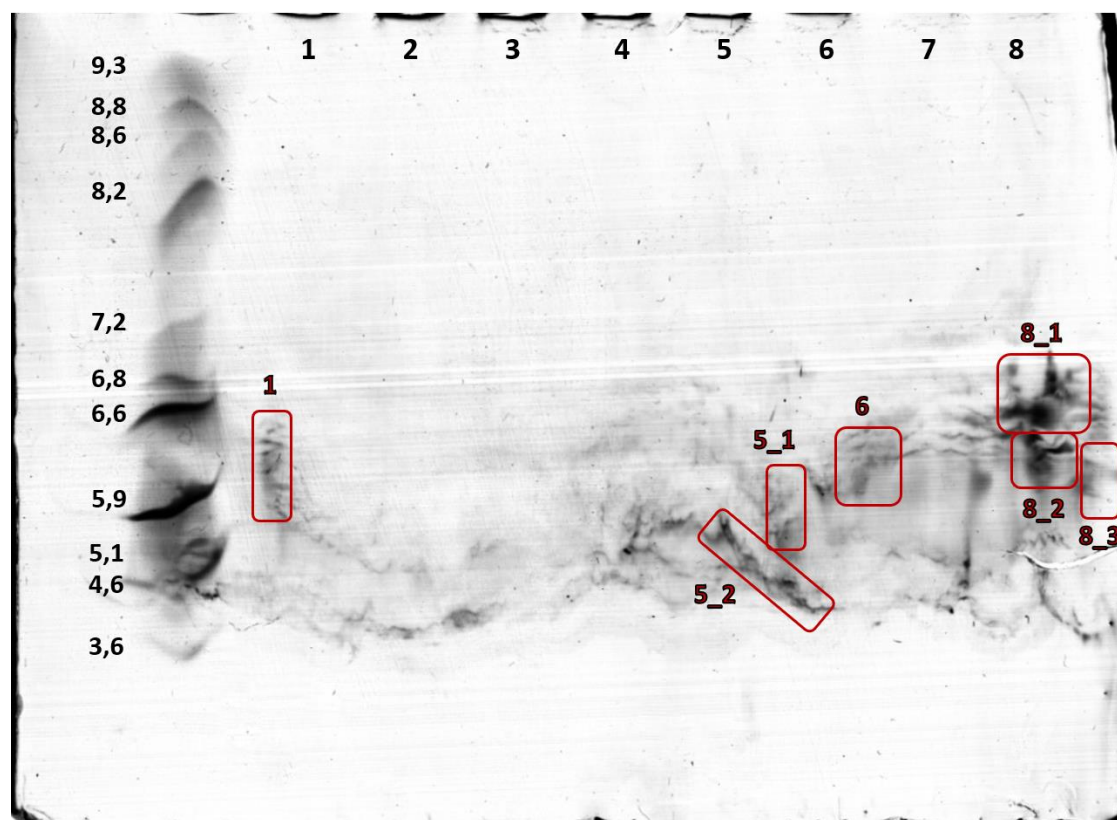


Obr. 19 Frakcie 1 – 9 vzorky GA-F získané pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne separované pomocou elektroforézy na polyakrylamidovom gély obsahujúcom disulfidové -S-S- väzby s použitím 4 % zaostrovacieho a 8 % separačného gélu. Štandard: 5  $\mu$ l Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Prestained Standards Dual Color. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho Coomasie Bio-Safe. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.

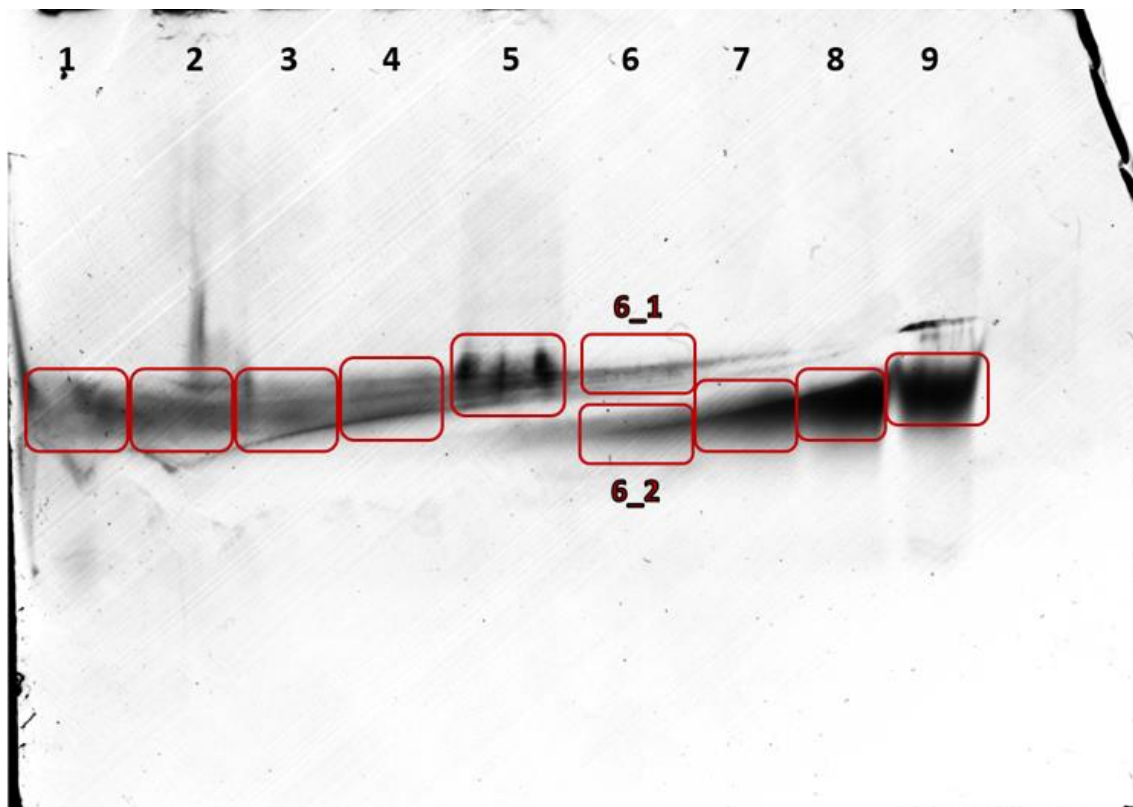


## 4.5 Vizualizácia proteínov pomocou IEF

Prevedenie natívnej a denaturačnej izoelektrickej fokusácie bolo uskutočnené podľa protokolu Robertson *et al.*, 1987. Vzhľadom na doterajšie výsledky bola na tento experiment použitá vzorka GA-F, v ktorej sa podarilo vizualizovať a identifikovať najviac proteínov. Vzorka gumy GA-F bola separovaná pomocou SEC na Sephacryl S-200 HR kolóne a pozbierané frakcie boli na IEF pripravené zahustením na vákuovej rotačnej odparke. Farbenie gélu bolo prevedené roztokom Commassie Bio-Safe a pre jeho odfarbenie bola použitá destilovaná voda. V oboch prípadoch (natívnej i denaturačnej IEF) sa nám podarilo proteíny vizualizovať. Zatiaľ čo u natívnej IEF (Obr. 20) došlo k zastaveniu migrácie proteínov pomerne širokej oblasti pH = 3,6 – 7, pri denaturačnej IEF (Obr. 21) bola väčšina proteínov zakoncentrovaná do jednej zóny. Následne boli jednotlivé pásy (na obrázkoch znázornené pomocou červených rámečkov) z gélu vyrezané a proteíny z nich získané identifikované pomocou MS (Tab. 10).



Obr. 20 Natívna izoelektrická fokusácia vzorky GA-F. Frakcie (1 – 8) získané z chromatografie na Sephacryl S-200 HR kolóne. Štandard: IEF mix 3,6 – 9,3. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Commassie Bio-Safe. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracované.



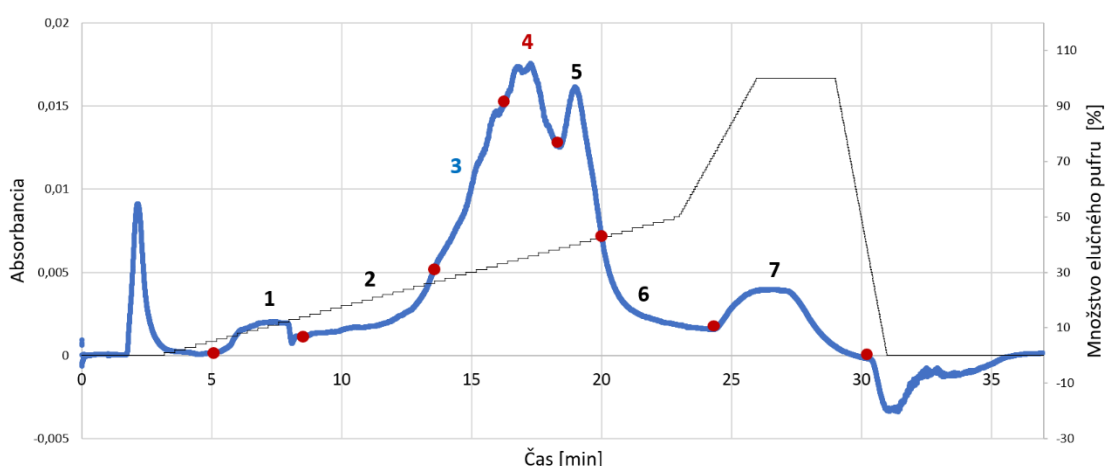
Obr. 21 Natívna izoelektrická fokusácia vzorky GA-F. Frakcie (1 – 9) získané z chromatografie na Sephacryl S-200 HR kolóne. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku Comassie Bio-Safe. Červené obdĺžniky označujú pásy, ktoré boli ďalej spracovávané.

Tab. 10 Proteíny identifikované vo vzorke GA-F pomocou nanoLC ESI-MS/MS z gélu denaturačnej izoelektrickej fokusácie

Frakcia	Prístupový kód	Proteín	MW [kDa]	Skóre	Počet peptidov	Pokrytie sekvencie [%]
2	PER73_ARATH	Peroxidase 73	35.9	133.8	2	7.0
	PER2_CYCRE	Peroxidase 2 (Fragment)	1.5	69.3	1	100.0
5	PER73_ARATH	Peroxidase 73	35.9	81.3	2	7.0

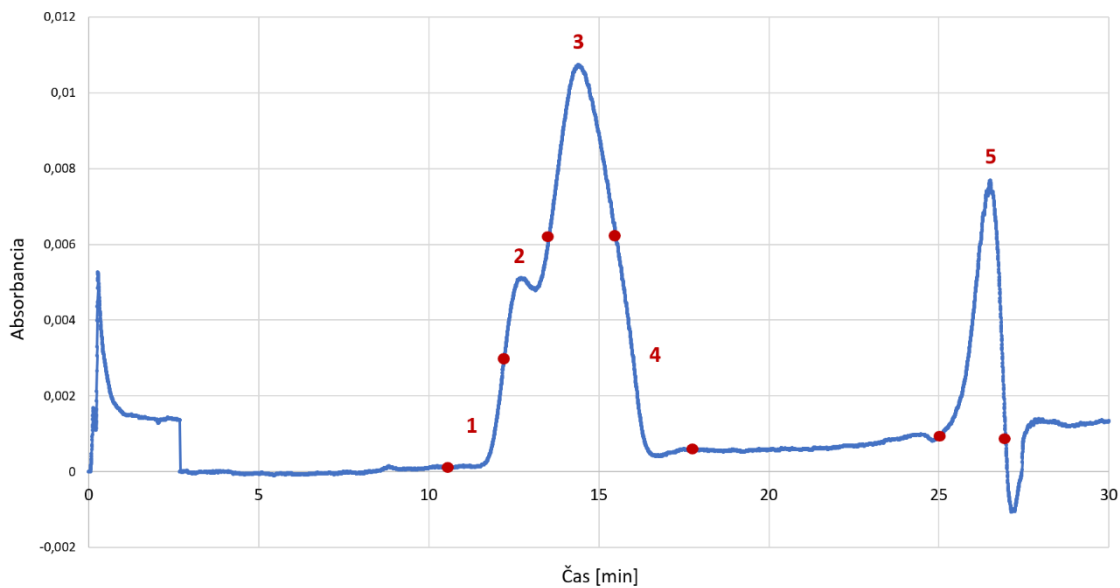
## 4.6 Spojenie IEC a SEC chromatografie

Vzorka arabskej gummy bola pripravená rozpustením 0,5 g GA-F v 10 ml vody a následne dialyzovaná cez noc v 2l 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufrí (pH = 7). Po centrifugácii pri 10 000 g a 4 °C bol odobratý supernatant, ktorý bol použitý na chromatografickú separáciu. Separácia prebehla na kolóne Enrich™ Q (5 x 50 mm) naplnenej anexom ekvilibrovanej rovnakým pufróm. Elúcia prebehla pomocou 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufru (pH = 7) s 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl. Zvyšovaním podielu elučného pufru bolo pozbieraných 7 frakcií (Obr. 22). Separácia bola s rovnakou vzorkou uskutočnená v 10-tich meraniach, pričom jednotlivé totožné frakcie boli spájané. Frakcie boli zakoncentrované pomocou centrifugácie cez filter na výsledný objem 2 ml. Ďalšia separácia rozdelila vzorky podľa veľkosti molekúl pomocou kolóny Enrich™ SEC 650 v 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufrí (pH = 7). V elučných profiloch frakcií 1 a 2 nebolo namerané využiteľné množstvo proteínov. Elučné profily frakcií 3 až 7 vykazovali menšie odlišnosti, vo všeobecnosti však u všetkých dochádzalo k elúcii proteínov v 12 – 20 minúte a 24 – 28 minúte. Pre demonštráciu uvádzame elučný profil frakcie 4 (Obr. 23). Pozbierané „píky“ z frakcií 3 – 7 boli zahustené centrifugáciou cez filter a následne odparené na vákuovej rotačnej odparke pri 45 °C. Tieto frakcie boli analyzované pomocou SDS-PAGE (Obr. 24). Zafarbené pásy boli analyzované pomocou MS, avšak nepodarilo sa detekovať žiadne proteíny.

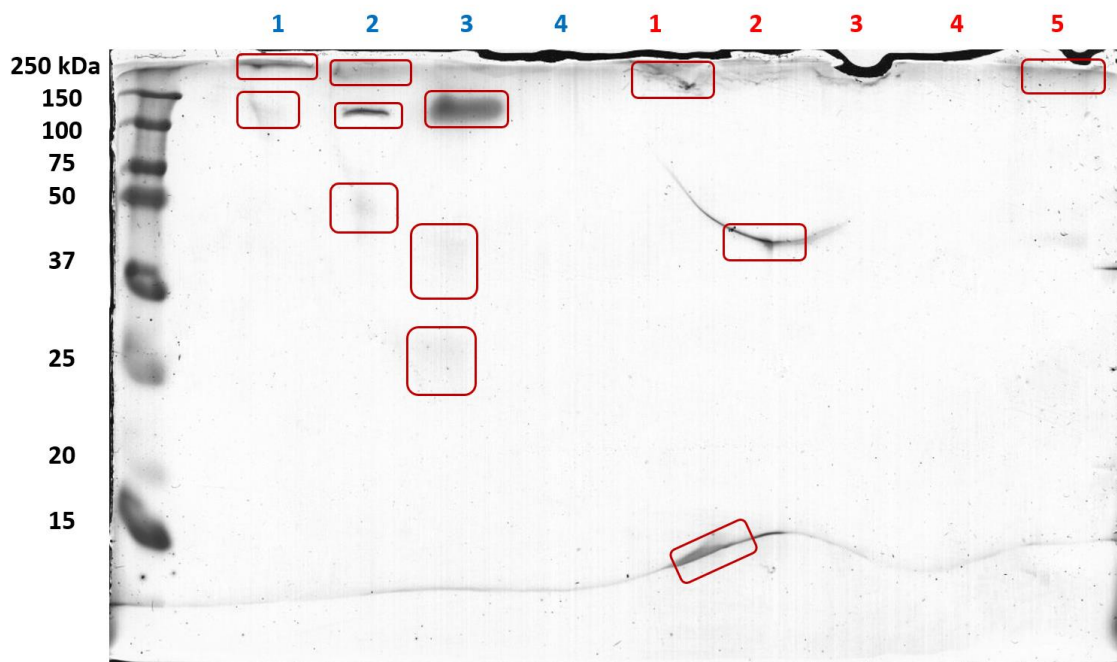


Obr. 22 Elučný profil vzorky GA-F získaný pomocou IEC. Modrá krivka znázorňuje absorbanciu eluátu pri 280 nm a čierna krivka percentuálne zastúpenie elučného pufru v mobilnej fáze. Prietoková rýchlosť bola 1 ml/min. Červené bodky znázorňujú pozbierané frakcie-označené číslami 1 – 7. Frakcie 3 a 4 sú označené farebne z dôvodu ľahšej orientácie v nadchádzajúcom texte.





Obr. 23 Elučný profil frakcie 4 GA-F z IEC získaný pomocou SEC. Prietoková rýchlosť bola 0,75 ml/min. Absorbancia eluátu bola detekovaná pri 280 nm. Vzorka GA-F 4 vznikla po 10násobnom zbere a následnom zahutnení frakcie 4 získanej pomocou IEC.

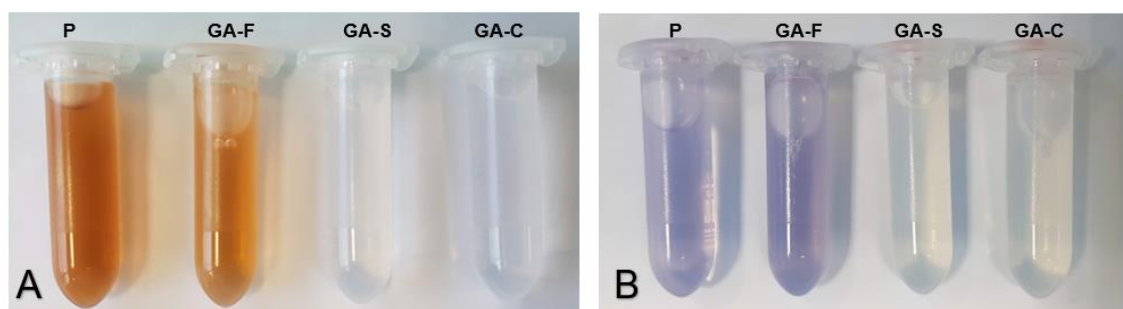


Obr. 24 Frakcie arabskej gummy získané pomocou IEC a následnej SEC separované pomocou SDS-PAGE s použitím 10 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Farbenie pomocou Coomassie Bio-Safe. Na gél bolo nanesených 5  $\mu$ l Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Color. Frakcia 3 (modrá farba) získaná pomocou IEC a následná separácia SEC (frakcie 1 – 4). Frakcia 4 (červená farba) získaná pomocou IEC a následná separácia SEC (frakcie 1 – 5, viz. Obr. 23).

## 4.7 Identifikácia peroxidázy pomocou natívnej PAGE

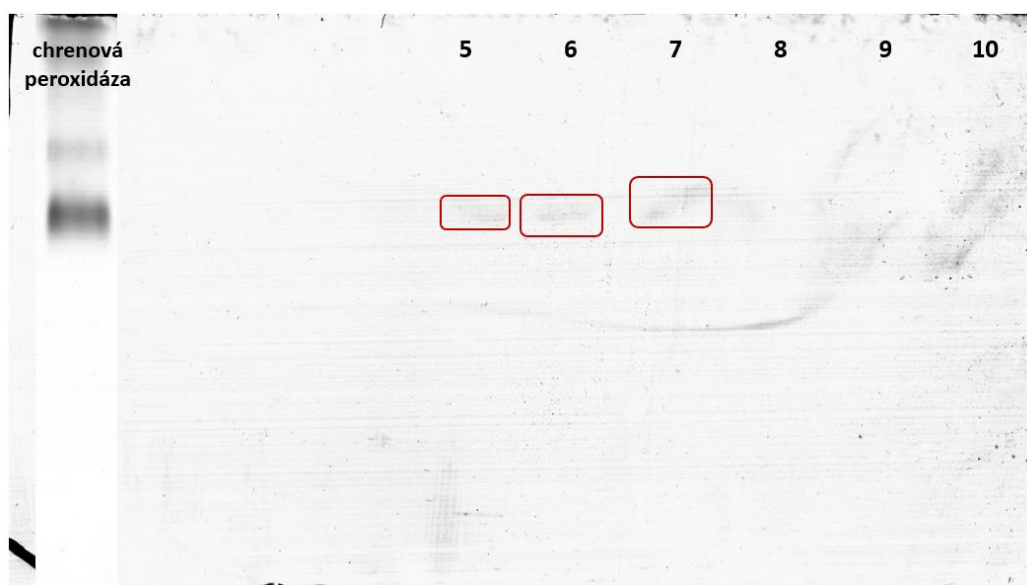
V predchádzajúcich experimentoch bola detekovaná peroxidázová aktivita, ktorú sme sa rozhodli overiť identifikáciou pomocou iných biochemických metód. K tomuto účelu bola využitá natívna elektroforéza s použitím 8 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu. Pre optimalizáciu prevedenia bola metóda odskúšaná s chrenovou peroxidázou za použitia dvoch farbiacich roztokov. Pri oboch farbeniach došlo k detekcii peroxidázy za vzniku očakávaných produktov, pričom sme na gély pozorovali viditeľné pásy. Farbenie pomocou 4-chlór-1-naftolu poskytuje po jeho oxidácii nerozpustný, modro-fialový produkt. Naopak po oxidácii guajakolu dochádza ku vzniku rozpustného, oranžovo-hnedého produktu – tetraguajakolu. Na gély so vzorkou chrenovej peroxidázy došlo k oranžovo-hnedého tetraguajakolu, avšak približne po 20 minútach sa farbenie z gélu začalo postupne vymývať. Vzhľadom na fakt, že množstvo peroxidázy je vo vzorke GA malé a rozpúšťanie produktu by mohlo spôsobiť problém pri detekcii, zvolili sme farbenie pomocou 4-chlór-1-naftolu.

Pred samotnou PAGE separáciou sme všetky vzorky gummy podrobili rýchlej skúmovkovej reakcii, kedy sme 1 ml 10 % roztoku gummy nechali reagovať s 1 ml farbiaceho roztoku (Obr. 25). Ku vzniku produktov v dôsledku peroxidázovej aktivity došlo iba v skúmovke so vzorkou GA-F. Preto bola táto vzorka vybraná pre detekciu na gély.



Obr. 25 Skúmovkové reakcie 10 %-tných roztokov GA s farbiacimi roztokmi po 20 minútovej inkubácii. A) 1 ml 10 % roztoku GA a 1 ml farbiaceho roztoku obsahujúcom guajakol, vzniká oranžovo-hnedý produkt – tetraguajakol. B) 1 ml 10 % roztoku GA a 1 ml farbiaceho roztoku obsahujúcom 4-chlór-1-naftol, vzniká modro-fialový produkt benzo-4-chlór-cyklohexadienón. Pre porovnanie bol zmiešaný štandard 5  $\mu$ l 0,1 mg/ml chrenovej peroxidázy a 2 ml farbiaceho roztoku (P).

Na natívnu elektroforézu bolo použitá vzorka GA-F, vzhľad na fakt, že u ostatných dvoch vzoriek nebola v skúmavkovej reakcii ani spektrofotometricky detekovaná peroxidázová aktivita. Po dialýze 5 % roztoku GA-F oproti čistej vode bol vždy 1 ml vzorky rozseparovaný pomocou SEC (9 frakcií). Frakcionácia bola prevedená 6-krát, pričom jednotlivé totožné frakcie boli spojené. Takto pospájané frakcie boli zhustené približne na 1,5 ml. Následne bol odobratý 1 ml z každej vzorky a odparený na vákuovej rotačnej odparke. Pred nanosením na gél bolo do každej mikroskúmavky pridaných 50  $\mu$ l destilovanej vody a 50  $\mu$ l 50 % glycerolu, vzorky boli zvortexované, sonikované na ultrazvuku 5 minút a sцентрифugované. Do každej jamky bolo napipetovaných 20  $\mu$ l vzorky (jamky 1 – 9). Do poslednej jamky bolo napipetovaných 20  $\mu$ l nefrakcionovaného roztoku 5 % roztoku GA-F. Peroxidáza bola identifikovaná vo frakciách 5 – 9 a v nerozseparovanej vzorke GA-F (Obr. 26). Pre porovnanie na obrázku uvádzame tiež separáciu štandardu chrenovej peroxidázy (na jamke 4  $\mu$ l 1 mg/ml roztoku peroxidázy, pomer vody a glycerolu 1:1), ktorá bola prevedená za identických podmienok. Chrenová peroxidáza nebola umiestnená na jeden gél so vzorkami z dôvodu, že v predchádzajúcom experimente došlo pri separácii k zmiešaniu chrenovej peroxidázy a obsahu prvých jamiek so vzorkami.

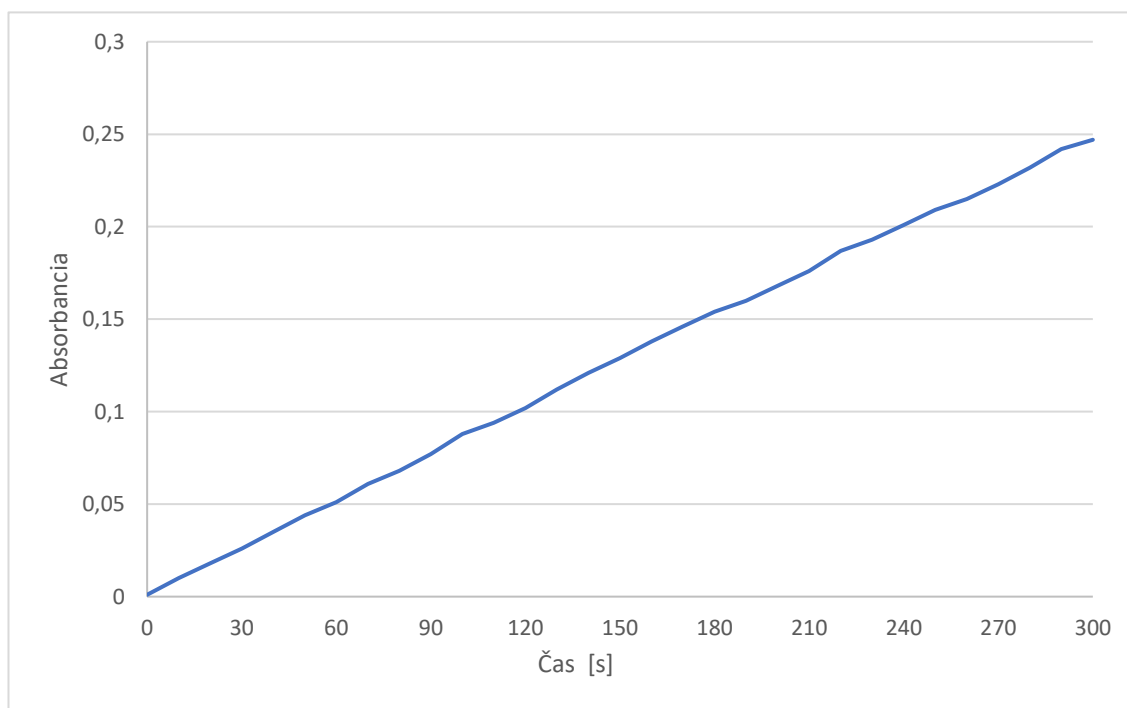


Obr. 26 Vzorka GA-F separovaná pomocou natívnej elektroforézy s použitím 8 % separačného a 4 % zaostrovacieho polyakrylamidového gélu bez SDS. Na farbenie bol použitý 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátový pufo (pH = 7) obsahujúci 0,06 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,06 mg/ml 4-chlór-1-naftol. Význam číslovania: jamky 5 – 9 frakcie získané frakcionáciou vzorky GA-F na kolóne Sephacryl S-200 (opakovaná 6x po 1 ml 5 % roztoku), pospájaním a následným zahustením; jamka 10 obsahuje nefrakcionovaný 5 % roztok GA-F (20  $\mu$ l). Ako štandard boli použité 4  $\mu$ l 1 mg/ml roztoku chrenovej peroxidázy separovanej za rovnakých podmienok.

## 4.8 Spektrometrické stanovenie peroxidázovej aktivity

Na meranie aktivity peroxidázy bola použitá spektrofotometrická metóda založená na princípe premeny guajakolu na oranžovo-hnedý tetraguajakol v prítomnosti peroxidu vodíka (Tayefi-Nasrabadi *et al.*, 2011).

Zmena absorbancie bola meraná kineticky v 10 s intervaloch v priebehu 5 minút pri 470 nm. Reakčná zmes obsahovala 500  $\mu\text{l}$  10 % roztoku GA vo fosfátovom pufrí (pH = 7) obsahujúcom 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  guajakol a 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Táto metóda bola vhodná len pre vzorku GA-F, u ktorej vykazoval nárast absorbancie v čase lineárnu závislosť (Obr. 27). Zo zmeny absorbancie bola následne s využitím Lambert-Beerovho zákona vypočítaná katalytická aktivita peroxidázy. Vo vzorkách GA-S a GA-C boli namerané len veľmi nízke hodnoty absorbancie, ktoré nemali lineárny charakter, preto u týchto vzoriek nebolo možné previesť výpočet peroxidázovej aktivity.



Obr. 27 Lineárna priamka vyjadrujúca zmenu absorbancie v roztoku meraní pri 470 nm v priebehu 5 minút. Zloženie roztoku: 500  $\mu\text{l}$  10 % roztoku GA vo fosfátovom pufrí obsahujúcom 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  guajakol a 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ako blank bol použitý roztok bez  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Výpočet enzymovej aktivity bol odvodený z nasledujúcej rovnice s využitím Lambert-Beerovho zákona:

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot c}{\Delta t} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot n}{\Delta t \cdot V} = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot a}{V}$$

$\Delta A$  = zmena absorbancie,  $\varepsilon$  = molárny extinkčný koeficient,  $l$  = dĺžka optickej dráhy kyvety,  $\Delta t$  = čas enzymovej reakcie,  $v$  = reakčná rýchlosť,  $V$  = celkový objem roztoku v kyvete,  $a = \Delta n / \Delta t$  – aktivita v kat, 1 kat = množstvo enzýmu v móloch, ktoré premení za štandardných podmienok za 1 sekundu 1 mol substrátu (1 kat = 1 mol/s).

Parametre usporiadania experimentu:

- celkový objem  $V = 2$  ml ( 967  $\mu$ l fosfátového pufru, 333  $\mu$ l 30 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> guajakolu, 500  $\mu$ l roztoku arabskej, 200  $\mu$ l 10 mmol $\cdot$ l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- reakčný čas: 5 min = 300 s
- zmena absorbancie bola monitorová v troch meraniach,  $\Delta A = 0,246; 0,237; 0,232$  priemerná hodnota =  $0,238 \pm 0,006$
- dĺžka optickej kyvety = 1 cm
- molárny extinkčný koeficient = 4500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>
- obsah proteínov vo vzorke gummy 2,1 %  $\pm$  2 % (zmerany BCA metódou, kap. 4.1), tzn. 10 % roztok obsahuje 0,1 g GA/ml, čo predstavuje 2 mg proteínov/ml

$$a = \frac{\Delta A \cdot V}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot l} = \frac{0,238 \cdot 0,002}{300 \cdot 4500 \cdot 1} = 3,53 \cdot 10^{-10} \text{ katal}$$

$$a = \frac{3,53 \cdot 10^{-10}}{V_{GA}} = \frac{3,53 \cdot 10^{-10}}{0,5} = 7,06 \cdot 10^{-10} \text{ kat}$$

$$= 0,706 \text{ nkat v ml } 10 \% \text{ roztoku GA}$$

$$a = \frac{0,706}{m_{GA}} = \frac{0,706}{2} = 0,353 \text{ nkat v mg proteínov GA}$$

## 5 DISKUSIA

Meraním absorbancie vo vzorkách arabskej gummy bol pomocou BCA metódy stanovený obsah všetkých proteínov v gume. Zastúpenie proteínov (%) vo vzorkách gummy sa pohybuje v rozmedzí približne 2,8 – 1,7 %. Obsah proteínov v GA je podľa dostupnej literatúry udávaný ~ 2 % (Islam *et al.*, 1997), čo odpovedá našim nameraným hodnotám. Rozdiely medzi jednotlivými vzorkami sú pochopiteľné, samotná literatúra uvádza, že hodnoty zastúpenia proteínov či sacharidových rezíduí sú variabilné, presné zloženie gummy závisí na lokalizácii, veku stromu, klimatických podmienok či miesta narezania (Idris *et al.*, 1998; Lopez-Torrez *et al.*, 2015).

Ďalším krokom pre objasnenie proteínového zloženia gummy bolo použitie chromatografických metód, ako prvá nasledovala SEC chromatografia. Frakcionácia GA pomocou SEC je zaznamenaná viacerými autormi v rôznych prevedeniach, líšiace sa pôvodom vzorky a jej spracovaním pred separáciou, typom použitej kolóny, zložením mobilnej fázy či použitou vlnovou dĺžkou pri UV detekcii. Na frakcionáciu vzoriek GA pomocou SEC sú často využívané kolóny Superosa 6 (frakcionačný rozsah v rozmedzí molekulových hmotností  $5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$  Da; Osman *et al.*, 1994; Mahendranetal *et al.*, 2008), Sephacryl S-400 ( $2 \times 10^4 - 8 \times 10^6$  Da; Vandavelde a Fenyo, 1985; Connolly *et al.*, 1988) či Sephacryl S-500 ( $2 \times 10^4 - 2 \times 10^7$  Da, Vandavelde a Fenyo, 1985; Randall *et al.*, 1988), roztok NaCl ako mobilná fáza a UV detekcia je často monitorovaná pri 214 nm, čo je vlnová dĺžka, ktorú absorbujú bielkoviny aj cukry (najmä urónové kyseliny) v pomeroch vzhľadom k ich príslušným extinkčným koeficientom (Connolly *et al.*, 1988). V našej práci sme previedli frakcionáciu GA s využitím Sephacryl S-200 HR kolóny (frakcionačný rozsah  $5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^5$  Da) pri 280 nm, čo je vlnová dĺžka typicky používaná pre stanovenie proteínov (Simonian, 2002). S použitím destilovanej vody ako mobilnej fázy sme zaznamenali elučné profily troch vzoriek (GA-F, GA-S, GA-C), ktoré zachytávajú systém niekoľkých pík (Obr. 10, 11, 12). Za spoločný rys predchádzajúcich prác a našej môžeme považovať, že elúcia GA poskytuje pomerne komplikovaný systém niekoľkých pík a separácia prebieha v širokom rozpätí, čo je dôkaz polydisperzity gummy. Medzi jednotlivými vzorkami pozorujeme výrazné odlišnosti v tvare elučnej krivky, ako aj v elučnom objeme, resp. doby elúcie. Podľa predchádzajúcich prác sú tvar a relatívna výška pík závislé od vzorky, elučné profily vzoriek sa odlišujú v závislosti na pôvode vzorky (Vandavelde a Fenyo, 1985).

Zozbierané frakcie boli po zahustení na vákuovej rotačnej centrifúge použité na SDS-PAGE elektroforézu. Na vizualizáciu proteínov bolo použité farbivo Coomassie Brilliant Blue R-250 (alebo Coomassie Bio-Safe). Separáciou frakcií arabskej gummy sa podarilo vizualizovať proteíny, avšak len vo veľmi málo frakciách bol band ostrý, väčšinou išlo o široký pás, zaznamenali sme aj problémy s miešaním materiálu v susedných jamkách. Myslíme si, že tieto komplikácie sú spôsobené najmä prítomnými sacharidmi, konkrétne naviazanými sacharidovými rezíduami na molekulách proteínov. Separácia GA pomocou elektroforézy je zaznamenaná niekoľkými publikáciami, prvý pokus o separáciu zložiek arabskej gummy bol vykonaný už v roku 1957, a to použitím elektroforézy pomocou sklenených vlákien (Lewis a Smith, 1957). Pechanek *et al.*, 1982 narazili pri separácii rôznych zahusťovadiel vrátane arabskej gummy na problémy s PAGE separáciou, pretože migrácia bola spomalená úzkymi pórmí štruktúry gélu. Migračné vzdialenosti polysacharidov boli veľmi krátke, dokonca aj pri použití zriedených polyakrylamidových gélov. Prevediteľnosť analýzy polysacharidov arabskej gummy použitím SDS-PAGE bola skúmaná aj kolektívom Motlagh *et al.*, 2006. Na separáciu boli použité gély s 2 – 15 % gradientom, Tris-glycín-SDS pufor a detekcia bola prevedená pomocou farbenia s kyselinou jodistou-Schiff, farbiva citlivého na polysacharidy (necitlivé na proteíny). Sacharidová časť niekoľkých vzoriek gummy zostala v oblasti s nízkou hustotou gélu, tzn. nemigrovala dostatočne ďaleko po gély, aby umožnila separáciu. Preto, ak by sa nám aj podarilo pomocou SEC frakcionácie v predchádzajúcom kroku oddeliť proteínovú časť od sacharidovej časti ako u Qi *et al.*, 1991, ktorí pomocou SEC na kolóne Superose-6 získali dve hlavné frakcie (eluované v rôznych časoch): GAGP (väčšina proteínov gummy) a GAP (väčšina sacharidov gummy), ešte stále musíme uvažovať o sacharidoch pripojených priamo na proteíny, ktoré môžu ovplyvňovať separáciu. V tomto smere sú v dostupnej literatúre značné rozdiely. Qi *et al.*, 1991 predpokladajú, že proteínová kostra je glykozylovaná buď krátkymi oligoglykozidmi (~ 3 sacharidové jednotky) alebo sacharidovými blokmi (~ 30 sacharidových rezíduí, molekulová hmotnosť bloku  $4,44 \times 10^3$  Da), kým Connolly *et al.*, 1988 prezentujú veľké polysacharidové bloky (molekulová hmotnosť bloku ~  $2 \times 10^5$  Da) pripojené na proteínovú kostru.

Pre identifikáciu proteínov vo vzorkách GA bola použitá kombinácia viacerých prístupov, po separácii SDS-PAGE boli vo frakciách identifikované proteíny pomocou nanoLC-MALDI MS/MS a nanoLC-ESI MS/MS. Vo vzorkách GA-F a GA-S bola identifikovaná peroxidáza, avšak s malým vyhľadávacím skóre. Identifikované úseky

boli zhodné s určitou peptidovou sekvenciou peroxidázy A2 z chrenu (*Armoracia rusticana*). Molekulová hmotnosť chrenovej peroxidázy je približne 40 kDa (Lavery *et al.*, 2010) a celkovo pre rastlinné peroxidázy (III. trieda peroxidáz) v rozmedzí 28 – 60 kDa (Hiraga *et al.*, 2001). Na géloch SDS-PAGE boli vizualizované proteínové pásy aj približne v oblasti 40 kDa (napr. Obr. 14, jamky 6 – 9), čo odpovedá molekulovej hmotnosti peroxidázy. Pomerne vysoké vyhľadávacie skóre prislúchalo homológovi proteínu bromelaín pochádzajúceho z ananásu (*Ananas comosus* L.). Komerčný bromelaín je rovnako ako arabská guma dostupný v podobe žltého prášku s využitím v potravinárstve, farmaceutike a kozmetike. Vo farmaceutickom priemysle sa využíva predovšetkým v prípravkoch na liečenie zápalu, infekcií či alergií. Predpokladáme, že pri spracovaní arabskej gummy GA-F mohol byť ku vzorke pridaný extrakt z ananásu (*Ananas comosus* L.), ktorý obsahuje zmes rôznych cysteínových proteáz, ako sú kmeňový bromelaín (hlavná zložka), ananaín a comosaín (Azarkan *et al.*, 2020). Ananain bol vo vzorke gummy prítomný tiež. Ďalšie vysvetlenie prítomnosti bromelaínu vo vzorke by bolo, že GA obsahuje proteázu odpovedajúcu bromelaínu, avšak v dostupná literatúra nezaznamenáva informácie o tejto problematike. Prítomnosť proteolytickej aktivity v rastlinných gumách bola zaznamenaná v gume zo stromu neem (*Azadirachta indica*) (Nayak *et al.*, 1979), ktorý však pochádza z inej rastlinnej rodiny.

V ďalšom kroku sme sa pokúsili o vytvorenie rozpustného gélu, čo by mohlo zvýšiť výťažok proteínov a zároveň skrátiť štandardný postup získavania proteínov z gélu, kedy môže dôjsť ku kontaminácii vzoriek, ktoré nám komplikovali stanovenie (prítomnosť keratínu, proteínov z rukavíc). Na tento experiment sme sa pokúsili vytvoriť 8 % a 10 % rozpustné gély nahradením BIS za BAC. Vytvoriť rozpustný gél sa nám podarilo len čiastočne, k úplnému rozloženiu štruktúry nedošlo, gél mal po použití redukčného činidla slizovitú povahu, čo sťažovalo manipuláciu (pipetovanie) a následné spracovanie. Pri postupe prípravy gélov sme vychádzali z poznatkov publikovaných kolektívom Hansen *et al.*, 1980. V tejto publikácii autori uvádzajú, že na vytvorenie viac ako 4 %-tných rozpustných gélov nestačí len sprísnenie podmienok (zvyšovanie koncentrácie redukčného činidla DTT) pre prítomnosť falošných väzieb, ktoré neobsahujú disulfidové mostíky. Formácia týchto väzieb je pravdepodobne spôsobená štiepením disulfidu v BAC za vzniku tiyolového radikálu ( $RS \cdot$ , kde R = alkyl alebo aryl), ktorý reaguje s akrylamidom, pričom vznikajú väzby medzi uhlíkom a sírou, ktoré sú necitlivé na tiolové činidlá, ako DTT či  $\beta$ -merkaptóetanol. Pre zvýšenie rozpustnosti gélov je možné previesť niekoľko opatrení, ktorými je možné znížiť prítomnosť



neželaných spojení, ako zmierniť účinok skrátením dĺžky polyakrylamidového reťazca, potlačiť reaktivitu disulfidu alebo znížiť koncentráciu BAC. Skrátenie dĺžky reťazca môže byť dosiahnuté zvýšením frekvencie iniciácie tvorby väzieb (Flory, 1953; Riggs a Rodriguez, 1967), a to pomocou iniciátora, ktorým je persulfátový radikál (Richards a Lecanidou, 1974). Zvýšenie frekvencie tvorby väzieb môže byť teda dosiahnuté zvýšením koncentrácie persulfátu, zvýšením koncentrácie katalyzátora tvorby radikálov (TEMED), alebo zvýšením teploty, ktorá zvyšuje disociáciu persulfátu na radikály (Gressel *et al.*, 1975; Riggs a Rodriguez, 1967). Hansen *et al.*, 1980 pozorovali zlepšenie rozpustnosti gélu vplyvom rôznych zlúčenín a usporiadaní experimentu vrátane zvýšenia koncentrácie persulfátu, TEMEDu a teploty a vytvorili rozpustné gély v širokom rozsahu koncentrácií 3,5 – 12,5 % polyakrylamidu. V tejto práci sme pre vytvorenie rozpustných gélov snažili dosiahnuť zvýšením koncentrácie TEMEDU a APS podľa návrhu Hansen *et al.*, 1980. Zvýšenie koncentrácií týchto látok je však spojené s problémami, veľké množstvo TEMEDu ako silnej báze má vplyv na pH použitého systému (Chrambach a Rodbard, 1972) a následná úprava pH má tiež nevýhody (Chrambach *et al.*, 1972). Zdá sa, že na vytvorenie úplne rozpustného gélu je potrebná kombinácia viacerých prístupov, dodržanie prísnych podmienok, dlhší čas pre optimalizáciu metódy, čo nebolo našou prioritou.

Ďalšie elektromigračné separačné metódy boli využité natívna a denaturačná izoelektrická fokusácia. Obidve metódy priniesli použiteľné výsledky, proteíny sa na géloch podarilo vizualizovať a mohli byť použité pre ďalšie spracovanie pomocou MS. Pri natívnej izoelektrickej fokusácii vidíme širokú distribúciu proteínov v oblasti  $\text{pH} = 7 - 3,6$ . Pomocou elektroforetickej mobility meranej v roztoku arabskej gummy bol izoelektrický bod arabskej gummy stanovený v oblasti  $\text{pH} = 2$  (Jayme *et al.*, 1999; Dror *et al.*, 2006; Atgié, 2018) a u arabinogalaktanových proteínov fazule (*Phaseolus vulgaris*) pri  $\text{pH} = 2,3$  (van Holst *et al.*, 1981). Migrácia je spôsobená hlavne kyselinou urónovou a proteínmi, ktoré sú pri  $\text{pH}$  vyššom ako izoelektrický bod záporne nabité (Manning, 2015), čo umožňuje ich pohyb do oblasti  $\text{pH}$  odpovedajúcej ich izoelektrickému bodu. Hodnota izoelektrického bodu GA uvádzaná v dostupnej literatúre je pomerne nízka, oproti migrácii proteínov v gély do oblasti  $\text{pH} = 7 - 3,6$  v našom prípade. Do úvahy je však treba brať použitú metódu i stále prítomné reťazce sacharidov na molekulách proteínov. Oproti pohybu iónu v roztoku je situácia zložitejšia v prípade, že elektroforéza prebieha na nosiči (napr. gély), kde je pre odpor prostredia rozhodujúca porozita nosiča, interakcia iónu s nosičom a ďalšie často neľahko popísateľné parametre (Káš *et al.*,

2006). Literatúru zaznamenávajúcu priamo izoelektrickú fokusáciu arabskej gummy sa dohľadať nepodarilo. Izoelektrická fokusácia arabinogalaktanových proteínov z repy (*Beta vulgaris* L.) rovnako zobrazuje bandy v menej kyslej oblasti, približne pH = 4 – 5 (Stohr *et al.*, 1996).

Druhou použitou chromatografickou metódou bola IEC na kolóne Enrich™ Q (5 x 50 mm) s pozitívne nabitou matricou – menič aniónov (anex). Elúcia prebehla zmenou iónovej sily pufru s použitím 10 mmol·l<sup>-1</sup> K-P pufru (pH = 7) s 1 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl. Frakcionáciou sme získali elučný profil vzorky GA-F a jednotlivé frakcie boli následne použité na frakcionáciu pomocou SEC. Použitím IEC chromatografie na frakcionáciu arabskej gummy v predchádzajúcich štúdiách sú zaznamenané zaujímavé výsledky z hľadiska otázky, podľa čoho je vlastne guma separovaná. IEC arabskej gummy *Acacia senegal* (Apolinar-Valiente *et al.*, 2019) a *Acacia seyal* (Apolinar-Valiente *et al.*, 2020) rozdelila arabskú guma na dve hlavné frakcie IEC-1 a IEC-2, pričom väčšina proteínového obsahu sa nachádzala vo frakcii IEC-1. Pri použití IEC separácie, by mali byť najviac záporne nabité makromolekuly najdlhšie zadržované na kolóne, a teda prvá eluovaná frakcia (IEC-1) by mala predstavovať nižší obsah negatívne nabitých makromolekúl, ktoré by interagovali s pozitívne nabitou matricou. Analýza aminokyselinového zloženia a kyseliny glukurónovej však ukazujú pravý opak. Frakcia IEC-1 vykazovala vyššie percento negatívne nabitých aminokyselín (kyseliny asparágová a glutámová) a kyseliny glukurónovej ako frakcia IEC-2. Poradie elúcie nezodpovedalo obsahu kyseliny glukurónovej ani v štúdiu Osman *et al.*, 1995, čoho dôvodom môže byť, že niektorým skupinám je sféricky bránené interakcii s povrchom matrice. Osman *et al.*, 1995 ďalej ohlasujú, že poradie elúcie nezodpovedá ani proteínovému obsahu vo frakciách. Výsledky teda ukazujú, že na separácia GA pomocou IEC závisí aj od sekundárnej štruktúry polypeptidovej kostry, ktorá je ovplyvnená povahou bočných reťazcov (Apolinar-Valiente *et al.*, 2020). Spojením IEC a SEC a následnou SDS-PAGE sa podarilo vizualizovať proteíny na gély, avšak pomocou MS neboli identifikované žiadne proteíny. Príčinou môže strata proteínov pri extrakcii peptidov z gélu a spracovaní vzoriek, nedostatok štiepných miest pre trypsín či prítomnosť sacharidových reziduí na molekulách proteínov.

Pre identifikáciu proteínov vo vzorkách arabskej gummy bola použitá kombinácia viacerých prístupov, frakcionácia pomocou kvapalinovej chromatografie, separácia SDS-PAGE či izoelektrická fokusácia s následnou analýzou pomocou nanoLC-MALDI MS/MS a nanoLC-ESI MS/MS. Prehľadávaním databázy SwissProt oproti celej ríši

zelených rastlín (*Viridiplantae*) boli vo vzorkách GA-F a GA-S identifikované úseky peroxidázy, avšak s malým vyhľadávacím skóre. Identifikované úseky boli najčastejšie homológy peroxidázy A2 z chrenu (*Armoracia rusticana*), fragmentu peroxidázy 2 z cykasu japonského (*Cycas revoluta*) a peroxidázy 73 z *Arabidopsis thaliana*. Prehľadávanie databázy SwissProt oproti rodu akácia neidentifikovalo žiadne sekvencie vyskytujúce sa priamo u akácií. Nízke vyhľadávacie skóre môže byť spôsobené prítomným sacharidmi naviazanými na molekuly proteínov, čo predstavuje komplikáciu pri meraní. Qi *et al.*, 1991 dokazujú glykozidové pripojenie na peptid cez hydroxyprolín, pričom uvádzajú, že len 12,1 % hydroxyprolínových rezíduí nebolo glykozylovaných vôbec, zatiaľ čo ostatné nesú krátke oligoglykozidy alebo väčšie sacharidové bloky. Sacharidové bloky je možné odstrániť, tzv. deglykozylácia arabskej gummy bola prevádzaná vo viacerými kolektívami (Akiyama *et al.*, 1984; Qi *et al.*, 1991; Mahendranetal *et al.*, 2008), avšak spomínané práce využívajú kyselinu HF, čo je látka so silne leptavými účinkami, ktorá leptá sklo a táto metóda by vyžadovala náročnejšie vybavenie, preto sme sa rozhodli pracovať s celou vzorkou gummy. Nízke vyhľadávacie skóre môže spôsobovať aj nedostatok štiepných miest pre trypsín (EC 3.4.21.4), ktorý sa vyznačuje špecifitou miesta štiepenia pre aminokyselinové zbytky lyzínu a arginínu (ak nenasleduje prolín) (Olsen *et al.*, 2004; Chamrád *et al.*, 2011).

Overenie prítomnosti peroxidázy vo vzorke gummy bolo prevedené natívnou PAGE pomocou farbiaceho roztoku obsahujúceho 1-chlór-4-naftol. Natívna elektroforéza a následné farbenie umožnilo vizualizáciu peroxidázy na gély (Obr. 26). Na pohyb peroxidázy v gély má vplyv veľkosť a náboj, ktoré môžu ovplyvňovať ďalšie prítomné zložky arabskej gummy, napr. sacharidové rezíduá naviazané na molekuly proteínov. Aktivita peroxidázy bola vypočítaná spektrofotometrickým meraním zmeny absorbancie v dôsledku premeny guajakolu na jeho oxidovanú formu v prítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reakcie ktorá je katalyzovaná peroxidázou. Vo vzorkách GA-S a GA-C sa nám peroxidázovú aktivitu týmito spôsobmi dokázať nepodarilo. Dôvodom môže byť rozdielne spracovanie vzoriek počas výrobného procesu v závislosti od následného využitia arabskej gummy v rôznych priemyselných odvetviach. Čo sa týka využitia GA v potravinárskom priemysle, špecifikácia pre arabskú gummy (E414) ako potravinového aditíva je definovaná Commission Regulation (EU) č. 231/2012. Toto nariadenie pojednáva o množstvách jednotlivých zložiek arabskej gummy pre jej bezpečné používanie. Revaluácia využitia arabskej gummy v potravinárskom priemysle Panelom EFSA pre prídavné látky v potravinách z roku 2019 podotýka, že v nariadení nie sú poskytnuté žiadne informácie

o oxidačných enzýmoch a zároveň odporúča, aby boli počas výrobného procesu oxidázy a peroxidázy prítomné v arabskej gume inaktivované, aby sa zabránilo nožnej oxidačnej degradácii zložiek v prípravkoch, do ktorých je arabská guma pridaná (EFSA/FAF, 2019). Literatúra potvrdzuje prítomnosť oxidačných enzýmov, špeciálne oxidáz a peroxidáz, v proteínovej časti arabskej gummy, ktoré môžu by ľahko inaktivované zahriatím arabskej gummy na 100°C na krátky čas (Leung a Foster, 2003). Podľa Glicksman a Sand, 1973 môžu oxidačné enzýmy prítomné v arabskej gume ničiť aktívnu zložku farmaceutických alebo výživových prípravkoch, ako to bolo preukázané pre vitamín A v emulznom oleji stabilizovanom arabskou gumou (Glicksman a Sand, 1973). Oxidácia amínov a fenolov (napr. eugenol, taníny, tymol, vanilín) peroxidázou prítomnou v arabskej gume vedie k vzniku farebných zlúčenín (Leung a Foster, 2003). Vzhľadom na vyššie uvedené odporúčania pre používanie arabskej gummy je preto možné, že peroxidázová aktivita bola vo vzorkách pri spracovaní zámerne inaktivovaná. Informácie o presnom zložení vzoriek sú však ťažko dostupné, bezpečnostný list arabskej gummy takéto informácie neposkytuje, preto rozdiely v spracovaní a zložení vzoriek GA-F, GA-S a GA-C nie sme schopní popísať.

Zapojenie AGP v procese androgenézy bolo opísané u jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) na prašníkovej kultúre (Makowska *et al.*, 2017). Proces androgenézy, v ktorom sa mikrospóry a mladé peľové zrná vyvinú do embrya, môže nastať za určitých stresových podmienok a na túto embryogenickú odpoveď mikrospór má vplyv mnoho endogénnych a exogénnych faktorov (Reynolds, 1997). Práve stres reprezentuje hlavný signál, ktorý môže prepnúť genetický program z gametofytického na sporofytický, takže dochádza k embryogenéze, zatiaľ čo sa vývoj fertilných peľových zrn zastaví (Touraev *et al.*, 1997). Proteomická a biochemická analýza kukuričných prašníkov po ošetrení chladom a indukcií androgenézy odhalila dôležitú úlohu antioxidantných enzýmov (Uváčková *et al.*, 2012). Medzi proteínmi, ktorých množstvo sa počas indukcie androgenézy zvýšilo (up-regulácia), bola identifikovaná MnSOD (superoxid dismutáza s mangánom) a askorbát peroxidáza, ktorá odstraňuje peroxid vodíka. Ďalšie proteomické štúdie odhalili, že bielkoviny indukované po oxidačnom strese (vrátane askorbát peroxidázy) boli spojené s vyššou aktivitou delenia buniek (Takáč *et al.*, 2011). V tejto práci bola vo vzorke arabskej gummy identifikovaná peroxidáza, ktorej rola kontroly oxidačného stresu či rola pri delení buniek, mohli byť jednou z príčin pozitívneho efektu GA na proces androgenézy v štúdií Makowska *et al.*, 2017.

## 6 ZÁVER

V teoretickej časti tejto diplomovej práce bola spracovaná literárna rešerš zameraná na arabskú gumu, konkrétne na proteínovú časť gummy. Časť práce bola venovaná popisu techník kvapalinovej chromatografie, ktoré prispeli k objasneniu štruktúry gummy a popisu identifikácie proteínov použitím hmotnostnej spektrometrie.

Experimentálna časť bola zameraná na separáciu vzoriek gummy pomocou chromatografických a elektromigračných metód a identifikáciu proteínov v gume. Obsah proteínov zmeraný BCA metódou sa pohyboval v rozmedzí približne 1,7 – 2,8 %. Použitím metód kvapalinovej chromatografie boli obdržané elučné profily vzoriek, pomocou SEC na kolóne Sephacryl S-200 HR alebo kombináciou IEC na kolóne Enrich™ Q (5 x 50 mm) a SEC na kolóne Enrich™ SEC 650 (10 x 300 mm). Separácia vzoriek prebehla v širokom rozpätí, čo potvrdzuje polydisperzitu gummy. Frakcie pozbierané z chromatografického delenia boli následne separované pomocou elektromigračných metód: SDS-PAGE, natívnej a denaturačnej izoelektrickej fokusácie. Všetky tri metódy sa ukázali ako použiteľné pre separáciu arabskej gummy, proteíny sa podarilo vizualizovať pomocou farbív Coomassie Brilliant Blue R-250 alebo Bio-Safe Coomassie Stain G-250. Komplikáciou však boli prítomné sacharidové rezíduá na molekulách proteínov, ktoré ovplyvňovali ich pohyb, a preto sa proteíny častokrát nezaostřili do ostrých pásov, ale do širších zón. Najvýraznejšie pásy boli vyrezané a identifikované pomocou kombinácie nanoLC-MALDI-MS/MS alebo nanoLC-ESI-MS/MS. Prehľadávanie spektier oproti databáze SwissProt vo vzorke GA-F a GA-S identifikovalo peroxidázu, avšak s malým vyhľadávacím skóre. Jednalo sa o homológy peroxidázy A2 z chrenu (*Armoracia rusticana*), fragmentu peroxidázy 2 z cykasu japonského (*Cycas revoluta*) a peroxidázy 73 z *Arabidopsis thaliana*. Peroxidáza bola potvrdená natívnou elektroforézou v polyakrylamidovom gély s následným farbením pomocou 4-chlór-1-naftolu, ktorý sa pôsobením peroxidázy v prítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxiduje na benzo-4-chlór-cyklohexadienón. Aktivita peroxidázy bola vypočítaná spektrofotometrickým meraním zmeny absorbancie v dôsledku premeny guajakolu na jeho oxidovanú formu tetraguajakol katalýzou peroxidázy v prítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Identifikácia peroxidázy v GA prispieva k pochopeniu možných mechanizmov zapojenia AGP arabskej gummy na proces androgenézy, ktorá dôležitým nástrojom v genetických a šľachtiteľských programoch, pretože androgénne embryá môžu vyprodukovať homozygotné diploidné rastliny (Touraev *et al.*, 1997). Identifikácia

d'alších proteínov v gume by mohla odhaliť príčiny pozitívneho efektu AGP arabskej gummy na proces androgenézy a prisieť k vyššej produkcii týchto rastlín. Táto práca popisuje frakcionáciu arabskej gummy pomocou metód kvapalinovej chromatografie, podáva informácie o využití elektromigračných metód na separáciu vzoriek a zaoberá sa identifikáciou proteínov gummy metódami hmotnostnej spektrometrie, čo by mohlo byť prínosom pre ďalšie štúdie venujúce sa tejto problematike.

## 7 LITERATÚRA

- Acosta-Garcia G., Vielle-Calzada J.P. (2004): A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2614-2628.
- Aebersold R., Mann M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.
- Akiyama K., Eda S., Kato K. (1984): Gum Arabic is a kind of arabinogalactan – protein. *Agricultural and Biological Chemistry* **48**, 235-237.
- Al-Assaf S., Phillips G., Williams P. (2005b): Studies on acacia exudate gums. Part II. Molecular weight comparison of the Vulgares and Gummiferae series of acacia gums. *Food Hydrocolloids* **19**(4), 661-667.
- Al-Assaf S., Phillips G.O., Williams P.A. (2005a): Studies on acacia exudate gums. Part I. The molecular weight of *Acacia senegal* gum exudate. *Food Hydrocolloids* **19**, 647-660.
- Ali A.A., Ali K.E., Fadlalla A., Khalid K.E. (2008): The effects of GA oral treatment on the metabolic profile of chronic renal failure patients under regular haemodialysis in Central Sudan. *Natural Product Research* **22**(1), 12-21.
- Anderson D.M.W., Dea I.C.M. (1968): Studies on uronic acid materials. Part XXV. Some unusual forms of the gum from *Acacia senegal* Willd. *Carbohydrate Research* **6**, 104-110.
- Anderson D.M.W., Dea I.C.M. (1971): Recent advances in the chemistry of acacia gums. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **22**, 61-76.
- Anderson D.M.W., Dea I.C.M., Karamalla K.A., Smith J.E. (1968): Studies on uronic acid materials. Part XXIV. An analytical study of different forms of the gum from *Acacia senegal* Willd. *Carbohydrate Research* **6**, 97-103.
- Anderson D.M.W., Hirst E., Stoddart J.F. (1966): Studies on uronic acid materials. Part XVII. Some structural features of *Acacia senegal* gum (gum arabic). *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1956-1966.
- Anderson D.M.W., Stoddart J.F. (1966): Studies on uronic acid materials. Part XV. The use of molecular-sieve chromatography in studies on *Acacia senegal* gum (gum arabic). *Carbohydrate Research* **2**, 104-114.
- Apolinar-Valiente R., Williams P., Nigen M., Tamayo V.M., Doco T., Sanchez C. (2019): Recovery, structure and physicochemical properties of an aggregate-rich fraction from *Acacia senegal* gum. *Food Hydrocolloids* **89**, 864-873.
- Apolinar-Valiente R., Williams P., Nigen M., Tamayo V.M., Doco T., Sanchez C. (2020): Fractionation of *Acacia seyal* gum by ion exchange chromatography. *Food Hydrocolloids*, **98**:105283.
- Atgié M. (2018): *Composition and structure of gum arabic in solution and at oil-water interfaces*. Dizertačná práca, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, Francúzsko.
- Azarkan M., Maquoi E., Delbrassine F., Herman R., M'Rabet N., Calvo Esposito R., Charlier P., Kerff F. (2020): Structures of the free and inhibitors-bound forms of bromelain and ananain from *Ananas comosus* stem and *in vitro* study of their cytotoxicity. *Scientific Reports* **10**(1):19570.
- Baldwin M.A., McLafferty F.W. (1973): Liquid chromatography-mass spectrometry interface-I: the direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer. *Organic Mass Spectrometry* **7**, 1111-1112.
- Baldwin T.C. (2002): Gum arabic: past, present and future. In: *Recent Progress in Medicinal Plants: Phytochemistry and Pharmacology II*. Vol 8., (Majundar D.K, Govil J.N., Singh V.K., eds.), Studium Press LLC, U.S.A., 410-418.
- Baldwin T.C., McCann M.C., Roberts K. (1993): A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. Purification and partial characterization. *Plant Physiology* **103**, 115-123.
- Banci L. (1997): Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology* **53**, 253-263.
- Banerjee S., Mazumdar S. (2012): Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* **2012**, 1-40.

- Bentham G. (1875): VII. Revision of the suborder Mimoseae. *Transactions of the Linnean Society of London* **30**(3), 335-664.
- Busch K.L. (1995): Desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **30**(2), 233-240.
- Cao J., Li X., Lv Y., Ding L. (2015): Comparative analysis of the phytoeyanin gene family in 10 plant species: a focus on *Zea mays*. *Frontiers in Plant Science* **6**, 515.
- Clarke A.E., Anderson R.L., Stone B.A. (1979): Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* **18**, 521-540.
- Coimbra S., Costa M., Jones B., Mendes M.A., Pereira L.G. (2009): Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis agp6 agp11* null mutants. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3133-3142.
- Connolly S., Fenyo J.C., Vandeveld M.C. (1988): Effect of a proteinase on the macromolecular distribution of *Acacia senegal* gum. *Carbohydrate Polymers* **8**, 23-32.
- Dass C. (2007): *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Wiley, Hoboken, New Jersey, U.S.A., 608 strán.
- Dastyeh M., Beňovská M., Breinek P., Bučková D., Gottwaldová J., Mikušková A. (2012): Hmotnostní spektrometrie. In: *Aplikované analytické a instrumentální techniky v laboratorní medicíně*. MU Brno, Brno, Česká republika, 86-102.
- de Hoffmann E., Stroobant V. (2007): *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed., Wiley, Hoboken, New Jersey, U.S.A., 502 strán.
- Defaye J., Wong E. (1986): Structural studies of gum arabic. The exudate polysaccharides from *Acacia senegal*. *Carbohydrate Research* **150**, 221-231.
- Doerge D.R., Divi R.L., Churchwell M.I. (1997) Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical Biochemistry* **250**, 10-17.
- Dror Y., Cohen Y., Yerushalmi-Rozen R. (2006): Structure of gum arabic in aqueous solution. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **44**(22), 3265-3271.
- Du H., Simpson R.J., Clarke A.E., Bacic A. (1996): Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glata*. *Plant Journal* **9**, 313-323.
- Du H., Simpson R.J., Moritz R.L., Clarke A.E., Bacic A. (1994): Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the styles of *Nicotiana glata* and characterization of a corresponding cDNA. *Plant Cell* **6**, 1643-1653.
- Dvořáková P., Hernychová L., Vojtěšek B. (2014): Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klinická Onkologie* **27**, 104-109.
- EFSA/FAF (2019): Opinion on the re-evaluation of acacia gum (E 414) as a food additive in foods for infants below 16 weeks of age and the follow-up of its re-evaluation as a food additive for uses in foods for all population groups. European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), *EFSA Journal* **17**(12):5922.
- Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A. (2009): *Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications*. Wiley, Hoboken, New Jersey, U.S.A., 388 strán.
- Ellis M., Egelund J., Schultz C.J., Bacic A. (2010): Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* **153**(2), 403-419.
- Elrayah H.H., Osman M.E., Al-Assaf S., Ali H.I. (2012): An overview of pre and post-harvest practices of gum arabic in Sudan. In: *Gum arabic*. (Kennedy J.F., Phillips G.O., Williams P.A., eds), RSC Publishing, Cambridge, United Kingdom, 29-38.
- Eriksson K.O., Belew M. (2011): Hydrophobic interaction chromatography. *Methods of Biochemical Analysis* **54**, 165-181.
- Evans A.J., Hood R.L., Oakenfull D.G., Sidhu G.S. (1992): Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat. *British Journal of Nutrition* **68**(1), 1217-1229.
- 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.
- Fincher G.B., Stone B.A., Clarke A.E. (1983): Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annual Review of Plant Physiology* **34**, 47-70.



- Flindt C., Al-Assaf S., Phillips G.O., Williams P.O. (2005): Studies of acacia exudates gums. Part V. Structural features of *Acacia seyal*. *Food Hydrocolloids* **9**(4), 687-701.
- Flory P.J. (1953): *Principles of polymer chemistry*. 1st ed., Cornell University Press, Ithaca, New York, 687 strán.
- Friedecký D., Lemr K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**(41), 152-157.
- Gao M., Showalter A.M. (1999): Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan-protein involvement. *Plant Journal* **19**, 321-331.
- Gaspar Y.M., Nam J., Schultz C.J., Lee L.Y., Gilson P.R., Gelvin S.B., Bacic A. (2004): Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactanprotein *AtAGP17* mutant (*rat1*) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. *Plant Physiology* **135**, 2162-2171.
- Ghosh S.S., Purkayastha S.K. (1962): Anatomical studies of wood and bark of *Acacia senegal* Willd. trees with special reference to gum exudation. *Indian Forester* **88**, 92-99.
- Glover D.A., Ushida K., Phillips A.O., Riley S.G. (2009): Acacia(sen) SUPERGUM™ (gum arabic): an evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids* **23** (8), 2410-2415.
- Gohlke R.S. (1959): Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Analytical Chemistry* **31**, 535-541.
- Goodrum L.J., Patel A., Leykam J.F., Kieliszewski M.J. (2000): Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins. *Phytochemistry* **54**, 99-106.
- Gressel J., Rosner A., Cohen N. (1975): Temperature of acrylamide polymerization and electrophoretic mobilities of nucleic acids. *Analytical Biochemistry* **69**, 83-91.
- Gross J.H. (2004): *Mass spectrometry a textbook*. 1st ed., Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 753 strán.
- Hansen J.N. (1976): Electrophoresis of ribonucleic acid on a polyacrylamide gel which contains disulfide cross-linkages. *Analytical Biochemistry* **76**(1), 37-44.
- Hansen J.N., Pfeiffer B.H., Boehnert J.A. (1980): Chemical and electrophoretic properties of solubilizable disulfide gels. *Analytical Biochemistry* **105**(1), 192-201.
- Hassan E.A., Al-Assaf S., Phillips G.O., Williams P.A. (2005): Studies on Acacia gums. Part III. Molecular weight characteristics of *Acacia seyal* var. *seyal* and *Acacia seyal* var. *fistula*. *Food Hydrocolloids* **19**(4), 669-677.
- Hillestad A., Wold J.K., Engen T. (1977): Water-soluble glycoproteins from *Cannabis sativa* (Thailand). *Phytochemistry* **16**(12), 1953-1956.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001): A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* **42**(5), 462-468.
- Hirst E.L., Jones J.K.N. (1958): The gums and mucilages in plants. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. (Ruhland W., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, 500-517.
- Hjertén S. (1973): Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **87**(2), 325-331.
- Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L. (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clinical Biochemist Reviews* **24**, 3-12.
- Hoefer R. (1994): Protein electrophoresis: applications guide. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California, U.S.A, 106 strán.
- Chamrád I., Strouhal O., Řehulka P., Lenobel R., Šebela M. (2011): Microscale affinity purification of trypsin reduces background peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of protein digests. *Journal of Proteomics* **74**(7), 948-957.
- Chaves I., Regalado A.P., Chen M., Ricardo C.P., Showalter A.M. (2002): Programmed cell death induced by (β-D-galactosyl)<sub>3</sub> Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum* **116**, 548-553.
- Chen C.-G., Pu Z.-Y., Moritz R.L., Simpson R.J., Bacic A., Clarke A.E., Mau, S.-L. (1994): Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*)

- cell suspension culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**(22), 10305-10309.
- Cheung A.Y., Wang H. and Wu H.-M. (1995): A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383-393.
- Chrumbach A., Hearing E., Lunney J., Rodbard D. (1972): Experimental validation of the predicted properties of a multiphasic buffer system applied to polyacrylamide gel electrophoresis. *Separation Science* **7**, 725-745.
- Chrumbach A., Rodbard D. (1972): Polymerization of polyacrylamide gels: efficiency and reproducibility as a function of catalyst concentrations. *Separation Science* **7**(6), 663-703.
- Churáček J. a kolektiv (1990): *Analytická separace látek*, 1. vydání, Státní nakladatelství technické literatury, Praha, Česká republika, 384 strán.
- Churms S.C., Merrifield E.H., Stephen A.M. (1983): Some new aspects of the molecular-structure of *Acacia senegal* gum (gum arabic). *Carbohydrate Research* **123**, 267-279.
- Idris O.H.M., Williams P.A., Phillips G.O. (1998): Characterisation of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*, **12**(4), 379-388.
- Islam A.M., Phillips G.O., Slijivo A., Snowden M.J., Williams P.A. (1997): A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids* **11**(4), 493-505.
- Izydorczyk M., Cui S.W., Wang Q. (2005): Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. In: *Food Carbohydrates*. 1st ed., (Cui S.W., ed.), CRC Press, Florida, U.S.A.
- Jayme M.L., Dunstan D.E., Gee M.L. (1999): Zeta potential of gum arabic stabilized oil-in-water emulsions. *Food hydrocolloids* **13**(6), 459-465.
- Johnson K.L., Jones B.J., Bacic A., Schultz C.J. (2003a): The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology* **133**, 1911-1925.
- Johnson K.L., Jones B.J., Schultz C.J., Bacic A. (2003b): Non-enzymic cell wall (glyco)proteins. In: *The Plant Cell Wall*. (Rose J., ed), Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, 111-154.
- Joseleau J-P., Ullmann G. (1990): Biochemical evidence for the site of formation of gum arabic in *Acacia senegal*. *Phytochemistry* **29**, 3401-3405.
- Jurasek P., Varga S., Phillips G.O. (1995): Classification of natural gums. VII. Relationships between the series Vulgares (*Acacia senegal*) and Gummiferae (*Acacia seyal*). *Food Hydrocolloids* **9**(1), 17-34.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Analytical chemistry* **60**, 2299-2301.
- Káš J., Kodíček M., Valentová O. (2006): *Laboratorní techniky biochemie*. 1.vydání, Vysoká škola technická v Praze, Praha, Česká Republika, 258 strán.
- Kašička V. (1997): Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* **91**, 320-329.
- Kieliszewski M.J., Lamport D.T.A. (1994): Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant Journal* **5**, 157-172.
- Kieliszewski M.J., O'Neill M., Leykam J., Orlando R. (1995): Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline-O-arabinosylation. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2541-2549.
- Kobayashi Y., Motose H., Iwamoto K., Fukuda H. (2011): Expression and genome-wide analysis of the xylogen-type gene family. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1095-1106.
- Lamport D.T., Kieliszewski M.J., Showalter A.M. (2006): Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytologist* **169**, 479-492.
- Lavery C.B., MacInnis M.C., MacDonald M.J., Williams J.B., Spencer C.A., Burke A.A., D'Cunha G.B. (2010): Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(15), 8471-8476.

- Lee K.J.D., Sakata Y., Mau S.L., Pettolino F., Bacic A., Quatrano R.S., Knight C.D., Knox J.P. (2005): Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **17**, 3051-3065.
- Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fischette-Lainé A.C., Gomord V., Faye L. (1998): N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology* **38**, 31-48.
- Leung A.T., Foster S. (1996): *Encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs, and cosmetics*. 2nd ed., Wiley, New York, U.S.A., 688 strán.
- Levitin B., Richter D., Markovich I., Zik M. (2008): Arabinogalactan proteins 6 and 11 are required for stamen and pollen function in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **56**, 351-363.
- Lewis B.A., Smith F. (1957): The heterogeneity of polysaccharides as revealed by electrophoresis on glassfiber paper. *Journal of the American Chemical Society* **79**, 3929-3931.
- Lopez-Torrez L., Nigen M., Williams P., Doco T., Sanchez C. (2015): *Acacia senegal* vs. *Acacia seyal* gums - Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocolloids* **51**, 41-53.
- Ma Y., Yan C., Li H., Wu W., Liu Y., Wang Y., Chen Q., Ma H. (2017): Bioinformatics prediction and evolution analysis of arabinogalactan proteins in the plant kingdom. *Frontiers in Plant Science* **8**, 66.
- Mahendran T., Williams P.A., Phillips G.O., Al-Assaf S., Baldwin T.C. (2008): New insights into the structural characteristics of the arabinogalactan - protein (AGP) fraction of gum arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 9269-9276.
- Makarov A. (2000): Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry* **72**, 1156-1162.
- Makowska K., Kałużniak M., Oleszczuk S., Zimny J., Czaplicki A., Konieczny R. (2017): Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **131**, 247-257.
- Manning H. (2015): *The fractionation of gum arabic using synthetic membranes*. Dizertačná práca, University of Bath, United Kingdom.
- Mantell C.L. (1954): Technology of gum arabic. In: *Natural plant hydrocolloids. Advances in Chemistry*. Vol. 11, American Chemical Society, Washington D.C., U.S.A, 20-32.
- Mashiguchi K., Asami T., Suzuki Y. (2009): Genome-wide identification, structure and expression studies, and mutant collection of 22 early nodulin-like protein genes in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**, 2452-2459.
- Maslin B.R., Miller J.T., Seigler D.S. (2003): Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* **16**, 1-18.
- Matsumoto N., Riley S., Fraser D., Al-Assaf S., Ishimura E., Wolever T., Phillips G.O., Phillips A.O. (2006): Butyrate modulates TGF- $\beta$ 1 generation and function: potential renal benefit for acacia(sen) SUPERGUM™ (gum arabic)? *Kidney International* **69**(2), 257-265.
- Mau S.-L., Chen C.-G., Pu Z.-Y., Moritz R.L., Simpson R.J., Bacic A., Clarke A.E. (1995): Molecular cloning of cDNAs encoding the protein backbones of arabinogalactan-proteins from the filtrate of suspension-cultured cells of *Pyrus communis* and *Nicotiana glauca*. *Plant Journal* **8**, 269-281.
- Mejia Tamayo V., Nigen M., Apolinar-Valiente R., Doco T., Williams P., Renard D., Sanchez C. (2018): Flexibility and hydration of amphiphilic hyperbranched arabinogalactan-protein from plant exudate: a volumetric perspective. *Colloids and Interfaces* **2**(1), 1-24.
- Mhinzi S.G. (2003): Intra-species variation of the properties of gum exudates from *Acacia Senegal* var. *Senegal* and *Acacia seyal* var. *fistula* from Tanzania. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* **17**(1), 67-74.
- Mika A., Lühje S. (2003): Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant physiology* **132**(3), 1489-1498.
- Mikeš O. a kolektiv (1980): *Laboratorní chromatografické metody*, 1. vydání, SNTL Nakladatelství technické literatury, Praha, Česká republika, 676 strán.
- Mirghani M.E.S., Elnour A.A.M., Kabbashi N.A., Alam M.Z., Musa K.H., Abdullah A. (2018): Determination of antioxidant activity of gum arabic: an exudation from two different locations. *ScienceAsia* **44**, 177-186.

- Montenegro M.A., Boiero M.L., Valle L., Borsarelli C.D. (2012): Gum arabic: more than an edible emulsifier. In: *Products and Applications of Biopolymers*. (Verbeek J., ed.), InTech, Rijeka, Croatia, 3-26.
- Motlagh S., Ravines P., Karamallah K.A., Ma Q. (2006): The analysis of acacia gums using electrophoresis. *Food Hydrocolloids*, **20**(6), 848-854.
- Motose H., Sugiyama M., Fukuda H. (2004): A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* **429**, 873-878.
- Motyka K., Hlaváč J. (2009): *Stručný přehled separačních metod*, 1. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika, 45 strán.
- Musa H.H., Ahmed A.A., Musa T.H. (2018): Chemistry, biological, and pharmacological properties of gum arabic. In: *Bioactive Molecules in Food*. (Mérillon J.-M., Ramawat K.G., eds.), Springer, Cham, Switzerland, 1-18.
- Nayak B.R., Rao N.M., Pattabiraman T.N. (1979): Studies on plant gums. Proteases in neem (*Azadirachta indica*) gum. *Journal of Biosciences* **1**(4), 393-400.
- Nigen M., Valiente R.A., Iturmendi N., Williams P., Doco T., Moine V., Massot A., Jaouen I., Sanchez C. (2019): The colloidal stabilization of young red wine by *Acacia senegal* gum: the involvement of the protein backbone from the protein-rich arabinogalactan-proteins. *Food Hydrocolloids*, 105176.
- Olsen J.V., Ong S.-E., Mann M. (2004): Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular and Cellular Proteomics* **3**(6), 608-614.
- Osman M.E., Menzies A.R., Martin B.A., Williams P.A., Phillips G.O., Baldwin T.C. (1995): Characterization of gum arabic fractions obtained by anion-exchange chromatography. *Phytochemistry* **38**, 409-417.
- Osman M.E., Williams P.A., Menzies A.R., Phillips G.O., Baldwin T.C. (1993): The molecular characterisation of the polysaccharide gum from *Acacia senegal*. *Carbohydrate Research* **246**, 303-318.
- Oxley D., Bacic A. (1999): Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan-protein from *Pyrus communis* suspensioncultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 14246-14251.
- Park M.H., Suzuki Y., Chono M., Knox J.P., Yamaguchi I. (2003): *CsAGP1*, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. *Plant Physiology* **131**, 1450-1459.
- Peč P. a kolektiv (2008): *Laboratorní cvičení z biochemie*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika, 100 strán.
- Pechanek U., Blaicher G., Pfannhauser W., Woidich H. (1982): Electrophoretic method for qualitative and quantitative analysis of gelling and thickening agents. *Journal Association of Official Analytical Chemists* **65**(3), 745-752.
- Pereira L.G., Coimbra S., Monteiro H.O.L., Sottomayor M. (2006): Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **223**, 374-380.
- Petřivalský M. a kolektiv (2010): Experimentální metody studia obranné reakce rostlin. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Olomouc, Česká republika, 105 strán.
- Prokopová I. (2007): *Makromolekulární chemie*. 2. vydání., VŠCHT Praha, Praha, Česká republika, 207 strán.
- Qi W., Fong C., Lamport D.T.A. (1991): Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope: a new model based on O-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology* **96**, 848-855.
- Randall R.C., Phillips G.O., Williams P.A. (1988): The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids* **2**, 131-140.
- Randall R.C., Phillips G.O., Williams P.A. (1989): Fractionation characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids* **3**(1), 65-75.
- Rehman K.U., Wingertzahn M.A., Teichberg S., Harper R.G., Wapnir R.A. (2003): Gum arabic (GA) modifies paracellular water and electrolyte transport in the small intestine. *Digestive Diseases and Sciences* **48**(4), 755-760.

- Renard D., Garnier C., Lapp A., Schmitt C., Sanchez C. (2012): Structure of arabinogalactan-protein from acacia gum: from porous ellipsoids to supramolecular architectures. *Carbohydrate Polymers* **90**, 322-332.
- Renard D., Lavenant-Gourgeon L., Ralet M.C., Sanchez C. (2006): *Acacia senegal* gum: continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio, molecular weight, and charges. *Biomacromolecules* **7**(9), 2637-2649.
- Renard D., Lepvrier E., Garnier C., Roblin P., Nigen M., Sanchez C. (2014): Structure of glycoproteins from acacia gum: an assembly of ring-like glycoproteins modules. *Carbohydrate Polymers* **99**, 736-747.
- Reynolds T.L. (1997): Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology* **33**, 1-10.
- Riggs J.P., Rodriguez F. (1967): Persulfate-initiated polymerization of acrylamide. *Journal of Polymer Science: Part A* **5**, 3151-3165.
- Richards E.G., Lecanidou R. (1974): Polymerization kinetics and properties of polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gels*. (Allen R.C., Maurer H.R., eds.), Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 16-22.
- Robertson E.F., Dannelly H.K., Malloy P.J., Reeves H.C. (1987): Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Analytical Biochemistry* **167**, 290-294.
- Sanchez C., Nigen M., Mejia Tamayo V., Doco T., Williams P., Amine C., Renard D. (2018): Acacia gum: history of the future. *Food Hydrocolloids* **78**, 140-160.
- Saulnier L., Brillouet J.-M. (1989): An arabinogalactanprotein from the pulp of grape berries. *Carbohydrate Research* **188**, 137-144.
- Seifert G.J., Roberts K. (2007): The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**(1), 137-161.
- Shevchenko A., Tomas H., Havliš J., Olsen J.V., Mann M. (2006): In gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**(6), 2856-2860.
- Shi H., Kim Y.S, Guo Y., Stevenson B., Zhu J.K. (2003): The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell* **15**, 19-32.
- Shimoni M., Reuveni R. (1988): A method for staining and stabilizing peroxidase activity in polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **175**(1), 35-38.
- Showalter A.M. (2001): Arabinogalactan-proteins: structure, expression, and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 1399-1417.
- Schultz C., Gilson P., Oxley D., Youl J., Bacic A. (1998): GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 426-431.
- Schultz C.J., Rumsewicz M.P., Johnson K.L., Jones B.J., Gaspar Y.M., Bacic A. (2002): Using genomic resources to guide research directions: the arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiology* **129**, 1448-1463.
- Simonian M.H. (2002): Spectrophotometric determination of protein concentration. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **4**(1), B1.3.1-B1.3.7.
- Smith F. (1939): The constitution of arabic acid. Part I. The isolation of 3-d-galactosido-1-arabinose. *Journal of the Chemical Society*, 744-753.
- Smith F., Montgomery R. (1959): The chemistry of plant gums and mucilages and some related polysaccharides, Reinhold, New York, U.S.A, 627 strán.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**(1), 76-85.
- Snowden M.J., Phillips G.O., Williams P.A. (1987): Functional characteristics of gum arabic. *Food Hydrocolloids* **1**(4), 291-300.
- Sommer-Knudsen J., Clarke A.E., Bacic A. (1996): A galactose-rich, cell-wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca*. *Plant Journal* **9**, 71-83.
- Stohr C., Snogerup L., Pennell R.I., Kjellbom P. (1996): An agarose gel electrophoresis method for the separation of arabinogalactan proteins. *The Plant Journal* **10**(5), 943-948.
- Street C.A., Anderson D.M.W. (1983): Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other acacia gum exudates. *Talanta* **30**, 887-893.

- Sun W., Kieliszewski M.J., Showalter A.M. (2004): Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant Journal* **40**, 870-881.
- Šamaj J., Baluška F., Volkmann D. (1998): Cell-specific expression of two arabinogalactan protein epitopes recognized by monoclonal antibodies JIM8 and JIM13 in maize roots. *Protoplasma* **204**, 1-12.
- Šňupárek J. (2014): Makromolekulární chemie: úvod do chemie a technologie polymerů. 3. vydání., Univerzita Pardubice, Pardubice, Česká republika, 187 strán.
- Takáč T., Pechan T., Šamaj J. (2011): Differential proteomics of plant development. *Journal of Proteomics* **74**(5), 577-588.
- Tan L., Qiu F., Lampert D.T., Kieliszewski M.J. (2004): Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 13156-13165.
- Tanaka K., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. (1987): Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*, 185-188.
- Tayefi-Nasrabadi H., Dehghan G., Daeihassani B., Movafegi A., Samadi A. (2011): Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* **10**(5), 751-763.
- Thermo Fisher Scientific (2010): Protein A280. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. Wilmington, Delaware, U.S.A., 32 strán.
- Tiss A., Carrière F., Verger R. (2001): Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. *Analytical Biochemistry* **294**(1), 36-43.
- Tonami H., Uyama H., Nagahata R., Kobayashi S. (2004): Guaiacol oxidation products in the enzyme-activity assay reaction by horseradish peroxidase catalysis. *Chemistry Letters* **33**(7), 796-797.
- Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. (1997): Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* **2**(8), 297-302.
- Trommer H., Neubert R.H. (2005): The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International Journal of Pharmaceutics* **298**(1), 153-163.
- Tsumuraya Y., Hashimoto Y., Yamamoto S. (1987): An arabinogalactan and an arabinogalactan-containing proteoglycan from radish (*Raphanus sativus*) seeds. *Carbohydrate Research* **161**, 113-126.
- Tsumuraya Y., Hashimoto Y., Yamamoto S., Shibuya N. (1984a): Structure of L-arabino-D-galactan-containing glycoproteins from radish leaves. *Carbohydrate Research* **134**(2), 215-228.
- Uváčková E., Takáč T., Boehm N., Obert B., Šamaj J. (2012): Proteomic and biochemical analysis of maize anthers after cold pretreatment and induction of androgenesis reveals an important role of anti-oxidative enzymes. *Journal of Proteomics* **75**(6), 1886-1894.
- van Hengel A.J., Roberts K. (2003): AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. *Plant Journal* **36**, 256-270.
- van Hengel A.J., van Kammen A., de Vries S.C. (2002): A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* **114**, 637-644.
- van Holst G.-J., Klis F.M., de Wildt P.J.M., Hazenberg C.A.M., Buijs J., Stegwee D. (1981): Arabinogalactan protein from a crude cell organelle fraction of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant physiology* **68**(4), 910-913.
- Vandeveld M.C., Fenyo J.C. (1985): Macromolecular distribution of *Acacia senegal* gum (gum arabic) by size-exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers* **5**, 251-271.
- Vidová V., Lemr K., Havlíček V. (2008): Současné trendy hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy* **102**, 957-959.

- Wapnir R.A., Sherry B., Codipilly C.N., Goodwin L.O., Vancurova I. (2008): Modulation of rat intestinal nuclear factor NF-kappaB by gum arabic. *Digestive Diseases and Sciences* **53**(1), 80-87.
- Whistler R.L., BeMiller J.N. (1993): *Industrial Gums*. 3rd ed., Academic Press, San Diego, California, U.S.A., 642 strán.
- Wilkesman J., Castro D., Contreras L., Kurz L. (2014): Guaiacol peroxidase zymography for the undergraduate laboratory. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **42**(5), 420-426.
- Williams P.A., Phillips G.O. (2000): Gum arabic. In: *Handbook of Hydrocolloids*. (Williams P.A., Phillips G.O., eds.), Woodhead Publishing Limited, New York, U.S.A, 155-168.
- Wrolstad R.E. (2004): *Handbook of food analytical chemistry: water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates*. Vol. 1, 1st ed., (Ronald E., Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D.M., Peter Sporns, eds.), Wiley, Hoboken, New Jersey, U.S.A., 784 strán.
- Yang J., Sardar H.S., McGovern K.R., Zhang Y., Showalter A.M. (2007): A lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis* is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. *Plant Journal* **49**, 629-640.
- Yariv J., Lis H., Katchalski E. (1967): Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* **105**(1), 1C-2C.
- Yariv J., Rapport M.M., Graf L. (1962): The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal* **85**(2), 383-388.
- Zhao J., Sakai K. (2003): Peroxidases are involved in biosynthesis and biodegradation of  $\beta$ -thujaplicin in fungal elicitor-treated *Cupressus lusitanica* cell cultures. *New Phytologist*, **159**(3), 719-731.
- Zhao Z.D., Tan L., Showalter A.M., Lamport D.T.A., Kieliszewski M.J. (2002): Tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein purified from transgenic tobacco corroborates the Hyp contiguity hypothesis. *Plant Journal* **31**, 431-444.

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

AA	akrylamid
ACN	acetonitril
AFM	mikroskopia atómových síl
AG	arabinogalaktan
AGP	arabinogalaktanové proteíny
APS	peroxodisíran amónny
BCA	kyselina bicínchonínová
BIS	<i>N,N'</i> -metylénbisakrylamid
BSA	hovädzí sérový albumín
DEAE	dietylamoetyl
DTT	DL-ditiotreitol
ESI	ionizácia elektrosprejom
EXT	extenzín
FPLC	rýchla proteínová kvapalinová chromatografia
GA	arabská guma
GAGP	glykoproteín arabskej gummy
GAP	polysacharid arabskej gummy
GLC	plynová rozdeľovacia chromatografia
GP	glykoproteíny
GPC	gélová permeačná chromatografia
GPI	glykozylfosfatidylinositol
HCCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyškoricová
HIC	hydrofóbna interakčná chromatografia
HRGP	glykoproteíny bohaté na hydroxyprolín
IAA	2-jódacetamid
ICR	iónová cyklotrónová rezonancia
IEC	iónová výmenná chromatografia
MALDI	laserová desorpcia a ionizácia za účasti matrice
MCS	viacbunkové štruktúry
MS	hmotnostná spektrometria
MS	hmotnostná spektrometria
nanoLC	nanoprietoková kvapalinová chromatografia



NMR	nukleárna magnetická rezonancia
PAGE	polyakrylamidová elektroforéza
$R_g$	polomer gyrácie
$R_h$	hydrodynamický polomer
SANS	malouhlový rozpad elektrónov
SDS	dodecylsírán sodný
SEC	vylučovacia chromatografia
SEC	veľkostne-vylučovacia chromatografia
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyletylendiamín
TFA	kyselina trifluóroctová
TOF	analyzátor doby letu
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometán