



**Posttranslační modifikace proteinů a jejich role v klíčení
rostlin**

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Mgr. Martin Černý, Ph.D.

Vypracoval:
Miroslav Berka

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Posttranslační modifikace proteinů a jejich role v klíčení rostlin

vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Martinovi Černému, Ph.D. za pomoc při vypracování této práce, za jeho cenné rady, odborné vedení v laboratoři, za jeho trpělivost a čas, který mi věnoval. Mé velké díky patří také pracovníkům Ústavu Molekulární biologie a radiobiologie za jejich přátelský přístup, vstřícnost a pomoc, kdykoliv jsem ji potřeboval. Nesmím opomenout také na pomoc rodiny, ať již psychickou či finanční, a také na podporu blízkých přátel a své přítelkyně, která se mnou měla trpělivost v průběhu psaní práce.

ABSTRAKT

Posttranslační modifikace proteinů představují komplexní rozšíření diverzity proteomu a poskytují na transkripci nezávislou kontrolu buněčných procesů. Tato práce s názvem „Posttranslační modifikace proteinů a jejich role v klíčení rostlin“ stručně pojednává o hlavních posttranslačních modifikacích, blíže rozebírá roli fosforylace proteinů v regulačních cestách rostlin a shrnuje obohacovací techniky využívané ve fosfoproteomice. Experimentální část popisuje vývoj a optimalizaci metod, které mohou být využity v monitorování posttranslačních modifikací v průběhu klíčení obilky ječmene (*Hordeum vulgare* L.), včetně frakcionace pletiv, ekvalizace proteomu a frakcionačních technik peptidů. Na závěr byly tyto metody použity při analýze účinku peroxidu vodíku na klíčení semen. Celkově bylo v jednotlivých frakcích identifikováno přes 1 400 proteinů. Kvantitativní profily byly stanoveny pro více než 880 proteinů (~60 %) a validované proteiny s rozdílně změněným množstvím by mohly objasnit potencionální mechanismus stimulačního účinku peroxidu vodíku. Peptidy, které by odpovídaly identifikovaným fosfoproteinům obilky, byly v tomto experimentu z velké většiny nezměřitelné a jejich kvantifikace by vyžadovala optimalizovanou cílenou analýzu.

Klíčová slova: proteom, klíčení, peroxid vodíku, frakcionace, hmotnostní spektrometrie, *Hordeum vulgare*

ABSTRACT

Protein posttranslational modification represents a complex extension of proteome diversity and provides a transcription-independent control of cellular processes. This thesis "Protein posttranslational modifications and their role in seed germination" briefly reviews major posttranslational modifications, highlights the role of protein phosphorylation in plant regulatory circuits, and summarises enrichment techniques that are employed in phosphoproteomics. The experimental part describes the development and optimisation of methods that can be utilised in a monitoring of protein posttranslational modifications during barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination, including a tissue fractionation, proteome equalisation and peptide fractionation techniques. Finally, these methods were employed in an analysis of hydrogen peroxide effect on seed germination. In total, over 1,400 proteins were identified in individual fractions, quantitative profiles were established for more than 881 (~60%) and the validated differentially abundant proteins could indicate a potential mechanism behind the peroxide stimulatory effect. Peptides that would correspond to the identified seed phosphoproteins were mostly inaccessible in this experiment and would require optimised targeted analysis.

Key words: proteome, germination, hydrogen peroxide, mass spectrometry, fractionation, *Hordeum vulgare*

OBSAH

1 Úvod a cíl práce	8
2 Literární přehled	9
2.1 Posttranslační modifikace	9
2.2 Fosforylace.....	10
2.2.1 Role fosforylací v regulačním mechanismu	11
2.3 Obohacovací techniky ve fosfoproteomice.....	13
2.3.1 Přehled základních obohacovacích a prefrakcionačních technik	14
2.4 Role PTM v průběhu klíčení rostlin	18
3 Materiál a metodika	20
3.1 Materiál	20
3.2 Extrakce a frakcionace proteinů	20
3.2.1 Aceton/TCA/fenol	20
3.2.2 Nativní extrakce.....	21
3.2.3 Laemmliho pufr	21
3.3 Štěpení proteinů, frakcionace peptidů a příprava pro LC-MS analýzu	22
3.3.1 Štěpení v roztoku	22
3.3.2 Frakcionace proteomu pomocí ACN gradientu.....	22
3.3.3 TiO ₂ frakcionace.....	23
3.3.4 Štěpení v gelu a přenos peptidů.....	24
3.4 LC-MS analýza a zpracování naměřených dat	24
3.4.1 q-TOF – profilování	24
3.4.2 LESA-MS analýza.....	25
3.4.3 TSQ Quantiva – cílená analýza	26
4 Výsledky a diskuze	27
4.1 Využití frakcionačních a separačních metod	27
4.1.1 Frakcionace na úrovni proteinů – ProteoMiner.....	27

4.1.2	Frakcionace na úrovni peptidů – ACN gradient.....	29
4.1.3	Přenos peptidů a LESA analýza	30
4.1.4	Frakcionace na úrovni pletiv	32
4.2	Testování metod pro obohacování fosfoproteomu	33
4.3	Proteomická analýza klíčení obilok ječmene.....	35
4.3.1	Identifikované fosfoproteiny a jejich změny v průběhu klíčení	40
5	Závěr	42
6	Použitá literatura	44
7	Použité zkratky	49
8	Seznam použitých obrázků	51
9	Přílohy.....	52

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

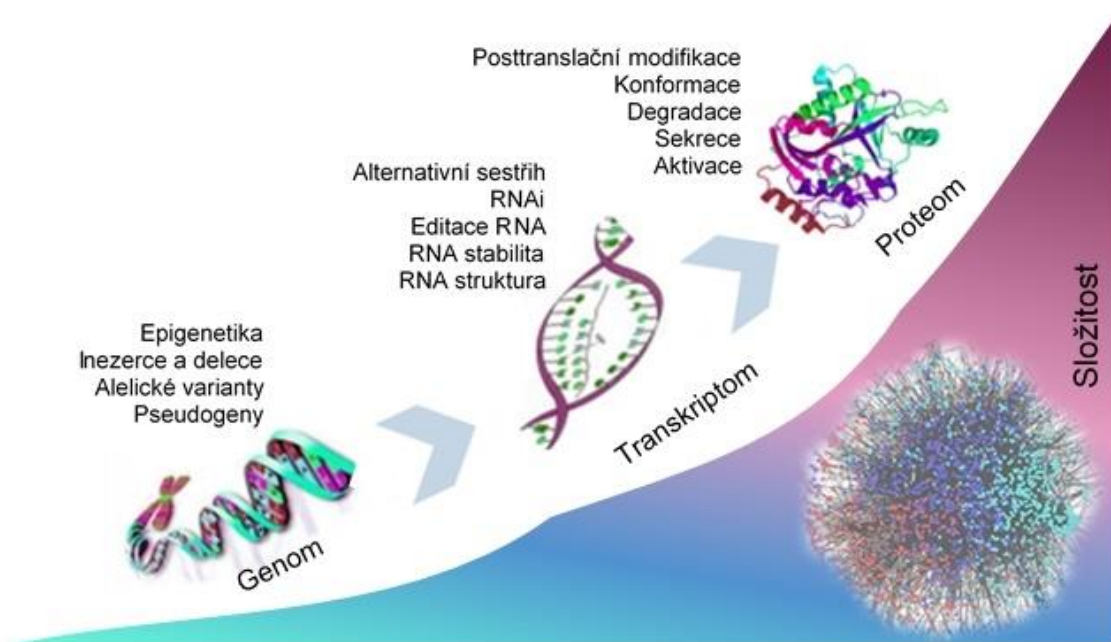
Klíčení je kritickým bodem v životě rostlin. Ke studiu buněčných procesů a změn, k nimž dochází v jeho průběhu, můžeme přistupovat na několika úrovních. Pokud bychom se zaměřili pouze na oblast exprese genů, tak můžeme využít sledování hladin mRNA, či analýzu proteinů a monitorování změn v proteomu. I když se tyto metody mohou zdát jako rovnocenné, právě proteomika se blíží více k realitě. Transkriptomika totiž nabízí pouze náhled na spektrum mRNA nacházejících se v buňce bez informace, zda je daná mRNA ve sledovaném okamžiku translatována nebo ne. Navíc v případě klíčení obilky jsou první proteiny translatovány především z mRNA uložené během maturace a k transkripci nové mRNA dochází až v pozdních fázích klíčení. Studium proteinů přináší ovšem svá úskalí, která spočívají například ve značně zvýšené diverzitě proteomu oproti transkriptomu nebo příslušného genomu. Jednou z příčin jsou posttranslační modifikace, které velkou měrou ovlivňují funkce proteinů, a proto je jejich studium v průběhu klíčení cílem této bakalářské práce.

Z širokého spektra známých modifikací byla vybrána fosforylace, která patří mezi ty lépe prostudované a z literatury je známo, že se podílí na procesech spojených s klíčením rostlin (Bewley et al., 2013). Prvním cílem práce byla literární rešerše, která by přiblížila význam fosforylace proteinu a popsala známé metody obohacování fosfoproteomu. Druhým cílem bylo vyzkoušení metod frakcionace proteomu a identifikovat proteiny, které jsou modifikované. Jako třetí cíl bylo předpokládáno monitorování těchto modifikovaných proteinů a jejich změn v průběhu klíčení.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Posttranslační modifikace

Po translaci proteinů dochází často k posttranslačním modifikacím (PTM), které jsou enzymaticky katalyzovány nebo vznikají spontánními chemickými reakcemi. PTM mohou měnit velikost, náboj, strukturu a konformaci proteinů, což může vyústit ve změnu vlastností proteinů, jakými jsou enzymová aktivita, vazebná afinita nebo hydrofobicita. PTM mohou nejen přímo měnit funkce proteinů, ale mohou také nepřímo ovlivnit proteinovou přeměnu (Clark et al., 2005). Jednotlivé proteiny mohou podstoupit násobné PTM stejného i rozdílného typu. PTM lze zjednodušeně rozdělit na dvě skupiny. První skupinu PTM zahrnují kovalentní modifikace postranních řetězců, které jsou z pohledu chemické povahy reakce obvykle elektronově bohaté a vystupují často jako nukleofily (Walsh et al. 2005). Druhou skupinu představují změny na úrovni peptidové vazby, jakou je například tvorba isopeptidové vazby nebo kovalentní štěpení peptidové vazby vzniklé působením proteáz, anebo autokatalytickým štěpením (Walsh et al., 2005). V posledních desetiletích bylo zjištěno, že proteom je mnohem komplexnější než k němu příslušný genom, a právě PTM představují jednu z příčin zvýšení dynamické složitosti proteomu živých buněk (Obr. 1). Identifikace a mapování PTM se v posledních letech dramaticky zlepšily, zejména díky neustálému zvyšování citlivosti, rychlosti, přesnosti a rozlišení hmotnostní spektrometrie (MS) (Černý et al., 2013). Nicméně pro identifikaci

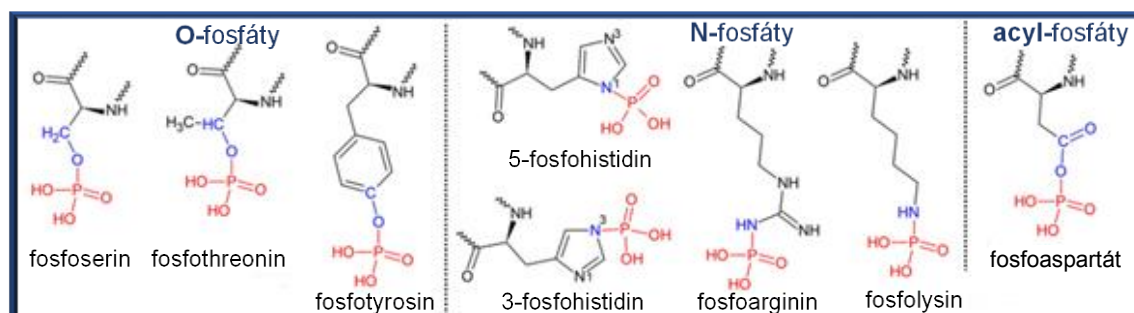


Obr. 1: Procesy vedoucí k řádovým rozdílům mezi počtem protein-kódujících genů a počtem výsledných unikátních proteinů a jejich lokalizací. Upraveno dle Barallobre-barreiro et al. (2013).

posttranslačně upravených proteinů nebo proteinů vyskytujících se v malém množství je jednoduchá MS analýza většinou nedostačující. Proto je pro studium posttranslačně modifikovaných proteinů často nutné zvolit vhodnou separaci, frakcionaci nebo vhodné obohacení proteomu. Analýzu neusnadňuje ani samotný počet možných modifikací, protože pomocí hmotnostní spektrometrie bylo identifikováno více než 1 000 rozdílných proteinových modifikací. Některé z nich mohou být ovšem umělé jako například oxidace methioninu a cysteinu během 2D elektroforézy, karbamylace vzniklá působením močoviny nebo modifikace vzniklé při MS analýze (konverze fosfoserinu na dehydroalanin díky neutrální ztrátě kyseliny fosforečné) (Černý et al., 2013). Z dnešního pohledu patří mezi nejvýznamnější modifikace fosforylace, glykosylace, metylace, acetylace, deamidace, ubiquitinace a různé varianty redoxních modifikací. Hlubší diskuze této selekce by byla zcela nad rámec bakalářské práce, proto se následující text zaměří na fosforylaci, která byla zahrnuta i do experimentální části této práce.

2.2 Fosforylace

První fosforylaci proteinu objevili v roce 1906 Leven a Alsberg na proteinu vaječného žloutku vitelinu (Collins et al., 2007). Teprve však po více než 50 letech Fischer a Krebs popsali jednu z funkcí reversibilní fosforylace, která spočívá v regulaci buněčných mechanismů, za což později obdrželi Nobelovu cenu. Cílem studia fosfoproteomiky je pomocí identifikace fosfoproteinů, následné kvantifikace fosforylací a přesného mapování fosforylovaných míst odhalit biologické funkce jednotlivých fosforylací (Kersten et al., 2006). Celkově může být fosforylováno minimálně osm aminokyselin (Obr. 2). V eukaryotických buňkách jsou převážně fosforylovány aminokyselinové zbytky serinu (Ser) a threoninu (Thr), a to v přibližném poměru

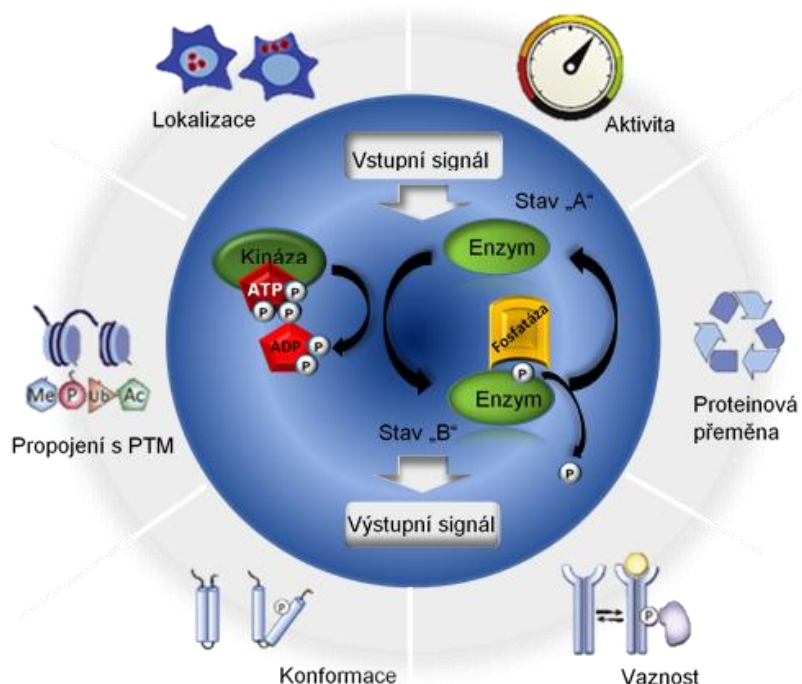


Obr. 2: Fosforylace nacházející se v proteinech. Na aminokyselinových zbytcích Ser, Thr a Tyr jsou vytvářeny O-fosfáty; N-fosfáty jsou tvořeny na aminokyselinových zbytcích Lys, His a Arg; acyl-fosfáty byly nalezeny pouze u Asp. Pro úplnost je vhodné dodat, že aminokyselinový zbytek cysteinu může být jako meziproduct enzymatické katalýzy fosforylován, ale tato vazba je pouze přechodná, a proto se obvykle neřadí mezi PTM (Černý et al., 2013), upraveno.

1 800 (pSer)/200 (pThr) (Li et al., 2016). Při běžných studiích nejsou fosforylace na N-fosfátech často detekovány z důvodu nestability vazby fosfátu na atom dusíku v kyselých roztocích, ale je stále více zřejmé, že jsou významné v mnoha regulačních mechanismech (Ciešla et al., 2011). Stabilita acyl-fosfátů je ještě nižší, hrají ovšem důležitou roli v signalizačních drahách (Černý et al., 2013). Předpokládá se, že průměrný protein může být fosforylován až na pěti rozdílných místech (Olsen et al., 2010). Více fosforylačních míst se nachází v bezstrukturních doménách (Tyanova et al., 2013) a na rozhraních proteinových komplexů (Nishi et al., 2011), a tudíž může fosforylace vyústit i v částečnou změnu struktury proteinu. Genom modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) obsahuje dle predikcí více než 1 000 proteinkináz (Champion et al., 2004), což ukazuje důležitost fosforylace v regulačních procesech rostlin (López-Pedrouso et al., 2014).

2.2.1 Role fosforylací v regulačním mechanismu

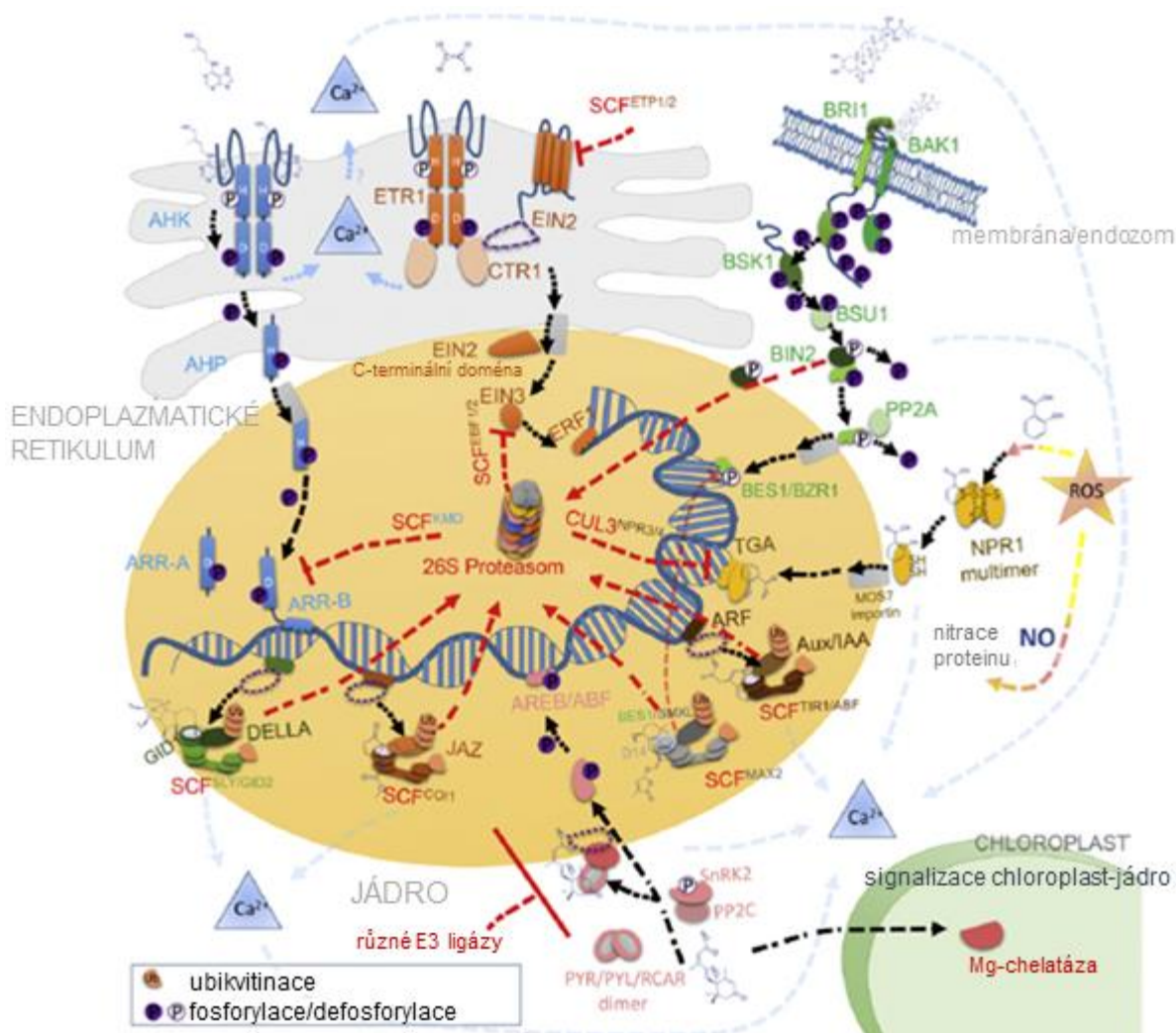
Mnohobuněčný organismus vyžaduje ke svému přežití rychlé reakce jak na interní, tak i na externí signály. Jako jedny z přenašečů signálů mohou sloužit PTM, díky své rychlé a reversibilní povaze, relativně nízké energetické náročnosti a schopnosti modulovat cílené proteiny (Humphrey et al., 2015). Fosforylace jsou zahrnuty do velké části buněčných procesů. Jsou známy dva hlavní mechanismy kontroly proteinů pomocí



Obr. 3: Jednoduché schéma mechanismu reversibilní fosforylace modulující rozmanité proteinové funkce a vlastnosti (Humphrey et al., 2015), upraveno.

fosforylací, a to změnou protein-proteinových interakcí nebo změnou konformace proteinů (Obr. 3; Humphrey et al., 2015). To je dosaženo pomocí kovalentního připojení γ -fosfátové skupiny ATP na postranní řetězec daných aminokyselin pomocí proteinkináz, či naopak jejího odstranění pomocí proteinfosfatáz (Johnson, 2009). Zatímco fosforylace proteinů bývá přičítána výhradně katalytické aktivitě enzymů, jejich defosforylace může být způsobena i neenzymatickou cestou například v průběhu stárnutí proteinů (Černý et al., 2013).

I když by se mohlo zdát, že poměrně jednoduchý přepínací systém na úrovni molekul vyústí v poměrně jednoduché a lehce srozumitelné signalizační dráhy, opak je pravdou. Signalizační dráhy vytváří sofistikovaný systém, který je zde popsán na příkladu signalizace rostlinných hormonů. Na kanonické cytokininové signalizaci lze demonstrovat postupnou fosforylací vedoucí k aktivaci regulátorů spouštějících expresi genů (Obr. 4). Cytokiny se váží na AHK receptory, což vede k autofosforylaci histidinkinázové domény a následně k přenosu fosfátu na kovalentně spojenou



Obr. 4: Zjednodušený přehled signálních drah fytohormonů (Černý et al., 2016).

přijímačovou doménu s následnou fosforylací AHP fosfotransferových proteinů, které jsou přesunuty do jádra, kde předají fosfát ARR regulátorům typu B (Kieber a Schaller, 2014). ARR regulátory typu B poté regulují expresi cílových genů odpovědi na cytokininy (Černý et al., 2016). Kromě ARR typu B jsou fosforylovány i regulátory ARR typu A, které spolu s dalšími faktory zpětně inhibují cytokininovou signalizaci (Kieber a Schaller, 2014), čímž je vytvořen velmi flexibilní regulační systém.

Přenos signálu pomocí fosforylace je klíčový nejen v signalizaci cytokininů, ale také brassinosteroidů nebo ethylenu (viz Obr. 4), navíc fosforylace často předchází ubikvitinaci v procesu degradace proteinů ubikvitin-proteazomovou dráhou (Černý et al., 2016). Mnoho proteinkináz a fosfatáz se účastní i v signalizaci kyseliny abscisové (ABA), která reguluje klíčení rostlin (Fujii et al., 2009). Příkladem je 2C proteinfosfatáza (PP2C) a proteinkináza SnRK2.2 (SNF-1related protein kinase 2.2), které patří mezi tři hlavní komponenty v signalizační dráze ABA u *Arabidopsis thaliana* spolu s PYR/PYL/RCAR receptorem (Yoshida et al., 2015).

2.3 Obohacovací techniky ve fosfoproteomice

Fosforylace je dobrý model pro demonstraci obecných metod obohacování PTM, jelikož využívá prakticky všech základních přístupů. V buňkách je hladina většiny signálních proteinů velmi nízká, a navíc množství fosforylovaných proteinů může být v daném okamžiku malé, tudíž je i přes relativně vysoké citlivosti moderních hmotnostních spektrometrů velmi nízká pravděpodobnost detekce fosfopeptidů při standardní MS analýze (Černý et al., 2013). Detekce fosfopeptidů je dále snížena díky nižší účinnosti ionizace fosfopeptidů oproti odpovídajícím nefosforylovaným peptidům, a navíc při běžně používané kolizně indukované disociaci (CID) dochází k odlišné fragmentaci. Pro studium fosforylací je tedy nejprve nutné zvládnout obohacovací techniky, ať již na úrovni fosfoproteinů nebo fosfopeptidů. Obě strategie mají své výhody i nevýhody. Nevýhoda obohacování o intaktní proteiny spočívá v nižší specifitě, což je způsobeno větší složitostí struktur proteinů v porovnání s peptidy, výhoda ovšem spočívá v možnosti identifikace fosfoproteinů díky přítomnosti lépe detekovatelných nefosforylovaných peptidů (Fíla a Honys, 2012). Naproti tomu u obohacovacích technik fosfopeptidů je možnost identifikace omezena mimo jiné i proto, že často identifikovaný fosfopeptid nemusí mít unikátní sekvenci, a pak nelze jednoznačně určit, z jakého proteinu pochází. Mezi výhody ovšem patří méně komplexní trojrozměrná struktura, a tím pádem snížená nespecifita obohacování oproti fosfoproteinům, a navíc nejsou

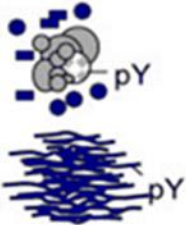
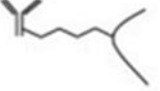
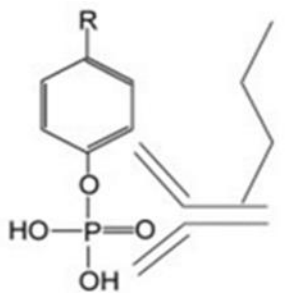
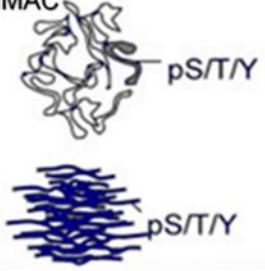
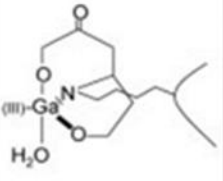
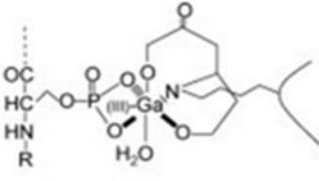


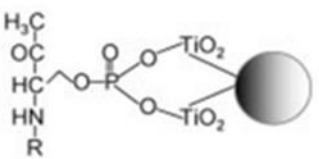

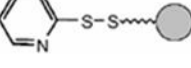
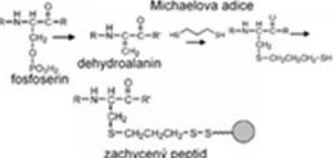

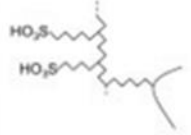
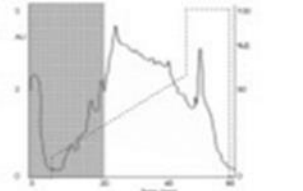

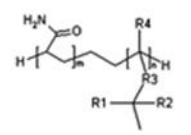
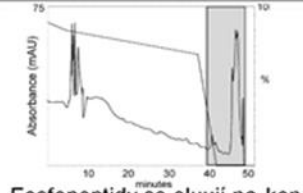
znevýhodněny malé, lipofilní a extrémně kyselé nebo bazické proteiny (Fíla a Honys, 2012). U fosfopeptidů mohou být snáze využity i chromatografické metody (např. ionexová chromatografie), které mohou sloužit k prefrakcionaci komplexního proteinového vzorku. Přístupy pro obohacování fosfopeptidů jsou navíc více využívány oproti technikám pro fosfoproteiny a bylo z nich získáno více experimentálních dat.

2.3.1 Přehled základních obohacovacích a prefrakcionačních technik

Vzhledem k obrovskému vývoji v oblasti izolace fosfoproteomu není výčet používaných technik úplný, ale jedná se o nejčastěji používané obohacovací a frakcionační techniky ve fosfoproteomice. Jejich celkové shrnutí je znázorněno na Obr. 5. Mezi metody sloužící pro obohacení vzorku patří afinitní metody, chemické modifikace a metody využívající protilátky. Ionexová chromatografie nebo hydrofilní interakční chromatografie jsou užívány spíše pro prefrakcionaci vzorků. Většinu z uvedených metod lze použít s určitými výhodami i nevýhodami pro obohacování směsi jak o fosfopeptidy vzniklé v průběhu proteolytického štěpení, tak i o fosfoproteiny.

2.3.1.1 Ionexová a hydrofilní interakční chromatografie

Ionexová chromatografie separuje látky na základě jejich nábojového stavu. Využívá se typu SCX (strong cation exchange; Obr. 5E), jelikož při nízké hodnotě pH mají fosfopeptidy v porovnání s nemodifikovanými peptidy nižší náboj (díky fosfátové skupině) a v solném gradientu se tak eluují dříve (Collins et al., 2007). Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC; Obr. 5F) je varianta klasické chromatografie využívající polární stacionární fázi a nepolární nebo méně polární mobilní fázi. Jako mobilní vodno-organické fáze se nejčastěji využívá směs acetonitrilu a vody, přičemž je eluce na rozdíl od reversní kapalinové chromatografie prováděna snižující se koncentrací acetonitrilu (Leitner, 2016). Analyty jsou tedy rozdělovány na základě jejich hydrofobicity, přičemž více polární sloučeniny se eluují později. Fosfopeptidy jsou obvykle hydrofilní a nabité, a tudíž budou s hydrofilní stacionární fází interagovat silněji. V důsledku toho by frakce na konci gradientu měly být obohaceny o fosfopeptidy. Jak již bylo zmíněno, jde o metody pouze prefrakcionační, jelikož fosfopeptidy nejsou v daných frakcích jedině, a je proto nutné použít další obohacovací techniky.

Počáteční materiál	Reagent	Interakce	Eluce
<p>A) Imunopurifikace (Fosfoprotein/peptid)</p> 	<p>Protilátky proti pTyr</p> 		<p>150mM fenylfosfát 0,15% TFA</p>
<p>B) Protein/peptid IMAC</p> 	<p>Imobilizovaný kov (Galium)</p> 		<p>Hydroxid amonný pH 10 100 mM EDTA</p>
<p>C) MOAC</p> 	<p>Kuličky oxidu titaničitého</p> 	 <p>+ kyselina mléčná, nižší pH</p>	<p>Hydroxid amonný pH 11</p>
<p>D) Chemická modifikace</p> 	<p>Dithiopyridinový resin</p> 	<p>Michaelova adice</p>  <p>fosfoserin → dehydroalanin → zachycený peptid</p> <p>Modifikace a následné zachycení fosfopeptidů na matici</p>	<p>Redukce pomocí DTT nebo 2-merkapt ethanolu</p>
<p>E) SCX</p> 	<p>Poly(2-sulfoethyl Aspartemid)-silikagel</p> 	 <p>Fosfopeptidy se eluují na začátku gradientu (šedá oblast)</p>	<p>Eluce pomocí solí nebo pH gradientu</p>
<p>F) HILIC</p> 	<p>TSKgel Amide-80</p> 	 <p>Fosfopeptidy se eluují na konci gradientu (šedá oblast)</p>	<p>Eluce pomocí zvyšujícího se obsahu vody v mobilní fázi</p>

Obr. 5: Příklad frakcionačních a obohacovacích technik ve fosfoproteomice (Collins et al., 2007, upraveno).

2.3.1.2 Chemické modifikace

Princip chemické modifikace (Obr. 5D) spočívá v modifikaci fosfátové skupiny pro umožnění vzniku kovalentní vazby na stacionární fázi nebo připojení afinitní značky (Li et al., 2016). Nejvíce užívaná je β -eliminace, která je založena na odstranění fosfátové skupiny ze serinu a threoninu za silně alkalických podmínek a následovaná Michaelovou adicí na nově vzniklou dvojnou vazbu v postranním řetězci dehydroalaninu resp. kys. dehydroaminomáselné (Leitner, 2016). Nevýhodou těchto technik je možná nespécifičnost reakce (např. náhrada sulfátové skupiny) a neúplný průběh reakcí vedoucí ke ztrátám a ke zvýšení složitosti vzorku (Yang et al., 2014).

2.3.1.3 Imunoprecipitace

Jak již vypovídá název metody, využívá imunoprecipitace (Obr. 5A) schopnosti protilátek specificky vázat látky s různorodými epitopy. Protilátky mohou být cíleny proti specifickým peptidovým sekvencím a být tak využity k imunoprecipitaci cílových fosfoproteinů nebo může být specifita protilátek zvýšena zaměřením na konsenzuální sekvence motivů kináz (Collins et al., 2007). Další možností je využití protilátek cílených proti příslušným fosforylovaným aminokyselinám, které jsou zároveň nezávislé na okolních aminokyselinových sekvencích. Toho se především využívá k vychytávání a detekci méně častých fosforylací na tyrosinu (Tyr), kdy následně může být provedena analýza pomocí specifického MS skenovacího módu cíleného na fosfotyrosin (Collins et al., 2007). Protilátky proti fosfoserinu a fosfothreoninu se dnes téměř nepoužívají, to je způsobeno jejich nižší specifitou (oproti fosfotyrosinovým) a nízkou dostupností funkčních protilátek.

2.3.1.4 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC; Obr. 5B) se primárně používá až po rozštěpení proteinu k zachycení fosfopeptidů. Princip metody spočívá ve využití afinity záporně nabitých fosfátových skupin ke kladně nabitým iontům kovu (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Zr^{4+} , Ti^{4+}) připojených k nosiči, kterým mohou být magnetické kuličky, stacionární fáze chromatografické kolony nebo i MALDI destička (Yang et al., 2014). Kvůli minimalizaci interference nefosforylovaných aminokyselinových zbytků by se mělo pH nanášecího a promývacího pufru pohybovat v rozmezí udržující karboxylové skupiny peptidů protonované a fosfátové skupiny deprotonované. Protonace všech kyselých aminokyselin (např. kyseliny asparagové a glutamové) může být dosaženo při velmi nízké hodnotě pH (pH = 1–1,5) (Fila a Honys, 2012), ale velmi nízká hodnota pH

může způsobit uvolnění iontů kovu z matrice (Negroni et al., 2012), proto je zvolené pH kompromisem mezi selektivitou a mírou zachycených fosfopeptidů. Součástí nanášecích a promývacích pufrů je tedy často kyselina trifluoroctová (TFA) nebo například kyselina mravenčí spolu s acetonitrilem, který slouží k potlačení nespecifických hydrofobních interakcí peptidů s matricí. Pro eluci zachycených fosfopeptidů se obvykle používá roztok hydroxidu amonného (pH 10–11), EDTA, roztoky fosfátových solí nebo kyseliny fosforečné (Thingholm a Larsen, 2016).

Pro účinnou IMAC by měly být při extrakci proteinů odstraněny všechny stopy nukleových kyselin, které působí jako kontaminanta vážící se na vazebnou matrici, což vyústí ve ztrátu fosfopeptidů (Li et al., 2009). Při použití IMAC se nedoporučuje použití močoviny, která se běžně používá jako denaturační činidlo, kvůli zvýšené tendenci indukovat deamidace a karbamylace, jež mohou být rovněž zachyceny pomocí IMAC (Yang et al., 2014).

2.3.1.5 Afinitní chromatografie na oxidech kovů

Afinitní chromatografie na oxidech kovů (MOAC; Obr. 5C) je metoda afinitní chromatografie využívající afinitu atomů kyslíku z fosfátových skupin na atomy kovů specifických oxidů. Směs peptidů je obvykle na kolonu navázána v kyselém prostředí a zachycené fosfopeptidy jsou poté eluovány bazickými roztoky. MOAC patří spolu s IMAC mezi nejvíce využívané obohacovací techniky ve fosfoproteomice. Ve srovnání s IMAC má ovšem MOAC větší toleranci k nižší hodnotě pH nanášecích a promývacích pufrů, které účinněji protonují karboxylové skupiny, ale udržují záporný náboj fosfátových skupin (Negroni et al., 2012). Mezi nejčastěji používané oxidy kovů patří oxid titaničitý (TiO_2) a oxid zirkoničitý (ZrO_2). V mnoha studiích se ukazuje, že efektivita obohacení může záviset na způsobu výroby, typu přípravy a fyzikálních vlastnostech MOAC matrice (Yang et al., 2014).

Nanášecí a promývací pufrů obvykle obsahují acetonitril a až 5% kyselinu trifluoroctovou k dosažení velmi nízké hodnoty pH pro zvýšení specifity (Leitner, 2016). Bazické eluční roztoky jsou opět obvykle tvořeny různě koncentrovanými roztoky hydroxidu amonného nebo roztoky fosfátových solí. Mnoho publikací se při zvýšení účinnosti zaměřuje na optimalizaci nanášecích a elučních pufrů, jejichž účinnost se může lišit v závislosti na typu zkoumaného vzorku. Mezi běžně používaná aditiva snižující počet nespecifických vazeb patří 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), kyselina ftalová, z hydroxykyselin dosahuje nejlepších výsledků kyselina mléčná (na rozdíl od

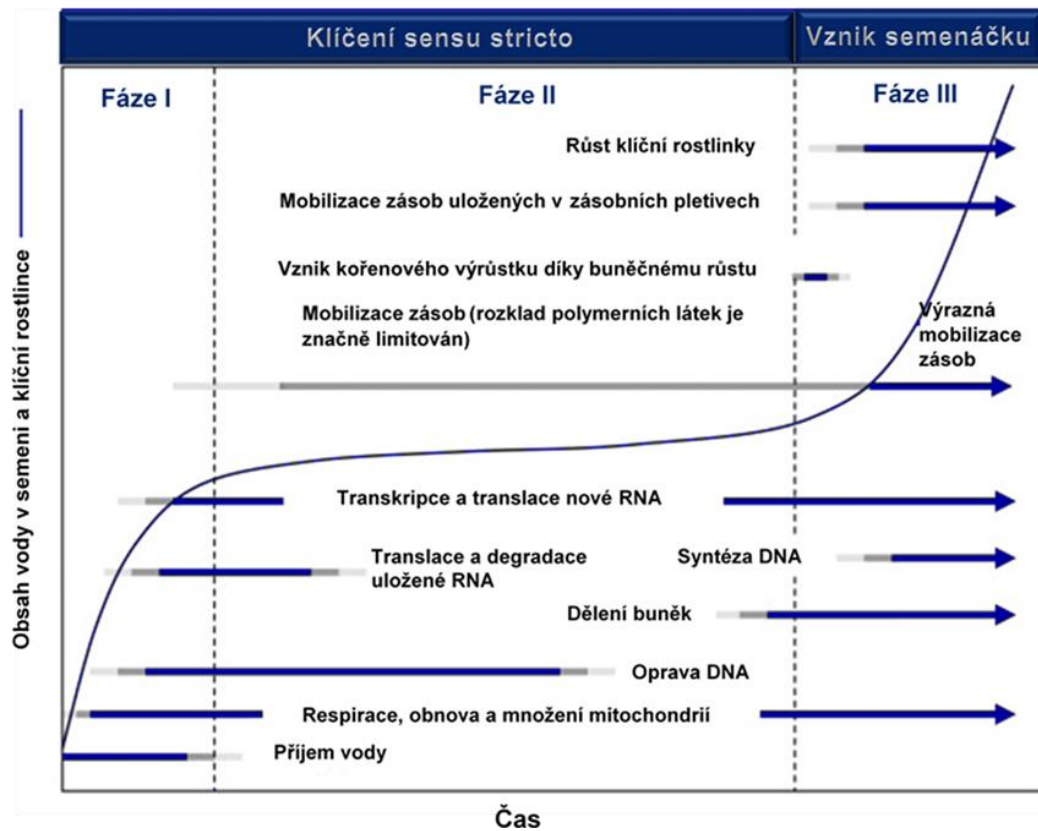
DHB neinterferuje s kapalinovou chromatografií) nebo například kyselina glutamová (Fíla a Honys, 2012). Fukuda et al. (2013) použili úspěšně vícesytný alkohol glycerol ke zvýšení selektivity při použití TiO_2 . Ve své práci dosáhli vyšší míry obohacení o monofosforylované peptidy než s použitím kyseliny mléčné a zjistili, že pro zvýšení selektivity je nutná přítomnost motivu 1,2-diol (dihydroxy skupin) a jedné nebo více hydroxy nebo karboxylových skupin sousedících s motivem 1,2-diol. Navíc úpravou elučních podmínek pomocí kombinace hydroxidu amonného a sekundárních aminů, jakými je například Bis-Tris propan, získali větší pokrytí o fosfopeptidy s větší délkou (včetně těch více hydrofilních nebo více kyselých) a celkově zvýšili množství identifikací vícenásobně fosforylovaných peptidů. MOAC patří k velmi oblíbeným obohacovacím technikám, a proto jde vývoj těchto technik stále dopředu. I v rámci této práce byl testován nový anorganický nanovlákný materiál na bázi oxidu titaničitého nebo oxidu zirkoničitého (NnF CERAM[®]- TiO_2 anatas a rutil; NnF CERAM[®]- ZrO_2 ; Křenková et al., 2016), který by mohl sloužit pro selektivní a účinné obohacování fosfopeptidů.

2.4 Role PTM v průběhu klíčení rostlin

Klíčení semen je obecně definováno jako proces začínající příjmem vody a končící proražením semenných obalů (Bewley et al., 2013). Na základě příjmu vody můžeme rozdělit klíčení do tří fází: první fáze, kdy dochází k rychlému příjmu vody, druhá fáze, při které se obsah vody příliš nemění, a třetí fáze provázená zvýšením příjmu vody a začátkem růstu klíčící rostliny (viz Obr. 6) (Nonogaki et al., 2010).

Mezi dvě nejprostudovanější modifikace zapojené do procesu klíčení patří ubikvitinace a fosforylace. GA-indukované geny, které jsou s největší pravděpodobností nutné pro dokončení klíčení, jsou v nepřítomnosti giberelinů (GA) potlačeny DELLA proteiny (Bewley et al., 2013). DELLA proteiny slouží jako molekulární přepínače v signalizaci GA a jejich GA-závislá degradace je esenciální pro přenos GA signálů (viz Obr. 4), a tudíž i pro proces klíčení (Gomi et al., 2004). V přítomnosti GA dochází k ubikvitinaci DELLA proteinů vedoucí k jejich degradaci 26S-proteasomem (Bewley et al., 2013). Mezi jeden z mnoha GA-indukovaných genů patří například α -amyláza, která se účastní degradace škrobu na jednoduché cukry, což je důležitým krokem pro klíčení semen některých rostlin (Fincher, 1989). Fosforylace hrají důležitou roli například v signalizaci ABA (viz Kap. 2.2.1) nebo v regulaci enzymů (např. askorbát peroxidáza, glutathion-S-transferáza, malátdehydrogenáza) a předpokládá se její zapojení přes inositolfosfát a fosfolipázu C (Kashem et al., 2000; Han et al., 2014).

I syntéza proteinů, k jejíž obnově dochází již v časných fázích klíčení skrze aktivaci ribozomů (Bewley et al., 2013), je mimo jiné regulována prostřednictvím fosforylace ribozomálních proteinů a translačního elongačního faktoru (Han et al., 2014).



Obr. 6: Zásadní události spojené s klíčením rostlin a následným začátkem růstu klíčící rostliny. Křivka zobrazuje přibližný časový průběh absorpce vody. Časové rozpětí od začátku po konec klíčení se pohybuje v rozmezí několika hodin až několika týdnů, v závislosti na druhu rostliny a podmínkách při klíčení (Nonogaki et al., 2010).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Materiál

Jako rostlinný materiál byl použit ječmen (*Hordeum vulgare L.*), cv. Sebastian, sklizeň z let 2015 a 2016. Až na výjimky popsané dále, byly pro extrakci proteinů homogenizovány vždy celé obilky pomocí Retsh Mill MM400.

V experimentu s klíčením byla připravena koncentrační řada 5 ml peroxidu vodíku (0%, 0,1%, 0,5%, 1%), poté se připravily Petriho misky se dvěma vrstvami filtračního papíru, do kterých bylo pro každou koncentraci vybráno 40 stejně velkých a nepoškozených obilek ječmene. Obilky ječmene klíčily v Petriho miskách v 5 ml připraveného roztoku za podmínek: světlo, laboratorní teplota, 24 hodin. Následně proběhl sběr vzorků, kdy byla z jednotlivých obilek vypeparována embrya. Vzorky embryí a endospermu byly zmrazeny v kapalném dusíku a homogenizovány pomocí Retsh Mill MM400

3.2 Extrakce a frakcionace proteinů

3.2.1 Aceton/TCA/fenol

Pro denaturační extrakci proteinů se používala kombinovaná metoda využívající TCA/acetonovou a fenolovou extrakci. K homogenizovaným vzorkům se přidaly 2 ml roztoku 10% (w/v) TCA v acetonu a poté byly vzorky ponechány přes noc při -20 °C. Vzorky byly druhý den centrifugovány (5 min, 10 000 × g, 4 °C), byl odebrán supernatant a pelet promyt v 1 ml roztoku 10% (w/v) TCA ve vodě. Byla zopakována centrifugace, opět odebrán supernatant, ke vzorku se přidal 1 ml 80% (v/v) acetonu a následně se rozrušil pelet. Následovala centrifugace a odstranění supernatantu. Poté proběhla solubilizace peletu v 0,8 ml SDS pufrem [2% (w/v) SDS, 30% (w/v) sacharóza, 5% (v/v) β-merkaptoethanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris (pH 8,0)] a inkubace vzorku (10 min, 850 rpm, 20 °C) v přístroji Thermomixer comfort (Eppendorf). Po solubilizaci peletu se přidalo 0,4 ml fenolu saturovaného pufrem [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA]. Vzorek byl velmi důkladně protřepán a následně centrifugován (10 min, 20 000 × g, 20–25 °C). Při centrifugaci dochází k rozdělení vzorku na tři fáze: na spodní fázi se zbytky buněk a anorganickou frakcí, prostřední tenkou vrstvou sacharózy a vrchní fenolovou frakci s proteiny. Po centrifugaci byla do nové mikrozkušavky odebrána fenolická frakce, ke které se přidalo 1,6 ml roztoku 100 mM octanu amonného v methanolu, a proteiny se nechaly srážet při -20 °C přes noc. Následující den byla provedena

centrifugace (5 min, $20\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a odebrán supernatant. Pelet se promyl 1 ml roztoku 80% (v/v) acetonu, poté byla provedena centrifugace (5 min, $20\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), po které následovalo opětovné odebrání supernatantu a vysušení peletu na vzduchu.

3.2.2 Nativní extrakce

Z ječmenného prášku se odvážily dva vzorky po 200 mg, které byly přesypány do 2 ml mikrozkuvek. K prvnímu vzorku byl přidán 1 ml extrakčního pufru [5 mM EDTA, 250 mM Tris (pH 8,0); inhibitory proteáz (Sigma-Aldrich)], který v druhé variantě navíc obsahoval 0,2% Igepal[®] CA-630 (Polyoxyethylen-nonylfenylether; Sigma-Aldrich). Vzorky byly následně protřepány a vloženy na 10 minut do sonikátoru naplněného ledem. Po sonikaci byla provedena dvakrát centrifugace (10 min, $14\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a pokaždé byl důkladně odstraněn pelet. Poté se stanovila koncentrace proteinu pomocí Bradfordova reagentu (Sigma-Aldrich) a destičkového spektrofotometru (Tecan). Vzorek byl doplněn extrakčním pufrem tak, aby finální koncentrace odpovídala $5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Takto získaný vzorek sloužil následně pro ekvalizaci proteomu.

Ekvalizace proteomu získaného nativní extrakcí byla provedena pomocí komerčního kitu ProteoMiner Protein Enrichment Kit (Bio-Rad). Dle přiloženého postupu byly kolonky nejprve centrifugovány (60 s, $1000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$), poté se přidalo 600 μl roztoku Reagent 1 (promývací), který byl 5 min protřepáván s afinitním nosičem. Po inkubaci byla provedena centrifugace (stejně parametry) a promývací krok ještě jednou zopakován. Následně byly do kolonek aplikovány vzorky (1 mg proteinu na kolonku) a 2 hodiny byly protřepávány s afinitním nosičem kolonky. Nenávázaný protein se odstranil centrifugací a třemi opakujícími se promývacími kroky (600 μl roztoku Reagent 1, 5 min inkubace), po kterých následovalo přidání 600 μl H₂O (LC-MS kvalita) a 1 min protřepávání s afinitním nosičem. Na závěr byla dvakrát po 15 minutách inkubace provedena eluce pomocí 20 μl roztoku Reagent 2 (eluční). Vzorky se doplnily pufrem do celkového objemu 1,2 ml a finálního složení 2 M močovina, 50 mM NH₄HCO₃, 1,6% ACN. Vzorky byly následně štěpeny a zpracovány tak, jak je popsáno níže (Kapitola 3.3).

3.2.3 Laemmliho pufr

Extrakce proteinů pro SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu byla provedena pomocí upraveného Laemmliho pufru [2% (w/v) SDS, 100 mM dithiothreitol, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) bromfenolová modř]. Přibližně ke 100 mg homogenizovaných obilek se přidal 1 ml Laemmliho pufru a vzorky se nechaly 10 min

považit. Poté byla provedena centrifugace (1 min, $10\,000 \times g$, 20–25 °C). Připravené vzorky v Laemmliho pufru byly separovány pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (rozlišovací gel – 5%, separační gel – 11%, 50 V po dobu 10 min a poté 150 V po dobu 60 min; Mini-PROTEAN systém, Bio-Rad).

3.3 Štěpení proteinů, frakcionace peptidů a příprava pro LC-MS analýzu

3.3.1 Štěpení v roztoku

Proteinový pelet byl po přidavku 0,5 ml roztoku 8 M močoviny a 100 mM NH_4HCO_3 solubilizován na Thermomixer comfort (Eppendorf) (30 min, 500 rpm, 20 °C). Po solubilizaci se stanovila koncentrace proteinu pomocí Bradfordova reagentu (Sigma-Aldrich) a destičkového spektrofotometru (Tecan). Ke vzorkům bylo následně přidáno 0,5 ml roztoku 3,3% (v/v) ACN a 50 mM NH_4HCO_3 a 1 ml H_2O (LC-MS kvalita). Do takto připravených vzorků byl přidán roztok enzymu trypsinu (Promega) imobilizovaného na kuličkách – 30 μl roztoku trypsinu na 1 mg proteinu. Vzorky se nechaly štěpit 20 hodin při 30 °C.

Pro odsolení vzorku se využily C18 SPE kolonky (Agilent). Kolonky byly nejdříve promyty 400 μl 100% ACN, poté dvakrát 1 ml H_2O (LC-MS kvalita) s 0,1% (v/v) kyselinou mravenčí (FA). Následně byly na kolonky naneseny vzorky. Nanesené vzorky se dvakrát promyly 1 ml H_2O (LC-MS kvalita) s 0,1% (v/v) kyselinou mravenčí a poté se eluovaly 400 μl 100% ACN. Eluované vzorky byly odpařeny (Speed-Vac system; Thermo).

Před MS analýzou se ke všem vzorkům přidal roztok 4% (v/v) ACN s 0,1% (v/v) FA v takovém objemu, aby se výsledná koncentrace peptidu pohybovala kolem 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (odhadnuto na základě stanovené koncentrace proteinu před digestem). Vzorky byly po centrifugaci přeneseny do vialek s insertem (objem 100 μl) a byla provedena LC-MS analýza.

3.3.2 Frakcionace proteomu pomocí ACN gradientu

Pro část proteinů extrahovaných kombinovanou metodou Aceton/TCA/fenol byla provedena frakcionace pomocí ACN gradientu spočívající v modifikaci pracovního postupu, kdy se při eluci peptidů z C18 SPE kolonky v odsolovacím kroku použil ACN gradient. Peptidy byly postupně eluovány roztoky 10%, 20%, 30%, 40% a 100% (v/v) ACN a rozděleny do 5 frakcí a odpařeny (Speed-Vac system; Thermo). Jednotlivé frakce

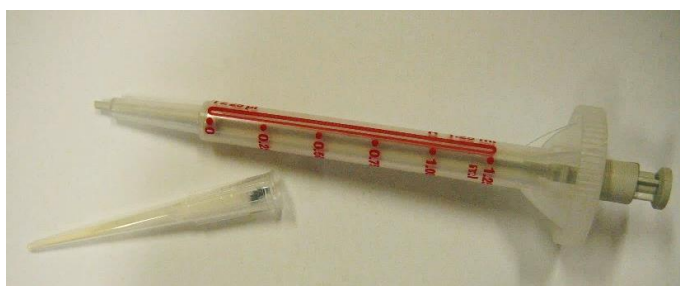
byly poté rozpuštěny v roztocích ACN (dle Tab. 1) s 0,1% (v/v) FA. Pro LC-MS analýzu byl pak náležitě upraven gradient (Tab. 1).

Tab. 1: Schéma frakcionace pomocí ACN gradientu (Čísla udávají koncentraci ACN v roztoku)

Číslo frakce	Eluce peptidů z C18	Rozpuštění peptidů	60 min gradient (UPLC)
1	10%	4%	4–10%
2	20%	13,6%	8–20%
3	30%	23,2%	18–30%
4	40%	32,8%	28–40%
5	100%	42,5%	38–100%

3.3.3 TiO₂ frakcionace

První část vzorků byla použita pro testování nanovláčného materiálu na bázi oxidu titaničitého (NnF CERAM®–TiO₂), který poskytla Mgr. Jana Křenková, Ph.D. (Ústav analytické chemie, AV ČR). Peptidový pelet se rozpustil v nanášecím pufru 50% ACN (v/v) a 2,5% TFA (v/v). Následně bylo naváženo 10 mg nosiče TiO₂, který byl přenesen do 1,5 ml mikrozkušavek a ekvilibrován ve 250 µl nanášecího pufru, který byl po centrifugaci (2 min, 1000 × g, 20 °C) odstraněn. Rozpuštěné peptidy byly přidány k nosiči a inkubovány (10 min, 500 rpm, 20 °C) v přístroji Thermomixer comfort (Eppendorf). Poté byly vzorky centrifugovány (stejně parametry) a dvakrát promyty promývacím pufrům 50% ACN (v/v) a 0,1% TFA (v/v). Na závěr proběhla eluce pomocí 0,5 M roztoku NH₄OH (pH 9,5–11), se kterým se vzorky nechaly 5 minut inkubovat (10 min, 500 rpm, 20 °C). Po centrifugaci byly vzorky odebrány a odpařeny (Speed-Vac system; Thermo). Druhá část vzorků se použila pro otestování komerčního kitu TopTip Titanium dioxide (Glygen). Postup obohacování byl proveden podle přiloženého návodu. Vzorky byly nejprve rozpuštěny ve 150 µl nanášecího pufru 2% kyseliny mravenčí (v/v). Následně se špičky s afinitním nosičem třikrát promyly 50 µl nanášecího pufru. (Pro odstraňování kapaliny ze špiček byl použit pipetovací nástavec Obr. 7.) Do připravených špiček byly



Obr. 7: Naplněná pipetovací špička TiO₂ spolu s injekční stříkačkou – součást kitu TopTip Porous Titanium Dioxide (Glygen)

naneseny vzorky a třikrát promyty 50 µl nanášecího pufru. Eluce byla provedena třikrát 50 µl 30% roztoku NH₄OH (pH 9,5–11). Poté byla provedena neutralizace vzorků pomocí kyseliny mravenčí následovaná odpařením a odsolením vzorků.

3.3.4 Štěpení v gelu a přenos peptidů

V rámci optimalizace metodiky pro detekci posttranslačních modifikací byla vytvořena metoda spojující přenos peptidů a LESA-MS analýzu (liquid extraction surface analysis – kapalinová extrakční povrchová analýza) pro detekci a identifikaci proteinů. Gel získaný pomocí 1D elektroforózy (3.2.3) byl promyt destilovanou vodou, fixován v ACN (5 min) a vysušen na vzduchu. Vysušený gel byl převrstven 5 ml roztoku trypsinu (20 µg, Promega, MS-grade; 50 mM NH₄HCO₃), inkubován 20 min při 4 °C, následné štěpení probíhalo přes noc při 37 °C. Gel s naštěpenými proteiny byl opláchnut 0,1% (v/v) FA a naštěpené proteiny byly přeneseny na Empore C18 disk (Sigma-Aldrich) pomocí tzv. semi-dry přenosu (30 min, 5 mA/cm²; Bio-Rad).

3.4 LC-MS analýza a zpracování naměřených dat

3.4.1 q-TOF – profilování

Vzorky byly analyzovány pomocí C18 reverzní chromatografie (15 cm, 0,1 mm, Zorbax Column, Agilent), která byla přímo napojená na zdroj nanoESI (CaptiveSpray, Bruker). S výjimkou ACN frakcionace pracoval Dionex Ultimate 3000 RSLC s průtokem 300–500 nl/min a s gradientem ACN 4–35% po dobu 120 minut. UHR-TOF spektrometr byl nastaven pro měření v MS/MS módu pro identifikaci proteinů (rozsah 50 až 2200 m/z, sběr MS spekter 2 Hz, rozsah MS/MS 10-20 Hz, každých 7 sekund).

Data získaná LC-MS analýzou byla nejdříve zpracována v programu Preview™ (Protein Metrics Inc.), ve kterém byla provedena recalibrace spekter s využitím MIPS ječmenné databáze (HighConf_genes_MIPS_23Mar12_ProteinSeq; <ftp://ftpmips.helmholtz-muenchen.de/>) a současně byly predikovány nejvhodnější vyhledávací parametry pro program Proteome Discoverer™ (Thermo Scientific) sloužící k identifikaci peptidů.

Program Proteome Discover™ pracoval s nastavenými parametry: trypsin – s možností vynechání maximálně jednoho štěpícího místa; tolerance přesnosti MS – 35 ppm; tolerance MS/MS – 0,05 Da; dynamické modifikace (maximální počet tři) – oxidace (M, W), deamidace (N, Q), metylace (H, K, N, R), karbamylace (K, R), přeměna Q na pyro-Glu (N-konec); dynamické modifikace na konci proteinu – acetylace (N-

konec), ztráta methioninu + acetylace (N-konec). V případě frakcí obohacených o fosfoproteiny byly dynamické modifikace doplněny o β -eliminaci (S, T) a fosforylaci (S, T, Y). Jako vyhledávací algoritmus sloužil Sequest HT využívají MIPS ječmennou databázi a hladiny FDR 1% (false discovery rate).

3.4.2 LESA-MS analýza

Triversa NanoMate (Advion) (Obr. 8) operoval v LESA módu. Povrchová extrakce byla dosažena pomocí vypuštění a opětovného nasátí 2 μ l extrakčního roztoku (0,1% (v/v) FA v ACN). Extrakční čas byl nastaven na 5 s a vzorky byly do MS sprejovány při konstantním toku při 1 400 V po dobu 10 min. Iontová past amaZon speed ETD (Bruker) operovala v CID módu s následujícími parametry: MS – rozšířený režim rozlišení se skenovacím rozsahem 400–2 000 m/z, ICC target 400 000, průměr 3 spekter, SPS cílová hmota 900 m/z; MS/MS – XtremeScan mód se skenovacím rozsahem 100 m/z do 2 \times hmoty prekursoru, ICC target 500,000, Smart Isolation, 20 prekursorů, bez průměrování spekter a amplituda fragmentace na 60 %.



Obr. 8: Přístroj TriVersa NanoMate (Advion) umožňující LESA-MS analýzu

Naměřená spektra byla zpracována pomocí programu Data Analysis 4.1 (Bruker). Výstupem programu Data Analysis byl MGF (mascot generic format) datový soubor, který se použil k identifikaci peptidů pomocí algoritmu Sequest HT s nastavenými parametry: trypsin – s možností vynechání maximálně dvou štěpících míst; tolerance hmotnosti 0,3 Da; dynamické modifikace (maximální počet tři) – oxidace (M), deamidace (N, Q), metylace (K); dynamické modifikace na konci proteinu – acetylace (N-konec).

3.4.3 TSQ Quantiva – cílená analýza

Vzorky separovaných embryí byly analyzovány pomocí C18 reverzní chromatografie (15 cm, 0,1 mm, Zorbax Column, Agilent). Pro Dionex Ultimate 3000 RSLC byl nastaven průtok 300–500 nl/min s gradientem ACN 4–35% po dobu 120 minut. Zdroj nanoESI (Nanospray Flex Ion Source, Thermo Scientific) pracoval s nastavenými parametry: teplota 250 °C; 1700 V napětí na jehlu; vysoušecí plyn – vypnut. Kvadrupólový hmotnostní spektrometr TSQ Quantiva (Thermo Scientific) měřil v SRM módu (kontinuální měření, rozlišení Q1 a Q3 0,7 Da, tlak v CID – 1,5 mTorr, ostatní parametry v základním nastavení).

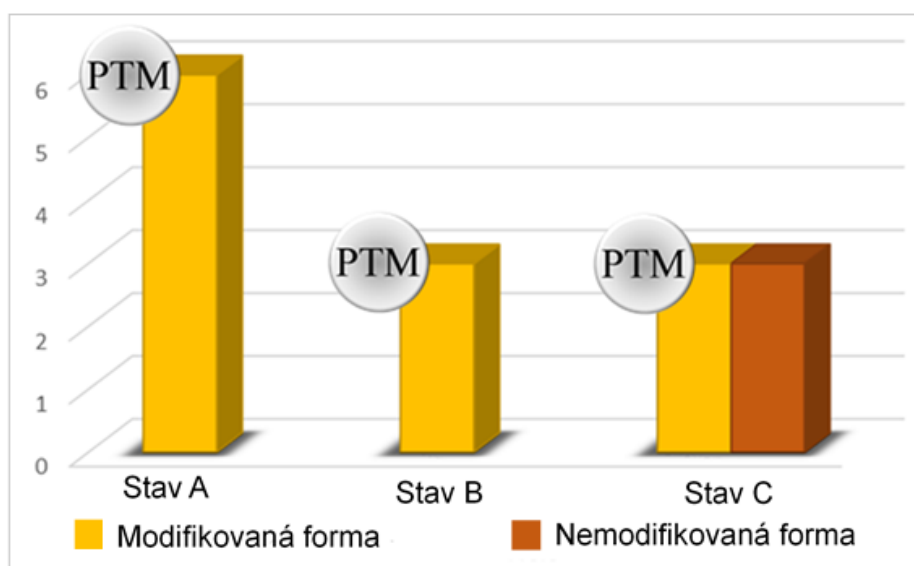
Kvantitativní rozdíly vyhodnocené podle počtu PSM (absolutní změna vyšší jak 1,5, $p < 0,05$) z profilovací analýzy (3.4.1) byly validovány pomocí cílené analýzy v SRM módu. Metodika byla vytvořena na základě vybraných prekurzorů (peptidů) a jejich produktových iontů (3–5 nejlepších tranzicí) spolu s následnou optimalizací retenčních časů a kolizních energií pomocí programu Skyline 3.1 (MacCoss Lab Software). Naměřená data se manuálně zkontrolovala v programu Skyline a následně byla vyexportována pro program Excel. Data zahrnovala informace o plochách píků jednotlivých peptidů. V programu Excel byla zprůměrována technická opakování pro každou variantu. Ze získaných dat byl pomocí programu Cluster 3.0 a JavaTreeview vytvořen přehled změněných proteinů.

Pro analýzu funkce proteinů byly nalezeny nejbližší orthology u *Arabidopsis thaliana* (UniProt, NCBI – Blastp, matice BLOSUM62) vizualizovány interakce pomocí databáze protein-proteinových interakcí (STRING; Szklarczyk et al., 2010) a dohledány mutantní fenotypy (Lloyd a Meinke, 2012) a proteiny reagující na signály fytohormonů obsahující navíc informace o predikovaných PTM (Černý et al., 2016). Dodatečné informace byly doplněny ze zdrojů: UniProt (UniProt, 4/2017), PGSB – Gene Annotation (PGSB, 4/2017) a KEGG pathway (GenomeNet, 4/2017).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Využití frakcionačních a separačních metod

Ječmen (*Hordeum vulgare*) patří mezi důležité obilniny a je využíván nejen v potravinářském a sladovnickém průmyslu, ale také v krmivářství. Vzhledem k tomu, že jeho genom byl sekvenován, představuje dobrý model pro proteomickou analýzu klíčení. Obilky ječmene obsahují ovšem velké množství zásobních proteinů a snižují tak úspěšnost použití jednoduché MS analýzy. V tomto případě je tak vhodné použít frakcionaci nejen k obohacení modifikovaných proteinů, ale i pro zvýšení pokrytí celkového proteomu. I když je zaměření této práce na modifikace proteinů a jejich případné změny v průběhu klíčení, tyto změny by nebylo možné interpretovat bez znalosti dynamiky celkového proteomu (Obr. 9).



Obr. 9: Interpretace změn PTM. Při analýze PTM vycházející z identifikace a kvantifikace peptidů ztrácíme informaci o stavu celkového proteinu. Úbytek či nárůst peptidu s PTM tak může značit jak pouze změnu celkového množství proteinu (B), tak regulační změnu a rozdíl v poměru mezi modifikovaným a nemodifikovaným peptidem (C).

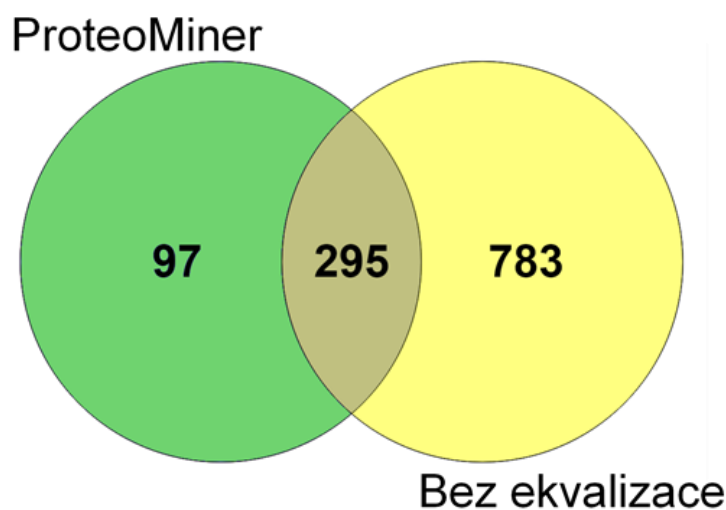
4.1.1 Frakcionace na úrovni proteinů – ProteoMiner

V rámci testování frakcionačních technik byl použit komerční kit ProteoMiner Protein Enrichment Kit (Bio-Rad). Technologie ProteoMiner se využívá při nativní přípravě vzorků a slouží ke snížení dynamického rozsahu proteinových koncentrací v biologickém vzorku. Toho je dosaženo pomocí rozsáhlé a velmi rozmanité knihovny rekombinantních peptidů sloužících jako ligandy, které jsou připevněny na pevnou matrix složenou z kuliček. Po aplikaci vzorku dochází k zakoncentrování středně a nízko

zastoupených proteinů na jejich specifických afinitních ligandech, přičemž vysoce abundantní proteiny saturují své vysoce afinitní ligandy a přebytečné proteiny jsou odmyty (Boschetti et al., 2009). To vede ke snížení dynamického rozsahu proteinových koncentrací, zatímco je zachováno reprezentativní zastoupení proteinů v rámci původního vzorku tzv. ekvalizace. Výsledky extrakce jsou závislé na protein-ligand afinitních interakcích a jsou velmi nepředvídatelné (Černý et al., 2013). Metoda byla původně určena pro ekvalizaci krevního séra, ale i když byla v minulosti použita i pro rostlinná pletiva, nebylo zřejmé, zda ji lze použít i pro ekvalizaci proteomu z obilí ječmene.

V rámci testování byl využit standardní protokol pro rostlinný materiál (Černý et al., 2014) a modifikovaný postup, kdy se do extrakčního pufru přidal detergent Igepal o koncentraci 0,2% (v/v). Identifikace proteinů z běžného postupu nebyla příliš úspěšná, celkově bylo nalezeno pouze 125 proteinů. Přídavek Igepalu zvýšil počet na téměř 400 a až na sedm proteinů obsahoval všechny identifikace z běžného protokolu. Všeobecnou vlastností detergentů je narušení buněčných membrán a vyšších struktur proteinů nebo solubilizace například membránových proteinů. Na základě těchto vlastností můžeme předpokládat, že použití Igepalu vedlo k efektivnější nativní extrakci spolu s navýšením počtu i méně abundantních proteinů ve vzorku, a tím pádem ke zvýšení účinnosti kitu ProteoMiner.

ProteoMiner byl již několikrát využit v předcházejících studiích zaměřujících se na proteom špenátu (*Spinacia oleracea L.*) (Fasoli et al., 2011) nebo *Arabidopsis thaliana* (Fröhlich et al., 2012), které ukázaly, že použití ProteoMiner vede ke snížení obsahu abundantních proteinů z listových extraktů, jakým je RUBISCO. I zde můžeme pozorovat

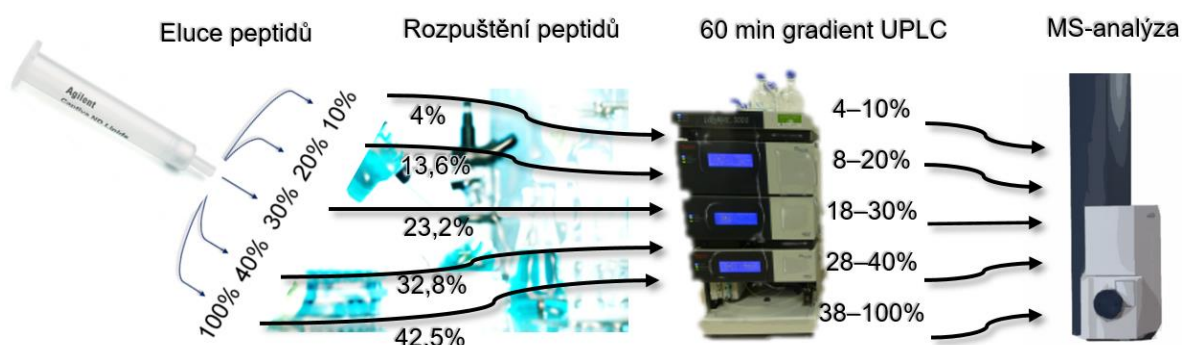


Obr. 10: Ekvalizace proteomu. Vennův diagram znázorňující počty identifikovaných proteinů při/bez použití kitu ProteoMiner (varianta s Igepal).

depleci abundantních zásobních proteinů, například serpin-Z4 (MLOC_10176.1) reprezentuje až 4 % PSM v běžné extrakci, ale jeho podíl klesl na 0,8 % po využití kitu Proteominer. V případě ekvalizace proteomu z obilek kukuřice (*Zea mays* L.) ukázali Boschetti et al. (2009), že pro dosažení uspokojivých výsledků je nutné odstranit interferující látky. Například před samotnou extrakcí proteinů použili pro odstranění lipidů směs chloroformu a methanolu. Další optimalizací podmínek extrakce by tudíž mohlo vést k dosažení vyšších výtěžků, a tím pádem také k umožnění snadnější detekce PTM.

4.1.2 Frakcionace na úrovni peptidů – ACN gradient

Další frakcionační metodou využitou v této práci byla gradientová ACN eluce, která by mohla být zařazena v každém pracovním postupu, který využívá C18 odsolovací krok před LC-MS analýzou. V konečném kroku jsou peptidy namísto 100% acetonitrilu eluovány vícekrokovým ACN gradientem (10%, 20%, 30%, 40% and 100% ACN) a rozděleny do 5 frakcí (viz Obr. 11). Tento krok vede k rozdělení peptidů na základě jejich hydrofobicity. Frakcionace proteomu vede následně ke kompenzaci vazebného omezení kolonky reversní chromatografie C18. Při běžné analýze využívající TCA/aceton/fenolovou extrakci lze dosáhnout počtu identifikací pohybujících se kolem 900–1 000. Při použití ACN gradientu bylo identifikováno 1 410 proteinů na základě 5 605 peptidů, což je o 41 % více identifikací než bez použití gradientu.



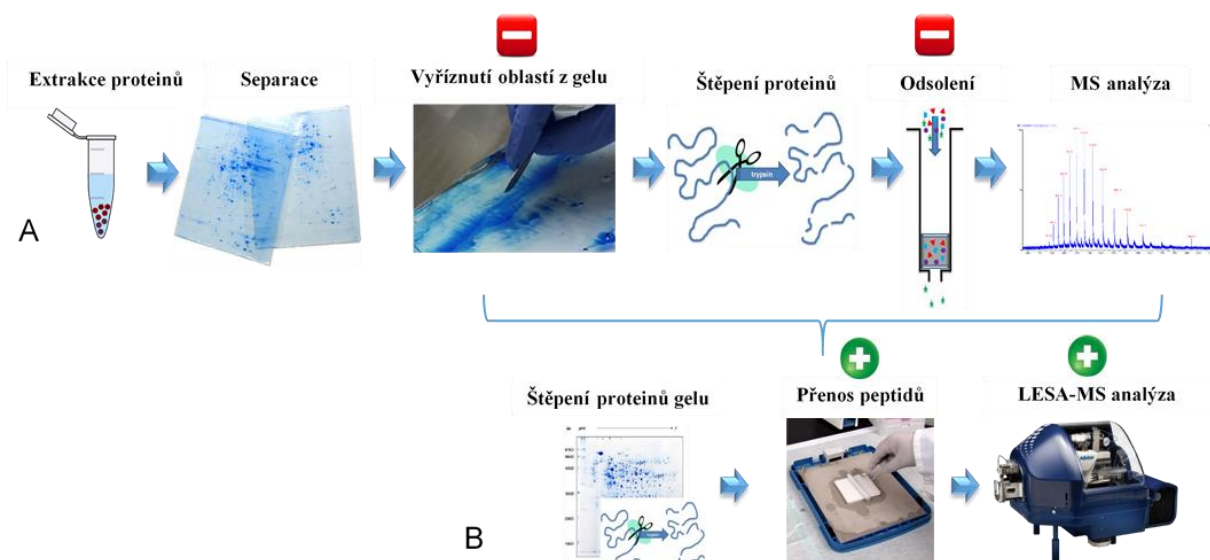
Obr. 11: Schéma frakcionace pomocí ACN gradientu

Jak bylo nastíněno v teoretické části, je při studiu fosforylací vhodné zapojit před samotným obohacovacím krokem prefrakcionační krok například SCX nebo HILIC k omezení složitosti proteomu. Tyto techniky však mimo přidané experimentální i finanční náročnosti představují další potenciální zdroj ztrát. Použití ACN gradientu ovšem pouze modifikuje stávající krok analýzy, a jak je patrné z výsledků, umožňuje

účinnou frakcionaci. Zařazení gradientové ACN eluce před afinitní chromatografií, jakou je například MOAC, by mohlo vést ke zvýšení počtu identifikovaných ječmenných fosfopeptidů. Tuto strategii využili Hou et al. (2009) při své studii, kdy použití devíti krokového gradientu vedlo k tří až čtyřnásobnému zvýšení počtu identifikovaných fosfopeptidů. Jednotlivé eluované frakce použili pro obohacování s využitím TiO₂. Získané frakce zkombinovali (pro snížení počtu měření) a analyzovali pomocí LC-MS analýzy. Tato strategie využívající levnou a velmi jednoduchou modifikaci v pracovním postupu by mohla být, díky zvýšení účinnosti při obohacování fosfopeptidů, využita při rozsáhlých studiích fosfoproteomu.

4.1.3 Přenos peptidů a LESA analýza

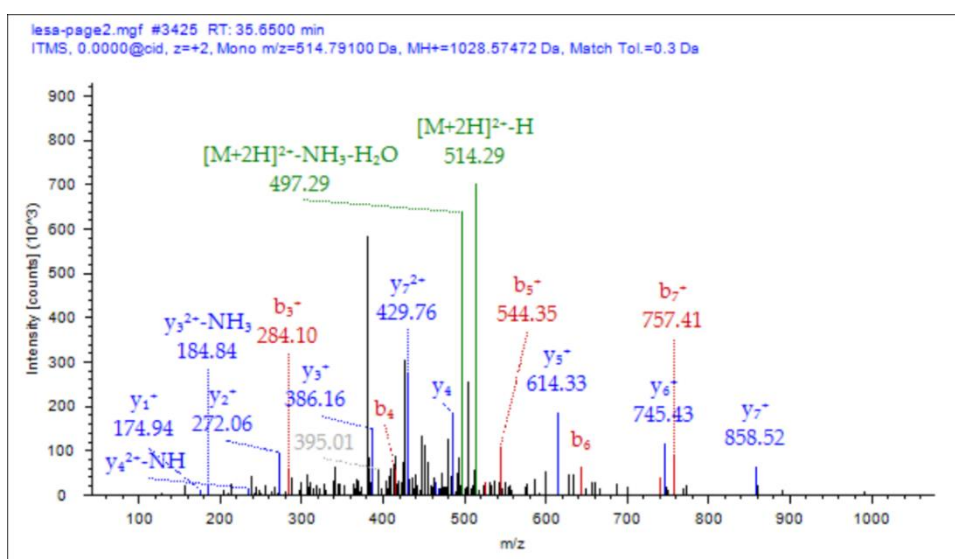
Spojení přenosu peptidů a LESA analýzy by mohlo umožnit snadné a rychlé studium PTM měnicích například náboj proteinů, mezi které patří mimo jiné fosforylace. 1D a 2D elektroforéza slouží k velmi účinné separaci proteinů. 2D elektroforéza navíc dosahuje velmi přesného rozdělení proteinů na základě izoelektrického bodu a může sloužit pro efektivní separaci fosforylovaných a nefosforylovaných forem proteinů. V dnešní době již pro identifikaci proteinů nestačí pouze jejich přesná pozice na 2D gelu, ale je nutná validace pomocí hmotnostní spektrometrie. Náročnost identifikace proteinů z gelů stoupá s počtem analyzovaných oblastí vyříznutých z gelu. Celý proces vyžaduje vyřezání požadovaných oblastí z gelů, štěpení proteinů a následné odsolení. Proces je proto časově náročný, problematický a opakované vysoušecí kroky mohou vést ke značným ztrátám



Obr. 12: Schéma běžné GeLC-MS analýzy (A); Schéma zjednodušené analýzy pomocí přenosu peptidů a LESA-MS analýzy (B). Pracovní kroky, které jsou označeny červeným mínus, mohou vést ke ztrátám a jsou časově náročné. Kroky označené zeleným plus představují zjednodušení postupu a zvyšují efektivitu analýzy.

vzorku. Snaha zjednodušit tento postup vedla k myšlence spojení přenosu peptidů s LESA-MS analýzou. Koncept (viz Obr. 12) zahrnuje štěpení proteinů přímo v gelu následovaný přenosem peptidů na Empore C18 disk (Sigma-Aldrich) pomocí tzv. semi-dry přenosu peptidů. Při přenosu peptidů dochází simultánně k odsolení. C18 disk je následně analyzován pomocí LESA-MS analýzy. LESA analýza je jedním z operačních módů přístroje TriVersa NanoMate (Advion) (viz Obr. 8). Koncept by mohl přinést množství výhod, jakým je eliminace odsolovacího kroku přenosem peptidů, rychlé zpracování vzorků separovaných pomocí 1D nebo 2D elektroforézy (lze analyzovat téměř celý gel, jelikož metoda není omezena pouze na vyříznuté úseky gelu) nebo zjednodušení mnohokrokové procedury GeLC-MS. Celý pracovní protokol trval navíc méně než 24 hodin.

Ve výsledku bylo úspěšně detekováno sice jen 34 ječmenných peptidů, ale prokázalo to možnost využít tuto metodiku, pokud bude dále optimalizována. V rámci budoucí optimalizace bude například upraveno rozvrstvení trypsinu na gelu k docílení jeho vyšší homogenity. Průměrná hydrofobicita by se měla při použití 100% ACN pohybovat kolem 30 % (Krokhin et al., 2004), ale u identifikovaných peptidů se pohybovala kolem 43 %. Identifikace převážně hydrofobních peptidů značí ztrátu většiny hydrofilních peptidů, které mohly vputovat hlouběji do membrány, a proto by měl být v rámci optimalizace upraven také transferový čas během přenosu peptidů. Třetím optimalizačním krokem je testování vícekrokového extrakčního gradientu, který by měl potlačit množství koeluujičích peptidů, spolu s využitím rychlejšího a citlivějšího hmotnostního analyzátoru, protože množství identifikovaných peptidů korelovalo s krátkým extrakčním časem (5 s).



Obr. 13: Identifikace peptidu VAIMEVNPR pomocí kombinace elektroforetického přenosu a LESA-MS analýzy

Výsledky testování byly publikovány formou příspěvku ve sborníku: Berka M.: Peptide blotting and liquid extraction surface analysis for protein detection and identification: proof of concept, MendelNET 2016; a jsou součástí přílohy této závěrečné práce.

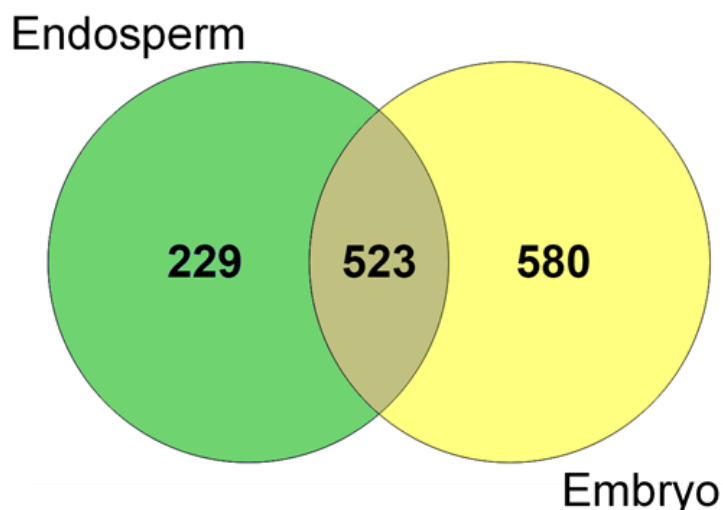
4.1.4 Frakcionace na úrovni pletiv

Ječmen (*Hordeum vulgare*) patří mezi představitele jednoděložných rostlin s malým embryem a mnohonásobně větším endospermem sloužící k uskladnění zásobních látek (především škrobu). Během klíčení dochází k aktivaci fyziologických a metabolických procesů v embryu, je proto velmi vhodné se při studiu klíčení zaměřit právě na embryo. Po naklíčení obilky se proto přistoupilo k separaci embryí od endospermu (viz Obr. 14). Separace je velmi jednoduchá a rychlá, protože pluchy jsou narušeny nabobtnáním obilky a růstem embrya. Následné oddělení embrya se nejlépe provádí v místě, kde sousedí štítek (*scutellum*) s přilehlým endospermem.



Obr. 14: Ukázka separace ječmenné obilky

Po separaci zkušebního vzorku byly z endospermů a z embryí extrahovány proteiny a provedena následná LC-MS analýza. Separací bylo dosaženo uspokojivých výsledků (viz Obr. 15), kdy bylo identifikováno 580 unikátních proteinů pro embryo a 229 proteinů pro endosperm. Získané výsledky potvrzují vhodnost zařazení separace částí obilky před samotnou extrakcí proteinů.



Obr. 15: Rozdělení obilky výrazně navyšuje množství identifikovaných proteinů. Reprezentativní srovnání z jedné analýzy.

4.2 Testování metod pro obohacování fosfoproteomu

Jedním z plánovaných cílů experimentální práce byla identifikace fosfoproteinů v klíčicím semeni a sledování jejich dynamiky v průběhu klíčení. Protože se rozcházejí názory nejen na optimální nosič, ale i na optimální protokol pro separaci fosfopeptidů, byla testována celá řada metod. Z testovaných materiálů to byl nanovlákněný materiál na bázi oxidu titaničitého (NnF CERAM®–TiO₂), komerční kit TopTip Titanium dioxide (Glygen) a jejich různé variace pracovních postupů. Postup, který pro jednotlivé materiály vedl k nejvyššímu počtu identifikovaných fosfopeptidů, je uveden v kapitole Materiál a metodika.

Jako nejefektivnější se ukázal komerční kit TopTip TiO₂. Nicméně i tak celkový počet spolehlivě identifikovaných fosfopeptidů nebyl srovnatelný se současnými fosfoproteomickými studiemi (Tab. 2). Na vině může být řada faktorů. Pokud vynecháme možnost, že by podíl fosforylovaných proteinů v obilce ječmene byl nižší, jako nejpravděpodobnější se jeví čtyři možnosti. První je poměrně nízká abundance proteinů v obilce v poměru k ostatním zásobním látkám, které interferují s vazbou fosfo skupiny. To by mělo být možné kompenzovat využitím dalších frakcionačních technik popsanych výše, nicméně pro kombinaci metod nebylo v rámci bakalářské práce dostatek časového prostoru. Druhá možnost je ztráta fosforylací v průběhu homogenizace. Aby se zabránilo ztrátám fosforylací při zvýšené teplotě, byla homogenizace prováděna pomocí mlýnu v kovové komoře. Tím je sice minimalizován efekt fosfatáz, ale je známo, že fosfopeptidy se silně vážejí na kovové povrchy, které jsou součástí i některých LC-MS systémů (Liu et al., 2005). Není tak možné vyloučit, že snahou o šetrnou homogenizaci došlo

Tab. 2: Identifikované fosopeptidy s příslušnými sekvencí a modifikacemi

Název proteinu	Kód proteinu	Sekvence peptidu	Modifikace
proteinkináza 2 (receptorová)	MLOC_63044.2	[].GSLPAIFPDGLQSLDLSGNQLSGR.[]	1×Fosforylace [S]
predikovaný protein	AK357471	[].GTMNMDVAAAATTSTNFLA TLQMFTIPAAFLADSYIK.[]	2×Fosforylace [T15; T20]; 1×Oxidace [M]
necharakterizovaný protein	MLOC_52485.4	[].LDYGNNGMSAASSLGIHQTY MFVNR.[]	1×Fosforylace [S]; 1×Deamidace [N24]; 1×Oxidace [M8]
člen z rodiny LEA proteinů	MLOC_44544.1	[-].MAGALSATRR.[T]	1×Fosforylace [S/T]; 1×Ztráta Met [N-Term]
necharakterizovaný protein	MLOC_67548.1	[-].MESVDSHSPR.[R]	1×Fosforylace [S3]; 1×Metylace [H7]; 1×Ztráta Met [N-Term]
homeoboxový protein BEL1	AK373388	[].VAASFEPVLGAAATAGYTSL MSR.[]	1×Fosforylace [T14]; 1×Oxidace [M21]
fosfoglukomutáza	MLOC_62030.2	[K].ATGAFILTASHNPPGGPTEDF GIK.[Y]	1×Fosforylace [S/T]
aktin-7	MLOC_13146.1	[K].SSSSVEKSYELPDGQVITIGAE ER.[F]	2×Fosforylace [S]
glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	MLOC_18233.1	[R].AASFNIIPSSSTGAAK.[A]	1×Fosforylace [S3]
protein s motivem zinkových prstů	AK376680	[R].ASSAEQLVLSLSLSLGAVALDR.[S]	1×Fosforylace [S15]; 1×Deamidace [Q6]; 1×Metylace [L/R]
serpin 2	MLOC_10176.1	[R].FALRLASAISSNPER.[A]	1×Fosforylace [S7]
serpin 2	MLOC_10176.1	[K].CDSFHLLDGSSIQTQFMSSTK.[K]	1×Fosforylace [S]
pyruvátfosfát dikináza	AK361560	[R].GGMTSHAAVVAR.[G]	1×Fosforylace [T/S]
oleosin	AK356020	[R].GSYVQVQHGGQYGAGQQQHGR.[G]	1×Fosforylace [S2]; 1×Metylace [H8]
oleosin	AK356020	[R].GSYVQVQHGGQYGAGQQQHGR.[G]	1×Fosforylace [S2]; 1×Deamidace [Q]
oleosin	AK356020	[R].GSYVQVQHGGQYGAGQQQHGR.[G]	1×Fosforylace [S2]; 1×Metylace [H8]; 2×Deamidace [Q7; Q11]
oleosin	AK356020	[R].GSYVQVQHGGQYGAGQQQHGR.[G]	1×Fosforylace [S2]; 1×Metylace [H8]; 1×Deamidace [Q]
oleosin	AK356020	[R].GSYVQVQHGGQYGAGQQQHGR.[G]	1×Fosforylace [S2]
3-fosfoglycerátdehydrogenáza	AK371688	[R].ILLDGSPVPINSIQVQLANV ESK.[F]	1×Fosforylace [S13]; 1×Metylace [N12]; 2×Deamidace [Q15; Q17]
predikovaný protein (reakce na stres)	MLOC_66076.1	[R].LAAGQAATIQPSSPR.[Y]	1×Fosforylace [S]
predikovaný protein (reakce na stres)	MLOC_65893.1	[R].LAASQAAVAIAIQPSSPR.[Y]	1×Fosforylace [S]
protein z rodiny globulinů	MLOC_63227.1	[R].LHQITGDQCPLR.[N]	1×Fosforylace [T5]
proteinkináza (receptorová)	MLOC_60829.1	[R].LKDGSVVAIK.[K]	1×Fosforylace [S5]
patatin	AK371618	[R].LSSSSALTPR.[S]	1×Fosforylace [S]
proteinfosfatáza	MLOC_56775.1	[R].SISAEGHSLR.[V]	1×Fosforylace [S3]

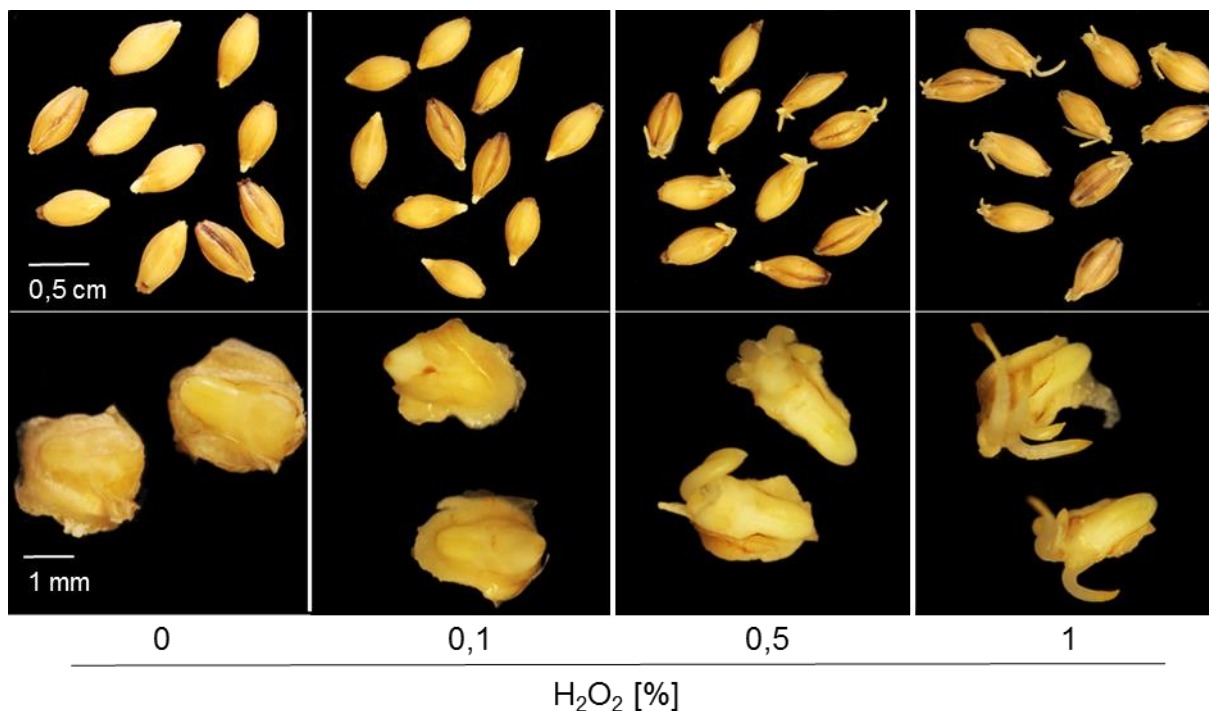
k nežádoucí ztrátě fosforylovaných proteinů. Třetí potenciální problém představuje samotná separace LC-MS, kdy byl využit standardní systém captivespray, který využívá kovový konektor na spojení mezi chromatografií a jehlou, a proto může opět dojít ke snížení detekce fosfopeptidů. Problém kovových součástí LC-MS systémů byl řešen v několika studiích, a to použitím 50 mM citrátu (Winter et al., 2008) nebo přístupu EDTA-2D-RP/RP (Fleitz et al., 2013). Z důvodu možného negativního vlivu uvedených aditiv na LC-MS systém nebyla tato možnost testována.

Jako poslední očekávaná interference může být samotné složení peptidů. Při pohledu na aminokyselinové složení proteinů obsažených v obilkách lze zjistit, že nejvíce zastoupenou aminokyselinou je kyselina glutamová, a to v přibližném množství pohybující se kolem 23 % (Åssveen, 2009). To je způsobeno přítomností zásobních proteinů z řad prolaminů a glutelinů s vysokým obsahem kyseliny glutamové. Pokud je brána spolu s kyselinou glutamovou i kyselina asparagová, zastupují obě aminokyseliny až 30 % všech aminokyselin obsažených v proteinech obilky (Åssveen, 2009), což je zhruba dvakrát více, než je průměrné zastoupení těchto aminokyselin v běžném celkovém proteomu (Černý et al., 2013). Nadměrné množství kyselých aminokyselin mohlo interferovat s vazbou fosfopeptidů, což by také vysvětlovalo poměrně vysoký obsah nefosforylovaných peptidů identifikovaných v těchto frakcích.

4.3 Proteomická analýza klíčení obilky ječmene

Již několikrát byly využity metody proteomiky ke zkoumání mechanismu klíčení u různých druhů rostlin včetně *Arabidopsis thaliana* (Gallardo et al., 2001), pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Mak et al., 2009), ječmene (*Hordeum vulgare*) (Finnie et al., 2004), rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) (Sheoran et al., 2005). Pokrytí proteomu v těchto pracích není valné a na průběh PTM se doposud zaměřilo jen několik studií například (Han et al., 2014) a (Li et al., 2015) u rýže (*Oryza sativa* L.) nebo (López-Pedrouso et al., 2014) u fazole (*Phaseolus vulgaris* L.).

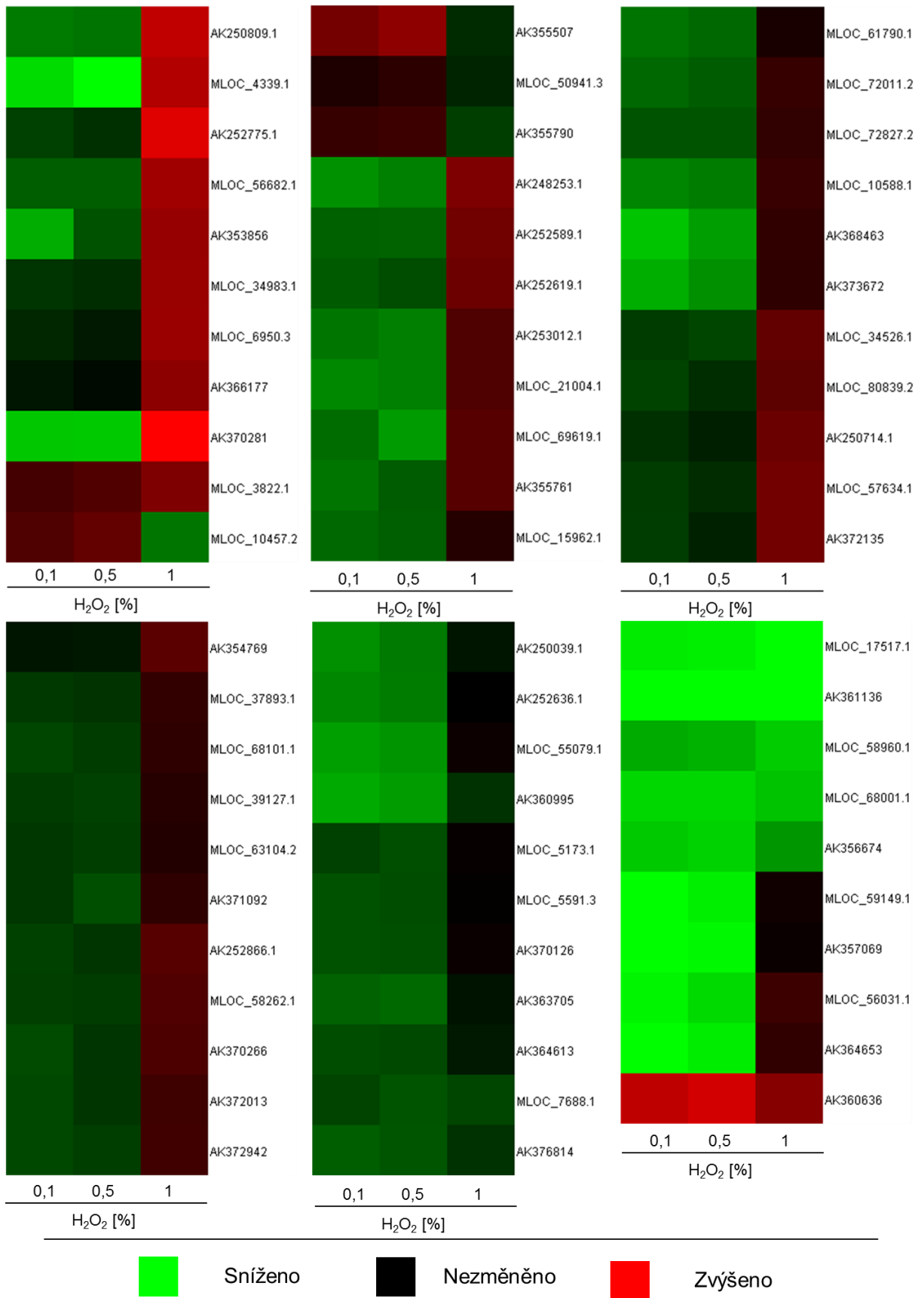
První část bakalářské práce připravila metodiku pro analýzu proteomu a pomocí analýzy zachycených fosfopeptidů se podařilo identifikovat prvních 20 zajímavých kandidátů pro monitorování změn fosforylace v průběhu klíčení. Z časových důvodů byla z testovaných metod frakcionace vybrána frakcionace na úrovni pletiv a průběh klíčení byl sledován ve vypreparovaném embryu. Jako modelový systém bylo zvoleno klíčení obilky v přítomnosti peroxidu vodíku, jelikož je známo, že peroxid má pozitivní efekt na klíčení některých druhů rostlin. Účinek peroxidu byl až překvapující. Znatelný efekt byl



Obr. 16: Peroxid vodíku stimuluje klíčení. Ukázka obilek a vypreparovaných embryí.

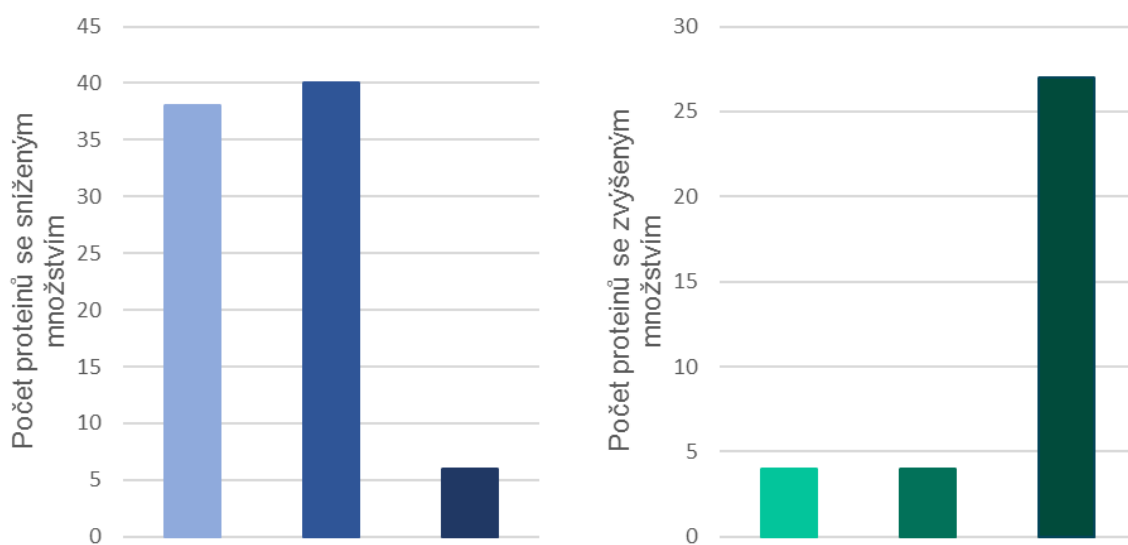
patrný již při 0,5% koncentraci H_2O_2 , přičemž nejvyššího urychlení bylo dosaženo při 1% koncentraci (viz Obr. 16). U varianty s 0% a 0,1% H_2O_2 je viditelná pouze část radikuly, kdežto již při 0,5% koncentraci jsou rozeznatelné jednotlivé kořínky. Další experimenty ukázaly, že 1,0% koncentrace peroxidu je zřejmě nejen ta s nejvyšším účinkem, ale zároveň je i velmi blízká toxické dávce. Již při 2,0% koncentraci byl patrný silně negativní efekt na klíčení. Pozitivní efekt peroxidu byl již v minulosti popsán a bohužel i jeho efekt na ječmen byl publikován v letošním roce (Ishibashi et al., 2017).

Necílenou analýzou se identifikovalo přes 1400 proteinů, z nichž bylo možné pro 882 provést kvantitativní analýzu na základě počtu přiřazených spekter (aspoň 2 identifikované peptidy a aspoň 10 přiřazených spekter). Významné změny vykazovalo 112 proteinů a ty pak byly validovány pomocí cílené analýzy. Celkem se podařilo pomocí cílené kvantifikace unikátních peptidů potvrdit kvantifikace pro 65 proteinů (Obr. 17). Při naší studii byla v rámci změněných proteinů pozorována mimo jiné kataláza (AK366177), a dále také superoxid dismutáza (AK355761) a několik forem peroxidázy (AK354769; AK355507). První získaná data naznačují, že množství superoxid dismutázy je při nižších koncentracích H_2O_2 oproti kontrole významně sníženo. Při 1% koncentraci dochází patrně k nasycení embryí H_2O_2 , a tím pádem ke zvýšení množství enzymu. Další studie těchto antioxidantních enzymů mohou přinést nové informace o způsobu regulace klíčení pomocí ROS.



Obr. 17: Přehled změněných proteinů

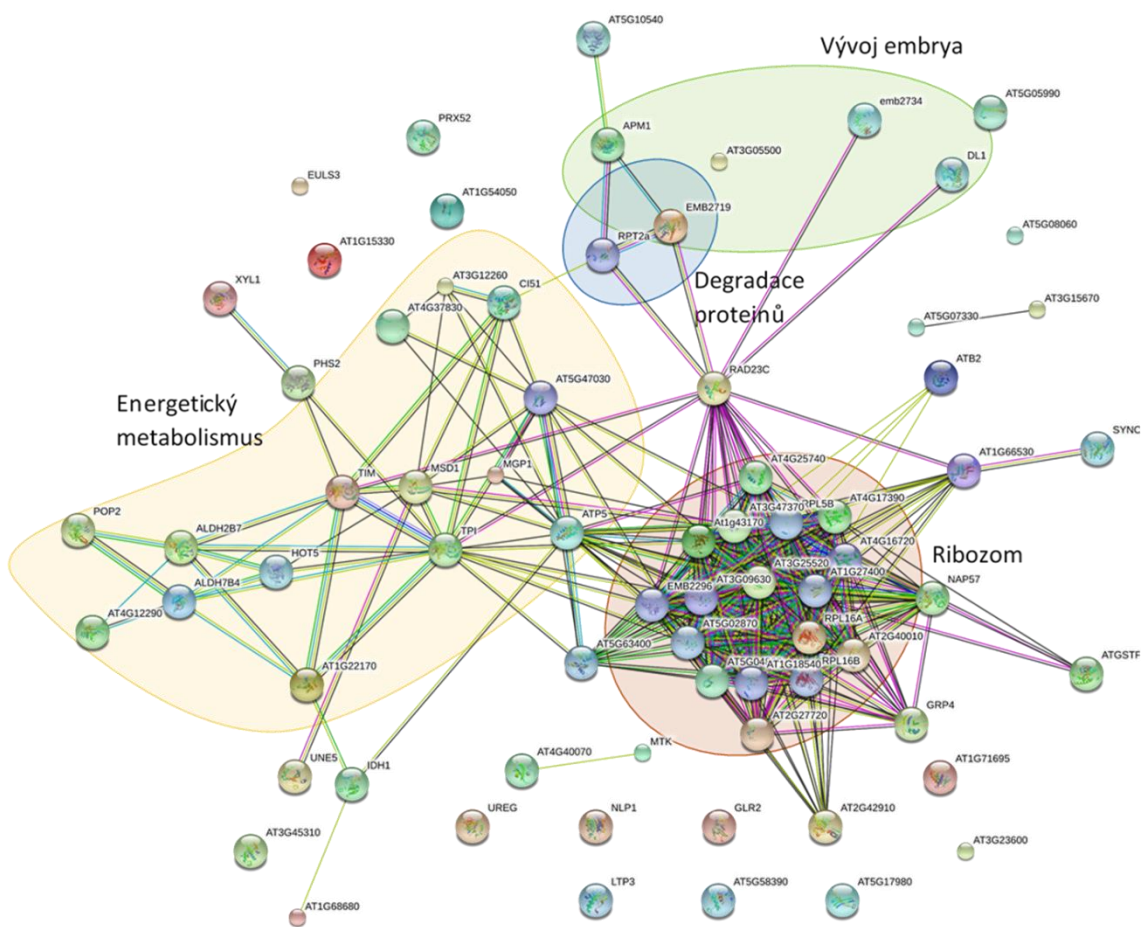
Z grafů na Obr. 18 lze pozorovat zajímavé rozdělení ve změnách proteinů. Při nízkých koncentracích H_2O_2 převažoval poměr proteinů, jejichž množství se snižovalo, kdežto při 1% koncentraci byl větší poměr proteinů, jejichž množství narůstalo. Pozorované rozdíly mohly být způsobeny různými růstovými fázemi embryí, ve kterých se při sběru nacházela. Do proteinů se zvýšeným množstvím v odpovědi již na nižší koncentrace H_2O_2 náležel člen z rodiny „heat shock“ proteinů (AK360636) nebo triosafosfátizomeráza (MLOC_10457.2), která hraje důležitou roli v energetickém metabolismu.



Obr. 18: Shrnutí počtu změn v množství proteinů pro jednotlivé koncentrace H_2O_2 . Změny jsou vztaheny ke kontrole (0% H_2O_2).

Jelikož anotace genů/proteinů ječmene nejsou ani zdaleka kompletní, byla pro lepší představu o funkci identifikovaných proteinů provedena analýza jejich orthologů u *Arabidopsis thaliana*. Na základě nalezených orthologů u *Arabidopsis thaliana* byla sestavena interakční síť (Obr. 19) sledovaných proteinů, ze které je patrné, že byly identifikovány tři základní klastry hrající důležitou roli v klíčení. První klastř odpovídá ribozomálním proteinům a proteinům zapojených do procesu translace. To odpovídá faktu, že k obnově syntézy proteinů dochází již v časných fázích klíčení skrze aktivaci ribozomů (Bewley et al., 2013). Během první fáze klíčení dochází také k obnově energetického metabolismu zajišťujícího potřebnou energii (Nonogaki et al., 2010), což je možné pozorovat na úrovni proteinů, které vytvářejí druhý ucelený klastř proteinů. Třetí klastř, který je sice v počtu pozorovaných proteinů se změněným množstvím nejmenší, je zapojen do procesu degradace proteinů. Tento proces je důležitý nejen pro

celkový buněčný metabolismus, ale také například pro signalizaci GA (viz Kap. 2.4). V mapě interakcí jsou pro ukázkou zvýrazněny čtyři z celkově osmi nalezených proteinů, u kterých byla potvrzena důležitá role pro vývoj embrya pomocí mutantních fenotypů u *Arabidopsis thaliana*. Mezi tyto zástupce patří například protein z rodiny dynaminů (MLOC_69619.1) zapojený do udržování integrity buněčné stěny, vezikulárního transportu, polárního růstu buněk a dalších aspektů souvisejících s růstem a vývojem rostlin (Kang et al., 2001). Zajímavým proteinem je aminopeptidáza (AK360995), jejíž ortholog M1 pravděpodobně hraje roli v regulaci PIN proteinů (transportéry auxinu) (Lee a Cho, 2012). Z literatury je známo, že auxiny hrají roli v dormanci semen, kdy interakce auxinů s ABA může podporovat její inhibiční účinek a bránit tak klíčení (Liu et al., 2013). To by bylo v souladu s dosavadním výzkumem, který naznačuje, že pozitivní efekt peroxidu na klíčení rostlin je zprostředkován narušením metabolismu a signalizace ABA. Za zmínku stojí i disulfid izomeráza (MLOC_15962.1), která katalyzuje přeskupení disulfidických vazeb v proteinech (UniProt). Z dalších proteinů to byly například

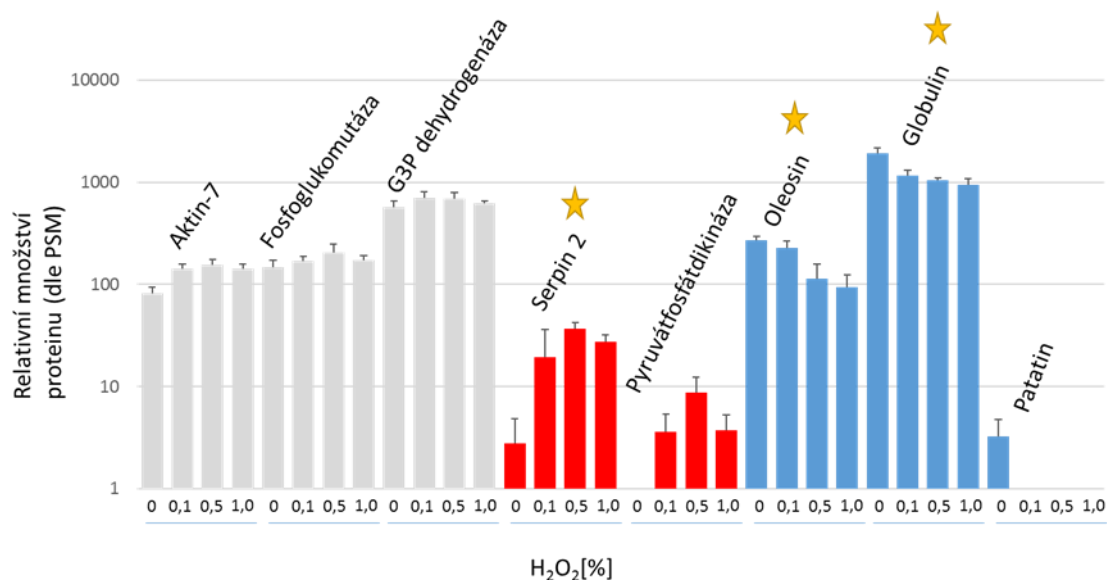


Obr. 19: Mapa interakcí změněných proteinů. Vytvořeno na základě analýzy orthologů k proteinům *Arabidopsis thaliana* (STRING; Szklarczyk et al., 2010).

asparagin-tRNA ligáza (AK363705), triosafosfátizomeráza (MLOC_10457.2) nebo 60S ribozomální protein (MLOC_56031.1). Ze 65 pozorovaných proteinů bylo podle databáze Černý et al. (2016) nalezeno 22 zástupců reagujících na signály fytohormonů a z toho celkově devět na ABA (údaje pro GA nebyly získány).

4.3.1 Identifikované fosfoproteiny a jejich změny v průběhu klíčení

První získaná data přinesla velmi zajímavé výsledky, které naznačují, že již při těchto testovacích pokusech bylo dosaženo velkého pokrytí buněčných procesů zapojených do procesu klíčení. Bohužel, i když je možné na základě homologie předpokládat u 10 proteinů přítomnost fosforylace, ani jeden není zastoupen mezi 20 kandidáty (Tab. 2) a ani na základě dat z celkového proteomu nebylo možné provést kvantifikaci, protože většina z nich buď vůbec nebyla identifikována, či nesplňovala podmínky pro spolehlivou kvantifikaci. V rámci probíhajícího opakování experimentu byly proto tyto proteiny přednostně vyhodnoceny. Celkem se podařilo shromáždit data pro osm (fosfo)proteinů. Tři proteiny nevykazují významné změny v průběhu klíčení, dva významně narůstají a zbývající tři zásobní proteiny významně klesají, což souhlasí s jejich očekávanou rolí v průběhu klíčení. Zatím je možné komentovat stav fosforylace pouze u oleosinu (AK356020), globulinu (MLOC_63227.1) a serpinu 2 (MLOC_10176.1), protože u ostatních buď nedochází k změně na úrovni celkového



Obr. 20: Relativní zastoupení (fosfo)proteinů a jejich změny v reakci na peroxid. Šedá – žádná významná změna; červená – významný nárůst; modrá – významný pokles. Hvězdička označuje proteiny, u kterých bylo možné monitorovat změny fosforylačního stavu.

proteinu, nebo nebyla zachycena nefosforylovaná forma hledaného fosfopeptidu. Ani v jednom z těchto tří případů však dostupná data neprokázala, že by v průběhu sledovaného experimentu docházelo k významné změně ve fosforylačním stavu. Dalším krokem bude optimalizace cílené analýzy, aby se podařilo kvantifikovat i zbývající (fosfo)peptidy.

5 ZÁVĚR

Klíčení rostlin představuje kritický bod v životě rostlin. Z výzkumů vyplývá, že PTM jsou zapojeny do procesu klíčení, a proto studium jejich změn může přinést informace, které mohou být uplatněny v zemědělské praxi. Studium PTM přináší jisté obtíže, které spočívají nejen v rozšíření diverzity proteomu. Například studium fosforylací zůstává stále výzvou i přes vývoj nových technik a materiálů pro jejich obohacování, protože nebyla dodnes vytvořena jednotná metodika pro nejúčinnější způsob obohacování vzorku o fosfopeptidy. Navíc mnoho publikací uvádí často protichůdné názory a různé optimální složení roztoků použitých při obohacování, a to nejen v závislosti na použitém vzorku, ale také na materiálu. Z důvodu mnoha uvedených problémů vyžaduje studium PTM často využití frakcionačních technik vedoucích ke zvýšení počtu identifikací, a navíc se studium změn neobejde bez znalosti změn na úrovni jednotlivých proteinů.

V bakalářské práci byly nejdříve testovány frakcionační techniky, kdy se nejvyšší úspěšnosti dosáhlo při použití ACN gradientu a při frakcionaci na úrovni pletiv, která přináší navíc důležitou informaci o lokalizaci identifikovaných proteinů, což může být velmi užitečné pro studium vývoje rostlin. V rámci snahy o usnadnění studia PTM byl navrhnout a otestován koncept spojující přenos peptidů a LESA-MS analýzu. Tato metoda se v průběhu testování osvědčila a ukázalo se, že by mohla přispět ke zjednodušení a zefektivnění proteomických analýz. V práci bylo otestováno několik obohacovacích technik, přičemž nejúčinnější byl komerční kit TopTip TiO₂ a bylo získáno prvních 20 kandidátů pro studium změn PTM v průběhu klíčení. Při klíčních experimentech byl sledován pozitivní efekt H₂O₂ na klíčení obilek ječmene. Pro sledování změn na úrovni proteinů se využila otestovaná frakcionace na úrovni pletiv, kdy bylo pomocí necílené analýzy kvantifikováno 822 proteinů. Cílenou analýzou bylo validováno 65 kandidátů s významně změněným množstvím. Bioinformatická analýza ukázala, že některé sledované proteiny mohou hrát důležitou roli v průběhu klíčení jako například aminopeptidáza (AK36099), protein z rodiny dynaminů (MLOC_69619.1) nebo disulfid izomeráza (MLOC_15962.1).

Práce poskytla robustní základy pro vytvoření metodiky pro studium změn PTM v průběhu klíčení. Získaná data budou využita v pokračujícím výzkumu, kdy již nyní probíhá měření druhého a třetího biologického opakování. Další experimenty budou cíleny na změny PTM, především na mechanismus, jakým ROS ovlivňuje dormanci semen a rychlost klíčení.

Tato práce vznikla díky podpoře grantu TE02000177 (TAČR) a podpoře MŠMT v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601), autor by také rád poděkoval Dr. Křenkové za poskytnutí materiálu na testování metod pro obohacování fosfopeptidů.

6 POUŽITÁ LITERATURA

ÅSSVEEN, M. (2009). Amino acid composition of spring barley cultivars used in Norway. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant Science*, 59(5), 395–401. ISSN 0906-4710.

BARALLOBRE-BARREIRO, J., CHUNG, Y. L., MAYR, M. (2013). Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 66(8), 657–661. ISSN 18855857.

BEWLEY, J. D., BRADFORD, K. J., HILHORST, H., NONOGAKI, H. (2013). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. 5. vyd. New York: Springer, 392 s. ISBN 978-1-4614-4692-7.

BOSCHETTI, E., BINDSCHEDLER, L. V., TANG, C., FASOLI, E., RIGHETTI, P. G. (2009). Combinatorial peptide ligand libraries and plant proteomics: a winning strategy at a price. *Journal of Chromatography A*, 1216(8), 1215–1222. ISSN 00219673.

CIEŚLA, J., FRĄCZYK, T., RODE, W. (2011). Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochimica Polonica*, 58(2), 137–148. ISSN 0001-527X.

CLARK, R. S., BAYIR, H., JENKINS, L. W. (2005). Posttranslational protein modifications. *Critical care medicine*, 33(12), S407–S409. ISSN 0090-3493.

COLLINS, M. O., YU, L., CHOUDHARY, J. S. (2007). Analysis of protein phosphorylation on a proteome- scale. *Proteomics*, 7(16), 2751–2768. ISSN 16159853.

CHAMPION, A., KREIS, M., MOCKAITIS, K., PICAUD, A., HENRY, Y. (2004). Arabidopsis kinome: after the casting. *Functional & integrative genomics*, 4(3), 163–187. ISSN 1438-793x.

ČERNÝ, M., SKALÁK, J., ČERNÁ, H., BRZOBOHATÝ, B. (2013). Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of proteomics*, 92, 2–27. ISSN 18743919.

ČERNÝ, M., JEDELSKÝ, P. L., NOVÁK, J. A. N., SCHLOSSER, A., BRZOBOHATÝ, B. (2014). Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, 37(7), 1641–1655. ISSN 01407791.

ČERNÝ, M., NOVÁK, J., HABÁNOVÁ, H., ČERNÁ, H., BRZOBOHATÝ, B. (2016). Role of the proteome in phytohormonal signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(8), 1003–1015. ISSN 15709639.

FASOLI, E., D'AMATO, A., KRAVCHUK, A. V., BOSCHETTI, E., BACHI, A., RIGHETTI, P. G. (2011). Popeye strikes again: The deep proteome of spinach leaves. *Journal of proteomics*, 74(1), 127–136. ISSN 18743919.

- FINCHER, G. B. (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual review of plant biology*, 40(1), 305–346. ISSN 1040-2519.
- FINNIE, C., MAEDA, K., ØSTERGAARD, O., BAK-JENSEN, K. S., LARSEN, J., SVENSSON, B. (2004). Aspects of the barley seed proteome during development and germination. *Biochemical Society Transactions*, 32(3), 517–519. ISSN 0300-5127.
- FÍLA, J., HONYŠ, D. (2012). Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino acids*, 43(3), 1025–1047. ISSN 0939-4451.
- FLEITZ, A., NIEVES, E., MADRID-ALISTE, C., FENTRESS, S. J., SIBLEY, L. D., WEISS, L. M., ANGELETTI, R. H., CHE, F. Y. (2013). Enhanced detection of multiply phosphorylated peptides and identification of their sites of modification. *Analytical chemistry*, 85(18), 8566–8576. ISSN 0003-2700.
- FRÖHLICH, A., GAUPELS, F., SARIOGLU, H., HOLZMEISTER, C., SPANNAGL, M., DURNER, J., LINDERMAYR, C. (2012). Looking deep inside: detection of low-abundance proteins in leaf extracts of *Arabidopsis* and phloem exudates of pumpkin. *Plant physiology*, 159(3), 902–914. ISSN 1532-2548.
- FUJII, H., CHINNUSAMY, V., RODRIGUES, A., RUBIO, S., ANTONI, R., PARK, S. Y., CUTLER, S. R., SHEEN, J., RODRIGUEZ, P. L., ZHU, J. K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*, 462(7273), 660–664. ISSN 0028-0836.
- FUKUDA, I., HIRABAYASHI-ISHIOKA, Y., SAKIKAWA, I., OTA, T., YOKOYAMA, M., UCHIUMI, T., MORITA, A. (2013). Optimization of enrichment conditions on TiO₂ chromatography using glycerol as an additive reagent for effective phosphoproteomic analysis. *Journal of proteome research*, 12(12), 5587–5597. ISSN 1535-3893.
- GALLARDO, K., JOB, C., GROOT, S. P., PUYPE, M., DEMOL, H., VANDEKERCKHOVE, J., JOB, D. (2001). Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiology*, 126(2), 835–848. ISSN 1532-2548.
- GOMI, K., SASAKI, A., ITOH, H., UEGUCHI-TANAKA, M., ASHIKARI, M., KITANO, H., MATSUOKA, M. (2004). *GID2*, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *The Plant Journal*, 37(4), 626–634. ISSN 09607412.
- HAN, C., WANG, K., YANG, P. (2014). Gel-based comparative phosphoproteomic analysis on rice embryo during germination. *Plant and Cell Physiology*, 55(8), 1376–1394. ISSN 0032-0781.
- HOU, J., CUI, Z., XIE, Z., XUE, P., WU, P., CHEN, X., LI, J., CAI, T., YANG, F. (2010). Phosphoproteome analysis of rat L6 myotubes using reversed-phase C18 prefractionation and titanium dioxide enrichment. *Journal of proteome research*, 9(2), 777–788. ISSN 1535-3893.

- HUMPHREY, S. J., JAMES, D. E., MANN, M. (2015). Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(12), 676–687. ISSN 10432760.
- ISHIBASHI, Y., AOKI, N., KASA, S., SAKAMOTO, M., KAI, K., TOMOKIYO, R., WATABE, G., YUASA, T., IWAYA-INOUE, M. (2017). The interrelationship between abscisic acid and reactive oxygen species plays a key role in barley seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 8, 275. ISSN 1664-462x.
- JOHNSON, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627–641. ISSN 0300-5127.
- KANG, B. H., BUSSE, J. S., DICKEY, C., RANCOUR, D. M., BEDNAREK, S. Y. (2001). The Arabidopsis cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1Ap, is required for multiple stages of plant growth and development. *Plant Physiology*, 126(1), 47–68. ISSN 1532-2548.
- KASHEM, M. A., ITOH, K., IWABUCHI, S., HORI, H., MITSUI, T. (2000). Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of α -amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology*, 41(4), 399–407. ISSN 0032-0781.
- KERSTEN, B., AGRAWAL, G. K., IWAHASHI, H., RAKWAL, R. (2006). Plant phosphoproteomics: a long road ahead. *Proteomics*, 6(20), 5517–5528. ISSN 16159853.
- KIEBER, J. J., SCHALLER, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 12, e0168. ISSN 1543–8120.
- KROKHIN, O. V., CRAIG, R., SPICER, V., ENS, W., STANDING, K. G., BEAVIS, R. C., WILKINS, J. A. (2004). An improved model for prediction of retention times of tryptic peptides in ion pair reversed-phase HPLC its application to protein peptide mapping by off-line HPLC-MALDI MS. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(9), 908–919. ISSN 1535-9476.
- KŘENKOVÁ, J., MORAVKOVÁ, J., BUK, J., FORET, F. (2016). Phosphopeptide enrichment with inorganic nanofibers prepared by forcespinning technology. *Journal of Chromatography A*, 1427, 8–15. ISSN 00219673.
- LEE, O. R., CHO, H. T. (2012). Cytoplasm localization of aminopeptidase M1 and its functional activity in root hair cells and BY-2 cells. *Molecular biology reports*, 39(12), 10211–10218. ISSN 0301-4851.
- LEITNER, A. (2016). Enrichment strategies in phosphoproteomics. *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols*, 1355, 105–121. ISSN 1064-3745.
- LI, Y., LUO, Y., WU, S., GAO, Y., LIU, Y., ZHENG, D. (2009). Nucleic acids in protein samples interfere with phosphopeptide identification by immobilized-metal-ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular biotechnology*, 43(1), 59–66. ISSN 1073-6085.

- LI, M., YIN, X., SAKATA, K., YANG, P., KOMATSU, S. (2015). Proteomic analysis of phosphoproteins in the rice nucleus during the early stage of seed germination. *Journal of proteome research*, 14(7), 2884–2896. ISSN 1535-3893.
- LI, X. S., YUAN, B. F., FENG, Y. Q. (2016). Recent advances in phosphopeptide enrichment: Strategies and techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 70–83. ISSN 01659936.
- LIU, S., ZHANG, C., CAMPBELL, J. L., ZHANG, H., YEUNG, K. K. C., HAN, V. K., LAJOIE, G. A. (2005). Formation of phosphopeptide- metal ion complexes in liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and their influence on phosphopeptide detection. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19(19), 2747–2756. ISSN 1097-0231.
- LIU, X., ZHANG, H., ZHAO, Y., FENG, Z., LI, Q., YANG, H. Q., LUAN, S., LI, J., HE, Z. H. (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15485–15490. ISSN 0027-8424.
- LLOYD, J., MEINKE, D. (2012). A comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in Arabidopsis. *Plant physiology*, 158(3), 1115–1129. ISSN 1532-2548.
- LÓPEZ-PEDROUSO, M., ALONSO, J., ZAPATA, C. (2014). Evidence for phosphorylation of the major seed storage protein of the common bean and its phosphorylation-dependent degradation during germination. *Plant molecular biology*, 84(4-5), 415–428. ISSN 0167-4412.
- MAK, Y., WILLOWS, R. D., ROBERTS, T. H., WRIGLEY, C. W., SHARP, P. J., COPELAND, L. (2009). Germination of wheat: a functional proteomics analysis of the embryo. *Cereal Chem*, 86(3), 281–289. ISSN 0009-0352.
- NEGRONI, L., CLAVEROL, S., ROSENBAUM, J., CHEVET, E., BONNEU, M., SCHMITTER, J. M. (2012). Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography. *Journal of Chromatography B*, 891, 109–112. ISSN 15700232.
- NISHI, H., HASHIMOTO, K., PANCHENKO, A. R. (2011). Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure*, 19(12), 1807–1815. ISSN 09692126.
- NONOGAKI, H., BASSEL, G. W., BEWLEY, J. D. (2010). Germination—still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574–581. ISSN 01689452.
- OLSEN, J. V., VERMEULEN, M., SANTAMARIA, A., KUMAR, C., MILLER, M. L., JENSEN, L. J., GNAD, F., COX, J., JENSEN, T. S., NIGG, E. A., BRUNAK, S., MANN, M. (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling*, 3(104), ra3. ISSN 1945-0877.

- SHEORAN, I. S., OLSON, D. J., ROSS, A. R., SAWHNEY, V. K. (2005). Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics*, 5(14), 3752–3764. ISSN 1615-9853.
- SZKLARCZYK, D., FRANCESCHINI, A., KUHN, M., SIMONOVIC, M., ROTH, A., MINGUEZ, P., DOERKS, T., STARK, M., MULLER, J., BORK, P., JENSEN, L. J., MERING, C. (2011). The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research*, 39(suppl 1), D561–D568. ISSN 0305-1048.
- THINGHOLM, T. E., LARSEN, M. R. (2016). Phosphopeptide enrichment by immobilized metal affinity chromatography. *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols*, 1355, 123–133. ISSN 1064-3745.
- TYANOVA, S., COX, J., OLSEN, J., MANN, M., FRISHMAN, D. (2013). Phosphorylation variation during the cell cycle scales with structural propensities of proteins. *PLoS Comput Biol*, 9(1), e1002842. ISSN 1553-734X.
- WALSH, C. T., GARNEAU- TSODIKOVA, S., GATTO, G. J. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(45), 7342–7372. ISSN 1433–7851.
- WINTER, D., SEIDLER, J., ZIV, Y., SHILOH, Y., LEHMANN, W. D. (2008). Citrate boosts the performance of phosphopeptide analysis by UPLC-ESI-MS/MS. *Journal of proteome research*, 8(1), 418–424. ISSN 1535-3893.
- YANG, C., ZHONG, X., LI, L. (2014). Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry- based phosphoproteomics. *Electrophoresis*, 35(24), 3418–3429. ISSN 01730835.
- YOSHIDA, T., MOGAMI, J., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2015). Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(6), 1043–1052. ISSN 0032-0781.

7 POUŽITÉ ZKRATKY

ABA	kyselina abscisová
ACN	acetonitril
AHK	<i>Arabidopsis</i> histidin kináza (angl. <i>Arabidopsis</i> h istidine k inase)
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidin fosfotransferový protein (angl. <i>Arabidopsis</i> histidine phosphotransfer protein)
ARR	regulátor odpovědi u <i>Arabidopsis</i> (angl. <i>Arabidopsis</i> response regulator)
CID	kolizně indukovaná disociace (angl. c ollision- i nduced d issociation)
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
FA	kyselina mravenčí (angl. f ormic a cid)
FDR	pravděpodobnost výskytu falešně pozitivního výsledku (angl. false discovery rate)
GA	gibereliny
GeLC-MS	gelová elektroforéza kombinovaná s LC-MS (angl. gel electrophoresis coupled with liquid chromatography-mass spectrometry)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (angl. h ydrophilic i nteraction l iquid c hromatography)
IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (i mmobilised m etal a ffinity c hromatography)
LC-MS	hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií (angl. l iquid c hromatography- m ass spectrometry)
LESA	kapalinová extrakční povrchová analýza (angl. l iquid e xtraction s urface a nalysis)
LESA-MS	hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou extrakční povrchovou analýzou (angl. l iquid e xtraction s urface a nalysis m ass spectrometry)
MALDI	laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (angl. m atrix- a ssisted l aser d esorption/ i onization)
MGF	mascot generic format

MOAC	afinitní chromatografie na oxidech kovů (angl. metal oxide affinity chromatography)
MS	hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
PIN protein	protein z rodiny auxinových transportérů (angl. pin-formed protein)
PP2C	2C proteinfosfatáza (angl. protein phosphatase 2C)
pSer	fosfoserin
PSM	přiřazená peptidová spektra (angl. peptide spectral match)
pThr	fosfothreonin
PTM	posttranslační modifikace (angl. posttranslational modification)
PYR/PYL/RCAR	receptory kyseliny abscisové (angl. pyrabactin resistance 1/pyrabactin resistance 1-like /regulatory component of ABA receptor)
Q	kvadrupól
ROS	reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species)
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza
SCX	kation-výměnná chromatografie (angl. strong cation exchange) (typ ionexové chromatografie)
SDS	dodecylsírán sodný (angl. sodium dodecyl sulphate)
SnRK2.2	proteinkináza SnRK2.2 (angl. SNF-1related protein kinase 2.2)
SRM	mód hmotnostní analýzy pro sledování charakteristického rozpadu molekuly (pro tzv. přechod) (angl. selected reaction monitoring)
TCA	kyselina trichloroctová (angl. trichloroacetic acid)
TFA	kyselina trifluoroctová (angl. trifluoroacetic acid)
Tris	tris(hydroxymetyl)aminomethan
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (angl. ultra performance liquid chromatography)
2D elektroforéza	dvojrozměrná elektroforéza
1D elektroforéza	jednorozměrná elektroforéza

8 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Procesy vedoucí k řádovým rozdílům mezi počtem protein-kódujících genů a počtem výsledných unikátních proteinů a jejich lokalizací
- Obr. 2: Fosforylace nacházející se v proteinech
- Obr. 3: Jednoduché schéma mechanismu reversibilní fosforylace modulující rozmanité proteinové funkce a vlastnosti
- Obr. 4: Zjednodušený přehled signálních drah fytohormonů
- Obr. 5: Příklad frakcionačních a obohacovacích technik ve fosfoproteomice
- Obr. 6: Zásadní události spojené s klíčením rostlin a následným začátkem růstu klíčící rostliny
- Obr. 7: Naplněná pipetovací špička TiO₂ spolu s injekční stříkačkou – součást kitu TopTip Porous Titanium Dioxide (Glygen)
- Obr. 8: Přístroj TriVersa NanoMate (Advion) umožňující LESA-MS analýzu
- Obr. 9 Interpretace změn PTM
- Obr. 10: Ekvalizace proteomu
- Obr. 11: Schéma frakcionace pomocí ACN gradientu
- Obr. 12: Schéma běžné GeLC-MS analýzy (A); Schéma zjednodušené analýzy pomocí přenosu peptidů a LESA-MS analýzy (B)
- Obr. 13: Identifikace peptidu VAIMEVNPR pomocí kombinace elektroforetického přenosu a LESA-MS analýzy
- Obr. 14: Ukázka separace ječmenné obilky
- Obr. 15 Rozdělení obilky výrazně navyšuje množství identifikovaných proteinů
- Obr. 16: Peroxid vodíku stimuluje klíčení
- Obr. 17: Přehled změněných proteinů
- Obr. 18: Shrnutí počtu změn v množství proteinů pro jednotlivé koncentrace H₂O₂
- Obr. 19: Mapa interakcí změněných proteinů
- Obr. 20 Relativní zastoupení (fosfo)proteinů a jejich změny v reakci na peroxid

9 PŘÍLOHY

BERKA M. (2016): Peptide blotting and liquid extraction surface analysis for protein detection and identification: proof of concept. In POLÁK, O., CERKAL, R., BŘEZINOVÁ BELCREDI N. *MendelNet 2016 – Proceedings of international PhD Students Conference*. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, 2016, s. 956-960. ISBN 978-80-7509-443-8.

Abstract: We demonstrate that peptides of in-gel digested proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis can be transferred directly onto a C18 disk and analyzed via Liquid Extraction Surface Analysis mass spectrometry. This concept, if further optimized, could facilitate a rapid identification of proteoforms separated by 1D

PEPTIDE BLOTTING AND LIQUID EXTRACTION SURFACE ANALYSIS FOR PROTEIN DETECTION AND IDENTIFICATION: PROOF OF CONCEPT

MIROSLAV BERKA

Department of Molecular Biology and Radiobiology
Mendel University in Brno
Zemedelska 1, 613 00 Brno
CZECH REPUBLIC
xberka1@mendelu.cz

Abstract: We demonstrate that peptides of in-gel digested proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis can be transferred directly onto a C18 disk and analyzed via Liquid Extraction Surface Analysis mass spectrometry. This concept, if further optimized, could facilitate a rapid identification of proteoforms separated by 1D or 2D electrophoresis.

Key Words: LESA, peptide blotting, MS

INTRODUCTION

Liquid Extraction Surface Analysis (LESA) is one of the mode of operation for the TriVersa NanoMate, an automated chip-based nanoelectrospray source for mass spectrometry. LESA enables simple, direct nanoESI mass spectrometric analysis from a variety of surfaces, including thin tissue sections, TLC plates and other planar separation media. Previously, it has been shown that noncovalently bound protein complexes can be directly probed via liquid extraction surface analysis from dried blood spot samples and that the intact hemoglobin complex can be sampled directly from thin tissue sections of mouse liver (Griffiths and Cooper, 2016). However, the analysis of intact proteins is still limited and even high-end instruments can't offer the sufficient resolution and sensitivity to address a complex mixture.

Electrophoretic methods provide invaluable resolution and a cost effective fractionation of a complex proteome sample (e.g. Černý et al. 2014). Available studies that compare gel-based and gel-free "shotgun" quantitative proteomics have demonstrated that a significant portion of proteome changes detected by a gel-based technique occur on the proteoform level and are not observed in the later approach (e.g. Černý et al. 2013, Baldrianová et al. 2015). However, the identification of separated proteoforms from a gel requires a multistep procedure that includes gel excision, washing, digestion, peptide extraction and desalting steps. In effect, a protein identification is usually limited only to a small subset of protein bands or spots and thus the most of the resolved proteome is not identified. Here, to address this issue, we tested the combination of peptide blotting and LESA connected to a mass spectrometer (MS).

MATERIAL AND METHODS

Protein extraction and separation

App. 100 mg of barley kernels were homogenized in Retsch Mill. The resulting fine powder was suspended in SDS-sample buffer (100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 50 mM TRIS, pH 6.8), boiled for 10 min and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE); TRIS-glycine PAGE; stacking gel - 5%; resolving gel - 11%; 50 V for 10 min and 150 V for 60 min; Mini-PROTEAN system, Bio-Rad).

Gel washing, digestion and blotting

The whole gel was washed with distilled water, fixed in acetonitrile (5 min) and dried on air. Dried gel was overlaid with 5 ml of trypsin solution (20 µg, Promega, MS-grade; 50 mM ammonium bicarbonate), incubated for 20 min at 4 °C and digested overnight at 37 °C. The gel with digested proteins was rinsed with 0.1% formic acid (FA) and blotted onto EMPORA C18 disk by a semi-dry blotting (30 min, 5 mA/cm²; Bio-Rad).

LESA-MS analysis

Advion TriVersa NanoMate was operated in the LESAs mode. The surface extraction was achieved by dispensing and aspirating of 2 µl of the extraction solvent (0.1% FA in acetonitrile). The extraction time was set to 5 s and the sample was delivered to MS at constant flow for 10 min at 1,400 V. Ion trap was operated in CID mode with the following acquisition parameters: MS - enhanced resolution mode with the scan range 400-2,000 m/z; ICC target 400,000; 3 spectra averages; SPS target mass 900 m/z; MS/MS - XtremeScan mode with the scan range 100 m/z to 2× mass of the precursor; ICC target 500,000; Smart Isolation, 20 precursors, no spectra averaging and the fragmentation amplitude at 60%.

Identification of peptides extracted from C18 disk by LESAs

The measured spectra were processed by Bruker's Data Analysis 4.1 as described previously (e.g. Cerna et al. 2016) and the resulting MGF files were searched against barley protein database by Sequest HT with the following parameters: trypsin; max two missed cleavage sites; mass tolerance 0.3 Da; up to three dynamic modifications including Met oxidation, Asn/Gln deamidation, Lys methylation, N-terminal acetylation.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein separation, digestion and transfer to C18 disk

To test the feasibility of peptide blotting and LESAs-MS, we separated a representative complex proteome sample extracted from homogenized barley seeds by SDS-PAGE. The resulting gel was fixed and dried by acetonitrile and then soaked with 5 ml of 0.0004% (w/v) MS-grade Trypsin and digested overnight. The gel with digested peptides was overlaid with 0.1% formic acid and blotted onto a C18 disk. The successful blotting was confirmed by observing the transfer of colored bands of a protein marker (Bio-Rad). The whole protocol takes less than 24 h (Table 1).

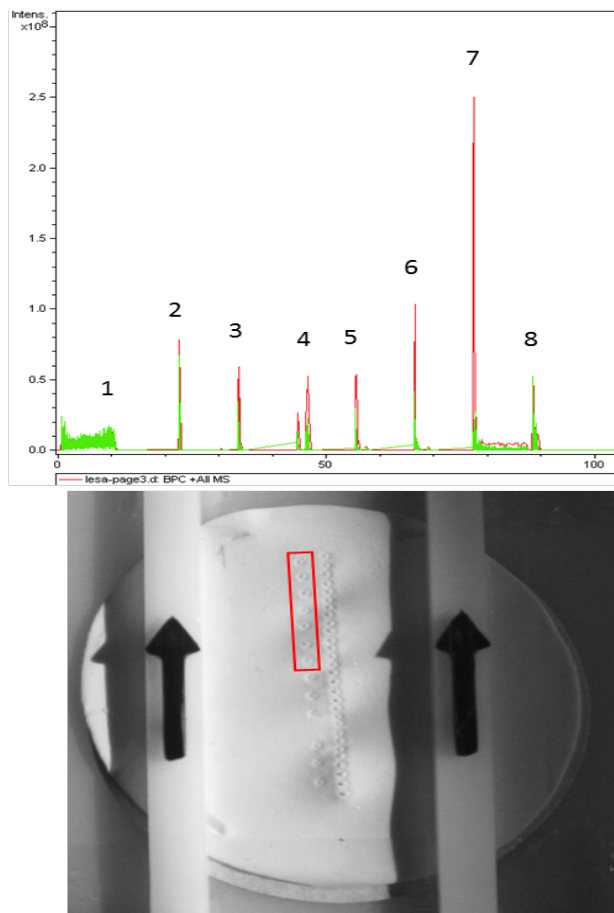
Table 1 Overview of the experiment

Method	Details	Time [h]
Protein extraction	Retsch Mill MM400, boiled in SDS-sample buffer	0.5
SDS-PAGE	5% stacking gel, 11% resolving gel; 150 V for 60 min;	1.0
Digestion	Trypsin, 20 µg (Promega)	15.0
Blotting	Washed with 0.1% FA; 30 min blotting (5 mA/cm ²); EMPORA C18 disk	0.5
LESA-MS	TriVersa NanoMate (Advion) and amaZon Speed ion trap (Bruker)	5.0

Identification of peptides extracted from C18 disk by LESAs

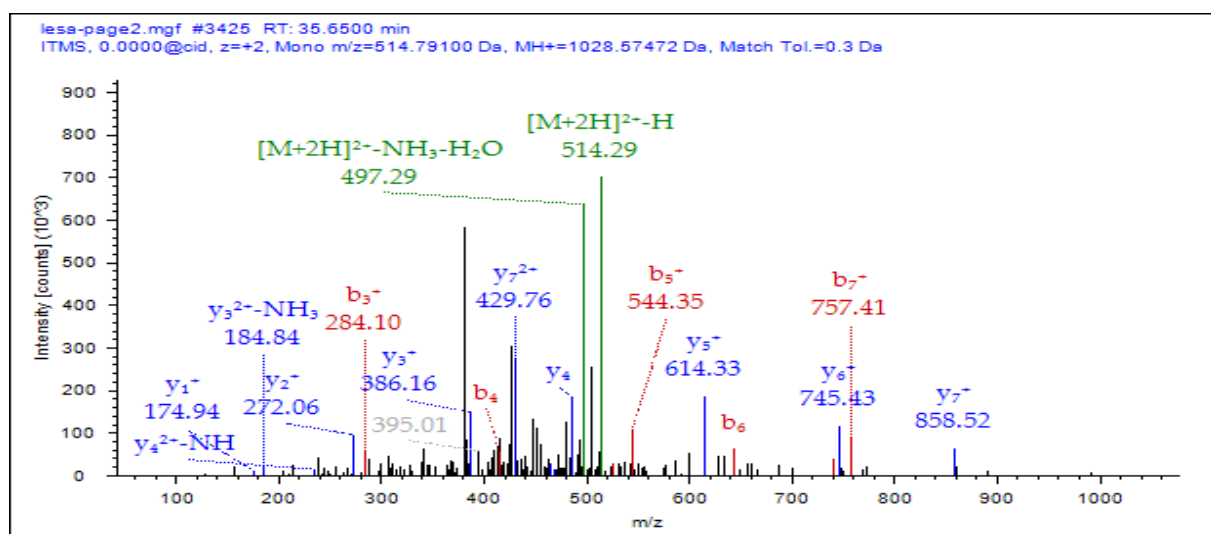
The C18 disk was taped to the LESAs holder and analyzed by LESAs connected to the mass spectrometer as described in Materials and Methods and the resulting spectra were analyzed (Figure 1). Altogether, 34 barley peptides were successfully identified in LESAs-MS spectra, including peptide VAIMEVNPR detected in the third extraction (Figure 2).

Figure 1 C18 disk after the LESA analysis and the corresponding MS chromatogram



The number of identified peptides correlates with a short extraction period (5 s) and would likely improve with a more sensitive/faster MS analyzer. Further, the solution employed in LESA (0.1% formic acid in acetonitrile) provides optimal conditions for peptide elution, but the amount of coeluting peptides suppresses the signal. A stepwise extraction gradient could improve the results, but would require a modification in the Advion software that would allow multiple extractions out of a single spot. We also found that the average amount of hydrophobic residues in identified peptides is 43%, which indicates that those more hydrophilic peptides could have migrated deeper into the disk or that the transfer time was too long to retain them in a C18 disk.

Figure 2 Representative peptide spectrum measured by LESA-MS



CONCLUSION

Our experiments proved that the semidry Western blot can be adapted for a peptide transfer and employed as a desalting step prior the ESI analysis. If further optimized, its combination with the LESA could provide a high throughput platform for identification of proteins separated by SDS-PAGE.

ACKNOWLEDGEMENTS

The results of this research have been acquired within CEITEC 2020 (LQ1601) project with financial contribution made by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic within special support paid from the National Programme for Sustainability II funds.

REFERENCES

- Baldrianová, J., Černý, M., Novák, J., Jedelský, P.L., Divišková, E., Brzobohatý, B. 2015. Arabidopsis proteome responses to the smoke-derived growth regulator karrikin. *Journal of Proteomics*, 120: 7–20.
- Cerna, H., Černý, M., Habánová, H., Šafářová, D., Abushamsiya, K., Navrátil, M., Brzobohatý, B. 2016. Proteomics offers insight to the mechanism behind *Pisum sativum* L. response to Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV). *Journal of Proteomics*, In Press. doi:10.1016/j.jprot.2016.05.018
- Černý, M., Kuklová, A., Hoehenwarter, W., Fragner, L., Novák, O., Rotková, G., Jedelský, P. L., Žáková, K., Šmečilová, M., Strnad, M., Weckwerth, W., Brzobohatý, B. 2013. Proteome and metabolome profiling of cytokinin action in Arabidopsis identifying both distinct and similar responses to cytokinin down- and up-regulation. *Journal of Experimental Botany*, 64(14): 4193–4206.
- Černý, M., Jedelský, P. L., Novák, J., Schlosser, A., Brzobohatý, B. 2014. Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 37(7): 1641–1655.
- Griffiths, R.L., and Cooper, H.J. 2016. Direct Tissue Profiling of Protein Complexes: Toward Native Mass Spectrometry Imaging. *Analytical Chemistry*. 88(1): 606–660.
- Novák, J., Černý, M., Pavlů, J., Zemánková, J., Skalák, J., Plačková, L., Brzobohatý, B. 2015. Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root-to-hypocotyl ratio changes induced by shading roots of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiology*, 56(5): 1006–1018.