

VYUŽITÍ AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE PRO STUDIUM PŮSOBNÍ VYBRANÝCH OXYSTEROLŮ U ROSTLIN

MAREK KAMLAR^{a,b}, ONDŘEJ UHLÍK^{a,b},
ILONA CHLUBNOVÁ^b, LADISLAV KOHOUT^a,
JURAJ HARMATHA^a, RUDOLF JEŽEK^a,
MILOSLAV ŠANDA^{a,b}, ANDREA PIŠVEJCOVÁ^a
a TOMÁŠ MACEK^{a,b}

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
macek@uochb.cas.cz

Došlo 3.8.09, přijato 16.10.09.

Klíčová slova: brassinosteroidy, ekdysteroidy, fytohormony, fytosteroly, osmotin, oxysteroly, RuBisCO, steroidní receptory, vazebné bílkoviny

Obsah

1. Úvod
2. Rostlinné oxysteroly
 - 2.1. Brassinosteroidy
 - 2.2. Ekdysteroidy
3. Afinitní chromatografie a její využití pro studium působení oxysterolů u rostlin
 - 3.1. Příprava kolon pro afinitní chromatografii
 - 3.1.1. Imobilizace steroidního ligandu na polymerní matici
 - 3.1.1.1. Tvorba amidové vazby
 - 3.1.1.1.1. Metoda aktivních esterů
 - 3.1.1.2. Tvorba esterové vazby
 - 3.2. Izolace a identifikace vazebných bílkovin
 - 3.2. Izolace a identifikace vazebných bílkovin
4. Bílkoviny s afinitou k vybraným rostlinným oxysterolům
 - 4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů
 - 4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů
5. Závěr

1. Úvod

Mezi nejprostudovanější skupiny rostlinných oxysterolů patří tzv. brassinosteroidy (BR) a ekdysteroidy (ES). Zatímco význam BR pro rostliny je znám – působí u nich zejména jako pozitivní regulátory jejich růstu a též jako látky schopné ovlivňovat adaptaci rostliny na stres^{1,2} – funkce ES v rostlinách dosud příliš objasněna není. Některé práce^{3–5} sice naznačují, že by u nich ES mohly hrát jistou roli v boji proti některým býložravým škůdcům a působit tedy jako jakési přírodní pesticidy, ale konečně „ano, je tomu skutečně tak“ stále vyřčeno nebylo a bude tak třeba ještě dalších potvrzujících studií.

O BR je také známo, že jsou hormonálně aktivní⁶ a že přenos signálu do buňky a následná buněčná odpověď jsou zprostředkovány systémem receptorů (příp. i vazebných bílkovin) lokalizovaných v buněčné membráně^{7,8}. Jak je tomu ale v případě ES, prozatím zřejmé není.

V souvislosti s objasněním mechanismu působení obou skupin těchto látek u rostlin je výzkum orientován převážně dvěma směry: první spočívá ve snaze o cílené odstranění (knock-out) či utlumení (knock-down) některého z genů ovlivňujících signální dráhu studovaných steroidů^{9,10}, druhý naopak využívá přímé izolace vazebných bílkovin či samotných receptorů, a to buď pomocí molekulárně-biologických metod^{11–13}, nebo s využitím afinitní chromatografie (AC), které se bude věnovat právě tato práce.

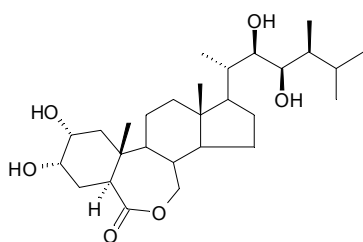
Kromě již výše zmíněného lze pro studium dané problematiky využít např. i fotoafinitního značení^{14,15}, radiochemických metod^{7,16,17} či jejich kombinace^{7,18}, dále pak troj-hybridního systému spojeného s aktivací tzv. reportérových genů^{19,20} a v neposlední řadě i metod založených na přenosu fluorescenčně rezonanční energie neboli FRET (z angl. fluorescence resonance energy transfer)^{21,22}.

2. Rostlinné oxysteroly

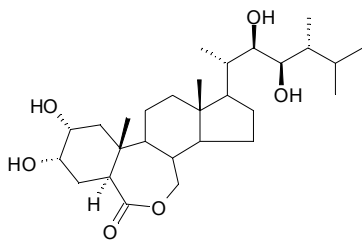
Jako oxysteroly (OS) označujeme steroidní alkoholy s 3β-hydroxylovou skupinou a 17β-alifatickým postranním řetězcem, které mají atomem kyslíku modifikován A- či B-kruh steranového cyklu, příp. i boční řetězec^{23,24}. Z rostlinných zástupců OS – též oxyfytoosterolů – jsou nejprostudovanější zejména kyslíkaté deriváty β-sitosterolu, kampesterolu a stigmasterolu^{25–27}, ale i jiné OS včetně již výše zmiňovaných brassinosteroidů²⁴ a ekdysteroidů²⁸, jimiž se dále budeme podrobněji zabývat.

2.1. Brassinosteroidy

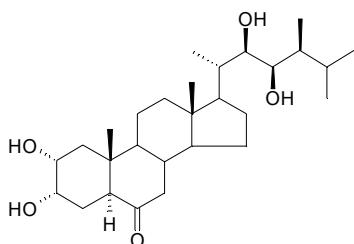
Brassinosteroidy (obr. 1) jsou látkami ryze rostlinnými. Mohou se v nich vyskytovat jednak volně a jednak vázané, přičemž vázanou formu většinou představují různé typy konjugátů, nejčastěji estery s nasyčenými i nenasycenými kyselinami, méně často pak glykosidy²⁴. U rostlin přitom hrají nezastupitelnou roli: podporují tvorbu biomasy, růst a diferenciaci orgánů, příp. regulují počet a velikost semen a následně i plodů. Kromě toho se též podílejí na přizpůsobivosti rostliny nepříznivým životním podmínkám, jimiž jsou např. nedostatek živin, sucho či naopak



brassinolid, první objevený brassinosteroid



24-epibrassinolid



kastasteron, biosyntetický prekurzor brassinolidu

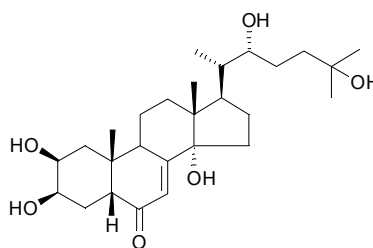
Obr. 1. Příklady přirozeně se vyskytujících brassinosteroidů

zamokření půdy, přítomnost herbicidů, toxických polutantů životního prostředí, nadbytek solí, chlad, popř. napadení rostliny škůdcem (patogenním mikroorganismem či třeba býložravým hmyzem), ale třeba i na oddalování senescence neboli stárnutí rostliny⁶.

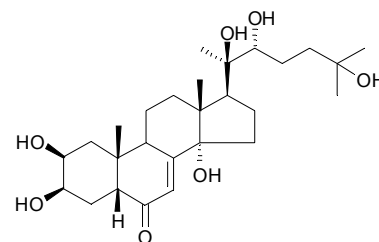
Výsledky studií z posledních let poukazují na to, že BR působí podobně jako peptidové hormony u živočichů prostřednictvím přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. Někteří autoři^{7,29} hovoří o přímé vazbě steroidu, jiní⁸ zase o vazbě nepřímé, kdy nejprve dojde ke vzniku komplexu steroid-vazebná bílkovina a teprve ten se váže na receptor. Který z výše uvedených předpokladů je však ten správný, není, bohužel, stále zcela jasné.

2.2. Ekdysteroidy

Ekdysteroidy (obr. 2) byly oproti BR nalezeny jak u živočichů (např. u hmyzu a korýšů), tak u rostlin (nejhojněji jsou zastoupeny zejména ve špenátu a některých kapradinách)^{30,31}. Podobně jako v případě BR se mohou vyskytovat ve volné či vázané formě. Vázanou formu v tomto případě představují hlavně glukosidy a sulfáty²⁸. ES jsou někdy označovány rovněž jako tzv. svlékací hormony, a to díky vlivu na fáze zakuklení a svlékání (ekdysi) hmyzu. U něj kromě toho ovlivňují také tvorbu pohlavních feromonů a negativně též tzv. vitelogenesi⁴, tedy tvorbu



ekdyson, první objevený ekdysteroid



20-hydroxyekdyson

Obr. 2. Příklady přirozeně se vyskytujících ekdysteroidů

žloutku ve vajíčku. Co se však jejich významu pro rostliny týče, ten je i přes značný obsah ES v rostlinné tkáni stále nejasný. Na základě faktu, že ES zasahují do vývoje hmyzu, byla navržena hypotéza, podle níž by u rostlin mohly hrát roli v obraně proti některým býložravým škůdcům (zejména proti hmyzu a půdním hlísticím) a působit tedy jako jakési přírodní pesticidy^{3–5,32}. Pravdivost této hypotézy však dosud jednoznačně potvrzena nebyla a její ověření či naopak vyvrácení je tak předmětem dalších výzkumů.

3. Afinitní chromatografie a její využití pro studium působení oxysterolů u rostlin

Afinitní chromatografie (AC) je separační metoda založená na specifické a současně vratné interakci mezi dvěma molekulami dvou různých látek, tj. např. mezi li-

gandem navázaným na polymerní matici (sorbentem) a biomolekulou s afinitou k tomuto ligandu³³. V případě studia působení rostlinných steroidních hormonů pomocí AC je pak ligandem míněna látka steroidní povahy a biomolekulou její vazebná(é) bílkovina(y), resp. přímo bílkovinný(é) receptor(y).

Samotná izolace těchto bílkovin ze vzorku spočívá v jejich prvotním specifickém navázání na sorbent a po odmytí balastních bílkovin v jejich opětovném uvolnění, a to buď specificky působením kompetujícího ligandu, nebo nespecificky změnou podmínek prostředí (iontové síly, pH či teploty)^{33,34}. Získané bílkoviny jsou poté podrobovány elektroforetické separaci s následnou hmotnostně-spektrometrickou analýzou a její výsledky pak tvoří podklady pro jejich konečnou identifikaci.

3.1. Příprava kolon pro afinitní chromatografii

Jedním ze způsobů provedení AC je kontinuální systém v koloně. Ten skýtá oproti vsádkové metodě řadu praktických výhod, zejména pak možnost využít k eluci kontinuálních gradientů v případech, kdy sorbent není monospecifický, či třeba jen vyšší efektivitu AC danou lepším kontaktem mezi adsorbentem a samotným vzorkem mnohdy velkého objemu³⁴. Nespornou výhodou je také možnost automatizace celého procesu, např. napojením na nějaký střednětlaký chromatografický systém³⁵ umožňující jak UV detekci vymývaných či eluovaných bílkovin, tak i monitorování gradientu koncentrace elučních pufrů procházejících vodivostí celou, to vše s grafickým výstupem na monitoru počítače.

3.1.1. Imobilizace steroidního ligandu na polymerní matici

Prvním krokem při přípravě sorbentu pro afinitní chromatografii je navázání vhodného ligandu na polymerní matici. Způsob vazby závisí jednak na povaze ligandu a jednak na typu použité matrice. Pokud je ligandem nízkomolekulární látka (s relativní molekulovou hmotností do 1000), což v případě většiny steroidních látek platí, je nutné oddálit ligand od povrchu nosiče tak, aby se stal pro biomolekulu dosažitelný. K tomu slouží tzv. oddalující raménka (angl. spacer arms). Těmi jsou nejčastěji kratší lineární uhlovodíky, které jsou na jednom konci opatřeny skupinami, jimiž se vážou na nosič (např. primárním aminem nebo hydroxyskupinou), a na druhém konci skupinami, kterými se vážou na ligand, tedy např. amino- nebo karboxyskupinami^{33,36}.

Imobilizace steroidů na polymerní nosič vychází z klasické Merrifieldovy syntézy peptidů na pevné fázi³⁷, která však byla pro potřeby steroidních látek^{38–41}, příp. přímo BR a ES^{42,43}, různě modifikována. Protože v případě fytosteroidů či jejich syntetických analogů většinou není známo, která část jejich molekuly je zodpovědná za interakci steroid-bílkovina, je nutné připravovat více typů afinitních nosičů současně. Ligandy tak mohou být vázány pomocí –OH skupiny na A-kruhu či modifikované oxoskupiny na kruhu B, příp. prostřednictvím –OH či –COOH skupin na bočním řetězci. Nejčastějším typem vazeb, jichž je při tomto navazování využíváno, jsou vazby amidové a esterové a s jejich přípravou se nyní blíže seznámíme.

3.1.1.1. Tvorba amidové vazby

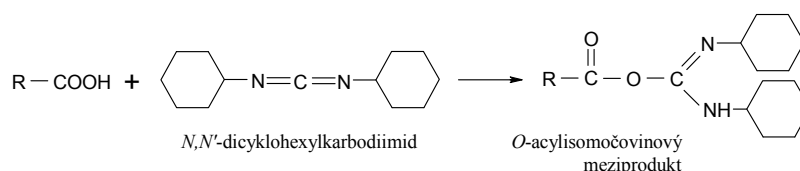
Pro tvorbu amidové vazby byly postupně vyvinuty zejména tyto čtyři metody: chloridová, azidová, metoda anhydridů a metoda aktivních esterů, přičemž nejčastěji používanou je poslední zmiňovaná^{39,44}.

3.1.1.1.1. Metoda aktivních esterů

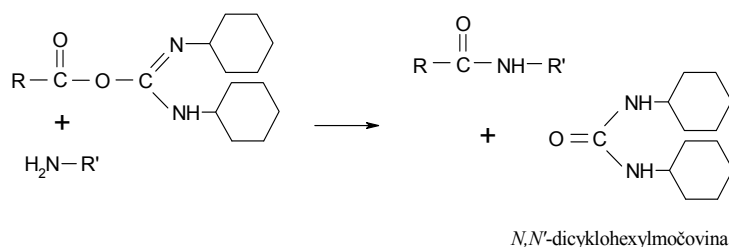
Počáteční snahy o využití aktivních esterů při syntéze na pevné fázi spadají již do období Merrifielda³⁷. Pro botnání pryskyřice byl tehdy používán zejména benzen, který se však pro své nedostatečné botnací schopnosti, které následnou reakci aktivních esterů s aminoskupinami matrice výrazně zpomalovaly, ukázal jako nevhodný. Další studie^{39,44,45} se zmiňují o dimethylformamidu, dimethylacetamidu, dichlormethanu a také o *N*-methylpyrrolidonu, které se naopak v syntéze na pevné fázi velmi osvědčily.

V případě tvorby amidové vazby mezi steroidním ligandem a volnými skupinami polymerní matrice, resp. oddalujícího raménka, byla prvním krokem aktivace karboxylové skupiny steroidního ligandu vedoucí k tvorbě aktivního esteru. K tomu se používají hlavně karbodiimidy a též *N*-hydroxybenzotriazol (1-hydroxybenzotriazol, HOBt) nebo jeho deriváty, např. BOP, HBTU, TBTU aj.⁴⁶

Nejužívanějšími karbodiimidy jsou *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC) a *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC, DCCI). Jejich působením na ligand s volnou –COOH skupinou vzniká meziproduct označovaný jako *O*-acylisomočovina (obr. 3). Ta poté reaguje s volnou –NH₂ skupinou molekuly druhé látky (druhý krok tvorby amidové vazby), čímž dojde k vytvoření amidové vazby mezi ligandem s karboxylovou skupinou a látkou nesoucí aminoskupinu za současného vzniku *N,N'*-diisopropyl-, resp. *N,N'*-dicyklohexylmočoviny (obr. 4).



Obr. 3. Příklad karbodiimidové metody



Obr. 4. Tvorba amidové vazby

N,N' -Dicyklohexylmočovina je velmi špatně rozpustná ve většině organických rozpouštědel, proto ji lze z výsledné směsi snadno odfiltrovat. Toho se využívá zejména v případech, kdy syntéza probíhá v roztoku. Jestliže ovšem syntéza probíhá na pevné fázi, je naopak výhodnější používat DIC, z něhož vznikající N,N' -diisopropylmočovina zůstává v roztoku, zatímco syntetizovaný peptid, resp. látka s amidovou vazbou zůstává zachycena, např. na fritě³⁹.

V průběhu tvorby amidové vazby karbodiimidovou metodou dochází také k reakci *O*-acylisomočoviny s karboxyskupinou dosud nezreagované kyseliny. Vzniká symetrický anhydrid, který následně reaguje s aminosložkou reakční směsi za vytvoření amidové vazby a opětovného uvolnění původně spotřebované kyseliny.

Karbodiimidy jsou látky velice reaktivní, aktivace tudíž probíhá velmi rychle. Pokud jsou navíc do směsi přidány $-\text{COOH}$ i $-\text{NH}_2$ složky, kromě aktivace probíhá i mnohem pomalejší vedlejší reakce karbodiimidu s volnou $-\text{NH}_2$ skupinou molekuly druhé látky za vzniku nereaktivního (a tedy nežádoucího) vedlejšího produktu, derivátu guanidinu (obr. 5, cit.³⁹). Nukleofilní atom dusíku na *O*-acylisomočovinně může také soutěžit o acylový zbytek, což vede k isomerizaci a vzniku minoritního podílu nežá-

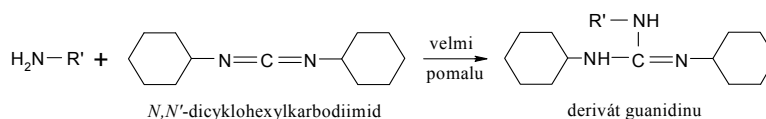
doucího nereaktivního vedlejšího produktu, *N*-acylmočoviny (obr. 6).

Tvorbu *N*-acylmočoviny (stejně jako i racemizaci) lze potlačit přidávkem hydroxybenzotriazolů⁴⁷, např. HOBt (obr. 7a) nebo 1-hydroxy-7-azabenzotriazolu (HOAt; obr. 7b). $\text{O} \rightarrow \text{N}$ acylový posun v „isomočovinně“ je přitom potlačen nukleofilním atakem HOBt na karbonylový uhlík acylu a následným vznikem aktivního (HOBt) esteru karboxylové kyseliny.

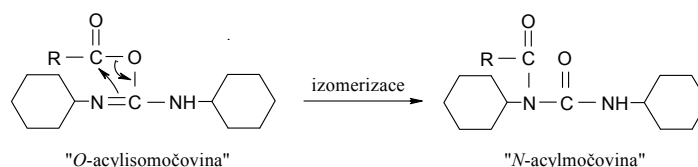
Reakční složky mohou být přidávány do reakční směsi buď současně, nebo postupně, tj. teprve po proběhnutí aktivace $-\text{COOH}$ skupiny, např. pomocí karbodiimidu. V prvním případě vzniká cyklický meziprodukt (obr. 8), zatímco ve druhém dochází nejprve ke vzniku *O*-acylisomočoviny, ze které teprve po přidávku HOBt vzniká ester, *O*-acyl-1-hydroxybenzotriazol (obr. 9).

Estery 1-hydroxybenzotriazolu jsou extrémně silnými acylačními činidly⁴⁷. Jejich reaktivita zřejmě souvisí s existencí již zmiňovaného cyklického intermediátu tvořeného $-\text{NH}_2$ skupinou, acylem a dusíkovými atomy HOBt. Výsledkem této interakce je tvorba amidové vazby a regenerace hydroxybenzotriazolu (obr. 8).

Hydroxybenzotriazoly mohou ovšem reagovat i bez přítomnosti karbodiimidů. Meziproduktem jsou pak jejich

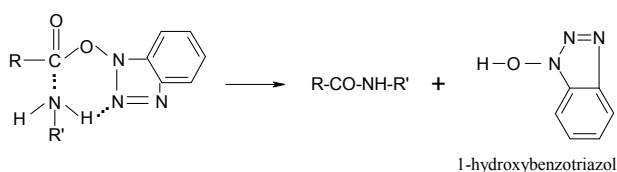


Obr. 5. Tvorba vedlejšího produktu, derivátu guanidinu

Obr. 6. Tvorba „*N*-acylmočoviny“



Obr. 7. a) HOBt, 1-hydroxybenzotriazol,
b) HOAt, 1-hydroxy-7-azabenzotriazol



Obr. 8. Tvorba amidové vazby cestou cyklického meziproduktu

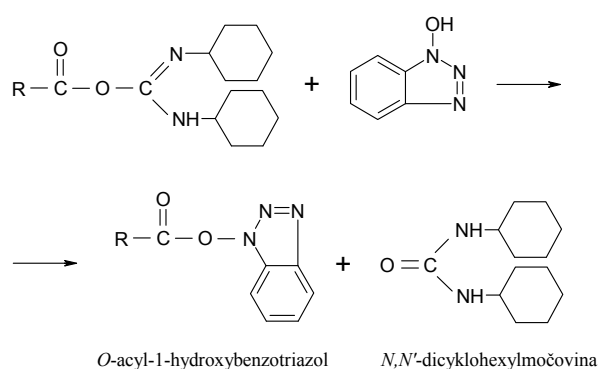
estery, které po reakci s aminoskupinami iniciují tvorbu amidové vazby mezi oběma složkami reakční směsi a podobně jako v předchozím případě regeneraci původního hydroxybenzotriazolu (obr. 10).

Výše uvedený způsob imobilizace byl použit⁴² u syntetických brassinosteroidů s volnou karboxyskupinou na bočním řetězci (např. u analogu odvozeného od kyseliny bisnorcholanové; obr. 11a), resp. s toutéž skupinou na modifikovaném B-kruhu steranového cyklu (např. u karboxymethyloximového derivátu 24-epikastasteronu; obr. 11b). Vzhledem k přítomnosti jedině -COOH skupiny v molekulách těchto látek se vždy jednalo o imobilizaci orientovanou. Pokud by však těchto skupin bylo zastoupeno více, imobilizace by vedla ke vzniku směsi dvou a více esterů^{33,48} a tedy k přípravě nosiče schopného interakce s bílkoviny o odlišné struktuře vazebného místa. Tím lze sice dosáhnout zachycení většího počtu bílkovin s afinitou k použitému ligandu, avšak s nižším výtěžkem.

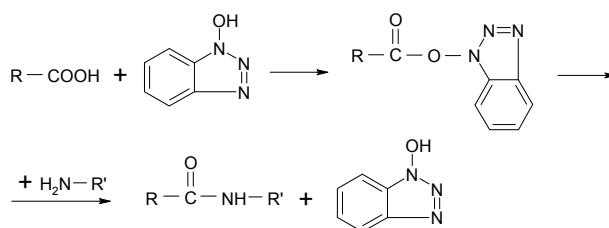
3.1.1.2. Tvorba esterové vazby

Při imobilizaci ligandu s volnými -OH skupinami na polymerní matici s -COOH skupinami dochází k vytvoření esterové vazby. Podobně jako v předchozím případě, tak i v tomto je prvním krokem aktivace -COOH skupiny. Aktivačním činidlem je opět HOBt, ale kromě něho se do reakční směsi přidává 4-(N,N -dimethylamino)pyridin (DMAP), který slouží jako katalyzátor aktivace a současně i jako supresor tvorby N -acylmočoviny. Dalším krokem je již samotná esterifikace, která bývá iniciována vhodným dehydratačním činidlem, např. DIC.

Tohoto způsobu imobilizace se využívá hlavně u ligandů s volnými -OH skupinami. Jak BR tak ES mají ve svých molekulách těchto skupin hned několik. Proto v těchto případech nedochází ke vzniku jedné sloučeniny, ale směsi dvou a více esterů. Příkladem takto navazované-



Obr. 9. Reakce *O*-acylisouřoviny s 1-hydroxybenzotriazolem



Obr. 10. Tvorba amidové vazby a regenerace 1-hydroxybenzotriazolu

ho ligandu může být např. 24-epibrassinolid se čtyřmi -OH skupinami (obr. 1b) nebo 20-hydroxyekdyson se šesti -OH skupinami (obr. 2b).

3.2. Izolace a identifikace vazebných bílkovin

Jak již bylo naznačeno výše, při afinitní chromatografii směsi bílkovin získaných z rostlinného materiálu jsou bílkoviny děleny na základě schopnosti interakce s ligandy navázanými na polymerní matici. Zatímco bílkoviny s vysokou afinitou k těmto ligandům (vazebné bílkoviny) zůstávají na nosičích zachyceny (adsorbovány) a musejí z nich být posléze uvolněny, bílkoviny s nízkou až nulovou afinitou (balastní bílkoviny) těmito sorbenty zadržovány nejsou a odcházejí pryč.

K extrakci bílkovin z rostlinného materiálu, resp. k získání jejich cytosolické frakce a k následné ekvilibraci kolon, byl využíván 0,05M fosfátový pufr, pH 7 (pro účely extrakce navíc s přidavkem inhibitorů proteas a merkapt ethanolu pro zabránění nežádoucí oxidace), pro odmývání případných nespecificky navázaných bílkovin ze sorbentu s imobilizovanými steroidními ligandy pak kontinuálních gradientů roztoků NaCl o koncentraci v rozmezí 0 až 0,5M. Samotná eluce pak probíhala působením 3% (v/v) roztoku kyseliny octové, 8M močoviny jakožto chaotropního činidla či pomocí kompetujících ligandů.

4. Bílkoviny s afinitou k vybraným rostlinným oxysterolům

4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů

První bílkovinou se vztahem k brassinosteroidům, kterou se výše uvedeným způsobem podařilo izolovat a poté identifikovat⁴², byl tzv. osmotin-like protein prekursor (OLPA). Výchozím materiálem byl v tomto případě třítydenní kalus tabáku viržinského (*Nicotiana tabacum* var. *Wisconsin 38*) a ligandem navázaným na polymerní matici karboxymethyloximový derivát 24-epikasteronu (obr. 11b).

O bílkovině OLPA je známo, že patří mezi tzv. PR (z angl. pathogenesis-related) proteiny, jejichž syntéza je podle literatury indukována různými stresovými faktory, ať už biotickými, tak abiotickými. OLPA je pak nejčastěji diskutována v souvislosti s adaptací rostliny na stres způsobený suchem, zasolením půdy, požerem rostliny býložravým živočichem, příp. napadením rostliny patogenním mikroorganismem (*Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* či *Trichoderma reesei*)^{49,50}. Vzhledem k faktu, že i samotné brassinosteroidy jsou spojovány s potlačením odezvy rostliny na stres^{1,2}, nabízí se jakási vzájemná spojitost OLPA a BR. Zda je tomu však i ve skutečnosti a případně jak přesně k interakci těchto dvou látek dochází, bude nutné ještě objasnit.

Další z bílkovin, která byla identifikována coby interagující s BR, je ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxidasa neboli RuBisCO, klíčový enzym Calvinova cyklu temnostní fáze fotosyntézy. Pokusným materiálem byly v tomto případě jednak listy špenátu novozélandského (*Tetragonia tetragonioides*) a jednak olistěné stonky lnu

setého (*Linum usitatissimum* var. *Venica*); ligandem navázaným na polymerní matici byl opět karboxymethyloximový derivát 24-epikasteronu⁵¹.

Význam enzymu RuBisCO pro rostliny spočívá ve schopnosti fixovat a poté zabudovávat vzdušný CO₂ do struktury organických molekul, tj. karboxylací. Dochází přitom k přeměně ribulosa-1,5-bisfosfátu na 3-fosfoglycerát a jeho redukci na glycerinaldehyd-3-fosfát, který pak slouží jako výchozí látka pro tvorbu sacharosy, škrobu a dalších sloučenin^{52,53}. Jak jsou však do tohoto, příp. jiného souvisejícího procesu zapojeny brassinosteroidy, dosud známo není a je to předmětem našich dalších výzkumů.

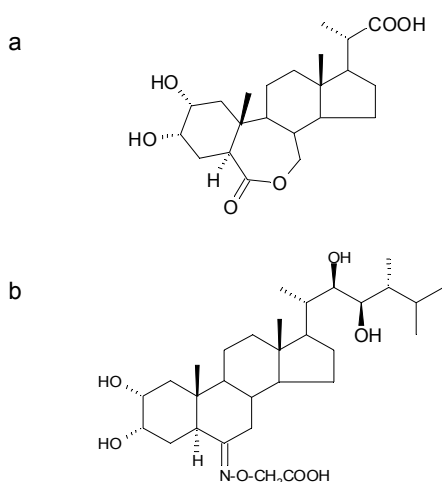
4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů

Podobně jako je tomu u BR, také informace o vazebných bílkovinách ES z rostlin jsou velmi strohé a jedinou bílkovinou, kterou lze prozatím dávat do souvislosti s vazbou k ekdysteroidům, je již výše zmiňovaný enzym RuBisCO (cit.⁴³), který byl izolován opět ze špenátu novozélandského (*Tetragonia tetragonioides*), tentokrát však pomocí afinitního nosiče s navázaným 20-hydroxyekdysonem (obr. 2b). Ani v tomto případě však není o mechanismu interakce RuBisCO a ekdysteroidů známo téměř nic. Z výsledků Uhlík a spol.⁴³ sice vyplývá, že některé ekdysteroidní látky mohou podstatně (až o 13 %) zvyšovat aktivitu tohoto enzymu, což se do budoucna může jevit jako jedna z možností, jak docílit snížení přebytků CO₂ v ovzduší nebo zajištění dostatku biomasy pro energetické či potravinové účely, ale jak přesně k danému ovlivnění dochází, zřejmě není a daná problematika tak zůstává opět předmětem dalšího bádání.

5. Závěr

Jak bylo uvedeno výše, s využitím afinitní chromatografie bylo izolováno a pomocí následných analýz také identifikováno několik bílkovin se vztahem k rostlinným brassinosteroidům a ekdysteroidům. První výsledky sice naznačují spjitost BR, resp. ES a jedné z těchto bílkovin – enzymu RuBisCO – ve smyslu zvýšení její aktivity, jak a zda vůbec to souvisí se samotným mechanismem účinku BR, o jehož objasnění nám šlo především, však prozatím známo není. Podobně je tomu i s druhou bílkovinou, kterou se nám podařilo výše uvedeným způsobem získat a identifikovat, tedy PR-proteinem OLPA. Souvislost s BR vzhledem k podobným účinkům na stresované rostliny se sama přímo nabízí, ale vysvětlení „jak a proč“, bohužel, také stále chybí a nezbyvá než danou problematiku podrobit ještě dalšímu studiu.

Tato práce vznikla v rámci řešení projektů IM06030 a Z40550506.



Obr. 11. Příklady analogů odvozených od přirozeně se vyskytujících brassinosteroidů a používaných k imobilizaci na polymerní matici. a) Brassinosteroid odvozený od kyseliny bisnorcholanové, b) karboxymethyloximový derivát 24-epikasteronu

LITERATURA

1. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Ae de Groot: *Brassinosteroids – A New Class of Plant Hormones*. Academic Press, Město 1999.
2. Zinov'eva S. V., Udalova Z. V., Vasil'eva I. S., Vanyushkin S. A., Paseshnichenko V. A.: *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 456 (2001).
3. Bergamasco R., Horn D. H. S., v knize: *Invertebrate Endocrinology, Vol. 1 – Endocrinology of Insects* (Downer R. G. H., Laufer H., ed.). Liss, New York 1983.
4. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochem. Rev.* 2, 321 (2003).
5. Thummel C. S., Chory J.: *Genes Dev.* 16, 3113 (2002).
6. Szekeres M., Nemeth K., Koncz-Kálman Z., Mathur J., Kauschmann A., Altmann T., Rédei G. P., Nagy F., Schell J., Koncz C.: *Cell* 85, 171 (1996).
7. Kinoshita T., Caño-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.: *Nature* 433, 167 (2005).
8. Müssig C., Altmann T.: *Trends Endocrin. Met.* 12, 398 (2001).
9. Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida S., Yuan H., Feldmann K. A., Tax F. E.: *Plant Physiol.* 121, 743 (1999).
10. Yokota T.: *Trends Plant Sci.* 2, 137 (1997).
11. Anniss A. M., Apostolopoulos J., Dworkin S., Purton L. E., Sparrow R. L.: *DNA Cell Biol.* 21, 571 (2002).
12. Dawson P. A., Ridgway N. D., Slaughter C. A., Brown M. S., Goldstein J. L.: *J. Biol. Chem.* 264, 16 798 (1989).
13. Skirpan A. L., Dowd P. E., Sijacic P., Jaworski C. J., Gilroy S., Kao T. H.: *Plant Mol. Biol.* 61, 553 (2006).
14. Katzenellenbogen J. A., Katzenellenbogen B. S., v knize: *Vitamines and Hormones – Advances in Research and Applications, Vol. 41*. (McCormick D. B., ed.). Academic Press, Město 1984. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=0Gs-vWD3buAC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false>.
15. Kubíčková B., Hodek P.: *Chem. Listy* 95, 359 (2001).
16. Kolbe A., Schneider B., Voigt B., Adam G.: *J. Label. Compd. Radiopharm.* 16, 131 (1998).
17. Yang X-H., Xu Z-H., Xue H-W.: *Plant Cell* 17, 116 (2004).
18. Scheer J. M., Ryan C. A.: *Plant Cell* 11, 1525 (1999).
19. Griffith E. C., Licitra E. J., Liu J.: *Methods Enzymol.* 328, 89 (2000).
20. Licitra E. J., Liu J. O.: *PNAS* 93, 12817 (1996).
21. Bogoeva V. P., Russev G. C.: *Steroids* 73, 1060 (2008).
22. Hübsch N. D., Mooney D. J.: *Biomaterials* 28, 2424 (2007).
23. Christie W. W.: Sterols 2. Oxysterols, bile acids and cholesterol sulfate – structure, occurrence and biochemistry [online]. Staženo 12. září 2009. Dostupné z: <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/chol_der/file.pdf>.
24. Zullo M. A. T.: The Brassinosteroids Page [online]. 1997, staženo 29. října 2008. Dostupné z: <<http://members.tripod.com/~mzullo>>.
25. Guardiola F.: *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 597 (2004).
26. Guardiola F., Dutta P. C., Codony R., Savage G. P.: *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products – Analysis, Occurrence, and Biological Effects*. AOCS Press, Urbana 2002. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=HVdKHweLhZAC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0>.
27. Lütjohann D.: *Br. J. Nutr.* 91, 3 (2004).
28. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L. and Wilson I. D.: *Ecdybase – The Ecdysone Handbook*. 3. vydání [online]. 2002, staženo červen 2009. Dostupné z: <<http://ecdysbase.org>>.
29. Vert G., Nemhauser J. L., Geldner N., Hong F., Chory J.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 177 (2005).
30. Jizba J., Herout V., Šorm F.: *Tetrahedron Lett.* 18, 1689 (1967).
31. Macek T., Vaněk T.: *Biotechnol. Agr. Forest.* 26, 299 (1994).
32. Soriano I. R., Riley I. T., Potter M., Bowers W. S.: *J. Chem. Ecol.* 30, 1885 (2004).
33. Amersham Biosciences: *Affinity Chromatography – Principles and Methods* [online]. Staženo 20. 7. 2009. Dostupné z: <[https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/\\$file/18102229AE.pdf](https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/$file/18102229AE.pdf)>.
34. Iontosorb: *Afinitní chromatografie* [online]. Staženo 1. 1. 2008. Dostupné z: <http://www.iontosorb.cz/cz/afi_chro.htm>.
35. Bio-Rad: *BioLogic LP Chromatography System – Instruction Manual*. Staženo 20. července 2009. Dostupné z: <http://www3.bio-rad.com/cm_upload/Literature/58931/4006072D.pdf>.
36. Stark M., Holmberg K.: *Biotech. Bioeng.* 34, 942 (1989).
37. Merrifield R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963).
38. Bodanszky M.: *Peptides* 1, 105 (1979).
39. Bodanszky M.: *Peptide Chemistry – A Practical Text Book*. 2. vydání. Telos/Springer-Verlag, Emeryville 1993.
40. Bodanszky M., Bodanszky A.: *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag, Berlin 1984.
41. Routledge A., Abell C., Balasubramanian S.: *Synlett*. 1, 61 (1997).
42. Kamlar M., Macek T., Koncz C., Kohout L.: *Eur. J. Biochem.* 271(S1), 113 (2004).
43. Uhlík O., Kamlar M., Kohout L., Ježek R., Harmatha J., Macek T.: *Steroids* 73, 1433 (2008).
44. Benoiton N. L.: *Chemistry of Peptide Synthesis*. CRC Press, 2005. Dostupné z: <<http://books.google.cz/books?id=minqbLmBjxkC&printsec>>.

- =frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0>.
45. Bodanszky M., Bednarek M. A.: *J. Protein Chem.* 8, 461 (1989).
 46. Chan W. C., White P. D.: *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford 2000. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=l5IPqfBWPXcC&printsec=frontcover&source=gbs_navlinks_s>.
 47. König W., Geiger R.: *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
 48. Marquart A.: *Immobilization Techniques*. Staženo 20. července 2009. Dostupné z: <<http://www.sprpages.nl/Downloads/PDFfiles/Immobilization.pdf>>.
 49. Capelli N., Diogon T., Greppin H., Simon P.: *Gene* 191, 51 (1997).
 50. Shih C-Y. T., Wu J., Jia S., Khan A. A., Ting K-L. H., Shih D. S.: *Plant Sci.* 160, 817 (2001).
 51. Kamlar M., Uhlík O., Kohout L., Šanda M., Macek T.: *FEBS Lett.* 276(S1), 237 (2009).
 52. Malkin R., Niyogi K., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L., ed.). ASPB, Rockville 2000.
 53. Raghavendra A. S., v knize: *Encyclopedia of Applied Plant Science* (Thomas B., Murphy D. J., Murray B. G., ed.). Elsevier, Oxford 2003.

M. Kamlar^{a,b}, O. Uhlík^{a,b}, I. Chlubnová^b, L. Kohout^a, J. Harmatha^a, M. Šanda^{a,b}, R. Ježek^a, A. Pišvejcová^a, and T. Macek^{a,b} (^a *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Affinity Chromatography as a Method of Studying the Mechanism of Action of Plant Oxysterols**

In plants, oxysterols brassinosteroids (BR) and ecdysteroids (ES) can be found. BR act as plant hormones with a positive effect on growth, stress tolerance or senescence. Their mechanism of action is based on signal transduction via a membrane receptor cascade, with or without assistance of oxysterol-binding proteins. The role of ES as insect hormones in plants is unknown. ES are likely to show an antifeedant effect on herbivorous pests, but other as yet unknown roles in plants are not excluded. A range of affinity carriers with immobilized synthetic analogues of plant BS and ES were prepared. Using these carriers, some proteins with affinity to the oxysterols were separated from cytosol extracts of plants. The proteins were assessed by electrophoresis and identified by sequencing. One of them is an osmotin-like protein precursor known as a pathogenesis-related protein. Another protein, RuBisCO, is known as the key enzyme in the Calvin cycle of the dark phase of photosynthesis. The interactions of these proteins with the oxysterols remain unclear.