

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**



DISERTAČNÍ PRÁCE

Identifikace inhibitorů proteáz

Ing. Lenka Hanusová

2008

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce **prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D.**, za pomoc a rady, které mi poskytoval v průběhu doktorandského studia. Dále bych ráda poděkovala **Ing. Evě Hradecké, Ph.D.** a **doc. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc.**, za cenné připomínky. A v neposlední řadě chci poděkovat své rodině a svému příteli za podporu a trpělivost.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 5.5.2008

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1. HISTORIE PĚSTOVÁNÍ BRAMBORU HLÍZNATÉHO (SOLANUM TUBEROSUM L.)	9
2.2. CHEMICKÉ SLOŽENÍ HLÍZY	10
2.2.1. Klasifikace proteinů z hlízy bramboru.....	10
2.2.1.1. Skupina ostatních proteinů.....	11
2.2.1.2. Patatin	11
2.2.1.3. Inhibitory proteáz.....	13
2.2.1.3.1. Klasifikace PI's.....	14
2.3. ROLE INHIBITORŮ PROTEÁZ (PI'S)	17
2.3.1. Úloha PI's v rostlinách	17
2.3.1.1. PI's jako součást obranného mechanismu rostlin.....	17
2.3.1.2. PI's jako zásobní proteiny.....	19
2.3.1.3. PI's jako kontrola endogenních proteáz.....	19
2.3.2. Využití PI's v lékařství	20
2.3.2.1. PI's jako protirakovinná činidla.....	20
2.3.2.2. PI's v léčbě dermatitid	21
2.3.2.3. PI's a léčba obezity	22
2.4. METODY DETEKCE A CHARAKTERIZACE PROTEINŮ A PI'S.....	22
2.4.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	23
3. CÍLE PRÁCE	25
4. MATERIÁL A METODY	26
4.1. MATERIÁL PRO ANALÝZY	26
4.1.1. Popis vybraných odrůd	26
4.1.2. Průmyslově získaná hlízová šťáva.....	27
4.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	28
4.3. METODY.....	28
4.3.1. Příprava standardů a vzorků pro analýzy.....	28
4.3.2. Metody pro analýzu vzorků	29
4.3.3. Získání chromatogramů jednotlivých odrůd.....	31

4. 3. 4. Analýza průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru	31
5. VÝSLEDKY	32
5.1. VYHODNOCENÍ VHODNOSTI JEDNOTLIVÝCH METOD HPLC PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI PI'S POMOCÍ STANDARDU	32
5.1.1. Metoda Inhibitory 1	32
5.1.2. Metoda Inhibitory 2	33
5.1.3. Metoda Inhibitory 3	34
5.1.4. Metoda Inhibitory 4	35
5.1.5. Metoda Inhibitory 5	35
5.1.6. Porovnání jednotlivých metod HPLC a výběr nejvhodnější metody pro další analýzu	36
5. 2. ZÍSKÁNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH PROFILŮ JEDNOTLIVÝCH ODRŮD Z KATALOGU ODRŮD	37
5.2.1. Stanovení retenčních časů metodou Inhibitory 1	38
5.2.2. Stanovení retenčních časů metodou Inhibitory 5	40
5.2.3. Procentický podíl jednotlivých skupin inhibitorů proteáz u metody Inhibitory 1	42
5.2.4. Procentický podíl jednotlivých skupin inhibitorů proteáz u metody Inhibitory 5	44
5.3. VYHODNOCENÍ VHODNOSTI VYBRANÝCH METOD HPLC PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI PI'S S VYUŽITÍM PRŮMYSLOVĚ ZÍSKANÉ ŠŤÁVY Z HLÍZ BRAMBORU	46
6. DISKUZE	48
6.1. VHODNOST JEDNOTLIVÝCH METOD HPLC PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI PI'S VE ŠŤÁVĚ Z HLÍZ BRAMBORU	48
6.2. CHROMATOGRAFICKÉ PROFILY VYBRANÝCH ODRŮD BRAMBORU	50
6.2.1. Retenční časy jednotlivých skupin PI's	50
6.2.2. Procentické podíly jednotlivých skupin PI's	51
6.3. VYHODNOCENÍ VHODNOSTI JEDNOTLIVÝCH METOD HPLC PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI PI'S S VYUŽITÍM PRŮMYSLOVĚ ZÍSKANÉ ŠŤÁVY Z HLÍZ BRAMBORU	53
7. ZÁVĚR	55

7.1. VYHODNOCENÍ VHODNOSTI JEDNOTLIVÝCH METOD HPLC K IDENTIFIKACI A DETEKCI INHIBITORŮ PROTEÁZ Z HLÍZ BRAMBORU	55
7.2. ZÍSKÁNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH PROFILŮ VYBRANÝCH ODRŮD BRAMBORU.	56
7.3. VYHODNOCENÍ VHODNOSTI JEDNOTLIVÝCH METOD HPLC PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI PÍ'S S VYUŽITÍM PRŮMYSLOVĚ ZÍSKANÉ ŠŤÁVY Z HLÍZ BRAMBORU	58
8. SOUHRN	59
9. SUMMARY	62
10. POUŽITÁ LITERATURA.....	64
11. PŘÍLOHY	73

1. Úvod

Téma inhibitorů proteáz se dostalo do popředí zájmu v několika posledních letech, a to díky svým pozitivním dietetickým a možným protirakovinným účinkům. Inhibitory proteáz (PI's) představují možný nástroj prevence a léčby chorob, jako je AIDS či dermatitidy. V oblasti biologického nebo biochemického výzkumu slouží PI's jako užitečný nástroj pro studování tříd a vlastností proteáz. Z hlediska působení v rostlinách zauímají PI's velmi široký okruh, a to od zásobních proteinů k složkám obranného mechanismu rostlin.

PI's se vyskytují ve všech typech živých organismů od živočichů přes rostliny až k mikroorganismům. Tvoří tedy značně heterogenní skupinu. Orientaci v této skupině látek nezjednodušuje ani rozdělení PI's do skupin. Důvodem jsou dva různé přístupy k této problematice, které se ve svém základu dosti liší. Výsledkem je potom značně komplikovaný přehled.

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) jsou čtvrtou nejrozšířenější plodinou, pěstovanou pro lidskou výživu. Pěstujeme je pro jejich jedlé hlízy, které jsou zdrojem škrobu, vysoce kvalitního proteinu a ostatních důležitých látek jako polysacharidy, vitamíny, enzymy, minerály a organické kyseliny. Mezi tyto látky patří rovněž inhibitory proteáz (PI's). Inhibitory proteáz, vyskytující se v hlíze bramboru, nejsou v žádném ohledu výjimkou. Jejich klasifikace rozhodně nepatří k těm jednodušším. I jejich pole působnosti se rozprostírá od zapojení do obranného mechanismu rostlin, obzvláště v obraně proti hmyzím škůdcům, až ke studiu využití v humánní medicíně. Protože brambory představují běžnou součást naší stravy, pohlíží se na ně jako na jeden z výhodných zdrojů PI's pro léčbu celé řady chorob. Jako velmi atraktivní se rovněž zdá možnost využití PI's z bramboru pro tvorbu transgenních rostlin s odolností vůči hmyzím škůdcům.

U brambor existuje v současnosti celá řada různých odrůd, ať konzumních, či průmyslových. Aby bylo využití PI's z bramboru efektivní, je nutno zjistit, zda se jednotlivé odrůdy od sebe kvalitativně či kvantitativně liší v zastoupení jednotlivých PI's. Proto je potřeba vyvinout nedestruktivní, rychlou a spolehlivou metodu pro detekci PI's. V současné době dochází k velkému rozvoji metod, využívajících ovládnutí a vyhodnocování pomocí počítače a s minimálními nároky na lidskou práci. Mezi tyto metody patří i vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC).

Tato metoda se již hojně využívá ke stanovování různých látek, avšak možnosti jejího využití pro detekci PI's byly doposud dosti opomíjeny.

Konečným krokem by mělo být zavedení metody do běžné praxe, kde by mohla sloužit jako východisko pro průmyslové získávání PI's z hlíz bramboru. V průmyslových podnicích se ovšem hlízy většinou nezpracovávají podle odrůd, ale podle ceny či dodavatele. Z toho vyplývá nutnost ověřit možnost použitelnosti vzniklé metody na materiálu z průmyslové výroby. Jako odpad při průmyslové produkci škrobu se získává šťáva obsahující proteiny a celou řadu dalších látek. Její využití jako výchozí suroviny pro izolaci PI's se proto jeví jako logické. Podařilo - li by se nalézt spolehlivou, rychlou a levnou metodu pro izolaci PI's z této šťávy, téměř nic by dále nebránilo možnosti získávat dostatečné množství PI's pro využití v humánní medicíně.

2. Literární přehled

2.1. Historie pěstování bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.)

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) je světově čtvrtou nejdůležitější plodinou po rýži, pšenici a kukuřici. Hraje významnou roli jak ve zpracovatelském průmyslu, tak ve výživě lidí i hospodářských zvířat. Uplatňuje se zejména v rozvojových oblastech, kde při nedostatku živočišné produkce tvoří hlavní zdroj živin, a obzvláště proteinu, rostliny. Přes nesporný význam cereálií a leguminóz se do popředí stále více dostávají i hlíznaté plodiny.

Z hlediska produkce patří brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) mezi 5 nejdůležitějších hlíznatých plodin. Zaujímá 45 % celkové světové produkce hlíznatých plodin (Pouvrau, 2004). Důvodem zřejmě bude možnost pěstovat jej v tropických, subtropických i mírných klimatických podmínkách. To má zřejmě přímou souvislost s původním centrem pěstování, kterým byly horské oblasti jihoamerického pohoří Andy. Zde byly brambory domestikovány přibližně před 4 až 5 tisíci let ve dvou centrech biodiverzity: andském a chilském.

V první polovině 16. století po dobytí incké říše Španěly byly brambory dovezeny do Evropy, nejprve jako dar španělskému králi Filipu II. Později ji začali španělští námořníci používat jako potravinu, zejména pro zabránění kurdějím. V Evropě mezi prostým lidem však byly brambory přijímány s velkou nedůvěrou a považovaly se za zdraví ohrožující. Pěstovaly se tedy pouze jako okrasná exotická rostlina na dvorech šlechticů a v klášterních zahradách. Až v 18. století došlo ke změně, když Bedřich II. Veliký v roce 1740 nařídil jejich pěstování v Prusku (Messer, 2000).

Brambory však byly dovezeny v 16. století, zcela nezávisle, rovněž do Anglie. Na rozdíl od kontinentální Evropy se v Anglii, a zejména v Irsku, začaly brambory pěstovat na větších plochách již ve druhé polovině 17. století, a to zřejmě díky přírodním podmínkám, které jsou zde velmi podobné podmínkám původní oblasti pěstování. Postupně se staly hlavním zdrojem obživy pro chudší vrstvy. V 19. století došlo k velké neúrodě, která měla za následek hladomor, při kterém zemřelo přibližně mezi půl a jedním a půl milionem Irů z celkového počtu 8 milionů. Lidé prchající před hladomorem s sebou odvezli brambory do Severní Ameriky. Postupně došlo k rozšíření brambor do ostatních částí světa (Lee, 2006).

2. 2. Chemické složení hlízy

Brambor je tedy pěstován pro své hlízy, které představují jedinou využitelnou část celé rostliny. Z morfologického hlediska se tyto hlízy zařazují mezi ztlustlé stolony. A to i přesto, že jsou uloženy převážně pod povrchem země (Vokál *et al.*, 2003).

Největší podíl z celkové hmotnosti hlízy bramboru lze přičíst vodě. Její obsah v hlíze dosahuje průměrně 75 % z celkové hmotnosti hlízy. Zbýlých 25 % tedy připadá na sušinu. Sušina zahrnuje celé množství látek. Za nejdůležitější z nich bývá považován škrob, který se kromě výživy uplatňuje i v průmyslu. Podíl škrobu v hlíze kolísá v závislosti na genotypu (odrůdě) a bývá uváděn mezi 13 až 24 % sušiny (Vokál *et al.*, 2003).

Dusíkaté látky (včetně proteinů) bývají vzhledem ke svému nízkému obsahu považovány za okrajové. Jejich obsah bývá zpravidla uváděn kolem 2 % v čerstvé hmotě hlíz. (Lisinska *et al.*, 1989; Pouvreau *et al.*, 2001). Tento údaj odpovídá obsahu kolem 10 %v sušině hlízy.

Dusíkaté látky lze rozdělit do dvou základních skupin: na proteiny a neproteinové dusíkaté látky. V závislosti na genotypu může podíl proteinů v rámci dusíkatých látek značně kolísat mezi 34 do 70 % (Shewry, 2003). Budeme – li uvažovat 50% zastoupení proteinů v obsahu celkových dusíkatých látek, jsou neproteinové dusíkaté látky členěny na volné aminokyseliny (15 %), amidy asparagin a glutamin (23 %) a ostatní dusíkaté látky (12 %) (Bárta *et Čurn*, 2004).

2.2.1. Klasifikace proteinů z hlízy bramboru

Přes zjevnou důležitost bramborových hlíz pro potravinářský a škrobárenský průmysl zůstává detailní znalost o hlízových proteinech pouze kusá. V současné době se rozpustné hlízové proteiny rozdělují do 3 základních skupin na základě jejich molekulové hmotnosti. Těmito skupinami jsou: patatin, inhibitory proteáz (PI's) a skupina ostatních proteinů (Pouvreau, 2004). Patatin a inhibitory proteáz, které tvoří největší část rozpustných hlízových proteinů, jsou považovány za zásobní proteiny. Většina izoform těchto proteinů vykazuje rovněž enzymatické a inhibiční aktivity, které mohou být fyziologicky významné (Bauw *et al.*, 2006). Jednotlivé skupiny rozpustných hlízových proteinů jsou popsány níže.

2.2.1.1. Skupina ostatních proteinů

V současné době jsou o skupině tzv. ostatních proteinů dostupné pouze neúplné informace a rovněž nebyl podniknut žádný systematický výzkum genů či sekvenování proteinů. Proteiny, zařazené do této skupiny, tvoří přibližně jednu třetinu všech hlízových proteinů. Jsou zde zahrnuty proteiny s celkovou molekulovou hmotností vyšší než 40 kDa (s výjimkou PI's) (Bauw et al., 2006).

Za nejdůležitější proteiny této skupiny jsou považovány lektiny. Důvodem je jejich zapojení do obranného mechanismu rostlin, kde navozují shlukování (aglutinaci) buněk. Některé z lektinů jsou v případě požití toxické rovněž pro savce, neboť procházejí gastrointestinálním ústrojím takřka beze změny a dokáží proto přivodit řadu odlišných systemických příznaků (Carlini and Grossi – de Sá, 2002). Dalšími příklady proteinů této skupiny jsou polyfenoloxidázy (Partington and Bolwell, 1996), enzymy podílející se na produkci škrobu (Marshall et al., 1996) a isoenzymy fosforylázy (Gerbrandy et Doorgeest, 1972).

2.2.1.2. Patatin

Patatin (nebo-li patatinový komplex či rodina patatinových proteinů) byl poprvé izolován a pojmenován v roce 1980 (Racusen and Foote, 1980). Očekávaný podíl patatinu na celkovém rozpustném proteinu se pohybuje mezi 20 a 40 % (Pouvreau, 2004; Racusen and Foote, 1980). Existuje však i daleko vyšší odhad, pohybující se kolem 60 % (Pots *et al.*, 1999.; Bárta et Čurn, 2004). Paiva *et al.* (1983) demonstroval existenci lineární příbuznosti mezi množstvím patatinu, vyjádřeného jako procentický podíl z celkového rozpustného proteinu), a logaritmem hmotnosti hlízy.

Ve své nativní formě se glykoprotein patatin vyskytuje jako dimer (přesněji homodimer), tvořící 2 identické podjednotky o molekulové hmotnosti 40 či 43 kDa (Park *et al.*, 1983; Pouvreau, 2004). Celková hmotnost patatinu je tedy 80 kDa, resp. 88 kDa (Racusen et Weller, 1984). Aminokyselinová sekvence monomeru čítá 366 aminokyselin (Bárta et Čurn, 2004).

Z hlediska celé rostlin lze zachytit významný obsah patatinu pouze v hlízách, jsou – li tvořeny. Za těchto podmínek se vyskytuje patatinu v ostatních částech rostliny, konkrétně v kořenech, stonku a listech, pouze ve stopovém množství. Tato skutečnost je

charakteristická pro zásobní proteiny hlíz (Shewry, 2003). S ohledem na množství a oblast jeho výskytu v rostlině je patatin považován za hlavní zásobní bílkovinu hlíz i rostliny jako celku (Racusen et Foote, 1980). Toto tvrzení je podepřeno rovněž skutečností, že se obsah patatinu (či patatinových bílkovin) během skladování a klíčení hlíz postupně snižuje (Bárta et Čurn, 2004).

Patatin zastává rovněž celou řadu dalších funkcí – enzymatických aktivit. Jako první byla studována jeho lipid acyl hydrolázová aktivita (LAH) pro deacylaci lipidů a tvorbu esterů vosku (Andrews *et al.*; 1988, Galliard et Dennis, 1974; Racusen, 1986; Anderson *et al.*, 2002). Další enzymatickou aktivitou, připisovanou patatinu, představuje fosfolipázová aktivita. Látka, označovaná jako cytosolová fosfolipáza A₂ (PLA₂), katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin v pozici *sn*-2 u diacylfosfolipidů. Enzym uváděný jako PLA₂ vykazuje stejné vlastnosti jako patatin. Konkrétně jde o molekulovou hmotnost, která je v obou případech 40 kDa, dále o pI 4,75 a v neposlední řadě o vysokou homologii N-koncové sekvence. Z těchto skutečností odvozují Hirschberg *et al.* (2001) i Senda *et al.* (1996), že se v případě PLA₂ u brambor v podstatě jedná o patatin.

Patatinu-podobný protein s galaktolipázovou aktivitou byl nalezen rovněž v listech vigny (*Vigna unguiculata*), která byla podrobena stresu ze sucha (Matos *et al.*, 2000). Tento protein katalyzuje hydrolýzu monogalaktosyldiacylglycerolu (MGDG), digalaktosyldiacylglycerolu (DGDG) a sulfoquinovosyldiacylglycerolů. Enzym, schopný odštěpovat mastné kyseliny z obou *sn* pozic, byl nazván galaktolipáza. Postupně bylo zjištěno, že jeho vlastnosti jsou velmi podobné vlastnostem patatinu. Z tohoto údaje je odvozována pravděpodobnost podobné schopnosti patatinu v hlíze bramboru (Matos *et al.*, 2001).

Výše uvedené aktivity naznačují možné zapojení patatinu v mechanismu obrany rostlin proti patogenům. Tato skutečnost byla podpořena provedením zkoušek s biologickým materiálem. Shewry (2003) využil patatinu jako umělého krmiva pro hmyz, konkrétně druhu *Diabrotica*, což mělo za následek potlačení růstu larev. Poté, co byl patatin ošetřen di-isopropylfluorofosfátem, došlo k inhibici jeho fosfolipázové, galaktolipázové a lipid acyl hydrolázové aktivity. Současně byl potlačen negativní vliv patatinu na růst larev. Srovnání enzymatických a inhibičních vlastností patatinových frakcí z odlišných odrůd bramboru prokázalo, že inhibice růstu larev je v pozitivní korelaci s galaktolipázovou aktivitou, zatímco fosfolipázová a acylhydrolázová aktivita žádný vztah k potlačení růstu

larev nevykazuje. Na základě tohoto srovnání Shewry (2003) dospěl k závěru, že patatin může svým působením na metabolismus lipidů působit jako obrana vůči hmyzím škůdcům.

Další náznak možné role patatinu v obranném mechanismu rostlin pochází ze studií provedených na tabákových listech, infikovaných virem mozaiky tabáku. Infekce silně podpořila projev tří genů kódujících patatinu-podobné proteiny, přičemž jeden z těchto proteinů vykazuje fosfolipázovou A₂ aktivitu (PLA₂). K nárůstu PLA₂ došlo před nahromaděním obranných signálů odvozených od mastných kyselin. To naznačuje že PLA₂ spouští syntézu těchto transduktivních signálů uvolňováním mastných kyselin z membránových lipidů (Dhont *et al.*, 2000). Matos *et al.* (2000) potvrdili nález patatinu podobného proteinu v listech viny, kterou nejprve podrobili stresu ze sucha. Na základě tohoto zjištění lze usuzovat na možnou širší roli patatinu v odpovědi rostliny na stres.

Dalšími enzymatickými aktivitami patatinu jsou aktivita enzymu acyl transferáza a rovněž aktivita β - 1,3 – glukonasy. β - 1,3 – glukonáza způsobuje hydrolyzu β - 1,3-glukanů v buněčných stěnách hub patogenních hub, čímž obecně přispívá k ochraně rostliny proti těmto patogenům (Bárta et Čurn, 2004).

V neposlední řadě je potřeba upozornit i na možné pozitivní účinky patatinu, které jsou způsobeny jeho antioxidačními vlastnostmi. Mezi antioxidačními látkami, obsaženými v hlízách bramboru, zaujímá svým významem patatin druhé místo, hned za kyselinou askorbovou (Al-Saikhan *et al.*, 1995; Bárta et Čurn, 2004).

2.2.1.3. Inhibitory proteáz

Třetí skupinu hlízových proteinů, z pohledu našeho výzkumu nejdůležitější, představuje skupina inhibitorů proteáz (PI's). Zastoupení PI's v hlízách je odhadováno na 20 – 30 % celkového množství proteinů v hlíze (Melville et Ryan, 1972). Pouvreau (2004) stanovila tento podíl z celkového proteinu ve šťávě z hlízy bramboru u odrůdy Elkana až na hodnotu 50 %.

Proteolytické enzymy (proteázy) zastávají důležitou funkci v organismu rostlin. Katalyzují štěpení molekuly proteinu na menší řetězce a v závěru až na jednotlivé aminokyseliny. Tento proces se nazývá proteolýza a je klíčovým procesem všech živých organismů. Jako taková tedy musí být pečlivě kontrolována. Nepřekvapí nás tedy existence přirozeně se vyskytujících látek, které tuto kontrolní funkci zastávají. Těmito látkami jsou inhibitory proteáz (PI's).

2.2.1.3.1. Klasifikace PI's

Ve srovnání s patatinem tvoří PI's více heterogenní skupinu proteinů. Odlišují se od sebe molekulovou hmotností, aminokyselinovým složením, pI a inhibiční aktivitou.

PI's jsou primárně klasifikovány na základě své inhibiční activity, tj. na základě typu či typů proteáz, které inhibují (Ryan, 1990; Bode et Huber, 2000). Proteázy samotné jsou většinou klasifikovány podle aminokyselinového zbytku, které mají ve svém aktivním místě. Existují celkem 4 třídy proteáz: 1) serinové proteázy (v aktivním místě je serin či histidin), 2) cysteinové proteázy (s cysteinem v aktivním místě), 3) aspartátové proteázy (s aspartátovou skupinou v aktivním místě) a 4) metaloproteázy (s kovovým iontem, např. Zn^{2+} či Mn^{2+} , v aktivním místě) (Neurath, 1984).

Rozdělení inhibitorů proteáz (PI's) do tříd pak vychází z předchozí klasifikace proteáz, např. inhibitory serinových proteáz. V některých případech je rozdělení PI's do rodin dále komplikováno strukturou aktivního místa. V tomto případě se jedná o tzv. double-headed PI's, které mají ve své struktuře 2 odlišná aktivní místa a proto mohou inhibovat 2 odlišné enzymy. Tento jev se však při klasifikaci PI's nebere v úvahu. PI's ze stejné rodiny mohou být tedy single- i double-headed (Pouvreau, 2004).

PI's mohou být dále klasifikována na základě jejich molekulové hmotnosti, stavbě proteinu (monomer či multimer), hodnotě izoelektrického bodu (pI) a počtu disulfidických můstků v molekule. Na základě těchto kritérií lze PI's rozdělit do 7 následujících rodin: potato inhibitor I (PI -1), potato inhibitor II (PI - 2), potato carboxypeptidase inhibitor (PCI), potato aspartate protease inhibitor (PAPI), potato cysteine protease inhibitor (PCPI), potato Kunitz-type protease inhibitor (PKPI) a "ostatní inhibitory serinových proteáz" (OSPI). Nejvíce zastoupenými rodinami jsou PI - 2 a PCPI, které představují 22 a 12 % ze všech proteinů v hlíze bramboru (Pouvreau, 2001). Vlastnosti všech výše uvedených rodin PI's jsou popsány v tabulce 1.

Skupina	Počet podjednotek	MW (kDa)	pI	Inhibované enzymy
PI - 1	5	35 - 40	5,1–7,8	<u>chymotrypsin</u> , trypsin
PI - 2	2	20,5	5,5-5,9	<u>trypsin</u> , chymotrypsin
PCPI	1	20,1-22,8	5,8-9,0	<u>papain</u> , trypsin, chymotrypsin
PAPI	1	19,9	8,2	trypsin, chymotrypsin, <u>cathepsinD</u>
PKPI	1	20,2	8,0-9,0	<u>trypsin</u> , chymotrypsin
PCI	1	4,3	-	<u>karboxypeptidasa A</u>
Ostatní	1 – 2	21 - 24	7,5-8,8	trypsin, chymotrypsin, elastasa

Tab. 1. Vlastnosti rodin PI's, přítomných v hlíze bramboru (Hlavní inhibovaný enzym je podtržen.)

Výše zmíněné rozdělení PI's není příliš hojně využíváno. Doposud se PI's z hlízy bramboru rozdělovaly spíše do 3 odlišných tříd a skupin (Richardson, 1991). První třídu tvoří potato inhibitor I (PI - 1), což je inhibitor serinových proteáz. Tento inhibitor je pentamer, složený z isoinhibitorových promotorových podjednotek. Jeho celková molekulová hmotnost je 40 kDa (Richardson et Cossins, 1974). Představitelem druhé třídy je potato inhibitor II (PI - 2). Tato třída je tvořena dimerickými inhibitory serinových proteáz. Obě podjednotky jsou spojeny disulfidickými můstky na N konci. Protein se chová jako jednodoménový protein. (Lee *et al.*, 1999; Beekwelder *et al.*, 2000).

Proteiny o molekulové hmotnosti 20 až 22 kDa jsou členy třetí třídy. Tato třída se dále dělí do 4 odlišných skupin: 1) inhibitory proteáz Kunitzova typu (Walsh *et al.*, 1991), 2) inhibitory cysteinových proteáz (Brzin *et al.*, 1988; Krizaj *et al.*, 1993), 3) inhibitory aspargátových proteáz (Mares *et al.*, 1989; Ritonja *et al.*, 1990) a 4) inhibitor karboxypeptidázy (Hass *et al.*, 1975; Hass *et al.*, 1976). Všechny PI's zařazené do této třídy jsou monomery. Liší se typem proteázy, kterou inhibují a počtem cysteinových zbytků na podjednotku.

Tabulka 2 ukazuje přehled všech výše popsaných PI's, přítomných v hlíze bramboru, které jsou zde rozděleny jednak podle hlavní klasifikace PI's a dále podle klasifikace specifické pro PI's z hlízy bramboru (tzv. potato klasifikace PI's).

Skupina	MW (kDa)	Podjednotka	Cys / sub.	Inhibované enzymy	Třída a skupina v tzv. potato klasifikaci PI's
<u>Třída inhibitorů serinových proteas</u>					
Inhibitory Kunitzova typu	21 - 23	1	4	T,C	III,1
Inhibitor I z bramboru	40	4-5	2	T,C,S	I
Inhibitor II z bramboru	20-21	2	14	T,C,E	II
<u>Třída inhibitorů cysteinových proteas</u>					
Multicystatiny	85	1	0	P	
Inhibitory Kunitzova typu	20-21	1	4	T,P,CB,CL	III,2
<u>Třída inhibitorů asparágových proteas</u>					
Inhibitory Kunitzova typu	20-22	1	4	CD	III,3
<u>Třída inhibitorů metalloproteas</u>					
Inhibitor karboxypeptidasy bramboru	4	1	6	CaP	III,4

Tab. 2. Rozdělení PI's do skupin podle hlavní a specifické klasifikace PI's

Inhibované enzymy: T – trypsin, C - chymotrypsin, S – subtilisin, E – elastasa, P – papain, CB – kathepsin B, CL – cathepsin L, CD – cathepsin D, CaP – karboxypeptidasa.

2.3. Role inhibitorů proteáz (PI's)

PI's mohou zaujímat v rostlinách celou řadu odlišných rolí. Mohou působit jako zásobní proteiny, regulátory endogenní proteolytické aktivity (Ryan, 1990) i jako součást mnoha vývojových procesů včetně programované buněčné smrti (Solomon *et al.*, 1999). PI's tvoří důležitou složku obranného mechanismu rostlin, spojeného s resistencí rostlin vůči hmyzu a patogenům (Lu *et al.*, 1998; Pernas *et al.*, 1999). Vykazují rovněž mnoho dalších funkcí mimo rostlinu. U řady PI's je studována možnost jejich využití při léčbě rakoviny, dermatitid, obezity či AIDS (Pouvreau, 2004).

2. 3. 1. Úloha PI's v rostlinách

2. 3. 1. 1. PI's jako součást obranného mechanismu rostlin

Nejdůležitější oblast činnosti PI's v rostlině představuje jejich zapojení do obranného mechanismu rostliny. V odpovědi na mechanické poranění nebo napadení patogenem či škůdcem dochází u rostlin k nárůstu obsahu PI's. Tento nárůst může být pozorován jednak v okolí poranění (lokální) a rovněž v celé rostlině (systemický). Z toho lze odvodit možné zapojení PI v obranném mechanismu (Lawrence et Koundal, 2002; Valueva *et al.*, 2003).

První zmínka o možné roli PI's v obraně rostliny pochází z roku 1947, kdy Mickel et Standish zjistili, že pokud jsou larvy rozličného hmyzu udržovány na produktech sóji, dochází u nich ke ztrátě schopnosti normálního vývoje. Toxický efekt inhibitoru trypsinu sóji byl následně potvrzen při pokusech s larvami brouka *Tribolium confusum* (Lipke *et al.*, 1954). Kromě těchto raných studií byla uvedena celá řada příkladů širokého spektra inhibiční aktivity PI's (Koiwa *et al.*, 1997; Pannetier *et al.*, 1997; Urwin *et al.*, 1997; Vain *et al.*, 1998). Jako příklad lze uvést působení proti motýlům řádu *Lepidoptera*, plošticím řádu *Hemiptera* či háďátkům. PI's mají rovněž schopnost potlačovat růst mycelia a zrání spór některých houbových patogenů (Hraška *et al.*, 2006).

Z hlediska jednotlivých tříd inhibitorů proteáz je asi nejprostudovanější skupinou v této oblasti skupina inhibitorů serinových proteáz. Zde hraje značnou roli skutečnost, že serinové proteázy nejsou využívány v procesech primárního metabolismu. Proto nelze přítomnost inhibitorů těchto proteáz přisoudit jejich roli v regulaci vnitřních pochodů

rostliny. Nejvíce prozkoumanou skupinou jsou poté inhibitory trypsinu (Hraška *et al.*, 2006). V souvislosti s touto skutečností a PI's obsaženými v hlíze bramboru je nutné zmínit práci Johnsona a spolupracovníků (1989), kteří prokázali, že larvy *Manduca sexta* krmené listy transgenního tabáku s transgenem pro PI - 2, důležitý inhibitor chymotrypsinu a trypsinu, měly v porovnání s larvami téhož druhu krmenými netransgenním materiálem značně retardovaný růst. Podobné pokusy s listy transgenního tabáku s transgenem pro inhibitor 1 z rajčete, který patří do rodiny PI- 1 inhibitorů a je důležitým inhibitorem chymotrypsinu, prokázaly, že tento inhibitor má pouze malý vliv na růst larev. Z těchto výsledků lze odvodit, že největší vliv na růst larev *Manduca sexta* má inhibiční aktivita vůči trypsinu (Pouvreau, 2004). Podobné výsledky byly pozorovány při pokusech s larvami druhu *Teleogryllus commodus* a stravou obsahující PI- 2 (Sutherland *et al.*, 2002).

Druhou důležitou třídou PI's představují inhibitory cysteinových proteáz, a to i přesto, že jsou podstatně méně časté než inhibitory serinových proteáz (Peña - Cortés *et al.*, 1995; Botella *et al.*, 1996; Bergey *et al.*, 1996). Cysteinové proteázy se nacházejí v trávicím traktu celé řady hmyzích druhů, např. zavíječ *Callosobruchus macalatus* či mšice *Zabrotes subfaceatus*. Cysteinová proteáza je rovněž hlavní proteázou v trávicím traktu *Diabrotica undecimpunctata howardi*. Tento hmyzí druh posloužil jako biologický materiál při pokusech s inhibitorem cysteinových proteáz Kunitzova typu (PKPI), vyskytujícím se v hlízách bramboru. Začlenění PKPI do stravy larev tohoto druhu mělo za následek nárůst mortality a v podstatě rovněž potlačení růstu (Fabrick *et al.*, 2002). Role cysteinových proteáz v obranném mechanismu byla potvrzena i prací Álvarez – Alfageme *et al.* (2007), kteří pomocí transgenóze zvýšili podíl cysteinových proteáz v bramboru. Na základě biologických pokusů s broukem *Podisus maccliventrís* zjistili, že v případě krmení larev tohoto hmyzu transgenními bramborami dochází ke zvýšenému úhynu.

Zbýlých dvou skupin PI's jsou znalosti o jejich působení mnohem menší. Aspartátové proteázy byly nalezeny u zástupců skupiny ploštic Hemiptera. Z metaloproteáz byly u rostlin dosud identifikovány pouze dvě skupiny, a to rodina P metaloproteáz u bramboru a rajčat a skupina cathepsin D PI bramboru (Ishikawa *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2000; Hraška *et al.*, 2006).

2. 3. 1. 2. PI's jako zásobní proteiny

Přítomnost PI's v hlízách bramboru v relativně vysokém množství i bez předchozí indukce zraněním či patogenem nasvědčuje tomu, že PI'mohou sloužit i jako zásobní proteiny. Tuto možnou roli naznačil poprvé Pusztai (1972). Dokázal časovou shodu mezi obdobím maximální proteolýzy a obdobím maximálního obsahu inhibitoru proteáz v průběhu klíčení fazolu šarlatového.

Derbyshire a spolupracovníci (1976) stanovili jako hranici pro zásobní protein obsah proteinu 5 % z celkového množství proteinu. Jelikož PI's tvoří 30 % všech rozpustných proteinů v hlíze bramboru, mohly by být považovány za zásobní proteiny. Problémem je však fakt, že PI's netvoří homologní skupinu, ale patří do rozdílných tříd a rodin, a že dochází ke změnám jejich koncentrace v průběhu zrání. Proto PI's nenaplnují zcela definici zásobního proteinu.

Pouvreau *et al.* (2001) stanovili hodnotu podílu PI 's v rozpustných bílkovinách hlízy bramboru u odrůdy Elkana na hodnotu 50 %. Podle těchto autorů by 5% hranici pro zásobní bílkoviny překročily celkem 4 rodiny PI's: PI - 2, PCPI, PKPI a PAPI. U rodiny PI-2 byl její obsah stanoven na 22,3 %. Vzhledem k tomu, že bylo zjištěno 10 izoform, které jsou do této rodiny zařazeny, nenaplnuje ani tato rodina definici zásobního proteinu. PCPI rodina je tvořena 8 různými inhibitory, které se liší v molekulové hmotnosti a pI. Dohromady zaujímá 11,9 % z celkového obsahu proteinu ve šťávě z hlízy bramboru. Nejčastější varianta PCPI inhibitoru, tj. PCPI - 8,3, však tvoří pouze 3,6 % celkového množství proteinu. Zde je další potvrzení pro teorii, že PI's nejsou zásobními proteiny v pravém slova smyslu. U zbývajících 2 rodin je situace podobná.

PI's mohou sloužit rovněž jako zdroj síry, nezbytné pro klíčení semen. Obecně jsou PI's velmi bohaté na zbytky cysteinu, jak je zřejmé z Tab. II. Jak lze dále vysledovat, to platí především pro PI's s nízkou molekulovou hmotností (3 - 13 kDa) (Jongsma, 1995).

2. 3. 1. 3. PI's jako kontrola endogenních proteáz

Shain et Mayer (1965) studovali interakce mezi trypsinu-podobnými proteázami a PI's v semenech salátu. Tyto studie přinesly důkaz, že PI's mohou být aktivní vůči endogenním proteázám. Dalším příkladem regulace aktivity endogenních proteáz je exprese inhibitorů cysteinových proteáz v kukuřici, kde se vyskytují paralelně s hromaděním glutelinu. To je známkou zapojení PI's do ochrany glutelinu proti hydrolýze (Abe *et al.*, 1987). Dále byla

popsána schopnost inhibitorů Bowman-Birkova a Kunitzova typu ze sóji inhibovat purifikovanou serinovou proteázu rovněž ze sóji (Morita *et al.*, 1996). Inhibitory cysteinových proteáz, které jsou přítomné v semenech a hlízách v menších množstvích než inhibitory serinových proteáz, se účastní regulace fyziologicko-metabolických procesů (Valeski *et al.*, 1991). Na tuto roli PI's odkazuje i Solomon *et al.* (1999), který popisuje úlohu PI's v programované buněčné smrti a naznačuje jejich vliv skrze kontrolu endogenních proteáz.

2. 3. 2. Využití PI's v lékařství

PI's jsou zkoumány i z hlediska využití v lékařském výzkumu. Ačkoliv byly dlouho považovány pouze za antinutriční faktory, dostávají se v posledních letech do popředí zájmu zejména díky svým možným protirakovinným a antidermatitickým vlastnostem.

2. 3. 2. 1. PI's jako protirakovinná činidla

PI's jsou uznávána jako skupina protirakovinných činidel (Kennedy, 1998). Tuto schopnost lze pozorovat u PI's pocházejících z různých skupin. Jako nejúčinnější se jeví PI's se schopností inhibovat chymotrypsinu-podobné proteázy, ke kterým patří v současnosti nejstudovanější inhibitor Bowman - Birkova typu ze sóji (BBI). PI's z hlízy bramboru v této oblasti nezůstávají pozadu. Obzvláště perspektivními se zdají být PI-1 a PI-2 (Frenkel *et al.*, 1987; Billings *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1997). Současně narůstá zájem o ostatní skupiny PI's z hlízy bramboru, zejména o inhibitory aktivní vůči cysteinovým proteázám a karboxypeptidáze (Billings *et al.*, 1989; Blanco - Aparicio *et al.*, 1998).

K nejrozšířenějším formám rakoviny patří karcinomy kůže. V souvislosti s touto formou rakoviny byly studovány účinky PI-1, PI-2 a PCI. Jednou z příčin nárůstu výskytu karcinomů lidské kůže je sluneční UV záření. Za aktivaci promotoru tumoru v savčích buňkách je zodpovědná aktivace aktivátorového proteinu (AP-1), což je transkripční faktor. Pokusy s PI-1 a PI-2, aplikované na myši epidermální buňky, prokázaly, že tyto PI's jsou schopny blokovat UV zářením indukovanou aktivaci AP-1. Tato inhibice je navíc specifická pouze pro přenos signálu pro aktivaci AP-1, který byl indukován UV zářením (Huang *et al.*, 1997).

Jako značně perspektivní v léčbě rakoviny se projevuje rovněž inhibitor karboxypeptidázy z hlízy bramboru (PCI), který je jediným přirozeným antagonistou lidského epidermálního růstového faktoru (EGF) (Blanco – Aparicio *et al.*, 1998). EGF spolu se svým receptorem (EGFR) tvoří součást některých aspektů vývoje nádoru, včetně růstu nádorových buněk, vaskularizace, invazivnosti a tvorby metastáz. PCI soupeří s EGF o vazebné místo na EGFR. V případě, že dojde k navázání PCI na EGFR, je inhibována jeho aktivace a následná proliferace buněk, kterou EGFR indukuje. Příčinou tohoto jevu je pravděpodobně disulfidická smyčka, tzv. T-knot, která se kromě PCI vyskytuje rovněž v mnoha růstových faktorech včetně EGF (Pouvreau, 2004).

Další možnost vzniku rakoviny je spojena s funkcí fagocytujících buněk. Ty jsou stimulovány invazí bakterií a následně vytvářejí aktivní kyslíkové druhy. Weitzman a spolupracovníci (1985) popsali podíl těchto aktivních druhů na vzniku zánětlivých onemocnění, nekrotizace okolních tkání, mutagenitě a karcenogenitě. Následně bylo dokázáno, že inhibitory chymotrypsinu, obzvláště PI-1, jsou schopny inhibovat tvorbu aktivních kyslíkových druhů v průběhu oxidačního hoření ve stimulovaných lidských leukocytech s polymorfními jádry (Valeski *et al.*, 1991).

2. 3. 2. 2. PI's v léčbě dermatitid

Další možné využití PI's v medicíně představuje jejich zapojení do léčby kožních onemocnění (dermatitid). Zde se PI's uplatňují především v léčbě peri-análních dermatitid. Ty vznikají často jako následek průjmových nebo jiných gastrointestinálních onemocnění či chirurgického zásahu v břišní krajině, kdy nedochází k dostatečné redukci a naředění proteáz, pocházejících z potravy a ze šťáv z žaludku, slinivky a tlustého střeva. Přebytky proteázy jsou následně vylučovány exkrementy a navozují vznik dermatitid v okolí konečníku. Pro odstranění této příčiny je potřeba získat zdroj, který zahrnuje PI's schopné inhibovat všechny typy proteáz. Jak bylo uvedeno výše, hlízy bramboru obsahují PI's všech 4 typů (z pohledu inhibovaných proteáz). Brambory jsou tedy vhodným rostlinným zdrojem, splňujícím uvedený požadavek a schopným zabránit vzniku těchto dermatitid (Ruseler – van Embden *et al.*, 2004).

2.3.2.3. PI's a léčba obezity

Bylo popsáno, že PI's ovlivňují pocit sytosti. Klíčovou roli v mechanismu nasycení hraje cholecystokinin (CCK), peptid složený z 33 aminokyselin, který stimuluje kontrakce žlučníku a vylučování trypsinogenu ze slinivky. Trypsinogen se ve dvanáctníku přeměňuje na aktivní trypsin, který mechanismem negativního zpětného kroku ovlivňuje uvolňování CCK. Přesný mechanismus tohoto ovlivňování nebyl dosud v lidském organismu dostatečně prozkoumán (Owyang *et al.*, 1986). Vysoká hladina CCK způsobuje redukci příjmu potravy. Hlavním efektem podávání CCK před jídlem je dřívější nástup pocitu sytosti a lidé proto přestanou dříve jíst (Pi – Sunyer *et al.*, 1982). Nejprve bylo tedy vyzkoušeno intravenózní podávání CCK obézním lidem. Tento způsob měl ovšem řadu negativních vedlejších účinků., jako například nauseu (Smith et Gibbs, 1987). Owyang a spolupracovníci (1986) zjistili, že inhibitory serinových proteáz jsou schopny udržovat vyšší hladinu CCK v organismu. Použití PI-2 jako doplňku stravy způsobuje tedy nárůst hladiny CCK a tím i redukci příjmu potravy. Současně zmizely zmiňované negativní vedlejší příznaky (Hill *et al.*, 1990).

2.4. Metody detekce a charakterizace proteinů a PI's

Metody využívané k detekci a charakterizaci proteinů (PI's) lze v podstatě rozdělit do dvou základních skupin: na metody založené na dvoudimenzionální (dvojrozměrná) gelové elektroforéze (2-DE) a metody nevyužívající 2-DE (Collinsová et Jiráček, 2004).

Základem první skupiny je dvojrozměrná gelová elektroforéza (2DE) – konkrétně dvojrozměrná polyakrylamidová elektroforéza (2 DE- PAGE). Tato metoda byla poprvé popsána v roce 1975 (Bouchal et Kučera, 2003). Principem je rozdělení jednotlivých proteinů na polyakrylamidovém gelu h podle dvou nezávislých biochemických charakteristik. Nejprve jsou proteiny rozděleny v prvním směru podle svých elektrických nábojů (pI) a poté v kolmém směru podle svých molekulových hmotností. Výsledkem je tzv. proteinová mapa, v níž každý protein zaujímá charakteristickou pozici. Nejvyšší citlivost této metody je dosažena při barvení gelu stříbrem (Kovářová, 2005). Postupně se ovšem začaly objevovat nové postupy jako je technika diferenčního fluorescenčního značení proteinů (DIGE) či fluorescenční detekce separovaných proteinů (Collinsová et Jiráček, 2004).

Přes všechny inovace neumožňuje metoda 2DE kvalitní identifikaci proteinů. Proto se 2 – DE využívá nejčastěji ve spojení s metodou hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich dvou základních typů: „Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight“ MS (MALDI-TOF MS) a „Electrospray – ionization“ MS (ES – MS). Principem těchto metod je měření hmotnosti molekuly (přesněji poměru hmotnosti k náboji) po její předchozí ionizaci a přenesení do vysokého vakua přístroje. Na základě spojení metod 2 – DE a MS lze zjistit s relativní přesností molekulovou hmotnost určovaného proteinu a tu posléze porovnat s příslušnou databází (Šedo et Havel, 2003; Kovářová, 2005).

Do této skupiny lze zařadit i metody imunochemické, konkrétně Western-blotting. Proteiny z 2 – DE jsou přeneseny na blotovací membránu. Ta je posléze inkubována s protilátkou A proti hledanému proteinu. Následně proběhne inkubace s protilátkou B proti protilátce A. Je-li protilátka B značena chromogenní značkou, je místo s hledaným proteinem na membráně barevně označeno (Bouchal et Kučera, 2003).

Druhou základní skupinu tvoří metody, které nemají základ ve dvojrozměrné gelové elektroforéze. Sem se řadí metody chromatografické. Tyto metody jsou ve své základní formě využívány především pro purifikaci. Základem těchto metod je afinitní chromatografie (AC), která používá sloupcových gravitačních kolon. Principem je využití schopnosti proteinů vázat se na specifické látky. Jednou z modifikací je kovalentní chromatografie, kdy se využívá schopnosti proteinů tvořit kovalentní vazby v místech SH skupin (Zouhar, 1999; Glatz, 2000). S rozvojem techniky se postupně stávaly sofistikovanější a jejich modifikaci ve formě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Chromatography - HPLC) lze využít i k detekci a charakterizaci proteinů. Do této skupiny lze zařadit i využití tzv. proteinových čipů (protein arrays). Specifické proteiny, jako jsou např. protilátky schopné rozpoznávat a vázat jiné proteiny, jsou imobilizovány na čipy se speciálně upravenými povrchy. Na povrch čipů je posléze aplikován vybraný proteinový vzorek. Na čipy zůstanou navázány pouze ty proteiny, které se vážou na odpovídající protilátky. Ty lze posléze odečíst přímo na čipu hmotnostní spektrometrií (Pandey et Mann, 2000; Collinsová et Jiráček, 2004).

2. 4. 1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metoda HPLC se vyskytuje v řadě modifikací. Nejčastějšími jsou: size exclusion HPLC (SE - HPLC), iontová výměnná HPLC (HPIEC), reverse phase HPLC

(RP - HPLC). Size exclusion chromatografie (SE-HPLC) je založena na rozdílné velikosti, přesněji rozdílném hydrodynamickém objemu, proteinů ve vzorku. Větší molekuly nemohou procházet póry ve sloupci částic a jsou rychleji vylučovány. Menší molekuly mohou prostupovat póry v stacionární fázi, čímž dochází k jejich zdržení a tím k rozdělení molekul vzorku do frakcí v závislosti na jejich velikosti (Welling et Welling – Wester, 1998).

Iontová výměnná HPLC (HPIEC) proteinů a peptidů je technika, která vyžaduje použití kolon s vysokou hustotou částic, tvořených tuhým, polymerickým substrátem. Nabitě skupiny jsou více či méně trvale vázány na kolonu (pevné vazby) a k nim mohou být pomocí převážně iontových interakcí vázány proteiny a peptidy (mobilní ionty). Mobilní fáze, tvořená pufrům o známém pH a iontové síle prochází kolonou s vlastnostmi, shodnými s pufrům. Vzorek je poté vstříkován na iontový výměnný obal (nebo vaznou fázi) za podmínek, které umožňují reversibilní, nedenaturační vazbu proteinu nebo peptidu, o který se zajímáme (Henry, 1998).

Základním vazebním mechanismem reverse phase HPLC (RP-HPLC; chromatografie na reverzní fázi) jsou hydrofóbní interakce. Jako stacionární fáze je používáno kapaliny zakotvené na pevném nosiči – silikagel, agarosa atd. Povrch těchto vysoce polárních hydrofilních nosičů je chemicky upraven a je na něm zakotvena stacionární fáze. V případě, že je stacionární fáze nepolární a jako mobilní fáze jsou používány vzorky proteinů v polárním rozpouštědle, mluvíme o reverzní fázi či chromatografii reverzní fáze (RP- HPLC) (Corran, 1998). První pokusy o použití RP-HPLC pro separaci proteinů a peptidů byly zaměřeny na malé molekuly. S rozvojem HPLC a nárůstem zájmu o průmyslové využití RP-HPLC došlo i k nárůstu využívání v biotechnologiích a proteomice (Chmelík, 2005). RP-HPLC je dnes využívána rovněž pro purifikaci PI např. u slunečnice (Regente et de la Canal, 2000). Použití u PI u brambor bylo popsáno u inhibitoru karboxypeptidázy (Bronsoms *et al.*, 2003) a u inhibitoru cysteinových proteáz (Križaj *et al.*, 1993). Dále bylo popsáno použití této metody u inhibitoru patřícímu ke skupině potato inhibitor I, nalezenému u dýně (Christeller *et al.*, 1998).

3. Cíle práce

1. Nalézt vhodnou metodu HPLC pro detekci a identifikaci inhibitorů proteáz (PI's) ve šťávě z hlíz bramboru.
2. Stanovit chromatografické profily v oblasti inhibitorů proteáz (PI's) u vybraných odrůd bramboru pomocí metody HPLC.
3. Ověřit možnost využití metod HPLC pro detekci a identifikaci inhibitorů proteáz (PI's) v průmyslově získané šťávě z hlíz bramboru.

Tato práce je zaměřena na možnost využití metod HPLC pro detekci a identifikaci inhibitorů proteáz (PI's) ve šťávě z hlíz bramboru. Celá práce je rozdělena do 3 částí. V první části je potřeba nalézt takovou metodu HPLC, která by byla využitelná k detekci a identifikaci PI's, a potvrdit její vhodnost pomocí komerčně dostupných standardů. V druhé části budou pomocí vybrané metody HPLC získány chromatografické profily vybraných odrůd bramboru. Tyto chromatografické profily budou zahrnovat retenční časy jednotlivých skupin PI's a jejich procentické zastoupení v celkovém obsahu PI's ve šťávě z hlíz bramboru. Zjištěné výsledky budou statisticky vyhodnoceny. V poslední části bude ověřena možnost využití metod HPLC pro identifikaci a detekci PI's ve šťávě z hlíz bramboru, která vzniká jako odpad při průmyslovém získávání škrobu.

4. Materiál a metody

4. 1. Materiál pro analýzy

Analýzy byly prováděny na dvou typech materiálu – hlízové šťávě získané z individuálních hlíz analyzovaných odrůd a hlízové šťávě ze škrobárenského provozu.

Analýzy byly prováděny na celkem 17 vzorcích registrovaných odrůd brambor. Analyzovaný materiál byl získán v rámci přípravy katalogu biochemických a molekulárních markerů odrůd brambor, uloženém na Biotechnologickém centru Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity. Konkrétně se jednalo o odrůdy: Amylex, Delikat, Ditta, Fambo, Futura, Innovator, Kariera, Katka, Korneta, Livera, Marena, Satina, Sinora, Tomensa, Vineta, Vivaldi a Vladan. Dalším analyzovaným materiálem byla průmyslově získaná hlízová šťáva.

Jako standardy byly použity komerčně připravené inhibitory proteáz od firmy Merck. Konkrétně se jednalo o Chymotrypsin Inhibitor I, Potato (katalogové číslo 217359) a Carboxypeptidase Inhibitor, Potato (katalogové číslo 230906).

4.1.1. Popis vybraných odrůd

Původ, rok uvolnění pro pěstování a rodičovské komponenty dané odrůdy jsou uvedeny v tabulce 3. Ze 17 odrůd pochází po 5 odrůdách z Nizozemí, Spolkové republiky Německo a České republiky. Skupina je dále doplněna po 1 odrůdě z Rakouska a Slovenské republiky. Rozmezí let, kdy byly tyto odrůdy zařazeny na seznam povolených odrůd, se pohybuje mezi lety 1989 (odrůda Ditta a Tomensa) a 2004 (odrůda Kariera). Z rodičovských komponent je nejčastěji zastoupena odrůda Agria, celkem u 2 odrůd: Futura a Sinora.

Na základě porovnání rodokmenů byla zjištěna jistá podobnost mezi vybranými odrůdami. Budeme-li sledovat jejich původ až do 5. generace předků, zjistíme, že u 7 odrůd se vyskytuje v rodokmenu stejný předek: odrůda Saskia. Konkrétně se jedná o odrůdy Delikat, Fambo, Innovator, Korneta, Vladan, Vineta a Vivaldi. U dalších 4 odrůd, odrůda Amylex, Korneta, Vineta a Vivaldi, je v rodokmenu společným předkem odrůda Aquila. Odrůdy Tomensa, Sinora a Vladan mají v rodokmenu odrůdu Mittelfruhe. Dalším

společným předkem u odrůd Ditta, Marena a Sinora je odrůda Quarta. Odrůdy Sinora, Satina, Marena a Livera jsou spřízněny přes předka odrůdu Clivia. Odrůda Katka má společné předky, odrůdy Majestic a Jubel, s odrůdami Vivaldi Korneta, Futura a Fambo. Pouze odrůda Kariera nemá v celém rodokmenu jediného společného předka s žádnou další vybranou odrůdou. Rodokmeny jednotlivých odrůd jsou uvedeny v příloze.

Odrůda	Země původu	Rok	Rodičovské komponenty
Amylex	CZ	1994	ZVIKOV x HR 126/11-67
Delikat	SRN	1995	KARLENA x 2-70.4154 N
Ditta	AUT	1989	BINTJE x QUARTA
Fambo	HOL	1985	OSTARA x PROVITA
Futura	HOL	1998	AGRIA x MORENE
Innovator	HOL	1999	SHEPODY x RZ 84 – 2580
Kariera	CZ	2004	BETTINA x KE.74
Katka	CZ	1998	KARIN x KE 509/28
Korneta	CZ	1996	ADRETTA x KE 025/21
Livera	SLK	1996	LU.74.417/102 DH x LH 168/77
Marena	SRN	1995	1325/77/2620 x AGRIA
Satina	SRN	1993	PUNTILA x H99/73
Sinora	HOL	1999	AGRIA x AM 70-2166
Tomensa	SRN	1989	ST 155 x TAIGA
Vineta	SRN	1994	2-75.1349 N x SOLINA
Vivaldi	HOL	1998	TS 77-148 x MONALISA
Vladan	CZ	1998	ASSIA x AUSONIA

Tabulka č. 3: Základní údaje o vybraných odrůdách.

4.1.2. Průmyslově získaná hlízová šťáva

Průmyslově získaná hlízová šťáva byla získána za přispění Ing. Jana Bárty, Ph.D. Tato průmyslově získaná hlízová šťáva je vedlejším produktem při zpracování hlíz ve škrobárenském průmyslu. Konkrétně se jednalo o hlízovou šťávu, která vznikla ze směsi

několika odrůd v závodě Lyckeby Amylex Horažďovice. Tato směs byla analyzována v roce 2006.

4.2. Přístrojové vybavení

Pro analýzy byl použit kapalinový chromatogram Finnigan SpectraSYSTEM Narrow-bore HPLC (High Performance Liquid Chromatography) od firmy Thermo Separation Products. Přístroj je složen z degasseru (Finnigan SpectraSYSTEM SCM1000 Solvent Degasser), pumpy (Finnigan SpectraSYSTEM P4000 Quaternary Pump pump), autosampleru (Finnigan SpectraSYSTEM AS3000 Autosampler), PDA detektoru (Finnigan UV6000LP Photodiode Array Detector) a komunikačního modulu SN 4000. V tomto systému je byla použita nástřiková smyčky o objemu 10 μ l. Jako ovládací a vyhodnocovací program je používán ChromQuest 3.0, dodaný rovněž firmou Thermo Separation Products. Dále byla použita preparativní kolona PLRP-S/4000 A (10 μ m, 250 x 4,6 mm, náplň sorbentu polystyren/divinylbenzen) (Polymer Laboratories). Pro ochranu kolony byla využívána předklonka Guard Column PL (Polymeric) RP Micro Blue (Michrom Resources, Inc.).

4.3. Metody

4.3.1. Příprava standardů a vzorků pro analýzy

Standardy byly připraveny v koncentraci 1 mg a 0,5 mg standardu na 1 ml 0,1% TFA. U vzorků jednotlivých odrůd bramboru jsem pro analýzu využila hlízovou šťávu izolovanou z individuálních hlíz příslušných odrůd. Omyté, zdravé a plně vyztřelé hlízy byly zmrazeny v -80°C a po jejich rozmrznutí (přes noc, v laboratorní teplotě) byla extrahována hlízová šťáva (Sýkorová et al., 2006). Hlízová šťáva byla poskytnuta Ing. Janem Bártou. Pro jednotlivé analýzy bylo využito po 5 μ l jednotlivých roztoků.

4. 3. 2. Metody pro analýzu vzorků

Na základě studia odborné literatury bylo navrženo a testováno celkem 5 odlišných metod, které byly označeny jako Inhibitory 1, Inhibitory 2, Inhibitory 3, Inhibitory 4 a Inhibitory 5.

4.3.2.1. Metoda Inhibitory 1

Tato metoda vycházela z metody autorů Regente et Canal (2000). Základem byl následující lineární gradient: 0-10 min., 0.1% TFA; 10 – 50 min., 0-50 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 50 – 55 min., 50 – 100 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 55 – 57 min., 100 % acetonitrilu; 57 – 60 min., 100 – 0 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 60 - 75 min., 100 % 0,1% TFA. Průtok byl 1 ml/min. Vzhledem k vyšší molekulové hmotnosti inhibitorů proteáz byla tato metoda modifikována , a to prodloužením časů jednotlivých fází. Výsledkem byl potom následující lineární gradient: 0-10 min., 0.1% TFA; 10 – 61 min., 0-50 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 61 – 65 min., 50 – 100 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 65 – 67 min., 100 % acetonitrilu; 67 – 70 min., 100 – 0 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 70-85 min., 100 % 0,1%TFA; 85 – 100 min., 4% methanolu a 96 % Milipore H₂O. Rychlost průtoku kolonou zůstala na 1 ml/min., od 85 minuty pak došlo ke snížení na 0,4 ml/min. Závěrečná fáze od 85. minuty byla přidána kvůli promytí kolony před nástřikem nového vzorku. Jednotlivé složky směsi byly detekovány při 254 a 280 nm.

4.3.2.2. Metoda Inhibitory 2

Základem této metody byla upravená metoda dle Konarev *et al.* (2000). Původní lineární gradient, 0 - 60% acetonitril v 0,1% TFA, byl změněn následujícím způsobem: 0 – 70 min., 0-60 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 70 – 90 min., 60 – 0 % acetonitrilu v 0,1% TFA. Průtok byl nastaven na rychlost 1 ml/min. Detekce probíhala při vlnových délkách 254 a 280 nm.

4.3.2.3. Metoda Inhibitory 3

Metoda dle Regente et Canal (2000), popsaná v metodě Inhibitory 1, byla modifikována do následujícího protokolu: 0 – 10 min., 0,1% TFA; 10 – 15 min., 0 -15 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 15 – 75 min., 15 – 45 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 75 – 80 min., 45 – 100 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 80 – 82 min., 100 % acetonitrilu; 82 – 85 min., 100 – 0 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 85 – 95 min., 0,1% TFA; 95 – 110 min. 4 % methanolu a 96 % Milipore H₂O. Rychlost průtoku byla 1 ml / min. Od 95. minuty byla tato rychlost snížena na 0,4 ml/min. Monitorování probíhalo při vlnových délkách 254 a 280 nm.

4.3.2.4. Metoda Inhibitory 4

Nejprve byla použita metoda dle Bronsoms *et al.* (2003). Základem této metody je lineární gradient, kdy se v podstatě jedná o 20 - 40% podíl acetonitrilu v 0,1% TFA, kterého má být dosaženo ve 30. minutě. I tato metoda byla následně upravena. Upravený lineární gradient byl: 0 – 60 min., 0,1% TFA; 60 - 61 min., 25 – 75 % acetonitrilu v 0,1% TFA; 62 min., 0,1% TFA; 70 min. - 100 min., 4 % methanolu a 96 % Milipore H₂O. Rychlost průtoku byla v období do 0 do 70 min. 1 ml/min. a v období od 70 do 100 min. 0,4 ml/min. Měření probíhalo při vlnových dálkách 245 a 280 nm.

4.3.2.5. Metoda Inhibitory 5

U této metody se vycházelo z upravené metody Inhibitory 3. Výsledkem úprav byl tento lineární gradient: 0 - 10 min., 100% 0,1% TFA; 10 - 10,5 min., 0 - 12% acetonitril v 0,1% TFA; 10,5 - 11 min., 12 - 27% acetonitril v 0,1% TFA; 11 - 90 min., 100% 0,1% TFA; 90 - 90,5 min., 0 - 27% acetonitril v 0,1% TFA; 90,5 - 91 min., 27 - 39% acetonitril v 0,1% TFA, 91 - 100 min., 100% acetonitril; 100 - 110 min., 4% methanol a 96 % Milipore H₂O. Průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml/ min., mezi 100. a 110. minutou na 0,4 ml/min. Monitorování probíhalo při vlnových délkách 245 a 280 nm.

4.3.2.6. Porovnání metodik

Na základě získaných chromatogramů byly vybrány nejvhodnější metody pro analýzu inhibitorů proteáz u brambor ze vzorků hlízové šťávy.

4.3.3. Získání chromatogramů jednotlivých odrůd

Následně byla provedena analýza celkem 17 odrůd z katalogu odrůd Biotechnologického centra Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Získané chromatografické profily jednotlivých odrůd byly statisticky vyhodnoceny pomocí analýzy variance (ANOVA) s následným testem rozdílů průměrů (LSD test). Pro zjištění rozdílů mezi procentickými obsahy PI's v závislosti na vybrané metodě detekce byl použit párový t - test.

4.3.4. Analýza průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru

Vzorky průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru byly analyzovány pomocí metod Inhibitory 1, Inhibitory 3 a Inhibitory 5, které byly navrženy na základě výsledků získaných při analýze individuálních odrůd. Získané chromatogramy byly hodnoceny z hlediska využitelnosti těchto metod pro stanovení množství inhibitorů.

5. Výsledky

5.1. Vyhodnocení vhodnosti jednotlivých metod HPLC pro detekci a identifikaci PI's pomocí standardu

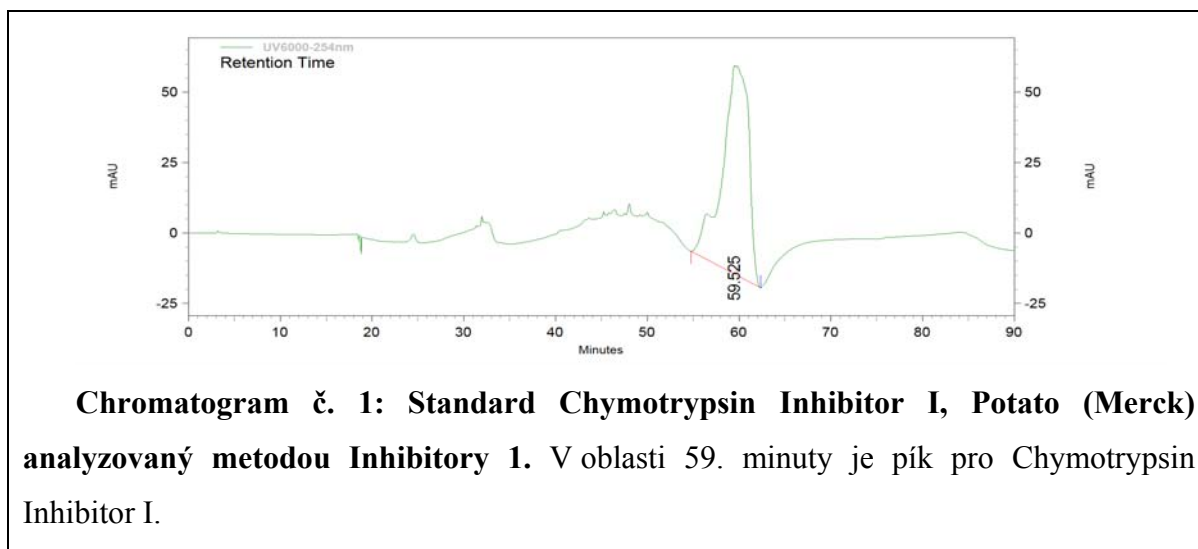
V odborné literatuře byly postupně vyhledány celkem 3 různé metodiky pro detekci inhibitorů proteáz (PI's) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Z těchto metodik byly následně vytvořeny metody, označené Inhibitory 1, Inhibitory 2 a Inhibitory 4. Následně byly úpravou metody Inhibitory 1 vytvořeny další 2 metody, označené jako Inhibitory 3 a Inhibitory 5. Protože nalezené metodiky nebyly primárně určeny pro detekci PI's z hlíz bramboru, bylo nutné nejprve provést vyhodnocení jejich vhodnosti pro detekci těchto PI's. Toto vyhodnocení bylo provedeno na základě vyhodnocení chromatogramů pro specifické standardy. Těmito standardy byly Chymotrypsin Inhibitor I, Potato (katalogové číslo 217359) a Carboxypeptidase Inhibitor, Potato (katalogové číslo 230906) od firmy Merck.

5.1.1. Metoda Inhibitory 1

Prvním analyzovaným standardem byl Chymotrypsin Inhibitor I, Potato (Merck). První zkoumanou metodou byla metoda Inhibitory 1. Výsledný chromatogram vykazoval 1 pík s retenčním časem 59,525 minuty. Retenční čas použitého standardu Chymotrypsin Inhibitor I, Potato (Merck) byl potvrzen opakovanými analýzami. Odečet retenčního času byl komplikován skutečností, že píky v určitých případech neostrý vrchol. Další problém představovalo značně kolísavé pozadí, které často zasahovalo i do píku detekovaných látek (viz. chromatogram č. 1). Vzhledem k tomu, že příčin kolísavého pozadí může být celá řada včetně chyb detektoru, použitého gradientu či bublinami v mobilní fázi, nepodařilo se jej zcela odstranit. Toto pozadí by mohlo způsobovat potíže při celkové analýze PI's ze šťávy z hlízy bramboru.

Metoda Inhibitory 1 byla dále testována pomocí analýz standardu Carboxypeptidase Inhibitor, Potato (Merck). Metoda Inhibitory 1 byla opět vyhodnocena jako vhodná. Na chromatografu byly zřetelně odlišitelné dva píky. První pík měl retenční čas 37,043 minuty a druhý pík měl retenční čas 80, 150 minut. Tento druhý pík se již vyskytoval v oblasti chromatogramu, který odpovídá době, kdy u této metody dochází k vymývání reziduí.

Proto byl jako retenční čas pro Carboxypeptidase Inhibitor, Potato (Merck) určen retenční čas 37,043 minuty. Tento čas byl potvrzen opakovanými analýzami. Metoda Inhibitory 1 vykazovala dobrou opakovatelnost. Ve všech případech byly stanoveny téměř totožné retenční časy pro použité standardy.



Protože metoda Inhibitory 1 poskytovala relativně dobrý odečet retenčních časů u obou testovaných standardů, byla tato metoda použita jako základ pro upravené metody Inhibitory 3 a Inhibitory 5. K úpravě bylo přistoupeno pro odstranění rušivého pozadí.

5.1.2. Metoda Inhibitory 2

Další metodou, která byla testována pro možnost využití k analýze PI's, byla metoda Inhibitory 2. Tato metoda byla původně vyvinuta pro analýzu PI's ze semen slunečnice. V případě použití původní nemodifikované metody se nepodařilo detekovat standard Chymotrypsin Inhibitor I (Merck). Po modifikaci metody se v 60. minutě objevil pík pro příslušný inhibitor. Problém však představovala nedostatečná možnost přesného odečtu retenčního času. Vzhledem ke narůstajícímu rušivému pozadí během analýzy nebyla tato metoda shledána jako dostatečně vhodná. Při opakovaných analýzách standardu Carboxypeptidase Inhibitor (Merck) se tato metoda chovala, jako by byla analyzována směs inhibitorů a nikoliv pouze standard. V chromatogramu se vyskytovaly píky v retenčním čase 12., 15., 20., 35., 42., 56., a 67. minutě. Vzhledem k tomu, že při analýzách obou standardů nebyl ani v jednom případě zachycen pík pro daný inhibitor,

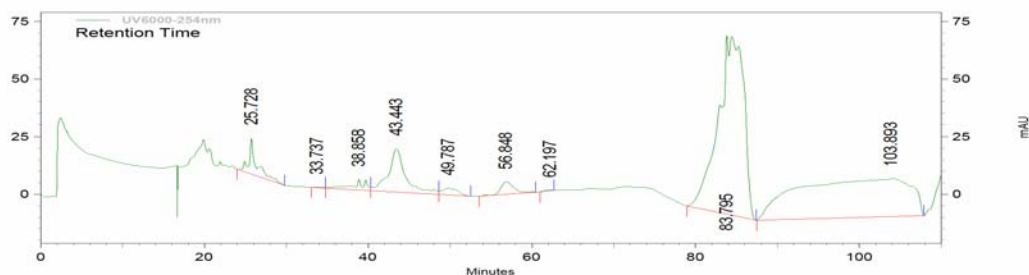
který by umožňoval dostatečně přesný odečet retenčního času, byla tato metoda z dalších pokusů vyloučena jako nevhodná.

5.1.3. Metoda Inhibitory 3

Tato metoda vznikla jako modifikace metody Inhibitory 1. Celkem byly provedeny dvě modifikace. V kapitole Materiál a metody je uvedena již finální úprava metody Inhibitory 3.

Při analýzách Chymotrypsin Inhibitoru I (Merck) byl v případě prvotní modifikace detekován jeden pík. Retenční čas tohoto píku byl 83,795 minuty, což odpovídá době, kdy u této metody docházelo již k vymývání reziduí z kolony. Po druhé modifikaci se v chromatogramu objevovaly celkem dva píky, jeden pík na místě píku původního v čase 83,795 minuty a druhý pík s retenčním časem 59,320 minut. Retenční čas druhého píku odpovídá retenčnímu času pro Chymotrypsin Inhibitor I (Merck), zjištěnému pomocí metody Inhibitory 1.

V případě analýz standardu Carboxypeptidase Inhibitoru I (Merck) měla tato metoda podobné nedostatky jako metoda Inhibitory 2. Ačkoliv byl detekován standard, tj. jednotlivá látka, chovala se tato metoda, jako by byla detekována směs. Výsledkem pak byl chromatogram zachycující celou řadu píků v různých retenčních časech (viz chromatogram č. 2). Navíc se v oné škále retenčních časů nevyskytl ani jeden z retenčních časů Carboxypeptidase Inhibitoru (Merck), určených pomocí metody Inhibitory 1. Tento jev je způsoben odlišným gradientem jednotlivých elučních pufrů.

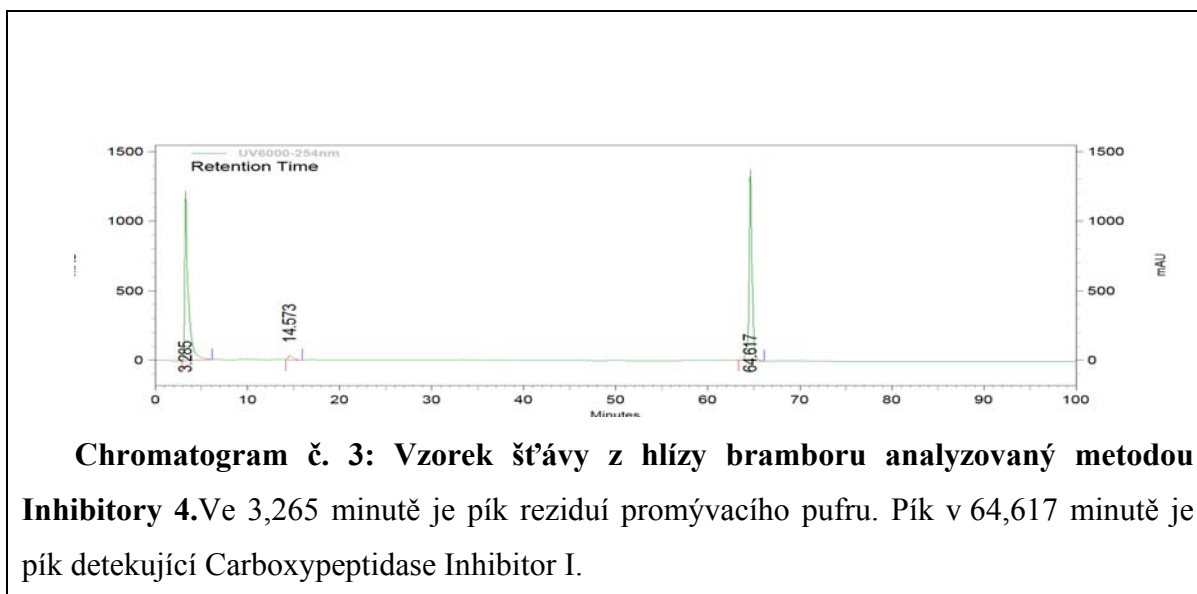


Chromatogram č. 2: Detekce standardu Carboxypeptidase Inhibitoru I (Merck) metodou Inhibitory 3. Píky se vyskytují po celé délce chromatogramu.

5.1.4. Metoda Inhibitory 4

V případě využití této metody pro analýzu standardu Chymotrypsin Inhibitor I (Merck) nedošlo k zachycení žádného píku. Příčina může být v primárním zaměření této metody, která byla původně určena pro detekci inhibitoru karboxypeptidázy. Při použití metody Inhibitory 4 na standard Carboxypeptidase Inhibitoru (Merck), byly na výsledném chromatogramu zaznamenány dva píky (viz chromatogram č. 3). První pík s retenčním časem 3,265 minut odpovídá době, kdy dochází k vyplavení zbytků promývacího pufru z kolony. Druhý pík měl retenční čas 64,617 minut a určuje tedy retenční čas Carboxypeptidase Inhibitoru v případě použití této metody.

Vzhledem k tomu, že metoda Inhibitory 4 dokáže detekovat pouze Carboxypeptidase Inhibitor I a druhý standard se touto metodou detekovat nepodařilo, byla tato metoda z dalších analýz vyloučena jako nevhodná.

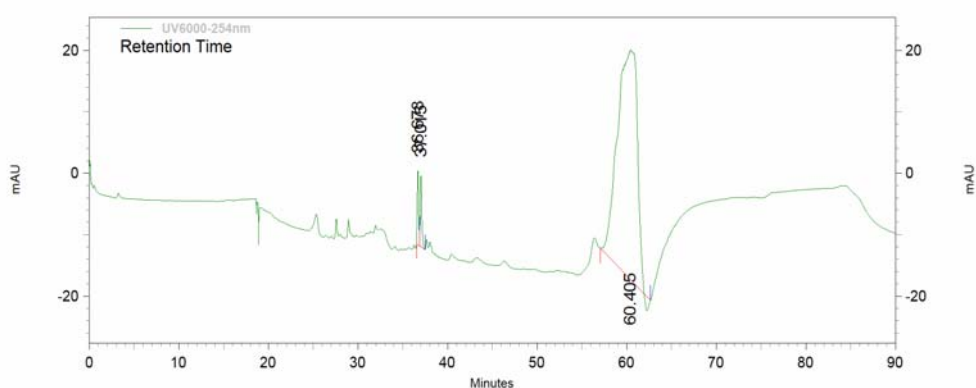


5.1.5. Metoda Inhibitory 5

Tato metoda vznikla jako modifikace metody Inhibitory 3 a jejím základem tedy byla metoda Inhibitory 1. Chromatografické profily, získané analýzou standardu Chymotrypsin Inhibitoru I (Merck), vykazovaly jeden pík s retenčním časem 60,125 minuty. Tento retenční čas je velmi blízký retenčnímu času pro stejný standard, který byl získán při

využití metody Inhibitory 1. Drobná odchylka je způsobena změnou počáteční rychlosti nárůstu koncentrace elučnicích pufrů.

Chromatogramy pro standard Carboxypeptidase Inhibitor (Merck) vykazovaly celkem tři píky (viz chromatogram č. 4) Jeden z nich se vyskytoval v retenčním čase 60,405 minuty a jedná se pravděpodobně o reziduum elučnicího pufru. Další dva píky se vyskytovaly v retenčních časech velmi blízkých sobě. Konkrétně se jednalo o časy 36,978 a 37,048 minuty. Oba retenční časy se téměř shodují s retenčním časem pro Carboxypeptidase Inhibitor (Merck), který byl získán při analýze stejného standardu pomocí metody Inhibitory 1.



Chromatogram č. 4: Standard Carboxypeptidase Inhibitoru I detekovaný metodou Inhibitory 5. V oblasti 36. a 37. minuty jsou zobrazeny píky Carboxypeptidase Inhibitoru I.. Pík v 60. minutě odpovídá reziduum elučnicího pufru.

5.1.6. Porovnání jednotlivých metod HPLC a výběr nejvhodnější metody pro další analýzu.

Výsledky analýz standardů jednotlivými metodami byly následně porovnány. Jako porovnávací kritéria byla zvolena: možnost přesného odečtu retenčního času, ostrost vrcholu píku, schopnost detekovat oba použité standardy a velikost rušivého pozadí. Na základě těchto kritérií byly jako nejvhodnější metody pro další analýzy jednotlivých odrůd a průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru vybrány metody Inhibitory 1 a Inhibitory 5.

5. 2. Získání chromatografických profilů jednotlivých odrůd z katalogu odrůd

Následně byly získány chromatografické profily u 17 odrůd z katalogu odrůd, uloženého v Biotechnologickém centru Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Jmenovitě se jednalo o odrůdy: Amylex, Delikat, Ditta, Fambo, Futura, Innovator, Kariera, Katka, Korneta, Livera, Marena, Satina, Sinora, Tomensa, Vineta, Vivaldi a Vladan. Získané chromatografické profily byly porovnány a byly zjištěny odlišnosti mezi jednotlivými odrůdami.

Pro analýzy šťáv získaných z hlíz jednotlivých odrůd byly použity metody Inhibitory 1 a Inhibitory 5. U každé metody bylo provedeno 7 opakování. Vzhledem k tomu, že ke stanovení optimální metody pro detekci PI's byly jako standardy použity inhibitory s nejmenší a největší molekulovou hmotností, lze očekávat, že se retenční časy jednotlivých skupin inhibitorů proteáz budou nacházet v oblasti mezi retenčními časy těchto standardů. Konkrétně se jedná o oblast mezi 37. a 60. minutou. U všech získaných chromatogramů se v této oblasti nalézalo celkem 7 skupin píků, což odpovídalo jednotlivým skupinám PI's. Navíc se zde nacházel jeden pík ve 22. minutě. Tento pík tvoří pravděpodobně skupina ostatních proteinů, které by mohly vykazovat nízkou afinitu k sorbentu použité kolony.

Na základě porovnání 7 chromatogramů jednotlivých odrůd byly zjištěny průměrné retenční časy PI's u dané odrůd a zároveň procentický podíl jednotlivých skupin inhibitorů proteáz, a to zvláště pro použité metody Inhibitory 1 a Inhibitory 5.

Průměrné retenční časy pro 17 odrůd brambor jsou uvedeny v tabulce 4 (metoda Inhibitory 1) a tabulce 6 (metoda Inhibitory 5). Retenční čas 1 je určen pro inhibitor karboxypeptidázy (PCI), retenční čas 2 pak pro skupinu inhibitorů aspartatových proteáz (PAPI). Retenční čas 3 odpovídá skupině inhibitorů proteáz Kunitzova typu (PKPI). Potato inhibitor – 2 (PI-2) má retenční čas označený jako Retenční čas 4. Retenční čas 5 zahrnuje skupinu inhibitorů cysteinových proteáz (PCPI). Skupina ostatních inhibitorů serinových proteáz (OSPI) odpovídá svou molekulovou hmotností retenčnímu času 6. Nejvyšší molekulovou hmotnost a současně nejvyšší počet podjednotek se nachází u potato inhibitoru 1 (PI-1). Vzhledem k tomu, že standard Chymotrypsin Inhibitor I je z této skupiny, odpovídá retenční čas 7 potato inhibitoru 1 (PI-1).

Procentický podíl jednotlivých skupin inhibitorů proteáz byl stanoven na základě výpočtu, který provedl vyhodnocovací software ChromQuest 3.0 (Thermo Separation

Products). Tyto procentické podíly jsou uvedeny v tabulce 8 (metoda Inhibitory 1) a tabulce 10 (metoda Inhibitory 5). Absolutní obsah jednotlivých inhibitorů proteáz nemohl být stanoven. Důvodem je skutečnost, že byly dostupné pouze 2 standardy inhibitorů proteáz, a to Carboxypeptidase Inhibitoru (Merck) a Chymotrypsin Inhibitoru I (Merck). Pro ostatní skupiny PI's nejsou tyto standardy dostupné a nelze tedy provést přepočtení procentického podílu na absolutní množství jednotlivých inhibitorů ve šťávě hlíz bramboru.

5.2.1. Stanovení retenčních časů metodou Inhibitory 1

V počáteční fázi metody byl zobrazen pík ve 22. minutě. Tento pík s největší pravděpodobností odpovídá skupině tzv. ostatních proteinů, nacházejících se ve šťávě hlízy bramboru. Důvodem může být, že některé proteiny z této skupiny mohou vykazovat alespoň minimální afinitu k danému sorbentu kolony.

U retenčních časů pro inhibitor karboxypeptidázy se vyskytuje rozpětí retenčních časů mezi 37,003 minuty (odrůda Innovator) a 37,454 minuty (odrůda Kariera). Retenční časy 2, tj. retenční časy pro PAPI, se pohybovaly mezi 49,454 minutou (odrůda Innovator) a 49,694 minutou (odrůda Kariera). Rozmezí retenčních časů pro skupinu PKPI je ohraničeno 52,224 minutou (odrůda Innovator) a 52,291 minutou (odrůda Korneta). Nejnižší hodnotu retenčního času pro PI-2 měla odrůda Satina, konkrétně 54,016 minuty. Horní hranici rozmezí tvořil retenční čas 54,078 minuty u odrůdy Kariera. U PI-2 se vyskytoval pík s nejnižší hodnotou retenčního času u odrůdy Vivaldi, konkrétně v 55,462. minutě. V chromatogramech odrůdy Kariera se nacházel pík s nejvyšší hodnotou retenčního času pro PI – 2, konkrétně 55,567 minuty. Skupina ostatních inhibitorů serinových proteáz (OSPI) vykazovala u jednotlivých odrůd retenční časy mezi 57,149 minuty (odrůda Tomensa) a 57,173 minuty (odrůda Vineta). Retenční časy posledního píku, odpovídajícímu PI – 1, se pohybovaly kolem 59,5 minuty. Nejkratší retenční čas 59,452 minuty byl nalezen u odrůdy Innovator, nejdelší pak s hodnotou 59,634 minuty u odrůdy Kariera.

Celkově lze říci, že odrůdou s nejnižšími hodnotami retenčních časů je odrůda Innovator, u které byly zaznamenány 4 píky s absolutně nejkratšími průměrnými retenčními časy. Naopak za odrůdu s nejvyššími hodnotami retenčních časů lze označit odrůdu Kariera s 5 píky s absolutně nejdelšími retenčními časy.

Odrůda	Retenční čas 1	Retenční čas 2	Retenční čas 3	Retenční čas 4	Retenční čas 5	Retenční čas 6	Retenční čas 7
Amylex	37,145	49,647	52,238	54,054	55,486	57,163	59,605
Delikat	37,075	49,607	52,236	54,022	55,474	57,154	59,587
Ditta	37,085	49,598	52,251	54,035	55,487	57,170	59,537
Fambo	37,125	49,654	52,243	54,061	55,490	57,166	59,541
Futura	37,099	49,666	52,287	54,039	55,483	57,158	59,555
Innovator	37,003	49,454	52,224	54,019	55,472	57,147	59,452
Kariera	37,454	49,694	52,241	54,078	55,567	57,168	59,634
Katka	37,124	49,608	52,266	54,029	55,523	57,160	59,614
Korneta	37,111	49,621	52,291	54,044	55,491	57,159	59,518
Livera	37,136	49,691	52,256	54,026	55,511	57,154	59,504
Marena	37,198	49,638	52,228	54,057	55,506	57,159	59,497
Satina	37,078	49,672	52,264	54,016	55,498	57,164	59,513
Sinora	37,156	49,639	52,248	54,053	55,561	57,157	59,520
Tomensa	37,178	49,624	52,251	54,051	55,474	57,149	59,526
Vineta	37,196	49,650	52,234	54,048	55,483	57,173	59,529
Vivaldi	37,134	49,602	52,242	54,041	55,462	57,152	59,581
Vladan	37,158	49,643	52,249	54,050	55,489	57,151	59,534

Tab. 4 Průměrné retenční časy u jednotlivých odrůd, stanovené metodou Inhibitory 1.

Získané retenční časy byly statisticky vyhodnoceny pomocí metody ANOVA. U jednotlivých skupin PI's byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými odrůdami. Hodnoty testovacích kritérií F a p pro jednotlivé skupiny PI's jsou uvedeny v tabulce 5. Největší rozdíly mezi odrůdami byly zjištěny u retenčních časů pro inhibitor karboxypeptidázy. Nejméně odlišné jsou retenční časy pro skupinu inhibitorů PI – 2. Následný test rozdílů průměrů (LSD test) určil jako odrůdu, která je nejméně podobná ostatním odrůdám u všech skupin PI's.

	Retenční čas 1	Retenční čas 2	Retenční čas 3	Retenční čas 4	Retenční čas 5	Retenční čas 6	Retenční čas 7
F	493,37	25,66	12,84	8,79	35,35	295,38	163,83
p<	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Tab. 5 Zjištěné hodnoty testovacích kritérií metody ANOVA pro retenční časy stanovené metodou Inhibitory 1.

5.2.2. Stanovení retenčních časů metodou Inhibitory 5

Při stanovení retenčních časů metodou Inhibitory 5 došlo k mírnému posunu retenčních časů jednotlivých skupin inhibitorů proteáz ve srovnání s metodou Inhibitory 1. Tento posun je důsledkem pomalejšího nárůstu koncentrace elučního pufru v počáteční fázi metody, a tudíž rovněž celkového prodloužení doby trvání této metody. Retenční časy jednotlivých skupin PI's jsou uvedeny v tabulce 6.

I tato metoda vykazuje pík v počáteční fázi, konkrétně ve 23. minutě, který pravděpodobně označuje skupinu ostatních proteinů ve šťávě hlízy bramboru. Průměrné retenční časy pro jednotlivé skupiny inhibitorů proteáz jsou vypsány v tabulce 5. Retenční časy pro inhibitor karboxypeptidázy se nachází v rozptylu mezi 37,196 minuty (odrůda Vineta) a 37,633 minuty (odrůda Kariera). Nejnižší hodnota průměrného retenčního času pro PAPI byl popsán u odrůdy Innovator, konkrétně 49,873 minuty. Odrůdou s nejvyšší hodnotou průměrného retenčního času pro tuto skupinu inhibitorů představuje odrůda Vivaldi, kde se pík objevoval v průměrném retenčním čase 50,012 minuty. Průměrné retenční časy pro skupinu PKPI se pohybují v rozmezí 52,791 minuty (odrůda Innovator) a 52,832 minuty (odrůda Livera). U píků pro PI- 2 byla zjištěna nejnižší hodnota průměrného retenčního času 54,705 minuty u odrůdy Delikat. Nejdelší průměrný retenční čas 54,759 minuty se poté vyskytoval u odrůdy Kariera. Dolní hranici průměrných retenčních časů pro skupinu inhibitorů PCPI představoval průměrný retenční čas 56,114 minuty, odpovídající odrůdě Katka. Horní hranici poté představuje odrůda Vladan s hodnotou průměrného retenčního času 56,139 minuty. Odrůda Innovator měla s hodnotou 58,997 minuty nejnižší hodnotu průměrného retenčního času pro skupinu ostatních inhibitorů serinových proteáz (OSPI). Odrůdu s nejvyšší hodnotou průměrného retenčního času pro tuto skupinu představovala odrůda Vladan s hodnotou 59,027 minuty. Poslední pík, odpovídající PI-1, měl hodnoty retenčních časů v rozmezí mezi 60,433 minuty u odrůdy Futura a 60,547 minuty u odrůdy Vladan.

Odrůdou s celkově nejnižšími retenčními časy je odrůda Innovator, u níž byly stanoveny nejnižší průměrné retenční časy pro celkem 3 skupiny inhibitorů proteáz. Nejvyšší retenční časy má odrůda Vladan nejvyššími průměrnými retenčními časy pro 3 skupiny inhibitorů proteáz.

Odrůda	Retenční čas 1	Retenční čas 2	Retenční čas 3	Retenční čas 4	Retenční čas 5	Retenční čas 6	Retenční čas 7
Amylex	37,363	49,987	52,823	54,743	56,125	59,012	60,507
Delikat	37,267	49,995	52,811	54,705	56,117	59,006	60,523
Ditta	37,294	49,876	52,804	54,724	56,126	59,016	60,496
Fambo	37,304	49,881	52,812	54,747	56,128	59,019	60,487
Futura	37,309	49,913	52,819	54,768	56,137	59,024	60,433
Innovator	37,214	49,873	52,791	54,748	56,119	58,997	60,517
Kariera	37,633	49,917	52,826	54,759	56,127	59,009	60,521
Katka	37,346	49,921	52,823	54,742	56,114	59,014	60,514
Korneta	37,307	49,934	52,809	54,753	56,121	59,01	60,512
Livera	37,324	50,007	52,832	54,749	56,118	59,004	60,497
Marena	37,395	49,963	52,83	54,756	56,124	59,013	60,493
Satina	37,276	49,899	52,822	54,729	56,113	58,999	60,514
Sinora	37,362	49,941	52,814	54,749	56,129	59,019	60,501
Tomensa	37,385	49,983	52,82	54,752	56,136	59,024	60,503
Vineta	37,196	49,977	52,817	54,743	56,13	59,018	60,521
Vivaldi	37,339	50,012	52,808	54,746	56,132	59,02	60,519
Vladan	37,347	49,988	52,815	54,757	56,139	59,027	60,547

Tab. 6 Průměrné retenční časy u jednotlivých odrůd , stanovené metodou Inhibitory 5.

Po vyhodnocení získaných retenčních časů pomocí metody ANOVA byly zjištěny statisticky významné rozdíly v retenčních časech jednotlivých skupin PI's mezi sledovanými odrůdami. V tabulce 7 jsou uvedeny hodnoty testovacích kritérií F a p pro jednotlivé skupiny PI's. Největší rozdíly v retenčních časech se vyskytují v případě retenčního času skupinu „ostatních inhibitorů serinových proteáz (OSPI)“. Skupinou

inhibitorů, ve které byly zjištěny nejmenší rozdíly mezi jednotlivými odrůdami, je skupina inhibitorů Kunitzova typu (PKPI). LSD test stanovil i v tomto případě nejvíce odlišnou odrůdou odrůdu Kariera.

	Retenční čas 1	Retenční čas 2	Retenční čas 3	Retenční čas 4	Retenční čas 5	Retenční čas 6	Retenční čas 7
F	66,78	29,64	18,30	26,87	23,97	194,34	142,65
p<	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Tab. 7 Zjištěné hodnoty testovacích kritérií metody ANOVA pro retenční časy stanovené pomocí metody Inhibitory 5.

5.2.3. Procentický podíl jednotlivých skupin inhibitorů proteáz u metody Inhibitory 1

Nejvyšší procentické zastoupení mezi inhibitory ve šťávě z hlízy bramboru má inhibitor PI-2. Tento podíl byl vypočten na 44 %. Nejnižší podíl PI-2 mezi inhibitory proteáz byl nalezen u odrůdy Satina, která obsahuje pouze 43,989 % PI-2. Odrůdou s nejvyšším zastoupením PI-2 je odrůda Vladan se 44,602% podílem PI-2. Druhou nejpočetnější skupinou PI's představuje skupina inhibitorů skupiny PCPI. Průměrný podíl této skupiny mezi PI's se pohybuje kolem 22 %. Nejvyšší podíl lze nalézt u odrůdy Katka, která obsahuje 22,909 % PCPI mezi PI's ve šťávě z jejích hlíz. Na opačném konci stojí odrůda Fambo, kde skupina PCPI zaujímá 22,348 % ze všech PI's. Třetí nejpočetnější skupinu PI's tvoří PKPI. Analýzy prokázaly přibližně 12% podíl této skupiny na celkovém množství PI's v šťávě z hlíz bramboru. Dolní hranice obsahu PKPI je 12,097 %, která byla nalezena u odrůdy Livera. Horní hranici pak tvoří odrůda Katka s 12,648% podílem PKPI. Poslední skupinou PI's, překračující 10% podíl, je skupina PAPI. Zde se rozmezí pohybuje mezi 10,122 % u odrůdy Vladan a 10,567 % u odrůdy Sinora.

Další tři skupiny jsou již pod hranicí 10% podílu z celkového obsahu PI's ve šťávě z hlíz bramboru. Zde nejvyšší podíl zaujímá skupiny PI-1 s obsahem přibližně 4,5 %. Nejnižší obsah 4,216 % byl stanoven u odrůdy Satina, nejvyšší 4,781 % pak u odrůdy Korneta. Podíl skupiny ostatních inhibitorů proteáz (OST) se pohybuje v rozmezí od 3,308 % (odrůda Tomensa) do 4,956 % odrůda Satina. Nejmenší procentický podíl z celkového obsahu PI's ve šťávě bramboru lze přisoudit inhibitoru PCI. Tento inhibitor zaujímá přibližně 1,5% podíl. Nejmenší podíl PCI je u odrůdy Vladan, konkrétně 1,02%.

Odrůda Delikat s 1,781% podílem PCI představuje odrůdu s nejvyšším podílem PCI mezi námi vybranými odrůdami.

Odrůda	PI-2	PCPI	PKPI	PAPI	PI-1	PCI	OSPI
Amylex	44,259	22,696	12,214	10,421	4,601	1,62	3,9
Delikat	44,215	22,755	12,138	10,351	4,597	1,781	4,1
Ditta	44,156	22,863	12,361	10,416	4,416	1,694	3,956
Fambo	44,432	22,348	12,512	10,419	4,493	1,725	3,859
Futura	44,268	22,659	12,243	10,394	4,591	1,596	4,183
Innovator	44,369	22,781	12,313	10,369	4,615	1,449	4,096
Kariera	44,598	22,875	12,569	10,256	4,429	1,366	3,7
Katka	44,478	22,909	12,648	10,241	4,329	1,2	4,159
Korneta	44,059	22,816	12,149	10,348	4,781	1,364	4,215
Livera	44,136	22,791	12,097	10,487	4,533	1,348	4,448
Marena	44,016	22,843	12,233	10,516	4,481	1,577	4,207
Satina	43,989	22,568	12,151	10,464	4,216	1,384	4,956
Sinora	44,223	22,769	12,306	10,567	4,319	1,121	4,652
Tomensa	44,75	22,815	12,297	10,396	4,42	1,563	3,308
Vineta	44,319	22,639	12,438	10,51	4,351	1,6	4,008
Vivaldi	44,681	22,865	12,248	10,453	4,372	1,597	3,586
Vladan	44,602	22,817	12,625	10,122	4,381	1,02	4,21

Tab. 8 Procentické podíly jednotlivých skupin PI's u vybraných odrůd bramboru, stanovené pomocí metody Inhibitory 1

Analýza zjištěných procentických podílů jednotlivých skupin PI's metodou ANOVA odhalila statisticky významné rozdíly mezi sledovanými odrůdami. Zjištěné hodnoty testovacích kritérií F a p pro jednotlivé skupiny PI's jsou uvedeny v tabulce 9. Nejvíce rozdílů mezi jednotlivými odrůdami se vyskytuje ve skupině inhibitorů potato inhibitor II (PI – 2). Nejnížší rozdíly mezi sledovanými odrůdami se vyskytují u procentických obsahů inhibitoru karboxypeptidázy. LSD testem byla jako nejodlišnější odrůda stanovena odrůda Katka.

	PI - 2	PCPI	PKPI	PAPI	PI -1	PCI	OSPI
F	2362,32	801,00	102,99	101,76	269,98	26,00	1357,66
p<	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Tab. 9 Zjištěné hodnoty testovacích kritérií metody ANOVA pro procentické obsahy jednotlivých skupin PI's stanovené pomocí metody Inhibitory 1.

5.2.4. Procentický podíl jednotlivých skupin inhibitorů proteáz u metody Inhibitory 5

Tato metoda potvrdila pořadí jednotlivých skupin v závislosti na jejich procentickém zastoupení. Současně byly ověřeny procentické podíly těchto skupin na celkovém obsahu PI's ve šťávě z hlízy bramboru. V případě konkrétních procentických podílů u jednotlivých skupin byly zaznamenány malé rozdíly oproti procentickým podílům zjištěným metodou Inhibitory 1. Tyto rozdíly mohou být způsobeny horším odečtem chromatografů pomocí softwaru. U PI- 2 byl stanoven nejvyšší podíl tohoto inhibitoru u odrůdy Tomensa (44,658 %), nejnižší pak u odrůdy Satina (44,016 %). U skupiny PCPI byl nejvyšší podíl nalezen opět u odrůdy Tomensa, konkrétně se jednalo o 22,912% podíl. Odrůdou s nejnižším podílem PCPI je odrůda Livera s podílem 22,35 %. Jako odrůda s nejvyšším podílem PKPI byla metodou Inhibitory 5 zjištěna odrůda Kariera s 12,607% podílem. Nejnižší podíl PKPI byl zaznamenán u odrůdy Korneta s 12,013% podílem PKPI. Další skupinu PI's tvoří skupina PAPI. Tato skupina je nejméně zastoupena u odrůdy Vladan, u které byl spočten pouze 10,098% podíl PAPI. Nejvyšší, tj. 10,641% podíl PAPI, byl spočten u odrůdy Marena. Podíl PI-1 se pohybuje mezi 4,163 % u odrůdy Satina po 4,79 % u odrůdy Korneta. V případě skupiny ostatních inhibitorů (OST) představuje nejnižší podíl 3,208 % (odrůda Tomensa). Na opačném konci stojí odrůda Livera se 4,623% podílem ostatních inhibitorů proteáz na celkovém podílu PI's ve šťávě z hlízy bramboru. Inhibitorem proteáz s nejnižším podílem je opět PCI. Zde se pohybuje v rozmezí mezi 1,098 % (odrůda Sinora) po 1,609 % (odrůda Delikat).

Odrůda	PI-2	PCPI	PKPI	PAPI	PI-1	PCI	OSPI
Amylex	44,267	22,546	12,325	10,561	4,565	1,515	4,01
Delikat	44,286	22,613	12,1	10,463	4,63	1,625	4,026
Ditta	44,241	22,891	12,519	10,537	4,453	1,758	3,597
Fambo	44,383	22,491	12,492	10,538	4,538	1,7	3,622
Futura	44,286	22,548	12,395	10,467	4,421	1,514	4,2
Innovator	44,352	22,507	12,465	10,416	4,628	1,467	4,03
Kariera	44,486	22,837	12,607	10,312	4,536	1,378	3,741
Katka	44,456	22,691	12,592	10,269	4,452	1,263	4,081
Korneta	44,169	22,638	12,013	10,517	4,79	1,432	4,291
Livera	44,201	22,35	12,151	10,491	4,562	1,357	4,623
Marena	44,259	22,296	12,305	10,641	4,503	1,6	4,29
Satina	44,016	22,911	12,152	10,508	4,163	1,406	4,8
Sinora	44,264	22,843	12,46	10,603	4,264	1,098	4,351
Tomensa	44,658	22,912	12,364	10,412	4,457	1,609	3,208
Vineta	44,325	22,649	12,523	10,493	4,386	1,587	3,891
Vivaldi	44,586	22,859	12,211	10,537	4,381	1,602	3,615
Vladan	44,524	22,591	12,564	10,098	4,418	1,107	4,59

Tab. 10 Procentické podíly jednotlivých skupin PI's u vybraných odrůd bramboru, stanovené pomocí metody Inhibitory 5.

Metodou ANOVA byla stanovena testovací kritéria F a p pro procentické podíly jednotlivých skupin PI's u sledovaných odrůd (Tab. 11). I v tomto případě byly zjištěny statisticky významné rozdíly v procentických obsazích jednotlivých skupin PI's mezi sledovanými odrůdami. Podle těchto kritérií je skupinou inhibitorů s největšími meziodrůdovými rozdíly opět skupina inhibitorů PI – 2. Nejmenší rozdíly byly potom stanoveny u skupiny PI – 1. LSD test stanovil odrůdu Kariera jako odrůdu s největšími rozdíly.

	PI - 2	PCPI	PKPI	PAPI	PI - 1	PCI	OSPI
F	3775,35	1072,42	58,83	125,19	26,17	35,30	258,61
p<	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Tab. 11 Zjištěné hodnoty testovacích kritérií metody ANOVA pro procentické obsahy jednotlivých skupin PI's stanovené pomocí metody Inhibitory 5.

Po provedení párového t-testu nebyly v případě procentických obsahů jednotlivých skupin PI's zjištěny žádné statistické rozdíly mezi oběma použitými metodami. V tabulce 12 jsou uvedeny hodnoty testovacích kritérií pro jednotlivé skupiny PI's. Těmito testovacími kritérii jsou u dané skupiny PI's průměrný obsah x_1 , stanovený metodou Inhibitory 1, a průměrný obsah x_2 , stanovený metodou Inhibitory 5. Dalšími testovacími kritérii jsou hodnoty t a hladina významnosti p.

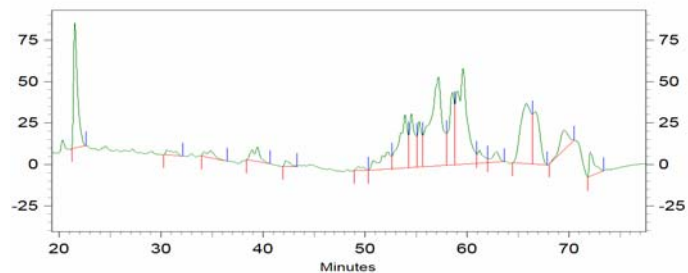
	PI - 2	PCPI	PKPI	PAPI	PI -1	PCI	OSPI
x_1	44,33	22,75	12,33	10,40	4,47	1,47	4,09
x_2	44,34	22,66	12,37	10,46	4,48	1,47	4,06
t	-0,18	1,67	-0,66	-1,59	-0,27	-0,01	0,25
p	0,86	0,11	0,51	0,12	0,79	0,99	0,81

Tab. 12 Zjištěné hodnoty testovacích kritérií párového t – testu.

5.3. Vyhodnocení vhodnosti vybraných metod HPLC pro detekci a identifikaci PI's s využitím průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru

Jako poslední byla provedena analýza průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru. Cílem této části dizertační práce bylo ověřit, zda by bylo možné použít metodu HPLC pro získávání jednotlivých skupin inhibitorů proteáz ze směsi bílkovin, která zůstane ve šťávě po průmyslovém vytěžení škrobu.

Jako první byla vyzkoušena metoda Inhibitory 1. Tato metoda dokázala dobře detekovat patatin. Důkazem je přítomnost píku ve 22. minutě. Tento pík je dobře oddělen od ostatních, tudíž umožňuje dobrou izolaci patatinu ze vzorku (viz chromatogram č. 5). Přítomnost PI byla detekována v oblasti retenčních časů mezi 30. a 70. minutou. Tato oblast pokrývá všechny retenční časy pro jednotlivé skupiny inhibitorů proteáz. Drobný problém představuje mírný překryv vrcholů píků v oblasti mezi 50. až 70. minutou. Tento překryv je způsoben tím, že při získávání škrobu průmyslovou metodou dochází k pomíchání jednotlivých odrůd brambor. Výsledná šťáva tedy obsahuje směs PI's pocházející z různých zdrojů. Ten problém však nemá vliv na možnost odchyty frakcí, obsahujících jednotlivé inhibitory, jejich následnou analýzu a purifikaci.



Chromatogram č. 5: Detekce vzorku bramborové šťávy metodou Inhibitory 1. Ve 22. minutě je pík patatinu. Oblast od 50. do 70. minuty odpovídá oblasti inhibitorů proteáz.

Metoda Inhibitory 5 vykazoval rovněž dobrou detekci PI's v průmyslově získané šťávě z hlíz bramboru. Problém zde představovaly mírně zvýšené překryvy píků pro jednotlivé skupiny PI's. Tato skutečnost zhoršuje možnost čisté izolace jednotlivých skupin PI's. Problém by pravděpodobně bylo možno odstranit prodloužením eluční doby. V tomto případě však doba 1 analýzy přesáhne 2 hodiny, což je maximální doba, po kterou lze udržet kolonu dostatečně čistou. Po uplynutí této doby by mohlo docházet k problémům se znečištěním následujících vzorků.

Celkově lze říci, že metody HPLC je vhodná k využití pro detekci a identifikaci PI's v průmyslově získané šťávě z hlíz bramboru. Při použití metody Inhibitory 1 je možné izolovat jednotlivé skupiny PI's.

6. Diskuze

Nejběžnější technika, která je používána v současné době pro detekci inhibitorů proteáz (PI's) v hlízách bramboru, je založena na principu dvojrozměrné gelové elektroforézy (2-DE). Collinsová et Jiráček (2005) však přiznávají nedostatečnou citlivost této metody i metod, na ní založených. Právě nedostatečná citlivost způsobuje, že jsou tyto metody nevhodné pro analýzu PI's ze šťávy z hlíz bramboru. Metody 2-DE neumožňuje dostatečně odlišit jednotlivé skupiny PI's, pokud mají velmi podobnou molekulovou hmotnost. Z tohoto důvodu bylo využito možnosti použít pro detekci PI's metod HPLC. Vzhledem ke schopnosti PI's vázat se na specifické látky, byla jako nejvhodnější zvolena modifikace HPLC na reverzní fázi (reverse-phase HPLC, RP – HPLC). Bylo nutno ověřit vhodnost vybraných metod pro detekci a identifikaci PI's.

6.1. Vhodnost jednotlivých metod HPLC pro detekci a identifikaci PI's ve šťávě z hlíz bramboru

V odborné literatuře byly nalezeny celkem 3 metody pro RP – HPLC, které by mohly být použity pro stanovení inhibitorů proteáz (PI's) ve šťávě z hlíz bramboru. Úpravami jedné z těchto metod byly vytvořeny další 2 metody.

První metoda, nazvaná Inhibitory 1, byla vytvořena na základě metody, kterou popisují Regente et Canal (2000). Ti tuto metodu využili k detekci lipid-transferového proteinu Ha-AP10, který se vyskytuje v semenech slunečnice. Vzhledem k některým podobným vlastnostem, jako např. složení podjednotek či antifungální účinek, byla tato práce vybrána jako vhodná pro využití k detekci PI's. Původní popisovaná metoda však byla kvůli vyšší molekulové hmotnosti PI's upravena prodloužením doby vymývání a pozvolnějším nárůstem gradientu elučního pufu. Po této úpravě byla shledána vhodnou k využití pro detekci PI's.

Další metoda, Inhibitory 2, vznikla na základě práce Konarev *et al.* (2000). Tato metoda byla primárně určena pro izolaci PI's ze semen slunečnice. PI's obsažené v těchto semenech (*Helianthus annuus L.*) se však svým složením odlišují od PI's ze šťávy v hlízách bramboru. To zapříčinilo, že nebylo možné detekovat standardy. Přistoupili jsme tedy k prodloužení celkové doby eluce, neboť jsme předpokládali, že největší problém bude

způsoben odlišnou molekulovou hmotností a odlišným pI. Bohužel tato modifikace nepřinesla očekávané výsledky. Metodu Inhibitory 2 jsme tedy museli z dalších analýz vyloučit.

Poslední metodou, která byla odvozena přímo z odborné literatury, je metoda Inhibitory 4. Původní práce Bronsom *et al.* (2003) byla zaměřena přímo na analýzu inhibitoru karboxypeptidázy ze šťávy z hlíz bramboru. Proto bylo možné očekávat, že tato metody bude vhodná i pro detekci ostatních skupin PI's, pocházejících z téhož zdroje. Bohužel se však tyto předpoklady ukázaly jako neopodstatněné. Původní metodou se dařila detekce inhibitoru karboxypeptidázy. Přistoupili jsem tedy k modifikaci. Původní metoda Bronsoma *et al.* (2003) spočívala v použití 20 – 40 % podílu acetonitrilu v 0,1% TFA. Ke zvyšování podílu acetonitrilu v TFA mělo docházet postupně, a to s vrcholem ve 30. minutě. Vzhledem k tomu, že inhibitor karboxypeptidázy má nejmenší molekulovou hmotnost, bylo nutné prodloužit dobu nárůstu podílu acetonitrilu v 0,1% TFA, společně s prodloužením doby eluce. Ani po této modifikaci se však nepodařilo dosáhnout jednoznačné detekce standardů. Proto byla i tato metoda vyloučena z dalších analýz.

Další 2 metody, Inhibitory 3 a Inhibitory 5, vznikly modifikacemi metody Inhibitory 1. U obou metod byly prodlouženy doby eluce a změněny nárůsty elučních pufrů. Metoda Inhibitory 3 měla problémy s detekcí standardu Carboxypeptidase Inhibitor (Merck). Zde by mohlo být pravděpodobnou příčinou příliš pozdní počátek přimíchávání acetonitrilu do eluční směsi. Regente et Canal (2000) zmiňují ve své práci možné problémy s touto metodikou při použití pro inhibitory s nižší molekulovou hmotností.

Rozdíl mezi metodou Inhibitory 3 a Inhibitory 5 spočívá v tom, že u metody Inhibitory 5 se acetonitril do eluční směsi přimíchává již od 10. minuty. Tím se předejde problémům s detekcí inhibitorů proteáz o nižší molekulové hmotnosti, které jsou popisovány v práci Regente et Canal (2000). Pomalejší nárůst podílu acetonitrilu ve směsi ve srovnání s metodou Inhibitory 1 má za následek prodloužení retenčních časů jednotlivých standardů.

Celkově lze říci, že nejvíce se osvědčily metody, které jsou založené na práci Regente et Canal (2000). Tato skutečnost je s podivem, uvědomíme – li si, že autoři této studie vyvinuli tuto metodu původně pro zcela jiný typ látek. Vysvětlení této skutečnosti může spočívat ve faktu, že PI's i Ha-AP10 mají afinitu k podobnému druhu látek. Další příčinu lze spatřovat v podobných pI obou typů látek.

6.2. Chromatografické profily vybraných odrůd bramboru

Pomocí vybraných metod RP – HPLC, Inhibitory 1 a Inhibitory 5, byly získány chromatografické profily 17 odrůd bramboru. Tyto profily zahrnují jednak retenční časy a dále procentický obsah jednotlivých skupin PI's u dané odrůdy. Vzhledem k tomu, že dosud žádná práce nepoužila metody HPLC pro stanovení kompletních chromatografických profilů jednotlivých odrůd, je možné porovnávat námi zjištěné výsledky pouze s výsledky získanými jinými metodami.

6.2.1. Retenční časy jednotlivých skupin PI's

I když obě použité metody pocházejí ze stejného základu, kterým je metodika dle Regente et Canal (2000), odlišným prodloužením lineárních gradientů obou metod došlo k tomu, že se zjištěné retenční časy jednotlivých skupin PI's u jednotlivých metod liší. Tato odchylka je v průměru 0,6 minuty. Dle Corrana (1998) má každé prodloužení eluční doby o 1 minutu za následek změnu eluční doby o přibližně 2 sekundy. Bereme – li v úvahu dobu od počátku vymývání do doby, kdy začne promyv kolony směsí 4 % methanolu a 96 % Milipore H₂O, došlo u metody Inhibitory 5 k prodloužení této doby o 15 minut oproti metodě Inhibitory 1. Námi zjištěné výsledky tedy korespondují s teoretickým předpokladem změny eluční doby, který je 0,5 minuty.

Rozdíly mezi retenčními časy jednotlivých skupin PI's u jednotlivých odrůd jsou statisticky významné. Největší rozdíly v retenčních časech jsou v případě metody Inhibitory 1 u retenčních časů pro inhibitor karboxypeptidázy. Toto zjištění podporují i výsledky dosažené při testování této metody pomocí komerčních standardů. Zde se rovněž vyskytovaly dva píky pro standard Carboxypeptidase Inhibitor. Je možné, že u jednotlivých odrůd dochází ke kolísání retenčního času v rozmezí mezi těmito původně zjištěnými retenčními časy. Důvodem může být nízká molekulová hmotnost v kombinaci s vyšším počtem cysteinových podjednotek. To může mít za následek nedostatečné navázání na sorbent kolony a v některých případech i poněkud rychlejší vymývání z kolony. U metody Inhibitory 5 určily výsledky ANOVY jako skupinu s nejvyšším rozdílem v retenčních časech u jednotlivých odrůd skupinu „ostatních inhibitorů serinových proteáz“ (OSPI). Tato skupina je značně heterogenní. Retenční čas se tedy může lišit v závislosti na převažujícím inhibitoru.

LSD test určil odrůdu, která je nejméně podobná ostatním. Touto odrůdou je u obou použitých metod odrůda Kariera. Podíváme – li se na dosažené retenční časy, lze říci, že právě PI's této odrůdy dosahují nejdelších retenčních časů a jsou tedy pravděpodobně odlišné od PI's u dalších odrůd. Důvody lze spatřovat v příbuzenském vztahu mezi jednotlivými odrůdami. Pokud budeme sledovat rodokmeny jednotlivých odrůd (viz příloha), lze říci, že téměř všechny odrůdy jsou spolu příbuzensky spojeny. Kromě odrůdy Kariera lze u všech ostatních 16 odrůd v rodokmenu nalézt podobné předky. Nejčastějším společným předkem je odrůda Saskia, která se vyskytuje u celkem 7 odrůd: Delikat, Fambo, Innovator, Korneta, Vineta, Vivaldi a Vladan. U odrůdy Innovator se Saskia vyskytuje celkem 2x. V obou případech se nalézá v „mateřské“ části rodokmenu. Lze se domnívat, že se odrůda Saskia podílí na zkracování retenčních časů PI's. Tuto domněnku poněkud potvrzuje skutečnost, že právě odrůda Innovator s dvojnásobným zastoupením odrůdy Saskia v rodokmenu vykazovala celkově nejnižší hodnoty retenčních časů u obou použitých metod HPLC. Příčinou může být lehce odlišné zastoupení jednotlivých izoform daných skupin PI's, které se vyskytují u odrůdy Saskia. Tuto domněnku lze ověřit získáním chromatografického profilu odrůdy Saskia a jeho porovnáním s odrůdami příbuznými. Protože však nebyla k dispozici, nebylo možné provést potřebné analýzy.

6.2.2. Procentické podíly jednotlivých skupin PI's

Pomocí vyhodnocovacího programu ChromQuest 3.0 (Thermo Separations Products) byly stanoveny procentické podíly jednotlivých skupin PI's na celkovém obsahu PI's. Hodnoty uvedené v kapitole Výsledky vycházejí ze stavu, kdy byl za základ výpočtu vzat 100% obsah PI's v analyzovaném vzorku. Tento stav byl dosažen vyloučením píků pro patatin z výpočtu. V literatuře je podíl PI's na celkovém obsahu rozpustných hlízových proteinů odhadován mezi 30 (Melville et Ryan, 1972) a 50 % u odrůdy Elkana (Pouvreau *et al.*, 2001; Pouvreau, 2004). Procentický podíl všech skupin PI's byl dosud zkoumán pouze u jediné odrůdy, a to odrůdy Elkana. Touto prací se zabýval Pouvreau *et al.* (2001), který své poznatky shrnul později v práci z roku 2004.

Pro porovnání procentických podílů je tedy nutno nejprve námi zjištěné výsledky přepočítat na hodnotu odpovídající skutečnému podílu PI's v celkovém obsahu rozpustných hlízových proteinů. Vezmeme za základ práci Pouvreau *et al.* (2001) a přepočteme zjištěné procentické podíly pro 50% podíl PI's na celkovém obsahu

rozpuštěných hlízových proteinů. U metody Inhibitory 1 budou tedy přepočtené průměrné procentické podíly PI's následující: skupina PI – 2 22,163 %, PCPI 11,377 %, PKPI 6,263 %, PAPI 5,198 %, PI – 1 2,233 %, PCI 0,735 % a OSPI 2,045 %. Metoda Inhibitory 5 potom vykazuje následující přepočtené průměrné procentické podíly PI's: PI – 2 22,169 %, PCPI 11,329 %, PKPI 6,183 %, PAPI 5,231 %, PI – 1 2,240 %, PCI 0,736 % a OSPI 2,028%. Pouvreau *et al.* (2001) stanovili podíly PI's na celkovém obsahu rozpuštěných hlízových proteinů u odrůdy Elkana takto: skupina PI – 2 zaujímá přibližně 22,9 %, skupina PCPI 11,9 %, PKPI 3,6 %, PAPI 6,1 %, PI – 1 4,5 %, OSPI 1,5 % a PCI 0,9 %. Naše výsledky se s těmito zjištěnými údaji rozcházejí. U skupin PI – 2, PCPI, PAPI, PI – 1 a PCI jsou námi zjištěné procentické podíly nižší. U skupin PKPI a OSPI naopak vyšší.

Pouvreau *et al.* (2001) ve své práci zmiňuje vlivy, které mohou způsobit rozdíly ve zjištěných podílech proteinu. Mezi tyto vlivy patří způsob přípravy šťávy z hlízy bramboru, dále rozsah vývoje hlízy či loupání brambor. Ryan *et al.* (1976) považuje za podstatný faktor použití rozdílných odrůd. Podle databáze rodokmenů odrůd brambor (<http://www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree/index.htm>) má odrůda Elkana některé společné předky s námi analyzovanými odrůdami (viz příloha). Lze zmínit např. společného předka s odrůdami Amylex, Korneta, Vineta a Vivaldi, kterým je odrůda Aquila. U odrůdy Elkana jsou však mezi předky silně zastoupeny odrůdy Libertas (celkem 4x) a Record (celkem 6x). Tyto odrůdy nejsou přítomny v rodokmenu žádné z námi analyzovaných odrůd. I zde lze tedy spatřovat možnou příčinu odlišných zastoupení jednotlivých skupin PI's u odrůdy Elkana a námi sledovaných odrůd.

V dalších pracích jsou zmiňovány i vlivy metody, která byla použita na stanovení koncentrace PI's. Racusen et Foote (1980) použili metodu dle Kjeldahla. Touto metodou stanovili podíl patatinu jako hlavního rozpustného hlízového proteinu na 20 %. Pouvreau *et al.* (2001) použili aniontovou výměnnou chromatografii a stanovili podíl patatinu na 40 %. Na tomto případě lze vidět, že použitá metoda analýzy může ovlivnit výsledek analýzy podstatným způsobem. Podobný vliv lze očekávat i v tomto případě, kdy byla ve srovnání s pracemi z poslední doby (Križaj *et al.*, 1993; Pouvreau *et al.*, 2001; Pouvreau, 2004) použita sofistikovanější metoda. Mezi oběma použitými metodami Inhibitory 1 a Inhibitory 5 nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Obě metody tedy stanovují velmi podobné procentické obsahy jednotlivých skupin PI's ve sledovaných odrůdách.

I zde lze vysledovat vliv rodokmenu na podíl jednotlivých skupin PI's v rámci sledovaných odrůd. Po provedení LSD testu byly jako nejodlišnější odrůdy stanoveny odrůda Katka (u metody Inhibitory 1) a Kariera (u metody Inhibitory 5). Obě tyto odrůdy mají s ostatními odrůdami nejnížší počet společných předků. Odrůda Katka je spřízněna s odrůdami Fambo, Futura, Korneta a Vivaldi. S těmito odrůdami má však pouze 2 společné předky, a to až v 5. generaci předků. Odrůda Kariera potom nemá žádného společného předka s dalšími sledovanými odrůdami.

Párovým t – testem nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi průměrnými procentickými obsahy jednotlivých skupin PI's, stanovenými metodou Inhibitory 1 a Inhibitory 5. Tato skutečnost naznačuje, že na stanovení procentického podílu nemá vliv použitá metoda HPLC.

6.3. Vyhodnocení vhodnosti jednotlivých metod HPLC pro detekci a identifikaci PI's s využitím průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru

Metoda HPLC nebyla dosud v žádné práci použita jako metoda k detekci PI's z průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru. Metodu HPLC sice využili k detekci inhibitoru karboxypeptidázy u brambor Bronsom *et al.* (2003) a rovněž tak i Křižaj *et al.* (1993) pro analýzu inhibitorů cysteinových proteáz. Ti však pracovali s laboratorně předčištěným roztokem stanovovaného inhibitoru.

Na základě námi získaných výsledků lze odvodit, že detekce, identifikace a izolace jednotlivých skupin PI's je možná rovnou ze průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru bez předchozího přečišťování. Další využití tato získaných PI's je však značně limitována použitým elučním pufrem. V tomto případě byla dle prací Regente et Canal (2000) využita směs acetonitrilu a 0,1% kyseliny trifluorooctové (TFA). Tato směs je značně toxická. Pokud se zaměříme na patatin, jehož izolace však nebyla cílem této práce, lze říci, že metoda HPLC umožňuje rovněž dostatečnou možnost detekce a izolace patatinu z průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru.

Porovnáme – li mnou využité metody HPLC s metodami běžně užívanými pro detekci proteinů z hlíz bramboru, lze říci, že v tomto případě se nevyskytují problémy, které jsou spjaty s běžně používanými metodami na bázi dvoudimenzionální polyakrylamidové gelové elektroforézy (2DE – PAGE). Collinsová et Jiráček (2004) zmiňují především denaturaci proteinů, analyzovaných touto metodou. Metoda HPLC s sebou toto omezení

nepřináší. Během procesu analýzy nedochází ke konečnému sloučení s jinou látkou a PI's si zachovávají své původní vlastnosti. Další zmiňovanou nevýhodou představuje nedostatečná schopnost odlišit jednotlivé skupiny proteinů (Kovářová, 2005). Zde je příčinou skutečnost, že na odečtu z gelu se zvýšenou měrou podílí lidský faktor. Automatizovaný proces odečtu chromatogramů snižuje chybu lidského faktoru na minimum. Nelze opomíjet ani skutečnost, že pouhá metoda 2DE-PAGE neumožňuje kvantifikaci jednotlivých skupin PI's. Pro tyto účely je nutno podrobit vzorek dalšímu zkoumání, např. pomocí „Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight“ MS (MALDI-TOF MS) a „Electrospray – ionization“ MS (ES – MS) (Šedo et Havel, 2003; Kovářová, 2005). I tento nepříjemný jev v případě použití metody HPLC odpadá, neboť vyhodnocovací program dokáže na základě svého nastavení provést kvantifikaci PI's pomocí porovnání se standardem. V případě, že standard není dostupný, lze vyjádřit alespoň procentický podíl jednotlivých detekovaných látek.

7. Závěr

Inhibitory proteáz (PI's) jsou nesmírně širokou skupinou proteinů, vyskytující se v rostlinách, živočiších i mikroorganismech. Z hlediska klasifikace představují značně heterogenní skupinu. PI's mají jedno z nejuniverzálnějších použití. Působnost PI's zaujímá velmi široký okruh od zásobních proteinů k složkám obranného mechanismu rostlin. PI's z hlízy bramboru nejsou výjimkou. Dva nejčastěji zmiňované PI's (PI-1 a PI-2) jsou studovány ve spojitosti s jejich zapojením do léčby celé řady chorob a s jejich rolí v obranném mechanismu rostlin, obzvláště v obraně vůči hmyzím škůdcům.

Hlízy bramboru představují snadno dostupný zdroj PI's. Protože však nejsou inhibitory proteáz dostatečně termostabilní, dochází k jejich degradaci v průběhu vaření. Existuje však proces, při kterém nejsou PI's degradovány. Tímto procesem je získávání škrobu ve škrobárenském průmyslu. Bylo by tedy třeba najít vhodnou metodu pro izolaci PI's ze šťávy z hlíz bramboru, které vznikají při procesu získávání škrobu. Současně by bylo výhodné, aby tato metoda současně dokázala jednotlivé PI's detekovat a umožňovala jejich vzájemné oddělení.

Až dosud se k izolaci a detekci proteinů z hlíz bramboru využívalo nejčastěji metod, založených na dvourozměrné gelové elektroforéze (2-DE). Tato metoda ani metody z ní vycházející však nemají dostatečnou citlivost. Druhým možným přístupem je využití metod, založených na chromatografii. Z této skupiny se v současné době dostávají metody, které jsou založeny na automatizaci celého postupu. Jednou z těchto metod je i High Performace Liquid Chromatography (HPLC). Dosud nebyla vytvořena žádná ucelená práce, která by se pokusila ověřit možnost použití této metody pro detekci a identifikaci PI's ze šťávy z hlíz bramboru. Navíc se touto metodou podařilo získat chromatografické profily 17 vybraných odrůd bramboru.

7.1. Vyhodnocení vhodnosti jednotlivých metod HPLC k identifikaci a detekci inhibitorů proteáz z hlíz bramboru

Bylo celkem vytvořeno 5 různých metod HPLC, potenciálně vhodných k identifikaci a detekci inhibitorů proteáz (PI's) z hlíz bramboru. Z toho metody Inhibitory 1, Inhibitory 2 a Inhibitory 4 vycházely z původních vědeckých prací, zaměřených na detekci inhibitorů

proteáz či jim příbuzných látek. Metody Inhibitory 3 a Inhibitory 5 vznikly úpravou původní metody Inhibitory 1.

Všechny metody byly podrobeny testu pomocí komerčních standardů Chymotrypsin Inhibitor I, Potato (Merck) a Carboxypeptidase Inhibitor, Potato (Merck). Na základě získaných chromatografů došlo k vyhodnocení vhodnosti jednotlivých metod pro použití k identifikaci a detekci PI's z hlíz bramboru.

Jako zcela nevhodné byly shledány metody Inhibitory 2 a Inhibitory 3. U metody Inhibitory 2 bylo důvodem značně vysoké rušivé pozadí. Rovněž se zde vyskytl problém z identifikací standardu Carboxypeptidase Inhibitor, Potato. Metoda Inhibitory 2 se chovala, jakoby nebyla analyzována čistá látka, ale směs látek. Důvodem může být špatné nastavení lineárního gradientu pro eluci inhibitoru karboxypeptidázy.

Metoda Inhibitory 3 vykazovala podobné potíže jako Metoda Inhibitory 2, a to zejména v případě detekce standardu Carboxypeptidase Inhibitor, Potato. Další problém představovalo zdvojení píků v případě standardu Chymotrypsin Inhibitor I, Potato. Toto zdvojení neumožňovalo přesný odečet retenčního času a vyloučilo tedy metodu Inhibitory 3 z dalšího použití.

V případě metody Inhibitory 4 docházelo k potížím při detekci standardu Chymotrypsin Inhibitor I, Potato. Zde je pravděpodobnou příčinou skutečnost, že tato metoda byla primárně určena pro detekci inhibitoru karboxypeptidázy. To může mít za následek neschopnost metody detekovat PI's s vyšší molekulovou hmotností.

Jako vhodné metody byly tedy vybrány metody Inhibitory 1 a Inhibitory 5. Tyto metody nevykazovaly žádné výrazné problémy při detekci použitých standardů. Retenční časy šly vždy dobře odečíst a nevyskytovaly se ani potíže s rušivým pozadím.

7.2. Získání chromatografických profilů vybraných odrůd bramboru.

Pomocí metod Inhibitory 1 a Inhibitory 5 byly získány chromatografické profily 17 vybraných odrůd bramboru. Vybrány byly odrůdy: Amylex, Delikat, Ditta, Fambo, Futura, Innovator, Kariera, Katka, Korneta, Livera, Marena, Satina, Sinora, Tomensa, Vineta, Vivaldi a Vladan. U těchto odrůd byly stanoveny retenční časy a procentické zastoupení jednotlivých skupin PI's ve šťávě z hlíz bramboru.

Jako první byla použita metoda Inhibitory 1. Retenční časy všech 7 skupin PI's byly dobře odečitatelné. Retenční časy jednotlivých skupin PI's se mezi jednotlivými odrůdami příliš nelišily. Rozdíly zde byly v řádu 0,5 minuty. Tento posun lze vysvětlit mírně

odlišným složením jednotlivých skupin PI's v rámci jednotlivých odrůd. Celkově lze říci, že odrůdou s nejnižšími hodnotami retenčních časů u metody Inhibitory 1 je odrůda Innovator, u které byly zaznamenány 4 píky s absolutně nejnižšími hodnotami průměrných retenčních časů. Naopak za odrůdu s nejvyššími hodnotami retenčních časů pro tuto metodu lze označit odrůdu Kariera s 5 píky s absolutně nejvyššími hodnotami retenčních časů.

Metoda Inhibitory 5 vykazovala celkový posun v hodnotách retenčních časů oproti metodě Inhibitory 1. Tento posun lze zdůvodnit prodloužením lineárního gradientu eluce oproti metodě Inhibitory 1. Rozmezí jednotlivých retenčních časů mezi odrůdami opět nepřekročilo 0,5 minuty. I u této metody byla odrůdou s celkově nejkratšími retenčními časy odrůda Innovator, u níž byly stanoveny nejkratší průměrné retenční časy pro celkem 3 skupiny PI's. Nejděší retenční časy má odrůda Vladan. Tato odrůda měla nejdelší průměrné retenční časy pro 3 skupiny PI's.

Druhou část chromatografických profilů představuje procentické zastoupení jednotlivých skupin PI's u jednotlivých odrůd. Zde nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi hodnotami, zjištěnými metodou Inhibitory 1, a hodnotami, zjištěnými metodou Inhibitory 5.

U obou metod byly zjištěny podobná procentická zastoupení jednotlivých skupin PI's u daných odrůd. Skupinou PI's s nejvyšším zastoupením je skupina PI -2 se 44 % z celkového obsahu PI's. Druhou nejpočetnější skupinu představuje skupina Druhou nejpočetnější skupinou PI's představuje skupina inhibitorů PCPI. Průměrný podíl této skupiny mezi PI's se pohybuje kolem 22 %. Třetí nejpočetnější skupinu PI's tvoří PKPI. Analýzy prokázaly přibližně 12% podíl této skupiny na celkovém množství PI's v šťávě z hlíz bramboru. Poslední skupinou PI's, překračující 10% podíl, je skupina PAPI. Zde se rozmezí pohybuje mezi 10,122 % u odrůdy Vladan a 10,567 % u odrůdy Sinora.

Další tři skupiny jsou již pod hranicí 10% podílu z celkového obsahu PI's ve šťávě z hlíz bramboru. Zde nejvyšší podíl zaujímá skupiny PI-1 s obsahem přibližně 4,5 %. Podíl skupiny ostatních serinových inhibitorů proteáz (OSPI) se pohybuje v rozmezí od 3,308 % (odrůda Tomensa) do 4,956 % (odrůda Satina). Nejmenší procentický podíl z celkového obsahu PI's ve šťávě bramboru lze přisoudit inhibitoru PCI. Tento inhibitor zaujímá přibližně 1,5% podíl.

Zjištěné procentické podíly odpovídají procentickým podílům PI's, které jsou popsány v práci Pouvreau (2001). V této práci jsou při 50% podílu PI's mezi hlízovými proteiny

odhadovány podíly PI- 2 na 22 % a PCPI na 12 %. Vezmeme-li v úvahu, že byl za základ výpočtu brán 100 % podíl PI's, jsou tyto výsledky ve vzájemné shodě.

7.3. Vyhodnocení vhodnosti jednotlivých metod HPLC pro detekci a identifikaci PI's s využitím průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru

Jako poslední byla provedena analýza průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru. Cílem této části dizertační práce bylo ověřit, zda by bylo možné použít metodu HPLC pro získávání jednotlivých skupin inhibitorů proteáz ze směsi bílkovin, která zůstane ve šťávě po průmyslovém vytěžení škrobu.

Metoda Inhibitory 1 je vhodná pro detekci patatinu. Důkazem je přítomnost píku píku ve 22. minutě. Tento pík je dobře oddělen od ostatních, tudíž umožňuje dobrou izolaci patatinu ze vzorku. Přítomnost PI byla detekována v oblasti retenčních časů mezi 30. a 70. minutou. Tato oblast pokrývá všechny retenční časy pro jednotlivé skupiny PI's. Drobný problém představuje mírný překryv vrcholů píků v oblasti mezi 50. až 70. minutou. Tento překryv je způsoben tím, že při získávání škrobu průmyslovou metodou dochází k pomíchání jednotlivých odrůd brambor. Výsledná šťáva tedy obsahuje směs inhibitorů proteáz pocházející z různých zdrojů. Tento problém však nemá vliv na možnost izolace frakcí, obsahujících jednotlivé inhibitory, jejich následnou analýzu a purifikaci.

Metoda Inhibitory 5 nebyla shledána vhodnou pro detekci a identifikaci PI's z průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru. Při použití této metody nebylo možno přesně odlišit píky pro jednotlivé skupiny PI's z důvodu překryvu píků. Důvodem může být nedostatečná citlivost této metody pro izolaci ze směsi několika odrůd.

8. Souhrn

Tato práce je zaměřena na možnost využití metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro detekci a identifikaci inhibitorů proteáz (PI's) ve šťávě z hlíz bramboru (PFJ).

Inhibitory proteáz (PI's) představují jednu ze tří skupin rozpustného proteinu v hlízách bramboru, a to společně s patatinem a skupinou tzv. ostatních proteinů. PI's tvoří značně heterogenní skupinu. Jejich klasifikace je značně obtížná, se 2 odlišnými přístupy. První přístup využívá klasifikace do 7 skupin: potato inhibitor I (PI – 1), potato inhibitor II (PI - 2), inhibitor karboxypeptidázy (PCI), inhibitory aspartátových proteáz (PAPI), inhibitory cysteinových proteáz (PCPI), inhibitory proteáz Kunitzova typu (PKPI) a „ostatní inhibitory serinových proteáz“ (OSPI). Tato klasifikace však není zcela typická.

Běžnějším přístupem je rozdělení do 3 rodin. První rodina je tvořena potato inhibitorem I (PI – 1). Druhá rodina pak zahrnuje izomery potato inhibitoru II (PI – 2). Do třetí rodiny jsou začleněny proteiny s molekulovou hmotností 20 až 22 kDa. Tato rodina se dělí do 4 odlišných skupin: 1) inhibitory proteáz Kunitzova typu, 2) inhibitory cysteinových proteáz, 3) inhibitory aspartátových proteáz, 4) inhibitor karboxypeptidázy.

V mnoha pracích byla naznačena celá řada možných funkcí PI's ve rostlinách. Mohou působit jako zásobní proteiny, regulátory endogenní proteolytické aktivity či se podílet na celé řadě vývojových procesů, včetně programované buněčné smrti. PI's tvoří důležitou složku obranných mechanismů, spojených s odolností rostliny vůči hmyzu a patogenům. PI's mohou vykazovat celou řadu funkcí i mimo rostlinu. Celá řada PI's je studována v souvislosti s možnou léčbou AIDS, rakoviny, dermatitid či obezity.

Pro detekci proteinů (včetně PI's) se nejčastěji využívá metod založených na dvourozměrné elektroforéze (2 - DE). Tyto metody však nejsou pro svou nízkou citlivost optimální pro identifikaci jednotlivých proteinů. Dalším možným přístupem je využití chromatografických metod. Tyto metody využívají schopnosti proteinů vázat se na specifické látky. Mezi tyto metody pak patří i vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Tato práce byla rozdělena do tří okruhů. V první části jsem se zaměřila na vyhledávání vhodné metody HPLC pro identifikaci a detekci PI's. Z používaných modifikací HPLC jsem na základě odborné literatury vybrala metody založené na reverzní fázové HPLC (RP – HPLC). Celkem jsem sestavila 5 metod, které by potenciálně mohli

být vhodné pro identifikaci PI´s ze šťávy z hlíz bramboru. Tyto metody jsme označili jako Inhibitory 1, Inhibitory 2, Inhibitory 3, Inhibitory 4 a Inhibitory 5. Na základě provedených pokusů s komerčními standardy jsem jako optimální metody pro identifikaci a detekci PI´s zvolila metody Inhibitory 1 a Inhibitory 5.

V druhé části práce jsem pomocí vybraných metod získala chromatografické profily 17 vybraných odrůd bramboru. Nejprve jsem změřila pomocí obou metod retenční časy jednotlivých skupin PI´s u dané odrůdy. Po statistickém zhodnocení pomocí metody ANOVA byly zjištěny statisticky významné rozdíly v retenčních časech jednotlivých skupin PI´s mezi vybranými odrůdami. Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišným zastoupením jednotlivých izomer daného inhibitoru. Z hlediska použitých metod lze říci, že se retenční časy mezi oběma metodami značně lišily. To je však způsobeno odlišným gradientem eluce obou metod. V zásadě se však retenční časy jednotlivých skupin PI´s pohybovaly mezi 37. a 60. minutou.

Dále jsem pomocí vyhodnocovacího systému ChromQuest 3.0 stanovila procentický podíl jednotlivých skupin PI´s na celkovém obsahu PI´s. Nejrozšířenějším PI´s je potato inhibitor II (PI – 2). Tento inhibitor tvoří přibližně 44 % celkového obsahu PI´s. Druhou nejrozšířenější skupinou je potom skupiny inhibitorů cysteinových proteáz (PCPI) s 22 %. Další dvě skupiny rovněž překročili 10% podíl na celkovém obsahu PI´s. Jedná se o skupinu inhibitorů Kunitzova typu (PKPI), která tvoří 12 % celkového obsahu PI´s, a skupinu inhibitorů aspartátových proteáz (PAPI) s 10% podílem. Potato inhibitor I (PI – 1) tvoří celkem 4,5 %. Podíl skupiny „ostatních inhibitorů serinových proteáz“ (OSPI) byl stanoven na 4 %. Nejmenší podíl pak tvoří inhibitor karboxypeptidázy (PCI) s 1,5% podílem na celkovém obsahu PI´s. ANOVA opět potvrdila významné rozdíly v zastoupení jednotlivých skupin PI´s mezi vybranými odrůdami. Z hlediska použití dvou metod nebyl párovým t – testem zjištěn žádný rozdíl ve stanovení procentického podílu mezi jednotlivými metodami.

Třetí a poslední část této práce je zaměřena na možnost použití vybraných metod HPLC na detekci a identifikaci PI´s z průmyslově získané šťávy z hlíz bramboru, která vzniká jako odpad při průmyslové výrobě škrobu. Zde byla ze dvou vybraných metod, Inhibitory 1 a Inhibitory 5, shledána vhodnou pouze metoda Inhibitory 1. V případě metody Inhibitory 5 docházelo k řadě problémů. Nebylo možné správně identifikovat jednotlivé skupiny PI´s. Důvodem je přítomnost značného rušivého pozadí.

V zásadě lze konstatovat, že metoda HPLC může být použita pro detekci a identifikaci PI's ze šťávy z hlíz bramboru. Pro komerční využití je však potřeba nalézt vhodný eluční pufr. Neboť mnou používaná kyselina trifluorooctová je vysoce toxická. Po odstranění této překážky představuje metoda HPLC možný nástroj pro průmyslovou izolaci PI's.

9. Summary

Identification of protease inhibitors

This work is focused on possibility of application of HPLC methods for detection and identification of protease inhibitors (PI's) from potato fruit juice (PFJ).

Protease inhibitors (PI) represent one of three groups of soluble protein in potato tuber, together with patatin and group of other proteins. They are considerable heterogenous group of proteins. Their classification is difficult, regarding two different approaches. First approach uses classification into 7 groups: potato inhibitor I (PI-1), potato inhibitor II (PI-2), potato carboxypeptidase inhibitor (PCI), potato aspartate protease inhibitor (PAPI), potato cysteine protease inhibitor (PCPI), potato Kunitz-type protease inhibitor (PKPI) and "other serine protease inhibitors" (OSPI). This classification isn't so typical.

More common is classification into three families. First family contains potato inhibitor I. Second family takes potato inhibitor II in. Third family consists from proteins with molecular weight about 20 kDa to 22 kDa. This family is divided into four different groups: 1) Kunitz type inhibitors, 2) cysteine protease inhibitors, 3) aspartate protease inhibitors, 4) carboxypeptidase inhibitor.

It have been suggested many different roles for PI's in plants They can act as storage proteins, as regulators of endogenous proteolytic activity, as participants in many developmental processes, including programmed cell death. PI's constitute important component of defence mechanism, associated with resistance of plants against insects and pathogens. PI's serve many other functions besides plants too. A number of PI's is studied for use in treatment for AIDS, cancer, dermatitis or obesity.

For detection of proteins (include PI's) are mostly used methods, based on 2 – dimensional electrophoresis (2 – DE). These methods are not optimal for identification of proteins, because of its lower sensitivity. Other approach represents using of chromatographic methods. These methods utilize binding of proteins to specific substances. Among these methods, there belong High Performance Chromatography (HPLC).

This work was split into three parts. In first part, optimal HPLC method for detection and identification of PI's was searching for. I found 5 methods, which could be used for this purpose. All these methods were tested, using commercial standards. Finally, two methods (named Inhibitory 1 and Inhibitory 5) were chosen like optimal.

In second part of this work, I obtained chromatographic profiles of selected potato varieties. Together, it was tested 17 varieties. Both optimized methods were used. First, retention times for every PI's group for all varieties were measured. Using ANOVA method, statistically significant differences among retention times among selected varieties were found. Retention times of individual PI's group in the same variety differ in dependence of used method, Inhibitory 1 and Inhibitory 5. It can be explained by different speed of elution in both methods. Generally, retention times of PI's rank between 50 and 70 minutes of method.

Further, proportions of individual PI's groups on total content of PI's in PFJ were calculated. Results of these calculations do not differ in both methods. The most widely fraction is created by potato inhibitor II (PI – 2). It includes about 44 % of total PI's content. Second most widely fraction is potato cysteine protease inhibitor (PCPI) with 22 %. Next groups are potato Kunitz-type protease inhibitor (PKPI) with 12 % and potato aspartate protease inhibitor (PAPI) with 10 %. Last three groups don't get over 10% limit. There belong potato inhibitor I (PI-1), "other serine protease inhibitors" (OSPI) and potato carboxypeptidase inhibitor (PCI). These groups constitute 4,5 %, 4 % and 1.5 % from total PI's content. ANOVA confirms significant differences in proportions of individual PI's groups between varieties.

Third and last part of this work was focused on possibility of using selected HPLC method for detection and identification of PI's from potato fruit juice, which forms like waste by industrial starch extraction. In this part, only method Inhibitory 1 was found to be an optimal method. Method Inhibitory 5 embodied many problems. It wasn't possible to identify individual PI's. Reason is the presence of interfering background.

In general, HPLC method can be used for detection and identification of PI's from potato fruit juice. For commercial using, there is necessary to find method with another elution buffer. I used tri-fluoro-acetate acid, which is toxic for every organism. After elimination of this obstruction, HPLC represents possible tool for industrial isolation of PI's.

10. Použitá literatura

1. Abe, K.; Emori, Y.; Kondo, H.; Suzuki, K.; Arai, S. (1987): Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). *J. Biol. Chem.* 262 (35), 16793 – 16797.
2. Al-Saikhan, M.S.; Howard, L. R.; Miller Jr., J. C. (1995): Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Food Sci* 60 (2), 341 – 343.
3. Álvarez-Alfageme, F.; Martínez, M.; Pascual – Ruiz, S.; Castanera, P.; Diaz, I.; Ortego, F. (2007): Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgenic Res.* 16, 1 -13.
4. Anderson, C.; Pinsirom, P.; Parkin, K. L. (2002): Hydrolytic selectivity of patatin (lipid acyl hydrolase) from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers towards various lipids. *J. Food Biochem.* 26 (1), 63 - 74.
5. Andrews, D. L.; Beames, B.; Summers, M. D.; Park, W. D. (1988): Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in baculovirus vector. *Biochem. J.* 252 (1), 199 - 206.
6. Bárta, J.; Čurn, V. (2004): Bilkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. *Chem. Listy* 98, 373 – 378.
7. Bauw, G.; Nielsen, H. V.; Emmersen, J.; Nielsen, K. L.; Jorgensen, M.; Welinder, K. G. (2006): Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *FEBS Journal* 273, 3569 – 3584.
8. Beekwilder, J.; Schipper, B.; Bakker, P.; Bosch, D.; Jongasma, M. (2000): Characterization of potato proteinase II reactive site mutants. *Eur. J. Biochem.* 267 (7), 1975-1984.
9. Bergey, D.R.; Howe, G. A.; Ryan, C. A. (1996): Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (22), 12053 - 12058.
10. Billings, P. C.; Morrow, A. R.; Ryan, C. A.; Kennedy, A. R. (1989): Inhibition of radiation-induced transformation of C3H/10T1/2 cells by carboxypeptidase inhibitor I and inhibitor II from potatoes. *Carcinogenesis* 10 (4), 687 - 691.

11. Blanco – Aparicio, C.; Molina, M. A.; Fernandez – Salas, E.; Frazier, M. L.; Mas, J. M.; Quero, E.; Aviles, F. X.; de Llorens, R. (1998): Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth. *Biol. Chem.* 273 (20), 12370 - 12377.
12. Bode, W.; Huber, R. (2000): Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 241 - 252.
13. Botella, M. A.; Xu, Y.; Prabha, T. N.; Zhao, Y.; Narasimhan, M. L.; Wilson, K. A.; Nielsen, S. S.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. (1996): Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 112 (3), 1201 - 1210.
14. Bouchal, P.; Kučera, I. (2003): Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chem. Listy* 97, 29 -36.
15. Bronsoms, S.; Villanueva, J.; Canals, F.; Querol, E.; Aviles, F.X. (2003): Analysis of the effect of potato carboxypeptidase inhibitor pro-sequence on the holding of the mature protein. *Eur. J. Biochem.* 270 (17), 3641 - 3650.
16. Brzin, J.; Popovic, T.; Drobnic – Kosorok, M.; Kotnik, M.; Turk, V. (1988): Inhibitors of cysteine proteinases from potato. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 369 (5), 233 - 238.
17. Carlini, C. R.; Grossi - de Sá, M. F. (2002): Plant toxic proteins with insecticidal properties. *Toxicon* 40, 1515 – 1539.
18. Chmelík, J. (2005): Proteomický průvodce. *Chem. Listy* 99, 883 – 885.
19. Christeller, J.T.; Farley, P. C.; Ramsay, R. J.; Sullivan, P. A.; Laing, W. A. (1998): Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.* 254, 160 – 167.
20. Collinsová, M.; Jiráček, J. (2004): Současný vývoj v proteomice. *Chem. Listy* 98, 1112 - 1118
21. Corran, P. H. (1998): Reverse-phase chromatography of proteins. In *HPLC of Macromolecules*. The Practical Approach Series, 93.
22. Derbyshire, E.; Wright, D. J.; Boulter, D. (1976): Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15, 3 - 24.
23. Dhont, S.; Geoffroy, P.; Stelmach, B. A.; Legrand, M.; Heitz, T. (2000): Soluble phospholipase A₂ activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic

virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *The Plant Journal* 23 (4), 431 - 440.

24. Fabrick, J.; Behnke, C.; Czapla, T.; Bala, K.; Rao, A. G.; Kramer, K. J.; Reeck, G. R. (2002): Effects of potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm *diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochem.* 32 (4), 405 - 415.

25. Frenkel, K.; Chrzan, K.; Ryan C. A., Wiesner R., Troll W. (1987): Chymotrypsin-specific protease inhibitors decrease H₂O₂ formation by activated human polymorphic nuclear leukocytes. *Carcinogenesis* 8 (9), 1207 - 1212.

26. Galliard, T.; Dennis, S. (1974): Isoenzymes of lipolytic acyl hydrolase and esterase in potato tuber. *Phytochemistry* 13 (11), 2463 - 2468.

27. Gerbrandy, S. J.; Doorgeest, A. (1972): Potato phosphorylase isoenzymes. *Phytochemistry* 11 (8), 2403.

28. Glatz, Z. (2000): Kovalentní chromatografie. *Chem. Listy* 94, 314 – 320.

29. Hass G. M., Ako H., Grahn D. T., Neurath H. (1976): Carboxypeptidase inhibitor from potatoes. The effect of chemical modifications on inhibitor activity. *Biochemistry* 15 (1), 93 - 100.

30. Hass G. M., Nau H., Biemann K., Grahn D. T., Ericsson L. H., Neurath H. (1975): The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Biochemistry* 14 (6), 1334 - 1342.

31. Henry, M. P.(1998): Ion-exchange chromatography of proteins and peptides. In: *HPLC of Macromolecules*. The Practical Approach Series, 63.

32. Hill A. J., Perkin S. R., Ryan C. A., Blundell J. A. (1990): Oral administration of proteinase inhibitor II from potatoes reduced energy intake in man. *Physiol. Behav.* 48 (2), 241 - 246.

33. Hirschberg, H. J. H. B.; Simons, J.-W. F.A.; Dekker, N.; Egmond, M. R. (2001): Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur. J. Biochem.* 268, 5037 – 5044.

34. Hraška, M.; Rakouský, S.; Čurn, V. (2006): Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin. *Chem. Listy* 100,501 – 507.

35. Huang, C.; Ma, W. - Y.; Ryan, C. A.; Dong, Z. (1997): Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein -1 activation through a

pathway that is independent of extracellular signal-regulated kinases, C-jun N-terminal kinases, and P38 kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 11957.

36. Ishikawa, A.; Yoshihara, T.; Nakamura, K. (1994): Jasmonate-inducible expression of a potato cathepsin D inhibitor - GUS gene fusion in tobacco cells. Plant Mol. Biol. 26, 403 - 414.
37. Johnson, R.; Narvez, J.; An, G.; Ryan, C. (1989): Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effect on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 9871.
38. Jongsma, M. A. (1995): *The resistance of insects to plant proteinase inhibitors*. Center for Plant Breeding and Reproduction Research, Wageningen University, Wageningen.
39. Kennedy, A. R. (1998): Chemopreventive agents: protease inhibitors. Pharmacol. Ther. 78 (3), 167 – 209.
40. Koiwa, H.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. (1997): Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends in Plant Science 2 (10), 379 - 384.
41. Konarev, A.V.; Anisimova, I.N.; Gavrilova, V.A.; Rozhkova, V.T.; Fido, R.; Tatam, A.S.; Sherry, P.R. (2000): Novel proteinase inhibitors in seeds of sunflower (*Helianthus annuus L.*): polymorphism, inheritance and properties. Theor. Appl. Genet. 100, 82 – 88.
42. Kovářová, H. (2005): Proteomika v postgenomové době. Chem. Listy 99, 886 – 889.
43. Krizaj, I.; Drobnic – Kosorok, M.; Brzin, J.; Jerala, R.; Turk, V. (1993): Primary structure of inhibitor of cysteine proteinase from potato. FEBS Lett., 333, 15 - 20.
44. Lawrence, P. K.; Koundal, K. R. (2002): Plant Protease inhibitors in control of phytophagous insects. J. Biotech. 5 (1), 93 - 109.
45. Lee, M. C. S.; Scanlon, M. J.; Craik, D. J.; Anderson, M. A. (1999): A novel two-chain proteinase inhibitor generated by circularization of a multidomain precursor protein. Nat. Struct. Biol. 6 (6), 526 - 530.
46. Lee, M. R. (2006): The Solanaceae: foods and poisons. J. R. Coll. Physicians Edinb. 36, 162 – 169.
47. Lipke, H.; Fraenkel, G. S.; Liener, I. E. (1954): Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. Food Chem. 2 (8), 410 - 414.

48. Lisinska, G.; Leszcynski, W. (1989): *Potato science and technology*. London, Elsevier Applied Science.
49. Lu, X. F.; Xia, Y. X.; Pei, Y. (1998): Role of plant proteinase inhibitors in the resistance of plant against insect and pathogens. *Prog. Biochem. Biophys.* 25, 328 - 333.
50. Mares, M.; Meloun, B.; Pavlik, M.; Kostka, V.; Baudys, M. (1989): Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin. *FEBS Lett.* 25, 94 - 98.
51. Marshall, J.; Sidebottom, C.; Debet, M.; Martin, C.; Smith, A. M.; Edwards, A. (1996): Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell* 8, 1121 - 1135.
52. Matos, A. R.; d'Arcy-Lameta, A.; França, M.; Petres, S.; Edelman, L.; Kader, J.-C.; Zuily - Fodil, Y.; Pham-Thi, A. T. (2001): A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett.* 491, 188 - 192.
53. Matos, A. R.; d'Arcy-Lameta, A.; França, M.; Zuily – Fodil, Y.; Pham-Thi, A. T. (2000): Patatin-like protein with galactolipase activity is induced by drought stress in *Vigna unguiculata* leaves. *Biochemical Society Transactions* 28, 779 - 781
54. Melville, J.C.; Ryan, C.A. (1972): Chymotrypsin inhibitor I from potatoes: Large scale preparation and characterization of its subunit components. *J. Biol. Chem.* 247, 3443 – 3453.
55. Messer, E. (2000) : Potatoes white. In: *The Cambridge world history of food*. Cambridge University Press, Cambridge.
56. Mickel, C. E.; Standish, J. (1947): Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. University of Minnesota, Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 178, 1 - 7.
57. Morita, S.; Fukase, M.; Hoshino, K.; Fukuda, Y.; Yamaguchi, M.; Morita, Y. (1996): Partial purification and characterization of a novel soybean protease which is inhibited by Kunitz and Bowman-Birk trypsin inhibitors. *J. Biochem. (Tokyo)* 119 (4), 711 - 718.
58. Neurath, H. (1984): Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350 – 357.
59. Owyang, C.; Louie, D. S.; Tatum, D. (1986): Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion - Suppression of cholecystokin release by trypsin. *J. Clin. Invest.* 77, 2042 - 2047.

60. Paiva, E.; Lister, R.M.; Park, W.P. (1983): Induction and accumulation of major tuber proteins of potato stems and petioles. *Plant Physiol.* *71*, 161 - 168.
61. Pandey, A.; Mann, M. (2000): Proteomics to study genes and genomes. *Nature* *405* (6788), 837 - 846.
62. Pannetier, C.; Giband, M.; Couzi, P.; Letan, V.; Mazier, M.; Tourneur, J.; Hau, B.(1997): Introduction of new traits into cotton through genetic engineering. *Euphytica* *96*, 163 - 166.
63. Park, W. D.; Blackwood, C.; Mignery, G. A.; Hermodsen, M. A.; Lister, R. M. (1983): Analysis of heterogeneity of the 40 000 molecular weight tuber glycoprotein of potatoes by immunological methods and by NH₂-terminal sequence analysis. *Plant Physiol.* *71*, 156 - 160.
64. Partington, J. C.; Bolwell, G. P. (1996): Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber. *Phytochemistry* *42* (6), 1499 - 1502.
65. Peña – Cortés, H.; Fisahn, J.; Willnitzer, L. (1995): Signals involved in wound-induced protease inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl., Acad. Sci. U. S. A.* *92* (10), 4106 - 4113.
66. Pernas, M.; Lopez – Solanilla, E.; Sanchez – Monge, R.; Salcedo, G.; Rodriguez – Palenzuela, P. (1999): Antifungal activity of plant cystatin. *Mol. Plant - Microbe Interact.* *12* (7), 624 - 627.
67. Pi – Sunyer, X.; Kissileff, H. G.; Thornton, J.; Smith, G. P. (1982): C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in obese man. *Physiol. Behav.* *29* (4), 627 - 630.
68. Pouvreau, L. (2004):. *Occurrence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber (Solanum tuberosum L.)*. Wageningen University, Wageningen.
69. Pouvreau, L.; Gruppen, H.; Piersma, S. R.; van den Broek, L. A. M.; van Koeningsveld, G. A.; Vpraven, A. G. J. (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. *Elkana*. *J. Agric. Food. Chem.* *49*, 2864 – 2874
70. Puztai, A. (1972): Metabolism of trypsin-inhibitory proteins in the germination seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Planta* *107*, 121.
71. Racusen, D. (1986): Esterase activity of patatin of two potato cultivars. *Can. J. Bot.* *64* (9), 2104 - 2106.

72. Racusen, D.; Foote, M. (1980): A major soluble glycoprotein of potato tubers. *J. Food Biochem.* 4, 43 - 52.
73. Racusen, D.; Weller, D. L. (1984): Molecular weight of patatin, a major potato tuber protein. *Food Biochem.* 8 (2), 103 – 107.
74. Regente, M.; de la Canal, L. (2000): Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum* 110 (2), 158 - 163.
75. Richardson, M. (1991): Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochem.* 5, 259.
76. Richardson, M.; Cossins, L. (1974): Chymotrypsin inhibitor I from potatoes: The amino acid sequence of subunit B, C and D. *FEBS Lett.* 45, 11 - 13.
77. Ritonja, A.; Krizaj, J.; Mesko, P.; Kopitar, M.; Lucovnik, P.; Strukelj, B.; Pungecar, J.; Buttle, D. J.; Barrett, A. J.; Turk, V. (1990): The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* 267, 13 – 15.
78. Ruseler - van Embden, J. G. H.; van Lieshout, L. M. C.; Smits, S. A.; van Kessel, I.; Laman, J. D. (2004): Potato tuber proteins efficiently inhibit human faecal proteolytic activity: implications for treatment of peri-anal dermatitis. *Eur. J. Clin. Invest.* 34 (4), 303 - 311.
79. Ryan, C. A. (1990): Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28, 425 - 449.
80. Šedo, O.; Havel, J. (2003): Analýza peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. *Chem. Listy* 97, 109 – 113.
81. Senda, K.; Yoshioka, H.; Doke, N.; Kawakita, K. (1996): A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiol.* 37 (3), 347 – 353.
82. Shain, Y.; Mayer, A. M. (1965): Proteolytic enzymes and endogenous trypsin inhibitor in germinating lettuce seeds. *Physiol. Plant.* 18 (3), 853.
83. Shewry, P. R. (2003): Tuber Storage Proteins. *Annals of Botany* 91, 755 – 769.
84. Smith, G. P.; Gibbs, J. (1987): The effect of gut peptides on hunger, satiety and food intake in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 499, 132 - 136.
85. Solomon, M.; Belenghi, B.; Belledonne, M.; Monachem, E.; Levine, A. (1999): The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11 (3), 431 - 443.

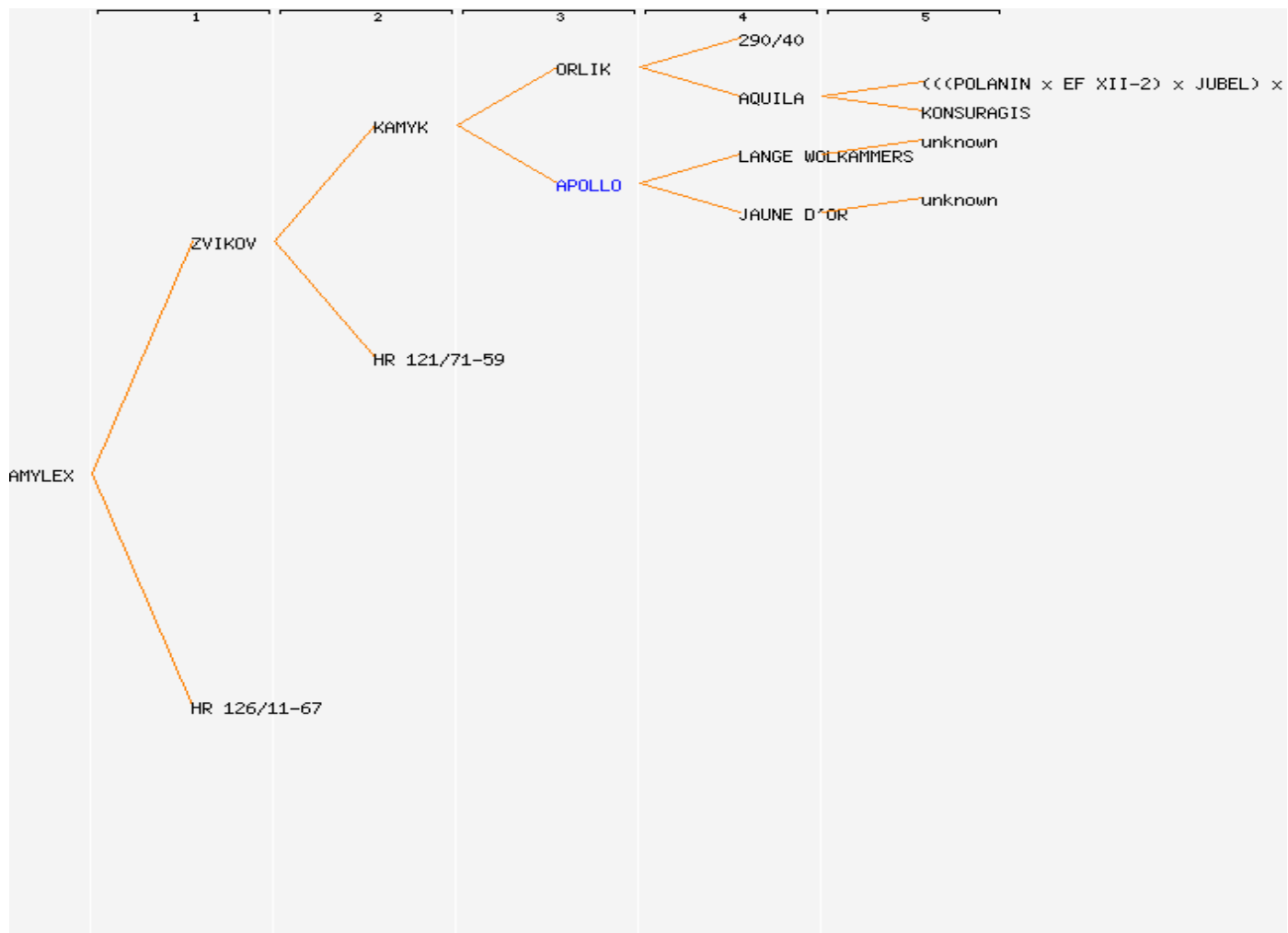
86. Sutherland, P. W.; Burgess, E. P. J.; Philip, B. A.; McManus, M. T.; Watson, L.; Christeller, J. T. (2002): Ultrastructural changes to the midgut of the black field cricket (*Teleogryllus commodus*) following ingestion of potato protease inhibitor II. *J. Insect Physiol.* 48 (3), 327 - 336.
87. Sýkorová, S.; Matějová, E.; Berová, M.; Bradová, J.; Sýkora, M.; Štočková, L. (2006): *Optimalizovaná metodika PAGE pro analýzu esteráz v hlízách bramboru (Solanum tuberosum L.)*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.
88. Urwin, P. E.; Lilley, C. J.; McPherson, M. J.; Atkinson, H. J. (1997): Resistance to both cyst and rootrot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant Journal* 12 (2), 455 - 461.
89. Vain, P.; Worland, B.; Clarke, M. C.; Richard, G.; Beavis, M.; Liu, H.; Kohli, A.; Leeck, M.; Snape, I.; Christou, P. (1998): Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin I - delta D86) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genetics* 96 (2), 266 - 271.
90. Valeski, K.; Fernandes, S.; Campos, F. A. P.; Do Val, R. R.; Xavier-Filho, J. (1991): The expression of papain inhibitor during development of cowpea seeds. *Plant Sci.* 74, 179.
91. Valueva, T. A.; Revina, T. A.; Gvozdeva, E. L.; Gerasimova, N. G.; Ozeretskoyanskaya, O. L. (2003): Role of protease inhibitors in potato protection. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 29 (5), 454 - 458.
92. Vokál, B.; Čepl, J.; Hausvater, E.; Rasocho, V. (2003): *Pěstujeme brambory*. Grada Publishing, Praha.
93. Walsh, T. A.; Twitchell, W. P. (1991): Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol.* 97 (1), 15 - 18.
94. Weitzman, S. A.; Weitberger, A. B.; Clark, E. P.; Stossel, T. P. (1985): Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227 (4691), 1231 - 1233.
95. Welling, G. W., Welling - Wester, S. (1998): Size - exclusion HPLC of proteins. In: *HPLC of Macromolecules. The Practical Approach Series*, 45.
96. Wu, J.; Haard, N. F. (2000): Purification and characterization of a cystatin from the leaves of methyl jasmonate treated tomato plants. *Comp. Biochem. Physiol.* 127 (2), 209 - 220.

97. Zouhar, J. : Afinitní chromatografie proteinů na vázaných kovových iontech. Chem. Listy 93, 683 – 685.

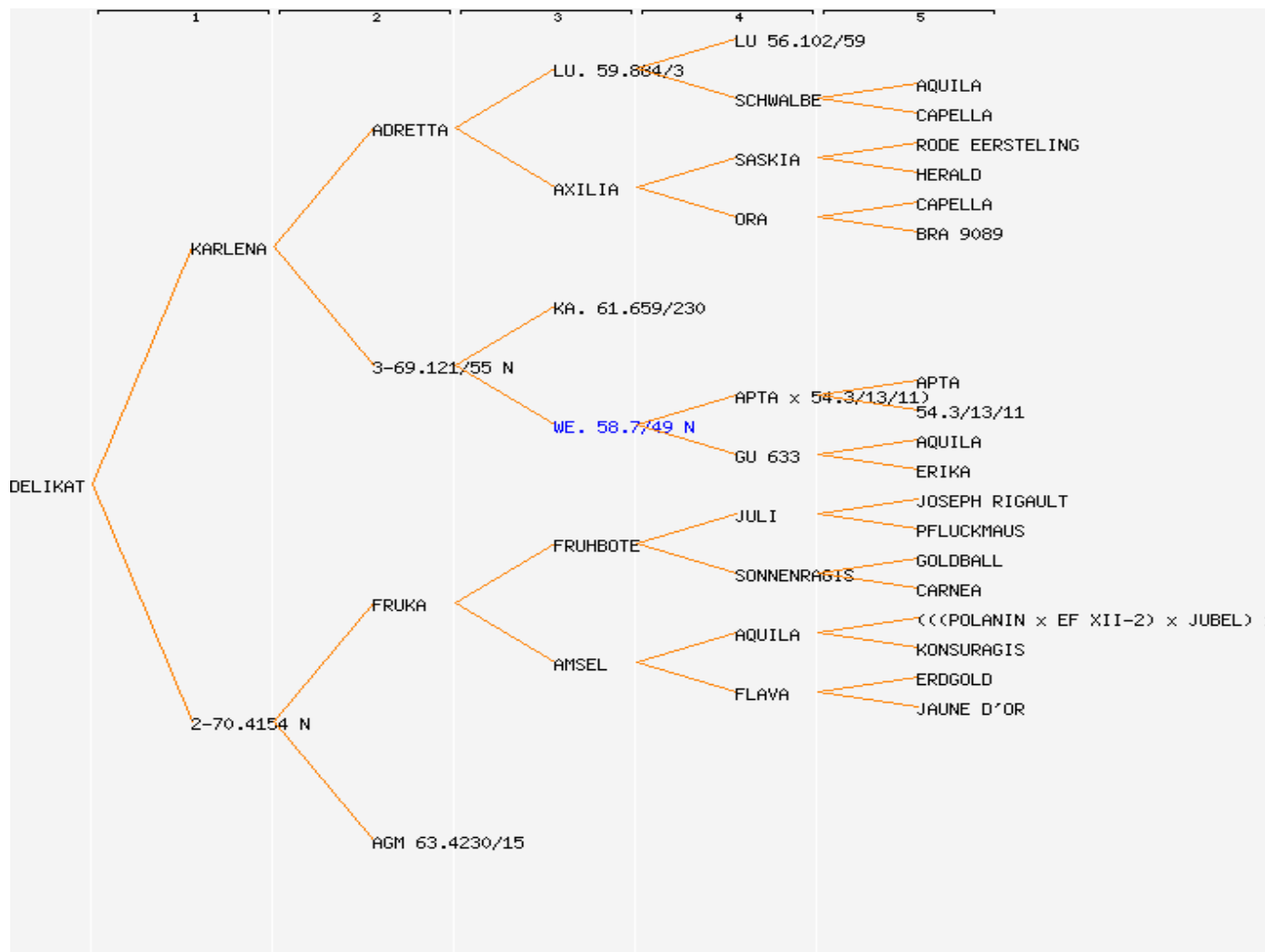
Internetové odkazy

1. <http://www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree/index.html>

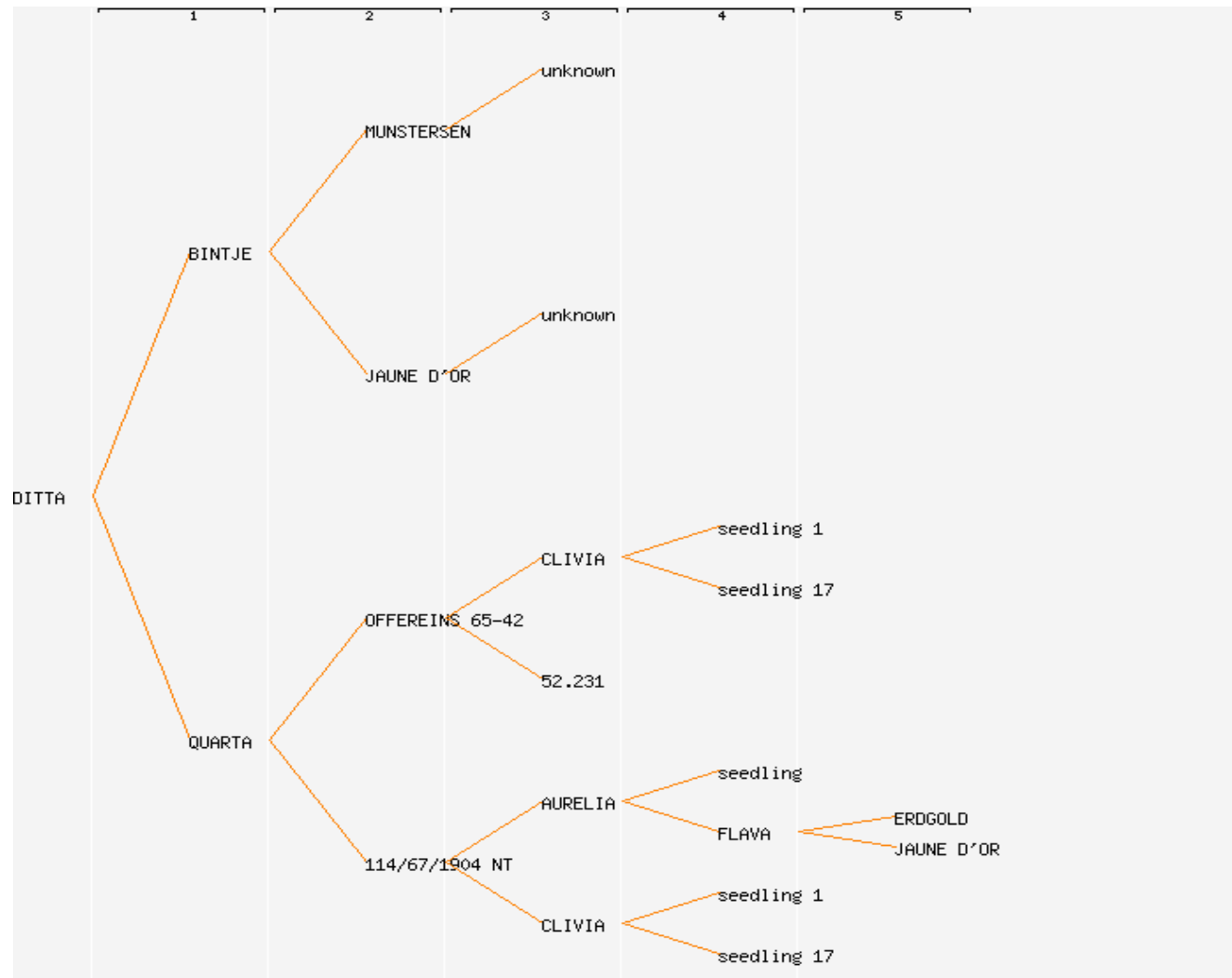
11. Přílohy



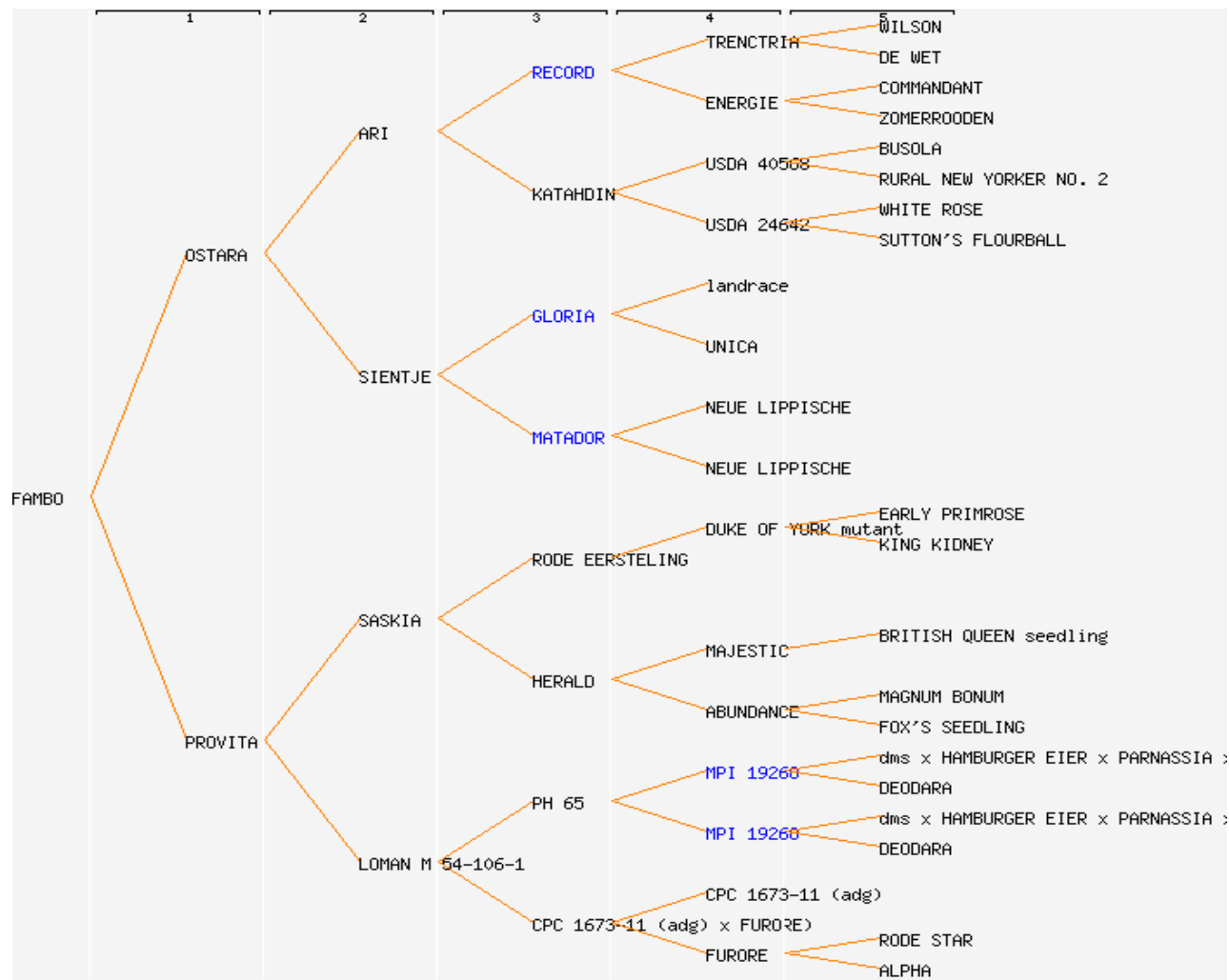
Příloha č. 1: Rodokmen odrůdy Amylex



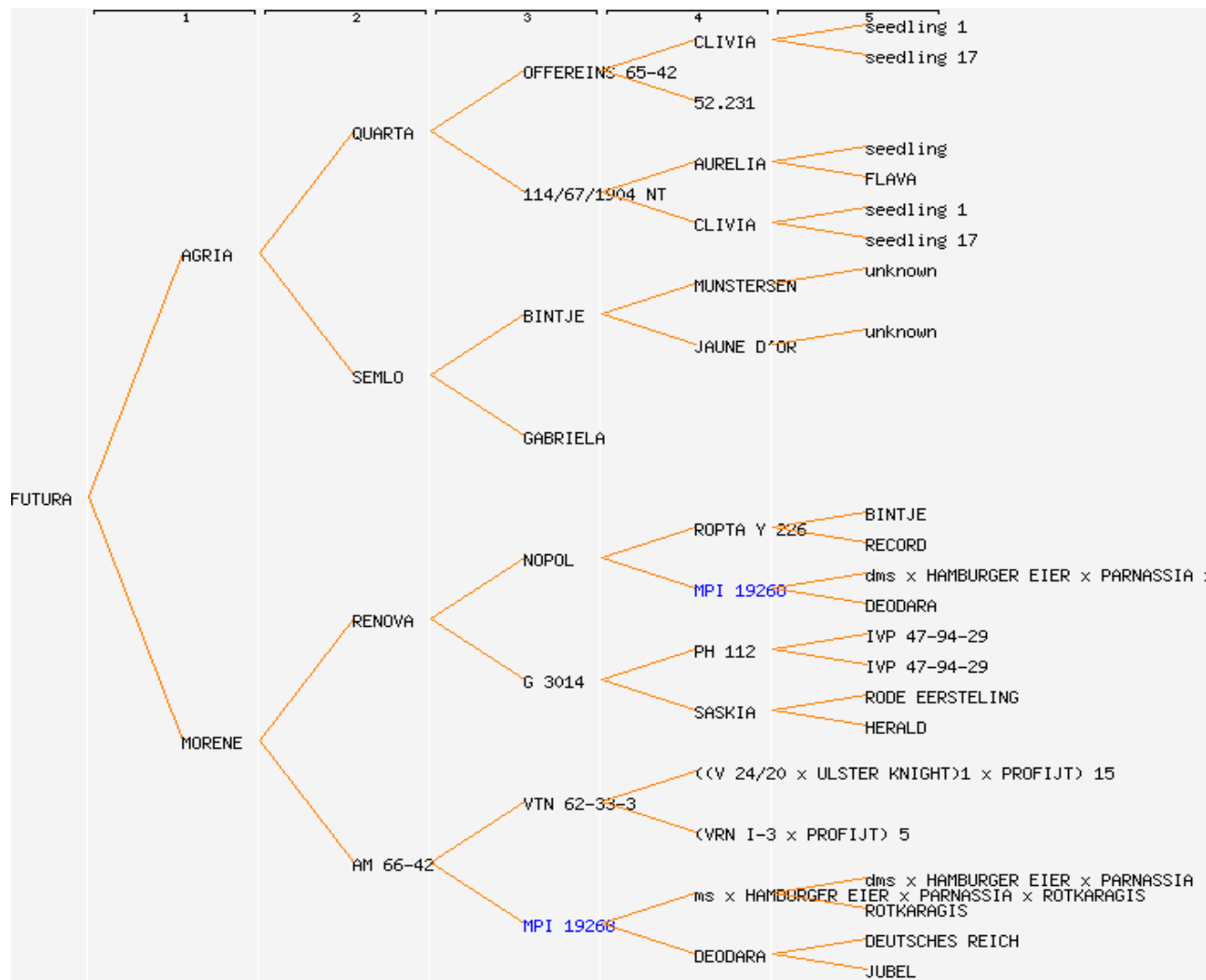
Příloha č. 2: Rodokmen odrůdy Delikat



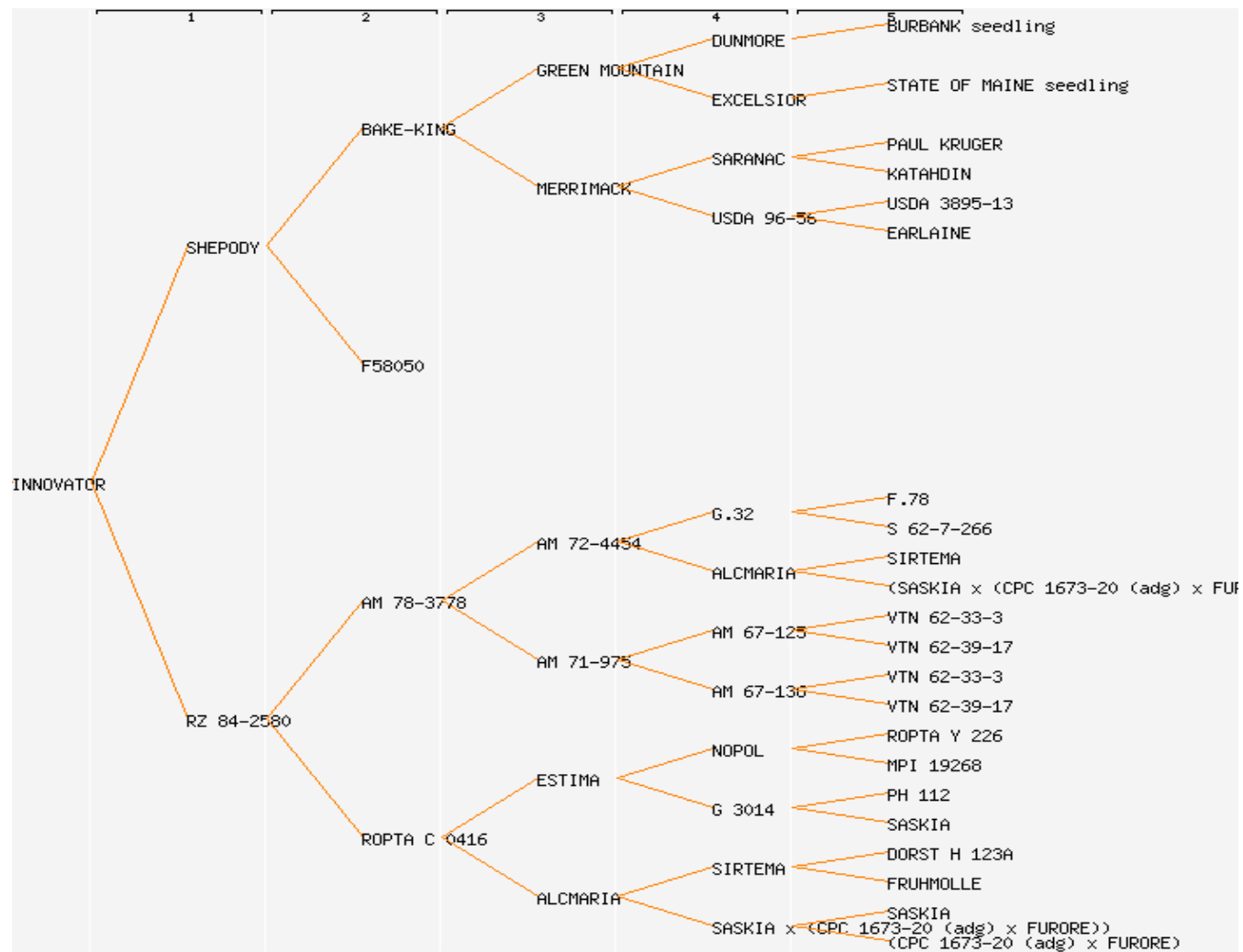
Příloha č. 3: Rodokmen odrůdy Ditta



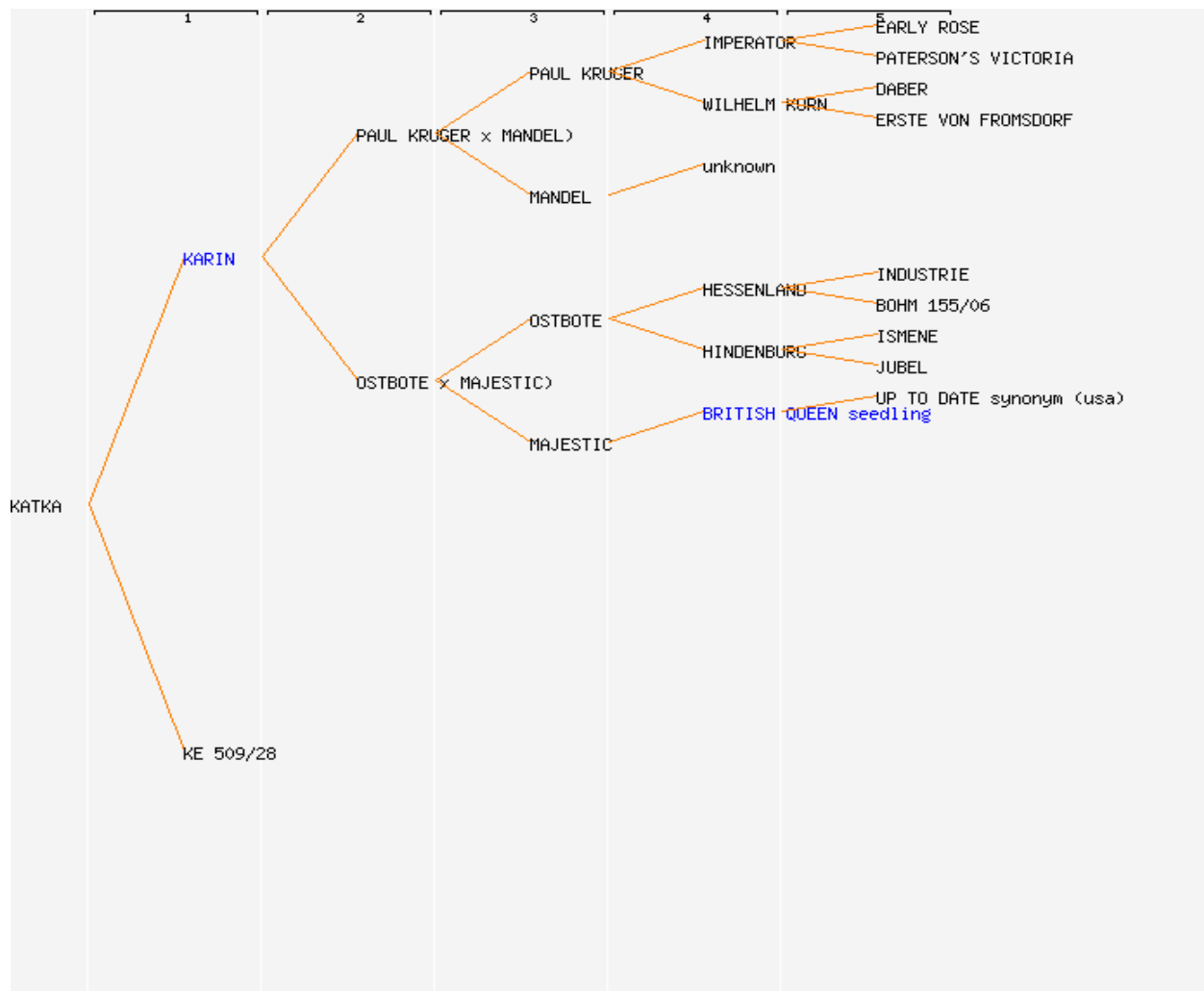
Příloha č. 4: Rodokmen odrůdy Fambo



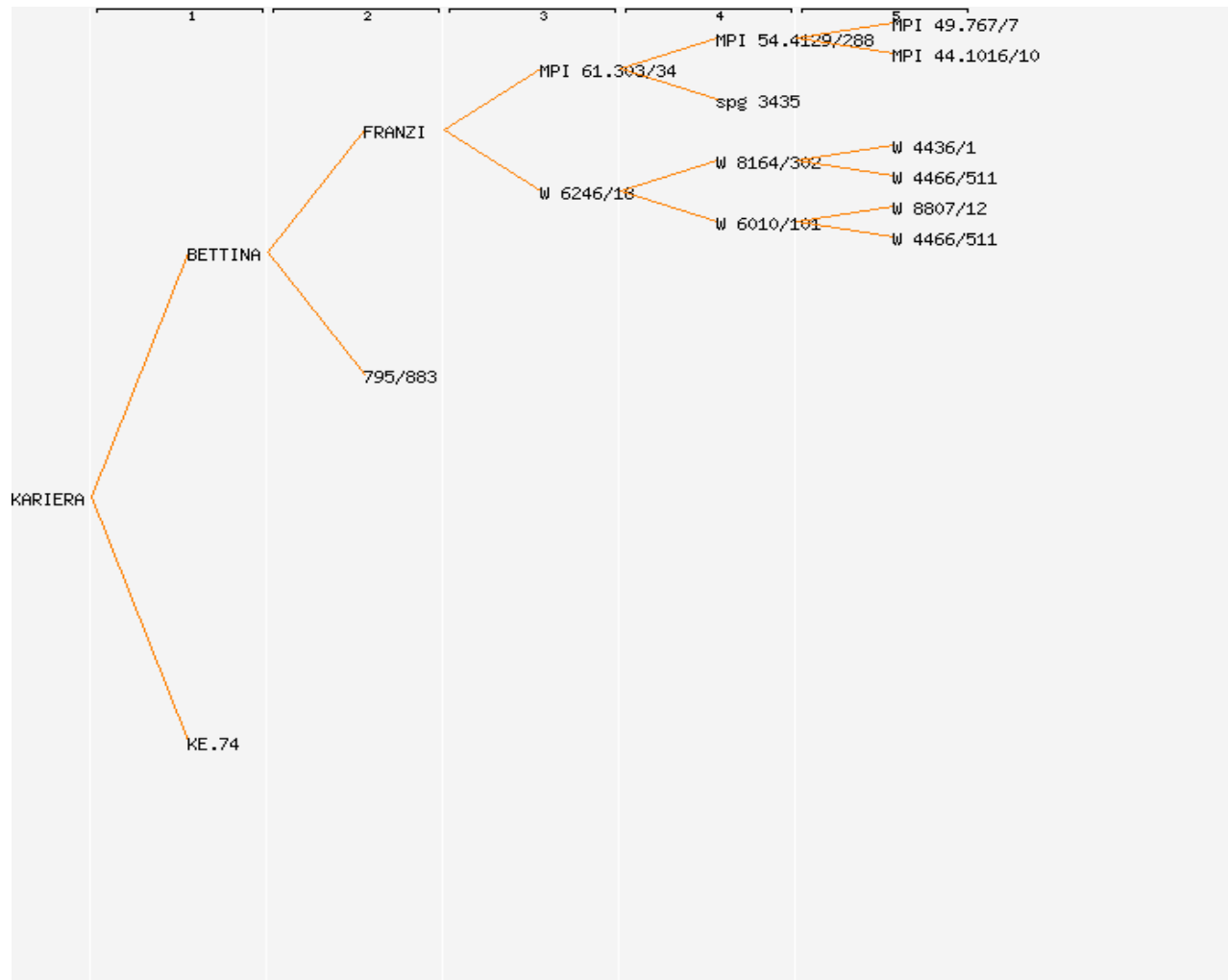
Příloha č. 5: Rodokmen odrůdy Futura



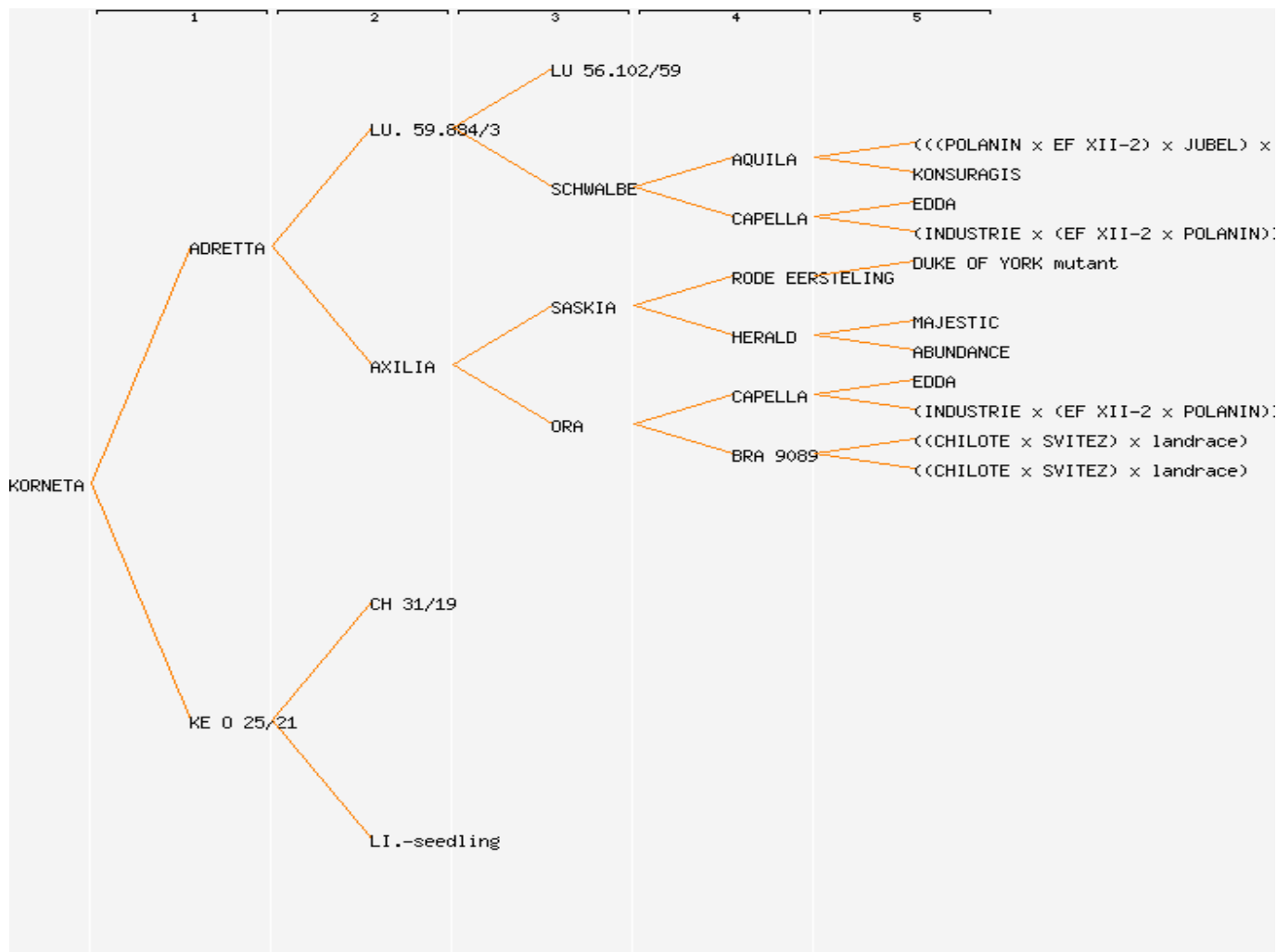
Příloha č. 6: Rodokmen odrůdy Innovator



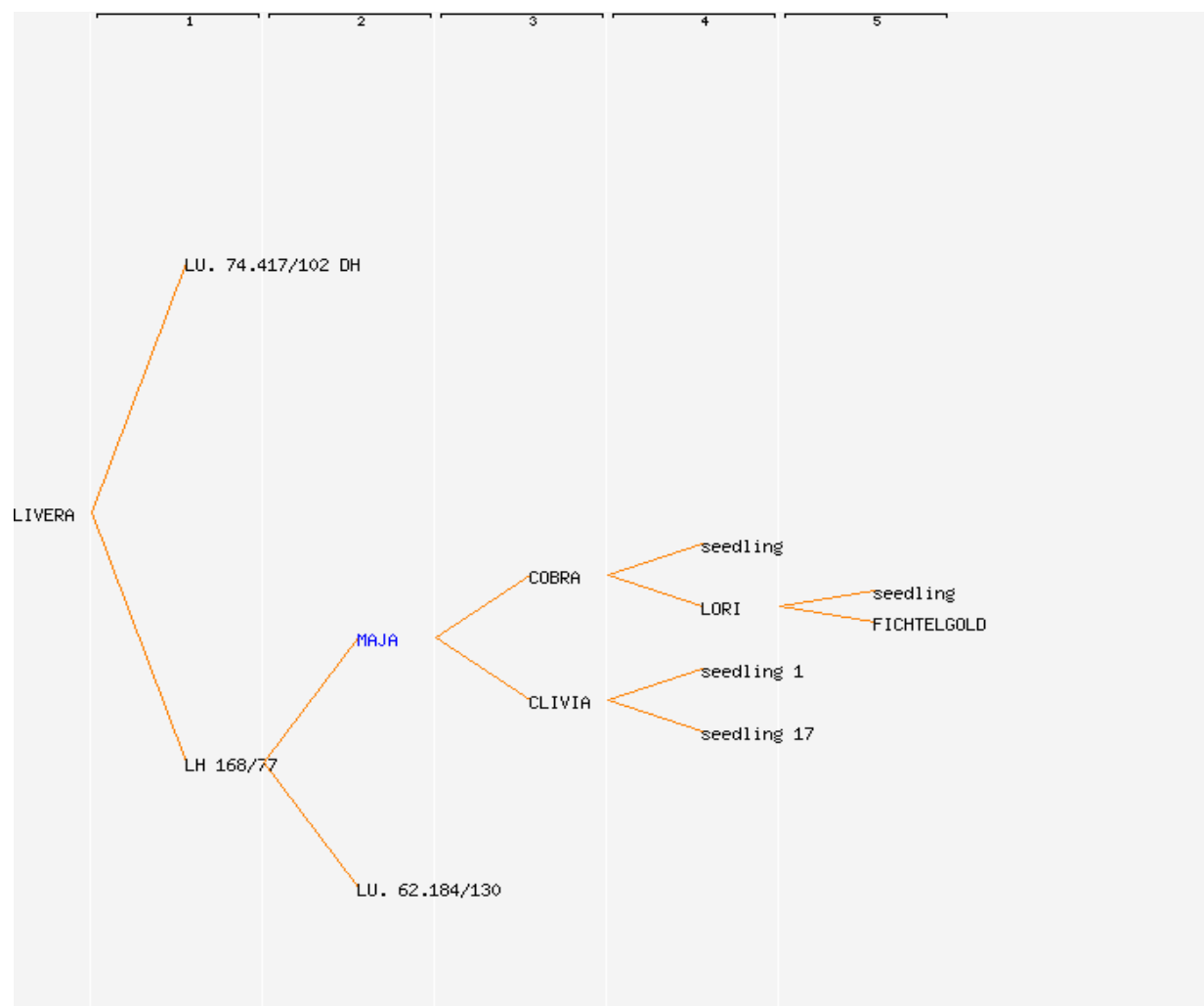
Příloha č. 7: Rodokmen odrůdy Katka



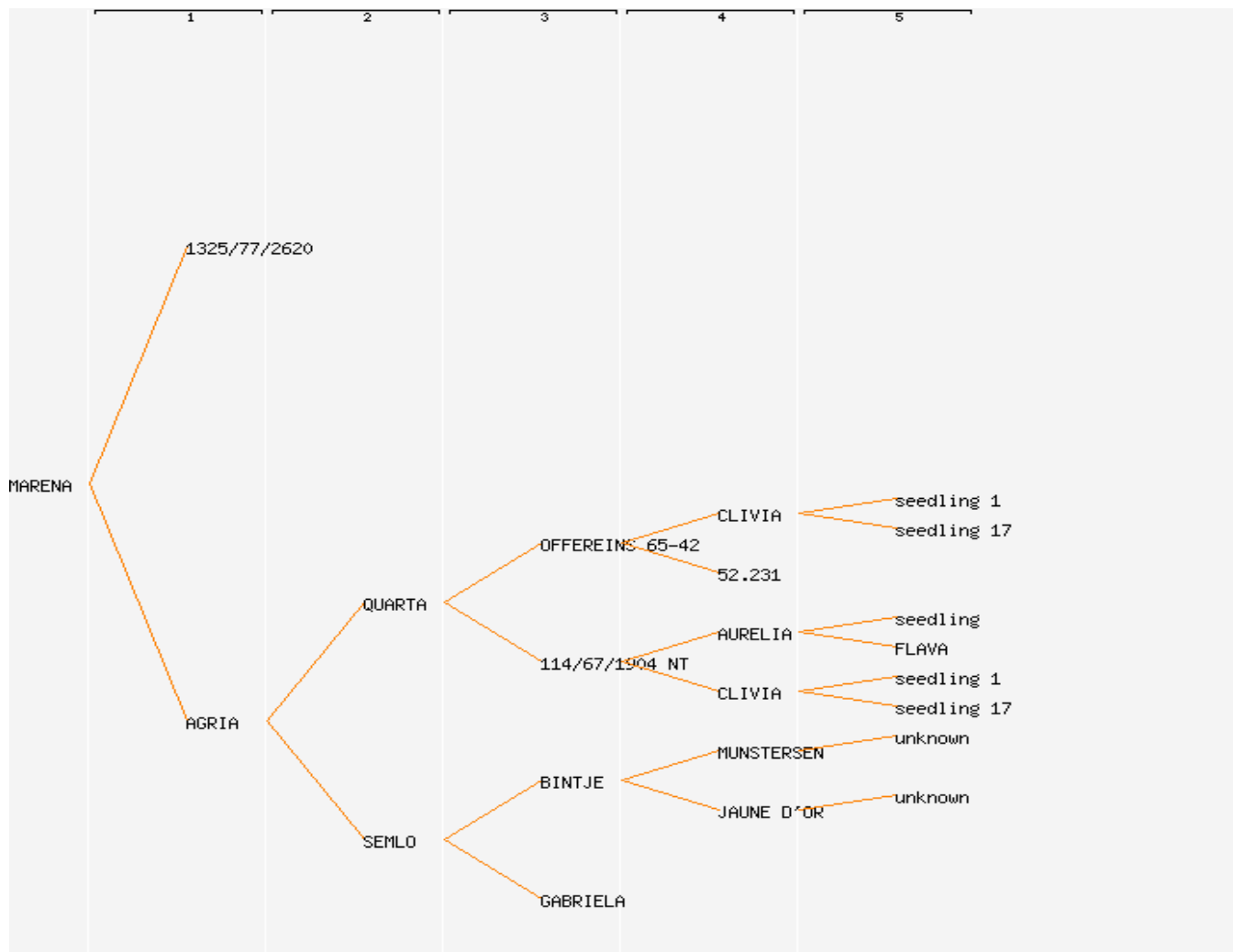
Příloha č. 8: Rodokmen odrůdy Kariera



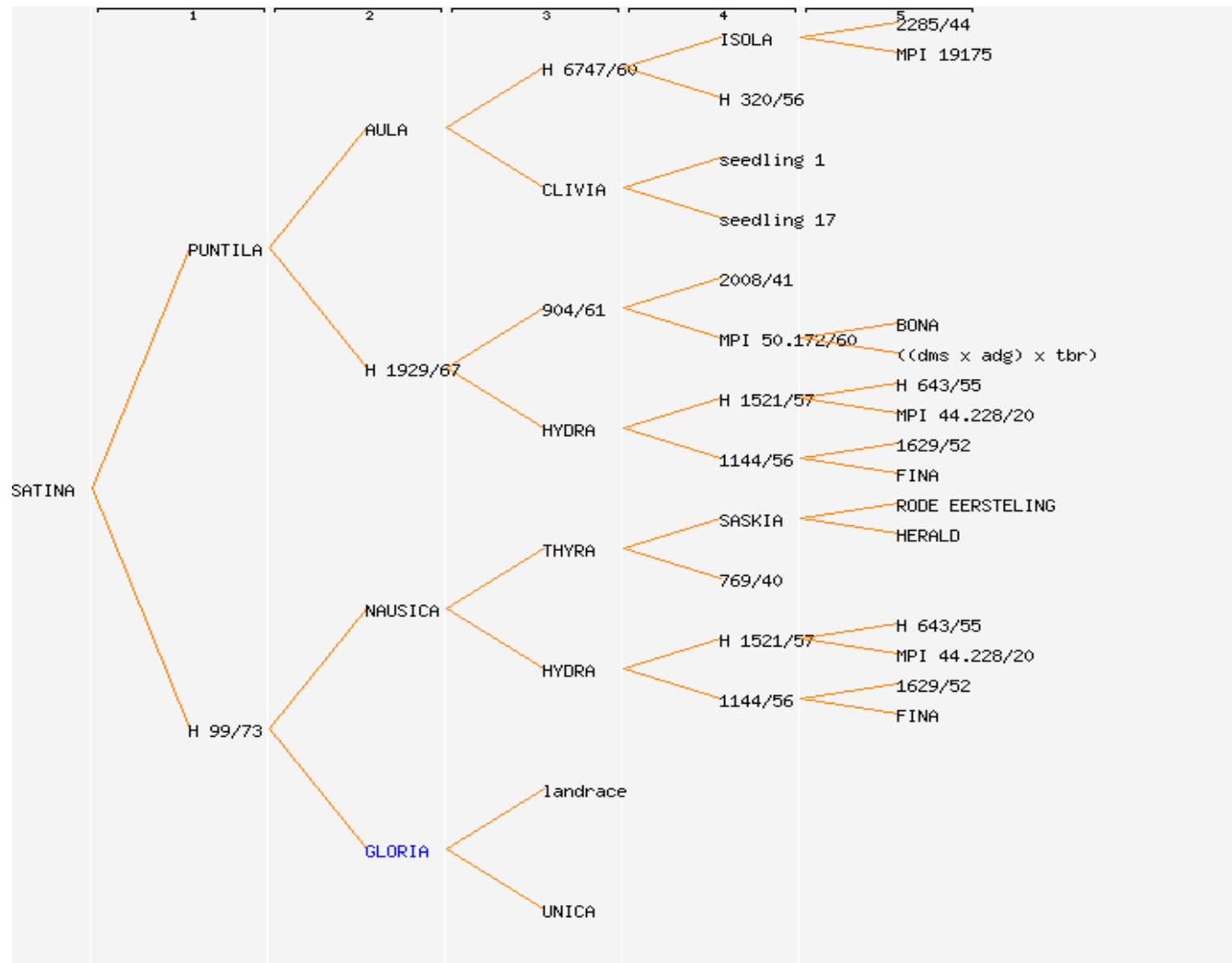
Příloha č. 9: Rodokmen odrůdy Korneta



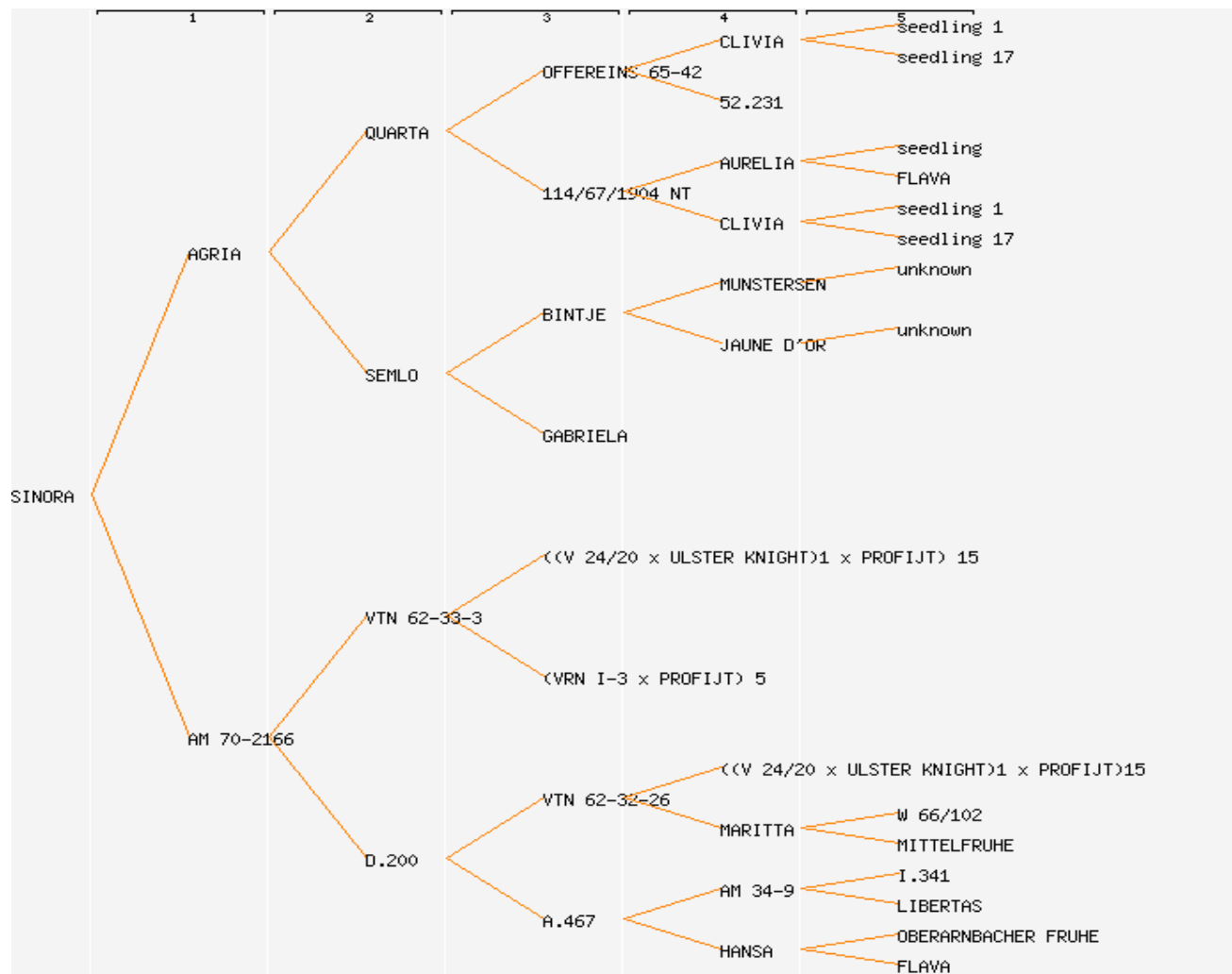
Příloha č. 10: Rodokmen odrůdy Livera



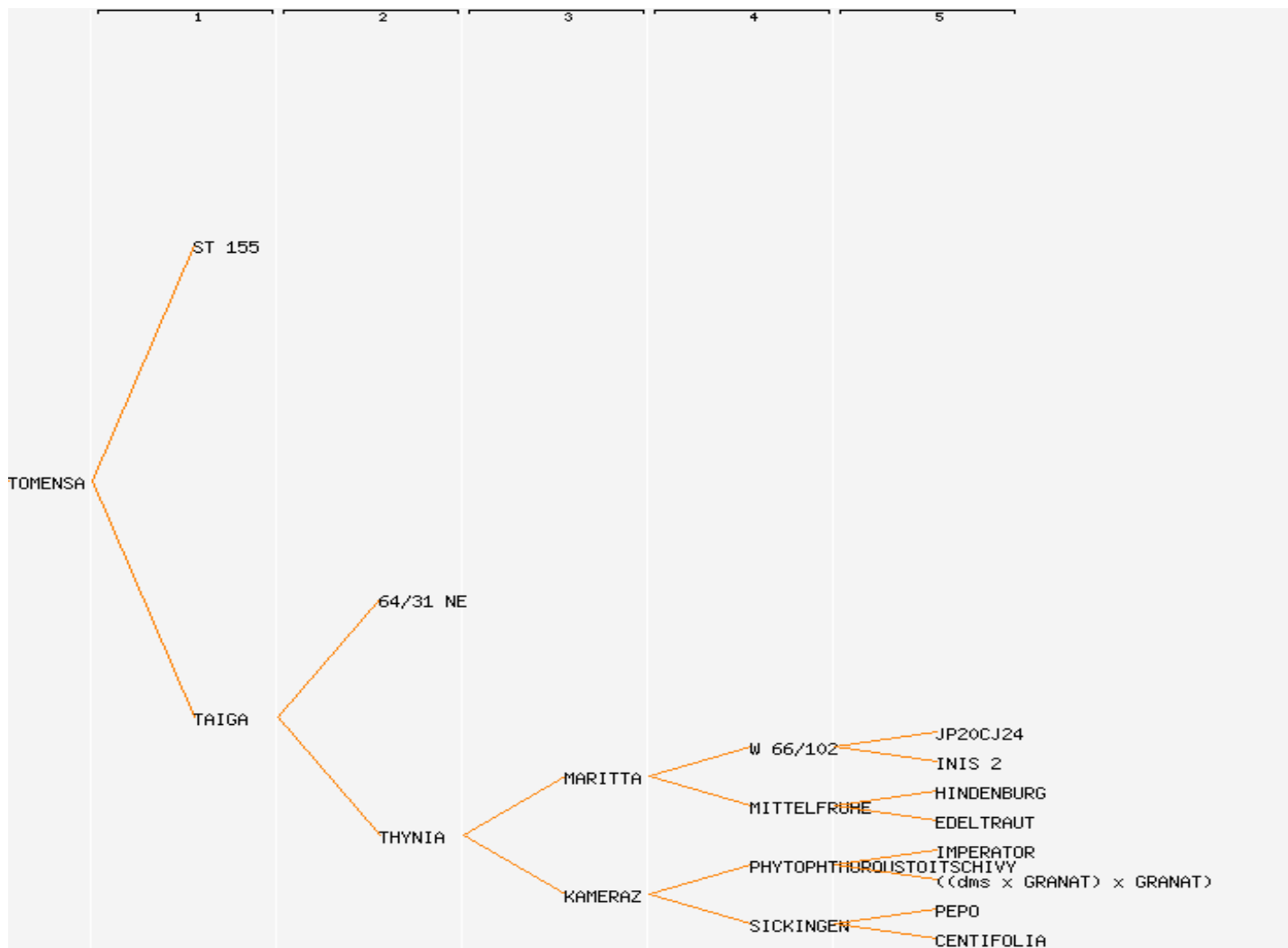
Příloha č. 11: Rodokmen odrůdy Marena



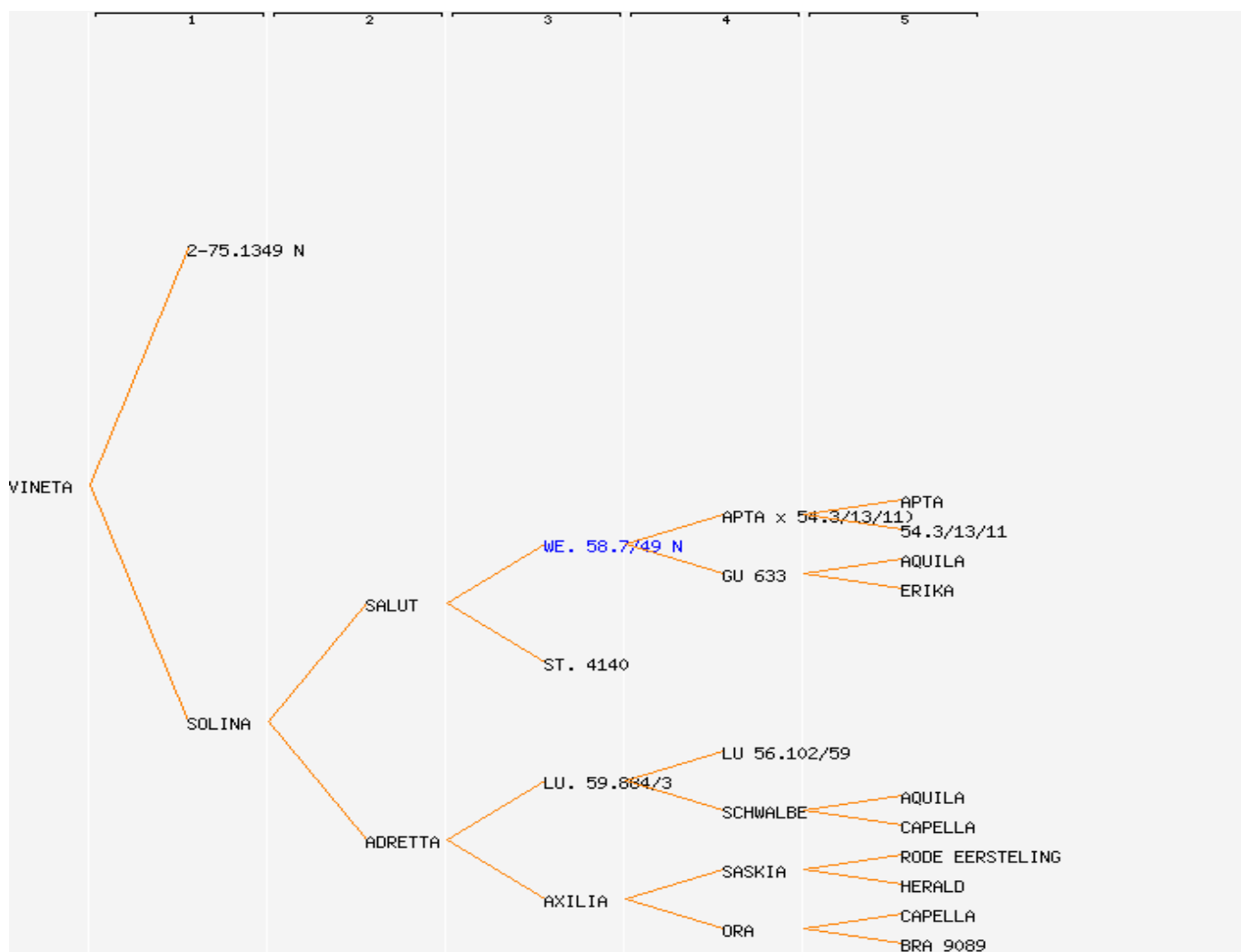
Příloha č. 12: Rodokmen odrůdy Satina



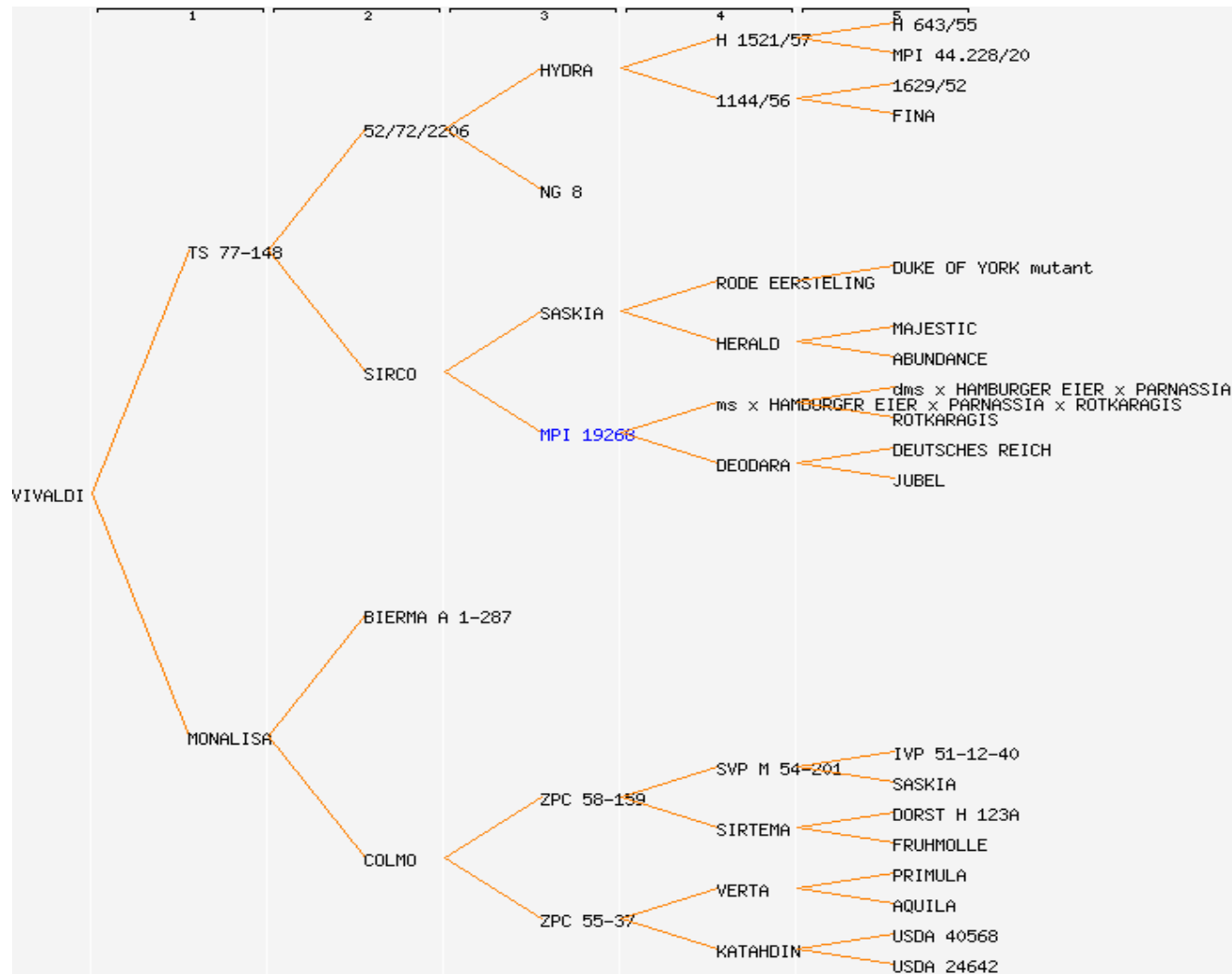
Příloha č. 13: Rodokmen odrůdy Sinora



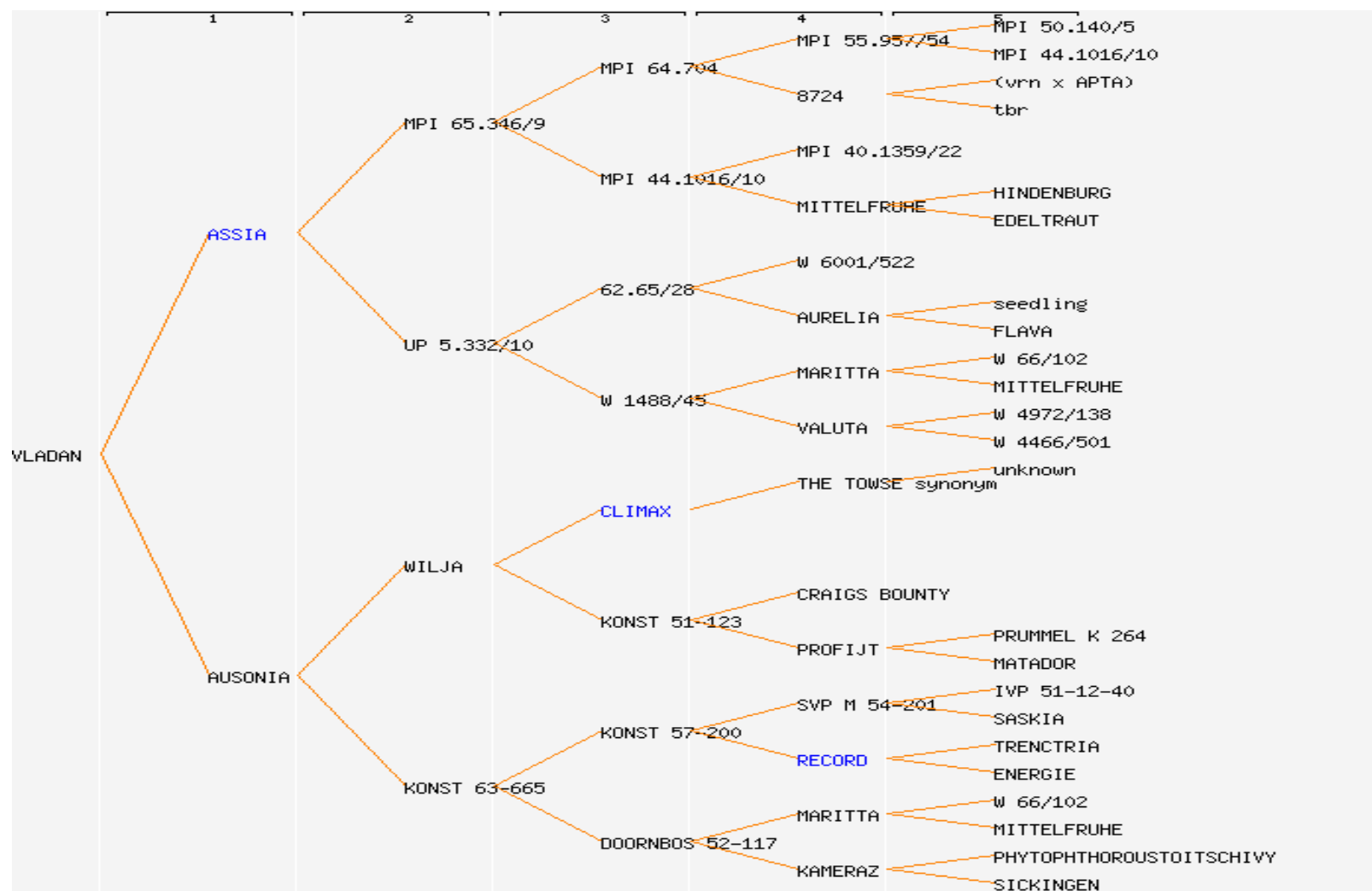
Příloha č. 14: Rodokmen odrůdy Tomensa



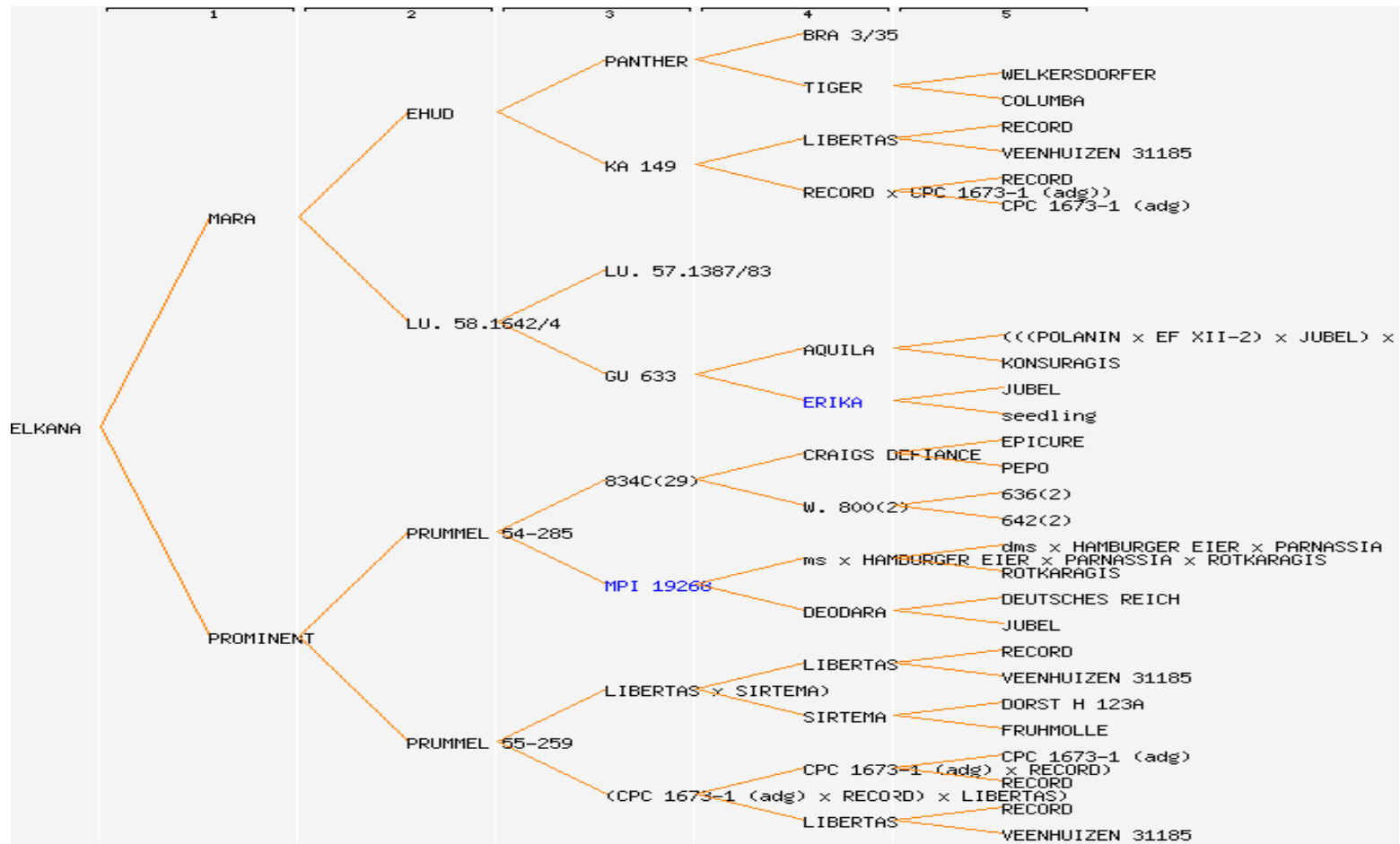
Příloha č. 15: Rodokmen odrůdy Vineta



Příloha č. 16: Rodokmen odrůdy Vivaldi



Příloha č. 17: Rodokmen odrůdy Vladan



Příloha č. 18: Rodokmen odrůdy Elkana

Ing. Lenka Hanusová

Osobní informace

Bydliště: Nebahovy 63, 384 01
Datum narození: 19. 04. 1979
Místo narození: Jindřichův Hradec
Rodinný stav: svobodná
Telefon: +420 728 756 958
E-mail: len.hanusova@seznam.cz

Vzdělání

- 2003 - 2006 studium DSP (Doktorský studijní program)
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Biotechnologické centrum
obor: Speciální produkce rostlinná
téma: Identifikace inhibitorů proteáz
- 1998 – 2003 Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
směr: Zemědělské inženýrství
obor: Všeobecné zemědělství
specializace: Genové inženýrství a šlechtění rostlin
diplomová práce: Sekvenování segmentu RNA 3 mop-
top viru bramboru
- 1997 – 1998 EDUCO – jazyková škola - České Budějovice
- státní zkouška z německého jazyka
- 1990 – 1997 víceleté gymnázium - Prachatice

Praxe

- od 1. 3. 2006 odborný asistent na katedře genetiky, šlechtění a
výživy zvířat ZF JU
- 11,12/2004 stáž - oddělení biochemie, Institut Jože Štefana,
Ljubljana, Slovinsko
- 8/2005 stáž – Laboratoř charakterizace molekulární struktury,
Mikrobiologický ústav, Akademie věd České
republiky, Praha - Krč
- 2001 – 2003 diplomová práce na Ústavu molekulární biologie
rostlin, Akademie věd České republiky, oddělení
rostlinné virologie – vytvořena sekvence MTcz z RNA
3 u mop top viru, publikovaná v GenBank

Seznam publikací

Vědecké časopisy s impakt faktorem

Hanusová, L.; Čurn, V. (2007): Protease Inhibitors in Potato Tubers. Chemické listy 101 (7), 536 – 541.

Recenzované časopisy

Řehout, V.; Hanusová, L.; Čítek, J.; Vrabcová, P.: Transgene detection in food using PCR methods: A review. Journal of Agrobiology, in press

Ostatní odborné časopisy

Řehout, V.; Košvanec, K.; Htradecká, E.; Čítek, J.; Hanusová, L. (2007): Problémy a perspektivy chovu genové rezervy českých červinek. Agromagazín, 2: 42 - 45.

Příspěvky na konferenci

Hanusová, L.; Vrabcová, P.; Řehout, V. (2007): Detekce fragmentů DNA z krmiv obsahujících geneticky modifikované organismy v krvi kuřat. Sborník příspěvků z VII. mezinárodní konference doktorandů a pregraduálních studentů „Genetika šlechtění zvířat“, MZLU Brno.

Hanusová, L.; Řehout, V.; Čítek, J.; Vrabcová, P. (2008): The methods of transgene detection in GMO food. Sborník příspěvků z konference Biotechnologie, ZF JU České Budějovice

Seznam absolvovaných stáží

Zahraniční stáže

11,12 / 2004 – oddělení biochemie, Institut Jože Štefana, Ljubljana, Slovinsko

Stáže v ČR

8/2005 – Laboratoř charakterizace molekulární struktury, mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Praha - Krč