

Literatura

- Farkas, E., Palkovics, L., Mikulás, J., Balázs, E. 1999. - Acta Phytopathol. Entomol. Hung. **34**: 7.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. - Anal. Biochem. **162**: 156.
- Kiefer, E. Heller, W., Ernst, D. 2000. - Plant Mol. Biol. Rep. **18**: 33.
- Lal, L., Sahoo, R., Gupta, R.K., Sharma, P., Kumar, S. 2001. - Plant Mol. Biol. Rep. **19**: 181a.
- Malnoy, M. Reynoird, J.P., Mourgues, F., Chevreau, E., Simoneau, P. 2001. - Plant Mol. Biol. Rep. **19**: 69a.
- Matoušek, J., Patzak, J. 2000. - Biol. Plant. **43**: 145.
- Matoušek, J., Trněná, L., Svoboda, P., Růžková, P. 1994. - Rostlinná Výroba **40**: 973.
- Patzak, J., Matoušek, J., Krofta, K., Svoboda, P. 2001. - Biol. Plant. **44**: 579.
- Salzman, R.A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. 1999. - Plant Mol. Biol. Rep. **17**: 11.

Poděkování Na závěr bych rád poděkoval Aleně Henychové za její technickou asistenci při zpracování vzorků, laboratoři RNDr. Jaroslavova Matouška, CSc z Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích za provedení radioaktivních *Dot-blot* molekulárních hybridizací a Národní agentuře pro zemědělský výzkum při MZe ČR za finanční podporu vědeckého projektu QC1183 „Komplexní diagnostika a rozšíření viroidních patogenů chmele, brambor, révy vinné, ovocných a okrasných kultur v ČR“, v rámci jehož řešení byly experimenty provedeny.

Stanovení aktivit rostlinných fosfolipas *in situ* s využitím fluorescenčně značených substrátů

PŘEMYSL PEJCHAR^{1,2}, OLGA VALENTOVÁ¹, JAN MARTINEC²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6-Dejvice, ²Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6-Lysolaje, (tel.: 296 780 420, e-mail: pejchar@ueb.cas.cz)

Úvod

Podstatnou část biologických membrán tvoří fosfolipidy, jejichž funkce ve vyšších rostlinách zahrnují mimo jiné zakotvení membránových proteinů, modifikaci mastných kyselin, aktivaci enzymů a zprostředkování signálních kaskád (Chapman 1998).

Přenos signálu přes membránu spočívá obvykle v zachycení signálu receptorem na povrchu membrány. Transmembránová signalizace probíhá ovlivněním propustnosti iontových kanálů nebo pomocí kinasových receptorů a receptorů, jež aktivují efektorové enzymy, které následně produkují intracelulární druhé posly. Ti mohou být odvozeni např. od membránových komponent. Druzí poslové nesou informaci k dalším cílům, například ke kinasám, které aktivují další kaskádu reakcí (Munnik *et al.* 1999).

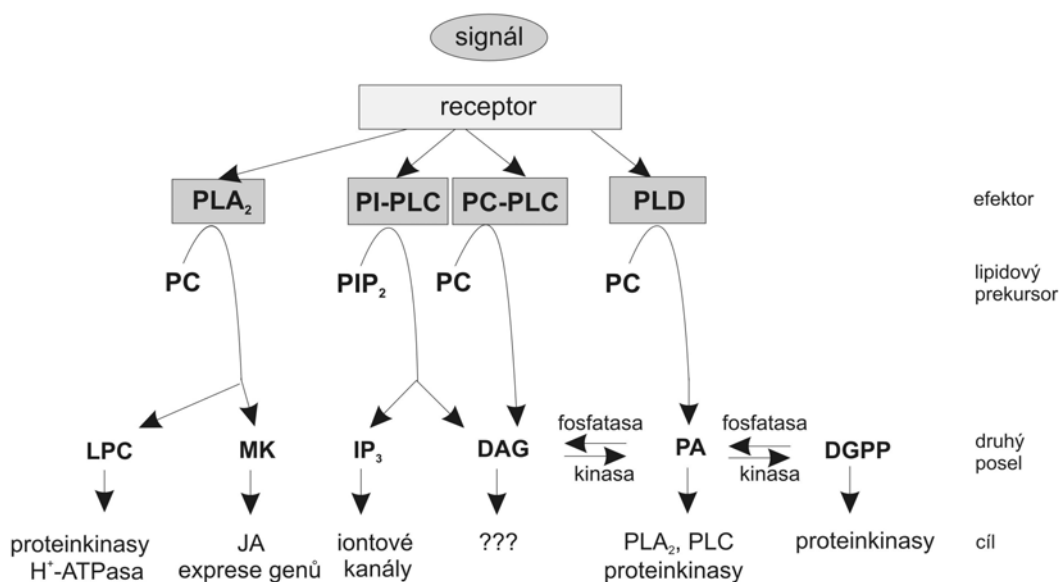
V případě fosfolipidové signální dráhy jsou membránovými komponentami fosfolipidy a efektorovými enzymy fosfolipasy, fosfatasy a kinasy. Tyto enzymy a produkty

jejich reakcí jsou organizovány do složitěho systému, schopného specificky reagovat na různé extracelulární podněty. Produkty hydrolysy fosfolipasami se mohou stát reaktanty pro další reakci jako v případě kyseliny fosfatidové (PA), která může být dále přeměněna fosfolipasou A₂ na kyselinu lysofosfatidovou nebo fosfatasou na diacylglycerol (DAG). Zavedením dalšího fosfátu do molekuly PA za katalysy kinasou vzniká v rostlinách nově identifikovaný fosfolipid, diacylglycerolpyrofosfát (DGPP) (Munnik *et al.* 1999). Celkové schéma fosfolipidového signálního systému je uvedeno na obr. 1.

V posledním desetiletí se, vzhledem k vysoké citlivosti a komerčnímu zpřístupnění, rozšířilo používání fluorescenčně značených fosfolipidů pro stanovení aktivit fosfolipas *in vitro* i *in situ*. Detekce fosfolipidů nesoucích fluorescenční značku BODIPY (4,4-difluoro-3a,4a-diasa-s-indacen, firmy Molecular Probes) se objevuje v několika studiích se zaměřením zejména na fosfolipas A₂ (Paul *et al.* 1998, Scherer *et al.* 2000). Žádná z prací se však nevěnuje fosfolipidovému signálnímu systému jako celku. Naším cílem bylo zavedení metody, která by dovolovala sledovat aktivity hlavních fosfolipas pomocí stanovení vznikajících fluorescenčně značených produktů a následně tak usuzovat na možné interakce mezi jednotlivými fosfolipasami, tvořícími komplexní síť fosfolipidového signálního systému.

Podstata metody

Metoda stanovení fosfolipasových aktivit *in situ* je založena na inkorporaci fluorescenčně značeného substrátu BODIPY-fosfatidylcholinu (BPC) (Paul *et al.* 1998) (obr. 2),

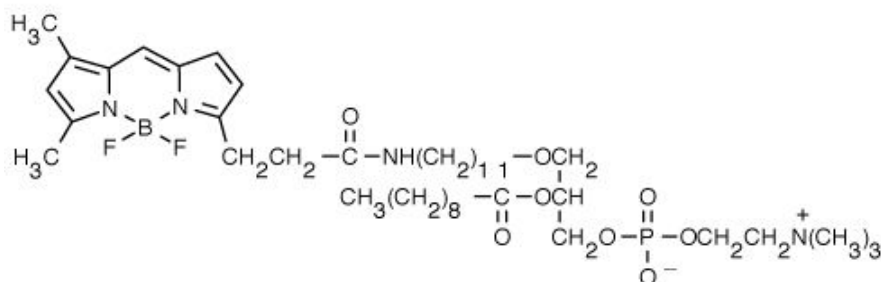


Obr. 1. Fosfolipidový signální systém. DAG - diacylglycerol, DGPP - diacylglycerolpyrofosfát, IP₃ - inositol-1,4,5-trisfosfát, JA - kyselina jasmonová, LPC - lysofosfatidylcholin, MK - mastné kyseliny, PA - kyselina fosfatidová, PC - fosfatidylcholin, PIP₂ - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, PC-PLC-fosfatidylcholin-specifická fosfolipasa C, PI-PLC - fosfatidylinositol-specifická fosfolipasa C, PLA₂ - fosfolipasa A₂, PLD - fosfolipasa D. (Upraveno podle Munnik *et al.* 1999).

do buněk suspenzních kultur tabáku BY-2 a VBI-0. S výhodou byly použity tři různé typy fluorescenčně značených substrátů, lišících se umístěním fluorescenční značky v molekule; tímto se docílí rozpoznání všech hlavních produktů reakcí katalyzovaných fosfolipasami (tab. 1) (Pejchar 2002).

Většina procesů spojených s přenosem signálů fosfolipidovou signální dráhou probíhá v plasmatické membráně. Nezbytným předpokladem pro využití fluorescenčně značených substrátů ke studiu těchto drah *in situ* je tedy jejich začlenění do membrány.

Po ošetření účinnými látkami jsou produkty reakcí extrahovány do organické fáze a analyzovány tenkovrstevnou chromatografií.



Obr. 2. Struktura eth-BODIPY-fosfatidylcholinu (eth-BPC). Fluorescenční značka v poloze *sn*-1, etherová vazba.

Tab. 1 Produkty vzniklé hydrolýzou jednotlivých fluorescenčních substrátů.

typ substrátu	fosfolipasa	produkty s fluorescenční značkou	neznačené produkty
eth-BPC (fluorescenční značka v poloze <i>sn</i> -1, etherová vazba)	PLA1	neštěpí	neštěpí
	PLA2	lysofosfatidylcholin	mastná kyselina
	PLC	diacylglycerol	fosfocholin
	PLD	kys. fosfatidová	cholin
β -BPC (fluorescenční značka v poloze <i>sn</i> -2, esterová vazba)	PLA1	lysofosfatidylcholin	mastná kyselina
	PLA2	mastná kyselina	lysofosfatidylcholin
	PLC	diacylglycerol	fosfocholin
	PLD	kys. fosfatidová	cholin
bis-BPC (fluorescenční značka v poloze <i>sn</i> -1 i <i>sn</i> -2, esterová vazba)	PLA1	lysofosfatidylcholin, mastná kyselina	x
	PLA2	lysofosfatidylcholin, mastná kyselina	x
	PLC	diacylglycerol	fosfocholin
	PLD	kys. fosfatidová	cholin

Chemikálie, přístroje a rostlinný materiál

Chemikálie:

ethanol (Merck), glycin (Aldrich), chloroform (Merck), inositol (Sigma), hydrolyzát kaseinu (Sigma), kys. 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (Sigma), kys. α -naftyloctová (NAA) (Sigma), kys. nikotinová (Sigma), MES (Sigma), methanol (Merck), MS (Murashige, Skoog) směs obsahující KNO_3 a NH_4NO_3 (Sigma), pyridoxin (Sigma), SDS (Pharmacia Biotech), sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA) (Sigma), thiamin (Sigma), Triton X-100 (Aldrich), ostatní běžně používané chemikálie čistoty p.a.

Fluorescenční substráty BODIPY-fosfatidylcholin:

eth-BPC (Molecular Probes, D-3771), β -BPC (Molecular Probes, D 3792), bis-BPC (Molecular Probes, B-7701).

Enzymy:

fosfolipasa A_2 z včelího jedu (*Apis mellifera*) (Sigma P-9279), fosfolipasa C z *Bacillus cereus* (Sigma P-6135), fosfolipasa D z kapusty, typ IV (Sigma P-8398).

Rostlinný materiál:

buněčné linie kultury tabáku BY-2 (Nagata *et al.* 1992) a VBI-0 (Opatrný a Opatrná 1976), odvozené z *Nicotiana tabacum* L., cv. Bright Yellow 2, resp. Virginia Bright Italia. Obě linie byly udržovány jako suspenzní kultury pasážováním v týdenním intervalu. Linie BY-2 byla pasážována v poměru 1 : 12,5 (8 ml inokula o hustotě přibližně 2×10^6 buněk. ml^{-1} do 100 ml čerstvého média). Složení média a výsledné koncentrace: základní MS směs (4,492 g. l^{-1}), KH_2PO_4 (0,2 g. l^{-1}), sacharosa (30 g. l^{-1}), myoinositol (50 mg. l^{-1}), thiamin (1 mg. l^{-1}), 2,4-D (0,553 mg. l^{-1}), upraveno na pH 5,8 přidávkem 1M KOH. Linie VBI-0 pak byla pasážována v poměru 1 : 8,3 (hustota inokula přibližně 5×10^4 buněk ml^{-1}) do kapalného média dle Heller (1953), doplněného syntetickými auxiny NAA (1 mg. l^{-1}) a 2,4-D (1 mg. l^{-1}). Růst buněk probíhal v Erlenmayerových baňkách při 27 °C v temnu. Baňky byly umístěny na orbitální třepačce (INR-200, Sanyo-Gallenkamp) při 150 otáčkách za minutu (průměr otáčení 32 mm).

Přístroje:

Digitální kamera Kodak DC120, mikroskop Nikon Eclipse E600, monochromatická integrační kamera COHU 4910, nanášec vzorků pro TLC CAMAG Linomat IV, orbitální inkubátor pro buněčné kultury Sanyo-Gallenkamp, transiluminátor Biometra TI 1, vakuový koncentrátor pro mikrozkuhavky Savant SpeedVac SC100, vymrazovací past Heto CT 60E.

Programové vybavení:

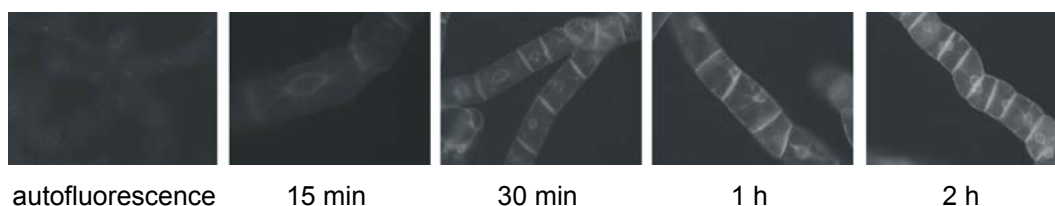
Kodak ds 1D (Kodak), LUCIA GF (Laboratory Imaging).

Pracovní postup

Sledování inkorporace fluorescenčně značeného substrátu

Průběh inkorporace fluorescenčně značeného substrátu byl sledován fluorescenční mikroskopií. K suspenzní kultuře byl přidán BPC (0,66 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ suspenze o hustotě přibližně 1×10^4 buněk. ml^{-1}). V různých časových intervalech byl odebrán 1 ml suspenze. Po filtrování a promytí byly buňky sledovány fluorescenční mikroskopií v oblasti UV-B spektra

(excitace: 450 – 490 nm, emise: 520 nm). Mikroskopické obrázky byly zaznamenány monochromatickou integrační kamerou a uloženy v podobě digitalizovaného snímku (obr. 3).

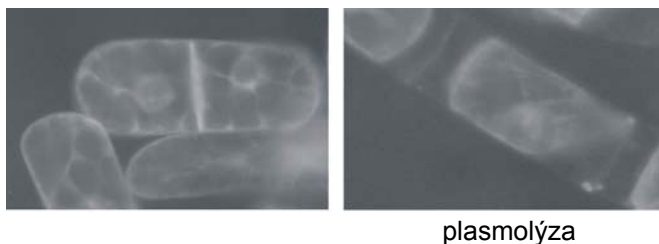


Obr. 3. Průběh inkorporace fluorescenčně značeného substrátu bis-BPC do buněk tabákové linie VBI-0 (2-denní).

Začlenění substrátu probíhalo do buněčných membrán a nikoliv do buněčné stěny, což bylo dokázáno pokusem, kdy byl k buňkám přidán 1 M NaCl, jehož působením došlo k plasmolýze buněk (obr. 4).

Inkubace buněk se substrátem a ošetření účinnými látkami

K suspenzi buněk byl přidán BPC ($0,66 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ suspenze). Suspenze byla inkubována v Erlenmayerově baňce 20 min v temnu za laboratorní teploty na třepačce ($150 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$), aby došlo k inkorporaci substrátu do buněčných membrán. Během inkubace bylo do skleněných zkumavek připraveno $100 \mu\text{l}$ roztoku studovaných látek daných koncentrací (výsledný objem reakce byl 1 ml). Po inkubaci bylo do zkumavek přidáno $900 \mu\text{l}$ suspenze buněk a zkumavky byly umístěny na třepačku v šikmé poloze tak, aby docházelo k účinnému míchání suspenze. Typicky probíhala tato inkubace 90 min při laboratorní teplotě v temnu a při $150 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$.



plasmolýza

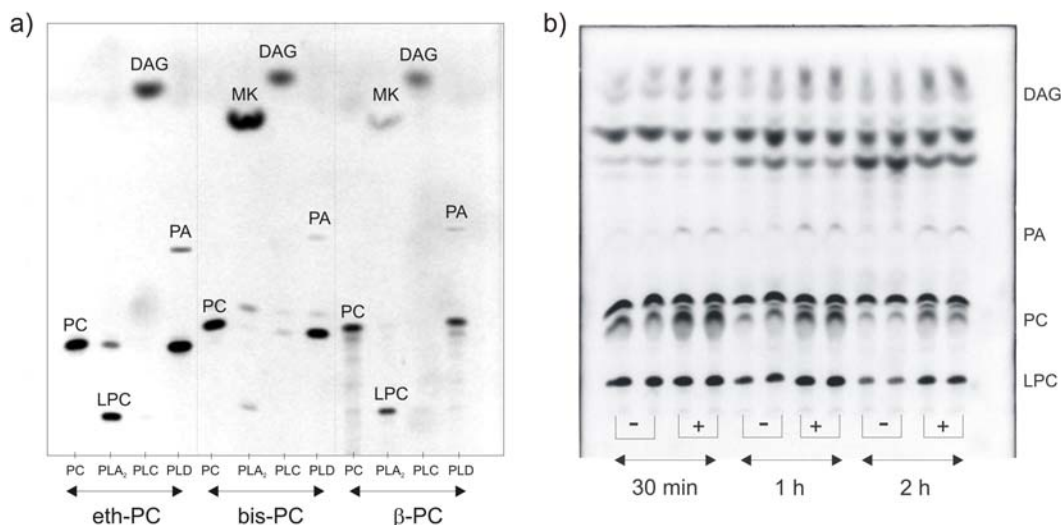
Obr. 4. Plasmolýza buněk tabákové linie VBI-0 (2-denní) po působení NaCl (1 M; 15 min). Substrát eth-BPC.

Extrakce fluorescenčně značených produktů

Inkubace byla zastavena přidáním 4 ml ledového „stop činidla“ (methanol/chloroform/konc. HCl 200 : 100 : 1,5 (obj.)). Vzorby byly promíchány a ponechány 30 min v temnu při laboratorní teplotě. Poté byly přidány 2 ml 0,1 M KCl, vzorky byly opět promíchány a ponechány v temnu při 4°C minimálně 30 min.

Oddělení vodné a organické fáze bylo urychleno centrifugací 15 min při 420 g a 4°C . $950 \mu\text{l}$ spodní organické fáze, obsahující sledované produkty, bylo převedeno do mikrozkušavek, vysušeno vakuovým koncentrátorem a rozpuštěno ve $40 \mu\text{l}$ ethanolu.

Kvantitativní stanovení jednotlivých reakčních produktů byla provedena jejich srovnáním se známými standardy, které byly připraveny štěpením fluorescenčně značených substrátů (BPC) komerčními preparáty jednotlivých fosfolipas (obr. 5).



Obr. 5. Vysokoúčinná tenkovrstevná chromatografie. a) rozdělení produktů štěpení jednotlivých fluorescenčně značených substrátů komerčními preparáty fosfolipas. b) ukázka rozdělení produktů reakcí *in situ*. (+) působení AlCl_3 (0,1 M; 30 min, 1 h, 2 h) na buňky linie BY-2 (2-denní) (-) kontrola. DAG – diacylglycerol, LPC – lysofosfatidylcholin, MK – mastná kyselina, PA – kyselina fosfatidová, PC – fosfatidylcholin.

Příprava standardů

Standard lysofosfatidylcholinu a mastných kyselin

Standards byly připraveny štěpením všech tří typů BPC fosfolipasou A_2 . Výsledné koncentrace v reakční směsi byly: 43,9 mM Mes-NaOH (pH 5,6), 1 % (obj.) Triton X-100, 10 mM CaCl_2 , 3,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BPC, 2,45 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLA_2 . Objem reakční směsi byl 1 ml.

Standard diacylglycerolu

Standards byly připraveny štěpením všech tří typů BPC fosfolipasou C. Výsledné koncentrace v reakční směsi byly: 48,9 mM Mes-NaOH (pH 6,0), 0,05 % (obj.) Triton X-100, 5 mM CaCl_2 , 3,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BPC, 0,2 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLC. Objem reakční směsi byl 1 ml.

Standard kyseliny fosfatidové

Standards byly připraveny štěpením všech tří typů BPC fosfolipasou D. Výsledné koncentrace v reakční směsi byly: 39,5 mM Mes-NaOH (pH 5,6), 1 % (obj.) Triton X 100, 50 mM CaCl_2 , 8 mM SDS, 3,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BPC, 30 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLD. Objem reakční směsi byl 1 ml.

Reakce byla vždy zahájena přidáním enzymu a probíhala 30 min při 30 °C (fosfolipasa D) nebo 37 °C (fosfolipasy A_2 a C). Zastavení reakce a další postup je shodný s postupem popsaným výše. Veškerá spodní fáze byla převedena do mikrozkušavek, vysušena vakuovým koncentrátorem a rozpuštěna v 500 μl ethanolu.

Analýza produktů

Pro vysokoúčinnou tenkovrstevnou chromatografii (HP-TLC) byly použity desky silikagel 60 pro HP-TLC o rozměrech 10 × 10 cm (Merck). Vzorky byly na desku naneseny pomocí nanášecího zařízení Linomat IV 1 cm od spodního okraje desky v objemu 1 - 20 µl podle toho, který produkt měl být kvantifikován. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/methanol/voda 65 : 25 : 4 (obj.). Deska byla vložena do horizontální vyvíjecí nádoby (CAMAG) a sycena párami mobilní fáze po dobu 10 min. Pak bylo provedeno samotné vyvíjení, dokud čelo mobilní fáze nedosáhlo přibližně 1 cm od horního okraje desky. K dělení látek docházelo po dobu 20 - 25 min v temnu. Jednotlivé fluorescenční produkty byly zviditelněny excitací ultrafialovým světlem transiluminátoru. Obraz desky byl zaznamenán kamerou Kodak a produkty kvantifikovány pomocí programu Kodak *ds 1D*.

Alternativní metody

Vyzkoušen byl i substrát s nitrobenzoxadiazolovou (NBD) fluorescenční značkou. Jak výsledky inkorporace, tak i citlivost metody byly však v tomto případě nižší než u značky BODIPY.

Jako alternativa pro analýzu produktů je vyvíjena metoda s použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V současné době probíhá testování různých kolon, složení mobilní fáze a průběhu eluce. Nespornou výhodou HPLC by byla větší možnost automatizace nanášení vzorků ve velkých sériích pomocí automatického dávkovače a také vyšší citlivost, zajištěná fluorescenčním detektorem.

Úskalí metody

Fluorescenční substráty jsou citlivé na světlo. Proto je třeba veškeré úkony provádět v temnu nebo alespoň zabránit přístupu světla např. přikrytím reakční směsi černou látkou.

Fluorescenční značka mění velikost molekuly fosfolipidu, čímž může docházet k ovlivnění interakce substrát - aktivní centrum fosfolipas a tím ke snížení jejich aktivity. Tento jev byl zřejmě příčinou nesnází při přípravě standardu fosfatidové kyseliny, který se nakonec podařilo připravit, ale jen v omezené míře v porovnání s ostatními standardy. Fosfolipasa D tedy jeví menší ochotu přeměňovat tento typ substrátu. K této skutečnosti je třeba přihlídnout při interpretaci výsledků.

Vzhledem k různému pozadí při zaznamenávání obrazu TLC desky kamerou je porovnání množství jednotlivých fluorescenčních produktů (aktivit jednotlivých fosfolipas) možné pouze v rámci jedné TLC desky (použitím HPLC by byl tento problém odstraněn).

Tipy a triky

Inkubace substrátu může být provedena i v kádince s magnetickým míchadlem jako alternativa k použití Erlenmayerovy baňky. Při práci se suspenzí buněk je třeba používat zastřižené špičky. Výhodné je šikmě položené zkumavky umístěné ve stojanu na třepače vzájemně upevnit např. lepicí páskou tak, aby nedocházelo k otáčení zkumavek během třepání. Tím se zabrání ulpívání buněk na stěnách zkumavek.

Vzhledem k promíchávání suspenze a její tendenci k usazování je třeba nalézt vhodný poměr sklonu zkumavek a rychlosti otáček v závislosti na použité třepačce. Také použití zkumavek s kulatým dnem se ukázalo výhodnější než použití zkumavek se dnem špičatým. Ty jsou ale naopak lepší při pozdějším odebrání spodní organické fáze, obsahující produkty.

Při odebrání spodní organické fáze se s výhodou uplatňuje následující postup: Nejprve se odebere veškeré množství spodní fáze do mikrozukmavky a následně se odebere přesně 950 µl do dalších mikrozukmavky. Přímé odebrání přesného množství spodní fáze je obtížné z důvodu protékání organické fáze.

Pokud není možné provést celý pokus v jednom dni, dá se přerušit po přidání KCl nebo po vysušení vakuovým koncentrátorem (zkumavky se umístí do -20 °C).

Finanční a časová náročnost

Cena jedné desky pro HP-TLC je 160 Kč, přičemž na ni lze nanést až 10 vzorků. Cena fluorescenčního substrátu se pohybuje v rozmezí 3,50 - 35 Kč na vzorek, v závislosti na typu fluorescenčního substrátu. Ostatní investice jsou v rámci běžného laboratorního vybavení.

Celý pokus lze provést během 8 - 9 hodin.

Literatura

- | | |
|--|--|
| Heller, R. 1953. - Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14 : 1. | Opatrný, Z., Opatrná, J. 1976. - Biol. Plant. 18 : 381. |
| Chapman, K.D. 1998. - Trends Plant Sci. 3 : 419. | Paul, R.U., Holk, A., Scherer, G.F.E. 1998. - Plant J. 16 : 601. |
| Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. 1999. - Biochim. Biophys. Acta 1439 : 175. | Pejchar, P. 2002. - Diplomová práce. VŠCHT, Praha |
| Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S. 1992. - Int. Rev. Cytol. 132 : 1. | Scherer, G.F.E., Paul, R.U., Holk, A. 2000. - Plant Growth Regul. 32 : 123. |

Sledování interakcí DNA s proteiny pomocí elektroforézy v agarosových gelech s následným *western* přenosem a imunodetekcí

HANA PIVOŇKOVÁ, KATEŘINA NĚMCOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; (tel.: 541 517 197, e-mail: hapi@ibp.cz)

Úvod

Interakce bílkovin s DNA hrají klíčové role v regulaci důležitých procesů v buňkách, včetně replikace DNA, transkripce, oprav DNA apod. Mezi významné regulační proteiny interagující specifickým způsobem s DNA patří nádorový supresor protein p53 (El-Deiry 1998, Apella a Anderson 2001). Tento protein, skládající se z 393 aminokyselinových zbytků, se váže na DNA jako tetramer jednak sekvenčně specificky (prostřednictvím své centrální domény), jednak je schopen rozpoznávat určité struktury DNA (C-koncovou