



## Proteomika nasion

Tomasz Pawłowski

Instytut Dendrologii, Polska Akademia Nauk, Kórnik

### Seed proteomics

#### Summary

Proteome analysis is becoming a powerful tool in the functional characterization of seeds. About 150 original articles focusing on seed proteomics have been published. These papers concern the proteome of at least 21 plant species, but have concentrated mainly on *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. The scientific objectives have ranged from proteomic analysis of whole, separate parts of the seeds, seed development, maturation, dormancy, dormancy breaking, germination, response to various stresses, to characterization of individual proteins. The dominant analytical platform has been 2-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry, but new techniques such as difference gel electrophoresis and isotope coded affinity tags have begun to make an impact.

#### Key words:

seed proteome, seed development, germination, mass spectrometry, two-dimensional gel electrophoresis.

### 1. Wprowadzenie

W wyszukiwarce “ISI Web of Knowledge” od 1997 do maja 2008 r. wygenerowano 147 publikacji w odpowiedzi na słowa kluczowe “proteom\* and seed”. W większości badań koncentruje się na modelowej roślinie dwuliściennej jaką jest rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*) oraz modelowej roślinie jednoliściennej jaką jest ryż (*Oryza sativa*). Kompletnie zsekwencjonowane genomy tych gatunków są dostępne w publicznych bazach danych, co ułatwia identyfikację białek na podstawie wyników analiz identyfikacji białek metodami spektrometrii mas (MS, ang. *mass spectrometry*). Innymi gatunkami będącymi przedmiotem badań są: jęczmień, pszenica oraz soja. Spośród ogólnej liczby 500. prac

#### Adres do korespondencji

Tomasz Pawłowski,  
Instytut Dendrologii,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Parkowa 5,  
62-035 Kórnik;  
e-mail:  
tapawlow@man.poznan.pl

---

#### biotechnologia

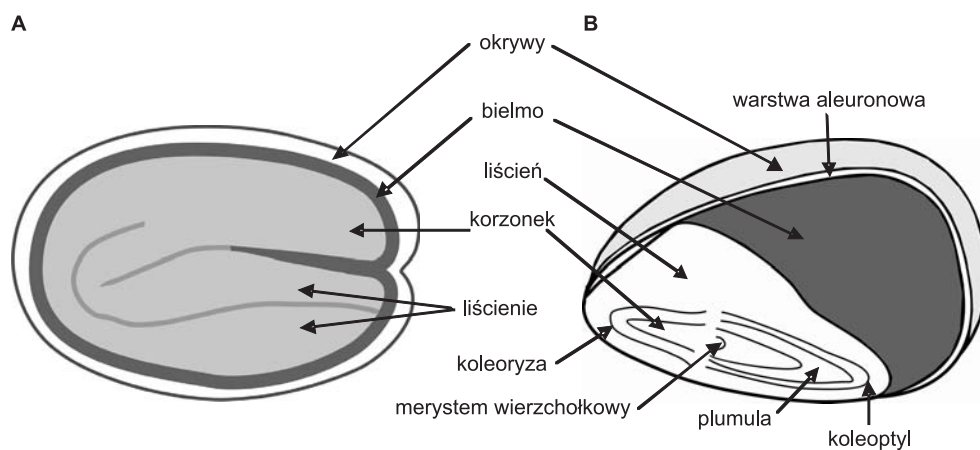
1 (84) 104–118 2009

dotyczących proteomiki roślin, 14 to prace przeglądowe (np. 1-3), w tym 3 poświęcone tylko nasionom: pszenicy (4) oraz ryżu (5,6).

Proteomika znajduje zastosowanie w wielu aspektach badań na roślinach, m.in. w badaniach biologii nasion. Proteomika nie skupia się już wyłącznie na opisie białek, ale na powiązaniu ich funkcji z badanym procesem, co stwarza szerokie perspektywy w dalszym jej wykorzystaniu.

Brak kompletnie zsekwencjonowanych genomów roślin, będących obiektem zainteresowań badaczy, utrudnia identyfikację wyizolowanych białek. Dla wielu gatunków brak jest danych o sekwencji DNA lub etykiet ekspresyjnych (EST, ang. *expressed sequence tags*), co skutkuje niemożliwością identyfikacji białek oraz niskim poziomem ufności. Powoli rośnie jednak liczba baz danych sekwencji genomowych, przykładem jest opublikowana ostatnio baza genomu *Populus trichocarpa*, co otwiera nowe możliwości zastosowania metod proteomicznych do badań drzew. Równocześnie wzrasta liczba prac zamieszczających wyniki analiz całych proteomów roślin lub poszczególnych ich organów: liści, łodyg, nasion itd., np. *Arabidopsis* (7).

Analiza zmian zachodzących w proteomie znajduje zastosowanie w badaniach różnorodnych procesów fizjologicznych i biochemicznych nasion. Opublikowane dotychczas prace wykonywane były na poziomie całego proteomu nasiona, subproteomów poszczególnych części nasiona (tab. i rys.): zarodka, korzonka, liścieni, bielma, okrywy oraz warstwy aleuronowej, substancji zapasowych, białek jądrowych czy błonowych. Na podstawie analizy zmian w proteomie roślinnym można badać bioróżnorodność genetyczną, określać wpływ różnych czynników stresowych na biologię nasion, czy też badać różne mechanizmy fizjologiczne, np. działanie hormonów. Innym ważnym aspektem prac są badania nad poprawą cech jakościowych nasion, i – co za tym idzie – cech jakościowych żywności, tworzeniem nowych



Rys. Schemat budowy nasion roślin: A – dwuliściennych (*Arabidopsis thaliana*), B – jednoliściennych (zboża).

odmian, czy też alergenami zawartymi w nasionach. Zastosowanie technik proteomicznych może służyć do oceny jakości i bezpieczeństwa żywności i pasz otrzymanych z nasion roślin zmodyfikowanych genetycznie (8,9). Ostatecznie, techniki stosowane do badania proteomów traktowane jako technologia, znajdują zastosowanie w praktyce, narodził się w związku z tym nowy termin „proteomika procesów przemysłowych”.

Tabela

**Przedmiot badań, badane procesy biologiczne oraz zastosowanie praktyczne w publikacjach o proteomice nasion**

Roślina (19)	Proteomy	Procesy biologiczne	Aspekt praktyczny
<b>Modelowa</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> (10) lucerna ( <i>Medicago truncatula</i> ) (5) <b>Zboża</b> ryż ( <i>Oryza sativa</i> ) (13) kukurydza ( <i>Zea mays</i> ) (2) pszenica ( <i>Triticum aestivum</i> ) (8) jęczmień ( <i>Hordeum vulgare</i> ) (12) <b>Drzewa</b> <i>Prunus campenulata</i> (1) kauczukowiec ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) (1) buk ( <i>Fagus sylvatica</i> ) (1) <b>Pozostałe</b> soja ( <i>Glycine max</i> ) (8) łubin ( <i>Lupinus albus</i> ) (2) orzech brazylijski ( <i>Bertholletia excelsa</i> ) (1) orzech ziemny ( <i>Arachis hypogea</i> ) (1) słonecznik ( <i>Helianthus annuus</i> ) (3) rzepak ( <i>Brassica napus</i> ) (2) gorczyca ( <i>Brassica kaber</i> ) (1) rącznik ( <i>Ricinus communis</i> ) (2) pomidor ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) (1) <i>Capsicum</i> sp. (1) <i>Cleome gynandra</i> (1) <i>Cyclamen persicum</i> (1)	<b>Genotypy (12)</b> <b>/mutanty (3)/GMO (3)</b> <b>Organy/tkanki/komórki</b> nasiono (18) zarodek (9) korzonek (4) liścienie (2) bielmo (13) okrywy (4) warstwa aleuronowa (5) <b>Substancje zapasowe (1)</b> skrobia (1) albumina (1) białka zapasowe (8) $\alpha$ -amylaza (1) tłuszcze (4) <b>Specyficzne białka</b> białka błonowe (1) białka jądrowe (1) siateczka endoplazmatyczna (2)	<b>Rozwój i kiełkowanie</b> rozwój (11) dojrzewanie (2) ustępowanie spoczynku (3) kiełkowanie (25) <b>Odpowiedź hormonalna</b> ABA (3) gibbereliny (2) <b>Stres</b> promieniowanie (1) susza (2) stres solny (2) temperatura (3) stres osmotyczny (1) kadm (1) miedź (1) siarka (1) dwuchromian potasu (1) utlenianie (4) azot (1)	jakość słodowania (7) alergeny (4) jakość żywności (10) rozmnażanie wegetatywne (1) nowe odmiany (2) produkcja kauczuku (1) jakość nasion (1)

## 1.1. Metodologia

Do ekstrakcji białek najpowszechniej są używane dwie metody: strącanie w mieszaninie kwasu trichlorooctowego z acetonem oraz ekstrakcja fenolem. Chinnasamy i Rampitsch (10) stwierdzili, że najbardziej odpowiednim buforem do ekstrakcji białek pszenicy, do elektroforezy dwuwymiarowej w zakresie pH 4-7, jest roztwór zawierający chaotropy: mocznik i tiomocznik oraz detergenty: CHAPS i SB3-10. Z kolei bufor zawierający mocznik, tiomocznik, CHAPS i DeStreak reagent (GE Healthcare) był najbardziej odpowiedni do rozpuszczania białek zasadowych w zakresie pH 6-11. Natomiast Natarajan i wsp. (11) podali, że najlepszą metodą ekstrakcji białek nasion soi do elektroforezy dwuwymiarowej oraz identyfikacji z użyciem MALDI-TOF-MS jest strącanie w mieszaninie kwas trójchlorooctowy/aceton i ekstrakcja białek w buforze z mocznikiem i tiomocznikiem.

Do rozdzielania białek można wykorzystać elektroforezę dwuwymiarową (2D) na żelu poliakrylamidowym. W pierwszym kierunku wykorzystuje się ogniskowanie izoelektryczne (IEF) w gradience pH (amfolyty), z kolei w drugim – białka rozdzielane są w zależności od ich mas cząsteczkowych, po nałożeniu próbek z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu –SDS, elektroforeza (SDS-PAGE). W drugim podejściu wykorzystuje się techniki 2D chromatografii cieczowej na kolumnach z wymienniczym jonowym (kationit) i następnie z fazą odwróconą (RT C18). W tym przypadku przed nałożeniem na kolumnę mieszaninę białek poddaje się trawieniu proteazami (trypsyną). Do identyfikacji białek, oprócz klasycznej metody degradacji Edmana, powszechnie wykorzystuje się techniki spektrometrii mas. Najczęściej stosowane są: spektrometry z jonizacją laserem wspomaganą matrycą wyposażone w analizator mierzący czas przelotu (MALDI TOF MS, ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*) – oraz układy do chromatografii cieczowej sprzężone z tandemowymi analizatorami wyposażonymi w źródła jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (LC-ESI/MS/MS, ang. *Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry*).

Zastosowanie technik proteomicznych ‘drugiej generacji’ takich jak żelowa elektroforeza różnicowa (DIGE, ang. *Difference Gel Electrophoresis*) itp. jest jeszcze bardzo rzadkie. W jednej pracy zastosowano, metodę znakowania białek aminokwasami z wbudowanym izotopem (ICAT, ang. *isotope coded affinity tag labeling*) (12). Metoda ta ma zastosowanie w proteomice różnicowej. W jednej z prób określony aminokwas zostaje zastąpiony analogiem znakowanym  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  lub  $^{15}\text{N}$ . Następnie próby odniesienia i znakowana zostają ze sobą połączone, a ich proteomy wspólnie poddane analizie spektrometrycznej. Zarejestrowane widma masowe umożliwiają określenie ewentualnych różnic ilościowych pomiędzy analizowanymi próbkami.

## 2. Badane proteomy nasion

### 2.1. Badane subproteomy nasion: organy, tkanki, organelle

W większości badań cel doświadczeń stanowił proteom całego nasiona. Jeśli chodzi o części nasiona zainteresowanie badaczy koncentrowało się głównie na zarodku, bielmie (endosperm) czy warstwie aleuronowej (13). Li i wsp. skoncentrowali swoje badania na subproteomie jądrowym bielma ryżu (14). Autorzy opracowali metodę izolacji białek o bardzo niskiej zawartości, nie związanych z ziarnami skrobi. Zidentyfikowano 468 białek jądrowych korzystając z dwóch metod: MALDI-TOF/TOF oraz LC/LC/ESI/MS/MS, były to: czynniki transkrypcyjne, białka modyfikujące histony, białka kinetochorowe, białka wiążące mikrotubule do centromerów oraz białka transpozonowe. Wszystkie wyizolowane białka są związane z regulacją procesów rozwojowych nasion. Inna ciekawa praca dotyczyła badań białek siateczki endoplazmatycznej, głównego miejsca syntezy białek zapasowych i lipidów, w czasie rozwoju i kiełkowania nasion rącznika (*Ricinus communis*) (15,16). Białka wyizolowano korzystając z metody 2-D DIGE oraz zidentyfikowano korzystając z metod MALDI-TOF i LC/ESI/MS/MS. Drugą z wymienionych metod wykorzystano również w badaniach subproteomu błonowego warstwy aleuronowej nasion jęczmienia w czasie kiełkowania. Zidentyfikowano nowe izoformy H<sup>+</sup>-ATPazy oraz dwa białka biorące udział w regulacji kanałów jonowych (17).

### 2.2. Badane substancje zapasowe

Obiektem badań wielu prac proteomicznych były substancje zapasowe zmagazynowane w nasionach roślin uprawnych. W większości przypadków prace te miały charakter praktyczny. Badano przede wszystkim białkowe substancje zapasowe: gluteliny w ryżu (18), białka zapasowe w nasionach dzikiej gorczycy (*Brassica kaber*) i *Cleome gynandra* (19), konglutyny i globuliny w łubinie (20), albuminy w nasionach orzecha brazylijskiego (21), które są głównym materiałem zapasowym nasion wielu roślin m.in. jęczmienia. Stosując techniki proteomiczne w badaniach granul skrobi, zidentyfikowano 74 białka metodą MALDI-TOF MS i wykazano, że za wytwarzanie skrobi są odpowiedzialne syntazy granul skrobi (GBSS, ang. *granul bond starch synthase*) (22). Podczas badań proteomu nasion lucerny (*Medicago truncatula*) z wykorzystaniem metod elektroforezy 2-D oraz LC/ESI/MS/MS stwierdzono, że w trakcie kiełkowania nasion oraz wzrostu młodych siewek białka zapasowe, typu legumin są stopniowo zużywane jako źródło substancji odżywczych (23).

### 3. Genotypy, mutanty, GMO

Większość przeprowadzonych analiz proteomicznych dotyczyła nasion posiadających duże znaczenie komercyjne. Celem tych prac było zbadanie bioróżnorodności roślin użytkowych, badania nad mutantami oraz roślinami modyfikowanymi genetycznie. Skylas i wsp. wykorzystali metody proteomiki w celu rozróżnienia odmian uprawnych pszenicy (*Triticum aestivum*) (4). W swoich badaniach Islam i wsp. zidentyfikowali metodą MALDI TOF MS dwie nowe podjednostki gluteniny jako markera różnorodności genetycznej pszenicy (24). Newton i wsp. (25) oraz Majoula i wsp. (26,27) w swoich badaniach ujawnili różnice pomiędzy zawartością puroindolin (odpowiedzialnych za miękkość ziarna i jakość mąki) a odmianami pszenicy. Podczas analizy 16. genotypów soi metodami proteomicznymi wykazano genetyczny polimorfizm w białkach zapasowych typu glicynin (28). Metody proteomiki zastosowano również do badań różnorodności genetycznej rodzaju *Capsicum* (29). Finnie i wsp. (30,31) obserwowali różne izoformy 1-cys-peroksyredoksyny i  $\alpha$ -amylazy w różnych odmianach ziarniaków jęczmienia w czasie kiełkowania. W wymienionych badaniach stosowano metody MALDI TOF MS. Korzystając z możliwości, jakie dają techniki analityczne stosowane w badaniach proteomicznych, jak i też analiza QTL (ang. *Quantitative Trait Loci* – geny cech ilościowych), AFLP (ang. *Amplification Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu) i SSR (ang. *Simple Sequence Repeat* – tzw. marker mikrosatelitarny), oszacowano różnorodność genetyczną dziesięciu odmian pszenicy chlebowej (32).

Analiza proteomu, jak się okazuje, jest skuteczną metodą detekcji zmian spowodowanych w DNA modyfikacjami transgenicznymi. Islam i wsp. (18) badali zawartość białek zapasowych typu glutelin, będących wskaźnikiem jakości nasion, w transgenicznym ziarnie ryżu, z wbudowanym genem albuminy słonecznika kodującym białko bogate w siarkę. Stwierdzili oni zmniejszoną akumulację tych białek. Na podstawie przeprowadzonych analiz udowodniono też przemieszczanie się siarki z albumin do glutelin. Badano także proteom transgenicznego jęczmienia (33). Autorzy wykazali zmiany w ekspresji trzech białek związanych z obiegiem azotu podczas dojrzewania nasion, co może wpływać na szybkość wzrostu siewek podczas dodatkowego nawożenia azotem. Stwierdzili także, że białka mogą ulegać modyfikacjom posttranslacyjnym. Takie modyfikacje mogą potencjalnie zmieniać funkcje produktów transgenicznych. Do identyfikacji białek zastosowali metodę MALDI TOF MS.

Badania proteomiczne wykorzystuje się także do analizy rodowodowej, np. hybryd ryżu (34). Trisiroy i wsp. (35) wykorzystali techniki proteomiczne (MALDI Q/TOF oraz analizę sekwencji N-końca) do określenia różnic pomiędzy aromatycznymi i niearomatycznymi odmianami ryżu.

Wykorzystanie technik MS w badaniach proteomicznych jest skutecznym podejściem w badaniu interakcji genów w ekspresji białek, pozwala na określenie poliploidalności, np. odmian pszenicy (36), wpływu delekcji (10) czy dwutelocentryczności chromosomu na ekspresję białek (24).

Proteomiczna analiza nasion słonecznika posłużyła do selekcji odmian odpowiednich do uprawy pod względem zawartości olei. Na podstawie wyników wykazano, że zawartość olei jest związana z metabolizmem węglowodorów i syntezą białek, metodą DIGE oraz LC MS/MS zidentyfikowano 61 białek (37). Podobne badania wykonano na odmianach rzepaku o różnej zawartości kwasu erukowego oraz glukozynolanów (38). Największe zmiany ilościowe dotyczyły białek obronnych oraz związanych z metabolizmem węglowodorów. Te białka poddano identyfikacji metodą MALDI TOF MS i LC/ESI/MS/MS.

#### 4. Rozwój i kiełkowanie nasion

Rozwój nasion roślin wyższych obejmuje okres od formowania się zarodka i bielma, które dostarcza składników pokarmowych dla rosnącego zarodka, aż do w pełni dojrzałego nasiona, gotowego do kiełkowania. Okres rozwoju nasion, w którym następuje wykształcenie się w pełni dojrzałego nasiona, charakteryzuje się gromadzeniem substancji zapasowych, utratą wody (podsuszanie) oraz dojrzewaniem fizjologicznym nasiona. Rozwój ma decydujący wpływ na jakość nasion oraz przyszłej siewki i rośliny. Rozwój nasion jest kontrolowany poprzez kompleksowe genetyczne programy oraz sygnały środowiskowe. Z całego okresu rozwoju rośliny, rozwój nasion jest głównym celem zainteresowań badaczy korzystających z metod, jakie oferuje proteomika (39). Badania proteomiczne są obecnie wprowadzane do biologii nasion w celu identyfikacji białek odgrywających zasadniczą rolę w procesach rozwojowych. Większość badań jest wykorzystywanych w celu wygenerowania referencyjnych obrazów białek na określonych etapach rozwojowych (40). Badania fizjologiczne dotyczą też wpływu egzogennych sygnałów na poszczególne tkanki nasion.

Na podstawie badań proteomicznych ziarniaków jęczmienia, stwierdzono, że okres ich dojrzewania w przypadku różnych odmian różni się długością trwania (30). Metodami MALDI-TOF MS oraz ESI-Q-TOF MS/MS zidentyfikowanych zostało 250 białek związanych z rozwojem bielma w ziarnach pszenicy (endospermu, gdzie głównie gromadzone są substancje zapasowe tych nasion). Na podstawie klasyfikacji białek pokazano, że biorą w nim udział białka enzymatyczne 13. szlaków metabolicznych (41). W przypadku nasion kukurydzy stwierdzono, że zasadniczą rolę pełni ortofosforanowa dikinaza pirogronianu (PPDK) odpowiedzialna za równowagę skrobia-białko poprzez ograniczanie syntezy ADP-glukozy oraz równowagę alanina – synteza aromatycznych aminokwasów (42). Badania te obejmowały 632 białka, które zidentyfikowano metodą LC MS/MS.

W trakcie dojrzewania, ostatniego etapu rozwoju prowadzącego do wykształcenia w pełni dojrzałego nasiona, następuje podsuszanie (cecha nasion typu „orthodox”, mogą być one przechowywane przez dłuższy czas) i wchodzenie nasion w stan metabolicznego spokoju, w którym pozostają do chwili skiełkowania. Do ba-

dań białek związanych z rozwojem i kiełkowaniem nasion wykorzystano modelową roślinę, jaką jest *Arabidopsis* (43). Z nasion wyizolowano i zidentyfikowano 74 białka, metodą MALDI-TOF MS, spośród których:  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny, krucyferyna, karboksylaza fosfoenolopirogronianowa (PEPC), akonitaza, katalaza 2, WD-40 oraz aktyna 7 związane były z uwadnianiem nasion, etapem potrzebnym do skielkowania nasion. Z samym procesem kiełkowania związane były: myrosina (białko odpornościowe przeciwko patogenom), Ado-Met syntetaza (odgrywająca istotną rolę w biosyntezie etylenu, spermidyny, sperminy i biotyny), białka późnej embriogenezy (LEA, ang. *Late Embryogenesis Abundant* – związane z tolerancją na podsuszanie, 44) oraz szoku termicznego (HSP, ang. *Heat Shock Protein* – białka ochronne), białko dojrzewania nasion (SMP, ang. *Seed Maturation Protein* – pełniące rolę magazynu biotyny) i chloroplastowy czynnik elongacyjny (ang. *Elongation Factor* – EF-Tu).

W proteomicznych i transkryptomicznych badaniach nad rozwojem nasion *Medicago truncatula* wskazano na udział enzymów biosyntezy metioniny oraz enzymów proteolitycznych w asymilacji substancji odżywczych w czasie dojrzewania nasion (45). W pracy tej posłużono się metodą nano-LC/ESI/Q/TOF MS/MS. W badaniach prowadzonych nad rozwojem nasion *Medicago truncatula* (46) wykazano zmiany w ekspresji białek: związanych z podziałami komórek ( $\alpha$ -tubulina i aneksyna), zapasowych (leguminy, wicyliny i konwicyliny), metabolizmu węgla (syntaza sacharozy, skrobi) i wydłużania się komórek (aktyna). Taka różnorodność ekspresji białek markerowych może być pomocna w scharakteryzowaniu wigoru nasion.

Hajdych i wsp. (47) zidentyfikowali, metodą MALDI TOF MS, 422 białka nasion soi w czasie rozwoju. Zaobserwowali spadek akumulacji białek związanych z metabolizmem oraz wzrost akumulacji białek związanych z modyfikacją i transportem białek oraz syntezą substancji zapasowych. Zbadano również zmiany w proteomie rzepaku (48). Zidentyfikowano 517 białek (korzystając z metod MALDI TOF MS oraz LC/ESI/MS/MS), co wskazuje, że z rozwojem tych nasion związane są zmiany wielu szlaków metabolicznych, w szczególności metabolizmu cukrów.

Kiełkowanie nasion następuje w warunkach odpowiedniego uwodnienia, dostępu powietrza i określonej temperatury. Wznowienie przez zarodek nasiona procesu wzrostu stanowi początek kiełkowania, korzeń zarodkowy przebija okrywy nasienne.

Gallardo i wsp. (49) zaobserwowali wpływ giberelin (hormonów stymulujących kiełkowanie nasion) na białka kiełkujących nasion *Arabidopsis*:  $\alpha$ -tubulinę, Ado-Met syntetazę oraz  $\beta$ -glukozydazę. W badaniach tych pokazano, że gibereliny nie biorą udziału w procesach związanych z kiełkowaniem przed pojawieniem się korzonka. Badając wpływ  $\alpha$ -amanityny (inhibitora transkrypcji) na poziomie proteomu Rajjou i wsp. (50) stwierdzili, że kiełkowanie nasion *Arabidopsis* wymaga transkrypcji *de novo*.

W badaniach nad kiełkowaniem nasion kauczukowca, wykazano powiązania białek beta-glukozydazy, enzymów syntezy skrobi, kwaśnej lektyny oraz 20-oksydazy gibereliny z tym procesem (51). Na podstawie proteomicznej analizy nasion ryżu podczas kiełkowania pokazano zmiany w 148. białkach (52). Białka te zidentyfikowano metodą MALDI TOF MS. Zaobserwowano spadek akumulacji białek zapaso-

wych i LEA oraz wzrost  $\alpha$ -amylazy i białek glikolitycznych. Stwierdzono również, że kiełkowaniu nasion towarzyszą zmiany stanów utlenienia i redukcji (redox) białek. W badaniach na nasionach *Medicago truncatula* stwierdzono, że to thioeredoksyna bierze udział w przejściu białek z formy utlenionej u nasion suchych do formy zredukowanej u nasion kiełkujących (53). Do identyfikacji tych białek zastosowano metodę LC/ESI/Q/TOF MS/MS.

Nasiona wielu gatunków roślin, szczególnie klimatu umiarkowanego charakteryzują się spoczynkiem. Spoczynek jest mechanizmem adaptacyjnym, pozwalającym nasionom przeżyć niekorzystne warunki zewnętrzne i skiełkować w momencie najbardziej odpowiednim. Niektóre nasiona w celu ustąpienia spoczynku i skiełkowania muszą być poddane specjalnym metodom traktowania, np. muszą przejść okres tzw. dojrzewania posprzętowego (przechowywania przez długi czas) lub muszą być poddane stratyfikacji, tzn. po uwodnieniu umieszczone w niskich temperaturach dodatnich (1-5°C), na okres od kilku tygodni do kilku miesięcy.

Na podstawie analizy zmian w proteomie nasion buka podczas stratyfikacji w 3°C wykazano, że z mechanizmem ustępowania spoczynku związane są białka (zidentyfikowano 74 metodą ESI MS/MS) odpowiedzialne za przebieg wielu procesów, zaczynając od inicjacji sygnału hormonalnego, poprzez transdukcję sygnału, transkrypcję, syntezę białek, metabolizm energii, wykorzystanie materiałów zapasowych, kończąc na inicjacji podziałów komórkowych (54). Z ustępowaniem spoczynku związane są prawdopodobnie następujące białka: białko proteasomalne PRCl, czynnik elongacyjny EF-Tu, kinaza nukleotydo-difosforanowa (NDPK, regulowana pozytywnie przez egzogenną giberelinę GA<sub>3</sub>, stymulującą kiełkowanie nasion), pirofosforylaza UDP-glukozowa, eukariotyczny czynnik inicjacyjny eIF-5 $\alpha$ 2 i elongacyjny EF-1 $\beta$ 2, kalretikulina (białka regulowane negatywnie przez kwas abscysynowy ABA). Z ustępowaniem spoczynku nasion buka była związana ekspresja białek z grupy LEA (białko Em, dehidryna) oraz HSP, regulowanych pozytywnie przez ABA (54). W badaniach proteomicznych nasion *Prunus campanulata* pokazano zależność akumulacji dehidryny, prekursorów prunin 1 i 2 z ustępowaniem spoczynku (55). Białka te zidentyfikowano metodą MALDI-TOF MS oraz LC/ESI/MS/MS. Na podstawie analizy zmian proteomów wykazano, że czynnikiem decydującym w ustępowaniu spoczynku nasion może być produkcja reaktywnych form tlenu oraz celowe zmiany w karbonylacji białek, co stwierdzono na podstawie badań nasion słonecznika (56), *Arabidopsis* (57) i ryżu (58).

## 5. Stres

Nasiona w trakcie rozwoju, spoczynku oraz kiełkowania poddawane są różnorodnym czynnikom stresowym, zarówno endogennym jak i egzogennym. Czynniki egzogenne mogą mieć charakter biotyczny oraz abiotyczny. Wykorzystanie metod proteomicznych oferuje możliwość praktycznego zbadania wpływu na regulację

syntezy białek m. in. nie prowadzących do śmierci stresów abiotycznych, takich jak susza, szok wysokiej i niskiej temperatury, stres osmotyczny czy solny (59).

Nasiona typu „orthodox” na ostatnim etapie dojrzewania ulegają odwodnieniu (w przeciwieństwie do nasion typu „recalcitrans” nieodpornych na odwodnienie), w wyniku czego zawartość wody spada nawet do 7%. Tolerancja na odwodnienie związana jest m. in. z zawartością specyficznych białek. W przypadku nasion pszenicy takim białkiem, jak się okazało, jest tioredoksyna (Trx) związana z obroną przeciwko stresowi oksydacyjnemu towarzyszącemu suszy (60).

Działanie stresu osmotycznego, wywołanego NaCl, spowodowało opóźnienie oraz spadek kiełkowania nasion soczewicy. W przeprowadzonych analizach wykazano, że białkami indukowanymi tym stresem były: białka LEA, HSP70, EF1, EF2,  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny. Autorzy sugerują, że zmniejszona ilość HSP może być związana z działaniem czynników środowiskowych oraz, że te białka mogą pełnić rolę wskaźników działania stresu solnego (61).

Zmiany w ekspresji białek nasion pszenicy wywołanych przenawożeniem azotem zostały opisane w pracy Bahrmana i wsp. (62). Zidentyfikowano 20 białek, funkcje większości z nich były związane z metabolizmem węgla. Zmiany w akumulacji tych białek były zależne od odmiany uprawnej pszenicy.

W badaniach nad białkiem bogatym w glicynę wiążącym RNA wykazano, że odgrywa ono ważną rolę w kiełkowaniu nasion *Arabidopsis* oraz w tolerancji na przemarzanie, zasolenie i odwodnienie poprzez modulacje ekspresji różnych klas genów (63,64).

Proteomika jest powszechnie wykorzystywanym podejściem w badaniach wpływu metali ciężkich na stan metabolicznej aktywności nasion, pomocnym w lepszym zrozumieniu mechanizmów towarzyszących obronie i tolerancji komórek. Analiza proteomu daje możliwość identyfikacji nowych białek – biomarkerów, które mogłyby być użyteczne w biomonitorowaniu roślin. Identyfikacja czynników związanych ze strategią bioakumulacji/bioograniczania jest bardzo ważna ażeby zrozumieć, które produkty rolne zawierają wysoki poziom stężeń metali ciężkich i są przez to potencjalnie toksyczne dla ludzi. W badaniach nad wpływem chromu na nasiona kukurydzy zaobserwowano indukcję białek związanych z tolerancją na stres oksydacyjny (dysmutazy ponadtlenkowej – SOD, peroksyredoksyny, glioksalazy) oraz inne stresy (np. syntetazy S-adenozylu metioniny – SAM) (65). Miedź w kiełkujących nasionach ryżu spowodowała zmiany w ekspresji 25 białek (66). Spośród nich były białka antyoksydacyjne i związane ze stresem: glioksalaza, peroksyredoksyna i reduktaza aldozy. Natomiast białka regulatorowe: chaperony typu DnaK, proteaza UIPI są bezpośrednio związane z reakcjami obronnymi rośliny. Natomiast zmniejszona akumulacja podstawowych metabolicznie enzymów jak  $\alpha$ -amylaza czy enolaza, spowodowała zahamowanie kiełkowania nasion. Wpływ kadmu na kiełkujące nasiona ryżu był związany ze zwiększoną akumulacją białek biorących udział w obronie, detoksyfikacji, biosyntezie białka i procesach kiełkowania (67). W wymienionych pracach białka zidentyfikowano metodą MALDI-TOF MS.

Czynnik stresogenny może mieć nie tylko negatywny wpływ na życie rośliny, ale może być wykorzystany w celach praktycznych, np. hodowlanych. W celu otrzymania nowych odmian roślin uprawnych wykorzystuje się m. in. różnorodne źródła promieniowania. Jednym z nowo stosowanych źródeł promieniowania mutagennego są ciężkie jony promieniotwórcze. W celu sprawdzenia wpływu mutagennych właściwości jonu promieniotwórczego  $N^+$  oraz zbadania mechanizmu mutacji dokonano analizy i identyfikacji metodą MALDI-TOF MS białek nasion słonecznika z wszczepionymi jonami  $N^+$ . Okazało się, że dwa białka: czynnik transkrypcyjny HAM59 oraz białko zamka leucynowego HAHB-4 związane są ze zjawiskiem mutageny (68).

## 6. Aspekt praktyczny

Techniki, które są wykorzystywane do badań proteomicznych są także pomocne w dziedzinach mających znaczenie praktyczne. W wielu publikowanych pracach dotyczących proteomów nasion opisane są badania dotyczące analiz białek związanych z jakością nasion, żywności, jakością słodu wykorzystywanego w browarnictwie. Badania koncentrują się też na alergenach zawartych w żywności, co stanowi część prac podnoszących bezpieczeństwo zdrowotne konsumentów.

Słodowanie nasion tzn. kiełkowanie nasion jęczmienia w kontrolowanych warunkach, jest ważnym procesem w browarnictwie. Jakość słodu zależy od odmiany uprawnej jęczmienia, ale także od warunków słodowania (69). Używając metod proteomicznych porównano 4 odmiany jęczmienia oraz poziom słodowania. Zidentyfikowano metodami MALDI TOF MS oraz nano-ESI/Q/TOF MS/MS 42 białka z nasion w pełni dojrzałych. Inhibitor  $\alpha$ -amylazy/ trypsyny oraz  $\alpha$ -amylaza izoenzym 2 były białkami różnicującymi poszczególne odmiany, co wskazuje na ich rolę w procesie dojrzewania nasion i słodowania (70). Badano również białka związane z rozwojem i kiełkowaniem nasion jęczmienia, które mogą wpływać na jakość słodu (71). Zidentyfikowano białko regulowane przez chłód Cor14b, które było związane z odpornością nasion na podsuszanie. Stwierdzono również spadek zawartości wraz z kiełkowaniem inhibitorów  $\alpha$ -amylaz, które odpowiadają za hamowanie rozkładu substancji zapasowych. Dwie izoformy thioredoksyny h (reduktaza dwusiarczkowa białek), HvTrxh1 i 2, prawdopodobnie biorą udział w regulacji białek ważnych dla kiełkowania nasion. Badano także białka specyficzne dla poszczególnych części nasiona: zarodka, endospermu oraz warstwy aleuronowej. Porównywano również całe proteomy należące do różnych odmian uprawnych. Stwierdzono zmiany w akumulacji serpiny Z4,  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylazy oraz inhibitorów  $\alpha$ -amylazy. Serpiny są inhibitorami proteaz seryny. Rola ich jest prawdopodobnie związana z ochroną substancji zapasowych przed proteolizą, zarówno przez czynniki wewnętrzne, jak i zewnętrzne (33). Zidentyfikowano również białka (metodą nano-LC/Q/TOF MS/MS), które mają istotny wpływ na jakość nasion jęczmienia, słodu i w końcowym efekcie piwa. Modyfikacje

białek przenoszących lipidy (LTP, ang. *lipid transport protein*): acylacja oraz glikozylacja pojawiające się w trakcie słodowania, mogą być czynnikami zmieniającymi jakość piwa (72).

W celu zbadania jakości ziarna pszenicy, używanej w piekarnictwie, wykorzystano metody, jakie oferuje proteomika (73). Zidentyfikowano białka (metodą MALDI TOF MS) typu puroindolin (białka amfifilowe, rozpuszczalne w detergencie Triton X-114), które prawdopodobnie są odpowiedzialne za cechy jakościowe pszenicy, szczególnie twardość ziarna i w konsekwencji jakość mąki.

Podejście proteomiczne zastosowano też w badaniach nad somatyczną embriogenezą *Cyclamen persicum* (74), w celu jak najefektywniejszego wykorzystania tej metody w wegetatywnym rozmnażaniu roślin ozdobnych. Zidentyfikowano metodą nano-LC/Q/TOF MS/MS białka związane z glikolizą i zapasowe, które mogą posłużyć jako markery jakości otrzymanych somatycznych zarodków.

Do badań cech jakościowych białek zapasowych nasion soi wykorzystano podejście proteomiczne. Analiza proteomu, jak się wydaje, jest bardzo efektywnym narzędziem wspomagającym pracę hodowców roślin w ich selekcji najlepszych jakościowo odmian soi (75). Zidentyfikowano 41 białek zapasowych, metodą LC-ESI-Q-TOF MS/MS, które mogą posłużyć jako wskaźniki jakości różnych odmian soi.

Kolejnym aspektem, w którym korzysta się z metod, jakie oferuje proteomika są badania alergenów w żywności. Proteomika może być traktowana jako ważne podejście w funkcjonalnej charakteryzacji roślin i ocenie bezpieczeństwa żywności. Analiza porównawcza białek zawartych w nasionach różnych genotypów jest niezwykle istotna dla identyfikacji i eliminacji potencjalnych alergenów. W nasionach soi wykryto i zidentyfikowano metodą MALDI TOF MS i LC/MS/MS podjednostki  $\alpha$ - i  $\beta$ -konglicynin, których poziom występowania był zależny od pochodzenia od odmian dzikich, rodowych czy nowoczesnych (76). Na podstawie identyfikacji kolejnych białek pokazano, że za reakcje alergiczne odpowiedzialne są białka: typu LEA oraz inhibitor proteazy cysteiny (77). Genetyczna modyfikacja soi nie wpłynęła na wzrost akumulacji tych białek.

## 7. Podsumowanie

Proteomika stała się popularnym kierunkiem badań w funkcjonalnej charakterystyce nasion. Spośród prac proteomicznych dotyczących roślin, około 150 dotyczy ważnego etapu ich rozwoju, zapewniającego reprodukcję płciową, jakim jest nasiono. Obserwuje się w ostatnich latach zwiększenie liczby publikacji na temat różnych aspektów biologii nasion. Prace te dotyczą proteomów co najmniej 21 gatunków roślin, w większości skoncentrowane są one na roślinach modelowych: rzodkiewniku (*Arabidopsis thaliana*) i ryżu (*Oryza sativa*). Zakres badań obejmuje analizę części nasion, rozwój nasion, dojrzewanie, przygotowanie do kiełkowania i samokiełkowanie, odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe oraz charakteryzacje poszczegól-

nych białek, np. alergenów czy markerów genetycznych. Dominującą platformą analityczną pozostaje ciągle elektroforeza dwuwymiarowa w połączeniu ze spektrometrią mas, ale coraz większym zainteresowaniem zaczynają się cieszyć techniki „drugiej generacji”, takie jak żelowa elektroforeza różnicowa (DIGE), czy metoda znakowania białek aminokwasami z wbudowanym izotopem (ICAT), które czynią badania bardziej precyzyjnymi. Interesującym kierunkiem dalszego rozwoju proteomiki nasion powinno być, jak się wydaje, wykorzystanie najnowszych metod identyfikacji białek na podstawie spektrometrii mas. Wprowadzenie równocześnie nowych technik, np. immunodetekcji pozwoliłoby scharakteryzować lepiej poszczególne białka.

## Literatura

1. Cánovas F. M., Dumas-Gaudot E., Recorbet G., Jorrin J., Mock H. P., Rossignol M., (2004), *Proteomics*, 4, 285-298.
2. Rossignol M., Peltier J. B., Mock H. P., Matros A., Maldonado A. M., Jorrin J. V., (2006), *Proteomics*, 6, 5529-5548.
3. Jorrin J. V., Maldonado A. M., Castillejo M. A., (2007), *Proteomics*, 7, 2947-2962.
4. Skylas D. J., van Dyk D., Wrigley C. W., (2005), *J. Cereal Sci.*, 41, 165-179.
5. Komatsu S., Tanaka N., (2004), *Proteomics*, 4, 938-949.
6. Agrawal G. K., Rakwal R., (2006), *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 1-53.
7. Giavalisco P., Nordhoff E., Kreitler T., Klöppel K. D., Lehrach H., Klose J., Gobom J., (2005), *Proteomics*, 5, 1902-1913.
8. Ruebelt M. C., Lipp M., Reynolds T. L., Astwood J. D., Engel K. H., Jany K. D., (2006), *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2162-2168.
9. Ruebelt M. C., Lipp M., Reynolds T. L., Schmuke J. J., Astwood J. D., DellaPena D., Engel K. H., Jany K. D., (2006), *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2169-2177.
10. Chinnasamy G., Rampitsch C., (2006), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 641-644.
11. Natarajan S., Xu C., Caperna T. J., Garrett W. M., (2005), *Analytical Biochemistry*, 342, 214-220.
12. Islam N., Tsujimoto H., Hirano H., (2003), *Proteomics*, 3, 307-316.
13. Finnie C., Svensson B., (2003), *J. Cereal Sci.*, 38, 217-227.
14. Li G., Nallamilli B. R. R., Tan., Peng Z., (2008), *Electrophoresis*, 29, 604-617.
15. Maltman D. J., Simon W. J., Wheeler C. H., Dunn M. J., Wait R., Slabas A. R., (2002), *Electrophoresis*, 23, 626-639.
16. Maltman D. J., Gadd M., Simon W. J., Slabas A. R., (2007), *Proteomics*, 7, 1513-1528.
17. Hynek R., Svensson B., Jansen O. N., Barkholt V., Finnie C., (2006), *J. Proteome Res.*, 5, 3105-3113.
18. Islam N., Upadhyaya N. M., Campbell P. M., Akhurst R., Hagan N., Higgins T. J. V., (2005), *Phytochemistry*, 66, 2534-2539.
19. Ochuodho J. O., Modi A. T., Beukes M., (2006), *South African Journal of Botany* 72, 238-244.
20. Magni C., Scarafoni A., Herndl A., Sessa F., Prinsi B., Espen L., Duranti M., (2007), *Phytochemistry*, 68, 997-1007.
21. Moreno F. J., Jenkins J. A., Mellon F. A., Rigby N. M., Robertson J. A., Wellner N., Mills E. N. C., (2004), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1698, 175-186.
22. Borén M., Larsson H., Falk A., Jansson C., (2004), *Plant Sci.*, 166, 617-626.
23. Zhang K., McKinlay C., Hocart C. H., Djordjevic M. A., (2006), *J. Proteome Res.*, 5, 3355-3367.
24. Islam N., Woo S. H., Tsujimoto H., Kawasaki H., Hirano H., (2002), *Proteomics*, 2, 1146-1155.
25. Newton R. P., Brenton A. G., Smith C. J., Dudley E., (2004), *Phytochemistry*, 65, 1449-1485.
26. Majoul T., Bancel E., Triboui E., Ben Hamida J., Branlard G., (2003), *Proteomics*, 3, 175-183.
27. Majoul T., Bancel E., Triboui E., Ben Hamida J., Branlard G., (2004), *Proteomics*, 4, 505-513.

28. Natarajan S., Xu C., Bae H., Bailey B. A., Cregan P., Caperna T. J., Garrett W. M., Luthria D., (2007), *Plant Physiol. Bioch.*, 45, 436-444.
29. Pinho Pessoa M. A. C., Bloch C., Silva D. F., Galdino A. S., Cunha R. M. S., Alvesm A. O., Grangeiro T. B., (2004), *Protein Peptide Lett.*, 11, 57-62.
30. Finnie C., Bak-Jensen K. S., Laugesen S., Roepstorff P., Svensson B., (2006), *Plant Sci.*, 170, 808-821.
31. Bak-Jensen K. S., Laugesen S., Østergaard O., Finnie C., Roepstorff P., Svensson B., (2007), *FEBS J.*, 274, 2552-2565.
32. Eivazi A. R., Naghavi M. R., Hajheideri M., Pirseyedi S. M., Ghaffari M. R., Mohammadi S. A., Majidi I., Salekdeh G. H., Mardi M., (2008), *Ann. Appl. Biol.*, 152, 81-91.
33. Finnie C., Steenholdt T., Noguera O. R., Knudsen S., Larsen J., Brinch-Pedersen H., Holm P. B., Olsen O., Svensson B., (2004), *Phytochemistry*, 65 1619-1627.
34. Xie Z., Wang J., Cao M., Zhao C., Zhao K., Shao J., Lei T., Xu., Liu., (2006), *Proteomics*, 6, 474-486.
35. Trisiriroj A., Jeyachok N., Chen S. T., (2004), *Proteomics*, 4, 2047-2057.
36. Islam N., Tsujimoto H., Hirano H., (2003), *Proteomics*, 3, 549-557.
37. Hajduch M., Casteel J. E., Tang S., Hearne L. B., Knapp S., Thelen J. J., (2007), *J. Proteome Res.*, 6, 3232-3241.
38. Devouge V., Rogniaux H., Nési N., Tessier D., Guéguen J., Larré C., ( 2007), *J. Proteome Res.*, 6, 1342-1353.
39. Agrawal G. K., Yonekura M., Iwahashi Y., Iwahashi H., Rakwal R., (2005), *J. Chromatography*, 15, 125-136.
40. Hochholdinger F., Sauer M., Dembinsky D., Hoecker N., Muthreich N., Saleem M., Liu Y., (2006), *Proteomics*, 6, 4076-4083.
41. Vensel W. H., Tanaka C. K., Cai N., Wrang J. H., Buchanan B. B., Hurkman W. J., (2005), *Proteomics*, 5, 1594-1611.
42. Méchin V., Thévenot C., Le Guilloux M., Prioul J. L., Damerval C., (2007), *Plant Physiol.*, 143, 1203-1219.
43. Gallardo K., Job C., Groot S. P. C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J., Job D., (2001), *Plant Physiol.*, 126, 835-848.
44. Buodet J., Buitink J., Hoekstra F. A., Rogniaux H., Larré C., Satour P., Leprince O., (2006), *Plant Physiol.*, 140, 1418-1436.
45. Gallardo K., Firnhaber C., Zuber H., Hericher D., Belghazi M., Henry C., Kuster H., Thompson R., (2007), *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 2165-2179.
46. Gallardo K., Signor C. L., Vandekerckhove J., Thompson R. D., (2003), *Plant Physiol.*, 133, 664-682.
47. Hajduch M., Ganapathy A., Stein J. W., Thelen J. J., (2005), *Plant Physiology*, 137, 1397-1419.
48. Hajduch M., Casteel J. E., Hurrelmeyer K. E., Song Z., Agrawal G. K., Thelen J. J., (2006), *Plant Physiol.*, 141, 32-46.
49. Gallardo K., Job C., Groot S. P. C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J., Job D., (2002), *Plant Physiol.*, 129, 823-837.
50. Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., Job C., Job D., (2004), *Plant Physiol.*, 134, 1598-1613.
51. Wong P. F., Abubakar S., (2005), *Plant Sci.*, 169, 303-311.
52. Yang P., Li X., Wang X., Chen H., Chen F., Shen S., (2007), *Proteomics*, 7, 3358-3368.
53. Alkhalfioui F., Renard M., Vensel W. H., Wong J., Tanaka C. K., Hurkman W. J., Batista R., Martins I., Jenö P., Ricardo C. P., Oliveira M. M., (2007), *Int. Arch. Allergy Imm.*, 144, 29-38.
54. Pawłowski T. A., (2007), *Proteomics*, 7, 2246-2257.
55. Lee C. S., Chien C. T., Lin C. H., Chiu Y. Y., Yang, Y. S., (2006), *Proteomics*, 6, 4147-4154.
56. Oracz K., Bouteau H. E. M., Farrant J. M., Cooper K, Belghazi M., Job C., Job D., Corbineau F., Bailly C., (2007), *The Plant Journal*, 50, 452-465.
57. Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D., (2005), *Plant Physiol.*, 138, 790-802.
58. Yano H., Kuroda M., (2006), *Proteomics*, 6, 294-300.
59. Thiellement H., Bahrman N., Damerval C., Plomion C., Rossignol M., Santoni V., de Vienne D., Zivy M., (1999), *Electrophoresis*, 20, 2013-2026.

60. Hajheidari M., Eivazi A., Buchnan B. B., Wrong J.H., Majidi I., Salekdeh G. H., (2007), *J. Proteome Res.*, 6, 1451-1460.
61. Dell'Aquila A., (2004), *Biologia Plantarum*, 48, 237-242.
62. Bahrman N., Le Gouis J., Negroni L., Amilhat L., Leroy P., Lainé A. L., Jaminon O., (2004), *Proteomics*, 4, 709-719.
63. Kim Y. O., Pan S., Jung C. H., Kang H., (2007), *Plant Cell Physiol*, 48, 1170-1181.
64. Kim J. Y., Park S. J., Jang B., Jung C. H., Ahn S. J., Goh C. H., Cho K., Han O., Kang H., (2007), *Plant J.*, 50, 439-451.
65. Labra M., Gianazza E., Waitt R., Eberini I., Sozzi A., Regondi S., Grassi F., Agradi E., (2006), *Chemosphere*, 62, 1234-1244.
66. Ahsan N., Lee D. G., Lee S. H., Kang K. Y., Lee J. J., Kim P. J., Yoon H. S., Kim J. S., Lee B. H., (2007), *Chemosphere*, 67, 1182-1193.
67. Ahsan N., Lee S. H., Lee D. G., Lee H., Lee S., Bahk J., Lee B. H., (2007), *C.R. Biologies*, 330, 735-747.
68. Guijun D., Weidong P., Gongshe L., (2006), *J. Biosci.*, 31, 247-253.
69. Bak-Jensen K. S., Laugesen S., Roepstorff P., Svensson B., (2004), *Proteomics*, 4, 728-742.
70. Østergaard O., Melchior S., Roepstorff P., Svensson B., (2002), *Proteomics*, 2, 733-739.
71. Finnie C., Maeda K., Østergaard O., Bak-Jensen K. S., Larsen J., Svensson B., (2004), *Biochemical Society Transactions*, 32, 517-519.
72. Perrocheau L., Rogniaux H., Boivin P., Marion D., (2005), *Proteomics*, 5, 2849-2858.
73. Amiour N., Merlino M., Leroy P., Branlard G., (2002), *Proteomics*, 2, 632-641.
74. Winkelmann T., Heintz D., van Dorsselaer A., Serek M., Braun H. P., (2006), *Planta*, 224, 508-519.
75. Zarkadas C. G., Gagnon C., Poysa V., Khanizadeh S., Cober E. R., Chang V., Gleddie S., (2007), *Food Res. Int.*, 40, 111-128.
76. Xu C., Caperna T. J., Garrett W. M., Cregan P., Bae H., Luthria D. L., Natarajan S., (2007), *J. Sci. Food Agric.*, 87, 2511-2518.
77. Batista R., Martins I., Jenö P., Ricardo C. P., Oliveira M. M., (2007), *Int. Arch. Allergy Imm.*, 144, 29-38.