



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Analýza proteinového složení
tylakoidní membrány pomocí metod
moderní proteomiky**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Holubová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
Rok:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Holubová
Název práce	Analýza proteinového složení tylakoidní membrány pomocí moderních proteomických metod
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Sekce biochemie a biofyziky Univerzity Palackého Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Rostlinné hormony jsou nedílnou součástí vývoje a fyziologických procesů rostlin, avšak stále nedošlo k podrobnému popisu mechanismu účinku. Tato práce byla zaměřena na analýzu proteinové složení tylakoidních membrán <i>Hordeum vulgare</i> (WT, <i>clo</i>) s použitím BAP. Byla provedena optimalizace extrakce a štěpení membránových proteinů s následnou analýzou na LC-MS/MS. Bylo zjištěno, že BAP je schopen opravdu vyvolat různé změny v expresi jednotlivých genů souvisejících s fotosyntézou.
Klíčová slova	Fotosyntéza, tylakoidní membrány, tylakoidy, chloroplasty, membránové proteiny, proteomika
Počet stran	89
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's name	Bc. Jana Holubová
Title of thesis	Analysis of thylakoid membrane proteins by means of modern proteomics
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics Biochemistry and Biophysics Section, Palacký University Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural research
Supervisor	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	Plant hormones are an integral part of the development and physiological processes of plants, which are still not available to describe their mechanism. This work was focused on the protein composition of thylakoid membranes of <i>Hordeum vulgare</i> (WT, <i>clo</i>) with BAP treatment. Extraction and cleavage of membrane proteins was optimized followed by analysis by LC-MS / MS. It has been found that BAP does indeed know the various changes in the expression of the individual genes available with photosynthesis.
Key words	Photosynthesis, thylakoid membranes, thylakoid, chloroplast, membrane proteins, proteomics
Number of pages	89
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Bc. Jana Holubová

Poděkování

Děkuji mému vedoucímu diplomové práce Mgr. Ivu Chamrádovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, ochotu, vstřícnost a čas, který mi věnoval. Také děkuji Mgr. Lukáš Noskovi, Ph.D. za pomoc a rady týkající se CN-PAGE a panu Mgr. René Lenobelovi, Ph.D., za pomoc s LC-MS/MS analýzami a zpracováním dat.

OBSAH

CÍLE PRÁCE.....	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 FOTOSYNTÉZA.....	9
1.2 PLASTIDY	12
1.3 CHLOROPLASTY	13
1.4 TYLAKOIDY	15
1.5 TYLAKOIDNÍ MEMBRÁNY	15
1.6 MEMBRÁNOVÉ PROTEINY.....	16
1.7 PROTEOMICKÁ ANALÝZA	17
1.7.1 Využívané metody	19
1.7.2 Proteomika chloroplastů a tylakoidních membrán	22
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
2.1 CHEMIKÁLIE	27
2.2 MATERIÁL.....	28
2.3. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	29
2.4 ROZTOKY	31
2.5 METODY	34
2.5.1 Pěstování ječmene setého (<i>Hordeum vulgare</i>)	34
2.5.1.1 Sterilizace.....	34
2.5.1.2 Výsev a pěstování rostlinek	34
2.5.2 Izolace tylakoidních membrán.....	34
2.5.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu	34
2.5.2.2 Izolace tylakoidních membrán.....	34
2.5.2.5 Měření koncentrace chlorofylu.....	35
2.5.3 Kvantifikace proteinů	35
2.5.3.1 WF assay.....	35

2.5.3.1. Standardní provedení WF assaye.....	36
2.5.3.2 2D-Quant Kit	37
2.5.4 Elektroforéza.....	38
2.5.4.1 Nativní elektroforéza	38
2.5.4.2 SDS-PAGE jako druhý rozměr 2D elektroforézy.....	40
2.5.6 Štěpení proteinů	42
2.5.6.1 Štěpení proteinů v roztoku.....	42
2.5.6.2 Štěpení proteinů v gelu	42
2.5.7 Přečištění peptidů před MS analýzou	43
2.5.7.1 Přečištění peptidů s jejich frakcionací za pomoci mikrokolonek StageTip.....	43
2.5.7.2 Přečištění peptidů za pomoci mikrokolonek StageTip	44
2.5.8 Analýza na MS	45
2.5.9 Počty opakování a statistické vyhodnocování výsledků.....	47
2.6 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	48
2.6.1 Úvod	48
2.6.2 WF Assay.....	49
2.6.2.1 Kalibrační křivka	49
2.6.2.2 Vliv denaturace na fluorescenci proteinů	53
2.6.2.3 Možnosti denaturace	57
2.6.2.4 Použitelnost WF assaye pro vzorky z tylakoidních membrán.....	58
2.6.3 Porovnání vybraných metod štěpení membránových proteinů v roztoku	59
2.6.3.1 Srovnání základních identifikačních charakteristik.....	60
2.6.3.2 Porovnání kvalitativní a kvantitativní opakovatelnosti	63
2.6.6 Analýza působení BAP na proteom tylakoidních membrán <i>Hordeum vulgare</i> .	65
2.7 ZÁVĚR	79
2.8 SEZNAM ZKRATEK	80
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

CÍLE PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

- Vypracovat odbornou rešerši na téma tylakoidy, tylakoidní membrána, její proteinové složení a proteomická analýza
- Vyzkoušet a případně optimalizovat kvantifikaci proteinů založenou na fluorescence tryptofanu, který je součástí jejich primární struktury
- Porovnat různé metody štěpení proteinů v roztoku v souvislosti s jejich použitelností pro vzorky pocházející z tylakoidní membrány
- Použít vybrané metody pro podrobnou charakterizaci proteinového složení tylakoidní membrány u vybraných rostlin kultivovaných za různých podmínek

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 FOTOSYNTÉZA

Fotosyntéza je biologický proces, při němž dochází k přeměně energie světelného záření na energii chemickou. Světelná energie se ukládá a následně je využita pro metabolismus organismu. Díky zachycení světelné energie dochází k redukci CO₂, což je nezbytné pro biosyntézu organických sloučenin (převážně sacharidů). Voda slouží u fotosyntézy jako donor elektronů a molekulární kyslík je tvořen jako vedlejší produkt (Vacha et al. 2005).

Pro správné pochopení procesu fotosyntézy je nutné podrobně znát jednotlivé složky. Konkrétně struktury PSI, PSII, LHCII, ATPázy a komplexu cytochromu *b₆f*. Je také důležité vědět, jak tyto složky interagují a jaké vytváří superkomplexy (Dekker and Boekema 2005).

Primární procesy probíhají v tylakoidních membránách, konkrétně v protein- pigmentových komplexech. Tyto komplexy se dělí dle své funkce do několika skupin – světlosběrné komplexy shromažďující světelnou energii s následným přenosem do reakčních center, komplexy fotosystémů typu I a II s reakčními centry pro primární procesy přeměny energie a cytochromy sloužící hlavně pro samotný transport elektronů, které se uvolňují během primárních procesů separace náboje v reakčních centrech. Fotosyntetické komplexy obsahují proteiny nesoucí molekuly podobné chlorofylu a jsou doplněny různými typy karotenoidů (Vacha et al. 2005).

Fotosyntéza je založena buď na rhodopsinu, anebo na tetrapyrolových barvivech. Rhodopsin je tvořen opsinem, což jsou transmembránové helixy vázající chromofor retinal, který změní svou konformační strukturu po absorpci světla. Změna struktury z *trans* na *cis* umožňuje transport vodíkových protonů z cytoplazmy do extracelulárního prostoru, a to dává za vznik elektrochemickému gradientu protonů a pomocí ATP-syntázy je tvořeno ATP. Nejznámějším typem rhodopsinu je bakteriorhodopsin či halorhodopsin, oba se vyskytují v doméně Archea (Sun et al. 2018).

Druhý typ fotosyntézy využívá tetrapyrolová barviva, tento systém lze ještě rozdělit z hlediska produkce kyslíku na fotosyntézu, která produkuje či neprodukuje kyslík. Fotosyntéza neprodukující kyslík, anoxygenní fotosyntéza, probíhá anaerobně a nalezneme ji například u bakterií (purpurové, zelené sirmé i nesirmé). Tetrapyrolová barviva stojí za zbarvením květin, ovoce či kořenů (oranžová, žlutá, červená) a zároveň jsou to prekurzory pro biosyntézu fytohormonových abscisových kyselin (ABA) a strigolaktonů (SL). Karotenoidové deriváty fungují také jako signální molekuly zprostředkovávající vývoj

roślin a reakce na podněty z prostředí. Zároveň jsou základní složkou lidské výživy, jako např. provitamin A a antioxidanty, důležité pro prevenci různých typů onemocnění. Jedná se o domény Archea, Eukaryota a Bacteria (Sun et al. 2018).

Oxygenní fotosyntéza probíhá v sinicích a eukaryotech (sinice, řasy, rostliny). Veškeré fotosyntetizující eukaryotní organismy obsahují specifické organely, chloroplasty. Fotosyntéza využívá světelnou energii k syntéze ATP a NADPH, což následně vede k produkci kyslíku. Tento proces je katalyzován čtyřmi membránovými komplexy rozdělenými podle reakcí, které katalyzují. Fotosystém II (PSII) je definován jako voda-plastochinon-oxidoreduktáza, fotosystém I (PSI) představuje plastocyanin-ferredoxin-oxidoreduktázu a F-ATPáza jako protonová ATP-syntáza. Chlorofyly a další pigmenty zachycující světlo se nachází právě v PSI a PSII, díky nimž je energie převedena do fotosyntetických reakčních center, kde dochází k excitaci specifického chlorofylového páru a následně je iniciována translokace elektronu pomocí kofaktoru přes membránu. Dárce elektronů je voda, která podstoupí oxidaci na O_2 a čtyři H^+ , což proběhne díky PSII. Elektrony extrahované z vody jsou uzavřeny přes chinonový pool a komplex cytochromu *b₆f* do plastocyaninu, což je malý rozpustný protein obsahující měď. Sluneční energii absorbuje PSI a ten následně indukuje translokaci elektronu z plastocyaninu na vnitřní membráně (lumen) na ferredoxin, který se nachází na opačné straně (stroma). Komplex cytochromu *b₆f* přenáší elektrony a PSI s PSII slouží k separaci nábojů, to vytváří elektrochemický potenciál. Ten využívá ATP-syntáza, jež je čtvrtým proteinovým komplexem, ke tvorbě ATP jako zdroje energie pro další procesy v buňce (Nelson 2011).

Fotosyntetická reakční centra (RC) obsahují chlorofylový pár, který je schopen oxidačně-redukčních reakcí, a také obsahují pigmenty schopné sbírat světlo, čímž dojde k excitaci chlorofylového páru. Tato centra se dělí dle identity terminálního elektronového akceptoru do dvou skupin – RC1 s Fe-S klastrem (PSI, sírné zelené bakterie a heliobakterie) a RC2 s mobilním chinonem (PSII a fialové či zelené filamentární bakterie). RC1 obsahuje jak jádrové proteiny, tak i chlorofyly vlastní antény jako komponenty elektronového přenosu v rámci svých 11 transmembránových helixů. Oproti tomu u RC2 jsou tyto funkce rozděleny mezi proteiny (Nelson 2011).

Vyšší rostliny jsou schopny absorbovat fotony ve světlosběrných komplexech LHC (light harvesting complexes) – do dvou protein-pigmentových superkomplexů – PSI a PSII. Tato absorbovaná energie směřuje dále do reakčních center, kde dojde k přenosu elektronů vedoucích k oxidaci vody, redukci $NADP^+$ a syntéze ATP. Tyto fotosyntetické procesy se odehrávají v chloroplastech, zároveň zde probíhá syntéza aminokyselin, mastných kyselin,

rostlinných hormonů i sekundárních metabolitů. Fotosyntéza probíhá ve vysoce komplexní proteinové síti, a je ovlivňována množstvím metabolických procesů. Tento fakt vede k tomu, že různé modifikace některých genových produktů (často lokalizované právě v chloroplastu) mohou ovlivnit biogenezi organel a jejich fotosyntetickou funkci. Modelovým organismem pro studium kvetoucích rostlin se stala rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), díky níž byly vyvinuty nové molekulární technologie pro identifikaci proteinů, určení jejich expresních vzorců či definice posttranslačních modifikací a jejich funkcí (Pesaresi et al. 2001).

PSII lze rozdělit do dvou subkomplexů – komplex LHC, který zachytává a rozděluje světelnou energii, a jádro PSII zahrnující reakční centrum (RC), kde dochází k vyvíjení kyslíku (štěpení vody spojeno s vývojem kyslíku). Anténa PSII je organizována do čtyř anténních komplexů, které se skládají z proteinů trimerních Lhcb1, Lhcb2, a Lhcb3 a z monomerních proteinů CP29 (Lhcb4), CP26 (Lhcb5) a CP24 (Lhcb6). Zmíněné proteiny váží pigmenty, jako je chlorofyl, lutein, violaxantin a neoxantin. Jádro rostlinného komplexu PSII zahrnuje přibližně 20 podjednotek představujících jak jednotlivé proteiny, tak i proteinové komplexy vázající pigment. Mezi nejdůležitější podjednotky, které zodpovídají za proces štěpení vody a vzniku kyslíku, patří CP47 (PsbB), CP43 (PsbC), D1 (PsbA), D2 (PsbD). Jádrové podjednotky (vnitřní proteiny) PSII jsou hydrofobní povahy.

Pokud dojde k poškození těchto vnitřních proteinů, může dojít k úplné ztrátě vývoje kyslíku, jelikož jsou zodpovědné za produkci a přenos elektronů, tím pádem v konečném důsledku za produkci NADPH a ATP, oproti tomu vnější proteiny jsou zodpovědné právě za vývoj kyslíku (Silveira and Carvalho 2016).

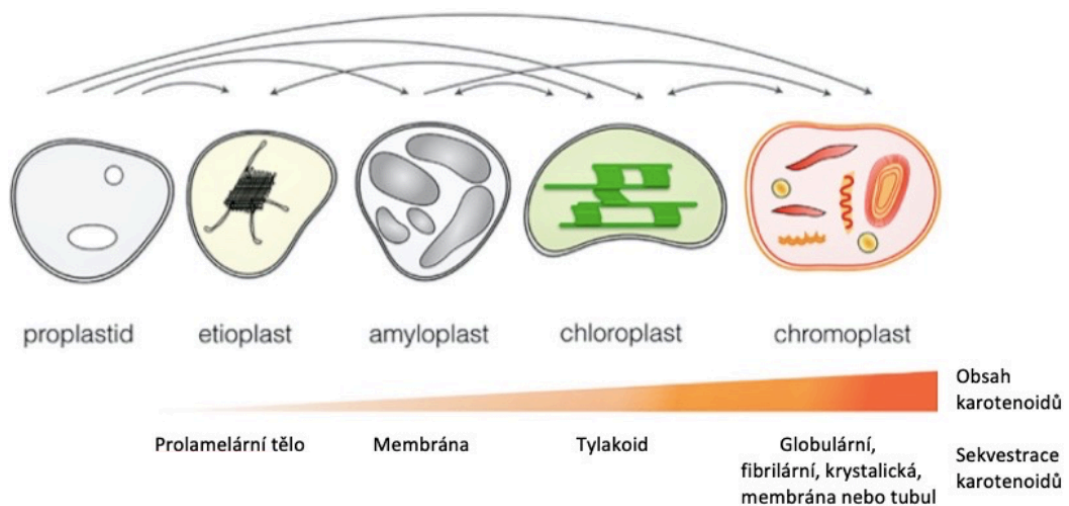
PSI je pigment-proteinovým superkomplexem obsahujícím cca 19 podjednotek. Antény se skládají z trimerů Lhca (1, 2, 3) a Lhca4. Trimery Lhcb, které jsou spojeny s PSII, mohou za specifických podmínek migrovat z PSII na PSI. Tento jev je závislý na fosforylaci a pravděpodobně se podílí na energetické rovnováze mezi oběma fotosystémy během expozice světla. Světelná energie shromažďující se v LHCI je využita v PSI k podpoření míry oxidace plastocyaninu a zvýšení produkce redukovaného ferredoxinu. Ferredoxin (Fdx) je silné redukční činidlo a je důležitý pro redukci NADP^+ a tvorbu NADPH (Silveira and Carvalho 2016).

Pokud je rostlina vystavena nadbytku dopadajícího světla nebo dochází ke snížení asimilace CO_2 a tím dojde ke změně zastoupení elektronů, tak mohou tyto jevy vést k ovlivnění homeostázy. Vytváří se přebytečná energie, která je extrémně škodlivá a nebezpečná pro samotný metabolismus rostlinných buněk. Důsledkem může být zvýšená

akumulace reaktivních sloučenin kyslíku (ROS), což může vést k poškození tylakoidních membrán i proteinových struktur. Mezi antioxidační látky působící proti ROS mechanismem rozptylu nadbytečné energie patří např. cyklus askorbát-glutathion, který lze nalézt u chloroplastů (Silveira and Carvalho 2016).

1.2 PLASTIDY

V rostlinných buňkách jsou plastidy místem biosyntézy a skladování karotenoidů. Karotenoidy jsou lokalizovány v tylakoidních membránách chloroplastů pro fotosyntézu a fotoprotekci. Plastidy, specifické rostlinné orgány, mají spoustu typů – proplastidy, amyloplasty, etioplasty, chloroplasty a chromoplasty. Progenitorem všech ostatních typů jsou proplastidy, které nejsou diferencované (Obrázek 1.) a obohacují meristémové a reprodukční tkáň rostliny. Etioplasty tvoří mezistupeň vývoje a obsahují protochlorofylid. Plastidy skladující škrob, jsou amyloplasty a ty lze nalézt v semenech, kořenech nebo hlízách. Fotosyntetické plastidy v zelených tkáních rostlin lze označit jako chloroplasty. Chromoplasty obsahují masivně nahromaděné karotenoidy, právě v barevných květech, ovoci či zelenině (Sun et al. 2018).



Obrázek 1. Zobrazení vývoje plastidů od progenitoru proplastidu s pozvolnou diferenciací a postupným nárůstem karotenoidů, převzato (Sun et al. 2018).

Důležitým rysem plastidů je vztah k morfologii a funkci rostlin. Vytváří odezvu na environmentální i vývojové signály, což je důležité hlavně pro vývoj rostlin a dozrávání ovoce (chloroplasty se mění na chromoplasty) a senescenci (chloroplasty se mění na gerontoplasty). Dynamický vývoj plastidů je regulován hlavně komplexem TOC (translokon

vnější membrány chloroplastu). Plastidy se také mohou pohybovat a redistribuovat uvnitř buňky, což může nastat při změně životního prostředí (Ling and Jarvis 2015).

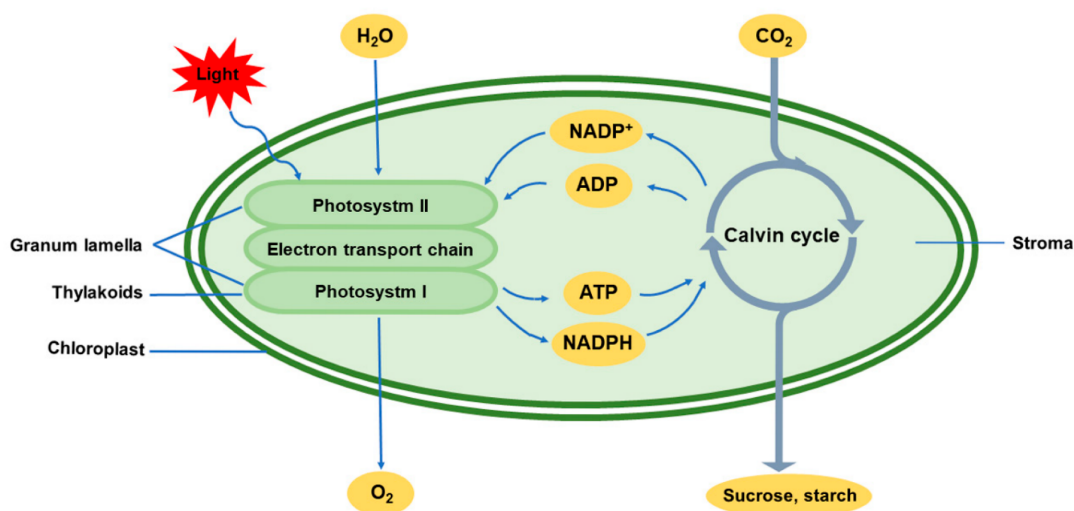
Plastidy exprimují geny, které lze rozdělit do 3 tříd – I. geny kódující části fotosyntetického aparátu, II. geny kódující komponenty genetického systému, III. geny kódující další funkce. Zároveň mají také specifické mechanismy k importu proteinů z cytosolu. Důležitá podobnost s mitochondriemi je taková, že chloroplastové proteiny jsou z velké části prekurzory obsahující štěpitelnou zacílovací sekvenci na terminálním amino konci, která se označuje jako tranzitní peptid. Nejdříve interaguje prekurzor s chloroplastem prostřednictvím tranzitního peptidu v komplexu TOC a následně s TIC (translokon vnitřní membrány chloroplastu), kde dochází ke štěpení tranzitního peptidu. Studie hovoří o tom, že regulace importu zprostředkovaná komplexem TOC významně ovlivňuje vývoj plastidů (Ling and Jarvis 2015; Tiller and Bock 2014).

1.3 CHLOROPLASTY

Chloroplasty představují specifické rostlinné orgány, fotosynteticky aktivní plastidy, a mají nepostradatelnou funkci pro správný průběh fotosyntézy (Obrázek 2.). Zároveň mají významnou roli v primárním i sekundárním metabolismu. Pokud je rostlina pěstována ve tmě, plastidy se přemění na etioplasty se semikrystalickou strukturou (prolamelární tělísko obsahující lipidy a protochlorofylid oxidoreduktázu závislou na NADPH). Jestliže tato rostlina je následně vystavena světelnému záření, prolamelární tělísko se rozpadne a vytvoří se tylakoidní membrána, čímž vznikne plně funkční chloroplast. Biosyntéza chlorofylu začíná z glutamátu, který se metabolizuje na kyselinu 5 - aminolevulová (ALA) s následnou přeměnou na protochlorofylid. Díky světelné aktivaci je protochlorofylid přeměněn pomocí oxidoreduktázy závislé na NADPH na chlorofyl. Pro samotný vývoj chloroplastů jsou nezbytné cytokininy, což jsou všestranné rostlinné hormony regulující fyziologické a vývojové procesy, buněčný cyklus, aktivitu kořenových a výhonkových látek či větvení kořenů (Cortleven et al. 2016).

Chloroplast je obalen dvěma membránami, vnější a vnitřní, které jsou od sebe odděleny mezimembránovým prostorem. Tylakoidní membrána v chloroplastech je organizována do dvou typů – stromální a granální tylakoidy. Stromální tylakoidy představují hmotu, která se nachází mezi vnitřní a vnější membránou, oproti tomu grana jsou tvořena několika tylakoidy nashromážděnými na sobě. Samotný fotosyntetický aparát se nachází právě v tylakoidech. Cytochromy jsou rozmístěny rovnoměrně v tylakoidních membránách,

tylakoidní membrány přiléhající na sebe v granech obsahují většinou PSII, naproti tomu membrány tylakoidů odvrácené ke stromě obsahují převážně komplexy PSI. Jelikož se v komplexech objevují pigmenty podobající se chlorofylu, mají komplexy výrazné absorpční a fluorescenční vlastnosti, což lze využít ke studiím optické mikroskopie. Lineární rozvětvené struktury jsou tvořeny stromuly (stroma-filled tubules), což jsou mobilní výčnělky, propojení mezi rostlinnými chloroplasty. Stromuly zajišťují přenos molekul mezi vzájemně propojenými chloroplasty (van Doorn and Yoshimoto 2010; Vacha et al. 2005).



Obrázek 2. Zobrazení probíhající fotosyntézy v chloroplastech, světelná reakce v tylakoidech chloroplastu. Nejdříve je sluneční energie absorbována a přenesena pomocí pigmentů za rozkladu vody. Kyslík je následně uvolňován a elektrony uvolněné oxidací se přenesou na $NADP^+$ řetězcem přenosu elektronů (PET) a vodík redukuje NADPH. Zároveň dochází k čerpání protonů ze stroma do tylakoidní dutiny, čímž se vytvoří transmembránový protonový gradient (řídí fosforylace ADP na ATP). Při temné reakci fotosyntézy je NADPH a ATP využito k asimilaci uhlíku v Calvinově cyklu a CO_2 se redukuje na sacharidy (Gan et al. 2019).

Ve stromě chloroplastů probíhají změny energie, kdy se protony převádí ze stromy do lumenu tylakoidů, a to vytváří hybnou protonmotivní sílu (pmf) přes tylakoidní membránu. Tato hybná síla řídí syntézu ATP pomocí ATP-syntázy, která se skládá ze dvou složek – ΔpH (gradient koncentrace protonu) a $\Delta \psi$ (rozdíl náboje, tzn. membránový potenciál, přes tylakoidní membránu). Jsou zde uplatněny dvě negativní zpětné vazby. Luminální pH a fotosyntéza závislá na pH je spojena s celkovou amplitudou pmf. Nedávné studie prokázaly, že regulace pmf hraje důležitou roli v rychlosti přizpůsobení fotosyntézy, kdy dojde ke změnám intenzity světla (mutanti defektní ve schopnosti modulovat amplitudu či složení pmf vykazují defekty ve fotosyntetické účinnosti a růstu) (Armbruster et al. 2017; Cortleven et al. 2016).

1.4 TYLAKOIDY

Tylakoidy si lze představit jako konzervované energetické transdukční membrány obsahující mnoho bílkovin, které se akumulují převážně v PSII. Nachází se ve stromě chloroplastů a jejich složitá struktura obklopuje vodnou fázi, lumen (Rast, Heinz, and Nickelsen 2015).

Během fotosyntézy, probíhající v tylakoidní membráně, jsou fotony absorbovány anténními pigmenty a excitační energie je přenášena z místa absorpce do reakčních center. U prokaryot nejsou tylakoidní membrány izolovány od cytosolu, kdežto u eukaryot jsou tylakoidy obklopeny stromou a oběma obalovými membránami, které spolu tvoří chloroplast jako bioenergetickou organelu. U vyšší rostlin jsou tylakoidy skládány do tzv. gran. Tylakoidní membrány obsahují proteiny vázající chlorofyl a karotenoidy a zde dochází k zachycení světla. Každý fotosystém má reakční centrum, které řídí tok elektronů z PSII do PSI prostřednictvím komplexu *b₆f*. Tok elektronů je řízen světlem a díky němu dochází k oxidaci molekul vody, čímž vzniká molekulární kyslík a také probíhá redukce NADP⁺ a generování protonového gradientu přes membránu s kyselým pH, které je generováno na luminální straně tylakoidní membrány. Rychlost vývoje molekulárního kyslíku může být brána jako míra fotosyntetické účinnosti (Checchetto et al. 2013).

Stejně důležité jako fotosyntetické komplexy protein-pigment, jsou také komplexy protein-lipid zajišťující stabilitu membránové dvojvrstvy a aktivitu fotosyntetických komplexů. Lipidy tvoří matici tylakoidů a vytváří důležité hydrofobní prostředí a fotosyntetický aparát, skládající se z komplexu protein-pigment. Obsahuje hlavně fotosyntetický transportní řetězec (PET) napříč tylakoidy, kam jsou přiváděny elektrony. Díky PET jsou generovány nosiče energie, NADPH a ATP, ty jsou využity pro syntézu sacharidů z CO₂, čímž fotosyntéza vytváří základní potravinový řetězec. Plastochinon a plastocyanin patří mezi hlavní složky tylakoidů, a slouží k přenosu elektronů mezi komplexy protein-pigment (PSI, PSII) přes cytochromový komplex *b₆f*. ATPázový komplex umí využít energii, která je uložena v protonovém gradientu pomocí PET k syntéze ATP (Rast et al. 2015).

1.5 TYLAKOIDNÍ MEMBRÁNY

Tylakoidní membránový systém se vyvinul u oxygených fotosyntetických organismů z důvodu zlepšení účinnosti zachycení dopadajícího světla. Jedná se o zploštělé membránové vezikuly, kde se odehrává sběr světla a přenos energie. V rostlinných buňkách

jsou tylakoidní membrány diferencovány na grana a stromální tylakoidy. Při probíhající fotosyntéze dochází k významným strukturním i funkčním změnám ovlivňujícím složení a samotnou organizaci membrány (Ünnep et al. 2014).

Tylakoidní membrány vytváří v chloroplastu kontinuální trojrozměrnou síť uzavírající vodní prostor, tylakoidní lumen. Ve zralých chloroplastech a sinicích jsou sestaveny do multilamelárních membránových systémů. Multilamelární systém má svůj význam například při interakcích protein-protein nebo při skládání granulárních membrán, kde jsou membrány laterálně rozděleny, které jsou obohaceny o PSII a PSI. Trojrozměrné modely ukazují, že PSII a LHCII se nachází v granech a PSI a ATPáza převážně ve stromálních tylakoidech. Ovšem může nastat reorganizace a reverzibilní změny způsobené světlem či změnami pH v PSI, což lze považovat za součást adaptace na světelné podmínky a fotoprotekční mechanismus rostlin. Pro funkční plasticitu je důležitá flexibilita fotosyntetického aparátu, ovšem faktory životního prostředí mohou způsobit strukturální změny působící změny funkce (Garab 2014)

1.6 MEMBRÁNOVÉ PROTEINY

Funkce membránových proteinů spočívá hlavně v transportu iontů či molekul a podílí se také na transdukci energie. Dají se rozdělit na iontové kanály, membránové receptory a transportéry. Iontové kanály umožňují difúzi látek skrz hydrofobní lipidovou dvojvrstvu, membránové receptory mají nenahraditelnou funkci v biochemických a signalizačních drahách. Transportéry dostávají molekuly či ionty přes membránu a zároveň jsou schopny likvidovat buněčný odpad. Samotná 3D struktura membránových proteinů byla charakterizována různými experimentálními metodami – např. nukleární magnetickou rezonancí (NMR), rentgenovou krystalografií nebo kryoelektronovým mikroskopem. Jejich analyzování v nativním prostředí je oproti rozpustným proteinům složitější. A to hlavně díky jejich inserci v lipidové membráně, obsahu cholesterolu a hydrofobní hustotě lipidové dvojvrstvy. Membránové proteiny obsahují několik domén a to extracelulární (účast v signalizaci, interakce), intracelulární (aktivují signální dráhy, ukotvení cytoskeletálních proteinů), intramembránovou (póry, kanály). Transmembránové proteiny většinou jsou amfipatické, tzn. mají různou elektronegativitu a hydrofobicitu podél své struktury (díky tomu mohou být v kontaktu s vodou i s membránou). Struktura i funkce je závislá na posttranslačních modifikacích – fosforylace, glykosylace (Almeida et al. 2017).

Hlavní překážka, která omezuje jejich studium, souvisí s jejich strukturou. Na svém povrchu mají hydrofobní charakter a je tedy důležité tyto struktury udržet v lipidovém prostředí, kdy díky tomu zůstanou stabilní a udrží si integritu. Za účelem udržení integrity membránového proteinu byla popsána různá řešení napodobující nativní prostředí lipidové dvojvrstvy. Vytváří se tedy specifické konstrukce (scaffolds), jež jsou založeny na polymerech, peptidech a proteinech, a ty vytvoří pás kolem hydrofobní části a stabilizují proteiny (Salvador et al. 2019).

1.7 PROTEOMICKÁ ANALÝZA

Pojem proteomika je znám od roku 1997 a jedná se o vědní obor, který se zabývá globální analýzou genové exprese pomocí kombinací různých technik. Často dochází ke spojení proteomiky s genomikou či transkriptomikou, díky čemuž mohou být řešeny různé otázky týkající se buněčné biologie. Díky proteomickým analýzám je možné jednoznačně identifikovat (pomocí sekvenování proteinů), kvantifikovat a charakterizovat proteiny ve vzorku. Je také možné propojení proteinů a sekvencí DNA, a mapovat tak daná místa. Jedná se o funkční molekuly a lze sledovat rozdíly v expresi genů, posttranslačních modifikacích nebo protein-proteinových interakcích. Samotný počet kopií mRNA v buňce nemusí odrážet stejný počet funkčních proteinových molekul, což přináší mnoho výhod oproti metodám založeným právě na kvantifikaci mRNA. První zmínky o proteomické analýze se vyskytují v roce 1950 (Edmanovo odbourávání). V dnešní době umožnil obrovský rozvoj měkkých ionizačních technik a nanokapilární kapalinové chromatografie analýzu proteinů a peptidů v komplexních biologických vzorcích s citlivostí dosahující až 10^{-15} mol (Celis et al. 1998; Mallick and Kuster 2010).

Transkriptomika není schopna poskytnout komplexní obraz genové exprese. Pro lepší porozumění expresi, posttranskripční kontrole a posttranslačním modifikacím proteinů byla použita právě proteomika. Proteomika využívá nejnovější technologie a zároveň spoléhá na mikrochemickou charakterizaci peptidů. I v lékařském výzkumu se proteomika stala běžně používaným nástrojem. Mezi průkopnické studie se řadí analýza proteinů získaných z lumenu a membránových povrchových tylakoidů chloroplastů izolovaných z hrachu (Peltier et al. 2000).

Ovšem na počátku se tento vědní obor opíral o spoustu metod, které se postaraly o další rozvoj, nicméně i dnes jsou stále využitelné. Konkrétně byla využívána Edmanova degradace (odbourávání), která byla aplikována od roku 1950. Jedná se o metodu, která je

založena na sekvenování proteinů, kdy reaguje fenylisothiokyanát s N-koncovou skupinou aminokyseliny a pomocí kyseliny fluorovodíkové tuto koncovou část lze odštěpit v podobě cyklického thioazolinonu. Výhoda této metody spočívá v tom, že je možné proces libovolně opakovat a postupně od N-konce sekvenovat i polypeptidy o délce 70 aminokyselin. Velká nevýhoda této metody je identifikace pouze jednotlivých proteinů, což znamená, že ji nelze použít pro obsáhlejší vzorky se směsí proteinů. Postupem času bylo Edmanovo odbourávání nahrazeno rychle rozvíjející se hmotnostní spektrometrií (Shimonishi et al. 1980).

V počátcích byly využívány také elektroforetické metody, které jsou závislé na elektroforetické mobilitě sledovaných struktur. Jedna z prvních metod byla založena vědcem Laemmlem v roce 1970, kdy použil různé varianty gelové elektroforézy. Při této elektroforéze byl používán dodecylsulfát sodný (SDS), což je silný aniontový detergent zajišťující rozvolnění trojrozměrné struktury a zároveň dodává jednotný záporný náboj. Díky tomu se proteiny pohybují skrz póry gelu pouze dle své velikosti. Dnes se tato metoda stále hojně využívá a je označována jako SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electroforesis), tedy elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (Peltier et al. 2004).

Pokud je žádáno větší rozlišení a samotná SDS-PAGE není dostačující, tak je často doplněna o druhý rozměr. Jedná se o separační metodu označující se jako dvoudimenzionální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2-DGE), konkrétně se jedná o spojení s izoelektrickou fokusací (IEF). V prvním rozměru dojde nejdříve k rozdělení proteinů dle izoelektrického bodu a následuje druhý rozměr, který dělí proteiny dle jejich velikosti. Díky tomuto spojení dochází k většímu rozlišení a lze analyzovat různé izoformy i posttranslační modifikace (Peltier et al. 2004).

Biochemie a molekulární biologie se neobejde bez stanovení celkového proteinu. Pomocí UV spektrometrie lze stanovit celkový protein v tělesných tekutinách či roztocích proteinů. Ovšem nelze tuto metodu použít k analýze lyzátů tkání celých buněk, jelikož přítomné nukleové kyseliny silně absorbují světlo ve stejném rozmezí jako proteiny, čímž je narušena detekce. Naopak tato interference je potlačena při použití barviv a stanovení proteinu je na základě změřené absorbance či fluorescence v oblasti viditelného světla. Studie ukázaly, že obsah tryptofanu v proteinech může být stanoven pomocí změření jeho fluorescence v plně denaturovaných proteinech (např. pomocí SDS, β -merkaptoethanolu). Lze tedy využít měření fluorescence tryptofanu pro kvantifikaci proteinových a peptidových směsí za použití standardních fluorescenčních spektrometrů či mikrotitračních destiček (Wiśniewski and Gaugaz 2015).

Od 80. let 20. století se začalo hojně využívat peptidové sekvenování (PS) v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) a to hlavně díky rozvoji ionizačních technik. Mezi nejvíce známé měkké ionizační techniky patří ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI), jež se spojují s kapalinovou chromatografií (LC). Nyní se často tyto metody spojí v LC-MS/MS a je dosaženo rychlé identifikace a separace, při použití izotopových značek je také možná kvantifikace (Damodaran et al. 2007).

1.7.1 Využívané metody

Dříve byly hojně využívány elektroforézy, které byly jednoduše, a přitom efektivně schopny separovat určité proteinové komplexy a ty se mohly následně zpracovávat. Při této metodě dochází k separaci nabitých látek, které se pohybují v elektrickém poli díky vloženému napětí. Elektroforeticky lze oddělit podle molekulových hmotností také molekuly RNA či DNA. Mezi často využívané separační matrice se řadil z počátku agar, agaróza, polyakrylamid a kompozitní agarózo-akrylamidové gely. Při porovnání výsledků za použití různých gelových matic bylo zjištěno, že následná samotná separace hmotnostním spektrometrem je závislá na použité gelové matici. Elektronová mikroskopie ukázala, že pohyblivost pozorovaná v agarózových gelech přímo odráží molekulární velikost (mobilita klesala se zvyšující se molekulovou hmotností), kdežto polyakrylamidové gely ne (provedeno u DNA). To, jak budou jednotlivé proteiny či proteinové komplexy migrovat gelovou maticí, samozřejmě závisí na stupni denaturace, kdy dojde k rozvinutí jejich 3D struktury (Stellwagen 2014).

Agarózové gely

V roztoku vytváří molekuly agarózy specifické struktury podobné cívkám, a to hlavně při vyšších teplotách. Pokud dojde ke snížení teploty, vytváří se agarózové řetězce spirálových vláken, které jsou na sebe vázány pomocí nekovalentních vazeb a vzniká gel (Stellwagen 2014).

Polyakrylamidové gely

Tyto gely jsou vytvořeny reakcí akrylamidu se zesíťovacím činidlem N, N'-metylenbisakrylamidem (BIS). Složení gelu je dáno stupněm zesíťování (T) a koncentrací zesíťovacího činidla (C). Polyakrylamidové gely mají polydisperzní strukturu, která je způsobena BIS, protože ten polymeruje rychleji než akrylamid. Z tohoto důvodu

polyakrylamidové gely obsahují vysoce zesíťované uzly bohaté na BIS spojené řídké zesíťovanými vlákny bohatými na akrylamid. Pokud je analytem protein, velikost pórů odpovídá pórům bohatým na BIS. Ovšem u DNA molekul, které jsou v porovnání s proteiny větší, dochází ke zpomalení migrace v místech bohatých na akrylamid (Stellwagen 2014).

Nativní elektroforéza

Tato metoda se využívá k separaci proteinů a proteinových komplexů tehdy, pokud chceme zachovat proteiny v nativním, nedenaturovaném a enzymaticky aktivním stavu. Velmi často je nativní elektroforéza používána jako první rozměr, kdy druhý rozměr bude již denaturující, například SDS-PAGE, kde se rozvolní vyšší struktury proteinů a rozseparují se na podjednotky. Spojení těchto dvou elektroforéz může být označeno jako dvourozměrná nativní elektroforéza (2D CN/SDS-PAGE). Následně po druhém rozměru jsou proteiny v purifikovaném stavu a lze je identifikovat pomocí MS po enzymatickém štěpení (Shukolyukov 2011; Wittig, Karas, and Schägger 2007).

Konkrétně u proteinů izolovaných z tylakoidních membrán je možné použít bezbarvou nativní elektroforézu (CN-PAGE), jelikož ve vzorku je obsažen chlorofyl (pigment-proteinové komplexy), který obarví separované proužky. Ovšem tuto metodu lze použít pouze pro ty proteiny, které mají hodnotu izoelektrického bodu (pI) nacházející se v pH, při kterém je elektroforéza prováděna. Vychází z předcházející techniky, modré nativní elektroforézy (BN-PAGE) z roku 1994. Hlavní rozdíl, mezi CN-PAGE a BN – PAGE je ten, že se nepoužívá modré barvivo Coomassie brilliant blue, které se adsorbuje na proteiny a mohlo by dojít ke zkreslení výsledků, jelikož takto obarvené proteiny se mohly pohybovat k anodě. Mezi prvotní experimenty, kdy byla použita CN-PAGE ve spojení s BN-PAGE (dvourozměrné uspořádání), se řadí separace mitochondriálních komplexů dýchacího řetězce (Krause 2006; Wittig et al. 2007).

Při separaci pomocí CN-PAGE je velmi často použit gradientový polyakrylamidový gel se zaostřovacím gelem. Při použití gelu 4-20 % (w/v) je možné separovat proteiny v hmotnostním rozmezí 10^5 - 10^6 Da. Proti zpětné agregaci separovaných proteinů je v gelu vždy přítomen v nízké koncentraci detergent, velmi často dodecyl- β -D-maltosid (DBM). Jako vhodné podmínky pro správný průběh CN-PAGE se uvádí teplota 4 °C (Kikuchi, Hirohashi, and Nakai 2006). Velká výhoda CN-PAGE, oproti BN-PAGE, je také to, že metoda může být použita i pro proteiny značené fluorescenčně. Modré barvivo působí až v 95 % případů jako zhasič fluorescenčního signálu. Coomassie je také schopno rozvolňovat slabé proteinové interakce (Wittig et al. 2007).

Nativní elektroforéza nalezne uplatnění ve studiu biomolekul od biotechnologií po forenzní vědu, jelikož je možné sledovat enzymatickou aktivitu v metabolických sítích a poskytuje přesné informace o buněčných procesech. Z hlediska velice komplexních vzorků je schopna oddělit různé zbytky, proteiny, lipidy či nukleové kyseliny (Auger et al. 2015).

2D-gelová elektroforéza

Jedná se o separační metodu oddělující proteiny dle jejich izoelektrického bodu (pI) a poté dle velikosti. Je to jedna z nejčastěji používaných technik ve srovnávacích proteomických analýzách, kde je možné rozlišit tisíce proteinů v jednom experimentu. Po provedení obou rozměrů jsou gely pro lepší vizualizaci proteinů obarveny a analyzovány pomocí softwarů pro vyhodnocení obrazu pro komplexní kvalitativní a kvantitativní zkoumání proteomu (Goez et al. 2018).

Prvotní experimenty používající 2-DGE k separaci a analýze byly uskutečněny v roce 1975, nicméně tato metoda se stále používá nejen k analýze proteomu, ale také biomarkerů, izoform a posttranslačních modifikací. Je také finančně dostupná a nevyžaduje složité laboratorní vybavení, přičemž nabízí spolehlivé a reprodukovatelné výsledky. Velkou výhodou je kompatibilita s hmotnostní spektrometrií. Často se využívá v prvních krocích analýzy, které slouží k popisu složení konkrétního typu vzorku v daném časovém bodě a za daných podmínek. Také lze tuto metodu použít ke zkoumání klinických projevů různých infekcí, např. MRSA (kmen zlatého stafylokoka), pomocí porovnávání cílených exoproteinů vylučovaných na základě hustoty a velikosti skvrn (Goez et al. 2018; Magdeldin et al. 2014).

IEF separuje proteiny v přítomnosti elektrického pole, kde se nachází ionizované látky vytvářející pH gradient. Často se můžeme setkat s kapilární izoelektrickou fokusací (CIEF). Jedná se o techniku, kterou poprvé popsal Hjertén a Zhu v roce 1985 a dnes tvoří pilíř analýzy proteinů, zejména v biofarmaceutickém průmyslu a je schopná kvantifikovat proteiny, které mají rozdílné náboje (posuny pI v kyselém či zásaditém prostředí). Proteinový analyt je injektován do kapiláry v přítomnosti amfolytů vytvářejících pH gradient při elektrickém proudu a polymerní matrice (methylcelulóza). Pokud se proteiny dostanou do bodu, kdy budou nést nulový náboj (pI), dochází k separaci. Tato technika má další výhodu v tom, že je schopna sledovat separaci v reálném čase. Díky IEF, zejména CIEF, jsme schopni charakterizovat proteinové deamidace vznikající při degradaci proteinů či peptidů, nejčastěji ovlivňuje asparagin nebo glutamin. Při vzniku meziproduktu, sukcinimidu, dojde ke snížení pI daného proteinu (Gervais and King 2014).

Polyakrylamidový gel obsahující dodecylsulfát sodný vytváří druhý rozměr a proteiny se zde separují dle své molekulové hmotnosti (MW). Posledním krokem je obarvení gelů modrým barvivem Coomassie Brilliant Blue, které umožní detekci proteinů. Mezi další metody zajišťující detekci proteinů je barvení stříbrem či fluorescenčními barvami.

Při následné analýze obrazu jsou používány specifické techniky detekce proteinových skvrn, segmentace a kvantifikace na úrovni exprese proteinu na základě počtu pixelů. Velmi často se po naskenování objevují různé anomálie, například šum kolem proteinové skvrny, pruhy, saturace skvrn atd. Také se může lišit pozadí v závislosti na technických specifikacích zobrazovacích systémů, které se používají k zachycení a digitalizaci gelů. Je tedy důležitá část předzpracování vzorků, která sníží či eliminuje zmíněné anomálie, které vedou k chybným detekcím skvrn. Konkrétně se jedná o regulaci intenzity pixelů (normalizace obrazu), korekci šumu a redukci šumu (filtrace), jinak je možná ztráta příslušných informací a získání nereprezentativních dat (Goez et al. 2018).

Poté jsou skvrny obsahující separované proteiny vyříznuty z gelu a enzymaticky naštěpeny, čímž vzniknou peptidové fragmenty, a ty jsou následně analyzovány na MS. Výsledkem jsou spektra, která přísluší daným proteinům a identifikace je provedena pomocí databází.

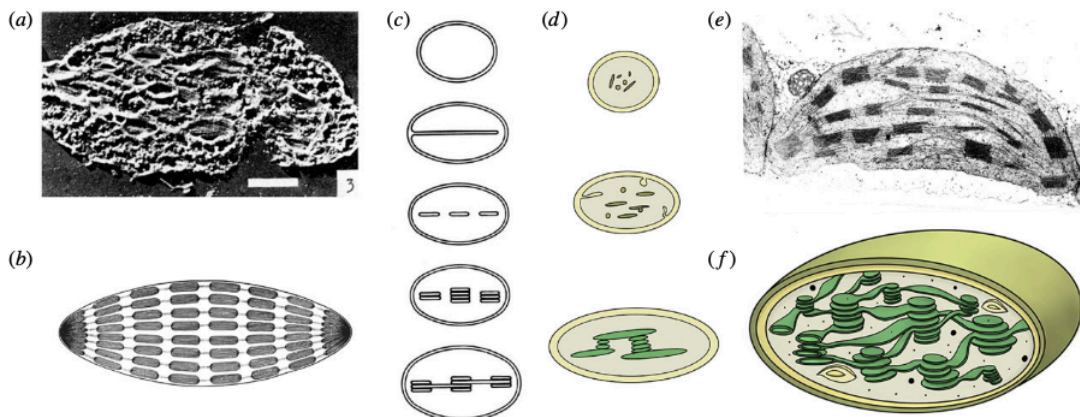
Díky hmotnostní spektrometrii je možné provést detailní identifikaci proteinů. Provádí se buď pomocí „otisku prstu peptidů“ (peptide mass fingerprinting, PMF) nebo sekvenováním aminokyselin peptidů (PS). Informace o sekvencích z MS/MS analýz je možné použít k ověření identifikace proteinů na bázi PMF, což při velkém počtu komplexních vzorků není praktické. Je ale také možné k identifikaci použít pouze PMF (Damodaran et al. 2007).

1.7.2 Proteomika chloroplastů a tylakoidních membrán

Experimentální identifikace proteinů chloroplastů je nezbytná pro přesnější definování funkce a složení. Informace o vývoji organel a homeostáze jsou důležitým doplňkem k transkripčním datům a rozšiřují data ke genomovým sekvencím (Pesaresi et al. 2001). Pro studie, týkající se různých chloroplastových procesů a struktur, je první krok ten nejdůležitější. Jedná se o frakcionaci celkového proteomu chloroplastu. Jsou to různé způsoby izolace stromálních membrán, tylakoidních membrán a subchloroplastů tylakoidního lumenu z listového materiálu. Poté lze tyto frakce využít právě pro různé proteomické analýzy, jako například pro jednoduché mapovací studie nebo ke složitějším

experimentům, kdy je možné sledovat diferenciální expresi za použití dvourozměrné gelové elektroforézy či hmotnostní spektrometrie, ale také pro další testování enzymatické aktivity či použití pro CN-PAGE, která se v tomto odvětví velmi často využívá (Shukolyukov 2011).

Chloroplasty byly poprvé popsány v roce 1848 Ungerem, který je popsal jako struktury vázané na pigmenty. Později v 19. století Schimper nazýval tyto struktury „Chlorophyllkörner“ a podrobněji je také charakterizoval. Velký posun v charakterizaci a struktuře nastal díky tehdy novým metodám (Obrázek 3.). Pomocí světelného mikroskopu byly popsány plastidy jako buněčné složky obsahující chlorofyl a další pigmenty vyvíjející se z bezbarvých prekurzorů. Již tehdy si Schimper všiml, že existují různá vývojová stádia a typy plastidů. Zanedlouho, po vynálezu elektronového mikroskopu, byly pořízeny první mikrofotografie chloroplastů, díky tomu byly provedeny další studie. Ke konci 50. let již byly popsány podrobnější struktury tylakoidů a začaly probíhat diskuze ohledně jejich biogeneze (Mechela, Schwenkert, and Soll 2019).



Obrázek 3. Zobrazení struktury a vývoje chloroplastů. a) První průřez chloroplastem tulipánu; b) Předpokládaný obsah chloroplastu, kdy byla myšlenka složený složených stromů a spojených tylakoidů; c) Předpokládalo se, že k diferenciaci na zralé chloroplasty dochází invaginací vnitřní obálky, kdy se rozdělí na disky a ty se následně na sebe naskládají a propojí; d) Moderní zobrazení diferenciaci chloroplastů z proplastidů; e) Elektronová fotografie skutečného uspořádání gran; f) Znárodnění organizace chloroplastu a propojených tylakoidů; převzato (Mechela et al. 2019).

Dále byla studována prolamelární tělíska, což jsou parakrystalické struktury z lipidů a proteinu (NADPH-dependentní protochlorofylid oxidoreduktázy). Bylo zjištěno, že po ozáření se prolamelární tělísko rozptýlí a poté se začnou tvořit tylakoidy. Jelikož se jedná o experimenty, které lze snadno světelně nastavit, byl tento proces velmi často využíván ke studiu chloroplastů. U zralých chloroplastů představují tylakoidní membrány velice dynamický systém, kdy dochází k pohybu proteinů, zejména komplexů sbírajících světlo.

Složky sloužící k syntéze a udržení tylakoidů pochází z vnitřního obalu chloroplastu (Mechela et al. 2019).

Mezi prvotní proteomické experimenty týkající se identifikací proteinů z tylakoidních membrán se řadí postupy s využitím cyanobakterií (*Synechocystis* 6803). Zde se poprvé izolovaly membrány ve zcela vyčištěném stavu, a to konkrétně odstředěním v hustotním gradientu sacharózy. Díky použití protilátek proti plazmatickým membránám bylo zjištěno, že tímto postupem izolace jsou tylakoidní membrány až z 38 % kontaminovány právě těmito membránami. Následovala dvoudimenzionální elektroforéza, díky které byly separovány proteiny, a ty byly identifikovány metodou Edmanova odbourávání. V tylakoidních membránách bylo nalezeno malé množství chlorofylu (0,8 a 0,14 mg chlorofylu / mg proteinu), kdy ještě nebyl znám jeho původ (Norling et al. 1998).

Dnes jsou membránové proteiny extrahovány a čištěny za použití detergentu, nicméně je zde možnost, že dojde k poškození integrity proteinu. Řešením toho problému mohou být kopolymery styrenu a kyseliny maleinové, které by přímo z nativní membrány extrahovaly proteiny (Hesketh et al. 2020).

V tylakoidní membráně, jak již bylo řečeno, se nachází tisíce proteinů, pigmentů a fotosyntetických kofaktorů, které se nachází ve dvojvrstvě obsahující glycerolipidy. Nejedná se ale o fosfolipidy, jako u buněčných membrán zvířat, hub či fotosyntetických bakterií, ale o nefosforované mono- a digalaktosyldiacylglyceroly. Další část tvoří aniontové lipidy se záporným nábojem (např. fosfatidylinositol) (Kobayashi 2016). Pro lipidovou kompozici u chloroplastů je důležitý požadavek na správný průběh kyslíkové fotosyntézy. Lipidová dvojvrstva tedy poskytuje dvojvrstevnou matici pro fotosyntetické proteinové a kofaktorové komplexy a zároveň zabraňuje volné difúzi iontů (Domonkos, Laczkó-Dobos, and Gombos 2008). Bylo také zjištěno, že samotná biosyntéza a homeostáza lipidů je důležitá při samotné tvorbě tylakoidů a ovlivňuje tím vývoj chloroplastů i samotné rostliny.

První experiment, který se zabýval právě izolací superkomplexu PSII -LHCII v nativní formě (Eshaghi, Andersson, and Barber 1999), za použití jednostupňové solubilizace detergentu. Fotosystém II se nachází, jak již bylo řečeno, v tylakoidní membráně sinic a chloroplastů rostlin. Obsahuje velké membránové proteiny a ve spojení s jádrovým komplexem PSII existuje sada proteinů vázajících chlorofyl *a/b*, který působí jako antény pro sběr světla. Zde je využívána světelná energie k řízení redoxních reakcí, které katalyzují oxidaci vody a redukci plastochinonu. Jako detergent byl použit dodecylmaltosid, který jemně solubilizoval tylakoidní membrány před odstředěním

v gradientu sacharózy a byly izolovány 3 pruhy pomocí SDS-PAGE. Izolovaný komplex byl izolován s vysokou aktivitou vyvíjení kyslíku.

Samotná oxygenní fotosyntéza je poháněna PSI a PSII, což jsou dva velké komplexy protein-kofaktor v tylakoidní membráně. K oxidaci vody dochází v PSII a díky ní rostlina dostává potřebné elektrony, protony i kyslík. Tato studie navazuje na předchozí elektronovou mikroskopii a elektronovou krystalografii a popisuje strukturu PSII pomocí rentgenového záření na základě krystalů plně aktivních při oxidaci vody. Díky tomu experimentu byly poskytnuty informace ohledně struktury proteinových podjednotek a kofaktorů s jejich prostorovým uspořádáním. Zde lze nalézt informace o velikosti, tvaru i poloze manganového klastru, díky němuž je zprostředkována oxidace vody (Zouni et al. 2001).

Důležité informace byly získány z experimentu, který byl zaměřen na PSI. Byly sledovány buňky (*Synechocystis sp.* PCC 6803) postrádající PSI, přičemž PSII byl zachován, anebo postrádající oba. S následným porovnáváním s nemutovanými buňkami byly zkoumány specifické role fotosystémů, jejich architektura, struktura i počet tylakoidních membrán. Struktura tylakoidních membrán *Synechocystis* byla vážně narušena u mutanta postrádajícího PSI. Tylakoidní membrány ve tvaru listu byly nalezeny v buňkách bez PSI, a to konkrétně ve všech stádiích vývoje. U dvojitého mutanta bylo těchto tvarů o poznání méně a byly zde neuspořádané. Je tedy pravděpodobné, že strukturní rozdíly v tylakoidní membráně odráží změny ve složení fotosyntetických částic. Zároveň se tyto změny promítly i v distribuci membránových proteinů a v pozměněných interakcích s lipidovou dvojvrstvou. Touto studií bylo potvrzena důležitost PSII při tvorbě tubulárních struktur (Van De Meene et al. 2012).

Experiment zaměřen na systematictější charakterizaci lumenálního kompartmentu vycházel z nízkého množství výchozího materiálu a špatné mechanické stability tylakoidů *Arabidopsis*. K překonání těchto omezení byla původní metoda izolace změněna tak, že byl vynechán druhý krok promývání, který odstranil periferní proteiny ze stromálního povrchu tylakoidů. Díky provedené analýze bylo zjištěno, že lumena tylakoidů měla vysokou koncentraci proteinů a byly nalezeny i nové lumenální proteiny. Jelikož genom *Arabidopsis thaliana* je stále více jasnější, byla metoda izolace upravena na tuto modelovou rostlinu, kdy byla použita 2-DGE. Rostlina byla pěstována hydroponicky a po deseti dnech byly její listy sklizeny. Izoelektrická fokusace byla provedena v prvním rozměru, přičemž byly proteiny solubilizovány v 5M močovíně, 2M thiomočovíně, 4% (w/v) CHAPS, 20mM DTT. Izoelektrická fokusace byla provedena v prvním rozměru a pro druhý rozměr byl použit

gradientový gel s modifikovaným Laemmli-SDS. Po obarvení stříbrem a naskenování, následovalo štěpení proteinů v gelu s použitím trypsinu. Následovala analýza pomocí MALDI-TOF. Na gelech bylo odhaleno přes 300 různých skvrn, které byly následně analyzovány na hmotnostním analyzátoru. V lumenální frakci bylo detekováno nejvíce plastocyaninů a byly detekovány i nové proteiny (Kieselbach et al. 2000).

Pozornosti neunikly ani polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), jelikož karcinogenní a teratogenní účinky těchto látek jsou v rostlinných buňkách známé a zároveň PAU působí negativně na životní prostředí. Devět dní byl do živného roztoku byl přidáván fenanthren a bylo předpokládáno poškození vnitřní struktury chloroplastů. K analýze byly použity izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci s následnou řetězovou polymerázou reakcí. Bylo sníženo a identifikováno 8 proteinů se souvisejících s tylakoidy a 4 proteiny byly up-regulovány, což byl důvod, proč si chloroplast udržel svůj kulatý tvar (Shen et al. 2019).

Byly provedeny četné experimenty týkající se morfologie chloroplastů až k novým poznatkům týkající se diferenciaci chloroplastů, biogenezi a struktury tylakoidů, avšak kromě struktury zůstávají přesné mechanismy, jimiž je tylakoidní membrána tvořena, do značné míry nevysvětlena. Je to dáno velmi dynamickým systémem, protože rostliny se musí rychle přizpůsobovat změnám prostředí (Pribil, Labs, and Leister 2014), např. jsou schopny tolerovat až 95% ztrátu buněčné vody a jsou schopny po rehydrataci plně regenerovat, tzn. oživit tylakoidní membránu včetně funkční fotosyntézy (Sherwin and Farrant 1998).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 CHEMIKÁLIE

BioRad (USA)

Akrylamid, N,N-methylenbisakrylamid, Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards

BioTech a.s. (ČR)

Agaróza

Fluka (USA)

Deoxycholát sodný (SDC), močovina, N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), thiomčovina, tris-2-karboxyethyl-fosfin (TCEP), uhličitan triethylamonný (TEAB)

GE Healthcare (GB)

2-D Quant Kit

Goldbio (USA)

Coomassie Brilliant Blue G-250

Lachner (ČR)

Chlorid sodný, chlorid hořečnatý, kyselina octová, sacharóza

Merck (GE)

Ethanol, hydroxid amonný, methanol, MS voda

Promega (USA)

Sequencing Grade Modified Trypsin

Serva (GE)

Dodecylsulfát sodný (SDS), glycin, persulfát amonný (APS)

Sigma (USA)

2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol (Bis-Tris), 2-4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-ethansulfonová kyselina (HEPES), 6- benzylaminopurin (BAP), aceton, acetonitril (ACN), sérový hovězí albumin (BSA), apotransferin, β -kasein (KAS), bromfenolová modř, dimethylsulfoxid (DMSO), dithiotreitol (DTT), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), glycerol, hexahydrát chloridu hořečnatého, hydrogenuhličitan amonný (AmBi), isopropanol, jodacetamid (IAM), kyselina mravenčí (FA), kyselina trifluorostová (TFA), lysozym (LYS), myoglobin (MYO), n-dodecyl- β -D-maltosid (DBM), ovoalbumin (OVA), tris(2-carboxyethyl)phosphin hydrochlorid (TCEP), tryptofan (TRP)

2.2 MATERIÁL

Dr. Maisch GmbH (GE)

Reverzní fáze Reprosil GOLD C18 (5 μ m, 3 μ m)

Eppendorf (DE)

Mikrozkumavky (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml), pipety (1-10 μ l; 10-100 μ l, 100-1000 μ l), špičky (1-10 μ l; 10-100 μ l, 100-1000 μ l), dávkovací špičky (1-10 μ l; 10-100 μ l)

New Objective (USA)

Kapilární předkolona IntegraFrit (75 μ l x 3 cm), kapilární kolona Silica Tip (50 μ m x 20 cm)

Sigma (USA)

3M Empore High Performance Extraction Disks – C18 (octadecyl) 20 each/47 mm extraction disks, kalibrované pH papírky (pH 0,0-14,0; 0,0-6,0; 7,0-14,0),

Simax (ČR)

Skleněné odměrné válce, skleněné kádinky, skleněné tyčinky

Thermo Fisher Scientific (USA)

Mikrotitrační 96-jamkové destičky

Waters (USA)

Total recovery vials

2.3. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Amersham Bioscience Corp (USA)

Skener Umax U9908- HAR0

Bibby Scientific (UK)

Vortex mixer Stuart SA8

Bio-Rad (USA)

Vertikální elektroforéza s elektroforetickou komorou Mini-PROTEAN Tetra Systém, zdroj pro elektroforézu POWERPAC 1000

Biochrom (USA)

Spektrofotometr WPA Lightwave II.

Biosan (USA)

Magnetická míchačka MS-3000

Biosciences (UK)

Scanner ke snímání gelů ImageScanner

Bruker Daltonics (GE)

UHR Q-TOF maXis

Čerpadla Kouřil (ČR)

Gradientová peristaltická pumpa PCD21

Eppendorf (GE)

Centrifuga 5430R, Thermomixer Comfort, vakuová odparka Concentrator Plus

IKA (USA)

Tyčový laboratorní homogenizátor Labororteknik T25 basic, vortex MS2 Minishaker

Infors AG (Švýcarsko)

Třepačka Infors Wavetec

Kraintek (ČR)

Sonifikační lázeň K-2L

Major Science (USA)

Termoblok MD-01

MS instruments (UK)

pH metr pH50

Radwag (USA)

Analytické váhy Radwag X XA 110/2X

Sartorius (GE)

Centrifuga Sigma 3-30 K

Snijders Scientific (USA)

Fytokomora Microclima MC 1750

Thermo Fisher Scientific (USA)

Centrifuga IEC CL31R Multispeed, systém kapalinové chromatografie UltiMate 3000
RSLCnano System

Vibra (JAP)

Předvážky AJ-420CE (Shinko Denshi)

2.4 ROZTOKY

Sterilizační roztok

- 70% (v/v) ethanol ve vodě

Hoaglandův roztok

- 0,4 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,15 M K_2SO_4 ; 0,13 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 M KCl ; 0,05 M KH_2PO_4 ; 1 mM H_3BO_3 ; 1 mM MnSO_4 ; 0,1 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,04 M Fe-EDTA

Izolace tylakoidních membrán

- **Pufr A (homogenizační pufr):** 35 mM HEPES pH 7,2, 400 mM sacharóza, 400 mM NaCl, 4 mM MgCl_2 , 5 mM askorbát sodný, 2 mg/ml BSA
- **Pufr B (resuspendační pufr 1.):** 25 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, 8 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA
- **Pufr C (resuspendační pufr 2.):** 50 mM HEPES pH 7,2, 400 mM sacharóza, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl_2

Stanovení koncentrace chlorofylu

- 80% (v/v) ACN

WF Assay pracovní roztoky

- **I:** 10mM Tris/Cl pufr pH 8,5
- **II:** 10mM Tris/Cl pufr pH 8,5; 8M močovina
- **III:** 10mM Tris/Cl pufr pH 8,5; 8M močovina; 5 mM DTT

Pufry pro rozpouštění proteinů WF Assay

- **1 (nativní):** 10mM Tris/Cl pufr pH 8,5
- **2 (denaturační):** 10mM Tris/Cl pufr pH 8,5; 8M močovina
- **3 (denaturační a redukční):** 10mM Tris/Cl pufr pH 8,5; 8M močovina; 5mM DTT

Nativní elektroforéza (CN-PAGE)

- **Zásobní roztok akrylamidu/bisakrylamidu (AA/BIS):** 50% T, 2,6% C
- **Zásobní roztok gelového pufru (6x koncentrovaný):** 0,3 M Bis-Tris/HCl pH 7,

3 M aminokapronová kyselina

- **Zásobní katodový pufr (10x koncentrovaný):** 0,15 M Bis-Tris/HCl pH 7, 0,5 M Tricin
- **Katodový pufr (1x koncentrovaný):** 15 mM Bis-Tris/HCl pH 7, 0,05M Tricin, 0,056 mM DBM, 1,4 mM SDC
- **Anodový pufr:** 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7
- **Pufr C (vzorkovací):** 50 mM HEPES/NaOH pH 7,2, 0,4 M sacharóza, 5 mM MgCl₂.6H₂O, , 15 mM NaCl, 10% glycerol
- 10% (v/v) roztok APS

SDS-PAGE

- **Zásobní roztok akrylamidu/bisakrylamidu (AA/BIS):** 50% T, 2,6% C
- **Zásobí gelový pufr (4x koncentrovaný):** 2,8 M Tris/HCl pH 8,6
- **Katodový pufr:** 0,25 M Tris, 1,92 M glycin, 35 mM SDS
- **Anodový pufr:** 0,5 M Tris/HCl pH 8,3
- **Ekvilibrační SDS pufr:** 25 mM Tris/HCl pH 7,2, 35 mM SDS, 35 mM DTT
- 10% (v/v) roztok APS

Barvení gelu pomocí Coomassie brilliant blue

- **Barvicí roztok:** 0,12% (w/v) koloidní Coomassie brilliant blue G-250, 10% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 10% (v/v) ortho-H₃PO₄, 20% (v/v) methanol
- **Odbarvovací roztok:** 5% (v/v) kyselina octová

Štěpení proteinů v roztoku

- **Extrakční pufr A:** 100 mM TEAB pH 8,5, 6 M močovina, 2 M thiomočovina
- **Extrakční pufr B:** 100 mM TEAB pH 8,5, 6 M močovina, 2 M thiomočovina, 5% (w/v) SDC
- **Extrakční pufr C:** 100 mM TEAB pH 8,5, 6 M močovina, 2 M thiomočovina, 0,5% (w/v) SDC
- **Redukční činidlo:** 100mM TEAB pH 8,5, 25mM TCEP
- **Alkylační činidlo:** 100mM TEAB pH 8,5, 330mM IAM
- **Zásobní roztok trypsinu:** trypsin 5 µg/µl v 0,1% (v/v) FA

Štěpení proteinů v gelu

- **Odbarvovací roztok:** 100 mM AmBi pH 8, 50% (v/v) ACN
- **Redukční činidlo:** 100 mM AmBi pH 8, 10 mM DTT
- **Alkylační činidlo:** 100 mM AmBi pH 8, 55 mM IAM
- **Štěpící roztok:** 20 mM AmBi pH 8, 20 ng/μl trypsinu

Extrakce peptidů

- **Extrakční pufr:** 30% (v/v) ACN, 5% (v/v) FA

Frakcionace peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip

- **Promývací roztok:** 5% (v/v) FA
- **Eluční roztok 1:** 8% (v/v) ACN, 25 mM NH₄HCO₃ pH 10
- **Eluční roztok 2:** 12% (v/v) ACN, 25 mM NH₄HCO₃ pH 10
- **Eluční roztok 3:** 16% (v/v) ACN, 25 mM NH₄HCO₃ pH 10
- **Eluční roztok 4:** 24% (v/v) ACN, 25 mM NH₄HCO₃ pH 10
- **Eluční roztok 5:** 32% (v/v) ACN, 25 mM NH₄HCO₃ pH 10
- **Eluční roztok 6:** 48% (v/v) ACN, 25 mM NH₄HCO₃ pH 10

Odsolení peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip

- **Promývací roztok:** 5% (v/v) FA
- **Eluční roztok:** 2,5 % (v/v) FA, 50% (v/v) methanol

Mobilní fáze pro LC-MS

- **Mobilní fáze A:** 0,1% FA (v/v)
- **Mobilní fáze B:** 90% ACN (v/v), 0,1% (v/v) FA

2.5 METODY

2.5.1 Pěstování ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

2.5.1.1 Sterilizace

Semena ječmene setého (*Hordeum vulgare*), konkrétně přirozeného genotypu (wilde type, WT) a mutantního typu chlorina (*clo*) byla inkubována 1 min za občasného míchání ve sterilizačním roztoku. Po vyjmutí byla semena vysušena pomocí filtračního papíru. Takto sterilizovaná semena byla uchována ve sterilizované uzavřené nádobce při -20 °C. Sterilizace byla provedena ve flowboxu.

2.5.1.2 Výsev a pěstování rostlinek

Semena rostliny *Hordeum vulgare* byla vyjmuta z -20 °C a ihned zasazena do květináčů obsahujících perlit. Květináče se zasetými semeny byly umístěny do fotokomory, podmínky pro růst byly nastaveny takto: 21 °C, vlhkost 60 % a délka dne 16/8h. Po dobu 7 dnů byla semena/rostlinky ječmene zalévána Hoaglandovým roztokem. 24 hodin před sklizením byly takto napěstované rostlinky rozděleny na dvě skupiny. Kontrolní skupina byla v průběhu posledního dne pěstování zalévána Hoaglandovým roztokem s 0,1% (w/v) DMSO a druhá skupina rostlinek byla zalévána roztokem obsahujícím 10 μM BAP a 0,1% (w/v) DMSO.

2.5.2 Izolace tylakoidních membrán

2.5.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu

Květináče s osmidenními rostlinami *Hordeum vulgare* byly přemístěny z fotokomory do laboratoře, kde byly umístěny do tmy na 20 min. Po uplynutí temnostní adaptace byla odstřižena horní zelená část listů. Následující kroky probíhaly při tlumeném zeleném světle a po celou dobu izolace byly vzorky umístěny na ledu. Listy byly nastříhány na menší kousky do kádinky ke 200 ml pufru A. Homogenizace byla provedena za použití tyčového homogenizátoru při 13 000 otáčkách ve 3 intervalech po 10 s.

2.5.2.2 Izolace tylakoidních membrán

Homogenát byl zfiltrován pomocí nylonové sítky a přelit do čisté kádinky. Následně byl rozdělen do 4 falkonek po 40 ml a centrifugován při 5000 g po dobu 6 min a 4 °C. Supernatant byl odpipetován, k peletu byly připipetovány 2 ml pufru B a pelet byl pomocí štětečku v pufru B resuspendován. Takto zpracovaný vzorek byl slit ze 4 alikvotů do 2 a ty

byly doplněny do 40 ml pufrem B. Vzorčky byly centrifugovány při 5000 g po dobu 10 min a 4 °C. Supernatant byl opět odstraněn, k peletu byly přidány 2 ml pufru C a pelet byl opět pomocí štětečku v daném pufru resuspendován. Takto připravené vzorky byly zkombinovány do jednoho, který byl následně centrifugován při 5000 g po dobu 5 min a 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odlit a pelet resuspendován pomocí pipety v 0,5 ml pufru C. Mikrozkušavky se získanou suspenzí izolovaných tylakoidních membrán byla zabalena do alobalu a uložena do ledu až do doby rozdělení na jednotlivé alikvoty (Shukolyukov 2011).

2.5.2.5 Měření koncentrace chlorofylu

Z připravených suspenzí izolovaných tylakoidních membrán bylo napipetováno vždy 10 µl do 2 ml zkumavky ke 2 ml 80% (v/v) acetonu. Zkumavka byla zvortexována a centrifugována při 10000 g po dobu 10 min 4 °C. Absorbance supernatantu byla změřena na laserovém spektrometru při vlnových délkách 470 nm (karotenoidy), 646,8 nm (chlorofyly), 663,2 nm a 750 nm (pozadí), kdy byl jako blank použit 80% (v/v) vychlazený aceton. Měření proběhlo ve skleněných kyvetách o délce jednoho cm. Obsah chlorofylu *a+b* byl vypočítán za použití naměřených absorbancí dle Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler 1987).

$$7,15 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{646,8} - A_{750}) = \text{obsah chlorofylu } a+b \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

kdy A představuje absorbanci vzorků při daných vlnových délkách.

Jelikož suspenze tylakoidních membrán byla v roztoku acetonu zředěna 200x, tento výsledek byl vynásoben číselnou hodnotou 200, čímž byla získána výsledná koncentrace chlorofylů v µg/ml. Suspenze tylakoidních membrán byla poté rozpipetována do 0,5 ml mikrozkušavek, kdy každý alikvot obsahoval 100 µg chlorofylů. Takto připravené alikvoty byly zamrazeny pomocí tekutého dusíku a uschovány při -80 °C.

2.5.3 Kvantifikace proteinů

2.5.3.1 WF assay

Nejprve byla připravena kalibrační křivka TRP dle Tabulky 1.

Tabulka 1. Příprava kalibrační křivky TRP.

Roztok standardu	TRP (μg)	Objem (μl)	C TRP (μg/μl)	Příprava	
A	5	2	2,5	2,5 mg TRP	997,5 μl*
B	2,5	2	1,25	200 μl A	200 μl*
C	1	2	0,5	80 μl A	320 μl*
D	0,5	2	0,25	200 μl C	200 μl*
E	0,2	2	0,1	80 μl C	320 μl*
F	0,1	2	0,05	200 μl E	200 μl*
G	0,04	2	0,02	80 μl E	320 μl*
H	0,01	2	0,005	40 μl F	360 μl*

* příslušný objem použitého rozpouštědla

Byla použita různá 3 rozpouštědla – 10mM Tris/Cl pH 8,5; 10mM Tris/Cl pH 8,5 s 8 M močovinou a 10mM Tris/Cl pH 8,5 s 8 M močovinou a 5 mM DTT.

2.5.3.1. Standardní provedení WF assaye

Do černé 96-jamkové destičky byly napipetovány proteinové standardy v objemu 2 μl. Poté k nim bylo přidáno 200 μl příslušného pracovního roztoku (10 mM Tris/Cl pufru o pH 8,5; 10 mM Tris/Cl pufru o pH 8,5 a 8 M močovina; nebo 10 mM Tris/Cl pufru, 8 M močovina a 5 mM DTT). Pro každý pracovní roztok byl každý vzorek pipetován v triplicátu. Následně byla provedena inkubace při 750 rpm po dobu 5 min a 20 °C (T_0). Poté byla změřena fluorescence ve zvolených časových intervalech při tomto nastavení: excitace při 295 nm s šířkou pásma 9 nm; emise při 350 nm s šířkou pásma 20 nm; 10 čtení, integrační čas 50 μs; 20 °C, zesílení (gain) 75.

Fluorescence TRP byla stejným způsobem změřena také u vybraných proteinů, konkrétně BSA, OVA, MYO, LYS s výslednou koncentrací 15 mg/ml apo-transferinu a β- kaseinu, které měly výslednou koncentraci 2 mg/ml. Každý protein byl opět rozpuštěn ve všech třech použitých rozpouštědlech a inkubován po zvolenou dobu při 750 rpm a 20 °C se všemi třemi typy pracovních roztoků.

Denaturace proteinů před stanovením WF assayí

Pro tento experiment byly použity proteiny BSA, LYS a MYO o koncentraci 15 mg/ml. Tyto proteiny byly rozpuštěny v následujících rozpouštědlech – 10 mM Tris/Cl pufr o pH 8,5; 10 mM Tris/Cl pufr o pH 8,5 s 8 M močovinou; 10 mM Tris/Cl pufr o pH 8,5 s 8 M močovinou a 5 mM DTT.

Od proteinů rozpuštěných v 10 mM Tris/Cl byly odebrány 3 alikvoty o objemu 20 μ l. První alikvot byl inkubován 15 min při 100 °C. Následovala 5 min centrifugace při 10 000 g a celý supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky. Ke zbylým dvěma alikvotům bylo přidáno SDS na výslednou koncentraci 1% (w/v) nebo 2% (w/v) SDS a následovala inkubace při 1400 rpm a 20 °C po dobu 15 min.

Z takto připravených vzorků (6 variant) byly pipetovány vždy 2 μ l do černé 96-jamkové desky. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l pracovního roztoku 10 mM Tris/Cl s 8 M močovinou nebo 10 mM Tris/Cl s 8 M močovinou a 5 mM DTT. Pro každý pracovní roztok byl každý vzorek pipetován v triplicátu. Samotné měření fluorescence proběhlo při popsaném nastavení, viz výše.

2.5.3.2 2D-Quant Kit

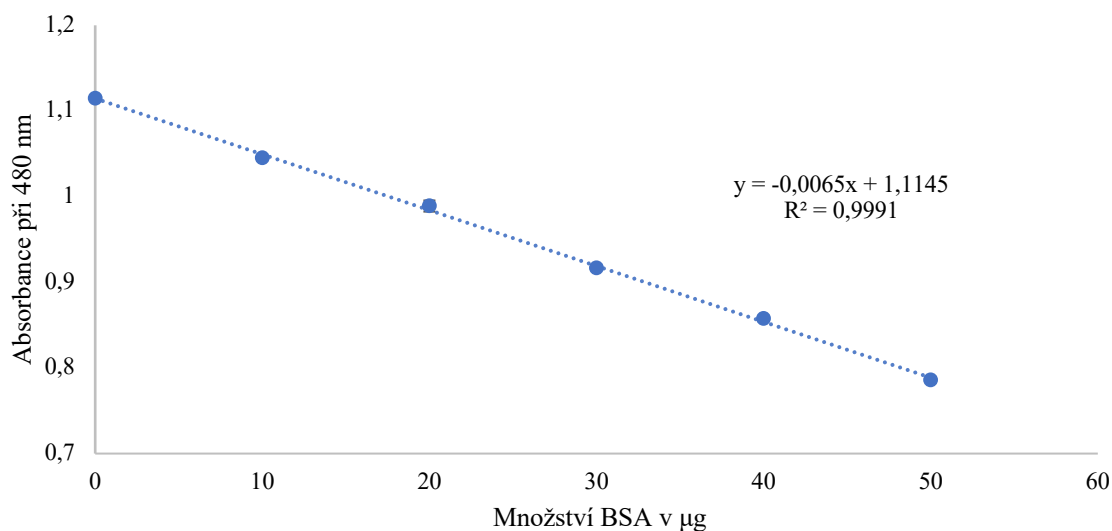
Nejprve byl smíchán reagent A s reagentem B do výsledného poměru 100:1, čímž vznikl pracovní roztok. V duplikátu byla dle návodu výrobce vytvořena kalibrační řada (Tab 2).

Tabulka 2. Příprava kalibrační křivky za pomoci BSA.

Roztok standardu	1	2	3	4	5	6
Množství standardu BSA (μ l)	0	5	10	15	20	25
Celkové množství proteinů (μ g)	0	10	20	30	40	50

Do nových 2 ml zkumavek bylo nejdříve napipetováno 5 μ l příslušného vzorku. Ke standardům i vzorkům bylo přidáno 500 μ l Precipitantu. Každá zkumavka byla zvortexována a 3 min inkubována při laboratorní teplotě (RT, 25 °C). Následoval přidavek 500 μ l Koprecipitantu a všechny zkumavky byly 10x promíchány otáčením dnem vzhůru. Po 5 min centrifugaci při 10 000 g a RT byla provedena dekantace supernatantu. K proteinovému peletu bylo připipetováno 100 μ l roztoku obsahujícího měď a 400 μ l

deionizované vody. Po krátkém zvortexování byl přidán 1 ml pracovního roztoku a promíchání bylo provedeno otočením dna vzhůru 10x. Následovala 15 min inkubace při RT. Absorbance při vlnové délce 480 nm byla změřena na spektrofotometru při RT s použitím deionizované vody jako blanku.



Obrázek 4. Příklad kalibrační křivky s použitím standardu BSA (2 mg/ml)

Ze získaných hodnot absorbance (Obrázek 4.) a její závislosti na množství proteinového standardu BSA byla odvozena koncentrace a množství proteinů v jednotlivých vzorcích.

2.5.4 Elektroforéza

Z izolovaných tylakoidních membrán byly jednotlivé proteinové komplexy rozděleny za použití nativní gelové elektroforézy (CN-PAGE), kdy bylo využito i druhého rozměru (2D SDS-PAGE).

2.5.4.1 Nativní elektroforéza

Příprava gelu

Nejprve byl připraven gradientový gel, za pomoci 4% a 8% roztoku akrylamidu dle Tabulky 3.

Tabulka 3. Složení 4% a 8% roztoku akrylamidu

	4 % (50 ml)	8% (50 ml)
Glycerol (ml)	-	10
Gelový pufr 1x koncentrovaný (ml)	8,33	8,33
Voda (ml)	37,67	23,67
Zásobní roztok AA/BIS (ml)	4	8

Na elektromagnetickou míchačku byla položena směšovací nádoba napojená na peristaltickou pumpu. Do levé komory obsahující míchadlo byl napipetován 4% roztok akrylamidu v objemu 3 ml a otevřením ventilu byl zkontrolován bezproblémový průtok roztoku do pravé komory. Po kontrole byl ventil mezi oběma komorami uzavřen. Do pravé komory byly napipetovány 3 ml 8% roztoku akrylamidu. Následně bylo do obou komor přidáno 5 μ l TEMED a 20 μ l roztoku APS. Po přidavcích byla zapnuta peristaltická pumpa, kohout mezi komorami byl rychle otevřen a roztok vznikajícího gradientového gelu byl přiveden mezi skla s 1 mm rozpěrkou. Poté byl vsazen hřebínek a roztoky byly ponechány volně polymerizovat mezi skly do dalšího dne, přičemž byly uchovávány ve fólii s navlhčenou buničinou v lednici při 4 °C.

Příprava vzorků

Vzorky bylo nutné připravit za tlumeného zeleného světla, kdy veškerá práce probíhala na ledu. Do 0,5 ml mikrozkušavek byl napipetován pufr C, 5% (w/v) roztok obsahující DBM a vzorek s izolovanými tylakoidními membránami dle Tabulky 4.

Tabulka 4. Složení jednotlivých roztoků vzorků v pořadí, v jakém byly nanášeny na gel. Vzorky dvojího typu tylakoidních membrán ječmene setého (*Hordeum vulgare*), přirozeně vyskytující se genotyp WT a jeho mutantní forma *clo*, který má deficit v chlorofylu b

Jamky	1	2	3	4
Vzorek	WT	<i>clo</i>	WT	<i>clo</i>
Ošetření	DMSO	DMSO	BAP	BAP
Pufr C (μ l)	19,9	18,1	19,4	16,7
5% (w/v) β -dodecylmaltosid (μ l)	5	5	5	5
Vzorek (μ l)	5,1	6,9	5,6	8,3

Vlastní elektroforéza

Skla obsahující gradientové gely byla upevněna do elektroforetické komůrky a ta byla vložena do elektroforetické vaničky. Do prostoru mezi skla byl přidán katodový pufr a do elektroforetické vaničky anodový pufr. Aparatura i s pufrý byla přenesena do nádoby s ledem a z gelu byl vyjmut hřebínek. Do vzniklých jamek byly dávkovány solubilizované vzorky o objemu 30 μ l (Tab. 5), celá aparatura byla připojena ke zdroji vysokého napětí a byla spuštěna elektroforéza. Na 2 gely byl použit program skládající se ze dvou cyklů, první patnáctiminutový – 100 V a 7 mA, druhý dvou hodinový – 500 V a 15 mA.

Po separaci byly gely vyjmuty z aparatury a skel, opláchnuty deionizovanou vodou a přeneseny na čistou hladkou euro fólii. Následně byly gely naskenovány za použití fluorescenčního skeneru. Byla zvolena vlnová délka excitačního světla odpovídající modré oblasti (420-450 nm), a protože chlorofyl *a* vyzařuje fluorescenci v červené oblasti, bylo nastaveno použití filtru CY5, který umožňuje detekovat emisi o vlnové délce 690 nm. Po naskenování byly gely uchovávány při -20 °C až do dalšího použití.

2.5.4.2 SDS-PAGE jako druhý rozměr 2D elektroforézy

Příprava gelu

Nejprve byl připraven gradientový separační gel, za pomoci 12% a 19,5% roztoku akrylamidu dle Tabulky 5.

Tabulka 5. Složení 5%, 12% a 19,5% roztoku akrylamidu

	5% (2*5 ml)	12% (30 ml)	19,5% (30 ml)
Sacharóza (g)	-	-	2,92
Močovina (g)	-	12,49	12,49
Gelový pufr 1x koncentrovaný (ml)	1,2	6,89	6,89
Voda (ml)	3,25	6,32	-
Zásobní roztok AA/BIS (ml)	0,5	7,22	11,676

Na skla s 1,5 mm rozpěrkou byla naznačena výška zaostřovacího a separačního gelu (1 cm, resp. 0,5 cm, od vrchní hrany skla). Na elektromagnetickou míchačku byla položena směšovací nádoba napojená na peristaltickou pumpu. Do levé komory obsahující míchadlo byl napipetován 12% roztok akrylamidu v objemu 4,65 ml a otevřením ventilu byl zkontrolován bezproblémový průtok roztoku do pravé komory. Po kontrole byl ventil mezi

oběma komorami uzavřen. Do pravé komory byl napipetován 19,5% roztoku akrylamidu v objemu 4,65 ml. Následně bylo do obou komor přidáno 5 μ l TEMED a 20 μ l roztoku APS. Po přidavcích byla zapnuta peristaltická pumpa, kohout mezi komorami byl rychle otevřen a roztok vznikajícího gradientového gelu byl přiveden mezi skla. Poté byl roztok separačního gelu převrstven deionizovanou vodou pomocí upravené stříkačky. Po ukončení polymerizace (45 min) byla voda odsáta. Do 5% roztoku akrylamidu bylo za mírného míchání přidáno 5 μ l TEMED a 25 μ l roztoku APS a roztok byl napipetován na zpolymerizovaný separační gel s následným převrstvením vodou. Aparatura s gely byla zabalena do fólie s vlhkou buničinou a umístěna do 4 °C přes noc.

Příprava proteinů separovaných pomocí CN-PAGE pro druhý rozměr

Poté, co byl proveden první rozměr separace pomocí CN-PAGE, byla příslušná dráha obsahující separované komplexy z gelu vyřezána. Ekvilibrační SDS pufr byl přelit do Petriho misky a do ní byla vložena vyřezaná dráha. Následovala inkubace 30 min za mírného promíchávání.

Vlastní elektroforéza

Po inkubaci byla ekvilibrovaná separační dráha přenesena mezi skla na povrch zaostřovacího gelu. Na malý kousek blottovacího papíru bylo napipetováno 5 μ l standardu molekulových hmotností a po jeho zaschnutí byl papírek vložena mezi skla tak, aby byl v kontaktu s gradientovým gelem. Vše bylo poté převrstveno 1% (w/v) roztokem agarózy.

Před elektroforézou byl nalit mezi skla obsahující gradientové gely katodový pufr a do elektroforetické vaničky anodový pufr. Po připojení zdroje vysokého napětí a spuštění elektroforézy, byl její průběh rozdělen do dvou cyklů. Nastavení pro prvních třicet minut bylo 10 mA, pro druhý cyklus, který trval čtyři hodiny, bylo nastaveno 20 mA.

Barvení proteinů v gelu

Na 50 ml barvicího roztoku bylo smícháno 40 ml zásobního roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s 10 ml methanolu. Polyakrylamidový gel byl vložena do Petriho misky naplněné destilovanou vodou. Po krátkém oplachu byla voda slita a k polyakrylamidovému gelu byl přidán barvicí roztok tak, aby byl gel ponořen. Inkubace na třepačce byla provedena přes noc. Po ukončení barvení byl roztok odlit a ke gelu byla

přidána 5% kyselina octová. V té byl gel inkubován, dokud nedošlo k odbarvení pozadí. Poté byl gel opláchnut destilovanou vodou a naskenován.

2.5.6 Štěpení proteinů

2.5.6.1 Štěpení proteinů v roztoku

K alikvotům izolovaných tylakoidních membrán bylo přidáno 80 μ l extrakčního pufru, membrány byly v tomto pufru resuspendovány a inkubovány po dobu 1 hodiny při 20 °C za maximálních otáček (rpm). Následovala 10 min centrifugace při 15 000 g a 20 °C. Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky a v ní byl promíchán. Poté bylo provedeno stanovení celkových proteinů v získaných vzorcích (viz kapitola 2.5.3 Kvantifikace proteinů).

Objem odpovídající 30 μ g proteinů byl napipetován do nové 0,5 ml zkumavky s následným doplněním extrakčním puforem do finálního objemu 20 μ l. Ke vzorkům bylo přidáno 5 μ l redukčního činidla s následnou inkubací 30 min při 1000 rpm. Poté bylo přidáno 5 μ l alkylačního činidla, po přidavku byla provedena inkubace 30 min za tmy při 1000 rpm.

Ke vzorkům obsahující redukované a alkylované proteiny bylo připipetováno 170 μ l 25 mM TEAB. Následovala kontrola pH pomocí kalibrovaných pH papírků (požadovaná hodnota byla mezi 8-8,5). Nakonec byly ke vzorkům připipetovány 2 μ l trypsinu o koncentraci 0,5 μ g/ μ l (tzn. 1 μ g) a inkubace proběhla přes noc při 37 °C a 300 rpm.

2.5.6.2 Štěpení proteinů v gelu

Gel byl přemístěn do čisté deionizované vody, kde byl inkubován na třepačce po dobu 5 min. Po opláchnutí byl gel přemístěn na skleněnou podložku a vybrané proteiny byly vyříznuty za použití skalpele a přeneseny do čisté mikrozkušavky. V té byl blok gelu nakrájen na co nejmenší kostičky (1x1x1 mm). K takto připraveným kouskům gelu byl připipetován odbarvovací roztok o objemu 300 μ l a následovala 15 min inkubace při 800 rpm a RT. Poté byl roztok odpipetován a kousky gelu byly převrstveny 300 μ l ACN a byla provedena inkubace 10 min při 800 rpm a RT. Roztok ACN byl odpipetován a dehydrované kousky gelu byly umístěny do flow boxu, aby co nejvíce vyschly.

Následovala redukce pomocí 100 μ l redukčního činidla (inkubace 30 min při 56 °C bez třepání), načež byl redukční roztok odpipetován a opět byla provedena dehydratace pomocí ACN viz výše. Poté následovala alkylace za použití alkylačního činidla o objemu

100 μ l (inkubace 20 min při RT za tmy). Po uplynutí inkubace byl alkylační roztok odstraněn a byla provedena dehydratace gelových kousků pomocí ACN (viz výše).

Vysušené gelové kousky byly opláchnuty 500 μ l 25 mM roztoku AmBi (inkubace 5 min v termomixéru při 800 rpm a RT) a v dalším kroku byla provedena dehydratace viz výše. Na závěr celého postupu byl přidán štěpící pufr obsahující trypsin v koncentraci 20 ng/ μ l a inkubace proběhla přes noc při 37 °C a 300 rpm.

Vzorky obsahující tryptické peptidy byly extrahovány pomocí přidavku 100 μ l extrakčního pufru po dobu 30 min při maximálním rpm a 37 °C. Po krátké centrifugaci byl roztok peptidů odebrán do nové mikrozkušavky a celá extrakce byla opakována ještě jednou. Následně bylo provedeno odpaření do sucha na vakuové odparce při 45 °C. Takto připravené vzorky byly ihned přečištěny pomocí mikrokolonek s reverzní fází viz níže.

2.5.7 Přečištění peptidů před MS analýzou

2.5.7.1 Přečištění peptidů s jejich frakcionací za pomoci mikrokolonek StageTip

Tvorba mikrokolonek

Mikrokolonky neboli StageTipy byly vytvořeny následujícím způsobem. Za pomoci Hamiltonovy jehly s průměrem 16 G byly z disku C18 vyseknuty postupně čtyři fritky, které byly jedna po druhé vpraveny do předem zastřižené 200 μ l žluté špičky. Takto připravená mikrokolona byla vsunuta do 1,5 ml mikrozkušavky, která měla ve svém uzávěru vytvořený otvor.

Příprava vzorků

Ke vzorkům, které byly štěpeny v roztoku, bylo přidáno 12 μ l 95% (v/v) FA. Vzorky byly zvortexovány, inkubovány 5 min při 37 °C za neustálého promíchávání, a následně centrifugovány na 20 000g 10 min. Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky.

Pokud byl při štěpení použit SDC, byly provedeny ještě další varianta jeho odstranění před frakcionací, konkrétně fázový transfer. Na ten bylo použito 200 μ l ethylacetátu, který byl přidán k celému objemu vzorku. Po promíchání následoval přidavek 24 μ l 98% (v/v) FA, čímž byl vzorek okyselen (hodnota pH okolo 2). Poté byl vzorek opět vortexován po dobu 1 min. Následovala 5 min inkubace při 1 400 rpm za RT a 10 min centrifugace při 20 000 g za RT. Poté byla přepipetována vodní fáze ze spodu mikrozkušavky do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Vzorky byly zakoncentrovány ve vakuové odparce při 60 °C na poloviční objem (50 μ l), ke kterému bylo následně připipetováno 100 μ l 5% (v/v) FA.

Vlastní přečištění s frakcionací

Aktivace mikrokolonek (resp. Reverzní fáze) byla provedena za použití 100 μ l isopropanolu a centrifugace po dobu 2 min při 6000 g za RT. Aktivace byla provedena dvakrát. Kolonky byly ekvilibrovány pomocí 100 μ l 5% (v/v) FA a centrifugovány po dobu 2 min při 3000 g za RT. Tento krok byl proveden dvakrát.

Aktivovaná a ekvilibrovaná špička byla upevněna do čisté 1,5 ml zkumavky (označení FT) a celý objem vzorku do ní byl přepipetován. Opět následovala centrifugace po dobu 2 min při 3000 g a RT. Poté, co se celý objem vzorku dostal skrz mikrokolonku, bylo do špičky přidáno 50 μ l 5% (v/v) FA a znovu centrifugována 2 min při 3 000g a RT. Následně byla mikrokolonka přemístěna do nové zkumavky označené podle příslušného elučního roztoku. Eluční roztok obsahoval dané % množství ACN (6 různých koncentrací, tzn. šestikroková eluce) a do špičky se napipetoval v objemu 50 μ l. Eluce bylo dosaženo centrifugací při 2 000 g 2 min a RT. Jednotlivé získané frakce byly přepipetovány do skleněných Total Recovery vialek a odpařeny při 60 °C na vakuové odparce. Skleněné vialky se zakoncentrovanými vzorky byly zaparafilmovány a skladovány při – 20 °C.

2.5.7.2 Přečištění peptidů za pomoci mikrokolonek StageTip

Tvorba mikrokolonek

Pro vyseknutí dvou fritek z disku C18 byla použita Hamiltonova jehla o průměru 16 G. Fritky byly vpravemý do předem zastřižené 200 μ l žluté špičky, která byla vsunuta do 1,5 ml mikrozkušavky, která měla ve svém uzávěru vytvořený otvor.

Příprava vzorku

K odpařeným vzorkům, které byly štěpeny v gelu, bylo přidáno 50 μ l 5% (v/v) FA. Vzorky byly zvortexovány, 5 min sonifikovány a centrifugovány po dobu 2 min při 2000 g.

Vlastní odsolení

Aktivace mikrokolonek (resp. Reverzní fáze) byla provedena za použití 50 μ l isopropanolu a centrifugace po dobu 2 min při 4000 g za RT. Aktivace byla provedena dvakrát. Kolonky byly poté ekvilibrovány pomocí 50 μ l 5% (v/v) FA a centrifugovány po dobu 3 min při 2000 g za RT. Tento krok byl také proveden dvakrát.

Aktivovaná a ekvilibrovaná špička byla upevněna do čisté 1,5 ml zkumavky (označení FT) a celý objem vzorku do ní byl přepipetován. Opět následovala centrifugace

po dobu 5 min při 1700 g a RT. Poté, co se celý objem vzorku dostal skrz mikrokolonku, bylo do špičky přidáno 50 μ l 5% (v/v) FA a znovu následovala centrifugace po dobu 5 min při 1700 g. Takto byl vzorek promyt dvakrát. Následně byla mikrokolonka přemístěna do nové označené zkumavky. Eluční roztok byl připipetován do špičky ke vzorku v objemu 50 μ l. Poté byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 1700 g. Eluce byla provedena dvakrát. Výsledný eluát byl přepipetován do skleněné Total Recovery vialky a zakoncentrován ve vakuové odparce při 45 °C. Skleněné vialky s odpařenými vzorky byly zaparafilmovány a skladovány při -20 °C.

2.5.8 Analýza na MS

Příprava vzorků

K přečištěnému (v případě štěpení v roztoku i frakcionovanému) vzorku obsahujícímu peptidy bylo připipetováno 20 μ l 5% (v/v) FA. Roztok byl několikrát řádně propipetován a následně 5 min sonifikován a krátce centrifugován.

Analýza vzorků byla provedena pomocí systému nanokapilární chromatografie (nLC) (UltiMate 3000 RSLCnano Systém, USA, Thermo Scientific) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF s ionizací elektrosprejem (ESI) (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo). Vzorky připravené k měření byly vloženy do autosampleru nLC, kde byly uchovávány při +10 °C do okamžiku nástřiku a provedení analýzy. Analýza jednotlivých vzorků byla opakována třikrát, nastřikovány byly vždy 4 μ l. V prvním kroku byly peptidy ze vzorku zachyceny na kapilární předkoloně (75 μ m \times 3 cm, IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reposil GOLD C18, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo). Zachycené peptidy byly na předkoloně izokraticky promývány 20 μ l 2% (v/v) FA po dobu 10 min. Přečištěné peptidy byly následně z předkolony postupně uvolňovány pomocí 80 minutové gradientové eluce (Tabulka 6) na analytickou kapilární kolonu (50 μ m \times 20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněnou také reverzní fází (Reposil GOLD C18, 3 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) při konstantním průtoku 180 nl/min.

Peptidy eluované z analytické kapilární kolony byly ionizovány pomocí elektrospreje a analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií metodou data-dependent analysis (DDA) s kolizí indukovanou fragmentací iontů v kolizní cele (CID).

Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; Captive Spray 1080 V; Dry gas: 8 l/min; Dry temperature: 150 °C); Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 3.5 eV; collision energy 6 eV;

Collision RF 1250 Vpp; transfer time 90 μ s; pre-puls storage 12 μ s); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; 2 s cycle time; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 500 cts; active exclusion po 1 spektrech po dobu následujících 20 s). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 100-1800 m/z s dobou sběru (acquisition time) 300 ms pro MS a rozsahu 60-250 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekursoru, kdy 60 ms odpovídá intenzitě iontů 50000 cts a více a 250 ms pro ionty s intenzitou 500 cts a méně.

Tabulka 6. Gradient pro eluci peptidů z nanokapilární předkolony. Použitá mobilní fáze A: 0,1% (v/v) FA; mobilní fáze B: 90% (v/v) ACN, 0,1% (v/v) FA

Čas	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	95	5
13	95	5
53	75	25
60	65	35
62	45	55
64	15	85
66	15	85
69	95	5
80	95	5

Zpracování dat

Surová data byla zpracována programem MaxQuant software v.1.6.10.43 (Tyanova et al., 2016) zahrnující prohledávací algoritmus Andromeda (Cox et al. 2011) (s nastavením parametrů „Bruker TOF“, (Beck et al. 2015). Identifikace proteinů byla provedena proti příslušné databázi. V případě vzorků získaných z huseničky rolního (*Arabidopsis thaliana*) to byla databáze obsahující referenční proteom jeho ekotypu Columbia získaný z databáze UniProt (staženo 25. 07. 2019; 39363 sekvencí) a soubor nejčastějších kontaminantů (247 proteinových sekvencí). V případě vzorků z ječmene setého (*Hordeum vulgare*) to byla databáze připravená stejným způsobem (staženo 17. 10. 2019; 299709 sekvencí). Základní parametry pro Andromeda algoritmus a identifikaci proteinů byly následující: enzym – trypsin, 2x možná vynechaná místa štěpení (miss cleavage), zadané modifikace peptidů – karbamidometylace cysteinu jako fixní, N-koncová acetylace proteinů a oxidace metioninu jako variabilní a minimální délka peptidu 7 aminokyselin. Výsledky prohledávání ze všech vzorků byly spojeny a statisticky filtrovány na hladině 1% FDR, false discovery rate, (Gupta et al. 2011) na úrovni spekter, peptidů a proteinů. Pro stanovení obsahu identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích byl byla použita metoda iBAQTa je založena na sumě

intenzit všech peptidů náležících danému proteinu a její následné normalizaci počtem všech peptidů, které se pro tento protein dají teoreticky pozorovat (Schwanhüusser et al. 2011). Anotace pro proteiny ječmene označené jako „uncharacterized“, případně „hypotetical“, byly doplněny na základě vyhledávání homologů metodou pBLAST (Madden, Tatusov, and Zhang 1996). Jako databáze byla zvolena databáze UniProt a organismus huseníček rolní (*A. thaliana*), ostatní parametry byly ponechány v originálním nastavení.

2.5.9 Počty opakování a statistické vyhodnocování výsledků

Technická opakování byla u všech vzorků prováděna minimálně v triplikátu. Pro biologické experimenty pak byl vždy použit triplikát.

Pro vyhodnocení významnosti detekovaných změn byl používán buďto párový (v případě opakovaného měření sledovaných hodnot téhož vzorku, např. u časového vývoje fluorescence), nebo nepárový T-test pro dva výběry se shodným rozptylem (v případě srovnávání naměřených hodnot dvou různých vzorků, např. fluorescence se dvěma pracovními pufrů) a dvěma chvosty. Statisticky významné změny jsou v grafech znázorněny hvězdičkou a v popisku je uvedena úroveň významnosti (velikost p -hodnoty). Pokud grafické znázornění významnosti nebylo z hlediska přehlednosti grafu možné, je statistická významnost naznačena v textu pomocí výrazů „významný“ či „signifikantní“.

V případě porovnávání změn obsahu identifikovaných proteinů byla pro stanovení významnosti použita metoda lineárních modelů pro vyhodnocování microarrayí, tzv. LIMMA testy (Smyth GK. 2004), s Lowessovou normalizací (Yang et al. 2001) příslušných iBAQ hodnot. Jako základní úroveň pro uznání změny jakožto významné byla vyžadována p -hodnota menší než 0,05.

2.6 VÝSLEDKY A DISKUZE

2.6.1 Úvod

Tato práce se zabírala proteomickou analýzou tylakoidních membrán. Jsou to specifické membrány nacházející se v rostlinném chloroplastu, kde vytváří tylakoidy, což jsou ploché váčky, v nichž sídlí fotosyntetický aparát. V těchto membránách se totiž nachází značené množství proteinů a ty jsou funkčně spojeny právě s fotosyntézou, díky níž dochází k přeměně energie světelného záření na energii chemickou a ta je následně využita k biosyntéze organických látek (Nath et al. 2013). Tyto proteiny jsou tedy pro rostliny zcela nezbytné.

Experimentální část byla proto nejprve zaměřena na metody přípravy a zpracování izolovaných membrán pro jejich následnou proteomickou analýzu. Konkrétně byly otestovány extrakce, solubilizace a denaturace, stanovení obsahu a enzymatické štěpení tylakoidních proteinů. Hlavním důvodem, proč byly optimalizovány tyto kroky, je fyzikálně-chemická povaha těchto proteinů. Obsahují totiž hydrofobní části a je tedy nutné použít detergenty, které umožní, aby se tyto oblasti dostaly do roztoku (Salvador et al. 2019). Hydrofobní části mají také snížený počet štěpných míst pro specifické proteasy. Pro zvýšení účinnosti enzymatického štěpení těchto proteinů je tedy nezbytná jejich úplná denaturace. Právě proto byly porovnány různé metody extrakce, denaturace a štěpení založené na aniontovém detergentu SDC (Lete et al. 2019) a vybrat tu, která bude vhodná pro finální vzorky obsahující tylakoidní membránové proteiny.

Neopomenutelným krokem proteomické analýzy je také stanovení celkových proteinů. Jelikož byl pro extrakci vybrán již zmíněný detergent SDC, bylo nutné zvolit metodu stanovení celkových proteinů, která s ním bude kompatibilní. Jako optimální se jevila WF assay, založená na fluorescenci TRP, který se nachází v primární struktuře proteinů. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu poskytující dostatečnou citlivost, která je velice specifická a navíc kompatibilní se zvoleným SDC až do koncentrace 5% (w/v) (Wiśniewski and Gaugaz 2015).

Se sestaveným protokolem pak byly provedeny experimenty, jejichž cílem bylo zjistit, zda mají rostlinné hormony cytokininy vliv na složení a zastoupení proteinů či proteinových komplexů u přirozeně se vyskytujícího genotypu ječmene setého (*Horeum vulgare*) a jeho mutantní formy *clo* s deficitem chlorofylu *b* (Janečková et al. 2019).

2.6.2 WF Assay

Jak již bylo zmíněno v úvodu, pro provedení kvantifikace extrahovaných tylakoidních proteinů byla vybrána WF assay a to nejenom díky své specifitě, jednoduchosti a citlivosti, ale také proto, že byla svými autory publikována jako kompatibilní s vybraným detergentem SDC v poměrně vysokých koncentracích. Tato metoda je tedy vhodná pro stanovení proteinů i ve zředěných vzorcích rozpuštěných v silně denaturujících pufrch (Wiśniewski and Gaugaz 2015).

Z počátku bylo nutné otestovat lineární rozsah kalibrační křivky, zda se bude měnit závislost intenzity fluorescence v čase a stabilitu standardů v závislosti na délce jejich skladování.

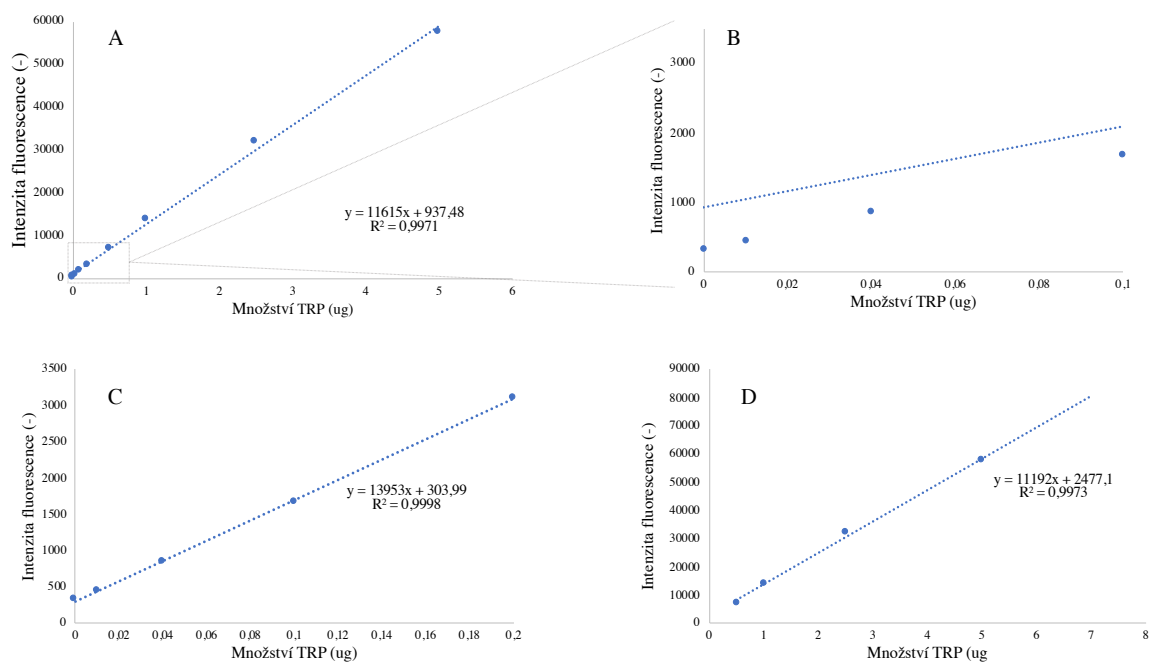
Poté proběhly experimenty sledující vliv denaturace na fluorescenci. Pro ně byla použita denaturační a redukční činidla a proteiny s různým počtem TRP a disulfidů. Protože každý z vybraných proteinů má svou jedinečnou strukturu, tak toto upořádání umožňuje porovnání případného vlivu změny konformace na jejich fluorescenci.

V posledním bloku experimentů pak byly vyzkoušeno několik způsobů denaturace proteinů ještě před samotným provedením WF assaye a jejich vlivu na získané výsledky.

2.6.2.1 Kalibrační křivka

Z původní publikace, která se zabírala WF assayí (Wiśniewski and Gaugaz 2015), byl nejdříve odvozen pracovní postup pro stanovení proteinů. Ještě před jeho použitím pro vzorky určené k finálním experimentům však bylo nutné prověřit jeho základní parametry jako lineární rozmezí, kdy jsou výsledky měření intenzity fluorescence TRP lineárně závislé na jeho množství, a složení rozpouštěcích a pracovní roztoků. V uvedené publikaci nebyla komentována stabilita standardů TRP, a proto byly následující experimenty zaměřeny také na tuto neobjasněnou část.

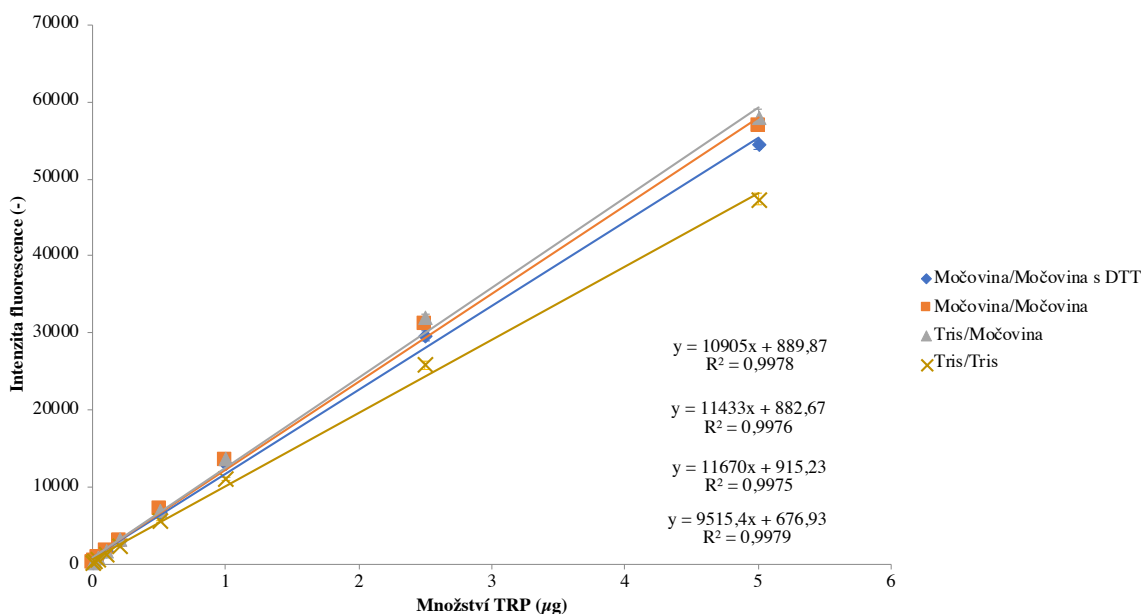
Nejdříve byla tedy sledován lineární rozsah kalibrační křivky. Jak je vidět na Obrázku 5., byla ověřena lineární závislost fluorescence TRP v použitém rozmezí 10 ng až 5 μ g. Tyto výsledky byly v souladu s původní publikací (Wiśniewski and Gaugaz 2015). Po přiblížení čtyř nejnižších bodů kalibračního grafu je ale vidět, že při vynesení celého rozsahu najednou dochází k odchylce v průběhu kalibrační křivky (Obrázek 5. B). Proto je třeba zvlášť vytvořit kalibrační křivku pro nejnižší body (10 ng až 0,1 μ g; Obrázek 5. C) a pro nejvyšší body (0,2 μ g až 5 μ g; Obrázek 5. D), kdy budou následně obě vzniklé rovnice regrese využity pro co nejpřesnější stanovení množství proteinů v měřených vzorcích.



Obrázek 5. A) Lineární závislost naměřené intenzity fluorescence na množství TRP, vyneseny jsou hodnoty v rozmezí 10 ng až po 5 µg TRP; B) Lineární závislost naměřené intenzity fluorescence na množství TRP; přiblíženo na 4 nejnižší hodnoty; C) Lineární závislost naměřené intenzity fluorescence TRP vynesené pro 5 nejnižších hodnot kalibrační křivky; D) Lineární závislost naměřené intenzity fluorescence vynesené pro zbývající 4 nejvyšší hodnoty kalibrační křivky.

Následovaly experimenty sledující závislost intenzity fluorescence TRP na složení a kombinaci používaných roztoků. Varianty pro rozpuštění TRP byly 2, a to pufr obsahující jen Tris/Cl o pH 8,5 a tentýž pufr s přidavkem močoviny (finální koncentrace 8 M). Tyto pufrы byly také použity i jako pracovní roztoky, přičemž ještě přibyla kombinace s 8 M močovinou a 5 mM DTT jako varianta třetí. Močovina byla přidávána, jelikož dle publikací by měla zvyšovat kvantový výtěžek fluorescence TRP (Aloj and Edelhoch 1972; Grinvald and Steinberg 1976). DTT bylo do experimentu zařazeno, protože redukuje disulfidické můstky v proteinech. (Vignes et al. 1992) bylo nutné ověřit, zda jeho přítomnost v pracovním roztoku již neovlivní fluorescenci samotného TRP. Z Obrázku 6. lze vidět rozdíly mezi vybranými kombinacemi rozpouštědel a pracovních roztoků. Nejnižší intenzitu fluorescence TRP vykazovala kombinace Tris/Tris, kdy byl rozpouštěcí i pracovní roztok samotný Tris/Cl pufr. Další roztoky obsahující přidavek močoviny v rozpouštěcím, nebo pracovním pufru, vykazují signifikantní rozdíly ve všech hodnotách naměřené fluorescence oproti výše zmíněné variantě. Při vzájemném porovnání variant Tris/Močovina a Močovina/Močovina pak v intenzitách fluorescence nebyly zjištěny významné rozdíly. U varianty Močovina/Močovina s DTT jsou sice při vyšších hodnotách množství TRP

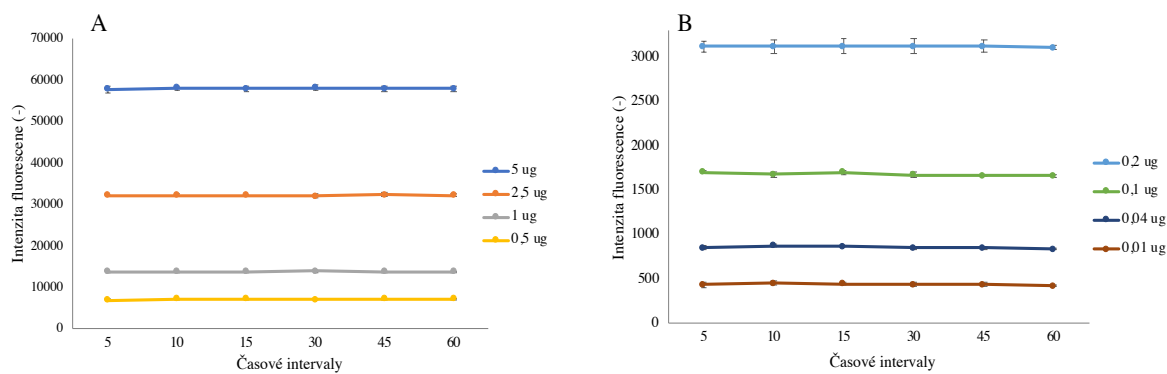
patrné rozdíly v naměřené fluorescenci, nicméně na základě provedených T-testů však nejsou signifikantní.



Obrázek 6. Závislost naměřené intenzity fluorescence na množství TRP složení a kombinaci používaných roztoků; označení použitých kombinací: Tris/Tris – rozpouštěcí i pracovní pufr 10 mM Tris/Cl o pH 8,5; Tris/Močovina – rozpouštěcí pufr 10 mM Tris/Cl o pH 8,5, a stejný pufr jako pracovní, pouze s přidavkem 8 M močoviny; Močovina/Močovina – rozpouštěcí i pracovní pufr 10 mM Tris/Cl o pH 8,5 s přidavkem 8 M močoviny; Močovina/Močovina s DTT – rozpouštěcí pufr 10 mM Tris/Cl o pH 8,5 s 8 M močovinou, a ten samý pufr jako pracovní, navíc s přidavkem 5 mM DTT jako pracovní pufr

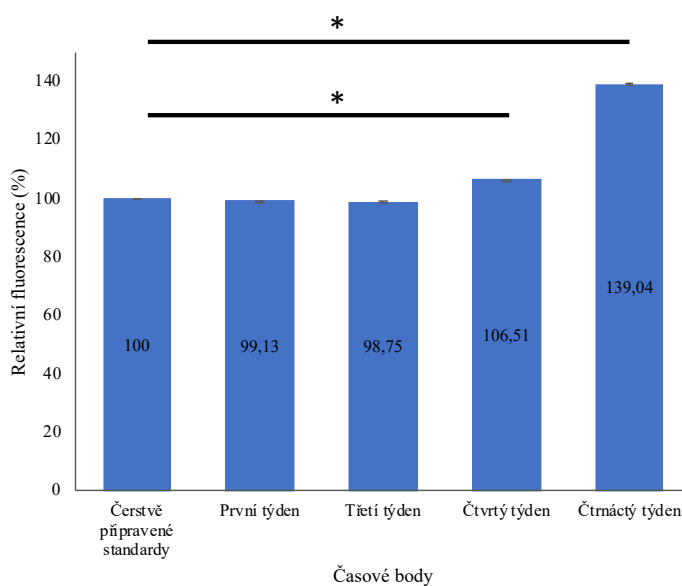
Z toho pokusu lze tedy usuzovat, že močovina opravdu zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence, a zároveň bude velmi dobře využitelná pro další experimenty, jelikož působí jako denaturační činidlo. DTT poté významně výsledné hodnoty fluorescence neovlivňuje, a tudíž by neměly být případné změny ve fluorescenci při jeho použití u proteinových vzorků přičítány jeho přidavku, ale například změně konformace daného proteinu. Oba tyto výsledky se shodují s dříve publikovanými závěry (Wiśniewski and Gaugaz 2015).

Fluorescence TRP standardů byla také měřena v závislosti na čase od přidavku pracovního roztoku, a to konkrétně v časových intervalech 5, 10, 15, 30, 45 a 60 min (Obrázek 7.). Z těchto grafů lze vyčíst, že intenzita fluorescence byla po celou dobu měření stabilní. Vlastní měření fluorescence by tedy mělo být provedeno během jedné hodiny od přidání pracovního roztoku.



Obrázek 7. Závislost fluorescence standardů TRP na době od přidavku pracovního roztoku ve zvolených časových intervalech pro A) 4 nejvyšší hodnoty množství TRP a B) 4 nejnižší hodnoty TRP.

Následně byla sledována stabilita připravených standardů v průběhu jejich skladování. Fluorescence čerstvě připravených standardů TRP byla, proto změřena ihned po přípravě a v rámci tohoto experimentu byly tyto hodnoty používány jako výchozí (100 %). Vůči nim pak byly vztahovány hodnoty naměřené v dalších časových bodech. Mezi měřeními byly standardy vždy zamrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jak je vidět na Obrázku 8., z počátku měly standardy zachovanou stejnou fluorescenci. Viditelný nárůst intenzity fluorescence je znatelný až po třítýdenním skladování. Po měsíčním skladování intenzita fluorescence začne významně narůstat, z čehož vyplývá, že skladování standardů déle jak měsíc není vhodné, a je lepší si vždy vytvořit nové roztoky.



Obrázek 8. Stabilita fluorescence standardů TRP v závislosti na době skladování; jako kontrolní byly použity hodnoty fluorescence čerstvě připravených TRP standardů; hodnoty fluorescence, které byly naměřeny pro tyto standardy v dalších časových bodech, byly vždy vztahovány ke kontrolním hodnotám fluorescence a vyjádřeny v %; * značí $p < 0,05$.

V těchto prvotních experimentech byla tedy jednak ověřena původní data autorů Wiśniewski a Gaugaz, 2015 a navíc byly získány další poznatky důležité pro vyhodnocování a praktické provedení WF assaye.

2.6.2.2 Vliv denaturace na fluorescenci proteinů

Intenzita fluorescence TRP je velmi ovlivněna prostředím, ve kterém se TRP nachází, zejména jeho polaritou, případnými vodíkovými vazbami a dalšími nekovalentními interakcemi (Ghisaidoobe and Chung 2014). To z TRP činí přirozenou „sondu“ pro sledování změn konformace a interakce proteinů. Výše zmíněné interakce jsou totiž významnější ve složených, nativních proteinech, kde indolový kruh TRP obklopují funkční skupiny aminokyselin a vytvářejí specifické mikroprostředí, které často fluorescenci snižuje, zhasí (Chen and Barkley 1998). Pokud však tuto skutečnost uvážíme vzhledem k využití fluorescence TRP v rámci WF assaye, nejedná se o jev zcela žádoucí, protože naměřené hodnoty by měly ideálně vždy odrážet množství daného proteinu, a ne stav jeho struktury.

Pro ověření vlivu denaturace proteinu na jeho fluorescenci byl vybrán soubor šesti standardních proteinů (viz Tabulka 7.) lišící se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Tyto proteiny pokrývaly širokou škálu velikostí od 583 po 129 aminokyselin, některé neobsahovaly žádné disulfidové vazby, jiné jich měly až 17, nicméně TRP byl obsažen v každém proteinu min 1.

Tabulka 7. Vlastnosti proteinů, které byly použity pro sledování vlivu denaturace na intenzitu fluorescence TRP.

Protein	Identifikační kód databáze UniProt	Počet aminokyselin n	Počet disulfidových vazeb h	Počet TRP	Zastoupení TRP v %	Průměrná hmotnost (Da)
Sérový albumin	P02769	583	17	2	0,56	66433
Ovoalbumin	P01012	385	1	3	1,31	42750
Myoglobin	P68082	153	0	2	2,2	16951
Lyzozym C	P00698	129	4	6	7,81	14313
Apo-transferrin	P02786	760	2	11	2,4	84871
β-kasein	P02666	209	0	1	0,79	23583

Pro rozpouštění proteinů byly používány tři různé roztoky, a to sice pufr založený pouze na 10 mM Tris/Cl (pH 8,5), tentýž pufr s přidavkem močoviny o finální koncentraci 8 M a stejný pufr s 8 M močovinou a 5 mM DTT. Jako pracovní roztoky sloužily dva posledně zmíněné pufry. Základní Tris/Cl pufr představoval roztok, ve kterém proteiny zůstaly při rozpouštění v nativní formě. Močovina pak v tomto pufru působila jako denaturační činidlo, které při koncentracích vyšších než 5 M narušuje nativní konformaci proteinů (Niether et al. 2018), a navíc také zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence TRP, viz předcházející kapitola. DTT byl použit jako činidlo, které ještě umocní denaturaci proteinů tím, že redukuje disulfidické vazby (Fjelstrup et al. 2017).

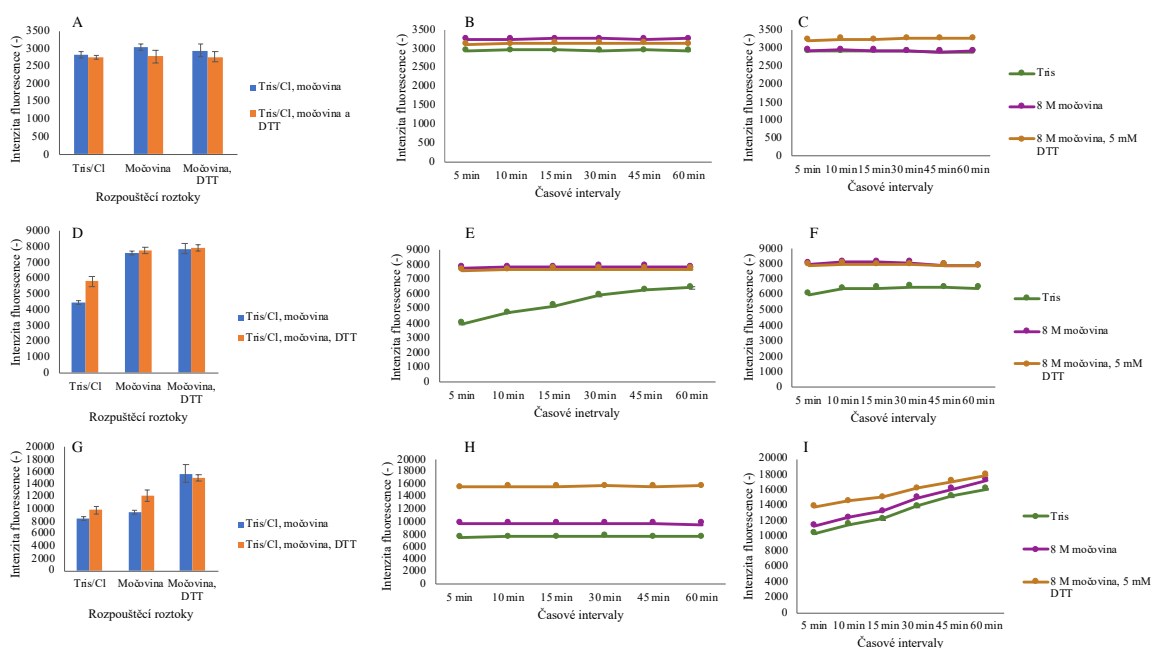
U vybraných proteinů tedy bylo za pomoci kombinací výše uvedených rozpouštěcích a pracovních roztoků zjišťováno, jaký má vliv denaturace na jejich fluorescenci. Její změna byla proto sledována i v různých časových bodech, a to přesně po 5, 10, 15, 30, 45 a 60 min.

Na základě dosažených výsledků se dá říct, že u většiny testovaných proteinů k výrazným změnám fluorescence nedocházelo, a to ani v závislosti na rozpouštěcím či pracovním roztoku, ani v průběhu času. Jako zástupce této skupiny můžeme uvést například BSA (Obrázek 9. A, B, C), kde je tento výsledek zcela v souladu s vlastnostmi tohoto proteinu.

BSA sice obsahuje 17 disulfidických vazeb, je to však poměrně velký protein a TRP má pouze 2. Tyto TRP se navíc nachází na jeho povrchu a jsou tak vystaveny přímo do roztoku, což znamená, že fluorescence těchto TRP není ovlivněna aminokyselinovým okolím (Lu et al. 2019), a tedy ani samotnou denaturací či redukcí. Fluorescence BSA tak byla opravdu v rámci celého experimentu zcela stabilní.

Oproti tomu MYO je specifický v tom, že obsahuje prostetickou skupinu hem nesoucí navíc ještě atom železa. Pokud je myoglobin v nativní konformaci, je fluorescence jeho TRP výrazně snížena právě hemovou skupinou, protože dochází k přenosu energie z indolové skupiny TRP na blízké tetrapyrrolové jádro hemu. Již při nízké koncentraci močoviny pak bylo pozorováno mírné zvýšení intenzity fluorescence (Patra and Barakat 2012). Dle publikace Takamizawa *et al.*, 2005 je při denaturaci vytvářen meziprodukt, tzv. holo-myoglobin, kdy „kapsa“ pro hem je dlouho zachována a nejprve nastává postupné rozvinutí aminokyselinového řetězce nacházejícího se před a za ní. Dá se tedy uvažovat, že denaturace MYO probíhá pozvolna. Další zajímavostí u MYO je to, že i železo vázané hemem by taktéž mohlo jeho fluorescenci ovlivnit. Samotné železo je totiž schopno měnit svůj oxidačně-redukční stav a přechází z Fe^{2+} na Fe^{3+} a zpět, a právě Fe^{3+} forma je schopna

zhášet fluorescence (Xia et al. 2020). Všechny tyto předpoklady se opravdu potvrdily (Obrázek 9. D, E, F).



Obrázek 9. Závislost intenzity fluorescence TRP na rozpouštěcím roztoku v čase za použití vybraných bílkovin. A) Intenzita fluorescence TRP u BSA v 60 min; B) Průběh intenzity fluorescence v čase u BSA s přidavkem pracovního roztoku 10 M Tris/Cl s 8 M močovinou; C) Průběh intenzity fluorescence v čase u BSA s přidavkem pracovního roztoku 10 M Tris/Cl s 8 M močovinou a 5 mM DTT; D) Intenzita fluorescence TRP u MYO v 60 min; E) Průběh intenzity fluorescence v čase u MYO s přidavkem pracovního roztoku 10 M Tris/Cl s 8 M močovinou; F) Průběh intenzity fluorescence v čase u MYO s přidavkem pracovního roztoku 10 M Tris/Cl s 8 M močovinou a 5 mM DTT; G) Intenzita fluorescence TRP u LYS v 60 min; H) Průběh intenzity fluorescence v čase u LYS s přidavkem pracovního roztoku 10 M Tris/Cl s 8 M močovinou; I) Průběh intenzity fluorescence v čase u LYS s přidavkem pracovního roztoku 10 M Tris/Cl s 8 M močovinou a 5 mM DTT

U rozpouštěcího roztoku obsahujícího pouze Tris/Cl v kombinaci s pracovním pufrům obohaceným o 8 M močovinu je intenzita fluorescence TRP signifikantně menší než u téhož rozpouštěcího roztoku kombinovaného s pracovním pufrům s 8 M močovinou a 5 mM DTT, a to i ve všech časových bodech (Obrázek 9. D, E, F). Dá se tedy předpokládat, že DTT redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} , což způsobuje vyšší fluorescence MYO v případě použití pracovního roztoku s tímto redukčním činidlem. Pokud se poté zaměříme na časový průběh fluorescence MYO rozpouštěného za nativních podmínek, je obzvláště u pracovního roztoku obsahujícího močovinu zcela patrný její nárůst až do 60 min (Obrázek 9. E, F). To naznačuje, že MYO v nativní formě je díky nadbytku močoviny opravdu postupně denaturován (dochází ke tvorbě holo-myoglobinu a nižších struktur). Nicméně je potřeba zdůraznit, že v tomto případě nikdy nebylo dosaženo tak vysoké fluorescence, jako u dalších variant, kdy byly již pro samotné rozpouštění použity roztoky s vysokou koncentrací močoviny (např. Obrázek 9. D). Denaturace tedy v případě nativního rozpouštění patrně nebyla nikdy

kompletní, což lze prokázat výpočtem s použitím bodů v 60 minutě měření. Po provedení kvantifikace MYO, hodnoty vycházející z rozpouštěcího roztoku založený na Tris/Cl byly výrazně menší než u hodnot z rozpouštěcích roztoků s močovinou a DTT. U močoviny byla neúplná denaturace popisována již dříve (Bennion and Daggett 2003), jak ale dokládají tyto výsledky, v kontextu WF assaye to není ideální zjištění. Rozdíly v případě kombinace rozpouštěcích i pracovních roztoků s močovinou nebo močovinou a DTT už nejsou významné, protože MYO neobsahuje žádné disulfidické vazby (Andersen and Otzen 2014).

Poslední komentovaný protein, LYS, obsahuje disulfidové vazby v blízkosti TRP (Chang and Li 2002), které v nativní stavu fluorescence TRP snižují, tím, že všechny cystiny v LYS jsou zapojeny do disulfidových vazeb (Hennecke et al. 1997; Imoto et al. 1972). Nedojde tak k emisi v příslušné vlnové délce, ale energie přijatá TRP se spotřebuje na přerušování nejbližšího disulfidického můstku. U denaturovaného LYS, kdy jsou disulfidové vazby rozrušeny, je fluorescence asi o 50% zvýšená (Formoso a Forsten, 1975). S postupnou denaturací LYS by tedy mělo docházet ke zvýšení fluorescence. Opravdu, chování LYS v rámci provedené WF assaye je odlišné od obou předchozích proteinů, jelikož je evidentní závislost fluorescence na přítomnosti DTT v rozpouštěcím, případně pracovním roztoku (Obrázek 9. G, H). Pokud je pracovní roztok obohacen ještě o DTT, je navíc zřetelný kontinuální nárůst fluorescence u všech variant rozpouštění po celou dobu měření (Obrázek 8. I). To je pravděpodobně způsobené tím, že dochází k postupné redukci 4 disulfidických můstků, které lze označit jako hlavní zhášecí fluorescence (Imoto *et al*, 1971). U 2 z těchto TRP již byl zvrat zhášení pomocí jejich redukcí disulfidů navíc popsán v literatuře (Chang and Li 2002).

Celkově výsledky tohoto experimentu naznačují tomu, že v některých případech není dostačující použít pracovní roztok založený na močovině, jelikož ta není vždy sama schopna zajistit plnou denaturaci proteinů. Kompletní denaturace je ale bohužel nutná pro dosažení správných výsledků stanovení. DTT by tak mělo být přidáváno určitě, uvažovat se však dá i o další suplementaci pracovního roztoku nějakým vhodným denaturačním činidlem, nebo o denaturaci vzorku ještě před samotným stanovením.

2.6.2.3 Možnosti denaturace

Na základě zjištění popisovaných v předcházející kapitole bylo nutné otestovat, jak nejlépe dosáhnout denaturace a porovnat jednotlivé denaturační podmínky mezi sebou. Konkrétně jsme zvolili denuraci proteinů ve vzorku ještě před samotným stanovením.

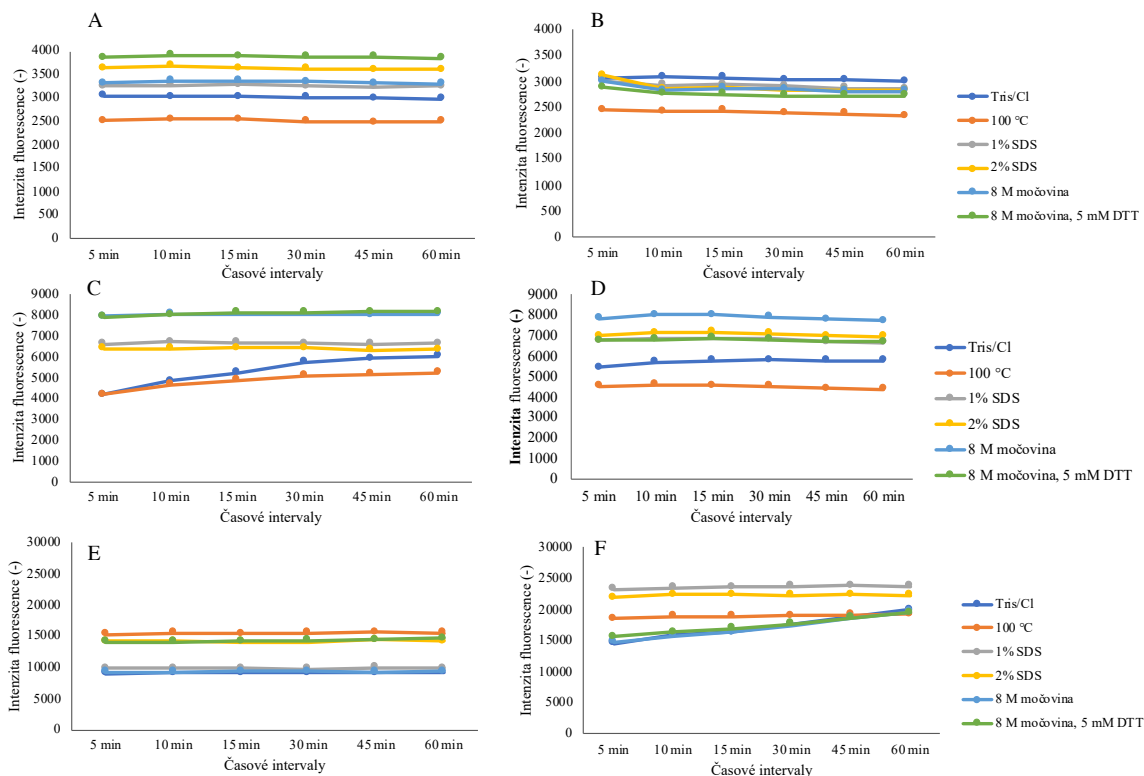
Do denaturovaného stavu lze proteiny dostat několika způsoby. Například zvýšením teploty, změnou pH, použitím organického rozpouštědla, denaturačního činidla či tlaku (Miron *et al*, 2019). Pro tyto experimenty byly vybrána denaturace změnou teploty a denaturace detergentem SDS (přesněji dvěma koncentracemi tohoto detergentu) a testována byla u tří standardních proteinů, BSA, MYO a LYS. Měření fluorescence ve zmíněných denaturačních podmínkách pak proběhlo v časových intervalech 5, 10, 15, 30, 45 a 60 min.

Při pohledu na graf pro BSA (Obrázek 10. A) je možno konstatovat, že výsledky odpovídají přechozímu zjištění, tzn., že jeho fluorescence příliš nezávisí na denuraci. Zajímavostí je, že nejnižší a téměř totožné hodnoty fluorescence byly naměřeny v případech obou pracovních pufrů při denuraci inkubací při 100 °C. Tento výsledek lze vysvětlit tím, že dochází k precipitaci BSA, a tím pádem i ke snížení jeho množství ve vzorku. Celkem jsou však hodnoty fluorescence jeho TRP ve všech časových intervalech stabilní.

Z grafického zobrazení fluorescence MYO (Obrázek 10. C) za použití pracovního roztoku s močovinou vyplývá, že denaturace změnou teploty nebyla účinná, protože u této varianty jsou počáteční hodnoty shodné s hodnotami naměřenými pro nativní MYO. Ani s postupem času pak nedosáhne očekávaných hodnot. Naopak nejúčinnějšími denuranty byly rozpouštěcí roztoky obsahující močovinu. 1% (w/v) a 2% (w/v) SDS mělo výsledky o něco nižší. Při použití pracovního roztoku obsahující přídavek DTT (Obrázek 10., D) pak byly tyto výsledky potvrzeny pouze s tím rozdílem, že u rozpouštěcího roztoku s 8 M močovinou a 5 mM DTT došlo ke snížení intenzity fluorescence, která vykazovala podobné hodnoty jako varianta denaturace SDS.

Při pohledu na graf fluorescence LYS (Obrázek 10., E) je viditelný signifikantní rozdíl dvěma skupinami výsledků. V první skupině dosahují podobných výsledků protein v nativním stavu, denaturace čistou močovinou a použití 1% (w/v) SDS. Shodu mezi nativními podmínkami a denurací pufrů na bázi močoviny vykazovaly již předcházející experimenty (Obrázek 9. G). Souhrně se pro tyto varianty dá říct, že patrně nezajistí potřebnou denuraci LYS. Ve druhé skupině výsledků jsou pak denaturace při 100 °C, za použití 2% (w/v) SDS a 8M močoviny s 5 mM DTT. Tyto podmínky vykazují fluorescenci vyšší, související patrně i s vyšší mírou denaturace. Jediná z variant, která si relativně podobné hodnoty i při použití pracovního roztoku obsahujícího DTT (Obrázku 10. F) byla

denaturace LYS při 100 °C. Ostatní varianty měly podle očekávání hodnoty znatelně vyšší, přičemž k největšímu signifikantnímu posunu došlo u 1% (w/v) SDS. Tento graf tedy naznačuje důležitost přídavku DTT v pracovním pufru.



Obrázek 10. Časová závislost intenzity fluorescence TRP na specifických denaturačních podmínkách. A) Závislost intenzity fluorescence u BSA s použitím pracovního pufru obsahující Tris/Cl a močovinu; B) Závislost intenzity fluorescence u BSA s použitím pracovního pufru obsahující 10 M Tris/Cl, 8 M močovinu a 5 mM DTT; C) Závislost intenzity fluorescence u MYO s použitím pracovního pufru obsahující 10 M Tris/Cl a 8 M močovinu; D) Závislost intenzity fluorescence u MYO s použitím pracovního pufru obsahující 10 M Tris/Cl, 8 M močovinu a 5 mM DTT; E) Závislost intenzity fluorescence u LYS s použitím pracovního pufru obsahující 10 M Tris/Cl a 8 M močovinu; F) Závislost intenzity fluorescence u LYS s použitím pracovního pufru obsahující 10 M Tris/Cl, 8 M močovinu a 5 mM DTT

Na základě získaných dat se dá říci, že ani jedna s testovaných metod denaturace proteinů nebyla zcela univerzální, tzn., že by poskytla kompletní rozvolnění struktury pro všechny tři testované proteiny. Pokud by však měla být jedna z variant doporučena, nejkonzistentnější a nejlepší výsledky mělo použití 2% (w/v) SDS. Potvrzen také opět byl význam redukce disulfidických můstků.

2.6.2.4 Použitelnost WF assaye pro vzorky z tylakoidních membrán

Jako největší výhody WF assaye jsou v literatuře uváděny citlivost, široký lineární rozsah kalibrační křivky, možnost provedení tak, že toto stanovení nespotebovává měřený

vzorek, a univerzálnost ve smyslu kompatibility s širokou škálou detergentů a použitelností pro různé typy proteinových vzorků (Wiśniewski and Gaugaz 2015).

Většina těchto závěrů byla potvrzena i v této práci. Jedním z hlavních zjištění však bylo, že za pracovních podmínek uváděných v originálním protokolu nemusí u některých proteinů dojít k úplné denaturaci, která je však silně ovlivňuje fluorescenci, a výsledky stanovení tak nemusí být správné. Bohužel, zcela ideální řešení nebylo nalezeno ani při pokusu o optimalizaci. Je sice pravda, že přídavek DTT do pracovního pufru, a denaturace proteinů ještě před stanovením (např. 2% (w/v) SDS), dokáže neúplnou denaturaci proteinů močovinou z větší části kompenzovat, ale tyto postupy nejsou univerzálně platné pro všechny proteiny (viz předcházející kapitola). Dalšími variantami, který by se daly otestovat, by mohla být buď tepelná denaturace za přítomnosti detergentu (SDS nebo SDC) ještě před stanovením, která by měla zabránit precipitacím a ztrátám, nebo přídavek silně denaturujícího detergentu přímo do pracovního pufru. Tyto experimenty však již z časových důvodů nemohly být v rámci této práce provedeny.

Jak prokázaly pokusy s MYO, jako problematické se pro toto stanovení jeví také proteinové vzorky, které obsahují vázané nebo volné molekuly, které interferují s fluorescencí TRP. U MYO to byl vázaný hem, dále například NADH, flaviny, deriváty pyridoxalu nebo chlorofyl (Lakowitz 2006). U toho byl přenos energie a vzájemné ovlivnění fluorescence s TRP v rámci struktury proteinů již opravdu několikrát prokázán (Alston et al. 2008; Vivian and Callis 2001). Vzhledem k povaze vzorků obsahujících proteiny z izolovaných tylakoidních membrán, pro které měla být WF assay v rámci této diplomové práce primárně určena, a které obsahují velké množství chlorofylu, se tedy dají interference při stanovení očekávat. To se potvrdilo při práci s proteiny z chloroplastů izolovaných průtokovou cytometrií, kde docházelo ke zhášení fluorescence při excitační vlnové délce 295 nm až na úroveň blanku (osobní sdělení, Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.) . Z tohoto důvodu bylo nutné do zamýšleného postupu vybrat jinou metodu ke stanovení obsahu izolovaných tylakoidních proteinů, která není citlivá na přítomnost chlorofylu ani detergentů. Konkrétně se jí stal komerčně dostupný 2D-Quant kit (viz kapitola 2.5.3.2. 2D-Quant kit), který je založený na odstranění interferujících látek precipitací.

2.6.3 Porovnání vybraných metod štěpení membránových proteinů v roztoku

Dalším důležitým krokem byl výběr správné metody extrakce a štěpení pro vzorky proteinů z izolovaných tylakoidních membrán. Jak jejich původ napovídá, jedná se o membránové proteiny, které mají specifické složení, a tedy i fyzikálně-chemické vlastnosti.

Typický je pro ně obsah hydrofobních částí, které je nutné při extrakci a rozpouštění dostat do roztoku, nejčastěji pomocí vybraného detergentu (Salvador *et al*, 2019). Tyto oblasti také znesnadňují proteomickou analýzu, jelikož mají snížený počet štěpných míst pro specifické proteasy, čímž při nedostatečné solubilizaci nemusí dojít k efektivnímu štěpení. Proto, aby bylo enzymatické štěpení co nejvíce účinné, je také nutná úplná denaturace.

Na základě studia literatury bylo jako vhodný detergent vybráno SDC, a to ze dvou důvodů. Nepomáhá totiž pouze rozpouštění membránových proteinů (Wang *et al*. 2018) ale také podporuje účinnost štěpení, celkově až 5x v přítomnosti 1% (w/v) SDC (Lin *et al*. 2013). Pokud je ale v roztoku s proteiny (a později peptidy) obsažen právě SDC, je nutné jej před LC - MS/MS analýzou odstranit. Existují dva způsoby. Jednak pomocí fázového transferu přidávkem organického rozpouštědla, kdy tryptické peptidy zůstaly ve vodné fázi (Masuda *et al*, 2009), nebo pomocí přesrážení SDC za použití kyseliny.

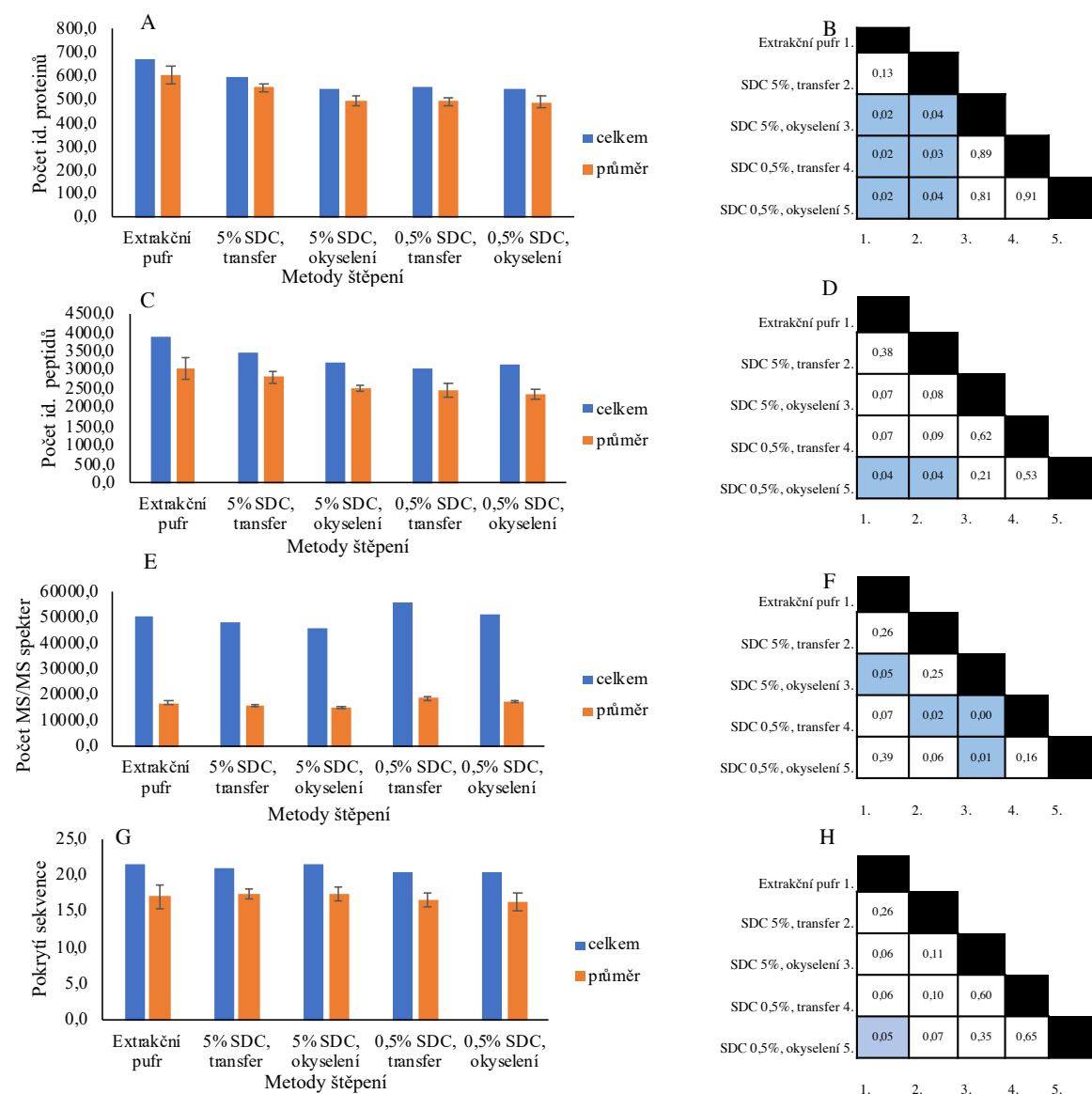
Experiment byl tedy proveden v pěti různých kombinacích pokrývajících extrakci a štěpení. Konkrétně byly srovnávány metody obsahující extrakční pufr s 100 mM TEAB, 6 M močovinu a 2 M thiomočovinu; stejný extrakční pufr s přidávkem 0,5% (w/v) SDC a následným fázovým transferem; extrakční pufr s 0,5% (w/v) SDC a následným okyselením; extrakční pufr s 5% (w/v) SDC a následným fázovým transferem; a extrakční pufr s 5% (w/v) SDC a následným okyselením. Pro tyto metody pak byly po LC-MS/MS srovnány jednotlivé naměřené hodnoty.

2.6.3.1 Srovnání základních identifikačních charakteristik

Při hodnocení počtu identifikovaných proteinů (Obrázek 11. A) vyšla nejlépe výchozí metoda s použitím extrakčního pufru obsahující močovinu a thiomočovinu, kdy celkový počet identifikací proteinů pro tři nezávislá opakování dosáhl dohromady hodnoty 669. Obecně se dá říci, že kromě varianty s 5% (w/v) SDC a fázovým transferem veškeré ostatní testované varianty extrakce a štěpení založené na SDC opravdu dosáhly nepatrně nižších celkových i průměrných hodnot počtů identifikovaných proteinů než metoda výchozí, přičemž tento výsledek byl statisticky signifikantní. Mezi těmito variantami pak signifikantních rozdílů zjištěny nebyly (Obrázek 11. B).

Při porovnání počtu identifikovaných peptidů (Obrázek 11. C) vychází, že nejvyšší celkové i průměrné hodnoty dosáhla opět metoda se základním extrakčním pufrům. Druhá nejlepší varianta byla i v tomto případě metoda obsahující 5% (w/v) SDC s fázovým transferem, kdy od základní metody liší v průměru pouze o 233 identifikovaných peptidů.

Ostatní testované varianty dosáhly o něco nižší počty identifikovaných peptidů, byť tyto rozdíly většinou nebyly významné (Obrázek 11. D).



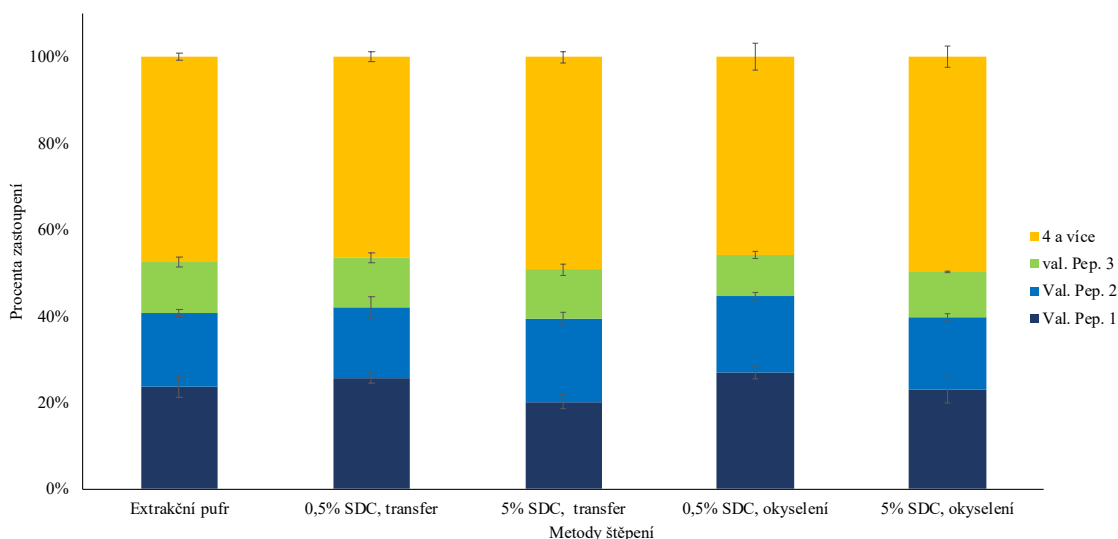
Obrázek 11. Srovnání různých metod extrakce a štěpení v závislosti na vybraných parametrech. A) Závislost počtu identifikovaných proteinů na metodě extrakce a štěpení. B) Matrice zobrazující výsledek t-testů při porovnání jednotlivých metod štěpení v závislosti na počtu identifikovaných proteinů; C) Závislost metod štěpení na počtu identifikovaných peptidů; D) Matrice zobrazující výsledek t-testů při porovnání jednotlivých metod štěpení v závislosti na počtu identifikovaných peptidů; E) Závislost metod štěpení na počtu MS/MS spekter;; F) Matrice zobrazující výsledek t-testů při porovnání jednotlivých metod štěpení v závislosti na počtu MS/MS spekter; G) Závislost metod štěpení na počtu pokrytí sekvencí; H) Matrice zobrazující výsledek t-testů při porovnání jednotlivých metod štěpení v závislosti na pokrytí sekvencí.

Dalšími parametry, které byly srovnávány, byly počty přiřazených spekter a průměrné pokrytí sekvence. U přiřazených spekter nebyl reflektován trend minulých dvou

parametrů, ale nejvyšší průměrných hodnot dosáhly varianty s 0,5% (w/v) SDC (Obrázek 11. E). Ostatní metody poskytly výsledky srovnatelné. Jednoznačný trend v signifikanci těchto rozdílů však kvůli jejich velikosti a rozptylu dat nelze pozorovat (Obrázek 11. F). Co se pokrytí sekvence týče, všechny metody dosáhly téměř totožných průměrných hodnot pohybujících se těsně okolo 17% (Obrázek 11. G, H).

Jelikož se z předchozího porovnání nedá jednoznačně zvolit jedna metoda, která by měla nejlepší výsledky ve všech sledovaných parametrech, bylo nutné podívat se podrobněji na identifikované peptidy, díky kterým byly následně identifikovány i konkrétní proteiny (Obrázek 12.). Konkrétně šlo o analýzu zastoupení proteinů v závislosti na tom, kolika peptidy byly identifikovány. Pro co nejlepší identifikaci proteinů je totiž nutné mít co největší počet validovaných peptidů identifikujících jeden protein.

Nejnižší zastoupení proteinů identifikovaných jedním validovaným peptidem měla varianta s 5% (w/v) SDC a následným fázovým transferem. V této variantě to byla hodnota 20,17 %, oproti nejvyšší hodnotě 26,96 %, kterou vykazovala varianta s 0,5 % (w/v) SDC a následným okyselením. To v kombinaci s faktem, že zastoupení proteinů identifikovaných více než 4 peptidy bylo u varianty s 5% SDC a fázovým transferem 49,27 % (o desetiny procenta druhé nejvyšší), činí tuto variantu v tomto porovnání jako nejlepší.



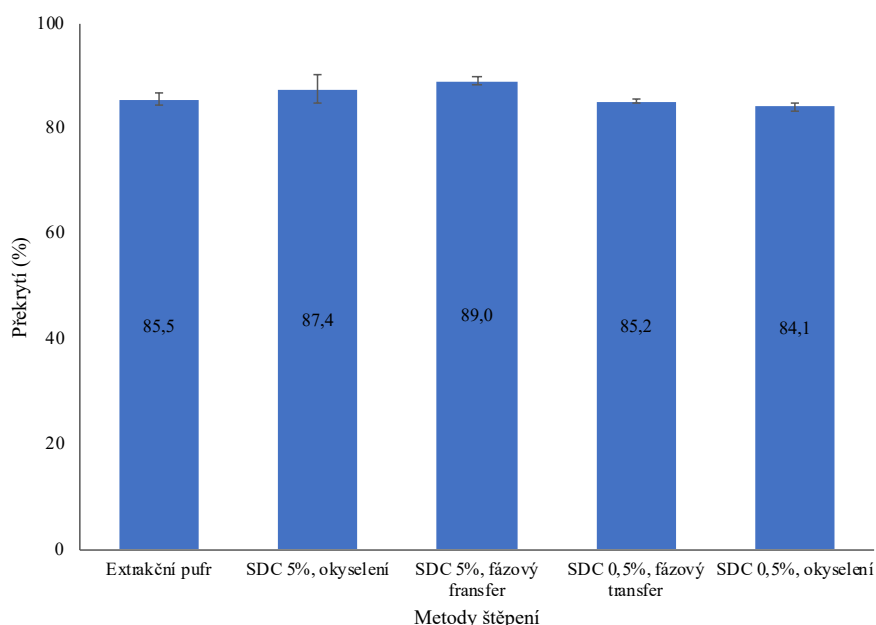
Obrázek 12. Srovnání procentuální zastoupení v závislosti na různých metodách extrakce a štěpení. Extrakční pufr obsahuje 100 mM TEAB, 6 M močovina, 2 M thiomočovina; následující varianty obsahovaly přísadku 0,5 % (w/v) nebo 5 % (w/v) SDC s následným fázovým transferem nebo okyselením.

Z těchto dat bylo usouzeno, že ač nebylo celkově dosaženo markantních rozdílů mezi jednotlivými metodami v žádném z hodnocených parametrů, jako nejlepší se jeví varianta s 5% (w/v) SDC a následným fázovým transferem. Důležitým aspektem, který vedl k tomuto rozhodnutí byl ten, že počet proteinů, které byly identifikovány více než jedním peptidem byl signifikantně vyšší než u ostatních variant. Zároveň dle srovnání hodnot ostatních parametrů (počet proteinů, peptidů, MS/MS spekter a pokrytí sekvence) tato metoda patřila vždy k těm, co vykazovala nejvyšší hodnoty.

2.6.3.2 Porovnání kvalitativní a kvantitativní opakovatelnosti

Pro optimalizaci jakékoliv metody je vždy důležité nejen to, jaké díky ní dostat výsledné hodnoty, ale také to, jaká je kvalitativní a kvantitativní opakovatelnost.

Graf na Obrázku 13. vyjadřuje průměrné hodnoty pro překryvy proteinů identifikovaných ve dvojici technických opakování u dané varianty extrakce a štěpení vyjádřené v procentech. Zde je nutné podotknout, že každá metoda byla opakována v triplikátu, a tak vždy byla provedena tři takováto párová porovnání a znázorněn je právě jejich průměr se směrodatnou odchylkou. Toto porovnání bylo tedy použito pro zhodnocení opakovatelnosti kvalitativní, jinými slovy jako míra toho, jaké shody u proteinového složení vzorku je daná metoda schopna opakovaně dosáhnout.

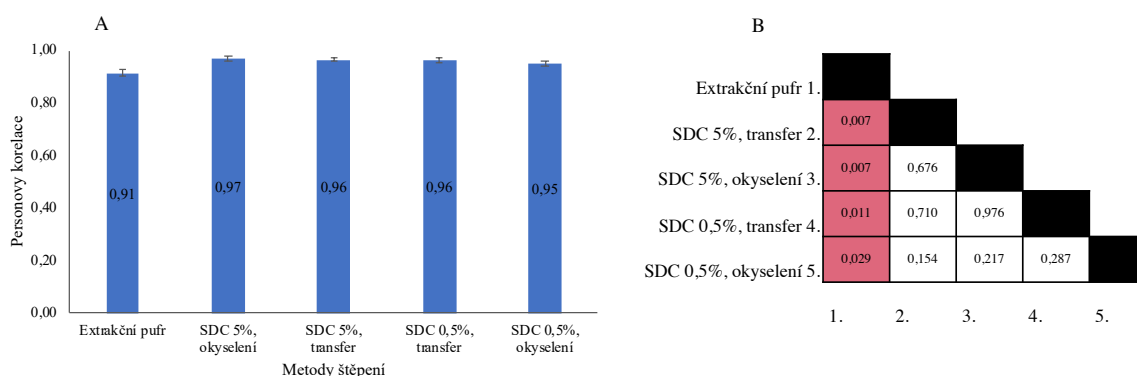


Obrázek 13. Závislost překryvu identifikovaných proteinů na metodách štěpení a extrakce.

Velmi zřetelně je vidět, že nejvyšší hodnoty s nejnižším rozptylem dat dosáhla metoda 5% (w/v) SDC a následným fázovým transferem. Detekované rozdíly byly sice opět malé, ale z hlediska provedených statistických testů významné.

Pro vyhodnocení kvantitativní opakovatelnosti byly srovnány iBAQ (Schwanhüusser et al. 2011) hodnoty proteinů, které byly úspěšně identifikovány ve dvojici posuzovaných technických opakování u dané varianty extrakce a štěpení. K tomuto srovnání byla použita Pearsonova korelace, která odráží variabilitu kolem lineárního trendu. Pro každou posuzovanou metodu byly opět provedeny tři korelace a z nich byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Tyto hodnoty také byly podrobeny T-testu.

U všech testovaných metod bylo dosaženo průměrného Pearsonova korelačního koeficientu vyššího než 0,9 (Obrázek 14. A), což je, když uvážíme, že maximální hodnotou je 1, velmi dobrý výsledek. Nicméně, veškeré testované metody, kdy bylo extrakce a štěpení podpořeno přítomností SDC, dosáhly signifikantně vyšších hodnot než metoda výchozí (Obrázek 14. A). Mezi nimi pak již rozdíly téměř nebyly.



Obrázek 14. A) Zobrazení testovaných metod štěpení a průměrů jejich Pearsnovy korelace; B) Matrice zobrazující výsledek t-testů při porovnání Pearsonových korelací.

V souhrnu se tak dá říct, že přidavek SDC do extrakčního pufru, a jeho následná přítomnost při štěpení, má pozitivní vliv na celkovou opakovatelnost experimentu, a to hlavně při koncentraci 5% (w/v). Preferovanou metodou jeho odstranění je pak při této koncentraci fázový transfer. To je v absolutní shodě se závěry minulé kapitoly, a tak byla varianta s 5% (w/v) SDC a fázovým transferem vybrána jako metoda extrakce a štěpení v roztoku pro veškeré další proteomické experimenty týkající se charakterizace proteomu tylakoidní membrány.

2.6.6 Analýza působení BAP na proteom tylakoidních membrán *Hordeum vulgare*

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit působení cytokininů, konkrétně BAP, na membránové proteiny v *Hordeum vulgare* pomocí technik moderní hmotnostní spektrometrie. Rostlinné hormony cytokininy jsou důležité pro mnoho vývojových a fyziologických procesů, přičemž každá tkáň na jejich přítomnost reaguje různými způsoby. BAP byl vybrán proto, že je zapojen do regulací proteinů podílejících se na metabolismu sacharidů, mimo jiné ovlivňuje i endogenní hormonální homeostázu se silnou tkáňovou specifitou a zvyšuje hladinu kyseliny abscisové (Zdárská et al. 2013). Ačkoliv se přirozeně nevyskytuje, ošetření s ním ukázalo silné účinky na rostlinné tkáně, a díky tomu je velmi často využíván u experimentů. Cytokininy, pokud jsou ve vysokých koncentracích přidávány do kultivačního média, mohou ovlivnit fotomorfogenezi, tedy ovlivní vývoj a růst v závislosti na světle (Lochmanová et al. 2008). V této publikaci bylo také zmíněno, že po analýze takto ošetřených rostlin došlo ke změně exprese ve 37 proteinech, které ale nebyly identifikovány.

Proces senescence, který je spjat s rozkladem chlorofylu, dezintegrací fotosyntetického aparátu a oxidativním poškozením, je také úzce spjat s cytokininy. Všechny zmíněné pochody lze zpomalit právě působením cytokininů (Hönig et al. 2018). Nicméně přesný molekulární mechanismus působení a případně výsledek tohoto působení dodnes nebyl mapován. Z toho důvodu byla tato práce zaměřena právě na tuto problematiku.

Avšak většina experimentů je založena na *Arabidopsis thaliana*, v této práci je postup aplikován na *Hordeum vulgare*, a to z několika důvodů. Jedná se o velice důležitou zemědělskou plodinu, díky svému nutričnímu složení je neopomenutelnou plodinou v potravinářství.

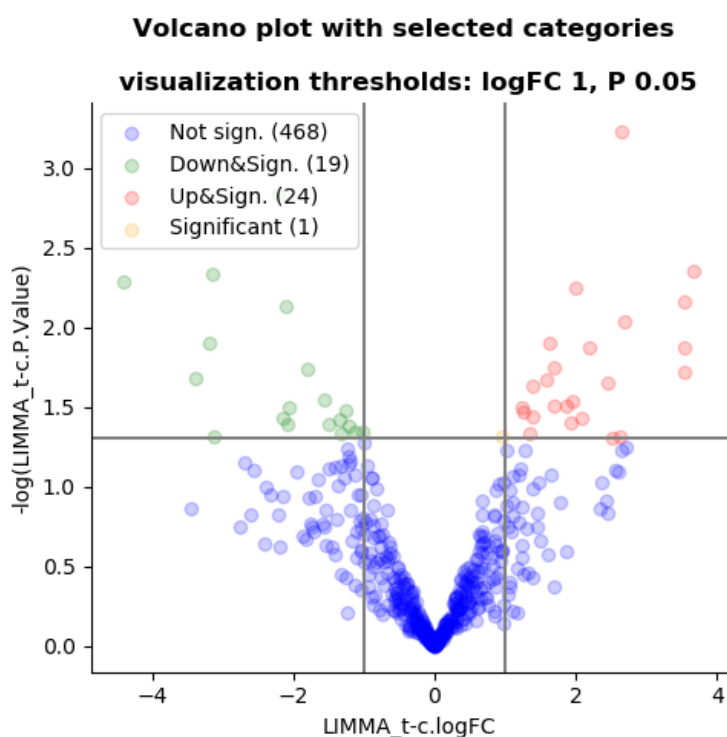
Za pomoci optimalizovaných metod a extrakce s využitím detergentu detergentu SDC a MS analýzy (viz předchozí kapitoly), byly zpracovány vzorky ječmene přirozeného genotypu a jeho mutantní formy *clo* s deficitem chlorofylu *b*. Byly vytvořeny 4 typy vzorků, kdy každý byl napěstován ve 3 nezávislých biologických opakováních. Následovalo zpracování těchto 12 vzorků již zmíněným způsobem a každý byl analyzován na hmotnostním spektrometru ve 3 nástřících. Také byly navíc provedeny extrakce nativních fotosyntetických komplexů a jejich separace pomocí nativní 1D a 2D elektroforézy.

2.6.6.1 Kvantitativní analýza

Jak již bylo zmíněno v úvodu, rostliny *Hordeum vulgare* byly ošetřeny, experimentální skupina BAP a standardní skupina DMSO. BAP je pro tyto experimenty

velmi často využíván, jelikož je schopen zpomalit působení senescence a specificky působit na rostliny (Hönig et al. 2018), nicméně toto působení nebylo na molekulární úrovni dodnes vysvětleno. Právě proto byl vybrán tento experiment, jako hlavní cíl práce. Pro srovnání hladin všech proteinů obsažených v analyzovaných tylakoidních membránách byly provedeny vybrané postupy (viz výše), čímž měly být zajištěny optimální podmínky pro membránové proteiny a pro následnou analýzu.

Po provedení analýzy na hmotnostním spektrometru bylo pro WT identifikováno 512 proteinů, z čehož 24 bylo ve zvýšeném množství a 19 proteinů ve sníženém. Jako parametr rozhodující o signifikantních rozdílech byl zvolen $-\log(\text{LIMMA_t-c.P.Value})$ kdy mezní p -hodnota je 0,05, tzn. 1,3. Z Obrázku 15. je patrné, že po přidání cytokininů do živného média jsou v proteinovém složení určité rozdíly, a tím pádem dosažené výsledky jsou v souladu s literaturou (Lochmanová et al. 2008; Zdárská et al. 2013). Lze předpokládat, že tyto membránové proteiny budou hrát určitou roli v regulaci metabolismu a vývoji rostliny.



Obrázek 15. Graf zobrazující změny obsahu proteinů izolovaných na P -hodnotě. Analyzované proteiny z *Hordeum vulgare* WT ošetřeny DMSO a BAP; modrá zobrazuje proteiny nevykazující signifikantně odlišné hodnoty; červená zobrazuje proteiny se signifikantně vyššími hodnotami; zelená zobrazuje proteiny se signifikantně nižšími hodnotami.

Z výsledků bylo možné provést identifikaci proteinů za pomoci databáze UniProt s následně provedeným proteinovým blastováním. Získaná data byla dle vybraných

parametrů srovnána a nalezeny signifikantně odlišné proteiny (Tabulka 8.) a většina z nich byla identifikována.

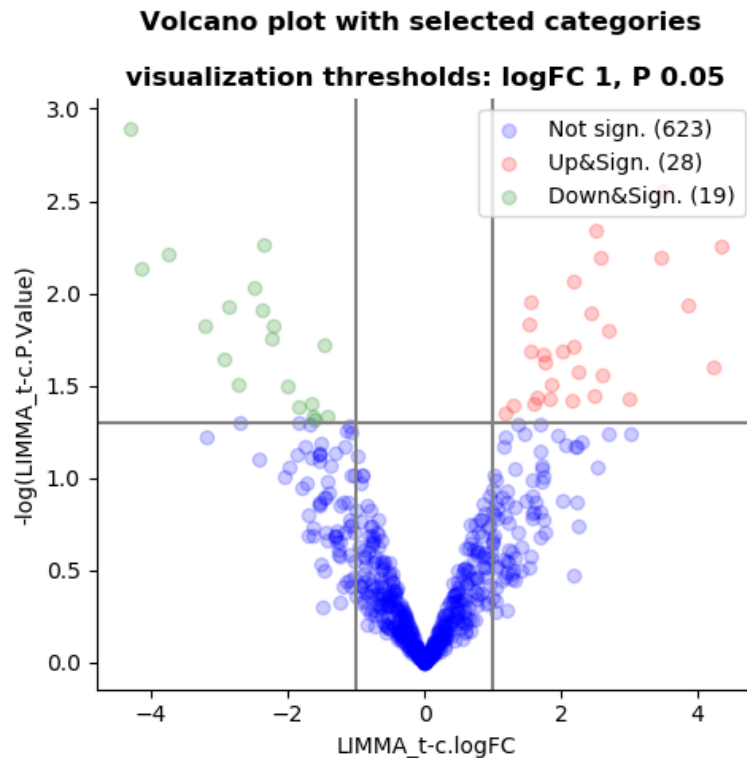
Protein, který měl nejvíce zvýšenou hodnotu byl identifikován jako NAD(P)H-chinon oxidoreduktázová podjednotka K. Jedná se o nejsložitější a nejméně probádaný enzym v dýchacím řetězci. Katalyzuje oxidaci NADH na NAD^+ a předává elektrony pravděpodobně na plastochinon (Roth and Hägerhäll 2001), což je důležitá molekula pro přenos elektronů při světelné fázi fotosyntézy. Jako druhý významně signifikantní protein se zvýšenou hodnotou byl identifikován peptidylprolyl izomeráza. Aktivita této izomerázy je připisována enzymu TLP20, který je klasifikován jako cyklofilin a katalyzuje skládání proteinů, podílí se na signálních drahách i biogenezi. Byla prokázána interakce TLP40 s tylakoidní membránou a regulace aktivity proteinové fosfatázy, která je specifická pro PSII (Edvardsson et al. 2003). Další membránový protein, který byl signifikantně zvýšen, je plastocyanin. Je to redoxní protein zprostředkovávající přenos elektronů z cytochromu *b₆f* (který má také signifikantní zvýšení) do PSI. Plastocyanin obsahuje měď, což lze považovat za redoxní aktivní kofaktor. Přijímá elektron cytochromu a dodává je chlorofylům PSI (P700) (Mayneord et al. 2019). Zajímavý je také protein vázající PAP-fibrillin doménu, protože fibrillin je hlavní proteinová složka struktur akumulující karotenoidy při dozrávání ovoce. Zároveň se proteiny související z fibrillinem akumulují při reakci na vodní stres (Gillet et al. 1998). Toto zjištění koreluje s předpokládanými výsledky s použitím BAP, jelikož by měl podporovat růst a tím i zvýšit expresi specifických proteinů.

Naopak značné snížení nastalo u fosfoinositid fosfolipázy C, ta patří do třídy enzymů hydrolyzujících fosfolipidy, které jsou spojeny s membránou za vzniku inositol-1,4,5-trifosfátu a diacylglycerolu. Doména C2 tohoto proteinu je schopna zacílit membrány. Důležitý je v tomto mechanismu i vápník, jelikož díky němu dojde ke změně povrchové hydrofobicity právě při cílení z rozpustných frakcí na membrány, což je klíčová role v regulaci aktivity tohoto proteinu (Rupwate and Rajasekharan 2012). Protein obsahující doménu rhodanese je důležitý k ukotvení ferredoxin-NADP reductázy k tylakoidním membránám chloroplastu a zároveň udržuje určitý lineární elektronový proud. Exprimuje se v listech a stoncích, v nízkých hladinách i v květech.

Tabulka 8. Jednotlivé identifikované proteiny se signifikantními rozdíly v měřeném parametru.

Uniprot označení	Název proteinu	Název Hit genu	LIMMA_ t-c.logFC	LIMMA_ t- c.P.Value
S4YYJ7	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K	ndhK	3,664	0,004
M0ZC22	Peptidylprolyl isomerase	FKBP16-4	3,531	0,007
A0A287W6R4	Uncharacterized protein	At3g10130	3,530	0,013
A0A287ICA1	Transket_pyr domain-containing protein	UGP3	2,696	0,009
M0UDJ5	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	CHL At3g47860	2,635	0,048
F2D3V0	Predicted protein	OHP1 APG16	2,525	0,049
F2D7P5	Plastocyanin	PETE At1g76100	2,459	0,022
A0A287FIJ0	PAP_fibrillin domain-containing protein	PAP3 FBN2	1,947	0,029
S4Z0M8	Photosystem I assembly protein Ycf3	ycf3	1,939	0,039
M0XX43	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	LHCB7	1,877	0,031
A0A287ML46	Uncharacterized protein	CCB1	1,638	0,013
A0A287L342	Uncharacterized protein	atpB	1,594	0,022
A0A287X150	Uncharacterized protein		1,399	0,037
A0A218LM74	Cytochrome b6	petB	1,261	0,034
A0A287HQH1	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	LHCA2	0,953	0,049
A0A287IEJ3	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein	At1g32220	-1,013	0,045
A0A287XS61	Peptidylprolyl isomerase	FKBP13	-1,135	0,046
F2D6Q1	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	LHCB1.3	-1,207	0,041
M0Y3A6	MFS domain-containing protein	At5g59250	-1,263	0,033
A0A287HLL3	Uncharacterized protein	At1g05910	-1,335	0,038
A0A287HIL4	Amino_oxidase domain-containing protein	PPOX2 HEMG2	-1,496	0,040
A0A287SQF2	Uncharacterized protein		-1,559	0,028
A1E9J0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	psaB	-2,054	0,032
A0A287W7M1	CAAD domain-containing protein	CURT1A At4g01150	-2,154	0,037
S4Z310	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 5	ndhF	-2,218	0,001
A0A287E466	Uncharacterized protein		-3,121	0,049
A0A287GY22	Uncharacterized protein	CYP89A2	-3,157	0,005
A0A287HNV7	Uncharacterized protein		-3,187	0,013
A0A287M8B9	Rhodanese domain-containing protein	STR4A	-3,389	0,021
F2CTX1	Phosphoinositide phospholipase C	STR10	-4,400	0,005

Analýza na hmotnostním spektrometru byla také provedena pro sadu vzorků obsahující izolované proteiny z tylakoidních membrán ječmene setého mutantní formy *clo*, která byla taktéž ošetřena BAP a DMSO. V tomto měření bylo celkově identifikováno 670 proteinů, přičemž množství 28 z nich bylo signifikantně zvýšené a obsah 19 proteinů byl signifikantně snížený (Obrázek 16.).



Obrázek 16. Graf zobrazující změny obsahu proteinů izolovaných na P-hodnotě. Analyzované proteiny z *Hordeum vulgare* v mutantní formě (*clo*) ošetřeny DMSO a BAP; modrá zobrazuje proteiny nevykazující signifikantně odlišné hodnoty; červená zobrazuje proteiny se signifikantně vyššími hodnotami; zelená zobrazuje proteiny se signifikantně nižšími hodnotami.

Výsledné jednotlivé proteiny byly identifikovány opět za pomoci databáze UniProt a následně bylo provedeno blástování. Získaná data byla dle vybraných parametrů srovnána a byly nalezeny signifikantně odlišné proteiny (Tabulka 9.) a většina z nich byla identifikována.

Tabulka 9. Jednotlivé identifikované proteiny se signifikantními rozdíly v měřeném parametru.

Uniprot označení	Jméno proteinu	Hit Gene names	LIMMA_ t-c.logFC	LIMMA_ t-c.P.Value
V9PE32	ATP synthase subunit c	atpH	4,229	0,025
A0A287MR04	Uncharacterized protein	CCB3	3,850	0,012
K3VXF8	ANK_REP_REGION domain-containing protein	AKT5	3,006	0,038
O82688	Amino acid selective channel protein	OEP161	2,683	0,016
F2CR28	Predicted protein		2,596	0,028
A0A287WM51	Chlorophyll a-b binding protein,	LHCB1.3	2,245	0,027
F2CS35	Predicted protein	RER4	2,189	0,009
A0A287JIQ2	AB hydrolase-1 domain-containing protein	At5g01700	2,179	0,019
F2CVS6	Predicted protein	PAM68	2,022	0,020
A0A287EIM2	Uncharacterized protein	OEP161 P	1,849	0,031
A0A287SGV7	Uncharacterized protein		1,843	0,037
A0A287NIG6	SRP54 domain-containing protein	FFC	1,758	0,024
A0A287U4Q4	ATP synthase subunit alpha	atpA	1,612	0,040
A0A287SNX7	Chlorophyll a-b binding protein	LHCB1.3	1,564	0,011
F2CW18	Chlorophyll a-b binding protein	LHCA5	1,563	0,021
A0A287U4K3	ABC1 domain-containing protein	ABC1K8	1,532	0,015
F2CPQ1	Predicted protein	OHP2	1,302	0,041
A0A287FW14	TPM_phosphatase domain-containing protein	At1g54780	1,172	0,044
A0A287MP90	Uncharacterized protein	ndhO	-1,424	0,046
M0WPH0	Uncharacterized protein	PSAH2	-1,456	0,019
A0A287U537	ATP synthase subunit beta	atpB	-1,608	0,048
F2CZH0	Predicted protein	STIC2	-1,641	0,046
A1E9N6	30S ribosomal protein S15	rps15	-1,654	0,040
A0A287ML46	Uncharacterized protein	CCB1	-1,992	0,032
S4S7Q7	Cytochrome b6-f complex subunit 4	petD	-2,358	0,005
M0XX43	Chlorophyll a-b binding protein	LHCB7	-2,482	0,009
M0YD50	Uncharacterized protein	FAX3	-2,734	0,031
A0A287UJE4	Methyltransf_11 domain-containing protein	At1g78140	-2,922	0,023
F2DK88	Predicted protein	At5g03900	-3,204	0,015
M0ZBE0	Lipase_3 domain-containing protein	At1g06800	-3,754	0,006
M0W1G3	Uncharacterized protein	At1g68590	-4,153	0,007
A0A287R8M0	Uncharacterized protein	PSRP2	-4,297	0,001

Nejvyšší up-regulace byla dle parametru LIMMA naměřena u proteinové podjednotky ATP-syntázy C. Samotná syntéza ATP je mechanicky propojena s rotací kruhu c podjednotek, které jsou v tylakoidní membráně. Rotace je řízena translokací protonů skrz tylakoidní membránu podél elektrochemického gradientu (Lawrence et al. 2011). Zvýšením

tohoto proteinu je patrné, že díky vyšším hodnotám vzniklého ATP, byl zvýšen i fotosyntetický metabolismus, a tedy byla podpořena fotosyntéza. Výrazné zvýšení nastalo i u proteinu vázající chlorofyl a-b, tedy LHCB1. Jedná se o apoprotein řady LHCB, který je spjat s PSII (Jackowski, Kacprzak, and Jansson 2001). Jelikož *clo* je deficientní v chlorofylu *b*, má díky tomu urychlenou inhibici PSII při stresu, čímž jsou negativně ovlivněna i RCII. Komplex LHCB1 byl celkově oproti dalším LHCB komplexům nalezen 9x, ostatní pouze jednou, avšak jejich zvýšení je taktéž signifikantně významné. Z tohoto zjištění lze vyvodit, že ošetření BAP potlačilo zhoršení funkce právě PSII.

U *A. thaliana* je PSRP charakterizován jako plastidově specifický ribozomální protein. Tento protein byl nalezen u *clo* jako nejvíce down-regulovaný. Jedná se o strukturu, která obsahuje dva RNA-rozpoznávací motivy. Bylo ale prokázáno, že PSRP2 není nezbytný pro funkci ribozomu a růst rostlin za standardních podmínek, ale semena s nadměrně exprimujícím PSRP2 vykazovala zpožděné klíčení v různých světelných a stresových podmínkách (Xu et al. 2013). Snížením množství tohoto proteinu došlo k rychlejšímu klíčení, pravděpodobně díky přidavku BAP.

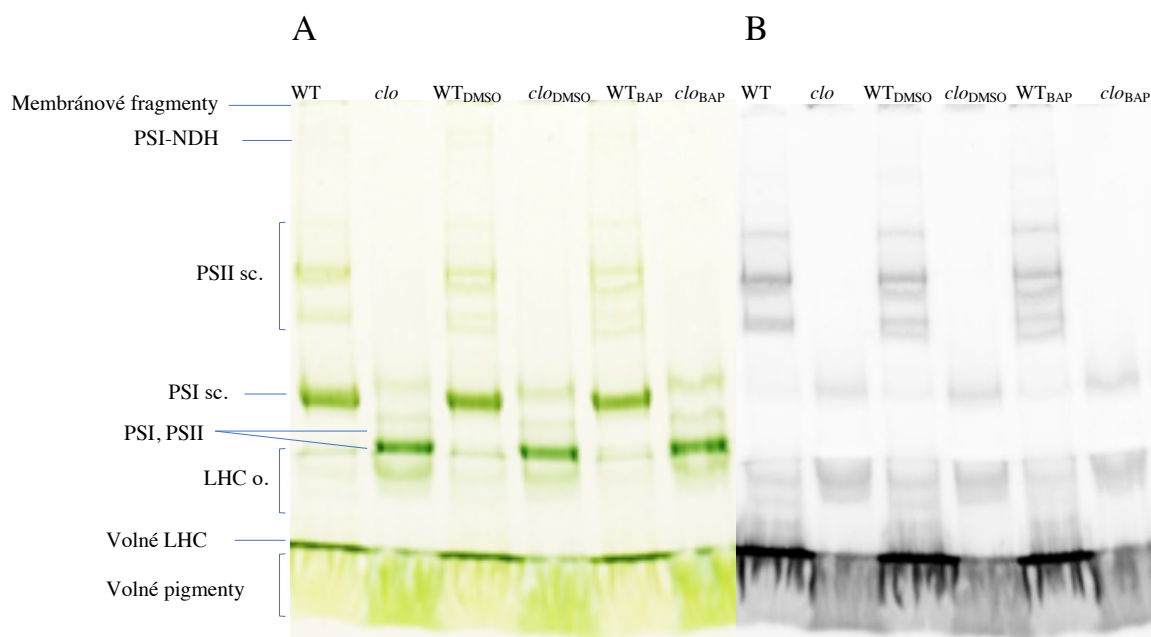
Při porovnání WT, kde bylo identifikováno 512 proteinů a *clo*, s 670 identifikovanými proteiny, je rozdíl 158 identifikovaných proteinů. Celkově při porovnání těchto dvou variant veškeré pozorované signifikantní hodnoty byly vyšší u *clo*, jak u množství zvýšených či snížených počtu proteinů, tak i u konkrétních maximálních a minimálních hodnot parametru LIMMA identifikovaných proteinů. Mutantní forma obsahuje také menší množství chlorofyl a i karotenoidů. Samotné fotochemické pochody jsou většinou nižší nebo srovnatelné s WT (Štroch et al. 2008), a právě proto by ošetření cytokininy mělo přispět k vyšším hodnotám, což může být další směr podrobnějšího výzkumu. Přestože nelze přesně specifikovat mechanismus jednotlivých proteinů, lze říci, že ošetření BAP přineslo pro tuto mutantní formu *clo* větší odezvu, což bylo zjištěno i experimentálně při pozorování senescence (Janečková et al. 2019). Zároveň v této publikaci bylo uvedeno, že *clo* má snížený počet LHCB až o 80 % oproti WT, konkrétně se jedná o LHCB1, LHCB6, LHCB4, LHCB2, LHCB3, což bylo potvrzeno i v této práci, jelikož i zde byly naměřeny velké rozdíly v těchto komplexech mezi WT a *clo*. Je možné, že by přítomnost cytokininů mohla změnit poměr světlosběrných komplexů, které jsou sníženy díky nedostatku chlorofylu *b* a mohou tak ovlivnit celou rostlinu a jejich metabolické procesy. Očividně ale probíhá vzájemná regulace, jelikož proteiny přenášející elektrony jsou zvýšeny (u WT např. *yfc3*), avšak je úbytek v *PsaB*, což jsou struktury, které jsou v úzkém kontaktu. Může to být reakce na přebytek *yfc3*, anebo naopak úbytek struktur, které nejsou

v přímém kontaktu. Výsledky naznačují, že použití BAP má vliv na světlosběrné komplexy u *clo* a je možné, že fotoprotektivní účinek je daleko rozsáhlejší. Tyto skutečnosti ale bude nutné ještě ověřit dalšími experimenty.

2.6.6.2 Analýza nativních komplexů tylakoidních membrán pomocí elektroforetických technik

Pro vizuální porovnání nativních komplexů z tylakoidních membrán osmidenní rostliny byla provedena nativní elektroforéza a gely s izolovanými proteiny byly naskenovány kolorimetricky a fluorescenčně. Ve fluorescenčním zobrazení nejsou viditelné separační dráhy náležící PSI, jelikož při RT fluoreskuje hlavně chlorofyl *a*, který je součástí PSII.

Tato práce se věnovala hlavně analýze membránových proteinů ošetřených DMSO a BAP s použitím přirozeného genotypu ječmene (WT) a jeho mutantní formy deficientní v chlorofylu *b* (*clo*), bylo nutné provést i vizuální srovnání s variantami neošetřenými cytokininy. Experimentální skupina byla ošetřena BAP a standardní skupina DMSO. Jak je patrné z obrázku x., WT a *clo* se liší na první pohled. Ovšem samotné WT a ošetřený WT s cytokininy nevykazuje znatelné rozdíly. Stejně tak je to u porovnání variant *clo*. Provedené nativní elektroforézy jsou na Obrázku 17. ve dvou různých zobrazeních, a to kolorimetrické a fluorescenční.

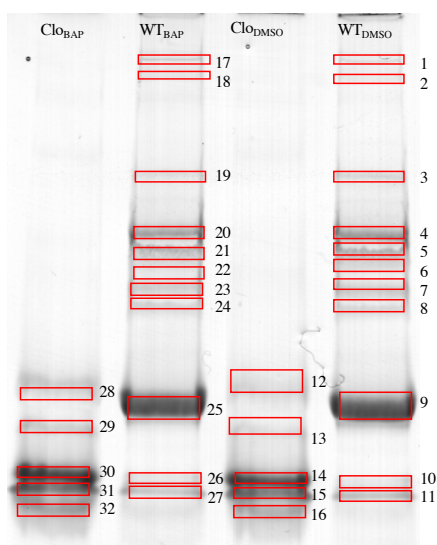


Obrázek 17. Nativní elektroforéza tylakoidních membrán *Hordeum vulgare* osmidenních listů WT a jeho mutantní formy *clo*, a další varianty ošetřeny DMSO nebo BAP. PSI.NDH – spojený komplex fotosystému I s NADH-dehydrogenasa-like komplexem; PSII sc. – superkomplexy fotosystému II; PSI sc. – superkomplex fotosystému I; LHC o. – oligomerní světlosběrné komplexy; A) kolorimetrické zobrazení gelu, B) fluorescenční zobrazení gelu.

Ztmavení na začátku separační dráhy je téměř u všech variant viditelné, a jedná se o nahromaděné membránové fragmenty. WT ve všech variantách má viditelně nejsilnější pruh obsahující superkomplex fotosystému I. Nižší, avšak stále výrazné zobrazení lze přiřadit superkomplexům fotosystému II, na tyto komplexy PSII jsou navázány LHCI antény, které s klesající molekulovou hmotností prošly dále, ovšem s menším množstvím antén. U *chloriny* PSII sc. nelze vidět, čímž je potvrzená mutace v nedostatku chlorofylu *b*, jelikož ten je velmi důležitý pro uspořádání komplexů PSII-LHCI (Kim et al. 2009). Dalším porovnání WT a *clo* jsou viditelné značné rozdíly, a to v molekulové velikosti, které jsou u *clo* značně nižší. Pravděpodobně větší a tím i složitější struktury se nachází u přirozeného genotypu ječmene. Komplex PSI se opět nachází níže u *clo* než u WT, což může znamenat, že LHCI antény se vyskytují ve velmi malém či žádném množství, jelikož na obrázku není téměř vidět. Těsně pod pravděpodobným PSI se nachází jaderná část PSII, a ještě níže samotné světlo-sběrné komplexy, ale u *chloriny* je zbarvení mnohem slabší, a lze tedy usuzovat, že bude i nižší koncentrace.

Z těchto vizuálních výsledků lze usoudit, že WT obsahuje složitější struktury ve vyšších koncentracích, kdy se jedná převážně o PSII a PSI superkomplexy. Mutantní typ *clo* obsahuje proteinové komplexy o nižších molekulových hmotnostech a dle jeho uspořádání na gelu byla potvrzena mutace v chlorofylu *b*.

Gel z nativní elektroforézy se separovanými proteiny byl také použit pro MS analýzu. Jednotlivé komplexy byly vyříznuty (Obrázek 18.), kdy celkem bylo vyříznuto z předpokládaných 32 kousků 29, konkrétně se jedná o 1+2, 21+22 a 31+32. Separované proteiny byly štěpeny dle zvolené metody (kapitola 2.5.6.2 Štěpení v gelu) a poté analyzovány na MS.

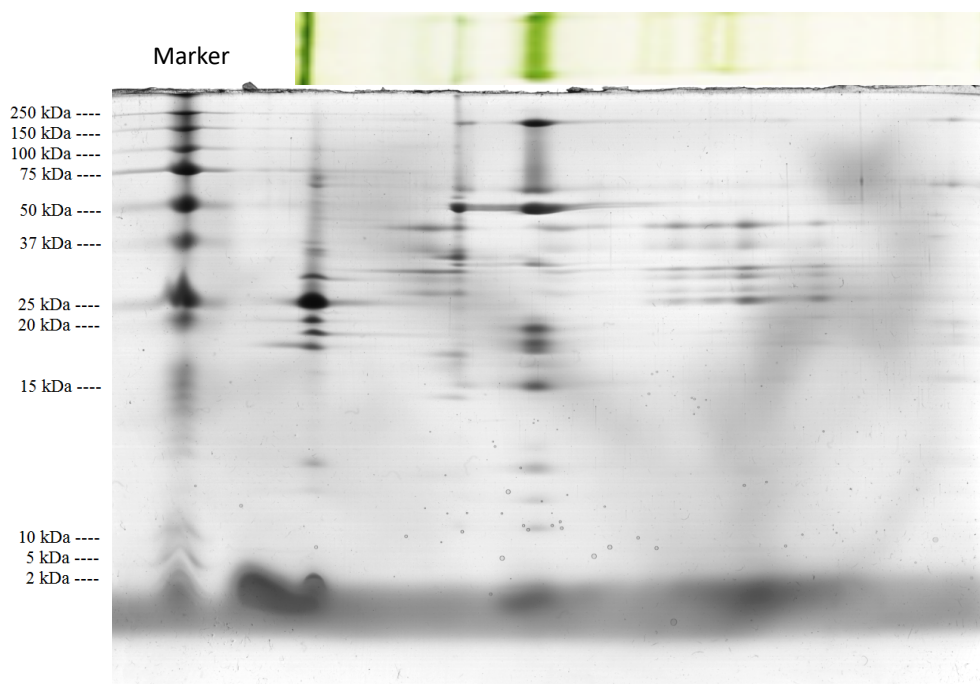


Obrázek 18. Zobrazení naskenovaného nativního gelu s označením jednotlivých separovaných komplexů pro vyříznutí.

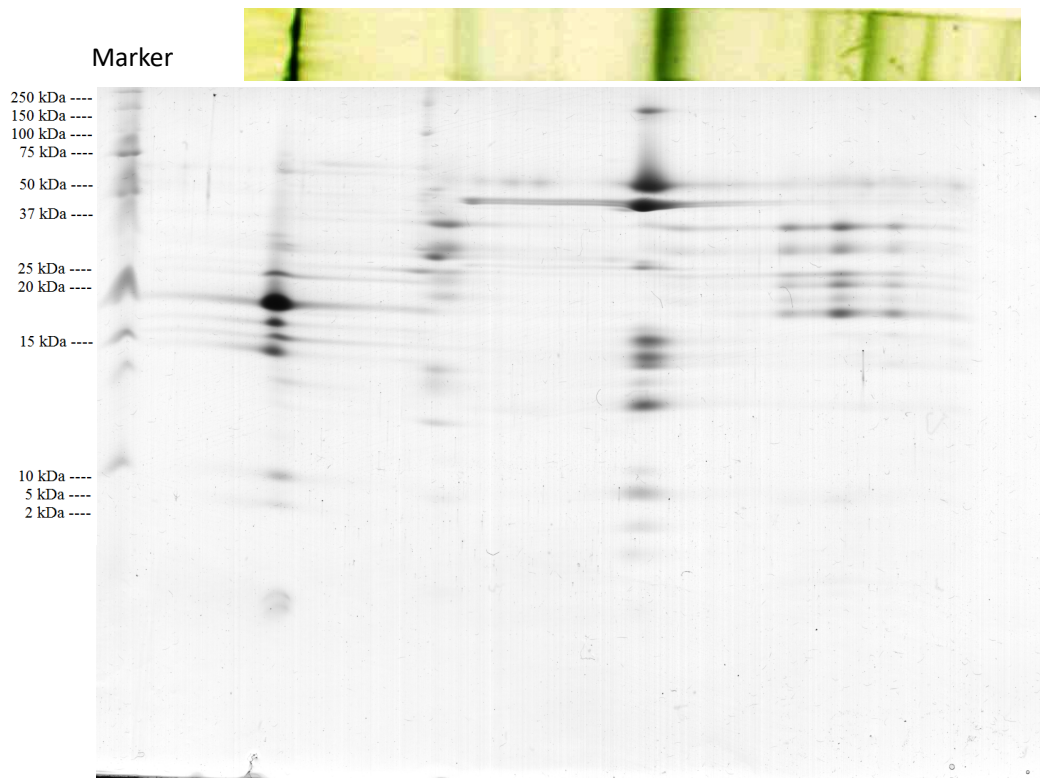
Ze získaných dat byla vytvořena Tabulka 10., kde jsou veškeré identifikované proteiny separované z gelu. Označení vyřiznutých vzorků je dle Obrázku 18. a pro jednodušší porovnání stejný variant obohacených o DMSO a BAP jsou varianty dány vedle sebe. Viditelné rozdíly jsou ve srovnání WT a *clo*, nicméně nyní jsou viditelné i rozdíly u variant obsahující BAP. Specifické proteiny, které byly identifikovány i pomocí vybrané metody štěpení, a to tedy s použitím 5% (w/v) SDC s následným fázovým transferem, byly vyznačeny barevně. Oranžové hodnoty jsou pro WT a zelené pro *clo*. Je důležité zkonstatovat, že při vyhodnocování analýzy bylo zjištěno, že chybí vzorek 9. a proto v konečné tabulce chybí.

Tabulku bude nutné následně více prozkoumat a najít korelace mezi jednotlivými variantami proteinů. Nicméně nebylo dosaženo velkých počtů identifikovaných proteinů, jelikož tato metoda má velké ztráty a není tak přesná, ovšem je vidět znatelné zastoupení LHCB u WT, oproti *clo*, která tyto komplexy nemá identifikovány. Tyto výsledky jsou opět ve shodě, jak s předchozí kapitolou týkající se kvantifikace proteinů pomocí MS, tak s literaturou (Janečková et al. 2019). Největší zastoupení u *clo* však bylo u *atpA* a *atpB*, ale není nejsou výrazné změny s variantou obohacenou o BAP, avšak se nachází v různých separových komplexem. Může to být způsobené právě mutací v chlorofylu *b*, jelikož nedostatečné množství LHCB je kompenzováno vyšším množstvím RCII (Ghirardi, McCauley, and Melis 1986).

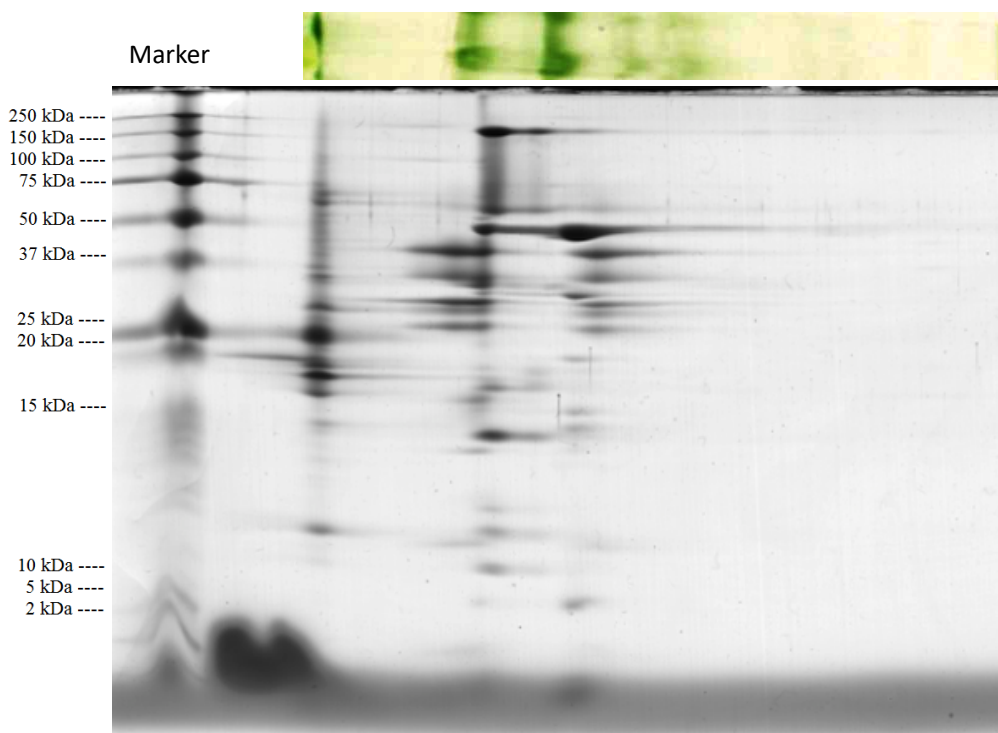
Pro hlubší vhled byla také provedena 2D elektroforéza, kdy byly vyřezány separační dráhy čtyř variant gelu z nativní elektroforézy (Obrázek 17.), tedy pouze WT a *clo* ošetřené DMSO nebo BAP. Jako druhý rozměr byl gradientový gel s SDS a pro přesnější odečtení molekulových hmotností separovaných komplexů a sub-komplexů, byl použit marker. U této elektroforetické separace, bohužel, z časových důvodů nebylo možné provést identifikaci separovaných podjednotek komplex a Obrázky 19., 20., 21. a 22. jsou zde uvedeny jen pro vizuální doplnění.



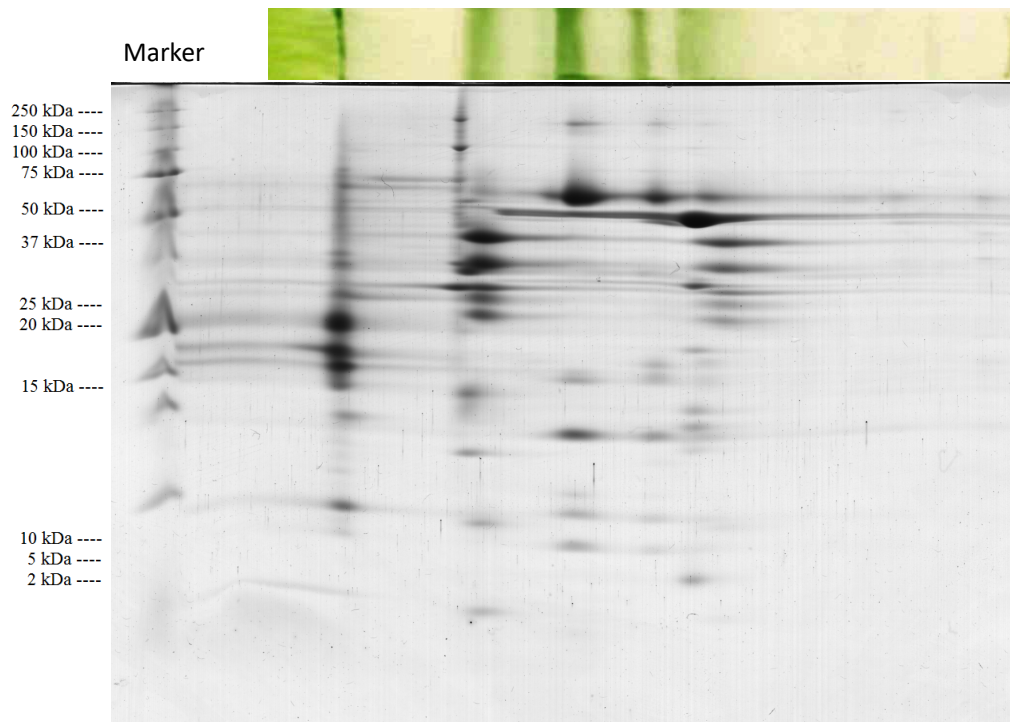
Obrázek 19. Elektroforeogram z dvourozměrné elektroforézy *Hordeum vulgare* WT ošetřen DMSO.



Obrázek 20. Elektroforeogram z dvourozměrné elektroforézy *Hordeum vulgare* WT ošetřen BAP.



Obrázek 21. Elektroforeogram z dvourozměrné elektroforézy *Hordeum vulgare* CLO ošetřena DMSO.



Obrázek 22. Elektroforeogram z dvourozměrné elektroforézy *Hordeum vulgare* CLO ošetřena BAP.

Díky využití elektrochemických technik byly potvrzeny informace dle publikací o přirozeném genotypu *Hordeum vulgare* a jeho mutantní formě *clo*. Bylo prokázáno, že WT a *clo* mají různou velikost separovaných komplexů, pravděpodobně lišící se v uspořádání a složitosti. Jelikož nebyla provedena identifikace dvoudimenzionálních gelů, nelze přesněji určit, o jaké jednotlivé komplexy či sub-komplexy se jedná.

2.7 ZÁVĚR

Hlavní cíl této diplomové práce byl zanalyzovat proteinové složení tylakoidních membrán *Hordeum vulgare* (WT, *clo*) s použitím BAP. Rostlinné hormony cytokinininy jsou důležité pro mnoho vývojových a fyziologických procesů. Jsou zkoumány od padesátých let minulého století, avšak nikdo podrobně necharakterizoval podrobný mechanismus účinku. Existují pouze náznaky hovořící o změnách proteinů. Právě proto tato práce byla zaměřena na podrobnější charakterizaci jednotlivých proteinů a jejich změn při ošetření BAP.

Byly optimalizovány metody vhodné pro použití proteinů tylakoidních membrán. WF assay založená na fluorescenci tryptofanu poskytuje poměrně přesné výsledky, nicméně je však vhodná spíše pro kvantitativní analýzy jednotlivých proteinů, a ne celkových směsí. Je závislá na denaturaci, a pokud není dostatečná, výsledky by mohly být ovlivněny. Z tohoto důvodu bylo od této metody upuštěno a byl využit 2D-Quant kit. Optimalizace štěpení byla vyhodnocena dle počtu identifikovaných proteinů, peptidů a počtu peptidů identifikující daný protein, byla tedy vybrána varianta s použitím 5% (w/v) SDC, jako detergent solubilizující proteiny tylakoidních membrán, s následným fázovým transferem.

Za pomoci vybraných metod byly zpracovány vzorky ječmene přirozeného genotypu a jeho mutantní formy *clo* s deficitem chlorofylu *b*, které byly následně ošetřeny BAP. Identifikované proteiny byly signifikantně změněny právě u *chloriny*. Samotné fotochemické pochody jsou většinou nižší nebo srovnatelné s WT (Štroch et al. 2008), a právě proto by ošetření cytokinininy mělo přispět k vyšším hodnotám, což může být další směr podrobnějšího výzkumu. Bylo zjištěno, že BAP je schopen opravdu vyvolat různé změny v expresi jednotlivých genů souvisejících s fotosyntézou. Pravděpodobně ovlivňuje více mutantní formu *clo*, než WT. Z výsledných hodnot je patrné, že zvyšuje počet LHC světlosběrných komplexů a tím může být zlepšen výtěžek fotosyntézy anebo tak ovlivnit celou rostlinu a její metabolické procesy. Tyto skutečnosti ale bude nutné ještě ověřit dalšími experimenty.

Závěrem lze říci, že tato práce je první, která se cíleně věnovala proteinům tylakoidních membrán souvisejících s fotosyntézou na základě působení cytokininů. Nabízí zajímavé poznatky ohledně působení cytokininů. Je potřeba zkonstatovat, že kvůli časovým nedostatkům by bylo vhodné doplnit podrobnější charakterizaci proteinů a dát je do společného kontextu.

2.8 SEZNAM ZKRATEK

2D-GE	Dvojměrná gelová elektroforéza
2D-SDS PAGE	Dvojměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza za použití dodecylsulfátu sodného
AA/BIS	Roztok akrylamidu a bisakrylamidu
ACN	Acetonitril
AmBi	Hydrogenuhlíčan amonný
APS	Persulfát amonný
BAP	6-benzylaminopurin
Bis-Tris	2,2-bis(hydroxymethyl)-2',2''-nitrioltriethanol
BSA	Hovězí sérový albumin
C	Koncentrace zesilovacího činidla
CID	Fragmentace iontů v kolizní cele
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
<i>clo</i>	Chlorina, mutantní forma <i>H. vulgare</i>
CN-PAGE	Nativní gelová polyakrylamidová elektroforéza
DBM	n-dodecyl- β -D-maltosid
Dc	Membránový potenciál přes tylakoidní membránu
DDA	Data dependent analysis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DpH	Gradient koncentrace protonu
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	Ionizace pomocí elektrospreje
FA	Kyselina mravenčí
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IAM	Jodacetamid
IEF	Izoelektrická fokusace
KAS	b-kasein
LC	Kapalinová chromatografie
LHC	Light harvesting complexes, světelné komplexy
LHCI	Světlosběrný komplex I
LHCII	Světlosběrný komplex II

LYS	Lysosym
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MW	Molekulová hmotnost
MYO	Myoglobin
nLC	Systém nanokapilární chromatografie
OVA	Ovolabumin
PET	Fotosyntetický transportní řetězec
PMF	Peptide mass fingerprinting, "otisk prstu"
PS	Peptide sequencing, peptidové sekvenování
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
RC	Fotosyntetická reakční centra
ROS	Reaktivní sloučeniny kyslíku
RT	Laboratorní teplota
SDC	Deoxycholát sodný
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza za použití dodecylsulfátu amonného
T	Stupeň zesíťování polyakrylamidového gelu
TCEP	Tris-2-karboxyethyl-fosfin
TEAB	Uhličitan triethylamonný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFA	Kyselina trifluoroctová
TIC	Translokon vnitřní membrány chloroplastu
TOC	Translokon vnější membrány chloroplastu
TRP	Tryptofan
UHR-Q-TOF	Tandemová hmotnostní detekce s průletovým analyzátozem
WT	Wilde type, přirozeně vyskytující se genotyp <i>H. vulgare</i>

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Almeida, Jose G., Antonio J. Preto, Panagiotis I. Koukos, Alexandre M. J. J. Bonvin, and Irina S. Moreira. 2017. "Membrane Proteins Structures: A Review on Computational Modeling Tools." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1859(10):2021–39.
- Aloj, Salvatore and H. Edelhoich. 1972. "Structural Studies on Polypeptide Hormones. II. Parathyroid Hormone." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 150(2):782–85.
- Alston, Roy W., Mauricio Lasagna, Gerald R. Grimsley, J. Martin Scholtz, Gregory D. Reinhart, and C. Nick Pace. 2008. "Peptide Sequence and Conformation Strongly Influence Tryptophan Fluorescence." *Biophysical Journal* 94(6):2280–87.
- Andersen, Kell K. and Daniel E. Otzen. 2014. "Denaturation of α -Lactalbumin and Myoglobin by the Anionic Biosurfactant Rhamnolipid." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1844(12):2338–45.
- Armbruster, Ute, Viviana Correa Galvis, Hans Henning Kunz, and Deserah D. Strand. 2017. "The Regulation of the Chloroplast Proton Motive Force Plays a Key Role for Photosynthesis in Fluctuating Light." *Current Opinion in Plant Biology* 37:56–62.
- Auger, Christopher, Nishma D. Appanna, Azhar Alhasawi, and Vasu D. Appanna. 2015. "Deciphering Metabolic Networks by Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Functional Proteomic Exploration." *EuPA Open Proteomics* 7:64–72.
- Beck, Scarlet, Annette Michalski, Oliver Raether, Markus Lubeck, Stephanie Kaspar, Niels Goedecke, Carsten Baessmann, Daniel Hornburg, Florian Meier, Igor Paron, Nils A. Kulak, Juergen Cox, and Matthias Mann. 2015. "The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics." *Molecular and Cellular Proteomics* 14(7):2014–29.
- Bennion, Brian J. and Valerie Daggett. 2003. "The Molecular Basis for the Chemical Denaturation of Proteins by Urea." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9):5142–47.
- Celis, Julio E., Morten Østergaard, Niels A. Jensen, Irina Gromova, Hanne Holm Rasmussen, and Pavel Gromov. 1998. "Human and Mouse Proteomic Databases: Novel Resources in the Protein Universe." *FEBS Letters* 430(1–2):64–72.
- Chang, Jui-Yoa and Li Li. 2002. "The Unfolding Mechanism and the Disulfide Structures of Denatured Lysozyme." *FEBS Letters* 511(1):73–78.
- Checchetto, Vanessa, Enrico Teardo, Luca Carraretto, Elide Formentin, Elisabetta Bergantino, Giorgio Mario Giacometti, and Ildiko Szabo. 2013. "Regulation of Photosynthesis by Ion Channels in Cyanobacteria and Higher Plants." *Biophysical Chemistry* 182:51–57.
- Chen, Yu and Mary D. Barkley. 1998. "Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins." *Biochemistry* 37(28):9976–82.
- Cortleven, Anne, Ingke Marg, Maria V. Yamburenko, Hagen Schlicke, Kristine Hill, Bernhard Grimm, G. Eric Schaller, and Thomas Schmülling. 2016. "Cytokinin Regulates the Etioplast-Chloroplast Transition through the Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-Related Genes." *Plant Physiology* 172(1):464–78.
- Cox, Jürgen, Nadin Neuhauser, Annette Michalski, Richard A. Scheltema, Jesper V. Olsen, and Matthias Mann. 2011. "Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the

- MaxQuant Environment.” *Journal of Proteome Research* 10(4):1794–1805.
- Damodaran, Senthilkumar, Troy D. Wood, Priyadharsini Nagarajan, and Richard A. Rabin. 2007. “Evaluating Peptide Mass Fingerprinting-Based Protein Identification.” *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 5(3–4):152–57.
- Dekker, Jan P. and Egbert J. Boekema. 2005. “Supramolecular Organization of Thylakoid Membrane Proteins in Green Plants.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1706(1–2):12–39.
- Domonkos, Ildikó, Hajnalka Laczkó-Dobos, and Zoltán Gombos. 2008. “Lipid-Assisted Protein–Protein Interactions That Support Photosynthetic and Other Cellular Activities.” *Progress in Lipid Research* 47(6):422–35.
- van Doorn, Wouter G. and Kohki Yoshimoto. 2010. “Role of Chloroplasts and Other Plastids in Ageing and Death of Plants and Animals: A Tale of Vishnu and Shiva.” *Ageing Research Reviews* 9(2):117–30.
- Edvardsson, Anna, Said Eshaghi, Alexander V. Vener, and Bertil Andersson. 2003. “The Major Peptidyl-Prolyl Isomerase Activity in Thylakoid Lumen of Plant Chloroplasts Belongs to a Novel Cyclophilin TLP20.” *FEBS Letters* 542(1–3):137–41.
- Eshaghi, Said, Bertil Andersson, and James Barber. 1999. “Isolation of a Highly Active PSII-LHCII Supercomplex from Thylakoid Membranes by a Direct Method.” *FEBS Letters* 446(1):23–26.
- Fjelstrup, Søren, Marie Bech Andersen, Jonas Thomsen, Jing Wang, Magnus Stougaard, Finn Skou Pedersen, Yi Ping Ho, Marianne Smedegaard Hede, and Birgitta Ruth Knudsen. 2017. “The Effects of Dithiothreitol on DNA.” *Sensors (Switzerland)* 17(6):1–10.
- Gan, Ping, Fang Liu, Rongbai Li, Shaokui Wang, and Jijing Luo. 2019. “Chloroplasts—beyond Energy Capture and Carbon Fixation: Tuning of Photosynthesis in Response to Chilling Stress.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(20):1–15.
- Garab, Gyoza. 2014. “Hierarchical Organization and Structural Flexibility of Thylakoid Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1837(4):481–94.
- Gervais, David and Darryl King. 2014. “Capillary Isoelectric Focusing of a Difficult-to-Denature Tetrameric Enzyme Using Alkylurea-Urea Mixtures.” *Analytical Biochemistry* 465:90–95.
- Ghirardi, Maria L., Steven W. McCauley, and Anastasios Melis. 1986. “Photochemical Apparatus Organization in the Thylakoid Membrane of *Hordeum Vulgare* Wild Type and Chlorophyll B-Less Chlorina F2 Mutant.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 851(3):331–39.
- Ghisaidoobe, Amar B. T. and Sang J. Chung. 2014. “Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques.” *International Journal of Molecular Sciences* 15(12):22518–38.
- Gillet, Benjamin, Audrey Beyly, Gilles Peltier, and Pascal Rey. 1998. “Molecular Characterization of CDSP 34, a Chloroplastic Protein Induced by Water Deficit in *Solanum Tuberosum* L. Plants, and Regulation of CDSP 34 Expression by ABA and High Illumination.” *Plant Journal* 16(2):257–62.
- Goez, Manuel Mauricio, Maria Constanza Torres-Madroño, Sarah Röthlisberger, and Edilson Delgado-Trejos. 2018. “Preprocessing of 2-Dimensional Gel Electrophoresis Images Applied to Proteomic Analysis: A Review.” *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*

16(1):63–72.

- Grinvald, A. and I. Z. Steinberg. 1976. “The Fluorescence Decay of Tryptophan Residues in Native and Denatured Proteins.” *BBA - Protein Structure* 427(2):663–78.
- Gupta, Nitin, Nuno Bandeira, Uri Keich, and Pavel A. Pevzner. 2011. “Target-Decoy Approach and False Discovery Rate: When Things May Go Wrong.” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22(7):1111–20.
- Hennecke, Jens, Alain Sillen, Martina Huber-Wunderlich, Yves Engelborghs, and Rudi Glockshuber. 1997. “Quenching of Tryptophan Fluorescence by the Active-Site Disulfide Bridge in the DsbA Protein from Escherichia Coli.” *Biochemistry* 36(21):6391–6400.
- Hesketh, Sophie J., David P. Klebl, Anna J. Higgins, Maren Thomsen, Isabelle B. Pickles, Frank Sobott, Asipu Sivaprasadarao, Vincent L. G. Postis, and Stephen P. Muench. 2020. “Styrene Maleic-Acid Lipid Particles (SMALPs) into Detergent or Amphipols: An Exchange Protocol for Membrane Protein Characterisation.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1862(5):183192.
- Hönig, Martin, Lucie Plíhalová, Alexandra Husičková, Jaroslav Nisler, and Karel Doležal. 2018. “Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(12):1–23.
- Imoto, T., L. S. Forster, J. A. Rupley, and F. Tanaka. 1972. “Fluorescence of Lysozyme: Emissions from Tryptophan Residues 62 and 108 and Energy Migration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(5):1151–55.
- Jackowski, Grzegorz, Karol Kacprzak, and Stefan Jansson. 2001. “Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 Heterotrimers of the Main Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Protein Complex of Photosystem II (LHC II).” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1504(2):340–45.
- Janečková, Helena, Alexandra Husičková, Dušan Lazár, Ursula Ferretti, Pavel Pospíšil, and Martina Špundová. 2019. “Exogenous Application of Cytokinin during Dark Senescence Eliminates the Acceleration of Photosystem II Impairment Caused by Chlorophyll b Deficiency in Barley.” *Plant Physiology and Biochemistry* 136(January):43–51.
- Kieselbach, Thomas, Maria Bystedt, Peter Hynds, Colin Robinson, and Wolfgang P. Schröder. 2000. “A Peroxidase Homologue and Novel Plastocyanin Located by Proteomics to the Arabidopsis Chloroplast Thylakoid Lumen.” *FEBS Letters* 480(2–3):271–76.
- Kikuchi, Shingo, Toshiya Hirohashi, and Masato Nakai. 2006. “Characterization of the Preprotein Translocon at the Outer Envelope Membrane of Chloroplasts by Blue Native PAGE.” *Plant and Cell Physiology* 47(3):363–71.
- Kim, Eun Ha, Xiao Ping Li, Reza Razeghifard, Jan M. Anderson, Krishna K. Niyogi, Barry J. Pogson, and Wah Soon Chow. 2009. “The Multiple Roles of Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Protein Complexes Define Structure and Optimize Function of Arabidopsis Chloroplasts: A Study Using Two Chlorophyll b-Less Mutants.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787(8):973–84.
- Kobayashi, Koichi. 2016. “Role of Membrane Glycerolipids in Photosynthesis, Thylakoid Biogenesis and Chloroplast Development.” *Journal of Plant Research* 129(4):565–80.
- Krause, Frank. 2006. “Detection and Analysis of Protein-Protein Interactions in Organellar and Prokaryotic Proteomes by Native Gel Electrophoresis: (Membrane) Protein Complexes and Supercomplexes.” *Electrophoresis* 27(13):2759–81.

- Lakowicz, J. R. 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Springer.
- Lawrence, Robert M., Benjamin Varco-Merth, Christopher J. Bley, Julian J. L. Chen, and Petra Fromme. 2011. "Recombinant Production and Purification of the Subunit c of Chloroplast ATP Synthase." *Protein Expression and Purification* 76(1):15–24.
- Lete, Marta G., Bingen G. Monasterio, M. Isabel Collado, Milagros Medina, Jesús Sot, Alicia Alonso, and Félix M. Goñi. 2019. "Fast and Slow Biomembrane Solubilizing Detergents: Insights into Their Mechanism of Action." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 183:110430.
- Lichtenthaler, Hartmut K. B. T. *Methods in Enzymology*. 1987. "[34] Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes." Pp. 350–82 in *Plant Cell Membranes*. Vol. 148. Academic Press.
- Lin, Yong, Linju Huo, Zhonghua Liu, Jianglin Li, Yi Liu, Quanze He, Xianchun Wang, and Songping Liang. 2013. "Sodium Laurate, a Novel Protease- and Mass Spectrometry-Compatible Detergent for Mass Spectrometry-Based Membrane Proteomics." *PLoS ONE* 8(3).
- Ling, Qihua and Paul Jarvis. 2015. "Functions of Plastid Protein Import and the Ubiquitin-Proteasome System in Plastid Development." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1847(9):939–48.
- Lochmanová, Gabriela, Zbyněk Zdráhal, Hana Konečná, Šárka Koukalová, Jiří Malbeck, Přemysl Souček, Martina Válková, Nagavalli S. Kiran, and Břetislav Brzobohatý. 2008. "Cytokinin-Induced Photomorphogenesis in Dark-Grown Arabidopsis: A Proteomic Analysis." *Journal of Experimental Botany* 59(13):3705–19.
- Lu, Junna, Qiwen Chen, Xingcheng Ding, Jia Wen, Yuhuan Zhang, Hongjuan Li, Yongqian Xu, Fengyu Liu, Su-Shing Chen, and Shiguo Sun. 2019. "BSA Modified, Disulfide-Bridged Mesoporous Silica with Low Biototoxicity for Dual-Responsive Drug Delivery." *Microporous and Mesoporous Materials* 278:257–66.
- Madden, Thomas L., Roman L. Tatusov, and Jinghui B. T. *Methods in Enzymology* Zhang. 1996. "[9] Applications of Network BLAST Server." Pp. 131–41 in *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis*. Vol. 266. Academic Press.
- Magdeldin, Sameh, Shymaa Enany, Yutaka Yoshida, Bo Xu, Ying Zhang, Zam Zureena, Ilambarthi Lokamani, Eishin Yaoita, and Tadashi Yamamoto. 2014. "Basics and Recent Advances of Two Dimensional-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Clinical Proteomics* 11(1):1–10.
- Mallick, Parag and Bernhard Kuster. 2010. "Proteomics: A Pragmatic Perspective." *Nature Biotechnology* 28(7):695–709.
- Mayneord, Guy E., Cvetelin Vasilev, Lorna A. Malone, David J. K. Swainsbury, C. Neil Hunter, and Matthew P. Johnson. 2019. "Single-Molecule Study of Redox Control Involved in Establishing the Spinach Plastocyanin-Cytochrome B6f Electron Transfer Complex." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1860(7):591–99.
- Mechela, Annabel, Serena Schwenkert, and Jürgen Soll. 2019. "A Brief History of Thylakoid Biogenesis." *Open Biology* 9(1).
- Van De Meene, Allison M. L., William P. Sharp, Jennifer H. McDaniel, Heiner Friedrich, Wim F. J. Vermaas, and Robert W. Roberson. 2012. "Gross Morphological Changes in Thylakoid Membrane Structure Are Associated with Photosystem i Deletion in *Synechocystis* Sp. PCC 6803." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*

1818(5):1427–34.

- Nelson, Nathan. 2011. “Photosystems and Global Effects of Oxygenic Photosynthesis.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1807(8):856–63.
- Niether, Doreen, Silvia Di Lecce, Fernando Bresme, and Simone Wiegand. 2018. “Unravelling the Hydrophobicity of Urea in Water Using Thermodiffusion: Implications for Protein Denaturation.” *Physical Chemistry Chemical Physics* 20(2):1012–20.
- Norling, Birgitta, Elena Zak, Bertil Andersson, and Himadri Pakrasi. 1998. “2D-Isolation of Pure Plasma and Thylakoid Membranes from the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803.” *FEBS Letters* 436(2):189–92.
- Patra, Digambara and Christelle Barakat. 2012. “Time-Resolved Fluorescence Study during Denaturation and Renaturation of Curcumin–Myoglobin Complex.” *International Journal of Biological Macromolecules* 50(4):885–90.
- Peltier, Jean Benoît, Giulia Friso, Dário Eluan Kalume, Peter Roepstorff, Frederik Nilsson, Iwona Adamska, and Klaas J. Van Wijk. 2000. “Proteomics of the Chloroplast: Systematic Identification and Targeting Analysis of Lumenal and Peripheral Thylakoid Proteins.” *Plant Cell* 12(3):319–41.
- Peltier, Jean Benoit, A. Jimmy Ytterberg, Qi Sun, and Klaas J. Van Wijk. 2004. *New Functions of the Thylakoid Membrane Proteome of Arabidopsis Thaliana Revealed by a Simple, Fast, and Versatile Fractionation Strategy*. Vol. 279.
- Pesaresi, Paolo, Claudio Varotto, Erik Richly, Joachim Kurth, Francesco Salamini, and Dario Leister. 2001. “Functional Genomics of Arabidopsis Photosynthesis.” *Plant Physiology and Biochemistry* 39(3–4):285–94.
- Pribil, Mathias, Mathias Labs, and Dario Leister. 2014. “Structure and Dynamics of Thylakoids in Land Plants.” *Journal of Experimental Botany* 65(8):1955–72.
- Rast, Anna, Steffen Heinz, and Jörg Nickelsen. 2015. “Biogenesis of Thylakoid Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1847(9):821–30.
- Roth, Robert and Cecilia Hägerhäll. 2001. “Transmembrane Orientation and Topology of the NADH:Quinone Oxidoreductase Putative Quinone Binding Subunit NuoH.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1504(2–3):352–62.
- Rupwate, Sunny D. and Ram Rajasekharan. 2012. “Plant Phosphoinositide-Specific Phospholipase C: An Insight.” *Plant Signaling and Behavior* 7(10):1281–83.
- Salvador, Dimitri, Marie Glavier, Guy Schoehn, Gilles Phan, Jean Christophe Taveau, Marion Decossas, Sophie Lecomte, Sébastien Mongrand, Cyril Garnier, Isabelle Broutin, Laetitia Daury, and Olivier Lambert. 2019. “Minimal Nanodisc without Exogenous Lipids for Stabilizing Membrane Proteins in Detergent-Free Buffer.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1861(4):852–60.
- Schwanhüusser, Björn, Dorothea Busse, Na Li, Gunnar Dittmar, Johannes Schuchhardt, Jana Wolf, Wei Chen, and Matthias Selbach. 2011. “Global Quantification of Mammalian Gene Expression Control.” *Nature* 473(7347):337–42.
- Shen, Yu, Jinfeng Li, Ruochen Gu, Xinhua Zhan, and Baoshan Xing. 2019. “Proteomic Analysis for Phenanthrene-Elicited Wheat Chloroplast Deformation.” *Environment International* 123(November 2018):273–81.
- Sherwin, Heather W. and Jill M. Farrant. 1998. “Protection Mechanisms against Excess Light in the Resurrection Plants *Craterostigma Wilmsii* and *Xerophyta Viscosa*.” *Plant Growth*

Regulation 24(3):203–10.

- Shimonishi, Yasutsugu, Yeong-Man -M Hong, Toyoko Kitagishi, Takekiyo Mastudo, Hisashi Matsuda, and Itsuo Katakuse. 1980. “Sequencing of Peptide Mixtures by Edman Degradation and Field-Desorption Mass Spectrometry.” *European Journal of Biochemistry* 112(2):251–64.
- Shukolyukov, S. A. 2011. “Native Electrophoresis in Cell Proteomic: BN-PAGE and CN-PAGE.” *Cell and Tissue Biology* 5(3):311–18.
- Silveira, Joaquim A. G. and Fabricio E. L. Carvalho. 2016. “Proteomics, Photosynthesis and Salt Resistance in Crops: An Integrative View.” *Journal of Proteomics* 143:24–35.
- Smyth G. K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 3, Article3. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>
- Stellwagen, Nancy C. 2014. “Electrophoresis of DNA in Agarose Gels, Polyacrylamide Gels and in Free Solution 1 Historical Overview 2 Apparent Gel Pore Size.” *Electrophoresis* 30(Suppl 1):S188–95.
- Štroch, Michal, Sándor Lenk, Martin Navrátil, Vladimír Špunda, and Claus Buschmann. 2008. “Epidermal UV-Shielding and Photosystem II Adjustment in Wild Type and Chlorina F2 Mutant of Barley during Exposure to Increased PAR and UV Radiation.” *Environmental and Experimental Botany* 64(3):271–78.
- Sun, Tianhu, Hui Yuan, Hongbo Cao, Mohammad Yazdani, Yaakov Tadmor, and Li Li. 2018. “Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids.” *Molecular Plant* 11(1):58–74.
- Takamizawa, Atsushi, Susumu Fujimaki, Jan Sunner, and Kenzo Hiraoka. 2005. “Denaturation of Lysozyme and Myoglobin in Laser Spray.” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16(6):860–68.
- Tiller, Nadine and Ralph Bock. 2014. “The Translational Apparatus of Plastids and Its Role in Plant Development.” *Molecular Plant* 7(7):1105–20.
- Tyanova, S., Temu, T., Cox, J., 2016. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 11, 2301–2319. <https://doi.org/10/f89fwn>
- Ünnep, R., O. Zsiros, K. Solymosi, L. Kovács, P. H. Lambrev, T. Tóth, R. Schweins, D. Posselt, N. K. Székely, L. Rosta, G. Nagy, and G. Garab. 2014. “The Ultrastructure and Flexibility of Thylakoid Membranes in Leaves and Isolated Chloroplasts as Revealed by Small-Angle Neutron Scattering.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1837(9):1572–80.
- Vacha, Frantisek, Ladislav Bumba, David Kaftan, and Martin Vacha. 2005. “Microscopy and Single Molecule Detection in Photosynthesis.” *Micron* 36(6):483–502.
- Vignes, Michel, Janique Guiramand, Isabelle Sasseti, and Max Recasens. 1992. “Dithiotreitol Specifically Inhibits Metabotropic Responses of Glutamate and Depolarizing Agents in Rat Brain Synaptoneuroosomes.” *Neurochemistry International* 21(2):229–35.
- Vivian, James T. and Patrik R. Callis. 2001. “Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins.” *Biophysical Journal* 80(5):2093–2109.
- Wang, Wei Qing, Ole Nørregaard Jensen, Ian Max Møller, Kim H. Hebelstrup, and Adelina Rogowska-Wrzesinska. 2018. “Evaluation of Sample Preparation Methods for Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Barley Leaves.” *Plant Methods* 14(1):1–13.

- Wiśniewski, Jacek R. and Fabienne Z. Gaugaz. 2015. "Fast and Sensitive Total Protein and Peptide Assays for Proteomic Analysis." *Analytical Chemistry* 87(8):4110–16.
- Wittig, Ilka, Michael Karas, and Hermann Schägger. 2007. "High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-Gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes." *Molecular and Cellular Proteomics* 6(7):1215–25.
- Xia, Minquan, Yinxia Chen, Jing Ma, Xiaoli Yin, Lan Wang, Wenjin Wu, Guangquan Xiong, Weiqing Sun, and Yuanhua Zhou. 2020. "Effects of Low Frequency Magnetic Field on Myoglobin Oxidation Stability." *Food Chemistry* 309:125651.
- Xu, Tao, Kwanuk Lee, Lili Gu, Jeong-Il Kim, and Hunseung Kang. 2013. "Functional Characterization of a Plastid-Specific Ribosomal Protein PSRP2 in Arabidopsis Thaliana under Abiotic Stress Conditions." *Plant Physiology and Biochemistry* 73:405–11.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., P. Luu and T. P. Speed. Normalization for cDNA Microarray Data. SPIE BiOS 2001, San Jose, California, January 2001.
- Zdárská, Markéta, Pavlína Zatloukalová, Mariana Benítez, Ondrej Šedo, David Potěšil, Ondřej Novák, Jana Svačinová, Bedřich Pešek, Jiří Malbeck, Jana Vašíčková, Zbyněk Zdráhal, and Jan Hejátko. 2013. "Proteome Analysis in Arabidopsis Reveals Shoot- and Root-Specific Targets of Cytokinin Action and Differential Regulation of Hormonal Homeostasis." *Plant Physiology* 161(2):918–30.
- Zouni, Athina, Horst Tobias Witt, Jan Kern, Petra Fromme, Norbert Krauss, Wolfram Saenger, and Peter Orth. 2001. "Crystal Structure of Photosystem II from Synechococcus Elongatus at 3.8 Å Resolution." *Nature* 409(6821):739–43.