

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

## **METODY SEPARACE BUNĚČNÝCH ORGANEL**

### **Diplomová práce**

Autor: **Vladimír Skalický**  
Studijní program: N1501 Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: Mgr. Radim Simerský, Ph.D.  
Termín odevzdání práce: 24. 07. 2015

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Vladimír Skalický
Název práce:	Metody separace buněčných organel
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, oddělení biochemie proteinů a proteomiky
Vedoucí práce:	Mgr. Radim Simerský, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	<p>Endoplazmatické retikulum (ER) je tvořeno nitrobuněčnou rozsáhlou sítí membrán. Mezi klasické funkce ER patří proteosyntéza a skládání proteinů, anabolismus lipidů a detoxifikace. Nedávné studie však ukázaly, že ER rostlin je také zapojeno do signalizace fytohormonů, proto stále vzrůstá zájem o studium tohoto kompartmentu. Pro zkoumání všech možných úloh ER je nutné získat jeho čistou frakci. Izolace ER je problematická, protože buněčné endomembrány vykazují podobnou hustotu. Většina purifikačních protokolů využívá hustotní gradientovou ultracentrifugaci. Proto je tato práce zaměřena na optimalizaci ultracentrifugační izolace ER ze suspenzní buněčné kultury <i>A. thaliana</i>. V rámci vývoje metodického postupu byly testovány čtyři způsoby homogenizace rostlinného materiálu. Extrahované organely byly separovány pomocí dvou rozdílných diskontinuálních sacharózových gradientů. Ve snaze získat co nejčistší frakci ER byla také testována schopnost <math>Mg^{2+}</math> iontů vyvolat specifický posun ER v sacharózovém gradientu. Optimalizovaný postup byl následně aplikován při izolaci ER ze semenáčků <i>A. thaliana</i>. V získaných mikrozomálních frakcích byla provedena identifikace proteinů pomocí nLC-MS/MS. Proteiny byly podrobeny GO analýze buněčných komponent, aby bylo ověřeno obohacení frakcí o konkrétní organely. V dalším kroku se předpokládá využití vyvinuté metody ke stanovení nízkomolekulárních látek v ER.</p>
Klíčová slova:	Rostlinná proteomika, endoplazmatické retikulum, ultracentrifugace, sacharózový gradient, subcelulární frakcionace, Western blot, hmotnostní spektrometrie
Počet stran:	
Počet příloh:	67
Jazyk:	český

## Bibliographical identification

Author's first name and Surname: Vladimír Skalický

Title of thesis: Subcellular Fractionation Methods

Type of thesis: Master

Department: Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Protein Biochemistry and Proteomics

Supervisor: Mgr. Radim Simerský, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract: Endoplasmic reticulum (ER) is intracellular extensive network of membranes. Protein biosynthesis and folding, lipid anabolism and detoxification belong among the classical functions of ER. However, several recent studies have shown plant ER involvement in phytohormones signaling. Thus, the interest of plant physiologist in this organelle has considerably risen. To investigate all possible biological roles of ER, it is necessary to get the enriched or, better, pure ER fraction. The separation of ER is troublesome because all cellular endomembranes dispose similar properties. Majority of protocols use density gradient ultracentrifugation despite the suboptimal resolution of this approach. Therefore, this work is aimed at the optimization of ultracentrifugation isolation ER from suspension culture of *A. thaliana*. Four means of tissue homogenization were tested. Extracted organelles were separated by two distinct discontinuous sucrose gradients in efforts to obtain pure ER. On the top of that the ability of Mg<sup>2+</sup> to induce the specific ER shift in sucrose gradient was evaluated. The best procedure was applied to *Arabidopsis* seedlings too. Fractions with the highest purity, verified by immunoblotting, were selected for qualitative protein analysis by LC-MS/MS. The identified proteins were subjected to GO term enrichment. The next step of this ongoing study will be determining low molecular weight compounds in ER.

Keywords: Plant proteomics, endoplasmic reticulum, ultracentrifugation, sucrose gradient, subcellular fractionation, Western blot, mass spectrometry

Number of page:

Number of appendices: 67

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně, pod vedením Mgr. Radima Simerského, Ph.D., s použitím literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci, dne 24. 7. 2015

.....

podpis

Rád bych touto cestou poděkoval především svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Radimovi Simerskému, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení, drahocenné rady, věcné připomínky a trpělivost.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Zuzaně Gelové a Mgr. Davidovi Zalabákovi, Ph.D. za praktickou ukázkou separace organel a sdělení cenných zkušeností.

Mé poděkování patří i kolektivu proteomické skupiny na oddělení biochemie proteinů a proteomiky, jmenovitě Mgr. Ivovi Chamrádovi, Ph.D., Mgr. Janě Uřinové, Ph.D. a Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za praktické rady, odbornou diskuzi a konzultaci výsledků.

V neposlední řadě děkuji Evě Hirnerové za pomoc při výsevu semínek *A. thaliana*.

## Obsah

Obsah .....	6
Seznam zkratk .....	8
1 Cíle práce .....	10
2 Teoretická část .....	11
2.1 Buňka .....	11
2.1.1 Vznik organel .....	11
2.2 Membránové organely .....	12
2.2.1 Plazmatická membrána .....	12
2.2.2 Jádro .....	12
2.2.3 Endoplazmatické retikulum .....	12
2.2.4 Golgiho aparát .....	13
2.2.5 Endozomy a lyzozomy .....	13
2.2.6 Vakuoly .....	14
2.2.7 Peroxizomy .....	14
2.2.8 Mitochondrie .....	14
2.2.9 Chloroplasty .....	15
2.3 Význam endoplazmatického retikula rostlin .....	15
2.3.1 Cytokininové receptory .....	15
2.3.2 Etylenové receptory .....	16
2.3.3 Transportéry auxinů .....	17
2.4 Vybrané metody frakcionace organel a stanovení jejich obohacení .....	17
2.4.1 Homogenizace rostlinné matrice .....	17
2.4.2 Centrifugační metody .....	18
2.4.3 Ověření čistoty frakcí .....	20
2.4.4 Elektroforéza .....	21
2.4.5 Western blot .....	23
2.5 Vybrané instrumentální metody v proteomice .....	24
2.5.1 Kapalinová chromatografie .....	25
2.5.2 Hmotnostní spektrometrie .....	26
3 Experimentální část .....	29
3.1 Příprava rostlinného materiálu .....	29
3.2 Chemikálie .....	29
3.3 Přístrojová technika a vybavení .....	30
3.4 Programy a online databáze: .....	31

3.5	Metody .....	32
3.5.1	Homogenizace a frakcionace organel s horním nanášením. ....	32
3.5.2	Homogenizace a frakcionace organel se spodním nanášením .....	34
3.5.3	Purifikace ER .....	35
3.5.4	Frakcionace organel z <i>A. thaliana</i> Col-0 pomocí spodního nanášení .....	36
3.5.5	Tvorba sacharózového gradientu .....	36
3.5.6	SDS-PAGE a WB .....	36
3.5.7	Vyhodnocení Western blotu.....	38
3.5.8	Štěpení v roztoku.....	38
3.5.9	SCX frakcionace peptidů .....	39
3.5.10	Odsolení peptidů na C18 koloně .....	40
3.5.11	MS analýza.....	41
3.5.12	Zpracování dat.....	42
4	Výsledky a diskuze .....	43
4.1	Subcelulární frakcionace <i>A. thaliana</i> Ler pomocí sacharózového gradientu s horním nanášením mikrozomální frakce .....	43
4.2	Subcelulární frakcionace <i>A. thaliana</i> Ler pomocí sacharózového gradientu se spodním nanášením extraktu.....	45
4.3.1	Odstranění vakuol pomocí Ficollového gradientu .....	47
4.3.2	Změna hustoty endoplazmatického retikula.....	49
4.4	Frakcionace organel semenáčků <i>A. thaliana</i> Col-0.....	50
4.5	Hmotnostní analýza a vyhodnocení obohacení frakcí.....	52
4.5.1	Zastoupení markerů ve frakcích.....	54
4.6	Gene-ontology analýza.....	55
4.6.1	Porovnání frakcí gradientu z <i>A. thaliana</i> Ler s absencí Mg <sup>2+</sup> iontů.....	56
4.6.2	Porovnání frakcí gradientu z <i>A. thaliana</i> Col-0 s absencí Mg <sup>2+</sup> iontů .....	57
4.6.3	Posun ER v závislosti na přítomnosti či absenci Mg <sup>2+</sup> iontů .....	58
5	Závěr .....	60
6	Seznam použité literatury.....	62

## Seznam zkratk

Ab	protilátka
ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
AmAc	octan amonný
Col-0	přirozený fenotyp ekotypu Columbia
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EH	Elvehjemův homogenizér
ELFO	elektroforéza
EM	elektronová mikroskopie
ER	endoplazmatické retikulum
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
GA	Golgiho aparát
GO	gene-ontology
IAM	jodacetamid
iPrOH	izopropanol
LC	kapalinová chromatografie
<i>Ler</i>	ekotyp Landsberg Erecta
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MeOH	metanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mzXML	extensible markup language



nLC	nanokapilární kapalinová chromatografie
pAA	polyakrylamidový
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
Q	kvadrupólový analyzátor
QqQ	trojitý kvadrupól
Rcf	relativní centrifugační síla
Roche inh.	Roche inhibitor cocktail cOmplete, EDTA free
Rpm	počet otáček za minutu
SCX	iontově výměnná chromatografie na silném katexu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TBS	tris solný pufr
TBS-T	tris solný pufr s obsahem Tweenu-20
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEAB	bikarbonát triethylamonný
TEMED	tetrametyletylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TM	třecí miska
TOF	hmotnostní analyzátor doby letu
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
WB	Western blot

## 1 Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši na téma ultracentrifugace a separace buněčných kompartmentů.
- Seznámit se s přístupy separace organel.
- Optimalizovat metodu homogenizace a extrakce organel z rostlinného materiálu.
- Optimalizovat postup separace endoplazmatického retikula ze suspenzní buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Landsberg erecta (*Ler*).

## 2 Teoretická část

### 2.1 Buňka

Buňka je považována za nejmenší samostatnou funkční jednotku živých soustav. Podílí se na stavbě těl mnohobuněčných organismů, ale existuje i početná skupina jednobuněčných zástupců. To dokazují bakterie, které jsou nejrozšířenější a nejpočetnější taxonomickou doménou.

Bakterie jsou tvořeny prokaryotickými buňkami o průměrné velikosti 1–10  $\mu\text{m}$ . Výrazně se liší od buněk eukaryotických, které v průměru dosahují 10–100  $\mu\text{m}$  (Campbell NA and Reece JB, 2006). Zásadním rozdílem je kompartmentace vnitřního prostoru buňky, kterou v prokaryotech nelze najít. Jediný membránový útvar prokaryot je cytoplazmatická membrána, žádným obalem není chráněna ani genetická informace.

U eukaryotických buněk došlo během procesu evoluce ke značné diferenciaci. Důsledkem byl vznik membránových oddílů, které oddělují enzymatické pochody, závislé na specifických podmínkách jako je pH a iontové složení. Vytvořením kompartmentů bylo zajištěno vhodné mikroprostředí pro konkrétní metabolické funkce. Vnitřní prostor byl tedy rozdělen do jednotlivých oddílů čili organel pomocí fosfolipidových membrán. Navíc došlo k zvětšení poměru povrchu membrán k objemu buňky (Alberts B et al., 2006).

Eukaryotické buňky se dělí na rostlinné a živočišné. Některé organely jsou pro všechna eukaryota společné. Patří sem jádro, plazmatická membrána, cytosol, Golgiho aparát (GA), endoplazmatické retikulum (ER), ribozomy, mitochondrie a peroxozomy. Každý typ buňky však disponuje specifickými oddíly. U rostlinné buňky to jsou např. vakuoly a chloroplasty. Naproti tomu pouze v živočišné buňce se vyskytují lyzozomy a centrioly tvořící centrosom.

#### 2.1.1 Vznik organel

Vnitřní uspořádání eukaryotických buněk se vyvíjelo různými cestami. Existují dvě základní teorie vzniku organel.

Podle první z nich došlo k vchlípení obklopující plazmatické membrány do vnitřního prostředí buňky a následnému odškrcení. Tento mechanismus vzniku organel je přisuzován jaderné membráně, ER, GA, endozomům a lyzozomům. Tyto organely tvoří systém endomembrán, který mezi sebou značně komunikuje pomocí uvolňování a fúzí malých váčků zvaných vezikuly (Alberts B et al., 2006).

Za druhou teorii vzniku organel je považována endosymbióza, kdy pravděpodobně došlo k pohlcení prokaryota jednoduchým eukaryotem. Takto zřejmě vznikly mitochondrie a chloroplasty. Existuje několik důkazů, které potvrzují tuto teorii. Výše zmíněné organely obsahují část vlastní genetické informace podobné prokaryotické DNA. Mitochondrie a chloroplasty

obklopují dvě vrstvy membrán. Dále nejsou zapojeny do systému bohaté vezikulární komunikace (Alberts B et al., 2006).

## **2.2 Membránové organely**

Jak bylo řečeno výše, eukaryotická buňka je rozdělena do jednotlivých kompartmentů, které zastávají specifické funkce. Všechny organely jsou od sebe odděleny minimálně jednou membránou tvořenou fosfolipidovou dvouvrstvou s integrovanými proteiny.

### **2.2.1 Plazmatická membrána**

Plazmatická membrána ohraničuje celou buňku a tvoří semipermeabilní bariéru. Volně jí prochází pouze malé nenabitě molekuly nebo nepolární látky. To umožňuje buňce selektivně regulovat vnitřní obsah nízkomolekulárních látek, makromolekul a iontů pomocí kanálů či přenašečů vnořených do membrány. Plazmatická membrána se také účastní výměny látek pomocí endo- a exocytózy. Další významnou vlastností je přítomnost proteinových receptorů, které zprostředkovávají příjem signálů z okolí (Taiz L and Zeiger E, 2010).

### **2.2.2 Jádro**

Ústřední organelou buňky je jádro, které uchovává to nejcennější – genetickou informaci. Obalují ho dvě vrstvy membrány. Pod vnitřní membránou se vyskytuje síť jemných proteinových vláken tvořící jadernou laminu, jež způsobuje pevnost organely.

Jádro zastává dvě hlavní funkce, replikaci DNA před dělením a syntézu RNA produktů, které následně ovlivňují další biologické procesy v buňce.

Komunikace jádra s okolím probíhá pomocí jaderných pórů v obalu. Jedná se o proteinový komplex, který je schopný transportovat biomolekuly v obou směrech. Většinou do nitra putují proteiny, kdežto z jádra vystupuje převážně RNA (Alberts B et al., 2006).

### **2.2.3 Endoplazmatické retikulum**

ER navazuje na vnější membránu jádra (Taiz L and Zeiger E, 2010). Jedná se o spletité membránový labyrint tvořený komplexem váčků a trubic nazývaných cisterny. Morfologicky i funkčně se ER dělí na hladké a drsné, které dostalo svůj název díky výskytu ribozomů. Společnou úlohou obou typů ER je syntéza rozličných druhů lipidů (fosfolipidy, tuky, steroidy).

Drsné retikulum má na vnější straně své membrány přisedlé ribozomy, jež zprostředkovávají proteosyntézu. Ve vodě rozpustné proteiny se exprimují do lumen ER, nerozpustné bílkoviny se zabudovávají přímo do membrány. S tímto dějem souvisí i řízení správného skládání proteinů, jež probíhá bezprostředně po expresi. Syntetizované proteiny, které nejsou adresovány do ER, se odštěpují ve vezikulech a putují do GA.

Hladké ER zastává různé funkce v závislosti na charakteru tkáně. Především se jedná o různé metabolické pochody, jež se odvíjejí od enzymatické výbavy tohoto kompartmentu. Např. v jaterních buňkách se vyskytuje zvýšené množství enzymů zpracovávajících polysacharidy nebo metabolizujících léčiva. V buňkách varlat a vaječníků dochází k syntéze pohlavních hormonů. Ve svalových buňkách slouží hladké ER jako úložiště vápenatých iontů, které jsou po stimulu uvolněny, což způsobí svalový stah (Campbell NA and Reece JB, 2006). V rostlinách ER zprostředkovává např. komunikaci a transport nízkomolekulárních látek mezi sousedícími buňkami skrz plazmodezmata, což jsou póry v buněčné stěně (Grabski S et al., 1993).

#### **2.2.4 Golgiho aparát**

GA je endomembránový útvar navazující na ER. Jedná se o soubor na sebe nasedajících cisteren s rozlišenou polaritou, avšak oproti ER cisterny nejsou mezi sebou propojeny. Část blíže ER se označuje jako *cis* a zde fúzí váčky přicházející z retikula. Strana orientovaná k plazmatické membráně se nazývá *trans* a odštěpuje vezikuly směřované do dalších kompartmentů.

Tato organela je centrem posttranslačních úprav proteinů, třídění produktů ER, jejich skladování a distribuce v rámci buňky. Dále zde vznikají nové produkty pektiny a nitrocelulózoové polysacharidy, které jsou transportovány k buněčné stěně rostlinných buněk, kam jsou zabudovávány (Campbell NA and Reece JB, 2006).

#### **2.2.5 Endozomy a lyzozomy**

Endozomy vznikají fúzí drobných váček odloučených z plazmatické membrány. Většinou obsahují extracelulární materiál. V endozomu se nachází kyselé prostředí udržované pomocí vodíkových pump, které čerpají protony vodíku do nitra organely. Dále v nich probíhá třídění pohlceného materiálu, který směřuje dále do buňky. Některé endozomy putují zpět k plazmatické membráně, jiné do lyzozomů (Alberts B et al., 2006).

Pouze v živočišných buňkách vznikají lyzozomy odštěpující se z *trans* GA. Obsahují hydrolytické enzymy, které zprostředkovávají nitrobuněčné trávení. Tyto enzymy jsou také závislé na kyselém prostředí vytvořeném vodíkovými pumpami. Nerozkládají pouze extracelulární materiál, ale i vlastní opotřebované organely, které jsou zabaleny do tzv. autofagozomu. V membráně lyzozomu jsou zanořeny i unikátní transportní proteiny

přenášející základní stavební kameny anabolismu, jako jsou aminokyseliny, cukry a nukleotidy, do cytosolu. Další specifikou tohoto oddílu jsou značně glykosilované lytické proteiny. Tento typ modifikace chrání enzymy před účinkem přítomných proteas (Alberts B et al., 2006).

### **2.2.6 Vakuoly**

Obdobou lyzozomů v rostlinných buňkách je vakuola. Její membrána se nazývá tonoplast. Vakuola u plně diferenciovaných buněk vyplňuje 80–90 % vnitrobuněčného prostoru (Taiz L and Zeiger E, 2010). Je to univerzální kompartment, který může skladovat proteiny, organické i anorganické látky, zejména sodík a draslík, jsou zde ukládány pigmenty, ale i toxické metabolity chránící rostlinu před predátory. Významnou rolí vakuoly je udržování turgoru, čili tlaku tonoplastu na buněčnou stěnu (Campbell NA and Reece JB, 2006).

### **2.2.7 Peroxozomy**

Peroxozomy jsou kulovité váčky ohraničené jednoduchou membránou. Obsahují specifický enzymatický aparát, který je schopný vyvíjet peroxid vodíku (odtud název peroxozom). Ten může být následně využit k oxidaci mastných kyselin nebo k rozkladu pro buňku toxických látek. Jelikož je peroxid vodíku vysoce reaktivní, obsahuje organela také enzymy, které peroxid redukuje na vodu, např. katalasy a dismutasy (Alberts B et al., 2006).

### **2.2.8 Mitochondrie**

Tato organela je společná pro všechna eukaryota. Jedná se o dvoumembránový útvar, jehož membrány se výrazně liší proteinovým zastoupením. Dalším rozdílem je zvrásnění vnitřní membrány z důvodu zvětšení povrchu. Záhyby se nazývají kristy. Mitochondrie obsahuje dva oddíly – mezimembránový prostor a mitochondriální matrix. V matrix je soustředěn enzymatický aparát Krebsova cyklu. Vzniklé produkty jsou dále využity proteinovými komplexy lokalizovanými na vnitřní membráně, jejichž hlavním produktem je adenosintrifosfát (ATP). Ten obsahuje makroergní vazby, a proto slouží jako univerzální zdroj energie. Počet mitochondrií v buňce odpovídá míře její metabolické aktivity (Alberts B et al., 2006).

### 2.2.9 Chloroplasty

Chloroplasty jsou dominantou fotosyntetizujících rostlinných buněk. Jsou složeny ze dvou membrán podobně jako mitochondrie. Interní systém membrány se nazývá tylakoid a odděluje vnitřní prostředí chloroplastu – stroma od lumen tylakoidu. Na vnitřní membráně jsou umístěny proteinové komplexy, které jsou schopné pomocí světelné energie syntetizovat ATP. To je dále využito k syntéze organických látek. Odlišností od ostatních organel je vysoký obsah barviv, především chlorofylu, který absorbuje světelnou energii využívanou při fotosyntéze (Taiz L and Zeiger E, 2010).

## 2.3 Význam endoplazmatického retikula rostlin

Nedávné výzkumy ukázaly, že ER rostlin plní i jiné úlohy než ty, které jsou uvedené v kapitole 2.2.3. Některé receptory fytohormonů a jejich přenašeče byly lokalizovány na membráně retikula. Z toho vyplývá, že ER zasahuje do signalizace a distribuce fytohormonů v buňce. Tyto informace napomohly pochopit doposud nejasné uspořádání signálních drah rostlinných hormonů cytokininů, auxinů a etylenu. Z toho důvodu vzrostl zájem o zkoumání tohoto kompartmentu.

Pro studium nových nebo neobjasněných úloh ER je ideální tento buněčný oddíl izolovat od ostatních organel. Následně lze identifikovat proteiny obsažené v tomto kompartmentu. Z funkcí bílkovin vyskytujících se v ER může být vyvozen význam této organely pro buňku. Další možností je stanovení obsahu nízkomolekulárních látek, jako jsou signální molekuly regulující buněčné procesy.

### 2.3.1 Cytokininové receptory

ER se účastní percepce cytokininového signálu, neboť v jeho membráně jsou ukotveny cytokininové receptory AHK2 a AHK3. Původní domněnka byla, že tyto receptory jsou lokalizovány na cytoplazmatické membráně (Inoue T et al., 2001; Kim HJ et al., 2006).

Z experimentů Georga Romanova vyplynulo, že pro vazbu *trans*-zeatinu do cytokininového receptoru AHK3 v modelové rostlině *A. thaliana* je ideální mírně zásadité prostředí. Bylo zjištěno, že ligand vykazoval nejvyšší afinitu k AHK3 při pH 8,5 (Romanov GA et al., 2006). Extracelulární prostor je charakteristický kyselějším pH (Li J et al., 2005), naproti tomu ER typicky disponuje neutrálním až mírně zásaditým prostředím (Kim JH et al., 1998; Lomin SN et al., 2012). Tato skutečnost vedla k domněnce, že se zmíněné cytokininové receptory pravděpodobně nebudou vyskytovat na plazmatické membráně. Proto studie zabývající se stanovením subcelulární lokalizace těchto receptorů pokračovaly.

Výsledky experimentů Klaase Wulfetangeho a kolektivu na *A. thaliana* potvrdily názor, že většina cytokininových receptorů se nachází v systému endomembrán. Tento závěr byl vyvozen z výsledků cytotokinin-vazebných testů na frakcích obohacených o cytoplazmatickou membránu, nebo systému endomembrán, získaných pomocí metody dvoufázového dělení (Wulfetange K et al., 2011), (princip dvoufázového dělení popsán v kapitole 2.4.2).

Mikrozomální frakce byla podrobena separaci v kontinuálním sacharózovém gradientu pro stanovení přesné lokalizace receptorů. V tomto kroku došlo k rozdělení organel, které byly detekovány pomocí Western blotu (WB). Bylo zjištěno, že signál protilátek (Ab) namířeným proti receptorům AHK2, AHK3 a markeru ER odpovídá stejným frakcím. Nezávislé ověření lokalizace receptorů AHK3 na membráně ER bylo provedeno díky fluorescenční mikroskopii (Wulfetange K et al., 2011). Obdobných výsledků bylo dosaženo při frakcionaci organel z protoplastů odvozených z listů rostliny *Zea mays*, přičemž cytokininový receptor ZmHK1 kolokalizoval s ER (Lomin SN et al., 2011).

Z tohoto modelu se vymyká CRE1/AHK4. Největší afinita *trans*-zeatinu byla taktéž prokázána v prostředí mírně zásaditého pH. Síla vazby však klesala pozvolněji při snižujícím se pH oproti afinitě ligandu s AHK3. Navíc bylo pozorováno lokální maximum síly vazby na receptor CRE1/AHK4 mezi hodnotami pH 6-7 (Romanov GA et al., 2006). Z toho vyplývá, že cytokininový receptor CRE1/AHK4 je schopný vázat ligand při nižších hodnotách pH. To nasvědčuje možnosti výskytu tohoto proteinu i v plazmatické membráně. Tuto domněnku potvrzuje i zjištění, že plazmatická membrána izolovaná z mutantních rostlin *A. thaliana* s inaktivovanými geny pro AHK2 a AHK3 vykazuje vyšší vazebnou specifitu ke značenému ligandu než systém endomembrán (Wulfetange K et al., 2011).

### 2.3.2 Etylenové receptory

Dalším receptorem lokalizovaným na membráně ER *A. thaliana* je receptor ETR1 pro plyný hormon etylen. K tomuto závěru dospěl tým Yi-Fenga Chena obdobným způsobem, jako předcházející skupiny, tedy pomocí frakcionace buněčných kompartmentů v sacharózovém gradientu s následnou imunodetekcí (Chen Y-F et al., 2002).

Do stejné proteinové rodiny jako ETR1 patří i další čtyři receptory pro etylen (ERS1, ETR2, ERS2, EIN4). Lokalizace všech pěti receptorů etylenu byla určena pracovní skupinou Christophera Grefena, za použití fúzního receptoru se zeleným nebo červeným fluorescenčním proteinem, který byl detekován fluorescenční mikroskopií. Jejich výsledky dokazují, že všechny doposud objevené etylenové receptory *A. thaliana* jsou zakotveny v membráně ER (Grefen C et al., 2008).



### 2.3.3 Transportéry auxinů

Signalizační dráha fytohormonů auxinů stále není objasněna. Bylo zjištěno, že v rostlině je tvořen auxinový gradient pomocí polárního transportu a jejich lokální biosyntézy. Transport auxinů zastává důležitou roli ve většině procesů řízených těmito fytohormony. Odlišné koncentrace auxinů v pletivu jsou regulovány proteinovými transportéry AUX/LAX zajišťujícími vstup auxinů do buňky (Carrier DJ et al., 2008). PIN proteiny pracují antagonisticky a zprostředkovávají výstup auxinů z buňky do apoplastu (Petrasek J et al., 2006). Bylo však zjištěno, že PIN5, jeden z členů rodiny PIN proteinů, nehraje přímou roli v transportu auxinů mezi buňkami. *A. thaliana* PIN5 transportér je totiž lokalizován na ER a zprostředkovává významnou funkci v udržování homeostázy a řízení metabolismu auxinů v rámci buňky (Mravec J et al., 2009). Rostliny *A. thaliana* s defektním genem pro PIN5 protein vykazovaly vyšší obsah konjugátů kyseliny indolactové. Oproti tomu se v rostlině s funkčním transportérem vyskytovalo více volné (aktivnější) formy tohoto auxinu (Mravec J et al., 2009). Lokalizace na ER byla následně potvrzena pomocí fúze PIN5 s fluorescenčním proteinem.

Dalším auxinovým transportérem vyskytujícím se na membráně ER je PIN8. Tento protein je však exprimován převážně v pylových zrnech a pylové láčce *A. thaliana* (Bosco CD et al., 2012; Ding Z et al., 2012). PIN8 je zapojen do vývoje samčího gametofytu. Díky následujícím experimentům pracovní skupiny Zhaojuna Dinga bylo zjištěno, že PIN5 a PIN8 pracují antagonisticky, a tak regulují homeostázu auxinů v buňce pylového zrna.

## 2.4 Vybrané metody frakcionace organel a stanovení jejich obohacení

### 2.4.1 Homogenizace rostlinné matrice

Homogenizace zkoumaného biologického materiálu je většinou klíčovým krokem extrakce, tedy uvolnění buněčných kompartmentů a dalších složek matrice, např. proteinů. Míra narušení tkáně ovlivňuje konečný výtěžek proteinů. Totéž platí i u subcelulární frakcionace, avšak zde je důležité brát ohled na zachování intaktnosti organel, která je nezbytná pro správný průběh separace v hustotním gradientu.

Mezi konvenční metody patří rozdrcení materiálu ve třecí misce (TM) za použití tekutého dusíku. Využívá se např. při izolaci jader (Safar J et al., 2004; Zhang H-B et al., 1995), jelikož jádro je robustní organela. Zmražení materiálu není vhodné pro frakcionaci zbylých organel, jak prokázala skupina Yanpinga Songa srovnáním výsledků frakcionace buněčných oddílů ze zmražených a čerstvých myších jater (Song Y et al., 2006). Při velmi nízkých teplotách pravděpodobně dochází k rozrušení membránových systémů, což znemožňuje následnou separaci.

Dalším hojně využívaným nástrojem k homogenizaci rostlinného materiálu je břitový mixér, který je využíván taktéž v protokolech na izolaci jader (Petrovska B et al., 2014;

Zhang H-B et al., 1995). Pomocí těchto dvou metod lze dosáhnout značné míry desintegrace homogenizovaného materiálu.

V závislosti na charakteru rostlinného materiálu je nutné zvolit šetrný, ale na druhou stranu dostatečně efektivní způsob homogenizace. Pro velké rostlinné orgány např. listy je s oblibou využívána žiletka, pomocí které je materiál nakrájen na malé kousky. Žiletku bohužel nelze využít k homogenizaci buněčné kultury, protoplastů, či jiných drobných rostlinných útvarů, např. kořenových špiček. Jednou z možností je využití již zmíněné TM pouze s extrakčním pufrem, čehož bylo využito při izolaci ER z šestidenních semenáčků *A. thaliana* (Wulfetange K et al., 2011).

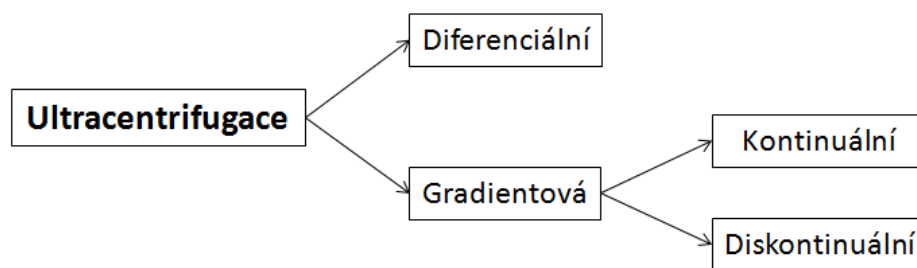
Další způsob homogenizace je použití homogenizéru skládajícího se ze zkumavky a těsně doléhajícího pístu. Příkladem může být Dounceho nebo Elvehjemův homogenizér (EH). Zmíněné homogenizéry byly využity např. při izolaci GA z protoplastů *A. thaliana* (Parsons HT et al., 2012) nebo separaci vakuol z červené řasy *Cyanidioschyzon merolae* (Yagisawa F et al., 2009).

#### 2.4.2 Centrifugační metody

Centrifugace je metoda sloužící k oddělení pevných látek od roztoku, přičemž je na zkumavku se suspenzí vyvinuta odstředivá síla. Částice sedimentující na dno tvoří pelet, kapalina nad peletem se nazývá supernatant. Centrifugací lze oddělit i dva nemísitelné roztoky o odlišné hustotě. Dle dosažené frekvence otáček lze centrifugy rozdělit na nízkoobrátkové, středněobrátkové až vysokoobrátkové.

Odstředivá síla závisí na poloměru, tj. vzdálenosti mezi osou otáčení a dnem zkumavky a úhlovou rychlostí, která je definovaná frekvencí otáček. V praxi se využívají dvě veličiny charakterizující odstředivou sílu. Je to počet otáček za minutu (rpm) a relativní centrifugační síla (rcf), která se vyjadřuje i jako násobek tíhového zrychlení (např.  $1000 \times g$ ). Rychlost sedimentace částic je přímo úměrná centrifugační síle, rozdílu hustoty částice a prostředí, ve kterém se nachází. Rychlost nepřímo úměrně ovlivňuje třecí síla. Dále na sedimentaci působí faktory charakterizující částici jako je tvar a velikost částice.

Centrifugační techniky lze využít mimo jiné pro rozdělení subcelulárních kompartmentů. Mezi hlavní přístupy se řadí diferenciální a gradientová centrifugace (Obr. 1), (Lee YH et al., 2010). Za průkopnickou je v této oblasti považována práce skupiny Christiana De Duvea z roku 1955, ve které byla metoda diferenciální centrifugace použita k separaci organel z krysí jaterní tkáně (De Duve C et al., 1955).



Obr. 1 Schéma rozdělení různých přístupů frakcionace organel pomocí ultracentrifugace

Diferenciální (též frakční) centrifugace je charakteristická souslednými kroky, v nichž dochází k postupnému zvyšování odstředivé síly a prodlužování centrifugačního času, přičemž se separované látky nacházejí stále ve stejném roztoku. Vždy před dalším stáčením dochází k odebrání supernatantu, který je následně centrifugován. V závislosti na velikosti centrifugační síly sedimentují typické organely či buněčné části. První frakce získaná za nízkých otáček 1000–7000 rcf obsahuje nejtěžší částice, zejména neporušené buňky, jejich zbytky a jádra. V následujícím kroku je supernatant stočen při 15000–20000 rcf. Pelet obsahuje těžší organely, jako jsou mitochondrie, chloroplasty, lyzozomy, peroxozomy. V supernatantu se stále vyskytují membránové vezikuly, ER a GA, které lze sedimentovat ultracentrifugací při centrifugační síle větší než 100000 rcf (Vertommen A et al., 2011).

Frakční centrifugace je limitována nízkým rozlišením, protože jednotlivé frakce neobsahují konkrétní organelu, ale nejčastěji jejich směs (Lee YH et al., 2010). Tento přístup bývá použit jako předstupeň samotné frakcionace buněčných kompartmentů pomocí hustotního gradientu.

Hustotní gradientová ultracentrifugace využívá k separaci buněčných oddílů prostředí se zvyšující se hustotou. Organely jsou unášeny odstředivou silou. Jakmile se dostanou do isopiknického bodu, čili místa, kdy se jejich hustota rovná hustotě okolí, přestanou se v gradientu pohybovat. Kompartmenty jsou tak rozděleny na základě jejich odlišné velikosti, tvaru a především denzity. Ta je dána poměrem lipidů a proteinů v dané organelle (de Araujo ME et al., 2008), přičemž proteiny zvyšují hustotu kompartmentu (Lee YH et al., 2010).

Podle charakteru cílové organely, kterou chceme separovat, lze zvolit i látku tvořící gradient. Pro izolaci ER a GA se nejčastěji používá sacharóza. Koncentrace roztoku sacharózy se pohybuje v rozmezí 5 – 50 % (Ding Z et al., 2012; Wulfetange K et al., 2011). Další možností je využití polymerů jako jsou Percoll k separaci mitochondrií a plastidů (Vertommen A et al., 2011), Ficoll pro vakuoly (Robert S et al., 2007) nebo Dextranu, polyetylen glykolu (PEG), (Hodges TK and Mills D, 1986; Chen Y-F et al., 2002; Wulfetange K et al., 2011) a iodixanolu (Nishida K et al., 2005; Yagisawa F et al., 2009).

V praxi je využíván kontinuální nebo diskontinuální hustotní gradient (Obr. 1). V první variantě se hustota roztoku zvyšuje rovnoměrně. Daný typ organely, např. ER se pak může

vyskytovat v širším pásu gradientu. Gradient je následně celý rozebrán na frakce o definovaném objemu.

V druhém případě jsou na sebe nanášeny jednotlivé roztoky s rostoucí hustotou, která se musí dostatečně lišit, aby nedošlo k jejich promíchání. Po ultracentrifugaci jsou organely zachyceny na rozhraní dvou různě hustých prostředí. Obohacené frakce jsou odebrány pouze z oblasti mezi patry gradientu.

Odlišnou technikou frakcionace je metoda dvoufázového dělení. Princip metody je založen na separaci organel s odlišným nábojem na povrchu membrán (Hodges TK and Mills D, 1986). Je zde využito systému dvou chemicky odlišných nemísitelných polymerů (Yoshida S et al., 1983). Zpravidla je využíván Dextran a PEG, přičemž mikrozomální frakce je smíchána se zmíněnými polymery. Následuje centrifugace, při které dojde k vytvoření dvou fází. V horní části je oddělen roztok PEG s obohacenou plazmatickou membránou. Dole je separován dextran obsahující zbylé endomembrány (Wulfetange K et al., 2012). Pro dosažení vyšší čistoty frakcí je nutné jednotlivé části repurifikovat obdobným způsobem (Hodges TK and Mills D, 1986).

### 2.4.3 Ověření čistoty frakcí

Žádná z doposud popsaných separačních technik není schopná organely stoprocentně rozdělit, a proto je nutné ověřit čistotu získaných frakcí gradientu a určit kontaminanty. V praxi se využívá několik přístupů jako je WB, testy enzymatické aktivity, fluorescenční mikroskopie nebo elektronová mikroskopie (EM).

V dnešní době je nejrozšířenější metodou stanovení čistoty frakcí elektroforéza (ELFO) s následnou imunodetekcí. Jejich princip je podrobně popsán v kapitolách 2.4.4 a 2.4.5. Zde je důležité zmínit tzv. markerové proteiny, které reprezentují přítomnost buněčného oddílu v dané frakci. Výběr markerů je kritický, neboť je odhadováno, že více jak 35 % proteinů vykazuje dvojí, nebo dokonce i vícenásobnou lokalizaci v rámci buňky (Zhang S et al., 2008). Je nutné, aby organelový marker měl unikátní umístění, a tudíž byl specifický pro jednu konkrétní organelu.

Použitím více různých Ab namířených proti markerům jednotlivých organel lze určit čistotu frakce a míru obohacení o daný kompartment. Pomocí WB lze vhodnou kombinací Ab zjistit i intaktnost organely. Příkladem může být ověření celistvosti mitochondrie, kdy byly použity Ab proti markeru vnější a vnitřní membrány a i mezimembránového prostoru, přičemž signál byl detekován ve stejných frakcích (Song Y et al., 2006).

Buňka je rozdělena do kompartmentů z důvodu závislosti různorodých enzymatických procesů na konkrétním prostředí. Jednotlivé oddíly disponují odlišným souborem enzymů. Některé z nich jsou pro danou organelu charakteristické. Měřením enzymatické aktivity markerových enzymů lze taktéž stanovit čistotu frakcí. Pozitivní výsledek však nemusí znamenat,

že je organela intaktní (Lee YH et al., 2010). Pro potvrzení je nutné provést jiný nezávislý test, např. morfológickou analýzu nebo otestovat ostatní enzymové markery.

S vývojem aplikací EM se otevírají nové možnosti validace čistoty a integrity obohaceného kompartmentu. EM poskytuje přímou morfológickou charakterizaci buněčných kompartmentů při velkém zvětšení a rozlišení přibližně 1 nm. EM lze uplatnit i při určování lokalizace konkrétního proteinu. K tomu je však zapotřebí Ab značená částicí zlata. Často kritizovanými nevýhodami jsou vysoká pořizovací cena mikroskopu a časově náročná příprava vzorku (Lee YH et al., 2010).

#### **2.4.4 Elektroforéza**

ELFO je skupina separačních metod využívajících elektrické pole k rozdělení především biomakromolekul, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny, peptidy. Existují i aplikace využívané k separaci nízkomolekulárních látek (např. izotachoforéza, kapilární elektroforéza). Proto má tato technika široké využití v proteomice, molekulární biologii, farmakologii, forenzní, klinické i veterinární medicíně a kontrole kvality potravin (Westermeier R, 2001). Metodu lze využít k analytickým aplikacím jako je kontrola čistoty a kvality nebo analýza komplexních směsí. Švédský chemik Arne Tiselius dostal v roce 1948 Nobelovu cenu za separaci bílkovin krevního séra pomocí elektroforézy a je považován za vynálezce této metody ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1948/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/)).

Princip ELFO bude popsán na příkladu proteinů. Jedná se o rozdělení různě nabitých makromolekul, jejichž mobilita se liší v elektrickém poli. Bílkoviny jsou amfoterní sloučeniny, které mění svůj náboj v závislosti na pH. Proteiny jsou negativně nabitě, je-li pH okolí vyšší než hodnota jejich izoelektrického bodu. Podle celkového náboje makromolekuly se mění i velikost síly, kterou je bílkovina přitahována k elektrodě. Proces může probíhat volně v kapalině, v pevném nosiči (většinou v gelu), na tenké vrstvě, filmu nebo v kapiláře (Westermeier R, 2001).

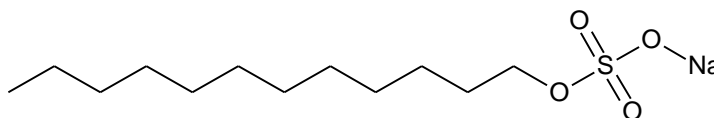
Jedním ze separačních mechanismů může být průchod proteinů přes pórovitý nosič, ve kterém se větší molekuly pohybují pomaleji oproti menším. V dnešní době se využívá polyakrylamidových (pAA) a agarózových gelů, protože jsou inertní a stabilní. Obsah polymerující složky určuje velikost pórů, kterými musí proteiny projít, tudíž si lze zvolit optimální podmínky separace pro konkrétní typ vzorku. K rozdělení proteinové směsi se využívají plošné vertikální pAA gely. Agarózové gely mají velké póry (10 nm v průměru) a většinou se používají k separaci dlouhých řetězců nukleových kyselin (Westermeier R, 2001).

Jednou z nejpoužívanějších elektroforetických metod užívaných k separaci proteinů je ELFO v pAA gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). V tomto uspořádání jsou použity dva gely o různé koncentraci polyakrylamidu a pH, a proto se jedná o diskontinuální variantu ELFO.

Zaostřovací gel o pH 6,8 a s nízkým obsahem polyakrylamidu (cca 4 %) disponuje velkými póry. Slouží ke snadnému proniknutí proteinů do gelu. Navíc zde dochází k jevu zvanému izotachofóreza, přičemž jsou proteiny zaostřeny do úzké linie mezi vedoucí chloridový anion a koncový nenabitý iont glycinu ve formě zwitteriontu.

Dělicí gel obvykle obsahuje 10 – 15 % polyakrylamidu a tudíž je charakterizován malými póry. pH gelu je 8,8, čímž glycin získá záporný náboj a přestane tvořit terminující iont. Tím je zahájena samotná separace směsi proteinů na základě elektroforetické mobility. Proteiny jsou separované v denaturovaném stavu způsobeným mimo jiné přítomností dodecylsírany sodného (SDS). Jedná se o amfifilní sloučeninu (Obr. 2), která působí jako detergent. SDS snižuje povrchové napětí proteinů, což vede k jejich denaturaci. Zároveň je schopný obalit bílkoviny do micely s negativním nábojem. Ty se pak dělí pouze na základě molekulové velikosti (Westermeier R, 2001). Mezi výhody SDS-PAGE patří:

1. SDS napomáhá denaturaci bílkovin.
2. SDS je záporně nabitý, a proto zvyšuje elektroforetickou mobilitu proteinů.
3. Metoda poskytuje vysoké rozlišení.
4. Proužky proteinů lze snadno zafixovat.
5. Separace probíhá pouze na základě molekulové velikosti.
6. Proteiny obalené SDS snadněji vážou barvivo při vizualizaci.
7. Po přenosu proteinů na imobilizační membránu je SDS vyloučeno do roztoku.



Obr. 2 Vzorec SDS. Molekulu tvoří alifatický hydrofobní řetězec, který interaguje s hydrofobními skupinami proteinu. Je zakončený nabitou „hlavičkou“ tvořenou sulfátovou skupinou. Ve vodném roztoku dojde k disociaci sodíku, přičemž molekula získává negativní náboj.

Nedílnou součástí ELFO je pufrovací systém, ve kterém proces probíhá. Používá se pufr o definovaném pH a konkrétní iontové síle. Ionty obsažené v pufrovací roztoku také migrují gelem k opačně nabitě elektrodě během procesu separace. Proto iontová síla pufru nemůže být příliš velká, aby elektrické pole působilo především na nabité proteiny. Složením roztoku pufru lze modifikovat mobilitu separovaných molekul. Pro separaci se obvykle využívá systému Tris-HCL/Glycin (Westermeier R, 2001).

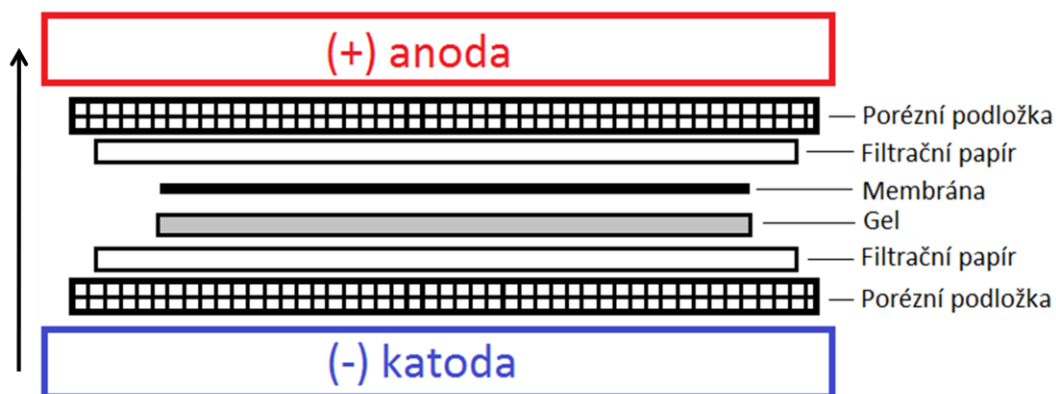
Proteiny separované v gelu lze následně vizualizovat např. barvivem Coomassie Brilliant Blue, které má sice nižší citlivost než barvení stříbrem, ale je kompatibilní s hmotnostní spektrometrií, jakožto analytickou koncovkou. Další možností je provést analýzu pomocí WB.

## 2.4.5 Western blot

WB, též imunoblot je specifická detekce proteinů imobilizovaných na membráně. Imunodetekce obvykle navazuje na SDS-PAGE. WB byl odvozen ze Southern blotu. Tato metoda byla poprvé použita v roce 1975 týmem Edwina Southerna k přenesení DNA na nylonovou membránu a následné detekci pomocí navázání komplementární sekvence značené radioaktivním fosforem (Southern EM, 1975). Pro přenos RNA se používá termín Northern blot. WB je složen ze čtyř základních kroků: transfer proteinů, blokace zbylých vazebných míst na membráně, vazba Ab a detekce.

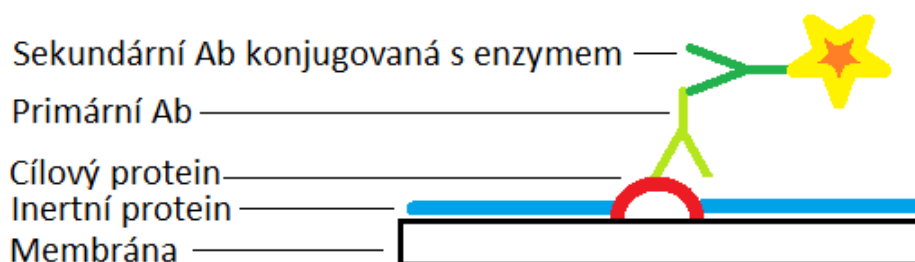
K přenesení proteinů bylo dříve využíváno prosté difúze, přičemž byl gel vložen mezi dvě membrány, takto sestavená aparatura byla zatížena a inkubována přes noc. Tento typ přenosu je využitelný pouze u gelu s velkými póry a není kvantitativní. Mezi další historické metody lze zařadit kapilární blot, transfer pomocí tlaku či vakua. Dnes se z většiny používá přenos pomocí elektrického pole. Gel s membránou je vložen mezi dvě ploché elektrody a proteiny jsou znovu přitahovány elektrickou silou k anodě (Obr. 3). Jakmile narazí na membránu (nejčastěji nitrocelulózovou nebo polyvinylidifluoridovou), jsou na ni imobilizovány. Při přenosu je důležité chladit kapalinu, v níž proces probíhá, protože se uvolňuje velké množství tepla. K ověření efektivity transferu proteinů lze membránu nespecificky obarvit například amidočerní či Ponceau S. Proteiny adsorbované na membráně jsou volně dostupné pro makromolekulární ligandy, např. Ab, antigeny, lektiny, u Southern a Northern blotu nukleové kyseliny (Westermeier R, 2001).

Následujícím a nezbytným krokem je blokace zbylých aktivních míst membrány. To je provedeno pomocí inkubace membrány v roztoku inertních proteinů, jako jsou hovězí sérový albumin, gelatin nebo kasein (Pingoud A et al., 2002; Westermeier R, 2001).



Obr. 3 Schéma sestavení blotovací soustavy pro přenos proteinů na membránu. Šipka znázorňuje směr transferu.

Membrána je po blokaci inkubována s primární Ab, která specificky interaguje s hledaným proteinem. Po vazbě primární Ab je nutné vymýt nespecificky navázané imunoglobuliny. Následuje inkubace se sekundární značenou Ab, která je namířena proti lehkému a těžkému řetězci primární Ab (Obr. 4). Tento dvoustupňový systém je využíván kvůli univerzálnosti sekundární Ab. Kdyby byla značena již primární Ab, bylo by to finančně nevýhodné. Díky zvětšení počtu vazebných míst pro sekundární Ab dochází také k zesílení signálu.



Obr. 4 Schéma dvoustupňové detekce cílového proteinu.

Detekce je zajištěna díky značení sekundární Ab. Často využívanou metodou byla konjugace imunoglobulinu s radioaktivně značeným proteinem A. Kvůli bezpečnosti a nutnosti disponovat radioizotopickou laboratoří se přešlo k enzymově značené Ab. V současnosti se nejvíce využívá alkalická fosfatasa a křenuvová peroxidasa, kdy po přidání substrátu dojde k zviditelnění proteinů. Výsledkem enzymatické reakce v závislosti na substrátu může být zbarvení, či emise elektromagnetického záření. To je detekováno buď na fotocitlivý film (Pingoud A et al., 2002) nebo CCD kamerou (Degasperis A et al., 2014).

Výhodou této metody je specifické zviditelnění i méně abundantního proteinu obsaženého v komplexní směsi. Nevýhodou může být nedostupnost primární Ab proti cílovému proteinu.

## 2.5 Vybrané instrumentální metody v proteomice

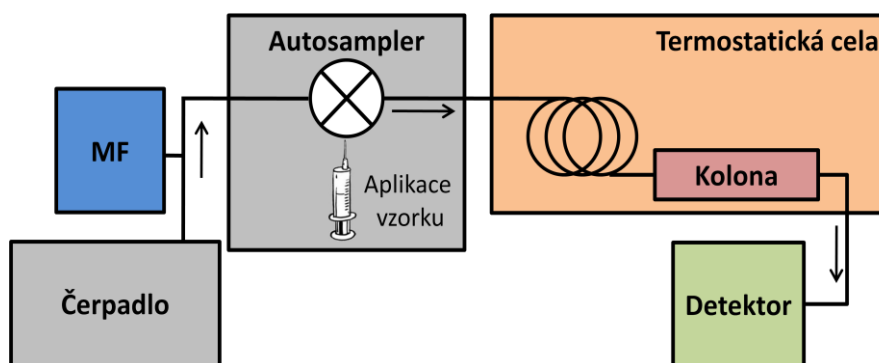
Proteomika je novodobý vědní obor, který se zabývá systematickou identifikací a kvantifikací celkového souboru proteinů, čili proteomu v biologickém systému v daný časový okamžik (<http://www.nature.com/subjects/proteomic-analysis>). Biologický systém může být představován buňkou, tkání, orgánem, biologickou tekutinou nebo organismem. Proteomika tedy zkoumá skladbu a zastoupení jednotlivých proteinů, jejich dynamiku, funkce, strukturní uspořádání, posttranslační modifikace a vzájemné interakce nejčastěji pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), (Jensen ON, 2006).



MS prodělala v posledních letech progresivní rozvoj a stala se jednou z nejpoužívanějších technik při analýze nízkomolekulárních látek, syntetických polymerů, ale i makromolekul jako jsou proteiny, peptidy nebo nukleové kyseliny. Existují dokonce i studie, které se zabývají přímou identifikací bakterií pomocí MS (Barnini S et al., 2015). Často dochází k on-line propojení hmotnostního spektrometru s plynovou nebo kapalinovou (LC) chromatografií, v případě proteomiky je využíván systém nanokapilární kapalinové chromatografie (nLC). Jedná se o vysoce sofistikované techniky, které umožňují separaci směsi analytů a jejich identifikaci i kvantitativní analýzu.

### 2.5.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinový chromatograf je sestaven z čerpadel udržujících konstantní průtok mobilní fáze (MF), zařízení pro dávkování vzorku, kolony, detektoru a výpočetní jednotky (Obr. 5). Důležitou součástí kapalinového chromatografu je kolona naplněná stacionární fází (SF). Fyzikálně-chemické vlastnosti SF a MF určují charakter separace látek obsažených ve vzorku. V dnešní době existuje spousta typů náplní. V proteomice je nejčastěji používána reverzní fáze se sorbentem C18, C8, C4 nebo iontově výměnná chromatografie na silném katexu (SCX) či anexu.



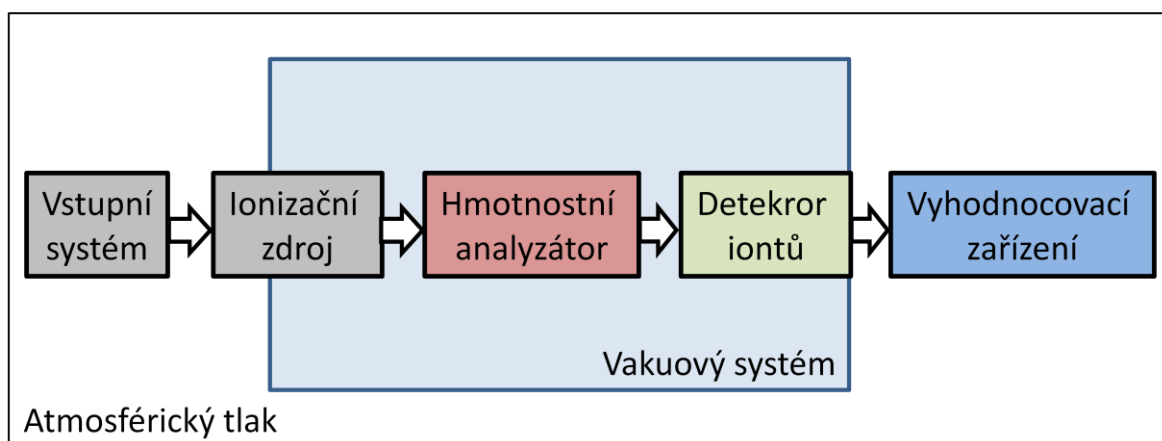
Obr. 5 Zjednodušené schéma kapalinového chromatografu. Šipky znázorňují směr toku MF.

Kolonou rovnoměrně protéká MF tvořená organickými rozpouštědly, např. metanolem (MeOH) či acetonitrilem (ACN), (Ali I et al., 2010). Ty mohou být smíchány s vodou v různém poměru, čímž lze zvolit eluční sílu MF. Směs peptidů je nanášena na kolonu a unášena MF. Následně dochází k rozdělení analytů na základě odlišné interakce se SF a MF. Hydrofobní peptidy vykazují vyšší afinitu k nepolárnímu sorbentu, a proto jsou na koloně zadržovány déle. Tyto peptidy se eluují z kolony později oproti hydrofilním peptidům. Doba, po kterou je analyt zadržován na koloně, se nazývá retenční čas a je charakteristický pro danou látku při dodržení konkrétních podmínek separace.

Po frakcionaci pokračují jednotlivé složky do detektoru. Tím může být UV/VIS a hmotnostní spektrometr (Ali I et al., 2010). Výstupem je chromatogram znázorňující závislost intenzity signálu analytu na čase. Z chromatogramu lze určit zmíněný retenční čas a plochu píku úměrnou množství analytu, takže LC může být použita i jako kvantifikační metoda. Nicméně je nutné provést kalibraci za použití standardů o známé koncentraci.

## 2.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Pomocí MS lze stanovit efektivní hmotnosti iontů tj. poměr molekulové hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Hmotnostní spektrometr se skládá ze čtyř hlavních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a počítačové jednotky (Obr. 6). Iontový zdroj převádí molekulu analytu na ionty v plynné fázi, které jsou následně usměrňovány a separovány pomocí elektromagnetického pole. V proteomice jsou nejčastěji využívány měkké ionizační techniky, mezi něž patří ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), při kterých nedochází k nežádoucí fragmentaci analytů.



Obr. 6 Obecné schéma hmotnostního spektrometru.

V ESI sprejovací kapilára vytvoří aerosol analytu rozpuštěného v těkavé kapalině např. v kyselině mravenčí (FA) nebo kyselině trifluoroctové (TFA). Díky vysokému pozitivnímu napětí na kapiláře je tvořen tzv. Taylorův kužel, ze kterého dochází k uvolňování kapének roztoku. Protony kyseliny propůjčují kapkám pozitivní náboj, což způsobuje jejich pohyb k negativně nabitým částem přístroje. Během průchodu aerosolu iontovým zdrojem dochází k postupnému odpařování volatilní kapaliny, což vede k tzv. Coloumbickému štěpení, při němž jsou molekuly analytu rozděleny na jednotlivé ionty, které přejímají vodíkové protony od kyseliny.

Ionizované molekuly pokračují do dalších bloků hmotnostního spektrometru (Kinter M and Sherman NE, 2000).

Naproti tomu při ionizační technice MALDI je analyt kokrytalizován na kovové destičce s matricí schopnou absorbovat UV záření. Mezi zástupce matrice je řazena např. kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina sinapová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová a další (Clark AE et al., 2013). Pulz UV laseru vypaří část matrice obsahující ionty molekul analytu. Ionizace je způsobena přenosem protonů z kyselého prostředí matrice na analyt. Ionty jsou dále unášeny z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru (Kinter M and Sherman NE, 2000).

Základní úlohou analyzátoru je separovat ionty na základě rozdílu jejich  $m/z$ . Vše probíhá ve vakuu, aby nedošlo ke srážce analytu s jinou molekulou, která může následně způsobit nechtěnou fragmentaci. Mezi zástupce analyzátorů patří kvadrupólový analyzátor (Q), iontová past, analyzátor doby letu (TOF) nebo Orbitrap. V praxi se často využívají kombinace dvou analyzátorů stejného typu (tandemové analyzátor – trojitý kvadrupól QqQ) nebo různého typu (hybridní analyzátor – Q-TOF).

Q je složen ze čtyř rovnoběžných kovových tyčí. Na dvojice protilehlých tyčí je střídavě vkládáno vysokofrekvenční střídavé a stejnosměrné napětí. Kombinací těchto fyzikálních veličin dochází k vytvoření elektromagnetického pole, v němž oscilují nabitě ionty. Při určitých hodnotách vloženého napětí jsou Q schopné projít jen ionty s definovaným poměrem  $m/z$ . Ostatní nabitě molekuly analytu jsou vychýleny ze své trajektorie a zachyceny na tyčích, proto Q funguje jako hmotnostní filtr (Kinter M and Sherman NE, 2000).

Při analýze v jednoduchém Q dochází k detekci odlišných látek vykazujících stejný poměr  $m/z$ , což komplikuje jejich identifikaci. QqQ umožňuje tyto ionty rozlišit pomocí fragmentace v prostředním Q sloužícím jako kolizní cela. V ní dochází k rozpadu prekurzorového iontu na charakteristické produkty, které následně pokračují do třetího Q (Kinter M and Sherman NE, 2000).

V praxi jsou využívány čtyři typy skenovacích módů: skenování iontů prekurzorů, produktových iontů, neutrálních ztrát, nebo iontových reakcí. Prvním zmíněným přístupem analýzy je skenovací mód prekurzorů, při němž jsou hodnoty napětí na prvním Q plynule měněny tak, aby proletěly postupně ionty od nízkých efektivních hmotností až po ty vysoké. Ve třetím Q jsou nastaveny fixní podmínky, proto jsou schopné proletět jen ionty o konkrétní  $m/z$ .

Při skenování produktových iontů je na první Q vkládáno stálé napětí a na třetím Q je napětí plynule měněno. Tím je umožněna detekce všech vzniklých fragmentů vzniklých v kolizní cele.

Třetí možností je detekce neutrální ztráty, při níž jsou posledním Q propuštěny jen dceřiné ionty, jejichž molekulová hmotnost byla snížena o konkrétní hodnotu.

Čtvrtým typem je snímání iontových reakcí, při němž jsou stanovovány analyty o známé molekulové hmotnosti. Nastavené hodnoty napětí a proudu jsou konstantní. Z toho plyne, že pouze ionty o definované  $m/z$  jsou schopné projít Q. Po fragmentaci lze znovu vybrat dceřiné ionty

o konkrétním poměru  $m/z$ , které doletí až k detektoru. V tomto módu je nutné znát molekulovou hmotnost prekurzoru i fragmentu.

Q je s oblibou používán jako kvantifikační nástroj. Předností Q je vysoký výkon a snadná obsluha zařízení (Kinter M and Sherman NE, 2000).

Identifikace iontů v TOF analyzátoru probíhá na principu stanovení času, za který ionty uletí definovanou dráhu. Doba letu je ovlivněna poměrem  $m/z$ . Nejprve je iontům uděleno fixní množství kinetické energie pomocí elektrického pole. Nabitě molekuly analytu jsou tak akcelerovány do letové trubice, v níž dochází k jejich rozdělení pouze na základě odlišné efektivní hmotnosti. Rychlost iontů je nepřímo úměrná poměru  $m/z$ . To znamená, že dvakrát nabitý iont se bude pohybovat vyšší rychlostí než jedenkrát nabitý iont o stejné molekulové hmotnosti. Výhodou TOF oproti Q je vysoká rozlišovací schopnost a velký detekční rozsah  $m/z$ . Díky těmto vlastnostem je TOF využíván ke stanovení přesné hmoty molekuly (Kinter M and Sherman NE, 2000).

Ionty po průletu hmotnostním analyzátozem dopadají na detektor, který snímá jejich elektrický signál, jenž je přímo úměrný množství detekovaných iontů. Výstupem je hmotnostní spektrum zobrazující závislost relativní intenzity na efektivní hmotnosti.

Pro analýzu dat získaných z hmotnostních spektrometrů jsou v proteomice využívány vyhledávací algoritmy, např. Mascot, MS-Fit, ProFound, Sequest a další, které porovnávají experimentálně naměřená spektra s daty z databází, jejichž příkladem je UniProt, National Center for Biotechnology Information, Protein Information Resources. Postup identifikace proteinů závisí na zvolené instrumentální metodě. Při analýze proteinů je důležité použít specificky štěpící proteasu, např. trypsin.

Získané informace z LC a MS jsou porovnávány s databázemi již dříve naměřených dat (retenčních časů a hmotnostních spekter), což umožňuje rychlou identifikaci zkoumaných molekul. Identifikace proteinů, jejichž sekvence není obsažena v databázi, je prováděna metodou de novo sekvenování peptidů, při které je určeno pořadí aminokyselin v peptidu pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). V kolizní cele je náhodně vytvořena směs iontů peptidů, které se liší délkou řetězce. Při velkém množství peptidů je statisticky pravděpodobné, že po fragmentaci vzniknou ionty, které se odlišují právě o jednu aminokyselinu. Kolizní cela tedy obsahuje dipeptidy, tripeptidy, tetrapeptidy atd. Následně jsou tyto ionty skenovány, přičemž je určena sekvence peptidu podle rozdílu molekulové hmotnosti, která je charakteristická pro danou aminokyselinu.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Příprava rostlinného materiálu

Pro experiment byla zvolena buněčná suspenzní kultura *A. thaliana*, ekotyp *Ler*, (L.) Heynh, která byla poskytnuta oddělením molekulární biologie Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Hlavním důvodem výběru tohoto zdroje biologického materiálu byla snadná manipulace s buňkami a rychlé množení materiálu.

Buněčná kultura byla inkubována v sedmidenních cyklech ve tmě při laboratorní teplotě za stálého míchání 110 rpm. Po týdnu bylo přeneseno cca 5-6 ml kultury do 50 ml nového sterilního média. Proces pasážování probíhal ve sterilním flowboxu. Kultivační médium obsahovalo 3 % sacharózy; 0,44 % Murashige-Skoog média; 0,23  $\mu\text{M}$  kinetinu a 5,37  $\mu\text{M}$  kyseliny 1-naftalenoctové. pH bylo upraveno na 5,75 pomocí roztoku 5M KOH.

Izolace ER byla provedena také z šestidenních semenáčků *A. thaliana*, ekotyp Col-0. Výsev probíhal ve flowboxu kvůli snížení rizika kontaminace. Semínka sterilizovaná roztokem 70% etanolu a 0,01% Tweenu-20 po dobu 10 min za neustálého míchání byla nejprve promyta 2 ml sterilní destilované vody a poté rozsuspendována v 1 ml sterilní destilované vody a pipetou nanášena ve třech řadách na pevné médium dle Murashigeho & Skooga s obsahem 1 % sacharózy; 0,22 % MS média a 0,8 % agaru. pH bylo upraveno 5M KOH na 5,9 (Murashige T and Skoog F, 1962). Vysetá semínka byla synchronizována tři dny ve tmě při 4 °C, poté byla přesunuta do kultivační místnosti. Rostliny byly pěstovány ve vertikální poloze za následujících podmínek: 22 °C, 16 hod světlo a 8 hod tma.

#### 3.2 Chemikálie

V provedených experimentech byly použity tyto chemikálie:

**3M Center** (USA):

extrakční disk C18 Empore, extrakční disk SCX Empore,

**Agrisera** (Švédsko):

Primární polyklonální králičí Ab: anti-H-ATPase, anti-Sar1, anti-Sec21p, anti-V-ATPase,

**Bio-Rad** (USA):

akrylamid, marker precision plus protein Dual Xtra standards, N, N'-metylenbisakrylamid,

**Duchfea Biochemie B. V.** (Nizozemsko):

Agar, Murashige-Skoog médium,

**Fluka** (Německo):

bikarbonát triethylamonný (TEAB), izopropanol (iPrOH), MgCl<sub>2</sub>, NaF, NH<sub>4</sub>OH, octan amonný (AmAc), persíran amonný, thiomocovina, tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP),

**Lach-ner** (ČR):

HCl, KOH, kyselina octová, MeOH, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, Tween-20,

**Laktino** (ČR):

sušené nízkotučné mléko,

**Merck Millipore** (Německo):

etanol, tetrametyletylendiamin (TEMED),

**MP Biomedicals** (USA):

tris ultra pure, trypsin,

**Roche** (Švýcarsko):

Roche inhibitor cocktail cOmplete, EDTA free,

**Sanra Cruz Biotechnology** (USA):

nitrocelulózová membrána, sekundární polyklonální kozí Ab anti-rabbit IgG-HRP,

**Serva** (Německo):

SDS,

**Sigma-Aldrich** (Německo):

aceton, ACN, bromfenolová modř, dithiotreitol (DTT), fenylmethansulfonylfluorid (PMSF), glycerol, glycin, jodacetamid (IAM), kinetin, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), FA, merkaptoethanol, močovina, 1-naftalenoctová kyselina, ponceau S, sacharóza, sorbitol, TFA,

**Thermo Scientific** (USA):

chemiluminiscenční substrát Super Signal West Pico.

### 3.3 Přístrojová technika a vybavení

Analytická nanokapilární kolona 75 µm × 15 cm (SilicaTip, New Objective, CA, USA) s reverzní břitový mixér SHM2 (Stuart, Velká Británie),

fázi Reprosil GOLD C18, 3 µm, (Dr. Maisch GmbH, Německo),

centrifuga CL 31R Multispeed (Thermo elektron corporation, USA),

centrifuga minispin (Eppendorf, Německo),

detekční stanice ChemiDoc MP ImagingSystem (Bio-Rad, USA),

Elvehjemův homogenizér (Sigma-Aldrich, Německo),  
elektroforetický set Mini-PROTEAN Tetra cell, PowerPac Basic Power (Bio-Rad, USA),  
hamiltonova stříkačka 1 ml (Hamilton Company, USA),  
laminární box UCS (Merci, ČR),  
míchačka Vortex mixer SA8 (Stuart, Velká Británie),  
nanokapilární předkolona 75  $\mu\text{m}$   $\times$  3 cm (IntagraFrit, New Objective, CA, USA) plněná reverzní  
fází Reprosil GOLD C18, 5  $\mu\text{m}$ , (Dr. Maisch GmbH, Německo),  
pH metr (Vertikon, ČR),  
automatické pipety (Eppendorf, Německo),  
rotační míchačka multi-rotator PRS-22 (Biosan, USA),  
rotační vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo),  
set pro WB Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA),  
systém nLC nanoEASY (Proxeon, Nizozemí, Bruker Daltonics, Německo) s tandemovou  
hmotností detekcí Q-TOF vybavenou elektropray ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker  
Daltonics, Německo),  
termomixer komfort (Eppendorf, Německo),  
total recovery vialky (Waters, USA),  
třepačka KS 130 control (IKA, Německo),  
ultracentrifuga CP 90 WX (Hitachi Koki, Japonsko),  
ultracentrifugační zkumavky 14  $\times$  89 mm (Backman Coulter, ČR),  
ultrazvuková lázeň Elmasonic S10 (Elma, Německo),  
výkyvný rotor P40ST-2054 (Hitachi Koki, Japonsko).

### **3.4 Programy a online databáze:**

Cytoscape v. 3.2.1 s aplikací ClueGO v. 2.1.7,  
DataAnalysis v. 4.0 sp5 (Bruker Daltonics, Německo),  
Excel 2007 (Microsoft, USA),  
ImageJ v. 1.46r (Rasband W, National Institutes of Health, USA),  
Mascot algoritmus (in-house mascot server, Matrix Science, Anglie),  
ProteinScape v. 2.2 (Bruker Daltonics, Německo),  
UnitProt *Arabidopsis Thaliana* v. 20140122 (UniProt KB, [www.UniProt.org](http://www.UniProt.org))  
Venny v. 2.0 (JC Oliveros, Spanish National Biotechnology Centre, Španělsko,  
[www.bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/](http://www.bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)).

## 3.5 Metody

### 3.5.1 Homogenizace a frakcionace organel s horním nanášením.

Čtyři dny stará buněčná suspenzní kultura *A. thaliana* Ler byla přefiltrována pomocí vakuové filtrační aparatury. Buňky byly promyty destilovanou vodou. Následný proces probíhal v ledové lázni. K odváženému množství 8,5 g buněk byl přidán ekvivalentní objem extrakčního pufru (Tab. 1). Pro experiment byly zvoleny čtyři varianty homogenizace.

- a) Homogenizace mixérem 10 minut,
- b) homogenizace v TM 3 minuty,
- c) homogenizace pomocí EH, přičemž píst byl pomalu protlačen přes suspenzi 15x,
- d) spojení homogenizace v TM a EH.

Tab. 1 Složení extrakčního pufru. pH pufru pro horní nanášení bylo upraveno 18% HCl na hodnotu 7,5. Chemikálie v šedém poli byly přidány bezprostředně před použitím pufru.

Horní nanášení	
Komponenta	Koncentrace
Tris	50 mM
NaCl	25 mM
Sacharóza	250 mM
EDTA	3 mM
DTT	1 mM
NaF	1 mM
PMSF	1 mM
Rosche inh.	1 ×

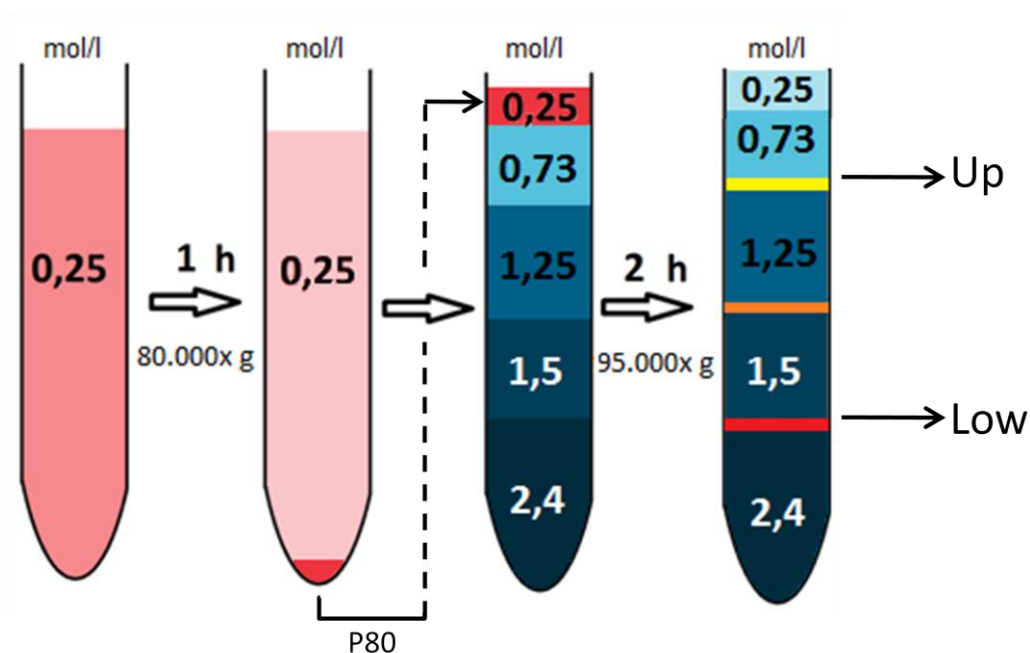
Po homogenizaci byly k biologickému materiálu přidány 2 díly extrakčního pufru (do finálního poměru 1:3). Homogenát byl inkubován 15 minut za občasného promíchání a poté přefiltrován přes dvě vrstvy nylonové tkaniny do 50 ml falkony. Filtrát byl stočen ve vychlazené centrifuge při 12000 rcf, 4 °C a po dobu 10 min. Frakcionace organel byla provedena podle již dříve publikovaného postupu (Hodges TK and Mills D, 1986), který byl mírně modifikován.

Supernatant získaný centrifugací při 12000 rcf byl rozdělen do dvou ultracentrifugačních zkumavek a centrifugován 1h při 80000 rcf a 4 °C. Následně byl roztok odstraněn. Pelety obsahující mikrozomální frakci byly označeny jako P80. Sediment byl důkladně rozpuštěn v 500 µl roztoku 0,25M sacharózy (Tab. 2). Bylo odebráno 50 µl mikrozomální frakce, která byla použita při imunodetekci jako pozitivní kontrola. Rozsuspendované pelety (každý zvlášť) byly naneseny na čtyři patra gradientu (tzn. původních 4,25 g buněk/gradient), (Obr. 7). Jedno patro bylo vždy tvořeno 2,5 ml 2,4M; 1,5M; 1,25M a 0,73M roztokem sacharózy, jehož složení je uvedeno v Tab. 2.



Tab. 2 Složení pufru použitého na přípravu roztoků sacharózy. pH roztoku bylo upraveno 9% HCl na hodnotu 7,35. Chemikálie v šedém poli byly přidány bezprostředně před použitím pufru.

Komponenta	Koncentrace
Tris	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
DTT	2,5 mM
PMSF	1 mM



Obr. 7 Schéma frakcionace s horním typem nanášení mikrozomální frakce.

Dva takto zhotovené gradienty byly ultracentrifugovány při 95000 rcf 2 h, 4 °C. Vzorek byl rozdělen do tří zaostřených zón, vždy mezi jednotlivá patra. Byla odebrána horní (Up) a dolní (Low) frakce. Stejně frakce z obou gradientů byly spojeny v jednu a stočeny 1 h při 80000 rcf a 4 °C. Získané pelety byly rozpuštěny v 450 µl 0,25M roztoku sacharózy a znovu nanášeny na nový, stejně připravený gradient. Celý proces ultracentrifugace byl zopakován. Repurifikované pelety byly rozpuštěny v 50 µl 0,25M roztoku sacharózy a zamraženy v -80 °C do dalšího použití (Hodges TK and Mills D, 1986).

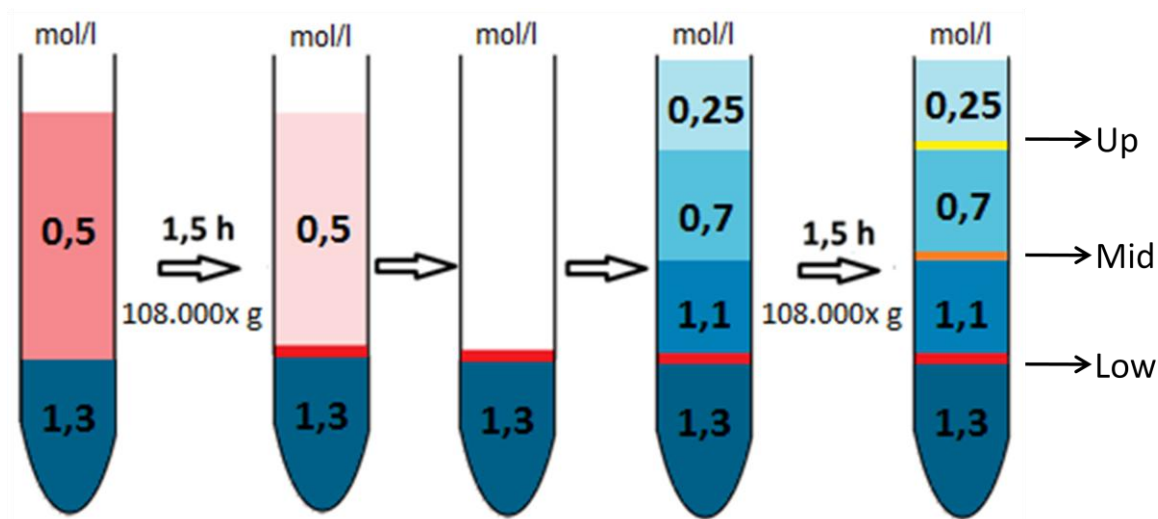
### 3.5.2 Homogenizace a frakcionace organel se spodním nanášením

Čtyři dny stará buněčná suspenzní kultura *A. thaliana* Ler byla přefiltrována pomocí vakuové filtrační aparatury. Buňky byly promyty destilovanou vodou. Následný proces probíhal v ledové lázni. K odváženému množství 3 g buněk byl přidán ekvivalentní objem extrakčního pufru (Tab. 3). Pro experiment byly zvoleny tři varianty homogenizace jako v předcházejícím postupu. Vynechán byl břitový mixér, protože způsoboval nadměrnou desintegraci organel. Po homogenizaci byl extrakt taktéž doplněn pufrem do finálního poměru 1:3. Homogenát byl přefiltrován přes dvě vrstvy nylonu a centrifugován 10 min při 12000 rcf a 4 °C. Z extraktu bylo odebráno 100 µl, které byly použity jako pozitivní kontrola při vizualizaci WB.

Tab. 3 Složení extrakčního pufru pro spodní nanášení. pH bylo upraveno 5M roztokem KOH na 6,65. Chemikálie v šedém poli byly přidány bezprostředně před použitím pufru.

Spodní nanášení	
Komponenta	Koncentrace
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Sacharóza	0,5 M
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Rosche inh.	1 ×

Extrakt byl rozdělen na poloviny a opatrně napipetován na první patro gradientu, které bylo tvořeno 3 ml 1,3M roztoku sacharózy. Takto připravené vzorky byly ultracentrifugovány při 108000 rcf, 1,5 h při 4 °C. Supernatant byl obezřetně odpipetován tak, aby nedošlo k rozrušení fokusované mikrozomální frakce na rozhraní. Následně na ni byla opatrně napipetována zbylá tři patra gradientu (1,1M; 0,7M; a 0,25M sacharóza), přičemž každé patro bylo tvořeno 3 ml (Obr. 8). Roztoky sacharóz byly stejného složení jako extrakční pufr, bez obsahu inhibitorů a DTT (Tab. 3). Gradient byl následně ultracentrifugován při 108000 rcf, 1,5 h při 4 °C. Mikrozomální frakce byla rozdělena mezi třemi rozhraními, ze kterých byly následně odpipetovány separované organely. Pro zakoncentrování byly frakce ultracentrifugovány při 108000 rcf, 1,5 h při 4 °C. Pelety byly rozpuštěny v 50 µl 0,25M roztoku sacharózy a zamraženy v -80 °C do dalšího použití (Ding Z et al., 2012).



Obr. 8 Schéma frakcionace se spodním typem nanášením extraktu.

### 3.5.3 Purifikace ER

Ve snaze zvýšit čistotu frakce obsahující ER bylo testováno použití extrakčního pufru o složení: 0,5M sacharózy, 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2mM EDTA, 1mM DTT a výše zmíněných inhibitorů (Tab. 3), přičemž buněčná suspenzní kultura byla homogenizována pouze TM. Postup byl proveden podle protokolu se spodním nanášením extraktu (Ding Z et al., 2012).

Další způsob odstranění kontaminujících membrán byl zvolen podle protokolu na izolaci vakuol (Mettler IJ and Leonard RT, 1979). Frakcionace byla provedena z extraktu získaného homogenizací buněk v TM. Po separaci organel byl pelet získaný z rozhraní 0,7/1,1M sacharózy rozpuštěn v 1 ml pufru o složení: 0,5M sorbitol; 10mM tris/HCl pH 7,2; 0,25mM EDTA a 1mM DTT. Tato frakce byla nanášena na 3 ml 3,5% roztoku Ficollu rozpuštěného ve stejném pufru.

Centrifugací při 1000 rcf a 4 °C trvající 45 min nedošlo k rozdělení organel, proto byl tento gradient centrifugován 45 min při 80000 rcf a 4 °C. Z rozhraní byl odebrán 1 ml frakce roztoku. Vzniklý pelet byl rozpuštěn v 50  $\mu\text{l}$  0,25 M sacharózy. Odebraná frakce z rozhraní byla zředěna 3 ml pufru obsahující 0,5 M sorbitol; 10 mM tris HCl pH 7,2; 0,25 mM EDTA a 1 mM DTT a byla stočena při 108000 rcf, 4 °C po dobu 45 min. Zbylý supernatant byl odstraněn a pelet byl rozpuštěn v 50  $\mu\text{l}$  stejného pufru. Všechny frakce byly následně zamrazeny v -80 °C do dalšího použití.

### 3.5.4 Frakcionace organel z *A. thaliana* Col-0 pomocí spodního nanášení

Frakcionace organel se spodním nanášením byla aplikována i na extrakt získaný z šestidenních rostlin *A. thaliana*, ekotyp Col-0. Pokus byl proveden ve dvou variantách, a to za přítomnosti 5mM MgCl<sub>2</sub>, nebo 2mM EDTA. Postup byl totožný jako v předcházejících experimentech, kromě homogenizace. Celý proces probíhal na ledové lázni. 2 g šestidenních semenáčků byly nakrájeny žiletkou v 6 ml vychlazeného extrakčního pufru (Tab. 3). Homogenizovaný materiál byl inkubován na ledu na rotační míchačce 15 min při 100 rpm. Homogenát byl přefiltrován přes dvě vrstvy nylonu a stočen 10 min, při 10000 rcf a 4 °C. Následovala separace organel v sacharózovém gradientu podle Obr. 8.

Po rozebrání gradientu bylo z každé frakce odebráno 25 % určených pro SDS-PAGE s imunodetekcí. Zbýlých 75 % bylo použito k analýze pomocí MS. Jednotlivé části byly ultracentrifugovány odděleně. Pelety určené k WB byly rozpuštěny v 15 µl 0,5M sacharózy a vzorky pro hmotnostní analýzu solvatovány ve 20 µl 6M močoviny, 2M thiomočoviny v 100mM TEAB. Vše bylo zamraženo v -80 °C do dalšího použití.

### 3.5.5 Tvorba sacharózového gradientu

Sacharózový gradient musí být napipetován rychle, ale pečlivě, aby nedošlo k promíchání jednotlivých roztoků sacharózy. Pro nanesení jednotlivých pater gradientu byla použita 1ml Hamiltonova stříkačka, která nemá pružinu jako automatická pipeta. Lze tak lépe regulovat rychlost vytékající kapaliny. Při pipetování gradientu je nutné použít vychlazené roztoky sacharózy uchovávané nejlépe na ledu. Nízká teplota zmenšuje pravděpodobnost promíchání jednotlivých pater gradientu a snižuje míru difúze.

### 3.5.6 SDS-PAGE a WB

Bylo nutné stanovit čistotu získaných frakcí. Z každé frakce bylo odebráno 15 µl pro SDS-PAGE (Laemmli UK, 1970), které byly smíchány s dvakrát koncentrovaným nanášecím pufrem v poměru 1:1. Složení nanášecího pufru je uvedeno v Tab. 3. Vzorky byly promíchány, inkubovány při 70 °C po dobu 5 min, znovu promíchány a stočeny stolní centrifugou při 10000 rpm, 5 min.

Tab. 3 Složení dvakrát koncentrovaného nanášecího pufru pro SDS-PAGE. pH bylo upraveno přidavkem koncentrované HCl na hodnotu 6,8. Chemikálie v šedém poli byly přidány bezprostředně před použitím pufru.

Komponenta	Koncentrace
Tris	125 mM
SDS	5 %
Bromfenolová modř	0,01 %
Glycerol	20 %
Merkaptoetanol	10 %

Takto připravené vzorky byly v celém objemu naneseny na 4 a 12% diskontinuální pAA gely. Bylo použito 3,5  $\mu$ l markeru molekulových hmotností. Elektroforéza byla zapnuta na 90 V, 30 minut a poté na 120 V až do konce separace (cca 1,5 h). Gely byly opláchnuty 5 min v destilované vodě a následně 10 min v transferovém pufru. Byla sestavena blotovací soustava, přičemž proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Proteiny byly transferovány při 90 mA, 4 °C, přes noc (cca 16 h).

Membrána byla obarvena roztokem obsahujícím 0,1% barvivo ponceau S a 1% kyselinu octovou. Proteiny byly nespecificky obarveny a jednotlivé separační dráhy byly vyznačeny tužkou. V případě nutnosti byla membrána rozstříhnutá na menší části. Membrána byla inkubována v 5% roztoku sušeného odtučněného mléka rozpuštěného v tris solném pufru s 0,05% tweenem-20 (TBS-T) 1 h za stálého míchání. Poté byla membrána opláchnuta 5 s v TBS-T. Následovala inkubace s primární Ab, která byla zředěna 1% mlékem v TBS-T (Tab. 4). Roztok Ab byl napipetován na vrstvu parafilmu vloženého do Petriho misky. Na kapku byla položena membrána. Inkubace primární Ab trvala 1 h, přičemž každých 20 min byla membrána na kapce přemístěna, aby došlo k rovnoměrné distribuci Ab. Membrána byla 5 min opláchnuta v TBS-T a dvakrát 5 min v TBS. Následovala hodinová inkubace membrány v roztoku sekundární Ab konjugované s křenovou peroxidasou za stálého míchání. Ab byla zředěna roztokem 1% mléka v TBS-T (Tab. 4). Nespecificky navázaná sekundární Ab byla vymyta roztokem TBS-T 10 min a dvakrát 10 min TBS.

Tab. 4 Seznam použitých Ab a jejich ředění. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, PM - plazmatická membrána, Vac - vakuola.

Ab	Marker	Velikost proteinu [kDa]	Ředění
Anti-H <sup>+</sup> -ATPasa	PM	95	1:1000
Anti-Sar1	ER	21	1:750
Anti-Sec21p	GA	98	1:1000
Anti-V-ATPasa	Vac	31	1:2000
Anti-rabbit IgG-HRP	-	-	1:5000

Membrána byla zlehka osušena a pokapána roztokem substrátu a takto inkubována 5 min. Následně byla membrána vložena do detekční stanice, kde byl navolen program pro snímání chemiluminiscence. Membrána byla focena 1,5 minuty. Během této doby bylo pořízeno 20 snímků. Při detekci signálu frakcí získaných z celých rostlin *A. thaliana* Col-0 byl čas expozice prodloužen na 1,5 – 10 min z důvodu nižšího výtěžku organel.

### 3.5.7 Vyhodnocení Western blotu

Pořízené obrázky byly analyzovány pomocí programu ImageJ. Nejprve byl upraven jas a kontrast obrázků za účelem eliminace pozadí, které by poskytovalo falešně pozitivní výsledek. Následně byly jednotlivé frakce podrobeny analýze obrazu. Program vygeneroval píky odpovídající míře signálu. Na základě plochy píku bylo přiřazeno procentuální zastoupení jednotlivých organel v analyzované frakci.

### 3.5.8 Štěpení v roztoku

Frakce organel ze suspenzní buněčné kultury *A. thaliana* Ler získané ze separace se spodním nanášením extraktu za přítomnosti EDTA a frakce získané z frakcionace kompartmentů semenáčků *A. thaliana* Col-0 byly vybrány k hmotnostní analýze. Nejprve byla provedena precipitace proteinů z roztoku sacharózy. K 20 µl každého vzorku bylo přidáno 100 µl acetonu o teplotě -20 °C a směs byla promíchána na vortexu. Vzorky byly inkubovány v -20 °C přes noc. Následující den byly vysrážené proteiny centrifugovány 10 min při 15000 rcf a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a k peletům bylo napipetováno 200 µl vychlazeného acetonu. Pelety byly jemně promýhány na vortexu 10 s. Následovala centrifugace za stejných podmínek. Pelety byly promyty celkem dvakrát. Po odstranění supernatantu byly pelety vysušeny 5 min na vzduchu.

Proteiny ze suspenzní kultury byly rozpuštěny ve 100 µl a ze semenáčků ve 20 µl roztoku 6M močoviny, 2M thiomočoviny ve 100mM TEAB. Po dvě hodiny byly vzorky míchány při 1400 rpm na termomixeru při 24 °C. Ke vzorkům bylo přidáno 5 µl redukčního roztoku obsahující

24mM TCEP ve 100mM TEAB. Inkubace probíhala 30 min při 25 °C. Poté bylo ke vzorkům napipetováno 5 µl 330mM IAM v 100mM TEAB. Mikrozkušavky byly inkubovány 30 min při 25 °C ve tmě.

pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,5 přidáním 170 µl roztoku 25 mM TEAB. Proteiny z buněčné kultury byly naštěpeny 4 µg trypsinu 2 h při 37 °C, poté doplněny na finální objem 1 ml 25mM TEAB. Alkylované a proteiny ze semenáčku byly štěpeny 2 µg trypsinu. Všechny vzorky byly inkubovány při 37 °C přes noc.

### **3.5.9 SCX frakcionace peptidů**

Následující den byly vzorky okyseleny 100% FA tak, aby pH bylo nižší než 5. Poté byl roztok lyzátu odpařen. Pelety byly rozpuštěny ve 100 µl 1% TFA, sonikovány 10 min a třepány v termomixéru 10 min při 1400 rpm. Následovala frakcionace pomocí SCX iontoměniče podle upraveného protokolu (Kulak NA et al., 2014). Kolony s pevnou fází byly připraveny z pipetovacích špiček 20 – 200 µl. Hamiltonovou jehlou o vnitřním průměru 1 mm byly vyseknuty dva disky SCX sorbentu a zatlačeny do špičky. Kolony byly umístěny do 2 ml mikrozkušavky s perforovaným víčkem.

Mikrozkušavky s kolonkami byly umístěny do centrifugy. Nejprve byla pevná fáze smočena 40 µl ACN. Špičky byly přemístěny do nových mikrozkušavek s předem předloženými 20 µl 25% FA a na kolony bylo nanášeno 60 µl každého vzorku. Z každého vzorku bylo jímáno pět frakcí, přičemž každá frakce byla eluována do nové mikrozkušavky. Po nanášení vzorku byl sorbent dvakrát promyt 40 µl 0,2% TFA. Takto byla připravena první frakce. Následovalo postupné vymývání peptidů z kolony pomocí roztoků se zvyšující se iontovou silou. Druhá až pátá frakce byla eluována dvakrát 40 µl roztoku AmAc obsahující 20% ACN a 5% FA. Pro vymytí všech peptidů ze sorbentu byla poslední frakce eluována 5% NH<sub>4</sub>OH v 80% ACN do 30 µl FA. Přesný postup frakcionace je uveden v Tab. 5. Získané frakce byly odpařeny a před odsolením zamraženy v -80 °C.

Tab. 5 Postup frakcionace peptidů pomocí SCX kolony

Navlhčení SCX kolony a nanesení vzorku					
Krok	Opakování	Roztok	Objem [ $\mu$ l]	Otáčky [rcf]	Čas [min]
1	1 ×	ACN	40	2000	4
2	1 ×	Vzorek	75	1000	8
3	2 ×	0,2% TFA	40	1200	4
SCX frakcionace					
Krok	Opakování	Roztok	Objem [ $\mu$ l]	Otáčky [rcf]	Čas [min]
1	2 ×	50 mM AmAc	40	1200	5
2	2 ×	125 mM AmAc	40	1200	5
3	2 ×	250 mM AmAc	40	1200	5
4	2 ×	5 % NH <sub>4</sub> OH, 80 % ACN	40	1200	5

### 3.5.10 Odsolení peptidů na C18 koloně

K odparům SCX frakcí bylo napipetováno 50  $\mu$ l 5% FA. Vzorky byly umístěny do sonifikační lázně na 10 min a následně třepány 10 min v termomixéru při 1400 rpm. Odsolení peptidů bylo uskutečněno podle postupu publikovaného Jurim Rappsilberem (Rappsilber J et al., 2007). Nejprve byly připraveny C18 kolony stejným způsobem jako v kapitole 3.5.9. Sorbent byl aktivován dvakrát 50  $\mu$ l iPrOH a ekvilibrován taktéž dvakrát 50  $\mu$ l 5% FA. Špičky byly přemístěny do nových mikrozkuvek. Následně bylo na kolonu nanášeno 50  $\mu$ l vzorku. Poté byly peptidy odsoleny dvakrát 50  $\mu$ l 5% FA. Průtoky byly zachyceny a zamraženy v -80 °C. Eluce peptidů byla jímána do čistých mikrozkuvek. Vzorky byly eluovány dvakrát 50  $\mu$ l roztoku 50% MeOH a 2,5% FA. Přesný postup přečištění peptidů je uveden v Tab. 6. Eluáty byly prepipetovány do čistých total recovery vialek a odpařeny. Vzorky byly zamraženy v -80 °C do další analýzy.

Tab. 6 Postup odsolení peptidů pomocí C18 kolony

Aktivace a ekvilibrace C18 kolony					
Krok	Opakování	Roztok	Objem [ $\mu$ l]	Otáčky [rcf]	Čas [min]
1	2 ×	iPrOH	50	4000	2,5
2	2 ×	5% FA	50	2000	2,5
Nanášení a promývání vzorku					
Krok	Opakování	Roztok	Objem [ $\mu$ l]	Otáčky [rcf]	Čas [min]
3	1 ×	Vzorek	50	1200	7,5
4	2 ×	5% FA	50	2000	2,5
Eluce vzorku					
Krok	Opakování	Roztok	Objem [ $\mu$ l]	Otáčky [rcf]	Čas [min]
5	2 ×	50% MeOH; 2,5% FA	50	1500	5



### 3.5.11 MS analýza

Odsolené a odpařené vzorky byly bezprostředně před MS analýzou rozpuštěny ve 20  $\mu$ l 5% FA, promíchány pipetováním a inkubovány 5 min v sonifikační lázni. Analýza vzorků peptidů byla provedena pomocí systému nLC s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF vybavenou ESI. Byly provedeny dva nástřiky každého vzorku o objemu 5  $\mu$ l. Peptidy byly zachyceny na předkoloně (75  $\mu$ m  $\times$  20 mm; C18 ,5  $\mu$ m), po izokratickém promytí navázaných peptidů 15  $\mu$ l 2% FA byly analyty postupně vymývány pomocí 75 min gradientové eluce (Tab. 7) na analytickou kolonu při průtoku 200 nl/min. Složení MF bylo následující:

Roztok A – 0,4% FA v H<sub>2</sub>O,

Roztok B – 0,4 % FA v 90% ACN.

Tab. 7 Nastavení míchání gradientové eluce (75 minut) pro rozdělení peptidů na nanokapilární koloně plněné reverzním nosičem.

Čas [min]	Roztok A [%]	Roztok B [%]
0	92	8
3	90	10
26	83	17
40	74	26
48	68	32
51	55	65
52	15	85
55	15	85
58	92	8
75	92	8

Separované a eluované peptidy byly ionizovány prostřednictvím ESI a analyzovány pomocí tandemového hmotnostního spektrometru metodou data dependentní analýzou. Fragmentační spektra peptidů byla získána technikou kolizí indukovanou fragmentací probíhající v kolizní cele plněné dusíkem.

Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; capillary voltage 2150 V; Dry gas: 6 L/min; Dry temperature: 130 °C); Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 7 eV; collision energy 8 eV; Collision RF 2000 Vpp; Ion cooler RF 350 Vpp; transfer time 65  $\mu$ s; pre-puls storage 12 $\mu$ s); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; 4 precursorions; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 7000 cts; active exclusion po 2 spektrech po dobu následujících 9 s; excluded mass rozsah prekurzorů 50-350 Da). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 100-1600 m/z s dobou sběru (acquisition time) 300 ms pro MS a 200-400 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru.

### 3.5.12 Zpracování dat

Naměřená surová data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis v. 4.0 sp5. Byly získány soubory mzXML (extensible markup language), obsahující seznamy měrných hmotností prekurzorů a jejich fragmentační spektra.

Do programu ProteinScape v. 2.2 byly nahrány kompletní mzXML soubory odpovídající jednotlivým vzorkům a bylo provedeno databázové prohledávání pomocí Mascot algoritmu proti manuálně sestavené databázi obsahující 66950 sekvencí proteinových sekvencí (UniProt KB, v. 20140122, 33350 sekvencí *A. thaliana*; 33350 reverzní sekvence proteinů pro stanovení tzv. „false discovery rate“ a doplněné 250 sekvencemi běžných kontaminantů).

Prohledávání bylo nastaveno následujícím způsobem: použitá proteasa ke štěpení: trypsin; maximální povolený počet vynechaných štěpných míst (miss cleavage) 2; povolené modifikace peptidů: karbamidomethylace cysteinů jako pevná (fixed), acetylace N-konců proteinů, oxidace methioninu, deamidace asparaginu a glutaminu byly nastaveny jako variabilní; povolené odchylky pro MS prekurzorů: 50 ppm a pro MS/MS fragmentace peptidů 0,05 Da. Sestavení identifikovaných peptidů a proteinů do proteinových listů bylo provedeno pomocí programu ProteinScape extractors s následným nastavením: minimální skóre pro identifikaci peptidů 15, minimální skóre pro identifikaci proteinů 30 přičemž alespoň jeden unikátní peptid musí mít skóre nejméně 25. Soubory proteinů identifikovaných v jednotlivých frakcích sacharózového gradientu byly následně exportovány do programu MS Excel a dále editovány.

Nejprve byly vymazány identifikované kontaminanty: keratiny, štěpící proteasa). Seznamy identifikovaných proteinů z jednotlivých frakcí gradientu byly vloženy do programu Cytoscape s aplikací ClueGO. Pro gene-ontology (GO) analýzu byla použita databáze proteinů *A. thaliana* ze dne 30. 4. 2015. Program na základě statistického vyhodnocení spojil obohacené proteiny do klastrů, kterým byl přiřazen termín spojený s buněčnou komponentou (Cellular component). Z vygenerovaných skupin proteinů byly vytvořeny diagramy. Vždy byly mezi sebou porovnány frakce v rámci jednoho gradientu a tři stejné frakce napříč experimenty. U frakce nebylo možno vyhodnotit kvůli nízkému počtu identifikovaných proteinů.

Dále bylo provedeno semikvantitativní stanovení markerových proteinů na základě identifikovaných peptidů daného proteinu. Nejprve byla provedena normalizace dat tímto způsobem: Počet identifikovaných peptidů pro daný protein byl podělen celkovým počtem peptidů v dané frakci, přičemž hodnoty poměrů proteinů byly rozděleny do kvartilů.

Pro určení unikátních proteinů ve frakcích v rámci jednoho gradientu byla využita online aplikace Venny v. 2.0. Zastoupení jedinečných proteinů bylo vztaženo k celkovému počtu bílkovin identifikovaných v téže frakci.

## 4 Výsledky a diskuze

Buněčná suspenzní kultura *A. thaliana* Ler byla podrobena čtyřem způsobům homogenizace – břitovým mixérem, TM, EH a spojení TM s EH. Tyto konvenční přístupy byly vybrány, protože každá metoda poskytuje jinou míru rozrušení biologického materiálu. Organely byly následně separovány pomocí diskontinuálního sacharózového gradientu. Pro frakcionaci byly vybrány dva přístupy s odlišným nanášením extraktů. Rozdíl byl i ve složení a hustotě použitých roztoků sacharózy.

Pro imunodetekci byly zvoleny čtyři proteinové markery hlavních membránových organel vyskytujících se v buňce. Jedná se o proteiny specifické pro ER, GA, plazmatickou membránu a vakuoly. Protein Sar1 je marker ER podílející se na tvorbě vezikul transportovaných mezi retikulem a GA (Bar-Peled M and Raikhel NV, 1997). Sec21p je podjednotkou komplexu proteinů, který obaluje váčky uvolňované z *cis* GA (Hopff D et al., 2013). Další dva markerové proteiny patří do skupiny ATPas, které syntetizují ATP. Jedná se o H-ATPasu zakotvenou v plazmatické membráně (Shen H et al., 2014) a V-ATPasu lokalizovanou v tonoplastu (Ranocha P et al., 2013).

Ab proti specifickým proteinům v jádru (Hansen AB et al., 2006) a chloroplastech (Seigneurin-Berny D et al., 2008) či mitochondriích (Glick BS and Pon LA, 1995) nebyly použity, protože tyto kompartmenty by měly být odstraněny z mikrozomální frakce centrifugací při 12000 *rcf*.

### 4.1 Subcelulární frakcionace *A. thaliana* Ler pomocí sacharózového gradientu s horním nanášením mikrozomální frakce

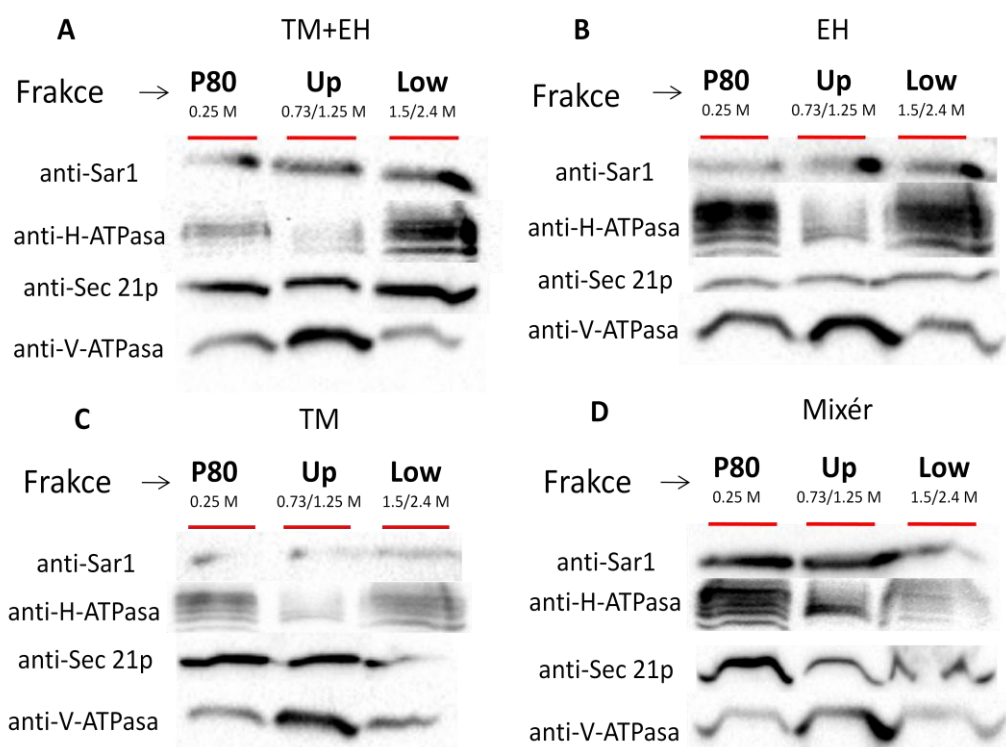
Protokol s horním nanášením byl původně vyvinut pro izolaci plazmatické membrány z kořenových buněk ovsa (Hodges TK and Mills D, 1986). V této práci byl protokol využit pro izolaci organel, protože podle výsledků výše zmíněné studie by mělo dojít k obohacení ER v horní frakci gradientu.

Jako zcela nevhodná se hned v úvodu studie ukázala homogenizace břitovým mixérem (Obr. 9D). Signály markerových proteinů všech membránových struktur byly detekovány především ve frakcích s nižší hustotou. Z toho vyplývá, že se organely nerozdělily podle očekávání. Lze předpokládat, že mixér způsobil nadměrnou desintegraci buněčných oddílů. Ty se následně spojily v menší útvary, což znemožnilo frakcionaci v hustotním gradientu (Obr. 9D; Tab. 8).

I při použití jemnějších technik homogenizace byly jednotlivé frakce navzájem značně kontaminované. Z námi dosažených výsledků lze vyčíst, že ER bylo přibližně rovnoměrně rozděleno v horní i spodní frakci (Obr. 9 A, B, C). Na žádném z rozhraní roztoků sacharózy nebylo dosaženo významného obohacení ER. Vzhledem k nízké míře rozlišení byl tento postup vyhodnocen jako nevyhovující pro izolaci ER.

Plazmatická membrána byla zachycena v Low frakci gradientu (1,5/2,4M), (Obr. 9A, B, C), což odpovídá výsledkům Thomase Hodgese a Davida Millse (Hodges TK and Mills D, 1986). Frakce však obsahovala i kontaminující membrány, především GA (Obr. 9A). Pomocí této separační metody bylo docíleno 69% čistoty plazmatické membrány. Dosažená hodnota se blíží i dříve publikovaným výsledkům purifikace (75–95 %), (Hodges TK and Mills D, 1986). Jak shrnuli Thomas Hodges a David Mills ve své práci, pro izolaci plazmatické membrány je vhodnější použít systému dvoufázového dělení (Hodges TK and Mills D, 1986).

Relativní zastoupení jednotlivých organel v gradientu je uvedeno v Tab. 8.



Obr. 9 Imunodetekce frakcí získaných subcelulární frakcionací suspenzní buněčné kultury *A. thaliana* Ler pomocí sacharóзовého gradientu s horním nanášením. (A) homogenizace pomocí třecí misky a Elv. homogenizéru, (B) Elv. homogenizéru, (C) třecí misky a (D) břitového mixéru. P80 – mikrozomální frakce sloužící jako pozitivní kontrola. Markery: Sar1 ER, H-ATPasa plazmatické membrány, V-ATPasa vakuolární membrány, Sec21p GA.

Tab. 8 Relativní zastoupení organel v jednotlivých frakcích získaných separací s horním nanášením mikrozomální frakce ze suspenzní kultury *A. thaliana* Ler. Hodnota nejvíce zastoupeného typu organely v dané frakci je zvýrazněna tučně. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, PM - plazmatická membrána, Vac - vakuoly, TM+EH - třecí miska + Elv. homogenizér, EH - Elv. homogenizér, TM - třecí miska, Mix - břitový mixér.

Homogenizace Frakce	TM+EH Up	TM+EH Low	EH Up	EH Low	TM Up	TM Low	Mix Up	Mix Low
ER	24 %	18 %	6 %	13 %	5 %	12 %	29 %	13 %
PM	8 %	<b>51 %</b>	3 %	<b>67 %</b>	7 %	<b>69 %</b>	27 %	<b>36 %</b>
GA	25 %	25 %	2 %	8 %	36 %	8 %	12 %	31 %
Vac	<b>43 %</b>	6 %	<b>89 %</b>	12 %	<b>52 %</b>	11 %	<b>32 %</b>	20 %

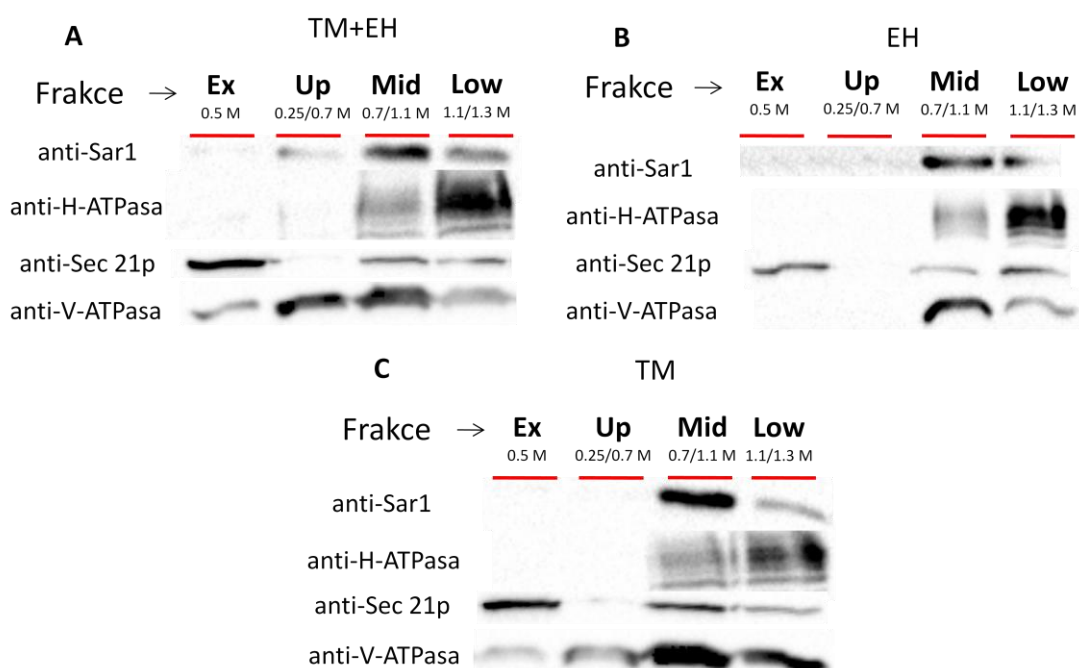
#### 4.2 Subcelulární frakcionace *A. thaliana* Ler pomocí sacharózového gradientu se spodním nanášením extraktu

Extrakty obsahující buněčné kompartmenty z buněčné suspenzní kultury *A. thaliana* Ler získané třemi jemnějšími způsoby homogenizace byly frakcionovány pomocí sacharózového gradientu se spodním nanášením. Separace byla provedena podle protokolu Zhaojuna Dinga využitého k izolaci ER z rostlin *A. thaliana* pro studium mechanismu transportu auxinů (Ding Z et al., 2012).

V tomto uspořádání bylo dosaženo obohacení ER především v Mid frakci (0,7/1,1M), (Obr. 10A, B, C). Jeho relativní zastoupení činilo cca 27 % (Tab. 9). V práci, podle které byl námi použitý protokol modifikován, bylo ER izolováno v Low frakci (1,1/1,3M) gradientu (Ding Z et al., 2012). Důvodem rozdílné frakcionace bylo pravděpodobně použití celých rostlin *A. thaliana*. Hustota buněčných oddílů může být odlišná v závislosti na organismu, typu tkáně (Hodges TK and Mills D, 1986) či stupni vývoje, protože organely jsou vysoce dynamickou entitou (Small I et al., 1998).

V Low frakci (1/1,3M) gradientu došlo k zakoncentrování plazmatické membrány (Tab. 9), která byla vždy ve spodní frakci dominantní (Obr. 10A, B, C). Toto zjištění koresponduje s výsledky separace s horním nanášením (Obr. 9A, B, C). Z tohoto trendu lze usoudit, že z detekovaných organel extrahovaných ze suspenzní buněčné kultury má plazmatická membrána nejvyšší hustotu.

V Up frakci (0,25/0,7M) získané homogenizací TM, respektive TM+EH dominovaly vakuoly (Obr. 10A), které zde představovaly 84 a 96 % z detekovaného signálu (Tab. 9). Dle vizuálního zhodnocení frakcionací lze usoudit, že v experimentech se spodním nanášením došlo k lepší separaci organel (Obr. 9 a 10; Tab. 8 a 9). Frakce jsou navzájem méně kontaminované a organely se zdají být více zakoncentrovány v jednotlivých frakcích. Vzhledem k výše zmíněným výsledkům se nabízí využití této metody k izolaci i jiných organel než jen ER.



Obr. 10 Imunodetekce frakcí získaných subcelulární frakcionací suspenzní buněčné kultury *A. thaliana* Ler pomocí sacharóзовého gradientu se spodním nanášením. (A) homogenizace pomocí třecí misky a Elv. homogenizéru, (B) Elv. homogenizéru a (C) třecí misky. Ex – celkový extrakt sloužící jako pozitivní kontrola. Markery: Sar1 endoplazmatického retikula, H-ATPasa plazmatické membrány, V-ATPasa vakuolární membrány, Sec21p Golgiho aparátu.

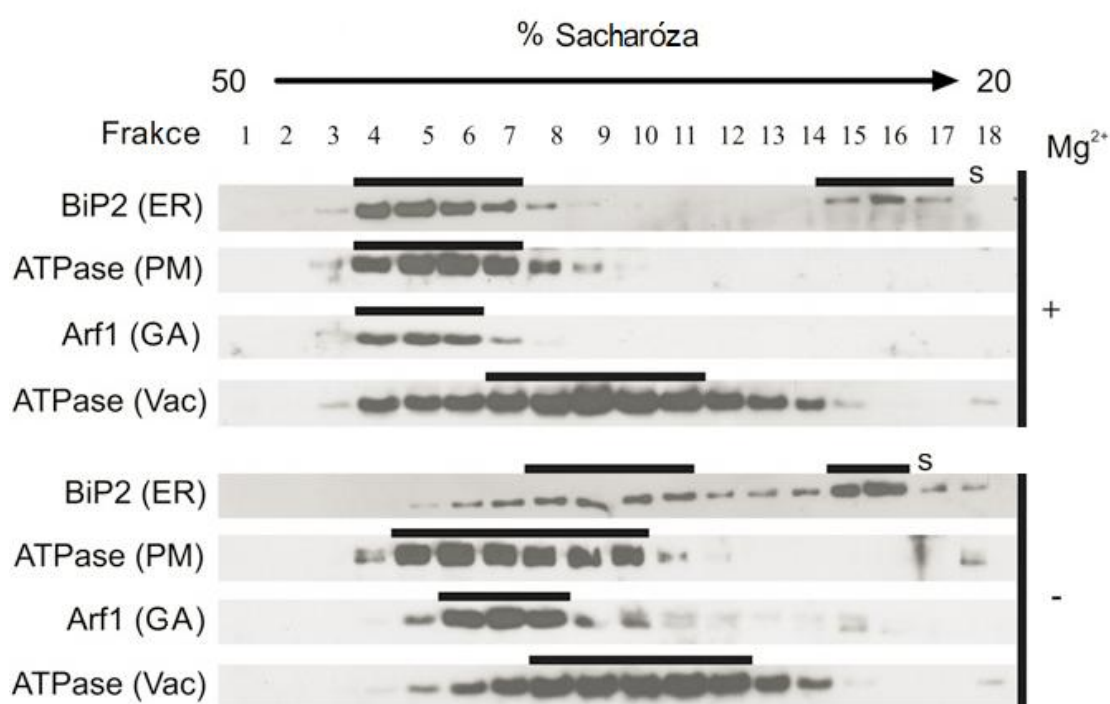
Tab. 9 Relativní zastoupení organel v jednotlivých frakcích získaných pomocí separace organel se spodním nanášením extraktu ze suspenzní kultury *A. thaliana* Ler. Hodnota nejvíce zastoupeného typu organely v dané frakci je zvýrazněna tučně. Up frakce při homogenizaci EH nebyla hodnocena, protože v ní nebyl detekován žádný signál (Obr. 10B), ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, PM - plazmatická membrána, Vac – vakuoly, TM+EH - třecí miska + Elv. homogenizér, EH – Elv. homogenizér, TM - třecí miska.

Homogenizace	TM+EH	TM+EH	TM+EH	EH	EH	TM	TM	TM
Frakce	Up	Mid	Low	Mid	Low	Up	Mid	Low
ER	12 %	27 %	12 %	27 %	10 %	-	28 %	6 %
PM	2 %	25 %	<b>72 %</b>	26 %	<b>75 %</b>	-	22 %	<b>60 %</b>
GA	2 %	10 %	6 %	6 %	7 %	4 %	10 %	5 %
Vac	<b>84 %</b>	<b>38 %</b>	10 %	<b>41 %</b>	8 %	<b>96 %</b>	<b>40 %</b>	29 %

Jako nejlepší byla z hlediska kombinace efektivity a jednoduchosti postupu vyhodnocena izolace ER s homogenizací pomocí TM. Významná kontaminace vakuolami si však vyžádala zařazení dalších purifikačních kroků vedoucích k zakoncentrování ER frakce.

### 4.3 Purifikace frakce obohacené o endoplazmatické retikulum

Hlavním zaměřením této práce bylo vyvinout metodu, pomocí které lze získat frakci obohacenou o ER s minimálním obsahem jiných kompartmentů. Námi použité purifikační postupy bohužel vedly k frakcím, které obsahovaly rovněž významné množství kontaminujících vakuol (Tab. 9). Také v pracích Klaase Wulfetangeho a Yi-Fenga Chena při subcelulární frakcionaci organel pomocí kontinuálního sacharózového gradientu tvořily vakuoly značné znečištění, protože byly přítomny ve většině frakcí (Obr. 11), (Chen Y-F et al., 2002; Wulfetange K et al., 2011). Ve snaze dosáhnout vyšší čistoty izolovaného ER byly proto dále otestovány dva metodické přístupy založené na různém principu.



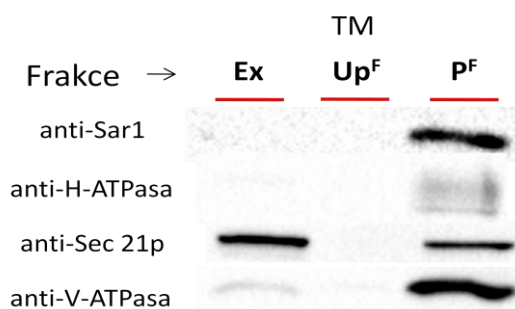
Obr. 11 Mikrozomální frakce z osmnáctidenních rostlin *A. thaliana* byla separována pomocí kontinuálního sacharózového gradientu 20–50% (w/w) za přítomnosti a při absenci  $Mg^{2+}$  iontů. S – volně rozpustný protein BiP2. ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, PM – plazmatická membrána, Vac – vakuoly (převzato z Wulfetange K et al., 2011).

#### 4.3.1 Odstranění vakuol pomocí Ficollového gradientu

První způsob byl odvozen z protokolu vyvinutého pro izolaci vakuol z protoplastů tabáku pomocí gradientu tvořeného roztokem Ficollu (Mettler IJ and Leonard RT, 1979). Bylo předpokládáno, že podle publikované metody budou vakuoly zachyceny na hranici 0% a 3,5% Ficollu (frakce  $U_p^F$ ), přičemž ostatní organely budou sedimentovány na dno zkumavky ( $P^F$ ).

Nejprve byla provedena frakcionace pomocí sacharózového hustotního gradientu se spodním nanášením extraktu. Mid frakce získaná z rozmezí 0,7/1,1M sacharózy obsahující především ER a vakuoly (Obr. 10C, Tab. 9) byla podrobena repurifikaci pomocí dvoupatrového gradientu Ficollu, v souladu s originálním postupem uvedeným v publikaci (Mettler IJ and Leonard RT, 1979). Mid frakce byla nanášena na roztok Ficollu. Následovala centrifugace gradientu při otáčkách 1000 rcf, při které však nedošlo k separaci organel. Dle vizuálního zhodnocení zůstaly kompartmenty pravděpodobně v původním roztoku pufru, protože nedošlo ani k zakoncentrování mikrozomální frakce na rozhraní dvou pater gradientu. Následovalo zvýšení odstředivé síly ve snaze separovat Mid frakci. Gradient byl centrifugován při 80000 rcf. Tato hodnota byla zvolena, protože při těchto otáčkách byla již dříve získána mikrozomální frakce z extraktu (Hodges TK and Mills D, 1986), (Obr. 7). Bylo předpokládáno, že vakuoly budou obohaceny v  $Up^F$  frakci. Pufr, dříve obsahující organely, byl po ultracentrifugaci čirý a na dně zkumavky byl vytvořen pelet. Pro imunodetekci byla odebrána frakce z rozhraní roztoků a repurifikovaný pelet.

Z výsledků imunodetekce je patrné, že vakuoly nebyly ani částečně zachyceny na rozhraní dvou pater gradientu a všechny membránové oddíly obsažené ve střední frakci byly stočeny na dno (Obr. 12). Obsah jednotlivých organel byl obdobný postupu bez purifikace frakce (Obr. 10C). Touto metodou k očekávanému odstranění vakuol nedošlo.



Obr. 12 Imunodetekce membrán suspenzní buněčné kultury *A. thaliana* Ler. Mid frakce získané ultracentrifugací v sacharózovém gradientu, která byla následně repurifikována pomocí gradientu Ficollu. Ex – celkový extrakt,  $Up^F$  – frakce sebraná mezi 0/3,5% Ficollem,  $P^F$  – pelet. Markery: Sar1 ER, H-ATPasa plazmatické membrány, V-ATPasa vakuolární membrány, Sec21p GA. TM – homogenizace třecí miskou.

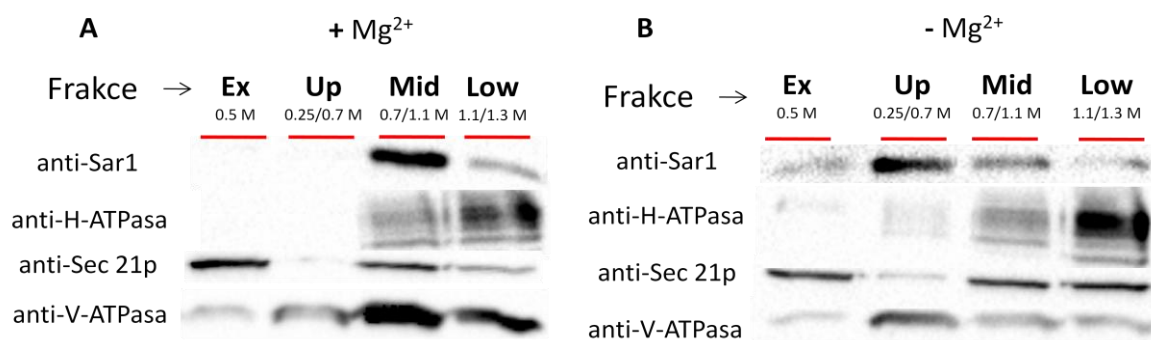


### 4.3.2 Změna hustoty endoplazmatického retikula

ER je centrem proteosyntézy, proto jsou na jeho membránu přisedlé ribozomy. Stabilitu tohoto spojení ovlivňuje přítomnost  $Mg^{2+}$  iontů. Při jejich absenci dochází k disociaci ribozomů z membrány a tím i ke snížení hustoty zmíněné organely, což se projeví charakteristickým posunem ER do vyšších frakcí gradientu (Lord MJ, 1987). Vysycení  $Mg^{2+}$  iontů lze dosáhnout přidáním chelatačního činidla do roztoku. V praxi se využívá EDTA, která přednostně váže právě ionty hořčíku. Na principu změny hustoty ER byly založeny studie zabývající se lokalizací cytokininových (Lomin SN et al., 2011; Wulfetange K et al., 2011) a etylenových receptorů (Chen Y-F et al., 2002).

V našem případě bylo předpokládáno, že ER (extrahované z buněčné kultury) bez přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů bude zachyceno v Up frakci (0,25/0,7M), nebo bude jeho výskyt detekován pouze ve střední frakci.

Z výsledků WB vyplývá, že došlo k částečnému přesunu ER z Mid frakce (0,7/0,1M) do Up frakce (0,25/0,7M), (Obr. 13). Tímto způsobem došlo k obohacení ER v Up frakci, která vykazovala nižší obsah vakuol a minoritní množství plazmatické membrány a GA. V získané Up frakci bylo obsaženo 54 % membrán ER a 35 % tonoplastu (Tab. 10).



Obr. 13 Imunodetekce frakcí získaných subcelulární frakcionací suspenzní buněčné kultury *A. thaliana* Ler. Buňky byly homogenizovány v TM. Organely byly separovány v gradientu se spodním nanášením (A) v přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů a (B) s jejich absencí. Ex – celkový extrakt sloužící jako pozitivní kontrola. Markery: Sar1 ER, H-ATPase plazmatické membrány, V-ATPase vakuolární membrány, Sec21p GA.

Tab. 10 Relativní zastoupení organel v jednotlivých frakcích získaných separací se spodním nanášením extraktu ze suspenzní kultury *A. thaliana Ler* bez přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů. Hodnota nejvíce zastoupeného typu organely v dané frakci je zvýrazněna tučně. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, PM - plazmatická membrána, Vac – vakuoly, TM - homogenizace třecí miskou.

Homogenizace Frakce	TM Up	TM Mid	TM Low
ER	<b>54 %</b>	20 %	5 %
PM	7 %	<b>45 %</b>	<b>72 %</b>
GA	4 %	22 %	16 %
Vac	35 %	13 %	7 %

Metodou subcelulární frakcionace se spodním nanášením extraktu ze suspenzní kultury *A. thaliana Ler* v kombinaci vysycením  $Mg^{2+}$  iontů bylo dosaženo nejlepšího obohacení ER – 54 % s nejnižším procentem kontaminujících membrán. V Up frakci došlo k signifikantnímu zakoncentrování ER oproti celkovému extraktu, ve kterém byl detekován velmi slabý signál. Vakuoly tvořící 35 % membrán ve frakci však stále představují významnou kontaminaci. V dalších krocích tedy bude nutné dále zvýšit efektivitu purifikačního protokolu.

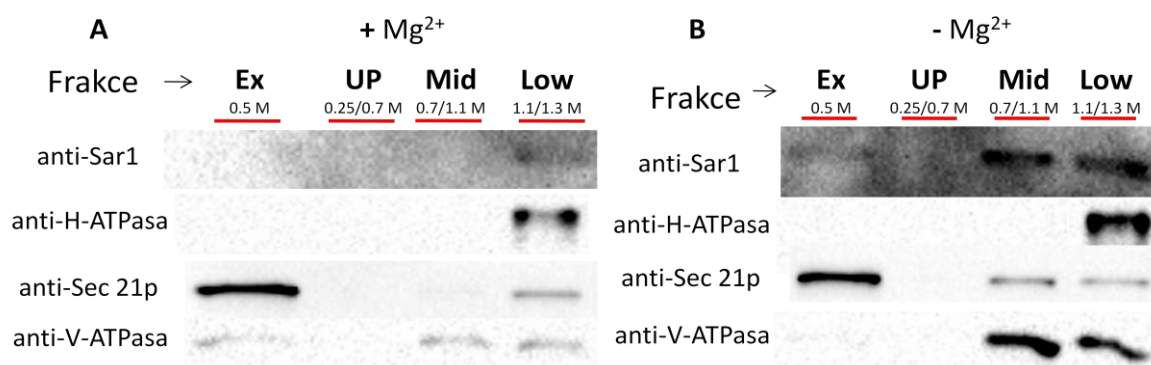
#### 4.4 Frakcionace organel semenáčků *A. thaliana Col-0*

Metoda frakcionace organel se spodním nanášením byla aplikována i na šestidenní semenáčky *A. thaliana Col-0* (Ding Z et al., 2012). Intaktní rostliny jsou obecně vhodnějším modelem, protože lépe reprezentují fyziologické procesy v komplexních biologických systémech. Bylo také předpokládáno, že v mladých semenáčcích nebudou vakuoly plně diferencovány, a proto nebudou komigrovat s ER jako v předešlých pokusech.

Stejně jako v případě *Ler* kultury byla kromě standardního postupu provedena i varianta frakcionace bez  $Mg^{2+}$  iontů ve snaze otestovat migraci rostlinného ER v diskontinuálním gradientu. Materiál byl homogenizován žiletkou, dle původního protokolu (Ding Z et al., 2012). Při imunodetekci markerů organel získaných separací za přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů nebyl v žádné z frakcí detekován signál markeru ER. Frakce bez obsahu  $Mg^{2+}$  vykazovaly signál ER na hranici limitu detekce v Mid (0,7/1,1M) i Low (1,1/1,3M) frakci až po 10 minutách expozice (Obr. 14B).

Jedním z důvodů detekce slabého signálu může být použití nedostatečného množství vstupního materiálu, které není uvedeno v původním článku (Ding Z et al., 2012). Další možností je, že homogenizace semenáčků žiletkou nebyla ideální, přičemž ER nebylo uvolněno do extrakčního pufru, nebo nedošlo k jeho dostatečnému oddělení od jaderné membrány. To mohlo vést k nechtěnému odstranění ER z extraktu už při centrifugaci 10000 rcf na začátku experimentu.

Přítomnost částí jaderného obalu mohlo ovlivnit i frakcionaci ER rostlin, při které bylo rozděleno mezi Mid (0,7/1,1M) a Low (1,1/1,3M) frakci bez obsahu  $Mg^{2+}$  iontů (Obr. 14B). Naproti tomu ER izolované ze suspenzní kultury bylo zachyceno v Up (0,25/0,7M) a Mid frakci (0,7/1,1M), (Obr. 12B). Tento problém může být vyřešen zapojením další homogenizační metody.



Obr. 14 Imunodetekce frakcí získaných subcelulární frakcionací šestidenních semenáčků *A. thaliana*. Organely byly separovány v gradientu se spodním nanášením (A) v přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů a (B) s jejich absencí. Ex – celkový extrakt sloužící jako pozitivní kontrola. Markery: Sar1 ER, H-ATPase plazmatické membrány, V-ATPase vakuolární membrány, Sec21p GA.

V článku, ze kterého byl převzat protokol izolace ER, bylo podle tvrzení autorů dosaženo obohacení Low frakce o ER rostlin *A. thaliana* bez přítomnosti nečistot (Ding Z et al., 2012). Ve studii však byla vyloučena přítomnost pouze plazmatické membrány na základě detekce auxinového přenašeče PIN1, přičemž výsledky frakcionace nebyly v článku zveřejněny. Námí provedený postup vykazoval obsah kontaminujících membrán zejména plazmatické membrány a vakuol, které ve zmiňované práci nebyly stanovovány (Tab. 11).

V Low frakci (1,1/1,3M) gradientu v obou variantách dominoval obsah plazmatické membrány, obdobně jako i u předchozích experimentů (Obr. 9, 10, 13; Tab. 8, 9, 10), přičemž představovala mírně přes 50 % obsahu všech detekovaných membrán. V Mid frakci (0,7/1,1M) z 66 % převažovaly vakuoly. Relativní zastoupení organel izolovaných ze semenáčků *A. thaliana* je uvedeno v Tab. 11.

Tab. 11 Relativní zastoupení organel v jednotlivých frakcích získaných separací se spodním nanášením extraktu z šestidenních semenáčků *A. thaliana* Col-0. Hodnota nejvíce zastoupeného typu organely v dané frakci je zvýrazněna tučně. ER - endoplazmatické retikulum, GA - Golgiho aparát, PM - plazmatická membrána, Vac – vakuoly.

Homogenizace Obsah Mg <sup>2+</sup> Frakce	Žiletka +	Žiletka +	Žiletka -	Žiletka -
	Mid	Low	Mid	Low
ER	-	24 %	21 %	18 %
PM	-	<b>55 %</b>	-	<b>51 %</b>
GA	3 %	12 %	13 %	5 %
Vac	<b>97 %</b>	9 %	<b>66 %</b>	26 %

#### 4.5 Hmotnostní analýza a vyhodnocení obohacení frakcí

Proteiny obsažené v jednotlivých frakcích sacharózového gradientu byly naštěpeny v roztoku. Ve snaze snížit komplexitu vzorku a dosáhnout tak většího množství identifikovaných proteinů byly peptidy následně separovány SCX frakcionací. Identifikace peptidů byla provedena pomocí nLC-MS/MS. Seznamy stanovených proteinů odpovídající jednotlivým frakcím gradientu sacharózy byly dále analyzovány.

V každé z purifikovaných frakcí byl identifikován odlišný počet proteinů (Tab. 12). V experimentech vycházejících z buněk suspenzní kultury *A. thaliana* Ler bylo detekováno méně proteinů než z rostlinek šestidenních semenáčků. To může být způsobeno rozdílnou komplexitou použitého biologického materiálu. Pro subcelulární frakcionaci byly použity celé sazeničky, ve kterých se vyskytuje značné množství rozličných typů pletiv disponujících odlišným proteomem. Ve srovnání s tím představuje suspenzní kultura relativně uniformní zdroj biologického materiálu, jenž je charakteristický jedním typem buněk.

Nejvíce proteinů bylo identifikováno v Low frakcích získaných z *A. thaliana* Col-0. Tento fakt koresponduje s výsledky imunodetekce, protože v Low frakcích byl zaznamenán intenzivnější signál než v ostatních frakcích. Možnou příčinou je přítomnost fragmentů jaderné membrány integrovaných s ER, neboť při MS analýze byl identifikován i RAN2 protein lokalizovaný v jaderné obálce (<http://www.uniprot.org/uniprot/P41917>). Dalším důvodem může být zakoncentrování větších a těžších kompartmentů získaných nedostatečnou homogenizací. Ve zmíněných frakcích byl také detekován výskyt chloroplastových a mitochondriálních proteinů.

Tab. 12 Počty proteinů identifikovaných v jednotlivých frakcích sacharózového gradientu.

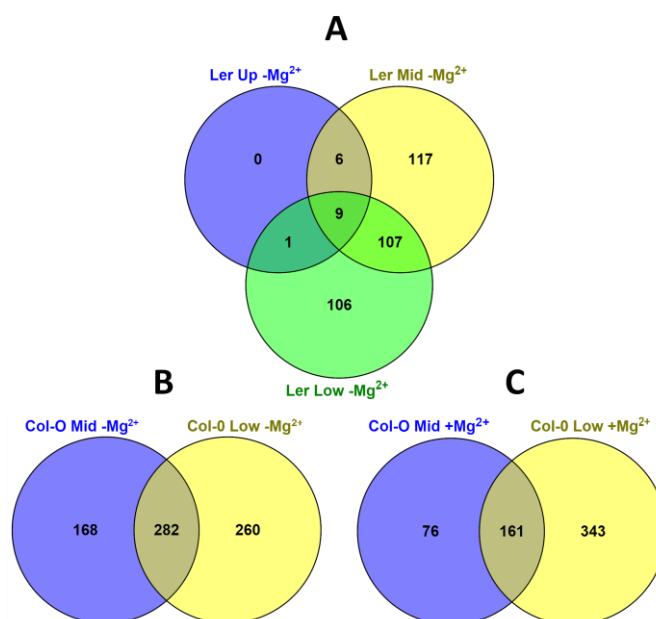
Biologický materiál	Frakce	Obsah Mg <sup>2+</sup>	Počet identifikací
<i>A. thaliana Ler</i>	Up	-	16
	Mid	-	239
	Low	-	223
<i>A. thaliana Col-0</i>	Up	-	0
	Mid	-	450
	Low	-	542
	Up	+	0
	Mid	+	237
	Low	+	504

Cílem subcelulární frakcionace bylo získat frakce obohacené o různé organely. Dá se usuzovat, že každá taková frakce bude obsahovat podstatnou část unikátních proteinů specifických pro konkrétní buněčný kompartment. Z toho důvodu byl stanoven počet jedinečných a společných proteinů v každé z frakcí v rámci jednoho gradientu (Obr. 15). I kdyby bylo dosaženo ideální izolace organel, jistá část proteinů by byla společná. Je odhadováno, že více než 35 % proteinů má vícenásobnou lokalizaci v buňce (Zhang S et al., 2008).

V Up frakci získané ze suspenzní kultury nebyl identifikován žádný jedinečný protein, protože v ní bylo identifikováno pouze 16 bílkovin hojně zastoupených v celé buňce. Zbylé dvě frakce obsahovaly při vzájemném srovnání cca 50 % unikátních proteinů každá (Obr. 15A).

V Mid frakcích získaných subcelulární frakcionací semenáčků s absencí Mg<sup>2+</sup> iontů či jejich přítomností bylo identifikováno zhruba 35 % jedinečných proteinů. Tomu se vymykaly Low frakce obou provedených variant, přičemž ve frakci bez přítomnosti zmíněných iontů bylo zastoupeno 48 % (Obr. 15B) a s jejich obsahem 68 % (Obr. 15C) specifických proteinů ze všech identifikovaných bílkovin v téže frakci.

Tento výsledek výrazně přesahuje běžnou opakovatelnost proteomických experimentů, při které se počet proteinů identifikovaných v tomtéž vzorku liší přibližně o 30 %. Vysoké relativní zastoupení unikátních proteinů v Low frakci s obsahem Mg<sup>2+</sup> iontů je pravděpodobně způsobeno obohacením této frakce o ER a také obsahem velkých fragmentů vzniklých nedostatečnou homogenizací. Oproti variantě s vysycením zmíněných iontů chelatačním činidlem nebyly pozorovány tak výrazné rozdíly, protože patrně došlo k částečnému přesunu ER do Mid frakce.



Obr. 15 Vennovy diagramy znázorňující počet společných a unikátních proteinů. **(A)** zastoupení identifikovaných proteinů ve frakcích získaných ze suspenzní kultury *A. thaliana* Ler v sacharózovém gradientu bez přítomnosti Mg<sup>2+</sup> iontů. **(B)** v šestidenních semenáčcích *A. thaliana* Col-0 s absencí Mg<sup>2+</sup> iontů a **(C)** při jejich prezenci.

#### 4.5.1 Zastoupení markerů ve frakcích

V seznamech proteinů identifikovaných pomocí MS byly vyhledány markery organel detekované pomocí WB (H-ATPasa, Sar1, Sec21p a V-ATPasa). Dále byly také hledány CRD1 chloroplastový protein (Lang EGE et al., 2011) účastníci se biosyntézy chlorofylu a mitochondriální marker COX2 zapojený v dýchacím řetězci (Vanlerberghe GC et al., 1994).

Zastoupení markerů v jednotlivých frakcích sacharózového gradientu je uvedeno v Tab. 13. Trend jejich výskytu v jednotlivých frakcích koresponduje s intenzitami signálů z WB, což potvrdilo i semikvantitativní vyhodnocení MS dat na základě počtu identifikovaných peptidů daného proteinu. MS analýzou byla verifikována separace organel do jednotlivých frakcí gradientu.

Některé markery byly pomocí MS detekovány i ve frakcích, ve kterých nebyl při imunodetekci zaznamenán žádný signál, protože MS disponuje ve většině případů nižším limitem detekce než WB. Názorným příkladem je marker plazmatické membrány (H-ATPasa) identifikovaný v Mid frakci (0,7/1,1M) získané ze semenáčků *A. thaliana* Col-0. Tyto markery však v daných frakcích vykazovaly minoritní zastoupení, jak bylo ověřeno semikvantitativní analýzou.

Zajímavé je, že v žádné frakci nebyl identifikován marker (Sec21p) GA. Retikulární protein Sar1 také nebyl signifikantně zastoupen ve frakcích, které vykazovaly výrazné obohacení o ER. To může být zapříčiněno principem výběru peptidových iontů k fragmentaci

při data dependentní analýze. Volba peptidů, které budou fragmentovány, je do jisté míry náhodný proces. Vždy je vybrán stanovený počet nejintenzivnějších peptidů limitovaný výkonností přístroje. Schopnost ionizace unikátního peptidu daného proteinu také ovlivňuje jeho intenzitu. Proto byl v seznamech identifikovaných proteinů vyhledán i chaperon CALR1, alternativní marker ER (Parsons HT et al., 2012). Tento protein vykazoval obdobné zastoupení právě jako Sar1 detekovaný WB.

Tab. 13 Relativní zastoupení markerů stanovené na základě semikvantitativního vyhodnocení počtu identifikovaných peptidů. (-) znamená absenci markeru, (+) hodnota spadající do 4. a 3. kvartilu, (++) 2. kvartilu a (+++) 1. kvartilu. ER - endoplazmatické retikulum, PM - plazmatická membrána, Vac - vakuoly, GA - Golgiho aparát, Mit - mitochondrie, Chl - chloroplasty.

Biologický materiál	Frakce	Obsah Mg <sup>2+</sup>	Sar1 (ER)	CALR1 (ER)	H-ATPasa (PM)	V-ATPasa (Vac)	Sec21p (GA)	COX2 (Mit)	CRD1 (Chl)
<i>A. thaliana</i> <i>Ler</i>	Up	-	-	-	-	+++	-	-	-
	Mid	-	-	+++	+	+++	-	-	-
	Low	-	-	++	+++	++	-	-	-
<i>A. thaliana</i> Col-0	Mid	-	+	++	+++	+++	-	-	-
	Low	-	+	+	+++	+++	-	+	+
	Mid	+	-	+	+++	+++	-	-	-
	Low	+	+	++	+++	+++	-	+	+

V Low frakci v obou variantách experimentů provedených na semenáčcích *A. thaliana* byly identifikovány i markery chloroplastů a mitochondrií, avšak po semikvantitativním vyhodnocení spadaly do čtvrtého, maximálně třetího kvartilu (Tab. 13), což znamená jejich minimální zastoupení. Přítomnost chloroplastů lze vysvětlit tím, že rostlinky byly pěstovány za přítomnosti světla, a tak se chloroplasty mohly plně rozvinout. Naproti tomu suspenzní kultura byla inkubovaná ve tmě, proto nedošlo k vývoji plně diferenciovaných chloroplastů.

#### 4.6 Gene-ontology analýza

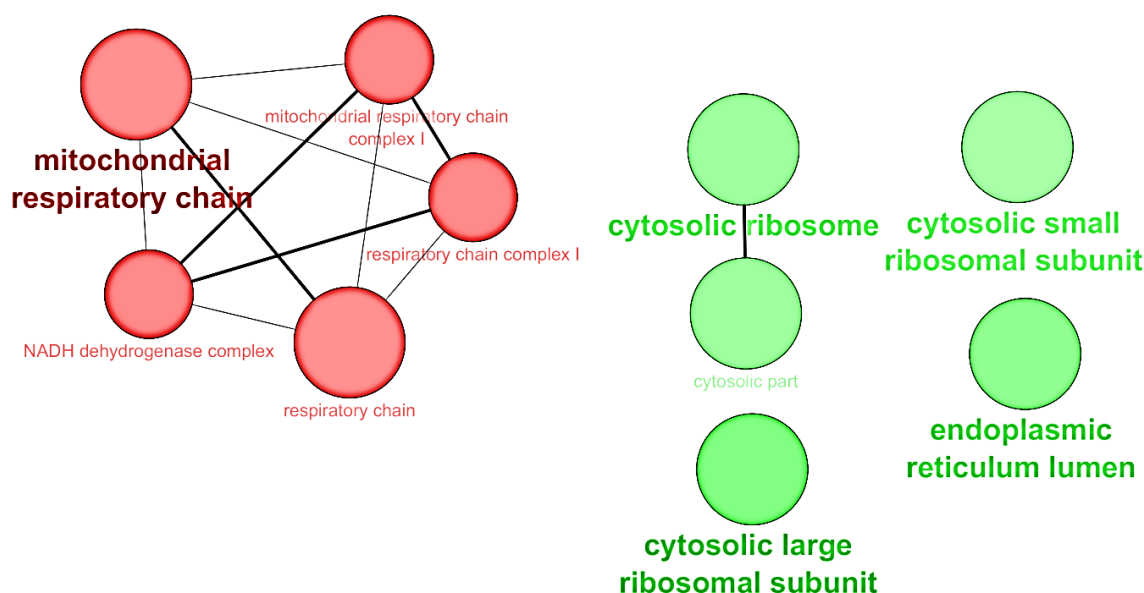
Byla provedena GO analýza detekovaných proteinů. Seznamy proteinů identifikovaných v jednotlivých frakcích sacharózového gradientu byly analyzovány aplikací ClueGO (Bindea G et al., 2009) v programu Cytoscape (Shannon P et al., 2003), aby bylo ověřeno obohacení frakcí o dané organely stanovené WB. Proteiny obsažené v jednotlivých frakcích byly nejprve porovnány proti databázi všech známých proteinů *A. thaliana* a byly jim přiřazeny termíny spojené s buněčnou komponentou (Cellular component). Podle počtu přiřazených termínů bylo stanoveno obohacení jednotlivých skupin proteinů a současně bylo provedeno porovnání zastoupení termínů mezi dvěma frakcemi.

GO analýze nebyly podrobeny Up frakce, protože v nich nebyl identifikován dostatečný počet proteinů pro tento typ analýzy. Pomocí ClueGO aplikace byly mezi sebou porovnány Mid a Low frakce téhož gradientu, čímž lze zjistit rozdíly v obohacení frakcí o konkrétní organely nebo části kompartmentů v rámci jedné varianty frakcionace. Dále byly porovnány ekvivalentní frakce získané z obou variant subcelulární frakcionace semenáčků (Mid +Mg<sup>2+</sup> vs. Mid -Mg<sup>2+</sup> a Low +Mg<sup>2+</sup> vs. Low -Mg<sup>2+</sup>) se záměrem určit odlišnosti separace v závislosti na přítomnosti či absenci Mg<sup>2+</sup> iontů.

#### 4.6.1 Porovnání frakcí gradientu z *A. thaliana* Ler s absencí Mg<sup>2+</sup> iontů

V této analýze byly porovnány proteiny identifikované v Mid a Low frakci gradientu vycházejících ze suspenzní kultury *A. thaliana* Ler. Při imunodetekci byl pozorován v Mid frakci (0,7/1,1M) signál všech stanovovaných organel (Obr. 13B). Jako dostatečně signifikantní však bylo vyhodnoceno pouze obohacení o proteiny lumen ER, ribozomů a jejich velkých i malých podjednotek (Obr. 16). Tento výsledek vypovídá o významném obohacení ER v Mid frakci potvrzující výsledek imunoblotu. S tím souvisí i výrazné zastoupení ribozomů.

Dle vyhodnocení WB byl v Low frakci (1,1/1,3M) detekován převážně signál plazmatické membrány. Příspěvek proteinů plazmatické membrány byl patrně vyhodnocen jako nesignifikantní. Z GO analýzy však vyplývá, že spodní frakce obsahovala proteiny dýchacího řetězce, což nasvědčuje přítomnosti vnitřní mitochondriální membrány (Obr. 16).



Obr. 16 Grafické znázornění identifikovaných proteinů ze suspenzní buněčné kultury *A. thaliana* Ler ve frakcích bez přítomnosti Mg<sup>2+</sup> iontů. Bílkoviny byly rozděleny do klastrů podle výskytu v buňce. Velikost uzlů znázorňuje význam obohacení. Míra sytosti spotů odpovídá signifikanci dané skupiny. Low frakce je znázorněná červeně a Mid frakce zeleně.



#### 4.6.2 Porovnání frakcí gradientu z *A. thaliana* Col-0 s absencí Mg<sup>2+</sup> iontů

Z výsledků GO analýzy frakcí sacharózového gradientu bez obsahu Mg<sup>2+</sup> iontů ze semenáčků *A. thaliana* Col-0 lze vyčíst, že i v tomto případě byla Mid frakce obohacena podle předpokladu o proteiny lumen ER (Obr. 17), stejně jako u experimentu provedeného na suspenzní kultuře. Podle originálního protokolu by mělo dojít v přítomnosti Mg<sup>2+</sup> iontů k zachycení ER v Low frakci gradientu (Ding Z et al., 2012). V našem provedení separace bez obsahu zmíněných iontů došlo k destabilizaci ribozomů a jejich uvolnění z membrány ER, což vede k snížení jeho hustoty (Lord MJ, 1987). Z této příčiny je ER obohaceno ve vyšších frakcích, v tomto případě v Mid frakci.

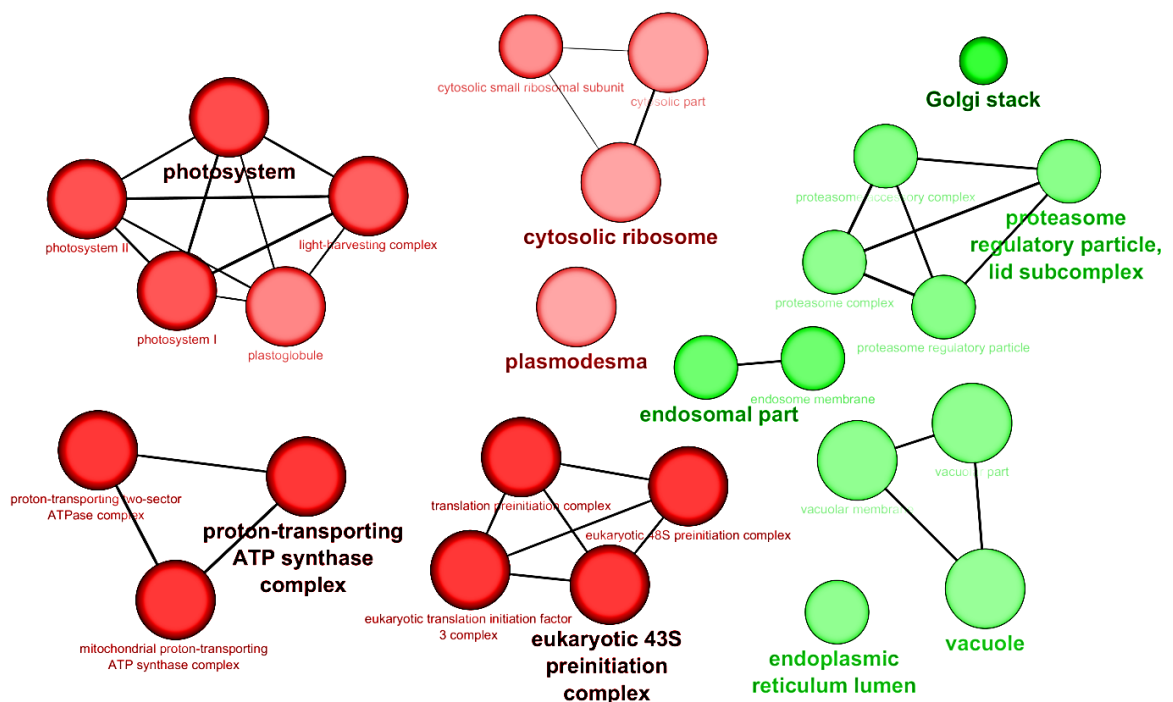
Dále byla Mid frakce obohacena o regulační částice proteazomů nativně se vyskytující v cytosolu, proteiny vakuol, endozomu a střední části GA (Obr. 17). Výstup GO analýzy koresponduje s výsledky z imunoblotu, při kterém byl pozorován signál Vakuol i GA v této frakci (Obr. 14B).

V Low frakci byla zaznamenána především zvýšená přítomnost proteinů vnitřní membrány mitochondrií (komplex ATPsyntázy), poukazující na jejich zastoupení téže frakci. Zřejmě v souvislosti se zvýšeným výskytem fragmentů plazmatické membrány došlo v této frakci k obohacení i proteinů lokalizovaných v plazmodezmatech.

V této frakci byly dále obsaženy i proteiny fotosystému vyskytující se v chloroplastech (Obr. 17). Jejich přítomnost, bylo možné předpokládat, protože organely byly extrahovány především ze „zeleného“ materiálu. Navíc bylo při frakcionaci registrováno zelené zabarvení Low frakce. Výskyt mitochondrií a chloroplastů neodstraněných centrifugací při 10000 rcf lze předpokládat právě v této frakci, protože patří k těžším organelám (Vertommen A et al., 2011). Z toho plyne, že všechny Low frakce, i ze suspenzní kultury, obsahují více kontaminujících kompartmentů, než bylo původně předpokládáno.

GO analýzou frakcí organel získaných ze semenáčků separovaných v gradientu obsahujícím Mg<sup>2+</sup> ionty byl zjištěn jediný významný rozdíl. Obě frakce byly rovnoměrně obohaceny o ER. Tato skutečnost je v souladu se specifickým posunem zmíněného kompartmentu (Lord MJ, 1987).

GO analýza potvrdila nižší efektivitu subcelulární frakcionace kompartmentů extrahovaných ze semenáčků *A. thaliana* Col-0 ve srovnání se suspenzní kulturou *A. thaliana* Ler. Příčinou může být nedostatečná homogenizace materiálu s následnou extrakcí větších buněčných komplexů, které byly zachyceny v Low frakci.

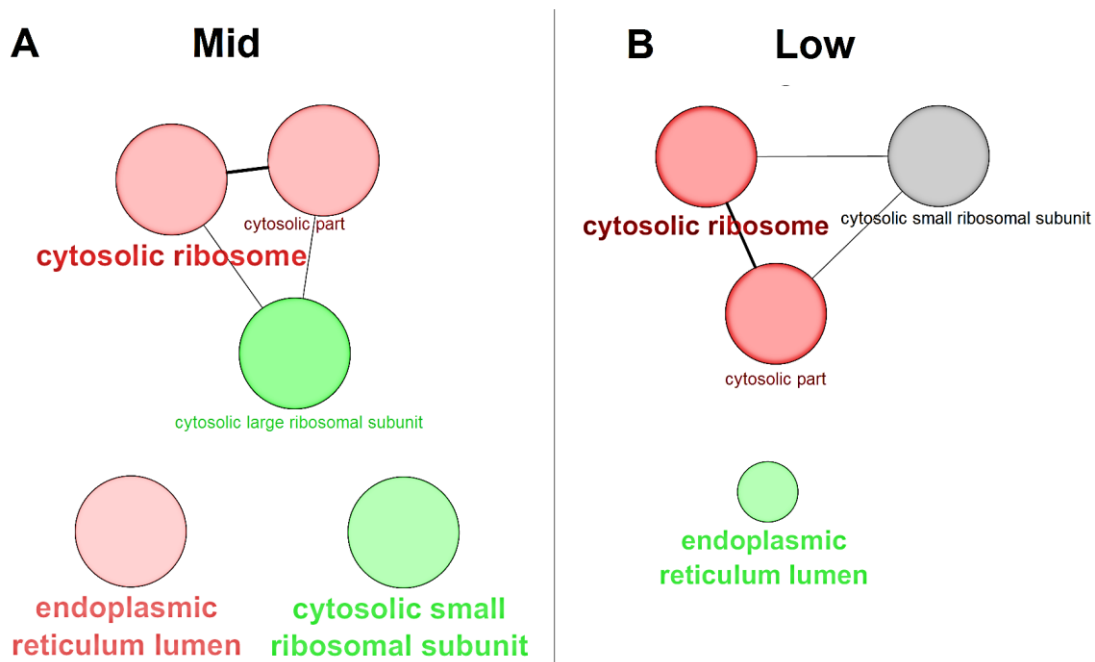


Obr. 17 Grafické znázornění identifikovaných proteinů z šestidenních semenáčků *A. thaliana* Col-0 ve frakcích bez přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů. Proteiny byly rozděleny do klastrů podle výskytu v buňce. Velikost uzlů znázorňuje význam obohacení. Míra sytosti spotů odpovídá signifikanci dané skupiny. Low frakce je znázorněná červeně a Mid frakce zeleně.

#### 4.6.3 Posun ER v závislosti na přítomnosti či absenci $Mg^{2+}$ iontů

Z důvodu vysokého počtu různých kompartmentů extrahovaných z rostlin *A. thaliana* v Low frakci byla otestována varianta gradientu bez obsahu iontů hořčičku, protože byl předpokládán posun ER do méně kontaminované frakce. Jak již bylo zmíněno výše, v závislosti na přítomnosti či absenci  $Mg^{2+}$  iontů lze docílit specifického posunu ER v gradientu z důvodu snížení jeho hustoty. Toho lze dosáhnout vysycením zmíněných iontů, což vede k snížení stability a následné disociaci ribozomálního komplexu lokalizovaného na membráně ER, který se rozpojí na dvě podjednotky (Lord MJ, 1987). Pro potvrzení výsledků

Aby byla ověřena schopnost posunu ER v gradientu, byly porovnány odpovídající frakce gradientu s obsahem či absencí  $Mg^{2+}$  iontů (Obr. 19). Výsledky GO analýzy potvrdili posun ER při použití diskontinuálního gradientu. Při absenci  $Mg^{2+}$  iontů došlo tedy k přesunu ER do Mid frakce (Obr. 19A) na rozdíl od varianty gradientu, který ionty obsahoval. Při jejich přítomnosti bylo ER obohaceno v Low frakci (Obr. 19B), (Ding Z et al., 2012). Ve studiích zabývajících se lokalizací proteinů v ER bylo využito jeho specifického posunu v kontinuálním gradientu (Chen Y-F et al., 2002; Lomin SN et al., 2011; Wulfetange K et al., 2011).



Obr. 19 Porovnání posunu ER šestidenních semenáčků *A. thaliana* Col-0 v závislosti na přítomnosti (zeleně) či absenci  $Mg^{2+}$  iontů (červeně), rovnoměrné zastoupení v obou frakcích (šedě). **(A)** Srovnání Mid frakcí (0,7/1,1M) a **(B)** Low frakcí (1,1/1,3M). Na obrázku jsou znázorněny jen klastry, které mají souvislost s ER.

## 5 Závěr

Původním cílem této práce bylo vyvinout postup frakcionace organel v diskontinuálním sacharózovém gradientu, kterým by bylo možné oddělit ideálně vakuoly, GA a ER během jedné separace. V praxi se ukázalo, že tento úkol v rámci rozsahu diplomové práce nelze obstojně splnit, protože biologické systémy jsou natolik komplexní a dynamické zároveň, že izolace organel je velice obtížná. Postup purifikace konkrétního kompartmentu je mnohem jednodušší optimalizovat na základě specifikací dané organely.

Novým záměrem se stalo vyvinutí metody separace organel, pomocí které lze získat frakci obohacenou o ER s minimálním obsahem jiných kompartmentů. Ve snaze dosáhnout ideální míry desintegrace materiálu byly testovány čtyři způsoby homogenizace a to břitovým mixérem, třecí miskou, Elvehjemovým homogenizérem a spojení posledních dvou zmíněných technik. Bylo zjištěno, že způsob homogenizace značně ovlivňuje výsledek separace organel v sacharózovém gradientu. Homogenizace břitovým mixérem byla vyhodnocena jako zcela nevyhovující z důvodu nadměrné destrukce buněčných oddílů, které pak nebylo možné v hustotním gradientu rozdělit. Ze třech zbývajících způsobů byla jako nejefektivnější a současně nejsnadněji proveditelná vyhodnocena homogenizace v TM.

Dále byly testovány dvě odlišné varianty nanášení extraktu organel na dva různě sestavené sacharózové diskontinuální gradienty. Separace organel s horním nanášením mikrozomální frakce poskytovala vzájemně kontaminované frakce organel, které byly přítomny v průběhu celého gradientu. Subcelulární frakcionace se spodním nanášením extraktu vykazovala slibnější výsledky, protože frakce byly méně kontaminované a navíc došlo k jejich zakoncentrování. Zastoupení jednotlivých organel bylo stanoveno pomocí Western blotu.

K nejvýraznějšímu obohacení retikula došlo v Mid frakci gradientu, která ale obsahovala značné kontaminace, především vakuoly. Při použití TM s EH, nebo pouze TM došlo k signifikantnímu obohacení vakuol v Up frakci. Plazmatická membrána byla vždy nejvíce obohacena v nejnižší frakci gradientu bez závislosti na použitém způsobu homogenizace. Z těchto důvodů je možné využít vyvinutý protokol i pro separaci dalších kompartmentů buňky.

Z důvodu přítomnosti významného množství vakuol ve frakci obohacené o ER, byly testovány dvě modifikace izolačního postupu, aby bylo dosaženo vyšší čistoty retikula. Jako první byla provedena repurifikace Mid frakce Ficollovým gradientem podle metody izolace vakuol, se záměrem dosáhnout jejich odstranění. Tento způsob přečištění frakce bohužel neměl žádný účinek.

Druhou možností byla změna hustoty ER prostřednictvím disociace ribozomů z membrány retikula. Touto variantou bylo dosaženo přesunu ER z Mid do Up frakce, čímž bylo získáno ER o nejvyšší dosažené čistotě 54 %. Up frakce obsahovala bohužel i 35 % vakuol, ale minoritní množství GA a plazmatické membrány.

Postup spodního nanášení extraktu byl také využit k separaci organel extrahovaných z šestidenních semenáčků *A. thaliana* Col-0 homogenizovaných žiletkou. Experiment byl proveden s přítomností i při absenci  $Mg^{2+}$  iontů. V tomto experimentu se signál markeru ER pohyboval na hranici detekce. Tento výsledek byl pravděpodobně způsoben nedostatečnou homogenizací semenáčků *A. thaliana* nebo použitím nedostatečného množství vstupního materiálu.

V získaných frakcích byly identifikovány proteiny pomocí nLC-MS/MS. Seznamy proteinů byly dále podrobeny GO analýze. Výsledky analýzy potvrdily, že Mid frakce bez obsahu  $Mg^{2+}$  iontů získaná z frakcionace buněčné suspenzní kultury *A. thaliana* Ler byla významně obohacena o proteiny ER a ribozomů. V Low frakci byly komplexy respiračního řetězce, z čehož vyplývá, že frakce byla kontaminovaná i mitochondriemi.

Po subcelulární separaci organel z šestidenních semenáčků *A. thaliana* Col-0 s absencí  $Mg^{2+}$  iontů byla získána Mid frakce s významným obsahem ER, vakuol, GA, endozomu a regulačních částic proteazomu. Nízká míra rozlišení v tomto případě byla způsobena pravděpodobně nízkou mírou homogenizace. Při srovnání stejných frakcí z obou variant gradientů byl pozorován specifický posun ER v závislosti na přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů na rozhraní dvou sacharóz s nižší hustotou.

V pracích zabývajících se studiem lokalizace proteinů na ER bylo využito frakcionace organel v kontinuálním sacharózovém gradientu. Většina organel komigrovala do stejných frakcí, proto bylo využito posunu ER v gradientu, aniž by byla získána jeho čistá frakce. Pomocí námi vyvinutého protokolu byla získána relativně čistá frakce obohacená o ER suspenzní kultury, která byla kontaminovaná pouze vakuolami.

V dalších krocích bude vyvíjený postup frakcionace optimalizován pro izolaci ER ze semenáčků *A. thaliana*. V budoucnu by měla být metoda využita k metabolickému profilování rostlinných hormonů v ER.

## 6 Seznam použité literatury

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2006) Vnitrobuněčné oddíly a transport. In: *Základy buněčné biologie*, 2<sup>nd</sup> edition, Pp 447–480, Espero, ČR

Ali I, Aboul-Enein HY, Singh P, Singh R and Sharma B (2010) Separation of biological proteins by liquid chromatography. *Saudi Pharm J*, 18, 59–73

de Araujo ME, Huber LA and Stasyk T (2008) Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation. *Methods MolBiol*, 424, 317–331

Barnini S, Gheralid E, Brucculeri V, Morici P and Lupetti A (2015) Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate. *BMC Microbiol*, 15, 124–132

Bar-Peled M and Raikhel NV (1997) Characterization of AtSEC12 and AtSAR1 – Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol*, 114, 315–324

Bindea G, Melcnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman HW, Pages F, Trajanovsky Z and Galon J (2009) ClueGO: A cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathways annotation networks. *Bioinformatics*, 25, 1091–1093

Bosco CD, Dovzhenko A, Liu X, Woemer N, Rench T, Eismann M, Eimer S, Hegermann J, Paponov IA, Ruperti B, Heberle-Bors E, Touraev A, Cohen JD and Palme K (2012) The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis. *Plant J*, 71, 860–870

Campbell NA and Reece JB (2006) Putování buňkou. In: *Biologie*, 1<sup>st</sup> edition, Pp. 109–126, Computerpress, ČR

Carrier DJ, Bakar NT, Swarup R, Callaghan R, Napier RM, Bennett MJ and Kerr ID (2008) The binding of auxin to the Arabidopsis auxin influx transporter AUX1. *Plant Physiol*, 148, 529–535

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A and Wolk DM (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a future fundamental shift in routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 26, 547–603

De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R and Appelmans F (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, 60, 604–617

Degasperi A, Britwistle MR, Volinsky N, Rauch J, Kolch W and Kholodenko BN (2014) Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PLoS One*, 9, e87293

- Ding Z, Wang B, Moreno I, Duplakova N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Pencik A, Chen X, Tejos R, Skupa P, Pollmann S, Mravec J, Petrasek J, Zazimalova E, Honys D, Rolcik J, Murphy A, Orellana A, Geisler M and Friml J (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 3, 941
- Glick BS and Pon LA (1995) Isolation of high purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, 260, 213–223
- Grabski S, De Feijter AW and Schindler M (1993) Endoplasmic reticulum forms a dynamic continuum for lipid diffusion between contiguous soybean root cells. *Plant Cell*, 5, 25–38
- Grefen C, Stadele K, Ruzicka K, Obrdlik P, Harter K and Horak J (2008) Subcellular localization and in vivo interaction of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. *Mol Plant*, 1, 308–320
- Hansen AB, Griner NB, Anderson JP, Kujoth GC, Prolla TA, Loeb LA and Glick E (2006) Mitochondrial DNA integrity is not dependent on DNA polymerase- $\beta$  activity. *DNA repair*, 5, 71–79
- Hodges TK and Mills D (1986) Isolation of the plasma membrane. *Methods Enzymol*, 118, 41–53
- Hopff D, Wienkoop S and L uthje S (2013) The plasma membrane proteome of maize roots grown under low and high iron conditions. *J Proteomics*, 91, 605–618
- Chen Y-F, Randlett MD, Findell JL and Schaller GE (2002) Localization of ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 277, 19861–19866
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K and Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409, 1060–1063
- Jensen ON (2006) Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 391–403
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee ICL, Sheen J, Nam HG and Hwang I (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 814–819
- Kim JH, Johannes L, Goud B, Antony C, Lingwood CA, Daneman R and Grinstein S (1998) Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 2997–3002
- Kitner M and Sherman NE (2000) Fundamental mass spectrometry. In: *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*, Pp. 29–63, Wiley-Interscience, USA

- Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N and Mann M (2014) Minima, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods*, 11, 319-324
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- Lang EGE, Mueller SJ, Hoernstein SNW, Porankiewicz-Asplund J, Vervliet-Scheebaum M and Reski R (2011) Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. *Plant Cell Rep*, 30, 205-215
- Lee YH, Tan HT and Chung MC (2010) Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *Proteomics*, 10, 3935-3956
- Li J, Yang W, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya B, Richards EL, Krizek B, Murphy AS, Gilroy S and Gaxiola R (2005) Arabidopsis H<sup>+</sup>-ATPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310, 121-225
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MY, Osolodkin DI and Romanov GA (2012) Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*, 4, 31-45
- Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H (2011) Ligand binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J Exp Bot*, 62, 5149-5159
- Lord MJ (1987) Isolation of endoplasmic reticulum: general principles, enzymatic markers, and endoplasmic reticulum-bound polysomes. *Methods Enzymol*, 148, 576-584
- Mettler IJ and Leonard RT (1979) Isolation and partial characterization of vacuoles from tobacco protoplasts. *Plant Physiol*, 64, 1114 - 1120
- Mravec J, Skupka P, Bailly A, Hoyerova K, Krecek P, Bielach A, Petrasek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof Y-D, Dobrev PI, Schwarzerova K, Rolcik J, Seifertova D, Luschnig C, Benkova E, Zazimalova E, Geisler M and Friml J (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, 459, 1136-1140
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497
- Nishida K, Yagisawa F, Kuroiwa H, Nagata T and Kuroiwa T (2005) Cell cycle-regulated, microtubule-independent organelle division in *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol Biol Cell*, 16, 2493-2502



- Parsons HT, Christiansen K, Knierim B, Carroll A, Ito J, Batth TS, Smith-Moritz AM, Morrison S, McInerney P, Hadi MZ, Auer M, Mukhopadhyay A, Petzold CJ, Scheller HV, Loque D and Heazlewood JL (2012) Isolation and proteomics characterization of the Arabidopsis Golgi defines functional and novel components involved in plant cell wall biosynthesis. *Plant Physiol*, 159, 12–26
- Petrasek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertova D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubes M, Covanova M, Dhonukshe P, Skupa P, Benkova E, Perry L, Krecek P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig C, Zazimalová E and Friml J. (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, 312, 914–918
- Petrovska B, Jerabkova H, Chamrad I, Vrana J, Lenobel R, Urinovska J, Sebel M and Dolezel J (2014) Proteomics analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting. *Cytogenet Genome Res*, 143, 78–86
- Pingoud A, Urbanke C, Hoggett J and Jeltsch A (2002) Immunological methods. In: *Biochemical Methods: A concise guide for students and researchers*, Pp. 234. Wiley-VCH, Německo
- Ranocha P, Dima O, Nagy R, Felten J, Corratge-Faillie C, Novak O, Morreel K, Lacombe B, Martinez Y, Pfrunder S, Jin X, Renou J-P, Thibaud J-B, Ljung K, Fischer U, Martinoia E, Boerjan W and Goffner D (2013) ArabidopsisWAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nat Commun*, 4, 2625
- Rappsilber J, Mann M and Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*, 2, 1896 – 1906
- Robert S, Zhouhar J, Carter C and Raikhel N (2007) Isolation of intact vacuoles from Arabidopsis rosette leaf-derived protoplasts. *Nat Protoc*, 2, 259–262
- Romanov GA, Lomin SN and Schmulling T (2006) Biochemical characteristic and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AKH4 a revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot*, 57, 4051–4058
- Safar J, Noa-Carrazana JC, Vrana J, Bartos J, Alkhimova O, Sabau X, Simkova H, Lheureux F, Caruana ML, Dolezel J and Piffanelli P (2004) Creation of BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musabalbisiana*) genome. *Genome*, 47, 1182–1191
- Seigneurin-Berny D, Salvi D, Joyard J and Rolland N (2008) Purification of intact chloroplasts from Arabidopsis and spinach leaves by isopycnic centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3.30, 1–14

- Shannon P, Markeil A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B and Ideker T (2003) Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction network. *Genome Res*, 13, 2498–2504
- Shen H, He Z, Yan H, Xing Z, Chen Y, Xu W and Ma M (2014) The fronds tonoplast quantitative proteomic analysis in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *J Proteomics*, 105, 46–57
- Small I, Wintz H, Akashi K and Mireau H (1998) Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol*, 38, 265–277
- Song Y, Hao Y, Sun A, Li T, Li W, Guo L, Yan Y, Geng C, Chen N, Zhong F, Wei H, Jiang Y and He F (2006) Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics*, 6, 5269–5277
- Southern EM (1975) Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol*, 98, 503–517
- Taiz E and Zeiger (2010) Plant Cells. In: *Plant physiology*, 5<sup>th</sup> edition, Pp. 1–27, Sinauer Associates, USA
- Vanlerberghe GC, Vanlerberghe AE and McIntosh L (1994) Molecular genetic alteration of plant respiration (Silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic Tobacco). *Plant Physiol*, 106, 1503–1510
- Vertommen A, Panis B, Swennen R, Carpentier SC (2011) Challenges and solutions for the identification of membrane proteins in non-model plants. *J Proteomics*, 74, 1165–1181
- Westermeier R (2001) *Electrophoresis in Practice*, 3<sup>th</sup> edition, Wiley-VCH, Německo
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A and Schmulung T (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol*, 156, 1808–1818
- Yagisawa F, Nishida K, Yoshida M, Ohnima M, Shimada T, Fujiwara T, Yosgida Y, Misumi O, Kuroiwa H and Kuroiwa T (2009) Identification of novel proteins in isolated polyphosphate vacuoles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant J*, 60, 882–893
- Yoshida S, Uemura M, Niki T, Sakai A and Gusta LV (1983) Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. *Plant Physiol*, 72, 105–114
- Zhang H-B, Zhao X, Ding X, Paterson AD and Wing RA (1995) Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant J*, 7, 175–184

Zhang S, Xia X, Shen J, Zhou Y and Sun Z (2008) DBMLoc: a Database of proteins with multiple subcellular localizations. *BMC Bioinformatics*, 9, 127

Internetové zdroje:

Online databáze UniProt

<http://www.uniprot.org/>, 6. 7. 2015

<http://www.uniprot.org/uniprot/P41917>, 23.7.2015

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q39043/>, 23. 7. 2015

The Nobel preize in chemistry 1948

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1948/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/), 20. 6. 2015

Proteomics analysis

<http://www.nature.com/subjects/proteomic-analysis>, 20. 6. 2015

Venny v. 2.0

<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, 20. 6. 2015