

**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav molekulární biologie a radiobiologie**

---



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



## **Charakterizace jaderného proteomu rostlin**

Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
Mgr. Martin Černý, Ph.D.

*Vypracoval:*  
Anna Svetláková

Brno 2017

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: **Charakterizace jaderného proteomu rostlin** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně

dne

Podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala všem, kteří se podíleli na vytvoření mé bakalářské práce, zejména vedoucímu práce Mgr. Martinu Černému, Ph.D. za veškeré rady, ochotu, vstřícné jednání a především trpělivost. Dále patří mé poděkování ostatním pracovníkům ústavu Molekulární biologie a radiobiologie Mendelovy univerzity v Brně za pomoc při vypracovávání mé práce a za všechny cenné rady.

## **ABSTRAKT**

Nukleární proteom obsahuje důležité regulační proteiny, které jsou přímo zapojeny do regulačních mechanismů. Odhaduje se, že přibližně 30 % genů kóduje proteiny, které jsou směřovány do jádra. Široká škála koncentrací proteinů však způsobuje, že některé jaderné proteiny jsou přítomny v koncentracích řádově nižších než ostatní proteiny a jsou tak nedostupné v běžné extrakci celkového proteinu. Tato práce „Charakterizace jaderného proteomu rostlin“ stručně shrnuje poznatky dnešní nukleární proteomiky a shrnuje extrakční protokoly. V experimentální části byly zhodnoceny dva různé frakcionační protokoly. Analýzou jaderných proteinových extraktů bylo navýšeno množství identifikovaných proteinů, ale výsledky kvantitativního porovnání s běžnou extrakcí ukazují, že některé proteiny byly ztraceny či došlo k jejich depleci v průběhu frakcionace. Dále byl studován účinek rostlinných hormonů cytokininů na nukleární proteiny ječmene. Celkově bylo nalezeno 65 známých jaderných proteinů (10 % identifikovaných proteinů v jaderné frakci) a 15 z nich bylo rozdílně zastoupeno v odpovědi na ošetření cytokininem, jedná se např. o RNA helikázu SUB2 nebo protein podílející se na odpovědi na solný stres.

Klíčová slova: frakcionace, obohacení, cytokinin, LC-MS

## **ABSTRACT**

Nuclear proteome contains important regulatory proteins that are directly involved in gene regulation mechanisms. It is estimated that about 30% of genes encode for proteins that are destined into the nucleus, but a large dynamic range in protein concentration results in some nuclear proteins being present at concentrations orders of magnitude lower than others and these are thus hidden in standard total protein extracts. This thesis "The characterization of the plant nuclear proteome" briefly reviews present-day knowledge of nuclear proteomics and summarises extraction protocols. In the experimental part, two different fractionation protocols were evaluated. Analyses of nuclear protein extracts increased the number of identified proteins, but the quantitative comparison with the results of total protein extractions indicate that at least some nuclear proteins were lost or depleted in the process. Finally, the effect of plant hormone cytokinin on barley nuclear proteins was analysed. In total, 65 known nuclear proteins (10% of identified proteins in the nuclear fraction) were found and 15 of them were differentially abundant in response to the cytokinin treatment, including e.g. RNA helicase SUB2 and a salt-stress response protein.

Keywords: fractionation, enrichment, cytokinin, LC-MS

## OBSAH

<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Literární přehled.....</b>	<b>10</b>
2.1    Jádro jako organela .....	10
2.2    Struktura jádra.....	11
2.2.1    Karyoplazma .....	11
2.2.2    Jaderný obal .....	12
2.2.3    Komplexy jaderných pórů (NPC, nuclear pore complexes) .....	13
2.3    Proteomická analýza .....	14
2.3.1    Nukleární proteomika.....	14
2.3.2    Jaderné proteiny .....	20
<b>3 Materiál a metodika.....</b>	<b>22</b>
3.1    Rostlinný materiál.....	22
3.2    Použité reagenty.....	22
3.3    Izolace nukleárních proteinů.....	23
3.3.1    Izolace s využitím percollového gradientu dle Sikorskaite <i>et al.</i> .....	23
3.3.2    Izolace s využitím kitu dle Pekala.....	25
3.4    LC-MS analýza .....	26
3.4.1    Měření a zpracování MS spekter.....	26
<b>4 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>27</b>
4.1    Identifikace nukleárních proteinů rajčete .....	27
4.2    Identifikace nukleárních proteinů ječmene.....	29
4.3    Reakce nukleárních proteinů ječmene na cytokininy .....	30
<b>5 Závěr .....</b>	<b>32</b>
<b>6 Přehled použité literatury .....</b>	<b>34</b>
<b>7 Seznam obrázků .....</b>	<b>38</b>

<b>8 Seznam použitých zkratek.....</b>	<b>39</b>
<b>9 PŘÍLOHY .....</b>	<b>42</b>

# 1 ÚVOD

Ve své přednášce roku 1831 zmínil skotský botanik Robert Brown, který je lépe znám pro svůj objev tzv. Brownova pohybu, pozorování zajímavého útvaru v buňkách epidermis orchidejí, "cirkulární areolu", která se zdá být jakýmsi jádrem buňky. Tak z latinského nucleus či nucleus (jádro, oříšek) vzniklo pojmenování organely, která schraňuje většinu genetické informace eukaryotické buňky. I když bylo poprvé jádro objeveno v rostlinách, víme dnes mnohem více o jeho složení a funkci u hub a živočichů, protože jaderný výzkum byl léta zaměřen právě na tyto modelové systémy. V posledních letech se však pozornost obrací i směrem k rostlinám (Meier, 2008). Rostlinné jádro vykazuje jisté odlišnosti od jader hub a živočichů. Jádro je běžně tvořeno dvěma hlavními komponentami - jaderným obalem a karyoplazmou. Jaderný obal obsahuje ve své struktuře vnitřní a vnější jadernou membránu a rostlinná lamina, jež se nachází ve vnitřní jaderné membráně obalu, má svou unikátní strukturu typickou pro rostliny, která nebyla prozatím nalezena u jiných organismů (Petrovska *et al.*, 2013).

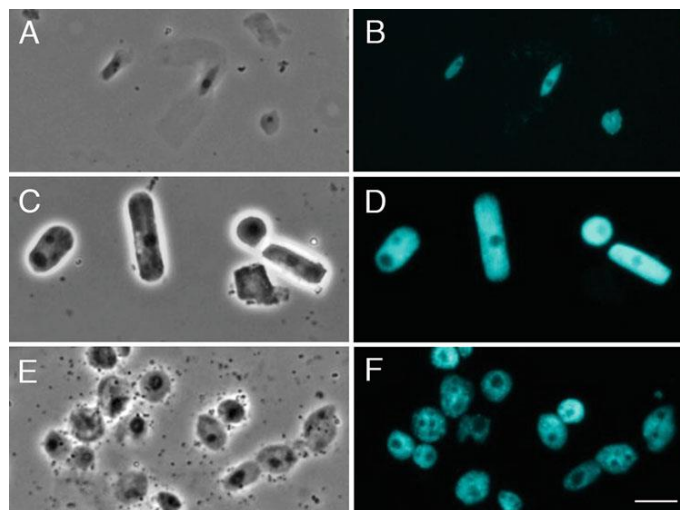
Je zřejmé, že obdobně jako v dalších organelách, není důležitá jen otázka co a jak se mění, ale i kde přesně k tomuto procesu dochází. Proteomická analýza může být vhodným nástrojem pro porozumění molekulární podstaty procesů v jádře a její aplikace je i tématem této bakalářské práce. Cílem této práce bylo v první řadě shrnout základní poznatky o jádře a metodách izolace jaderného proteomu. V experimentální části pak vyzkoušet izolaci jaderného proteomu z vybraných modelových rostlin a pokusit se naleznout změny jaderného proteomu vyvolané rostlinným hormonem cytokininem.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Jádro jako organela

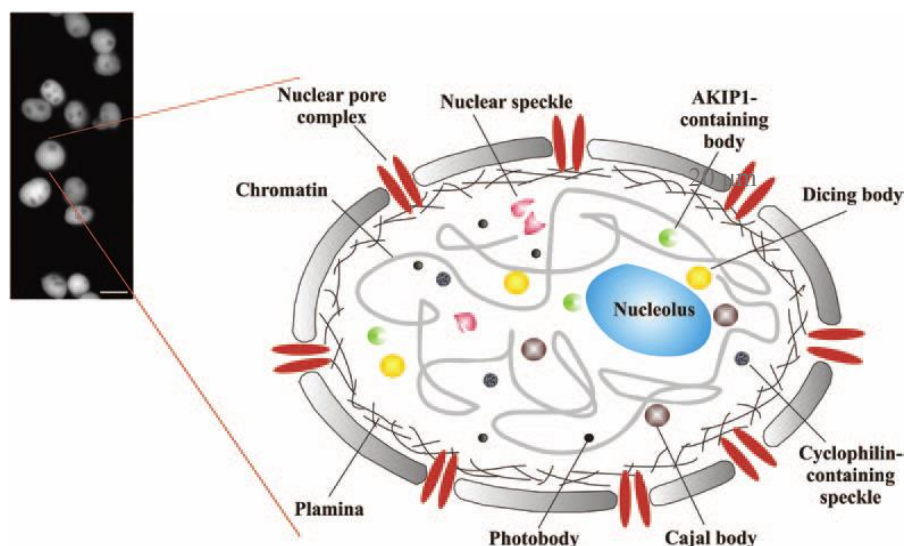
Jádro (*nucleus*, *karyon*), jakožto největší organela v buňce, slouží především k uložení dědičné informace organismu a zároveň se podílí na koordinaci buněčných procesů jako buněčného dělení, růstu, diferenciaci, proteosyntézy, smrti buňky aj. Převážná část jaderného materiálu je tvořena chromatinem, který je během většiny života buňky rozvolněn. Jádro odděluje genom spolu s transkripčním mechanismem od cytoplazmy a ostatních organel. Tvar a velikost jádra se odvíjí od typu buňky, ve které se nachází (Obr. 1). Meristematické buňky se vyznačují větším jádrem, které je většinou lokalizováno v centru buňky. Diferenciované buňky, jako například parenchymatické či kolenchymatické, mají jádro spíše na periferii buňky (Pollard a Earnshaw, 2008; Lammerding, 2011). Tvar jádra se může měnit v průběhu života buňky, jako je tomu u embryí *Drosophily*, kdy dochází ke změně z okrouhlého tvaru na elipsoidní (Webster *et al.*, 2009). Uvnitř jádra můžeme nalézt i jadérko, jež slouží převážně k syntéze ribozomální RNA (Lodish, 2003).



Obr. 1 Jádra z odlišných rostlinných druhů získaná fázovou kontrastní mikroskopií (A, C, E) a barvením DAPI s fluorescenční mikroskopií (B, D, F). (A, B) Jádra kořenů *Arabidopsis thaliana*. (C, D) Jádra kořenů *Triticum aestivum*. (E, F) Jádra kořenů *Pisum sativum*. Zdroj: Pendle a Shaw, 2017.

## 2.2 Struktura jádra

Jádro rostlin obdobně jako jádro hub a živočichů je běžně tvořeno dvěma hlavními komponentami, jaderným obalem a karyoplazmou (Obr. 2).



Obr. 2 Struktura jádra. Jádro rostlin obsahuje kromě chromatinu i jiné struktury jako například Cajalova tělíska, jaderné skvrny, cyklofilinové skvrny aj. Zdroj: Petrovská et al., 2015.

### 2.2.1 Karyoplazma

Karyoplazma (též nukleoplazma) je hmota typická pro interiér jádra, jejíž hlavní složkou je voda s obsahem různých esenciálních enzymů, proteinů a směsí látek. Je ohraničena jaderným obalem. Látky, které obsahuje, jsou nutné například pro syntézu deoxyribonukleových a ribonukleových kyselin. Nachází se zde také velká škála proteinů, které se podílejí na transportu látek z jádra a do jádra, transkripci či modifikačních procesech RNA molekul (Plant Life, 2011).

Jaderný genom eukaryot je tedy lokalizován v jádře, kde vytváří chromozomy. Ty představují dlouhou lineární molekulu DNA, která tvoří chromatin. Jádro obsahuje dvě formy chromatinu – vysoce kondenzovaný heterochromatin, který se dále dělí na konstitutivní a fakultativní, a euchromatin, který naopak nepodléhá značné

kondenzaci. Obě formy heterochromatinu se podílejí na regulaci genové exprese a obsahují oblasti, které nejsou příliš bohaté na geny. Konstitutivní typ je tvořen inaktivními bloky, které jsou ustálené, a fakultativní forma vytváří úseky DNA, které jsou aktivní či neaktivní jen za určitých podmínek, ve kterých se organismus právě nachází. Lokalizace na periferii jádra je typická pro heterochromatin, kdežto euchromatin je k nalezení spíše v centru jádra či v okolí jaderných pórů (Cooper, 2000). Jaderné chromozomy musí být vysoce kompaktní během buněčného cyklu, neboť chromozom, který není v kondenzovaném stavu, je mnohem větší než průměr jádra. První úroveň kondenzace je sbalování DNA kolem 8 molekul histonů za vzniku nukleozomu. Nukleozom je dále sbalen do vlákna (30 nm vlákno), které vytváří prostý helix (Pollard, Earnshaw, 2008).

### 2.2.2 Jaderný obal

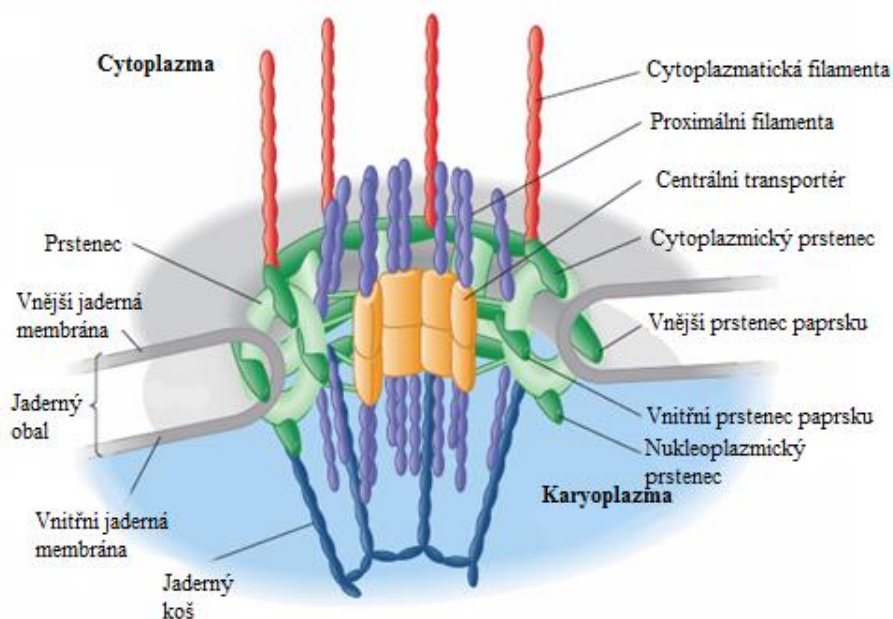
Jaderný obal tvoří hlavní předěl mezi dvěma plazmatickými objekty - cytoplazmou a karyoplazmou. Tato bariéra s vysoce organizovanou strukturou zabraňuje volné migraci molekul mezi jádrem a cytoplazmou a jediná možná cesta skrze jaderný obal vede přes komplexy jaderných pórů (Petrovska *et al.*, 2015). Obal, jenž obklopuje jaderný materiál, se skládá z **vnější** (ONM, outer nuclear membrane) a **vnitřní membrány** (INM, inner nuclear membrane), které navazují na membránu endoplazmatického retikula. Navzdory tomu jsou však proteiny obsažené v membránách jaderného obalu odlišné od proteinů obsažených v endoplazmatickém retikulu (Hetzer, 2010). Jako většina membrán jsou membrány jaderného obalu také tvořeny fosfolipidovými dvojvrstvami. V jaderných pórech dochází ke spojení vnitřní a vnější membrány, mezi nimiž se navíc nachází perinukleární prostor, a vzniká tak jediný volný průchod pro molekuly vody, sacharidů nebo například molekuly iontů, které by se jinak do jádra nedostaly (Cooper, 2000).

Další složkou, která se podílí na mechanické podpoře jaderného obalu, je jaderná **lamina**. Ta je ukotvena k INM, interaguje s komplexy jaderných pórů a kromě mechanické podpory také usnadňuje jaderný pohyb, zprostředkovává propojení mezi nukleoskeletem a cytoskeletem a podílí se na signalizaci a organizaci chromatinu. Hraje důležitou roli při replikaci či opravách DNA nebo syntéze RNA, účastní se tedy i buněčného dělení, diferenciaci či apoptózy (Lammerding, 2011). Její šířka

se pohybuje v rozmezí od 5 do 13 nm dle druhu rostliny. Nejlépe charakterizovanými proteiny jaderné laminy rostlin jsou NMCP (nuclear matrix constituent protein).

### **2.2.3 Komplexy jaderných pórů (NPC, nuclear pore complexes)**

Tyto komplexy jsou důležité svou přítomností pro různé jaderné procesy, jako například aktivace genů nebo regulace buněčného cyklu. Jejich hlavní úlohou je však zprostředkování transportu látek dovnitř jádra a odchodu molekul z jádra ven. Kromě molekul vody mohou být jadernými póry (Obr. 3) transportovány proteiny vnitřní jaderné membrány a veškeré malé proteiny nacházející se v karyoplazmě. Také RNA, které jsou syntetizované v jádru, musí být přemístěny do cytoplazmy, kde budou plnit svou funkci při proteosyntéze. Naopak proteiny, které jsou vyžadovány pro správné fungování jádra, musí být dopraveny do jádra z místa jejich syntézy v cytoplazmě. Transport těchto proteinů může probíhat dvěma hlavními způsoby, z nichž první je difúze otevřenými kanály, které jsou propustné pro molekuly o velikosti zhruba 9 nm. Takto mohou prostupovat i proteiny o maximální velikosti 50 kD a to v obou směrech, z cytoplazmy do jádra a zpět. Některé proteiny by však takovými kanálky neprošly, musí být proto specificky rozpoznány a jejich transport proběhne pouze v jednom směru. V odpovědi na rozpoznávací signál jsou molekuly, jako např. velké ribonukleoproteiny, dopraveny na potřebné místo obdobnými kanálky s centrálním transportérem, které však mají schopnost se otevřít pro průchod větších molekul bezprostředně po přijetí rozpoznávacího signálu (Cooper, 2000). Vzhledem k tomu, že jsou transportovány různé druhy látek, musí být transport těchto komponent regulován na vyšší úrovni buněčné kontroly, která není zapotřebí u nižších organismů (Wente a Rout, 2010).



Obr. 3 Struktura jaderného póru. NPC se jeví jako cylindrické struktury, jejichž střed obsahuje vždy 8 paprsků, které obklopují centrální kanál. Přímo v něm dochází k výměně makromolekul mezi karyoplazmou a cytoplazmou. Filamenta, která se nachází v jádru póru, vytváří strukturu „košíku“ na vnitřní straně komplexu. Zdroj: Lodish et al., 2007.

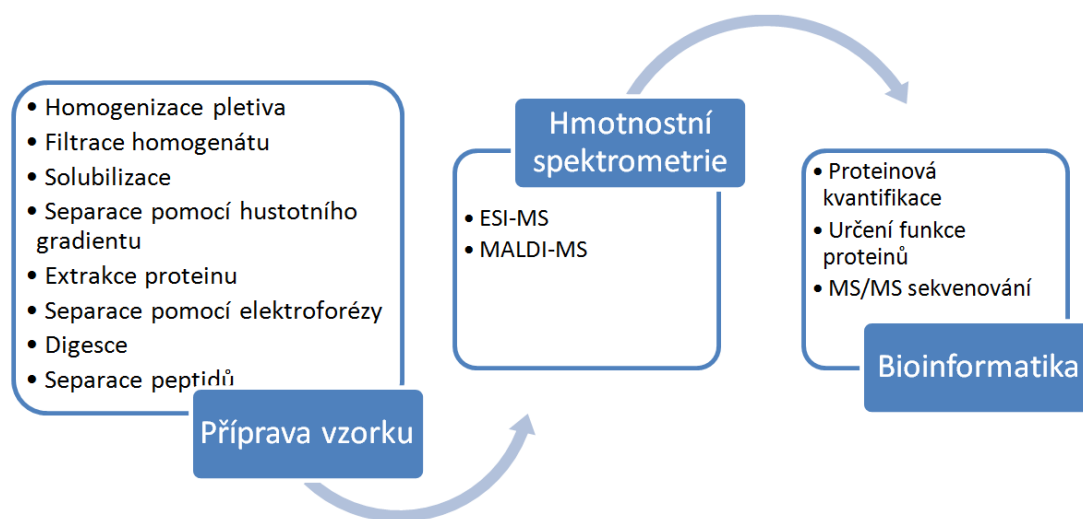
## 2.3 Proteomická analýza

### 2.3.1 Nukleární proteomika

Proteom shrnuje všechny genové expresní profily v určitém stádiu buňky, organismu, či pletiva. Tyto profily vznikají při jasně stanovených podmínkách prostředí. Jeden gen může tvořit několik typů proteinů, které podstupují četné modifikace na úrovni transkripce, translace či posttranslační úrovni. Ke struktuře proteinu mohou být přidány další skupiny, jako např. cukry či fosfáty. Proto organismy vykazují několikanásobně vyšší množství různých proteinů oproti výchozímu množství unikátních protein-kódujících genů a souvisí s tím také schopnost tvořit různé fenotypy.

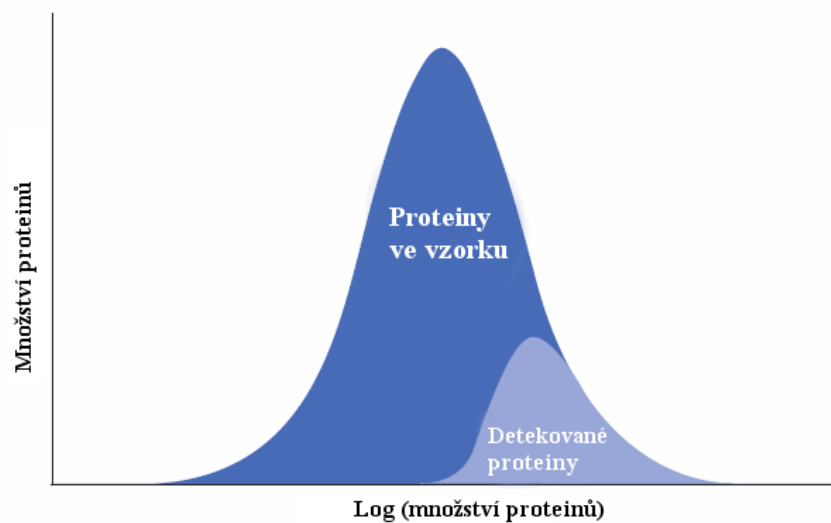
Při proteomické analýze je tak nutné se vypořádat se směsí, kde se nacházejí jak velké proteiny, tak i proteiny malých velikostí, dále vysoce abundantní spolu s méně abundantními proteiny. Proteomické techniky se musí vyhnout jakékoliv možné

kontaminaci. Abychom získali co největší množství proteinů a zároveň v intaktním stavu, jsou vyžadovány četné solubilizační kroky, které uvolní vázané proteiny např. v membránách. Při izolaci rostlinných jader je tento proces o něco náročnější a nesprávnou manipulací může dojít k velkým ztrátám (Kellner, 2000; Novak, 2016).



*Obr. 4 Zjednodušené schéma proteomické analýzy. Příprava vzorku vyžaduje důslednou manipulaci, aby nedošlo k nechtěné kontaminaci jinými proteiny nebo kontaminanty. Identifikace využívá hmotnostní spektrometrii v různých modifikacích: ESI, ionizace elektrosprejem; MALDI, ionizace laserem za přítomnosti matrice; MS/MS, tandemová hmotnostní spektrometrie. Bioinformatická část slouží ke zpracování získaných dat a jejich využití v různých oblastech proteomiky.*

Příprava vzorku pro izolaci jaderných proteinů zahrnuje několik kroků. Neexistuje univerzální protokol, který by platil pro všechna pletiva, popřípadě tkáň tělní tekutiny, vzhledem k heterogenitě proteinů a samotných vzorků (zdrojů). Je však nutné dostat se přes určité bariéry, které mohou být u extrakce z rostlinných zdrojů výzvou. Jedná se zejména o komplexitu proteinů, ke které přispívají také post-translační modifikace. V důsledku toho nemohou být současnými technikami detekovány v celkovém extraktu všechny přítomné proteiny (Obr. 5)



Obr. 5 Schéma detekovatelných proteinů z celkového extraktu. 2-D elektroforéza a hmotnostní spektrometrie jsou schopny detekovat pouze část proteinů přítomných v celkovém extraktu. Zdroj: GE Healthcare, 2014.

#### 2.3.1.1 Homogenizace

Pro identifikace jaderných proteinů je nutno dodržet několik základních kroků. Po získání materiálu musí být rostlinné pletivo rozrušeno, stejně tak i buněčná stěna (mechanicky, enzymaticky). Způsoby **homogenizace** jsou velice variabilní a volba závisí na typu pletiva/tkáně/organismu.

#### 2.3.1.2 Inhibitory proteáz a fosfatáz

Další výzvou při extrakci je zajištění intaktnosti proteinů, tedy aby nedošlo k degradaci proteázami, což by se negativně projevilo na elektroforéze. Narušení jejich struktury by mohlo vést k mylným informacím o proteinech a celých populacích proteinů, tudíž i ke zkreslení výsledků při vyhodnocení. Přítomnost kontaminantů, jako nukleové kyseliny, soli, polysacharidy, také často způsobuje chybné závěry a to zejména při kvantifikaci (Protein sample preparation).

V mnoha případech se provádí rozrušování buněčných stěn a membrán v přítomnosti **inhibitorů proteáz** (Tab. 1). Stabilita proteinů je tedy ovlivňována přítomností a aktivitou proteáz, ale také různými chemickými či konformačními modifikacemi, ke kterým může docházet při přípravě vzorku (proteolýza, oxidace, deaminace aj.). Neméně významné jsou defosforylace fosfoserinu, threoninu a tyrosinu,

kde je tento proces kontrolován především fosfatázami. Aktivita těchto enzymů může být kontrolována **fosfatázovými inhibitory**, např. pomocí imidazolových solí. Stejně jako se předchází hydrolýze, je nutné vyvarovat se i oxidaci (Protein sample preparation).

*Tab. 1 Inhibitory proteáz. Příklady nejpoužívanějších inhibitorů proteáz, jejich koncentrace a molekuly, které inhibují. Zdroj: Thermofisher.*

Inhibitor	Běžná koncentrace	Cílová molekula
<b>PMSF</b>	0,1-1 mM	Serinové proteázy
		Cysteinové proteázy
<b>EDTA</b>	2-10 mM	Metaloproteázy
<b>Pepstatin A</b>	1-20 $\mu$ M	Aspartátové proteázy
<b>Leupeptin</b>	10-100 $\mu$ M	Cysteinové proteázy
		Serinové proteázy
<b>Aprotinin</b>	100-200 nM	Serinové proteázy
		Papain
		Cysteinové proteázy
<b>E-64</b>	1-20 $\mu$ M	Cysteinové proteázy

### 2.3.1.3 Diferenciální centrifugace

Pro izolaci jader (ostatně i jiných organel) od buněčných komponent může být využita diferenciální centrifugace, která vytvoří ve vzorku několik fází. Aby mohly být jednotlivé frakce ve vzorku odděleny, je nutno využít medium, které se přidává před centrifugací ke vzorku. Jedním z nejvíce využívaných medií jsou sacharóza, glycerol či sorbitol. Při izolaci jader je také častý Percoll (Sigma-Aldrich, 2017).

### 2.3.1.4 Solubilizace

Pro purifikaci proteinů je velmi důležitým krokem **solubilizace**. Kontaminanty by měly mít co nejmenší rozpustnost v roztoku, aby nezkreslovaly výsledky. Jde zejména o nukleové kyseliny, lipidy či jiné druhy proteinů. Dle zdroje, ze kterého pochází izolované proteiny, jsou zvoleny lytické a extrakční pufrů. Základními složkami bývají zpravidla soli a různé druhy detergentů. Jejich koncentrace musí být hlídána, stejně jako



teplota a pH. Aby tedy bylo zajištěno stabilní prostředí pro proteiny, používají se při izolaci **pufrů**, jejichž hlavní úlohou je ochrana před změnami v pH, které by mohly vést k nežádoucím denaturacím či fragmentaci. Různé pufrů mají rozdílnou pH škálu, proto je nutné zvolit vhodný typ pufru vzhledem k proteinům, které izolujeme, neboť každý protein vyžaduje pro svou stabilitu jiné pH. Při izolaci jader z *A. thaliana* se často volí pufr PIPES-KOH (PIPES-NaOH). HEPES-KOH je pak vhodným pufrům při izolaci jader z rýže (*Orizum sativa*), neméně častý je MES-KOH pro izolaci jader z listů brambor (*Solanum tuberosum*). Pro extrakci jader z kukuřice (*Zea mays*) či rajčat (*Solanum lycopersicum*) se používá Tris-HCl (Yin a Komatsu, 2016). Nejčastěji volené pufrů jsou vybrány v Tab. 2 a to v kombinaci se solí, ve které jsou běžně používány. Jejich koncentrace se pohybuje v rozmezí 20-50 mM.

Tab. 2 Nejčastěji volené pufrů. Vybrané pufrů a pH rozpětí. Zdroj: Lloyd, 2000.

Název	pH rozpětí
<b>Fosfátový pufr</b>	5,8-8,0
<b>Glycin-NaOH</b>	8,6 - 10,6
<b>MES</b>	5,5-6,7
<b>MOPS</b>	6,5-7,9
<b>HEPES-NaOH</b>	6,8-7,5
<b>HEPES-KOH</b>	6,8-8,2
<b>Tris-HCl</b>	7,0-9,0
<b>PIPES-NaOH</b>	6,1-7,5

#### 2.3.1.5 Soli a detergenty

**Soli** slouží především ke stabilizaci iontové síly, jedná se zejména o NaCl a KCl. Do roztoků mohou být přidány také různé druhy detergentů, které mají schopnost vytvářet micely, umožňují mísitelnost látek s vodou, které jsou za běžných podmínek ve vodě nerozpustné. Denaturující detergenty rozruší buněčné struktury a přeruší také veškeré interakce mezi proteiny a dalšími složkami. Za takovým účelem se používá např. dodecylsírán sodný (SDS). Aby nedocházelo k denaturaci, používají se jiné detergenty jako Triton X-100 nebo CHAPS (Life technologies). Kromě toho, detergenty

umožňují také rozklad některých abundantních organel, jako jsou například chloroplasty (Yin a Komatsu, 2016).

#### 2.3.1.6 *Ověření čistoty a koncentrace vzorku*

Po izolaci jader by měla být ověřena **čistota** získané frakce extrahovaných jader. Pro posouzení čistoty jaderné frakce se využívá metoda Western blot s použitím histonů jako proteinových markerů. Kontaminace jaderné frakce jinými organelami bývá hodnocena také pomocí subcelulárních proteinových markerů. Jako takové poslouží například enzym kataláza, alkoholdehydrogenáza či glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (Yin a Komatsu, 2016).

Po izolaci by měla část analytu projít **kvantifikací**, aby byla zjištěna koncentrace proteinu. Je dostupné velké množství kvantifikačních metod. Jednou z nejčastěji používaných je Bradfordova metoda, která využívá kolorimetrického stanovení při 595 nm a je poměrně rychlá. Mezi její přední nevýhody patří skutečnost, že může být narušena přítomností detergentů (Protein sample preparation; Thermofisher, 2017). Dále se používá kvantifikace pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA) či Lowryho metoda (Thermofisher, 2017).

#### 2.3.1.7 *Separace proteinů a hmotnostní spektrometrie*

Rozdělení proteinů dle velikosti je docíleno pomocí gelové filtrace. Média v kolonkách mají rozdílné póry, a proto mohou projít například pouze molekuly s nízkou molekulární hmotností a proteiny, jež mají větší hmotnost, budou od těch ostatních odděleny. Kromě gelové filtrace může být použita také ultrafiltrace, kdy roztok prochází přes membránu s póry a skrze membránu se dostanou pouze menší molekuly. Velikost těchto pórů je předem přesně určena, aby mohly být zachyceny cílové molekuly (Protein sample preparation).

Poté, co jsou separovány jednotlivé nukleární proteiny, mohou být identifikovány pomocí **hmotností spektrometrie (MS)**. Jedná se o analytickou metodu, kdy dochází k rozdělení iontů na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Ve výsledku poskytuje hmotnostní spektrum, které znázorňuje závislost mezi  $m/z$  a intenzitou signálu. Hmotnostní spektrometr začíná zpravidla iontovým zdrojem, který převádí neutrální molekuly na nabitě částice, a je následován analyzátozem, který tyto ionty rozdělí dle

poměru hmotnosti a náboje. Ionizace může probíhat za sníženého (MALDI) či atmosférického (ESI) tlaku. Ionizace elektrosprejem (ESI) využívá vysokého napětí, které je aplikováno na kapalinu, aby došlo k vytvoření aerosolu. Může být v mnoha případech spřažena s kapalinovou chromatografií. Ionizace za přítomnosti matrice (MALDI) umožňuje desorpci a ionizaci větších molekul, proto se často využívá k analýze biopolymerů. Poslední část hmotnostního spektrometru je detektor, který vyhodnocuje relativní intenzitu iontů po rozdělení v analyzátoru (Friedecký *et al.*, 2012).

### 2.3.2 Jaderné proteiny

Jaderné proteiny jsou považovány za nejvíce abundantní složky buněčného jádra. Genom modelového organismu *A. thaliana* zahrnuje necelých 26 000 genů. Literatura uvádí, že proteiny, které jsou exprimovány těmito geny náleží zhruba z 28-48 % právě do jádra. Přestože rostlinný genom modelových organismů byl podroben četným analýzám a poskytuje relativně velké množství výsledků, proteom není ani zdaleka tak objasněn (Hooper *et al.*, 2014). Kromě histonů, které jsou považovány za nejvíce abundantní proteiny v jádře, je zatím důkladně probádáno jen několik dalších proteinových rodin, z nichž některé uvádím níže. Vybrané proteinové rodiny jsou ve většině případů součástí rostlinné laminy, jejíž přítomnost byla dlouhou dobu velice kontroverzním tématem. Dnes víme, že nejen existuje, ale že se podílí na mnoha aspektech jaderných funkcí a že změnami vlastností laminy tedy dochází k abnormálním změnám jaderné morfologie (Petrovská *et al.*, 2015; Ciska *et al.*, 2013).

**NMCP1** (nuclear matrix constituent protein 1) je protein, nacházející se hlavně na periférii jádra, v jaderné lamině. Proteiny odvozené od NMCP u *Arabidopsis thaliana*, dříve LINC (little nuclei), dnes nazývané CRWN se dělí do dvou hlavních skupin – CRWN1, které se nachází v jaderné periférii, a proteiny skupiny CRWN2, které můžeme najít v karyoplazmě. Bylo zjištěno, že různými mutacemi v genech pro CRWN dochází k redukci velikosti jádra či dokonce k dramatickým změnám v morfologii jádra. (Dittmer, 2008; Ciska a Moreno Díaz de la Espina, 2014). NMCP bývají často označovány za analogy proteinů nazývaných laminy, které jsou charakteristické pro laminu živočichů (Petrovská *et al.*, 2015). **SUN proteiny** (Sad1/UNC84) jsou komponenty vnitřní membrány a účastní proteinového komplexu

LINC (linker of nucleoskeleton a cytoskeleton), který se váže k nukleoskeletu i cytoskeletu jádra. SUN proteiny *A. thaliana* – AtSUN1 a AtSUN2 podléhají četným interakcím s proteiny skupiny NMCP (Ciska a Moreno Díaz de la Espina, 2014). **KASH proteiny** (Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology) můžeme najít ve vnější jaderné membráně, jejich název je odvozen od proteinů *D. melanogaster* (Klarsicht), *C. elegans* (ANC-1) a savců (Syne-1 a 2). U *A.thaliana* byly nalezeny KASH proteiny, jež specificky interagují se SUN proteiny – WPP doménové proteiny (WPP1, WPP2 a RanGAP1) (Evans *et al.*, 2014; Ciska a Moreno Díaz de la Espina, 2014). V případě **LINC** (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) se jedná o komplex skládající se z dvou klíčových komponent: SUN a KASH proteinů. Hraje významnou roli při pohybu jádra, propojování nukleoskeletu s cytoskeletem či uchycení centrozomů k ONM. **Nukleoporiny** (Nups) představují stavební kameny pro jaderné póry. Rostlinné nukleoporiny nejsou tak dobře prostudované jako lidské nebo kvasinkové, přesto však byly objeveny některé homology, jenž se podílejí na transportu látek přes NPC. Prozatím bylo identifikováno pouze 13 rostlinných nukleoporinů, některé z nich se obecně podílejí na hormonální signalizaci, buněčném dělení, odpovědi na stres a patogeny, vývoji kvetení či reprodukci. Funkce a samotný proces regulace u většiny z nich však nejsou zatím zcela objasněny. U *A. thaliana* jsou známy nukleoporiny LONO1 a AtGLE1, které se účastní vývoje semen (Braud *et al.*, 2014, Petrovská *et al.*, 2015). **NUA** (nuclear pore anchor) je protein nacházející se během interfáze ve vnitřní jaderné membráně a v průběhu metafáze může být detekovatelný v blízkosti vřeténka, je vyžadován tedy při buněčném dělení. Podílí se na procesu SUMOylace, kdy dochází k připojení proteinu SUMO k jinému cílovému proteinu. Účastní se také exportu mRNA (Xu *et al.*, 2007). **MFPI** (matrix attachment region (MAR)-binding filament-like protein 1) se váže k DNA, interaguje s chromatinem prostřednictvím (Gindullis *et al.*, 1999). Na počátku bádání se zdálo, že je tento protein lokalizován pouze v jaderném obalu a matrix, později se ukázalo, že se nachází v plastidech, kde asociuje s membránou thylakoid (Dittmer, 2008). **MAR** (matrix attachment region) představuje DNA sekvence bohaté na A-T páry, které asociují s matrix. Předpokládá se, že se podílí na organizaci chromozomů do struktury růžice v metafázi (Liebich *et al.*, 2002). V případě **MAF1** (MFP1-associated factor 1) se jedná o poměrně malý protein, který je bohatý na serin a threonin. Je lokalizován na periférii jádra, v jaderné matrix a je možné jej nalézt i v cytoskeletu (Gindullis *et al.*, 1999).

## 3 MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Rostlinný materiál

Výchozím materiálem byl *Arabidopsis thaliana* typ Col-0, *Solanum lycopersicum* typ Moneymaker a *Hordeum vulgare* typ Sebastian. Rostlinný materiál pro experimenty poskytl Msc. Kifaha Abushamsiya (AF MENDELU). Listy rostlin byly kultivovány po dobu 4 týdnů ve skleníku (srpen-září 2016). Čtyřtýdenní rostliny ječmene byly po sedmi dnech kultivace v pravidelných intervalech (2× týdně) zalévány 50 ml 10  $\mu$ M roztoku BAP (benzylaminopurin).

### 3.2 Použité reagenty

#### **Pufr pro izolaci jader (Pufr A):**

1×Pufr A: 40 mM MES-KOH (pH 5.4), 40 mM NaCl, 40 mM KCl, 10 mM EDTA, 1000 mM sacharóza, 0.4 mM spermin, 2 mM spermidin, 4 mM DTT.

**10% (v/v) Triton X-100** v deionizované H<sub>2</sub>O

**60% (v/v) percoll** v 1×Pufru A

**2.5 M sacharóza**

#### **Pufr pro uskladnění jaderné frakce (Pufr B):**

20% glycerol, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.2), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (-20°C)

#### **SDS pufr:**

2% (w/v) SDS, 30% (w/v) sacharóza, 5% (v/v) merkaptoethanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0

**10% (w/v) TCA v acetonu**

**Fenol (pH 7.5)**

**5% (v/v) a 10% (v/v) acetonitril**

**Trypsin**

**100 mM octan amonný v methanolu**

**8 M močovina**

**50 mM hydrogenuhličitan amonný**

### 3.3 Izolace nukleárních proteinů

#### 3.3.1 Izolace s využitím percollového gradientu dle Sikorskaite *et al.*

##### HOMOGENIZACE

S využitím kapalného dusíku bylo homogenizováno 400 mg 4-týdenních listů rajčete. K peletu byl přidán 1 ml diethyletheru (3 min). Po odebrání byl pelet propláchnut v 1 ml pufru A a roztok byl ihned odebrán. Pelet byl homogenizován ve 2 ml pufru A do úplného rozdrčení.

##### FILTRACE

Suspenze byla přefiltrována pro odstranění větších částí pletiv přes membránu Miracloth.

##### SOLUBILIZACE

Ke vzorku byl přidán Triton X-100 do finální koncentrace 0,5%. Vzorek byl umístěn do ledničky na 20 min a každých 5 min byl promíchán převrácením zkumavky (4 °C). Byla provedena centrifugace homogenátu (10 min, 1000 × g). Po odstranění supernatantu bylo přidáno 10 ml izolačního pufru A.

##### IZOLACE JADER POMOCÍ HUSTOTNÍHO GRADIENTU

Pro vytvoření hustotního gradientu bylo do falkony nanášeno 5 ml 2,5 M sacharózy. Na sacharózu bylo nanášeno 5 ml 60% roztoku Percollu. Spuštěním po stěně falkony byl přidán homogenát tak, aby se co nejméně narušila vrstva Percollu. Vzorek byl umístěn do vychlazené centrifugy (30 min, 1000 × g, 4 °C). Vrchní tekutina byla odstraněna a vrstva Percollu s jaderným extraktem opatrně přenesena do nové zkumavky. Percoll s jádry byl zředěn 2 ml pufru A a 0,5% roztokem Triton X-100. Extrakty byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 10 min s občasným promícháním. Znovu byly přidány 2 ml pufru A a provedena centrifugace (10 min, 1000 × g). Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován s 5 ml pufru A. Extrakt byl překryt 35% roztokem Percollu a vzorek centrifugován (10 min, 1000 × g). Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 5 ml pufru A s následnou centrifugací (10 min, 1000 × g).

## EXTRAKCE PROTEINŮ POMOCÍ ACETONU/TCA

Pelet byl resuspendován v 500  $\mu$ l pufru B. Další den byl vzorek umístěn do centrifugy (10 min, 20 000  $\times$  g). Supernatant byl odebrán a pelet resuspendován v 1,5 ml 10% (w/v) TCA v acetonu. Opět byla provedena centrifugace (10 min, 20 000  $\times$  g). Vzorek byl resuspendován v 80% (v/v) acetonu v destilované vodě.

## RESOLUBILIZACE PROTEINOVÉHO PELETU

K peletu bylo přidáno 800  $\mu$ l SDS pufru a vzorek byl inkubován 30 min při laboratorní teplotě.

## FENOLOVÁ EXTRAKCE

Po inkubaci bylo přidáno 400  $\mu$ l pufrém saturovaného fenolu a vzorek byl patřičně protřepán. Po oddělení fází byl odebrán fenol (vrchní vrstva), přenesen do nové zkumavky a doplněn do 2 ml vymraženým roztokem 100 mM octanu amonného v methanolu a vzorek byl ponechán přes noc při teplotě -20  $^{\circ}$ C. Další den byl vzorek umístěn do vychlazené centrifugy (4  $^{\circ}$ C, 10 min, 20 000  $\times$  g). Pelet byl promyt 0,5 ml 80% (v/v) acetonem v destilované vodě. Opět byla provedena centrifugace (10 min, 20 000  $\times$  g) a po dokončení byla odebrána kapalná fáze.

## RESOLUBILIZACE PROTEINU

Vzorky byly vysušeny (10 min), pelet rozpuštěn v 200  $\mu$ l 8 M močoviny a umístěn na třepáčku (60 min, 25  $^{\circ}$ C).

## STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINU

Pomocí Bradfordova reagens byla stanovena koncentrace proteinu.

## ŠTĚPENÍ TRYPSINEM

Získané vzorky byly žředěny roztokem acetonitrilu a hydrogenuhličitanu amonného do finální koncentrace 2 M močovina, 50 mM hydrogenuhličitan amonný, 5% acetonitril. Vzorek byl štěpen přidáním 30  $\mu$ l imobilizovaného trypsinu přes noc při teplotě 30  $^{\circ}$ C.

## ODSOLENÍ

Odsolení bylo provedeno na odsolovací desce následujícím postupem: 2×400 µl acetonitrilu (aktivace) → 4×400 µl 0,1% kyseliny mravenčí → nanesení vzorku → promytí 4×400 µl ddH<sub>2</sub>O → eluce - 2×200 µl acetonitrilu, odpařeno pomocí koncentrátoru.

## PŘÍPRAVA VZORKU PRO LC-MS

Vzorek byl rozpuštěn v roztoku 0,5% (v/v) kyseliny mravenčí v 5% (v/v) acetonitrilu.

### 3.3.2 Izolace s využitím kitu dle Pekala

Rostlinný materiál byl podroben extrakci pomocí izolačního kitu dle přiloženého manuálu výrobce (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents).

## HOMOGENIZACE

Objem reagentů CER I:CER II:NER byl použit v poměru 200:11:100 µl.

100 mg listů ječmene bylo nakrájeno na menší kousky a umístěno do mikrozkuhavky. Ke vzorku byl přidán roztok PBS dle manuálu. Mikrozkuhavka byla umístěna do centrifugy (5 min, 500 × g). Supernatant byl opatrně odstraněn. Vzorek byl homogenizován s přídavkem 1000 µl CER I.

## SEPARACE JADER

Po homogenizaci byl vzorek umístěn na vortex (15 s) dokud nebyl pelet plně resuspendován a mikrozkuhavka byla umístěna na led na 10 min. K roztoku bylo přidáno 55 µl CER II. Vzorek byl promíchán na vortexu (5 s) a ponechán na ledu po dobu 1 min. Byl zopakován předešlý krok, ale místo inkubace na ledu byl vzorek centrifugován (5 min, 16 000 × g). Po centrifugaci byl odebrán supernatant do nové mikrozkuhavky a umístěn na led.

## EXTRAKCE NUKLEÁRNÍCH PROTEINŮ

Pelet byl resuspendován v 500 µl NER, který byl získán po centrifugaci v minulých krocích. Vzorek byl umístěn na vortex (15 s) pro důkladné promíchání a následně na led. Předešlý krok byl opakován každých 10 min po celkovou dobu 40 min. Vzorek



byl centrifugován (10 min,  $16\,000 \times g$ ). Supernatant, který obsahoval jádra, byl odebrán do nové mikrozkuhavky a umístěn na led. Poté byl vzorek umístěn do mrazáku ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) před následnou MS analýzou.

### **3.4 LC-MS analýza**

Analýza proběhla dle shotgun protokolu, který je založen na nano-HPLC a MS/MS (Baldrianová *et al.*, 2015). Pro analýzu našich vzorků byla využita C18 reverzní chromatografie za použití 40 cm kolony (vnitřní průměr 0,075 mm; Nano Separations) and a Dionex Ultimate 3000 RSLC nano-UPLC systém (Thermo), který byl přímo napojen k nanoESI zdroji CaptiveSpray (Bruker) a UHR maXis impact q-TOF hmotnostnímu spektrometru (Bruker). Peptidy byly následně eluovány po dobu 120 minut s využitím acetonitrilového gradientu (od 4% do 40%). Hmotnostní spektrometr byl nastaven v módu závislém na intenzitě a spektra byla získána při 2 Hz (pro MS) a v rozsahu 10-20 Hz (pro MS/MS).

#### **3.4.1 Měření a zpracování MS spekter**

Získaná spektra byla zpracována pomocí software Bruker's Data Analysis 4.1. Provedla se recalibrace spekter a získaná MGF data z MS/MS byla dohledána a srovnána s proteinovou databází rajčete pomocí softwarů Sequest HT, MS Amanda a Mascot 2.4. Softwary srovnávaly získaná data s proteinovou databází ITAG 2.4 (rajče), TAIR10 (huseníček) a Bowtie 0.12.7 a TopHat 1.4.0 (ječmen). Byly zohledněny následující parametry: enzym - trypsin, maximálně dvě vynechaná štěpná místa, hmotnostní tolerance byla nastavena na 35 ppm (pro MS) a 0,1 Da (pro MS/MS), modifikace - do 3 dynamických modifikací včetně oxidace metioninu, Asn/Gln deaminace, Lys metylace, n-terminální acetylce, Ser/Thr/Tyr fosforylace. Informace o lokalizaci identifikovaných proteinů byly dohledány pomocí databáze cropPAL. Pro analýzu reakce nukleárních proteinů ječmene na cytokininy byly vyříděny regulované proteiny, které se neshodovaly v MS/MS a LFQ metodě.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

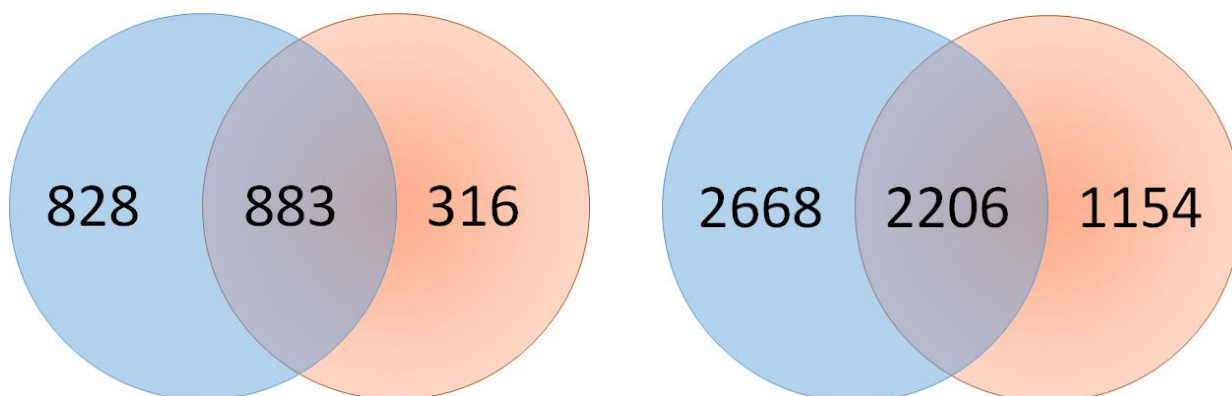
Cílem experimentální části mé práce bylo izolovat nukleární proteiny a pokusit se naleznout změny jaderného proteomu vyvolané rostlinným hormonem cytokininem. Pro mou práci byly vybrány modelové rostliny *A. thaliana*, *S. lycopersicum* a *H. vulgare*. Extrakce proteinů *A. thaliana* a *H. vulgare* byla provedena za použití izolačního kitu a protokolu “NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“ (Pekala, 2013). Pro izolaci proteinů *S. lycopersicum* byl použit manuál “Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the *Solanaceae* and *Rosaceae* families“ (Sikorskaite, 2013). Jelikož v průběhu testování bylo potřeba větší množství materiálu, pozornost se soustředila pouze na ječmen a rajče, kterého bylo k dispozici více.

V případě rajčete a ječmene byla následná homogenizace prováděna tekutým dusíkem, u rostlin huseníčku byl materiál homogenizován pomocí pufru CER I. Jádra rajčete a ječmene musela být separována od ostatních buněčných komponent pomocí diferenční centrifugace s využitím sacharóзовého a Percollového gradientu, narozdíl od jader huseníčku, jehož jádra byla získána centrifugací v přítomnosti pufru CER II. Extrakce nukleárních proteinů byla provedena pomocí kombinace acetonové a fenolové extrakce (rajče, ječmen), dále pak s použitím pufru NER (huseníček). Pro následnou analýzu byla použita LC-MS, konkrétně C18 reverzní chromatografie ve spojení se systémem Dionex Ultimate 3000 RSLC nano-UPLC, kde jako zdroj posloužil nanoESI CaptiveSpray a ve finále byl použit UHR maXis impact q-TOF hmotnostní spektrometr.

### 4.1 Identifikace nukleárních proteinů rajčete

Získaná spektra z MS analýzy byla dále zpracována. V našem případě byla MS spektra ze 14 měření zpracována kombinací tří algoritmů a získaná data ze všech replikací byla mezi sebou kombinována pro dosažení co největšího překryvu. Bylo identifikováno celkem 1 711 a 1 199 proteinových rodin (Obr. 6) a to v celkovém proteinovém extraktu a jaderném extraktu. Získané proteiny rajčete byly vyhledávány a srovnávány s databází ITAG 2.4; 8/2014.

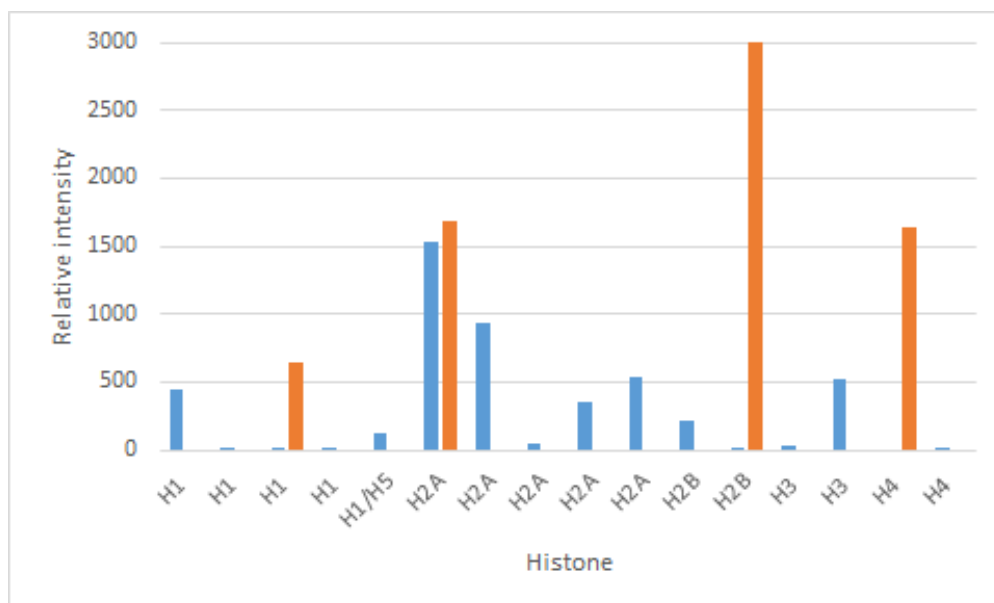
Překryv identifikovaných proteinů z celkového proteinu a nukleární frakce je značně vysoký, reprezentující 51 % a 74 % všech identifikovaných proteinů (Obr. 6A). Podobně je tomu u identifikovaných peptidů, jež jsou reprezentovány 45 % a 65 % (Obr. 6B). Nicméně identifikace 139 proteinů, které jsou specifické pro jaderný extrakt, je založena pouze na jediném identifikovaném peptidu. Důkladnější analýza dat ukázala, že alespoň některé jaderné proteiny byly významně obohaceny v jaderném extraktu. Jedná se zejména o DNA-dependentní RNA-polymerázu II (nebyla detekována v celkovém proteinovém extraktu) a tři proteiny z histonové proteinové rodiny – H1 (200×), H4 (nebyl detekovatelný v celkovém proteinovém extraktu) a H2B (200×). Dále bylo nalezeno 12 histonů a 4 proteiny asociované s histony, které byly detekované pouze v celkovém proteinovém extraktu a v jaderném nikoliv (Obr. 7). Pouze však 4 z 8 detekovaných proteinů byly nalezeny v jaderném extraktu. Je tedy zřejmé, že obohacování jaderných proteinů může mít ve výsledku negativní dopad na detekci některých nukleárních proteinů.



A) Identifikované proteiny.

B) Identifikované peptidy.

Obr. 6 Identifikace proteinů (*S. lycopersicum*). Celkový proteinový extrakt je označen modře, jaderný pak oranžově.

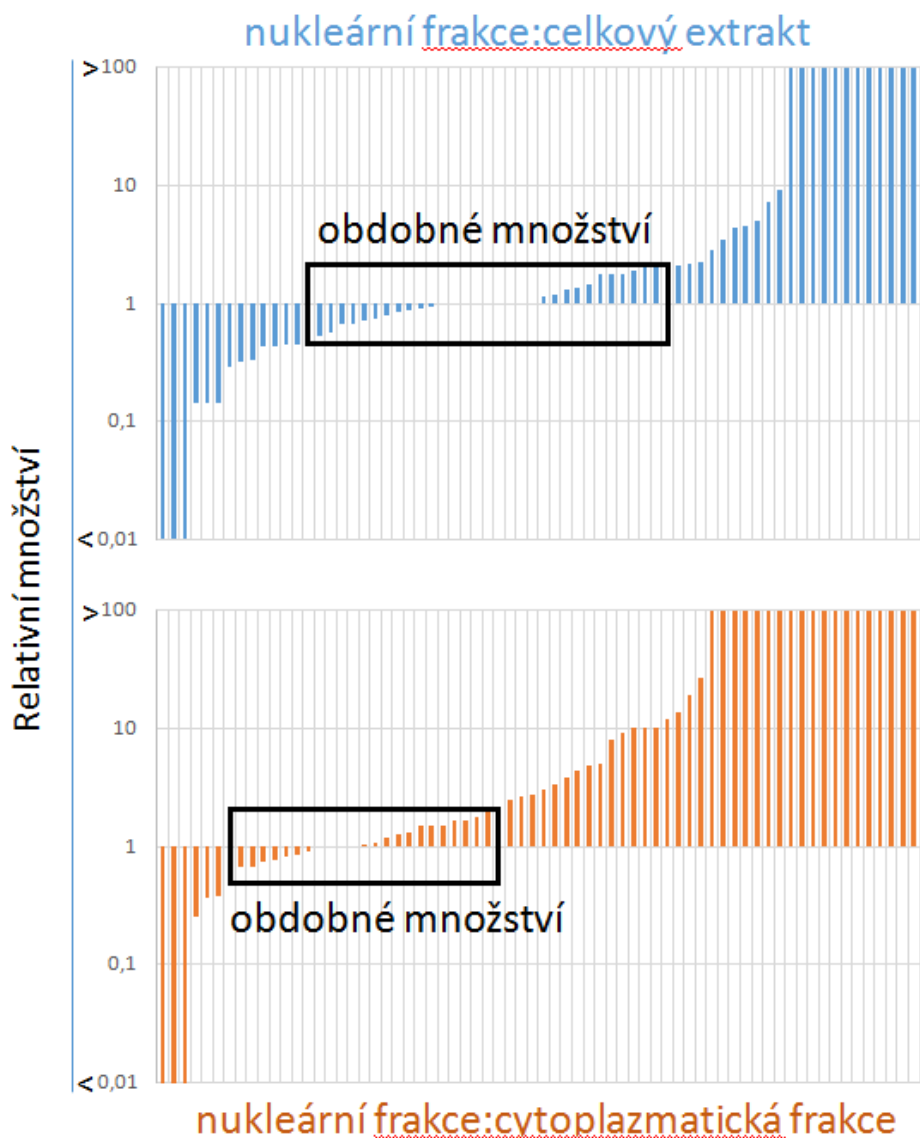


Obr. 7 Relativní množství detekovaných histonů v celkovém proteinu (modrá) a jaderném extraktu (oranžová).

## 4.2 Identifikace nukleárních proteinů ječmene

Při analýze ječmene se podařilo identifikovat celkem 613 (celkový protein), 643 (jaderný protein) a 587 (cytoplazmatický protein) proteinových rodin. Ke všem identifikovaným proteinům nebyly dostupné anotace (cropPAL). Naše následná analýza tedy vycházela pouze z 382 anotovaných proteinů (Obr. 8). Celkově bylo identifikováno 68 nukleárních proteinů, z nichž 65 bylo přítomno v nukleární frakci, 56 v běžném celkovém extraktu a 48 v cytoplazmatické frakci. Pomocí počtu přiřazených spekter (PSM) byla porovnána míra obohacení nukleárních proteinů.

Jaderná frakce při porovnání s běžnou extrakcí byla obohacena v případě 22 proteinů (více jak 2×), 33 nebylo významně ovlivněno a 13 dokonce v nukleární frakci významně ubylo. Porovnání nukleární a cytoplazmatické frakce již trochu více odpovídá očekávanému. Celkem 37 nukleárních proteinů je významně obohaceno v nukleární frakci, zastoupení 25 se neliší a pouze pro 6 proteinů bylo pozorováno zvýšené množství v cytoplazmatické frakci.



Obr. 8 Porovnání zastoupení známých nukleárních proteinů v nukleární frakci. Modrá – porovnání s celkovým extraktem; oranžová – porovnání s cytoplazmatickou frakcí. K izolaci byl použit NE-PER® extrakční kit a běžná aceton/TCA extrakce.

### 4.3 Reakce nukleárních proteinů ječmene na cytokininy

Bylo nalezeno 65 jaderných proteinů, z nichž 15 vykazuje změnu ve vzorku ošetřeném cytokininy. Významný nárůst v reakci na cytokinin byl pozorován např. u proteinu MLOC\_10478.2, který slouží jako ATP-dependenční RNA helikáza SUB2, dále u MLOC\_12553.1, který je zapojen do odpovědi rostlin na solný stres. Podobně tomu je u dalších proteinů (Tab. 3).

Tab. 3 Přehled nukleárních proteinů, u kterých byla pozorována změna ve vzorku ošetřeném cytokininy.

ID proteinu	Název proteinu	Relativní změna CK:kontrola
MLOC_60125.2	60S ribozomální protein	0.3
MLOC_67651.1	Elongační faktor 1-beta	0.3
MLOC_7518.1	DNA vazebný protein	0.4
MLOC_15227.2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomeráza	0.7
MLOC_54589.1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A	0.7
MLOC_12553.1	Protein RS1 podílející se na odpovědi na solný stres	0.8
MLOC_7826.2	PGR5	1.6
MLOC_10478.2	ATP-dependentní RNA helikáza SUB2	>10.0
MLOC_56500.1	Kalmodulin 7	>10.0
MLOC_67933.1	Neznámý	>10.0
MLOC_54382.1	Aktin 7	>10.0
MLOC_73132.2	Aktin 7	>10.0
MLOC_552.2	Aquaporin	>10.0
MLOC_13138.1	60S ribozomální protein L14-1	>10.0
MLOC_28316.1	ATPáza G1 podjednotak, vakuolární	>10.0

## 5 ZÁVĚR

Práce s izolačním kitem použitým pro *H. vulgare* a *A. thaliana* byla poměrně snadná, neboť obsahovala pouze tři komponenty a pomocí přiloženého protokolu byly zvoleny použité objemy. V porovnání s tímto extrakčním kitem byla izolace proteinů *S. lycopersicum* dle manuálu “Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the *Solanaceae* and *Rosaceae* families“ (Sikorskaite, 2013) o něco složitější. Tento protokol zahrnoval použití percollového gradientu. Cena Percollu je sice nižší, ale příprava roztoků, která přecházela samotné extrakci, je časově náročnější, než práce s izolačním kitem. Na první pohled je množství identifikovaných proteinů u rajčete vyšší, takže se dá říci, že i samotná izolační metoda je účinnější a spolehlivější. Pomocí analýzy jaderného proteomu bylo v listech rajčete navýšeno množství identifikovaných proteinů (~16 %) a peptidů (~19 %). Určení lokalizace všech 316 jaderných proteinů však není možné vzhledem k nedostatečné anotaci proteomu rajčete. Nicméně porovnání několika dobře známých jaderných proteinů ukázalo, že protokol využívající percoll může mít, narozdíl od aceton/TCA extrakce, negativní dopad na výnosy v oblasti jaderného proteomu. Tyto výsledky naznačují, že extrakce celkového proteinu pomocí aceont/TCA extrakce může být vhodnější metodou pro kvalitativní analýzu nukleárních proteinů. Analýzou ječmene byly získány dvě sady dat, z nichž jedna hodnotí obohacení jaderné frakce ve srovnání s běžnou extrakcí a cytoplazmatickou frakcí. Druhá pak sleduje změny v proteinech ošetřených cytokininy. Ve srovnání s běžnou extrakcí byla získána jaderná frakce obohacená celkem o 22 proteinů. Některé proteiny v jaderné frakci zcela chyběly v porovnání s běžnou extrakcí a u velké části nebylo zaznamenáno obohacení ani úbytek. V případě porovnání cytoplazmatické a jaderné frakce jsou výsledky uspokojivější, došlo zde k výraznějšímu obohacení jaderné frakce (až u 37 proteinů) a také pouze 6 proteinů v nukleární frakci chybělo. U 25 proteinů nebyly patrné žádné změny. U proteinových vzorků ošetřených cytokininy byly pozorovány změny v případě 15 nukleárních proteinů s rozmanitými funkcemi. Po izolaci nukleárních proteinů rajčete, stejně tak po extrakci proteinů ječmene, byly nalezeny nukleární proteiny v celkovém proteinu, které už nebyly detekovány v jaderné frakci. Vzhledem k časově náročným krokům není vždy zaručena úplná inhibice proteáz, a proto mohou některé proteiny degradovat.

Ve výsledku by se tedy dalo říci, že obohacení jaderných proteinů nemusí vždy vést ke zvýšení jejich detekovatelnosti.

Výstupy a výsledky práce byly zpracovány na přístrojovém vybavení financovaném z projektu OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/04.0135 Výukové a výzkumné kapacity pro biotechnologické obory a rozšíření infrastruktury.



## 6 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Baldrianová, J., Černý, M., Novák, J., Jedelský, P. L., Divíšková, E., Brzobohatý, B., 2015: Arabidopsis proteome responses to the smoke-derived growth regulator karrikin. *Journal of Proteomics*, 120: 7–20.

Baldrianová, J., Černý, M., Novák, J., Jedelský, P. L., Divíšková, E., Brzobohatý, B. 2015. Arabidopsis proteome responses to the smoke-derived growth regulator karrikin. *Journal of Proteomics*, 120: 7–20.

Bradford protein assay. In: Wikipedie: otevřená encyklopedie [online]. Stránka naposledy edit. 25. 2. 2017 v 21:43. [vid. 2017-03-31]. Anglická verze. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Bradford\\_protein\\_assay](https://en.wikipedia.org/wiki/Bradford_protein_assay)

Braud, C., Zheng, W., & Xiao, W., 2013: Identification and analysis of LNO1-Like and AtGLE1-Like Nucleoporins in plants. *Plant signaling & behavior*, 8(12), e27376.

Cell nucleus. In: Wikipedie: otevřená encyklopedie [online]. Stránka naposledy edit. 19. 2. 2017 v 14:47. [vid. 2017-03-13]. Anglická verze. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_nucleus](https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_nucleus)

Ciska, M., & Moreno Díaz de la Espina, S., 2013: NMCP/LINC proteins: putative lamin analogs in plants?. *Plant signaling & behavior*, 8(12), e26669.

Ciska, M., & Moreno Díaz de la Espina, S., 2014: The intriguing plant nuclear lamina. *Frontiers in Plant Science*, 5, 166.

Cooper, G. M., 2000: *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. The Nuclear Envelope and Traffic between the Nucleus and Cytoplasm.

Cooper, G. M., Hausman, R. E., 2000: *The Cell, A Molecular Approach*. Chapter 4.2 Chromosomes and Chromatin. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates.

Dittmer, T. A., Richards, E. J., 2008: Role of LINC proteins in plant nuclear morphology. *Plant Signaling & Behavior*, 3(7), 485–487.

Evans, D. E., Pawar, V., Smith, S. J., & Graumann, K., 2014: Protein interactions at the higher plant nuclear envelope: evidence for a linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex. *Frontiers in plant science*, 5, 183.

Friedecký, D., Lemr, K., 2012: Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Chemické Listy*, roč. 20, 150-157.

Gindullis, F., Peffer, N. J., Meier, I., 1999: MAF1, a novel plant protein interacting with matrix attachment region binding protein MFP1, is located at the nuclear envelope. *The Plant Cell*. 11(9): 1755-1768

Hetzer, M. W., 2010. The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2(3).

Hooper, C. M., Tanz, S. K., Castleden, I. R., Vacher, M. A., Small, I. D., Millar, A. H., 2014: SUBAcon: a consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the Arabidopsis proteome. *Bioinformatics*, 30(23), 3356-3364.

Jeong, S. Y., 2003: MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Research*. 31(17), 5175-5185.

Kellner, R. (2000). Proteomics. Concepts and perspectives. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366(6), 517-524.

Lammerding, J., 2011: Mechanics of the nucleus. *Comprehensive Physiology*. 783-807.

Liebich, I., Bode, J., Reuter, I., & Wingender, E., 2002: Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). *Nucleic acids research*, 30(15), 3433-3442.

Lloyd, D. D., 2000: Preparation of pH buffer solutions. Dostupné z: <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html>

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., & Darnell, J., 1995: *Molecular cell biology*. 2<sup>nd</sup> ed.. New York: Scientific American Books. ISBN 07-167-4366-3.

Meier, I., 2008: Functional organization of the plant nucleus.

Pekala, P. H., 2013: NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents.

Pendle, A. F., & Shaw, P. J., 2017: Isolation of Nuclei and Nucleoli. *Isolation of Plant Organelles and Structures: Methods and Protocols*, 31-44.

Petrovská, B., Šebela, M., Doležel, J., 2015: Inside a plant nucleus: discovering the proteins. *Journal of Experimental Botany*. 66(6), 1627-1640.

Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G., 2016: *Cell biology*. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier Health Sciences. c2008. ISBN 978-1-4160-2255-8.

Sikorskaite, S., Rajamäki, M. L., Baniulis, D., Stanys, V., & Valkonen, J. P. (2013). Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant methods*, 9(1), 31.

Svetláková, A., Černá, H., Novák, J., Selale, H., 2016: Pros And Cons Of Plant Nuclear Protein Enrichment. 1022-1025.

Wang, H., Dittmer, T. A., Richards, E. J., 2013: Arabidopsis CROWDED NUCLEI (CRWN) proteins are required for nuclear size control and heterochromatin organization. *BMC plant biology*, 13(1), 200.

Wente, S. R., & Rout, M. P., 2010: The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a000562.

Xu, X. M., Rose, A., Muthuswamy, S., Jeong, S. Y., Venkatakrisnan, S., Zhao, Q., & Meier, I. (2007). NUCLEAR PORE ANCHOR, the Arabidopsis homolog of Tpr/Mlp1/Mlp2/megator, is involved in mRNA export and SUMO homeostasis and affects diverse aspects of plant development. *The Plant Cell*, 19(5), 1537-1548.

Yin, X., Komatsu, S., 2016: Plant nuclear proteomics for unraveling physiological function. *New biotechnology*, 33(5), 644-654.

## WEBOVÉ ZDROJE

Life Technologies. (b. d.). Dostupné z: <https://www.thermofisher.com>

Plant Life: Anything related to plant life. 2011. Dostupné z: <http://lifeofplant.blogspot.cz/2011/03/nucleoplasm.html>

Protein Sample Preparation. (b. d.). Dostupné z: [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com)

Sigma-Aldrich, 2017. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/>

## 7 SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obr. 1:** Jádra z odlišných rostlinných druhů získaná fázovou kontrastní mikroskopií (A,C, E) a barvením DAPI s fluorescenční mikroskopií (B, D, F).

**Obr. 2:** Struktura jádra.

**Obr. 3:** Struktura jaderného póru.

**Obr. 4:** Zjednodušené schéma proteomické analýzy.

**Obr. 5:** Schéma detekovatelných proteinů z celkového extraktu.

**Obr. 6:** Identifikace proteinů (*S. lycopersicum*).

**Obr. 7:** Relativní množství detekovaných histonů v celkovém proteinu (modrá) a jaderném extraktu (oranžová).

**Obr. 8:** Porovnání zastoupení známých nukleárních proteinů v nukleární frakci.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**2-DE** (twodimensional gel electrophoresis) — dvoudimenzionální elektroforéza

**BAP** — benzylaminopurin

**BCA** — bicinchoninová kyselina

**CER** (cytoplasmic extraction reagent) — reagent pro cytoplazmatickou extrakci

**CRWN** (crowded nuclei) — nukleární protein

**DAPI** — 4',6-diamidin-2-fenylindol

**DTT** — dithiotreitol

**E-64** — 1-trans-epoxysukcinylnyl-L-leucylamido(4-guanidino)butan

**EDTA** — ethylendiamintetraoctová kyselina

**ESI** (electrospray ionization) — ionizace elektrosprejem

**HEPES** — 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

**HPLC** (high-performance liquid chromatography) — vysokoúčinná kapalinová chromatografie

**CHAPS** — 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát

**INM** — (inner nuclear membrane) vnitřní jaderná membrána

**KASH** (Klarsicht/ANC-1/Syne-1 homology) — nukleární protein

**kD** — kilodalton

**LINC** (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) — jaderný proteinový komplex

**m/z** — hodnota poměru hmotnosti a náboje

**MAF1** (MFP1-associated factor 1) — nukleární protein

**MALDI** (matrix-assisted laser desorption/ionization) — ionizace laserem za přítomnosti matrice

**MAR** (matrix attachment region) — oblast pro připojení matrix

**MES** — 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina

**MFP1** (MAR-binding filament-like protein 1) — nukleární protein

**MS** (mass spectrometry) — hmotnostní spektrometrie

**MS/MS** — tandemová hmotnostní spektrometrie

**NER** (nuclear extraction reagent) — reagent pro nukleární extrakci

**NMCP** (nuclear matrix constituent protein) — nukleární protein

**NPC** (nuclear pore complex) — jaderný pór

**NUA** (nuclear pore anchor) — nukleární protein

**Nups** (nucleoporins) — nukleoporiny

**ONM** (outer nuclear membrane) — vnější jaderná membrána

**PBS** — fosfátový pufr

**PIPES** — N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonová kyselina

**PMSF** — fenylmetylsulfonyl fluorid

**q-TOF** (quadrupole time-of-flight mass spectrometer) — tandemový hmotnostní spektrometr sdružující dvojici kvadrupólů a průletový hmotnostní analyzátor

**SDS** — dodecylsírán sodný

**SUN** (Sad1/UNC84) — nukleární protein

**TCA** — trichloroctová kyselina

**WPP** — tryptofan-prolin-prolin (doména)



## **9 PŘÍLOHY**

### **Posterové sdělení**

Svetláková, A., Černá, H., Novák, J., Selale, H., 2016: **Pros And Cons Of Plant Nuclear Protein Enrichment**. 1022-1025.

# PROS AND CONS OF PLANT NUCLEAR PROTEIN ENRICHMENT

ANNA SVETLAKOVA<sup>1</sup>, HANA CERNA<sup>1</sup>, JAN NOVAK<sup>1</sup>, HATICE SELALE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Radiobiology

Mendel University in Brno

Zemedelska 1, 613 00 Brno

CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology and Genetics

Izmir Institute of Technology

Gulbahce Campus, Urla, 35430 Izmir

TURKEY

xsvetlak@mendelu.cz

**Abstract:** Nuclear proteome contains important regulatory proteins. To improve the detection of these proteins, Percoll gradient-based fractionation techniques have been developed and optimized. However, owing to the ever increasing sensitivity of identification methods based on liquid chromatography and mass spectrometry, the time and material consuming fractionation methods may no longer be necessary. Here, we show that a Percoll-based nuclear protein fractionation of tomato leaf proteome increased the number of detected proteins, but at least some nuclear proteins were lost or depleted in the process.

**Key Words:** nuclear proteome, LC-MS, proteome fractionation

## INTRODUCTION

The nucleus is a complex and heterogeneous organelle that is composed of two main structural parts: nuclear envelope and nucleoplasm. The later contains most of the cell's genetic information but also other molecules, including proteins that play a central role in regulating gene expression (Petrovská et al. 2015). The identification and characterization of these regulatory proteins presents a challenge. They are usually in a low abundance and subjects of post-translational modifications. The enrichment of phosphorylated or acetylated proteins (e.g. Černý et al. 2013b) may increase the detection limits, but the most effective technique to isolate nuclear proteins seems to be a cell fractionation. The standard protocol consists of a homogenization of tissues, pelleting, elimination of contaminating organelles and separation on a density gradient. Plant extracts are more complicated and require an additional filtration step after a homogenization to remove large debris (e.g. Sikorskaite et al. 2013). The extraction of nuclei is a time consuming step and may have a negative impact on proteome quality. For instance, even the addition of protease inhibitors does not necessarily prevent a residual protease activity during filtration and pipetting steps. Further, the efficiency of the extraction protocol is not comparable to that of phenol extraction or acetone/TCA precipitation and thus the amount of starting material has to be considerably larger. Here, we compare results of an optimized protocol for nuclear protein extraction and standard protein precipitation protocol in the analysis of tomato leaf proteome.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

Leaves of 4-week-old tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. moneymaker) were collected, frozen in liquid nitrogen, homogenized (Retsch Mill MM400), aliquoted and stored at -80 °C.

### Protein extraction

Total protein extracts were prepared by acetone/TCA/phenol extraction (Carpentier et al. 2005, Černý et al. 2014, Novák et al. 2015) from 200 mg of ground tissue. In brief, the homogenized tissue was washed with 1.5 ml acetone (4 °C, 30 min), clarified by centrifugation, washed with 10% (w/v)

TCA in acetone, 10% (w/v) TCA in distilled water then 80% (v/v) acetone, resuspended in 0.8 ml SDS buffer [2% (w/v) SDS, 30% (w/v) sucrose, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0], and protein was extracted by 0.4 ml buffer-saturated phenol. Phenolic phase was collected and protein was precipitated overnight in 1.6 ml ice-cold 100 mM ammonium acetate in methanol (-20 °C). Protein pellets were washed with 1.0 ml 80% (v/v) acetone in distilled water and dried. Nuclei were extracted on percoll gradient from 2 g of ground tissue as described previously (Sikorskaite et al. 2013). In brief, 1 g of homogenized tissue was extracted in 5 ml of NIB buffer [10 mM MES-KOH (pH 5.4), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 250 mM sucrose, 0.1 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM DTT], decanted through two layers of pre-wetted cheesecloth, treated with Triton X-100 (dropwise to 0.5%), agitated for 20 min at 4°C and centrifuged at 1000  $\times$  g for 10 min. The pellet was resuspended in 10 ml of NIB and nuclei were purified using Percoll/sucrose density gradient (2.5 M sucrose, 60% Percoll for isolation; 35% Percoll for washing). Nuclear proteome was precipitated with 10% (w/v) TCA in acetone and washed 1.0 ml 80% (v/v) acetone in distilled water and dried. The resulting protein pellets were solubilized (100 mM ammonium bicarbonate, 8 M urea) and digested with an immobilized trypsin (Promega) overnight and desalted by C18 SPE (Černý et al. 2013a).

### LC-MS proteome analysis

Analyses were performed using a gel-free shotgun protocol based on nano-HPLC and MS/MS (Baldrianová et al. 2015). Briefly, tryptic digests were dissolved in 0.5% (v/v) formic acid in 5% (v/v) acetonitrile, and then analyzed by nanoflow C18 reverse-phase liquid chromatography using a 40 cm column (0.075 mm inner diameter; NanoSeparations) and a Dionex Ultimate 3000 RSLC nano-UPLC system (Thermo) directly coupled to a CaptiveSpray nanoESI source (Bruker) and an UHR maXis impact q-TOF mass spectrometer (Bruker). Peptides were eluted with up to a 120-min, 4% to 40% acetonitrile gradient. Spectra were acquired at 2 Hz (MS) and 10 to 20 Hz (MS/MS) using an intensity-dependent mode with a total cycle time of 7 s.

### Protein identification

The measured spectra were extracted by Bruker's Data Analysis 4.1 and processed as described previously (e.g. Cerna et al. 2016). In brief, recalibrated MGF files were searched against Tomato protein database (ITAG 2.4; 8/2014) by Sequest HT, MS Amanda and Mascot 2.4 with the following parameters: Enzyme - trypsin, max two missed cleavage sites; Mass tolerance - 35 ppm (MS) and 0.1 Da (MS/MS); Modifications - up to three dynamic modifications including Met oxidation, Asn/Gln deamidation, Lys methylation, N-terminal acetylation, Ser/Thr/Tyr phosphorylation.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification of tomato proteins

Total protein extracts and nuclear enriched extracts were prepared in 14 replicates each. To increase the proteome coverage, MS spectra were processed by a combination of three complementary search algorithms and the resulting data obtained from all replicates were combined. Altogether, 1,711 and 1,199 protein groups were identified in total protein extracts and nuclear protein extracts, respectively (Figure 1).

### Enrichment of nuclear proteins does not necessarily improve their detection

The overlap in identified proteins between total protein and nuclear extracts is high, representing 51% and 74% of all identified proteins, respectively (Figure 1A). A similar distribution is also reflected on a peptide level (45% and 65%; Figure 1B). Further, identification of 139 proteins unique to nuclear extracts is based only on a single identified peptide and these are thus not suitable for a quantitative analysis. In depth analysis of our data showed that at least some nuclear proteins are significantly enriched in nuclear extracts, including DNA-directed RNA polymerase II (not detected in total protein extracts) or three proteins of histone family H1 (200 $\times$ ), H4 (not detectable in total protein extracts) and H2B (200 $\times$ ). However, 12 histones and four histone-associated proteins were detected only in total protein extracts (Figure 2). Similarly, only four of eight detected 14-3-3 proteins were found in nuclear extracts. This shows that the nuclear protein enrichment may in fact have a negative impact on the detection of at least some of the nuclear proteins. To our knowledge, this is the first report of its kind in tomato proteomics and we can not exclude that this is a consequence of a tomato specific protease

activity. Standard protocols for nuclei extraction consists of several incubation steps at 4 °C and employ protease inhibitors. If the inhibition efficiency was lower (as is often the case) quality of the proteome would suffer.

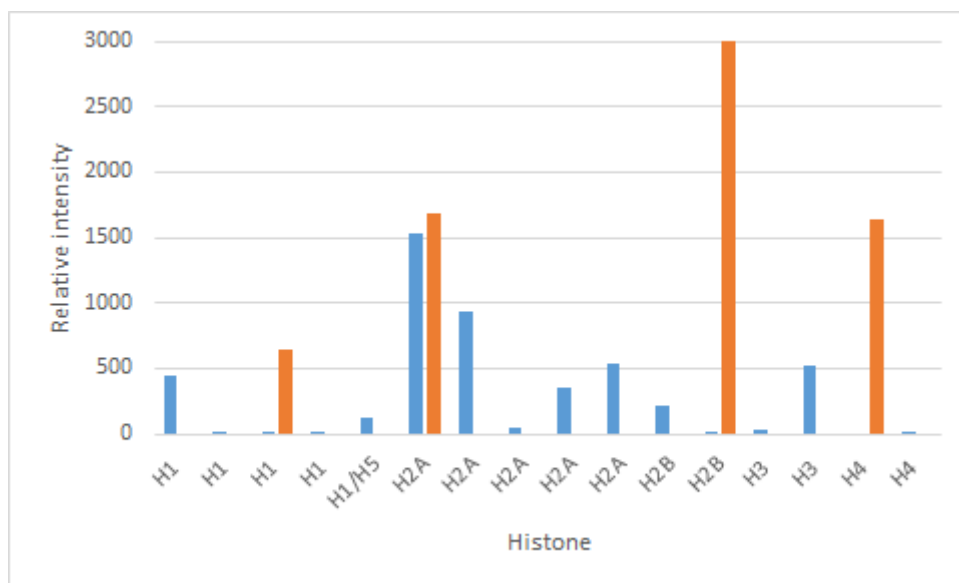
Figure 1 Identification of proteins in total protein extracts (blue) and nuclear extracts (orange)

A) Identified proteins

B) Identified peptides



Figure 2 Relative abundances of detected histones in total protein extracts (blue) and nuclear extracts (orange) based on sum of all assigned peptide spectral matches



**CONCLUSION**

Analysis of nuclear protein extracts increased the number of identified proteins and peptides in tomato leaves by ~16% and ~19%, respectively. Insufficient annotation of tomato proteome does not allow to easily assess the localization of all 316 proteins unique to nuclear extracts. However, based on the profiles of several well-known nuclear proteins we conclude that the established Percoll-based protocol shows disproportionate yields in nuclear proteins and may even decrease the detectability of some. This would imply that the acetone/TCA total protein extraction is superior in the qualitative analysis.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The results of this research have been acquired within CEITEC 2020 (LQ1601) project with financial contribution made by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic within special

support paid from the National Programme for Sustainability II funds. The support within the project TŮBITAK/14/012 (the Czech Academy of Sciences and Scientific and Technological Research Council of Turkey) is greatly appreciated.

## REFERENCES

- Baldrianová, J., Černý, M., Novák, J., Jedelský, P.L., Divišková, E., Brzobohatý, B. 2015. Arabidopsis proteome responses to the smoke-derived growth regulator karrikin. *Journal of Proteomics*, 120: 7–20.
- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., & Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5(10), 2497–507.
- Cerna, H., Černý, M., Habánová, H., Šafářová, D., Abushamsiya, K., Navrátil, M., Brzobohatý, B. 2016. Proteomics offers insight to the mechanism behind *Pisum sativum* L. response to Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV). *Journal of Proteomics*, In Press.
- Černý, M., Kuklová, A., Hoehenwarter, W., Fagner, L., Novák, O., Rotková, G., Jedelský, P. L., Žáková, K., Šmehilová, M., Strnad, M., Weckwerth, W., Brzobohatý, B. 2013a. Proteome and metabolome profiling of cytokinin action in Arabidopsis identifying both distinct and similar responses to cytokinin down- and up-regulation. *Journal of Experimental Botany*, 64(14): 4193–4206.
- Černý, M., Jedelský, P. L., Novák, J., Schlosser, A., Brzobohatý, B. 2014. Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 37(7): 1641–1655.
- Černý, M., Skalák, J., Cerna, H., Brzobohatý, B. 2013b. Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of Proteomics*, 92: 2–27.
- Novák, J., Černý, M., Pavlů, J., Zemánková, J., Skalák, J., Plačková, L., Brzobohatý, B. 2015. Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root-to-hypocotyl ratio changes induced by shading roots of Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiology*, 56(5): 1006–1018.
- Petrovská, B., Šebela, M., Doležel, J. 2015. Inside a plant nucleus: discovering the proteins. *Journal of Experimental Botany*, 66(6): 1627–1640.
- Sikorskaite, S., Rajamäki, M.L., Baniulis, D., Stanys, V., Valkonen, J.P.T. 2013. Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods* [Online], 9(31):1. Available at: <https://plantmethods.biomedcentral.com/article/s/10.1186/1746-4811-9-31> [2016-08-05].