

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Aneta Mísařová

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

Metody analýzy buněčných kompartmentů

Aneta Mísařová

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Aneta Mísařová**
Osobní číslo: **C14306**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Metody analýzy buněčných kompartmentů**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu pojednávající o buněčných kompartmentech a metodách, jak je izolovat.
2. Prostudujte literaturu týkající se neinvazivní analýzy buněčných kompartmentů, zejména optických metod.
3. Ke studiu tematiky použijte hlavně zahraniční odbornou literaturu a informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Zinser a Daum (1995) Isolation and Biochemical Characterization of Organelles from the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 493-536. Frezza, Cipolat, Scorrano (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols* 2, 287-295. Daemen, van Zandvoort, Parekh, Hesselink (2015) Microscopy tools for the investigation of intracellular lipid storage and dynamics. *Mol Metab* 31, 153-163. Schie, Kraft, Popp (2015) Application of coherent Raman scattering microscopies to clinical and biological studies. *Analyst* 140, 3897-3909. Další relevantní články vyhledejte pomocí standardních databází.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že 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 směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4.7.2018

.....
Aneta Mísařová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala mé školitelce RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala při psaní této práce. Také chci poděkovat mé rodině a blízkým za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato práce se zabývá metodami izolace buněčných organel. Pozornost je věnována především metodám, které jsou invazivní, tedy je nutné narušit buněčnou membránu. Dále se tato práce také věnuje neinvazivní analýze pomocí mikroskopických metod. Izolace a analýza buněčných kompartmentů je důležitá pro správně pochopení mnoha buněčných funkcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Organely, buněčné kompartmenty, mitochondrie, izolace organel, analýza

TITLE

Methods of cellular compartments analysis

ANNOTATION

This thesis deals with methods of isolation of intracellular organelles. Attention is paid mainly to methods which are invasive, so it is necessary to disrupt cell wall. This thesis also deals with non-invasive microscopic analysis. Isolation and analysis of cell compartments is important for correct understanding of many cellular functions.

KEYWORDS

Organelles, cell compartments, mitochondria, organelle isolation, analysis

Obsah:

0 Úvod	10
1 Destruktivní (invazivní) analýza.....	11
1.1 Metody izolace organel z buňky	11
1.2 Narušení buněčné (cytoplazmatické) membrány	11
1.2.1 Homogenizace	11
1.2.2 Dusíková kavitace	12
1.3. Izolace buněčných kompartmentů.....	13
1.3.1 Subcelulární frakcionace	13
1.3.1.1 Diferenciální centrifugace	13
1.3.2 Gradientová centrifugace.....	14
1.3.3 Imunoizolace organel	15
1.3.3.1 Imunofluorescenční značení.....	15
1.4 Metody pro analýzu jednotlivých buněčných kompartmentů	15
1.4.1 Průtoková cytometrie.....	15
1.4.1.1 Využití průtokové cytometrie v identifikaci jednotlivých organel....	15
1.4.1.2 FACS – fluorescence activated cell sorter.....	16
1.4.2 Elektroimigrační analýza	16
1.4.2.1 FFE (Free Flow Electrophoresis) – elektroforéza s volným tokem ..	16
1.4.2.2 FFF (Field-flow fracionation).....	17
1.4.2.3 Kapilární elektroforetické techniky	18
1.4.2.4 Stanovení izoelektrického bodu mitochondrií izoelektrickou fokusací	18
1.4.2.5 Dielektrická elektroforéza (DEP).....	18
1.4.3 Mikrofluidní technologie	19
1.4.3.1 μ -FFE.....	19
1.4.4 Ověření průběhu izolace	19
1.4.4.1 Western Blot	19
1.4.4.2 Identifikace mitochondrií a dalších organel pomocí Western blotu..	19
1.4.4.3 Markery používané při Western blotu	20
2 Rozdíly v izolaci živočišných a rostlinných, houbových, případně bakteriálních organel.....	21
2.1 Buněčná stěna.....	21
2.1.1 Dezintegrace buněčné stěny pomocí chemických látek	21

2.1.2 Fyzikální (mechanická) dezintegrace	21
2.1.3 Dezintegrace pomocí enzymů	22
3 Příklady izolace některých organel	23
3.1 Mitochondrie	23
3.1.1 Izolace mitochondrií	23
3.1.2 Purifikace mitochondrií pomocí gradientové centrifugace v sacharózovém gradientu	24
3.1.3 Analýza mitochondrií pomocí průtokové cytometrie	24
3.2 Izolace mitochondria-asociated membranes	25
3.3 Izolace Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula	26
4 Neinvazivní analýza	27
4.1 Mikroskopické metody	27
4.1.1 Konfokální mikroskopie	27
4.1.2 Superrozlišovací fluorescenční mikroskopie	28
4.1.2.1 STED mikroskopie – vyčerpání stimulovanou emisí	28
4.2 Další mikroskopické techniky	29
4.2.1 Elektronová mikroskopie	29
4.2.1.1 Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)	30
4.2.1.1.1 Korelace mezi imunofluorescencí a SEM	30
4.2.2 Mikroskopie atomárních sil (AFM)	30
5 Izolace a analýza kvasinkových buněk	32
5.1 Narušení buněčné stěny mechanicky	32
5.2 Štěpení buněčných stěn enzymy	32
5.3 Analýza kvasinkových kompartmentů in vitro	33
5.3.1 Izolace a purifikace mitochondrií	33
5.3.2 Vakuoly	33
5.4.1 Izolace	34
5.4.2 Charakterizace vakuol pomocí fluorescenční mikroskopie	34
5.4.3 Strukturální a funkční charakterizace izolovaných vakuol pomocí průtokové cytometrie	35
6 Závěr	36
7 Seznam literatury	37
8 Zdroje obrázků	42
9 Seznam použitých zkratk	43

0 Úvod

Eukaryotické buňky, ať rostlinného nebo živočišného původu, obsahují organely. Pozornost bude věnována především těmto buňkám, neboť buňky prokaryotické buněčné organely prakticky téměř neobsahují. Jako buněčné kompartmenty označujeme především takové útvary, které jsou ohraničeny vlastní biomembránou. Buňky jsou kompartmentovány na mnoho organel, zajišťujících v buňce specifickou úlohu.

Analýza buněčných kompartmentů představuje jeden z hlavních pilířů moderní bioanalytické chemie. Izolace buněčných organel pro analýzu se používá především v bioanalytické chemii a je základem mnoha biomedicínských testů. Nejprve je nutné buňku nějakým způsobem „rozbít“, aby bylo možno získat jednotlivé organely k jejich další následné analýze. Buněčná suspenze připravená mechanickou homogenizací obsahuje velké množství různých buněčných kompartmentů, které jsou posléze odděleny například centrifugací. Další možností, jak získat informace o buněčných kompartmentech je analýza neinvazivní, což znamená, že buněčná membrána je neporušena a pouze nahlížíme dovnitř buňky. Mezi tyto metody můžeme zařadit například elektronovou mikroskopii, STED mikroskopii, fluorescenční značení nebo různé barvicí techniky.

1 Destruktivní (invazivní) analýza

1.1 Metody izolace organel z buňky

Abychom získali buněčné organely, musíme buňku nějakým způsobem lyzovat, což znamená penetrovat (porušit) cytoplazmatickou membránu. Metody používané k izolaci organel z jejich buněčného prostředí zahrnují mechanickou homogenizaci, dusíkovou kavitaci (nitrogen cavitation), chemické narušení a elektrické narušení. Stejně principy izolace se však vztahují prakticky na všechny buňky a tkáně a modifikace těchto způsobů buněčné frakcionace mohou být použity k oddělení a čištění libovolných složek. Organely, které se velmi často ke studiu používají jsou lidské mitochondrie, neboť jejich studium je důležité pro správné pochopení apoptózy a nemocí, které s ní souvisí. [1]

V poslední době také dochází k rozvoji metod, které zajišťují lepší kontrolu a reprodukovatelnost izolace organel. Jsou to například metody specifické pro určitý druh organel a metody kompatibilní s pozorováním jednotlivých organel po jejich izolaci. [1]

1.2 Narušení buněčné (cytoplazmatické) membrány

1.2.1 Homogenizace

Uvolnění jednotlivých kompartmentů z buňky je první a zároveň jeden z nejdůležitějších kroků k získání požadovaných organel. Při klasické homogenizaci se nepoužívají žádné enzymy ani chemické látky. Používá se pouze určité množství mechanické energie. K narušení buněčné membrány se využívá principů, při kterých jsou buňky vystaveny proudu kapaliny nebo rozdílným tlakům uvnitř a vně buňky, případně se využívá speciálních třepacích nádob, kde na tkáně nebo jednotlivé buňky působí malé kuličky a v neposlední řadě lze také využít střídavé zmrazování a rozmrazování buněk. Jako další způsob lýze membrány můžou být různé kombinace těchto metod. [2]

Nejprve se buňky suspendují v roztoku o vhodném pH, které by mělo být stejné jako pH cytosolu, což je přibližně 7,4 a s určitým obsahem soli. Obvykle je k těmto účelům využívána izotonická sacharóza (0,25 M) nebo kombinace solí, které mají podobné složení jako obsah buňky. K mechanickému lyzování buňky se mohou používat speciální

homogenizátory, které mohou být například rotační, vysokotlaké. K ruptuře plazmatické membrány lze použít speciální tlakový tkáňový homogenizátor, kdy jsou buňky tlačeny skrz úzký prostor mezi pístem a stěnou nádoby. Obecně se suspenze udržuje při teplotě okolo 0 °C, aby nedošlo k poškození enzymů a dalších složek. [3]

Mezi nejznámější homogenizátory patří Dounceho nebo Potter-Elvehjemův homogenizátor a také se velmi často využívá ultrazvukových sonikátorů. [2]

Avšak využití manuální homogenizace přináší řadu nevýhod, jako jsou například vysoké nároky na obsluhu, je také obtížné zjistit, kdy už je tkáň dostatečně rozrušená. Částečným řešením mohou být komerčně vyráběné přístroje, které jsou méně náročné na obsluhu, jako je například PCT drtič, který slouží k mechanickému rozrušení tkání, aniž by došlo k poškození jednotlivých organel. Dále se využívá přístroj zvaný Barocycler, který pomocí kontrolovaných tlakových impulsů lyzuje buňky, dokud nedojde k uvolnění organel nebo homogenizátor zvaný French press, který protlačuje tekutou suspenzi skrze malý otvor pod velkým tlakem. Tyto přístroje se nejčastěji využívají k izolaci živočišných mitochondrií. [16]

Kvalita homogenizace poté bývá sledována například fázovým kontrastním mikroskopem, kdy se můžeme přesvědčit, že došlo k rozrušení buňky nikoliv k poškození jader a vzniku agregátů. [4]

1.2.2 Dusíková kavitace

Rozrušení buněk pomocí dusíkové kavitace nebo-li dekomprese je další z možností, jak poměrně rychle a účinně dosáhnout buněčné homogenizace, a získat tak jednotlivé buněčné kompartmenty. Metoda je založená na působení vysokého množství dusíku na buňky v tlakové nádobě bez přítomnosti kyslíku. Tento dusík je rozpuštěn v buňkách za vysokého tlaku (cca 5500 kPa). Tlak se poté rychle uvolní a bublinky dusíku, které unikají způsobí prasknutí buněčné membrány a dojde k uvolnění obsahu buňky. Fyzický a chemický stres na enzymy a buněčné organely způsobený dusíkovou kavitací je v porovnání s klasickými mechanickými homogenizačními metodami minimální. Metoda je vhodná při práci se savčími nebo některými rostlinnými buňkami, není příliš vhodná pro kvasinky, buňky hub a spory, jelikož mají silnou buněčnou stěnu a je zapotřebí obvykle ještě použití enzymů. [29]

1.3. Izolace buněčných kompartmentů

1.3.1 Subcelulární frakcionace

Jednou z možností, jak z homogenátu získat jednotlivé buněčné organely je subcelulární frakcionace. Buněčná frakcionace (subcelulární frakcionace) je proces dělení obsahu buňky na jednotlivé části. Jednotlivé organely mohou být rozděleny z hlediska jejich fyziologické funkce podle tvaru, hustoty a náboje.

Proces subcelulární frakcionace se skládá ze dvou základních kroků. Prvním krokem je homogenizace, která byla popsána v předešlé kapitole. Homogenizace tedy znamená šetrné rozbití buněčné membrány se zachováním jednotlivých neporušených buněčných kompartmentů. Podmínky pro homogenizaci musí být optimalizovány pro každou buněčnou linii. Dalším krokem je obvykle diferenciální centrifugace, pomocí které dojde k rozdělení populací jednotlivých organel. [4]

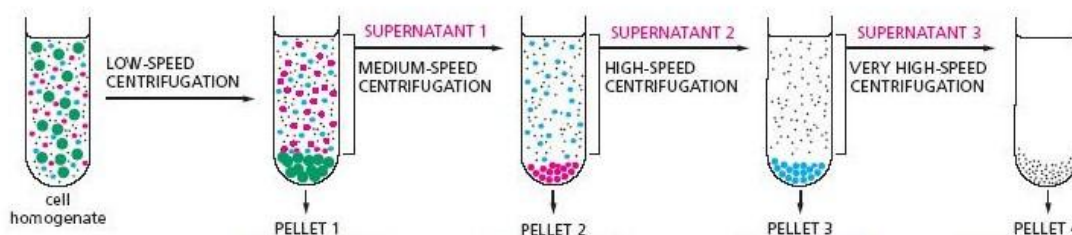
1.3.1.1 Diferenciální centrifugace

Nejběžnější způsob, jak organely od sebe oddělit je metoda zvaná diferenciální centrifugace. Avšak tato metoda neposkytuje dostatečně čisté organely, nýbrž slouží k předběžnému roztřídění. A k přečištění těchto organel je následně použita gradientová centrifugace. [3]

Princip oddělení jednotlivých organel je založen na rozdílné hustotě a hmotnosti jednotlivých organel, kdy se postupně zvyšuje normální tíhové zrychlení, a právě podle hustoty dochází k postupnému oddělování „nejtěžších“ kompartmentů až po komponenty s nejnižší hustotou.

Ještě před samotnou centrifugací je buněčná peleta promyta a promíchána s ledovým hypotonickým pufrům, poté jsou buňky mechanicky zlyzovány a jsou přidány stabilizační pufrы, aby nedocházelo k poškození samotných organel. Buněčný lyzát se poprvé zcentrifuguje (obvykle při 1300g, na 5 min. při 4 °C) a dojde k oddělení první frakce. Tato první peleta obsahuje především buněčná jádra, případně cytoskelet a úlomky buněk. Druhá centrifugace je už prováděna při vyšších otáčkách (při 17 000g na 15 mi. při 4 °C). Druhá peleta obsahuje mitochondrie, lysozomy a peroxyzomy. Po další centrifugaci (při 80 000g, 1 hod. při 4 °C) vzniká peleta obsahující cytoplazmatické membrány a

fragmenty endoplasmatického retikula. Při posledním stočení (150 000g, 3 hod. při 4 °C) získáme peletu obsahující ribozomy. [19]



Obr. 1: Diferenciální centrifugace. Vlevo na obrázku je peleta s buněčným homogenátem, který je nejprve zcentrifugován při nižších otáčkách. První peleta po zcentrifugování obsahuje celé buňky, jádra, případně cytoskelet. První supernatant obsahuje na spod peletu č 2, která obsahuje mitochondrie, lysozomy a peroxizomy. Peleta č 3 po zcentrifugování supernatantu při vysokých otáčkách obsahuje mikrozomy a další malé váčky, poslední peleta zcentrifugovaná při velmi vysokých otáčkách obsahuje ribozomy. Dostupné z: Zdroj [1]

1.3.2 Gradientová centrifugace

Při této metodě se jednotlivé částice dělí podle hustotního gradientu roztoku, který je v kyvetě. K přípravě hustotních gradientů se využívá například sacharóza, což je jedna z levnějších alternativ. Jako další médium k přípravě gradientu je hojně užíván Perkol, který může být použit jako kontinuální nebo diskontinuální gradient. Nachází využití při dělení buněk, subcelulárních částic případně i virů za fyziologických podmínek. Je dodáván jako sterilní koloidní suspenze obsahující částice oxidu křemičitého o průměru 15-30 nm potažené polyvinylpyrolidinem. [27] V dalších případech je k přípravě gradientu používána látka zvaná Fikol, která se nejčastěji používá jako stupňovitý gradient. Jedná se o neutrální hydrofilní polysacharid, který se velmi dobře rozpouští ve vodných roztocích. Funguje na podobném principu jako Perkol a běžně se využívá k izolaci mitochondrií a synaptozomů z mozku. [18]

Gradientová centrifugace se nejčastěji využívá k purifikaci neboli přečištění buněčných kompartmentů od nejrůznějších příměsí a ostatních organel a v kombinaci s diferenciální centrifugací lze získat organely téměř bez nežádoucích příměsí. [28] Metoda je také hojně využívána k izolaci jednotlivých buněčných linií nebo v hematologii k izolaci různých populací krevních buněk. [30]

1.3.3 Imunoizolace organel

Zatímco klasické purifikační metody jsou omezeny na rychlost sedimentace jednotlivých elementů, imunoizolační metody využívají vysokou specifitu protilátek k izolaci organel, které dané antigeny obsahují. Tyto metody obvykle kombinují frakcionaci pomocí gradientové centrifugace s imunoizolací. K pozorování fixovaných preparátů lze použít klasický fluorescenční mikroskop případně lze použít i konfokální mikroskop. Dále lze takto izolované organely využít například k proteomické analýze. [5]

1.3.3.1 Imunofluorescenční značení

Podmínkou pro imunoizolaci je najít odpovídající antigen, který obsahuje organela, kterou chceme detegovat. Dále je také nutné mít vysoce afinitní protilátku, která bude rozpoznána daným antigenem. Značení antigenem může být přímé nebo nepřímé, kdy u přímého je fluorescenční značka přímo navázána na antigen a u nepřímého se nejprve použije primární protilátka a následně protilátka sekundární. Nepřímé označení je mnohem citlivější, a proto je využíváno častěji.

1.4 Metody pro analýzu jednotlivých buněčných kompartmentů

1.4.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie se používá jako analytický nástroj pro třídění buněk nebo jejich menších částí. Průtokový cytometr může identifikovat různé buňky pomocí měření světla, které tyto buňky rozptýlí, případně pomocí fluorescence, kterou emitují, když proudí laserovým paprskem. Umožňuje také označení a studování jednotlivých intracelulárních komponent. [5]

Kromě používání ke třídění jednotlivých krevních buněk nebo analýzu buněčného cyklu pomocí měření obsahu DNA se průtoková cytometrie používá také k identifikaci chorob, které souvisejí s určitou genovou sekvencí. [3]

1.4.1.1 Využití průtokové cytometrie v identifikaci jednotlivých organel

Průtokový cytometr je přístroj, který umožňuje identifikovat různé znaky v buňce. Jeho využití je poměrně široké, lze ho využívat v hematologii pro třídění, jednotlivých

krevních buněk, dále také v imunologii, kde je možné sledovat buňky napadené virem HIV a podobně. Pro identifikaci buněčných kompartmentů se používají specifické protilátky proti povrchovým znakům, které jsou právě typické pro jednotlivé organely. Těmito metodami je také možné zkoumat jednotlivé procesy, které se v buňce odehrávají, jako je například mitóza, apoptóza nebo intracelulární transport. [5]

V porovnání s mikroskopií má průtoková cytometrie výhody v daleko rychlejší detekci a kvantifikaci membránových struktur organel, také je méně náročná na obsluhu a v neposlední řadě lze pomocí této metody detekovat tisíce organel v jediném vzorku. K detekci organel v průtokovém cytometru je zapotřebí jednotlivé organely označit nejprve specifickou primární protilátkou (u mitochondrií se například používá králičí protilátka anti-Mfn2), poté se použije protilátka sekundární, která je fluorescenčně konjugovaná a následně mohou být organely analyzovány pomocí průtokového cytometru a výsledky vyhodnoceny s použitím vhodného softvéru. [36]

1.4.1.2 FACS – fluorescence activated cell sorter

Tato metoda využívá průtokový cytometr k detekci a třídění organel se specifickou fluorescencí a charakteristickým rozptylem. U této techniky je zapotřebí speciálních fluorescenčních sond specifických pro dané organely, včetně chemických čidel, fluorescenčně značených protilátek a fluorescenčních proteinů. Je také omezená pouze pro použití buněčných kultur a modelů zvířat, ve kterých byly exprimovány fluorescenční bílkoviny. [1]

1.4.2 Elektroimigrační analýza

Tyto metody na rozdíl od běžných centrifugačních metod nezávisí na hustotě či velikosti separovaných organel nýbrž využívají rozdíly elektroforetické mobility jednotlivých komponent, tedy odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektroimigrační analýza zahrnuje elektroforézu s volným tokem (FFE), frakcionaci průtokového pole (FFF), dielektroforézu a kapilární elektroforetické techniky [1] [2]

1.4.2.1 FFE (Free Flow Electrophoresis) – elektroforéza s volným tokem

Elektroforéza s volným tokem, někdy také nazývána jako elektroforéza bez nosiče, je technika založená na elektroforetické separaci analytu, který protéká rovinným

průtokovým kanálem. Kolmo ke kanálu je elektrické pole, které umožní vychýlení analytů bočně. Jednotlivé analyty se oddělují na základě jejich hustoty případně izoelektrického bodu. [13]

V případě izolace organel tato metoda slouží jako purifikační, tedy k získání čistých organel. Organely se v tomto případě vychylují nejčastěji v závislosti na jejich povrchovém náboji. Promyté a Perkolou případně sacharózy zbavené organely z předchozí gradientové centrifugace jsou vstříknuty do separační nádoby, která bývá ze shora obvykle průhledná díky akrylátovému sklu a umožňuje tak vizuálně pozorovat separační proces. [34]

Separací médium unáší nabitý vzorek (mohou to být například mitochondrie) a jakmile vstoupí do zóny elektrického pole je odkloněn směrem k anodě a shromažďuje se na konci separační komory. Požadované organely jsou tedy odděleny od ostatních kontaminantů na základě odlišnosti v náboji. [35]

Pomocí FFE lze také posoudit kvalitu izolovaných organel. V případě poškozených nebo osmotickému stresu vystavených organel dochází k analytickým změnám, které jsou poznat z výsledných grafů. Například u poškozených mitochondrií jejich profily v grafu vykazují široké píky s nízkým poměrem signálu k šumu. [35]

1.4.2.2 FFF (Field-flow fractionation)

FFF nebo-li frakcionace průtokového pole je další technika vhodná pro separaci organel. Je to metoda podobná technikám založeným na centrifugační bázi, ale s tím rozdílem, že není zapotřebí centrifugačních médií, jako například Perkolu. Podobně jako u FFE laminární průtok eluuje analyty do otevřené trubice. Průtokový proud vychyluje analyty kolmo ke stěně obdobně jako u FFE. Poté co se jednotlivé analyty dostanou do rovnováhy mezi silou difúze a průtokem jsou eluovány na odlišných místech otevřené trubice. První studie byla provedena na čtyřech různých frakcích mitochondrií z potkaních jater. Jednotlivé eluované frakce obsahovaly mitochondrie s odlišnými morfologickými vlastnostmi, jako je velikost a tvar, což bylo následně potvrzeno fluorescenční mikroskopií. [45]

1.4.2.3 Kapilární elektroforetické techniky

Při těchto metodách se dělení provádí v úzkých křemičitanových kapilárách za použití silných elektrických polí. Tyto separace jsou poměrně rychlé, mají vysokou separační účinnost a spotřebovávají malé objemy vzorků a pufrů. Pro kapilární elektroforetickou analýzu fluorescenčně označených organel se díky vysoké citlivosti využívá laserem indukovaná fluorescence. Tedy kombinací kapilární elektroforézy a laserem indukované fluorescence je možné určit jak fluorescenci tak i povrchovou hustotu náboje jednotlivých organel. [47]

Pro spolehlivé stanovení elektroforetické mobility jednotlivých organel je zapotřebí minimální interakce mezi organelami a stěnou kapilár. K těmto účelům se používají speciální kovalentní nátěry, které obsahují hydrofobní polymery jako je například poly(acrylaminoopropanol), nebo se kapiláry potahují polyvinylalkoholem. [48]

1.4.2.4 Stanovení izoelektrického bodu mitochondrií izoelektrickou fokusací

Při měření izoelektrického bodu pomocí kapilární elektroforézy a detekce pomocí laserem indukované fluorescence u mitochondrií lze využít izoelektrické fokusace, která odděluje analyty na základě rozdílu v jejich izoelektrickém bodě. Mitochondrie označené pomocí nonylakridinové oranže a pI (izoelektrický bod) nízkomolekulárními markery jsou poté změřeny na pH gradient a mobilizovány. Izoelektrický bod individuálních mitochondrií je poté stanoven při použití markerů izoelektrického bodu jako standardů. Tato metoda může být použita i pro jiné typy organel. [49]

1.4.2.5 Dielektroforéza (DEP)

Dielektroforéza používá nehomogenní elektrické pole k vytvoření dielektroforetické síly, která závisí na polarizovatelnosti analytu. Používá se například k separaci buněk nebo oddělení mitochondrií od jader, nebo separaci mitochondrií od ostatních organel. Nevýhodou této metody je, že neumožňuje dobře rozdělit organely podobné velikosti, jako jsou například mitochondrie a peroxizomy a v případě úspěšné izolace takto podobných organel tato metoda poskytuje pouze mikrogramy čistých organel. [1][46]

1.4.3 Mikrofluidní technologie

Tyto technologie se uplatňují především v buněčné biologii a klinické diagnostice. Ve srovnání s kapilárními systémy je zde vyšší rychlost separace a větší propustnost. Těchto technologií může být využito například při elektroforetické separaci izolovaných mitochondrií z potkaních kostních myoblastů ve skleněném mikrofluidním čipu. Dále bylo zjištěno, že mitochondrie z hovězích jater označené pomocí nonyl-akridinové oranže, které byly oddělovány v kanálu potaženém PVF a individuálně detekovány pomocí LIF systému mikrofluidního čipu, se separují až pět krát rychleji v porovnání s klasickou CE analýzou. [50]

1.4.3.1 μ -FFE

Další technikou spadající pod mikrofluidní technologie je μ -FFE, která na rozdíl od klasické FFE umožňuje analýzu a přípravu organelových frakcí z malých objemů vzorků. Košťál a kol. poprvé demonstrovali separaci fluorescenčně značených mitochondrií z myoblastů kosterního svalstva potkana pomocí mikročipové FFE vybavené online detekcí. Ve srovnání CE-LIF a μ -FFE je technika μ -FFE mnohonásobně rychlejší a čas separace se zkracuje přibližně z 20 minut na 30 sekund. Tuto metodu lze také použít při analýze jiných kyselých organel nebo cytoskeletárních mitochondriálních agregátů. [51]

1.4.4 Ověření průběhu izolace

1.4.4.1 Western Blot

Western blot je technika, která slouží v buněčné a molekulární biologii k identifikaci specifických proteinů z komplexní směsi proteinů z extrahovaných buněk. Skládá se obvykle ze tří kroků. První je rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti, následuje přenos na pevný nosič a jako poslední krok je označení cílového proteinu pomocí vhodné primární a sekundární protilátky pro vizualizaci. [42]

1.4.4.2 Identifikace mitochondrií a dalších organel pomocí Western blotu

Technika Western blot se používá nejčastěji pro ověření přítomnosti organel ve vzorku pomocí identifikace specifických membránových proteinů. V případě mitochondrií lze například pro srovnání provést analýzu hrubé mitochondriální frakce a purifikovaných

mitochondrií po gradientové centrifugaci. Vzorky se separují pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následně jsou tyto vzorky přebílotovány na PVDF membránu (lze použít i membránu nitrocelulóзовou), kde jsou imunodetekovány pomocí specifických antisér, které směřují proti danému markeru. V případě hrubé mitochondriální frakce jsou ve vzorku přítomny i jiné organely, jako například peroxizomy, ER nebo v případě bakteriálních buněk i vakuoly, zatímco u purifikovaných mitochondrií pomocí sacharóзовé gradientové centrifugace se jiné organely obvykle nevyskytují. [22] [42]

1.4.4.3 Markery používané při Western blotu

Pro každou jednu organelu existuje specifický marker, pomocí něž se lze přesvědčit o přítomnost dané organely ve vzorku, případně pro kontrolu čistoty vzorku. Tyto markery nemusí být použity jen pro Western blot, ale lze je využít i při klasické imunodetekci. Takovými markery mohou být v případě kvasinkových mitochondrií *Sacharomyces cerevisiae* například porin (protein vnější membrány mitochondrií) nebo SSC1, což je mitochondriální protein teplotního šoku (heat shock protein). [22] U savčích mitochondrií se používá cytochrom C, který se účastní řetězce přenosu elektronů a nachází se v mezi membránovém prostoru a jako další se využívá VDAC (Voltage-dependent anion channel), což je marker jinak také zvaný mitochondriální porin, který se nachází ve vnější membráně a je zodpovědný za její propustnost. [15]

Typickým markerem pro endoplazmatické retikulum je kalretikulin, kalnexin a InsP3R (inositol trifosfátový receptor) [15]

2 Rozdíly v izolaci živočišných a rostlinných, houbových, případně bakteriálních organel

2.1 Buněčná stěna

Rostlinné a bakteriální buňky se od živočišných liší přítomností buněčné stěny, která má především ochranou a zpevňovací funkci u rostlin, hub a řas. U bakterií tato buněčná stěna slouží k ochraně bakterie před imunitním systémem hostitele. Při izolaci těchto organel je proto potřeba tuto stěnu dezintegrovat. K tomuto účelu slouží metody založené na fyzikální případně chemické bázi a dále se také často využívá lytických enzymů, které štěpí buněčné stěny.

2.1.1 Dezintegrace buněčné stěny pomocí chemických látek

Chemická dezintegrace je založená na principu působení určité chemické látky nebo sloučeniny, která způsobí permeabilizaci buněčné stěny. Takovéto látky jsou například Triton X-100 nebo Tween 80 což jsou neiontové detergenty. Další metoda jak rozrušit buněčnou stěnu je vystavit buňky osmotickému šoku, tedy suspendovat je v hypertonickém prostředí (např. 50mmol Tris-HCl pufr, pH 7,5, který obsahuje 10 mmol/L EDTA a 30% sacharózy), směs je poté třepána a následně zcentrifugována. V dalším kroku je buněčná směs opět zcentrifugována a získaná peleta buněk se dezintegruje rozpuštěním v roztoku 10 mmol/L chloridu manganatém. Výsledná suspenze může být dále analyzována. [21]

2.1.2 Fyzikální (mechanická) dezintegrace

Tyto metody jsou podobné jako u předchozí kapitoly o buněčné homogenizaci, ale s tím rozdílem, že u rostlinných buněk je zapotřebí ještě rozrušit buněčnou stěnu. K tomu je potřeba daleko větší mechanická energie, nebo použití speciálních přístrojů určených k izolaci rostlinných kompartmentů.

Jedním způsobem, jak buněčnou stěnu rozrušit je Sonikace. Je to metoda, která je založená na působení ultrazvukových vln s vysokou frekvencí (okolo 16 kHz), které způsobí dezintegraci buněčné stěny. Místo klasických homogenizátorů se dají použít

vysokorychlostní míchací homogenizátory. [26] Jako další se používají například zjednodušeně řečeno mlýnky se sklenými kuličkami (bead mills), které rozrušují buněčnou stěnu na principu rychlého třepání suspenze a přítomnost malých kuliček, které o sebe narážejí, zapříčiní to, že vzniká vysoká třecí síla, která způsobí rupturu stěny buňky. [22] [23]

2.1.3 Dezintegrace pomocí enzymů

K rozštěpení buněčné stěny se používají takzvané lytické enzymy, mezi něž patří například endolyziny nazývané někdy také jako mureinové hydrolázy. Tyto enzymy tedy patří mezi hydrolytické a jsou produkovány bakteriofágy, které je produkují za účelem štěpit hostitelskou buňku. [24]

Buněčná stěna řas slouží primárně k ochraně před vnějšími vlivy prostředí a skládá se především z polysacharidové a glykoproteinové matrice. Mezi enzymy, které dokáží jejich buněčnou stěnu natrávit patří například chitinázy nebo lysozomy, na tyto dva enzymy jsou řasy nejvíce senzitivní. Mezi další enzymy schopné částečně natrávit buněčnou stěnu se řadí pektinázy, sulfatázy nebo β -glukuronidázy. [25]

3 Příklady izolace některých organel

3.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou organely, které regulují buněčný metabolismus. Nejdůležitější funkcí je výroba energie ve formě ATP. Dále také mitochondrie hrají klíčovou roli při apoptóze neboli programované buněčné smrti. Tento jev nastává, pokud dojde k uvolnění cytochromu c z mitochondrií do buňky. Mitochondrie se také podílejí na produkci a detoxifikaci reaktivních forem kyslíku regulují koncentraci cytoplazmatického a mitochondriálního vápníku. Stále také přibývá důkazu o roli mitochondrií v některých patofyziologických procesech jako například neurodegenerace, kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes nebo neplodnost. [4] [40]

3.1.1 Izolace mitochondrií

Mitochondrie lze izolovat například z tkání nebo přímo z tkáňových buněk. Po úspěšné izolaci je možné sledovat aktivity jednotlivých komplexů mitochondriálního respiračního systému, produkci ATP a kyslíkových radikálů nebo například sledování aktivity vybraných mitochondriálních enzymů.

Před samotnou izolací je nutné buňky homogenizovat, v tomto případě lze využít speciálního mlýnku s malými skleněnými kuličkami a suspenzi buněk několikrát zhomogenizovat s použitím sterilní vody a poté umístit do ledu. [39]

K izolaci samotných mitochondrií se používá nejčastěji metoda diferenciální centrifugace nebo gradientová centrifugace, která umožňuje získání dostatečně čisté mitochondriální frakce k následné analýze. Pro ověření přítomnosti mitochondrií ve vzorku se používají různé metody, jako je například průtoková cytometrie, kdy se používají fluorescenční barviva, případně se využívá imunoizolace například pomocí Western blotu, která je vysoce specifická. [14] Jako mitochondriální markery pro imunodetekci se nejčastěji používá cytochrom C nebo VDAC. [15]

3.1.2 Purifikace mitochondrií pomocí gradientové centrifugace v sacharózovém gradientu

Purifikace neboli takzvané přečištění od nežádoucích příměsí je důležitý krok k následné analýze jednotlivých mitochondrií. U těchto organel se nejčastěji používá právě metoda gradientové centrifugace. K nejlevnějším a nejvyužívanějším alternativám se řadí gradientová centrifugace s využitím sacharózy. V případě, že se tato metoda nedá použít existují ještě varianty, při kterých je sacharóza nahrazena Fikolem nebo Perkolem. [18]

Na povrch sacharózové vrstvy se opatrně nanese mitochondriální suspenze v určitém množství, například u myší suspenze jsou to maximálně 2 ml buněčné tkáňové kultury na jeden stupeň gradientu. Poté se suspenze zcentrifuguje při 60 000 g na 20 minut a mitochondrie jsou opatrně odebrány pomocí pipety. Následně je sacharóza opatrně zředěna tak, aby nedošlo k osmotické ruptuře mitochondrií. Po přidání pufru se suspenze ještě jednou zcentrifuguje při 7 000-17 000 g po dobu 15 minut, nakonec jsou mitochondrie promyty homogenizačním pufrem a resuspendovány v pufru pro následnou analýzu. [18]

3.1.3 Analýza mitochondrií pomocí průtokové cytometrie

Možnosti analýzy mitochondrií jsou velice důležité při studiu buněčné smrti, na které se právě mitochondrie úzce podílejí. Pomocí průtokové cytometrie lze určit najednou mnoho mitochondriálních parametrů, které jsou klíčové při indukci buněčné smrti způsobené mitochondriemi. Dále lze určit například čistotu mitochondriálního preparátu, také se užívá ke zjištění morfologických změn indukovaných vápníkem. Při použití kombinace specifických fluorescenčních markerů a průtokové cytometrie je možné sledovat tyto parametry na úrovni jednotlivých organel. Výhody této metody jsou především v možnosti analýzy velmi malých vzorků (5 000-10 000 mitochondrií) a také mohou být zpracovávány vzorky, které jsou kontaminovány jinými buněčnými složkami, kdy se použijí specifické markery pro mitochondrie. [38]

K měření membránového potenciálu u mitochondrií v živých buňkách se už několik desetiletí používá fluorescenční barvivo zvané Rhodamin 123, které je specificky koncentrováno v mitochondriální membráně a je tak užitečnou sondou pro sledování aktivity mitochondrií. [41]

K selektivnímu barvení mitochondrií se používá 10-nonyl akridinová oranž (NAO), která se váže na kardiolipin ve vnitřní mitochondriální membráně. K měření membránového potenciálu lze použít tetramethylrhodamin-methylester (TMRM) nebo 1,1,3,3,3,3-hexamethylindodicarbocyanin iodid (DiIC1(5)), což jsou sondy, které nijak neinterferují s mitochondriálním metabolismem a vykazují nízkou nespecifickou vazbu. [38] Další možností jak mitochondrie analyzovat pomocí průtokového cytometru je imunodetekce pomocí specifických protilátek. Nejprve se pro imunologické označení použije primární protilátka, v tomto případě například protilátka cílená na Mitofuzin 2, což je protein, který se podílí na fúzi vnější membrány mitochondrií. Poté se naváže fluorescenčně konjugovaná sekundární protilátka a vzorek může být zpracován průtokovým cytometrem a analyzován pomocí softvéru. Nejprve se analyzují všechna shromážděná data a parametry v bodovém diagramu a následně se určují z jednotlivých grafů počet pozitivních barviv, která jsou specifická právě pro mitochondrie. [36]

3.2 Izolace mitochondria-associated membranes

Mnoho buněčných procesů vyžaduje správnou kooperaci mezi mitochondriemi a endoplazmatickým retikulem. Mezi těmito organelami existuje v buňce určitá spolupráce na základě jejich vzájemného kontaktu membrán nazývaného mitochondria-associated membranes (MAMs). Tento kontakt zajišťuje například syntézu a intracelulární transport fosfolipidů, signalizaci Ca^{2+} a také je tento kontakt stěžejní pro stanovení mitochondriální struktury. [15]

Ukázalo se, že protein p66Shc, který hraje roli při oxidativním stresu a apoptóze se ve významné části vyskytuje v MAM frakcích a jeho hladina závisí na stáří zvířete. Proces izolace je obvykle rozdělen do dvou kroků. Prvním je tkáňová izolace surové mitochondriální frakce, která obsahuje MAM pomocí centrifugačních metod a dalším krokem je purifikace surové mitochondriální frakce pomocí gradientové centrifugace na čisté mitochondrie a MAM frakci. Kvalita MAM frakcí může být sledována pomocí Western blotové analýzy, kde je také možné sledovat intracelulární distribuci proteinu p66Shc. Použitím různých markerů pro získané frakce lze kontrolovat čistotu MAM frakce a přítomnost kontaminace z jiných oddílů. [15]

3.3 Izolace Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula

Prvním krokem k úspěšné izolaci je jako v předchozích případech ruptura cytoplazmatické membrány. Dalším krokem jsou centrifugační techniky, v tomto případě lze použít například diferenciální centrifugaci, hustotní gradientovou ultracentrifugaci nebo gradientovou ultracentrifugaci s kontinuálním proudem a s následným výpočtem hustotního gradientu jednotlivých organelových frakcí. Dalším krokem je změření proteinové koncentrace pomocí barviv pro stanovení bílkovin. Jednotlivé organelové frakce mohou být poté dále identifikovány a analyzovány pomocí SDS-page elektroforézy a následného Western blotu, případně mohou být porovnány jejich proteinové profily s použitím digitalizovaného zobrazování 2D gelové elektroforézy a v neposlední řadě lze použít hmotnostní spektrometrii pro určení složení jednotlivých organel. [55]

4 Neinvazivní analýza

4.1 Mikroskopické metody

Neinvazivní analýza spočívá především v tom, že se nahlíží přímo do živé buňky tedy *in vitro*. Tato analýza je důležitá, pokud je zapotřebí zkoumat živé buňky a například děje, které se odehrávají v cytoplazmě. Pro tyto účely se nejčastěji využívají různé mikroskopické techniky.

4.1.1 Konfokální mikroskopie

Nejčastěji používaným konfokálním mikroskopem je laserový skenovací konfokální mikroskop (LSCM), který byl poprvé koncipován a patentován v roce 1957 Marvinem Minskym. Další typ konfokálního mikroskopu je konfokální mikroskop s takzvaným rotujícím laserem (SDCM). Tento typ mikroskopie lze také využít při analýze buněčných kompartmentů. Jeho výhodou je především možnost pozorovat specifické buněčné komponenty v živém vzorku a reálném čase pomocí specifického molekulového značení. [37]

K vizualizaci organel se využívá především lokalizace určitých proteinů specifických pro danou konkrétní organelu. Tedy tato technika slouží k zobrazování fluorescenčně označených struktur. K lokalizaci intracelulárních struktur se používá značení fluorescenčními proteiny případně se intracelulární proteiny mohou značit imunofluorescencí. Tyto techniky poté poskytují řadu vzorců, které jsou následně rozpoznávány konfokální mikroskopií a tyto vzorce jsou stěžejní pro správné pochopení intracelulárních dějů. [33]

Zobrazování preparátu funguje na principu laseru, který osvětluje preparát přes bodovou clonu. Tím samým objektivem poté projde odražené světlo nebo emitované fluorescenční záření v případě fluorescenční konfokální mikroskopie. V konečném kroku paprsky vstoupí do fotonásobiče a poté jsou detekovány. [20]

Organely v buňce nejsou nikdy distribuovány náhodně, nýbrž jsou organizovány do specifických regionů a mají důležité buněčné funkce. Například Golgiho aparát je

lokalizován v blízkosti jádra a tvorby mikrotubulů. Endoplazmatické retikulum zaujímá v buňce daleko větší prostor. K vizualizaci intracelulárních struktur se používají specifické protilátky. Pro Golgiho aparát je to TGN38, který se využívá jako monoklonální protilátka, která se vyskytuje jako integrální membránový protein v Golgiho komplexu. Pro pozdní endozomy a lysozomy se využívá lysozomální glykoprotein LGP120 a dále například kalnexin a protein disulfidická izomeráza PDI pro značení endoplazmatického retikula. [33]

4.1.2 Superrozlišovací fluorescenční mikroskopie

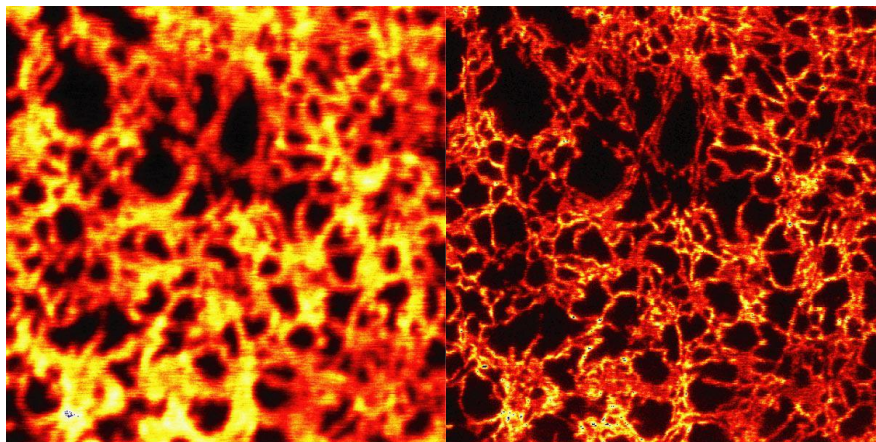
Klasická fluorescenční mikroskopie je omezená poměrně malým prostorovým rozlišením, které je způsobeno difrakcí světla. Tento difrakční limit je přibližně 200-300 nm v bočním směru a ve směru axiálním je to asi 500-700 nm, avšak tento limit je u většiny subcelulárních struktur srovnatelný případně větší, tudíž objekty za hranicí difrakčního limitu nemohou být podrobně zkoumány. Z těchto důvodů byly vynalezeny techniky, které tuto difrakční bariéru překonávají. Mezi mikroskopické techniky s velmi vysokým rozlišením patří například STED mikroskopie, 4Pi mikroskopie, mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM), skenovací optická mikroskopie blízkého pole (NSOM) a další. [20]

4.1.2.1 STED mikroskopie – vyčerpání stimulovanou emisí

STED mikroskopie je jednou z technik patřící do skupiny vysoce rozlišovacích mikroskopických metod, která poskytuje snímky s velice vysokým rozlišením oproti ostatním mikroskopickým technikám, jakou je například konfokální mikroskopie. Tuto mikroskopickou techniku vynalezli Stefan W. Hell a Jan Wichmann v roce 1994. První experimentální pokus byl proveden v roce 1999 a v roce 2014 Stefan W. Hell za tuto metodu získal Nobelovu cenu za chemii. [9] [10]

STED mikroskopie se odlišuje od klasické fluorescenční tím, že její rozlišení není striktně omezeno vlnovou délkou, a tudíž preparáty je možné pozorovat při několikanásobně větším rozlišení. Tento typ mikroskopie pracuje na principu skenování pozorovaného materiálu laserem, který materiál skenuje jednotlivě bod po bodu. Překonání difrakčního limitu je dosaženo především díky speciálnímu deplečnímu laseru, který obklopuje excitační laserový paprsek kolem dokola a tvarem připomíná takzvaný americký

donut a tímto způsobem je potlačena nežádoucí emise fluorescence okolo paprsku. [32]
[31]



Obr. 2: Zobrazení endoplazmatického retikula (ER) pomocí konfokální mikroskopie (vlevo) a STED mikroskopie (vpravo). Porovnání rozlišení ER v živé savčí buňce označeného pomocí fluorescenčního proteinu Citrinu cíleného na ER. Dostupné z: Zdroj [2]

Fluorescenční proteiny jsou schopny vizualizovat všechny organely nebo proteiny v živé buňce. Ukázalo se, že tato metoda pracuje při 50 nm laterálním rozlišení u savčích buněk, které prezentují citrin-tubulin. [11]

4.2 Další mikroskopické techniky

Mezi další mikroskopické techniky, které umožňují nahlížet do buňky lze zařadit elektronovou mikroskopii. U této metody je ale třeba buňky fixovat a analýza vzorku probíhá ve vakuu, tudíž buněčné kompartmenty už nelze pozorovat v živých buňkách. Jako další lze využít mikroskopii atomárních sil, která umožňuje trojrozměrné zobrazení povrchů, avšak organely musí být izolovány z buněk.

4.2.1 Elektronová mikroskopie

V elektronovém mikroskopu, který je obdobný, jako světelný mikroskop jsou fotony nahrazeny proudem elektronů a místo skleněných čoček se využívá čoček elektromagnetických. Elektronový mikroskop se používá v buněčné biologii především díky tomu, že dokáže zobrazit i ty nejmenší detaily a můžeme tak nahlédnout přímo do buňky a pozorovat jednotlivé buněčné organely, což obyčejný světelný mikroskop neumožňuje. Existují dva druhy elektronových mikroskopů. Prvním z nich je transmisní

elektronový mikroskop, který dokáže zobrazit buněčné struktury jako je například cytoskelet nebo různé endomembránové systémy. [57] A druhým je rastrovací elektronový mikroskop.

4.2.1.1 Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

Tato mikroskopie je hojně využívána v biomedicínských oborech pro analýzu trojrozměrné povrchové struktury buněk a tkání díky své dlouhé ohniskové vzdálenosti. K pozorování trojrozměrných (3D) struktur membránových buněčných organel pomocí (SEM) je možné použít metodu macerace osmia s použitím oxidu osmičelého pro fixaci membrány a odstranění cytozolických rozpustných proteinů. Pomocí této metody lze přímo pozorovat organely, jako jsou například mitochondrie ER nebo Golgiho aparát. Avšak tato metoda značně narušuje antigenicitu molekul ve vzorku, proto se v současné době používá metoda kryořezů s metodou macerace pro korelační imunocytochemickou analýzu.

4.2.1.1.1 Korelace mezi imunofluorescencí a SEM

Vzorek tkáně je nejprve zmrazen a poté je z něj v kryokomoře ukrojena pomocí speciálního skleněného nože velice tenká vrstva okolo 1 μm . tato vrstva je poté označena specifickými primárními protilátkami různých druhů a následně se použijí sekundární protilátky konjugované s fluorescenčními barvivy. Po provedení tenkého řezu pro imunofluorescenční mikroskopii je zbytek tkáně se zrcadlovou plochou, která odpovídá imunologicky zbarvené části rozmrazen a podroben macerační proceduře pomocí osmia. Imunologicky označená část tkáně je pozorována pomocí laserového konfokálního mikroskopu a zbytek tkáně se zrcadlovou plochou je pozorováno pomocí SEM a tyto dva obrazy, které zobrazují stejný prostor, mohou být následně porovnány.

4.2.2 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Tato mikroskopie používá hrot o velikosti nanometru jako sondu pro analýzu povrchů a vytváří 3D obrazy se sub-molekulárním rozlišením. AFM byla úspěšně aplikována na studium vlastností DNA, bílkovin, bakterií, virů a v neposlední řadě také organel. Lze také určovat prostorové změny izolovaných organel. [52]

Pomocí AFM lze například určit morfologické a nanomechanické změny u izolovaných mitochondrií z krysího srdce po infarktu myokardu, což přineslo nové poznatky o morfologických změnách, které se vyskytují na vnější mitochondriální membráně během apoptózy. [53]

5 Izolace a analýza kvasinkových buněk

Nejčastěji používaným buněčným modelem jsou buňky kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, neboť metody používané k izolaci a charakterizaci buněčných organel jsou velmi podobné metodám, které se využívají při izolaci ze živočišných buněk případně vyšších eukaryot. Další výhody analýzy kvasinkových kompartmentů jsou především ve snadném získání poměrně velkého množství buněčného materiálu. Analýza těchto organel je stěžejní pro správné pochopení specifických funkcí, jako je například metabolických funkcí nebo proteinového transportu. [7] [17]

5.1 Narušení buněčné stěny mechanicky

K porušení stěny buňky se mohou využívat například speciální skleněné kuličky, které na sebe vzájemně narážejí a díky této mechanické energii dojde k rozbití buňky. Tato metoda je rychlá a poměrně jednoduchá. Hodí se například pro izolaci plazmatické membrány nebo cytozolu. Avšak této metody se nevyužívá při izolaci ostatních organel, neboť velice často dochází k poškození proteinů a membránových interakcí. [17] Ostatní metody byly popsány v předchozí kapitole o dezintegraci buněčné stěny.

5.2 Štěpení buněčných stěn enzymy

Výtěžnost jednotlivých organel u kvasinkových buněk je obvykle nižší, neboť mají také navíc buněčnou stěnu, která je oproti jednoduché plazmatické membráně živočišných buněk daleko silnější a její narušení je proto více komplikované. V těchto případech se opět používají enzymatické, chemické nebo fyzikální metody, které byly popsány v předchozích kapitolách. K izolaci nijak nepoškozených organel lze použít enzymy, které štěpí buněčnou stěnu. Takovéto enzymy jsou například zymolyáza nebo lytikáza. Tyto enzymy štěpí sacharidové struktury uvnitř buněčné stěny.

Kvasinkové buňky jsou nejprve enzymaticky přeměněny na protoplasty, ty jsou poměrně křehké a také citlivé na změnu osmotického tlaku, tudíž mohou být zlyzovány například za izoosmotických nebo hyperosmotických podmínek, případně kombinací obojího. [22]

5.3 Analýza kvasinkových kompartmentů in vitro

Prvním krokem ke zkoumání kvasinkových kompartmentů je správná a úspěšná kultivace. V tomto případě se používají relativně jednoduché a variabilní techniky. Pokud je zapotřebí izolovat organely, které se účastní metabolických přeměn, jako jsou například mitochondrie nebo peroxizomy, stačí změnit nutriční podmínky média. V tomto případě je možné zvýšit množství laktátu případně oleátu. Tyto dvě substance mají rozhodující vliv na úspěšnou izolaci těchto organel. [17]

5.3.1 Izolace a purifikace mitochondrií

Pro biochemické účely je důležité správné určení a lokalizace proteinů případně celé sady proteinů z izolovaných mitochondrií. Proto je velice důležité získat velmi čisté frakce dané organely bez kontaminace jinými buněčnými kompartmenty, které poté zkreslují výsledná data.

Kvasinky pro izolaci mitochondrií jsou obvykle pěstovány na glycerolu nebo na YPD médiu, které obsahuje 1% kvasinkového extraktu, 2% peptonu a 2% glukózy případně na YPG médiu (1% kvasinkového extraktu, 1% peptonu 2% galaktózy). Jsou uchovány v třepací komoře při 30 °C po 48 hodin. Obvykle následují několikastupňové centrifugace, kdy se získá surová mitochondriální frakce. K purifikaci mitochondrií od nežádoucích komponent se obvykle užívá metoda gradientové centrifugace s použitím sacharózy jako gradientu (4ml 32%, 1,5 ml 23%, 1,5 ml 15% sacharózy). [43] Výtěžnost čistých mitochondrií je o něco větší, než při použití jiného gradientového média, jakým je například médium zvané Nycodenz. Vysoce čisté mitochondriální preparáty mohou být uchovávány v ledu bez toho, aniž by došlo ke ztrátě jejich funkční integrity. [22]

5.3.2 Vakuoly

Vakuoly kvasinek jsou funkčně podobné savčím lysozomům a rostlinným vakuolám a zaujímají až jednu čtvrtinu celého prostoru. V obou případech hrají významnou roli v buněčných procesech, jakými jsou například proteinová degradace, detoxifikace, osmoregulace nebo apoptóza. Dále plní důležitou funkci v případě osmotického a iontového stresu a svou roli mají i při buněčné smrti. Téměř všechny tyto funkce závisí na kyselém pH uvnitř vakuoly. [12]

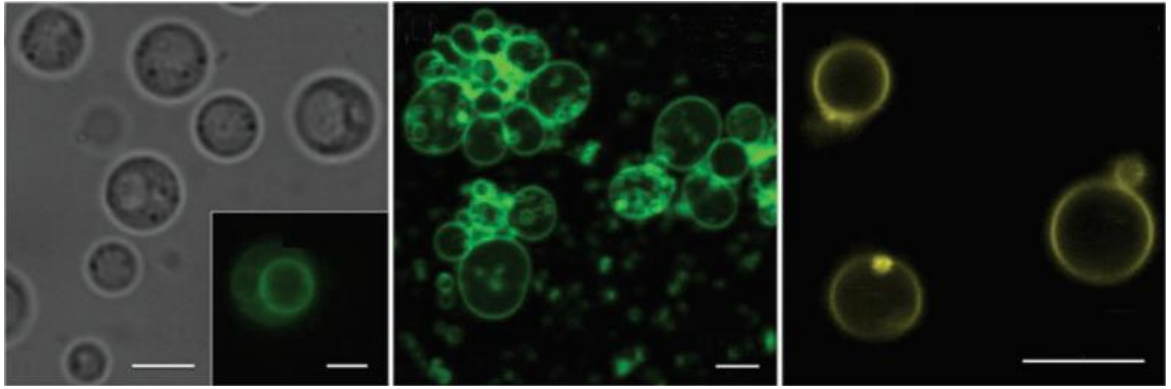
5.4.1 Izolace

Pro izolaci intaktních vakuol, se buňky obvykle nechávají kultivovat na YPD médiu (1% kvasinkového extraktu, 1% peptonu a 2% glukózy). Poté jsou buňky sebrány a promyty destilovanou vodou a následně resuspendovány v promývacím puftru a inkubovány v třepací komoře při 30 °C po dobu 30 minut. V následujícím kroku jsou buňky inkubovány v takzvaném trávicím puftru, do kterého je následně přidána zymolyáza, která způsobí lyzi buněčné stěny za vzniku protoplastu. Tento proces je možné sledovat pomocí fázového kontrastního mikroskopu. Protoplasty se dále zcentrifugují a směs je resuspendována ve 12% Fikolu a poté umístěno do Porter Elvehjemova homogenizátoru kde dojde k ruptuře buněčné membrány se zachováním vakuolární integrity. Tato vakuolární frakce je dále purifikována od ostatních kompartmentů pomocí gradientové centrifugace za použití Fikolu jako gradientu. Takto získané intaktní vakuoly mohou být následně analyzovány například pomocí průtokové cytometrie. [44]

5.4.2 Charakterizace vakuol pomocí fluorescenční mikroskopie

Izolovaná vakuolární suspenze může být charakterizována pomocí fázové mikroskopie a fluorescenční mikroskopie před a po obarvení specifickým fluorescenčním barvivem. V protoplastech lze velké vakuoly pozorovat fázovým mikroskopem a vakuolární membránu pomocí fluorescenční mikroskopie po obarvení 10 μ M strukturálním markerem MDY-64. Tento marker lze použít jak k analýze izolovaných vakuol, tak i k vizualizaci vakuol v neporušených buňkách.

K zjištění vakuolárního membránového potenciálu lze využít DiBAC4, což je fluorescenční sonda, která je indikátorem membránového potenciálu a akumuluje se na pozitivně nabitých membránách. Purifikované vakuoly s touto sondou vykazují vysokou fluorescenci, což značí, že byla zachována jejich membránová integrita a funkce. [44]



Obr. 2 Mikroskopická analýza protoplastů (vlevo) a vakuol izolovaných z kvasinkových buněk. Vlevo na obrázku se nacházejí protoplasty pozorované pomocí fázového kontrastu a fluorescenční mikroskopie. Uprostřed jsou znázorněny vakuoly obarvené pomocí MDY-64 a vpravo vakuoly obarvené pomocí DiBAC4 pozorované pomocí konfokální mikroskopie. Dostupné z: Zdroj [3]

5.4.3 Strukturální a funkční charakterizace izolovaných vakuol pomocí průtokové cytometrie

Dobře izolované vakuoly jsou cenným nástrojem pro porozumění vakuolární morfologie a funkce, případně k analýze vakuolární membrány a proteomu. K účelům analýzy kvasinkových organel lze využít průtokové cytometrie.

K další charakterizaci a kvantitativní analýze populace izolovaných vakuol, vakuolárních membránových vezikulů a směsi celých buněk je možné využít biparametrických histogramů (forward scatter FS versus side scatter SS), které dokáží určit rozdíly ve složitosti a velikosti mezi těmito populacemi. Samotné buňky jsou v takových histogramech daleko větší než vakuoly nebo vakuolární vezikuly. Malé vakuoly jsou velikostně podobné vezikulům, avšak jsou strukturně mnohem složitější. Vakuolární suspenze značená pomocí MDY-64 případně pomocí nespecifického membránového fluorescenčního barviva FM1-43 je vhodná pro strukturální a funkční analýzu. [44]

Průtoková cytometrie také umožňuje monitorování kontaminace vakuolární suspenze.

6 Závěr

V této práci byly popsány metody izolace organel z buňky, způsoby, jak buňku zlyzovat, aniž by byly porušeny jednotlivé buněčné kompartmenty a následná analýza izolovaných organel pomocí průtokové cytometrie, imunoanalýzy a dále elektroimigrační analýza. Byly také vysvětleny rozdíly mezi dezintegrací savčí membrány a buněčné stěny u rostlin, hub a bakterií. Následně jsou v práci popsány příklady izolace vybraných kompartmentů a to mitochondrií, endoplazmatického retikula a vakuol.

Další kapitola se věnuje neinvazivní analýze organel *in vivo* pomocí optických metod. Největší pozornost je věnována konfokální fluorescenční mikroskopii, také je zmíněno využití elektronové mikroskopie, která ale neumožňuje analýzu *in vivo* a v neposlední řadě jsou popsány výhody superrozlišovací mikroskopie oproti konfokální.

Poslední kapitola popisuje analýzu kvasinkových kompartmentů. Pozornost je věnována především kvasinkám druhu *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou nejčastěji používaným modelem ke studiu.

7 Seznam literatury

1. SATORI CP, KOSTAL V, ARRIAGA EA. Review on Recent Advances in the Analysis of Isolated Organelles. *Analytica Chimica Acta*. 2012, **753**, 8-18.
2. BÖCK G, STEINLEIN P, HUBER LA. Cell biologists sort things out: analysis and purification of intracellular organelles by flow cytometry. *Trends in cell biology*, 1997, **7**(12), 499-503.
3. WEDEMEYER N, PÖTTER T. Flow cytometry: an 'old' tool for novel applications in medical genetics. *Clinical genetics*, 2001, **60**(1), 1-8.
4. PASQUALI C, FIALKA I, HUBER LA. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 1999, **722**(1-2), 89-102
5. GOLDBERG S. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods in Molecular Biology*. 2008, **424**, 3-22
6. FREZZA C, CIPOLAT S, SCORRANO L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature protocols*. 2007, **2**, 287-295
7. ERWIN Z, GUNTHER D. Isolation and Biochemical Characterization of Organelles from the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1995, **11**(6), 493-536.
8. PICARD M., TAIVASSALO T., GOUSPILLOU G. A HEPPLER RT. Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of Physiology*. 2011, **589**(18), 4413-4421.
9. WESTPHAL V, RIZZOLI SO, LAUTERBACH MA, KAMIN D, JAHN R, HELL SW. Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement. *Science*. 2008, **320** (5873), 246-249
10. HELL SV, WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*. 1994, **19** (11), 780-782
11. HEIN B, WILLIG KI, HELL SW. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, **105** (38), 14271-14276

12. RODRIGUES J, SILVA RD, NORONHA H, PEDRAS A, GERÓS H, CÔRTE-REAL M. Flow cytometry as a novel tool for structural and functional characterization of isolated yeast vacuoles. *Microbiology*. 2013, **159**(5), 848-856.
13. TURGEON RT, BOWSER MT. Micro free-flow electrophoresis: theory and applications. *Anal Bioanal Chem*. 2009, **394**(1), 187-198
14. FREZZA CH, CIPOLAT SA, SCORRANO L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature prot*. 2007, **2**(2), 287-295.
15. WIECKOWSKI MR, GIORGI C, LEBIEDZINSKA M, DUSZYNSKI J, PINTON P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nature prot*. 2009, **4**(11), 1582-1590.
16. GROSS VS, GREENBERG HK, BARANOV SV, CARLSON GM, STAVROVSKAYA IG, LAZAREV AV, KRISTAL BS. Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization. *Anal Biochem*. 2011, **418**(2), 213-223.
17. RIEDER SE, EMR SD. Isolation of Subcellular Fractions from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Protocols in Cell Biology*. 2001, **8**(1), 3.8.1-3.8.68.
18. CLAYTON DA, SHADEL GS. Purification of mitochondria by sucrose step density gradient centrifugation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2014, **2014**(10), 1115-1117.
19. GRAHAM JM. Preparation of crude subcellular fractions by differential centrifugation. *The Scientific World*. 2002, **2002**(2), 1638-1642.
20. HUANG B, BATES M, ZHUANG X. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu Rev Biochem*. 2009, **78**, 993-1016.
21. KLIMEK-OCHAB M, BRZEZIŃSKA-RODAK M, ZYMAŃCZYK-DUDA E, LEJCZAK B, KAFARSKI P. Comparative study of fungal cell disruption--scope and limitations of the methods. *Folia Microbiol*. 2011, **56**(5), 469-475.
22. MEISINGER C, PFANNER N, TRUSCOTT K.N. Isolation of yeast mitochondria *Methods in Molecular Biology*. 2006, **313**, 33-39.
23. DOUCHA J, LÍVANSKÝ K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008, **81**(3), 431-440.

24. GANESH RAM R, VISWESWARAN, BAUKE W, DIJKSTRA, JAN KOK. Two Major Archaeal Pseudomurein Endoisopeptidases: PeiW and PeiP. *Archaea*. 2010, **2010**, 1-4.
25. GERKEN HG., DONOHOE B, KNOSHAUG EP. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*. 2013, **237**(1), 239-253.
26. ŘEHÁČEK J, BERAN K, BIČÍK V. Disintegration of microorganisms and preparation of yeast cell walls in a new type of disintegrator. *Appl Microbiol*. 1969, **17**(3), 462-466.
27. KRISTIAN T. Isolation of mitochondria from the CNS. *Curr Protoc Neurosci*. 2010, kap. 7, č.7.22, 1-16.
28. SIMS NR, ANDERSON MF. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nature Protocols*. 2008, **3**(7), 1228-1239.
29. SIMPSON RJ. Disruption of cultured cells by nitrogen cavitation. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010, **2010**(11).
30. LU Y, AHMED S, HARARI F, VAHTER M. Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma. *J Trace Elem Med Biol*. 2015, **29**, 249-254.
31. EGGELING C, WILLIG KI, BARRANTES FJ. STED microscopy of living cells--new frontiers in membrane and neurobiology. *Journal of Neurochemistry*. 2013, **126**(2), 203-212.
32. WILLIG KI, KELLNER RR, MEDDA R, HEIN B, JAKOBS S, HELL SW. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nature Methods*. 2006, **3**(9), 721-723.
33. DANCKAERT A, GONZALEZ-COUTO E, BOLLONDI L, THOMPSON N, HAYES B. Automated recognition of intracellular organelles in confocal microscope images. *Traffic*. 2002, **3**(1), 66-73.
34. EUBEL H, LEE CP, KUO J, MEYER EH, TAYLOR NL, MILLAR AH. Free-flow electrophoresis for purification of plant mitochondria by surface charge. *Plant Journal*. 2007, **52**(3), 583-594.
35. ZISCHKA H, BRAUN RJ, MARANTIDIS EP, BÜRINGER D, BORNHÖVD C, HAUCK SM, DEMMER O, GLOECKNER CJ, REICHERT AS, MADEO F, UEFFING M. Differential analysis of *Sacharomices cerevisiae* mitochondria by free flow electrophoresis. *Mol Cell Proteomics*. 2006, **5**(11), 2185-2200.

36. PICKLES S, ARBOUR N, VANDE VELDE C. Immunodetection of outer membrane proteins by flow cytometry of isolated mitochondria. *Journal of Visualized Experiments*. 2014, **18**(91), 1-8.
37. JONKMAN J, BROWN CM. Any Way You Slice It-A Comparison of Confocal Microscopy Techniques. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2015, **26**(2), 54-65.
38. MATTIASSON G. Flow cytometric analysis of isolated liver mitochondria to detect changes relevant to cell death. *Cytometry A*. 2004, **60**(2), 145-154.
39. LAMPL T, CRUM JA, DAVIS TA, MILLIGAN C, DEL GAIZO MOORE V. Isolation and Functional Analysis of Mitochondria from Cultured Cells and Mouse Tissue. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, **23**(97), 1-19.
40. BOUTAGY NE, PYNE E, ROGERS GW, ALI M, HULVER MW, FRISARD MI. Isolation of Mitochondria from Minimal Quantities of Mouse Skeletal Muscle for High Throughput Microplate Respiratory Measurements. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, **13**(105), 1-7.
41. RNOT X, BENEL L, ADOLPHE M, MOUNOLOU JC. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. *Biol Cell*. 1986, **57**(1), 1-7.
42. MAHMOOD T, YANG PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012, **4**(9), 429-434.
43. GREGG C, KYRYAKOV P, TITORENKO VI. Purification of mitochondria from yeast cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2009, **24**(30), 1-2.
44. RODRIGUES J, SILVA RD, NORONHA H, PEDRAS A, GERÓS H, CÔRTE-REAL M. Flow cytometry as a novel tool for structural and functional characterization of isolated yeast vacuoles. *Microbiology*. 2013, **159**(5), 848-856
45. KANG D, OH S, RESCHIGLIAN P, MOON MH. Separation of mitochondria by flow field-flow fractionation for proteomic analysis. *Analyst*. 2008, **133**(4), 505-515.
46. GAGNON ZR. Cellular dielectrophoresis: applications to the characterization, manipulation, separation and patterning of cells. *Electrophoresis*. 2011, **32**(18), 2466-2487.
47. POE BG, NAVRATIL M, ARRIAGA EA. Analysis of subcellular sized particles. Capillary electrophoresis with post-column laser-induced fluorescence detection versus flow cytometry. *J Chromatogr A*. 2006, **1137**(2).

48. WHITING CE, ARRIAGA EA. CE-LIF analysis of mitochondria using uncoated and dynamically coated capillaries. *Electrophoresis*. 2006, **27**(22), 4523-4531.
49. WOLKEN GG, KOSTAL V, ARRIAGA EA. Capillary isoelectric focusing of individual mitochondria. *Anal Chem*. 2011, **83**(2), 612-618
50. DUFFY CF, MACCRAITH B, DIAMOND D, O'KENNEDY R, ARRIAGA EA. Fast electrophoretic analysis of individual mitochondria using microchip capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *Lab on a Chip*. 2006, **6**(8), 1007-1011.
51. KOSTAL V, FONSLow BR, ARRIAGA EA, BOWSER MT. Fast determination of mitochondria electrophoretic mobility using micro free-flow electrophoresis. *Anal Chem*. 2009, **81**(22), 9267-9273.
52. LAYTON BE, BOYD MB. Atomic force microscopy of isolated mitochondria. *Methods in Molecular Biology*. 2011, **736**, 133-151.
53. LEE GJ, CHAE SJ, JEONG JH, LEE SR, HA SJ, PAK YK, KIM W, PARK HK. Characterization of mitochondria isolated from normal and ischemic hearts in rats utilizing atomic force microscopy. *Micron*. 2011, **42**(3), 299-304.
54. LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, a kol.. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 5.2, Purification of Cells and Their Parts. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21492/>
55. DRAHOS KL, TRAN HC, KIRI AN, LAN W, MCRORIE DK, HORN MJ. Comparison of Golgi apparatus and endoplasmic reticulum proteins from livers of juvenile and aged rats using a novel technique for separation and enrichment of organelles. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2005, **16**(4), 347-355.
56. KOGA D, KUSUMI S, BOCHIMOTO H, WATANABE T, USHIKI T. Correlative Light and Scanning Electron Microscopy for Observing the Three-Dimensional Ultrastructure of Membranous Cell Organelles in Relation to Their Molecular Components. *Journal of Histochem and Cytochem*. 2015, **63**(12), 968-979.
57. HIGAKI T, KUTSUNA N, AKITA K, SATO M, SAWAKI F, KOBAYASHI M, NAGATA N, TOYOOKA K, HASEZAWA S. Semi-automatic organelle detection on transmission electron microscopic images. *Scientific reports*. 2015, **5**, 1-9

8 Zdroje obrázků

1. CELL BIOLOGY OLM. Stephen Gallik. [online].2011 [cit. 2018-05-25]. Dostupné z: <http://cellbiologyolm.stevegallik.org/node/74>
2. HEIN B, WILLIG KI, HELL SW. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, **105** (38), 14271–14276
3. RODRIGUES J, SILVA RD, NORONHA H, PEDRAS A, GERÓS H, CÔRTE-REAL M. Flow cytometry as a novel tool for structural and functional characterization of isolated yeast vacuoles. *Microbiology.* 2013, **159**(5), 848-856

9 Seznam použitých zkratk

CE – kapilární elektroforéza

DiBAC4 - Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol

ER – endoplazmatické retikulum

FFE – free flow electrophoresis

FM1-43 - N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium
Dibromid

LIF – laserem indukovaná fluorescence

MDY-64 – marker kvasinkové vakuolární membrány (zelené fluorescenční barvivo)

PDI – protein disulfidická izomeráza

pI – izoelektrický bod

PVDF – polvinylidenfluorid

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrilamidovém gelu v přítomnosti dodecilsíranu
sodného

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

SSC1 – heat shock protein, „Stress-Seventy subfamily C“

STED – stimulated emission depletion, vyčerpání stimulovanou emisí

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

VDAC – voltage-dependent anion channels, na napětí závislé aniontové kanálky