

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv vnější teploty na množství PSI-NDH superkomplexu
produkovaného rostlinami**

Vypracoval: Bc. Ondřej Kocáb

Studijní obor: Biofyzika

Konzultant diplomové práce: Mgr. Lukáš Nosek

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.

Olomouc, 2016

Chtěl bych zde poděkovat všem, kteří se zasloužili o dokončení mé diplomové práce a umožnili mi tak završit magisterské studium Biofyziky na Univerzitě Palackého. Především děkuji RNDr. Romanu Kouřilovi, Ph.D., který na mě po celou dobu tvorby této práce dohlížel, pomohl a poradil v těžkých chvílích, vždy mi vyšel vstříc a především se mnou měl železnou trpělivost. Stejně velké díky zcela zaslouženě patří Mgr. Lukáši Noskovi, který mě seznámil s většinou metod použitých v této práci a vždy byl ochoten mi v případě nouze pomoci či poradit. Velké díky také patří Doc. RNDr. Dušanu Lazárovi, Ph.D., Prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D., a zbytku profesorského sboru za všechny informace, které mi během studia poskytli. Dále děkuji všem doktorandům, se kterými jsem měl tu čest se setkat, za skvělou atmosféru, která na pracovišti vládla a bezproblémovou komunikaci. A v neposlední řadě také děkuji Ivetě Kobrlové za péči o vybavenost laboratoře a fungování kávovaru – bez kávy by pro mne byla mnohá rána na pracovišti krušná. V případě, že bych se rozhodl v dalším studiu nepokračovat, chci tímto vyjádřit svou vděčnost za veškerou pomoc a ochotu, které se mi při studiu dostalo.

Nesmím ale zapomínat na mou rodinu a přátele, kteří mě při tvorbě této práce podporovali i mimo laboratoř. Především děkuji Mgr. Šárce Bártové, která mi vždy byla silnou duševní oporou a rádkyní, dále Bc. Ivě Petrové, Mgr. Noemi Bucharové a Bc. Slavomíru Šmecku, u kterých jsem našel podporu v dobách melancholie, a mým spolužákům Bc. Petru Běčákovi a Bc. Adéle Stavárkové za to, že tu dlouhou cestu absolvovali se mnou. Dále děkuji svým rodičům a prarodičům za veškerou podporu, ať už hmotnou či duševní a za trpělivost, kterou se mnou po celou tu dlouhou dobu měli.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením RNDr.
Romana Kouřila, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

SOUHRN

Tato práce se zabývá sledováním struktury a množství PSI-NDH superkomplexu u rostlin pěstovaných za různých teplot. Obsahuje stručný přehled lineárního elektronového transportu, cyklického elektronového transportu a obecný popis některých metod užívaných při výzkumu PSI-NDH superkomplexu.

Měření probíhalo na ječmeni (*Hordeum vulgare*). Pro stanovení struktury proteinových komplexů byla využita separační technika CN-PAGE, z nichž byly získány vzorky pro analýzu pod transmisním elektronovým mikroskopem. Ke stanovení množství proteinových komplexů byla využita separační technika SDS-PAGE v kombinaci s metodou Western blotting a také fluorescenční analýza pomocí přístroje PAM-2000, kde byl sledován nárůst minimální fluorescence.

V diskusi jsou obdržené výsledky rozebrány z hlediska použitých separačních technik, struktur nalezených u daných teplotních variant a výsledků fluorescenční analýzy. Obdržená data jsou porovnána s nejnovějšími poznatky v odborné literatuře. Tato práce ukazuje, že působení vyšších teplot na rostlinu zřejmě stimuluje cyklický elektronový transport a kompenzuje tak zpomalený tok elektronů skrze PSII. U rostlin pěstovaných při teplotě 38 °C byl odhalen PSI-NDH superkomplex se třemi PSI, což se zdá tuto teorii podporovat. Fluorescenční analýza také potvrzuje, že rostliny pěstované za vyšších teplot obsahují větší množství PSI-NDH superkomplexu, než rostliny pěstované za nižší teploty. Nečekaným nálezem byly tetramery PSI u rostlin pěstovaných při 40 °C v oblasti, kde sem měly narážet primárně PSI-NDH superkomplexy.

SUMMARY

This work deals with structure and quantity of PSI-NDH supercomplex in plants grown at various temperatures. Current knowledge of linear electron transport, cyclic electron transport and general description of some methods which are used in PSI-NDH supercomplex research are summarized.

Measurement was carried on barley (*Hordeum vulgare*). Structure of protein complexes was examined using separation technique CN-PAGE. Obtained samples were then analyzed by transmission electron microscope. Quantity of protein complexes was determined using separation technique SDS-PAGE in combination with Western Blotting; fluorescence analysis was observed as an increase of minimal fluorescence measured by PAM.

In discussion, our results in terms of used separation techniques, structures obtained at various temperatures and results from fluorescence analysis were analyzed. Our observations are compared with recently published data. This work shows that effect of highest temperatures on plant is stimulates cyclic electron transport and thus compensates inhibited linear electron transport through PSII. Supercomplex with three PSI was detected in plants grown at 38 °C. Plants grown at higher temperatures contain more PSI-NDH supercomplexes then plants grown at lower temperatures, which was confirmed by fluorescence analysis. Unexpectedly, in place of PSI-NDH supercomplex only PSI tetramers were present in plants grown at 40 °C.

SEZNAM ZKRATEK

AL	Aktinické světlo
CET	Cyklický elektronový transport
CN-PAGE	Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f komplex
EM	Elektronová mikroskopie
Fd	Ferredoxin
HSP	Proteiny teplotního šoku
LET	Lineární elektronový transport
LHCI	Světloběrný komplex fotosystému I
LHCII	Světloběrný komplex fotosystému II
ML	Měřící světlo
NDH	NAD(P)H dehydrogenáza
OEC	Kyslík vyvíjející komplex
PGR5	Proton gradient regulation 5 komplex
PGRL1	Proton gradient regulation like 1 komplex
PQ	Plastochinonový „pool“
PQH ₂	Plastohydrochinon
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
Q _A	Plastochinon A
Q _B	Plastochinon B
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SP	Saturační puls
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie

OBSAH

1. Úvod	1
2. Fotosyntetický aparát rostlin	3
2.1. Lineární elektronový transport	4
2.2. Cyklický elektronový transport	6
2.2.1. Cyklický transport elektronů přes PGRL1/PGR5 komplex	6
2.2.2. Cyklický transport elektronů přes NDH komplex	8
2.3. Vliv zvýšené teploty na rostlinu	10
3. Metody využívané při studiu PSI-NDH superkomplexu	11
3.1. Obecný princip elektroforézy	11
3.1.1. Nativní elektroforéza	12
3.1.2. SDS elektroforéza	12
3.2. Elektronová mikroskopie	13
3.2.1. Příprava biologických vzorků pro EM	13
3.2.2. Transmisní elektronový mikroskop	14
3.2.3. Obrazová analýza	14
4. Materiál a metody	16
5. Výsledky měření	21
5.1. Separace PSI-NDH superkomplexu	21
5.2. Strukturní analýza	25
5.3 Stanovení množství PSI-NDH superkomplexu	38
5.3.1. Western blotting	38
5.3.2. Fluorescenční analýza	39
6. Diskuze	42
7. Závěr	45
8. Citace	46

1. Úvod

Rostliny ovlivňují náš život na tisíc způsobů. Jsou zdrojem obživy, inspirací v umění či projevem lásky. Zanikly by bez nich knihy i tištěný text, neboť by chyběl materiál na výrobu papíru. A konečně, bez rostlin by život na Zemi nebyl možný – minimálně pro vyšší organismy.

Důvodem, proč je pro nás a ostatní živočichy výskyt rostlin tak zásadní, je proces zvaný fotosyntéza. Při tomto procesu je energie absorbovaná ze Slunce využita k transformaci energeticky chudých látek (voda) v látky energeticky bohaté (ATP, NADPH). Tyto energeticky bohaté molekuly jsou poté využity k fixaci uhlíku z oxidu uhličitého, což vede k tvorbě sacharidů. Jelikož živočichové nejsou schopni cukry samostatně syntetizovat, je pro ně tato schopnost rostlin zcela zásadní. Co víc, odpadním produktem fotosyntézy je kyslík, bez kterého se aerobní organismy nejsou schopné obejít.

Z tohoto důvodu je výzkum rostlin a jejich fyziologických procesů zcela zásadní; v mnoha výzkumných střediscích po celém světě jsou studovány a modifikovány jejich vlastnosti. Jednou ze studovaných problematik je právě fotosyntéza. Už mnoho let je znám její obecný princip, ovšem i v současnosti panuje v této oblasti mnoho nejasností, které jsou stálým předmětem bádání. V posledních letech se do ohniska zájmu přesunul i cyklický elektronový transport okolo fotosystému I (PSI) (viz. 2.2.), který byl dříve považován za méně významný. Dnes už je známo, že tento typ transportu je zcela zásadní, zejména při okolních podmínkách, které vedou ke stresu rostlin.

Jsou známy dva hlavní typy cyklického elektronového transportu okolo PSI – přes PGR5/PGRL1 (proton gradient regulation 5/ like 1) komplexy a přes komplex NDH (NAD(P)H dehydrogenáza) (viz. 2.2.). Ohledně fyziologické role obou cyklických cest jejich regulace a přesného fungování stále panují otazníky. V současnosti jsou studovány mnoha metodami, mezi jinými i pomocí elektronové mikroskopie. Právě tato metoda podala přímý důkaz o tvorbě a organizaci PSI-NDH superkomplexu (Kouřil *et al.*, 2014). Výsledek strukturní analýzy ukázal, že NDH komplex se za určitých podmínek asociuje až se dvěma fotosystémy I. O struktuře a přesném způsobu fungování PGR5/PGRL1 komplexů není v současnosti mnoho známo.

Jak již bylo naznačeno, cyklický elektronový transport je specificky aktivován v důsledku působení stresu, s čímž souvisí i formování PSI-NDH superkomplexu. Předběžné a dosud nepublikované výsledky strukturní analýzy PSI-NDH superkomplexů ukazují, že ne vždy jsou PSI komplexy navázány na stejném místě NDH komplexu a ne vždy musí být dva; byly pozorovány i struktury se třemi nebo čtyřmi PSI komplexy (osobní sdělení vedoucího diplomové práce R. Kouřila). Je otázkou, zda celkové množství PSI-NDH komplexů a formování jeho vyšších oligomerních struktur nesouvisí např. s mírou stresu působícího na rostlinu.

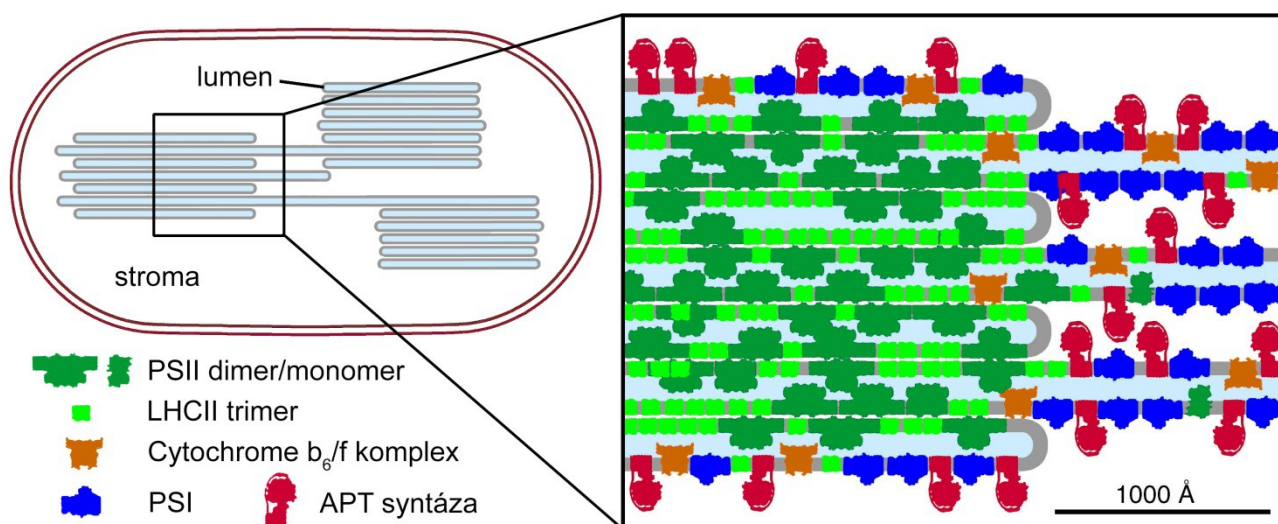
V této práci jsme se zaměřili na vysokoteplotní stres a jeho vliv na tvorbu a strukturní organizaci PSI-NDH superkomplexů. Tato studie dosud nebyla provedena a mohla by být důležitá pro pochopení mechanismů souvisejících s tvorbou a funkcí tohoto superkomplexu. Vzhledem k měnícím se klimatickým podmínkám na naší planetě by tyto informace mohly být v budoucnosti užitečné.

2. Fotosyntetický aparát rostlin

K pochopení funkce cyklického elektronového transportu (CET) je potřeba se nejprve seznámit s lineárním elektronovým transportem (LET). Abychom však mohli popsat LET, musíme nejprve lokalizovat místo, kde k němu dochází. V buňkách většiny fotosyntetizujících organismů se nachází semiautonómni organely zvané chloroplasty. Chloroplasty jsou membránové struktury, v jejichž nitru se nacházejí thylakoidy. Ty jsou taktéž membránovými strukturami – rozlišujeme lumen (vnitřek thylakoidu) a stroma (vnějšek thylakoidu). Thylakoidy se dále dělí na grana a stromatální lamely (propojení gran).

Nejdůležitější z proteinových komplexů v thylakoidní membráně jsou fotosystém II (PSII) s příslušným světlosběrným komplexem (LHCII), cytochrom b_6/f komplex (Cyt b_6/f), fotosystém I (PSI) s příslušným světlosběrným komplexem (LHCI) a ATP-syntáza (Obrázek č.1). Zatímco první tři zajišťují transport elektronů skrze thylakoidní membránu (konečným produktem je NADPH), skrze ATP-syntázu procházejí protony H^+ z lumenu do stromatu, čímž je generováno ATP.

Fotosyntézu jakožto proces můžeme rozdělit na fázi primární (světelnou) a sekundární (temnostní). Během primární fáze je pomocí LHCI a LHCII absorbována světelná energie ze Slunce, která je využita k transportu elektronů přes thylakoidní membránu s využitím výše uvedených proteinových komplexů. Výsledné produkty primární fáze jsou využity ve fázi sekundární, která je spojena s biochemickými pochody Calvinova cyklu. Přestože jsou z hlediska existence života na Zemi důležité obě tyto fáze, v dalším pokračování se zaměříme zejména na primární fázi.



Obrázek č.1: Model rozložení proteinových komplexů v thylakoidní membráně. Dle legendy na obrázku zde můžeme vidět umístění dimerů/monomerů PSII (tmavě zelená), LHCII trimerů (světle zelená), cytochrom b_6/f komplexů (oranžová), PSI (modrá) a ATP-syntázy (červená). Světle modrou je označen prostor lumenu, bílou barvou stroma. Převzato a upraveno z Dekker a Boekema, 2005.

2.1. Lineární elektronový transport

První pigment-proteinový komplex v dráze LET (Obrázek č.2) je PSII. Na jeho lumenální straně se nachází kyslík vyvíjející komplex (OEC), silný oxidant, schopný z H_2O odebrat elektron. Z molekul vody poté v lumenu zůstávají protony H^+ (potřebné pro tvorbu ATP) a molekuly kyslíku O_2 (potřebné pro dýchání většiny živočichů). Elektrony z OEC přecházejí na molekulu tyrosinu a štěpení vody pokračuje dále.

Z molekuly tyrosinu se elektron přesune do reakčního centra PSII, které je také označováno jako primární donor či P680 (dle maxima absorpce při 680 nm). Jde o speciální molekulu chlorofylu *a*, do které jsou shromážděny excitace z přidruženého LHCI. Díky dodané energii se P680 dostane do excitovaného stavu, stává se z něj reductant a předává elektron na molekulu feofytinu. Mezitím je na molekulu tyrosinu přiveden další elektron, který se opět přesune na neredukované P680.

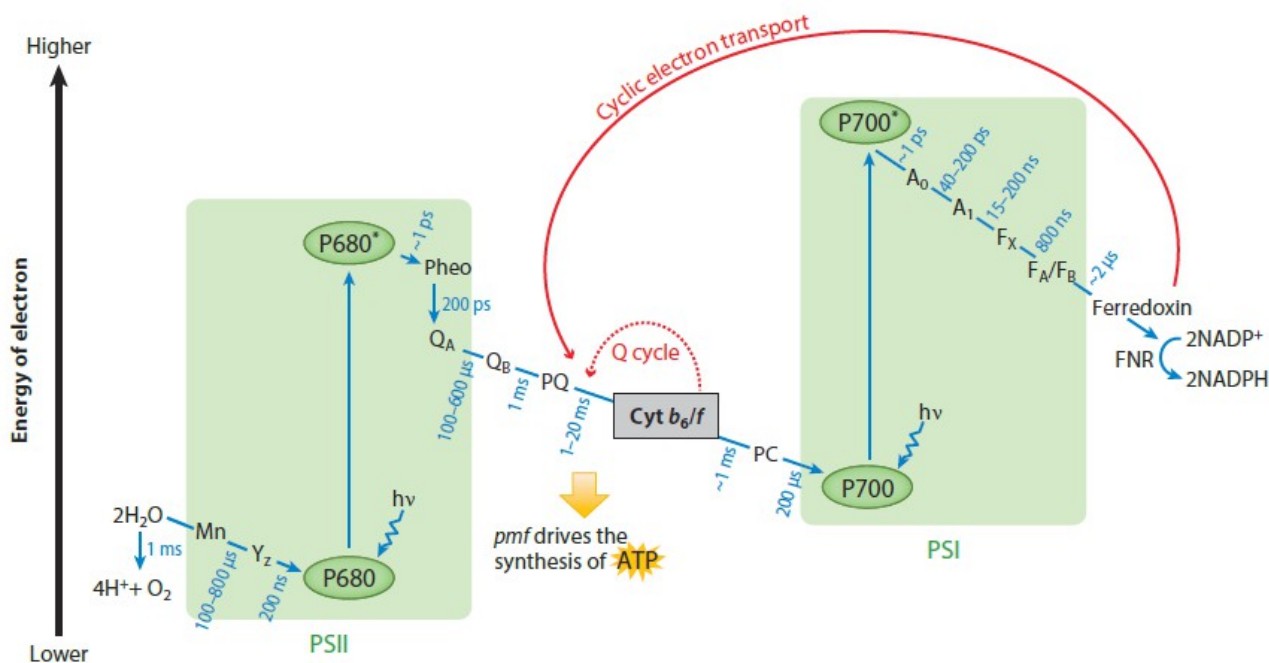
Po energetické spádnicí je z feofytinu elektron nejprve přesunut na plastochinon Q_A a poté na plastochinon Q_B . Plastochinon Q_B je dvouelektronovým přenašečem, který je schopný putovat thylakoidní membránou. S každým přijatým elektronem současně naváže jeden H^+ ze stromatu – vzniká plastohydrochinon PQH_2 . Ten putuje k Cyt b_6f komplexu, který je však již pouze jedoelektronovým přenašečem. Oba přijaté H^+ jsou přesunuty do lumenu, zatímco cesty elektronů se rozdělí. Jeden elektron je transportován přes cytochrom *b* zpátky na Q_B . Ten po opětovném dodání dvou elektronů (a dvou H^+ ze stromatu) znovu interaguje s Cyt b_6f komplexem; toto zacyklení je známo jako Q-cyklus (Shikanai, 2007).

Druhý elektron přijatý Cyt b_6f komplexem čeká jiný osud. Nejprve putuje na Rieskeho FeS protein a z něj na cytochrom *f*. Odtud redukuje plastocyanin, mobilní molekulu schopnou pohybu v lumenu, která je donorem PSI. Obdobně jako PSII je i PSI pigment-proteinovým komplexem s příslušejícím světlosběrným komplexem, v tomto případě LHCI. Elektron putuje z plastocyaninu přímo do reakčního centra PSI, které se také nazývá P700 (dle maxima absorpce při 700 nm). Obdobně jako v předchozím případě je energie z LHCI shromážděna do P700.

Excitované P700 je velmi silným reductantem, ze kterého elektron opět putuje po energetické spádnicí přes řadu přenašečů. Prvním z nich je speciální molekula chlorofylu A_0 ; následuje jeho přesun na fylochinon A_1 a poté i přes železnosírnaté klastry (F_x , F_A a F_B). Nakonec doputují až na ferredoxin (Fd), což je mobilní molekula schopná pohybu ve stromatu. Elektron přenášený na Fd je zde za pomoci enzymu ferredoxin-NADP⁺-oxidoreduktázy (FNR) využit k redukci molekuly NADP⁺, což vede ke vzniku NADPH. Molekula FD se pak vrací na své místo, kde čeká na přijetí dalšího elektronu (Nelson and Yocum, 2006).

Při LET jsou tedy transportovány elektrony z vody do molekuly NADPH, přičemž dochází k zvyšování množství H^+ v lumenu (díky činnosti OEC a interakce PQH_2 s Cyt b_6/f komplexem), což vede k produkci ATP skrze ATP-syntázu. Pokud je rostlina vystavena nadměrnému množství světla, kapacita LET je nasycena a v lumenu se začnou hromadit H^+ ; při výrazném okyselení rostlina spouští signální dráhy vedoucí k aktivaci nefotochemického zhášení. Nefotochemické zhášení má význam zejména jako ochrana před fotooxidačním poškozením, kdy může zachycená světelná energie redukovat singletní kyslík, díky čemuž vzniká tripletní kyslík; vznikající kyslíkové radikály mohou okolní proteiny poškodit. Nefotochemické zhášení je realizováno zejména prostřednictvím xanthofilového cyklu a působením PsbS proteinu (Ruban, 2016).

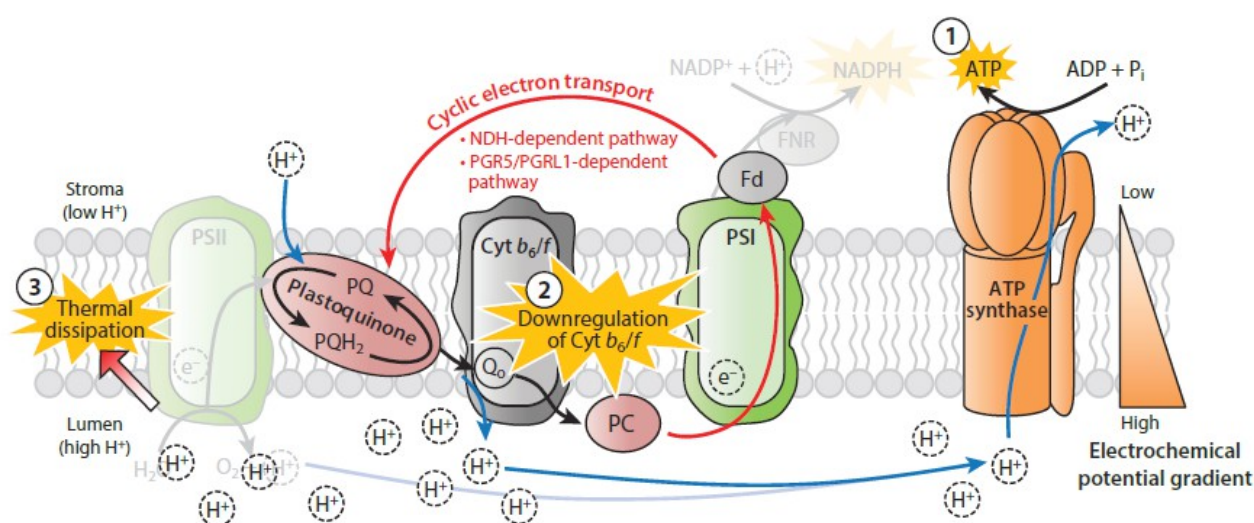
Ačkoli by se dal LET popsat v mnoha ohledech detailněji, v této práci nás více zajímají aspekty týkající se CET. Přesto je však potřeba mít přehled i o LET, protože oba typy transportů spolu úzce souvisí. V dalším přiblížení si tedy popíšeme, co je známo o cyklickém elektronovém transportu.



Obrázek č.2: Z-schéma lineárního elektronového transportu přes thylakoidní membránu, znázorňující přenos elektronů z molekul H_2O na NADPH. Modré šipky naznačují přenos elektronů přes jednotlivé elektronové přenašeče (viz text této kapitoly) i s příslušnými dobami přenosu elektronu. Černá šipka vlevo znázorňuje energii elektronu v průběhu LET. Červená čipka znázorňuje cyklický elektronový transport (viz další kapitola). Přerušovaná červená šipka označuje Q-cyklus na cytochrom b_6/f komplexu, díky kterému dochází k translokaci H^+ do lumenu. Dále je naznačeno, že H^+ v lumenu jsou transportovány do stromatu skrze ATP-syntázu za tvorby ATP. Obrázek byl převzat z Yamori and Shikanai, 2016.

2.2. Cyklický elektronový transport

CET je alternativním typem elektronového transportu, který umožňuje navracet elektrony z Fd či dokonce z NADPH zpět na Q_B (Obrázek č.3). Cyklus je uzavřen opětovným přenosem elektronů z Q_B na PSI skrze Cyt b_6/f komplex a plastocyanin, vše na úkor tvorby NADPH (Shikanai, 2007). Důležitým důsledkem činnosti CET je nárůst koncentrace H^+ v lumenu. Lze tedy usuzovat, že existence CET má dva významy. Prvním z nich je zvýšení poměru produkovaného ATP/NADPH; druhým efektem je rychlejší okyselení lumenu a tedy aktivace nefotochemického zhášení při stresových podmínkách (Johnson, 2011; Joliot and Johnson, 2011; Ifuku *et al.*, 2011). Již je známo, že CET může probíhat dvěma způsoby – buď pomocí PGRL1/PGR5 (Johnson, 2011) či NDH komplexů (Kouřil *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2006; Ifuku *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011).



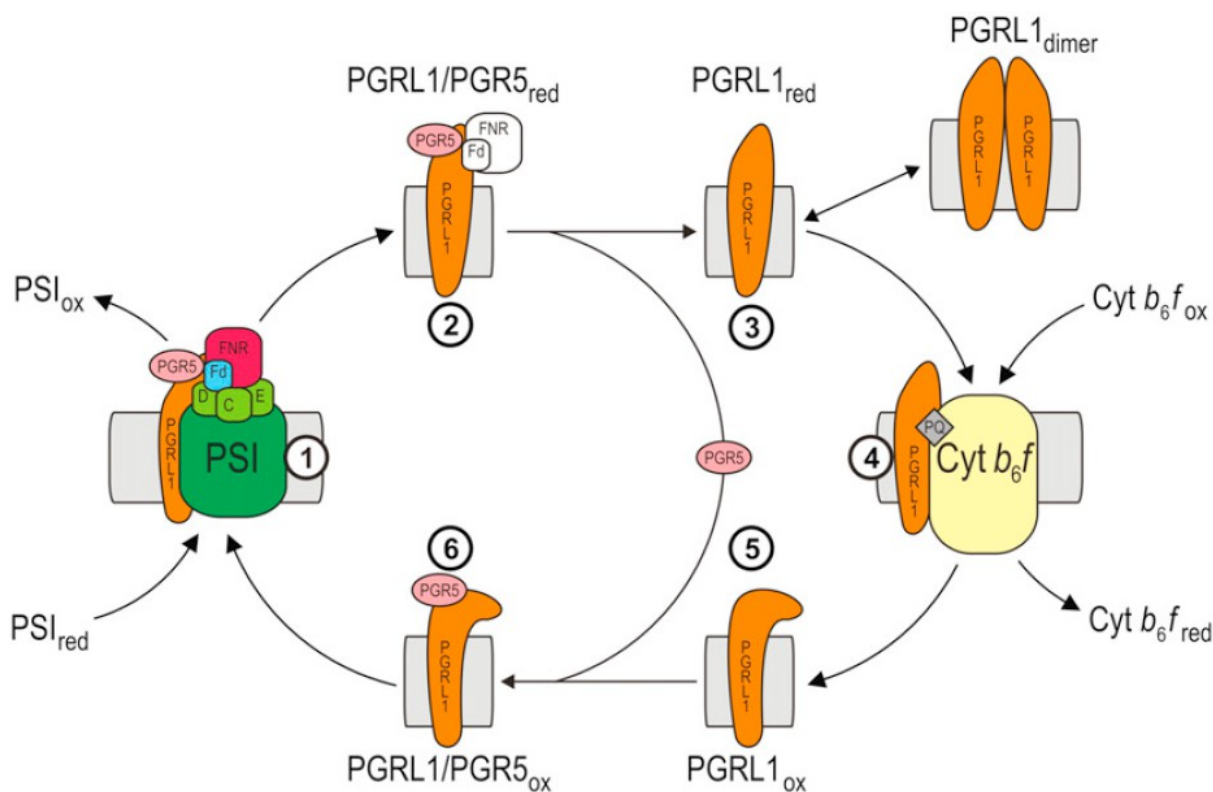
Obrázek č.3: Znárodnění cyklického elektronového transportu, který může probíhat za účasti PGRL1/PGR5 komplexů nebo NDH komplexů. Oba typy komplexů interagují s redukováným Fd, ze kterého je elektron přenesen na cytochrom b_6/f komplex; v důsledku Q-cyklu je do lumenu transportováno více H^+ , což v konečném důsledku vyvolává zvýšenou tvorbu ATP oproti NADPH a rychlejší aktivaci nefotochemického zhášení fluorescence PSII (teplotní disipace). Obrázek byl převzat z Yamori and Shikanai, 2016.

2.2.1. Cyklický transport elektronů přes PGR5/PGRL1 komplex

PGR5 protein umožňuje realizaci hlavního CET, který probíhá i za nestresových podmínek za účelem fotoprotekce a vyrovnávání poměru ATP/NADPH (Munekage *et al.*, 2002; Joliot and Joliot, 2006). Aby mohl být tento typ transportu realizován, interaguje PGR5 s membránovým proteinem PGRL1 (proton gradient regulation like 1) (Munekage a kol., 2002; DalCorso a kol., 2008). Zatímco PGRL1 je integrálním proteinem nacházejícím se v thylakoidní membráně, PGR5 se nachází volně ve stromatu. Interakce těchto dvou proteinů, označována také jako PGRL1/PGR5 komplex (DalCorso *et al.*, 2008; Johnson, 2011), je pro tento typ CET u rostlin zcela zásadní.

Jak již bylo uvedeno výše, ke vzniku PGRL1/PGR5 komplexu je třeba volný PGR5 protein a oxidovaná forma PGRL1 komplexu. Tento komplex je stabilní a nachází se volně v membráně v okolí PSI, kde probíhá LET. Poté, co se elektron dostane na Fd, může dojít k interakci s PGR5, kterému je tento elektron předán. Redukovaná forma PGR5 vytváří komplex s PGRL1, který je následně redukován a PGRL1/PGR5 komplex se rozpadá. PGR5 protein je uvolněn do stromatu a po další redukci molekulou Fd vyhledává jiný oxidovaný PGRL1 (Obrázek č.4).

Redukovaný PGRL1 dokáže narozdíl od PGR5 předat elektron na Cyt b_6f komplex, respektive na plastochinonový „pool“ (PQ), který s Cyt b_6f interaguje. V případě, že by redukováný PGRL1 protein neměl kam elektron předat, vytvoří dimer s jiným redukováným PGRL1. Tento proces je reverzibilní a zřejmě funguje jako ochrana před vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS). Po předání elektronu na PQ je PGRL1 opět oxidovaný a může opět reagovat s PGR5 (Hertle *et al.*, 2013).



Obrázek č.4: Předpokládaný model fungování CET pomocí PGRL1/PGR5 komplexů, popisovaný v textu. Po předání elektronu z redukováného Fd na PGRL1/PGR5 komplexu (1) se stávají redukovánými (2). PGR5, který předal elektron na PGRL1, se uvolňuje do stromatu (3). Redukovaný PGRL1 předává elektron na cytochrom b_6f komplex (4); v případě, že se poblíž cytochrom b_6f komplex nenachází, utváří PGRL1 dočasný dimer. Oxidovaný PGRL1 (5) se opět spojí s PGR5 (5) a společně putují do oblasti s výskytem PSI, kde je PGR5 opět redukováno Fd (1) a celý cyklus se opakuje. Obrázek byl převzat z Hertle *et al.*, 2013.

2.2.2. Cyklický transport elektronů přes NDH komplex

Druhá možnost CET je transport elektronů skrze NDH komplex (Obrázek č.5). Tento typ CET je označován také jako vedlejší a má se za to, že je aktivní zejména při stresu rostlin (Peng *et al.*, 2011). Za normálních podmínek se ho v thylakoidní membráně vyskytuje pouze malé množství a jeho aktivita není příliš výrazná. Při stresových podmínkách však přestává být postradatelný a výrazně se uplatňuje při CET a tím pádem i aktivaci nefotochemického zhášení (viz dále).

Svou strukturou NDH komplex vykazuje podobnost s mitochondriálním NDH-1 (Complex 1), který je v mitochondriích součástí dýchacího řetězce (Horváth *et al.*, 2000; Baradaran *et al.*, 2013; Efremov *et al.*, 2010). V analogii s mitochondriemi je v rostlinách NDH komplex kódován chloroplastovou DNA, konkrétně 11 geny (*ndhA – ndhK*) (Lascano *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2013; Peng and Shikanai, 2011). Mimo to má však chloroplastový NDH komplex více podjednotek, kódovaných jinými geny (Ifuku *et al.*, 2011).

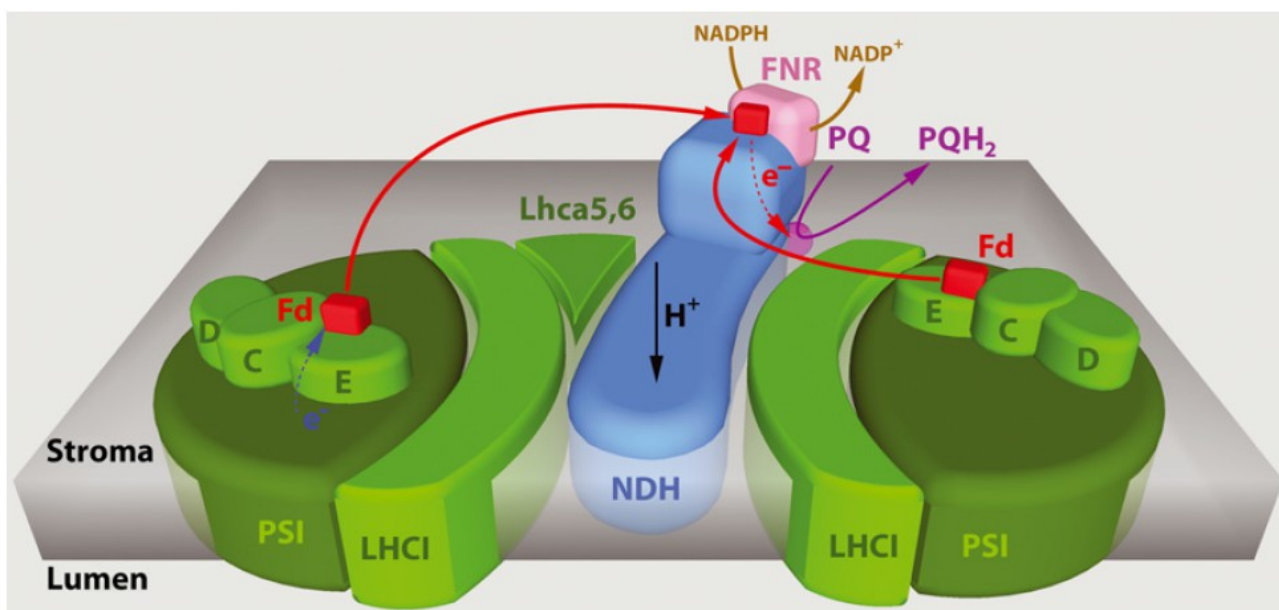
Samotný NDH komplex můžeme rozdělit na 4 subkomplexy – membránový, lumenální, část A a část B (Peng and Shikanai, 2011; Peng *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2012; Shikanai, 2016). Poslední dva jmenované subkomplexy (A a B) se z větší části nacházejí ve stromální části a zajišťují interakci s okolím. V chloroplastu se nachází 11 genů kódujících podjednotky těchto subkomplexů, ty jsou však ještě doplněny o podjednotky z genů uložených v jaderné DNA. Exprese genů kódujících NDH komplex je spuštěna zvýšeným výskytem H₂O₂ (Shikanai, 2007; Casano *et al.*, 2001; Lascano *et al.*, 2003).

Zvýšený výskyt H₂O₂ signalizuje stres působící na rostlinu. Syntézou NDH komplexů se dosáhne rychlejšího okyselení lumenu (a tedy nefotochemického zhášení). Toto okyselení je generováno jednak samotným NDH komplexem, dále pak hydrogenací PQ, Q-cyklem a OEC. Původně nevýrazný NDH komplex se tedy nyní vyskytuje ve větším množství (Peng *et al.*, 2012; Burrows *et al.*, 1998) a jeho role v elektronovém transportu je díky tomu poměrně významná. Přesto může tento komplex dosáhnout ještě větší efektivity a stability, a to interakcí s jedním či více PSI. Tím je vytvořen PSI-NDH superkomplex (Kouřil *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2011; Peng and Shikanai, 2011), což zřejmě vede k prudkému zvýšení efektivity CET.

Bylo zjištěno, že PSI je k NDH komplexu připojeno pomocí Lhca5 a Lhca6 (Peng *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2011; Ifuku *et al.*, 2011; Kouřil *et al.*, 2014). Tyto dva pigment-proteinové komplexy se vyskytují v chloroplastech jen v malém množství. Poté co se připojí k LHCI, je PSI schopný se připojit se k NDH komplexu a stabilizovat ho. PSI-NDH superkomplexy bez Lhca5 a Lhca6 nejsou příliš stabilní a snadno podléhají oxidativnímu stresu (Peng and Shikanai, 2011).

Úloha NDH komplexu spočívá v navázání redukováného Fd do vazebného místa v jeho hydrofilní části (Szymanska *et al.*, 2011; Ifuku *et al.*, 2011; Shikanai, 2016). Po navázání Fd je elektron transportován skrze NDH komplex na PQ, odkud pokračuje přes Cyt b_6f směrem k PSI. Pokud je ve vazebném místě NDH komplexu přítomen Fd, může za přítomnosti FNR docházet k reverzní reakci, při které je elektron z NAD(P)H přenesen na Fd. Při této reakci vzniká NAD(P)⁺ a dochází k dislokaci H⁺ skrze thylakoidní membránu do lumenu. Elektron na Fd opět pokračuje směrem k PSI způsobem popsáným výše.

PSI-NDH superkomplex je struktura ve své intaktní formě dobře pozorovatelná pomocí elektronového mikroskopu (EM). Jeho separace je snadno proveditelná pomocí nativní či SDS elektroforézy. V práci Kouřila *at al.* (2014) se poprvé podařilo využít těchto dvou skutečností k získání snímků PSI-NDH superkomplexu. Ukázalo se, že PSI-NDH superkomplex se skládá z jednoho NDH komplexu, ke kterému jsou po stranách navázány jeden až dva PSI. Dále se ukazuje, že k NDH mohou být připojeny celkem tři až čtyři PSI, a to zejména za stresových podmínek. Tato práce se zabývá strukturou a množstvím PSI-NDH superkomplexu u rostlin se zvýšenou pěstební teplotou.



Obrázek č.5: Model fungování NDH-PSI superkomplexu. Vidíme zde nejobvyklejší případ, kdy jsou k NDH komplexu připojeny pomocí Lhca5 a Lhca6 dva PSI. Z těchto PSI putuje redukováný Fd směrem k NDH komplexu, pomocí kterého dochází k přenosu elektronu z Fd na PQ. Druhou možností je reverzní přenos elektronu z NADPH na Fd (a z něj opět na PQ) nacházející se ve vazebném místě NDH komplexu; tato interakce probíhá za spoluúčasti FNR a je při ní skrze NDH komplex translokován do lumenu H⁺. Obrázek byl převzat z Kouřil *et al.*, 2014.

2.3. Vliv zvýšené teploty na rostlinu

Rostliny vyrůstající za nestandardních podmínek si většinou vybudují mechanismy, které jim umožní nepříznivý stav přečkat a ve výsledku jsou tak vůči výchozím podmínkám odolnější. Pokud vztáhneme tuto skutečnost na zvýšenou teplotu, je pravděpodobné, že se na ni rostlina během svého růstu aklimuje. Výsledkem může být větší termostabilita systému díky zvýšenému množství heat shock proteinům (HSP) v thylakoidní membráně (Allakhverdiev *et al.*, 2008).

Jelikož vzorky studované v praktické části byly pěstovány při teplotách 25 °C a výš, nezabývá se tato část práce vlivem nižších teplot na rostlinu (což nijak nesnižuje význam této problematiky). Pohybujeme-li se v oblasti pokojových teplot (20 °C až 25 °C), převažuje zejména LET a CET zprostředkovaný PGR5/PGRL1 komplexem popsany výše. Pokud se přesuneme k teplotám 25 °C až 35 °C, neměl by se průběh fotosyntézy ani struktura fotosyntetického aparátu příliš měnit.

První známky působení vysokoteplotního stresu se objevují při 38 °C, tedy přesněji řečeno v teplotním rozmezí 35 °C až 40 °C, kdy LET skrze PSII slábne (Sharkey, 2005). Při teplotách 40 °C až 45 °C dojde k degradaci OEC a LET se přeruší; elektrony však mohou být i nadále získávány z alternativních zdrojů, jako například askorbát (Ilík *et al.*, 2010).

Pro náš případ se zaměříme na teploty okolo 25 °C až 40 °C. Jak již bylo řečeno, při 38 °C přestává fungovat OEC a díky tomu je zde riziko vzniku oxidovaného P680; současně s tímto jevem vzrůstá i pravděpodobnost vzniku ROS. V důsledku toho se v rostlině tvoří PSI-NDH superkomplex, který podle posledních informací rostlinám napomáhá odolávat tepelnému stresu a brání přeredukování stromatu při jeho působení (Essemine *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Je tedy žádoucí zabývat se výzkumem v této oblasti a v další kapitole si teoreticky popíšeme některé možné metody výzkumu, které byly použity i v této práci.

3. Metody užívané při studiu PSI-NDH superkomplexu

Abychom vůbec mohli objasnit pochody v rostlinách, zmiňované v předchozích kapitolách, potřebujeme k tomu vhodné nástroje. Existují stovky metod, mnohdy i velmi specifických, jak zjistit informace o struktuře, množství či fungování proteinů či proteinových komplexů. Vzhledem k jejich velikosti je však není snadné získat, natož zkoumat. K jejich získání používáme řadu separačních technik, mezi které patří například chromatografie nebo elektroforéza. Konkrétně v této práci používáme k separaci PSI-NDH superkomplexu nativní elektroforézu (CN-PAGE) a pro získání informace o množství jsme se pokusili v kombinaci s imunoanalýzou využít SDS elektroforézu (SDS-PAGE).

Pro určení struktury proteinů a proteinových komplexů je zhora nemožné použít světelný mikroskop, neboť u něj dochází vlivem difrakce ke zkreslení zobrazovaných objektů, které mají obdobnou velikost jak vlnová délka použitého světla. Je tedy nutné použít jiných metod, například rentgenové krystalografie či elektronové mikroskopie (EM). V této práci byla PSI-NDH superkomplexy separované CN-PAGE pozorované právě pod elektronovým mikroskopem.

Tato část práce nemá za úkol nahradit kapitolu *Materiál a metody*, nýbrž seznámit čtenáře s nejobecnějšími principy elektroforézy a elektronové mikroskopie.

3.1. Obecný princip elektroforézy

Elektroforéza je separační technika, založená na migraci molekulárních struktur (např. proteiny či proteinové komplexy) v závislosti na jejich náboji a velikosti. Migrace probíhá ve vhodné gelové matici (vodné prostředí), díky čemuž by nemělo dojít promíchání jednotlivých separovaných vzorků. Tato gelová matrice je tvořena polyakrylamidem, který tvoří molekulové síto, jímž separované proteiny prochází. Způsob separace proteinů odlišný u různých typů elektroforézy, v konečném důsledku se však částice migrující k anodě rozdělí do pásů odpovídajících různé velikosti proteinů.

Elektroforetické dělení může probíhat v prvním či druhém rozměru. Prvním rozměrem je míněna standardní elektroforetická separace. Druhý rozměr elektroforézy je tzv. denaturující rozměr, kdy dochází k rozvolňování proteinových struktur a separování jejich podjednotek. Spojení těchto dvou metod nazýváme dvourozměrnou elektroforézou. Jednotlivé typy elektroforézy se dále mohou lišit složením gelů, pufrů, použitým detergentem a přípravou separovaných vzorků. V této práci je použita elektroforéza pouze v prvním rozměru. Informace v této kapitole a následujících dvou podkapitolách jsou čerpány z autorových zkušeností a také z osobních sdělení a diplomové práce Lukáše Noska, 2012.

3.1.1. Nativní elektroforéza

CN-PAGE je typ elektroforézy, jejímž cílem je získat neporušené (nativní) proteiny či proteinové komplexy. Pro separaci je používán lineární gradientový polyakrylamidový gel, kde musí být dodržen jistý koncentrační rozsah (4 až 20 %). Pro nedenaturující solubilizaci proteinů je využívána kombinace dvou jemných detergentů – deoxycholátu sodného a jednoho dalšího, zvoleného v rámci intaktnosti separace proteinových komplexů. Mezi tyto „další“ detergenty patří například dodecyl- β -D-maltosid, dodecyl- α -D-maltosid, Triton X-100 či digitonin.

V průběhu CN-PAGE elektroforézy vznikají pásy odpovídající jednotlivým proteinům nejen na základě rychlosti migrace, ale i na jejich velikosti. Jelikož se v důsledku koncentračního gradientu póry v gelu zmenšují, zůstávají proteiny o větší velikosti zachyceny v horní části gelu, zatímco menší budou migrovat k jeho spodní části. Při separaci rostlinných vzorků jsou výsledkem tzv. „zelené gely“, pojmenované dle zeleného barviva chlorofylu. Jelikož jsou výsledné gely barevné, není zde třeba vzorky dále přibarvovat; samotné používání umělých barviv by navíc mohlo ovlivnit nativitu separovaných vzorků.

3.1.1. SDS elektroforéza

SDS-PAGE umožňuje získat proteiny či proteinové komplexy v rozvolněném stavu a případně separovat jejich podjednotky. Směs zkoumaných proteinů je obvykle denaturována ještě před samotnou separací (např. vystavením vyšší teplotě). Použitým detergentem je SDS (dodecylsírán sodný).

V tomto případě je rozdělení jednotlivých pásů v gelu dáno rychlostí migrace jednotlivých proteinů. Poloha jednotlivých pásů opět souvisí s velikostí separovaného proteinu; menší proteiny budou ve spodní části gelu, větší v horní části gelu. Do krajních jamek gelu se obvykle dává marker, díky kterému se dá odhadnout velikost daného proteinu. Jelikož je tento typ elektroforézy bezbarvý, přidává se do směsi separovaných proteinů bromfenylová modř, aby elektroforézu bylo možno včas ukončit.

Rozseparované pásy proteinů nejsou zviditelněny žádným barvivem. Jednotlivé pásy mohou být obarveny vhodným barvivem (např. pomocí Coomassie Blue) a na základě porovnání s markerem mohou být identifikovány. Dalšími způsoby zpracování gelu se separovanými proteiny je například hmotnostní spektroskopie nebo Western blot.

3.2. Elektronová mikroskopie

Jak již bylo řečeno dříve, světelná mikroskopie je omezena difrakčním limitem. Pro pozorování objektů srovnatelných s vlnovou délkou světla je využívána elektronová mikroskopie. Stejně jako bylo při světelné mikroskopii využíváno elektromagnetické vlnění ve viditelné oblasti, je v elektronové mikroskopii využíváno elektronů. To je možné díky de Broglieho teorii, která tvrdí, že každý hmotný objekt má i vlnovou povahu a obráceně. Z toho plyne, že elektron můžeme vnímat jako částici stejně jako vlnu; ukazuje se, že pomocí elektronového svazku jsme schopni získat o vzorku mnohem lepší strukturní informace (teoreticky získáme až o pět řádů lepší rozlišení než u elektronového mikroskopu).

Existují dva základní typy EM – transmisní a skenovací. Transmisní elektronový mikroskop (TEM) je založen na průchodu elektronového svazku skrze sledovaný vzorek; energie detekovaných elektronů poskytuje informaci o struktuře vzorku. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) je založena především na detekci rozptálených elektronů různého druhu (dle energie; elektrony pochází z různé hloubky vzorku). V této práci budeme mluvit pouze o TEM.

3.2.1. Příprava biologických vzorků pro EM

V elektronové mikroskopii je stejně jako v mikroskopii světelné velmi důležitý kontrast. Ten je v případě TEM určen rozptylem elektronů, ovšem u biologických vzorků není kontrast příliš výrazný; navíc je tento typ vzorků náchylný na radiační poškození. To znamená, že bychom neměli používat příliš intenzivní elektronový svazek, což však povede k dalšímu zhoršení kontrastu. Tento problém je řešen zprůměrováním více projekcí sledované struktury (viz dále) a metodou negativního barvení při přípravě vzorku (Oosterwijk, 2005; Kozarová, 2013).

Metoda negativního barvení využívá aplikaci solí těžkých kovů na biomolekuly. Aby bylo možné ji aplikovat je třeba nejprve měděnou mikroskopickou síťku potaženou uhlíkovou vrstvou upravit doutnavým výbojem. Díky tomu na základě hydrofobních a hydrofilních interakcí biomolekuly lépe přilnou na grid, kam je jich umístěno cca 5 μl . Poté je aplikována sůl těžkého kovu (nejčastěji je používán 2% octan uranyl) a po zaschnutí je vzorek připraven pro EM, přičemž jeho kontrast se výrazně zlepšil.

Jelikož nemusí být příjemné pracovat se solemi těžkých kovů, byla vyvinuta i alternativní metoda zvýšení kontrastu vzorku, zvaná kryo-EM. Jak název napovídá, dojde ke zmrazení tenké vrstvy vzorku. Ačkoli je tak dosaženo lepšího rozlišení, kontrast není tak velký jako v metodě negativního barvení, kterou jsme využívali i při získávání dat pro tuto práci.

3.2.2. Transmisní elektronový mikroskop

Jak již bylo řečeno výše, v TEM jsou detekovány elektrony procházející studovaným vzorkem. Uvnitř tubusu elektronového mikroskopu tedy musí panovat vysoký stupeň vakua, aby výsledný obraz nebyl kontaminován interakcí plynů (O_2 , CO_2 , NO_2 , ...) a elektronů; navíc by výskyt vzduchu v tubusu mohl být spojen s nebezpečím ionizace a následným elektrickým výbojem.

Zdrojem proudu elektronů je tzv. elektronové dělo. Jde termoemísni zdroj, tedy například wolframové vlákno či krystal LaB_6 , ze kterého jsou po přivedení dostatečného napětí emitovány elektrony. Tok těchto elektronů je však potřeba usměrnit.

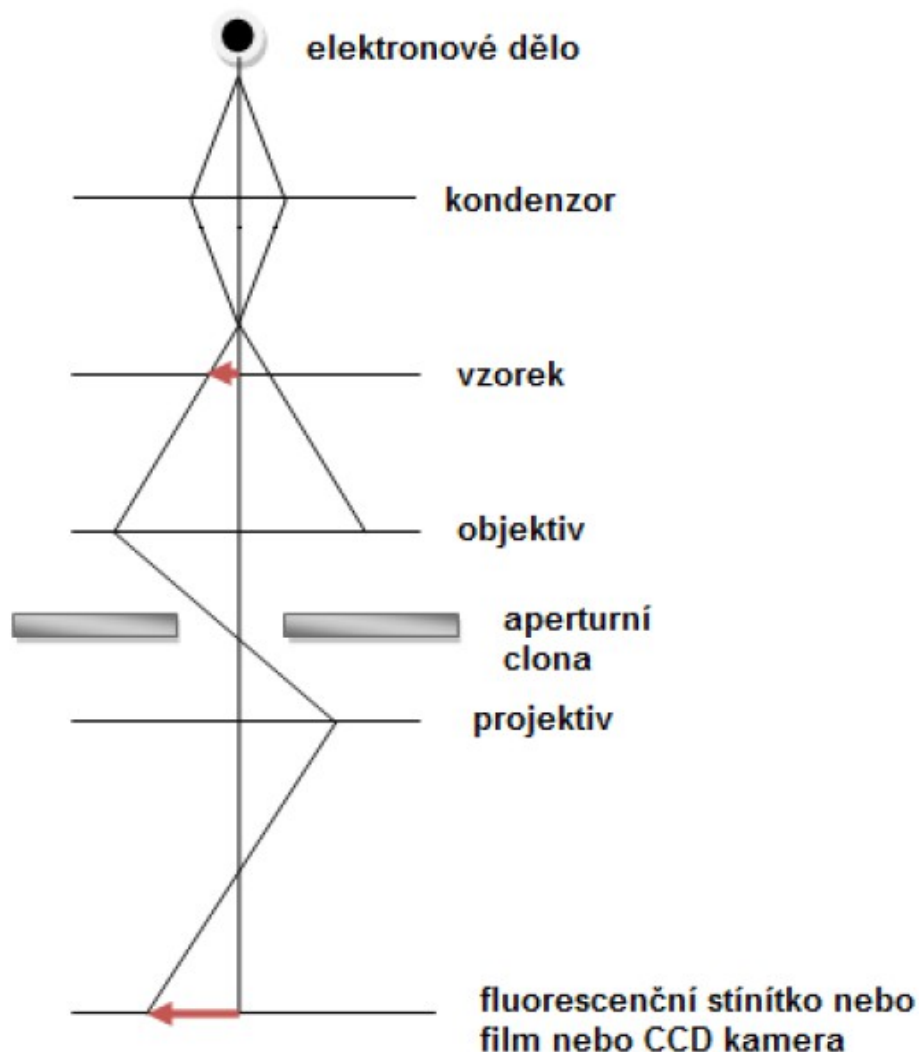
V podobnosti se světelnou mikroskopií i v EM najdeme čočky (Oosterwijk, 2005; Kozarová, 2013). Zde však nejde o čočky fyzického charakteru, nýbrž o elektromagnetické čočky, které elektronový svazek usměrňují. Tyto čočky jsou realizovány pomocí solenoidů (cívka s velkým počtem závitů). První z těchto čoček se nazývá kondenzor, který nám umožňuje zfokusovat proud elektronů na sledovaný vzorek. Za vzorkem se nachází další fokusovatelné čočky; ty fungují jako spojky a brání tak rozbíhavosti svazku. Na konci se nachází objektivová čočka a za ní aperturní clona, jejíž vysunutí umožňuje detekci pouze těch elektronů, které prošly difrakčními maximy. Za aperturní clonou jsou další čočky tvořící projektiv, jenž je zodpovědný za výsledné zvětšení a projekci na fluorescenční stínítko. (Obrázek č.6)

Získaný obraz může být zaznamenán na CCD kameru a výsledné snímky tak mohou být rovnou převedeny do počítače, kde budou dále zpracovány v rámci obrazové analýzy. Je vhodné, aby byl EM po dobu provozu chlazen; toto opatření zabrání driftu vzorku a tím zlepšuje kvalitu snímků.

3.2.3. Obrazová analýza

Abychom mohli určit, co se na snímcích získaných z EM nachází, je třeba provést obrazovou analýzu. K té však potřebujeme stovky až tisíce snímků daného vzorku; z praktického hlediska je vhodné jich mít co nejvíce. Na těchto snímcích pomocí vhodného software vybereme projekce zkoumaných proteinů či proteinových komplex.

Vybrané snímky jsou dále v příslušném software vzájemně srovnávány a v případě podobnosti jsou digitálně naskládány na sebe, čímž dojde ke zlepšení poměru signál/šum a kontrast proteinů se výrazně zvýší. Následně jsou zvoleny další referenční snímky, se kterými je celý proces zopakován; to vede k dalšímu zlepšení kontrastu (Oosterwijk, 2005). Po řadě takových iterací získáme snímky s relativně dobrým kontrastem, které odpovídají vzhledu proteinů ve vzorku.



Obrázek č.6: Zjednodušený nákres fungování EM. Z elektronového děla je emitován svazek elektronů, který je kondenzorem fokusován na sledovaný vzorek. Po průchodu svazku elektronů přes vzorek jejich cesta pokračuje přes objektiv a aperturní clonu; nakonec svazek prochází přes projektiv, který výsledný obraz zvětší a fokusuje elektrony na fluorescenční stínítko či na CCD kameru. Červené šipky znázorňují zvětšený obraz (spodní šipka) a původní obraz (horní šipka). Převzato z práce Kozarové, 2013.

4. Materiál a metody

A) Rostlinný materiál

Měření probíhalo na ječmeni (*Hordeum vulgare* L. cv. Akcent) pěstovaném v režimu 16/8 hodin den/noc při bílém světle o intenzitě $110 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Postupně bylo pěstováno pět variant rostlin (každá cca 7 dní), každá na jiné pěstební teplotě (25, 30, 35, 38 a 40 °C). V noci byly všechny vzorky vystaveny teplotě 20 °C. Z technických důvodů bylo nutno semena zasadit do hlíny a zalévat obyčejnou vodou. U vyšších teplot (38 °C a 40 °C) bylo nutné semena nejprve namořit; stejně tak byla vydesinfikována i pěstební fytokomora, hlína a voda. Při těchto dvou teplotách bylo nutno semena nejdříve nechat naklíčit při běžné teplotě (cca 3 dny) a až poté teplotu zvýšit – při nedodržení tohoto postupu byly rostliny zadušeny plísněmi už v zárodku.

B) Izolace thylakoidních membrán

Ustřížené listy byly homogenizovány v homogenizačním pufru (sacharóza, HEPES, NaCl, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; těsně před použitím bylo v roztoku rozpuštěno Na-Asc a BSA; úprava na pH 7,2), přefiltrovány a zcentrifugovány (6 min, 5000g, 4 °C). Poté byla odstraněna tekutá část a supernatant rozmíchán v izolačním pufru (HEPES, NaCl, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, EDTA-Na; úprava na pH 7,5); výsledný roztok byl opět zcentrifugován (10 min, 5000g, 4 °C). Opět byla odstraněna tekutá část, supernatant byl rozpuštěn v stabilizačním pufru (sacharóza, HEPES, NaCl, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; úprava na pH 7,2) a centrifugován (5 min, 5000g, 4 °C). Znovu byla odstraněna kapalina a supernatant byl rozpuštěn v malém množství stabilizačního pufru.

Koncentrace chlorofylů v takto získaném zásobním roztoku thylakoidních membrán byla stanovena spektrofotometrickou metodou. Ze zásobního roztoku bylo odebráno 10 μl a smícháno s 2 ml 80% acetonu. Roztok byl centrifugován (5 min, 30 000g, 4 °C). Spektrofotometrickou metodou byly proměřeny absorbance při vlnových délkách 470, 647, 663 a 750 nm, z kterých byl stanoven obsah chlorofylů (výpočetní vztah neuveden). Dle zjištěných koncentrací (viz tabulka č.1) byly rozděleny izolované proteiny do ependorfev v množství odpovídajícímu 110 μg . Vzorky byly uloženy do hluboko chladícího boxu (-80 °C) před dalším použitím. Po celou dobu izolace musel být rostlinný materiál důkladně chlazen v ledové lázni!

C) Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii a obrazová analýza

Nejprve bylo nutno připravit separační CN-PAGE gel, který byl získán z 4% gelového pufru (2,5 ml), 8% gelového pufru (2,5 ml), TEMEDu (3 μl) a těsně před nalitím gelu pomocí gradientové komory bylo rychle přidáno 10% APS (13 μl). Následně byl gel převrstven deionizovanou vodou a

ponechán 30 minut v klidu, aby zpolymerizoval. Poté byla deionizovaná voda odsáta a byl nalit zaostřovací gel, který se skládal z 4% gelového pufru (2,5 ml), TEMEDu (3 μ l) a 10% APS (13 μ l), který byl přidán těsně před nalitím. Do gelu byl opatrně vložen hřebínek s deseti jamkami, aby byly eliminovány vzduchové bubliny. Nakonec byl gel ponechán 45 minut v klidu, aby zpolymerizoval.

Dále byl připraven jeden litr dolního pufru (10,45 g Bis-Tris) a 150 ml horního pufru (43 mg dodecyl- β -D-maltosidu, 86 mg deoxycholátu sodného a 48 μ l HCl). Elektroforetická vanička byla umístěna do ledu a poté byly nality oba výše zmíněné pufrы. Dle koncentrace izolovaných proteinů daných teplotních variant bylo pro každou teplotní variantu určeno vhodné objemové zastoupení pufru C (viz výše), 5% detergentu dodecyl- β -D-maltosidu a izolovaných proteinů tak, aby byla získána koncentrační řada po deseti. Jednotlivé roztoky s izolovanými proteiny byly naloženy do příslušných jamek; před loadováním byly roztoky zcentrifugovány (10 min, 20 000 g, 4 °C). Krajní jamky (první a poslední) byly kvůli možným defektivitě napuštěny stejnou směsí proteinů, jako vedlejší jamka – tyto krajní jamky ve výsledném gelu nemají žádnou výpovědní hodnotu.

Po cca 2 hodinách byla elektroforéza ukončena a CN-PAGE gel byl analyzován na gel skeneru Amersham Imager (GE HealthCare Life Sciences, Japan). Gel byl skenován v transmisním kolorimetrickém módu (barevné snímky) a fluorimetrickém módu (černobílé snímky), aby bylo možné odlišit pásy příslušející PSII a PSI. Fluorescenční snímky byly získány při excitační vlnové délce 460 nm, přičemž fluorescenční signál byl detekován v rozmezí 690 až 720 nm.

Tento postup byl zopakován pro všechny teplotní varianty a na základě porovnání jednotlivých gelů byl vytvořen finální gel. Ten obsahoval všechny teplotní varianty při takové koncentraci detergentu, kdy byly pásy odpovídající PSI-NDH superkomplexu nejvýraznější (tedy 15 μ g/ml u teplot 25, 30 a 35 °C a 35 μ g/ml u teplot 38 a 40 °C). Tato finální separace byla provedena čtyřikrát. Pásy se superkomplexy byly vyříznuty, nasekány na menší kousky a umístěny do elučního pufru. Eluce proteinů z gelu probíhala samovolnou difuzí po dobu přibližně dvou hodin při teplotě 4 °C. Takto získaný roztok proteinů byl použit pro přípravu vzorku pro elektronovou mikroskopii.

Vzorky pro elektronovou mikroskopii byly připraveny na měděné síťce pokryté tenkým uhlíkovým filmem. Aby byl uhlíkový film více hydrofilní a lépe vázal izolované membránové proteiny, byl před samotnou přípravou vzorku upraven pomocí doutnavého výboje (PELCO easiGlow Discharge System, Ted Pella, Redding, Californie, USA).

Vzorek o objemu 5 μ l byl nanesen na měděnou síťku a po jedné minutě odsát a nahrazen uranyl acetátem (pro zvýšení kontrastu). Po další minutě byl uranyl acetát odsát a vzorek byl připraven pro pozorování elektronovým mikroskopem JEOL F-2010 (Jeol, Japan) se zvětšením 40 000krát. Snímky byly získány pomocí CCD kamery G2-Keenview. U každého vybraného vzorku

bylo získáno a zpracováno okolo 400 snímků.

Obrazová analýza proteinových projekcí byla provedena na PC pomocí následujících programů: EMAN (Ludtke *et al.*, 1999) byl využit na poloautomatický výběr projekcí proteinů z mikroskopických snímků, Grip a Relion (Scheres, 2012), který byl použit pro obrazovou analýzu a výpočet výsledných projekcí.

D) Stanovení množství PSI-NDH superkomplexu

V první fázi byl připraven separační SDS-PAGE gel, který se skládal z SDS gelového pufru (10 ml), akrylamidu AB-3 (6 ml), glycerolu (3 g) a vody (30 ml) (Schägger, 2006). Těsně před nalitím gelů byl přidán TEMED (15 μ l) a 10% APS (150 μ l). Následně byl gel převrstven deionizovanou vodou a ponechán v klidu, dokud nezpolymerizoval. Poté byla deionizovaná voda odsáta a byl nalit zaostřovací gel, který se skládal z SDS gelového pufru (3 ml), akrylamidu AB-3 (1 ml) a vody (12 ml). Těsně před nalitím gelů byl přidán TEMED (9 μ l) a 10% APS (90 μ l). Poté byl opatrně vložen hřebínek a gel byl ponechán v klidu, dokud nezpolymerizoval.

V dalším postupu byly smíchány 800 μ l extrakčního pufru a 100 μ l alikvótu dané teplotní varianty, které byly 10 minut vortexovány. Následně byly ponechány po 30 minut v termobloku při 70 °C a poté centrifugovány (10 minut, 20 000 g, 4 °C). Supernatant byl přepipetován do nové ependorfky, pelet vyhozen. Z vzniklého extraktu bylo smícháno 25 μ l s 500 μ l 10% TCA; tato směs byla opět centrifugována (10 minut, 20 000 g, 4 °C). Následně byl precizně odstraněn supernatant a pelet byl v otevřené ependorfce ponechán v termobloku o teplotě 40 °C po 30 minut, aby došlo k jeho vysušení. Po vysušení peletu bylo přidáno 50 μ l 0,1M NaOH a roztok byl po 30 minut vortexován. Pomocí bicinchoninové metody byla stanovena kalibrační křivka a z ní byla stanovena koncentrace našeho vzorku. Ze zjištěné koncentrace byl vypočítán objem vzorku, který byl napipetován do ependorfeček pro pozdější loading do jamek v gelu. Do každé z ependorfeček byly přidány 2 μ l bromfenylové modři. Obsah ependorfeček byl krátce zvortexován, umístěn na 20 minut do termobloku (70 °C) a velmi krátce centrifugován na stolní centrifuze.

Dále byla sestavena aparatura pro elektroforézu, kde byl na příslušná místa nalit jeden litr dolního pufru a 150 ml horního pufru. Do první a poslední jamky v gelu bylo naloženo 2,5 μ l markeru; do zbývajících jamek byla vhodně naložena směs proteinů s bromfenylovou modří (viz výše) dle vypočteného množství tak, abychom získali koncentrační řadu po pěti.

Po ukončení elektroforézy (cca 2 hodiny) byla nachystána blotovací aparatura. Používané papíry i nitrocelulózy byly namočené do transferového pufru; na membrány bylo nevhodno sahati rukou, k manipulaci byla používána pinzeta. Poté byl jeden z blotovacích papírů umístěn do blotovací aparatury a na něj byla umístěna blotovací membrána. Gely byly odděleny od

skel, současně byl odstraněn i zaostřovací gel; poté byl gel umístěn na blotovací membránu. Následně byl překryt druhým blotovacím papírem. Z výsledného „sendviče“ byly válečkem vyválcovány přebytečné vzduchové bubliny a znovu navlhčen transferovým puffem. Nakonec byla blotovací aparatura spuštěna (nastaveno 50 mA za každý gel) a zůstala v provozu cca hodinu.

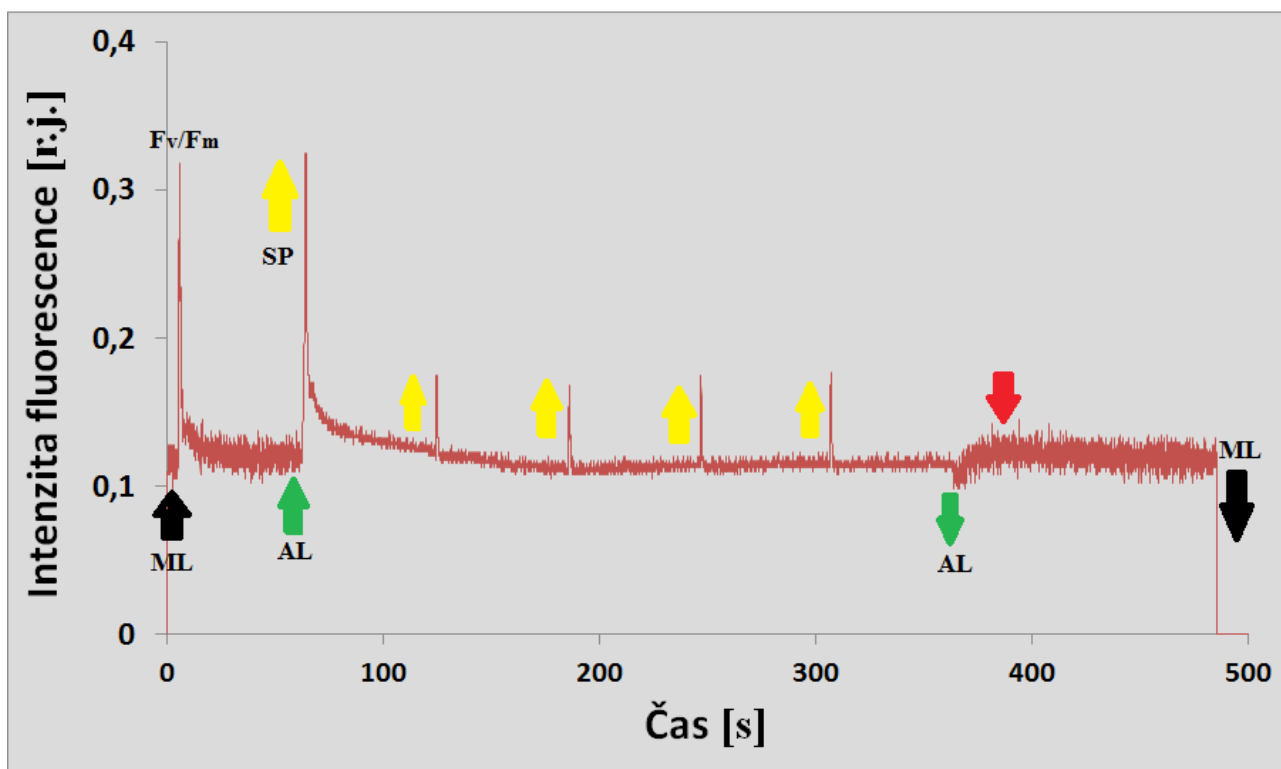
Po ukončení blottingu byla blotovací membrána na 5 minut umístěna na třepačku do speciálního roztoku potravinářského barviva kvůli kontrolní vizualizaci pásů (není nutné provádět). Poté byl roztok potravinářského barviva odstraněn a místo něj přidáno TBS-T; takto byla membrána na třepačce ponechána po 5 až 10 minut. Následně bylo TBS-T nahrazeno blokovacím roztokem (5 g sušeného mléka + 100 ml TBS-T) a ponecháno přes noc na třepačce.

Následující ráno byl blokovací roztok nahrazen protilátkou citlivou na H podjednotku NDH komplexu (NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, chloroplasic, Agrisera Antibodies, Vännas, Sweden) a ponechán hodinu na třepačce. Po uplynutí této doby byla protilátka navrácena zpět do mrazáku, kde byla původně přechovávána. K membráně bylo poté přidáno TBS-T a po deseti minutách vylito a nahrazeno novým; to bylo opakováno pětkrát. Poté bylo přidáno TBS, které bylo po uplynutí dalších deseti minut taktéž odstraněno. K membráně na třepačce pak přidám 5 μ l nespecifické protilátky v roztoku 2,5 g BSA a 50 ml TBS; tento roztok zde byl ponechán hodinu a poté byl odstraněn. Opětovně bylo k membráně na třepačku přidáno pětkrát po deseti minutách TBS-T a poté jednou na deset minut TBS. Po ukončení tohoto postupu byly pořízeny snímky z gel skeneru (viz výše v části o CN-PAGE) v chemiluminiscenčním módu k zobrazení hledaného PSI-NDH superkomplexu. Tato procedura byla použita u teplotních vzorků 25, 30, 35 a 38 °C.

Ve druhé fázi bylo rozhodnuto použít nepřímou metodu založenou na fluorescenční analýze nárůstu minimální fluorescence (Shikanai *et al.*, 1998). K danému měření bylo využito zařízení PAM-2000 (Heinz Waltz GmbH, Effeltrich, Germany). Na listy ječmene u jednotlivých teplotních variant bylo nejprve aplikováno měřicí světlo (ML) a byl automaticky určen maximální kvantový výtěžek fotochemie. Po uplynutí jedné minuty bylo zapnuto bílé aktinické světlo (AL) o intenzitě 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a současně byl aplikován saturační puls (SP), který se opakoval pětkrát po jedné minutě. Po uplynutí dalších pěti minut bylo AL i SP ukončeno a list byl následující dvě minuty vystaven pouze ML. Pro doplnění představy o průběhu měření viz obrázek č.7. U každé teplotní varianty byly před samotným měřením listy (adaptované na tmu) v teplotní lázni vystaveny 5 minut teplotám 25, 30, 35, 38, 40 a 44 °C a poté byl ponechán dalších 5 minut na vzduchu, aby se usušil. Každá teplotní varianta byla pro každou z těchto teplot měřena třikrát. Z důvodů výskytu plísní a nedostatku času byly bohužel proměřeny pouze teplotní varianty 25 a 30 °C.

Tabulka č.1: Koncentrace izolovaných proteinů a objem, ve kterém byly uskladněny do ependorfek

Teplotní varianta [°C]	Koncentrace chlorofylu [$\mu\text{g/ml}$]	Rozděleno na objemy... [μl]
25	2000	55
30	2000	55
35	3200	35
38	800	140
40	520	212



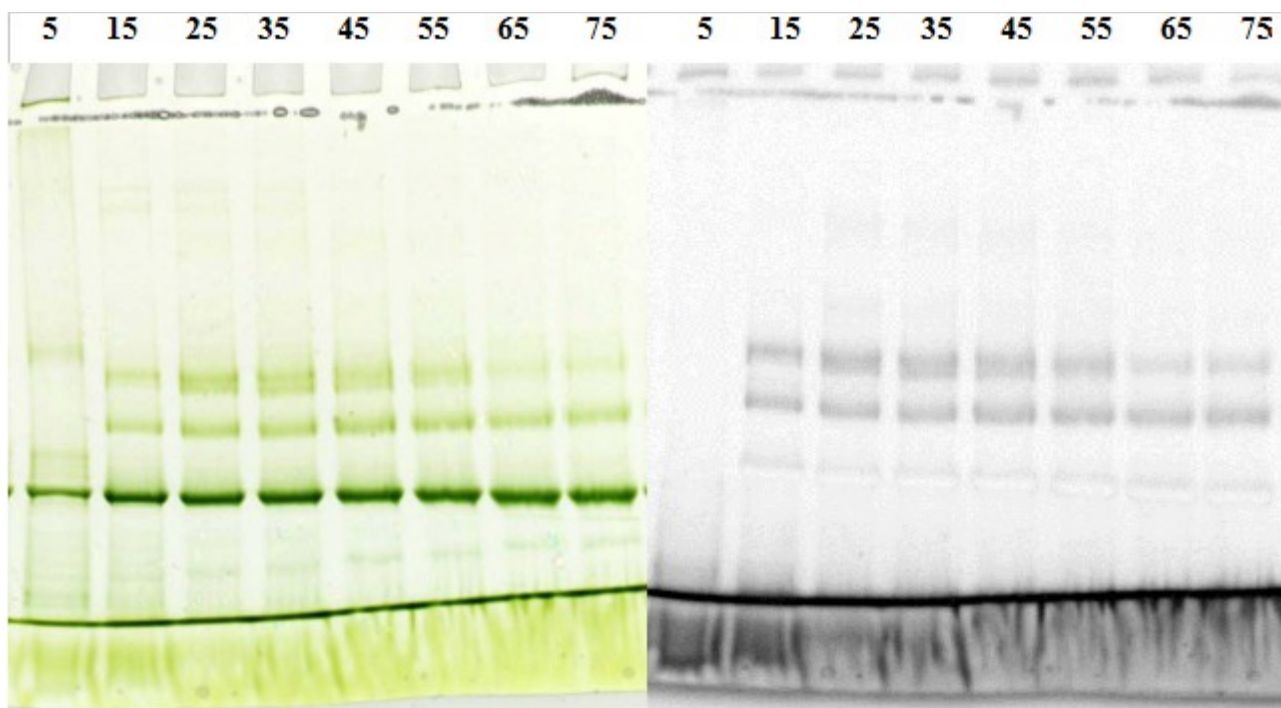
Obrázek č.7: Ukázkové měření fluorescenční analýzou nárůstu minimální fluorescence dle Shikanai et al., 1998. Po zahájení měření bylo zapnuto měřící světlo (ML; černé šipky) a automaticky bylo proměřeno F_v/F_m . Po uplynutí jedné minuty bylo zapnuto aktinické světlo (AL; zelené šipky) po dobu pěti minut; během této doby byly vždy po jedné minutě aplikovány saturační pulsy (SP; žluté šipky). Po vypnutí AL lze po počátečním poklesu signálu pozorovat nárůst minimální fluorescence, který by měl odrážet míru aktivity CET skrze PSI-NDH superkomplex.

5. Výsledky měření

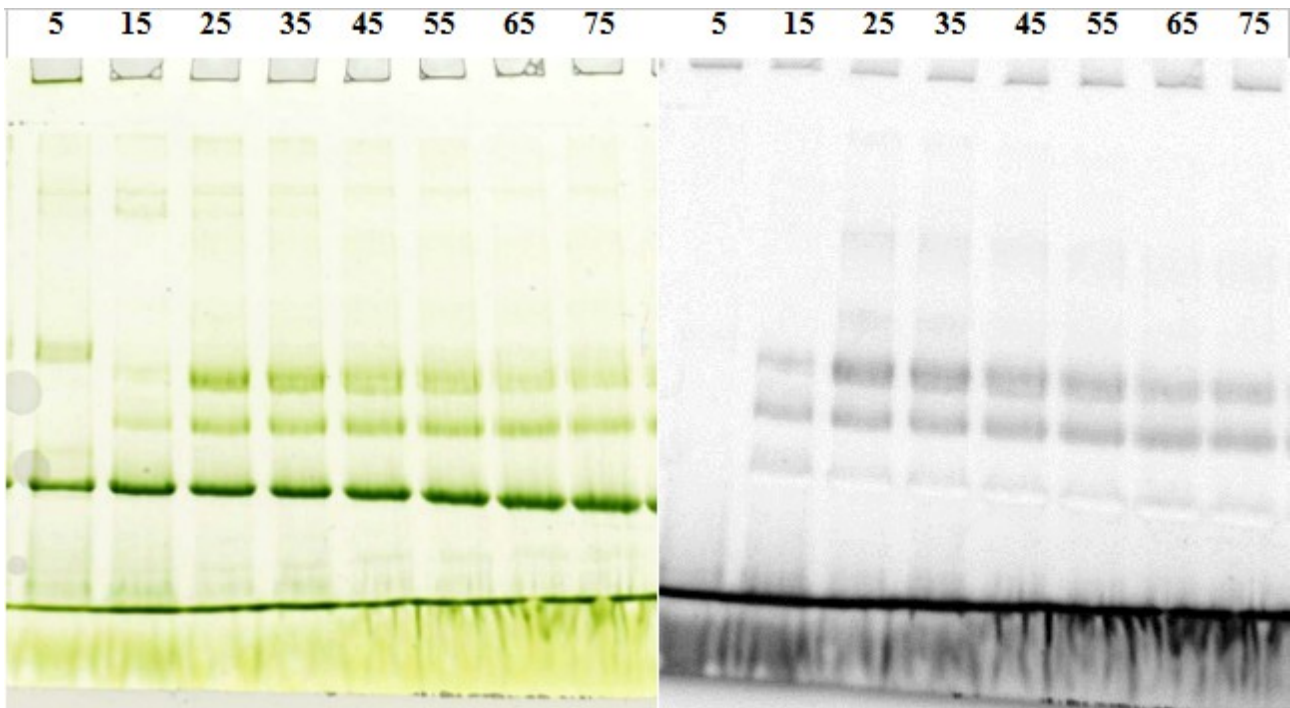
Cílem této práce bylo stanovit změny ve struktuře a množství PSI-NDH superkomplexu v thylakoidních membránách u ječmene pěstovaného za různých teplot. Izolace PSI-NDH superkomplexu pomocí CN-PAGE byla optimalizována pro jednotlivé varianty rostlin. Strukturní analýza byla provedena pomocí elektronové mikroskopie a obrazové analýzy. Množství NDH komplexu v jednotlivých variantách rostlin bylo monitorováno pomocí imunoanalytické metody Western blot a pomocí fluorescenční analýzy.

5.1. Separace PSI-NDH superkomplexu

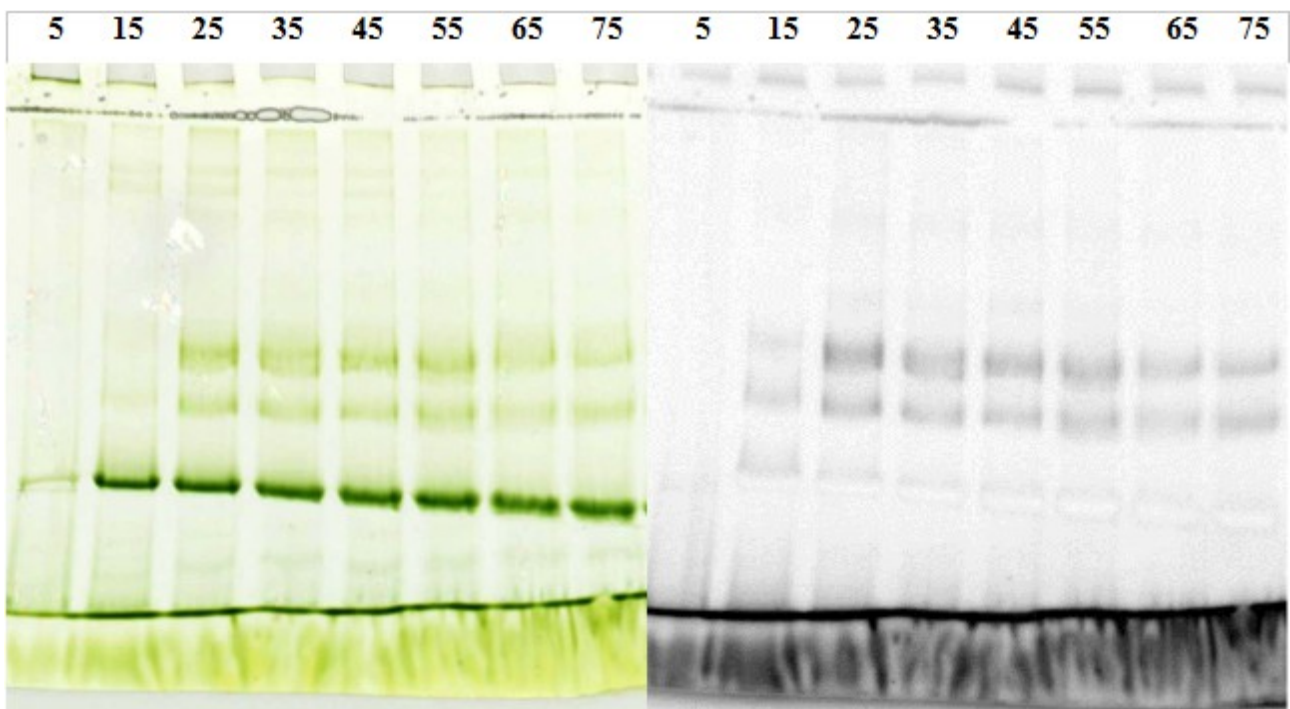
Provedením CN-PAGE a následným pořízením kolorimetrických a fluorescenčních snímků pro každou teplotní variantu (viz obrázek č.8, č.9, č.10, č.11 a č.12) jsme z koncentrační řady určili optimální koncentraci detergentu pro solubilizaci PSI-NDH superkomplexu. Pro teplotní vzorky z rostlin pěstovaných při 25, 30 a 35 °C jsme jako vhodnou koncentraci určili 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; pro teplotní vzorky pěstované při 38 a 40 °C jsme jako vhodnou koncentraci stanovili 35 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Provedli jsme při těchto optimálních koncentracích jednotlivých teplotních vzorků separaci pomocí CN-PAGE; výsledný gel se separovaným PSI-NDH superkomplexem je ukázán na obrázku č.13.



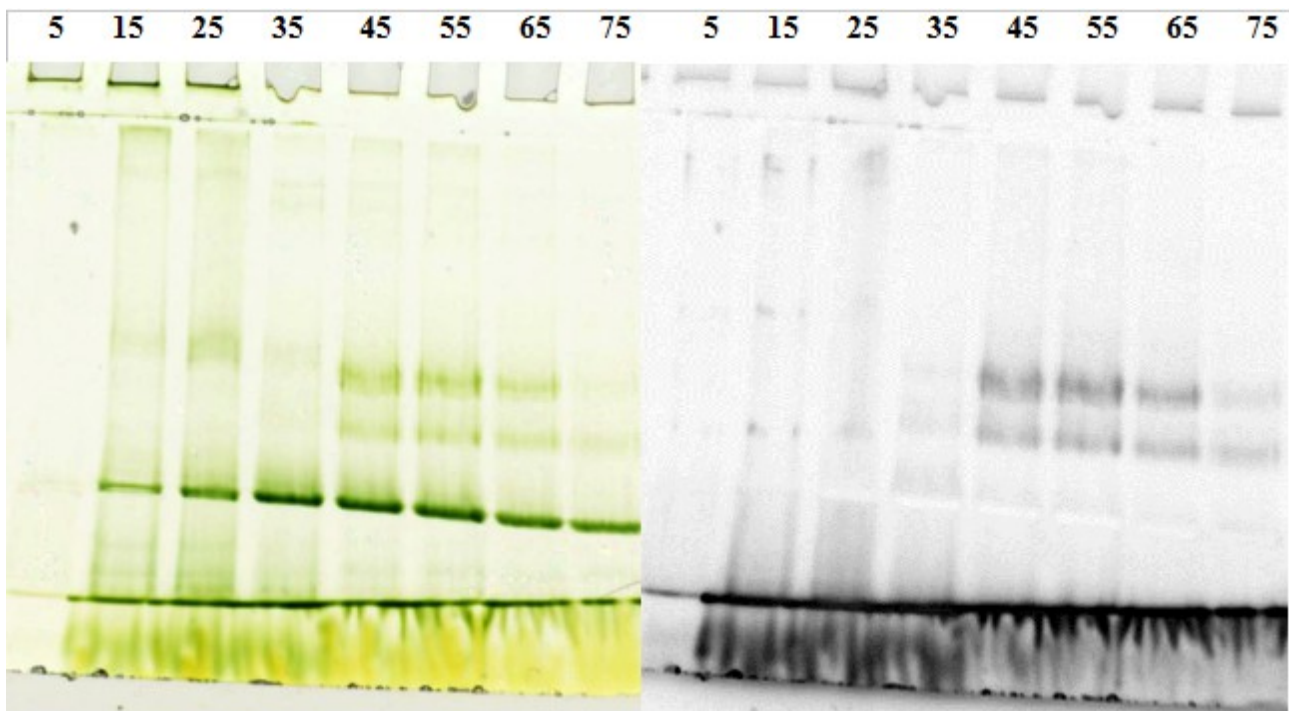
Obrázek č.8: CN-PAGE pro teplotní variantu 25 °C. Čísla nahoře označují zvyšující se koncentraci detergentu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) rostoucí v jamkách směrem doprava. Vlevo je kolorimetický svímek, kde můžeme v horní části vidět pásy odpovídající PSI-NDH superkomplexu. Vpravo je fluorescenční snímek, kde šedé části odpovídají fluorescenci PSII; vzájemné porovnání snímků nám umožňuje určit, které části odpovídají PSI.



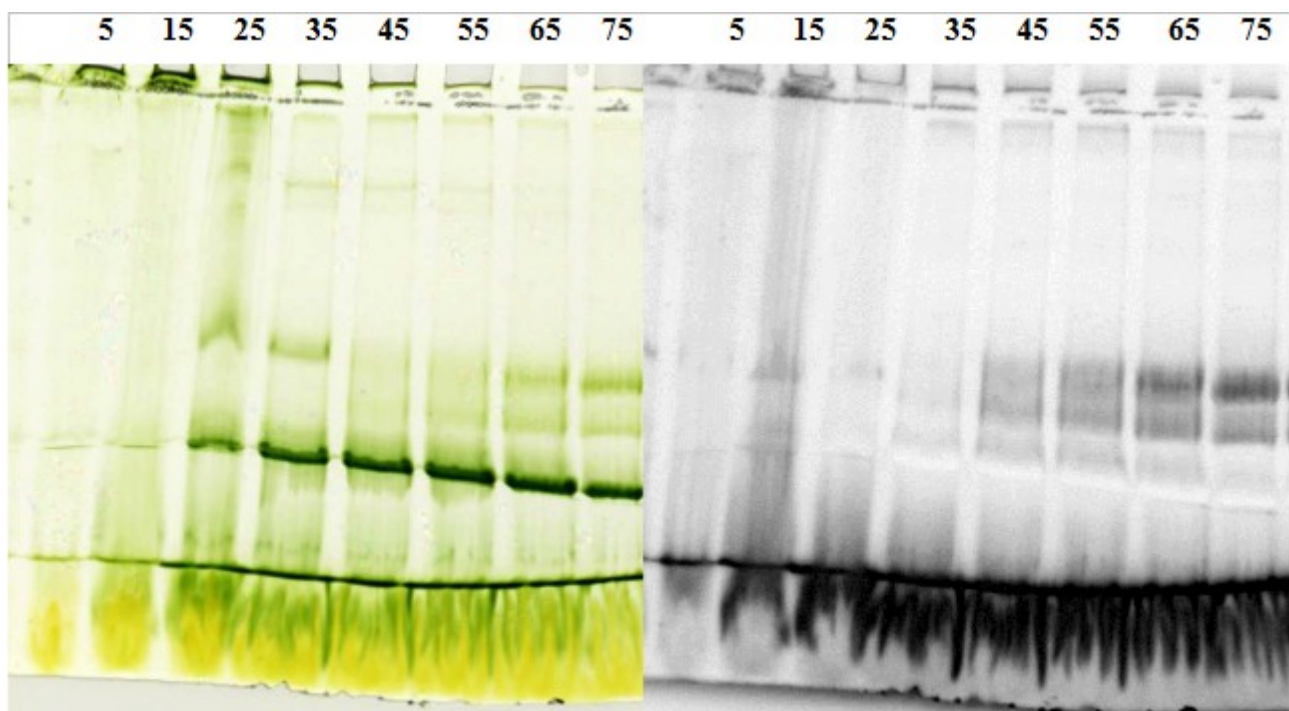
Obrázek č.9: CN-PAGE pro teplotní variantu 30 °C. Čísla nahoře označují zvyšující se koncentraci detergentu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) rostoucí v jamkách směrem doprava. Vlevo je kolorimetický svímek, kde můžeme v horní části vidět pásy odpovídající PSI-NDH superkomplexu. Vpravo je fluorescenční snímek, kde šedé části odpovídají fluorescenci PSII; vzájemné porovnání snímků nám umožňuje určit, které části odpovídají PSI.



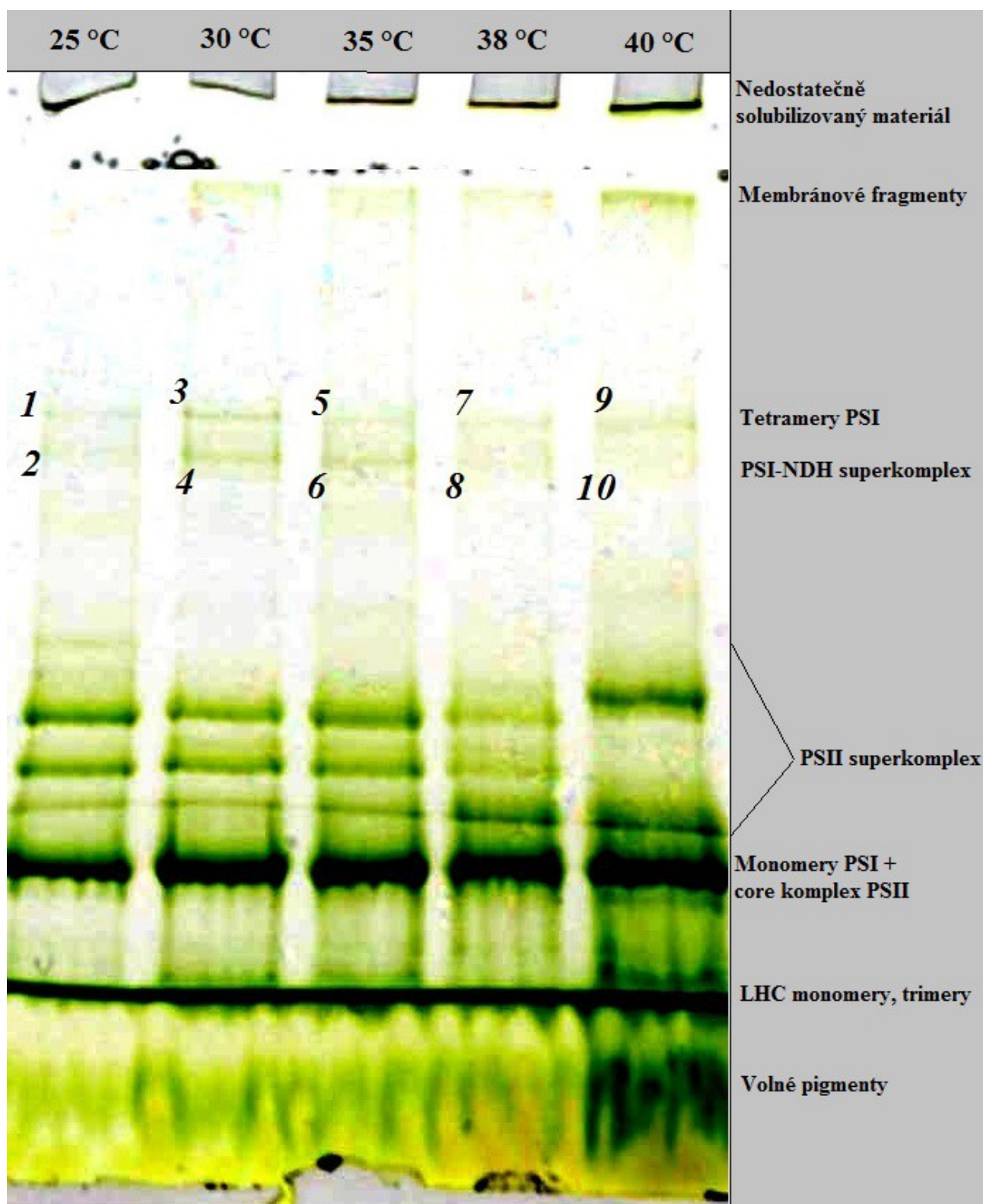
Obrázek č.10: CN-PAGE pro teplotní variantu 35 °C. Čísla nahoře označují zvyšující se koncentraci detergentu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) rostoucí v jamkách směrem doprava. Vlevo je kolorimetický svímek, kde můžeme v horní části vidět pásy odpovídající PSI-NDH superkomplexu. Vpravo je fluorescenční snímek, kde šedé části odpovídají fluorescenci PSII; vzájemné porovnání snímků nám umožňuje určit, které části odpovídají PSI.



Obrázek č.11: CN-PAGE pro teplotní variantu 38 °C. Čísla nahoře označují zvyšující se koncentraci detergentu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) rostoucí v jamkách směrem doprava. Vlevo je kolorimetický svímek, kde můžeme v horní části vidět pásy odpovídající PSI-NDH superkomplexu. Vpravo je fluorescenční snímek, kde šedé části odpovídají fluorescenci PSII; vzájemné porovnání snímků nám umožňuje určit, které části odpovídají PSI.



Obrázek č.12: CN-PAGE pro teplotní variatu 40 °C. Čísla nahoře označují zvyšující se koncentraci detergentu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) rostoucí v jamkách směrem doprava. Vlevo je kolorimetický svímek, kde můžeme v horní části vidět pásy odpovídající PSI-NDH superkomplexu. Vpravo je fluorescenční snímek, kde šedé části odpovídají fluorescenci PSII; vzájemné porovnání snímků nám umožňuje určit, které části odpovídají PSI.



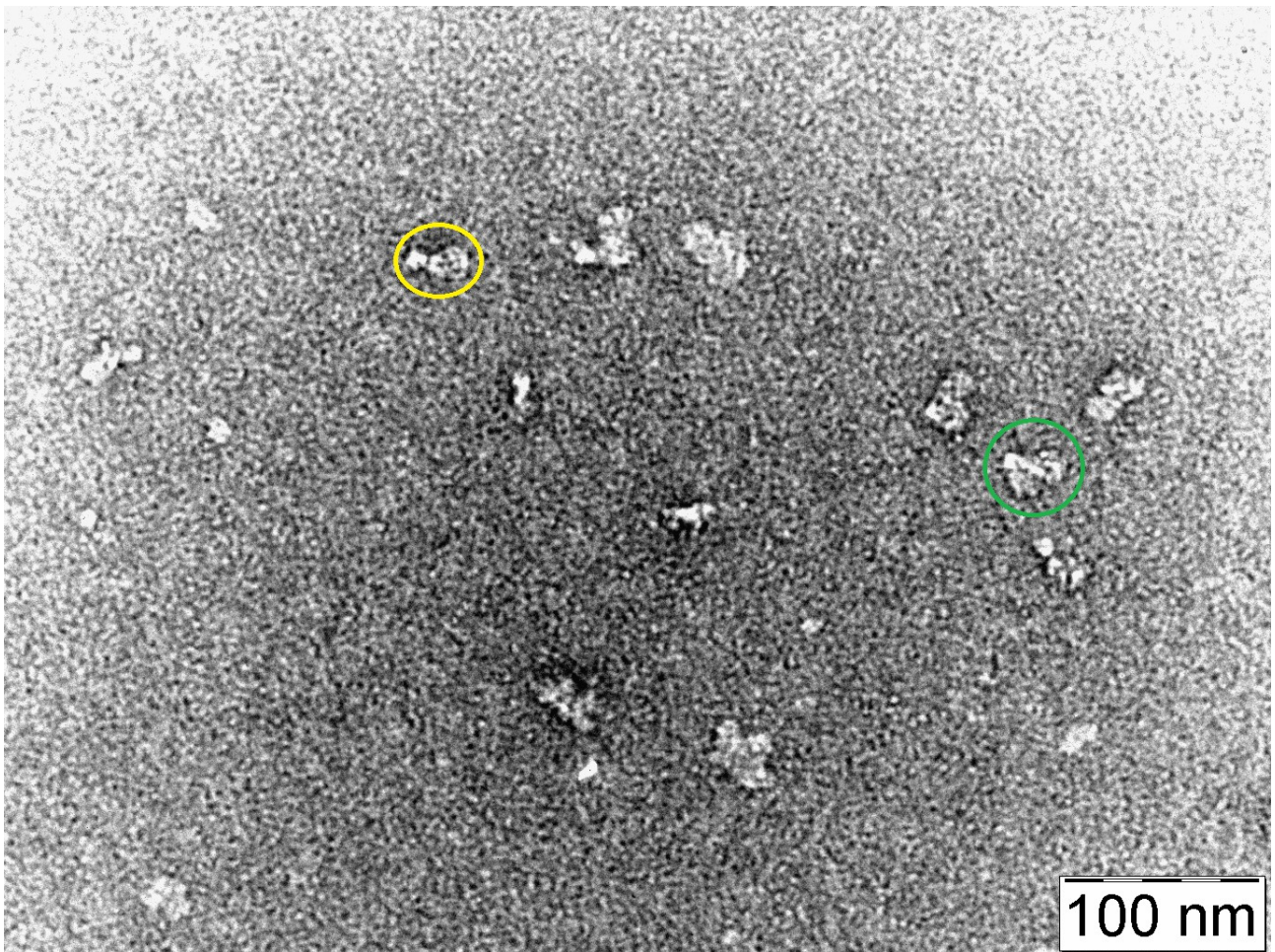
Obrázek č.13: *Finální CN-PAGE pro všechny teplotní varianty (viz horní část obrázku); u rostlin pěstovaných při teplotě 25, 30 a 35 °C byly použity koncentrace detergentu 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, u rostlin pěstovaných při teplotě 38 a 40 °C byla použita koncentrace 35 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V pravé části obrázku je orientační popis původu jednotlivých pásů. Pásky, které byly vyříznuty a snímkovány pod EM, jsou označeny čísly 1 až 10.*

5.2. Strukturní analýza

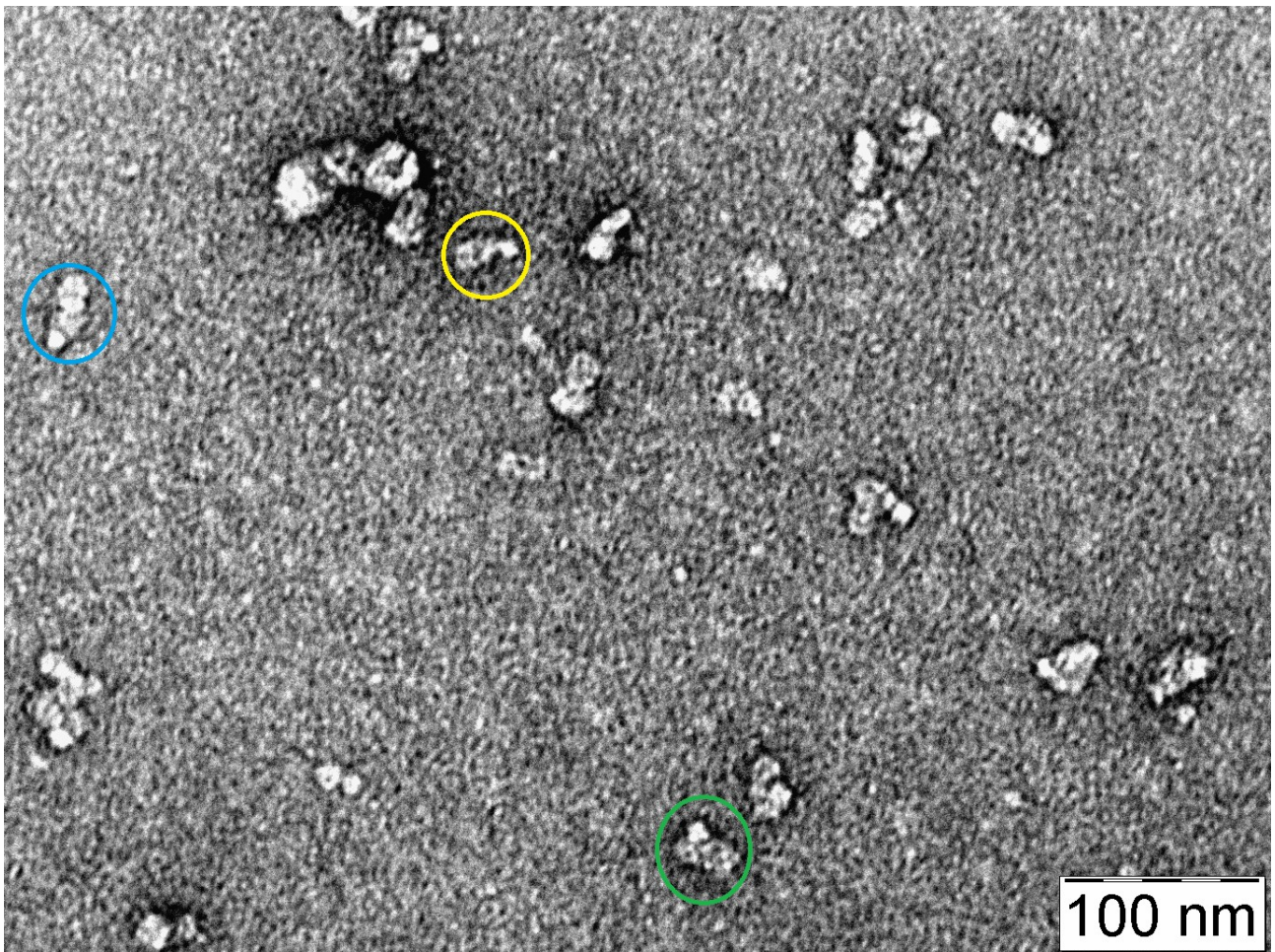
Očíslované pásy na obrázku č.13 jsme z gelu vyřízli a zpracovali pro EM; ukázkové snímky z jednotlivých pásů pozorovaných pod EM jsou prezentovány na obrázcích č.14 až č.23. Na obrázcích odpovídajících dolním pásům (č.15, č.17, č.19, č.21 a č.23) jsou pozorovatelné PSI-NDH superkomplexy s jedním či dvěma PSI; na obrázcích č.15 a č.19 se dá také identifikovat samostatný NDH komplex. Na obrázcích odpovídajících horním pásům (č.14, č.16, č.18, č.20 a č.22) se dají v případě snímků na obrázcích č.16, č.18, č.20 a č.22 identifikovat velké struktury, které pravděpodobně odpovídají oligomerům PSI. Větší neidentifikované struktury se objevily i na obrázku č.14, kde však můžeme nalézt i PSI-NDH superkomplexy s jedním či dvěma PSI.

Po získání dostatečného množství snímků (studovány byly pouze sudé pásy z obrázku č.13) a obrazové analýze jsme vybrali reprezentativní projekce nalezených proteinových komplexů, které jsou na obrázku č.24. Ukazuje se, že u teplotních vzorků 25 °C a 35 °C se nacházejí PSI-NDH superkomplexy s jedním či dvěma PSI a samostatný NDH komplex. U teplotního vzorku 30 °C byly nalezeny pouze superkomplexy s jedním či dvěma PSI, ovšem samostatný NDH komplex nikoliv. Ovšem u teplotního vzorku 38 °C byly identifikovány superkomplexy s jedním, dvěma a dokonce i třemi PSI. Teplotní vzorek 40 °C obsahoval PSI-NDH superkomplexy se dvěma nebo jedním PSI; také zde byly odhaleny tetramery PSI, jejichž výskyt jsme zaznamenali na obrázek č. 25.

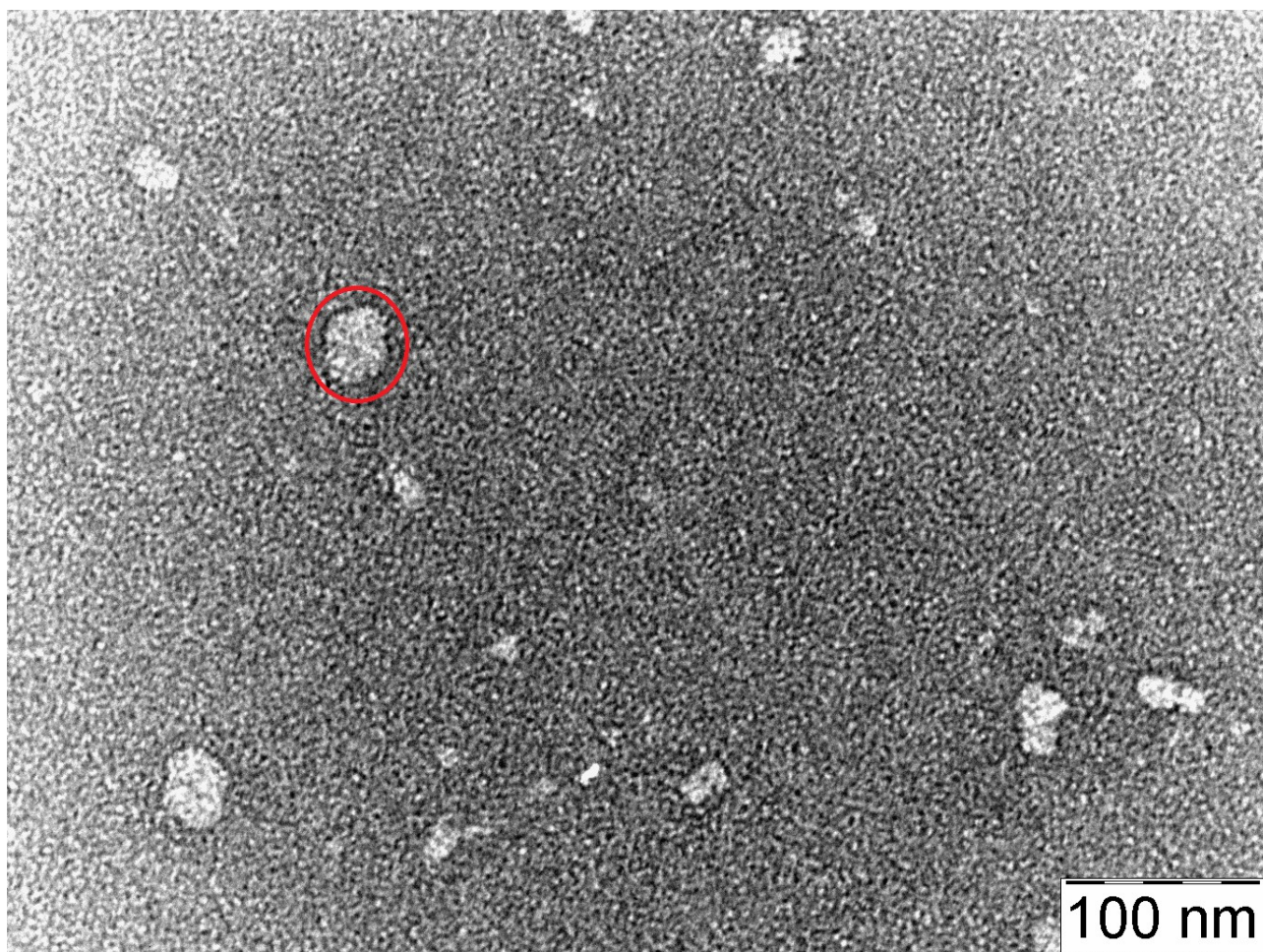
Statistické vyhodnocení výsledků obrazové analýzy (celkový počet projekcí, počet projekcí proteinových komplexů, jejich relativní zastoupení a množství kontaminace nespecifickými komplexy) jsme zaznamenali do tabulky č.2. Obecně se ukazuje, že s vyšší pěstební teplotou roste ve vzorku množství kontaminace a nespecifických komplexů. Ve vzorcích 25 °C a 30 °C bylo velké množství specifických proteinů a kontaminace zde byla (i podle obrázků č.14 až č.17) poměrně nízká. Mnohem hůř na tom jsou vzorky 35 °C a 38 °C, kde nespecifické proteiny a kontaminace tvoří až čtyři pětiny projekcí. Z hlediska čistoty vzorku však dopadl teplotní vzorek 40 °C, kde z celkového množství projekcí připadalo specifickým proteinovým komplexům a kontaminaci pouhých 11 %.



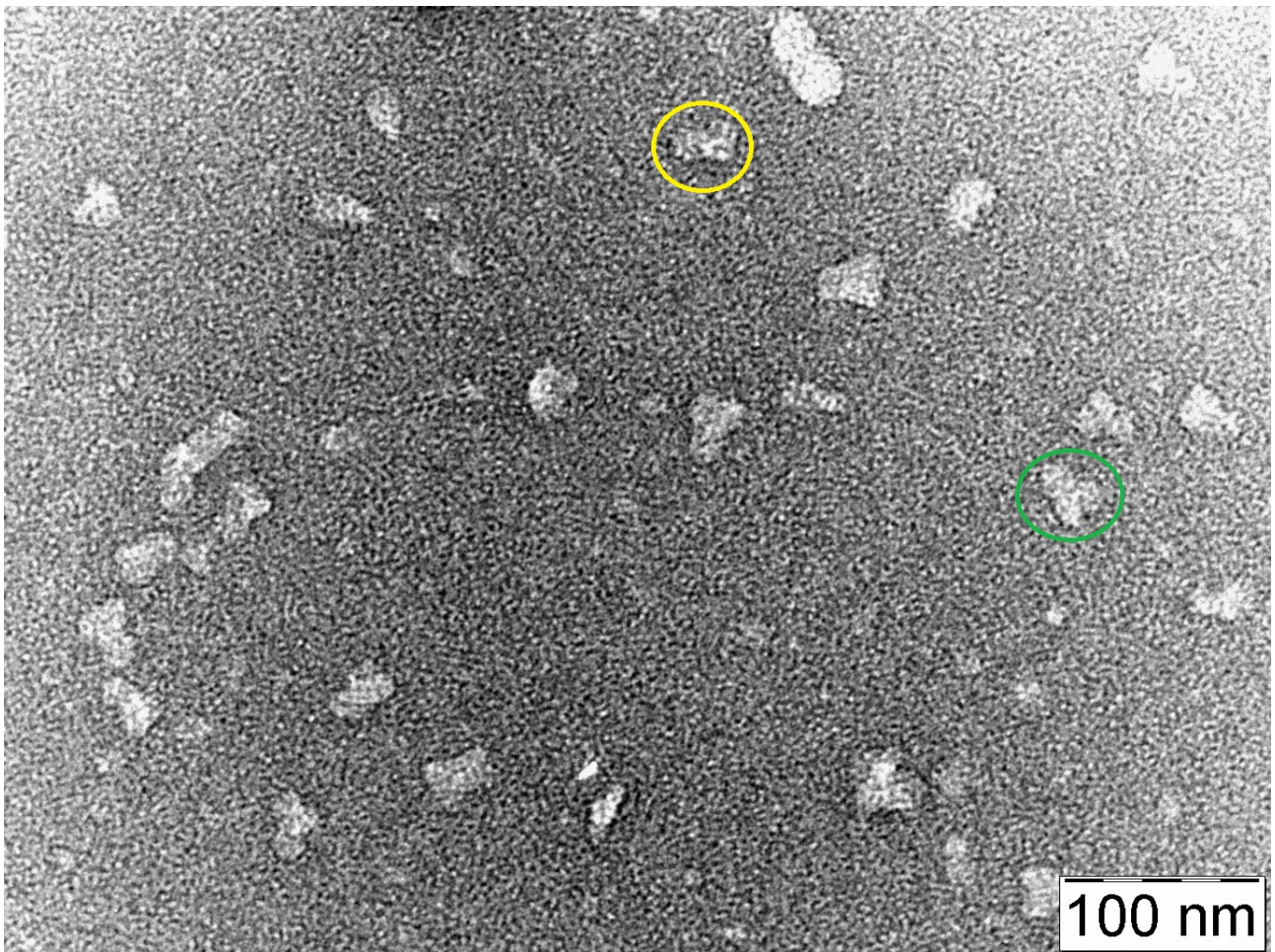
Obrázek č.14: Teplotní varianta 25 °C, snímek z pásu 1 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Přestože se nacházíme v horním pásu, kde jsou obvykle pozorovány oligomery PSI (na obrázku možná větší neidentifikované struktury), vyskytuje se zde PSI-NDH superkomplex s jedním (žlutě) i dvěma (zeleně) PSI.



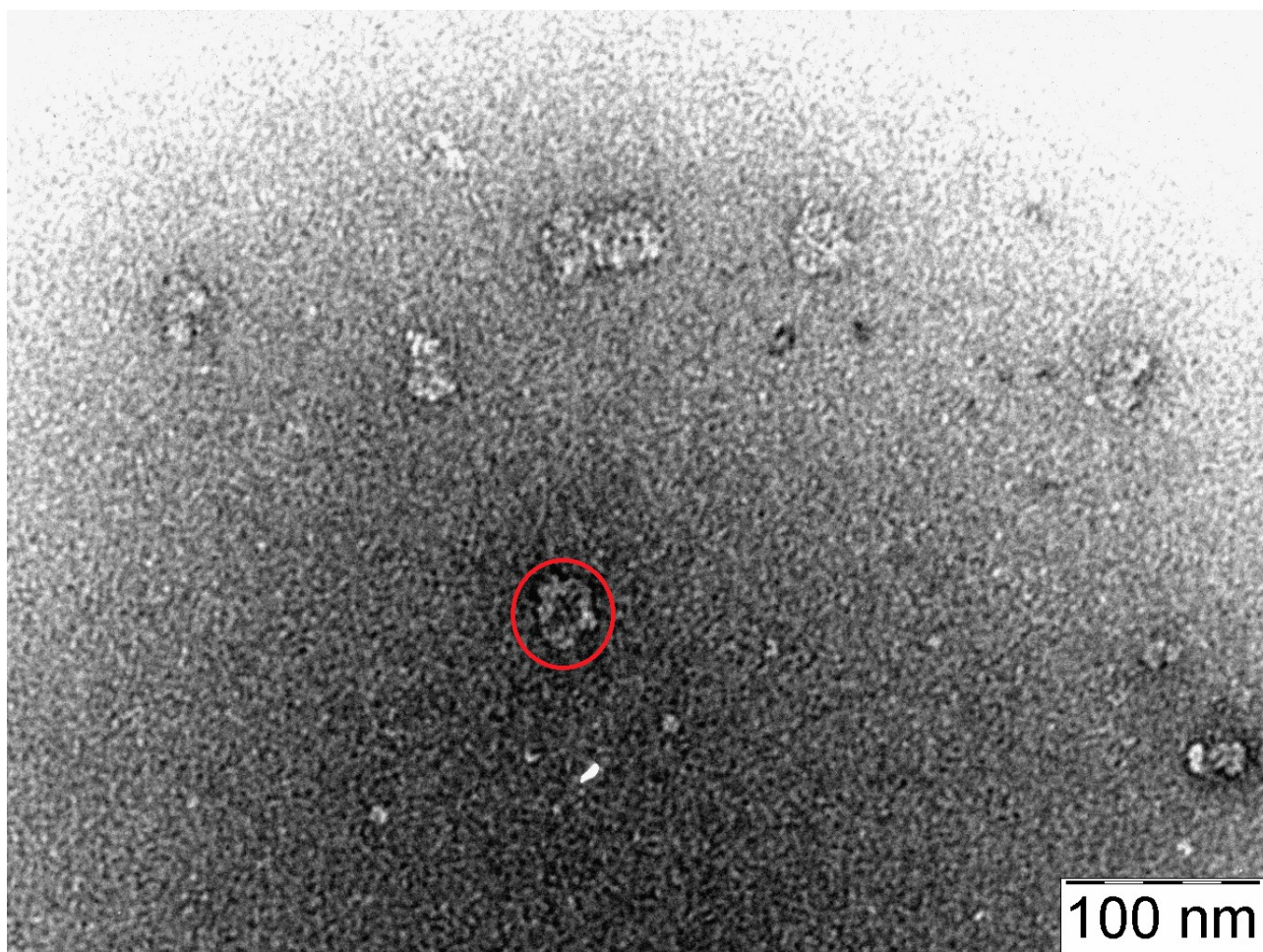
Obrázek č.15: Teplotní varianta 25 °C, snímek z pásu 2 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Pozorujeme zde samostatný NDH komplex (modře) a PSI-NDH superkomplex s jedním (žlutě) i dvěma (zeleně) PSI.



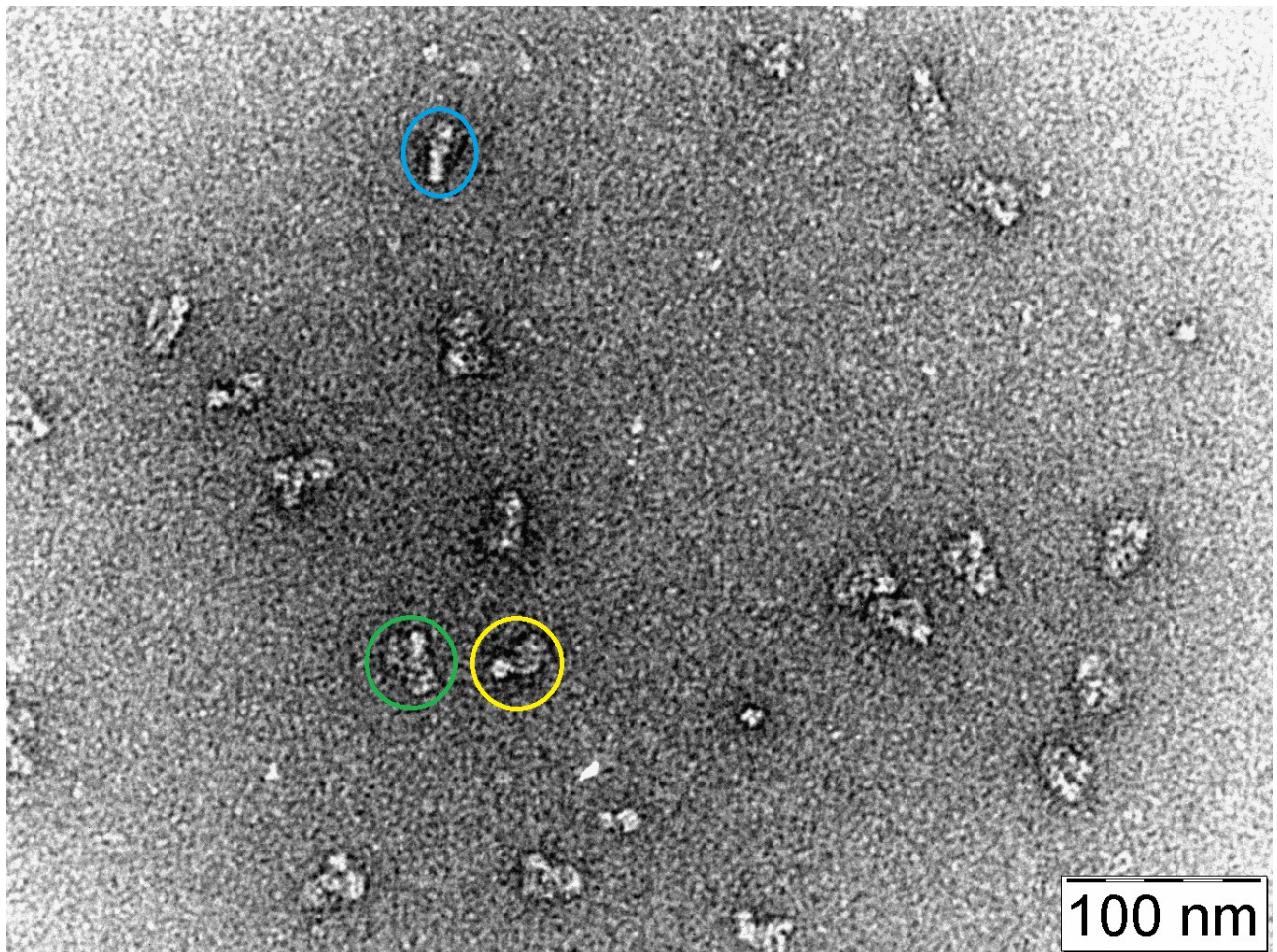
Obrázek č.16: Teplotní varianta 30 °C, snímek z pásu 3 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Vidíme zde oligomery PSI (červeně).



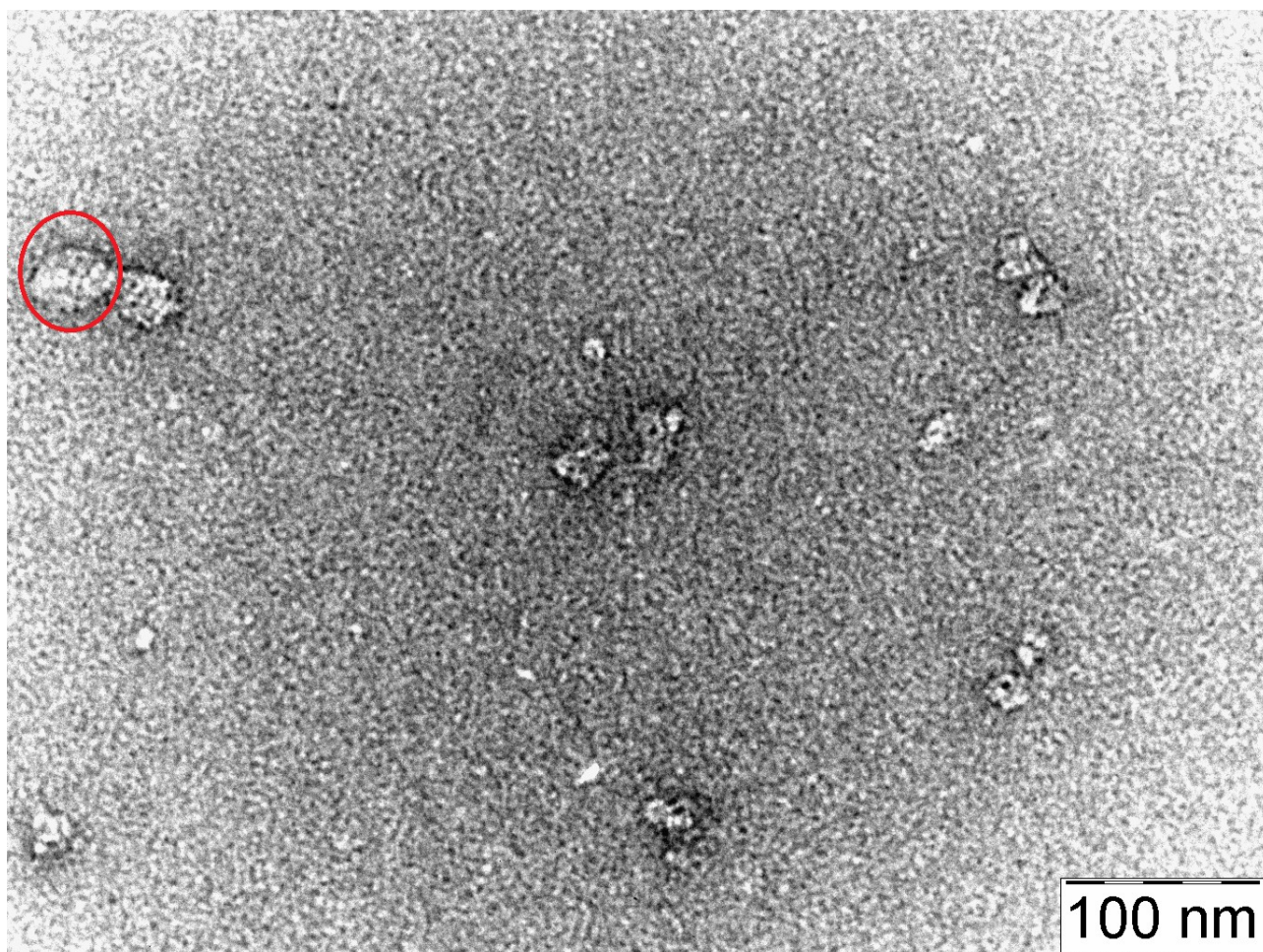
Obrázek č.17: Teplotní varianta 30 °C, snímek z pásu 4 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Pozorujeme zde PSI-NDH superkomplex s jedním (žlutě) i dvěma (zeleně) PSI.



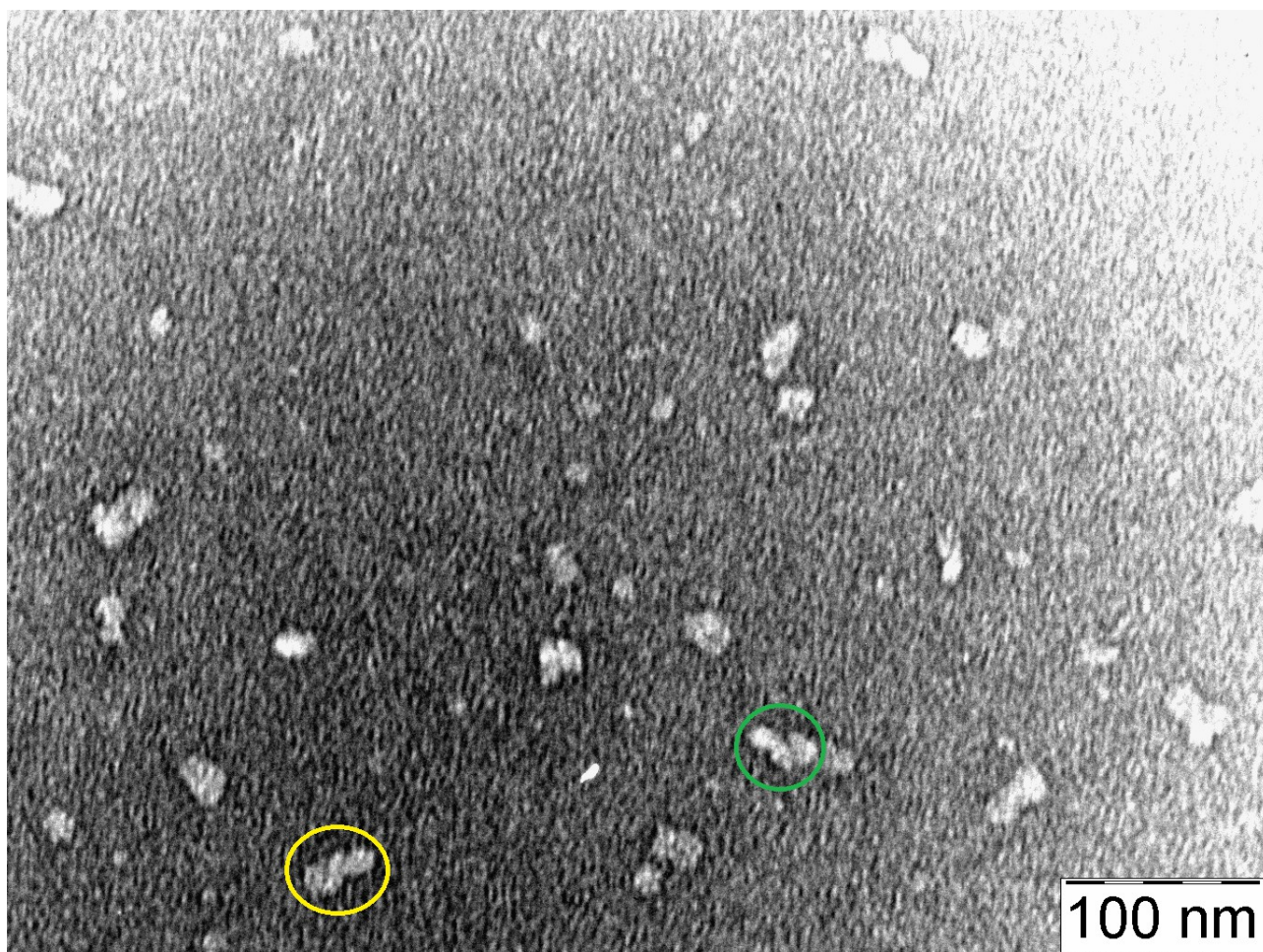
Obrázek č.18: Teplotní varianta 35 °C, snímek z pásu 5 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Vidíme zde oligomery PSI (červeně).



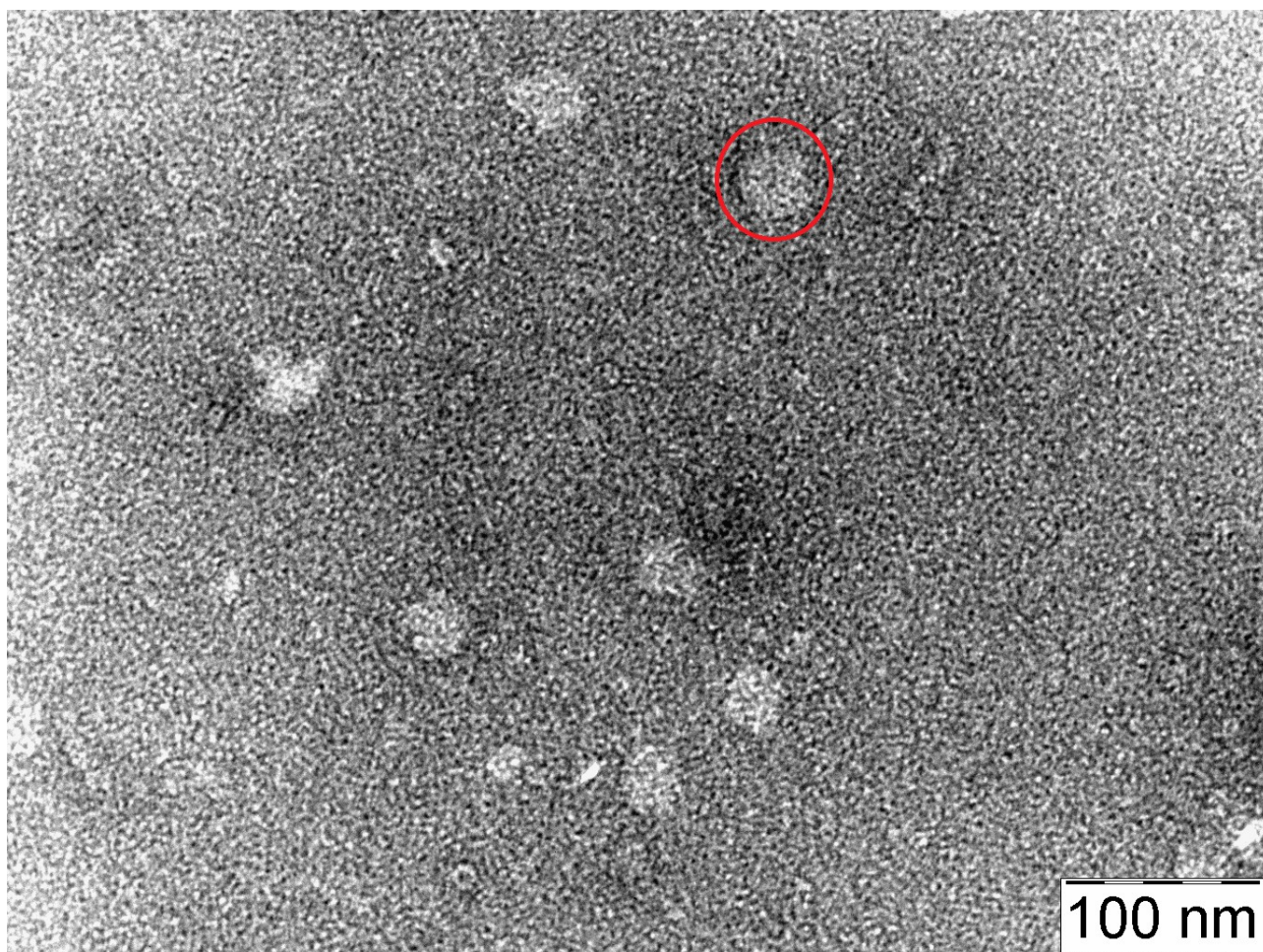
Obrázek č.19: Teplotní varianta 35 °C, snímek z pásu 6 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Pozorujeme zde samostatný NDH komplex (modře) a PSI-NDH superkomplex s jedním (žlutě) i dvěma (zeleně) PSI.



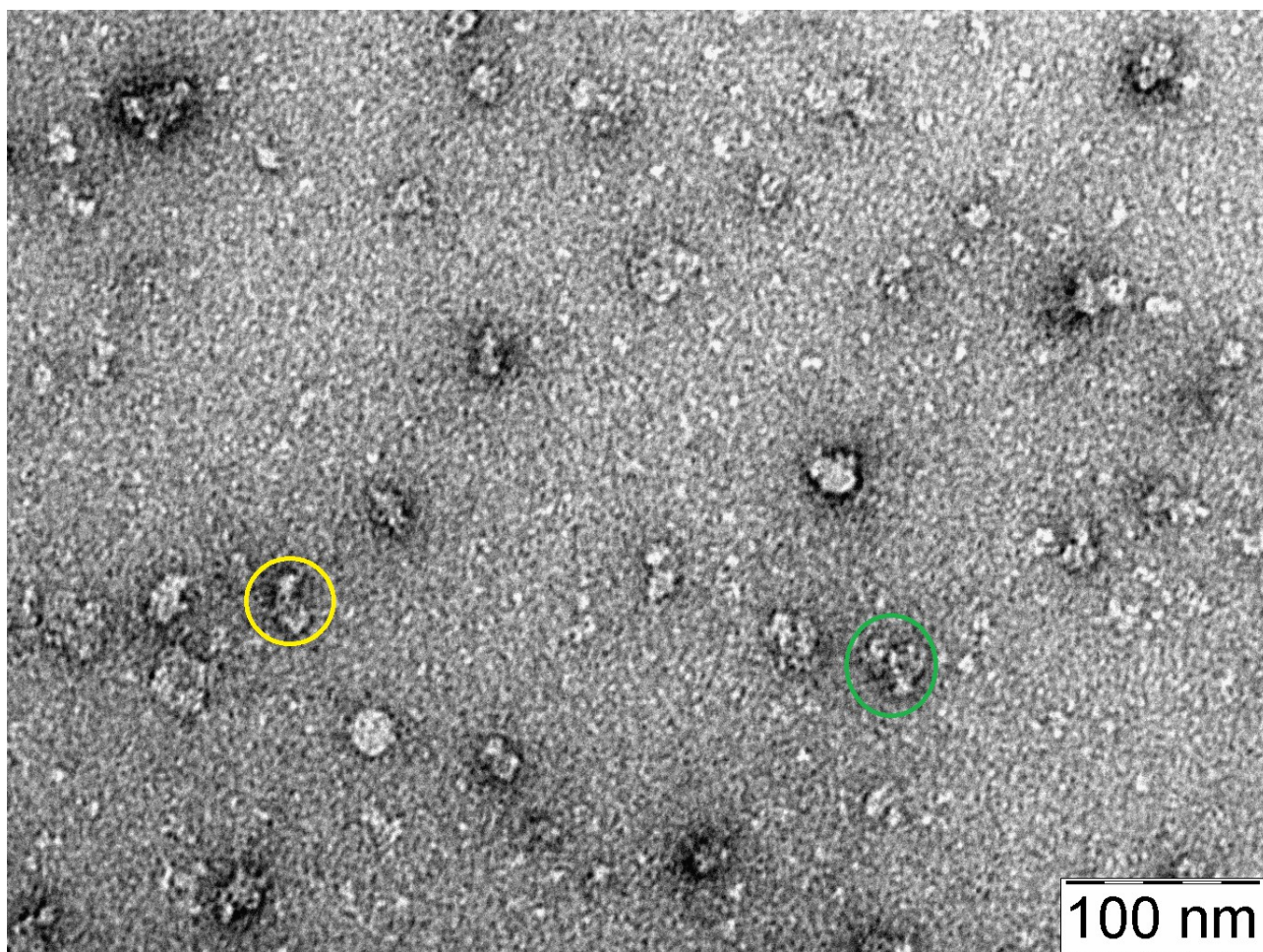
Obrázek č.20: Teplotní varianta 38 °C, snímek z pásu 7 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Vidíme zde oligomery PSI (červeně).



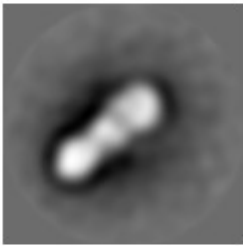
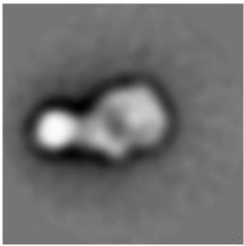
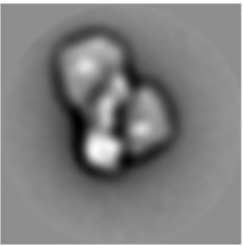
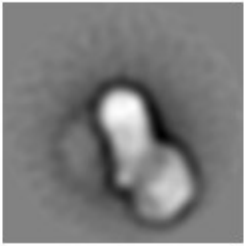
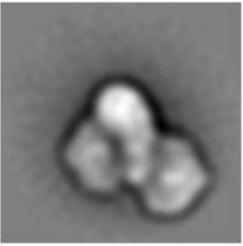

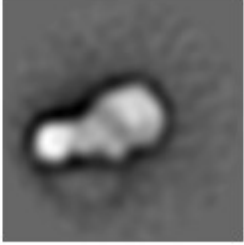
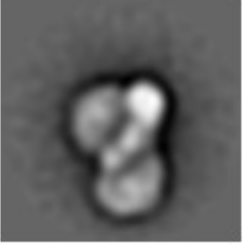
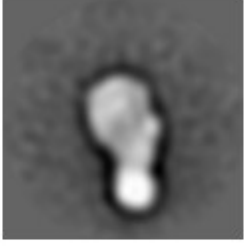
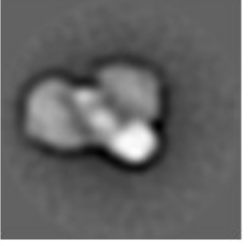
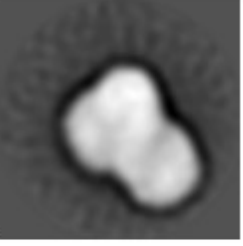
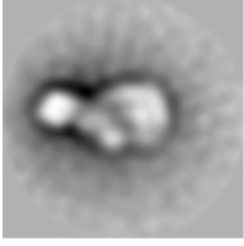
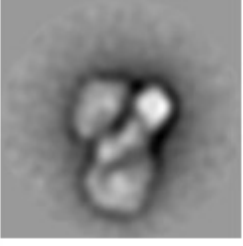
Obrázek č.21: Teplotní varianta 38 °C, snímek z pásu 8 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Pozorujeme zde PSI-NDH superkomplex s jedním (žlutě) i dvěma (zeleně) PSI.



Obrázek č.22: Teplotní varianta 40 °C, snímek z pásu 9 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Vidíme zde oligomery PSI (červeně).



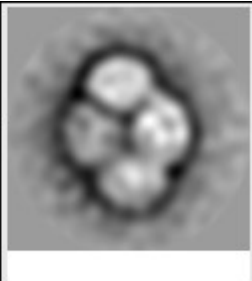
Obrázek č.23: Teplotní varianta 40 °C, snímek z pásu 10 (viz obrázek č.13), zvětšení 40 000 x. Pozorujeme zde PSI-NDH superkomplex s jedním (žlutě) i dvěma (zeleně) PSI.

Teplotní varianta	NDH komplex	NDH komplex + 1 PSI	NDH komplex + 2 PSI	NDH komplex + 3 PSI
25 °C				-
30 °C	-			-
35 °C				-
38 °C	-			
40 °C	-			-

Obrázek č.24: Repräsentativní projekce proteinových komplexů ve studovaných typech teplotních vzorků.

Tabulka č.2: Celkový počet zaznamenaných projekcí, počet projekcí proteinových komplexů, jejich relativní zastoupení a kontaminace v teplotních vzorcích. Relativní zastoupení proteinů bylo vypočteno jako podíl projekcí daného proteinového komplexu a celkového množství projekcí. Kontaminace značí procentuální podíl projekcí nespecifickými komplexy. Pomlčka znamená, že hledaný proteinový komplex nebyl nalezen.

Teplotní varianta		NDH komplex	NDH komplex + 1 PSI	NDH komplex + 2 PSI	NDH komplex + 3 PSI
25 °C	Celkem projekcí	6296			
	Počet nalezených projekcí	153	369	3173	-
	Relativní zastoupení	2 %	5 %	50 %	
	Kontaminace	43 %			
30 °C	Celkem projekcí	12245			
	Počet nalezených projekcí	-	1548	3867	-
	Relativní zastoupení		13 %	32 %	
	Kontaminace	55 %			
35 °C	Celkem projekcí	7367			
	Počet nalezených projekcí	319	326	853	-
	Relativní zastoupení	4 %	4 %	12 %	
	Kontaminace	80 %			
38 °C	Celkem projekcí	12284			
	Počet nalezených projekcí	-	783	1632	1216
	Relativní zastoupení		6 %	13 %	10 %
	Kontaminace	71 %			
40 °C	Celkem projekcí	8368			
	Počet nalezených projekcí	-	389	368	-
	Relativní zastoupení		5 %	4 %	
	Kontaminace	89 %			

Počet projekcí	175	
Relativní zastoupení	2 %	

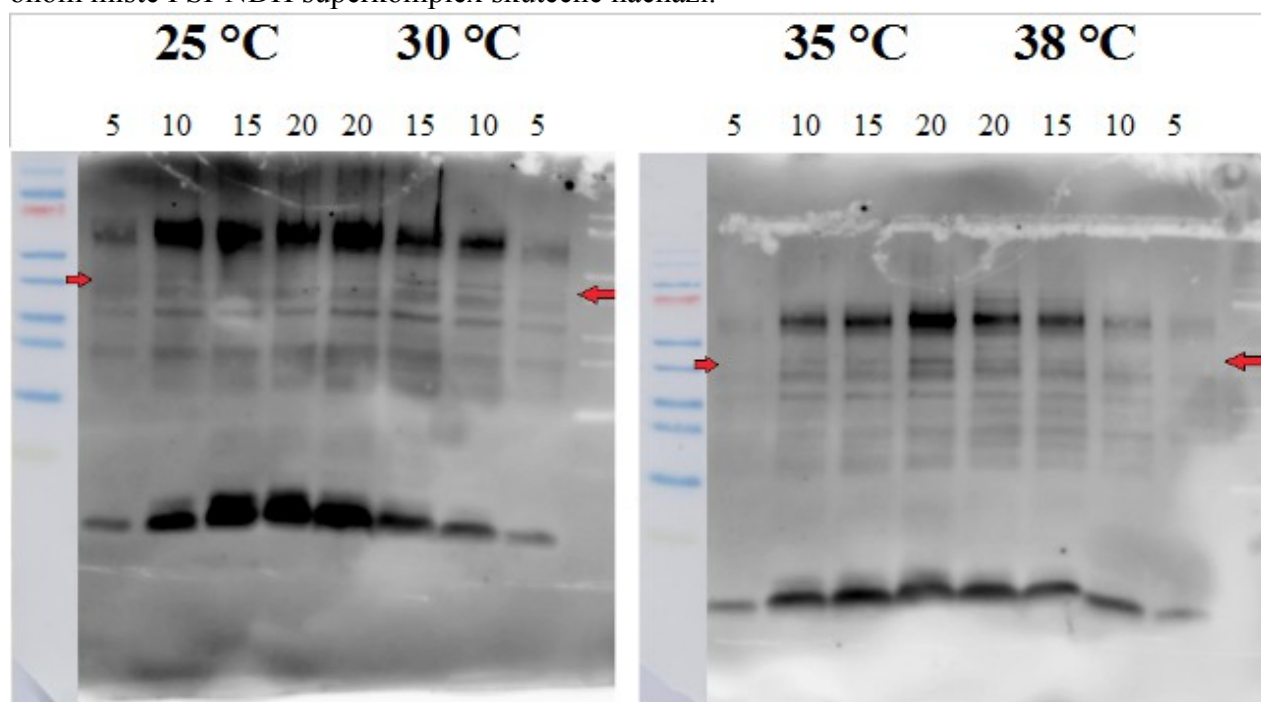
Obrázek č.25: Doplněk k obrázku č.24 a tabulce č.2; u teplotní varianty 40 °C byl v pásu 10 (viz obrázek č.13) nalezen tetramer PSI. Zde uvádíme jeho reprezentativní projekci, počet projekcí a relativní zastoupení.

5.3. Stanovení množství PSI-NDH superkomplexu

Kvantitativní analýza jednotlivých teplotních vzorků byla nejprve provedena pomocí Western blottingu na vzorcích spearovaných pomocí SDS elektroforézy, tato metoda se však pro stanovení množství PSI-NDH superkomplexu ukázala jako neprůkazná. Specifická protilátka, která se měla vázat na H podjednotku NDH komplexu, se totiž nespecificky navázala na větší množství proteinů a znemožnila tak spolehlivé stanovení množství PSI-NDH superkomplexu pomocí Western blottingu. V důsledku toho jsme se rozhodli využít nepřímou fluorescenční metodu, založenou na práci Shikanai *et al.* (1998). Výsledky z obou typů měření jsou uvedeny v následujících kapitolách.

5.3.1. Western blotting

Na obrázku č.26 vidíme výsledek Western blottingu po separaci v SDS-PAGE. Jak bylo řečeno výše, použitá protilátka se bohužel v rozporu s tvrzením výrobce navázala nespecificky, díky čemuž jsme nemohli stanovit množství PSI-NDH superkomplexu u jednotlivých teplotních vzorků. Použitím markeru (Obrázek č.26) jsme alespoň určili oblast (40 kDa), kde by se měl nacházet pás odpovídající hledanému superkomplexu; skutečně se zde pás nachází (na obrázku vyznačeno červenými šipkami). Ovšem na základě našeho odhadu nemůžeme s jistotou tvrdit ani to, že se na onom místě PSI-NDH superkomplex skutečně nachází.

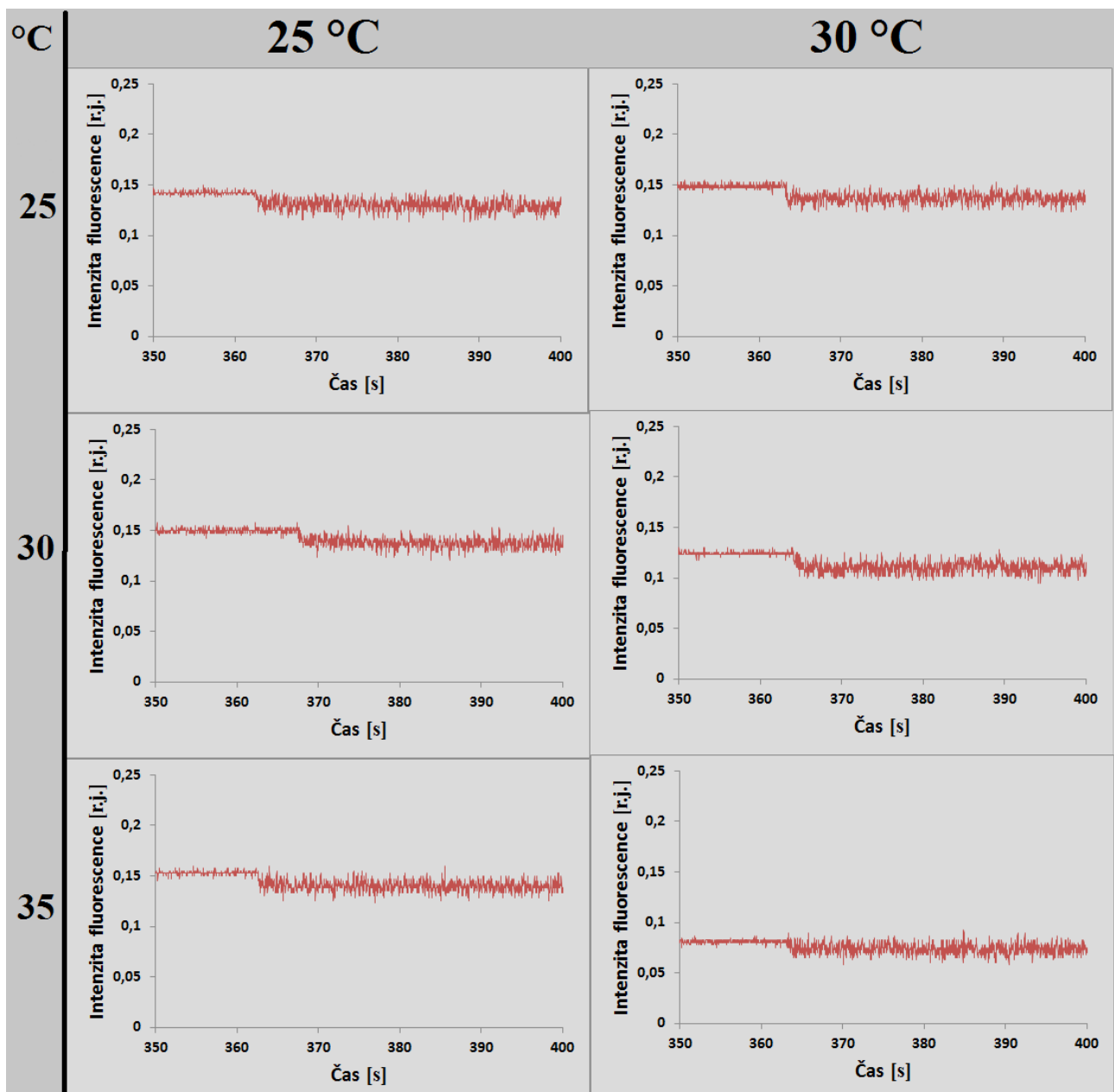


Obrázek č.26: Chemiluminiscenční snímky imunoanalýzy (Western blotting) u rostlin pěstovaných při teplotě 25, 30, 35 a 38 °C spearované pomocí SDS elektroforézy. Koncentrace detergentu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pro danou teplotu jsou vždy uvedeny nad příslušným sloupcem. Červené šipky označují pás proužků, které by měly odpovídat PSI-NDH superkomplexu.

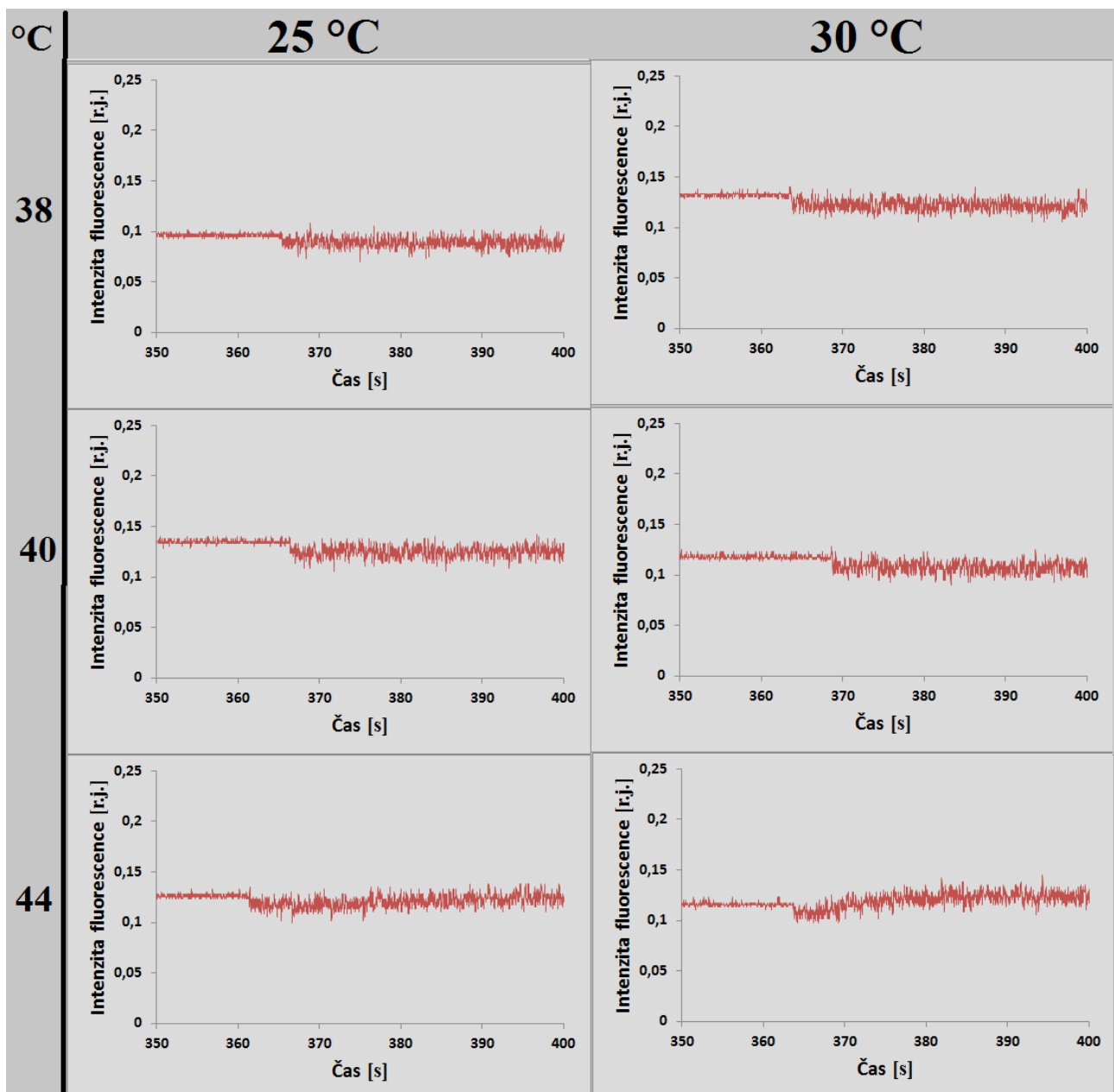
5.3.2. Fluorescenční analýza

Vzhledem k neúspěchu při určování množství PSI-NDH superkomplexu pomocí Western blotu, jsme se rozhodli použít nepřímou metodu založenou na fluorescenční analýze, která umožňuje určit aktivitu CET a tím současně i PSI-NDH superkomplexu. Výsledky fluorescenční analýzy byly z technických důvodů provedeny pouze u teplotních variant 25 °C a 30 °C. Jelikož nebyl čas napěstovat další teplotní varianty, otevírá se zde cesta pro další výzkum.

Obrázky č.27 a č.28 ukazují srovnání fluorescenčních křivek teplotních variant 25 a 30 °C po vypnutí aktinického světla, tedy v době mezi šestou a sedmou minutou měření (viz obrázek č.7). Obrázek č.27 ukazuje toto srovnání pro teplotní stimulaci 25, 30 a 35 °C, obrázek č.28 pro teploty 38, 40 a 44 °C. Na obrázku č.27 nevidíme nárůst minimální fluorescence v žádném z prezentovaných případů. Na obrázku č.28 nepozorujeme nárůst minimální fluorescence po teplotní stimulaci při 38 a 40 °C; po stimulaci 44 °C však pozorujeme její nárůst u obou typů vzorků. Ukazuje se, že ječmen adaptovaný na pěstební podmínky 30 °C zde má mnohem výraznější nárůst fluorescence (a tedy i aktivitu CET přes PSI-NDH komplex), než u ječmene pěstovaného za kontrolních podmínek.



Obrázek č.27: Srovnání nárůstu minimální fluorescence po vypnutí AL u rostlin pěstovaných při teplotě 25 a 30 °C. Teploty, kterým byly rostliny vystaveny (25, 30 a 35 °C), jsou zaznamenány v levé části obrázku.



Obrázek č.28: Srovnání nárůstu minimální fluorescence po vypnutí AL u rostlin pěstovaných při teplotě 25 a 30 °C. Teploty, kterým byly rostliny vystaveny (38, 40 a 44 °C), jsou zaznamenány v levé části obrázku.

6. Diskuze

Získané výsledky potvrzují, že rostliny tvoří PSI-NDH superkomplex, který lze separovat pomocí nativní i SDS elektroforézy. U vyšších teplot (teploty 38 a 40 °C) bylo k jeho separaci zapotřebí použít větší koncentrace detergentu, než u teplot nižších; ani tak ovšem nedošlo k úplné solubilizaci thylakoidiních membrán. Důkazem toho jsou agregáty viditelné na dně jamek na obrázku č.13. Řešením by mohlo být použití větší koncentrace detergentu, což by ovšem mohlo současně vést k výraznému rozpadu studovaného PSI-NDH superkomplexu. Tato skutečnost je dobře patrná na obrázcích č.8 až č.12.

To, že se u všech našich teplotních variant skutečně jedná o PSI-NDH superkomplex, opět potvrzují obrázky č.8 až č.12. Jelikož u snímků získaných v fluorescenčním módu pásy s očekávaným PSI-NDH superkomplexem oproti kolorimetrickým snímkům chybí, nemohou být součástí PSII. Při pokojové teplotě je totiž kvantový výtěžek fluorescence výrazně vyšší, než je tomu u PSI (Baker, 2008). To v souvislosti s jejich polohou v horní části gelu potvrzuje, že zřejmě jde o PSI-NDH komplex či oligomery komplexů PSI.

Zajímavé také je, že se u každé varianty nachází proužky ve dvou blízkých oblastech gelu (viz. obrázek č.2), přičemž v spodním pásu se zřejmě nachází PSI-NDH superkomplex a v horním oligomery PSI (Kouřil *et al.*, 2014; Nosek *et al.*, 2016). To potvrzují i obrázky č.14 až č.23, kde jsou na snímcích odpovídajících horním pásům vidět velké oligomerní struktury, zatímco na snímcích odpovídajících dolním pásům lze pozorovat NDH komplexy a PSI-NDH superkomplexy. Výjimkou je obrázek č.14, odpovídající hornímu pásu při kontrolní teplotě; ačkoli se zde nacházejí nespécifikované oligomerní struktury, našli jsme zde i PSI-NDH superkomplexy. Další výjimkou by mohl být výskyt tetramerů PSI v dolním pásu u teplotní varianty 40 °C (viz dále).

U kontroly (25 °C) jsme zaznamenali výskyt PSI-NDH superkomplexu s jedním i se dvěma PSI. V tabulce č.1 vidíme, že výrazně více bylo projekcí PSI-NDH superkomplexu se dvěma PSI; projekcí s jedním PSI bylo skoro desetinásobně méně. To může potvrzovat fakt, že PSI-NDH superkomplex dosahuje větší stability se dvěma PSI (Peng *et al.*, 2011). Dále se nám podařilo v malém množství zaznamenat i samotný NDH komplex; pravděpodobně jde o důsledek rozpadu PSI-NDH superkomplexu v rámci solubilizace.

Teplotní varianta 30 °C opět obsahuje PSI-NDH superkomplex s jedním i se dvěma PSI. Opět je zde výrazně vyšší výskyt superkomplexu se dvěma PSI než s jedním PSI. Samostatné NDH komplexy nebyly nalezeny. Obojí je zřejmě opět důsledkem rozpadu superkomplexu v rámci solubilizace, případně eluce. Je možné i to, že některé teplotní varianty ječmene mají PSI-NDH komplex odolnější než jiné a k jeho rozpadu tedy nedochází v takové míře.

U teplotní varianty 35 °C se podobně jako u teplotní varianty 25 °C vyskytoval PSI-NDH superkomplex se dvěma i jedním PSI, stejně tak se objevil i samostatný NDH komplex. Opět převažují projekce PSI-NDH superkomplexu se dvěma PSI, ovšem oproti kontrole je zde výskyt samostatného NDH komplexu a PSI-NDH superkomplexu srovnatelné.

Varianty o pěstební teplotě 38 °C opět poukazují na výskyt PSI-NDH superkomplexu s jedním či dvěma PSI; i zde převažují superkomplexy se dvěma PSI. Samostatný NDH komplex nebyl zaznamenán. Novinkou je výskyt většího PSI-NDH superkomplexu, který pravděpodobně představuje superkomplex se třemi PSI. Ten byl zastoupen v poměrně hojné míře a jeho množství je srovnatelné se superkomplemem o dvou PSI. Je tedy potřeba provést podrobnější průzkum, který umožní větší rozlišení tohoto superkomplexu a potvrdí či vyvrátí jeho existenci v této teplotní variantě. Je pravděpodobné, že jde o reakci na vysokoteplotní stres, kdy je inhibován přenos elektronů skrze PSII (Sharkey, 2005) a zvýšena aktivita CET. Obdobnou asociaci NDH komplexu se třemi, či dokonce čtyřmi PSI komplexy, jsme již pozorovali v nezávislé analýze PSI-NDH superkomplexů izolovaných z huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a je stále předmětem probíhajícího výzkumu (osobní sdělení vedoucího diplomové práce R. Kouřila).

Při teplotní variantě 40 °C byl znovu pozorován PSI-NDH superkomplex s jedním i dvěma PSI, tentokrát však jsou oba typy zastoupeny v přibližně stejném množství. Nepozorovali jsme zde samostatný NDH komplex ani PSI-NDH superkomplex se třemi PSI. Je možné, že PSI-NDH superkomplexy s třemi PSI se nacházejí spíše v pásu 9 (viz obrázek č.2), který byl oproti pásu 10 velmi zřetelný a který bohužel nebyl čas důkladněji prostudovat. Vrátime-li se ke sledovanému pásu 9, je naší povinností poukázat na skutečnost, že se zde nacházejí tetramery PSI v nezanedbatelném množství (viz obrázek č.25); dosud není jasné, zda mají nějaký fyziologický význam či zda skutečně jde jen o artefakty. Oligomerické struktury PSI komplexů byly již v minulosti pomocí elektronové mikroskopie a obrazové analýzy studovány (Boekema *et al.*, 2001), ale zatím se nepodařilo jednoznačně potvrdit jejich nativní charakter. Důvodem bylo nízké rozlišení výsledných projekcí PSI oligomerů, které bylo zapříčiněné malým množstvím analyzovaných částic. Zjištěná skutečnost, že u rostlin pěstovaných při 40 °C dochází k dramatickému nárůstu tetramerů PSI, může výrazně usnadnit jejich strukturní charakterizaci.

V tabulce č.2 vidíme, že v mnoha případech se na většině získaných projekcích nachází kontaminace a případně i nspecifické proteinové komplexy, které nemůžeme analyzovat z důvodu nevelkého výskytu. S výjimkou kontrolní teploty se zde tyto kontaminace vyskytují v nadpoloviční většině. Může jít například o kousky membrány, nedostatečně solubilizované proteinové komplexy či naopak podjednotky rozpadlých proteinových komplexů. I přes značnou kontaminaci se však podařilo získat obstojné projekce PSI-NDH superkomplexu (viz. obrázek č.24).

Je důležité si uvědomit, že 38 °C dochází ke zpomalování LET skrze PSII; to je dáno postupným zpomalováním činnosti OEC a jeho postupnou degradací, která začíná právě na této teplotě. To však klade zvýšené nároky na CET, což může u rostlin pěstovaných při teplotách 38 °C a 40 °C vysvětlovat výskyt PSI-NDH komplexu se třemi PSI a tetramerů PSI, které jsme u nižších teplot nepozorovali. Naše výsledky jsou tedy v souladu s teorií, že při působení teplotního stresu napomáhá PSI-NDH superkomplex odolávat nepříznivým podmínkám (Essemine *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

Druhou částí práce bylo studium množství PSI-NDH superkomplexu u jednotlivých teplotních variant. To mělo být studováno pomocí imunoanalytické metody Western blotting na jednotlivých teplotních vzorcích separovaných pomocí SDS elektroforézy; jak ovšem vidíme na obrázku č.3, u variant 25, 30, 35 a 38 °C pozorujeme kromě linie odpovídající hmotnosti 40 kDa (odpovídající H podjednotce PSI-NDH superkomplexu) v důsledku nespecifického navázání protilátky zvýraznění mnoha dalších proteinů. To znemožňuje přesné určení množství PSI-NDH superkomplexu. Tato skutečnost je v rozporu s technickou dokumentací užití protilátky a byly potvrzena zopakováním experimentu. Určení množství PSI-NDH superkomplexu touto cestou se tedy v našem případě ukázalo jako neprůkazné. Řešením problému by mohlo být zopakování pokusu s novou protilátkou.

Rozhodli jsme se tedy využít nepřímou metodu nárůstu minimální fluorescence, standardně využívanou pro stanovení aktivity CET zprostředkovanou pomocí PSI-NDH superkomplexu (Shikanai *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2012), z čehož tedy můžeme usuzovat i na jeho množství. Bohužel jsme z technických důvodů stihli získat výsledky jen pro teplotní varianty 25 °C a 30 °C. Fluorescenční křivky prezentované na obrázcích č.27 a č.28 neukazují při teplotní stimulaci 25, 30, 35, 38 a 40 °C žádný fluorescenční nárůst. To může být dáno tím, že rostliny pěstované při nižší teplotě se spoléhají spíše na LET a tudíž je u nich CET skrze PSI-NDH komplex málo aktivní či dokonce neaktivní. (CET však stále může probíhat přes PGRL1/PGR5 komplexy.) Při teplotě 44 °C však byl u obou typů vzorků zaznamenán po vypnutí aktinického světla nárůst fluorescence, který byl u teplotní varianty 30 °C mnohem výraznější, než tomu bylo u varianty 25 °C. To poukazuje na skutečnost, že v teplotní variantě 30 °C je větší aktivita a tudíž i množství PSI-NDH superkomplexu, než tomu bylo u kontrolního vzorku. Zda bychom u ostatních teplotních variant dosáhli ještě vyšší aktivity PSI-NDH superkomplexu či zda by se nárůst fluorescence projevil i u nižších teplotních stimulací ukáže až další výzkum v této oblasti.

7. Závěr

Tato práce ukázala, že při všech zkoumaných variantách ječmene pěstovaných na různé teplotě (25, 30, 35, 38 a 40 °C) se vyskytuje PSI-NDH superkomplex. U teplotní varianty 38 °C byly odhaleny PSI-NDH superkomplexy se třemi PSI; pro potvrzení této skutečnosti bude třeba detailnější EM s vyšším rozlišením. U teplotní varianty 40 °C se nečekaně vyskytnul tetramer PSI, jehož funkce a výskyt doposud nebyly uspokojivě vysvětleny. Obě tyto skutečnosti mohou naznačovat potřebu posílení CET pomocí NDH komplexu při teplotním stresu.

Při určování množství PSI-NDH komplexů u všech zkoumaných teplotních variant jsme byli poměrně neúspěšní. Podařilo se nám však pomocí fluorescenční analýzy zjistit, že výraznější aktivitu a tedy i větší množství PSI-NDH superkomplexu se oproti kontrole vyskytuje už u rostlin pěstovaných při 30 °C. Další teplotní varianty bohužel nebyly z tohoto pohledu z časových důvodů studovány.

Tato práce otevírá široké spektrum možností dalším pokračovatelům. Bylo by jistě žádoucí získat projekci PSI-NDH superkomplexu se třemi PSI pozorovaného při 38 °C v lepším rozlišení, než bylo prezentováno v této práci. Dále tato práce poukazuje na zvýšený výskyt tetrameru PSI u rostlin pěstovaných při 40 °C. Také by bylo vhodné znovu provést Western blot s novou protilátkou a tentokrát i u varianty 40 °C. Zejména by však bylo velmi vhodné navázat tam, kde tato práce končí, a pokusit se určit množství PSI-NDH superkomplexu pomocí fluorescenční analýzy u rostlin s různou pěstební teplotou pro vybrané stimulační teploty.

8. Citace

- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* 98: 541-550
- Allen JF (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1908: 275-335
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59:89-113
- Baradaran R., Berrisford JM, Minhas GS, Sazanov LA (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494: 443-448.
- Boekema EJ, Hifney A, Yakushevskaya AE, Piotrowski M, Keegstra W, Berry S, Michel KP, Pistorius EK, Kruip J (2001) A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* 412: 745-748
- Burrows PA, Sazanov LA, Svab Z, Maliga P, Nixon PJ (1998) Identification of functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted *ndh* genes. *The EMBO Journal* 4:868-876
- Casano LM, Martín M, Sabater B (2001) Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic NDH complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiology* 125: 1450-1458
- DalCorso G, Pesaresi P, Masiero S, Aseeva E, Schünemann D, Finazzi G, Joliot P, Barbato R, Leister D (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132: 273-285
- Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706: 12-39
- Efremov RG, Baradaran R, Sazanov LA (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465: 441-445
- Essemine J, Qu M, Mi H, Zhu XG (2016) Response of chloroplast NAD(P)H dehydrogenase-mediated cyclic electron flow to a shortage or lack in ferredoxin-quinone oxidoreductase-dependent pathway in rice following short-term heat stress. *Front Plant Sci* 7:383.doi: 10.3389/fpls.2016.00383
- Hertle AP, Blunder T, Wunder T, Pesaresi P, Pribil M, Armbruster U, Leister D (2013) PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic flow. *Molecular Cell* 49: 511-523.

Horváth EM, Peter SO, Joët T, Rumeau D, Cournac L, Horváth GV, Kavanagh TA, Schäfer C., Peltier G, Medgyesy P. (2000) Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiology* 123: 1337-1349.

Hu P, Lv J, Fu P, Hualing M (2013) Enzymatic characterization of an active NDH complex from *Thermosynechococcus elongatus*. *FEBS Letters* 587: 2340-2345

Ifuku K, Endo T, Shikanai T, Aro EM (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear encoded subunits. *Plant Cell Physiol* 52(9): 1560-1568.

Ilík P, Kotabová E, Špundová M, Novák O, Kaňa R, Strzalka K (2010) Low-light-induced violaxanthin de-epoxidation in shortly preheated leaves: uncoupling from Δ pH-dependent nonphotochemical quenching. *Photochemistry and Photobiology* 86: 722-726

Johnson GN (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807: 384-389

Joliot P, Johnson GN (2011) Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *PNAS* 108: 13317-13322

Joliot P, Joliot A (2006) Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 362-368

Kouřil R, Strouhal O, Nosek L, Lenobel R, Chamrád I, Boekema EJ, Šebela M, Ilík P (2014) Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex. *The Plant Journal* 77: 568-576

Kozarová I (2013) Strukturní analýza proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Bakalářská práce Univerzita Palackého, katedra Biochemie

Lascano HR, Casano LM, Martín M, Sabater B (2003) The activity of the chloroplastic NDH complex is regulated by phosphorylation of the NDH-F subunit. *Plant Physiology* 132: 256-262

Li Q, Yao ZJ, Mi H (2016) Alleviation of photoinhibition by co-ordination of chlororespiration and cyclic electron flow mediated by NDH under heat stressed condition in tobacco. *Front Plant Sci* 7:548. doi: 10.3389/fpls.2016.00548

Lípová L, Krchňák P, Komenda J, Ilík P (2010) Heat-induced disassembly and degeneration of chlorophyll-containing protein complexes in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 63-70

Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* 128: 82-97

- Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 361-371
- Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and functions of photosystem I and II. *Annu Rev Plant Biol* 57: 521-565
- Nosek L (2012) Použití 2D-CN/SDS-PAGE ke sledování změn v zastoupení pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán stresovaných rostlin. Bakalářská práce Univerzity Palackého, katedra Biochemie
- Nosek L, Semchonok D, Boekema E, Ilík P, Kouřil R (2016) Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *The Plant Journal* (revision submitted)
- Oosterwijk N (2005) Structural investigation of photosystem I in higher plants and cyanobacteria. Bakalářská práce University of Groningen, Department of Chemistry
- Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, Shikanai T (2012) Multistep Assembly of chloroplast NADH dehydrogenase-like subcomplex A requires several nucleus-encoded proteins, including CRR41 and CRR42, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 202-214
- Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, Takami T, Shikanai T (2009) Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 3623-3640
- Peng L, Shikanai T (2011) Supercomplex formation with photosystem I is required for the stabilization of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 1629-1639
- Peng L, Yamamoto H, Shikanai T (2011) Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807: 945-953
- Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, Shikanai T (2012) Multistep Assembly of chloroplast NADH dehydrogenase like subkomplex A requires several nucleus-encoded proteins, including CRR41 and CRR42, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 202-214
- Ruban AV (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiology* 170: 1903-1916
- Schägger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1: 16-22
- Scheres SH (2012) RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J Struct Biol* 180: 519-530
- Sharkey T (2005) Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment* 28: 269-277

Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K, Yokota A (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci* 95: 9705-9709

Shikanai T (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: Genetic Approaches. *Annu Rev Plant Biol* 58: 199-217

Shikanai T (2016) Chloroplast NDH: A different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857: 1015-1022

Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K, Yozota A (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci* 95: 9705-9709

Szymańska R, Dłużewska J, Ślesak I, Kruk J (2011) Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase bound to cytochrome b₆f complex is active in plastoquinone reduction: Implications for cyclic electron transport. *Physiologia Planetarum* 141: 289-298

Wang P, Duan W, Takabayashi A, Endo T, Shikanai T, Ye JY, Mi Hualing (2006) Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. *Plant Physiology* 141: 465-474

Yamamoto Y, Aminaka R, Yoshioka M, Khatoon M, Komayama K, Takenaka D, Yamashita A, Nijo N, Inagawa K, Morita N, Sasaki T, Yamamoto Y (2008) Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth Res* 98: 589-608

Yamori W, Shikanai T (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu Rev Plant Biol* 67:25.1-25.26