

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Modrá nativní elektroforéza pigment-proteinových
komplexů izolovaných z thylakoidních membrán

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lukáš Nosek
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	14. 5. 2010

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Lukáš Nosek

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D. za přátelský přístup, pomoc a rady, které mi v průběhu řešení této práce poskytl. Děkuji také prof. Josefu Komendovi a jeho spolupracovníkům z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Třeboni za nemalou pomoc při řešení problémů spojených s metodou nativní elektroforézy. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ivě Šnyrychové, Ph.D. a Mgr. Ondřeji Strouhalovi za pomoc při řešení experimentální části mojí práce a děkuji také všem zaměstnancům katedry experimentální fyziky UP v Olomouci za příjemnou atmosféru na pracovišti. Rovněž bych chtěl poděkovat RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za poskytnuté konzultace.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Lukáš Nosek
Název práce	Modrá nativní elektroforéza pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá problematikou použití modré nativní polyakrylamidové elektroforézy (BN-PAGE) k separaci pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán v nativním stavu. Teoretická část pojednává o separaci membránových multiproteinových komplexů pomocí elektroforézy. Důraz je kladen zejména na 2D BN/SDS-PAGE, která je využívána ke studiu složení multiproteinových komplexů a ke studiu vzájemných protein-proteinových interakcí. V teoretické části je rovněž pojednáno o pigment-proteinových multikomplexech v thylakoidních membránách, jejich lokalizaci, funkci a pozici v elektroforetogramech. Je zmíněna i metoda CN-PAGE („bezbarvá“ nativní PAGE), která se začíná využívat k separaci nativních proteinových komplexů v současné době.</p> <p>V experimentální části se zabývám separací pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>) metodou 2D BN/SDS-PAGE a vzájemně porovnávám metody BN-PAGE a CN-PAGE. Výsledkem experimentů bylo úspěšné rozdělení vysokomolekulárních pigment-proteinových multikomplexů s vysokým stupněm intaktности. Při použití BN-PAGE byl pozorován vysoký počet pásů se superkomplexy se stejným podjednotkovým složením, což patrně vypovídá o postupném rozpadu superkomplexů během elektroforézy. Naproti tomu u metody CN-PAGE byl patrný výrazně menší počet pásů se superkomplexy. Výsledky práce naznačují, že metoda CN-PAGE je díky své větší šetrnosti k pigment-proteinovým komplexům z thylakoidních membrán vhodnější než metoda BN-PAGE.</p>
Klíčová slova	Modrá nativní elektroforéza, BN-PAGE, CN-PAGE, pigment-proteinové komplexy, thylakoidní membrány, fotosystém I, fotosystém II, <i>Pisum sativum</i>
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Lukáš Nosek
Title	Blue native electrophoresis of pigment containing protein complexes isolated from thylakoid membranes
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	<p>This bachelor work deals with problems of usage of blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) to separate pigment containing protein complexes isolated from thylakoid membranes in native state. The theoretic part of this work deals with separation of multiprotein complexes by electrophoresis and it places emphasis on problems of 2D BN/SDS-PAGE, which is used to study of composition of multiprotein complexes and to study of protein-protein interactions. The theoretic part of this work deals with pigment containing protein complexes in thylakoid membranes too, with their localization and function and with their position in electrophoretograms and so called CN-PAGE (clear native polyacrylamide gel electrophoresis), which is nowadays used for separation of native protein complexes, is mentioned too.</p> <p>I deal with separation of pigment containing protein complexes isolated from thylakoid membranes of <i>Pisum sativum</i> by method 2D BN/SDS-PAGE in experimental part of my work and I try to compare BN-PAGE and CN-PAGE. The result of my experiments is succesfull separation of pigment containing protein complexes of high molecular mass in native state. We can see a large number of bands with multiprotein supercomplexes of the same composition in results of BN-PAGE. It can mean progressive decomposition of protein supercomplexes during electrophoresis. In contrast to BN-PAGE, results of CN-PAGE show reduced number of this bands which probably means, that CN-PAGE is more gentle electrophoretic method for separation of multiprotein complexes isolated from thylakoid membranes.</p>
Keywords	Blue-native electrophoresis, BN-PAGE, CN-PAGE, pigment containing protein complexes, thylakoid membranes, photosystem I, photosystem II, <i>Pisum sativum</i>
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce.....	- 7 -
TEORETICKÁ ČÁST.....	- 8 -
1. Modrá nativní elektroforéza.....	- 9 -
1.1. Úvod.....	- 9 -
1.2. Základní principy BN-PAGE.....	- 9 -
1.3. Příprava vzorků pro BN-PAGE.....	- 10 -
1.4. Solubilizace nativních membránových proteinů pro BN-PAGE.....	- 10 -
1.4.1. Třídy detergentů.....	- 10 -
1.4.1.1. Iontové detergenty.....	- 11 -
1.4.1.2. Soli žlučových kyselin.....	- 11 -
1.4.1.3. Neiontové detergenty.....	- 11 -
1.4.1.4. Zwitteriontové detergenty.....	- 12 -
1.4.2. Vliv lipidů na solubilizaci proteinů.....	- 12 -
1.4.3. Provádění solubilizace proteinových komplexů.....	- 12 -
1.4.4. Výběr vhodného detergentu a volba správného poměru detergent / protein.....	- 13 -
1.5. Elektroforéza.....	- 14 -
1.5.1. Množství nanášeného vzorku.....	- 14 -
1.5.2. Podmínky elektroforézy.....	- 15 -
2. 2D BN/SDS elektroforéza.....	- 16 -
2.1. Úvod.....	- 16 -
2.2. SDS elektroforéza.....	- 16 -
2.3. Výběr systému pro různá rozmezí molekulových hmotností.....	- 16 -
2.3.1. Koncentrace akrylamidu.....	- 17 -
2.3.2. Štěpení disulfidových vazeb.....	- 17 -
2.3.3. Vliv močoviny.....	- 17 -
2.3.4. Vliv nahrazení SDS barvivem Coomassie blue.....	- 17 -
2.4. Srovnání tricinové a Laemmliho procedury.....	- 18 -
2.5. Příprava vzorku pro druhý rozměr elektroforézy.....	- 18 -
2.6. Podmínky elektroforézy.....	- 19 -
2.7. Barvení proteinů po druhém rozměru.....	- 19 -
3. CN-PAGE.....	- 20 -
4. Shrnutí výhod modré nativní elektroforézy.....	- 21 -
5. Pigment-proteinové komplexy thylakoidních membrán.....	- 21 -
5.1. Fotosystém II.....	- 21 -
5.2. Fotosystém I.....	- 23 -
5.3. Pozice podjednotek fotosystémů I a II v elektroforetogramech po 2D BN/SDS-PAGE.....	- 26 -
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 29 -
6. Použitý materiál.....	- 30 -
6.1. Rostlinný materiál.....	- 30 -
6.2. Knopův roztok.....	- 30 -
7. Použité chemikálie.....	- 31 -
8. Použité metody.....	- 32 -
8.1. Izolace thylakoidních membrán.....	- 32 -
8.2. Určení koncentrace chlorofylů.....	- 33 -
8.3. Solubilizace thylakoidních membrán a příprava vzorku pro BN-PAGE.....	- 33 -
8.4. BN-PAGE.....	- 34 -

8.5. Skenování gelu po prvním rozměru	- 36 -
8.6. SDS-PAGE.....	- 36 -
8.7. CN-PAGE.....	- 38 -
8.8. Detekce fluorescence chlorofylu	- 38 -
8.9. Vysokoteplotní stres thylakoidních membrán	- 38 -
9. Výsledky a diskuse	- 39 -
9.1. 2D BN/SDS-PAGE	- 39 -
9.2. CN-PAGE.....	- 42 -
10. Závěr	- 45 -
11. Seznam literatury.....	- 46 -
12. Seznam použitých zkratk	- 49 -

Cíle práce

- Zpracovat rešerši na téma použití modré nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy (BN-PAGE) k separaci pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán chloroplastů
- Izolovat intaktní thylakoidní membrány z rostlin hrachu setého (*Pisum sativum*) a provést elektroforetickou separaci proteinových superkomplexů obsažených v těchto membránách pomocí BN-PAGE. Pokusit se o separaci superkomplexů i pomocí CN-PAGE (bezbarvá nativní polyakrylamidová elektroforéza) a diskutovat výhody či nevýhody obou elektroforetických metodik

TEORETICKÁ ČÁST

1. Modrá nativní elektroforéza

1.1. Úvod

Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE) je zvláštním druhem nativní elektroforézy, která je určena pro separaci membránových multiproteinových komplexů při vysokém rozlišení v enzymaticky aktivní formě. Byla vyvinuta začátkem 90. let minulého století pro separaci mitochondriálních OXPHOS* komplexů. Rozmezí molekulových hmotností proteinů, které mohou být touto elektroforetickou technikou děleny, je od 10 kDa do 10000 kDa (Schägger & Von Jagow, 1991). V poslední době je tato metoda intenzivně využívána pro studium jak mitochondriálních, tak i chloroplastových membránových komplexů a stává se stále více populární ve studiu a identifikaci protein-proteinových interakcí (Krause, 2006). Ačkoli se základní princip metody BN-PAGE nezměnil, původní protokol postupně prošel řadou změn.

1.2. Základní principy BN-PAGE

Při BN-PAGE se pro solubilizaci membránových proteinů používají jemné detergenty a nepostradatelnou složkou je aniontové barvivo Coomassie blue. Jak se ukázalo, toto barvivo se váže na povrch naprosté většiny membránových proteinů (Schägger, 2003a). Navázáním tohoto barviva dojde u proteinových komplexů k několika důležitým změnám, které jsou nezbytné pro jejich úspěšné elektroforetické rozdělení. V první řadě způsobí navázání barviva Coomassie blue posun isoelektrického bodu proteinu do kyselé oblasti. Tudíž při pH 7,0 – 7,5, které se u BN-PAGE běžně používá, se mohou k anodě pohybovat všechny proteiny, včetně bazických. U BN-PAGE se využívá gradientového gelu, u kterého se s rostoucí vzdáleností od startu postupně snižuje velikost pórů. Větší proteinové komplexy a proteiny při elektroforéze migrují pomaleji. Druhým významným jevem, který způsobuje navázání barviva Coomassie blue na proteiny je to, že se tyto proteiny navzájem odpuzují a tím je zabráněno jejich shlukování. To je především díky negativnímu náboji, které proteiny získaly vazbou tohoto barviva. Dalším jevem spojeným s vazbou barviva Coomassie blue na proteiny je zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě a díky tomuto zvýšení rozpustnosti proteinů není potřeba přidávat do gelu detergent, čímž se významně snižuje riziko rozvolnění labilních proteinových komplexů. Posledním významným jevem spojeným s interakcí proteinů s barvivem Coomassie blue je to, že migrující proteiny obarvené tímto barvivem jsou v gelu dobře viditelné jako modré pásy. To mimo jiné umožňuje pohodlné vyřezání jednotlivých pásů z gelu a následné uvolnění proteinů z gelu pomocí elektroeluce (Schägger, 2003a).

* Proteinové komplexy zodpovědné za oxidativní fosforylaci, OXidative PHOSphorilation

1.3. Příprava vzorků pro BN-PAGE

Modrá nativní elektroforéza umožňuje separaci membránových proteinových multikomplexů v nativním stavu. Šetrná příprava vzorku je tedy jedním z kritických kroků. Pro úspěšnou separaci komplexů v nativním stavu je nutné připravovat vzorek při nízké teplotě (na ledové lázni), aby se zabránilo případnému znehodnocení vzorku aktivací hydrolytických enzymů. Stabilita nativního proteinového komplexu také závisí na povaze samotného vzorku, stejně jako na druhu a koncentraci detergentu. Existuje mnoho proměnných faktorů, které mohou ovlivnit úspěšnost experimentu a tyto faktory je nutné experimentálně stanovit pro každý vzorek zvlášť (Reisinger & Eichacker, 2006).

1.4. Solubilizace nativních membránových proteinů pro BN-PAGE

Má-li se dosáhnout úspěšné solubilizace membránových proteinů a komplexů, je nutné použít vhodnou metodu. Pro experimenty, které separují proteiny na základě jejich molekulární hmotnosti nebo náboje, jako například SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) nebo IEF-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s využitím isoelektrické fokusace), zůstává hlavním účelem solubilizace rozptýlení celého vzorku na jednotlivé proteinové druhy. Naproti tomu příprava vzorku pro BN-PAGE je více komplexní. Jejím hlavním účelem je úplná extrakce všech proteinů a proteinových komplexů spojená s jejich zachováním v nativním stavu a v aktivní formě. Splnění obou požadavků je někdy velmi problematické. Ale naštěstí existuje mnoho extrakčních postupů, které dovolují úspěšnou solubilizaci labilních komplexů v nativním stavu. Tyto postupy zpravidla využívají šetrné neiontové detergenty, ale existují i jiné postupy, které pro extrakci proteinových komplexů používají jiné druhy detergentů (Reisinger & Eichacker, 2008). O detergentech je pojednáno v následujících kapitolách.

1.4.1. Třídy detergentů

Detergenty jsou skupinou látek, které jsou strukturně podobné lipidům a jejichž molekuly se skládají ze dvou hlavních částí. První z nich je hydrofilní část označovaná jako hlavička a druhou částí je postranní hydrofobní uhlovodíkový řetězec. Obě tyto části molekuly mají vliv na solubilizační vlastnosti detergentu a existuje vztah mezi velikostí hlavičky a postranního řetězce a takzvanou jemností detergentu. Čím delší je postranní řetězec a čím větší je hlavička detergentu, tím jsou účinky detergentu mírnější. Jemností detergentu je v tomto případě myšlena jejich schopnost solubilizovat proteiny a přitom zachovat jejich komplexní strukturu. Detergenty mohou být podle svých chemických vlastností a podle vlivu na

membránové proteiny rozděleny na iontové, soli žlučových kyselin, neiontové a zwitteriontové (obojetné) (Reisinger & Eichacker, 2008, Seddon et al., 2004).

1.4.1.1. Iontové detergenty

Iontové detergenty se skládají z hlavičky s nábojem, který může být buď kladný nebo záporný a z hydrofobního uhlovodíkového řetězce. V přítomnosti iontových detergentů (jako například dodecylsírán sodný, SDS) ztrácí většina proteinových komplexů svou nativní strukturu. Detergent přerušuje protein-proteinové interakce a vnitřní proteinové interakce a komplex se tím rozpadá na jednotlivé proteinové podjednotky. Lipid-proteinové interakce nejsou ovlivněny. Tyto druhy detergentů (hlavně SDS) jsou tedy často používány ke kompletní solubilizaci jednotlivých membránových proteinů a které jsou separovány pomocí SDS-PAGE. Navzdory denaturujícím vlastnostem SDS, existují proteinové komplexy, které mohou být izolovány v přítomnosti malého množství SDS za současného zachování jejich funkce. Příkladem takového komplexu je fotosystém I. Bylo zjištěno, že reakční centrum tohoto komplexu obsahuje značné množství hydrofobních oblastí, které tento komplex chrání proti destabilizujícím vlivům SDS (Reisinger & Eichacker, 2008, Seddon et al., 2004).

1.4.1.2. Soli žlučových kyselin

Vlastnosti těchto detergentů se do určité míry podobají iontovým detergentům, obsahují však rigidní steroidní skupinu a mají mírnější denaturační účinky. Důsledkem přítomnosti steroidní skupiny v hlavičce detergentu je to, že místo kulových micel tvoří tyto detergenty uskupení, která se svým tvarem podobají tvaru ledviny. I když je známo, že tyto soli mohou solubilizovat například receptorové komplexy, nejsou běžně používány jako detergenty v nativní elektroforéze (Reisinger & Eichacker, 2008, Seddon et al., 2004). V poslední době však nacházejí uplatnění v takzvané CN-PAGE (viz kap. 3.).

1.4.1.3. Neiontové detergenty

Biochemické analýzy integrálních proteinů vyžadují použití detergentů, které účinně solubilizují hydrofobní proteiny, ale nenarušují jejich protein-proteinové interakce. Neiontové detergenty narušují většinu lipid-lipidových interakcí a lipid-proteinových interakcí, což je hlavním požadavkem pro izolaci nativních membránových komplexů. Protože elektroforetické analýzy enzymaticky aktivních proteinových komplexů jsou možné pouze za nedenaturujících podmínek, jsou k tomuto účelu použitelné pouze jemné, nedenaturující detergenty, které jsou převážně neiontové povahy - jako například digitonin, Triton X-100 nebo n-dodecyl- β -D-maltosid. Tyto detergenty jsou tedy nejvhodnějšími a nejčastěji používanými při solubilizaci proteinových komplexů pro BN-PAGE (Reisinger & Eichacker, 2008, Krause, 2006).

1.4.1.4. Zwitteriontové detergenty

Zwitteriontové detergenty kombinují vlastnosti iontových a neiontových detergentů a nacházejí své největší uplatnění v solubilizaci proteinů pro IEF-PAGE. Přesto, že solubilizace proteinů těmito detergenty většinou závisí na rozvolňování protein-proteinových interakcí, jsou tyto detergenty občas používány i u BN-PAGE (Reisinger & Eichacker, 2008, Seddon et al., 2004).

1.4.2. Vliv lipidů na solubilizaci proteinů

Skutečnost, že pro izolaci nativních membránových proteinových komplexů jsou nevhodnějšími právě neiontové detergenty může být vysvětlitelná tím, že intaktnost komplexů závisí na současné koextrakci určitých lipidů spolu s proteiny, což neiontové detergenty umožňují. S ohledem na lipid-proteinové interakce můžeme tedy lipidy rozdělit do tří tříd. První třídou jsou anulární lipidy, které zahrnují lipidy obklopující proteinový komplex z vnější strany a zprostředkovávají tak kontakt mezi lipidovou dvojvrstvou membrány a proteinovým komplexem. Druhou třídou jsou nonanulární povrchové lipidy, které se vážou na specifická místa na povrchu proteinu a typicky se nacházejí mezi proteiny a různými subkomplexy. Příkladem mohou být kontaktní plochy mezi superkomplexy nebo mezi různými podjednotkami multiproteinového komplexu. Poslední, třetí třídou, jsou integrální proteinové lipidy, které jsou vnitřní součástí proteinů. Často se nacházejí v neočekávané pozici a orientaci vzhledem k rovině membrány, ale vždy jsou v těsném kontaktu s proteinem.

Při práci s proteiny, u nichž chceme zachovat jejich nativní strukturu obecně platí tvrzení, že „čistší není lepší“. To znamená, že izolace určitých proteinových komplexů s jejich lipidovým okolím je žádanější než vyizolování čistého proteinového komplexu. Přílišná snaha o izolaci proteinového komplexu v co možná nejčistším stavu může vést k rozpadu nativní struktury komplexu (Reisinger & Eichacker, 2008).

1.4.3. Provádění solubilizace proteinových komplexů

Pro extrakci nativních komplexů z lipidové fáze se používají detergenty, které rozruší lipidovou dvojvrstvu a solubilizují lipidy stejně jako membránové proteiny do detergentových micel. Detergentové micely jsou termodynamicky stabilní útvary, které obsahují hydrofobní jádro obklopené vodním prostředím. Toto hydrofobní jádro poskytuje vhodné prostředí pro solubilizaci hydrofobních molekul, jako jsou např. membránové proteiny. Nad kritickou koncentrací monomerů detergentu (CMC) se molekuly detergentů začnou shlukovat do micel vzájemnou interakcí svých hydrofobních řetězců. Čím nižší je CMC, tím jsou micely stabilnější a tím méně ochotně jsou molekuly proteinů a lipidů do micel integrovány, popřípadě z micel

odstraňovány. CMC je silně závislá na řadě faktorů, jako například na teplotě, pH, iontové síle a homogenitě a čistotě detergentu.

Jakmile se detergenty včlení do lipidové fáze membrány, začnou se tvořit lipid-detergentové, lipid-protein-detergentové a protein-detergentové micely. Za účelem popsání solubilizace proteinů bylo provedeno množství výzkumů, které se zaměřovaly na interakci detergentů s čistými fosfolipidy. Tyto výzkumy vedly k formulování tří hlavních fází solubilizace. V první fázi se molekuly detergentu začlení do fosfolipidové dvojvrstvy, ve druhé fázi detergentové molekuly včleněné do lipidové dvojvrstvy spoluexistují s lipidovými molekulami včleněnými do detergentových micel a ve třetí fázi jsou lipidové molekuly solubilizované v detergentových micelách. Solubilizace lipidů je také významně ovlivněna složením membrány. Je také stále nejasné, zda následné přidání lipidů do roztoku solubilizovaných proteinových komplexů může efekt odstranění lipidů zvrátit (Reisinger & Eichacker, 2008).

Druh detergentu a jeho vhodnou koncentraci je nutné určit experimentálně pro každý vzorek zvlášť za účelem zachování nativní struktury proteinového komplexu a aby bylo zaručeno, že každá protein-detergentová micela bude obsahovat pouze jeden proteinový komplex. Poté, co je vzorek s obsahem biologických membrán inkubován s roztokem detergentu, musí být odstraněny nesolubilizované membrány, případně i další nežádoucí shluky molekul. To je prováděno centrifugací, která probíhá až 30 minut při 100000 g (Schägger, 2003a). Proteinové komplexy solubilizované v detergentových micelách zůstanou v supernatantu, zatímco balastní materiál sedimentuje na dně centrifugační kyvety. Poté, co se podaří získat solubilizované membránové komplexy, může být započato s jejich elektroforetickým dělením (Reisinger & Eichacker, 2006).

1.4.4. Výběr vhodného detergentu a volba správného poměru detergent / protein

Pro BN-PAGE je nejčastěji voleno ze tří detergentů, a to buď dodecyl- β -D-maltosid, Triton X-100 nebo digitonin. U BN-PAGE je ale nejčastěji používán digitonin a dodecyl- β -D-maltosid (Reisinger & Eichacker, 2006), protože Triton X-100 může některé superkomplexy částečně rozdělit na samostatné komplexy (Schägger, 2003a).

Při stanovování nejvhodnějšího poměru detergent / protein se postupuje tak, že je vzorek s biologickými membránami o známé koncentraci proteinů inkubován s různým množstvím detergentu. Nejvhodnější poměr bývá v intervalu 0,5 – 8,0 g/g (detergent/protein). Při stanovování optimálního hmotnostního poměru detergent / protein by měl volený interval poměrů zahrnovat poměr pod rozpouštěcím limitem i poměr zajišťující úplnou solubilizaci vzorku (Reisinger & Eichacker, 2008, Reisinger & Eichacker, 2006, Schägger, 2003a).

1.5. Elektroforéza

Termínem elektroforéza je označován proces, při kterém dochází k pohybu nabitých částic v elektrickém poli. V případě BN-PAGE jsou těmito nabitými částicemi proteinové komplexy nebo proteiny s navázaným barvivem Coomassie blue. Obecně se v homogenním elektrickém poli nabitá částice pohybují se stálou rychlostí, pokud je urychlující síla elektrického pole vyvážena odporovými silami prostředí. Je známo, že rychlost částice, a tudíž i její migrační vzdálenost, je přímo úměrná jejímu náboji a síle elektrického pole a nepřímo úměrná velikosti částice včetně jejího hydratačního obalu, její hmotnosti a viskozitě média, ve kterém elektroforéza probíhá. Tímto médiem je nejčastěji chemicky inertní polyakrylamidový gel. Optimálního rozlišení separovaných proteinů lze dosáhnout vhodnou volbou hustoty gelu a volbou velikosti pórů gelu, který se používá při BN-PAGE. U BN-PAGE se často využívá gradientového gelu, kde jakmile proteinový komplex dosáhne limitního rozměru pórů, se jeho pohyblivost v elektrickém poli významně sníží a je tím dosaženo dobrého rozlišení.

Již bylo zmíněno, že modrá nativní elektroforéza je schopná separovat multiproteinové komplexy v hmotnostním rozmezí od 10 kDa do 10000 kDa. Pro dělení proteinů v tak širokém rozmezí musí být použit pouze gradientový gel, jehož parametry jsou voleny podle povahy studovaných komplexů. Při BN-PAGE se používá vertikální elektroforetické jednotky s polyakrylamidovým dělicím gelem. Dělicí gel je překryt zaostřovacím gelem o nízké koncentraci s velkými póry (Reisinger & Eichacker, 2006, Schägger, 2003a). Složení gelu pro různá hmotnostní rozmezí separovaných proteinů udává tab. 1.

Tabulka 1 – Doporučené složení gelu pro BN-PAGE (podle Schägger, 2003a). V tabulce jsou uvedena doporučená koncentrační rozmezí gelu pro různá hmotnostní rozmezí separovaných proteinů.

Rozmezí molekulových hmotností (kDa)	Zaostřovací gel (%T)	Gradientový dělicí gel (%T)
50-10000	2,5-3,0	3→13
50-3000	3,5	4→13
50-1000	4,0	5→13
10-500	4,0	6→18

%T ... celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu

1.5.1. Množství nanášeného vzorku

Minimální množství vzorku, který můžeme použít pro BN-PAGE, se odvíjí od citlivosti metody, kterou budeme následně proteiny detekovat. Toto množství se pohybuje okolo 0,1-1 μg proteinů při barvení barvivem Coomassie blue a při kontrastování stříbrem lze nanášet na gel množství proteinů v řádu nanogramů. Naproti tomu maximální množství vzorku se pohybuje

okolo 200 μg . Je důležité zmínit, že jak pro minimální, tak i pro normální a maximální množství nanášeného vzorku je nutné zachovat stejný poměr detergent / protein a konečná koncentrace detergentu musí být zřetelně nad kritickou micelární koncentrací (CMC) specifickou pro daný detergent (Schägger, 2003a).

1.5.2. Podmínky elektroforézy

Modrá nativní elektroforéza zpravidla probíhá při 4 - 7 °C, protože při pokojových teplotách bylo pozorováno nežádoucí rozšiřování pásů (Schägger, 2003a). Elektroforéza se provádí ve vertikální aparatuře s katodovým pufrům obsahujícím barvivo Coomassie blue. Dokud vzorek nevstoupí ze zaostřovacího gelu do dělicího, je udržováno na elektroforetické aparatuře konstantní napětí 100 V (Schägger, 2003a). Napětí a proud, který se poté používá pro dělicí gel, se různí. Někteří autoři doporučují provádět tuto část elektroforézy při 500 V a 15 mA (viz Schägger, 2003a), jiní autoři se zmiňují o napětí 1000 V a proudu 12 mA (viz Reisinger & Eichacker, 2006). Jakmile čelo barviva Coomassie dosáhne přibližně třetiny až poloviny celkové délky dělicího gelu, provádí se výměna katodového pufru. Katodový pufr bývá vyměněn za pufr s desetinou koncentrací barviva Coomassie blue (Schägger, 2003a). Někteří autoři doporučují použití i bezbarvého pufru, tj. pufru bez barviva Coomassie blue (viz Reisinger & Eichacker, 2006). Přesná složení pufrů (a to jak katodového, tak i anodového) se liší podle autorů. Zpravidla však tmavý katodový pufr obsahuje 0,02 % barviva Coomassie blue a světlý katodový pufr obsahuje 0,002 % barviva Coomassie blue. Výměnou tmavého pufru za světlý je zajištěno odbarvení pozadí gelu a tedy snadnější vizuální zhodnocení výsledku elektroforézy. Jsou především lépe viditelné slabé a málo zřetelné pásy. Elektroforéza je ukončena, jakmile čelo migrujících částic dosáhne konce dělicího gelu. Dělicí gel může být následně použit pro několik aplikací: komplexy mohou být vizualizovány kontrastováním stříbrem nebo obarveny barvivem Coomassie blue, případně mohou být detekovány za pomoci specifických protilátek. Dále se gel může použít pro stanovení aktivity enzymů v gelu. Nejčastěji se gel používá pro rozdělení proteinových podjednotek multikomplexů ve druhém, denaturujícím rozměru elektroforézy.

2. 2D BN/SDS elektroforéza

2.1. Úvod

Význam dvourozměrné elektroforézy (2D), která je složena v prvním rozměru z modré nativní elektroforézy (BN) a v druhém rozměru z SDS elektroforézy v posledních několika letech značně stoupl. Používá se především k analýze membránových proteinových komplexů, jako jsou například membránové komplexy thylakoidních membrán chloroplastů (Granvogl et al., 2006). 2D BN/SDS elektroforéza je obecně velmi vhodnou elektroforetickou technikou pro systematickou proteomickou analýzu membránových komplexů. Tato technika umožňuje identifikaci membránových proteinů, které nemohly být identifikovány dřívějšími metodami. Umožňuje určit vzájemné protein-proteinové interakce v intaktních funkčních komplexech (Braun et al., 2007).

2.2. SDS elektroforéza

SDS elektroforéza (název odvozen od dodecylsírany sodného) je často využívána jako rozměr dvourozměrné elektroforézy. V dvourozměrném uspořádání elektroforézy je často jako první rozměr používána modrá nativní elektroforéza, která rozdělí multiproteinové komplexy v závislosti na jejich molekulové hmotnosti a velikosti a jako druhý rozměr je následně používána denaturující elektroforéza, která dokáže rozdělit proteinové komplexy na jejich jednotlivé proteiny. Existuje několik procedur SDS elektroforézy, které poskytují vynikající rozlišovací schopnosti. Například Laemmliho procedura (Laemmli, 1970) lépe separuje velké proteiny, zatímco tzv. tricínová procedura, ve které se narozdíl od Laemmliho procedury nahrazuje glycin tricínem, je častěji používána pro separaci malých proteinů a peptidů. Tyto dvě procedury pokrývají celé rozmezí molekulových hmotností proteinů. Nastavením vhodných podmínek elektroforézy je možné se vyhnout problémům, které jsou s dělením membránových proteinů spojeny, jako je například jejich shlukování během inkubace s SDS (Schägger, 2003b, Reisinger & Eichacker, 2007, Schägger & Von Jagow, 1987).

2.3. Výběr systému pro různá rozmezí molekulových hmotností

Někdy se může stát, že i přes snahu zvolit optimální proceduru, dochází během elektroforézy k nedostatečnému rozlišení dvou komigrujících proteinů. Vhodnou úpravou procedury (změnou koncentrace akrylamidu, rozštěpením disulfidových vazeb, přidáním močoviny nebo přidáním barviva Coomassie blue) je tedy možné ovlivnit pohyblivost proteinů a tím jejich separaci při elektroforetickém dělení.

2.3.1. Koncentrace akrylamidu

Jedním z důvodů komigrace dvou proteinů s různou molekulovou hmotností je skutečnost, že proteiny s vyšší hydrofobicitou obecně navazují menší počet molekul SDS a jsou tedy nositeli menšího záporného náboje. Jedním ze způsobů, jakým lze ovlivnit pohyblivost takovýchto dvou komigrujících proteinů, je provádění elektroforéz na gelech s různou koncentrací akrylamidu a tedy s různou velikostí otvorů v gelu. Proteiny, které komigrují v gelech určité koncentrace akrylamidu, nemusí komigrovat v gelech odlišné koncentrace akrylamidu (Schägger, 2003b).

2.3.2. Štěpení disulfidových vazeb

Někdy je komigrace dvou proteinů zapříčiněna přítomností disulfidové vazby mezi dvěma molekulami různých proteinů. K řádnému oddělení takto vázaných proteinů se provádí jejich denaturace v roztoku SDS za přítomnosti redukčního činidla. Takovými činidly jsou například merkaptoethanol a dithiothreitol (DTT) (Schägger, 2003b).

2.3.3. Vliv močoviny

Další možností, jak odstranit komigraci dvou proteinů, je přidání 6-8M močoviny do gelu. Močovina významně ovlivňuje pohyblivost jak malých, tak velkých membránových proteinů. Předpokládá se, že močovina ovlivňuje schopnost proteinů vázat SDS, případně má také vliv na konformaci proteinů. Některé proteiny v přítomnosti močoviny vykazují výrazně sníženou pohyblivost a s tím spojenou zdánlivě vyšší molekulovou hmotnost. Snížení pohyblivosti proteinů díky jejich interakci s močovinou lze využít pro zvýšení rozlišení malých proteinů. Při použití močoviny jsou však gely nepoužitelné pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů (Schägger, 2003b).

2.3.4. Vliv nahrazení SDS barvivem Coomassie blue

Jiný způsob ovlivnění migrace proteinů představuje přidání barviva Coomassie blue do vzorku proteinů před samotnou elektroforézou. Podstatou rozdílné migrace je skutečnost, že barvivo Coomassie blue částečně substituuje SDS. Proteiny poté migrují jako modré pásy podobně jako v modré nativní elektroforéze. Coomassie ovlivňuje pohyblivost sice málo, přesto je tato změna měřitelná. Tento způsob ovlivnění pohyblivosti však s sebou přináší určité nevýhody, a to především rozšiřování pásů nebo shlukování membránových proteinů (Schägger, 2003b).

2.4. Srovnání tricinové a Laemmliho procedury

Tricinová procedura poskytuje dobré rozlišovací schopnosti pro proteiny v hmotnostním rozmezí od 1 do 100 kDa. Je dobře použitelná jak pro malé, tak i pro velké proteiny pro preparativní účely, pro elektroeluci a elektroblotting. Je také dobře použitelná pro izolaci proteinů pro sekvencování od N-konce (Schägger, 2003b, Schägger & Von Jagow, 1987).

Porovnáním Laemmliho a tricinové procedury bylo zjištěno, že k tomu, abychom dosáhli stejného rozlišení jako u uniformního 10 % tricinového gelu, je třeba použít 10-20 % gradientový Laemmliho gel. Použitím uniformního Laemmliho gelu totiž dochází u malých proteinů k rozšiřování pásů. Naproti tomu Laemmliho procedura je nejčastěji používána pro dělení velkých proteinů. Jestliže při použití Laemmliho procedury dochází k rozšiřování pásů s malými proteiny, je nutné přejít na tricinovou proceduru (Schägger, 2003b). Složení gelu pro různá hmotnostní rozmezí ukazuje tab. 2.

Tabulka 2 – Doporučené složení gelu a doporučená procedura pro SDS-PAGE (podle Schägger, 2003b). Tabulka uvádí optimální koncentraci akrylamidu a nejvhodnější proceduru pro separaci vzorků s proteiny v různých hmotnostních rozmezích.

Hmotnostní rozmezí	Hmotnostní limit (kDa)	Optimální složení gelu, procedura
Široké	6,0-250	8-16 % gradient, Laemmli
	2,5-200	4-20 % gradient, Laemmli
	2,5-100	10 % uniformní, tricin
	1,0-70	16 % uniformní, tricin
Úzké	50-100	8 % uniformní, Laemmli
	40-80	10 % uniformní, Laemmli
	30-60	12 % uniformní, Laemmli
	5-50	10 % uniformní, tricin
	2-30	16 % uniformní, tricin
	1-20	16 % uniformní, tricin

2.5. Příprava vzorku pro druhý rozměr elektroforézy

Po proběhnutí prvního rozměru elektroforézy je nativní gel vyjmut z elektroforetické komory a promyt vodou. Poté je z gelu vyříznut pás proteinů, který odpovídá vzorku z jedné jamky a je inkubován v roztoku, který obsahuje SDS a případně i již zmíněná redukční činidla (merkaptoethanol, DTT). Po určité době inkubace je gel přenesen přímo na SDS gel a je spuštěna elektroforéza (Reisinger & Eichacker, 2006).

2.6. Podmínky elektroforézy

Podmínky pro SDS elektroforézu jsou závislé na typu elektroforetické aparatury, koncentraci akrylamidu, teplotě a na délce a tloušťce gelu. Elektroforéza se běžně provádí za pokojové teploty a bez intenzivního chlazení. Napětí je nastaveno na 200 V a proud limitován 50 mA. Jestliže během elektroforézy poklesne proud pod 50 mA, je vhodné nastavit napětí na 300 V (Schägger, 2003a). Poté, co proteiny vstoupí do dělicího gelu, může být napětí postupně zvyšováno za účelem zkrácení celkového času elektroforézy. Maximální napětí je však limitováno produkcí tepla (Schägger, 2003b).

2.7. Barvení proteinů po druhém rozměru

Proteiny jsou po druhém rozměru elektroforézy nejčastěji barveny barvivem Coomassie blue. Některé malé proteiny v hmotnostním rozmezí od 1 do 2 kDa však potřebují speciální předpřípravu (viz Schägger, 2003b). Proteiny však mohou být i kontrastovány stříbrem nebo obarveny fluorescenčními barvivy (Schägger, 2003a, Reisinger & Eichacker, 2007).

3. CN-PAGE

CN-PAGE, („colorless“ resp. „clear native polyacrylamide gel electrophoresis“), je elektroforetická technika, která byla vyvinuta pro separaci membránových proteinů krátce po uvedení BN-PAGE. Její provedení je téměř identické s BN-PAGE, avšak ani do vzorku, ani do katodového pufru se nepřidává barvivo Coomassie blue. Pomocí této techniky lze relativně úspěšně separovat kyselé proteiny se záporným nábojem (Wittig & Schägger, 2005, Schägger, 1994). V poslední době však tato technika prošla řadou změn, které jí umožňují i separaci bazických proteinů. Jednou z nich je použití aniontového detergentu deoxycholátu (Wittig & Schägger, 2008, Wittig & Schägger, 2009).

Protože při dřívějším způsobu provedení CN-PAGE nebyla používána žádná chemická sloučenina, která by ovlivňovala náboj proteinu (v případě BN-PAGE je touto sloučeninou barvivo Coomassie blue), závisela migrační vzdálenost proteinu pouze na záporném náboji, který protein získal na základě svého isoelektrického bodu a pH, při kterém byla elektroforéza prováděna. V případě CN-PAGE jsou pH podmínky elektroforézy srovnatelné s podmínkami BN-PAGE a je tedy zřejmé, že záporný náboj nutný k pohybu proteinu k anodě získaly pouze ty proteiny, které měly isoelektrický bod nižší než 7,0-7,5. V současné době je však častěji používán novější způsob provedení CN-PAGE. Při tomto způsobu provedení je do katodového pufru přidáván dodecylmaltosid a deoxycholát. Přítomnost deoxycholátu v pufru působí na proteiny podobně jako SDS, deoxycholát má však výrazně menší denaturační účinky. Všechny proteiny díky deoxycholátu získají záporný náboj a mohou migrovat směrem k anodě (Wittig & Schägger, 2008, Wittig & Schägger, 2009). Nevýhodou CN-PAGE je problém spojený s vizualizací proteinů, které neváží pigmenty. CN-PAGE poskytuje oproti BN-PAGE i určité výhody. Absence barviva Coomassie blue u CN-PAGE umožňuje lepší identifikaci proteinů metodami, při kterých přítomnost tohoto barviva má určitý rušivý vliv. V některých případech dovoluje i lepší kvantifikaci katalytické aktivity separovaných proteinů. Také se spekuluje o tom, že při BN-PAGE může dojít vlivem vazby barviva Coomassie blue na protein k disociaci některých velmi labilních multiproteinových komplexů, k čemuž u CN-PAGE docházet nemusí (Wittig & Schägger, 2005).

4. Shrnutí výhod modré nativní elektroforézy

1) Protože modrá nativní elektroforéza nepoužívá denaturující látky a používá jen jemné, neiontové detergenty, je ve většině případů zachován komplexní stav multiproteinového komplexu se zachováním jeho nativního stavu a enzymatické aktivity.

2) Díky použití detergentů, jako je Triton X-100, n-dodecyl- β -D-maltosid nebo digitonin, může dojít k úspěšné solubilizaci hydrofobních membránových proteinů, které mohou být následně elektroforeticky rozděleny. Jiné techniky, které nepoužívají tyto druhy detergentů, zpravidla nedokáží membránové proteiny úspěšně rozdělit.

3) Vazba barviva Coomassie blue posouvá isoelektrický bod proteinů do kyselé oblasti, tudíž při pH modré nativní elektroforézy jsou proteiny záporně nabity a mohou se v elektrickém poli pohybovat směrem k anodě. Barvivo Coomassie však zejména přispívá k celkovému zápornému náboji proteinů svým negativním nábojem.

4) Proteiny obarvené barvivem Coomassie blue získají modrou barvu a jsou tedy během elektroforézy viditelné jako modré pásy. To značně ulehčuje vizuální zhodnocení průběhu elektroforézy a případné následné vyjmutí určitých pásů s proteiny z gelu.

5. Pigment-proteinové komplexy thylakoidních membrán

Hlavním experimentálním zaměřením mé práce je možnost použití nativních elektroforéz pro separaci pigment-proteinových komplexů z thylakoidních membrán chloroplastů. Mezi tyto komplexy patří fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII), které jsou oba složeny z mnoha podjednotek s různými funkcemi a oba váží různá množství chlorofylu.

5.1. Fotosystém II

PS II je složen z mnoha menších podjednotek. Mezi ně patří především anténní pigmentový komplex, dále komplex reakčního centra s dimerem chlorofylu *a* (P680) a komplex periferních proteinů vázajících atomy manganu. Reakční centrum PS II je tvořeno heterodimerní jednotkou, která je složena ze dvou podobných 40 kDa proteinů, které se nazývají D1 a D2. Každý z nich obsahuje pět transmembránových helixů. Podjednotka D1 obsahuje tyrosinové residuum, které přebírá elektrony z komplexu štěpícího vodu a váže molekulu feofytinu a chinonu. D2 podjednotka obsahuje rovněž tyrosinové residuum a váže molekulu plastochinonu a chinonu. D1 a D2 proteiny jsou spojeny chlorofylovým dimerem P680. Obecnou funkcí těchto podjednotek D1 a D2 je koordinace atomů manganu v různých oxidačních stupních, které jsou obsaženy v komplexu zodpovědném za fotooxidaci vody. Nejsou v něm však obsaženy žádné molekuly chlorofylů ani jiných pigmentů. Oxidací vody jsou v tomto komplexu získávány elektrony, které jsou dále předávány do elektron-

transportního řetězce (Nelson & Ben-Shem, 2004, Lawlor, 2001). Celkové proteinové složení jaderného komplexu PSII je uvedeno v tab. 3.

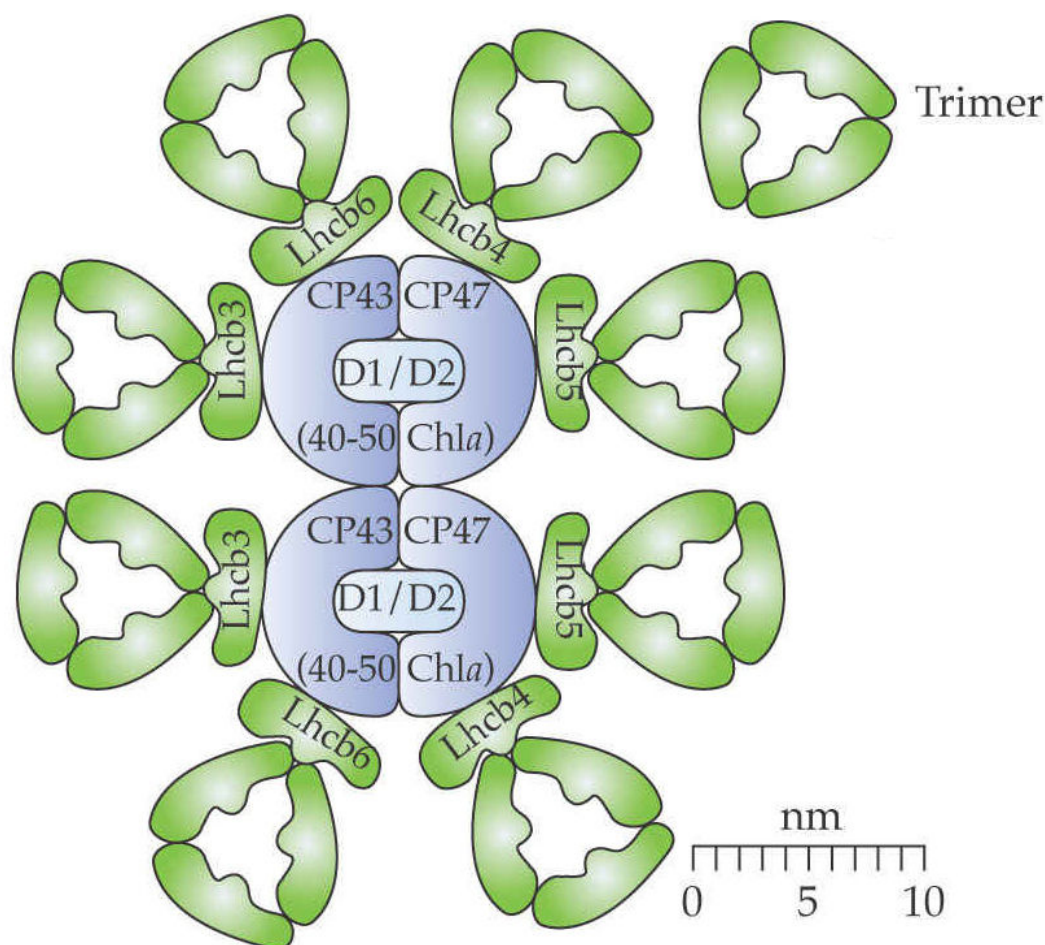
Tabulka 3 – Podjednotky jaderného komplexu PSII (podle Malkin & Niyogi, 2000). V tabulce je souhrn všech podjednotek centra PSII s uvedením názvu proteinu, označením jeho kódujícího genu, hmotnosti a funkce.

Název proteinu	Název kódujícího genu	Hmotnost proteinu (kDa)	Funkce
<i>Hydrofobní proteiny</i>			
D1	psbA	32	Protein reakčního centra
D2	psbD	34	Protein reakčního centra
CP47	psbB	51	Světlosběrná funkce
CP43	psbC	43	Světlosběrná funkce
PsbH-PsbN	psbH-psbN	3,8-10	Neznámá
22 kDa	psbS	22	Fotoprotekce
- Cyt <i>b</i> ₅₅₉			
α podjednotka	psbE	9	Neznámá
β podjednotka	psbF	4	Neznámá
<i>Hydrofilní proteiny</i>			
33 kDa	psbO	33	Produkce kyslíku
23 kDa	psbP	23	Produkce kyslíku
17 kDa	psbQ	17	Produkce kyslíku
10 kDa	psbR	10	Neznámá

Reakční centrum je obklopeno vnitřními světlosběrnými proteiny označovanými jako CP43 a CP47, z nichž každý obsahuje šest transmembránových hydrofobních helixů. První z nich váže 14 molekul chlorofylu *a* a na druhý je navázáno 16 molekul chlorofylu *a* (viz Nelson & Ben-Shem, 2004), jiní autoři zase tvrdí, že podjednotka CP47 obsahuje 20-22 molekul chlorofylu *a* a 2-4 molekuly β-karotenu a podjednotka CP43 obsahuje 20 molekul chlorofylu *a* a 5 molekul β-karotenu (viz Lawlor, 2001). Předpokládá se, že funkcí těchto dvou podjednotek je přenos excitační energie do reakčního centra (Lawlor, 2001).

Nejpodstatnější část molekul chlorofylů PS II je vázána ve vnějším, periferním světlosběrném anténním komplexu nazývaném jako LHCI. LHCI je trimer tvořený třemi světlosběrnými podjednotkami nazývanými Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 a je zajímavým faktem, že tento trimer může obsahovat různá množství různých podjednotek. Tzn. že nemusí vždy obsahovat jednu kopii každé podjednotky. Tyto jednotlivé podjednotky se navzájem liší svou strukturou a každá z nich obsahuje 12-14 molekul chlorofylů *a* a *b* a přibližně 4 molekuly karotenoidů, mezi které patří β-karoten, lutein, violaxanthin a neoxanthin. Mezi trimery LHCI

a reakčním centrem PSII jsou přítomny minoritní světlosběrné proteiny Lhcb6, Lhcb5 a Lhcb4, které jsou alternativně označeny jako CP24, CP26 a CP29. Svou strukturou jsou velmi podobné monomerům trimeru LHCII a jejich funkcí je přenos excitační energie z LHCII na podjednotky CP43 a CP47. Celkové množství molekul chlorofylů *a* a *b*, které připadá na jedno reakční centrum, je přibližně 250. Ve funkčních thylakoidních membránách tvoří PSII dimery (Nelson & Ben-Shem, 2004, Lawlor, 2001). Schéma komplexního uspořádání PS II je zobrazeno na obr.1. PS II je v chloroplastech lokalizován v granální části thylakoidů a z thylakoidní membrány vyčnívá do lumenální oblasti (Malkin & Niyogi, 2000, Nelson & Ben-Shem, 2004).



Obrázek 1 - Uspořádání fotosystému II (Malkin & Niyogi, 2000), upraveno. Uprostřed schématu je dimer reakčního centra, které je tvořeno podjednotkami D1, D2, CP43 a CP47. Tento dimer je bezprostředně obklopen minoritními světlosběrnými proteiny, na které zvnějšku nasedají trimery LHCII.

5.2. Fotosystém I

Fotosystém I (PSI) je podobně jako PS II složen z reakčního centra a světlosběrného komplexu. Reakční centrum tohoto fotosystému obsahuje velké množství podjednotek. Někteří

autoři (viz. Nelson & Ben-Shem, 2004) uvádějí, že jich obsahuje 12-14 s označením PsaA – PsaL, PsaN a PsaO. Jiní autoři (viz. Lawlor, 2001) zase uvádějí, že počet těchto podjednotek je 13, z nichž sedm jich je vnějších a hydrofilních a šest jich je vnitřních a hydrofobních. Všechny tyto podjednotky se podílí na různých funkcích. Podjednotky podílející se na tvorbě PSI jsou shrnuty v tab. 4.

Tabulka 4 – Podjednotky reakčního centra PSI (podle Malkin & Niyogi, 2000). V tabulce jsou shrnuty všechny podjednotky centra PSI s uvedením názvu proteinu, označením jeho kódujícího genu, hmotnosti a funkce.

Název proteinu	Název kódujícího genu	Hmotnost proteinu (kDa)	Funkce
<i>Hydrofobní proteiny</i>			
PsaA	psaA	83	Protein reakčního centra
PsaB	psaB	82	Protein reakčního centra
PsaG	psaG	11	Neznámá
PsaI	psaI	4	Neznámá
PsaJ, PsaM	psaJ, psaM	5; 3,5	Neznámá
PsaK, PsaL	psaK, psaL	8,4; 18	Neznámá
<i>Hydrofilní proteiny</i>			
<i>- Stromální orientace</i>			
PsaC	psaC	9	Fe-S apoprotein
PsaD	psaD	18	Vazba ferredoxinu
PsaE	psaE	10	Cyklický el. transport
PsaH	psaH	10	Vazba LHCI
<i>- Lumenální orientace</i>			
PsaF	psaF	17	Vazba plastocyaninu
PsaN	psaN	10	Neznámá

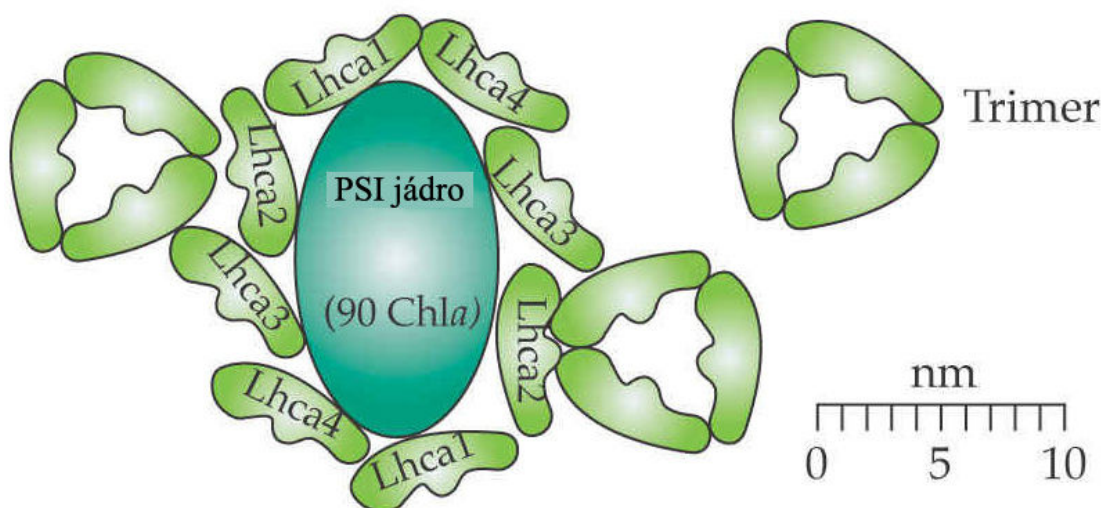
Ústředím reakčního centra PS I je heterodimer tvořený proteiny PsaA a PsaB. Na tento dimer je navázaný pigment P700, což je podobně jako u PSII dimer chlorofylu *a*. Reakční centrum obsahuje také molekulu chlorofylu *a*, která slouží jako elektronový akceptor, molekulu fylochinonu a sirno-železnatý klastr se stechiometrií částic Fe₄-S₄. Tento ústřední dimer také obsahuje 80-100 molekul chlorofylu *a* plnící světlosběrnou funkci.

Podjednotka PsaC slouží k vázání konečných součástí elektron-transportního řetězce, kterými jsou další dva již zmíněné sirno-železnaté klastry. Podjednotky PsaE, PsaD a také PsaC se účastní vazby ferredoxinu a podjednotka PsaF váže plastocyanin. Podjednotky PsaK, PsaG, PsaJ a PsaF zajišťují propojení reakčního centra se světlosběrným komplexem LHCI a podjednotky PsaI, PsaH a PsaL vážou LHCI. Všechny podjednotky PsaC - PsaO dále obecně

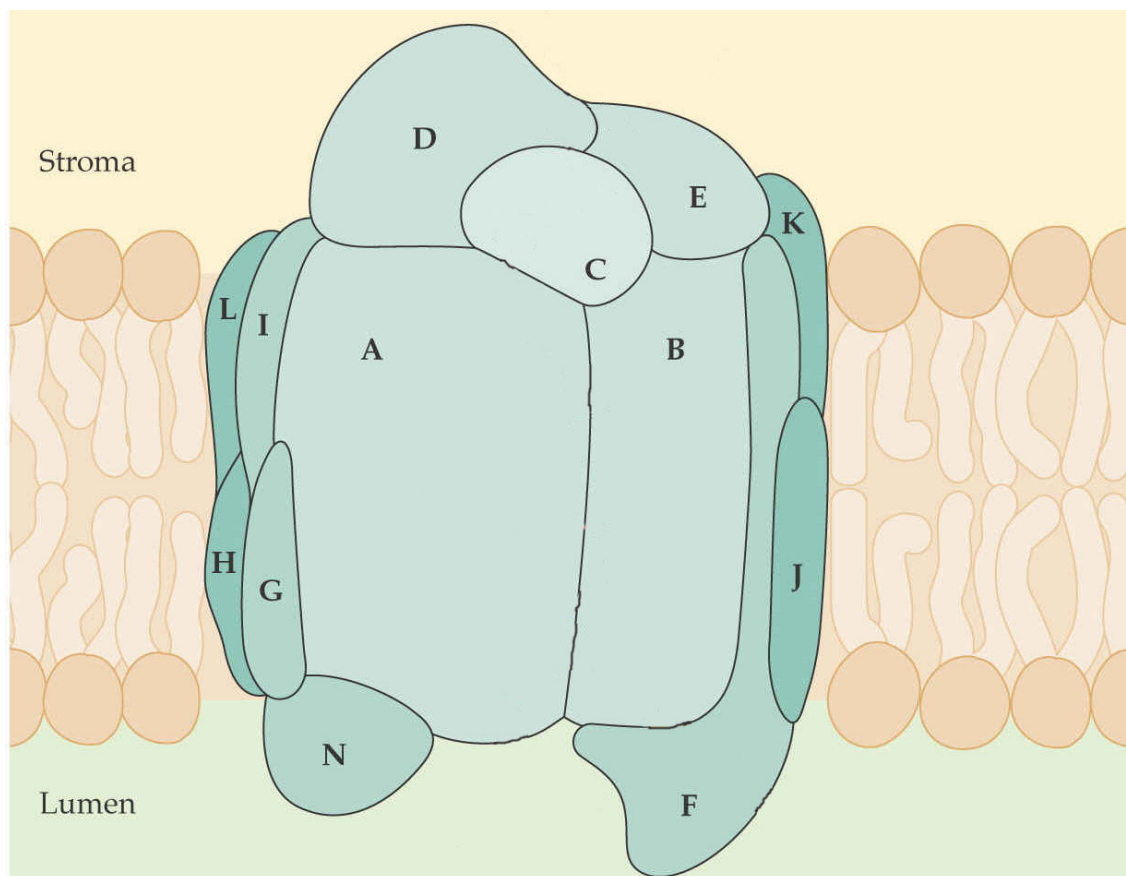
zajišťují zachování komplexnosti systému a mají pravděpodobně i další funkce, které nám prozatím zůstávají utajeny (Nelson & Ben-Shem, 2004, Lawlor, 2001).

Podobně jako PS II, je i PS I obklopen vnějším periferním světlosběrným komplexem, který se označuje jako LHCI a obsahuje molekuly chlorofylů *a* a *b*, dále molekuly luteinu, β -karotenu a violaxanthinu (Fromme et al., 2003). Tento anténní komplex je tvořen čtyřmi různými pigment-proteiny označovanými jako Lhca1 - Lhca4. Bylo zjištěno, že se tyto čtyři proteinové podjednotky spojují do dvou dimerů, který tvoří půlměsícovitý pás okolo reakčního centra. Tento pás je u reakčního centra přidržován interakcí s podjednotkou Psf. Na PS I je také navázán LHCII. Je také důležité poznamenat, že na rozdíl od PSII je většina chlorofylových molekul v PSI vázána právě v reakčním centru (Nelson & Ben-Shem, 2004, Lawlor, 2001, Fromme et al., 2003).

PS I se nachází v oblasti stromálních thylakoidů a z thylakoidní membrány příliš nevyčnívá (Nelson & Ben-Shem, 2004, Malkin & Niyogi, 2000). Schéma uspořádání PSI a LHCII znázorňuje obr.2 a uspořádání podjednotek reakčního centra PSI ukazuje obr. 3.



Obrázek 2 - Uspořádání fotosystému I (Malkin & Niyogi, 2000), upraveno. V centru obrázku se nachází jádro PSI (jeho přesné složení viz. obr. 3), které je obklopeno LHCI. Zvnějšku jsou vázány trimery LHCII.



Obrázek 3 - Uspořádání podjednotek reakčního centra fotosystému I (Malkin & Niyogi, 2000), upraveno. Obrázek znázorňuje prostorové uspořádání jednotlivých proteinových podjednotek reakčního centra PSI. Písmena v obrázku odpovídají označení podjednotek tak, jak je uvedeno v kap. 5.2.

5.3. Pozice podjednotek fotosystémů I a II v elektroforetogramech po 2D BN/SDS-PAGE

Pigment-proteinové komplexy z thylakoidních membrán chloroplastů mohou být separovány různými separačními metodami. Pro separaci se s výhodou používají nativní elektroforézy využívající různých detergentů. Přehled elektroforetických metod využívaných ke studiu pigment-proteinových komplexů v thylakoidních membránách je uveden v práci Lípové (Lípová, 2004). V poslední době se v odborné literatuře vyskytuje řada prací využívajících BN-PAGE pro separaci pigment-proteinových komplexů s nejvyšším stupněm intaktnosti. Příklad elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů z thylakoidních membrán ječmene jarního (*Hordeum vulgare*) solubilizovaných dodecylmaltosidem je uveden na obr. 4.

Pokud se zaměříme pouze na součásti fotosystému I a II, dojde během prvního rozměru elektroforézy pigment-proteinových komplexů získaných z thylakoidních membrán chloroplastů k následujícímu rozdělení proteinových komplexů (viz horní část obr. 4). Nejblíže ke startu

elektroforézy se zachytí superkomplexy fotosystémů I a II, za nimi následuje kompletní PSI spolu s dimerem jádra PSII. Následuje PSI, který je ochuzen o některé proteinové jednotky. Dále následuje monomer jádra PSII a jádro PSII bez podjednotky CP43. Na posledních, od startu nejvzdálenějších místech, jsou přítomny trimery LHCII, LHC I a nakonec monomery LHCII (Ciambella et al., 2005).

Analýza gelu v druhém rozměru prozradila následující podjednotkové složení separovaných komplexů (viz spodní část obr. 4) (Ciambella et al., 2005):

- Superkomplexy, které jsou v prvním rozměru málo zřetelné, obsahují zejména jádro fotosystému II (*PsbA (D1)*, *PsbD (D2)*, *PsbC (CP43)*, *PsbB (CP47)*) s navázanými pigment-proteiny *Lhcb1* a *Lhcb2*.
- Analýza pásu s fotosystémem I a dimerem reakčního centra fotosystému II prozradila přítomnost podjednotek reakčního centra PSI *PsaA*, *PsaB*, *PsaC*, *PsaD*, *PsaE*, *PsaF*, *PsaG*, *PsaH*, *PsaJ*, *PsaK*, *PsaL* a podjednotky světlosběrného komplexu LHCI *Lhca1*, *Lhca2*, *Lhca3* a *Lhca4*. Dále byly přítomny podjednotky reakčního centra PSII *PsbA (D1)*, *PsbD (D2)*, *PsbC (CP43)*, *PsbB (CP47)* i s podjednotkami *PsbF* a *PsbL*.
- Při porovnání pásu s „ochuzeným“ fotosystémem I a pásu s kompletním fotosystémem I je patrné, že u pásu s ochuzeným fotosystémem I chybí podjednotky *PsaC*, *PsaD*, *PsaE*, *PsaF*, *PsaG*, *PsaJ*, *PsaF*, *PsaL* a podjednotky *Lhca2*, *Lhca3* a *Lhca4*.
- Pás s monomerem reakčního centra fotosystému II obsahoval podjednotky *PsbA (D1)*, *PsbD (D2)*, *PsbC (CP43)*, *PsbB (CP47)* a podjednotky *PsbE* a *PsbZ*.
- Komplex fotosystému II bez podjednotky CP43 obsahoval pouze podjednotky *PsbA (D1)*, *PsbD (D2)*, a *PsbB (CP47)*.
- Trimer LHCII byl složen z podjednotek *Lhcb1*, *Lhcb2* a *Lhcb3*.
- Pás s LHCI obsahoval podjednotky *Lhca1*, *Lhca2*, *Lhca3* a *Lhca4*.
- Monomerní LHCII se skládal z podjednotek *Lhcb1*, *Lhcb2*, *Lhcb3*, *Lhcb4*, *Lhcb5* a *Lhcb6* a byla přítomna i podjednotka *PsbS*.

K podobným závěrům jako Ciambella et al., 2005 došli i jiní autoři (viz Heinemeyer et al., 2004, Rexroth et al., 2003, Chen et al., 2007).



Obrázek 4 - Ilustrativní znázornění výsledku 2D BN/SDS-PAGE s označením jednotlivých podjednotek komplexů (Ciambella et al., 2005), upraveno. Popis obrázku uveden v předchozím textu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Použitý materiál

6.1. Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál pro izolaci thylakoidních membrán byly použity rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* var. *Medulare*), které byly pěstovány hydroponicky na inertním nosiči (perlitu). Rostliny byly zalévány Knopovým roztokem. Pěstování probíhalo ve fytochomře JumoILP F200 (Snijders Scientific, Tilburg, Nizozemí). Rostliny byly pěstovány v režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Intenzita světla $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fotosynteticky aktivního záření (400 - 700 nm). Pěstování probíhalo při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti 60 – 65 % po dobu 4 týdnů. Pro izolaci thylakoidních membrán byly vybírány pouze nepoškozené, dobře vyvinuté listy hrachu.

6.2. Knopův roztok

Pro zalévání rostlin byl používán Knopův roztok, který byl připraven tak, že do 950 ml deionizované vody bylo přidáno po 10 ml od každého z pěti zásobních roztoků (viz tab. 5) a nakonec byly přidány 3 kapky 50 % FeCl_3 .

Tabulka 5 - Zásobní roztoky pro přípravu Knopova roztoku.

Chemická sloučenina	Množství látky (g/l zásobního roztoku)
KCl	7,1
KH_2PO_4	14,3
KNO_3	14,3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	57,2
MgSO_4	14,3

7. Použité chemikálie

2-(N-Morpholino)ethansulfonová kyselina	Sigma
2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol	Biorad
2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol	Fluka
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina	Sigma
Akrylamid	Biorad
Aminokapronová kyselina	Sigma
Askorbát sodný	Sigma
Bisakrylamid	Biorad
BSA	Sigma
Deoxycholát sodný	Sigma
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
Dithiothreitol	Fluka
Dodecylsírán sodný	Fluka
Dodecyl- β -D-maltosid	Appllichem
Dusičnan draselný	Lachema
Dusičnan vápenatý, tetrahydrát	Hichem
Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl	Sigma
Glycerol	Penta
Glycin	Sigma
Hydroxid sodný	Lach:ner
Chlorid draselný	Lachema
Chlorid hořečnatý, hexahydrát	Lach:ner
Chlorid sodný	Lachema
Chlorid vápenatý	Lachema
Chlorid železitý	Aldrich
Kyselina chlorovodíková	Lach:ner
Methanol	Lachema
Močovina	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Biorad
Octová kyselina	Lachema
Persírán amonný	Biorad
Sacharosa	Lachema
Serva G-250 (ekvivalent Coomassie brilliant blue)	Serva
Sírán hořečnatý	Lachema
Tricin	Biorad

8. Použité metody

8.1. Izolace thylakoidních membrán

Thylakoidní membrány byly izolovány podle protokolu uvedeného v pracích Dau et al., 1995 a Hideg, 1994 s několika úpravami. Listy hrachu byly vloženy do homogenizační nádoby, přestříhány nůžkami a přelity homogenizačním pufrem (viz tab. 6), který byl vychlazen na 0 °C. Homogenizace byla provedena pomocí homogenizátoru T25basic (IKA Labortechnik, Staufen, Německo) ve třech pětivteřinových intervalech při otáčkách 13500 min⁻¹. Homogenizované listy hrachu byly následně přefiltrovány přes čtyři vrstvy silonové sítě (velikost oka 40 µm). Filtrát byl poté rozdělen do čtyřech 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován v centrifuze 3K30 (Sigma, Osterode am Harz, Německo). Centrifuga s příslušným rotorem byla vychlazená na 4 °C a centrifugace probíhala po dobu 6 minut při 5000 g. Supernatant byl odlit a pelet byl resuspendován v resuspendačním pufru I (viz tab. 6) při teplotě 0 °C. Resuspendovaný pelet byl rozdělen do dvou 50 ml kyvet a centrifugován při 4 °C po dobu 10 minut při 5000 g. Po centrifugaci byl supernatant opět odlit a pelet byl resuspendován v resuspendačním pufru II (viz tab. 6) vychlazeném na 0 °C. Tento resuspendovaný pelet byl opět centrifugován při 4 °C po dobu 3 minut při 200 g, aby byl odstraněn případný škrob. Supernatant po této centrifugaci byl přelit do čistých kyvet a centrifugován při 4 °C po dobu 5 minut při 5000 g. Supernatant byl po centrifugaci odlit a pelet resuspendován v minimálním množství resuspendačního pufru II (cca 1 ml), který byl vychlazen na 0 °C. Takto připravená suspenze thylakoidních membrán byla rozpipetována do malých mikrozkušavek a uložena v -80 °C v hlubokomrazícím boxu. Veškerá práce probíhala při slabém zeleném světle a všechny materiál byl v průběhu izolace uchováván na ledové lázni.

Tabulka 6 - Složení pufrů pro izolaci thylakoidních membrán.

	Chemikálie	Koncentrace
Homogenizační pufr (pH 7,2)	Sacharosa	400 mM
	HEPES	35 mM
	NaCl	400 mM
	MgCl ₂	4 mM
	Askorbát sodný*	5 mM
	BSA*	2 mg/ml
Resuspendační pufr I (pH 7,5)	HEPES	25 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl ₂	8 mM
	Na-EDTA	1 mM
Resuspendační pufr II (pH 7,2)	Sacharosa	400 mM
	HEPES	50 mM
	NaCl	15 mM
	MgCl ₂	5 mM

*Přidává se těsně před použitím

8.2. Určení koncentrace chlorofylů

Celková koncentrace chlorofylů *a* a *b* v suspenzi thylakoidních membrán byla stanovena spektrofotometricky podle práce Lichtenthalera (1987). Vhodné množství suspenze thylakoidních membrán bylo smícháno s 2 ml 80 % acetonu a centrifugováno při laboratorní teplotě po dobu 5 minut při 5000 g na centrifuze MPW-310 (Mechanika Precyzyjna, Warszawa, Polsko). Absorbance supernatantu (pigmentového extraktu) byla měřena pomocí spektrofotometru UV550 (Thermo Spectronic, Rochester, USA) při vlnových délkách 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm. Pro určení koncentrace chlorofylů v extraktu byly použity Lichtenthalerovy rovnice (Lichtenthaler, 1987):

$$c_a = 12,25(A_{663,2} - A_{750}) - 2,79(A_{646,8} - A_{750})$$

$$c_b = 21,50(A_{646,8} - A_{750}) - 5,10(A_{663,2} - A_{750})$$

c_a ... koncentrace chlorofylu *a* v µg/ml

c_b ... koncentrace chlorofylu *b* v µg/ml

Měření absorbance pigmentového extraktu při vlnové délce 750 nm bylo použito pro korekci rozptylu vzorku.

8.3. Solubilizace thylakoidních membrán a příprava vzorku pro BN-PAGE

Thylakoidní membrány izolované z rostlin hrachu setého (*Pisum sativum*) byly pro elektroforetickou separaci solubilizovány dodecyl-β-D-maltosidem (DM) při hmotnostním poměru DM:chlorofyl 40:1. Do mikrozkušavky byl nejdříve napipetován B-pufr (složení

0,025 M MES/NaOH, 0,010 M MgCl₂, 0,010M CaCl₂ a 25% glycerol, pH 6,5) a 10 % dodecyl-β-D-maltosid a do této směsi byla následně přidána suspenze thylakoidních membrán. Množství suspenze thylakoidních membrán bylo zvoleno tak, aby odpovídalo vhodnému množství chlorofylu potřebného pro elektroforetickou separaci pigment-proteinových komplexů, množství napipetovaného dodecylmaltosidu bylo takové, aby odpovídalo výše zmíněnému hmotnostnímu poměru DM:chlorofyl a množství B-pufry bylo zvoleno tak, aby doplnilo celkový objem směsi DM a suspenze thylakoidních membrán na objem potřebný k nanášení do jamek gelu. Celková směs B-pufry, dodecylmaltosidu a suspenze thylakoidních membrán byla poté centrifugována při 4 °C po dobu 10 minut při 22000 g v centrifuze 3K30 (Sigma, Osterode am Harz, Německo). Účelem centrifugace bylo odstranění nesolubilizovaného materiálu.

Supernatant byl po centrifugaci použit pro přípravu konečného vzorku. Supernatant byl z mikrozkušavky odebrán a přenesen do čisté mikrozkušavky, ve které byly již napipetovány 3 μl tzv. nanášecího roztoku (složení nanášecího roztoku bylo 0,75 M ACA, 5 % Coomassie blue). Takto vytvořená směs solubilizovaných thylakoidních membrán a nanášecího roztoku byla jemně promíchána a použita k nanášení do jamek gelu.

Pro přípravu vzorku byla použita suspenze thylakoidních membrán o celkové koncentraci chlorofylů 733 μg/ml a na jednu jamku bylo celkem nanášeno 16,4 μl suspenze, což odpovídá 12 μg chlorofylů. Dále bylo použito takové množství B-pufry, aby celkový objem vzorku byl 30 μl*.

8.4. BN-PAGE

Pro první rozměr elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů byla použita modrá nativní elektroforéza s gradientovým dělicím polyakrylamidovým gelem (R), který byl shora překryt zaostřovacím gelem (S) a zespodu byl nastaven uniformním nadstavovacím gelem (F). Tloušťka gelu byla 1 mm. Pro přípravu gelu byly namíchány roztoky podle tab. 7. Nadstavovací 8 % gel byl nalit do poloviny celkové délky dělicího gelu a jeho funkcí bylo pouhé vyplnění prostoru, protože při elektroforetické separaci vzorku na celé délce gelu by došlo k výraznému rozšíření pásů. Nad tímto nadstavovacím gelem byl následně vytvořen 4 – 8 % gradientový gel. Výška 4 % zaostřovacího gelu mezi dnem jamky a rozhraním S/R byla 5 mm.

* Celkovým objemem vzorku je myšlen součet objemů suspenze thylakoidních membrán a B-pufry. Pro konečnou přípravu vzorku bylo použito takové množství nanášecího roztoku, které odpovídalo 1/10 celkového objemu vzorku. Roztoku DM bylo použito takové množství, aby byl dodržen solubilizační poměr 40:1.

Tabulka 7 - Rozpis na přípravu gelu pro první rozměr elektroforézy. 8 % F: roztok pro přípravu nastavovacího gelu; 4 % R, 8 % R: roztoky pro přípravu gradientového dělicího gelu; 4 % S: roztok pro přípravu zaostřovacího gelu.

	8 % F	4 % R	8 % R	4 % S
Glycerol (ml)	-	-	1,30	-
Gelový pufr (ml)	2,15	1,10	1,10	0,85
Voda (ml)	8,65	4,85	3,00	3,70
50 % roztok akrylamidu (ml)	2,10	0,50	1,05	0,40
TEMED (ml)	0,013	0,007	0,007	0,005
10 % APS* (ml)	0,065	0,033	0,033	0,025

*přidává se těsně před naléváním gelu

Pro přípravu roztoků na přípravu gelu a pro celkový průběh elektroforézy byly namíchány následující zásobní roztoky:

- 50 % roztok akrylamidu: 50 % T, 1,33 % C (na celkový objem 100 ml bylo použito 48,67 g akrylamidu a 1,33 g bisakrylamidu), T ... celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C... koncentrace bisakrylamidu
- Gelový pufr (pH 7,0), 6x koncentrovaný: 3M aminokapronová kyselina (ACA), 0,3M Bis-Tris/HCl
- Katodový pufr (pH 7,0), 10x koncentrovaný: 0,5M Tricin, 150mM Bis-Tris/HCl. Pro elektroforézu byly ředěním koncentrovaného katodového pufru připraveny dva roztoky: pufr s barvivem Coomassie blue s celkovou koncentrací barviva 0,02 % a pufr bez tohoto barviva
- Anodový pufr (pH 7,0): 0,05M Bis-Tris/HCl
- Roztok APS: 10 % persíran amonný

Následně byla sestavena aparatura pro nalévání gelu s 1 mm distančními pásky, jejíž skla byla řádně očištěna a jejíž těsnost byla po sestavení ověřena pomocí vody. Prostor mezi skly byl po vylití vody vysušen filtračním papírem. Poté byl nalit 8 % nastavovací gel, který byl následně převrstven vodou. Po jeho polymeraci byla voda odlita a nad tento nastavovací gel byl nalit gradientový dělicí gel. Pro přípravu gradientu polyakrylamidu byla použita gradientová aparatura s peristaltickou pumpou PCD21 (Kouřil, Kyjov, Česká republika). Celá aparatura byla nejprve promyta vodou. Do komory dále od výpusti byl nalit 4 % R gel a do komory blíže k výpusti byl nalit 8 % R gel. Oba roztoky byly intenzivně míchány, byl do nich přidán roztok APS a asi po jedné minutě míchání byl otevřen kohout a spuštěna pumpa, čímž došlo k vytvoření gradientového gelu. Gradientový gel byl po nalití překryt vodou. Po ztuhnutí gradientového gelu (přibližně po 30 minutách) byla voda odlita, nad gel byl vložen hřebínek a nalit 4 % zaostřovací gel s rozmíchaným APS (viz tab. 7). Poloha hřebínku byla upravena tak,

aby mezi dnem jamky a rozhraním S/R zůstala mezera 5 mm a aby pod hřebínkem nezůstaly žádné vzduchové bubliny.

Po polymerizaci zaostřovacího gelu byla sestavena elektroforetická aparatura Protean II xi Cell (Biorad, Hercules, USA). Byl opatrně vyjmut hřebínek a jamky byly dvakrát promyty vodou. Poté byla do aparatury nalita část katodového pufru s barvivem Coomassie blue (tolik, aby došlo k zaplavení jamek) a následně byl do jamek nanesen vzorek solubilizovaných thylakoidních membrán připravený podle postupu, který je uveden v kap. 8.3. Po nanesení vzorku do jamek gelu byly dolity potřebné pufrы a byla spuštěna elektroforéza. Jakmile čelo migrujících částic dosáhlo poloviny celkové délky gradientového gelu, byl vyměněn modrý katodový pufr za bezbarvý (viz výše).

Modrá nativní elektroforéza probíhala při 4 °C a ve tmě. Jako zdroj elektrického proudu byl použit Powerpac 1000 (Biorad, Philadelphia, USA). Dokud proteinové komplexy neprošly zaostřovacím gelem, byl na elektroforetické aparatuře udržován proud 7 mA a napětí bylo nastaveno na limit 350 V. Tento proces probíhal po dobu 30 minut. Poté byl proud zvýšen na 15 mA a napětí nastaveno na limit 1000 V. Jakmile čelo migrujících částic dosáhlo poloviny délky gradientového gelu (přibližně po 1,5 hodině), byla elektroforéza přerušena a došlo k výměně katodového pufru. Následně byl na elektroforetické aparatuře opět nastaven proud 15 mA a napětí nastaveno na limit 1000 V. Poté, co čelo migrujících částic dosáhlo rozhraní mezi gradientovým a nastavovacím gelem, byla elektroforéza ukončena, gel vyjmut a skenován.

8.5. Skenování gelu po prvním rozměru

Gel po prvním rozměru byl skenován na prosvětlovacím skeneru, jehož konstrukce je popsána v práci Ilíka et al., 2002. Pro skenování bylo použito monochromatické záření o vlnové délce 680 nm.

8.6. SDS-PAGE

Pigment-proteinové komplexy separované v prvním rozměru elektroforézy byly rozděleny na své proteinové podjednotky denaturující SDS elektroforézou, pro kterou byl použit 12 – 19,5 % gradientový dělicí gel (R). Ten byl překryt 5 % zaostřovacím gelem (S). Celková tloušťka gelu byla 1,5 mm. Roztoky pro přípravu gradientového i zaostřovacího gelu byly namíchaný podle rozpisu v tab. 8. Pro vytvoření gradientu i pro průběh samotné elektroforézy byla použita stejná zařízení jako při nativní elektroforéze.

Tabulka 8 - Rozpis na přípravu jednoho gelu pro druhý rozměr. 12 % R, 20 % R: roztoky pro přípravu gradientového dělicího gelu; 5 % S: roztok pro přípravu zaostřovacího gelu.

	12 % R	20 % R	5 % S
Sacharosa (g)	-	1,8	-
Močovina (g)	7,7	7,7	-
Gelový pufr (ml)	4,20	4,20	1,20
Voda (ml)	3,90	-	3,25
50 % roztok akrylamidu (ml)	4,45	7,20	0,50
TEMED (ml)	0,009	0,009	0,005
10 % APS* (ml)	0,090	0,090	0,025

*přidává se těsně před naléváním gelu

Pro přípravu gradientového a zaostřovacího gelu a pro celkový průběh elektroforézy byly připraveny následující roztoky:

- Roztok akrylamidu (AB): 50 % T, 1,33 % C (na 100 ml roztoku bylo použito 48,67 g akrylamidu a 1,33 g bisakrylamidu). T... celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C... koncentrace bisakrylamidu
- Gelový pufr (pH 8,6): 2,8M Tris/HCl
- Katodový pufr, 10x koncentrovaný: 250mM Tris/HCl, 1,92M glycin, 1 % SDS
- Anodový pufr (pH 8,3): 0,025M Tris/HCl
- Roztok APS: 10 % persíran amonný
- SDS pufr (pH 7,5): 25mM Tris/HCl, 1% SDS (před použitím bylo přidáno 1 % DTT)
- Barvicí roztok: 45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,1 % Coomassie blue
- Odbarvovací roztok: 10 % kyselina octová

Gel z prvního rozměru byl nařezán na jednotlivé pásy, které odpovídaly rozděleným komplexům z jedné jamky. Vybraný pásek byl po vyříznutí po dobu 20 minut při laboratorní teplotě inkubován v SDS pufru. Mezitím byla zkompletována elektroforetická aparatura a nad SDS gel byl nalit katodový pufr. Nad SDS gel byl poté vložen pásek z prvního rozměru elektroforézy a jeho poloha byla upravena tak, aby mezi ním a zaostřovacím gelem SDS gelu nezůstaly žádné vzduchové bubliny. Poté byly dolity potřebné pufrы a spuštěna elektroforéza.

Teplota byla během elektroforézy udržována na 22 °C a jako zdroj elektrického proudu byl použit zdroj Powerpac 1000 (Biorad, Philadelphia, USA). Dokud proteiny z pásku z prvního rozměru nevstoupily do zaostřovacího gelu a dokud tímto gelem neprošly, byl na elektroforetické aparatuře udržován proud 10 mA a napětí nastaveno na limit 200 V (celková

doba byla 30 minut). Poté byl proud zvýšen na 20 mA a napětí nastaveno na limit 350 V. Po 10 hodinách byla elektroforéza ukončena.

Po ukončení elektroforézy byl gel z elektroforetické aparatury vyjmut a po dobu 20 minut promýván ve vodě. Po promytí proběhlo barvení proteinů přítomných v gelu inkubací gelu v barvicím roztoku, které probíhalo po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po obarvení bylo provedeno trojnásobné vymytí barviva z gelu pomocí odbarvovacího roztoku. První dvě vymývání probíhaly po dobu 2 hodin, třetí vymývání probíhalo přes noc. Po vymytí barviva z gelu byl gel 20 minut promýván ve vodě a následně skenován pomocí 2D skeneru Image scanner Powerlook 1120 USG (Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko).

8.7. CN-PAGE

Pro provedení CN-PAGE byl použit shodný postup i materiál jako pro BN-PAGE. Byl použit shodný typ gelu i shodné pufrů, pouze katodový pufr neobsahoval žádné barvivo Coomassie blue a byl do něj přidán deoxycholát sodný (výsledná koncentrace 0,05 %) a dodecyl- β -D-maltosid (výsledná koncentrace 0,02 %). Příprava vzorku pro elektroforézu probíhala podle postupu, který je uveden v kap. 8.3. s tím rozdílem, že nebyl použit nanášecí roztok. Pro solubilizaci byla použita rovněž suspenze thylakoidních membrán o celkové koncentraci chlorofylů 733 $\mu\text{g/ml}$, ale na jednu jamku bylo nanášeno množství 10,9 μl suspenze, což odpovídalo 8 μg chlorofylů. Celkový objem vzorku byl stejně jako v případě BN-PAGE 30 μl . Takto připravený vzorek byl nanášen do jamek a byla spuštěna elektroforéza. Podmínky průběhu elektroforézy byly shodné s podmínkami BN-PAGE s tím rozdílem, že v průběhu elektroforézy nebyl měněn katodový pufr.

8.8. Detekce fluorescence chlorofylu

Gel po CN-PAGE byl skenován ve fluorescenčním analyzátoru Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japonsko). Excitace chlorofylů byla vyvolána zářením o vlnové délce 460 nm a detekce fluorescence probíhala za pomoci filtru propouštějícího pouze vlnové délky delší než 670 nm. Detekce probíhala za běžné laboratorní teploty.

8.9. Vysokoteplotní stres thylakoidních membrán

Pro CN-PAGE byly použity vzorky s pigment-proteinovými komplexy z thylakoidních membrán vystavených vysokoteplotnímu stresu. Mikrozkuřavka se suspenzí thylakoidních membrán byla po dobu 5 minut ve tmě zahřívána na vodní lázni při teplotě 40, resp. 50 °C. Takto připravená suspenze thylakoidních membrán byla následně použita pro přípravu konečného vzorku.

9. Výsledky a diskuse

Hlavním cílem experimentální části práce bylo separovat pigment-proteinové komplexy izolované z thylakoidních membrán hrachu setého (*Pisum sativum*) metodou BN-PAGE. Zvláštní důraz byl kladen na to, aby byl u těchto proteinových komplexů zachován nejvyšší možný stupeň intaktnosti. Rovněž byla provedena i elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů metodou CN-PAGE za účelem vzájemného porovnání účinnosti a šetrnosti obou metod. Výsledky jsou prezentovány na obr. 5 a 6 a v následujícím textu.

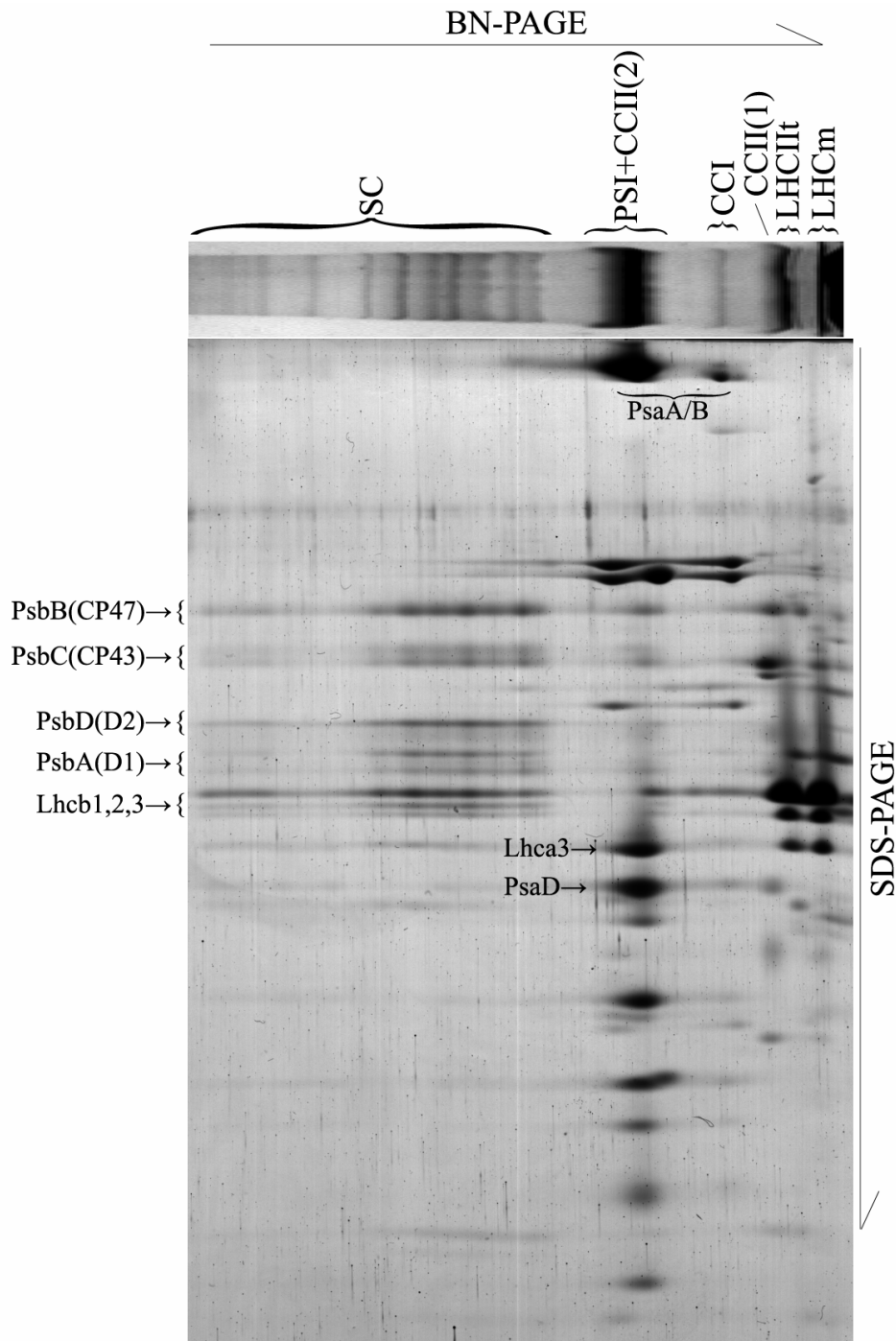
9.1. 2D BN/SDS-PAGE

Během elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán hrachu setého (*Pisum sativum*) došlo během prvního rozměru elektroforézy k jejich úspěšnému rozdělení. Tyto jednotlivé separované komplexy byly poté podrobeny i druhému, denaturujícímu rozměru, který prozradil jejich podjednotkové složení (viz obr. 5). Označení jednotlivých podjednotek v obr. 5 odpovídá označení, které je uvedeno v kap. 5.1., 5.2. a 5.3. PsaA/B: dimer jádra PSI tvořený podjednotkami *PsaA* a *PsaB*. Označení podjednotek je pouze orientační a proběhlo na základě srovnání obr. 5 s obr. 4 a srovnáním s výsledky prací Lípové et al., 2010 a Ilíka et al., 2002. Pro přesné označení všech podjednotek v obr. 5 bude nutné provést analýzu proteinů obsažených v gelu například metodou hmotnostní spektrometrie nebo imunoanalýzou.

Celá levá polovina obr. 5 patří proteinovým superkomplexům, které obsahují PSII a PSI. Jak je z obrázku patrné, jsou superkomplexy přítomny ve značném množství. Následné elektroforetické rozdělení jejich podjednotek ve druhém rozměru prozradilo, že superkomplexy obsahovaly převážně fotosystém II, jehož podjednotky byly v druhém rozměru přítomny ve velkém množství. Na gelu druhého rozměru v místech, které odpovídaly rozděleným superkomplexům, byly viditelné výrazné proteinové pásy, které byly předběžně identifikovány jako podjednotky jádra PSII (D1, D2, CP43 a CP47) a proteinové pásy obsahující podjednotky trimerního světlosběrného komplexu LHCI (*Lhcb1*, *Lhcb2* a *Lhcb3*). V těchto místech byly rovněž viditelné slabé proteinové pásy, které byly předběžně identifikovány jako podjednotky PSI (*PsaA/B* – heterodimer jádra PSI a *Lhca3* – podjednotka světlosběrného komplexu LHCI). Malý výskyt součástí PSI v oblasti superkomplexů naznačuje, že přirozeným místem výskytu PSI nejsou narušeny od PSII vysokomolekulární superkomplexové struktury.

Za oblastí se superkomplexy následuje v elektroforetogramu prvního rozměru výrazný pás obsahující PSI spolu s dimerem jádra PSII (viz obr. 5). Analýza druhého rozměru tohoto proteinového pásu prozradila, že tento pás obsahoval heterodimer jádra PSI – *PsaA/B*, byla přítomna i podjednotka *PsaD* a dále byl přítomen jeden výrazný pás předběžně identifikovaný

jako podjednotka světlosběrného komplexu LHCI (*Lhca3*). V elektroforetogramu tohoto pásu byly patrné i podjednotky PSII (D1, D2, CP43, CP47 a *Lhcb1*, *Lhcb2* a *Lhcb3*) a tento pás obsahoval i další proteinové pásy, které však nebyly identifikovány. Proteinové pásy patřící jádru PSII však byly velmi málo zřetelné, z čehož lze usoudit, že většina proteinů PSII zůstala v intaktním stavu a byla přítomna ve dříve zmíněné oblasti se superkomplexy.



Obrázek 5 - Elektroforetogram znázorňující výsledky 2D BN/SDS-PAGE multiproteinových komplexů thylakoidních membrán izolovaných z hrachu setého (*Pisum*)

sativum). V horní části obrázku je uveden výsledek prvního rozměru elektroforézy. SC: superkomplexy fotosystémů; PSI: fotosystém I; CCII(2): dimer jádra PSII; CCI: jádro PSI; CCII(1): monomer jádra PSI; LHCI: trimerní světlosběrný komplex PSII; LHCm: monomerní světlosběrný komplex PSII/I. Spodní část obrázku představuje výsledek druhého rozměru elektroforézy. Snímek prvního rozměru elektroforézy byl pořízen pomocí prosvětlovacího skeneru (viz kap. 8.5.), snímek druhého rozměru byl pořízen pomocí 2D skeneru (viz kap. 8.6.).

Skutečnost, že většina PSII zůstala v oblastí superkomplexů opět ukazuje, že přirozeným místem výskytu PSII v thylakoidní membráně chloroplastů jsou vysokomolekulární superkomplexové struktury.

Vyšší rychlost migrace v prvním rozměru vykazovaly komplexy označené jako CCI a CCII(1) (viz obr. 5). Pás CCI (jádro PSI bez LHCI) obsahoval zejména *PsaA/B* – heterodimer jádra PSI, pás CCII(1) (monomer jádra PSII) obsahoval podjednotky D1, D2, CP43 a CP47. Proteinové pásy CCI a CCII(1) byly málo zřetelné, což opět naznačuje, že většina PS I a II zůstala v intaktním stavu.

Komplexy s nejvyšší rychlostí migrace patřily trimernímu komplexu LHCI a monomerům LHCI a LHCI. V elektroforetogramu druhého rozměru této oblasti jsou patrné především podjednotky *Lhcb1*, *Lhcb2*, *Lhcb3* a *Lhca3* (viz obr. 5).

Metoda BN-PAGE je v mnoha odborných publikacích uváděna jako účinná a šetrná separační technika vhodná pro separaci membránových proteinových komplexů v nativním stavu (viz Wittig & Schägger, 2005). V našem případě byla použita pro separaci membránových proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán chloroplastů hrachu setého (*Pisum sativum*) a výsledky práce ukázaly, že elektroforetická separace těchto komplexů proběhla úspěšně. Úspěšnost separace závisela především na vhodné volbě hustoty gradientového dělicího gelu a také na šetrné metodě izolace thylakoidních membrán z rostlin. Díky vhodnému nastavení všech podmínek separace byly superkomplexy v elektroforetogramu přítomny ve značném množství a také došlo k jejich dostatečné vzájemné separaci. Při elektroforéze však docházelo k postupnému rozpadu vyšších proteinových struktur superkomplexů, který je na elektroforetogramu prvního rozměru dobře zřetelný. O pravých důvodech tohoto rozpadu superkomplexů je možné pouze spekulovat, ale vybízí se možnost, že tento rozpad byl zapříčiněn vazbou barviva Coomassie blue na proteiny. Wittig & Schägger, 2005 se ve své práci zmiňují o tom, že právě vazba tohoto barviva na proteinové superkomplexy může způsobit určité rozvolnění některých velmi labilních proteinových komplexů. Dalším z možných důvodů, proč mohlo dojít k rozpadu proteinových superkomplexů, je přílišná solubilizace proteinových komplexů detergentem, který mohl rozpad superkomplexů způsobit

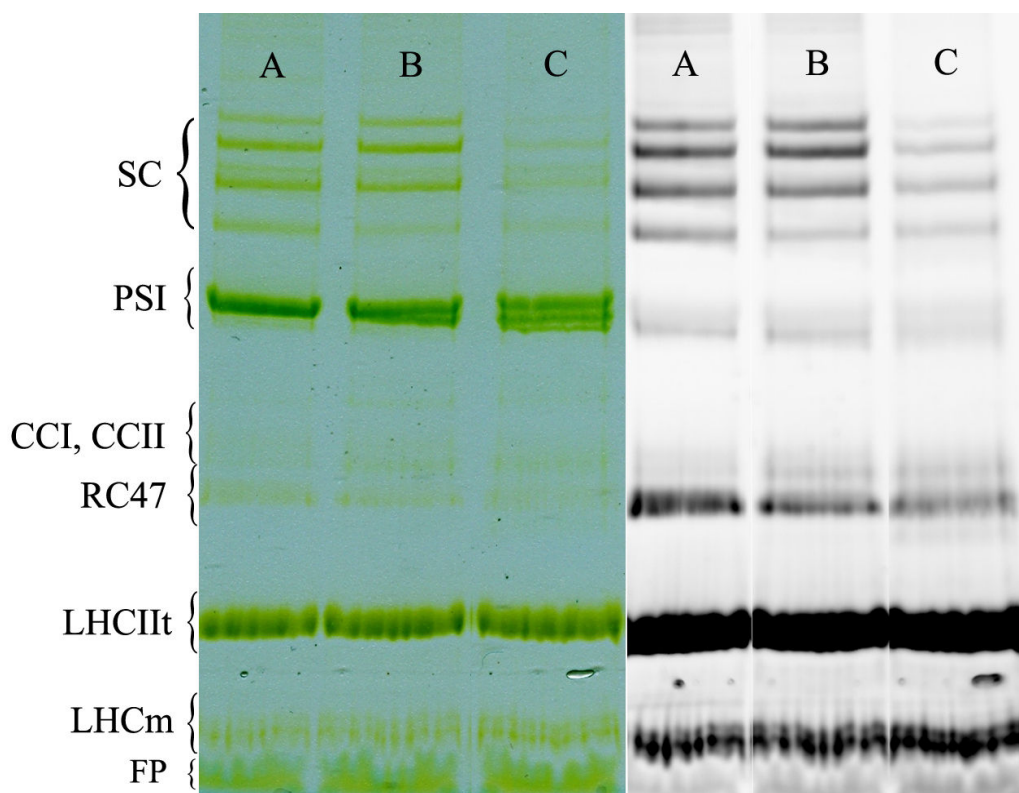
již během přípravy vzorku. I přes tyto problémy spojené s rozpadem superkomplexů je však možné BN-PAGE označit za skutečně účinnou a šetrnou elektroforetickou metodu.

9.2. CN-PAGE

V poslední době se v odborné literatuře vyskytuje celá řada prací, ve kterých je pojednáváno o metodě CN-PAGE jako o účinné alternativě k BN-PAGE. Bylo proto provedeno i elektroforetické dělení pigment-proteinových komplexů z thylakoidních membrán hrachu setého (*Pisum sativum*) metodou CN-PAGE. Při experimentu byly použity i vzorky thylakoidních membrán, které byly vystaveny vysokoteplotnímu stresu. Účelem experimentu se stresovanými thylakoidními membránami byla snaha zjistit, zda je metoda CN-PAGE potencionálně použitelná i pro studium teplotního stresu rostlin. Výsledky jsou prezentovány na obr. 6 a v následujícím textu.

V horní části obou CN-PAGE elektroforetogramů (viz obr. 6) jsou viditelné čtyři proteinové pásy označené jako superkomplexy PS II u kterých je patrné, že u nich vlivem zvýšené teploty došlo k jejich rozpadu. Po ohřevu thylakoidních membrán na 40 °C došlo k viditelnému vymizení nejspodnějšího pásu se superkomplexy (viz obr. 6) a je možno si rovněž povšimnout, že při této teplotě docházelo v oblasti označené jako PSI k nárůstu počtu proteinových pásů. O příčinách nárůstu je možno spekulovat. Jednou z možných příčin nárůstu počtu pásů v oblasti PSI je buď poškozující vliv zvýšené teploty na komplexní strukturu PSI, nebo má tento pás původ v původně komplexní struktuře PSII. K tomu, abychom zjistili původ tohoto nového pásu, byl gel po CN-PAGE skenován ve fluorescenčním analyzátoru (viz kap. 8.8.) Součásti PS I a II mohou totiž být identifikovány na základě fluorescence chlorofylů obsažených v těchto fotosystémech. Při běžné pokojové teplotě vykazuje PSII vysoký kvantový výtěžek fluorescence a je na fluorescenčním snímku dobře viditelný. Naopak kvantový výtěžek fluorescence PSI je příliš nízký a PSI je na fluorescenčním snímku velice špatně zřetelný. Kdyby tedy nový pás u vzorků předeřátých na 40 °C v oblasti PSI měl svůj původ v superkomplexech PSII, musel by obsahovat součásti PSII a to by se muselo projevit i ve fluorescenčním snímku. Z fluorescenčního snímku (pravá polovina obr. 6) je však patrné, že vlivem zvýšené teploty v oblasti PSI k nárůstu fluorescence nedošlo. Pokud však nový pás v oblasti PSI pocházel z rozvolněné vyšší struktury PSI, zůstává stále nejasné, kam se poděly pigment-proteiny uvolněné ze superkomplexů PSII. V elektroforetogramu totiž nedošlo k zesílení intenzity ostatních proteinových pásů obsahujících jádro PSII. K podobným jevům jako v případě vzorku inkubovaného při teplotě 40 °C docházelo i u vzorku inkubovaného při teplotě 50 °C. Při pohledu na obr. 6 je možné si všimnout, že vymizení pásů se superkomplexy však bylo při teplotě 50 °C mnohem výraznější a počet proteinových pásů se v oblasti PSI dokonce zvýšil na tři. Naopak nebylo zjištěno, že by došlo k nárůstu denzity některého z ostatních proteinových pásů a zůstává tedy záhadou, kam se uvolněné pigment-proteiny

poděly. K vyřešení tohoto problému by bylo nutné provést druhý rozměr elektroforézy metodou SDS-PAGE který by prozradil podjednotkové složení jednotlivých pásů.



Obrázek 6 - Elektroforetogram znázorňující výsledky CN-PAGE multiproteinových komplexů thylakoidních membrán izolovaných z hrachu setého (*Pisum sativum*). Vlevo je snímek elektroforetogramu ve viditelném světle pořízený pomocí kancelářského skeneru, vpravo je fluorescenční snímek pořízený pomocí luminiscenčního analyzátoru (viz kap. 8.8.), černé pásy odpovídají fluoreskujícím proteinům. A: referenční vzorek; B: vzorek inkubovaný po dobu 5 minut ve tmě při teplotě 40 °C; C: vzorek inkubovaný po dobu 5 minut ve tmě při teplotě 50 °C; SC: multiproteinové komplexy fotosystému II; PSI: komplex fotosystému I; CCII: jádro PSII včetně podjednotky CP43; CCI: částečně dezintegrovaný komplex PSI bez LHCI; RC47: jádro PSII skládající se z podjednotek D1, D2 a CP47; LHCII: trimer světlosběrného komplexu LHCII; LHCm: monomery světlosběrného komplexu LHC; FP: volné pigmenty. Bližší popis uveden v textu.

Pás označený jako CCI, CCII byl identifikován na základě porovnání denzity pásů získaných pomocí skeneru a pomocí detekce fluorescence chlorofylů. Je tvořen převážně jádrem PSI bez LHCI. Protože je však ve fluorescenčním snímku této oblasti viditelná i nepatrná fluorescence, obsahuje pás CCI, CCII pravděpodobně i menší množství jádra PSII složeného z podjednotek D1, D2, CP43 a CP47. Pás RC47 je vzhledem k tomu, že ve fluorescenčním

snímku vykazoval poměrně vysokou fluorescenci, pravděpodobně složen z jádra PSII bez podjednotky CP43. Pás LHCIIt byl na základě značné fluorescence identifikován jako trimerní světlosběrný komplex PSII a pás LHCm byl předběžně identifikován jako pás patřící monomerům světlosběrných komplexů LHC. Poslední pás FP pravděpodobně obsahoval pouze volné pigmenty, které se uvolnily ze svých pozic v pigment-proteinových komplexech.

Identifikace proteinových pásů je pouze předběžná a proběhla podobně jako v případě BN-PAGE na základě srovnání obr. 6 s obr. 4 a srovnáním s výsledky prací Lípové et al., 2010 a Ilíka et al., 2002. Důležitým vodítkem pro identifikaci jednotlivých pásů bylo i porovnávání snímku gelu pořízeného pomocí skeneru s jeho fluorescenčním snímkem. Přesnou identifikaci proteinových pásů by bylo možné provést například imunodetekcí podjednotek komplexů rozdělených ve druhém rozměru elektroforézy.

Z elektroforetogramů BN-PAGE a CN-PAGE je obecně patrné, že metoda CN-PAGE je pro separaci pigment-proteinových superkomplexů z thylakoidních membrán chloroplastů šetrnější než metoda BN-PAGE. Jak je vidět na obr. 5, došlo během elektroforetického dělení superkomplexů metodou BN-PAGE k jejich postupnému rozpadu, což se projevilo ve velkém počtu pásů s těmito superkomplexy. Elektroforetické rozdělení superkomplexů ve druhém rozměru totiž prozradilo, že všechny jednotlivé pásy se superkomplexy měly identické podjednotkové složení (viz obr. 5). Naproti tomu u metody CN-PAGE jsou v oblasti se superkomplexy viditelné pouze čtyři proteinové pásy (viz obr. 6). Další důkaz o vyšší šetrnosti CN-PAGE je možné spatřit v elektroforetogramech v místech, které patří světlosběrným komplexům. Zatímco denzita pásů s trimery světlosběrného komplexu PSII (LHCIIt) je jak v případě CN-PAGE, tak i v případě BN-PAGE srovnatelná, denzita pásu s LHCm je u BN-PAGE značně vyšší než u CN-PAGE. To může (podobně jako v případě vysokého počtu pásů se superkomplexy) znamenat, že během elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů metodou BN-PAGE došlo k rozvolnění vyšších proteinových struktur superkomplexů. Velkou roli v šetrnosti CN-PAGE může hrát přítomnost aniontového detergentu deoxycholátu, který nejspíše nabíjí proteinové komplexy šetrněji, než barvivo Coomassie blue (viz kap. 1.2. a 1.4.1.2.)

10. Závěr

Při porovnání výsledků uvedených v práci Ciambelly et al., 2005 (viz kap. 5.3.) (práce, která je přehledovým článkem pro použití BN-PAGE k separaci proteinových komplexů z thylakoidních membrán a která byla v mé práci použita pro identifikaci podjednotek proteinových komplexů) a výsledků prezentovaných v mé práci je možné usoudit, že separace pigment-proteinových komplexů zaměřená na separaci nativních pigment-proteinových multikomplexů ve vysokém stupni intaktnosti proběhla v případě mé práce mnohem úspěšněji. Superkomplexy s fotosystémy byly jak v případě BN-PAGE, tak i v případě CN-PAGE přítomny ve velkém množství, zatímco Ciambellovi et al., 2005 se podařilo separovat multikomplexy jen ve velice omezeném množství a na elektroforetogramu byly jen málo zřetelné (viz obr. 4).

Vzájemné porovnání metod BN-PAGE a CN-PAGE prozradilo, že metoda CN-PAGE je pro separaci pigment-proteinových komplexů pravděpodobně vhodnější než metoda BN-PAGE. Při metodě BN-PAGE byl totiž v oblasti superkomplexů přítomen velmi vysoký počet proteinových pásů s těmito komplexy. Vysoký počet pásů se superkomplexy u metody BN-PAGE nejspíše vypovídá o postupném rozpadu vyšších proteinových struktur, který může být zapříčiněn celou řadou faktorů, mezi které patří s velkou pravděpodobností vliv vazby barviva Coomassie blue na proteiny. Naproti tomu metoda CN-PAGE rozdělila superkomplexy pouze do čtyřech pásů. S ohledem na výsledky prezentované v této práci je možné usoudit, že metoda CN-PAGE se pro svou velkou šetrnost k pigment-proteinovým multikomplexům stane vyhledávanou a často používanou metodou například pro studium různých fyzikálně-chemických vlivů, které na tyto vyšší proteinové struktury působí.

11. Seznam literatury

Braun R. J., Kinkl N., Beer M., Ueffing M. (2007) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1033-1045.

Ciambella C., Roepstorff P., Aro E. M., Zolla L. (2005) A proteomic approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics* **5**, 746-757.

Dau H., Andrews J. C., Roelofs T. A., Latimer M.J., Liang W. C., Yachandra V. K., Sauer K., Klein M.P. (1995) Structural consequences of ammonia binding to the manganese center of the photosynthetic oxygen-evolving complex - an X-ray-absorption spectroscopy study of isotropic and oriented photosystem-II particles. *Biochemistry* **34**, 5274-5287.

Fromme P., Schlodder E., Jansson S. (2003) Structure and Function of the Antenna System in Photosystem I. In *Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 13 Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis* (Green B. R., Parson W. W., ed.), pp. 253-279, Kluwer Academic Publishers, Norwell, USA.

Granvogel B., Reisinger V., Eichacker L. A. (2006) Mapping the proteome of thylakoid membranes by de novo sequencing of intermembrane peptide domains. *Proteomics* **6**, 3681-3695.

Heinemeyer J., Eubel H., Wehmhöner D., Jänsch L., Braun H. P. (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry* **65**, 1683-1692.

Hideg E. (1994) Detection of Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In *Methods in Molecular Biology, vol. 274: Photosynthesis Research Protocol* (Carpentier R., ed.), pp. 249-260, Humana Press Inc, Totowa, USA.

Chen X., Zhang W., Xie Y. J., Lu W., Zhang R. X. (2007) Comparative proteomics of thylakoid membrane from a chlorophyll b-less rice mutant and its wild type. *Plant Sci* **173**, 397-407.

Ilík P., Krchňák P., Tomek P., Nauš J. (2002) 2-D gel densitometer for high-contrast and selective imaging of chlorophyll-containing protein complexes separated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **51**, 273-281.

Krause F. (2006) Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* **27**, 2759-2781.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lawlor D. W. (2001) Electron and proton transport. In *Photosynthesis, third edition* (Lawlor D. W., ed.), pp. 84-112, BIOS Scientific Publishers, Oxford, Velká Británie.
- Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method. Enzymol.* **148**, 350-382.
- Lípová L. (2004) Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Lípová L., Krchňák P., Komenda J., Ilík P (2010) Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes in vivo. *BBA-Bioenergetics* **1797**, 63-70.
- Malkin R., Niyogi K. (2000) Photosynthesis. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan B. B., Gruisem W., Lones R. L., ed.), pp. 568-628, American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA.
- Nelson N., Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **5**, 971-982.
- Reisinger V., Eichacker L. A. (2006) Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics Suppl. S.*, 6-15.
- Reisinger V., Eichacker L. A. (2007) How to analyze protein complexes by 2D blue native SDS-PAGE. *Proteomics* **7** Suppl 1, 6-16.
- Reisinger V., Eichacker L. A. (2008) Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *Journal of Proteomics* **71**, 277-283.
- Rexroth S., Tittingdorf J. M. W. M. Z., Krause F., Dencher N. A., Seelert H. (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* **24**, 2814-2823.
- Seddon A. M., Curnow P., Booth P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *BBA-Biomembranes* **1666**, 105-117.
- Schägger H. (2003a) Blue Native Electrophoresis. In *Membrane Protein Purification and Crystallization, Second Edition: A Practical Guide*. (Hunte C., Von Jagow G., Schägger H., ed.), pp. 105-130, Academic Press, San Diego.
- Schägger H. (2003b) SDS Electrophoresis Techniques. In *Membrane Protein Purification and Crystallization, Second Edition: A Practical Guide*. (Hunte C., Von Jagow G., Schägger H., ed.), pp. 85-103, Academic Press, San Diego.
- Schägger H., Cramer W. A., Von Jagow G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane-protein complexes by 2-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.

Schägger H., Von Jagow G. (1987) Tricine sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-kDa to 100-kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

Schägger H., Von Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane-protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.

Wittig I., Schägger H. (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**, 4338-4346.

Wittig I., Schägger H. (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* **8**, 3974-3990.

Wittig I., Schägger H. (2009) Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics* **9**, 5214-5223.

12. Seznam použitých zkratek

2D BN/SDS-PAGE	Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, která v prvním rozměru využívá modrou nativní elektroforézu a v druhém rozměru využívá elektroforézu s dodecylsíránem sodným
AB	Směs akrylamidu a bisakrylamidu
ACA	Aminokapronová kyselina
APS	Persíran amonný
Bistris	2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
BN-PAGE	Modrá nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
BSA	Hovězí sérový albumin
CMC	Kritická micelární koncentrace
CN-PAGE	„Clear-native“ elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
DM	Dodecyl- β -D-maltosid
DTT	dithiothreitol
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IEF-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu využívající pro separaci částic isoelektrické fokusace
LHCI	Světloběrný komplex fotosystému I
LHCII	Světloběrný komplex fotosystému II
Na-EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, která jako detergent využívá dodecylsírán sodný
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Triton X-100	Polyethylenglykol-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether