

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Mobilita fotosyntetických proteinů

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Radek Kaňa, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor: Bc. Jaroslav Krafl

České Budějovice, listopad 2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslav KRAFL**
Osobní číslo: **Z11643**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**
Název tématu: **Studium mobility fotosyntetických proteinů**
Zadávající katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

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

Cíl práce: Seznámení se s metodou detekce mobility proteinů na mikroskopické úrovni (metoda FRAP - Fluorescence Recovery After Photobleaching) a detekce pohybu proteinů thylakoidní membrány.

Postup:

1. Krátký literární přehled na téma mobility fotosyntetických proteinů
2. Testování vhodnosti různých fototrofních mikroorganismů, jejich kultivace za kontrolovaných podmínek
3. Seznámení se s metodou detekce mobility proteinů FRAP pomocí konfokální mikroskopie, vyhodnocování dat z konfokální mikroskopie, výpočet hodnot difuzního koeficientu numerickými metodami
4. Aplikace metody FRAP na vybrané modelové organismy, získání hodnoty difuzních koeficientů pro jednotlivé proteiny thylakoidní membrány
5. Studium mechanismu kontrolujících pohyb proteinů, studium s inhibitory

Rozsah grafických prací: **Diplomová práce**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Kaňa R, Prášil O, Mullineaux CW (2009) Immobility of phycobilins in the thylakoid lumen of a cryptophyte suggests that protein diffusion in the lumen is very restricted. Febs Letters 583: 670-674

Mullineaux CW, Tobin MJ, Jones GR (1997) Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. Nature 390: 421-424

Mullineaux CW (2008) Factors controlling the mobility of photosynthetic proteins. Photochemistry and Photobiology 84: 1310-1316

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Radek Kaňa, Ph.D.**

Přírodovědecká fakulta

Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2013**




Ing. Karel Suchý, Ph.D.

proděkan pověřený vedením ZF

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚLÉSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice**

L.S.



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. února 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 26. listopadu 2014

Podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce Mgr. Radku Kaňovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky v Třeboni za nesmírnou trpělivost a obětavý přístup k vedení práce. Rovněž bych chtěl upřímně poděkovat konzultantovi práce - vedoucímu Katedry rostlinné výroby a agroekologie ZF JU prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za umožnění pracovat na tomto tématu a za shovívavost, kterou projevoval po dobu studia. Vřelý dík patří i vedoucímu sektoru Algotech Mikrobiologického ústavu AV ČR v Třeboni prof. RNDr. Ondřeji Prášilovi, Ph.D. za toleranci a umožnění studia na Zemědělské fakultě JU při zaměstnání na tomto ústavu. V neposlední řadě děkuji za cenné rady i všem svým treboňským spolupracovníkům a kolegům.

ANOTACE

Metodou FRAP (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching - Návrat fluorescence po fotovybělení) byla zkoumána mobilita fotosyntetických pigment-proteinových komplexů (fykobilizomy a fotosystém II), které hrají ve fotosyntéze důležitou roli. Metoda FRAP je fluorescenční mikroskopickou metodou pro měření mobility v biologických systémech. Studované komponenty v membráně jsou vyběleny soustředěným laserovým paprskem. Návrat fluorescence ve vybělené oblasti odpovídá mobilitě (difúzi) nevybělených proteinů.

Současný stav poznání o mobilitě fotosyntetických proteinů je značně omezený. Práce byla zaměřena na optimalizaci měření mobility fotosyntetických proteinů metodou FRAP. Bylo provedeno několik metodických experimentů, na základě jejichž vyhodnocení a ověření se povedlo se změřit mobilitu a difúzní koeficienty fykobilizomů a proteinů obsahující chlorofyl u vybraných zástupců ruduch (*Porphyridium cruentum*, *Cyanidium caldarium*) a sinic (*Synechocystis* PCC6803, *Acaryochloris marina*). Metodika vyvinutá v rámci diplomové práce byla uplatněna v dalších výzkumech.

Klíčová slova: FRAP, mikroskop, fotosyntéza, fykobilizom, fotosystém, fluorescence, ruduchy, sinice

ANNOTATION

Mobility of pigment-protein complexes (phycobilizomes and photosystem II playing a key role in photosynthesis) was studied by FRAP method (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching). FRAP represents a fluorescence based microscopy method enabling measurement of protein mobility in living systems. The protein complexes are bleached by a laser pulse. And mobility of unbleached proteins is measured as a fluorescence recovery in the bleached area.

Currently we have only limited knowledge about the mobility of photosynthetic proteins. This work was aimed at optimization of the photosynthetic protein mobility measurement by FRAP. I have performed several methodological experiments which led to the successful assessment of phycobilisome and chlorophyll-containing proteins diffusion coefficients in selected red algae (*Porfyridium cruentum*, *Cyanidium caldarium*) and cyanobacteria (*Synechocystis* PCC6803, *Acaryochloris marina*). The methodology developed and validated in my thesis was then applied in further research projects.

Key words: FRAP, microscope, photosynthesis, phycobilisomes, photosystem, fluorescence, rhodophytes, cyanobacteria

SEZNAM ZKRATEK:

2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný
ADP	adenosindifosfát
APC	allofykocyanin
ATP	adenosintrifostát
CLSM	laserová konfokální rastrovací mikroskopie
ČSSR	Československá socialistická republika
D	difúzní koeficient
FAR	fotosynteticky aktivní záření
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
Fd	Ferredoxin
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ reduktáza
FRAP	návrat fluorescence po fotovybělení
GFP	zelený fluorescenční protein
Hi-Lo	vysoký-nízký
LHCII	světloběrný komplex vyšších rostlin
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
P680 PSII	reakční centrum fotosystému II
P700 PSI	reakční centrum fotosystému I
PBS	fykobilizomy
PC	fykocyanin
PE	fykoerytrin
PQ	plastochinon
PQH ₂	plastochinol
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
SPT	pozorování pohybů jednotlivých částic v médiu
SSSR	Svaz sovětských socialistických republik
USA	Spojené státy americké
UV	ultrafialový

OBSAH:

1	Úvod a cíle	10
2	Literární přehled.....	11
2.1	Konfokální mikroskopie.....	11
2.2	Princip metody FRAP	14
2.3	Fotosyntéza.....	17
2.3.1	Mobilita membránových proteinů ve fotosyntéze	20
2.3.2	Mobilita Fykobilizomů	23
2.3.3	Mobilita fotosystémů	26
2.4	Difúze	27
3	Metodika	30
3.1	Příprava vzorku pro mikroskopická měření	31
3.2	Nastavení konfokálního mikroskopu během měření mobility proteinů	32
3.3	Výběr buněk	33
3.4	Numerické vyhodnocení snímků– určení mobilní složky	34
3.5	Vyhodnocení – určení difúzního koeficientu	35
4	Výsledky	38
4.1	Mobilita proteinů u ruduch.....	38
4.1.1	FRAP.....	38
4.1.2	Difúzní koeficient.....	42
4.1.3	Shrnutí výsledků	43
4.2	Porovnání vlivu růstové teploty kultivace na mobilitu proteinů <i>C. caldarium</i> 44	
4.2.1	FRAP.....	44
4.2.2	Difúzní koeficient.....	46
4.2.3	Shrnutí výsledků	47
4.3	Mobilita fykobilizomů/fykobiliproteinů u různých sinic	47
4.3.1	Mobilita fykobilizomů u sinic, metoda FRAP	47
4.3.2	Difúzní koeficient.....	52
4.3.3	Shrnutí výsledků	53
4.4	Mobilita proteinů obsahujících chlorofyl u sinic	54
4.4.1	Výsledky metodou FRAP	54
4.4.2	Shrnutí výsledků	59
4.5	Metodický experiment, role délky fotovybělení	60
5	Diskuse.....	66
6	Závěr	69
7	Přehled použité literatury	70

1 Úvod a cíle

V souvislosti s výzkumem fotosyntézy na úrovni membrán, proteinových superkomplexů i jednotlivých molekul se ukazuje, že je zapotřebí pochopit a prozkoumat mobilitu těchto proteinů a okolnosti, které ji ovlivňují. Současné znalosti jsou zatím stále jen útržkovité, ale v posledních letech bylo dosaženo významných pokroků zejména díky rozvoji přístrojů, metod i výpočetní techniky. Například MULLINEAUX (2008) ale poukazuje na nutnost stále ještě zodpovědět k pochopení širších souvislostí řadu otázek jako například: jak moc hustota proteinů v membráně omezuje mobilitu a ztěžuje její funkce? Jaké jsou hlavní faktory určující mobilitu proteinů v membráně? Je rychlost procesů, například přenos elektronů či cyklus reparace fotosystému II, limitována difúzí nebo jsou důležitější jiné faktory? Použitím metody FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) můžeme v thylakoidních membránách měřit přímo laterální difúzi *in vivo* u světlosběrných komplexů a reakčních center přímo na jednotlivých buňkách. V této práci jsem se zabýval porovnáním mobility fotosyntetických proteinů u sinic a ruduch a optimalizací jejího měření touto metodou.

Cíl práce: Seznámení se s metodou detekce mobility proteinů na mikroskopické úrovni (metoda FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching) a detekce pohybu proteinů thylakoidní membrány.

2 Literární přehled

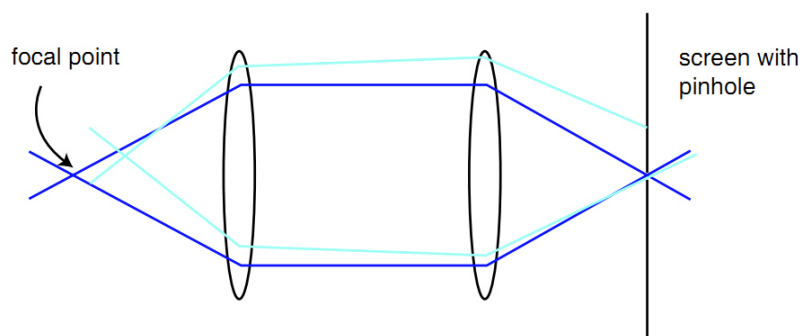
2.1 Konfokální mikroskopie

První rané pokusy o pozorování zvětšených předmětů pomocí vodních kapek a skleněných kuliček byly popsány již ve 13. století z území Velké Británie a základy současné mikroskopie byly položeny v 17. století (HOŠEK, 2008). Světelné mikroskopy se používaly k pozorování buněk nebo jejich výrazných struktur, avšak až rozvoj fluorescenční mikroskopie dovolil pozorovat i jednotlivé makromolekuly (BEDNÁR et al., 2004). Snaha o zvýšení kontrastu a rozlišení fluorescenčních mikroskopů vedla na přelomu 50. a 60. let 20. století tři nezávislé skupiny (USA, SSSR, ČSSR) ke konstrukci konfokálního mikroskopu (HOŠEK, 2008). V současné době naprostá většina používaných konfokálních mikroskopů vychází z koncepce Marvinina Minskyho (USA). Problém s uplatněním konfokálních mikroskopů vyvstal v době vzniku prvních prototypů díky absenci dostatečně silného zdroje světla. Rovněž chyběly i výkonné počítače pro následné zpracování pořízených snímků. Z těchto důvodů došlo k rozšíření konfokální mikroskopie až od 80. let minulého století (HOŠEK, 2008). Ruku v ruce s progresivním vývojem počítačů a technologií se zvyšuje i dostupnost a možnosti jejího využití. Rovněž i dnes komerčně dostupné lasery umožňují používat k excitaci takřka jakoukoliv vlnovou délku světla (RAŠKA, 2009).

Laserová konfokální rastrovací mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy* – CLSM) je prostředkem k lokalizaci buněčných struktur, a to na základě jejich autofluorescence nebo pomocí fluorescenčních barviv. Technika poskytuje efektivní způsob určení přítomnosti, viability či prostorové organizace specifických struktur. Umožňuje nedestrukční *in situ* pozorování povrchu i vnitřku pozorovaného objektu s minimální náročností na přípravu vzorku (NEU a LAWRENCE, 1997). Rovněž nabízí neinvazivní pořizování optických řezů a jejich následné seskládání do trojrozměrných modelů. Výhodou je také specifická a citlivost fluorescenčních prób a obarvovacích postupů (HAUGLAND, 1999).

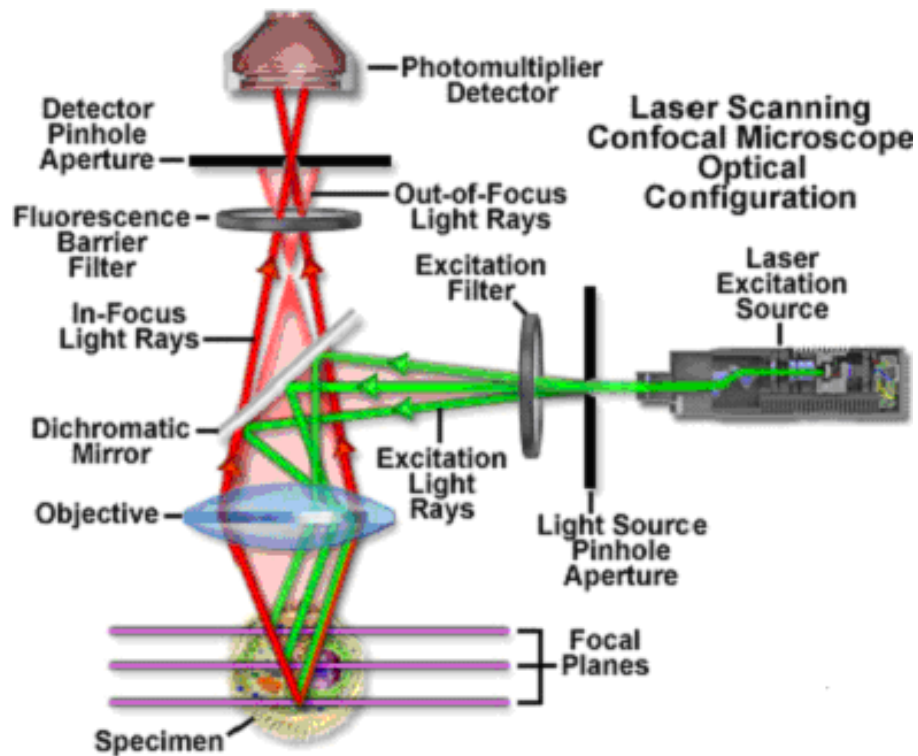
Zásadní výhoda CLSM oproti standardním fluorescenčním mikroskopům je skutečnost, že výsledný obraz není zkreslen neostrým pozadím resp. popředím. Je to

dáno tím, že konfokální clona před detektorem propouští pouze signál z fokální roviny (viz obr. 1).



Obr. 1: Schématické znázornění průchodu paprsků světla z místa roviny zaostření (focal point) přes bodovou clonku (pinhole), jež umožní průchod jen paprskům ze zaostřené roviny (znázorněno tmavě modrou; světle modré paprsky pocházejí z jiné (nezaostřené) roviny). Převzato z SEMWOGERERE a WEEKS (2005).

Z laserového světelného zdroje vychází koherentní paprsek, jenž prochází přes bodovou clonku (angl. pinhole), excitační filtr a je odražen dichroickým zrcadlem přes objektiv na vzorek. Objektivem se vrací fluorescenční signál vzorku zpět přes dichroické zrcadlo, emisní filtr a druhou bodovou clonku do detektoru s fotonásobičem (obr. 2).

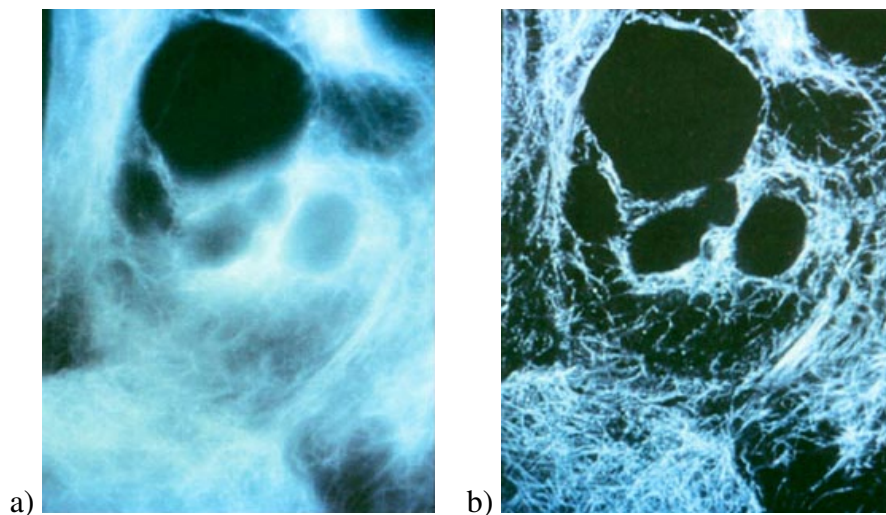


Obr. 2: Diagram principu konfokální mikroskopie

(<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>, staženo dne 2.4.2013)

Obraz ve fokální rovině je snímán bod po bodu. Pro toto rastrování se užívá buď pohyblivé dichroické zrcadlo (častější způsob) nebo naopak je optická soustava v klidu a je pohybováno vzorkem (HOŠEK, 2008) Nejužívanějšími laserové zdroje jsou: argonový (excitační laserový paprsek o vlnové délce 488nm a 514nm), argon-kryptonový (488nm, 568nm a 647nm), helium-neonový (543nm, 596nm a 633nm) a ultrafialový (UV-argon; 351-364nm) (HERNÁNDEZ et al., 2004).

U CLSM je udávána maximální rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu přibližně o faktor 1,4 lepší (viz obr. 3) než rozlišovací schopnost standardního mikroskopu o stejné numerické apertuře objektivu (PLÁŠEK, 1995). Maximální rozlišení konfokálního mikroskopu v osách x a y je tedy zhruba 200 nm (SEMWOGERERE a WEEKS, 2005).



Obr. 3: Porovnání snímků značených mikrotubulů savčí jaterní buňky. Snímek a pořízen klasickou fluorescenční mikroskopií; snímek b konfokálním mikroskopem Nikon RCM 8000. Převzato z PLÁŠEK (1995).

2.2 Princip metody FRAP

Metoda FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching - Návrat fluorescence po fotovybělení) je klasickou fluorescenční mikroskopickou metodou pro měření difúze v biologických systémech (MULLINEAUX, 2008). Využívá se buď přirozené autofluorescence nebo je možné požadované struktury či jejich komponenty označit fluorescenčním barvivem (značkou).

K měření metodou FRAP je zapotřebí konfokálního či epifluorescenčního mikroskopu s odpovídajícím softwarem, vhodným laserem pro fotovybělení a sadou filtrů pro selekci signálu. Základním požadavkem je rovněž možnost kontroly intenzity a prostorového rozložení laserového paprsku v oblasti vzorku (MULLINEAUX a SARCINA 2002). Jak se konfokální mikroskopy stávaly dostupnější a uživatelsky jednodušší, stal se FRAP běžnou technikou (MULLINEAUX a SARCINA 2002). Studované komponenty jsou označeny fluorescenčním barvivem a soustředěný zaostřený laserový paprsek vybělí určitou oblast membrány. Návrat fluorescence ve vybělené oblasti odpovídá difúzi nevybělených proteinů nebo jiných fluorescenčních molekul a odráží rychlost, se

kteřou difundují do vybělené oblasti (MULLINEAUX et al., 1997) případně sílu interakce proteinů (KAŇA, 2013).

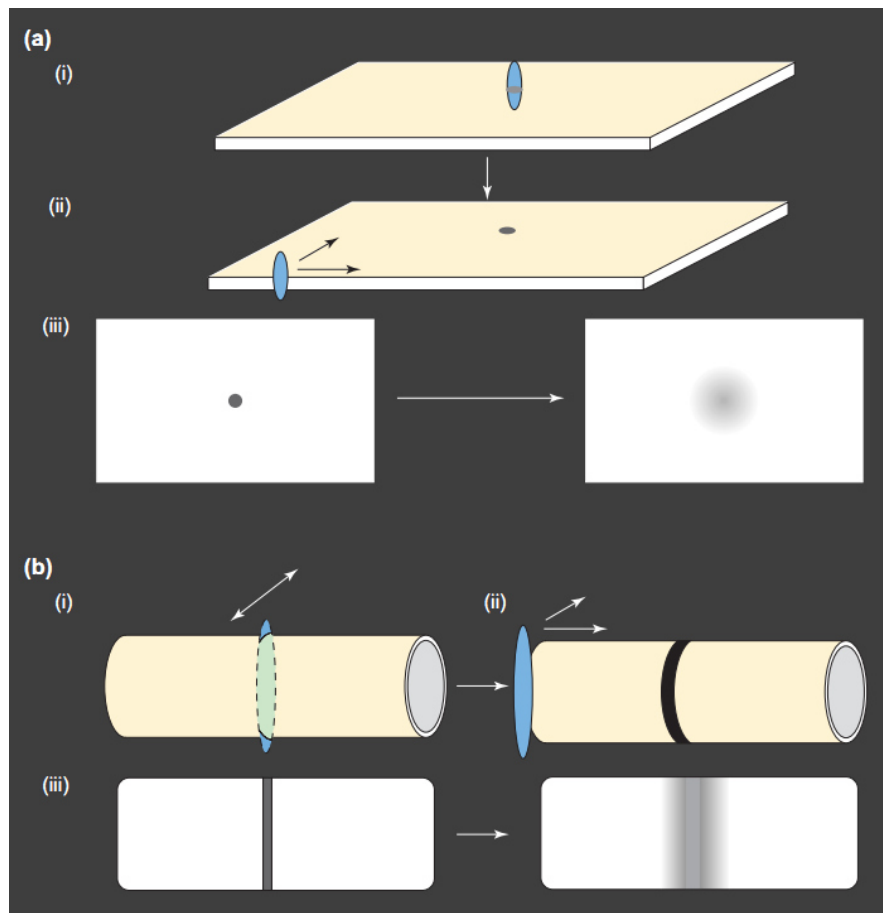
V případě, že studované proteiny jsou imobilní, nebude se intenzita fluorescence v oblasti vybělení s časem měnit. Jestliže ale tyto proteiny můžou difundovat, vybělená oblast se začne charakteristicky „rozmazávat“ a její fluorescence začne stoupat vlivem difúze vybělených proteinů mimo tuto oblast a difúzi proteinů z okolí do vybělené oblasti (MULLINEAUX, 2008).

Když se značení proteinů pomocí GFP (zeleného fluorescenčního proteinu) stalo rutinou, značně to rozšířilo možnosti této techniky (MULLINEAUX a SARCINA 2002). Značná výhoda FRAP u fotosyntetických systémů spočívá ve skutečnosti, že většina fotosyntetických pigment-proteinových komplexů jsou přirozeně fluorescentní a není tak třeba používat značení proteinů pomocí GFP (MULLINEAUX et al., 1997, MULLINEAUX a SARCINA, 2002).

Metoda FRAP má limity ve svém prostorovém rozlišení. Měření metodou FRAP vypovídá pouze o 2D difúzi na velikostní škále od mikrometru výše. Bohužel mnoho významných dějů na fotosyntetických membránách se uskutečňuje na menších plochách. Pro korektní kvantifikaci měření (např. pro výpočet difúzního koeficientu) je potřeba, aby měla membrána předvídatelnou strukturu a byla homogenní prostředí na ploše alespoň jednoho čtverečního mikrometru. V zásadě lze zaostřit vybělený bod zhruba o průměru poloviny vlnové délky světla k tomu použitého. Ve skutečnosti jsou bod i výsledná vybělená oblast většinou větší v důsledku rozptýlení laserového paprsku ve vzorku. Z toho důvodu je důležité pro přesné kvantitativní měření, aby byla velikost vzorku mnohem větší než velikost vyběleného bodu (MULLINEAUX a SARCINA, 2002). Ale i přes tato omezení představuje metoda FRAP možnost nového náhledu do dynamiky fotosyntetických membrán a proteinů (MULLINEAUX, 2008).

Co se týče prostorového rozlišení, nabízí se k FRAPu alternativa v podobě metody SPT – Single Particle Tracking (pozorování pohybů jednotlivých částic v médiu), jejímž prostřednictvím lze sledovat dynamiku jednotlivých komponent (například jednotlivých membránových komplexů). SPT zajišťuje lepší prostorové rozlišení než FRAP. Nevýhodou je ale nutnost použití fluorescenčního značení (MULLINEAUX, 2008). K detekci mobility molekul lze využít i metodu FCS –

Fluorescence correlation spectroscopy (fluorescenční korelační spektroskopie). Principem metody je pozorování kolísání změn intenzity fluorescence v malém detekčním objemu, jež vyvolává difúze fluoreskujících molekul. Následně lze určit jak difúzní koeficient, tak i koncentraci zkoumaných molekul (BERANOVÁ et al., 2009).

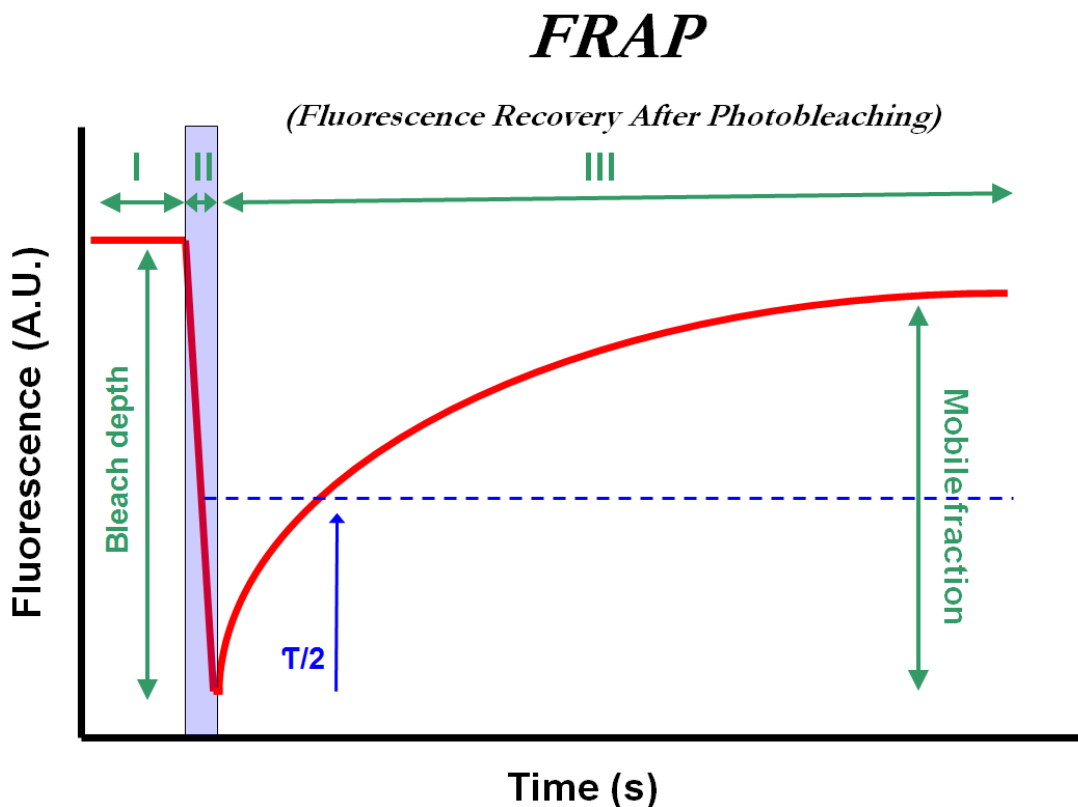


Obr. 4: Uspořádání vzorku pro měření mobility metodou FRAP.

a) Dvourozměrný FRAP na povrchu ploché membrány. Zaostřený bod (focal point) laseru je označen modře. (i) Fotovybělení je vyvoláno krátkým ale intenzivním ozářením laserem v malé oblasti vzorku. (ii) Návrat fluorescence po periodě fotovybělení je sledován s nižší intenzitou laseru, povrch vzorku v rovině ostrosti je snímán, je zaznamenávána série snímků v čase. (iii) Pokud je vybělená složka mobilní (schopná difúze), začne se jevit vybělená oblast časem jako širší a méně kontrastní.

Převzato z MULLINEAUX a SARCINA (2002).

Numerickým vyhodnocením časoběrných snímků v oblasti fotovybělení získáváme typickou křivkou intenzity fluorescence před, během a po periodě fotovybělení (Obr. 5).



Obr. 5: Časový průběh intenzity fluorescence ve vybělené oblasti během FRAP experimentu. FRAP křivka obsahuje tři základní části. I – Průběh intenzity fluorescence před fotovybělením (angl. „pre-bleach“); II – Pokles intenzity fluorescence vlivem fotovybělení (angl. „bleach“); III – Průběh intenzity fluorescence po fotovybělení, návrat fluorescence (angl. „post-bleach“). Z křivky lze vyčíst řadu parametrů jako mobilní složka (angl. „mobile fraction“), hloubka fotovybělení (angl. „bleach depth“), $\tau/2$ - čas, za který dojde k návratu poloviny fluorescence (Krafl, 2013).

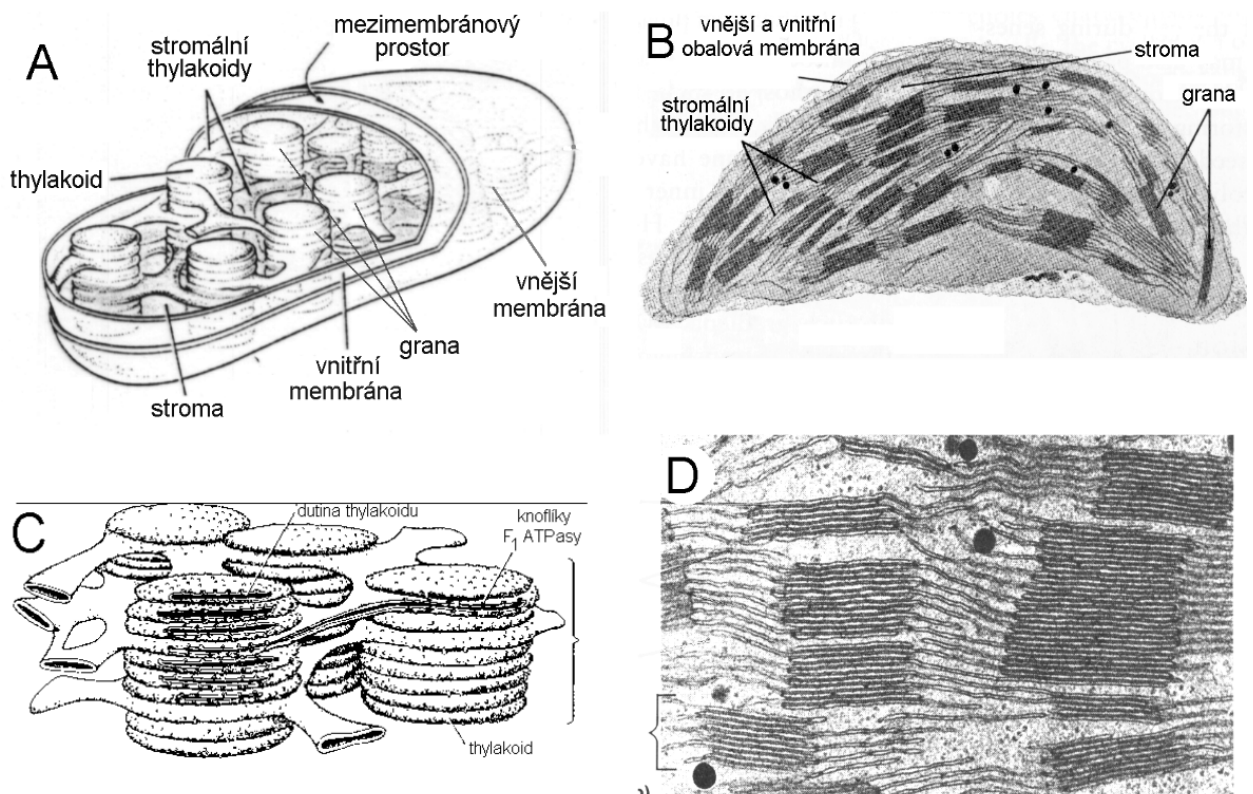
2.3 Fotosyntéza

Fotosyntéza je biologická přeměna světelné energie na energii chemických vazeb ukládaných ve formě organických sloučenin uhlíku (FALKOWSKI a

RAVEN, 1997). Přibližně ke 40% celosvětové fotosyntézy dochází ve vodním prostředí (FALKOWSKI, 1994).

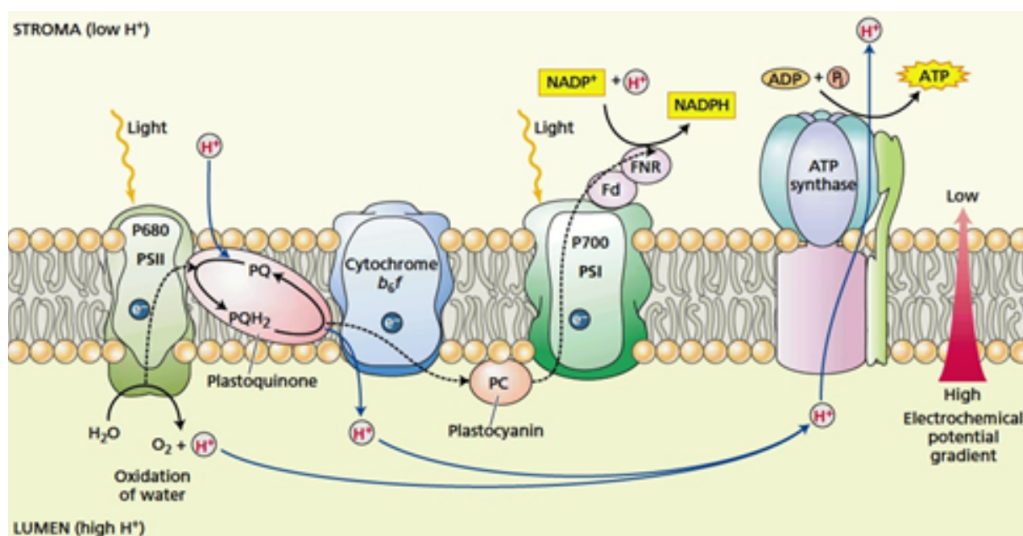
Fotoautotrofové mohou využít pro fotosyntézu pouze část ze spektra slunečního záření (400 nm - 700 nm), a tato část bývá označována jako fotosynteticky aktivní záření (FAR) (PROCHÁZKA et al., 1998). K zachycování fotonů z různých částí spektra slouží tři skupiny fotosyntetických pigmentů - chlorofyly, karotenoidy a fykobiliny. Výsadní postavení mezi nimi zaujímá chlorofyl *a*. Úloha ostatních pigmentů je usměrnění toku fotonů právě k chlorofylu *a* (KIANG et al., 2007).

Fotosyntéza probíhá ve dvou fázích, světelné a temnotní. Děje světelné fáze fotosyntézy probíhají na thylakoidních membránách umístěných v blízkosti plazmalemy. Temnotní část fotosyntézy se odehrává ve stromatech thylakoidů (BLANKENSHIP et al., 1995).



Obr. 6: A - Schématická kresba chloroplastu s thylakoidy; B - řez chloroplastem (elektronový mikroskop); C - schématické znázornění struktury gran; D - snímek z elektronového mikroskopu, skupina gran. Převzato z ŠETLÍK et al. (2004).

Během světelné (primární) fáze fotosyntézy probíhá cyklická a necyklická fotofosforylace a s ní spojená fotolýza vody a tvorba ATP a NADPH. V thylakoidní membráně se nalézají čtyři supramolekulární komplexy (viz obr. 7), kterými jsou fotosystém I (PS I), fotosystém II (PS II), komplex cytochromů b_6/f a ATP-syntáza, jež využívá protonový gradient (vytvořený během přenosu elektronů) k syntéze ATP na povrchu thylakoidní membrány (PROCHÁZKA et al., 1998).



Obr. 7: Schématické znázornění hlavních supramolekulárních proteinových komplexů a dějů v thylakoidní membráně. P700 PSI a P680 PSII jsou reakční centra fotosystémů s terminálními pigmenty. P680 PSII se skládá z dvaceti podjednotek. Zajišťuje přenos elektronů z vody na plastochinon. Absorbuje světlo o vlnové délce kratší než 680 nm. P700 PSI je transmembránový komplex tvořený deseti podjednotkami. Absorbuje světlo o vlnové délce kratší než 700 nm. Podílí se na redukci NADP^+ . Cytochrom b_6/f je transmembránový protein vytvářející protonový gradient přes thylakoidní membránu a přispívá tak k tvorbě ATP, za niž je odpovědná ATPsyntáza. Molekula plastochinonu (PQ) nacházející se uvnitř membrány se účastní přenosu elektronů. Reverzibilně se redukuje na plastochinol (PQH_2). Plastocyanin (PC) je membránovým proteinem na vnitřní straně. Podílí se na regeneraci fotooxidovaného P700 PSI. Ferredoxin (Fd) je přenašečem elektronů. Enzym ferredoxin- NADP^+ reduktáza (FNR) katalyzuje redukci NADP^+ . Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP^+) je oxidovaná forma redukčního činidla NADPH. Nukleotid adenosintrifosfát (ATP) je přenašeč energie. Adenosindifosfát (ADP) vzniká defosforylací ATP. Převzato z TAIZ a ZEIGER (2010).

2.3.1 Mobilita membránových proteinů ve fotosyntéze

Membrány jsou nezbytnou součástí buněk a jejich částí. Membrány jsou tvořeny proteiny a lipidy. Sacharidy jsou přítomny ve formě glykoproteinů a glykolipidů. Proteiny jsou buď integrální (součástí membrány) nebo periferní (přítomné na jedné ze stran membrány bez pevného spojení s ní).

Thylakoidní membrány v granech chloroplastů jsou ze 75% zaplněny proteiny, což z nich dělá membrány s jedním z největších koncentrací proteinů (KIRCHHOFF et al., 2002; KIRCHHOFF et al., 2008). MULLINEAUX (2008) poukazuje na základě předcházejících mikroskopických prací (GIDDINGS et al., 1983; MULLINEAUX, 1999) na fakt, že toto platí i pro thylakoidní membrány organismů, které obsahují i fykobilizomy, například sinice či ruduchy.

Vysoký podíl proteinů ve složení membrán přináší zřejmě dvě fyziologické výhody. Jednak to dovoluje na omezeném prostoru membrány zvýšit koncentraci chromoforů a komplexů přenášejících elektrony a tím i zvýšit rychlost fotosyntézy. Druhou výhodou se zdá z toho vyplývající možnost zvýšení účinnosti příjmu světla díky interakcím světlosběrných antén s reakčními centry (MULLINEAUX, 2008). Fotosyntetické membrány jsou podobně jako ostatní biologické membrány, dynamickými systémy, kde mohou proteiny a lipidy difundovat. Jejich difúze je životně důležitá pro fungování membrány (MULLINEAUX a SARCINA 2002). Při dosažení kritické hustoty v prostředí se mohou proteiny stát imobilními. V prostředích s menším obsahem proteinů, naopak proteiny vykazují rychlý náhodný pohyb, pokud ovšem nejsou ukotveny či ovlivněny silnými specifickými interakcemi s imobilními buněčnými strukturami (MULLINEAUX, 2008). Obecně lze říci, že čím vyšší koncentrace makromolekulárních látek v prostředí buňky je, tím pomalejší bude i difúze proteinů (ELLIS, 2001). MULLINEAUX (2008) předložil otázku, zda je imobilita proteinů způsobena hustým zaplněním (crowding) membrány či více specifickými interakcemi, které vedou k tvorbě velkých stabilních agregátů. Došel k závěru, že vliv mají oba faktory. Dostupné důkazy naznačují, že omezení difúze vlivem zaplnění (crowding) je významné v thylakoidní membráně a může být závažnější v lumenu, kde mohou být proteiny takřka imobilní (KAŇA et al., 2009).

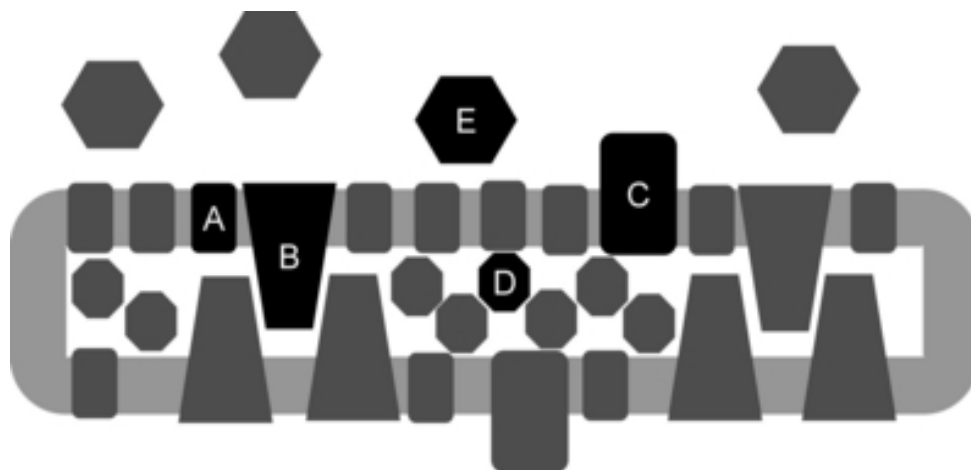
Současný stav poznání o mobilitě fotosyntetických proteinů je značně omezený, a to zejména díky problematickému měření, kdy jsme odkázáni na výsledky reprezentující chování všech fotosyntetických proteinů v rámci thylakoidních membrán. Přímého měření konkrétní skupiny molekul bylo dosaženo až díky rozvoji fluorescenční mikroskopie a spektroskopie v posledních letech (KAŇA, 2013). A jak ilustruje tab. 1, známe mobilitu PSII, fykobilizomů i antén, ale zůstává skupina proteinů (zejména PSI), u nichž zatím mobilita změřena nebyla. Rovněž z ní vyplývá, že mobilita proteinů v thylakoidní membráně je mnohem menší, než u podobných proteinů v jiných membránách.

Tab. 1: Přehled difúzních koeficientů proteinů z různých membrán. Převzato z KAŇA, 2013.

Diffusion rates of protein (lipid) in various compartments			Photosynthetic proteins of thylakoid membranes		
	D ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	Ref.			
Cell compartments			Cytochrome b_6/f	Unknown values	
Water (GFP)	87	[1]	F_1F_0 -ATPase		
Plant cytoplasm (GFP)	40	[2]	Plastocyanin		
Animal cytoplasm (GFP)	25	[1]	Photosystem I		
Mitochondrial matrix (GFP)	20–30	[3]	Phycobilisomes core	0.07	[5]
Prokaryotic cytoplasm (GFP)	6–9	[4]	Phycobilisomes	0.004–0.03	[5, 12, 13]
Prokaryotic periplasm (GFP)	2.6	[4]	Phycocerythrins	~ 0	[6]
Chloroplast stroma (GFP)	0.9	[2]	LHCIIp—in stroma	0.03	[14]
Cyanobacteria cytoplasm (based on PBS)	0.03	[5]	LHCII in stroma	0.003	[14]
Thylakoid lumen (Phycocerythrin)	~ 0	[6]	LHCII in grana	0.005	[15]
Eukaryotic membranes			IsiA—cyanobacteria	0.003	[16]
Plasma membrane (protein)	0.25–0.75	[7]	Photosystem II—red light	0.023	[17]
Endoplasmatic reticulum (protein)	0.26–0.49	[8]	Photosystem II—dark	~ 0.00002	[16, 12, 18]
Lipids	1–4	[9]	Lipids	0.06–1	[19]
Mitochondria membranes			Values were taken from literature according the following list: [1] (Swaminathan et al. 1997);[2] (Kohler et al. 2000);[3] (Partikian et al. 1998);[4] (Mullineaux et al. 2006);[5] (Sarcina et al. 2001);[6] (Kaňa et al. 2009b);[7] (Frick et al. 2007);[8] (Nehls et al. 2000);[9] (Fulbright et al. 1997);[10] (Gupte et al. 1991);[11] (Hochman et al. 1982); [12] (Mullineaux et al. 1997);[13] (Kaňa et al. unpublished);[14] (Consoli et al. 2005);[15] (Kirchhoff et al. 2008);[16] (Sarcina and Mullineaux 2004);[17] (Sarcina et al. 2006);[18] (Kirchhoff et al. 2004b);[19] (Sarcina et al. 2003)		
Cytochrome bc_1	0.1–1	[10]			
F_1F_0 -ATPase	0.1	[10]			
Cytochrome c	0.016	[11]			

MULLINEAUX et al. (2006) poukazují, že difúze i bakteriální cytoplazmě je značně rychlejší než v membráně. Z toho, že se difúze GFP ve stromatech chloroplastů se zdá ještě rychlejší (KÖHLER et al., 1997), vyplývá, že stroma je rovněž poměrně fluidní prostředí. ZHANG et al. (1993) opublikovali zjištění, že proteiny v plazmatické membráně eukaryotických organismů vykazují hodnotu koeficientu laterální difúze kolem $0,1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ a podobnou hodnotu vypočítal i MULLINEAUX et al (2006).

V izolovaných granech chloroplastů bylo zaznamenáno, že kolem 75% proteinů vykazujících fluorescenci chlorofylu bylo naprosto imobilní (MULLINEAUX, 2008).



Obr. 8: Ilustrace překážek v membráně omezujících volnou difuzi fotosyntetických proteinů:

A – Malý integrální membránový protein

B – Thylakoidní protein s lumenální doménou

C – Thylakoidní protein se stromální/cytoplazmatickou doménou

D – Lumenální protein

E – Stromální/cytoplazmatický protein

Převzato z MULLINEAUX (2008).

MULLINEAUX (2008) poukazuje na skutečnost, že k pochopení funkce fotosyntetických membrán je zapotřebí znalostí mobility proteinů. Vystávají zejména otázky týkající se vlivu hustoty proteinů v membráně na omezení mobility. Jaké jsou hlavní faktory určující mobilitu proteinů v membráně? Je rychlost procesů, například přenos elektronů či cyklus reparace fotosystému II, limitována difúzí nebo jsou důležitější jiné faktory? Rovněž dodává, že naše znalosti o mobilitě fotosyntetických proteinů jsou zatím stále jen kusé.

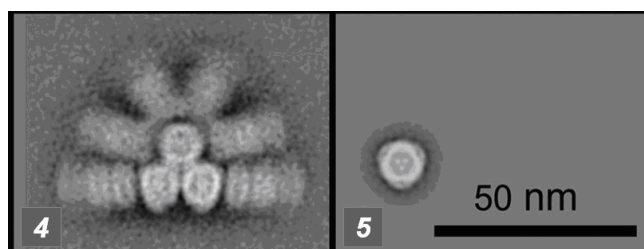
Použitím metody FRAP můžeme v thylakoidních membránách měřit přímo laterální difúzi *in vivo* u světlosběrných komplexů a reakčních center přímo na jednotlivých buňkách (MULLINEAUX et al., 1997). Jejich mobilita je popsána v následujících podsekcích

2.3.2 Mobilita Fykobilizomů

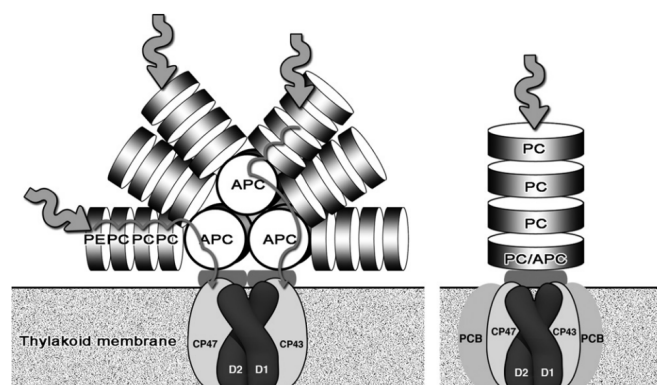
Fykobilizomy jsou hlavními doplňujícími světlosběrnými komplexy u sinic, ruduch. Chlorofyl *a* absorbuje primárně v modré a červené oblasti spektra, fykobilizomy absorbují v rozmezí 500 až 660nm a tak zvyšují efektivitu příjmu světla i za stavu nízké intenzity záření (GANTT, 1980).

Fykobilizomy jsou složeny ze stovek fykobiliproteinů a několika tzv. spojovacích polypeptidů (ARTENI et al., 2009). GANTT, (1980) popisuje tři skupiny fykobiliproteinů - fykoerytriny, fykocyaniny a allofykocyaniny. Fykobiliprotein je složen ze dvou polypeptidových podjednotek (α a β), z nichž každá váže kovalentní vazbou tetrapyrolový chromofor - fykobilin. $\alpha\beta$ heterodimery tvoří pak funkční oligomery (trimery $(\alpha\beta)_3$ či hexamery $(\alpha\beta)_6$) diskovitého tvaru s centrální dutinou. Jednotlivé disky jsou vázány a stabilizovány spojovacími proteiny, které jsou v centrální dutině (ARTENI et al., 2009). Fykobiliproteiny mohou tvořit až 24% suché hmotnosti buněk (GANTT, 1980)

Jádro fykobilizomu tvoří tři hexamery allofykocyaninu, na které jsou navázány tzv. rody (tyčinky) směřující do prostoru (viz obr. 11); ty jsou tvořeny hlavně hexamery fykocyaninu a fykoerytrinu (ARTENI et al., 2008). Délka a počet hexamerů vyběhávajících z jádra je druhově proměnlivé. Počet se většinou pohybuje od šesti do osmi rodů s delkou od dvou do čtyř disků, hexamerů fykocyaninu nebo fykoerytrinu (ARTENI et al., 2009).



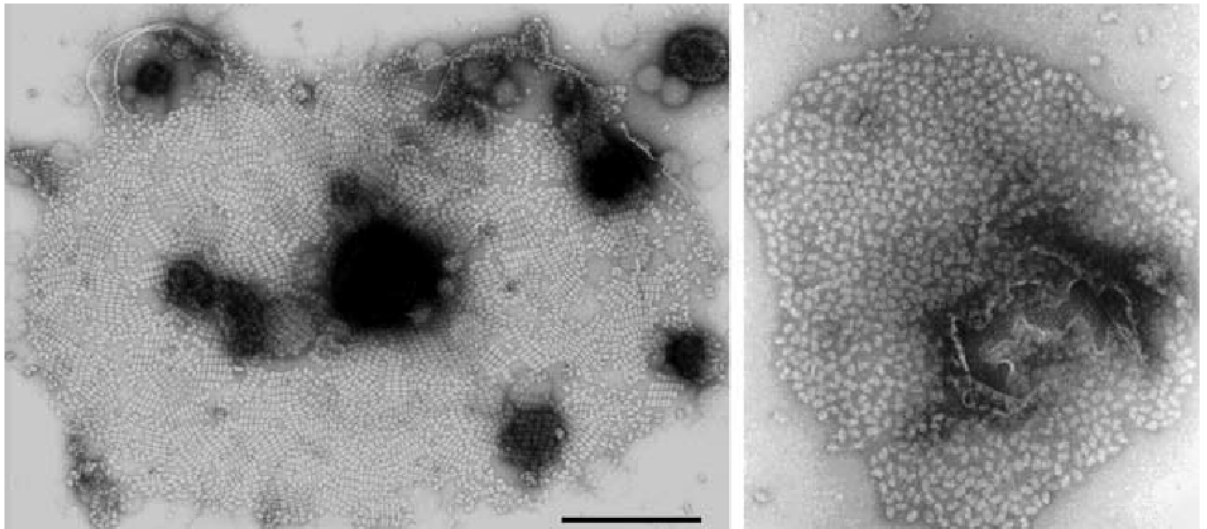
Obr. 9: Snímky fykobilizomů sinice *Synechocystis* získané elektronovou mikroskopií (Single Particle Electron Microscopy). Fig. 4 – boční pohled; projekce z 684 snímků; Fig. 5 – pohled shora na fragment antény. Převzato a upraveno z ARTENI et al. (2009).



Obr. 10: Schéma struktury fykobilizomů. Vlevo standardní typ PBS se šesti tyčinkami a jádrem, vpravo struktura PBS objevená u sinice *Acaryochloris marina*. APC-allofykocyanin, PC-fykocyanin, PE-fykoerytrin. Převzato z THEISS et al. (2011).

Bylo zjištěno, že u různých druhů organismů se může celkový tvar fykobilizomu lišit. (ARTENI et al., 2009). Nejrozšířenější a nejlépe prostudovaný jsou diskovité fykobilizomy popsány u sinic, ruduch a zástupce glaukofyt *Cyanophora paradoxa* (SIDLER, 1994). Elipsoidní fykobilizomy byly poprvé popsány u ruduchy *Porphyridium cruentum* a později i u některých sinic. Oproti polodiskovitým se vyznačující větší šířkou (GANTT a LIPSCHULTZ, 1972). "Balíkovitě" formované (bundle-shaped) fykobilizomy u *Gloeobacter violaceus* popsali KROGMANN et al. (2007). Nejjednodušší typ fykobilizomu byl zjištěn u mořské sinice *Acaryochloris marina* (viz obr.10), kde je přítomen jen jeden rod (tyčinka) bez jádra (THEISS et al., 2011)

Fykobilizomy jsou spojeny s cytoplasmatickým povrchem thylakoidní membrány (GANTT, 1980). Jak dokládá práce ARTENI et al. (2008), hustota fykobilizomů na membráně klesá se zvyšující se intenzitou ozáření a stejně tak i organizace jednotlivých fykobilizomů vykazovala mnohem menší míru pravidelného uspořádání (viz obr. 11).



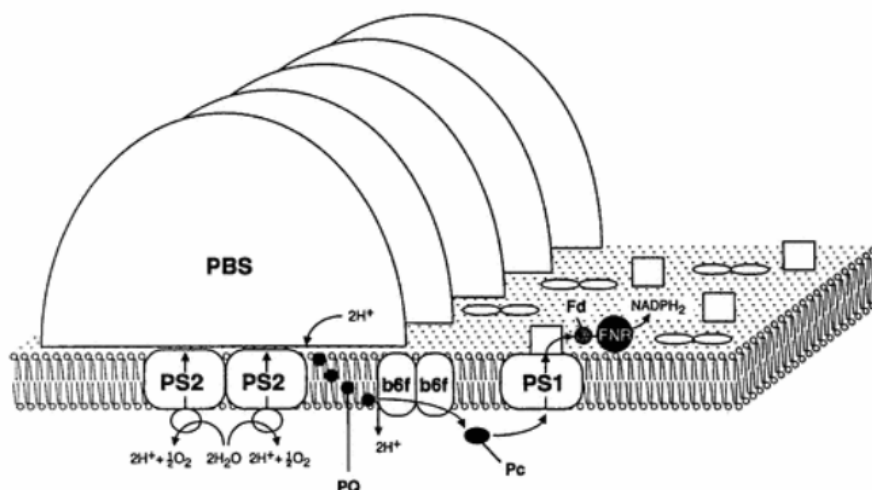
Obr. 11: Uspořádání fykobilizomů na povrchu thylakoidu. Levá část: Membrána sinice s navázanými fykobilizomy za podmínek nízké intenzity světla, hustota 560 ± 20 PBS/ μm^2 ; Pravá část: Distribuce fykobilizomů za podmínek vyššího osvětlení, hustota 384 ± 45 PBS/ μm^2 ; měřítko pro levou část 1 μm , pro pravou 400 nm. Převzato z ARTENI et al. (2008).

Světelná energie absorbovaná jakoukoliv částí fykobilizomu je účinně přenesena k fotosystémům v membráně. Tyto proteinové komplexy se mohou vázat jak s PS I, tak i PS II (GLAZER et al., 1983). Účinnost tohoto přenosu energie závisí na hustotě reakčních center v thylakoidní membráně, protože díky jejich vysoké koncentraci je dostatek vazebných míst pro fykobilizomy (MULLINEAUX, 2008b). Efektivita fotosyntézy závisí mimo jiné na regulaci distribuce excitační energie mezi fotosystémy I a II pomocí stavových přechodů (state transitions). S nimi je spjata i mobilita fykobilizomů. Jedná se o rychlý fyziologický adaptační mechanismus regulující způsob, jakým je absorbovaná světelná energie distribuována mezi PS I a PS II (JOSHUA a MULLINEAUX, 2004).

Navzdory četným studiím, které naznačují, že fykobilizomy mohou být spojeny s fotosystémem I i II přímo, se zatím ví relativně málo o strukturální povaze a síle těchto interakcí (KAŇA, 2013). Bylo navrženo, které jednotky by se těchto interakcích mohly účastnit, konkrétně podjednotky PS II cyt b559 a CP47 (ARTENI et al., 2008). MULLINEAUX et al. (1997) popisují, že PBS musí být asociované s fotosystémem II přechodné a nestálé, protože PBS difundují, kdežto fotosystém II je imobilní. A efektivní přenos energie z PBS do PSII může existovat jen když je

poměr PBS připojených k PSII dostatečně velký, což je pravděpodobné vzhledem k hustému nahloučení PBS a komplexům PSII na povrchu membrány.

V roce 1996 navrhli BALD et al. model regulace interakce mezi fykobilizomy a fotosystémem II (viz obr. 12).



Obr. 12: Regulace lineárního toku elektronů thylakoidní membránou sinice: Fotosystémy I a II (PS1, PS2), cytochrom *b₆f* komplex (*b₆f*), fykobilizomy (PBS), plastochinon (PQ), plastocyanin (*Pc*), ferredoxin (*Fd*) a ferredoxin-NADP-oxidoreduktáza (*FNR*). Převzato z BALD et al. (1996).

Díky přítomnosti fykobilizomu na cytoplazmatickém povrchu thylakoidní membrány jejich mobilita poskytuje informace o fluiditě cytoplazmy v blízkosti thylakoidní membrány. Ačkoliv se zdají být přisedlé na povrchu membrány, ve skutečnosti jsou *in vivo* mobilní, a to i navzdory odporu, způsobenému interakcemi membránovým povrchem a reakčními centry. SARCINA et al. (2001) ve své práci stanovili difúzní koeficient pro PBS u sinice *Synechococcus* PCC 7942 na $0,03 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$

2.3.3 Mobilita fotosystémů

Fotosystémy jsou na rozdíl od fykobilizomů uvnitř thylakoidní membrány. Povrch PSII na cytoplazmatické straně je plochý a dovoluje interakci fykobilizomů.

(ARTENI et al., 2009), která je zprostředkována elektrostaticky mezi spojovacím peptidem, fosfolipidy a sulfolipidy povrchu membrány (LOLL et al., 2007). Výsledky získané metodou FRAP ukazují, že komplexy PS II jsou imobilní (JOSHUA a MULLINEAUX, 2004; KIRCHHOFF et al., 2013; ZHANG et al., 2009). U PS I je zatím problém s uspokojivým hodnocením mobility, protože je pouze slabě fluorescenční.

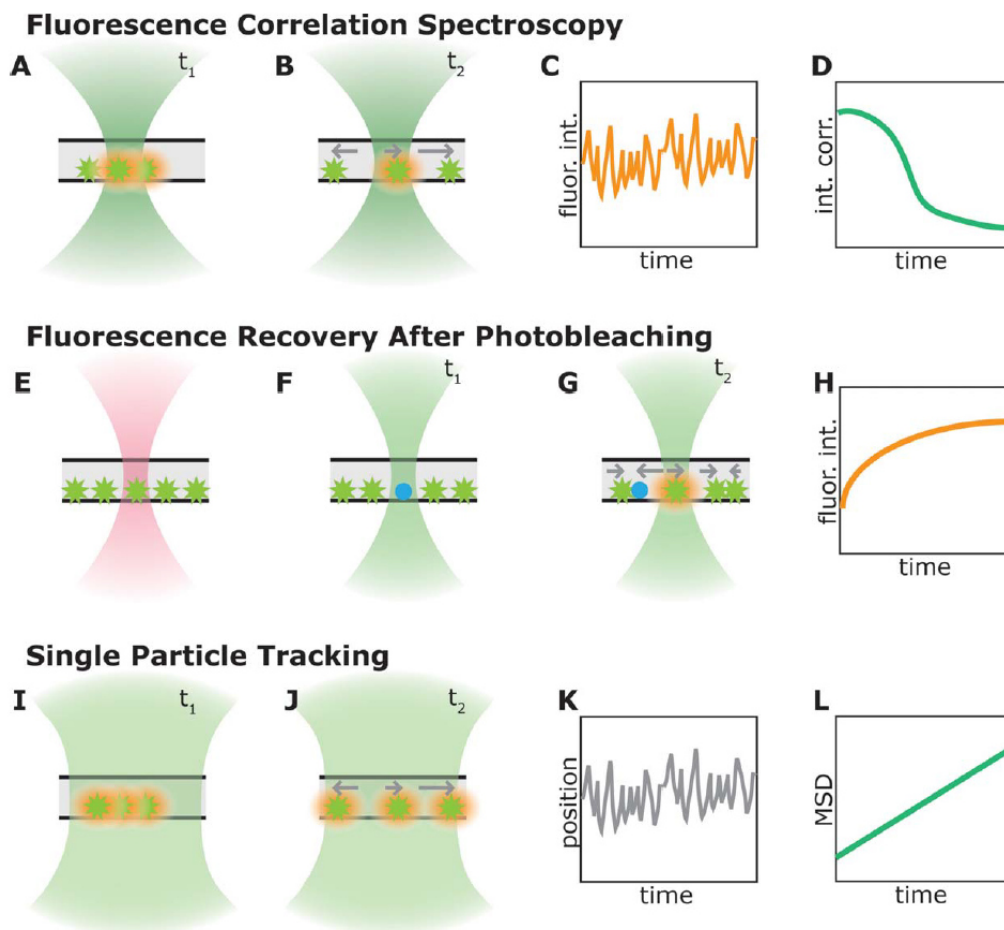
2.4 Difúze

FRAP umožňuje detekovat jak difúzi, tak sílu interakce protein-protein. U fotosyntetických proteinů se zatím jen předpokládá primární role difúze (KAŇA, 2013). Difúze proteinů ve fotosyntetických membránách a kolem nich je nezbytná pro celou řadu procesů a zdá se, že elektronový transport je závislý na difúzi mobilních elektronových přenašečů (MULLINEAUX, 2008). Laterální difúze proteinů je důležitá pro mnoho životních procesů, jako jsou přeměna energie, signalizace, chemotaxe i dělení buněk. U bakterií jsou všechny tyto funkce lokalizovány v membráně. Kvantitativní měření difúze v bakteriálních membránách může poskytnout informace k pochopení těchto důležitých procesů (WILDENBERG et al., 2011).

Difúze je potřebná pro elektronový transport mezi fotosystémy a pro regulaci světlosběrné funkce proteinů, kdy za různých podmínek dochází k shlukování a přesunu fotosyntetických komplexů, fotosyntetických antén (MULLINEAUX a SARCINA 2002). U eukaryotických buněk je imobilita membránových proteinů obecně připisována interakcemi s cytoskeletem, u sinic nejsou důkazy o přítomnosti těchto struktur, proto důvod imobility některých fotosyntetických proteinů není jasný. Nicméně u sinic jsou například komplexy fotosystému II často uspořádány v dlouhých paralelních řadách a právě toto těsné spojení v takovýchto strukturách může zabraňovat difúzi. (MULLINEAUX et al., 1997).

Difúze membránových proteinů u eukaryotických organismů byla podrobně zkoumána rozličnými mikroskopickými metodami jako jsou FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) a SMF (Single-Molecule Fluorescence Microscopy) (viz obr. 12). V případě bakterií

jsou takové experimenty nesnadné kvůli malým rozměrům pozorovaných buněk (WILDENBERG et al., 2011). Pro srovnání, velikost buněk sinic je podobná velikosti jednotlivých chloroplastů.



Obr. 13 : Schématické znázornění fluorescenčních mikroskopických technik umožňujících kvantifikaci dvourozměrné difúze fluoroforů v membráně. A-D: Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). Výkyvy v intenzitě fluorescence vlivem pohybu fluoroforů (např. proteinů, různých chromoforů, fluorescenčních sond) uvnitř a vně detekované oblasti, jsou zaznamenávány v čase a následně autokorelovány. Výsledkem je získání difúzního koeficientu nebo průměru počtu sledovaných částic. E-H: Metoda FRAP. Metoda studuje návrat fluorescence vlivem difúze po vybělení části buňky...Fluorofory v části buňky jsou vysvíceny paprskem laseru (znázorněno růžově) a následně je měřena intenzita fluorescence v čase (jiným nebo jinak silným laserem – znázorněno zeleně). I-L: Zaznamenávání pohybu jednotlivých molekul (SPT) s následným vyhodnocením souboru pořízených mikroskopických snímků. Převzato z WILDENBERG et al. (2011).

Mimo membránových proteinů, hrají ve fotosyntéze sinic a ruduch významnou roli proteiny na povrchu mebrány - fybilizomy (viz kapitola 2.3.2). MULLINEAUX et al. (1997) zjistili, že fykobilizomy difundují mnohem rychleji

než imobilní fotosystém II, což naznačuje nestabilní vazbu mezi ním a fykobilizomy. Laterální difúzi fykobilizomů dávají některé modely do souvislosti s regulací světlosběrného aparátu - stavové přechody. Jedná se vlastně o redistribuci excitací mezi fotosystémy. Rovněž se zdá, že je difúze PBS zásadní a nezbytná při regulaci přenosu energie do fotosystému II a I stavovými přechody. MULLINEAUX et al. (1997) zjistili, že jimi vypočítaný difúzní koeficient naznačuje, že difúze fykobilizomů z fotosystému II k fotosystému I může proběhnout do 100ms.

MULLINEAUX (2008) uvádí, že vysoká rychlost difúze fykobilizomů naznačuje, že zaplnění cytoplazmatické strany thylakoidní membrány pravděpodobně nemá vliv na rychlost fotosyntetických procesů. Mobilita fykobilizomů může klesat vlivem vazby s reakčním centrem. Je zřejmé, že kvůli efektivitě příjmu dopadajícího světla je většina fykobilizomů spojena s reakčními centry většinu času.

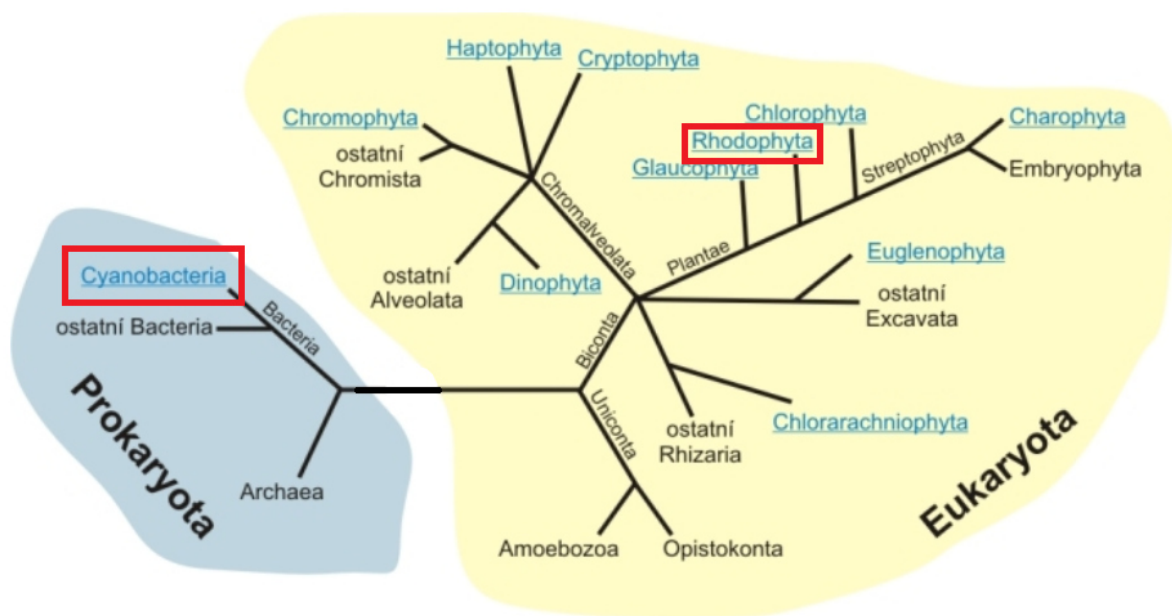
SARCINA et al., (2001) zjistili, že mutace, která způsobila u sinice *Synechococcus* zmenšení velikosti fykobilizomů, měla za následek jejich rychlejší difúzi ($D \sim 0,07 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) a tudíž, že překážky v cytoplazmě jsou jen jedním z faktorů snižujících rychlost difúze. V úvahu je potřeba brát i interakci s membránou, stejně tak jako změna v lipidovém složení membrány.

MULLINEAUX et al. (1997) uvádějí, že difúze fykobilizomů je zřejmě nezbytná z důvodu přístupu ribozomů a dalších cytoplasmatických komponent při syntézách, regulaci i opravách reakčních center. Opravy jsou velmi časté vlivem poškození světlem.

3 Metodika

3.1. Modelové organismy a jejich kultivace

Ke studiu byli vybráni zástupci různých velkých taxonomických skupin (viz obr. 14 a Tab. 1).



Obr. 14: Fylogenetický strom znázorňující příbuzenské vztahy sinic a skupin řas. Červeně jsou označena oddělení, jejichž zástupci byli studováni. (<http://www.sinicearasy.cz/134/uvod>, staženo dne 25.3.2013, upraveno)

Tab. 1: Přehled studovaných organismů a jejich taxonomické zařazení. (System dle www.algabase.com)

Studovaný organismus	Oddělení	Třída	Řád
<i>Porphyridium cruentum</i> (S.F.Gray) Nägeli	Rhodophyta	Porphyridiophyceae	Porphyridiales
<i>Cyanidium caldarium</i> (Tilden) Geitler	Rhodophyta	Cyanidiophyceae	Cyanidiales
<i>Synechococcus</i> Nägeli (kmen PCC7942)	Cyanobacteria	Cyanophyceae	Synechococcales
<i>Synechocystis</i> Sauvageau (kmen PCC6803)	Cyanobacteria	Cyanophyceae	Synechococcales

Mořské ruduchy byly kultivovány v tekutých médiích na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Třeboni ve skleněných válcích o objemu přibližně 300ml. Válce byly umístěny v akváriu temperovaném na 18°C. Z důvodu zabránění sedimentace a poskytnutí rovnoměrného osvětlení celé kultury byl do válců zavedeno probublávání vzduchem přes bakteriální filtr. Intenzita osvětlení zářivkami byla 35 μE . Sterilní ředění kultur probíhalo v cca desetidenních cyklech.

Zásobní buňky sinic byly udržovány na agarovém médiu v Petriho miskách. Před měřením byly buňky přeočkovány do tekutého média a vloženy v 250ml Erlenmayerových baňkách na třepačku. Takto byly buňky kultivovány za podmínek nízkého světla (Low-Light, 5 μE) po dobu pět dní.

3.1 Příprava vzorku pro mikroskopická měření

Mikroskopická měření probíhala v Českých Budějovicích na invertovaném laserovém konfokálním rastrovacím mikroskopu Olympus FV1000, který je vybaven laserovou jednotkou (diodové excitační lasery o vlnových délkách 405 nm, 559 nm, 635 nm a multiargonové excitační lasery s vlnovými délkami 458 nm, 488 nm a 515 nm). Mikroskop je osazen dvěma suchými objektivy (zvětšení 10 \times a 20 \times) a čtyřmi objektivy pro imerzní mikroskopii (zvětšení 20 \times , 40 \times , 60 \times a 100 \times). K dispozici jsou tři detekční kanály pro fluorescenční obraz a jeden pro procházející světlo. Ke snímání obrazu slouží dvě galvanická rastrovací zrcadla. Detekční systém s dichroickými zrcadly a bariérovými filtry poskytuje lineární spektrální rozlišení v širší intervalu od 400 nm do 800 nm s rozlišením 2 nm.

Vzorky kultur byly převáženy z Třeboně do Českých Budějovic v plastových zkumavkách a po převozu byly v mikroskopovně udržovány na slabém světle (intenzita okolo 5 μE). Příprava mikroskopického preparátu spočívala v nanesení ~ 2 μl kultury na čistou agarovou plotnu v Petriho misce, vyříznutí disku agaru s touto kulturou korkovrtem a vložení agaru na krycí sklo (24 \times 60mm, tloušťka 0,7mm) svrchní stranou dolů.. Takto připravený vzorek na krycí sklu se uchytil do držáku preparačního stolku mikroskopu. Nehybnost vzorku během měření jsme tedy dosáhli přichycením mikroorganismů k povrchu agaru (MULLINEAUX a SARCINA, 2002). Schéma mikroskopování bylo tedy následující: inverzní objektiv – vrstva imerzního oleje – krycí sklo – kultura – agarový disk.

3.2 Nastavení konfokálního mikroskopu během měření mobility proteinů

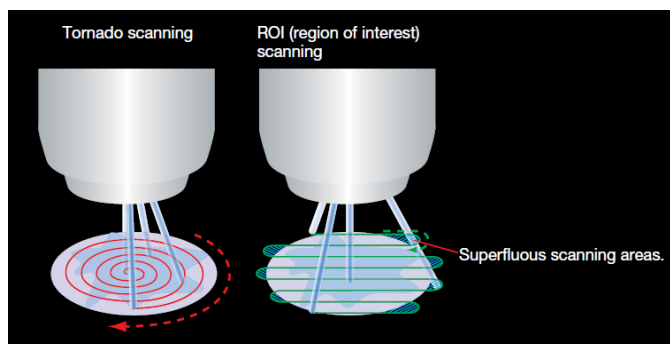
Mobilita Proteinů byla měřena metodou FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching, viz kap. 2.2). V rámci metody FRAP jsou pořizovány časosběrné mikroopické snímky které jsou dále numericky vyhodnocovány. Jednotlivé měření rutinou FRAP se sestává ze tří fází. První fází je snímání fáze před vybělením (*pre-bleach*), následuje fáze vybělení (*bleach*) a poté fáze snímání za účelem sledování vývoje (návratu) fluorescence (post-bleach) (viz Graf 1). Z tohoto hlediska je možné nastavit na ovládacích panelech softwaru mikroskopu tři proměnné, a to a) počet snímků před vybělením, b) délku bělení (v milisekundách) a c) počet snímků po vybělení. V experimentech byly vždy před vlastním vybělením nasnímány tři snímky pro určení bazální fluorescence, k níž se bude vztahovat vybělení.

Chlorofyl byl excitován laserem o vlnové délce 488 nm, emise byla detekována za použití dichroického zrcadla 405/488 nm bariérovými filtry v rozsahu 690 – 790 nm. Stejný laser byl použit pro fotovybělení.

Fykobilizomy byly excitovány laserem o vlnové délce 635 nm, emise byla detekována za použití dichroického zrcadla 405/488 nm bariérovými filtry v rozsahu 645 – 680 nm. Stejný laser byl použit pro fotovybělení.

Ke snímání obrazu byl používán laser o intenzitě od 10 do 20% v závislosti na druhu organismu a použita rychlost snímání byla 2 μ s/Pixel. U časosběrných snímků je žádoucí, zejména při krátkých intervalech mezi jednotlivými snímky, nastavit intenzitu rastrovacího laseru na nízkou intenzitu, aby nedocházelo ke zbytečnému vybělování buňky, což by mohlo mít za následek zkreslení výsledku.

Intenzita bělicího laseru byla vždy 100%. Expozice během fáze 2 (fáze vybělení) byla v módu „tornado“ (viz Obr. 15) nastavena na rychlost snímání 100 μ s/Pixel, případně modu čtyřúhelníku pro ruduchy (možnost ručně nastavit oblast vysvícení tvaru čtverce nebo obdélníku) byla rychlost rastru 200 μ s/Pixel. Přehled používaných laserů a detekce zájmových struktur je uveden v tabulce 2.



Obr. 15: Porovnání módů pro vysvicování (bleaching) konfokálního mikroskopu Olympus FV1000. Vlevo mód tornádo se spirálně se pohybujícím laserem, vlevo laser standardně řádkující (<http://www.olympusmicro.com/brochures/pdfs/FV1000.pdf>, staženo dne 26.3.2013).

Tab. 2: Přehled používaných laserů a detekce zájmových struktur u sinic

Objekt pozorování	Detekce signálu	Vlnová délka laseru
Fykobilizomy	645 - 680nm	635nm
Fykobiliproteiny	645 - 680nm	635nm
Chlorofyl	690 - 790nm	488nm

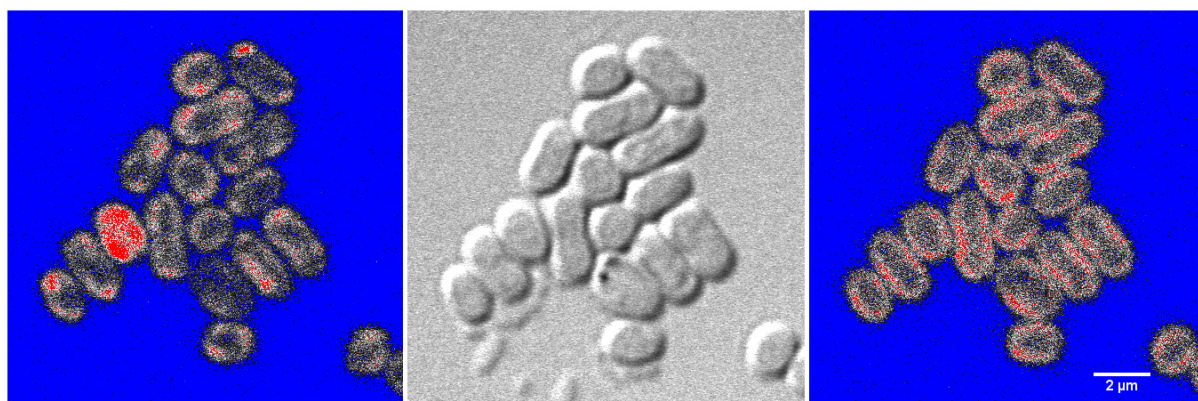
Vzhledem ke konsenzu mezi rychlostí snímání a kvalitou pořízených snímků se velikost snímaného pole ustavila na rozměrech 800×800 pixelů. Velikost vybělované oblasti (ROI – *Region of interest*) v módu tornádo byla vždy nastavována na hodnotu 21,6ms, to znamená, že provedení jedné celé kompletní spirály (viz obr.15) trvalo 21,6ms. Z toho vyplývá, že při nastavení času vybělení například 200ms vykoná vybělovací laser necelých deset spirál po sobě.

3.3 Výběr buněk

Buňky vzorků vždy vykazovaly jistou heterogenitu, pro měření však byly použity pouze ty, které se co nejvíce blížily ideotypu standardní buňky daného organismu. V praxi byly použity pouze „standardní“ buňky podobného tvaru, ve stejné fázi cyklu (např. nedělící se buňky) buňky s rovnoměrnou distribucí a intenzitou signálu

fluorescence. Pro normalizaci výsledků podle sousední referenční buňky bylo nutno vybírat takové buňky, které splňovaly výše uvedené a zároveň od sebe byly vzdáleny tak, že se mohly snímat současně v rámci jednoho snímku.

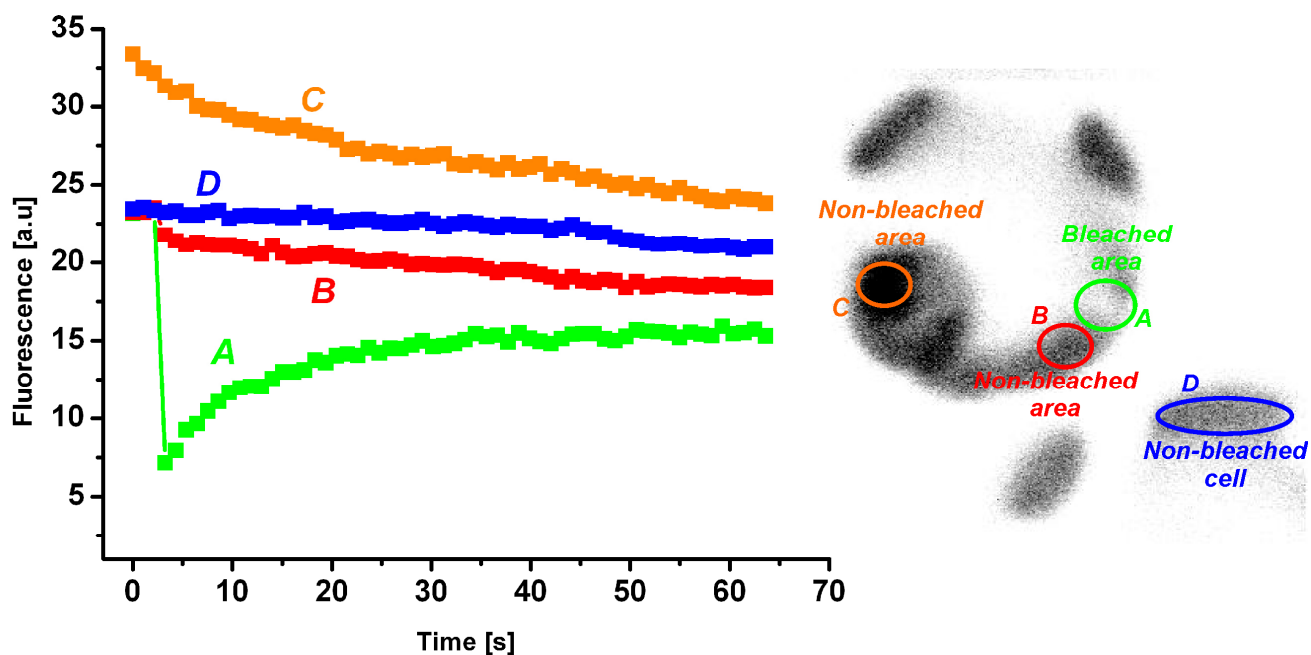
Pro zobrazování během měření byl vždy použit barevná škála „Hi-Lo“ (z anglického High-Low, vysoká-nízká). Barevná škála Hi-Lo převádí pozadí bez signálu do modré a přesycení detektoru do červené; optimální signál je pak zobrazován na škále od černé (nízký signál) přes šedou a bílou (optimální signál) (viz obr. 16). Nastavení detektoru je tak intuitivní a rychlé. Jiné škály které jsou v nabídce, například „Cyan“, je signál reprezentován jednobarevně v různých stupních intenzity a pozadí je černé. Hrozí proto nebezpečí při nastavení detektoru, že dojde neúmyslně k přesycení signálu, což zkreslí výsledek.



Obr. 16: Snímek skupiny buněk Synechocystis PCC6803. Levá část: signál fykobilizomů, střední část: obraz v procházejícím světle, pravá část: signál chlorofylu. Pravá a levá část zobrazena v módu "Hi-Lo".

3.4 Numerické vyhodnocení snímků– určení mobilní složky

Nasnímané časosběrné snímky byly primárně zpracovány pomocí software Olympus FluoView. Nejprve se označily jednotlivé oblasti (viz obr. 17), u nichž se později vygenerovala numerická data průběhu fluorescence v čase.

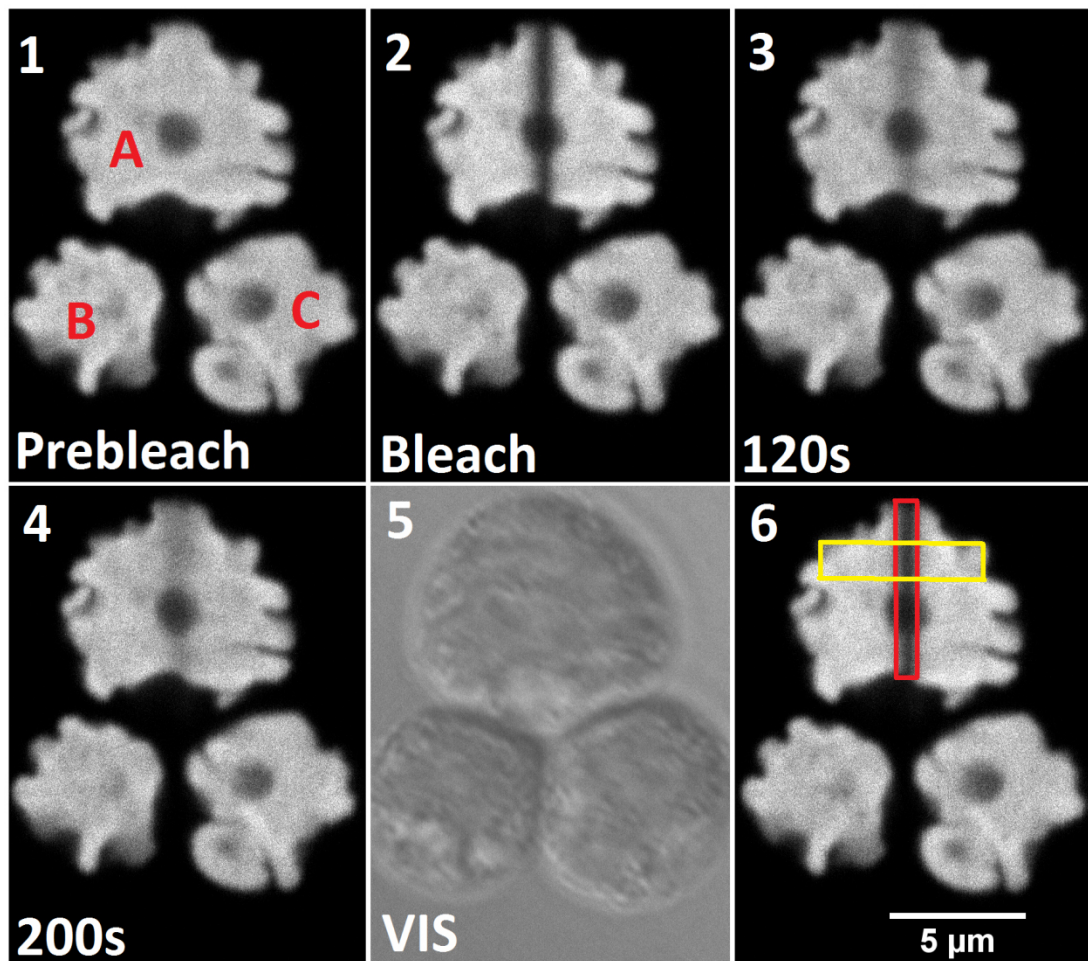


Obr. 17: Výběr jednotlivých měřených oblastí nasnímaných buněk a průběh křivky průběhu jejich fluorescence v čase. A - zeleně, oblast vybělení silným paprskem laseru, B - červeně, oblast blízka oblasti vybělené, C - oranžově, vzdálenější oblast v rámci buňky, kde došlo k vybělení, D - modře, referenční buňka bez zásahu. Převzato z Kotabová et al. (2011).

Tato data byla následně zkopírována do Excelu, kde se vynesl průběh fluorescence všech označených oblastí v čase a data byla znormalizována na vlastní celou buňku nebo buňku referenční (na průměr fluorescence celé buňky v průběhu času). Na základě výsledných křivek proběhla selekce a výsledné křivky z vybraných měření se zprůměrovaly do jediné, která reprezentuje velikost mobilní složky.

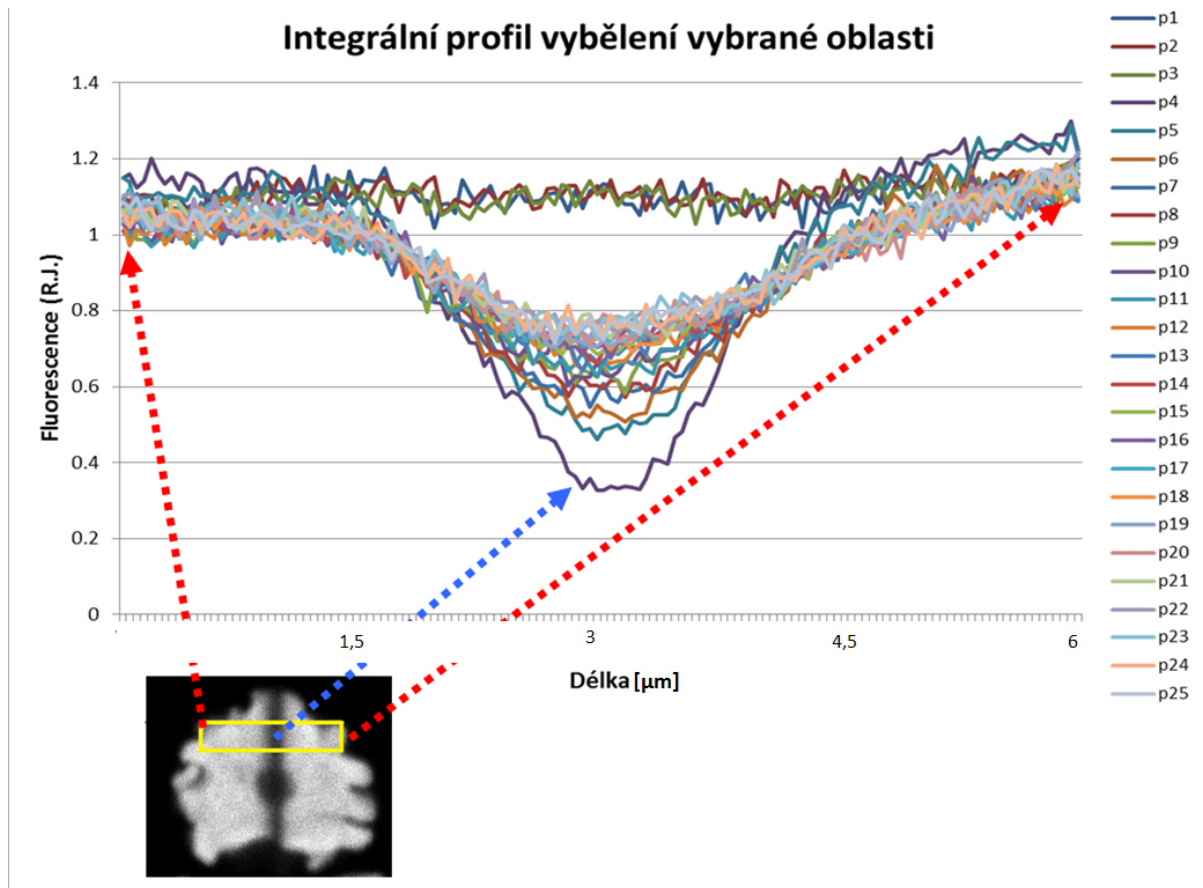
3.5 Vyhodnocení – určení difúzního koeficientu

Primární data reprezentovaná časosběrnými snímky se exportovala ve formátu TIFF do programu zpracování obrazu ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012). V něm se v první fázi jednotlivé obrazy spojily do jednoho snímku a oddělila se transmisní část. Následovalo označení oblastí, která se bude vyhodnocovat (viz obr.18) a následné vygenerování numerických dat průběhu fluorescence.



Obr. 18: Snímky *Porphyridium cruentum* v programu ImageJ. 1 - snímek před fotovybělením (prebleach), vybraná buňka pro vybělení (A), dvě sousední referenční buňky (B, C); 2 - snímek pořízený ihned po vybělení, čas nula; 3 - snímek pořízený 120 sekund od vybělení (jasně patrný návrat fluorescence); 4 - snímek pořízený 200 sekund od vybělení; 5 - snímek buněk v procházejícím světle; 6 - snímek buňky ihned po vybělení s vyznačeným místem vybělení (oblast orámovaná červeným obdélníkem) a místem, které bylo vybráno pro výpočet difúzního koeficientu.

Stejný typ dat se vygeneroval pro referenční buňku kvůli normalizaci. Poté se data zkopírovala do Excelu a na základě vizualizace grafem se určil interval délky měřené části buňky, kde došlo k vybělení (viz obr. 19).



Obr. 19: Integrální profil vybrané části buňky - vybělená oblast (střední prohlubující se část, interval 33-113) a blízké okolní oblasti (napravo a nalevo). Křivky (p1-p25) reprezentují časový vývoj. První tři (p1-p3) před vybělením (pre-bloch), křivky p4-p25 jsou fáze po vybělení a návratu fluorescence do místa vybělení.

Z těchto dat se vytvořily dva soubory ve formátu CSV a do poznámkového bloku se zadaly hodnoty specifikace souboru - počet vnitřních uzlů, počet časových vrstev, časový krok a prostorový krok.

Vlastní výpočet provedl program FRAP v2.0 (PAPÁČEK et al. 2012), vyvinutý Ctíradem Matonohou (Ústav informatiky AV ČR), Radkem Kaňou (Mikrobiologický ústav AV ČR) a Štěpánem Papáčkem (Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita). Výsledkem je hodnota difúzního koeficientu v $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

4 Výsledky

4.1 Mobilita proteinů u ruduch

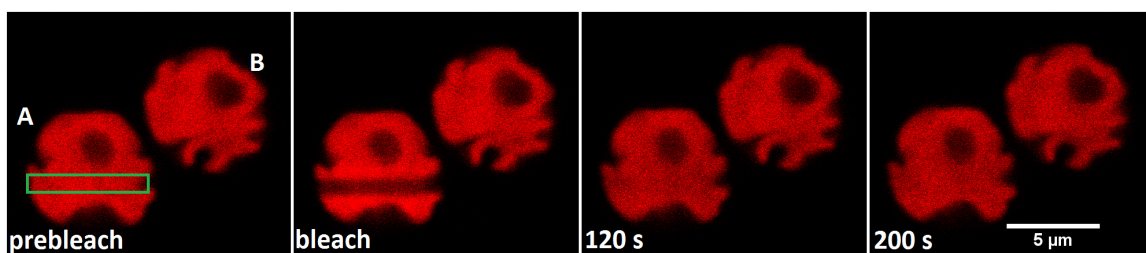
4.1.1 FRAP

Ruduchy (dříve tzv. červené řasy) jsou skupinou řas obsahující přibližně 5500 druhů v 600 rodech. V naprosté většině převládají mořské druhy, sladkovodních je zhruba 150 (VAN DEN HOEK et al., 1995). Většina druhů je mnohobuněčných. Ruduchám chybí chlorofyl *b* a *c*, zato však obsahují allofykocyanin, fykoerytrin a fykocyanin ve formě fykobilizomů. Pro studium kinetiky fykobilizomů byly vybrány dva druhy ruduch jako modelové organismy: *Porphyridium cruentum* a *Cyanidium caldarium*.

Porphyridium cruentum, poprvé popsána v roce 1849, je jednobuněčnou ruduchou a patří do skupiny primitivních zástupců řádu Porphyridiales. V minulosti byly popsány ekotypy terestrické i mořský, přičemž se usuzuje na mořský původ druhu (JONES et al., 1963). V posledních letech se tento druh rovněž jeví velmi perspektivně pro biotechnologické využití (např. HÉDOIN et al., 2006; OH et al. 2009).

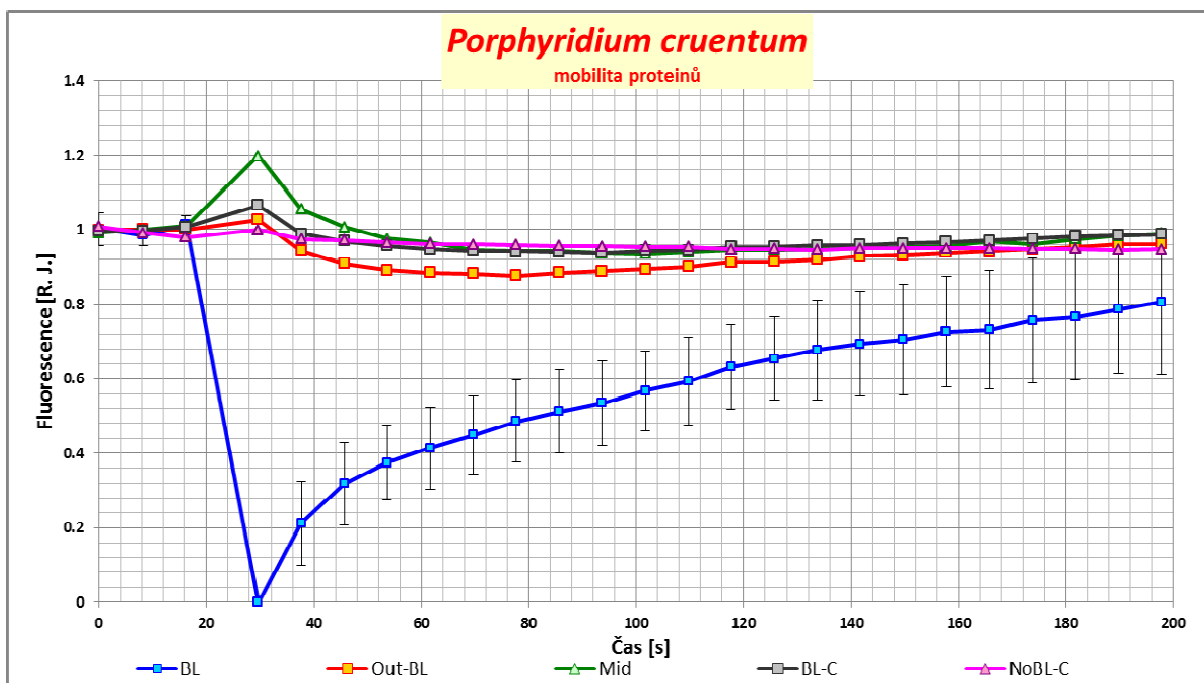
Primitivní jednobuněčná ruducha *Cyanidium caldarium* z řádu Cyanidiales byla poprvé popsána v roce 1898 z termálních pramenů v Yellowstonském národním parku. Přírodním prostředím jsou horké prameny a půdy, u nichž je hodnota pH nižší než 5 a teplota prostředí vyšší než 40 °C (DOEMEL a BROCK, 1971).

Buňky rostly v kultivačních válcích probublávaných vzduchem (přes bakteriální filtr) s intenzitou osvětlení 30μE a světelným režimem 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Buňky byly excitovány laserem o vlnové délce 635 nm a emise byla detekována v spektrálním rozsahu 655 až 755 nm. Vzorke byly snímány v časových sekvencích ve formě časosběrných snímků, s intervalem osm sekund. Tato sekvence vždy obsahovala 25 snímků nasnímaných během 200 sekund. První tři snímky reprezentovaly stav před vybělením, zbylých 22 snímků stav po vybělení s typickým návratem intenzity fluorescence který byl pozorován v místě vybělení (viz obr. 20). Bělení laserem o vlnové délce 635 nm trvalo 12 sekund. Oblast bělení byla vybírána přibližně ve středu buňky a měla tvar obdélníku.



Obr. 20: Ukázka časoběrné série snímků získaných metodou FRAP pro fykobilizomy řasy *P.cruentum*. Zleva: snímek před vybělením; snímek vybělení; návrat fluorescence, čas 120s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 200s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100×, měřítko 5 μm (Krafl, 2013).

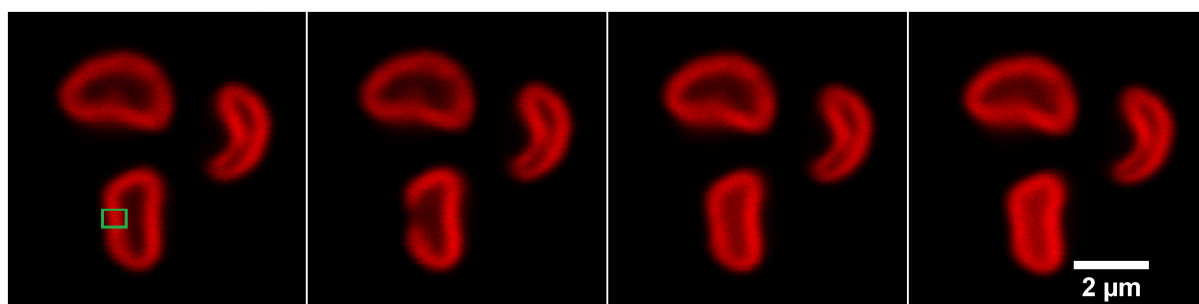
Hodnoty intenzity fluorescence v místě vybělení během časoběrné série (viz Obr. 20) byla vynesena numericky do grafu (Graf 2). Výsledný graf je průměrem z osmi časoběrných snímků. Z grafu je patrné, že návrat poloviny fluorescence (parametr $\tau/2$) nastal přibližně třicet sekund po vybělení a velikost mobilní složky je přibližně 80%. Hloubka vybělení byla rovna 43%.



Graf 2: Průběh návratu fluorescence proteinů po fotovybělení při experimentu FRAP u *P. cruentum*. Průměr ze dvou biologických opakování ($n = 8 (4+4)$). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 635\text{nm}$) byla 12 000ms; hloubka vybělení 43%; data jsou normalizována na sousední nevyfotobělenou buňku v rozsahu $<0,1>$. Legenda:

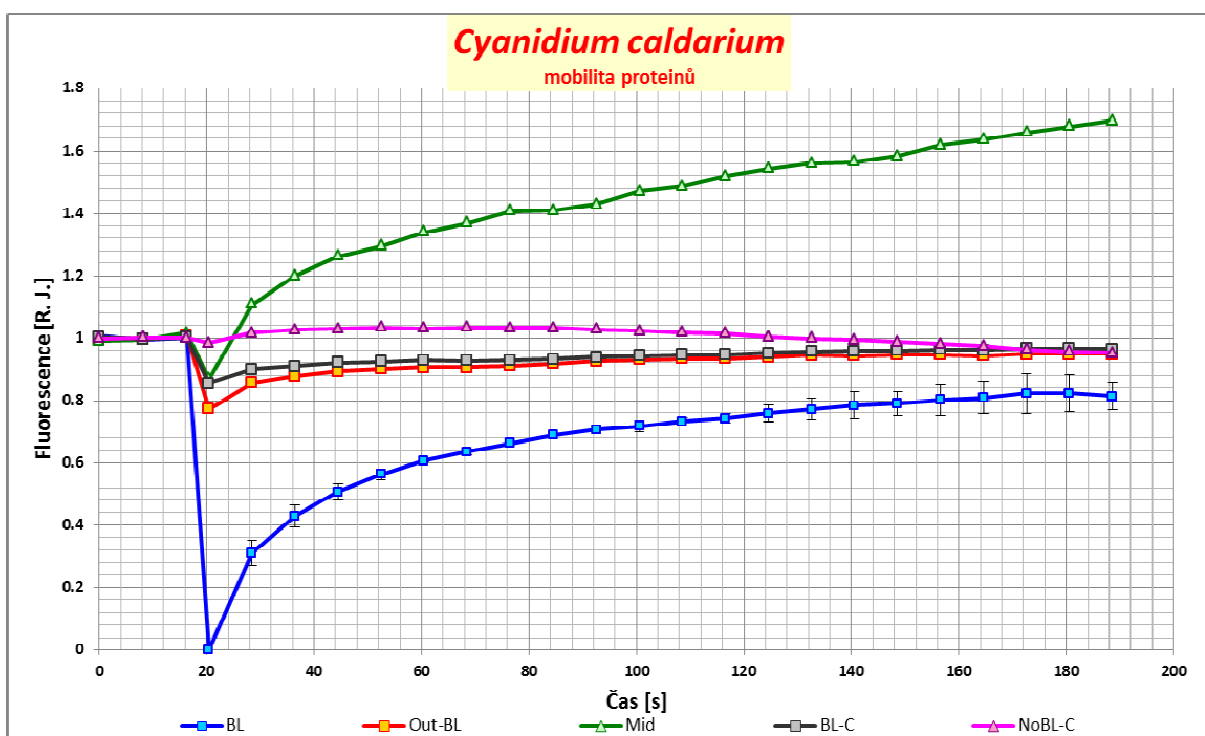
BL - vybělená oblast, *Out-BL* - nevybělená plocha thylakoidní membrány, *Mid* - střed buňky mimo thylakoidní membránu, *BL-C* - celá buňka.

Měření buněk *C. caldarium* probíhalo obdobným způsobem jako pro řasu *P. cruentum*, jenom tvar vybělované oblasti a délka bělení se odlišoval od předchozího nastavení. K bělení bylo vybíráno místo v rámci thylakoidních membrán, které jsou lokalizovány při okraji buněk. Obdélník oblasti bělení byl tedy kratší (viz obr. 21). Vybělování trvalo pouze 1,75 sekundy a bylo dosaženo hloubky vybělení 64%.



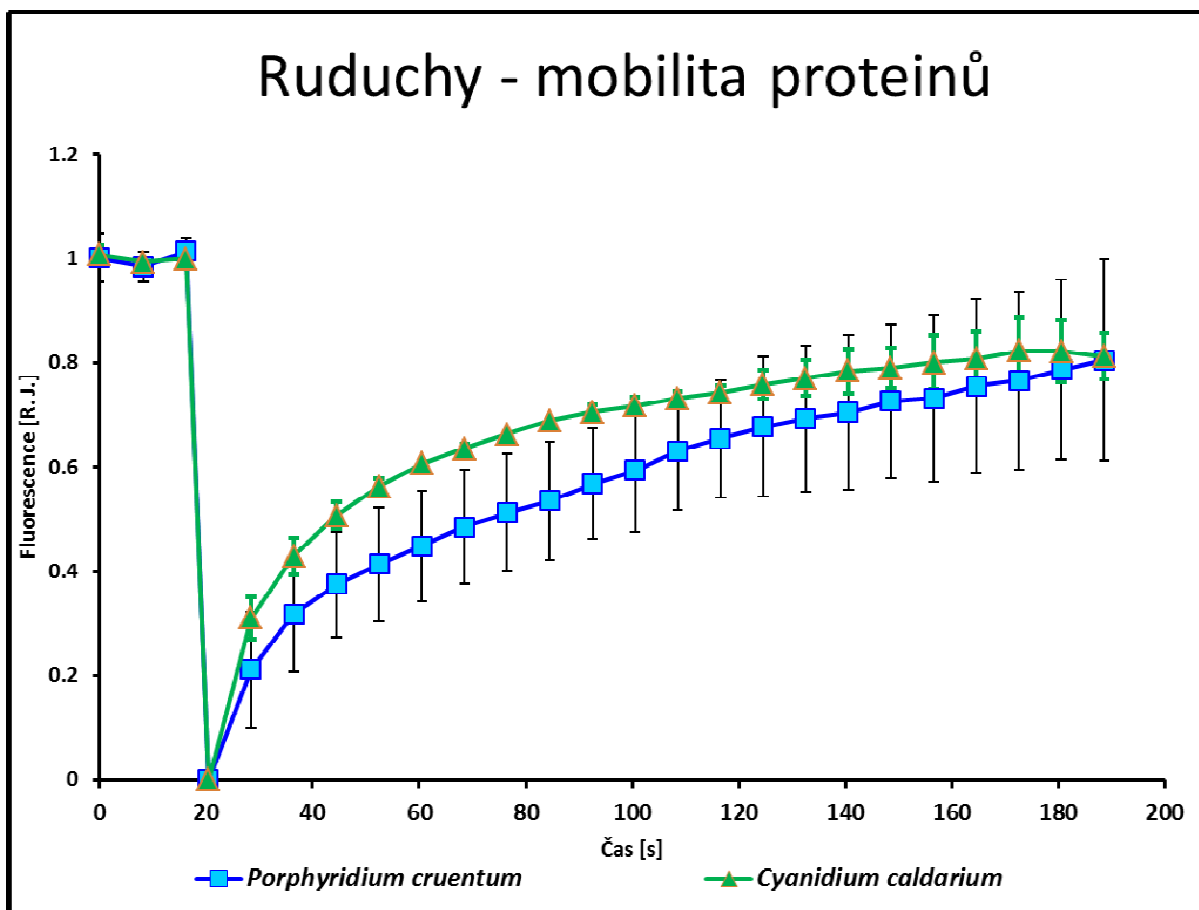
Obr. 21 : Časoběrná série snímků získaných metodou FRAP pro fykobilizomy řasy *C. caldarium*. Zleva: snímek před fotovybělením; snímek po vybělení; návrat fluorescence, čas 120s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 200s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100× (Autor: Krafl, 2013).

Hodnoty intenzity fluorescence v místě vybělení během časoběrné série (viz Obr. 21) byla vynesena numericky do grafu (Graf 3), kde ve výsledném grafu je křivka návratu fluorescence reprezentující osm vzorků ze dvou biologických opakování. Buňky ruduchy druhu *Cyanidium caldarium* adaptovaného na suboptimální teplotu 18 °C vykazaly velikost mobilní frakce přibližně 81% a parametr $\tau/2$ byl přibližně 14 sekund. V porovnání s *P. cruentum* je parametr $\tau/2$ přibližně poloviční, ale mobilní složka stejně velká (cca 80%). Nejpatrnějším rozdílem je skutečnost, že v oblasti středu buňky se v průběhu času zvýšila fluorescence oproti výchozímu stavu téměř dvojnásobně. Že se nejedná o artefakt měření dokládá porovnání s referenčními buňkami (u nichž nedošlo k fotovybělení, křivka „NoBL-C“ v Grafu 3), kde takovýto nárůst fluorescence patrný není.



Graf 3: Průběh návratu fluorescence proteinů (fykobilizomů) po fotovybělení při FRAP u *C. caldarium*. Průměr ze dvou biologických opakování ($n = 8$ (4+4)). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 635\text{nm}$) 1 750ms; hloubka vybělení 64%; normalizováno na sousední nevyfotobělenou buňku $<0,1>$. Legenda: BL - vybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, Mid - střed buňky mimo thylakoidní membránu, BL-C - celá buňka.

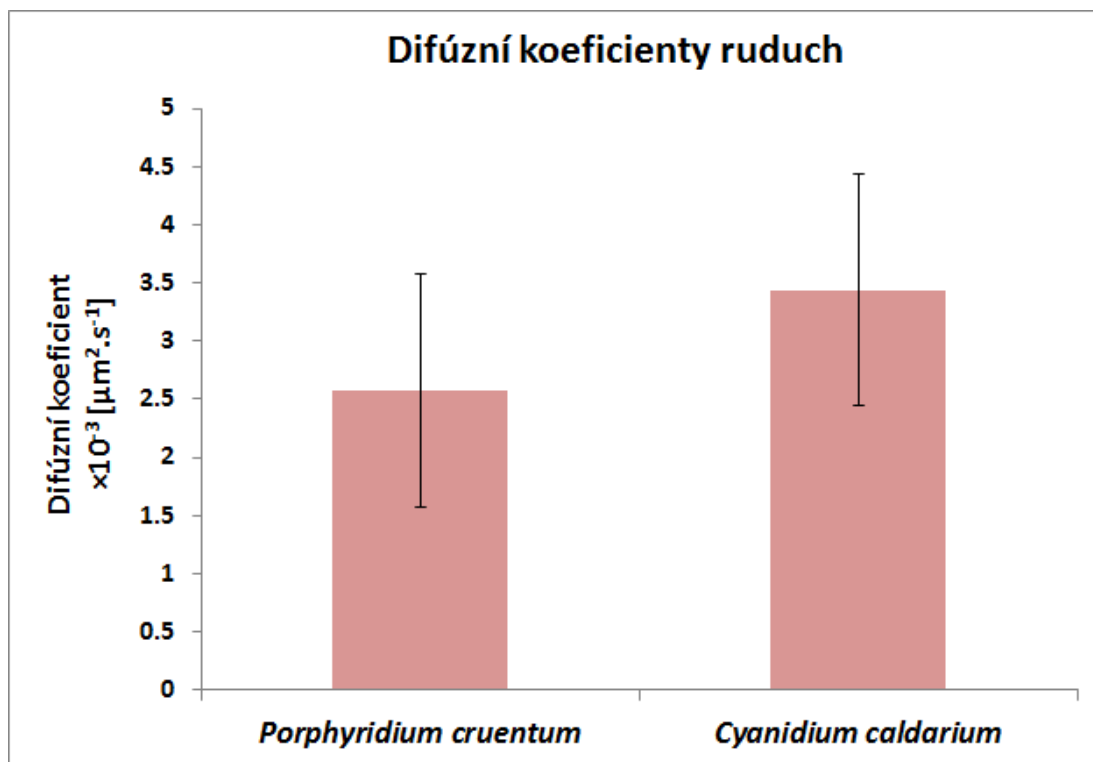
Porovnání velikosti a průběhu křivek návratu fluorescence poskytuje následující graf 4, z něhož vyplývá, že buňky *P. cruentum* i *C. caldarium* (adaptované na růstovou teplotu 18 °C) vykazovaly podobnou mobilitu fykobilizomů.



Graf 4: Porovnání mobility proteinů (fykobilizomů) dvou druhů ruduch *P. cruentum* a *C. caldarium*. Data představují průměry a směrodatné odchylky získané pro $n = 8$. Kultivováno při teplotě 18°C.

4.1.2 Difúzní koeficient

Difúzní koeficient pro *P. cruentum* byl vypočítán dle metody PAPÁČEK et al. (2012) (viz Materiál a metody) z naměřených časosběrných sérií získaných pro tři biologických opakování uskutečněných v průběhu dvou měsíců. Celkem bylo zpracováno osmnáct časosběrných sérií, a vypočtená průměrná hodnota difuzního koeficientu byla $2,57 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou $1,78 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Numerickou analýzou osmi časosběrných sérií naměřených pro *C. caldarium* byla získána hodnota difuzního koeficientu $3,44 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou $2,76 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Porovnání těchto výsledků je zobrazeno grafu 5.



Graf 5: Porovnání difúzních koeficientů mobility fykobilizomů u ruduch *P. cruentum* a *C. caldarium* adaptovaného na 18 °C. Data představují průměry a směrodatné odchylky získané pro $n = 8$.

4.1.3 Shrnutí výsledků

Tabulka 3 ukazuje výsledky získané metodou FRAP u dvou zkoumaných zástupců ruduch.

Tab. 3: Přehled naměřených výsledků pro u dvou druhů ruduch

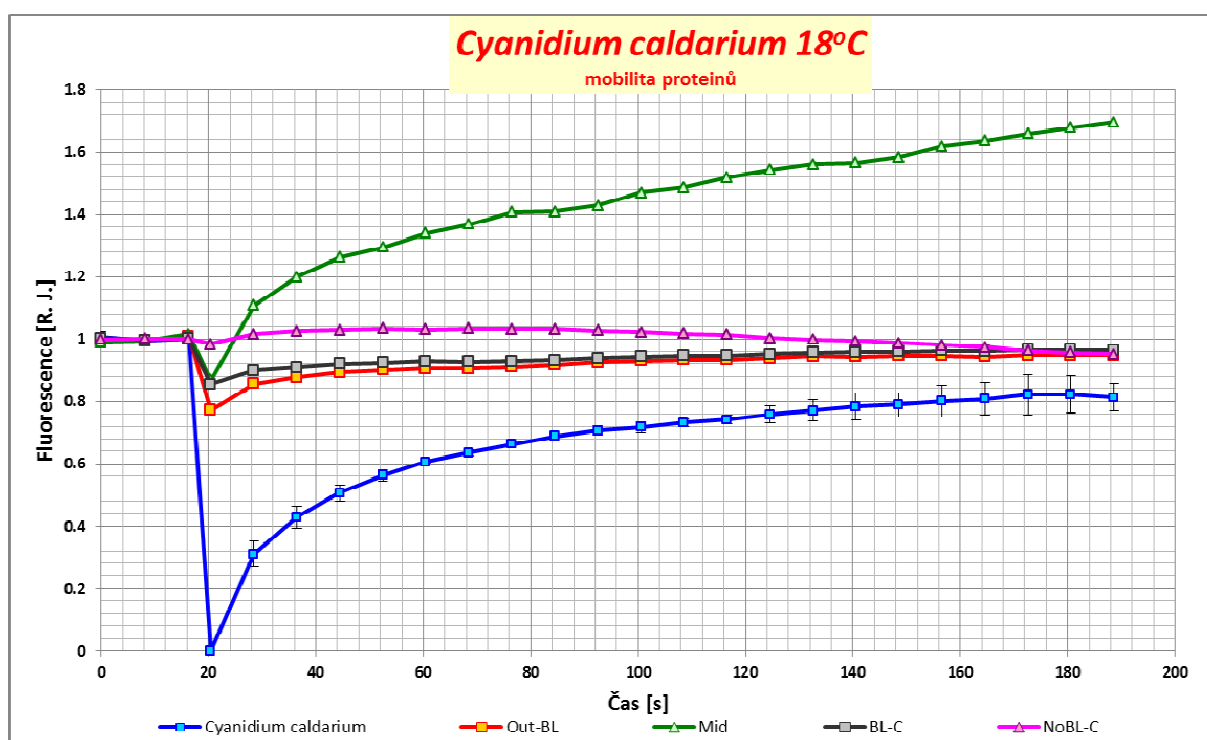
Organismus	$\tau/2$ (s)	Mobilní frakce (%)	Difúzní koeficient ($\times 10^3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
<i>Porphyridium cruentum</i>	~ 30	80	2,57
<i>Cyanidium caldarium</i>	~ 14	81	3,44

4.2 Porovnání vlivu růstové teploty kultivace na mobilitu proteinů *C. caldarium*

4.2.1 FRAP

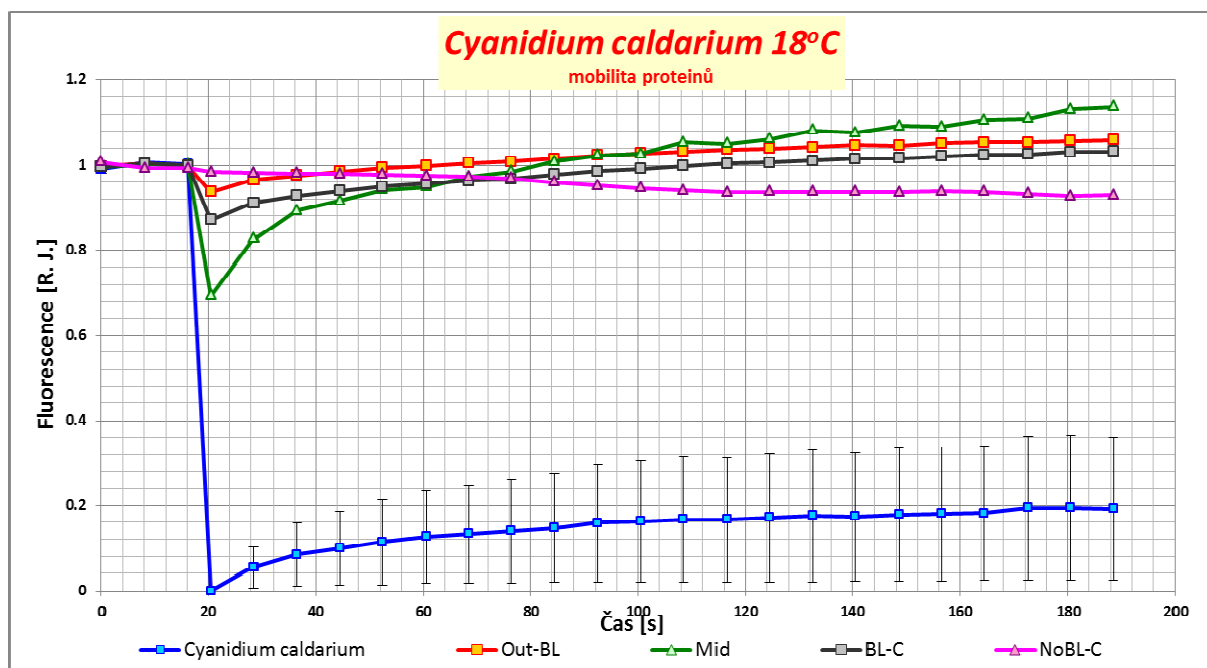
Ruducha *C. caldarium* byla přeočkována a několikafázově aklimatizována z udržovací kultivační teploty 18 °C na 38 °C, která zhruba odpovídá teplotě přirozeného prostředí této ruduchy. Mobilita fykobilizomů byla měřena přibližně po měsíci od úspěšné aklimatizace. Jako kontrola byl současně měřen i vzorek adaptovaný během růstu na 18 °C.

Měření vzorků obou kultur bylo provedeno se stejným nastavením měřicího protokolu metody FRAP. Délka vybělování byla 1,750 s a časosběrná série obsahovala 25 snímků (3 snímky před fotovybělením, 22 následně s návratem fluorescence) s intervalem snímání 8 sekund. Hodnoty intenzity fluorescence pro *C. caldarium* během časosběrné série byly vyneseny numericky do grafu (Graf 6).



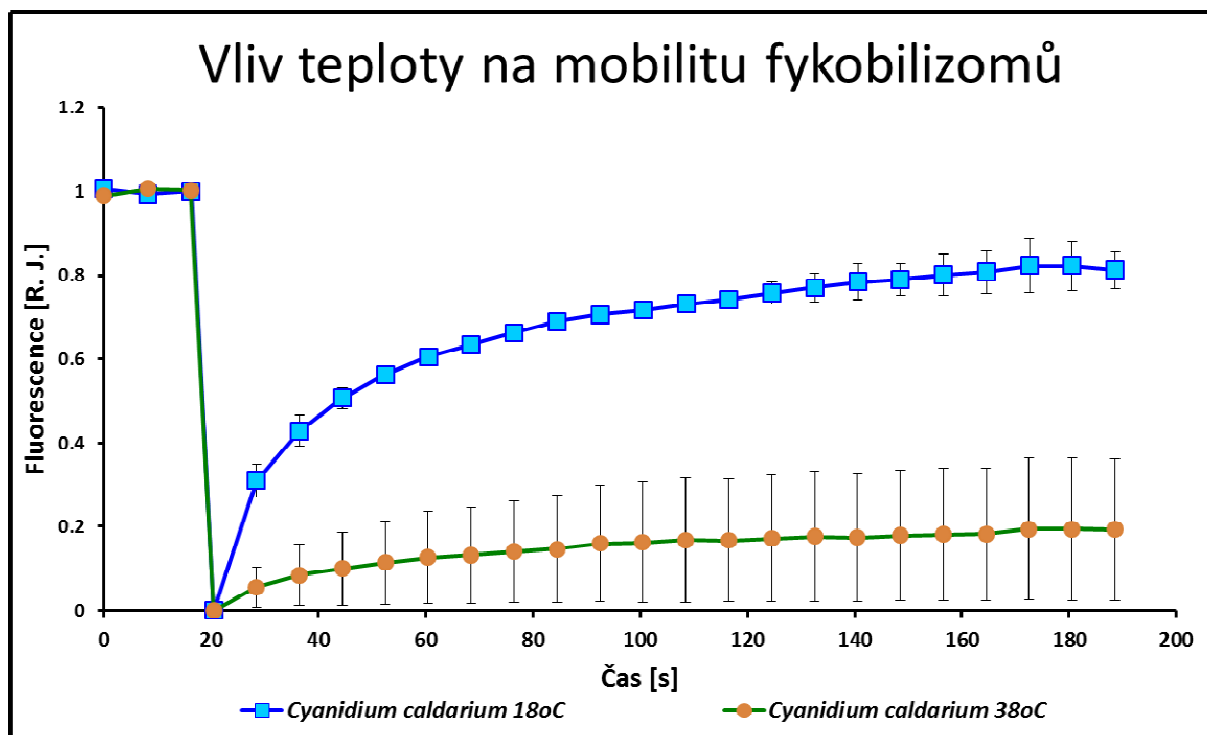
Graf 6: Průběh návratu intenzity fluorescence fykobilizomů po fotovybělení při experimentu FRAP u *C. caldarium*, kultivovaného při teplotě 18°C. Průměr ze dvou biologických opakování ($n = 8$ (4+4)). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 635\text{nm}$) 1 750ms; hloubka vybělení 64%; normalizováno na sousední nevyfotobělenou buňku $\langle 0,1 \rangle$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami - fotovybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, Mid - střed buňky mimo thylakoidní membránu, BL-C - celá buňka.

Zobrazená data (Graf 6) ukazují typický průběh návratu fluorescence po fotovybělení. Hloubka vybělení u buněk kultivovaných při 18 °C byla 64%, velikost mobilní složky činila 81% a parametr $\tau/2$ byl přibližně 14 s. Tento průměr byl získán z osmi nezávislých časoběrných sérií.



Graf 7: Průběh návratu fluorescence fykobilizomů po fotovybělení při FRAP experimentu u *C. caldarium*, kultivovaného při teplotě 18°C. Průměr ($n = 3$). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 635\text{nm}$) 1 750ms; hloubka vybělení 78%; normalizováno na sousední nevyfotobělenou buňku $<0,1>$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami - fotovybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, Mid - střed buňky mimo thylakoidní membránu, BL-C - celá buňka.

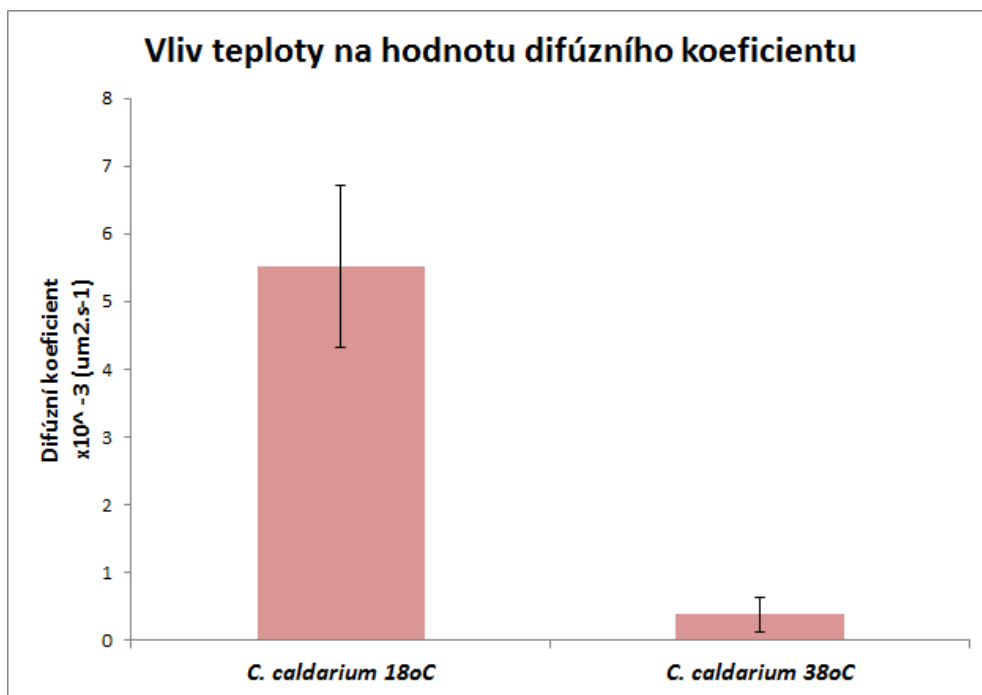
Velikost mobilní složky kultury z 38 °C byla jen zhruba 20%, hloubka vybělení 78% a parametr $\tau/2$ byl 24 s. Mobilní složka byla tedy zhruba čtvrtinová oproti kultuře z 18 °C. Rovněž nebyl zaznamenán vysoký nárůst fluorescence ve středu buňky (porovnej graf 6 a 7, zelená křivka). Průměr byl vypočítán ze tří časoběrných sérií. V následujícím grafu 8 jsou pro porovnání vyneseny získané křivky návratu fluorescence pro *C. caldarium* adaptované na 18 °C a 38 °C.



Graf 8: Vliv teploty kultivace na mobilitu proteinů u *Cyanidium caldarium*.

4.2.2 Difúzní koeficient

U nasnímaných vzorků z kultivace 18°C a 38°C byla vypočítána hodnota difúzního koeficientu dle metody PAPÁČEK et al. 2012 (viz Materiál a metody). Hodnoty difúzního koeficientu byly stanoveny na $5,52 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou $1,19 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (pro buňky z kultivace při 18°C) a $0,378 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou $0,248 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ z kultivace při 38°C. Tyto hodnoty jsou pak souhrnně uvedeny v grafu 9.



Graf 9: Porovnání vlivu teploty kultivace na velikosti hodnoty difúzního koeficientu fykobilizomů u ruduchy *C. caldarium*.

4.2.3 Shrnutí výsledků

Tabulka 4 ukazuje výsledky porovnání vlivu teploty kultivace na velikost mobilní složky získané metodou FRAP u druhu *Cyanidium caldarium*.

Tab. 4: Přehled naměřených výsledků pro porovnání vlivu teploty na mobilitu proteinů

Organismus	$\tau/2$ (s)	Mobilní frakce (%)	Difúzní koeficient ($\times 10^3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
<i>Cyanidium caldarium 18°C</i>	~ 14	81	5,520
<i>Cyanidium caldarium 38°C</i>	~ 24	20	0,378

4.3 Mobilita fykobilizomů/fykobiliproteinů u různých sinic

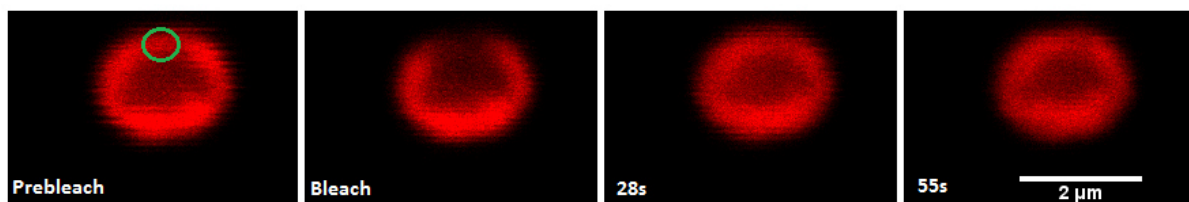
4.3.1 Mobilita fykobilizomů u sinic, metoda FRAP

K porovnání mobility fykobilizomů byla vybrána mořská sinice *Acaryochloris* a dva kmeny sladkovodní sinice *Synechocystis* PCC6803 která

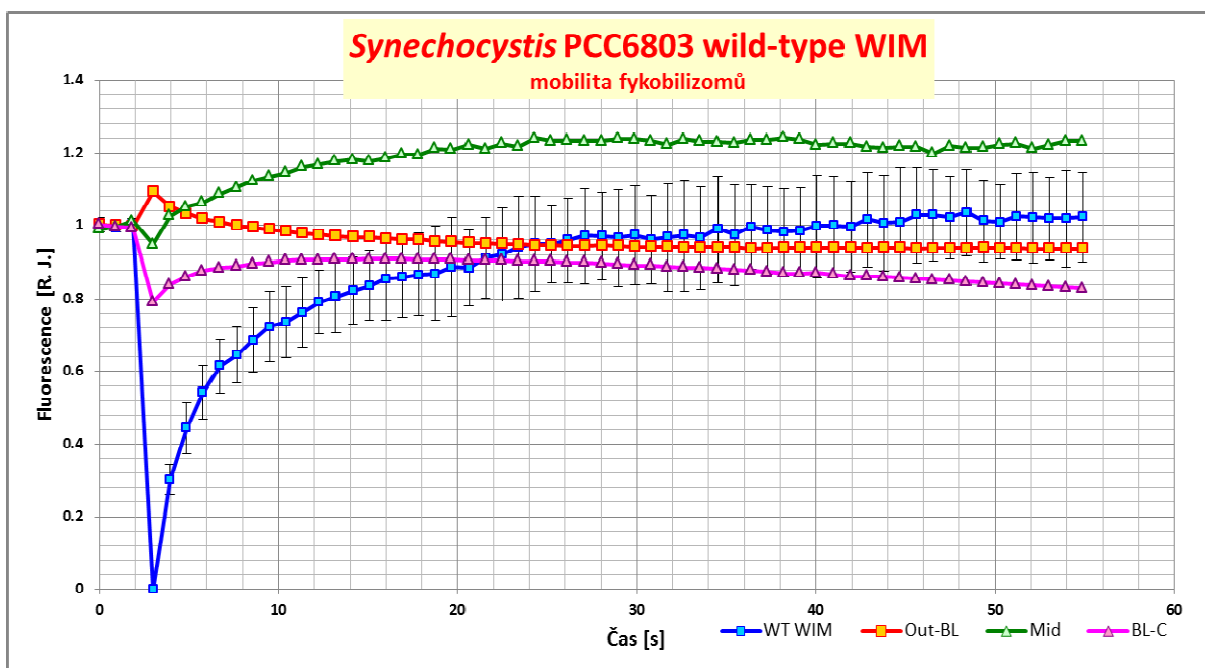
pocházejí s laboratoře Wim Vermaase (označení „WIM“) a Petera Nixona (označení „NIX“). *Synechocystis* PCC6803 je jednobuněčná sladkovodní sinice poprvé izolovaná v roce 1968 a poté zařazená do sbírek sinic Pasteurova ústavu (zkratka PCC). Od té doby představuje jeden z nejrozšířenějších organismů v základním výzkumu. Jednak díky svému malému genomu, díky čemuž lze dobře připravovat mutanty technikami rekombinantní DNA, jednak v neposlední řadě i díky její schopnosti růst heterotrofně (IKEUCHI a TABATA, 2001). Genom sinice *Synechocystis* PCC6803 byl poprvé osekvenován v roce 1996 a tato sinice se tak stala prvním osekvenovaným fototrofním organismem a čtvrtým osekvenovaným organismem celkově (KANeko et al., 1996).

Acaryochloris marina je symbiotická sinice žijící v sumce *Lissoclinum patella* (LÓPEZ-LEGENTIL et al., 2011). Byla objevena v roce 1996. V reakčním centru má jako jediný známý druh chlorofyl *d* (LOUGHLIN et al., 2013). Obsahuje ve vodě rozpustné fykobiliproteiny (PBS), které jsou menší obdobou fykobilizomů. Sestávají ze čtyř hexamerických jednotek podobných výběžkům (rods) klasických fykobilizomů u sinic (CHEN et al., 2009). Během kultivace byly buňky přeneseny z agarové plotny do 100 ml tekutého média umístěného ve 250 ml Erlenmayerově baňce a tato byla přemístěna na třepačku s intenzitou světla 5 μ E, kde byla tato sinice kultivována po dobu pěti dní.

U *Synechocystis* kmen WIM bylo změřeno pět vzorků mobility fykobilizomů za použití červeného 635 nm laseru pro vybělování i rastrování. Délka vybělování byla 250 ms. Velikost vybělované oblasti byla nastavena tak, že jedna kompletní spirála laserem byla provedena za 21,6 ms. Za celou dobu vybělování 250 ms tedy laser vykonal zhruba jedenáct a půl spirál. Časoběrná řada obsahovala šedesát snímků (tři před vybělením, zbylé s návratem fluorescence po vybělení) s časovým intervalem 0,9 sekundy na snímek, ukázka vybraných snímků z časoběrné série je zobrazena v Obr. 22. Buňky *Synechocystis* PCC6803 WT WIM vykazaly velikost mobilní frakce 100%. Návrat fluorescence byl rychlý, čemuž odpovídá i parametr $\tau/2$, jenž byl roven přibližně 2,5 s. Hloubka vybělení činila 69% (viz Graf. 10).

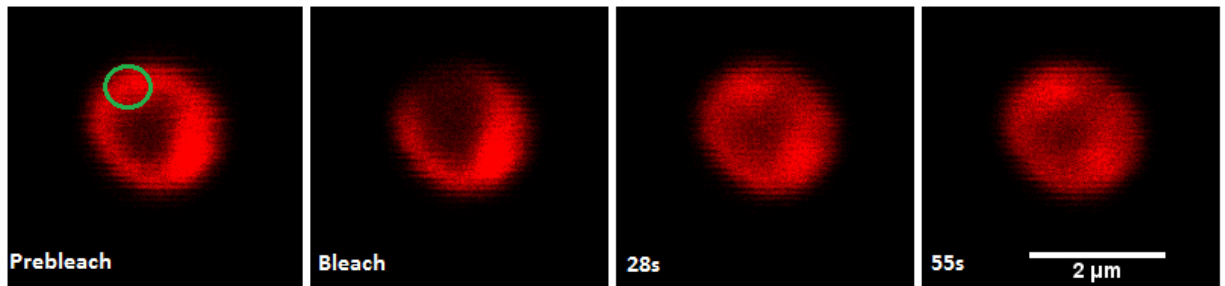


Obr. 22 : Časoběrný snímek FRAP fykobilizomů u *Synechocystis PCC6803 WIM*. Zleva: snímek před vybělením; snímek vybělení; návrat fluorescence, čas 28s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 55s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100× (Autor: Krafl, 2013).

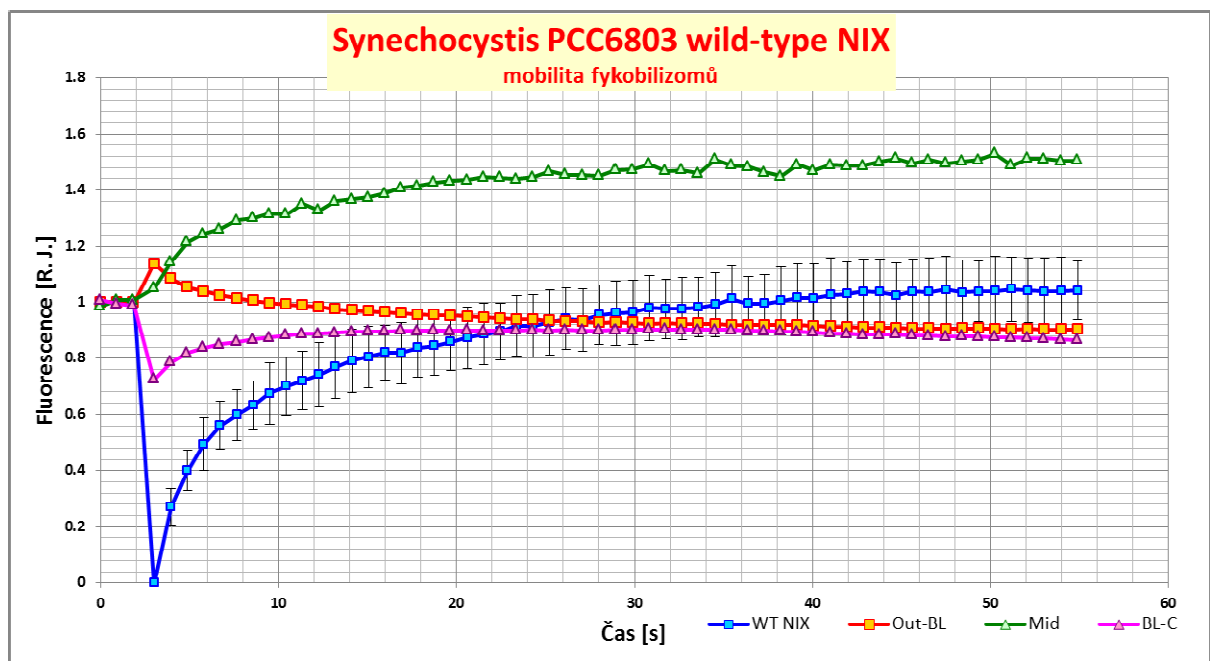


Graf 10: Průběh návratu fluorescence fykobilizomů po fotovybělení při FRAP u *Synechocystis PCC6803 WIM*. Průměr ($n = 5$). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 635\text{nm}$) 250ms; hloubka vybělení 69%; normalizováno na vybělenou buňku $<0,1>$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami - fotovybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, Mid - střed buňky mimo thylakoidní membránu, BL-C - celá buňka.

Obdobným způsobem byly napěstovány a změřeny buňky *Synechocystis PCC6803 WT NIX* (ukázka časoběrné série viz Obr. 23). Po numerické analýze snímků je vidět že průměr z pěti měření vykazuje podobně rychlý návrat fluorescence jako u kmene WIM; parametr $\tau/2$ byl roven rovněž přibližně 2,8s. Rovněž mobilita dosahovala hodnoty 100% s hloubkou vybělení 80%. Oproti kmenu WIM se ale v průběhu měření zvýšila fluorescence střední části buňky, a to více než dvojnásobně.



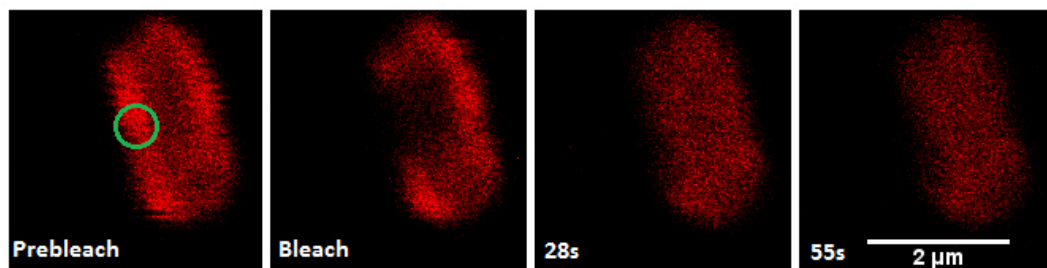
Obr. 23 : Časosběrná série snímků pro metodu detekci mobility fykobilizomů metodou FRAP u *Synechocystis PCC6803 NIX*. Zleva: snímek před vybělením; snímek po fotovybělení; návrat fluorescence, čas 28s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 55s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100× (Autor: Krafl, 2013).



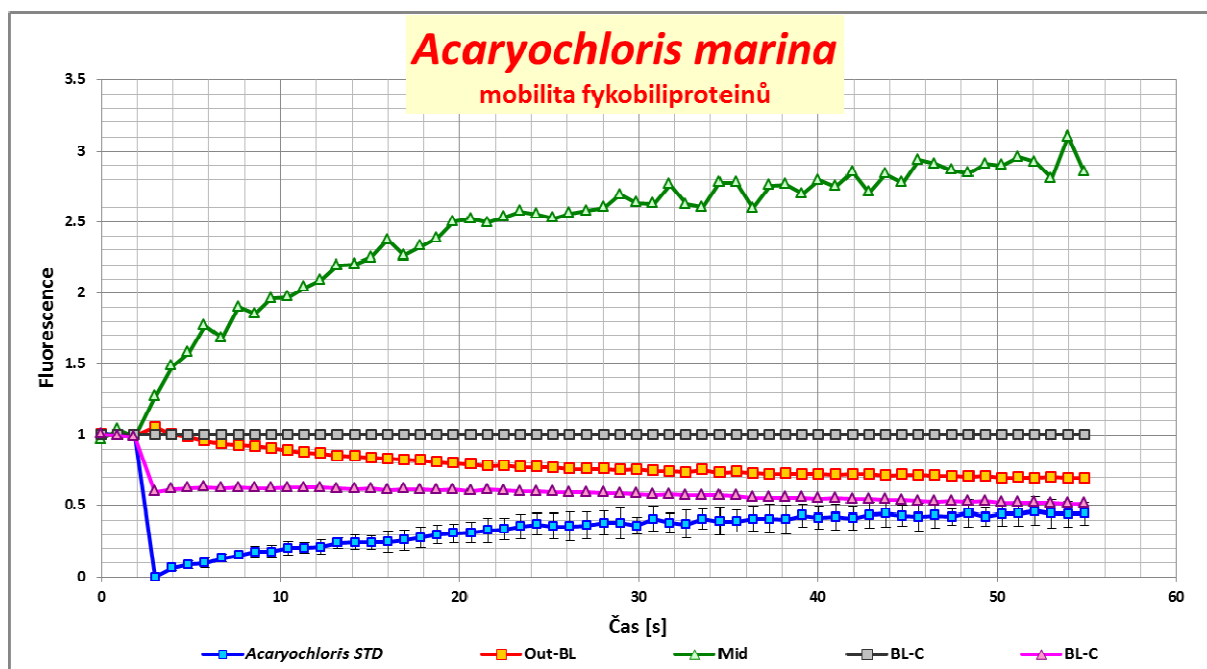
Graf 11: Průběh návratu fluorescence fykobilizomů po fotovybělení po fotovybělení fykobilizomů metodou FRAP u *Synechocystis PCC6803 NIX*. Průměr ($n = 5$). Délka bĕlení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 635\text{nm}$) 250ms; hloubka vybĕlení 80%; normalizováno na vlastní buňku $<0,1>$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami - fotovybĕlená oblast, Out-BL - nevybĕlená plocha thylakoidní membrány, Mid - střed buňky mimo thylakoidní membránu, BL-C - celá buňka.

Buňky *Acaryochloris* vypěstované z tekuté zásobní kultury přenesené do 100 ml média byly měřeny stejně a se stejným nastavením jako kmeny *Synechocystis PCC6803* „WIM“ a „NIX“ (ukázka časosběrné série, viz Obr. 24). Do celkového průměru bylo zahrnuto osm změřených vzorků. Numerická analýza časosběrných

sérií ukázala, že celková velikost mobilní složky fykobilizomů je 45% a polovina navrátní se fluorescence ($\tau/2$) byla patrná za 9,5 sekundy. Hloubka vybělení byla 90%. Překvapivé bylo zjištění, že ve střední části buňky se velmi výrazně zvýšila fluorescence.

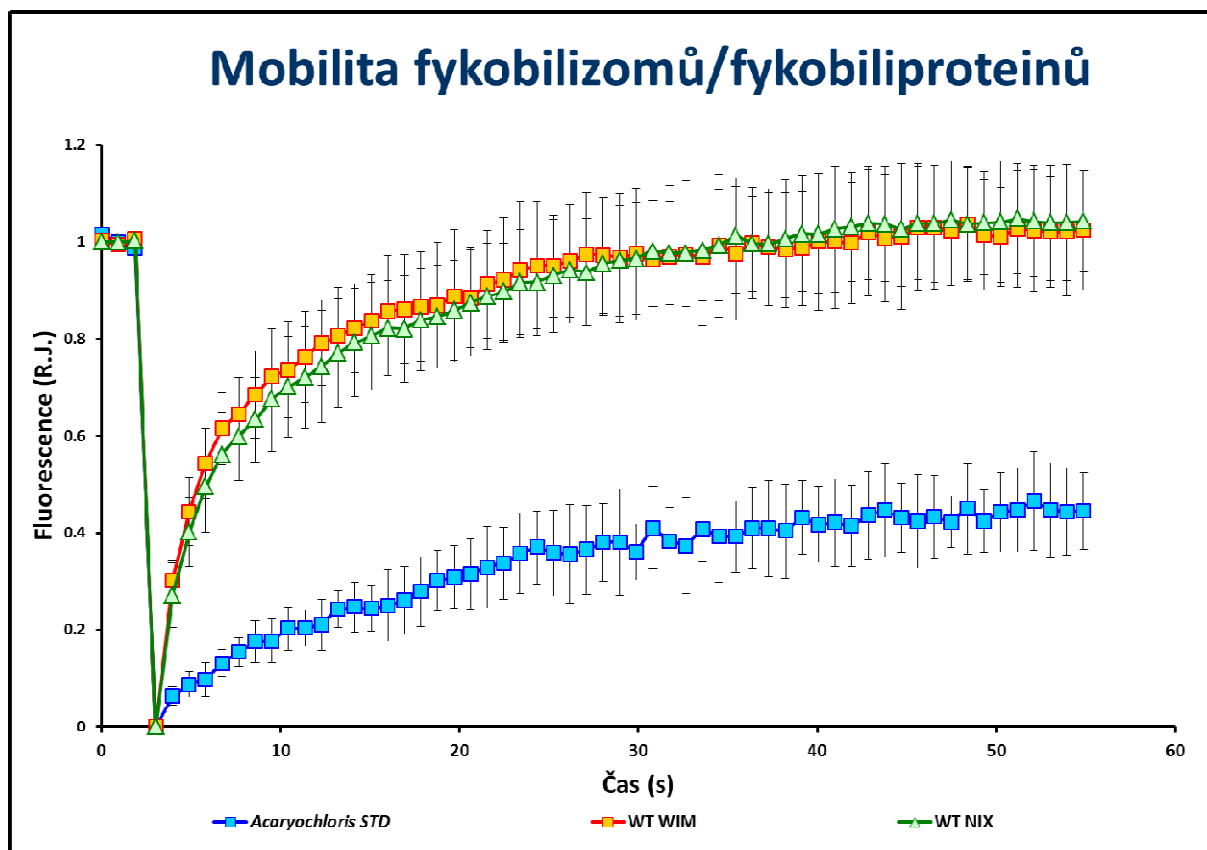


Obr. 24 : Časoběrný snímek FRAP fykobiliproteinů u *A. marina*. Zleva: snímek před vybělením; snímek vybělení; návrat fluorescence, čas 28s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 55s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100× (Autor: Krafl, 2013).



Graf 12: Průběh návratu fluorescence fykobiliproteinů po fotovybělení při FRAP u *A. marina*. Průměr ($n = 8$). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 635\text{nm}$) 250ms; hloubka vybělení 90%; normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami – fotovybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, Mid - střed buňky mimo thylakoidní membránu, BL-C - celá buňka.

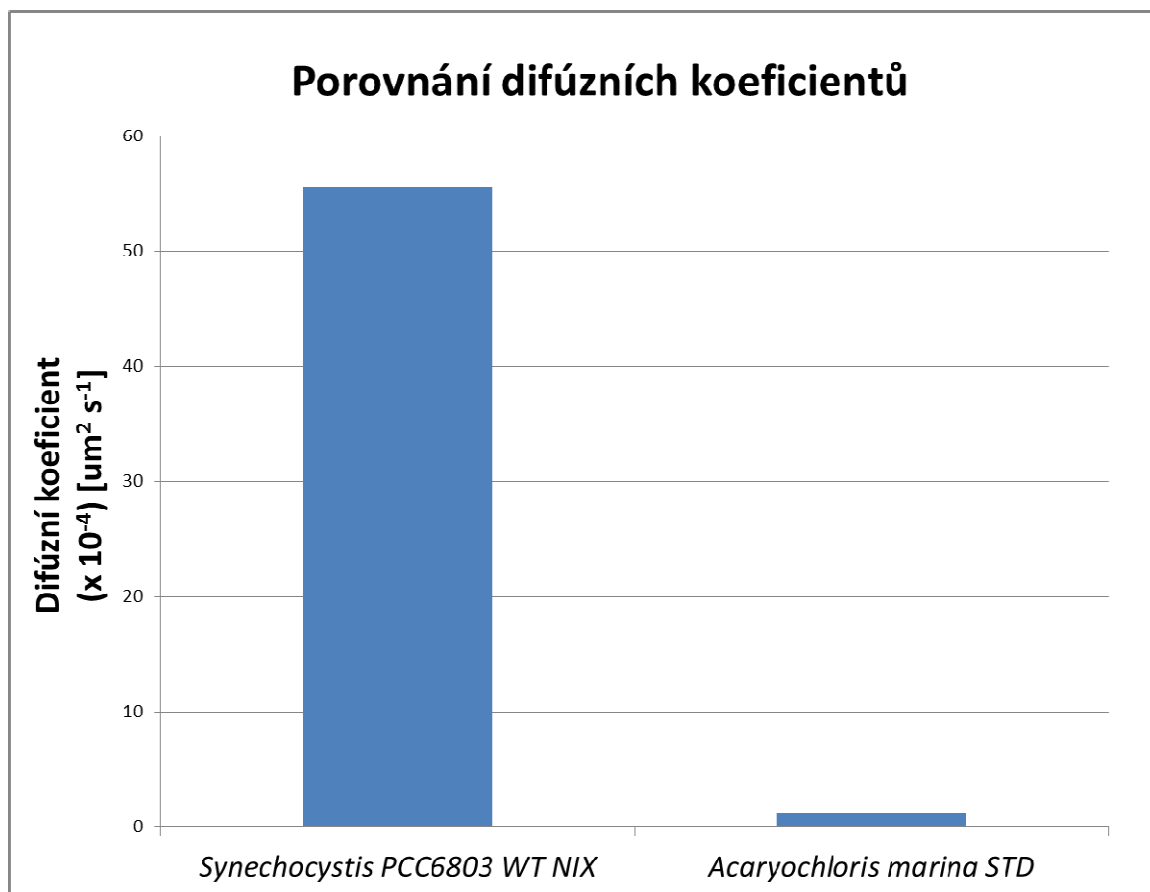
V následujícím grafu jsou pro porovnání vyneseny získané křivky návratu fluorescence ukazující rozdílnou mobilitu fykobilizomů u sinice PCC 6803 a fykobiliproteinů u *Acaryochloris Marina*.



Graf 13: Porovnání mobility fykobilizomů (fykobiliproteinů) u sinic *Synechocystis* PCC6803, kmeny WIM a NIX a sinic *Acaryochloris marina*.

4.3.2 Difúzní koeficient

Ze snímků získaných metodou FRAP (Obr. 22,23 a 24) byly vypočteny hodnoty difúzního koeficientu. Pro *Synechocystis* byl difúzní koeficient $0,0555 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou $0,0721 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Graf 14, Tab. 5). V případě *Acaryochloris* byl koeficient $0,00116 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou $0,00219 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Graf 14, Tab. 5).



Graf 14: Difúzní koeficienty fykobiliproteinů a fykobilizomů u sinic *Synechocystis* a *Acaryochloris*.

4.3.3 Shrnutí výsledků

Tabulka 5 ukazuje výsledky získané metodou FRAP u tří druhů sinic.

Tab. 5: Přehled naměřených výsledků pro fykobilizómy tří druhů sinic

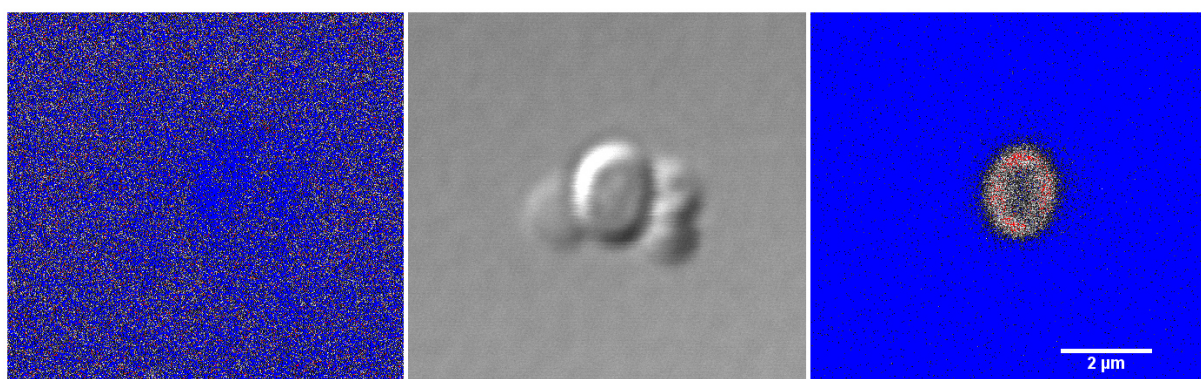
Organismus	$\tau/2$ (s)	Mobilní frakce (%)	Difúzní koeficient ($\times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
<i>Synechocystis</i> PCC6803 WT WIM	~ 2,5	100	5,550
<i>Synechocystis</i> PCC6803 WT NIX	~ 2,8	100	-
<i>Acaryochloris marina</i>	~ 9,5	45	0,116

4.4 Mobilita proteinů obsahujících chlorofyl u sinic

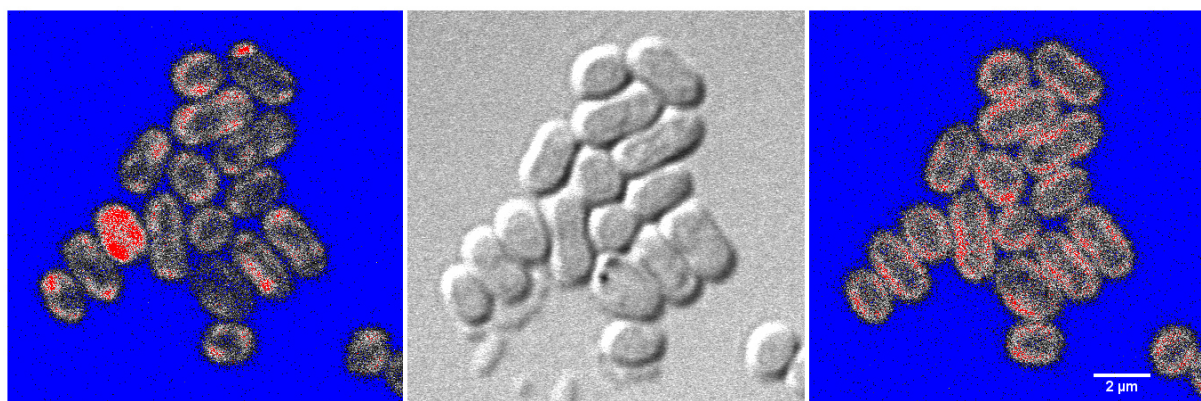
4.4.1 Výsledky metodou FRAP

Ke studiu byly vybrány sinice *Synechocystis PCC6803 WT NIX*, *Acaryochloris marina* a mutant *Acaryochloris marina* HICR IIIA bez fykobiliproteinů.

Nejprve byla provedena mikroskopická kontrola absence fykobiliproteinů u zmíněného mutantu *Acaryochloris marina* (viz obr. 25 a 26).

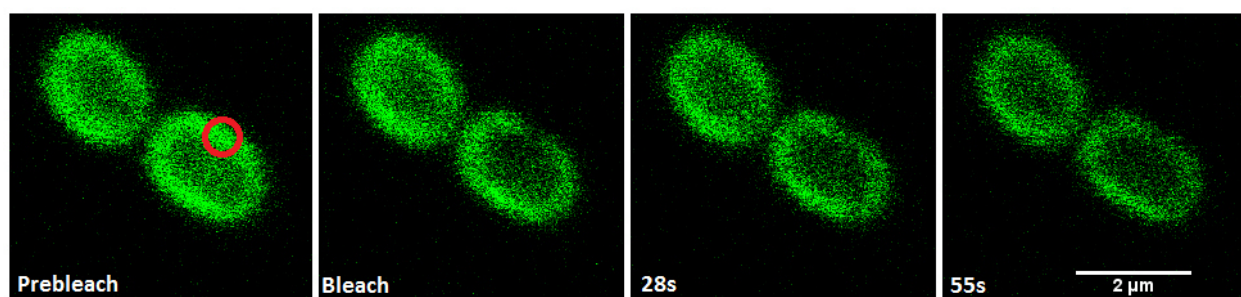


Obr. 25: Snímek mutantu HICR IIIA sinice *Acaryochloris marina* (Δ PBS). Vlevo detekce fluorescence fykobiliproteinů (645-680nm), uprostřed snímek v procházejícím světle, vpravo detekce fluorescence chlorofylu (690-790nm). Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100 \times (Autor: Krafl, 2013).



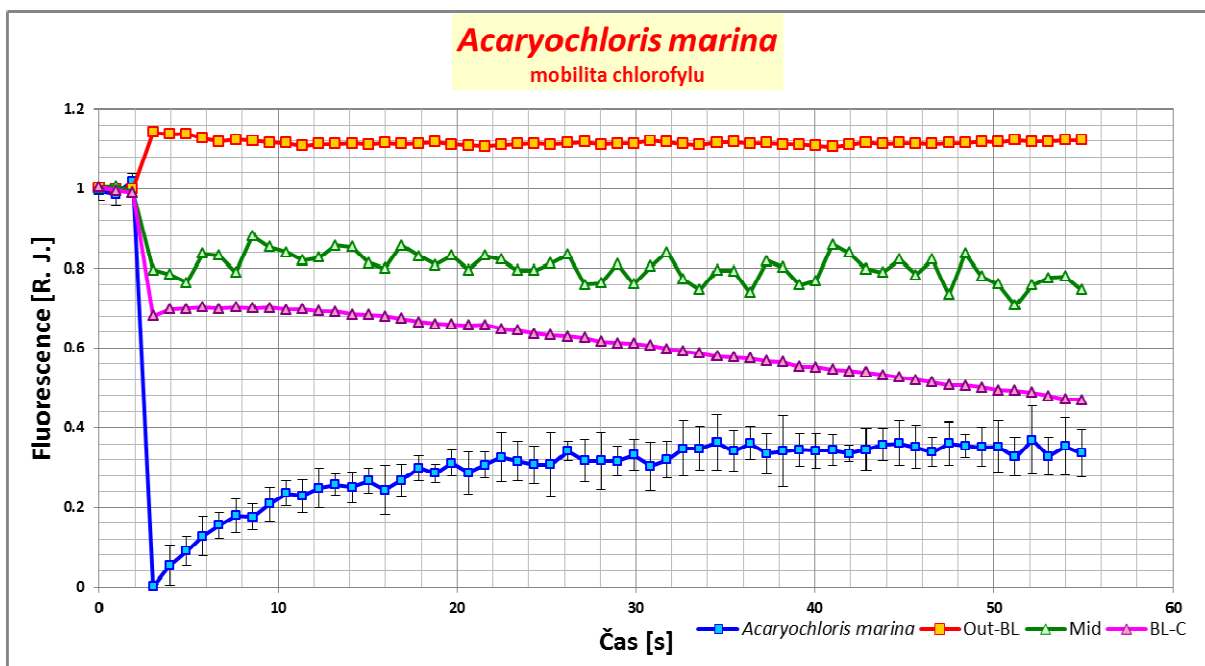
Obr. 26: Snímek sinice *Acaryochloris marina*. Vlevo detekce fluorescence fykobiliproteinů (645-680nm), uprostřed snímek v procházejícím světle, vpravo detekce fluorescence chlorofylu (690-790nm). Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100 \times (Autor: Krafl, 2013).

Fluorescence buňek sinice *Acaryochloris marina* byly měřeny laserem o vlnové délce 488 nm, kdy fluorescence byla detekována v rozmezí 690 - 790 nm. Porovnáním Obr. 25 a 26 je zřejmá absence fykobiliproteinů u mutantu *Acaryochloris marina* (Δ PBS). Ba kmeny *Acaryochloris marina* byly následně použity pro detekci mobility proteinů obsahujících chlorofyl metodou FRAP. Vybělování probíhalo 250 ms, jedna spirála byla vybělena za 21,6 ms. Design experimentu byl obdobný jako při měření PBS, tj. nasnímání tří snímků před vlastním fotovybělením, následovalo vybělení a po něm se bylo nasnímáno 27 obrazů odrážející s návratem fluorescence odrážející mobilitu proteinů obsahujících chlorofyl.



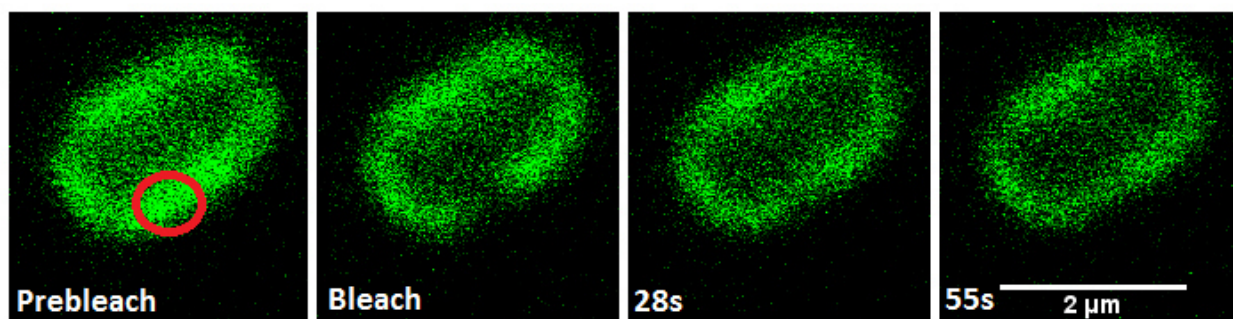
Obr. 27 : Časoběrná série snímků metody FRAP pro detekci mobility proteinů obsahujících chlorofyl u sinice *A. marina*. Zleva: snímek před vybělením; snímek vybělení; návrat fluorescence, čas 28s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 55s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100 \times (Autor: Krafl, 2013).

Numerické vyhodnocení Obr. 27 je znázorněno v grafu 15, ten reprezentuje zprůměrované křivky z osmi měření. Buňky vykázaly velikost mobilní frakce chlorofylu 34% a parametr $\tau/2$ byl odpovídal hodnotě přibližně 4,5s. Hloubka vybělení byla 80%.

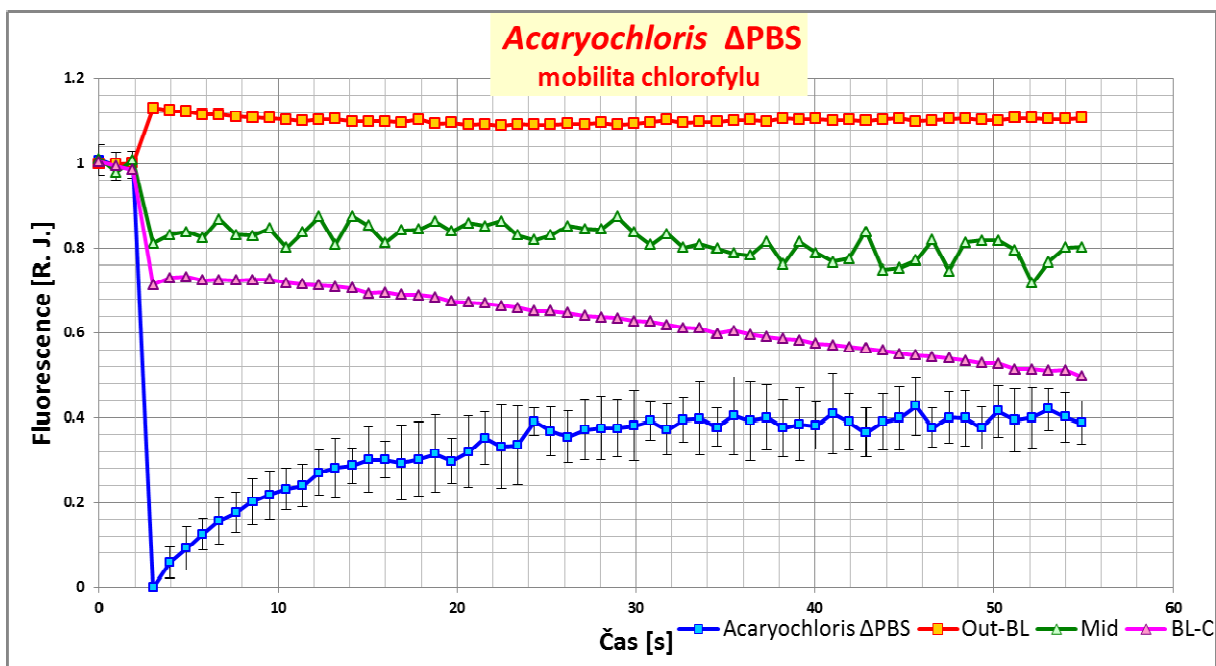


Graf 15: Průběh návratu fluorescence chlorofylu po fotovybělení při měření FRAP u *A. marina*. Průměr ($n = 8$). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 488\text{nm}$) 250ms; hloubka vybělení 80%; normalizováno na vlastní buňku $<0,1>$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami - fotovybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, BL-C - celá buňka.

Dle stejného protokolu byly měřeny buňky mutantu *Acaryochloris marina* HICR IIIA. Průběh křivky návratu fluorescence a velikost mobility se ukázaly podobné jako u divokého typu. Velikost mobilní frakce chlorofylu činila 40% a parametr $\tau/2$ byl roven hodnotě přibližně 4,5s. Hloubka vybělení dosáhla úrovně 76%. Celkem průměr zahrnuje devět měření.

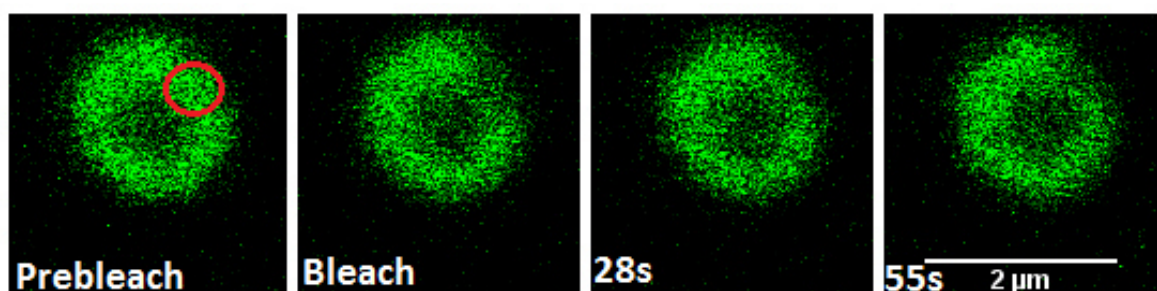


Obr. 28 : Časosběrná série snímků FRAP využitých pro detekci mobility proteinů obsahujících chlorofyl u *A. marina* HICR IIIA (ΔPBS). Zleva: snímek před vybělením; snímek vybělení; návrat fluorescence, čas 28s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 55s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100 \times (Autor: Krafl, 2013)

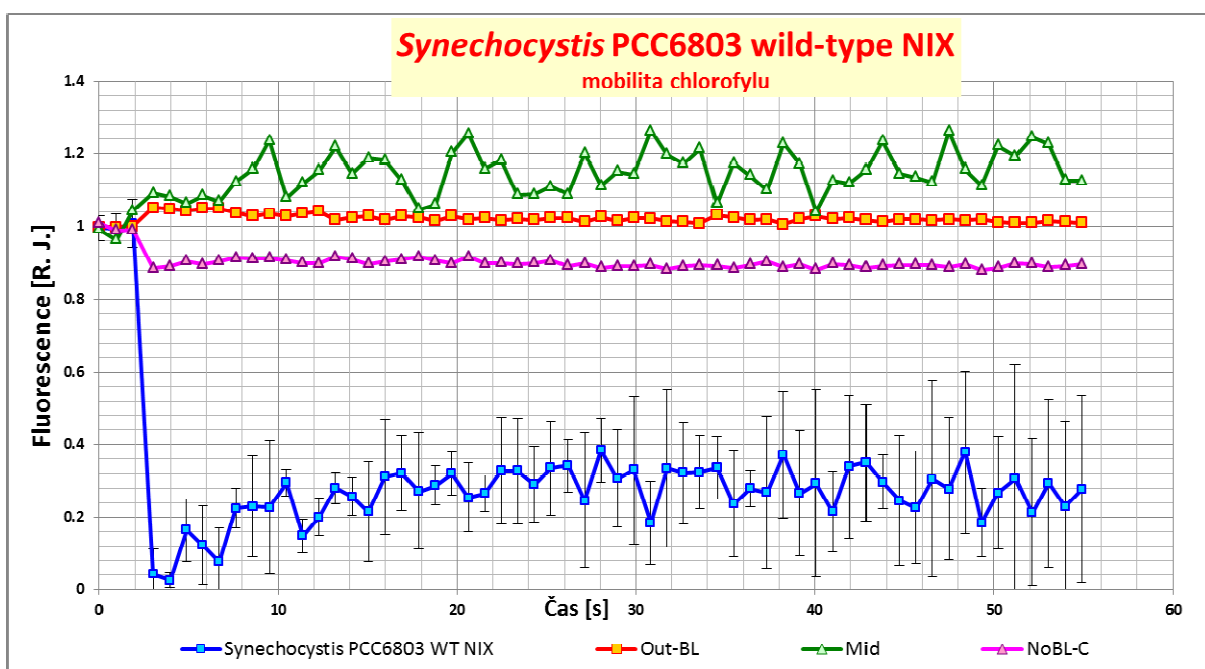


Graf 16: Průběh návratu fluorescence chlorofylu po fotovybělení při FRAP u *A. marina* mutant *HICR IIIA* (Δ PBS). Průměr ($n = 9$). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 488\text{nm}$) 250ms; hloubka vybělení 76%; normalizováno na vlastní buňku $<0,1>$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami - fotovybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, BL-C - celá buňka.

Buňky *Synechocystis* PCC6803 WT NIX byly měřeny stejně jako u předešlých dvou organismů. Velikost mobilní frakce chlorofylu od povídala hodnotě 26% a parametr $\tau/2$ přibližně 3 sekundám. Oproti předchozím byl ale snímaný signál zatížen větším šumem, což se odrazilo ve větších odchylkách a tvaru křivky. Hloubka vybělení při použití stejné doby a intenzity vybělovacího laseru byla přibližně 48%.

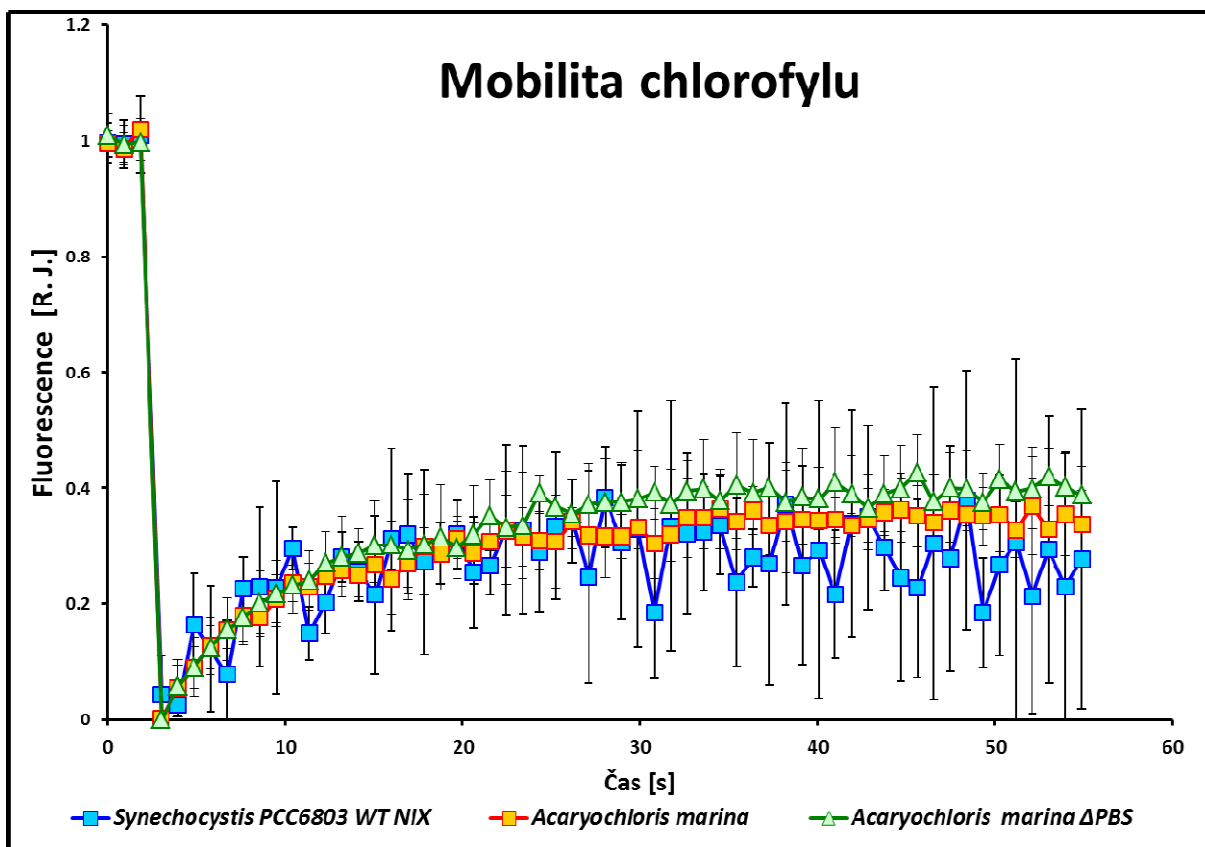


Obr. 29 : Časoběrná serie snímků pro metodu FRAP pro proteiny obsahující chlorofyl u *Synechocystis* PCC6803 NIX.. Zleva: snímek před vybělením; snímek vybělení; návrat fluorescence, čas 28s od začátku měření; návrat fluorescence, čas 55s od začátku měření. Konfokální mikroskop Olympus FV1000, objektiv 100 \times (Autor: Krafl, 2013).



Graf 17: Průběh návratu fluorescence chlorofylu po fotovybělení při FRAP u *Synechocystis PCC6803 NIX*. Průměr ($n = 3$). Délka bělení paprskem bělicího laseru ($\lambda = 488\text{nm}$) 250ms; hloubka vybělení 48%; normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$. Legenda: modrá křivka se směrodatnými odchylkami - fotovybělená oblast, Out-BL - nevybělená plocha thylakoidní membrány, Mid - střed buňky mimo thylakoidní membránu, BL-C - celá buňka.

V následujícím grafu jsou pro porovnání vyneseny získané křivky návratu fluorescence které odráží mobility proteinů obsahujících chlorofyl.



Graf 18: Porovnání mobility chlorofylu tří zástupců sinic.

4.4.2 Shrnutí výsledků

Tabulka 6 ukazuje velikosti mobilní frakce chlorofylů a parametry $\tau/2$ získané metodou FRAP u tří druhů sinic.

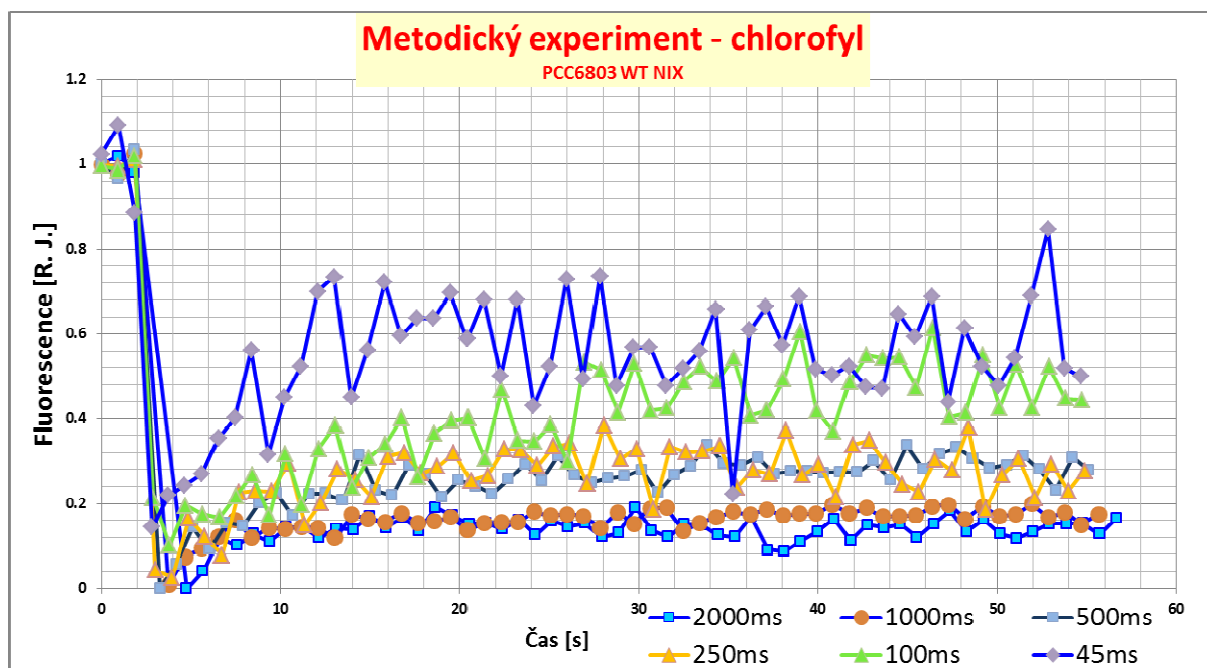
Tab. 6: Přehled naměřených výsledků pro chlorofyly u tří druhů sinic

Organismus	$\tau/2$ (s)	Mobilní frakce (%)
<i>Acaryochloris marina</i>	~ 4,5	34
<i>Acaryochloris marina</i> HICR IIIA	~ 4,5	40
<i>Synechocystis</i> PCC6803 WT NIX	~ 3,0	26

4.5 Metodický experiment, role délky fotovybělení

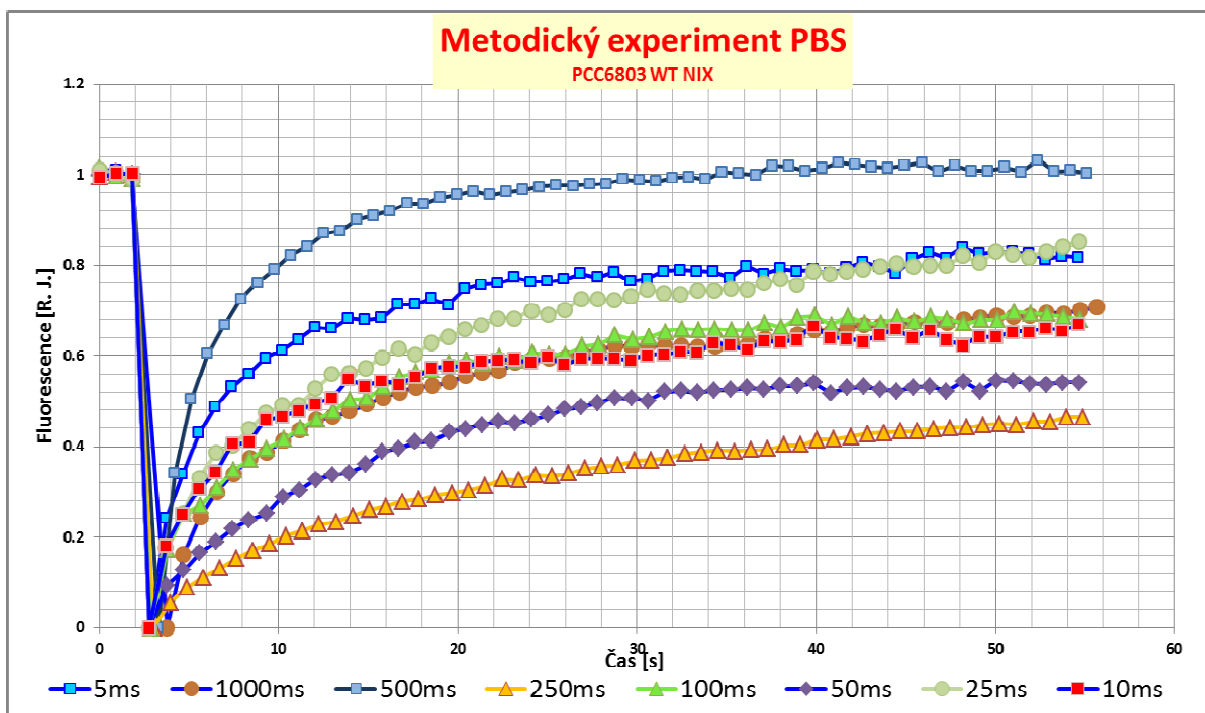
Byl proveden metodický experiment ke zjištění vlivu nastavení parametrů fotovybělování na průběh křivky návratu fluorescence za účelem standardizace a optimalizace měření.

Buňky *Synechocystis* PCC6803 byly přeneseny z agarové plotny do tekutého média a kultivovány na třepače pět dní při intenzitě světla 5 μE . Vzorky byly snímány a vybělovány laserem o vlnové délce 488 nm. Byla snímána emise pro chlorofyl (690-790 nm). Parametry nastavení, které zůstaly konstantní byly: plocha vybělované oblasti (21,6 ms), objektiv (100x), zoom (7x), výkon rastrovacího laseru (10%), výkon fotobělicího laseru (100%). Parametrem, který se měnil, byla délka fotobělení v sekundách (250 - 500 - 1000 ms).



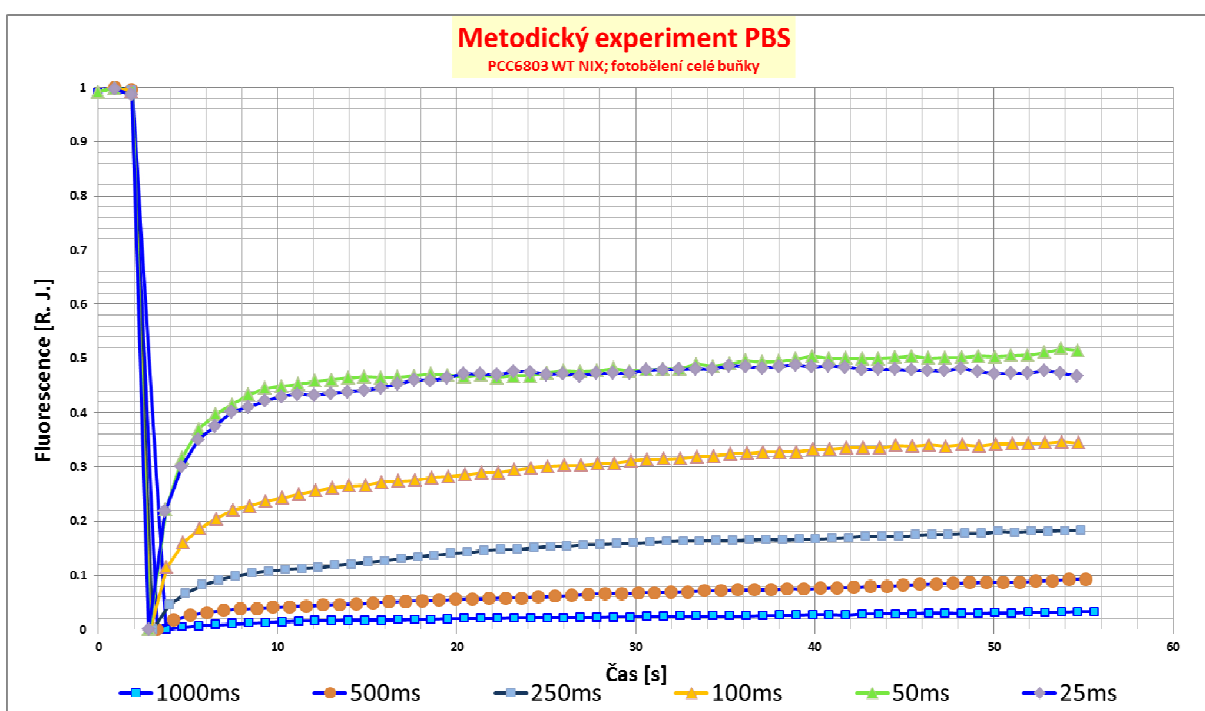
Graf 19: Porovnání křivek návratu fluorescence chlorofylu ($\lambda = 488 \text{ nm}$) pro různě dlouhé doby fotovybělování. Normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$.. Každá křivka reprezentuje průměr minimálně ze čtyř měření.

Při druhém měření (s použitím červeného laseru o vlnové délce 635 nm) s obdobným nastavením a designem pokusu byla zjišťována mobilita fykobilizomů.



Graf 20: Porovnání křivek návratu fluorescence fykobilizomů ($\lambda = 635 \text{ nm}$) pro různě dlouhé doby fotovybělování. Normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$. Každá křivka reprezentuje průměr minimálně ze čtyř měření.

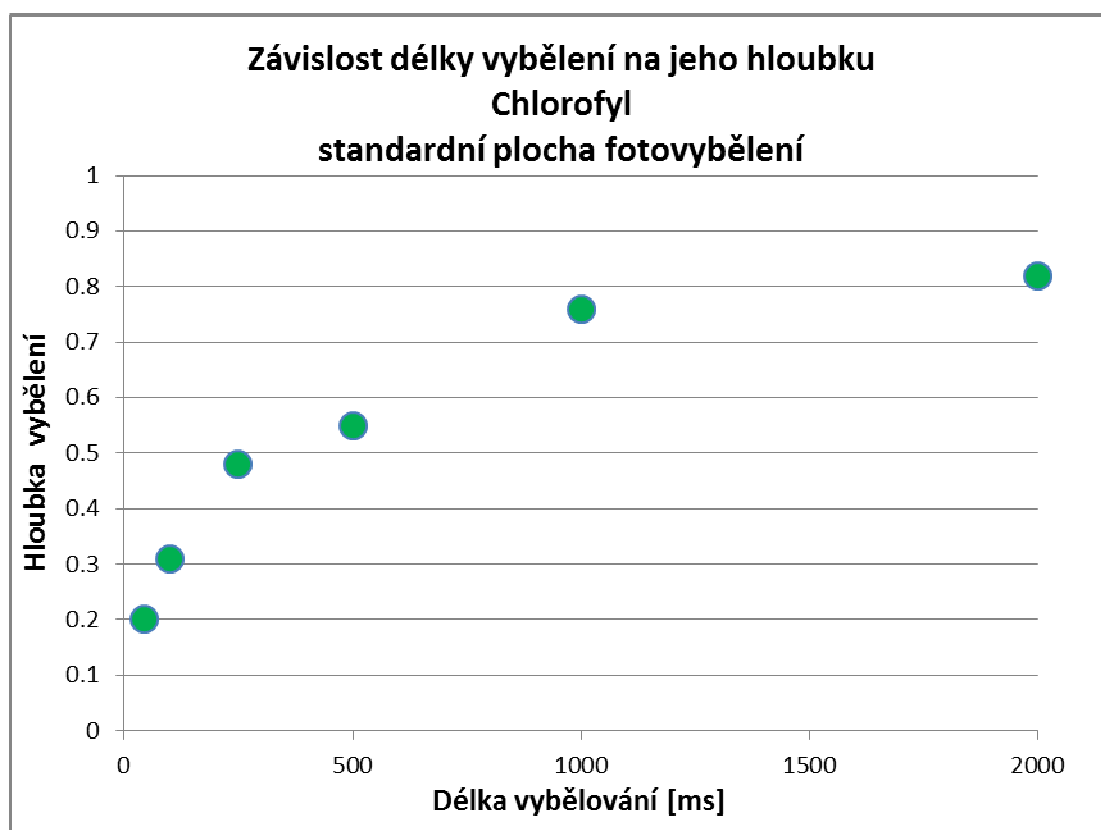
Bylo přistoupeno i fotovybělování celé buňky ("velikost" oblasti byla zvětšena na plochu celé buňky a doba dokončení jedné spirály se tedy zvýšila z 21,6 na 81,6 ms). Uspořádání experimentu zůstalo pro ostatní parametry stejné.



Graf 21: Porovnání křivek návratu fluorescence fykobilizomů ($\lambda = 635 \text{ nm}$) pro různě dlouhé doby fotovybělování celých buněk. Normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$. Každá křivka reprezentuje průměr minimálně ze čtyř měření.

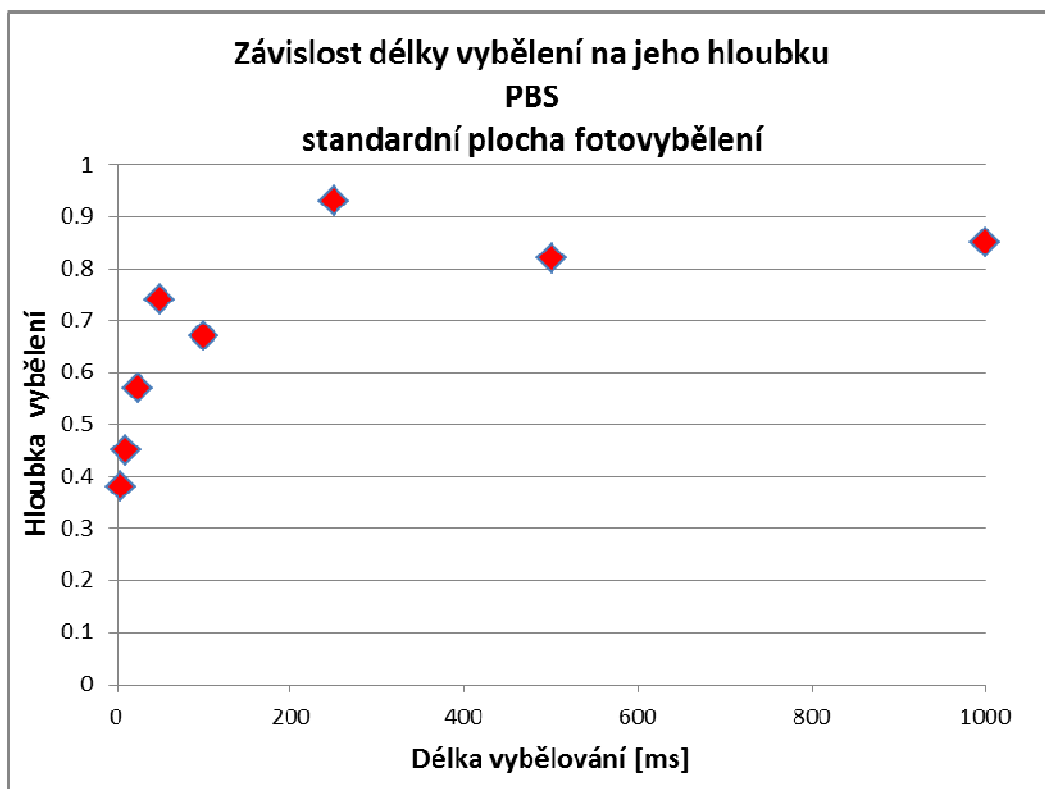
Z posledního grafu vyplývá, že se zvyšující se dobou fotovybělování klesala i míra návratu fluorescence. V grafech nejsou z důvodu přehlednosti zobrazeny směrodatné odchylky.

V následujících grafech jsou zobrazeny hloubky vybělení v závislosti na době bělení pro chlorofyly.

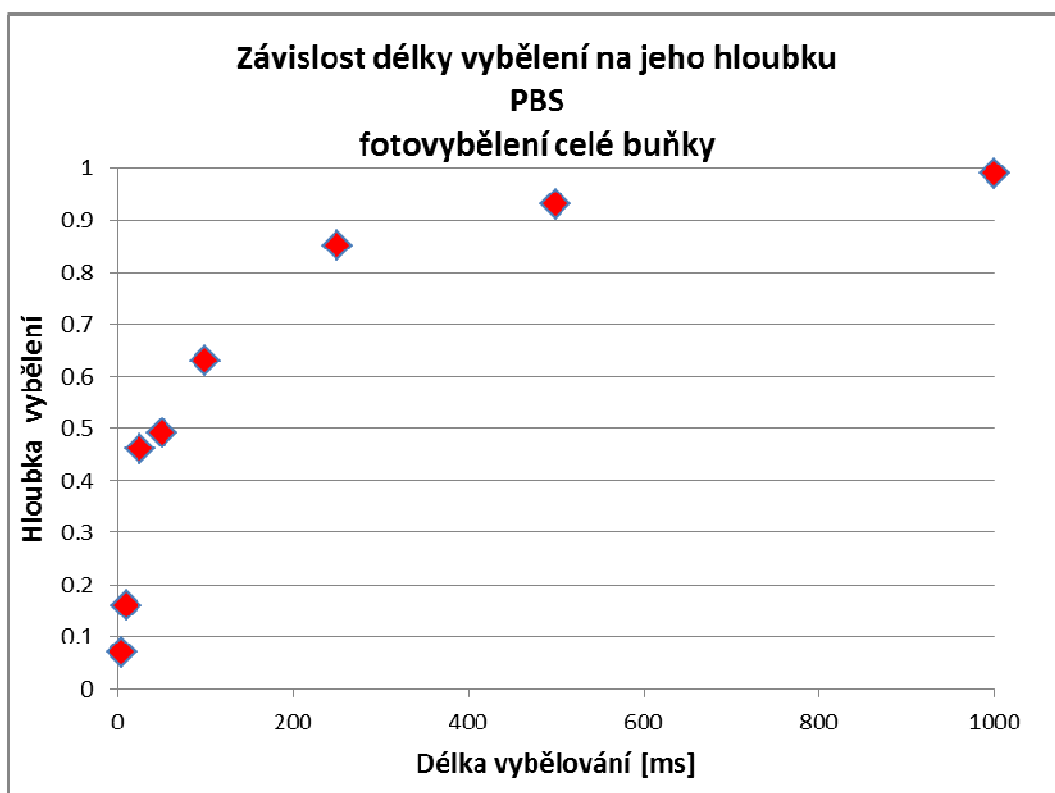


Graf 22: Závislost délky vybělování na výslednou hloubku vybělení chlorofylu.

Obdobné měření pro fykobilizomy při fotovybělování části i celých buněk přineslo podobné výsledky. Se zvyšující se délkou fotovybělování je zvyšuje hloubka vybělení.

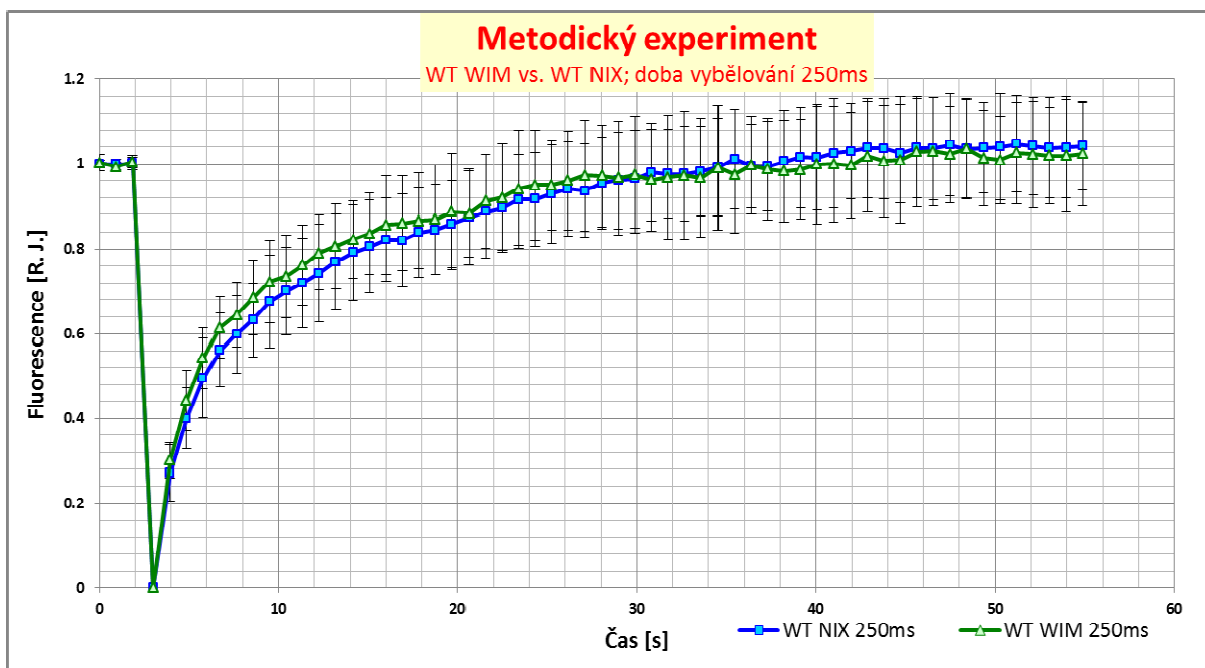


Graf 23: Závislost délky vybělování na výslednou hloubku vybělení fykobilizomů.

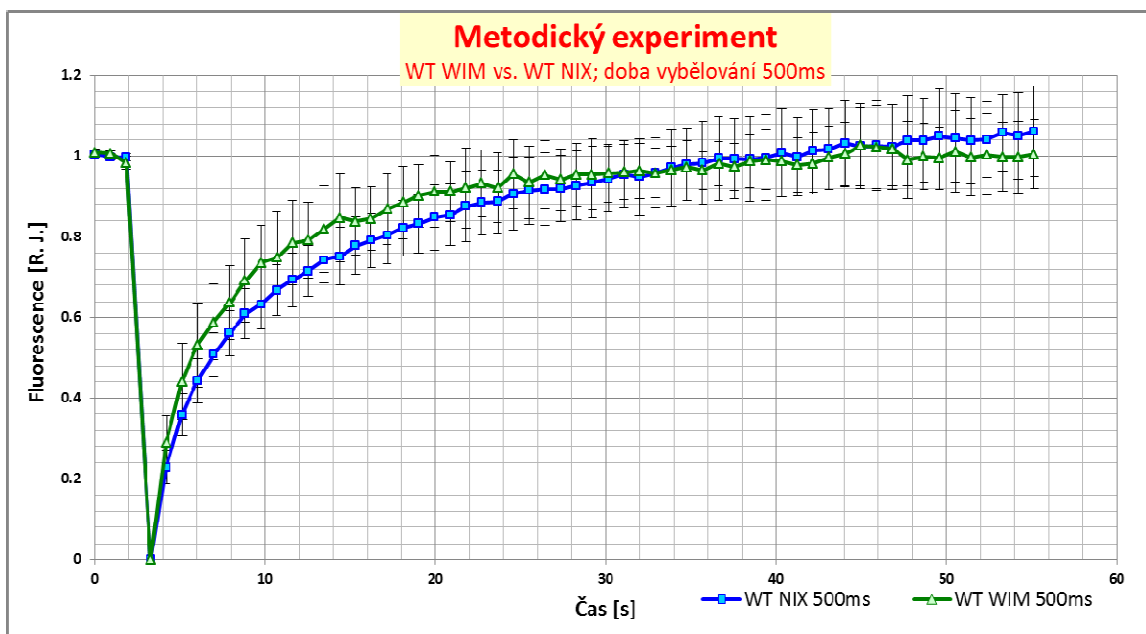


Graf 24: Závislost délky vybělování na výslednou hloubku vybělení fykobilizomů při vybělení celých buněk..

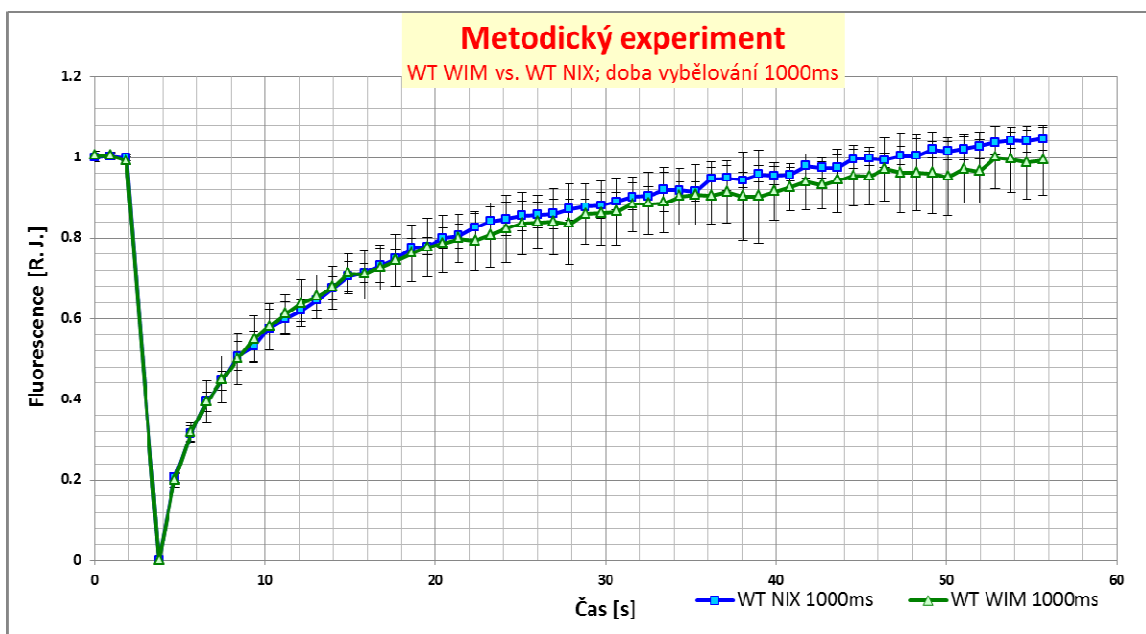
Na základě předcházejících měření byl proveden doplňující metodický experiment, kdy byl porovnáván vliv průběhu křivky návratu fluorescence fykobilizomů na délku vybělování u dvou divokých typů *Synechocystis* PCC6803 (WIM a NIX). Následující grafy ukazují porovnání průběhu křivek návratu fluorescence obou divokých typů při délce fotovybělování 250 ms, 500 ms a 1000 ms. Pro přehlednost je každá dvojice křivek pro stejnou délku vybělování v jednom grafu.



Graf 25: Porovnání průběhu křivek návratu fluorescence fykobilizomů ($\lambda = 635 \text{ nm}$) pro délku vybělování 250 ms u *PCC6803* NIX ($n = 5$) a WIM ($n = 5$). Normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$.



Graf 26: Porovnání průběhu křivek návratu fluorescence fykobilizomů ($\lambda = 635 \text{ nm}$) pro délku vybělování 500 ms u PCC6803 NIX ($n = 5$) a WIM ($n = 4$). Normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$.



Graf 27: Porovnání průběhu křivek návratu fluorescence fykobilizomů ($\lambda = 635 \text{ nm}$) pro délku vybělování 1000 ms u PCC6803 NIX ($n = 4$) a WIM ($n = 3$). Normalizováno na vlastní buňku $\langle 0,1 \rangle$.

Křivky obou divokých typů mají velmi podobný průběh. Rozdíly jsou v rámci statistické odchylky.

5 Diskuse

V průběhu mé experimentální práce jsem se také zabýval obecnými aspekty metody FRAP, zjistil jsem že v celém procesu od výběru buňky k fotobělení přes způsob měření až po vyhodnocení je mnoho kroků a proměnných majících zásadní vliv na konečný výsledek. Obecně je signál snímaný z chlorofylů byl zatížen větším šumem oproti signálu z PBS. Tato skutečnost byla umocněna u zkoumaných sinic ještě jejich velikostí a oblastmi signálu. Zkoumané sinice byly ve srovnání s rudou P. cruentum o řád menší a na rozdíl od P. cruentum, kde byl signál v celé ploše optického řezu buňkou, u sinic je signál soustředěn do oblastí membrán po obvodu buňky a při mikroskopii se jeví jako konzistentní kroužek či ovál. Problematickou se rovněž ukázala skutečnost, že jednotlivé buňky sinic v rámci populace se vyznačovaly vysokou heterogenitou. V populaci se vyskytovaly buňky, u nichž byl signál soustředěn jen do malých nepravidelných ohraničených oblastí. Tyto oblasti vykazovaly i vyšší intenzitu signálu oproti ostatním buňkám. Bylo zjištěno, že zvyšující se míra heterogenity buněk v populaci koreluje s fyziologickým stavem kultury. Měřením a začleněním těchto buněk do celkového průměru by mohlo dojít ke zkreslení výsledků. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto používat k měření pouze buňky nejpodobnější ideotypu, tj. buňky s rovnoměrným signálem po celém svém obvodu. Jak poukázali ARTENI et al. (2008), vliv kultivace, resp. světelného režimu, ovlivňuje uspořádání i hustotu fykobilizomů na povrchu membrány. Je potřeba mít tedy na zřeteli, že míra uspořádanosti fykobilizomů, tedy i hustota, mohly mít za následek (jako jeden z více možných faktorů) výše uvedenou heterogenitu.

Sledoval jsem také roli přípravy vzorku na vlastní mikroskopická měření. Jednotlivá měření sama o sobě sice trvají krátkou dobu (řádově jednotky minut), ale čas zabere výběr buňky, proostřování vzorku. Po celou dobu je vzorek exponován rastrovacím laserem a se zvyšujícím se počtem opakování se zvyšuje i nebezpečí fotopoškození (fotovybělení) silným paprskem bělícího laseru. Buňky jsou v tenké vrstvě média pod agarovou výsečí. V průběhu času dochází i k postupnému tání agaru vlivem teploty prostředí a buňky jsou tedy mimo standardní podmínky, v nichž byly kultivovány. Proto bylo přistoupeno ke konsensu mezi počtem opakování a

délkou měření a to tak, aby se pracovalo s jedním vzorkem maximálně dvacet minut. Poté byl připraven vzorek nový.

Pro optimalizaci metody FRAP jsem provedl řadu experimentů zabývajících se rolí nastavení metody FRAP a získanými výsledky. Zjistil jsem, že zásadním parametrem je délka vybělování. Proto bylo přistoupeno k provedení metodického experimentu u sinice *Synechocystis* WT NIX. Jasný trend poskytuje graf porovnání délky vybělování v rozmezí od 25 ms do 1000 ms u celé buňky (Graf 19 a 20). Z něj jasně vyplývá korelace mezi zvyšující se délkou vybělování a poklesem návratu fluorescence. Z výsledků vybělování části buňky se zdá, že nízké časy vybělování (5 až 100 ms) vedou jen k dočasnému vybělení (bez destrukce chromoforů) a vlivem vnitřního efektu se fluorescence ihned obnovuje. Proto nelze takto krátké časy pro FRAP používat. Vyplývá to i z grafů závislosti délky fotovybělování na hloubku vybělení. Druhá fáze metodického experimentu sloužila k ověření délky vybělování pro zavedení do rutiny měření. Bylo ověřeno, že časy 250 ms, 500 ms a 1000 ms jsou již dostatečně dlouhé na to, aby se u sinic docílilo trvalého zničení chromoforů ve vybělované části membrány. Tohoto poznatku bylo využíváno pro standardizaci měření metodou FRAP u sinic.

Optimalizovanou metodu FRAP jsem pak testoval při detekci mobility fykobilinomů a proteinů vázajících chlorofyl u několika modelových organismů. Podařilo se změřit mobilitu proteinů a numericky vypočítat difúzní koeficienty u ruduch a sinic. Křivka odrážející mobilitu u *Porphyridium cruentum* stoupala pomaleji než u druhu *Cyanidium caldarium* adaptovaného na 18 °C (Graf 4), avšak konečné hodnoty po zhruba 190 sekundách měření byly v rámci směrodatné odchylky stejné - kolem 80% návratu fluorescence. Difúzní koeficient obou lze v rámci směrodatné odchylky považovat za stejný. Průkazné rozdíly jsou však patrné při porovnání kinetiky u *C. caldarium* pěstovaných a adaptovaných na dvě různé teploty - 18°C a 38°C (Graf 8). U kultury adaptované na teplotu 18°C dosáhla výsledná křivka návratu fluorescence hodnoty čtyřnásobně vyšší než u téhož organismu adaptovaného na teplotu 38°C. V hodnotách difúzního koeficientu byl u obou případech rozdíl řádový. KAŇA et al. (2014) poukazují i na rozdíly v lipidickém složení membrán vlivem rozdílných kultivačních teplot. U *P. caldarium* pěstovaného při 38°C byl zjištěn oproti vzorku z kultury pěstované při 18°C vyšší podíl kyseliny palmitové. KAŇA et al. (2014) rovněž poukazují na základě nízkoteplotních (77K) emisních spekter, že u kultury z 38°C byla vyšší mobilita

fykobilizomů, nicméně nedávají to do příčinné souvislosti se změnou fluidity membrány, ale spíše se snížením interakce mezi fykobilizomy a fotosystémem u kultury z 18°C, kde je velké množství fykobilizomů nepřipojených k fotosystémům. Mobilitou fykobilizomů u *P. cruentum* se zabývali i LIU et al. (2009), kteří vyhodnotili mobilitu okolo 65%. K vybělování však přistupovali jiným způsobem, vybělovali celou polovinu buňky. Lišila se i vlnová délka použitého laseru (568 nm).

Při porovnání mobility fykobilizomů u dvou divokých typů sinice *Synechocystis* a sinice *Acaryochloris* bylo zjištěno, že kinetika obou wild-typů je v rámci směrodatné odchylky stejná oproti průběhu u *Acaryochloris marina* (Graf 13), kde návrat fluorescence dosáhl ani ne poloviční hodnoty proti výše zmíněným. Difúzní koeficient u *A. marina* byl řádově nižší ($0,116 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) než u *Synechocystis* WT NIX ($5,550 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Graf 14). Mnohem menší rozdíly byly naopak u návratu fluorescence při snímání signálu chlorofylu který odráží mobilitu proteinů s navázaným chlorofylem (Graf 18); v tomto případě si byly křivky podobné, avšak zatíženy většími odchylkami z důvodu vyššího šumu, jenž je průvodním jevem při snímání chlorofylového signálu. Zjištěné údaje jsou v souladu s literaturou. MULLINEAUX et al. (1997) udává hodnotu difúzního koeficientu u sinice *Dactylococcopsis salina* $6,3 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. YANG et al. (2007) popsali u termofilní sinice *Thermosynechococcus elongatus* hodnoty difúzního koeficientu v rozmezí $1,4 - 1,8 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a návrat fluorescence fykobilizomů vykazoval podobnou kinetiku jako u zkoumaných divokého typu *Synechocystis* a dosáhl také 100%. V roce 2001 opublikovali SARCINA et al. práci, v níž vypočítali difúzní koeficient sinice *Synechococcus* sp. 7942 na $30 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, tedy o řád vyšší. Veškeré zjištěné údaje jsou konzistentní s dostupnou literaturou (viz souhrnný článek KAŇA 2013).

6 Závěr

Seznámil jsem se s metodou FRAP a celkově se mi podařilo ji optimalizovat pro proteiny vázající chlorofyl a pro fykobilizomy. Podařilo se změřit a porovnat mobilní složky a difúzní koeficienty vybraných ruduch a sinic, zjistit, že rychlost difúze se může i řádově lišit v závislosti na organismu. Veškeré zjištěné údaje jsou konzistentní s dostupnou literaturou (viz souhrnný článek KAŇA 2013).

Standardizace metody vedla k jejímu použití i v následujících výzkumech (i pro molekuly bez autofluorescence a proto označené GFP), z nichž část již byla opublikována v impaktovaných vědeckých časopisech (viz seznam literatury: KAŇA et al. (2014) a KRYNICKÁ et al. (2014)).

7 Přehled použité literatury

ARTENI A. A., LIU L.-N., AARTSMA T. J., ZHANG Y.-Z., ZHOU B.-C., BOEKEMA E. J. (2008). Structure and organization of phycobilisomes on membranes of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photosynthesis Research*, 95: 169-174

ARTENI A. A., AJLANI G., BOEKEMA E. J. (2009). Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochimica et biophysica acta*, 1787: 272-279

BALD D., KRUIP J., RÖGNER M. (1996). Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: how is the phycobilisome connected with the photosystems? *Photosynthesis research*, 49: 103-118

BEDNÁR J., STANĚK D., MALÍNSKÝ J., KOBERNA K., RAŠKA I. (2004): Dnešní mikroskopie v biomedicíně. *Vesmír*, 83: 581-585

BLANKENSHIP, R. E., MADIGAN M. T., BAUER, C. E. (1995). Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands

BERANOVÁ L., HUMPOLÍČKOVÁ J., HOF M. (2009). Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Chemické listy*, 103: 125-129

DOEMEL W. N., BROCK T. D. (1971). Physiological ecology of *Cyanidium caldarium*. *Journal of General Microbiology*, 67: 17-20

ELLIS R. J. (2001). Macromolecular crowding: An important but neglected aspect of the intracellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 114-119

FALKOWSKI, P. G., RAVEN, J. A. (1997). Aquatic Photosynthesis. *Blackwell Publishers*, Blackwell Science, Oxford, England

FALKOWSKI, P. G., LONG, S. P., EDWARDS, G. E. (1994). Photosynthesis and global changes in the environment. *Photosynthesis Research*, 39: 204-207

GANTT E. (1980). Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *International review of cytology*, 66: 45-80

GANTT E., LIPSCHULTZ C. A. (1972). Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. I. Isolation. *Journal of cell biology*, 54: 313-324

GIDDINGS T. H., WASMANN C., STAEHELIN L. A. (1983). Structure of the thylakoids and envelope membranes of the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *Plant Physiology*, 71: 409-419.

GLAZER A. N., LUNDELL D. J., YAMANAKA G., WILLIAMS R.C. (1983). The structure of a "simple" phycobilisome. *Annales de l'Institute Pasteur/Microbiologie*, 134: 159-180

HAUGLAND R. P. (1999). Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 7th Edition, Eugene, Molecular Probes, Inc.

HERNÁNDEZ M., CLAVERO E., ROLDÁN M. (2004). Microscopy methods applied to research on cyanobacteria. *Limnetica*, 23: 179-186

HÉDOIN H., COUTE A., KAISER P. (1996). Nature and occurrence of sulfoxidizing bacteria in Baregine developing in sulfurated thermal waters at Bareges (France). *Hydrobiologia*, 323: 75-81

VAN DEN HOEK C., MANN D. G., JAHNS H. M. (1995). Algae. An introduction to phycology. *Cambridge university press*

- HOŠEK J. (2008): Přehled klasických a moderních mikroskopických metod. In: NOVÁK J., NOVÁK P. (eds.): Aplikovaná optika a mikroskopie 2008. České vysoké učení technické v Praze, s. 12-23
- CHEN M., GUO M., Li S. (2009). A new fluorescent particle prepared by chemical stabilized phycobilisome. *Chinese chemical letters*, 20: 724-728
- IKEUCHI M., TABATA S. (2001). Synechocystis sp PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 70: 73-83
- JOSHUA S., MULLINEAUX C. W. (2004). Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. *Plant Physiology*, 135: 2112-2119
- JONES R. F., KURY W., SPEER H. L. (1963). Studies on growth of red alga *Porphyridium cruentum*. *Physiologia plantarum*, 16: 636-640
- KAŇA R. (2013): Mobility of photosynthetic proteins. *Photosynthesis Research*, 116: 465-479
- KAŇA R., KOTABOVÁ E., LUKEŠ M., PAPÁČEK Š., MATONOHA C., LIU L.-N., PRÁŠIL O., MULLINEAUX C. W. (2014). Phycobilisome mobility and its role in the regulation of light harvesting in red algae. *Plant Physiology*, 165: 1618-1631
- KAŇA R., PRÁŠIL O., MULLINEAUX C. W. (2009). Immobility of phycobillins in the thylakoid lumen of cryptophyte suggests that protein diffusion in the lumen is very restricted. *FEBS Letters*, 583: 670-674
- KANEKO T., SATO S., KOTANI H. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 3: 109-136

KIANG N. Y., SIEFERT J., GOVINDJEE (2007). Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of Earth organisms. *Astrobiology*, 7: 222-251

KIRCHHOFF H., SHARPE R. M., HERBSTOVÁ M. (2013) Differential Mobility of Pigment-Protein Complexes in Granal and Agranal Thylakoid Membranes of C-3 and C-4 Plants. *Plant Physiology*, 161: 497-507

KIRCHHOFF H., MUKHERJEE U., GALLA H.-J. (2002). Molecular architecture of the thylakoid membrane: Lipid diffusion space for plastoquinone. *Biochemistry*, 41: 4872-4882

KIRCHHOFF H., LENHERT S., BÜCHEL C., CHI L., NIELD J. (2008). Probing the organisation of photosystem II in photosynthetic membranes by atomic force microscopy. *Biochemistry*, 47: 431-440.

KÖHLER R. H., ZIPFEL W. R., WEBB W. W., HANSON M. R. (1997). Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science*, 276: 2039-2042

KRYNICKÁ V., TICHÝ M., KRAFL J., YU J., KAŇA R., BOEHM M., NIXON P. J., KOMENDA J. (2014). Two essential FtsH proteases control the level of the Fur repressor during iron deficiency in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* (in press)

KROGMANN D. W., PÉREZ-GÓMEZ B., GUTIÉRREZ-CIRLOS E. M., CHAGOLLA-LÓPEZ A., de la VARA L. G., GÓMEZ-LOJERO C. (2007). The presence of multidomain determines the bundle-shape structure of the phycobilisome of the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. *Photosynthesis research*, 93: 27-43

LIU L.-N., AARTSMA T. J., THOMAS J.-C. (2009) FRAP Analysis on red alga reveals the fluorescence recovery is ascribed to intrinsic photoprocesses of phycobilisomes than large-scale diffusion. *Plos One*, 4: e5295

LOLL B., KERN J., SAENGER W., ZOUNI A., BIESIADKA J. (2007). Lipids in photosystem II: Interactions with protein and cofactors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767: 509-519

LÓPEZ-LEGENTIL S., SONG B., BOSCH M. (2011). Cyanobacterial diversity and a new Acaryochloris-like symbiont from Bahamian Sea-Squirts. *Plos One*, 6: e23938

LOUGHLIN P., LIN Y., CHEN M. (2013). Chlorophyll *d* and Acaryochloris marina: current status. *Photosynthesis Research*, 116: 277-293

MULLINEAUX C. W., TOBIN M. J., JONES G. R. (1997). Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature*, 390: 421-424

MULLINEAUX C. W. (1999). The thylakoid membranes of cyanobacteria: Structure, dynamics and function. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 671-677

MULLINEAUX C. W., SARCINA M. (2002). Probing the dynamics of photosynthetic membranes with fluorescence recovery after photobleaching. *Trends in Plant Science*, 7: 237-240

MULLINEAUX C. W., NENNINGER A., RAY N., ROBINSON C. (2006). Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 188: 3442-3448.

MULLINEAUX C. W. (2008). Factors controlling the mobility of photosynthetic proteins. *Photochemistry and Photobiology*, 84: 1310-1316.

MULLINEAUX C. W. (2008b). Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria. *Photosynthetic Research*, 95: 175-182

NEU T., LAWRENCE J. R. (1997). Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 24: 11-25

OH S. H., HAN J. G., KIM Y. (2009). Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108: 429-434

PLÁŠEK J. (1995). Konfokální mikroskop - renezance experimentálních metod. *Vesmír*, 74: 508-511

PAPÁČEK Š., MATONOHA C., ŠTUMBAUER V. (2012). Modelling and simulation of photosynthetic microorganism growth: random walk vs. finite difference method. *Mathematics and Computers in Simulation*, 82: 2022-2032

PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J. a kol. (1998). Fyziologie rostlin. Praha, Academia, s. 134-135.

RAŠKA I. (2009): Dnešní mikroskopie v biomedicíně: Tak trochu jinak. *Československá fyziologie*, 58: 4-14

SARCINA M., TOBIN M. J., MULLINEAUX C. W. (2001). Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942: Effects of phycobilisome size, temperature and membrane lipid composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 46830-46834

SEMWOGERERE D., WEEKS E. R. (2005): Confocal microscopy. In: WNEK G., BOWLIN G. (eds.): *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Taylor & Francis, Marcel Dekker, New York, s. 1-10

SIDLER W. A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In: BRYANT D. A. (ed.) *The molecular biology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 139-216

SCHNEIDER C., RASBAND W. S., ELICEIRI K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9: 671-675

ŠETLÍK I., SEIDLOVÁ F., ŠANTRŮČEK J. (2004). Fyziologie rostlin. Učební text Biologické fakulty Jihočeské Univerzity

TAIZ L., ZEIGER E. (2010). *Plant Physiology*. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc.

THEISS C., SCHMITT F.-J., PIEPER J. (2011). Excitation energy transfer in intact cells and in the phycobiliprotein antennae of the chlorophyll d containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1473-1487

WILDENBERG van den S. M. J. L., BOLLEN Y. J. M., PETERMAN E. J. G. (2011). How to quantify protein diffusion in the bacterial membrane. *Biopolymers*, 95: 312-321

YANG S., SU Z., LI H., FENG J., XIE J., XIA A., GONG Y., ZHAO J. (2007). Demonstration of phycobilisome mobility by the time- and space-correlated fluorescence imaging of a cyanobacterial cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767: 15-21

ZHANG F., LEE G. M., JACOBSON K. (1993). Protein lateral mobility as a reflection of membrane microstructure. *Bioassays*, 15: 579-588