

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Optimalizace nativních separačních metod pro studium
fotosyntetických proteinových superkomplexů pomocí transmisní
elektronové mikroskopie**



Vypracoval: Kudělka Petr

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Ilík, Ph. D.

Děkuji vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph. D. za odborné vedení, korekturu a čas, který mi při zpracování této práce věnoval. Dále děkuji Mgr. Lukáši Noskovi, Ph. D. za odborné rady a pomoc při práci v laboratoři a cenné rady při psaní celé práce. Dále děkuji Dmitryi A. Semchonokovi, Msc. a prof. Dr. Egbertu J. Boekemovi z Laboratoře elektronové mikroskopie Univerzity v Groningenu, kteří snímkovali pomocí transmisního elektronového mikroskopu Tecnai G2 20 Twin a vyhodnocovali získané výsledky.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou vypracoval samostatně, pod vedením prof. RNDr. Petra Ilíka, Ph. D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne:

Podpis:

Souhrn

Je známo, že fotosystém II (PSII) vyšších rostlin je schopen tvořit megakomplexy interakcí mezi dvěma superkomplexy. Tyto interakce jsou zprostředkovávány světlosběrnými podjednotkami PSII.

Nedávné studie ukázaly, že rostliny z čeledě *Pinaceae* neobsahují některé podjednotky světlosběrného komplexu PSII a dosud u nich nebyly pozorovány megakomplexy PSII jako u jiných vyšších rostlin (*Arabidopsis thaliana*).

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací nativní elektroforézy pro separaci výše zmíněných megakomplexů z thylakoidních membrán *Picea abies*. Výsledky této optimalizace potvrzují vznik megakomplexů u rostlin z čeledi *Pinaceae*, kde byly objeveny dosud neznámé interakce mezi PSII superkomplexy a také byly objeveny úplně nové formy superkomplexů PSII.

Summary

It is known that photosystem II (PSII) of higher plants is capable of creating megacomplexes interactions between two supercomplexes. Formed by interactions mediated by light harvesting subunits of PSII.

Recent studies have shown that, on the contrary to other higher plants (*Arabidopsis thaliana*) plants from the family *Pinaceae* do not contain some of subunits of light harvesting complex PSII as in other higher plants (*Arabidopsis thaliana*). Further, in *Pinaceae* the PSII megacomplexes have not been observed yet.

This bachelor thesis deals with the optimization of native electrophoresis for the separation of the above mentioned megacomplexes from the thylakoid membranes of *Picea abies* seedlings. The results of this optimization confirm the emergence of megacomplexes in *Pinaceae*. We have found completely new forms of PSII megacomplexes with new interactions between PSII supercomplexes.

Seznam zkratek

ACA	Aminokapronová kyselina
APS	Persíran amonný
bisakrylamid	N, N'-methylenbisakrylamid
BN-PAGE	Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza
CBB	Coomassie brilliant blue
CN-PAGE	Bezbarvá nativní polyakrylamidová elektroforéza
DDM	Dodecylmaltosid
DDM/chl	Hmotnostní poměr α -DDM ku chlorofylům $a+b$
DOC	Deoxycholát sodný
EM	Elektronová mikroskopie
hrCN-PAGE	High resolution CN-PAGE
LHCII	Světlosběrný komplex fotosytému II
PSI	Fotosytém I
PSII	Fotosytému II
SDS	Dodecylsíran sodný
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1, 3-diol
α -DDM	n-Dodecyl- α -maltosid
β -DDM	n-Dodecyl- β -maltosid

Obsah	
TEORETICKÁ ČÁST	1
Úvod	2
1. Elektroforéza proteinů	3
1.1 Nativní elektroforéza	3
1.2 Gely používané při hrCN-PAGE	4
1.3 Použití hrCN-PAGE pro separaci fotosyntetických komplexů....	5
2. Fotosystém II	7
2.1 Megakomplexy PSII	9
2.2 PSII izolovaný ze smrku	10
3. Elektronová mikroskopie proteinových komplexů	11
4. Cíl práce	12
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	13
5. Použité metody a materiál	14
5.1 Rostlinný materiál	14
5.2 Izolace thylakoidních membrán	14
5.3 Stanovení koncentrace chlorofylů	15
5.4 Solubilizace thylakoidních membrán	16
5.5 CN-PAGE	17
5.6 Skenování gelů.....	18
5.7 Eluce separovaných PSII megakomplexů	18
5.8 Příprava vzorku pro EM.....	18
5.9 Snímkování EM	19
6. Výsledky	20
6.1 Stanovení optimálního složení gelů a koncentrace detergentu	20
6.2 EM strukturní analýza	25
7. Diskuze	29
8. Závěr	32
9. Seznam literatury	33

TEORETICKÁ ČÁST

Úvod

Jedním z mnoha proteinových komplexů obsažených v thylakoidní membráně je fotosystém II (PSII). Tento proteinový komplex je významnou součástí při světle indukovaných reakcích. Tyto reakce jsou důležité pro přeměnu světelné energie na energii chemickou. Nedávné studie ukázaly, že superkomplexy PSII jsou u vyšších rostlin (např. *Arabidopsis thaliana*) schopny vzájemnou interakcí dvou superkomplexů tvořit megakomplexy PSII (Nosek, 2017). Strukturálně je PSII složen z jádra a světlosběrných antén. Toto složení, se však u některých vyšších rostlin liší (např. *Picea abies*). Superkomplexy PSII u rostlin *Picea abies* neobsahují světlosběrné antény Lhcb3 a Lhcb6 (Kouřil a kol., 2016), tyto antény by mohly plnit klíčovou roli pro tvorbu megakomplexů PSII.

Jelikož dosud nebyly pozorovány megakomplexy PSII u rostlin *Picea abies*, je tato bakalářská práce zaměřena na použití bezbarvé nativní polyakrylamidové elektroforézy (CN-PAGE), díky které lze separovat záporně nabitě proteiny. Záporný náboj proteinů je způsobený použitím jemného detergentu deoxycholátu sodného (DOC) přítomného v katodovém pufru. Použitím velmi jemných detergentů k solubilizaci jakými jsou např. dodecylmaltosid (DDM) lze při solubilizaci a následné separaci dosáhnout velmi dobrých výsledků a získat tak celé proteinové komplexy v jejich nativním stavu.

1. Elektroforéza proteinů

Pro studium vlastností a struktury proteinů a proteinových komplexů je výhodné získat studované proteiny a proteinové komplexy v čisté podobě. K tomuto účelu je s výhodou používána takzvaná elektroforéza, což je separační metoda, při které dochází k pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu částice je přímo úměrná velikosti jejího náboje a intenzitě elektrického pole, ve kterém se nachází a nepřímo úměrně velikosti této částice a viskozitě materiálu, ve kterém elektroforéza probíhá. Elektroforéza proteinů je obecně rozdělována na dva typy: na denaturující elektroforézu a na nativní (nedenaturující) elektroforézu. V případě denaturující elektroforézy jsou pro solubilizaci vzorku používány agresivní detergenty (např. dodecylsírán sodný, SDS) a dochází tak k separaci jednotlivých proteinů. Naopak v případě nativní elektroforézy jsou pro solubilizaci vzorku používány velmi jemné detergenty a mohou tak být separovány celé proteinové komplexy, u kterých je zachován jejich nativní stav.

1.1 Nativní elektroforéza

Pro studium velmi labilních fotosyntetických proteinových komplexů, je nutné použít separační techniku, která je šetrná k labilním protein-proteinovým interakcím a zachová jejich nativní stav. Ve většině případů se využívá nativní elektroforézy (např. Kouřil a kol., 2016; Nosek a kol., 2017; Järvi a kol., 2011).

Hlavními metodami nativní elektroforézy proteinů jsou modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza („blue native polyacrylamide gel electrophoresis“, BN-PAGE) a bezbarvá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza („clear native polyacrylamide gel electrophoresis“, CN-PAGE).

BN PAGE byla poprvé použita v devadesátých letech pro separaci mitochondriálních komplexů (Schägger a kol., 1994). Tato metoda používala záporně nabitě modré barvivo Coomassie brilliant blue (CBB), které má schopnost adsorbovat se na proteiny. Přítomnost tohoto barviva uděluje separovaným komplexům záporný náboj, který je důležitý pro jejich pohyb v elektrickém poli. Protože přítomnost barviva CBB narušovala některé velmi nestabilní proteinové interakce (Wittig a Schägger, 2008), bylo nutné v některých speciálních elektroforetických aplikacích vyloučit přítomnost tohoto barviva. To vedlo k vývoji nové metodiky známé jako CN PAGE. Kvůli absenci barviva CBB udělující záporný náboj měla původní CN-PAGE bohužel malou rozlišovací schopnost. Tato metodika byla tedy použitelná pouze pro separaci

proteinů, jejichž isoelektrický bod (pI) byl pod hodnotou pH, při které se separace prováděla. (Wittig a Schägger, 2005). Byla tedy hledána možnost jak sloučit výhody obou zmíněných technik. Vznikla tak přepracovaná metodika CN-PAGE která byla pojmenována jako „highresolution CN-PAGE“ (hrCN-PAGE) (Wittig a kol., 2007).

V případě hrCN-PAGE bylo barvivo CBB nahrazeno šetrným aniontovým detergentem deoxycholátem sodným (DOC), přidaným do katodového pufru. Tento detergent se vmezeňuje do micel solubilizovaných proteinů, čímž separované částice získávají záporný náboj a mohou se tak pohybovat v elektrickém poli. Právě proto, že DOC je přítomný pouze v micelách a není tak v těsném kontaktu se solubilizovanými proteinovými komplexy, a je tedy šetrný k labilním protein-proteinovým interakcím (Nosek, 2016). Typickým příkladem labilních proteinových komplexů jsou fotosyntetické superkomplexy (Kouřil a kol, 2014; Pavlovič a kol., 2016; Nosek a kol., 2017).

1.2 Gely používané při hrCN-PAGE

Elektroforéza se provádí na hydrofilních porézních nosičích (např. acetát celulózy, agarózový gel apod.). Nejčastěji používanými nosiči jsou různé gely. Gel je strukturálně z více než 90 % tvořen vodou. Gel vytváří trojrozměrnou síť, která slouží jako „síť“. Nejvíce rozšířeným gelem pro separaci směsi různě velkých proteinů je gel polyakrylamidový. Aby bylo vzájemně možné rozdělit různě velké proteiny, používají se pro jejich separaci gradientové gely (Wittig a Schägger, 2008). U gradientových gelů dochází k pozvolnému nárůstu koncentrace polyakrylamidu, s čímž souvisí postupné zmenšování pórů v gelu. Jakmile separované komplexy dorazí do oblasti gelu, kde velikost pórů odpovídá velikosti separovaných komplexů, u komplexu dojde k výraznému snížení rychlosti separace a velikostně rozdílné komplexy se koncentrují ve vzájemně rozlišitelných pásech.

Velikost pórů v gelu je ovlivněna množstvím akrylamidu a zesít'ovadla N,N'-metylenbisakrylamidu (bisakrylamidu). Celková koncentrace a vzájemný poměr akrylamidu a bisakrylamidu bývá definován veličinami T a C. T vyjadřuje celkové procentuální zastoupení akrylamidu a bisakrylamidu v daném objemu a C vyjadřuje procentuální obsah bisakrylamidu k celkovému obsahu akrylamidu a bisakrylamidu.

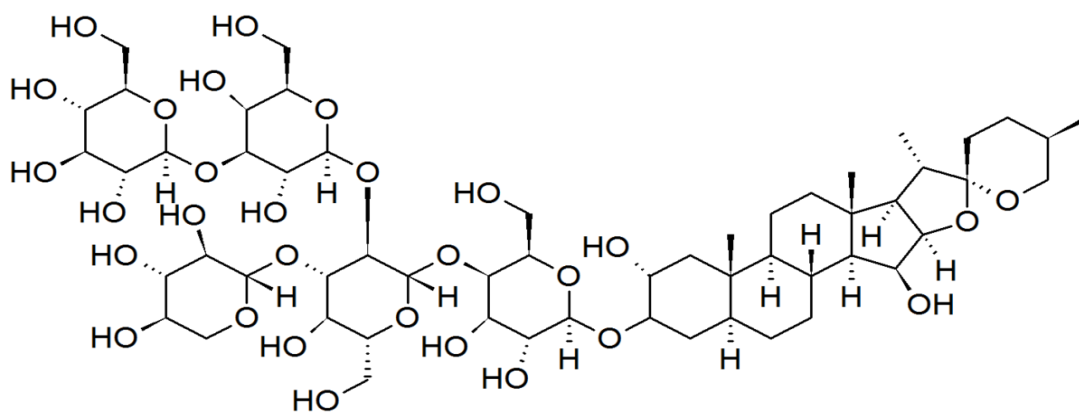
Obecně platí, že se vzrůstajícím podílem bisakrylamidu velikost pórů v gelu klesá. Na velikost pórů má vliv i teplota, při které dochází k polymerizaci. Při vyšší teplotě dochází k tvorbě menších pórů v gelu, naopak při nižších teplotách dochází k tvorbě větších pórů (Wittig a Schägger, 2008).

K separaci proteinů se používají i gely jednokontrační, u kterých se nemění koncentrace akrylamidu ani velikost pórů. Jednokontrační gel je vhodný pro separaci proteinů které mají podobnou molekulovou hmotnost (Svrčinová, 2012).

Pro optimální separaci proteinových komplexů je nutné zvolit vhodný koncentrační rozsah gradientového gelu. Je obecně platnou zásadou, že pro separaci menších komplexů je nutné zvolit větší koncentraci akrylamidu, zatímco pro separaci větších komplexů je nutné zvolit menší koncentraci akrylamidu v gradientovém gelu (Svrčinová, 2012; Järvi a kol., 2011).

1.3 Použití hrCN-PAGE pro separaci fotosyntetických komplexů

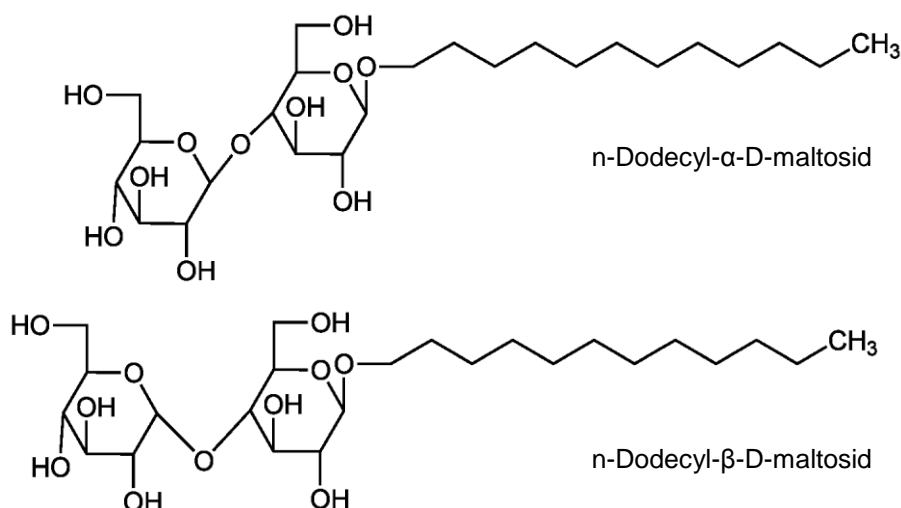
Kombinace hrCN-PAGE a gradientového gelu (viz kap. 1.1 a 1.2) je výhodná pro separaci fotosyntetických komplexů, což je doloženo řadou nedávno publikovaných prací (Järvi a kol., 2011; Kouřil a kol, 2014; Kouřil a kol, 2016; Pavlovič a kol., 2016; Nosek a kol., 2017). Před samotnou separací je nutné provést solubilizaci thylakoidních membrán, ve kterých jsou fotosyntetické komplexy zakotveny. V současné době jsou pro šetrnou solubilizaci používány dvě třídy detergentů: digitonin a dodecylmaltosid (DM), které jsou velmi jemné detergenty ponechávající proteinovým superkomplexům jejich nativní strukturu. Digitonin je velmi jemný detergent, jehož vlastnosti vycházejí z velké a rigidní molekuly. Právě velikost digitoninu způsobuje, že tento detergent nedokáže vstoupit do gran a solubilizuje tak pouze stromální thylakoidy, ve kterých se nachází přednostně fotosystém I (PSI). (Seddon a kol., 2004; Järvi a kol., 2011). Struktura molekuly digitoninu je znázorněna na obrázku č. 1.



Obr. č. 1: Struktura molekuly digitoninu

Nicméně, jak bylo ukázáno v mnoha pracích zabývajících se separací fotosyntetických superkomplexů (Kouřil a kol., 2014; Pavlovič a kol., 2016; Nosek a kol., 2017), právě použití DDM přináší nejlepší výsledky.

U dodecylmaltosidů se rozlišují dvě různé isoformy: n-Dodecyl- α -D-maltosid (α -DDM) a n-Dodecyl- β -D-maltosid (β -DDM). Obě isoformy jsou téměř identické, nepatrně se však liší ve své prostorové konfiguraci (Seddon a kol., 2004).



Obr. č. 2: Struktura isoform DDM s axiální změnou konfigurace alkylového řetězce u α -DDM a s ekvatoriální změnou konfigurace alkylového řetězce u β -DDM.

Nepatrná změna v prostorové konfiguraci obou detergentů má výrazný vliv na jejich solubilizační vlastnosti. Zatímco α -DDM isoforma má slabší solubilizační schopnosti a ponechává solubilizované superkomplexy ve velmi intaktním stavu, β -DDM isoforma má silnější solubilizační schopnosti. Bohužel však při použití detergentu β -DDM dochází k částečnému rozpadu superkomplexů. Proto je nutné před použitím obou detergentů oba detergenty vyzkoušet a použít isoformu vhodnou pro zvolený experiment (Nosek 2016).

Použití DDM významně přispělo k objasnění struktury fotosytému II (PSII) (Caffarri a kol., 2009; Wei a kol., 2016).

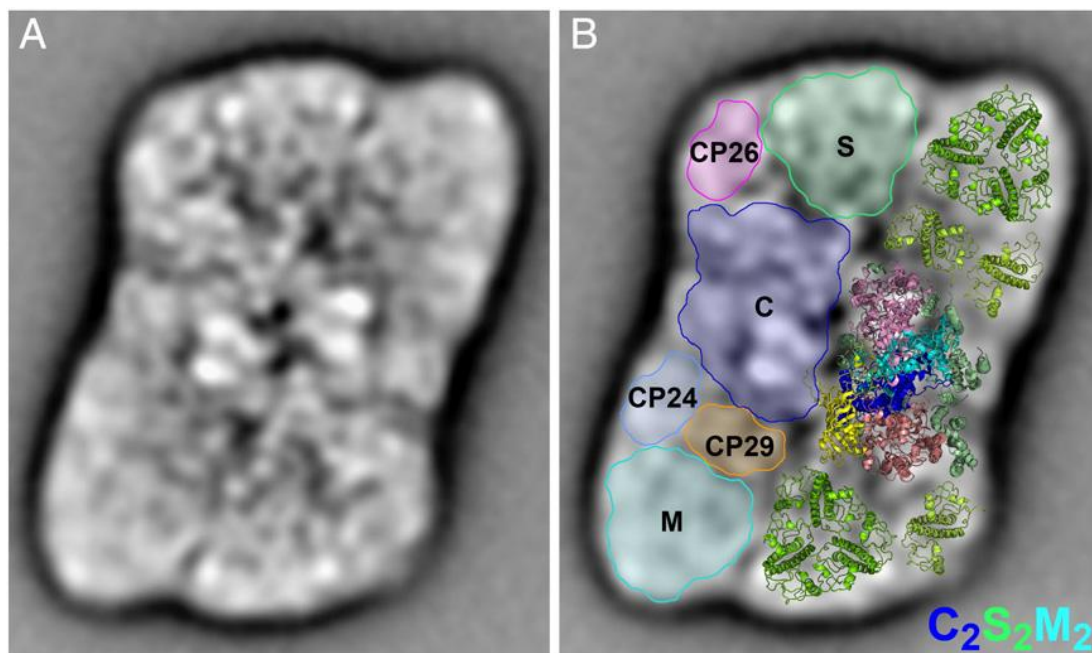
2. Fotosystém II

Fotosystém II (PSII) je pigment-proteinový komplex nacházející se v thylakoidní membráně chloroplastů. V PSII probíhají světlem indukované reakce. Výsledkem těchto reakcí je přeměna světelné reakce na energii chemickou a rozklad molekul vody za vzniku molekulárního kyslíku a protonů.

Fotosystém II je tvořen dvěma základními celky, mezi něž patří jádro PSII a na něj navázané světlosběrné komplexy (LHCII). Jádro PSII vyšších rostlin je tvořeno podjednotkami PsbA (D1), PsbB (CP47), PsbC (CP43), PsbD (D2), PsbE-F, PsbH, PsbI-M, PsbTc, PsbW, PsbX, PsbZ, PsbO-Q, PsbTn, které jsou kódovány jaderným nebo chloroplastovým genomem. Z funkčního hlediska plní podjednotky různě důležité funkce. Mezi nejvýznamnější patří podjednotky PsbA-PsbD, které tvoří střed celého jádra PSII a dochází v nich ke světlem indukované nábojové separaci v chlorofylovém dimeru P680 (Nelson a Ben-shem, 2004). Dalšími funkčně významnými podjednotkami PSII jsou PsbO, PsbP a PsbQ, které tvoří tzv. kyslík vyvíjející komplex. (např. Umena a kol., 2011). Funkcí tohoto komplexu je světlem indukované štěpení vody, při kterém dochází k tvorbě molekulárního kyslíku a uvolňování elektronů a protonů. Uvolněné elektrony dále putují fotosyntetickou kaskádou a protony jsou využity k syntéze ATP a elektrony k redukci NAD(P)⁺ na redukci NAD(P)H.

Na jádro PSII jsou vázány světlosběrné antény (LHCII), mezi jejichž hlavní funkci patří zásobování jádra PSII energií získanou z pohlcených světelných kvant a také ochrana jádra PSII před nadbytečnou světelnou energií (Nelson a Ben-shem, 2004; Ruban a kol., 2012).

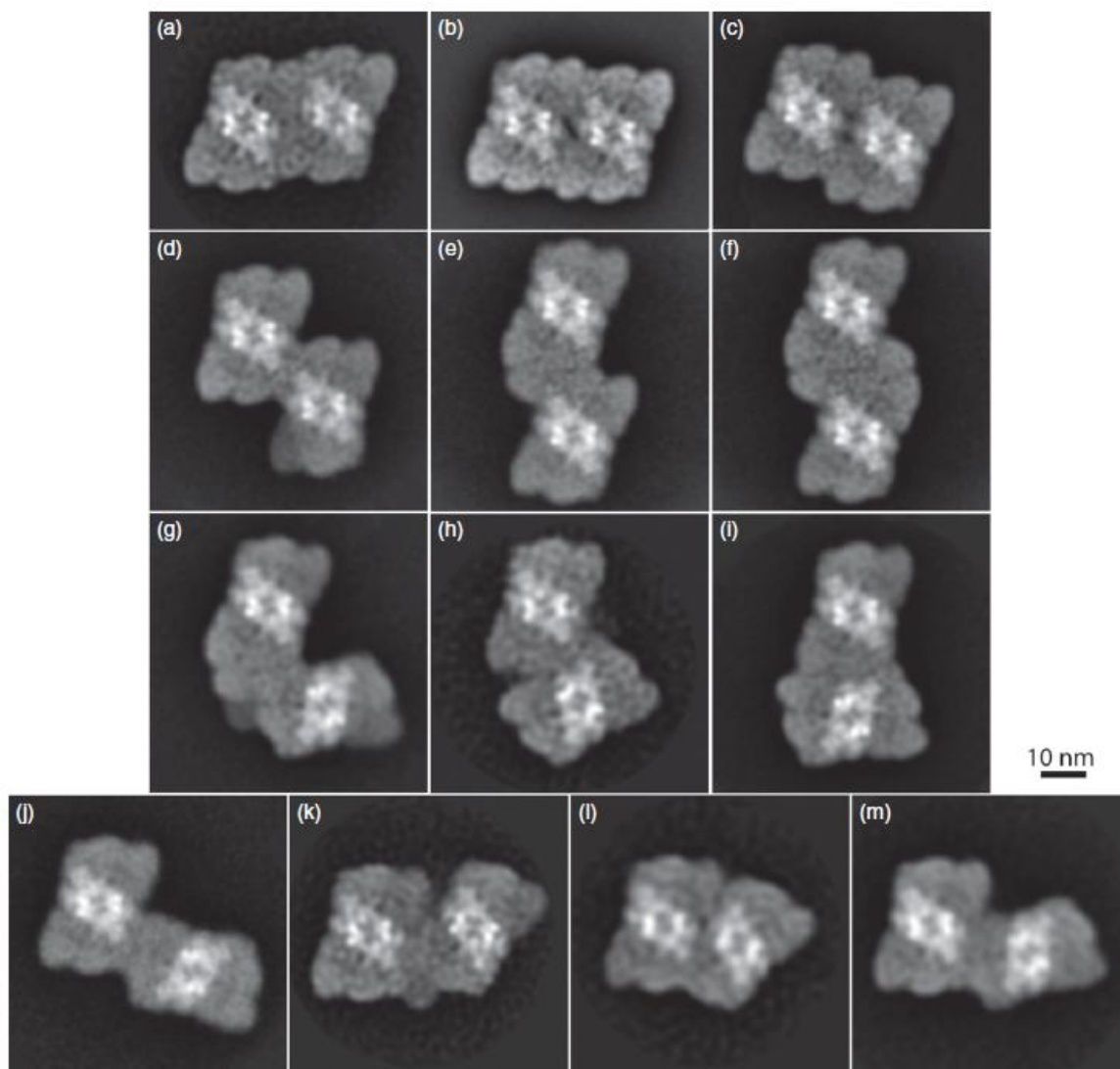
LHCII vyšších rostlin je tvořeno podjednotkami Lhcb1-6 (Jansson, 1999). Podjednotky Lhcb1-3 tvoří trimery, které jsou k jádru PSII vázány různě velkou silou. Podle míry interakce trimerů s jádrem PSII rozlišujeme S trimer („*Strongly bound*“) a M trimer („*Moderately bound*“). Podjednotky Lhcb 4-6 jsou k jádru PSII vázány v monomerní podobě a zprostředkovávají interakci mezi jádrem PSII a trimery LHCII (Caffarri a kol., 2009; Kouřil a kol., 2012; Dekker a Boekema, 2005). Monomerní podjednotky jsou označovány také jako CP24 (Lhcb6), CP26 (Lhcb5) a CP29 (Lhcb4) (Caffarri a kol., 2009). Schématické znázornění struktury rostlinného PSII s navázanými monomerními a trimerními LHCII je ukázáno na Obr. č. 3.



Obr. č. 3: Struktura PSII v tzv. $C_2S_2M_2$ formě, která představuje nejběžnější strukturu PSII izolovaného z rostlin *Arabidopsis thaliana*. Převzato z Kouřil a kol., 2012.

2.1 Megakomplexy PSII

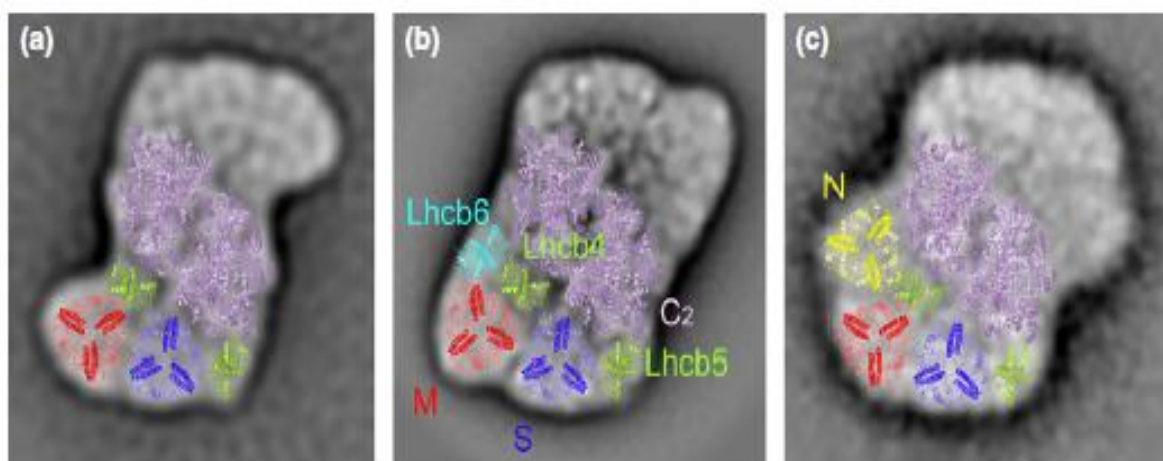
U vyšších rostlin bylo ukázáno, že PSII má schopnost tvořit megakomplexy tvořené dvěma kopiemi PSII (Nosek a kol., 2017). Jednotlivé komplexy PSII spolu interagují paralelně či neparalelně a na interakcích se podílejí především světlosběrné komplexy. Struktury známých megakomplexů jsou znázorněny na obrázku č. 4.



Obr. č. 4: Snímky megakomplexů PSII získané jednočásticovou transmisní EM zprůměrováním cca. 50 000 projekcí. Snímky (a-f) představují PSII v paralelním a (g-m) PSII v neparalelním uspořádání. Převzato z Nosek a kol., 2017

2.2 PSII izolovaný ze smrku

Nedávná studie (Kouřil a kol., 2016) ukázala, že světlosběrný systém některých druhů vyšších rostlin (skupiny *Gnetales*, *Pinaceae*) neobsahuje Lhcb3 a Lhcb6 podjednotky. Obě podjednotky byly považovány za standardní součást světlosběrného systému všech vyšších rostlin, které se vyvinuli při přechodu rostlin z vody na souš (Alboresi a kol., 2008). Nepřítomnost těchto podjednotek, způsobila změnu v orientaci M trimeru. Absence některých podjednotek LHCII je důvodem toho, že strukturně je PSII komplex rostlin z čeledě *Pinaceae* více podobný evolučně nižším PSII komplexům řas např. *Chlamydomonas reinhardtii*, než komplexům PSII vyšších rostlin např. *Arabidopsis thaliana*. Struktura PSII komplexů výše zmíněných rostlin je na obrázku č. 5.



Obr. č. 5: Snímky z transmisního EM PSII superkomplexů rostlin (a) *Picea abies* v porovnání s PSII superkomplexy (b) *Arabidopsis thaliana* a (c) *Chlamydomonas reinhardtii*. Převzato z Kouřil a kol., 2016

U rostlinné čeledě *Pinaceae* se dosud nepodařilo pozorovat podobné megakomplexy PSII podobné těm které byly izolovány u rostlin *Arabidopsis thaliana*. Tato skutečnost mohla být ovlivněna dvěma faktory. Buď zmíněná rostlinná třída megakomplexy PSII vůbec neobsahuje, nebo jsou tyto megakomplexy kvůli absenci podjednotek Lhcb3 a Lhcb6 nestabilní.

3. Elektronová mikroskopie proteinových komplexů

Pro studium struktur proteinových komplexů je velmi často používána elektronová mikroskopie (EM). Tato metodika poskytuje mnoho výhod oproti světelné mikroskopii, která je ve svém rozlišení omezena difrakčním limitem světelného záření. Nevýhodou EM u biologických vzorků je jejich nízký kontrast, který je dán rozptylem elektronů a tento rozptyl je přímo úměrný atomovému číslu prvků, ze kterých je tvořen biologický materiál. Jelikož je biologický materiál tvořen lehkými prvky (O, N, C, P, S a jiné) je z tohoto důvodu kontrast biologických vzorků nízký. Biologické vzorky jsou také velmi citlivé k radiačnímu poškození, čemuž je nutné zabránit snížením dávky elektronů. Snížení intenzity elektronového svazku má však za následek snížení poměru signál/šum. Právě kvůli nízkému kontrastu a nízkému poměru signál/šum je nutné při studiu struktury biologických vzorků přistoupit k jednočásticové analýze. Jednočásticová analýza spočívá v prostém průměrování projekcí shodných proteinových komplexů, čímž se zlepšuje kontrast a zvyšuje poměr signál/šum (Boekema a kol., 2009).

Kontrast u biologických vzorků, je nejčastěji zvyšován pomocí tzv. negativního barvení. Při této metodě je kontrast zvýšen přidáním roztoku solí těžkých kovů ke vzorku (Boekema a kol., 2009). Tyto soli těžkých kovů vyplní prostory kolem vzorku a nepronikají do hydrofóbních částí proteinů. Nevýhodou membránových proteinů je, že zůstávají monodisperzní v roztoku vrstvy detergentu. Tato vrstva má za následek rozmazání projekce po obvodu proteinu. Z tohoto důvodu se uhlíková vrstva, kterou je potažena měděná síťka, upravuje doutnavým výbojem, aby se stala více hydrofilní. Tato úprava zlepšuje adsorpci proteinů na uhlíkový film a poskytuje lepší pozadí (Kozarová, 2013).

Pro studium vzorku pod elektronovým mikroskopem je nutné nejprve extrahovat zkoumané proteiny z polyakrylamidového gelu. Bylo ukázáno, že nejúčinnější metodou pro extrakci proteinu je jejich samovolná eluce do vhodného roztoku. Z gelu je po separaci vyřezán pás, který je nasekán na malé částičky a vložen do elučního pufru. Takto připravené vzorky jsou nanášeny na síťku a nejčastěji obarveny solemi těžkých kovů.

4. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je optimalizovat metodiku hrCN-PAGE takovým způsobem aby během solubilizace a elektroforetické separace nedošlo k rozpadu případných megakomplexů PSII.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. Použité metody a materiál

5.1 Rostlinný materiál

Pro izolaci thylakoidních membrán byly použity 18 - denní semenáčky smrku ztepilého (*Picea abies* Karst.), které byly pěstovány ve fotokomoře za těchto podmínek: ozáření 100 μmol fotonu PAR, fotoperioda: 8 hodin světla 16 hodin tma, pěstební vlhkost nebyla definována.

5.2 Izolace thylakoidních membrán

Rostliny byly odebrány pro izolaci před ukončením temnostní fáze. Nastříhané kotyledony *Picea abies* byly vloženy do homogenizační nádoby, přestříhány nůžkami na menší kousky a přelity pufrem A, který byl vychlazen na 0°C. Homogenizaci jsme provedli pomocí homogenizátoru (T25 basic, IKA, Německo) v pěti desetivteřinových intervalech při otáčkách 17500 min^{-1} . Homogenizované kotyledony *Picea abies* byly přefiltrovány přes čtyři vrstvy silonové sítky s velikostí oka 40 μm . Filtrát byl rozdělen do čtyř 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován v centrifuze (3K30, SIGMA). Centrifuga s vhodným rotorem byla vychlazená na 4°C a centrifugace probíhala po dobu 6 minut při 5000 g. Supernatant byl odlit a pelet byl resuspendován v pufru B při teplotě 0°C. Resuspendovaný pelet byl rozdělen do dvou 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován při 4°C po dobu 10 minut při 5000 g. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v pufru C při teplotě 0°C. Takto resuspendovaný pelet byl centrifugován při 4°C po dobu 5 minut při 5000 g. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v malém množství pufru C (cca 2 ml), který byl vychlazen na 0°C. Takto připravená suspenze thylakoidních membrán byla napipetována do mikroskopových a uchována v -80°C pro následné použití. Izolace probíhala při zeleném světle a veškerý materiál potřebný k izolaci byl uchováván na ledu.

Tabulka č. 1: Složení pufrů použitých k izolaci thylakoidních membrán

	Látka	Koncentrace
Pufr A (pH 7,2)	HEPES	35mM
	Sacharosa	400mM
	NaCl	400mM
	MgCl ₂	4mM
	Askorbát sodný	5mM
	BSA	2mg/ml
Pufr B (pH 7,5)	HEPES	25mM
	NaCl	150mM
	MgCl ₂	8mM
	EDTA	1mM
Pufr C (pH 7,2)	HEPES	50mM
	Sacharosa	400mM
	NaCl	15mM
	MgCl ₂	5mM

5.3 Stanovení koncentrace chlorofylů

Celkovou koncentraci chlorofylů a a b v izolované suspenzi thylakoidních membrán jsme stanovovali podle práce Lichtenthalera. Suspenze thylakoidních membrán byla smíchána s 2 ml 80 % acetonu a centrifugována po dobu 5 minut při 10000 g pomocí centrifugy (3K30, SIGMA). Absorbance supernatantu byla naměřena pomocí spektrofotometru (SPECORD 250 PLUS, Analytik Jena) při vlnových délkách 646,8; 663,2; 750 nm. Výsledné absorbance byly dosazeny do Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987):

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

$$c_b = 21,5(A_{646,8} - A_{750}) - 5,1(A_{663,2} - A_{750})$$

kde c_a a c_b jsou koncentrace chlorofylů v $\mu\text{g/ml}$. Absorbance při vlnové délce 750 nm byla použita ke korekci na rozptylu vzorku.

5.4 Solubilizace thylakoidních membrán

Thylakoidní membrány smrku ztepilého (*Picea abies*) byly solubilizovány α -DDM při různém hmotnostním poměru α -DDM:chlorofylům $a+b$ (DDM/chl). Do mikrozkuvek byl napitován C-pufr (0,4M sacharóza, 5mM $MgCl \cdot 6H_2O$, 50mM HEPES/NaOH, 15mM NaCl, 10% glycerol) a α -DDM. Do tohoto roztoku byla přidána v místnosti osvětlené zeleným světlem suspenze thylakoidních membrán. Množství α -DDM bylo takové, abychom dosáhli potřebného hmotnostního poměru, množství suspenze thylakoidních membrán bylo zvoleno tak, aby na jamku bylo nanášeno potřebné množství chlorofylu, množství C-puftru bylo takové, aby doplnilo objem α -DDM a thylakoidních membrán na objem potřebný k nanášení do jamky (30 μ l). Tato směs byla následně centrifugována při 20 000 g po dobu 10 minut při 4°C. Centrifugace byla provedena z důvodu odstranění nesolubilizovaného materiálu.

Pro přípravu vzorku byla použita suspenze thylakoidních membrán o celkové koncentraci chlorofylů $a+b$ 3670 μ g/ml.

Tabulka č. 2: Použité množství detergentu a C-puftru při solubilizaci α -DDM thylakoidních membrán smrku ztepilého (koncentrace chlorofylů 3670 μ g /ml), množství chlorofylu na jamku 10 μ g

Poměr DDM/chl	C-pufr [μ l]	5 % α -DDM[μ l]	Suspenze [μ l]
5:1	26,3	1,0	2,7
10:1	25,3	2,0	2,7
15:1	24,3	3,0	2,7
20:1	23,3	4,0	2,7
25:1	22,3	5,0	2,7
30:1	21,3	6,0	2,7
35:1	20,3	7,0	2,7
40:1	19,3	8,0	2,7

5.5 CN-PAGE

Pro elektroforetickou separaci byl použit gradientový polyakrylamidový gel s různou koncentrací bis-akrylamidu, touto změnou koncentrace lze regulovat hustotu zesíťování polyakrylamidového gelu.

Pro přípravu gelů a samotné spuštění elektroforézy jsou potřebné tyto roztoky:

- Gelový pufr (pH 7, 6x koncentrovaná) 3M aminokapronová kyselina (ACA), 0,3M Bis-Tris/HCl
- 50% zásobní roztok akrylamidu 50%T/3%C (6%C nebo 10%C)
- Katodový pufr (pH 7, 10x koncentrovaný) 0,5M Tricin, 0,15M Bis-Tris/HCl
- Anodový pufr (pH 7) 50mM Bis-Tris/HCl
- Zásobní roztoky akrylamidového gelu 4% (8,33 ml gelového pufru, 37,67 ml H₂O, 4 ml 50% zásobního roztoku akrylamidu na 50ml zásobního roztoku) a 8% (10 ml glycerol, 8,33 ml gelového pufru, 23,67 ml H₂O, 8 ml 50% zásobního roztoku akrylamidu na 50ml zásobního roztoku)
- 10 % persíran amonný (APS),
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Po přípravě potřebných roztoků byla sestavena aparatura pro nalévání gelu s tloušťkou gelu 1mm. Gradientový gel byl připraven pomocí gradientové pumpy (Kouřil, Kyjov, Česká republika). Po promytí aparatury deionizovanou vodou, byl do jedné komory nalit 4% gel, do druhé komory 8% gel a přidán 10% APS a TEMED. Oba dva roztoky byly přibližně třicet vteřin důkladně promíchány a následně otevřením kohoutu postupně smíchávány, čímž vznikl gradientový polyakrylamidový gel. Mezi skla byl vložen hřebínek s deseti jamkami.

Po polymerizaci gelu byl vyjmut hřebínek a sestavena elektroforetická aparatura Protean II (Biorad, Hercules, USA). Její těsnost byla ověřena neionizovanou vodou. Poté byly do aparatury nality jednotlivé pufrы (do katodového pufru bylo přidáno 43 mg α -DDM, 86 mg DOC a 48 μ l 35 % HCl) a do jamek nanesen vzorek solubilizovaných thylakoidních membrán a spuštěna elektroforéza.

CN-PAGE probíhala ve tmě a celá aparatura byla uložena na ledu. Na aparatuře byl v prvním kroku udržován proud 7mA. V druhém kroku byl proud

udržován na 15 mA. Jakmile putující částice byly přibližně 1 cm od konce gradientového gelu (cca po 1,5 hodině) byla elektroforéza ukončena a gel vyjmut.

5.6 Skenování gelů

Gel byl skenován na přístroji Amersham Imager 600RGB. Byl pořízen snímek pomocí bílého světla v transmisním módu skeneru. Pro rozlišení mezi PSI a PSII komplexu byl pořízen fluorescenční snímek gelu. Při pokojové teplotě je kvantový výtěžek PSI velmi malý, oproti PSII, který má kvantový výtěžek mnohonásobně větší. Díky tomu můžeme jednotlivé komplexy bezpečně rozeznat. Bylo excitováno světlem o vlnové délce 460 nm, při detekci fluorescence byl použit pásový filtr (690-720 nm).

5.7 Eluce separovaných PSII megakomplexů

Pro snímkování megakomplexů PSII je nutné tyto proteiny v možná co nejintaktnější formě vyextrahovat z polyakrylamidového gelu. Nejšetrnějším způsobem je samovolná eluce proteinů z gelu do elučního pufru. Bylo nutné z gelu vyřezat vybrané proteinové pásy, u kterých jsme očekávali přítomnost vysokomolekulárních komplexů PSII. Jednotlivé pásy byly z gelu vyřezány a takto jemně „nasekaný“ proteinový pás byl smíchán s elučním puffrem v mikrozkušavkách. Po dobu přípravy vzorku bylo nutné pracovat ve tmě, aby nedošlo k poškození proteinů. Eluce probíhala po dobu jedné hodiny ve tmě při 4°C.

5.8 Příprava vzorku pro EM

Pro získání dobrého kontrastu byly vzorky připraveny metodou negativního barvení. Měděná síťka potažená uhlíkovou vrstvou byla nejprve upravena doutnavým výbojem, aby se stala hydrofilní a lépe adsorbovala PSII komplexy. Na síťku bylo naneseno 5 μ l eluovaného vzorku a po dobu jedné minuty se směs proteinů nechala adsorbovat. Po minutě byla přebytečná směs odsáta filtračním papírem a přidán na jednu minutu 2% roztok uranyl acetátu. Přebytečný uranyl acetát byl odsát filtračním papírem.

5.9 Snímkování EM

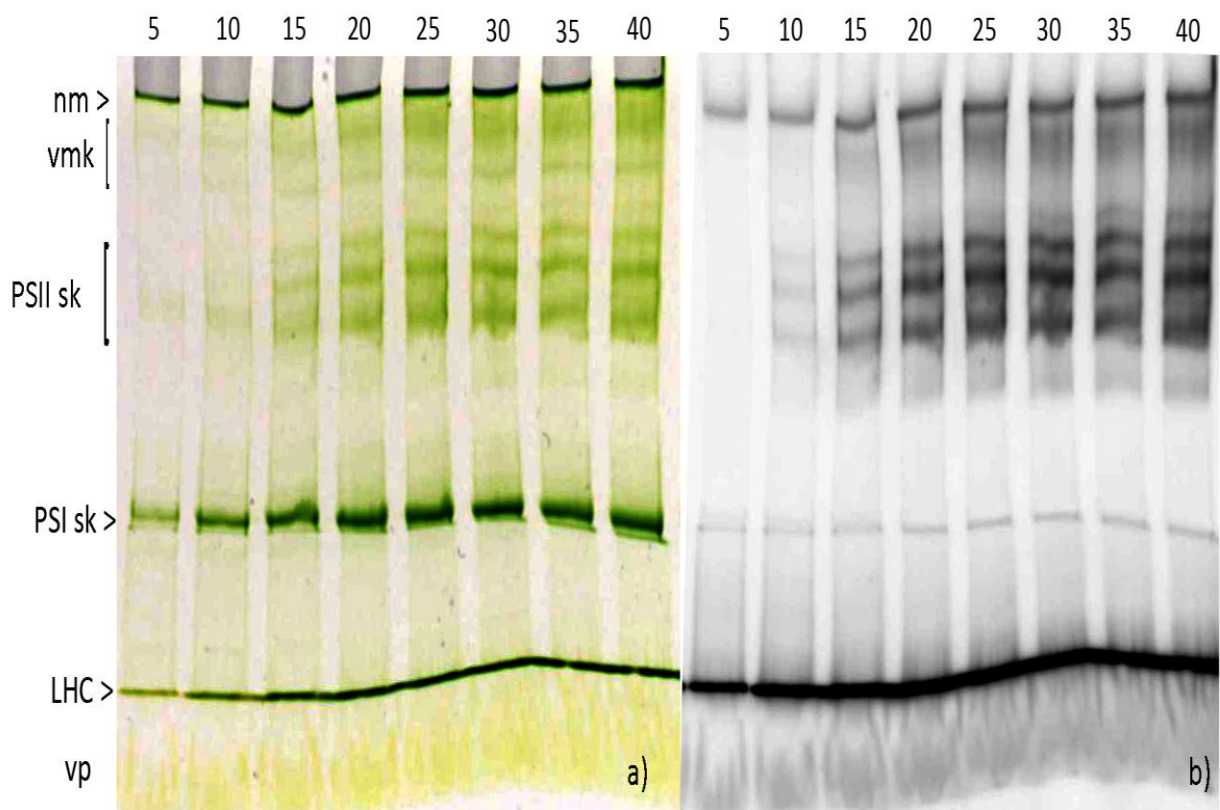
Takto připravený vzorek byl snímkován na elektronovém mikroskopu Jeol2010F s LaB₆ katodou při napětí 120 kV a zvětšení 40 000x. Snímky byly pořízeny CCD kamerou Keenview G2. Snímky pro jednočásticovou analýzu byly pořízeny elektronovým mikroskopem Tecnai G2 20 Twin s LaB₆ katodou při napětí 200 kV a zvětšení 130 000x. Jednočásticová analýza byla provedena softwarem GRIP a RELION (Scheres, 2012)

6. Výsledky

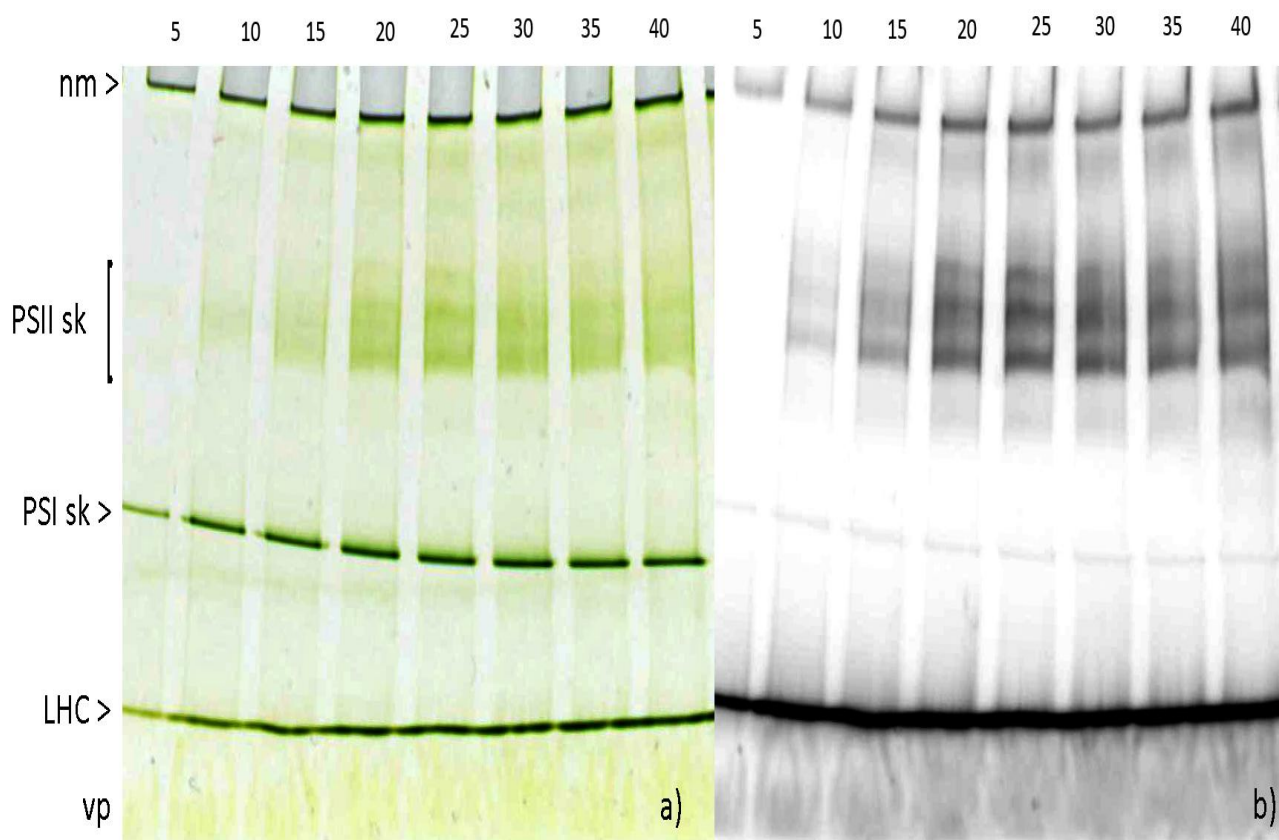
Hlavním cílem experimentální části byla optimalizace separační metody CN-PAGE za použití detergentu α -DDM pro izolaci smrkových vysokomolekulárních komplexů PSII. Důraz byl kladen na optimalizaci složení polyakrylamidových gelů a vhodného poměru DDM/chl. Bylo důležité, aby separované pigment-proteinové komplexy fotosyntetického aparátu byly zachovány v intaktním stavu pro studium jejich struktury pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Jako šetrný způsob extrakce proteinů z polyakrylamidového gelu byla použita samovolná eluce proteinů do pufru.

6.1 Stanovení optimálního složení gelů a koncentrace detergentu

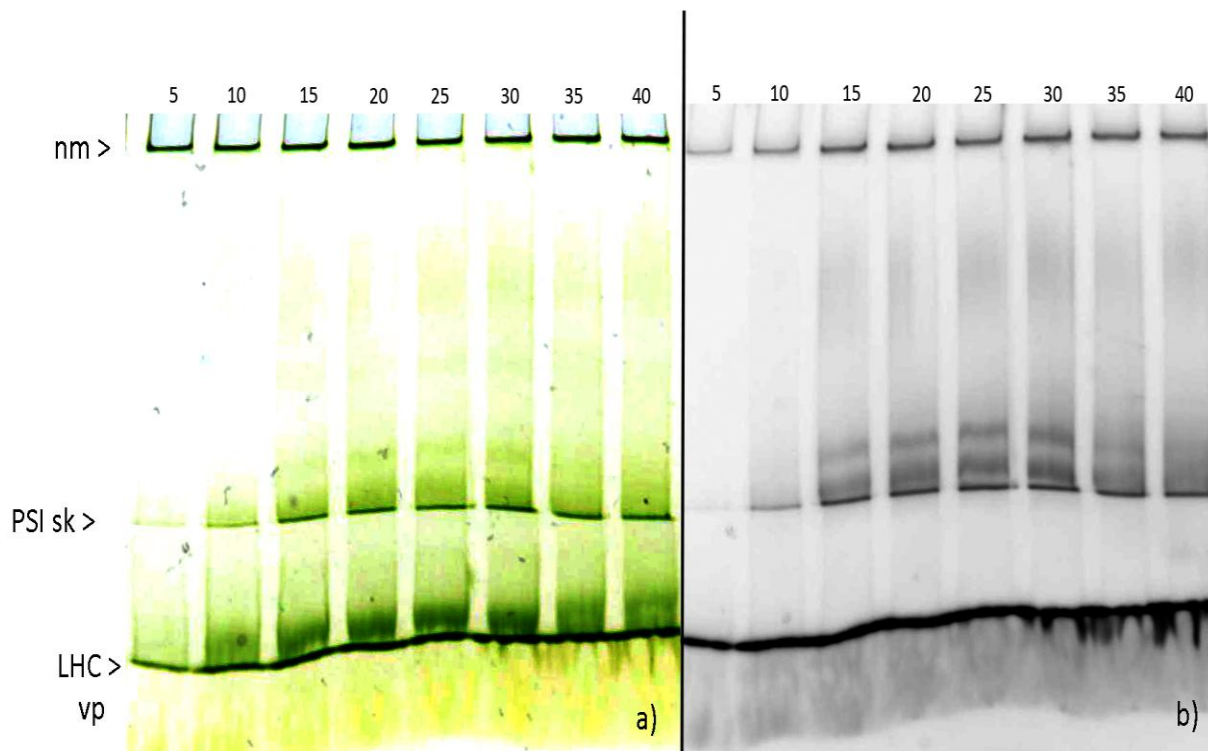
Pro úspěšnou elektroforetickou separaci pigment-proteinových komplexů, bylo nutné experimentálně určit vhodný hmotnostní poměr DDM/chl. Optimalizace byla provedena na 4 – 8 % T/ 3%C (6%C, 10%C) gradientovém polyakrylamidovém gelu s poměrem DDM/chl v rozsahu 5 – 40, za použití 10 μ g chlorofylů na jamku. Výsledky separace vidíme na obr. č. 6 – 8.



Obr. č. 6: Separace smrkových fotosyntetických superkomplexů. Snímek reprezentuje kolorimetrický snímek (a) a fluorescenční snímek (b) gelu 4 – 8 %T/3%C. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr, který byl použit při solubilizaci thylakoidních membrán s α -DDM. nm: nesolubilizovaný materiál, vmk: vysokomolekulární komplexy, PSII sk: superkomplexy fotosystému II, PSI sk: superkomplexy fotosystému I, LHC: trimery a monomery světlosběrných komplexů fotosystému II, vp: volné pigmenty.



Obr. č. 7: Separace smrkových fotosyntetických superkomplexů. Snímek reprezentuje kolorimetrický snímek (a) a fluorescenční snímek (b) gelu 4 – 8 %T/6%C. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr, který byl použit při solubilizaci thylakoidních membrán s α -DDM. nm: nesolubilizovaný materiál, PSII sk: superkomplexy fotosystému II, PSI sk: superkomplexy fotosystému I, LHC: trimery a monomery světlosběrných komplexů fotosystému II, vp: volné pigmenty.



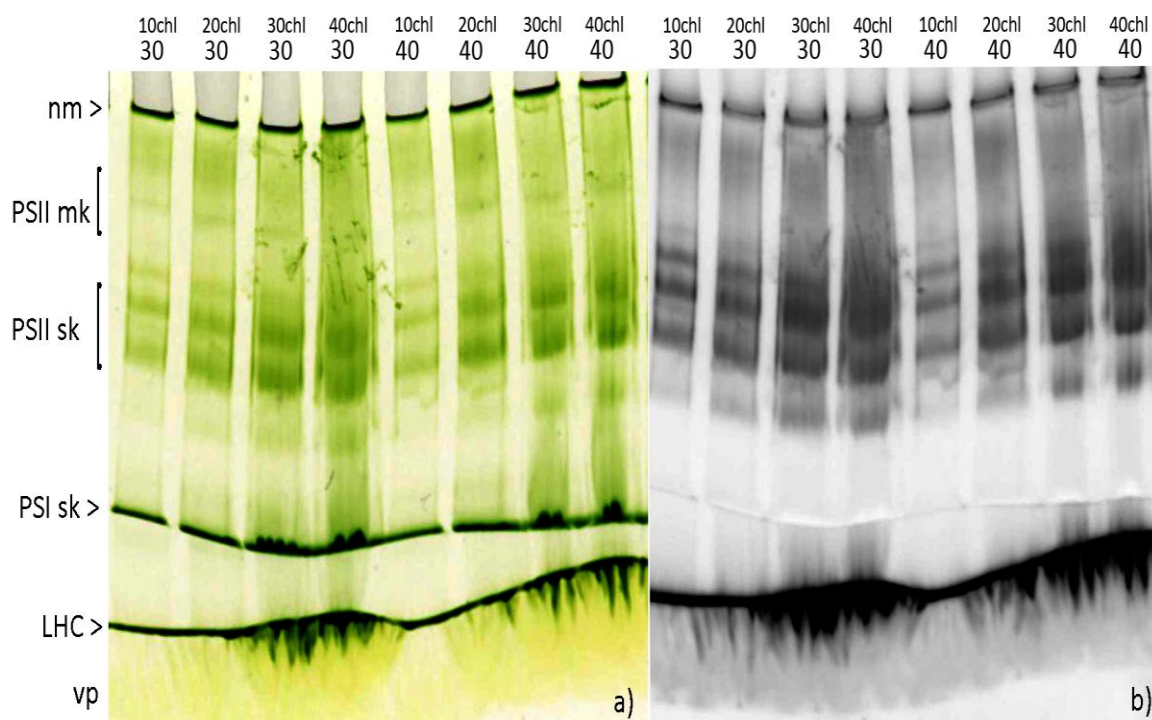
Obr. č. 8: Separace smrkových fotosyntetických superkomplexů. Snímek reprezentuje kolorimetrický snímek (a) a fluorescenční snímek (b) gelu 4 – 8 %T/10%C. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr, který byl použit při solubilizaci thylakoidních membrán s α -DDM. nm: nesolubilizovaný materiál, PSI sk: superkomplexy fotosystému I, LHC: trimery a monomery světlosběrných komplexů fotosystému II, vp: volné pigmenty.

Z optimalizace složení gelů a vhodného poměru DDM/chl za použití 10 μ g chlorofylů na jamku lze pozorovat, že se zvyšujícím se poměrem DDM/chl dochází k postupnému nárůstu intenzity pásů PSII superkomplexů. Při nižších poměrech DDM/chl docházelo k velmi dobré separaci PSI komplexů. Na obr. č. 6 je velmi dobře vidět nárůst intenzity pásů, které odpovídají superkomplexům PSII. Z gelu na Obr. 6 je dále patrná přítomnost pásů s vysokomolekulárními komplexy, které pravděpodobně odpovídají megakomplexům. Jak je ovšem patrné z fluorescenčního snímku gelu na Obr. 6b, pouze horní z těchto pásů by měl být tvořen megakomplexy PSII.

Pro separaci byly použity i gradientové gely 4 – 8 %T/6%C nebo 4 – 8 %T/10%C. Na obr. č. 7 lze vidět pásy, které by mohly obsahovat vysokomolekulární proteiny PSII, avšak tyto pásy nejsou tak výrazné a intenzivní jako u gradientového gelu

4 – 8 %T/3%C. Na obr. č. 8 vidíme gradientový gel 4 – 8 %T/10%C, který se ukázal k separaci pigment – proteinových komplexů PSII jako nevhodný.

Ke studiu vysokomolekulárních PSII komplexů se ukázalo, že nejvhodnějším způsobem separace bude použití gradientového gelu 4 – 8 %T/3%C s poměrem DDM/chl v rozmezí 30 – 40. Za účelem zvýšení intenzity vysokomolekulárních pásů a tím i zlepšení výtěžku případných proteinů byla dále provedena optimalizace, při které jsme měnili množství naneseného chlorofylu na jamku v rozmezí 10 – 40 μg . Výsledky vidíme na obr. č. 9.



Obr. č. 9: Separace smrkových fotosyntetických superkomplexů. Snímek reprezentuje kolorimetrický snímek (a) a fluorescenční snímek (b) gelu 4 – 8 %T/3%C Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr, který byl použit při solubilizaci thylakoidních membrán s α -DDM a množství chlorofylů použitých na jamku. nm: nesolubilizovaný materiál, PSII mk: megakomplexy fotosystému II, PSII sk: superkomplexy fotosystému II, PSI sk: superkomplexy fotosystému I, LHC: trimery a monomery světlosběrných komplexů fotosystému II, vp: volné pigmenty

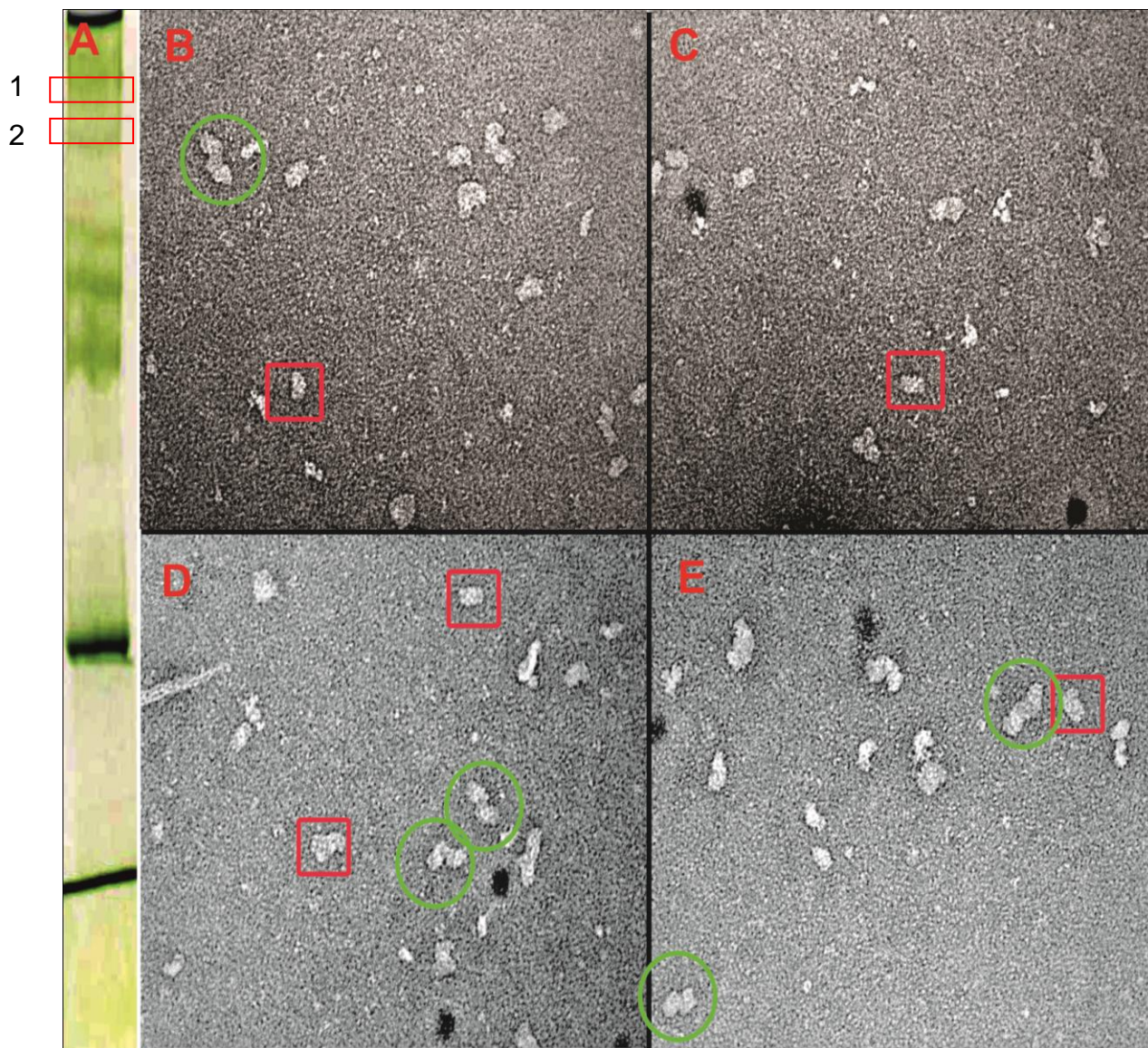
Výsledky této optimalizace ukazují, že se zvyšujícím se množstvím nanášených chlorofylů dochází k nárůstu intenzity pásu, které odpovídají PSII

superkomplexům. Ovšem lze pozorovat negativní vliv na rozlišení jednotlivých pásů, kdy dochází k jejich splývání, což je pro účely naší studie nevhodné.

Pásy označené červeným obdélníkem (č. 1 a 2) na obr. č. 10A byly vyřezány a připraveny pro strukturní analýzu pomocí EM.

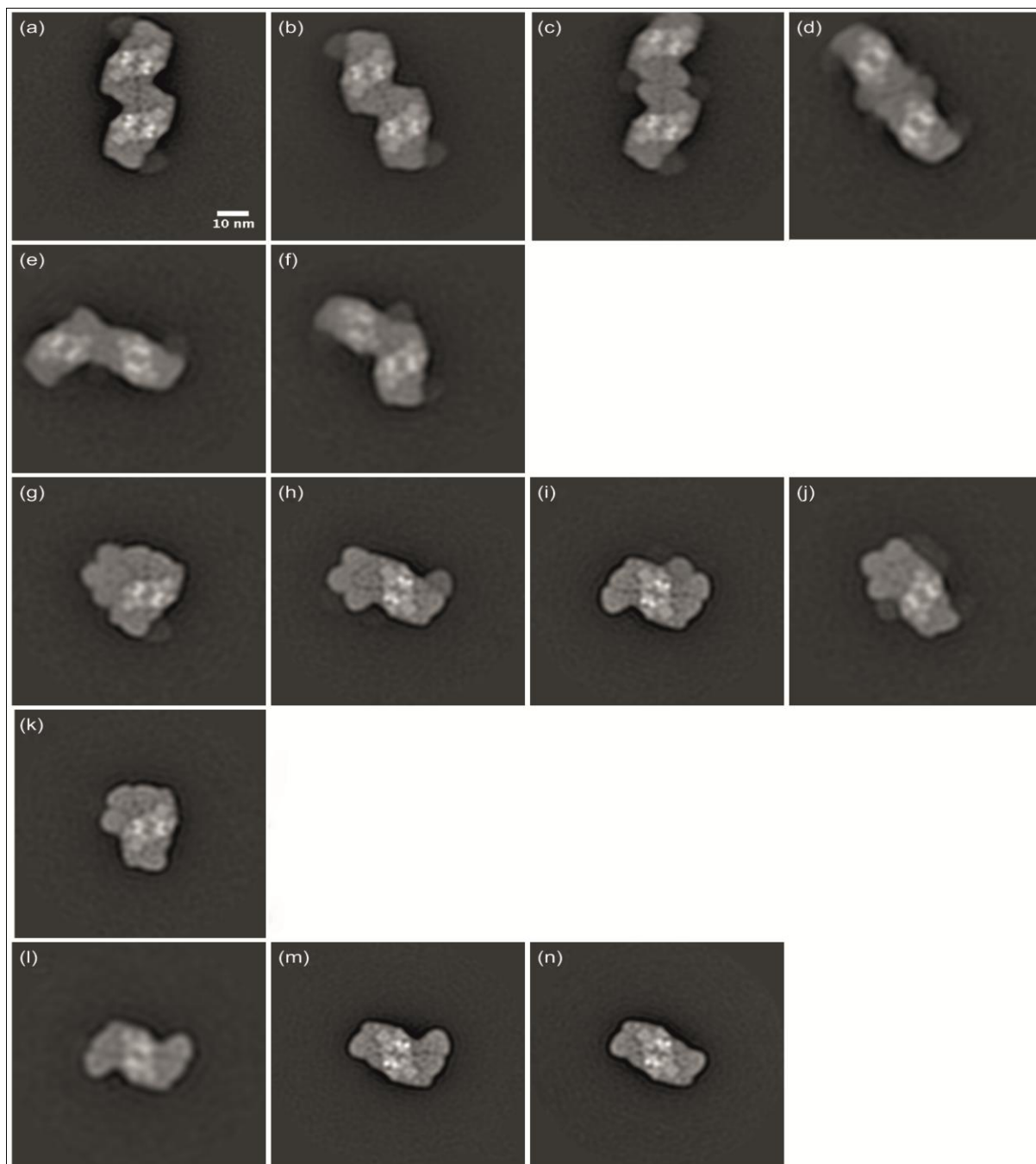
6.2 EM strukturní analýza

Příprava vzorku pro EM je detailněji popsána v kapitole 5.8. Vzorky byly pozorovány při zvětšení 40 000x a urychlovacím napětí 120 kV. Výsledky pozorování pigment – proteinových komplexů jsou ukázány na obr. č. 10. Cílem bylo hledat případné megakomplexy PSII. U vzorku vyřezaných z těchto pásů, které byly solubilizovány α -DDM byly pozorovány megakomplexy PSII. Podle již dostupných výsledků (Nosek a kol., 2017; Kouřil a kol., 2016) jsme očekávali, že tyto komplexy jsou velmi málo stabilní a při jejich eluci dochází k jejich rozpadu na superkomplexy PSII.



Obr. č. 10: Snímky z elektronového mikroskopu proteinů z pásu č. 1 10B-C a z pásu č. 2 10D-E na obr.10A. Megakomplexy PSII jsou zvýrazněny zeleně, superkomplexy PSII červeně. Zvětšení 40 000x.

Ukázalo se, že oba dva pásy obsahují vysokomolekulární komplexy. Pro detailnější strukturní analýzu byl ovšem vybrán pás č. 2 (obr. č. 10A), protože při předběžném snímkování obsahoval více megakomplexů PSII (viz obr. č. 10D-E), než pás č. 1 (viz obr. č. 10B-C). Výsledky detailnější obrazové analýzy vidíme na Obr. č. 11.



Obr. č. 11. Snímky superkomplexů a megakomplexů PSII izolovaných z thylakoidních membrán *Picea abies*. Snímky (a) – (f) představují megakomplexy PSII, kde (a)-(d) reprezentují megakomplexy s paralelní orientací PSII superkomplexů, (e-f) megakomplexy s neparalelní orientací PSII superkomplexů, (g) – (n) představují superkomplexy PSII. Počet projekcí, ze kterých je složen snímek (a) 2419; (b) 3118; (c) 1549; (d) 1059; (e) 915; (f) 1103; (g) 1018; (h) 2067; (i) 2525; (j) 1299; (k) 1570; (l) 1297; (m) 4011; (n) 3635.

Na obr. 11(a)-(f) vidíme megakomplexy PSII, interakce je zprostředkována LHCII. Na obr. 11(g)-(n) vidíme superkomplexy PSII s různým množstvím návazných světlosběrných antén, kde (g) představuje $C_2S_2MX_4$, (h) $C_2S_2M_2X$, (i) $C_2S_2M_2X$, (j) $C_2S_2MX_2$, (k) C_2S_2MX , (l) $C_2S_2M_2$, (m) C_2S_2M , (n) C_2S_2 superkomplex.

7. Diskuze

Hlavním cílem experimentální části této práce byla optimalizace metodiky hrCN-PAGE pro separaci vysokomolekulárních komplexů izolovaných z thylakoidních membrán smrku ztepilého (*Picea abies*). Výsledky této optimalizace jsou prezentovány na Obr. 6 – 8. Prvním krokem optimalizace bylo určení vhodného hmotnostního poměru detergentu k chlorofylům $a+b$ (DDM/chl) a posouzení vlivu gelů různého složení na kvalitu separace. Detergentem použitým pro solubilizaci byl α -DDM, který je známý svými šetrnými solubilizačními vlastnostmi (Nosek 2016 a Nosek a kol., 2017) a byl použit v hmotnostních poměrech 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 (Obr. 6 – 8). Pro separaci solubilizovaných komplexů byly poté použity tři různé gely lišící se velikostí pórů. Tato velikost byla ovlivněna změnou procentuálního zastoupení bisakrylamidu (parametr C viz kap. 1.2) ve směsi bisakrylamid + akrylamid, jehož hodnota byla 3 (Obr. 6), 6 (Obr. 7) a 10 (Obr. 8). Z Obr. 6 je dobře patrný vliv detergentu na solubilizaci thylakoidních membrán. S postupným zvyšováním hmotnostního poměru DDM/chl je zřejmý postupný nárůst solubilizačního účinku detergentu, jak je zjevné z nárůstu intenzity pásů především se superkomplexy PSII. Tento fakt pravděpodobně souvisí s postupným pronikáním detergentu do gran thylakoidních membrán, kde se superkomplexy PSII nacházejí. Podobné výsledky separace fotosyntetických komplexů izolovaných ze smrku ztepilého již byly publikovány (Kouřil a kol., 2016). V této publikaci však byl pro solubilizaci použit β -DDM, jehož solubilizační účinek je ve srovnání s α -DDM silnější. Tato záměna detergentů měla za následek nepřítomnost pásů s megakomplexy. Právě fakt, že ve výsledcích prezentovaných v experimentální části této bakalářské práce se podařilo izolovat megakomplexy svědčí o šetrnosti použité metodiky a úspěšnosti optimalizace solubilizace. Dalším faktorem svědčícím o šetrnosti použité metodiky je fakt, že s rostoucím hmotnostním poměrem DDM/chl nedocházelo k žádnému zjevnému rozpadu separovaných fotosyntetických komplexů, které by se projevilo poklesem intenzity pásů se zmíněnými komplexy. Následujícím krokem provedeným v rámci optimalizace metodiky hrCN-PAGE bylo posouzení vlivu gelů různého složení na kvalitu separace. Předpokladem tohoto kroku bylo, že zvyšující se stupeň zesíťování polyakrylamidového gelu zlepší kvalitu separace a zvýší rozlišení pásů s vysokomolekulárními komplexy. Jak je ovšem zřetelné z Obr. 6 – 8, separace solubilizovaných fotosyntetických komplexů nepřinesla očekávané výsledky. U gelů s vyšším stupněm zesíťování (Obr. 7 a 8) došlo k zachycení převážné části větších komplexů na dně jamky a tyto komplexy se tak vůbec nedostaly do separační části gelu.

Z výsledků prezentovaných na Obr. 6 – 9 tedy vyplývá, že pro optimální separaci vysokomolekulárních komplexů je výhodné použít gel s 3% množstvím bisakrylamidu (Obr. 6) a solubilizaci provádět s vyšším poměrem DDM/chl. Posledním krokem provedeným během optimalizace metodiky hrCN-PAGE byl pokus o zvýšení intenzity pásů s vysokomolekulárními komplexy. Za tímto účelem bylo do elektroforetických jamek nanášeno zvyšující se množství chlorofylu (10, 20, 30 a 40 μg) a solubilizace byla provedena při hmotnostním poměru DDM/chl 30 a 40 (Obr. 9). Jak je ovšem z výsledků patrné zvyšující se množství vzorku nanášeného do elektroforetických jamek nezpůsobilo žádný dramatický nárůst v intenzitě pásů s megakomplexy. Naopak, docházelo spíše ke splývání sousedních pásů a celkovému zhoršení kvality separace. Tento fakt byl pravděpodobně způsoben dvěma faktory. Prvním z nich byla nedostatečná kapacita gelu, která nedovolila separaci vysokého množství vzorku a druhým z nich bylo přílišné zvýšení koncentrace thylakoidních membrán v solubilizátu a detergent tak nebyl schopen dostatečně vzorek solubilizovat. Jako optimální množství vzorku nanášeného do elektroforetické jamky bylo zvoleno 10 μg chlorofylu.

Na základě provedené optimalizace byla provedena konečná separace thylakoidních membrán smrku ztepilého. Z gelu po separaci byly vyřezány pásy s vysokomolekulárními komplexy (označeny na Obr. 10 A) a po eluci komplexů bylo provedeno jejich snímkování pomocí elektronového mikroskopu a následná obrazová analýza. Výsledky snímkování jsou prezentovány na Obr. 10B-C (pás č. 1) a 10D-E (pás č. 2). Z těchto snímků je jasně patrná přítomnost megakomplexů PSII, které jsou podobné nedávno publikovaným megakomplexům PSII získaným z *Arabidopsis thaliana* (Nosek a kol., 2017). Jak však ukázaly výsledky detailnější obrazové analýzy druhého pásu z obr.10A (výsledky na Obr. 11), tento pás neobsahoval pouze megakomplexy PSII (Obr. 11A-F), ale také dosud nepozorované superkomplexy PSII (Obr. 11G-K) a také již známé superkomplexy PSII (Obr. 11L-N) pravděpodobně vzniklé rozpadem megakomplexů PSII. Při bližším posouzení zde prezentovaných megakomplexů PSII je zřejmé, že je jedná o nové megakomplexy, odlišné od dříve publikovaných (Nosek a kol., 2017). Jedná se především o odlišný způsob interakce mezi sousedními megakomplexy, který je sice také zprostředkován světlosběrnými anténami, ale došlo k vytvoření odlišných struktur. V případě nově objevených superkomplexů PSII se však jedná o zcela novou a dosud nikdy nepozorovanou skupinu komplexů. Tato nová skupina superkomplexů se od běžně známých liší množstvím

vázaných trimerních světlosběrných antén, které v některých případech (např. Obr. 11G) několikrát převyšuje obecně známé množství.

Nalezené a v této práci prezentované megakomplexy a nové superkomplexy PSII velmi pravděpodobně hrají určitou fyziologickou roli. Aby však tato role byla objasněna, bylo by nutné provést detailní strukturální analýzu všech komplexů a provést i další fyziologické studie. Ani jedno však nebylo cílem této bakalářské práce a zůstává tedy předmětem dalšího výzkumu.

Zajímavým zjištěním je také, že pás č. 2 na Obr. 10A, u kterého byla prokázána přítomnost megakomplexů a superkomplexů PSII (Obr. 11). Nevykazuje žádnou fluorescenci (viz Obr. 6B). Tento jev je způsoben námi dosud nezjištěnými procesy. Možným vysvětlením je např. atypická velikost superkomplexů PSII (viz Obr. 11G-J), které způsobují zhášení fluorescence. Tato hypotéza ovšem není potvrzena a vysvětlení tohoto jevu je předmětem dalšího studia.

8. Závěr

V této bakalářské práci jsme optimalizovali metodiku hrCN – PAGE pro účely separace vysokomolekulárních komplexů z thylakoidních membrán smrku ztepilého (*Picea abies*). Bylo použito polyakrylamidového gradientového gelu s různým obsahem bisakrylamidu a k solubilizaci použit detergent α -DDM.

Optimalizace metodiky hrCN-PAGE byla úspěšná a následné snímkování elektronovým mikroskopem, potvrdilo tvorbu megakomplexů PSII u nahosemenných rostlin (např. *Picea abies*), tak jak je tomu u rostlin krytosemenných (např. *Arabidopsis thaliana*).

Následná obrazová analýza těchto vysokomolekulárních pásů potvrdila objevení dosud nepublikovaných megakomplexů a superkomplexů PSII.

9. Seznam literatury

Alboresi A., Caffarri S., Nogue F., Bassi R., Morosinotto T. (2008) In silico and biochemical analysis of *Physcomitrella patens* photosynthetic antenna: identification of subunits which evolved upon land adaptation. *PLoS ONE* 3:e2033.

Boekema E. J., Folea M., Kouřil R. (2009) Single particle electron microscopy. *Photosynthesis Research* 102, 189-196.

Caffarri S., Kouřil R., Kereiche S., Boekema E. J., Croce R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J.* 28, 3052-3063.

Dekker J. P., Boekema E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1706, 12-39.

Jansson S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 4, 236-240.

Järvi S., Suorsa M., Paakkarinen V., Aro E. M. (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochemical Journal* 439, 207-214.

Kouřil R., Dekker J. P., Boekema, E. J. (2012) Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1817, 2-12.

Kouřil R., Nosek L., Bartoš J., Boekema E. J., Ilík P. (2016) Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plants groups – break-up of current dogma. *New Phytol.* 210, 808-814

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

Kozarová I. (2013) Strukturní analýza proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Bakalářská práce. UP Olomouc

Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.

Nelson N., Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 971-982.

- Nosek L. (2016)** Structural characterization of photosynthetic supercomplexes in plants. Disertační práce, UP Olomouc
- Nosek L., Semchonok D., Boekema E. J., Ilík P., Kouřil R. (2017)** Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *Plant J.* 89, 104 – 111.
- Pavlovič A., Stolárik T., Nosek L., Kouřil R., Ilík P. (2016)** Light-induced gradual activation of photosystem II in dark-grown Norway spruce seedlings. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1857, 799-809.
- Ruban A. V., Johnson M. P., Duffy C. D. P. (2012)** The photo protective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1817, 167-181.
- Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J. (2004)** Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1666, 105-117.
- Schägger H., Cramer W. A., Vonjagow G. (1994)** Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two – dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217, 220 – 230.
- Scheres S. H. (2012)** RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 180, 519–530.
- Svrčinová K. (2012)** Separace pigment-proteinových komplexů pomocí CN – PAGE s gradientovým gelem. Bakalářská práce, OU Ostrava
- Umena Y., Kawakami K., Shen J. R., Kamiya N. (2011)** Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 angstrom. *Nature* 473, 55-U65.
- Wei X. P., Su X. D., Cao P., Liu X. Y., Chang W. R., Li M., Zhang X. Z., Liu Z. F. (2016)** Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 angstrom resolution. *Nature* 534, 69-..
- Wittig I., Karas M., Schägger H. (2007)** High resolution clear native electrophoresis for in – gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1215 – 1225.
- Wittig I., Schägger H. (2005)** Advantages and limitations of clear – native PAGE. *Proteomics* 5, 4338 – 4346.
- Wittig I., Schägger H. (2008)** Features and applications of blue – native and clear – native electrophoresis. *Proteomics* 8, 3974 – 3990.