

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Aleš Řiháček

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv různé intenzity pěstebního světla na
množství PSI-NDH superkomplexu
produkovaného rostlinami**

Bakalářská práce

Aleš Řiháček

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Nosek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Lukáše Noska, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:

Podpis:

Souhrn

Teoretická část této bakalářské práce je zaměřena na charakterizaci NAD(P)H dehydrogenasového komplexu, který interaguje s fotosystémem I za vzniku PSI-NDH superkomplexu. Tento superkomplex hraje klíčovou roli v cyklickém elektronovém transportu a v ochraně rostlin před stresovými faktory. Práce obsahuje i popis metod využívaných při studiu tohoto superkomplexu.

Experimentální část této práce se zabývá posouzením množství a struktury PSI-NDH superkomplexu u rostlin pěstovaných při různé intenzitě světla. Experiment probíhal na ječmeni setém (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos). PSI-NDH superkomplex byl izolován metodou bezbarvé nativní elektroforézy. Kvantitativní analýza byla provedena metodou fluorometrie, imunoanalýzy a denzitometrie. Strukturní analýza byla provedena za pomoci transmisní elektronové mikroskopie. Experimenty ukázaly, že různá intenzita světla nemá u ječmene setého (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos) vliv na množství ani strukturu PSI-NDH superkomplexu.

Summary

Theoretical part of this bachelor's thesis is focused on characterization of NAD(P)H dehydrogenase-like complexes which interact with photosystem I to form the PSI-NDH supercomplex in higher plants. This supercomplex plays a crucial role in the cyclic electron transport and in the protection of plants against stress factors. Descriptions of methods which are used in study of the PSI-NDH supercomplex are summarized in this part of thesis.

Experimental part of this thesis deals with quantity and structure of the PSI-NDH supercomplex in plants grown at various light intensity. Experiment was carried on barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos). PSI-NDH supercomplex was isolated in native state by clear-native electrophoresis. Quantitative analysis of supercomplexes was performed using fluorometry measurement, immunoanalysis and densitometry analysis. Structural analysis was performed using transmission electron microscope. Experiment showed that various light intensity does not affect quantity or structure of the PSI-NDH supercomplex.

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Lukáši Noskovi, Ph.D. za odborné vedení, korekturu a čas, který mi při zpracování této práce věnoval. Poděkování patří i RNDr. Romanu Kouřilovi, Ph.D. za pomoc při fluorescenčním měření a korekturu mojí práce a rovněž celému pracovišti Katedry biofyziky UP v Olomouci za přátelské prostředí.

Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 8 |
| 2 | Současný stav řešené problematiky | 9 |
| 2.1 | Fotosyntetický aparát rostlin | 9 |
| 2.1.1 | Cyklický elektronový transport..... | 11 |
| 2.1.1.1 | Cyklický elektronový transport závislý na PGR5-PGRL1 komplexu | 12 |
| 2.1.1.2 | Cyklický elektronový transport závislý na NDH komplexu..... | 12 |
| 2.1.2 | NDH komplex | 13 |
| 2.1.2.1 | PSI-NDH superkomplex | 16 |
| 2.1.3 | Fotosystém I..... | 17 |
| 2.1.3.1 | Jádro fotosystému I..... | 18 |
| 2.1.3.2 | Světlosběrný komplex fotosystému I..... | 21 |
| 2.2 | Techniky využívané při studiu PSI-NDH superkomplexu | 22 |
| 2.2.1 | CN-PAGE..... | 22 |
| 3 | Cíl práce | 25 |
| 4 | Materiál a metodika | 26 |
| 4.1 | Rostlinný materiál..... | 26 |
| 4.2 | Izolace thylakoidních membrán..... | 26 |
| 4.3 | Stanovení koncentrace chlorofylů <i>a</i> a <i>b</i> | 27 |
| 4.4 | Solubilizace thylakoidních membrán | 28 |
| 4.5 | CN-PAGE..... | 28 |
| 4.6 | Denzitometrie | 30 |
| 4.7 | Transmisní elektronová mikroskopie | 30 |
| 4.8 | SDS-PAGE | 31 |
| 4.9 | Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace | 32 |
| 4.10 | Western blotting | 33 |
| 4.11 | Fluorometrie | 34 |
| 4.12 | Použité chemikálie..... | 35 |
| 4.13 | Použité kity..... | 36 |
| 4.14 | Použité přístroje..... | 36 |
| 5 | Výsledky | 38 |
| 5.1 | Izolace PSI-NDH superkomplexu | 38 |
| 5.2 | Kvantitativní stanovení PSI-NDH superkomplexu | 44 |
| 5.2.1 | Denzitometrie | 44 |
| 5.2.2 | Western blotting | 49 |
| 5.2.3 | Fluorescenční měření | 53 |
| 5.3 | Strukturní analýza PSI-NDH superkomplexu | 55 |
| 6 | Diskuze | 60 |
| 7 | Závěr | 64 |
| 8 | Seznam použitých zkratk | 65 |
| 9 | Literatura..... | 67 |

1 Úvod

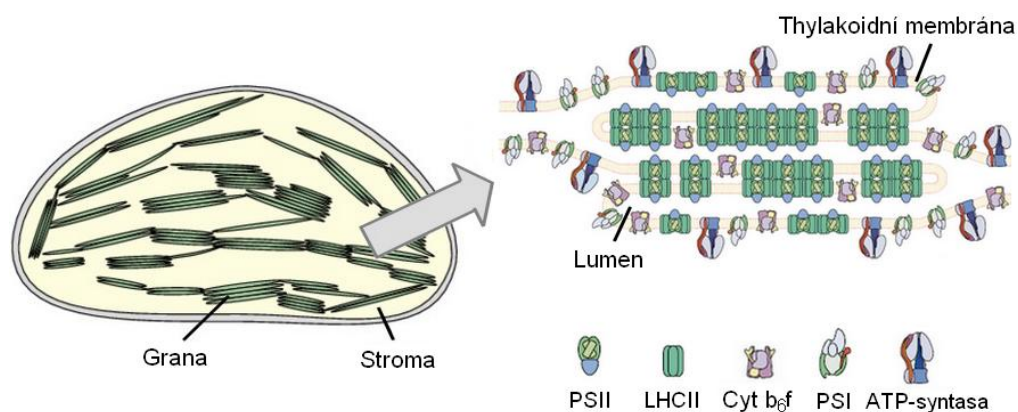
Rostliny musí během svého růstu čelit řadě stresujících faktorů, kterými jsou například sucho, nízké nebo naopak vysoké teploty či příliš vysoká ozáření. U rostlin se proto vyvinuly mechanismy, které je před účinky stresových faktorů chrání. Jedním z mechanismů je cyklický elektronový transport. Jsou známy dvě hlavní cesty cyklického elektronového transportu. První z nich je závislá na PROTON GRADIENT REGULATION5 a PGR5-LIKE1 komplexu, druhá cesta je zprostředkována NAD(P)H dehydrogenasovým komplexem. Obě tyto cesty nejsou doposud detailně prostudovány. Abychom byli schopni pochopit jejich přesný mechanismus, je třeba znát strukturu jednotlivých fotosyntetických komplexů, které tyto transportní dráhy zprostředkovávají. K jejich studiu se používá řada metod, umožňujících jejich separaci a strukturní analýzu. Významnou separační metodou je bezbarvá nativní elektroforéza, která umožňuje separovat fotosyntetické komplexy v nativní formě, díky čemuž lze následně pomocí elektronové mikroskopie zkoumat jejich neporušenou strukturu. Důležitým parametrem je i posouzení změn v množství těchto komplexů, produkovaných rostlinami při zapojení cyklických elektronových transportních drah. K posouzení kvantitativních změn pak slouží metody imunoanalýzy, fluorescenčního měření či denzitometrické analýzy. Zmíněné metody byly využity i v experimentální části této bakalářské práce, která byla zaměřena na vliv různé intenzity pěstebního světla na množství PSI-NDH superkomplexu, jenž hraje důležitou roli v cyklickém elektronovém transportu, zprostředkovanému přes již zmíněný NAD(P)H dehydrogenasový komplex. Podobná studie nebyla dosud publikována a mohla by tak o něco více objasnit fungování této transportní dráhy.

2 Současný stav řešené problematiky

Fotosyntéza je významný fyziologický proces, odehrávající se ve fotoautotrofních organismech, jenž přispívá k udržení života na Zemi. Je to jediný biologický děj, při kterém se uvolňuje kyslík, a také jediný děj využívající energii pocházející mimo Zemi, přesněji energii slunečního záření. Tuto energii využívá k syntéze energeticky bohatých molekul, především NAD(P)H a ATP. Ty jsou následně využívány v různých rostlinných syntetických procesech. Fotosyntéza, ať již přímo či nepřímo, zajišťuje výživu pro téměř všechny živé organismy.

2.1 Fotosyntetický aparát rostlin

Ve vyšších rostlinách probíhá fotosyntéza ve specializovaných organelách zvaných chloroplasty. Velikost chloroplastů je okolo 5 μm a jejich množství v buňce listu je variabilní. V závislosti na velikosti buňky, jejím typu, druhu a růstových podmínkách se jejich počet pohybuje od 1 do 100 (Dey *et* Harborne, 1997). Chloroplasty jsou tvořeny vnější dvojitou membránou, která obklopuje vnitřní prostor zvaný stroma. Stroma je vyplněno vodným roztokem bohatým na enzymy a nachází se v něm thylakoidy, systém membránových váčků diskovitého tvaru. Thylakoidy mohou být organizovány do grana, což jsou struktury vzniklé stěsněním jednotlivých váčků k sobě. Grana jsou navzájem propojena stromálními thylakoidy. Vnitřní prostor thylakoidů se nazývá lumen (Obr. 1) (Buchanan *et al.*, 2015).

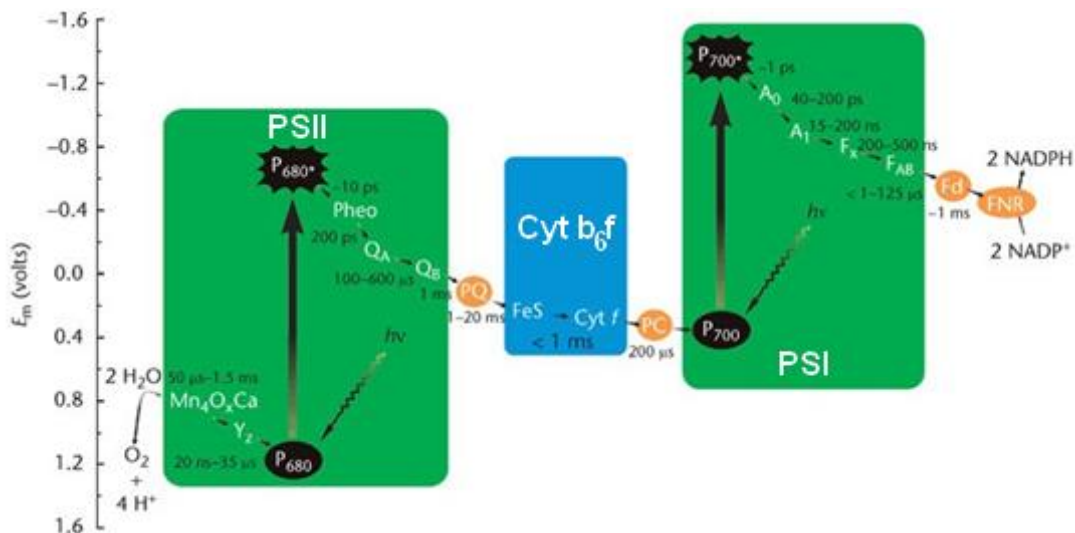


Obrázek 1: Struktura chloroplastu s detailním vyobrazením thylakoidní membrány obsahující základní fotosyntetické komponenty. Fotosystém I (PSI) a ATP-syntasa jsou lokalizovány na okraji grana a ve stromálních thylakoidech, zatímco fotosystém II (PSII) je spolu se světlosběrnými komplexy (LHCII) lokalizován uvnitř grana. Cytochrom b₆f (Cyt b₆f) je rovnoměrně rozprostřen napříč celou membránou. Převzato a upraveno z Allen *et* Forsberg, 2001.

Fotosyntetické reakce probíhající v chloroplastech mohou být rozděleny na dva typy. První typ zahrnuje reakce primární (světelné) fáze fotosyntézy, ve které dochází k přenosu elektronů, syntéze ATP a NADPH a k produkci kyslíku. Tyto reakce se odehrávají v membránách thylakoidů. Druhým typem jsou sekundární (temnostní) reakce fotosyntézy probíhající ve stromatu chloroplastu. Tyto reakce spotřebovávají redukční sílu NADPH a energii ATP syntetizované ve světelné fázi fotosyntézy k fixaci CO₂ a k tvorbě cukrů (Dey *et Harborne*, 1997).

Hlavními proteinovými komponentami fotosyntetického aparátu primární fáze fotosyntézy jsou fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII) spolu se světlosběrnými komplexy (LHCI a LHCII), Cytochrom *b₆f* komplex (Cyt *b₆f*) a ATP-synthasa, znázorněné na Obr. 1. Mezi další významné složky fotosyntetického aparátu lze zařadit i proteinové elektronové přenašeče plastocyanin (PC) a ferredoxin (Fd) a navíc také neproteinový elektronový přenašeč plastochinon (PQ) (Buchanan *et al.*, 2015; Procházka, 1998).

Světelná fáze fotosyntézy začíná ve PSII, kde dochází ke světlem indukované oxidaci vody. Elektrony získané oxidací vody jsou předány na feofytin, primární akceptor elektronů PSII a z něj jsou dále předány na Q_A, vázaný jednoelektronový přenašeč. Z Q_A poté elektrony putují na Q_B, vázaný dvouelektronový přenašeč, který po přijetí dvou elektronů od Q_A přijme ze stromatu dva protony (H⁺), odpojí se od PSII a putuje k Cyt *b₆f* komplexu. V Cyt *b₆f* komplexu poté dochází k přenosu jednoho z elektronů redukovaného PQH₂ na PC, který elektron přenesení k PSI a také k přenosu protonů do lumenu. Druhý z elektronů je recyklován tzv. Q-cyklem zpět na PQ, který zabezpečuje přenos dalších protonů do lumenu, které následně využívá ATP synthasa k produkci ATP (Procházka, 1998; Rochaix, 2011). Elektron přenesený PC do PSI putuje přes sérii elektronových přenašečů na Fd, který pomocí enzymu ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktasy (FNR) redukuje NADP⁺ na NADPH. Výše popsaný elektronový transport je známý jako lineární elektronový transport (LET) a lze jej vyjádřit pomocí tzv. Z-schématu (Obr. 2). Existují však i jiné, alternativní dráhy fotosyntetického přenosu elektronů, z nichž nejvýznamnější je cyklický elektronový transport (CET).



Obrázek 2: Z-schéma znázorňující cestu elektronů v lineárním elektronovém transportu. Pozice každého elektronového přenašeče na vertikální ose odráží jeho standardní redukční potenciál (E_m). Po absorpci fotonu fotosystémem II (PSII) se elektron chlorofylu reakčního centra P680 (podle absorpčního maxima při 680 nm) vymrští na vyšší energetickou hladinu. Prostřednictvím řetězce, skládajícího se z feofytinu, plastochinonu (PQ), plastocyaninu (PC) a cytochromu b_6f (Cyt b_6f), elektron putuje k fotosystému I (PSI). Během tohoto pochodu se elektrony postupně dostávají na nižší energetickou hladinu, až doputují k reakčnímu centru PSI, označovanému jako P700 (dle absorpčního maxima při 700 nm). Odtud jsou světlem vybuzené elektrony přeneseny na ferredoxin (Fd) a z něj pak pomocí ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktasy (FNR) redukují NAD(P)⁺ na NAD(P)H. Převzato a upraveno z Govindjee *et al.*, 2010.

2.1.1 Cyklický elektronový transport

Na rozdíl od LET, při CET dochází k cyklickému přenosu elektronů pouze mezi PSI a Cyt b_6f komplexem. Elektrony z NAD(P)H či Fd jsou recyklovány zpět na PQ, čímž CET přispívá jen k tvorbě transmembránového protonového gradientu, aniž by docházelo k produkci NAD(P)H (Shikanai, 2007). CET tak hraje důležitou roli ve vyrovnávání poměru mezi produkovaným ATP a NAD(P)H a také v ochraně obou fotosystémů před poškozením způsobeným nadměrnou redukcí stromatu (Takahashi *et al.* 2011; Miyake, 2010; Shikanai, 2007). Ve vyšších rostlinách využívá CET dvě hlavní cesty. První z nich je závislá na PROTON GRADIENT REGULATION5 (PGR5) a PGR5-LIKE1 (PGRL1) komplexu (Munekage *et al.*, 2002; DalCorso *et al.*, 2008), druhá cesta CET je zprostředkována NAD(P)H dehydrogenasovým komplexem (NDH) (Munekage *et al.*; 2004 Shikanai, 2007).

2.1.1.1 Cyklický elektronový transport závislý na PGR5-PGRL1 komplexu

PGR5 protein se vyskytuje volně ve stromatu, kdežto PGRL1 protein se nachází v thylakoidní membráně chloroplastů. Aby mohla dráha CET závislá na PGR5-PGRL1 proběhnout, je nutná interakce obou proteinů (DalCorso *et al.*, 2008; Johnson, 2011). PGR5-PGRL1 komplex poté funguje jako ferredoxin-chinon oxidoreduktasa (FQR), která oxiduje Fd a elektrony předává na PQ (Hertle *et al.*, 2013) a jeho hlavní rolí je udržení správného transmembránového protonového gradientu. PGRL1 protein pravděpodobně interaguje též s PSI, ferredoxin-NADP⁺ reduktasou (FNR) a Cyt *b₆f* komplexem (DalCorso *et al.*, 2008).

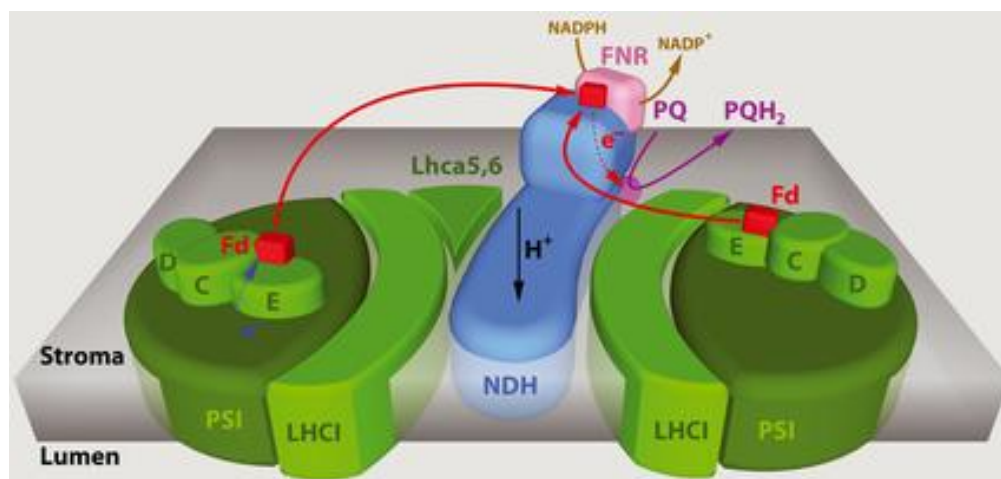
2.1.1.2 Cyklický elektronový transport závislý na NDH komplexu

NDH-dependentní CET, jež je považována za vedlejší dráhu CET, hraje důležitou roli v ochraně rostlin před oxidativním stresem způsobeným nadměrnou redukcí stromatu (Peng *et al.*, 2011). Rovněž se ukazuje, že je tato dráha důležitá pro udržení elektronového transportu a tím i pro asimilaci CO₂ u rostlin pěstovaných při nízkých intenzitách světla (Yamori *et al.*, 2015).

Existence chloroplastového NDH komplexu byla poprvé předpovězena u tabáku a jatrovky po osekvenování jejich genomu (Shinozaki *et al.*, 1986; Ohyama *et al.*, 1986) a jeho účast v CET byla poprvé experimentálně prokázána u sinic – evolučních předchůdců chloroplastů (Mi *et al.*, 1994, 1995). Předpokládá se, že chloroplastový NDH komplex je přítomný u všech kvetoucích rostlin (Wakasugi *et al.*, 1994), ovšem vyskytují se i výjimky. U dvou podskupin nahosemenných rostlin, jehličnanů (Pinopsida) a liánovcotvarých (Gnetales), došlo k evolučnímu vymizení genů pro NDH komplex (Braukmann *et al.*, 2009).

Chloroplastový NDH je multipodjednotkovým komplexem, nacházejícím se ve stromálních thylakoidech (Shikanai, 2007). NDH komplex odebírá elektrony z Fd na PQ, který je následně transportuje k PSI přes Cyt *b₆f* komplex. NDH komplex tak přispívá k tvorbě protonového gradientu napříč thylakoidní membránou (Okegawa *et al.*, 2008). Byl navržen i alternativní funkční model NDH komplexu (Kouřil *et al.*, 2014), podle něhož může být Fd redukován NAD(P)H přes reverzní reakci FNR, která je připojena k NDH komplexu. Fd poté redukuje molekulu PQ přes NDH (Obr. 3). Oba zmíněné funkční modely jsou v souladu s dřívějšími zjištěními (Yamamotoy *et al.*, 2011), podle nichž NDH komplex přijímá

elektrony spíše z Fd než z NAD(P)H, což naznačuje, že chloroplastový NDH komplex není dehydrogenasou, ale spíše Fd-dependentní PQ reduktasou.



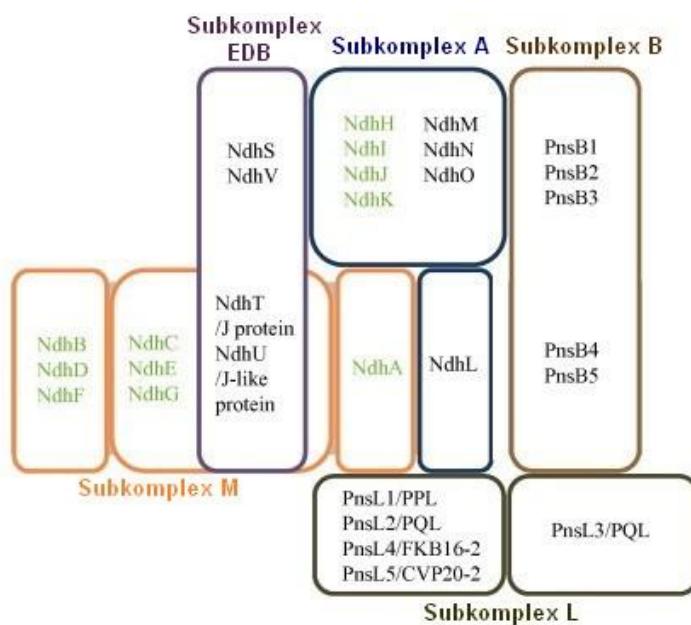
Obrázek 3: Alternativní funkční model NDH komplexu strukturně vycházející z tzv. PSI-NDH superkomplexu (viz kap. 3.1.2.1.) nacházejícího se v thylakoidní membráně. Ferredoxin (Fd) se váže na hydrofilní rameno NDH komplexu (kontinuální červená šipka) po své redukci na akceptorové straně fotosystému I (PSI) (tečkovaná modrá šipka). Poté Fd redukuje molekulu plastochinonu (PQ) přes NDH (tečkovaná červená šipka). Cyklická dráha je dokončena přenosem elektronu z molekuly PQ zpět k PSI komplexu přes cytochrom b_6f komplex (Cyt b_{6f}) a plastocyanin (PC). Při alternativní cestě je Fd redukován NAD(P)H přes reverzní reakci ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktasy (FNR). Převzato z Kouřil *et al.*, 2014.

2.1.2 NDH komplex

NDH komplex se skládá z mnoha podjednotek kódovaných chloroplastovými i jadernými geny. Tyto podjednotky tvoří pět subkomplexů: A, B, membránový, lumenální a tzv. EDB (vázájící donory elektronů) subkomplex (Peng *et al.*, 2011; Shikanai, 2016). Subkomplex A je tvořen podjednotkami NdhH-NdhO. NdhH-NdhK podjednotky tohoto subkomplexu jsou kódovány chloroplastovými geny, zatímco zbylé podjednotky subkomplexu jsou kódovány jadernými geny (Peng *et al.*, 2009). Subkomplex B je tvořen podjednotkami NDF1, NDF2, NDF4, NDF 6 a NDH18, též označované jako Pnsb1, 2, 3, 4 a 5, kódovány jaderným genomem (Ifuku *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2011). Membránový subkomplex, tvořený podjednotkami NdhA-NdhG, je kódován chloroplastovými geny (Ifuku *et al.*, 2011). Lumenální subkomplex obsahuje pět jádrem kódovaných podjednotek PPL2, PQL1 a 2, FKBP16-2 a CYP20-2, které jsou označované rovněž jako PnsL1 – PnsL5

(Ishihara *et al.*, 2007; Shikanai *et al.*, 2016; Suorsa *et al.*, 2010; Yabuta *et al.*, 2010). EDB subkomplex je tvořen podjednotkami NdhS-NdhV (Yamamoto *et al.*, 2011; Shikanai 2016).

Subkomplex A spolu s membránovým subkomplexem tvoří kostru celého NDH komplexu (Battchikova *et al.*, 2011). Subkomplex B tvoří hydrofilní rameno zasahující do stromatu a interaguje s membránovým komplexem (Ishikawa *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009). Subkomplex B je důležitý pro stabilizaci celého NDH komplexu, protože absence některé z podjednotek subkomplexu B vede k jeho destabilizaci (Peng *et al.*, 2011). Lumenální subkomplex se rovněž podílí na stabilizaci NDH komplexu a pravděpodobně se také podílí na vazbě Lhca5 a Lhca6, které zprostředkovávají vazbu PSI (Shikanai, 2016; Peng *et al.*, 2009). Subkomplex EDB interaguje se subkomplexem A a vytváří vazebné místo pro Fd (Shikanai, 2016; Yamamoto *et al.*, 2011). Schematický model NDH komplexu je znázorněn na Obr. 4 a informace o podjednotkovém složení v Tab. 1.



Obrázek 4: Schematický model NDH komplexu *Arabidopsis thaliana*, se znázorněnými subkomplexy. Barevně vyznačené subkomplexy nepředstavují aktuální pozici ve 3D struktuře NDH komplexu. Podjednotky kódované chloroplastovými geny jsou znázorněny zeleným písmem. Převzato a upraveno z Shikanai, 2016.

Tabulka 1: Podjednotkové složení NDH komplexu vyšších rostlin. Převzato a upraveno z Shikanai, 2016.

| Subkomplex | Podjednotka | Jiný název | Lokalizace genu |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|
| Membránový | | | |
| | NdhA | - | Chloroplast |
| | NdhB | - | Chloroplast |
| | NdhC | - | Chloroplast |
| | NdhD | - | Chloroplast |
| | NdhE | - | Chloroplast |
| | NdhF | - | Chloroplast |
| | NdhG | - | Chloroplast |
| A | | | |
| | NdhH | - | Chloroplast |
| | NdhI | - | Chloroplast |
| | NdhJ | - | Chloroplast |
| | NdhK | - | Chloroplast |
| | NdhL | CRR2 | Jádro |
| | NdhM | - | Jádro |
| | NdhN | - | Jádro |
| | NdhO | - | Jádro |
| Vázající donory elektronů | | | |
| | NdhS | CRR31 | Jádro |
| | NdhT | CRRJ | Jádro |
| | NdhU | CRRL | Jádro |
| | NdhV | - | Jádro |
| B | | | |
| | PnsB1 | NDH48/NDF1 | Jádro |
| | PnsB2 | NDH45/NDF2 | Jádro |
| | PnsB3 | NDF4 | Jádro |
| | PnsB4 | NDF6 | Jádro |
| | PnsB5 | NDH18 | Jádro |
| Lumenální | | | |
| | PnsL1 | PPL2 | Jádro |
| | PnsL2 | PQL | Jádro |
| | PnsL3 | PQL | Jádro |
| | PnsL4 | FKBP16-2 | Jádro |
| | PnsL5 | CYP20-2 | Jádro |

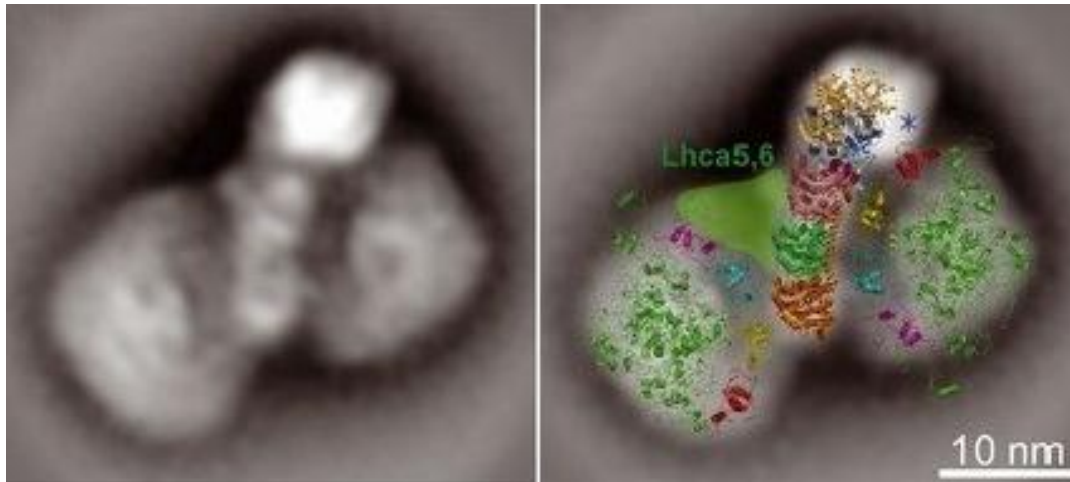
2.1.2.1 PSI-NDH superkomplex

Jednou z vlastností chloroplastového NDH komplexu je jeho schopnost interagovat s PSI za tvorby PSI-NDH superkomplexu (Obr. 5). Jeden NDH komplex interaguje se dvěma kopiemi PSI, které jsou na NDH vázány přes své světlosběrné antény. Molekulová hmotnost tohoto superkomplexu je větší než 1 000 kDa a je možné ho separovat od ostatních thylakoidních membránových komplexů nativními elektroforetickými technikami (Peng *et al.*, 2008; Kouřil *et al.*, 2014). K tvorbě PSI-NDH superkomplexu je nutná vazba podjednotek Lhca5 a Lhca6, jak bylo ukázáno analýzou mutantů defektních v expresi *lhca5* a *lhca6* genů (Peng *et al.*, 2009).

Tvorba PSI-NDH superkomplexu je navíc nutná k udržení stability NDH komplexu (Peng *et Shikanai*, 2011), především pak při působení různých stresových faktorů, mezi něž patří i proměnlivá intenzita světla. Rostliny jsou vystaveny v průběhu dne různým světelným podmínkám v rozmezí několika sekund, minut či hodin, a to především z důvodu pohybu listů způsobeným větrem a proměnlivé oblačnosti. Pokud intenzita světla přesáhne schopnost listů využívat světelnou energii ve fotosyntéze, přebytek světelné energie může vést k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), jakým je H_2O_2 , a eventuálně k fotoinhibici (Pearcy, 1990). Vzniklý H_2O_2 spouští signální dráhu, která vede k expresi genů kódujících podjednotky NDH komplexu, účastnícího se alternativní CET (Casano *et al.*, 2001).

Vlivem různé intenzity pěstebního světla na roli PSI-NDH superkomplexu vyšších rostlin se ve své práci zabýval Yamori *et al.* (2015). Ve svém experimentu autoři použili mutanty rostlin rýže (*Oryza sativa*) defektní na podjednotku NdhI subkomplexu A, nutnou pro vytvoření NDH komplexu, a standardní srovnávací rostliny. Tato studie ukázala, že u mutantů defektních na NdhI podjednotku NDH komplexu nevedla vysoká intenzita pěstebního světla ($800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) k zesílení fotoinhibice, změně fotosyntetických parametrů ani růstu rostlin ve srovnání se standardní kontrolní rostlinou. Nízká intenzita světla ($200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) naopak vedla u mutantů defektních na NdhI podjednotku NDH komplexu ke snížení rychlosti toku elektronů přes PSI, což mělo za následek i snížení množství rostlinné biomasy.

Problematika vlivu různé intenzity světla na samotný PSI-NDH superkomplex není však doposud detailně prozkoumaná. Experimentální část této bakalářské práce je proto zaměřena na charakterizaci vlivu pěstebního světla na množství a také strukturu tohoto superkomplexu.

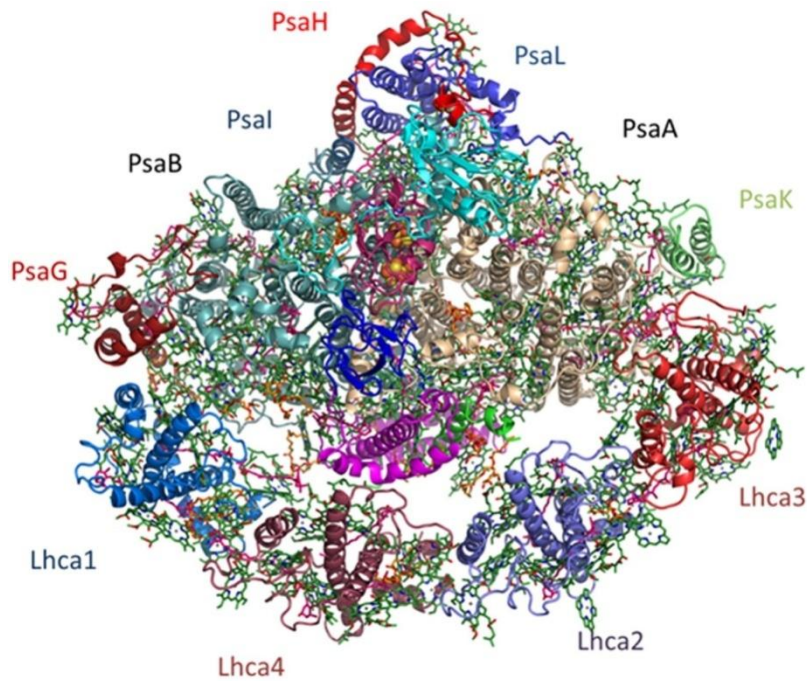


Obrázek 5: Snímky znázorňující strukturu PSI-NDH superkomplexu pořízené elektronovou mikroskopií. Na levém levém snímku lze pozorovat NDH komplex s navázanými dvěma kopiemi PSI. Na pravém snímku je znázorněna krystalová struktura PSI-NDH superkomplexu, získaná na základě znalostí struktury fotosystému I (PSI) a mitochondriálního respiračního komplexu I, analogu chloroplastového NDH (Baradaran *et al.*, 2013). PSI je vyznačen zeleně, světlosběrné proteiny (Lhca) následovně: Lhca1 červeně, Lhca4 žlutě, Lhca2 azurově a Lhca3 fialově. Podjednotky membránové části respiračního komplexu I jsou znázorněny oranžovou (ndhF), zelenou (NdhD), lososovou (NdhB), růžovou (NdhE), světle azurovou (NdhG) a modrou barvou (NdhA a NdhC). Modrá hvězdička označuje nepřirazenou oblast na hydrofilním rameni. Převzato a upraveno z Kouřil *et al.*, 2014.

2.1.3 Fotosystém I

Fotosystém I je multipodjednotkový superkomplex nacházející se ve stromálních thylakoidech. Funguje jako světlem indukovaná ferredoxin-reduktasa a je znám jako jeden z nejefektivnějších světelných převodníků v přírodě s kvantovou účinností blízkou 1 (Nelson, 2009). První PSI vyšších rostlin byl izolován a popsán již v roce 1966 (Anderson *et Boardman*, 1966), jeho podjednotkové složení pak bylo poprvé popsáno v roce 1975 (Bengis *et Nelson*, 1975).

PSI je složen ze dvou základních částí: jaderného komplexu a světlosběrného komplexu (LHCI). V jaderném komplexu PSI probíhá převážná část fotochemických reakcí, které využívají energii světelných kvant k přenosu elektronu z PC na Fd. LHCI slouží jako anténní systém, který pohlcuje světelná kvanta, která následně předává jadernému komplexu PSI (Amunts *et Nelson*, 2008; Jensen *et al.*, 2007). Struktura rostlinného PSI je znázorněna na Obr. 6.



Obrázek 6: Struktura a organizace podjednotek rostlinného PSI-LHCI superkomplexu. Pohled je ze stromální strany membrány. PsaF a PsaJ podjednotky jsou znázorněny purpurovou a zelenou barvou. Podjednotky PsaC, PsaD a PsaE, lokalizované uprostřed komplexu, jsou znázorněny tyrkysovou, růžovou a modrou barvou. Dva Fe-S klastry podjednotky PsaC lze rozlišit ve formě žlutých a oranžových klastrů uprostřed komplexu. Převzato a upraveno z Mazor *et al.*, 2015.

2.1.3.1 Jádru fotosystému I

Rentgenová strukturní analýza krystalů PSI odhalila, že jádro PSI vyšších rostlin obsahuje 12 stabilních podjednotek označených jako PsaA-PsaL. Dále jádro PSI obsahuje podjednotky PsaN-PsaP a podjednotku PsaR, které jsou však k jádru PSI vázány pouze slabě a v závislosti na různých podmínkách izolace a krystalizace PSI nebyly zatím v krystalech identifikovány. Přesto jsou považovány za běžné součásti PSI (Ben-Shem *et al.*, 2003; Amunts *et al.*, 2007, 2010; Mazor *et al.*, 2015). Střed jádra PSI je tvořen heterodimerem složeným z podjednotek PsaA (84 kDa) a PsaB (83 kDa). Každá z podjednotek je tvořena 11 transmembránovými helixy a dohromady se podílí na vazbě chlorofylového dimeru P₇₀₀ a primárních elektronových akceptorů (A₀, A₁). Je zajímavé, že tento centrální heterodimer se vyvinul z homodimerního předka (Büttner *et al.*, 1992; Liebl *et al.*, 1993; Tittgen *et al.*, 1986). Podjednotka PsaC (9 kDa), spolu s podjednotkami PsaD (18 kDa) a PsaE (10 kDa), zprostředkovává vazbu Fd (Hayashida *et al.*, 1987; Hoj *et al.*, 1987). Podjednotka PsaF (17 kDa) zajišťuje vazbu PC (Farah *et al.*, 1995) a je nepostradatelná pro přechod excitační energie z LHCI do jádra PSI (Haldrup *et al.*, 2000). PsaG (11 kDa) a PsaK (9 kDa)

podjednotky umožňují vazbu PSI s LHCI (Ben-Shem *et al.*, 2003). PsaH (10 kDa), PsaL (18 kDa) a PsaO (10 kDa), a pravděpodobně také PsaP (14 kDa) a PsaI (4 kDa) podjednotky se podílí na interakci PSI s fosforylovaným světlosběrným komplexem fotosystému II (LHCII) během tzv. stavových přechodů (Lunde *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2004; Zhang *et Scheller*, 2004). Podjednotka PsaL také hraje důležitou roli v trimerizaci PSI u sinic (Chitnis *et Chitnis*, 1993; Jordan *et al.*, 2003) a její funkce je u vyšších rostlin eliminována podjednotkou PsaH (Ben-Shem *et al.*, 2003). Podjednotky PsaN (10 kDa) a PsaJ (5 kDa) zajišťují vazbu PC (Fischer *et al.*, 1994; Haldrup *et al.*, 1999). Informace o podjednotkovém složení jádra PSI jsou shrnuty v Tab. 2.

Tabulka 2: Podjednotkové složení jaderného komplexu rostlinného PSI. Převzato a upraveno z Buchanan *et al.*, 2015.

| Protein | Gen | Lokalizace genu | Mol. Hmotnost (kDa) | Funkce |
|-------------------------------|-------------|------------------------|----------------------------|---|
| Hydrofobní podjednotky | | | | |
| PsaA | <i>psaA</i> | chloroplast | 83 | světlosběrná, transport elektronů, vazba P700, chlorofylu <i>a</i> , doplňkových chlorofylů a fylochinonu |
| PsaB | <i>psaB</i> | | 82 | |
| PsaF | <i>psaF</i> | | 17 | vazba PC |
| PsaG | <i>psaG</i> | jádro | 11 | vazba LHCI |
| PsaH | <i>psaH</i> | jádro | 10 | vazba LHCII |
| PsaI | <i>psaI</i> | chloroplast | 4 | vazba LHCII |
| PsaJ | <i>psaJ</i> | jádro | 5 | vazba s PC |
| PsaK | <i>psaK</i> | jádro | 9 | vazba LHCI |
| PsaL | <i>psaL</i> | jádro | 18 | vazba LHCII |
| PsaO | <i>psaO</i> | jádro | 10 | vazba LHCII |
| PsaP | <i>psaP</i> | jádro | 14 | vazba LHCII |
| Hydrofilní podjednotky | | | | |
| PsaC | <i>psaC</i> | chloroplast | 9 | vazba Fd |
| PsaD | <i>psaD</i> | jádro | 18 | vazba Fd |
| PsaE | <i>psaE</i> | jádro | 10 | vazba Fd |
| PsaN | <i>psaN</i> | jádro | 10 | vazba PC |

2.1.3.2 Světlosběrný komplex fotosystému I

Světlosběrný komplex PSI vyšších rostlin se skládá z proteinů Lhca1-6, které jsou kódovány jaderným genomem (Jansson *et al.*, 1999). Proteiny Lhca1-4 vytváří komplex srpkovitého tvaru na PsaF/PsaJ straně jádra PSI a jejich hlavní funkcí je absorpce světelných kvant a jejich transport do jádra PSI (Boekema *et al.*, 2001; Amunts *et al.*, 2007; Amunts *et al.*, 2010; Ben-Shem *et al.*, 2003). Lhca1-4 proteiny tvoří funkční dimery LHCI-730 (složený z Lhca1 a Lhca4 proteinů) a LHCI-680 (složený z Lhca2 a Lhca3 proteinů) (Croce *et al.*, 2002; Ihalainen *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 1997; Knoetzel *et al.*, 1992). Lhca1 (22 kDa) protein interaguje s jádrem PSI přes PsaG a PsaB podjednotky, zatímco Lhca4 (22 kDa) se váže přes podjednotku PsaF. Protein Lhca2 (23 kDa) je asociován s jádrem PSI interakcí s podjednotkami PsaA a PsaJ, kdežto Lhca3 (25 kDa) se váže přes podjednotky PsaA a PsaK k RC PSI (Amunts *et al.*, 2010; Ben-Shem 2003; Mazor *et al.*, 2015). Vazba Lhca1-4 proteinů k jádru PSI je vysoce specifická, jak bylo dokázáno analýzou mutantů postrádajících jednotlivé Lhca 1-4 podjednotky (Wientjes *et al.*, 2009).

Kromě Lhca1-4 proteinů byly u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) identifikovány také proteiny Lhca5 (24 kDa) a Lhca6 (25 kDa) (Jansson, 1999). Tyto proteiny jsou exprimovány pouze na velmi nízké úrovni, tzn. nestechiometricky vzhledem k ostatním Lhca proteinům (Klimmek *et al.*, 2006). Lhca5 a Lhca6 proteiny zprostředkovávají vazbu PSI k NDH komplexu za tvorby PSI-NDH superkomplexu, který zároveň stabilizují (Peng *et al.*, 2009). Informace o podjednotkovém složení světlosběrného komplexu PSI jsou shrnuty v Tab. 3.

Tabulka 3: Podjednotkové složení světlosběrného komplexu LHCI PSI. Převzato a upraveno z Jensen *et al.*, 2007 a Buchanan *et al.*, 2015.

| Protein | Počet chlorofylů | Gen | Molekulová hmotnost (kDa) | Funkce |
|---------|------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|
| Lhca3 | 13 | <i>lhca3</i> | 25 | tvorba komplexu LHCI-680 |
| Lhca2 | 13 | <i>lhca2</i> | 23 | tvorba komplexu LHCI-680 |
| Lhca1 | 13 | <i>lhca1</i> | 22 | tvorba komplexu LHCI-730 |
| Lhca4 | 13 | <i>lhca4</i> | 22 | tvorba komplexu LHCI-730 |
| Lhca5 | 13 | <i>lhca5</i> | 24 | vazba PSI k NDH komplexu |
| Lhca6 | - | <i>lhca6</i> | 25 | vazba PSI k NDH komplexu |

2.2 Techniky využívané při studiu PSI-NDH superkomplexu

Výrazným rysem tylakoidních membrán je velká rozmanitost ve složení jejich proteinových komplexů (Järvi *et al.*, 2011). Existuje řada technik, díky kterým je možné tyto komplexy strukturně detailně studovat (např. transmisní elektronová mikroskopie). Abychom ovšem mohli tyto komplexy blíže studovat a charakterizovat, je potřeba nejprve provést jejich separaci a získat tyto proteinové komplexy v čisté a nativní formě. V současné době se k separaci využívají dvě hlavní nativní separační techniky, kterými jsou ultracentrifugace v sacharosovém gradientu (Caffarri *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2016) a elektroforetická technika zvaná CN-PAGE („clear native polyacrylamide gel electrophoresis“) (Nosek *et al.*, 2017; Kouřil *et al.*, 2016, 2014; Pavlovič *et al.*, 2016; Järvi *et al.*, 2011). Z obou zmíněných technik právě CN-PAGE představuje rychlejší, a co se týče vybavení, méně náročný, přesto však velmi účinný nástroj vhodný k separaci fotosyntetických proteinových komplexů (Nosek, 2016).

2.2.1 CN-PAGE

CN-PAGE patří mezi elektroforetické techniky, které obecně slouží k separaci nabitých částic v elektrickém poli na základě jejich velikosti a náboje. CN-PAGE však umožňuje separovat proteiny a proteinové komplexy za současného zachování jejich nativního a nedenedurovaného stavu, především pak u křehkých fotosyntetických komplexů. Stabilita těchto komplexů je během separace zajištěna použitím jemných detergentů, které nemají negativní dopad na jejich integritu. Separace probíhá v polyakrylamidovém gelu, který je tvořen sítí polymerních molekul, jimiž separované částice prochází různou rychlostí. Migrující komplexy se tak rozdělí do pásů, jež odpovídají různé velikosti proteinů či proteinových komplexů.

CN-PAGE vychází ze starší techniky, známé jako BN-PAGE (blue native polyacrylamide gel electrophoresis) (Schägger *et al.*, 1994; Schägger *et al.*, 1991). BN-PAGE pro nabíjení separovaných částic nezbytné pro jejich pohyb v elektrickém poli používá modré barvivo Coomassie brilliant blue, které však může narušovat některé velmi slabé protein-proteinové interakce (Wittig *et al.*, 2005). Byla proto hledána alternativa k tomuto barvivu, které bylo nahrazeno jemným bezbarvým aniontovým detergentem deoxycholátem sodným. Substituce Coomassie za deoxycholát tak vedla ke zrodu CN-PAGE (Wittig *et al.*, 2005; Wittig *et al.*, 2007).

Před samotným provedením CN-PAGE je potřeba provést solubilizaci biologických membrán. Cílem solubilizace je získat z těchto membrán proteiny a proteinové komplexy (Helenius *et* Simons, 1975). Jako solubilizační činidla se používají detergenty, což jsou amfipatické molekuly, sestávající na jedné straně z tzv. polární hlavičky a na druhé straně z hydrofobního řetězce. Detergenty mají schopnost tvořit micely, což jsou struktury podobné přirozeně se vyskytující lipidové dvouvrstvě, umožňující solubilizaci membránových proteinů (Seddon *et al.*, 2004). Jelikož má každý detergent své specifické vlastnosti, volba detergentu vždy závisí na typu separace. Pokud vykazuje vhodné solubilizační vlastnosti u jednoho typu separace, nemusí tomu tak být při jiném typu separace. Proto je důležité experimentálně ověřit, který detergent je pro potřebu dané separace nejvhodnější. Kromě volby detergentu je také důležitá jeho koncentrace, kterou je též nutné experimentálně ověřit. Obecným pravidlem je, že čím vyšší koncentrace detergentu se použije, tím vyšší solubilizace je dosaženo (Wittig *et al.*, 2007; Nosek, 2012). Nejběžněji používanými detergenty jsou tridecylmaltosid, digitonin, Triton X-100 a dodecylmaltosid (Järvi *et al.*, 2011). Právě dodecylmaltosid, jenž se řadí mezi tzv. neiontové detergenty, patří při solubilizaci membránových proteinových komplexů k nejvíce používanému detergentu (Seddon *et al.*, 2004; Caffarri *et al.*, 2009; Nosek *et al.*, 2017; Kouřil *et al.* 2014). Rozlišujeme dvě izoformy dodecylmaltosidu: n-dodecyl- α -D-maltosid (α -DDM) a n-dodecyl- β -D-maltosid (β -DDM) (Dupuy *et al.*, 1997). Pro izolaci PSI-NDH superkomplexu, který je hlavním předmětem této práce, se jeví jako nejvhodnější právě izoforma β -DDM (Peng *et al.*, 2008, 2009; Kouřil *et al.*, 2014; Nosek 2016).

Pro separaci proteinů a proteinových komplexů se při tomto typu elektroforézy používají polyakrylamidové gely, což jsou chemicky zesítené gely vytvořené polymerací akrylamidu se zesíťovacím činidlem, nejčastěji N,N'-metylenbisakrylamidem. Jedná se o volnou radikálovou polymeraci, při které se jako iniciátor používá peroxodisíran amonný a funkci katalyzátoru při této reakci zajišťuje N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). Při přípravě gelů pro CN-PAGE se využívá koncentračního rozsahu roztoku polyakrylamidu od 4 do 20 % k tvorbě gradientových gelů (Schägger, 1994). Gradientové gely umožňují rozdělit směs proteinů s širokým rozmezím molekulových hmotností. To je také typický příklad fotosyntetických komplexů vázaných v membránách, jenž mohou mít formu velkých megakomplexů, stejně tak i malých komplexů. Pokud odpovídá velikost póru gradientového gelu velikosti separovaného proteinového komplexu, komplex ztrácí rychlost a v určité oblasti gelu se koncentruje (Nosek, 2016). Výsledkem separace jsou zeleně zbarvené pásy, které

odpovídají jednotlivým fotosyntetickým komplexům. Při izolaci PSI-NDH superkomplexu je nejvhodnější použití 4-8% gradientového gelu (Kouřil *et al.*, 2014).

CN-PAGE probíhá za nízkých teplot, zpravidla při 4-7 °C. Při běžné laboratorní teplotě by mohlo docházet k tepelnému poškození vzorků, způsobenému přehřátím elektroforetické jednotky, což by mělo za následek rozostření pásů se separovanými částicemi (Nosek, 2012).

3 Cíl práce

- Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat rešerši o problematice PSI-NDH superkomplexu.
- Cílem experimentální části bakalářské práce byla izolace PSI-NDH superkomplexu pomocí metody CN-PAGE, posouzení změn v množství PSI-NDH superkomplexu pomocí metody Western blotting v kombinaci s fluorescenčním měřením a posouzení změn ve struktuře tohoto superkomplexu pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

4 Materiál a metodika

4.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty byl použit ječmen setý (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos). Zvoleno bylo 6 variant rostlin pěstovaných v sadách po šesti květináčích při následujících intenzitách pěstebního světla: 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR. Pěstování probíhalo ve fotokomoře, v režimu 16 h světla a 8 h tmy, v délce 8 dní. Teplota ve fotokomoře byla nastavena na 25 °C pro denní režim a 18 °C pro noční režim. Vlhkost činila 40 %. Rostliny byly pěstovány v perlitu a zalévány Knopovým roztokem. Knopův roztok byl připraven následujícím způsobem: bylo odebráno po 100 ml od každého z pěti zásobních roztoků (Tab. 4), přidáno 10 kapek 50% chloridu železitého a doplněno deionizovanou vodou do objemu 10 l.

Tabulka 4: Složení zásobních roztoků pro přípravu Knopova roztoku

| Chemická látka | Množství látky |
|--|----------------|
| KNO ₃ | 14,3 g/l |
| MgSO ₄ | 14,3 g/l |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 57,2 g/l |
| KCl | 7,1 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 14,3 g/l |

4.2 Izolace thylakoidních membrán

Pro izolaci thylakoidních membrán byly použity tři pufry. Prvním byl homogenizační pufr A (Tab. 5), druhým pufrem byl izolační pufr B (Tab. 6) a třetím pufrem byl stabilizační pufr C (Tab. 7).

Tabulka 5: Složení homogenizačního pufru A (pH 7,2)

| Chemická látka | Koncentrace |
|--------------------------------------|-------------|
| Sacharosa | 400 mmol/l |
| HEPES | 35 mmol/l |
| NaCl | 400 mmol/l |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 4 mmol/l |
| Na-Asc | 5 mmol/l |
| BSA | 2 mg/ml |

Tabulka 6: Složení izolačního pufru B (pH 7,5)

| Chemická látka | Koncentrace |
|--------------------------------------|--------------------|
| HEPES | 25 mmol/l |
| NaCl | 150 mmol/l |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 8 mmol/l |
| EDTA-Na | 1 mmol/l |

Tabulka 7: Složení stabilizačního pufru C (pH 7,2)

| Chemická látka | Množství látky [g/l] |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| sacharóza | 400 mmol/l |
| HEPES | 50 mmol/l |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 5 mmol/l |
| NaCl | 15 mmol/l |

Rostliny se k izolaci thylakoidních membrán odebíraly minimálně dvě hodiny po začátku denní fáze fytokomory. Nastříhané listy byly vloženy do kádinky s vychlazeným homogenizačním pufrem A a homogenizovány za pomoci homogenizátoru. Následovala filtrace přes tři vrstvy nylonové sítky s definovanou velikostí oka 40 µm. Filtrát byl rozdělen do centrifugačních kyvet a centrifugován (6 min, 5000 g, 4 °C). Vzniklý pelet byl po odlití supernatantu rozmíchán ve vychlazeném izolačním pufru B, rozdělen do centrifugačních kyvet a centrifugován (10 min, 5000 g, 4 °C). Vzniklý supernatant byl znovu odlit a pelet byl rozmíchán ve stabilizačním pufru C. Následovala centrifugace (5 min, 5000 g, 4 °C). Po centrifugaci byl pelet rozmíchán v 1 ml pufru C a ve vzniklé suspenzi thylakoidních membrán byla stanovena koncentrace chlorofylů *a* a *b*. Poté byla suspenze rozpipetována do označených mikrokumavek. Vzorke byly uchovány při teplotě -80 °C v mrazicím boxu. Práce probíhala v temné místnosti ozářené zeleným světlem. Rostlinný materiál a pufrly byly v průběhu izolace chlazeny v ledové lázni.

4.3 Stanovení koncentrace chlorofylů *a* a *b*

Koncentrace chlorofylů v jednotlivých vzorcích suspenzí thylakoidních membrán byla měřena spektrofotometricky. V mikrokumavkách byly smíchány 2 ml 80% acetonu spolu s 5, resp. 10 µl suspenze thylakoidních membrán od každého vzorku pěstební varianty.

Po extrahování chlorofylů do acetonu proběhla centrifugace (5 min, 35 000 g, 4 °C), po které následovalo přelití supernatantu do nové mikrozkušavky. Měření absorbance probíhalo při vlnových délkách 646,8, 663,2 a 750 nm. Jako blank byl použit 80% aceton. Absorbance při příslušných vlnových délkách se dosadily do Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987):

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

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

c_a ...koncentrace chlorofylu a v $\mu\text{g/ml}$

c_b ...koncentrace chlorofylu b v $\mu\text{g/ml}$

Vypočítala se tak koncentrace chlorofylů a a b v suspenzích. Tímto způsobem byly proměřeny vzorky všech pěstebních variant. Dle zjištěných koncentrací chlorofylu byly vzorky jednotlivých pěstebních variant rozděleny do mikrozkušavek po 110 μg a uchovány v chladicím boxu při teplotě -80 °C.

4.4 Solubilizace thylakoidních membrán

Izolované thylakoidní membrány byly před provedením elektroforetické separace solubilizovány detergentem dodecyl- β -D-maltosidem (DM) v různých hmotnostních poměrech DM k chlorofylům a a b (DM/chl). V mikrozkušavkách byla smíšena suspenze thylakoidních membrán v objemu odpovídajícím 10 μg chlorofylů s různým množstvím 5% roztoku DM, které odpovídalo hmotnostnímu poměru DM/chl 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 a 32. Vzniklá směs byla doplněna puřrem C (viz Tab. 7) do objemu 30 μl . Poté následovala centrifugace (5 min, 20 000 g, 4 °C), aby byly odstraněny zbytky nesolubilizovaných membrán. Supernatant byl poté ihned nanesen do jamek polyakrylamidového gelu.

4.5 CN-PAGE

Před započítím samotné elektroforetické separace pomocí CN-PAGE bylo třeba nachystat aparaturu pro nalévání gelu. Tloušťka gelu byla zvolena 1 mm, k čemuž byla použita velikostně vhodná, řádně očištěná a nepoškozená skla. Těsnost aparatury byla zkontrolována nalitím deionizované vody do prostoru mezi skla. Dále bylo třeba připravit následující zásobní roztoky, nezbytné pro přípravu gradientového gelu:

- Roztok akrylamidu (AB): 50%T, 2,6%C (T – celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C – koncentrace bisakrylamidu), pro objem 250 ml použito 122 g akrylamidu a 3,3 g bisakrylamidu
- Gelový pufr (6× koncentrovaný, pH 7): 3 mol/l aminokapronová kyselina (ACA), 0,3 mol/l Bis-Tris/HCl (pro objem 100 ml bylo použito 39,4 g ACA a 6,3 g Bis-Tris)

Elektroforetická separace solubilizovaných pigment-proteinových komplexů probíhala na 4-8% gradientovém gelu. Pro přípravu gelu byla použita gradientová aparatura s peristaltickou pumpou. Gel byl vytvořen z 3 ml 4% a 3 ml 8% zásobního gelového roztoku akrylamidu (přesný rozpis chemických látek pro přípravu 4% a 8% zásobního roztoku je uveden v Tab. 8). Těsně před nalitím gelu mezi elektroforetická skla bylo do nalévací aparatury ke gelovým pufrům přidáno 5 μ l TEMED a 20 μ l 10% APS. Do vytvořeného gelového gradientu byl vložen hřebínek a gel ponechán v klidu, aby proběhla polymerizace. Vzniklý zpolymerovaný gel byl do okamžiku použití uchován v lednici.

Tabulka 8: Složení 50 ml zásobních roztoků 4% a 8% gelu k provedení CN-PAGE

| Chemická látka | 4% gel [ml] | 8% gel [ml] |
|----------------|-------------|-------------|
| Glycerol | - | 10 |
| gelový pufr | 8,33 | 8,33 |
| Voda | 37,67 | 23,67 |
| AB | 4 | 8 |
| TEMED* | 0,005 | 0,005 |
| 10% APS* | 0,02 | 0,02 |

*Přidat těsně před použitím

Pro celkový průběh elektroforézy bylo dále potřeba připravit následující pufrы:

- Zásobní roztok katodového pufru (10× koncentrovaný, pH 7,0) obsahoval 0,5 mol/l Tricin, 150 mmol/l Bis-Tris/HCl. K provedení CN-PAGE byl zásobní roztok naředěn a do 150 ml bylo přidáno 43 mg DM, 86 mg deoxycholátu sodného a 48 μ l 35% HCl.
- Anodový pufr (1× koncentrovaný, pH 7,0) obsahoval 50 mmol/l Bis-Tris/HCl.

Po ukončení polymerizace gelu byl vyjmut hřebínek a jamky byly promyty deionizovanou vodou. Následovalo sestavení elektroforetické aparatury a nalití anodového a

katodového pufru. Vzorky připravené podle postupu uvedeného v kapitole 4.4 byly nanесeny do jamek gelu. Následně byla spuštěna elektroforéza. Separace probíhala zpočátku při konstantním proudu 7 mA po dobu 15 min a následně byl proud zvýšen na 15 mA, dokud čelo separovaných komplexů nedosáhlo konce separačního gelu. Příprava vzorků a samotná elektroforéza probíhala ve tmě a v chladu. Po ukončení separace byl gel vyjmut a skenován v transmisním kolorimetrickém módu a fluorimetrickém módu pomocí gelskeneru.

Na základě tohoto postupu byly připraveny gely pro každou pěstební variantu, kdy do jednotlivých jamek gelu byly nanесeny vzorky při poměru DM/chl uvedených výše, v kapitole 4.4. Porovnáním takto získaných gelů byly následně připraveny čtyři další gely, které obsahovaly všechny pěstební varianty rostlinného materiálu solubilizované při stejném poměru DM/chl (8, 16, 20 a 24). Poměry DM/chl byly zvoleny tak, aby byl maximalizován výtěžek PSI-NDH komplexu.

4.6 Denzitometrie

Po elektroforetické separaci byly pásy, odpovídající jednotlivým pigment-proteinovým komplexům, denzitometricky kvantifikovány pomocí programu ImageJ. Získané číselné výsledky byly zaznamenány do grafu.

4.7 Transmisní elektronová mikroskopie

Pásy, které odpovídaly PSI-NDH superkomplexu, byly po provedené CN-PAGE z gelu vyřezány, nasekány a vloženy do mikroskopu, do které se následně přidalo 30 μ l elučního pufru (50 mmol/l HEPES, 14 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl₂, 0,0003% β -DM, pH 7,2). Eluce probíhala přibližně dvě hodiny v chladu. Takto získané eluované proteinové superkomplexy byly využity k přípravě vzorku pro elektronovou mikroskopii.

Vzorky s proteiny se nanášely na měděné síťky pokryté tenkým uhlíkovým filmem. K získání větších hydrofilních vlastností byly měděné síťky před nanesením vzorku upraveny pomocí doutnavého výboje. Na takto upravené síťky se pak nanášely vzorky o objemu 5 μ l. Po 1 min se pomocí filtračního papíru opatrně vzorek odsál a na síťky se naněsl uranyl acetát, který byl po 1 min též odsát. Takto připravené vzorky byly postupně umístěny do držáku mikroskopu a pozorovány při zvětšení 40 000 \times . Obraz byl snímán CCD kamerou.

4.8 SDS-PAGE

Prvním krokem k provedení SDS-PAGE byla příprava gelu. Tloušťka gelu byla zvolena 1 mm, k čemuž byla použita velikostně vhodná, řádně očištěná a nepoškozená skla. Těsnost aparatury byla zkontrolována nalitím deionizované vody do prostoru mezi skla. Gel pro SDS-PAGE byl vytvořen z 5 ml 10% zásobního roztoku pro přípravu separačního gelu a 1 ml 4% zásobního roztoku pro přípravu zaostřovacího gelu. Jejich přesné složení je uvedeno v Tab. 9.

Tabulka 9: Složení 4% a 10% gelu k provedení SDS-PAGE

| Chemická látka | 4% gel [ml] | 10% gel [ml] |
|------------------|-------------|--------------|
| AB | 0,4 | 2 |
| gelový pufr (3×) | 1,24 | 3,3 |
| Glycerol | - | 1 |
| Voda | 3,36 | 3,7 |
| TEMED* | 0,004 | 0,01 |
| 10% APS* | 0,04 | 0,05 |

*Přidat těsně před použitím

Pro přípravu 4% a 10% zásobních roztoků bylo třeba připravit následující roztoky:

- Roztok akrylamidu (AB): 49,5%T, 3%C (T – celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C – koncentrace bisakrylamidu), použito 48 g akrylamidu a 1,5 g bisakrylamidu ve 100 ml deionizované vody
- Gelový pufr (3× koncentrovaný, pH 8,45): 3 mol/l Tris, 1 mol/l HCl, 0,3% SDS

Před nalitím 10% separačního gelu mezi elektroforetická skla se do tohoto roztoku polyakrylamidu přidalo 10 μ l TEMED a 50 μ l 10% APS. Gel byl nalit zhruba 0,5 cm pod hřebínek. Následně byl gel převrstven deionizovanou vodou a ponechán v klidu, dokud nedošlo k polymerizaci. Poté byla deionizovaná voda odsáta a separační gel se převrstvil 4% zaostřovacím gelem, do kterého se před použitím přidaly 4 μ l TEMED a 40 μ l 10% APS. Do nalitého zaostřovacího gelu se vložil hřebínek a gel byl ponechán v klidu, dokud nedošlo k polymeraci

Pro celkový průběh elektroforézy bylo dále potřeba připravit následující pufrы:

- Zásobní roztok katodového pufru (10× koncentrovaný, pH 8,25) obsahoval 1 mol/l Tris, 1 mol/l Tricin, 1% SDS. K provedení SDS-PAGE byl pufr náležitě zředěn.
- Zásobní roztok anodového pufru (10× koncentrovaný, pH 8,9) obsahoval 1 mol/l Tris a 0,225 mol/l HCl. K provedení SDS-PAGE byl pufr náležitě zředěn.

Po polymerizaci byl z gelu vyjmut hřebínek a jamky byly promyty deionizovanou vodou. Následovalo sestavení elektroforetické aparatury a nalití anodového a katodového pufru. Do krajních jamek gelu bylo nanášeno 2,5 μ l hmotnostního markeru (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo scientific™) a do zbývajících jamek byly nanášeny vzorky v objemu odpovídajícím určitému množství proteinů. Následně byla spuštěna elektroforéza. Separace probíhala při konstantním proudu 100 mA přibližně 1 h. Po ukončení elektroforézy byly gely použity pro Western blotting.

4.9 Izolace proteinů a stanovení jejich koncentrace

Před provedením SDS-PAGE bylo nutné provést izolaci proteinů ze suspenzí thylakoidních membrán od všech pěstebních variant a ve výsledných izolátech zjistit koncentraci proteinů.

Pro izolaci byl smíchán 1 ml extrakčního pufru (28 mmol/l dithiotreitol, 28 mmol/l Na₂CO₃, 175 mmol/l sacharosa, 5% SDS, 10 mmol/l EDTA, 150 μ l inhibitor proteas) spolu s připravenými vzorky jednotlivých pěstebních variant (množství vzorku odpovídající 110 μ g chlorofylů). Následovala inkubace v termobloku při 70 °C po dobu 30 min, s následnou centrifugací (10 min, 19 000 g). Supernatant byl převeden do nové mikrozkuřavky. Z takto vzniklého proteinového izolátu bylo odebráno 5, 10 a 25 μ l od každého vzorku a doplněno 500 μ l 10% TCA. Zbytek supernatantu byl uchován pro další použití v chladicím boxu při teplotě – 80°C. Proběhla centrifugace (10 min, 30 000 g) a odlití supernatantu. Pelet byl vysušen ve vakuové odparce a poté rozpuštěn ve 100 μ l 0,1 mol/l NaOH.

Dále byla připravena kalibrační řada roztoků BSA o koncentracích: 0, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 a 2000 μ g/ml v 0,1M NaOH. Z kalibračních roztoků bylo odebráno 100 μ l do nových mikrozkuřavek. Do nich pak byl napipetován 1 ml vyvíjecího činidla (Bicinchoninic Acid

Kit for Protein Determination, Sigma), stejně tak i do mikrozkušavek se vzorky rozpuštěnými v NaOH. Následovala inkubace 30 min při 36°C, poté byly vzorky prudce zchlazeny na laboratorní teplotu a bylo provedeno měření absorbance při vlnové délce 562 nm pomocí spektrofotometru. Jako blank byla použita deionizovaná voda. Ze sestavené kalibrační přímky pak byla vypočítána koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

4.10 Western blotting

Pro potřeby Western blottingu byl připraven 10× koncentrovaný blotovací roztok (15,1 g Tris, 72 g glycin, 0,01 g SDS doplněno deionizovanou vodou do 1 l) a z něj 1× koncentrovaný blotovací roztok. Na blotovací zařízení byl umístěn blotovací papír, který byl navlhčený v blotovacím roztoku. Na navlhčený blotovací papír byla umístěna nitrocelulosevá membrána, též navlhčená v blotovacím roztoku. Na membránu byl přenesen gel se separovanými proteiny z SDS-PAGE, ze kterého byl odstraněn zaostřovací gel. Gel byl přikryt dalším navlhčeným blotovacím papírem a pomocí skleněného válečku byly odstraněny vzduchové bubliny. Byla sestavena blotovací aparatura a spuštěn blotting při konstantním proudu 50 mA pro jeden gel po dobu 1 h. Po ukončení blottingu byla membrána 5 min obarvena v roztoku Ponceau S (0,1 g Ponceau S a 100 ml 5% kyseliny octové), aby se ověřila správnost přenosu proteinů. Následně byla odbarvena v TBS-T a poté přes noc inkubována v blokovacím roztoku (5% odtučněné mléko v TBS-T) přes noc v chladicím boxu. TBS-T bylo připraveno zředěním 10× koncentrovaného TBS (15 g Tris a 88 g NaCl v 1 l, pH 7,4) a přidáním 1 ml Tween-20 do 1 l roztoku. Zbytky blokovacího roztoku byly následně vymývány 1× 10 minut v TBS. Následně byla membrána inkubována v primární protilátce proti H podjednotce NDH komplexu (ředěna 1:3000) po dobu 1 h. Po inkubaci s primární protilátkou se membrána promývala 5× 10 min v TBS-T a 1× 10 min v TBS a poté byla inkubována v sekundární protilátce značené křenovou peroxidase (HRP) (ředěna 1:10000) po dobu 1 h. Po inkubaci se sekundární protilátkou byla membrána promývána 5× 10 min v TBS-T a 1× v TBS. Stejný postup byl zvolen k promývání membrán s použitím TBS s vyšší koncentrací NaCl (15 g Tris a 100 g NaCl v 1 l, pH 7,4). Po ukončení promývání byl na membránu nanesen 1 ml vyvíjecího substrátu pro HRP (ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate, MERCK MILLIPORE) a následně byly pořízeny snímky pomocí gelskeneru v chemiluminiscenčním módu.

4.11 Fluorometrie

Fluorescenční měření bylo provedeno dle Shikanai *et al.*, 1998. Před započítím měření byly rostliny adaptovány na tmu. Pomocí fluorometrického zařízení PAM 2000 bylo na listy ječmene jednotlivých pěstebních variant aplikováno měřící světlo (ML) a byl určen maximální kvantový výtěžek fotochemické reakce. Poté bylo zapnuto bílé aktinické světlo (AL) o intenzitě $50 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po pěti minutách bylo AL ukončeno a list byl po dobu tří minut vystaven pouze ML. Pozoroval se nárůst minimální fluorescence, který je přisuzován cyklickému elektronovému transportu vedenému přes PSI-NDH komplex. Každá pěstební varianta byla měřena dvakrát.

4.12 Použité chemikálie

- 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris) $\geq 99,9\%$ (Sigma)
- 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Bis-Tris) $\geq 98\%$ (Sigma)
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) (Sigma)
- Aceton $\geq 99,5\%$ (Lach:ner)
- Akrylamid $\geq 99,9\%$ (BIO-RAD)
- Aminokapronová kyselina (ACA) (Sigma)
- Askorbát sodný (Asc) (Sigma)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
- Deionizovaná voda
- Deoxycholát sodný (Sigma)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema)
- Dithiotreitol (BIO-RAD)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Fluka)
- dodecyl- β -D-maltosidem (DM) (AppliChem)
- Dusičnan draselný (Lachema)
- Dusičnan vápenatý, tetrahydrát (Hichem)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl (EDTA) (Sigma)
- Glycerol (Lach:ner)
- Glycin (Sigma)
- Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) Horseradish Peroxidase Conjugate (BIO-RAD)
- Hydroxid sodný (Lach:ner)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid hořečnatý, hexahydrát (Lach:ner)
- Chlorid sodný (Lach:ner)
- Chlorid železitý (Aldrich)
- Inhibitor proteas (BIO-RAD)
- Kyselina chlorovodíková (Lach:ner)
- Kyselina octová 99,8% (Lach:ner)
- N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED) (BIO-RAD)
- N, N'-metylenbisakrylamid (BIO-RAD)

- N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin (Tricin) (BIO-RAD)
- NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, chloroplasic (Agrisera)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo scientific™)
- Peroxodisíran amonný (APS) (BIO-RAD)
- Ponceau S (Sigma)
- Sacharosa (Lachner)
- Síran hořčnatý (Lachema)
- Trichloroctová kyselina (TCA) (Lach:ner)
- Tween® 20 (Sigma)
- Uhličitan sodný (Lach:ner)
- Uranyl acetát (Spi Supplies)

4.13 Použité kity

- Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma)
- Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (MERCK MILLIPORE)

4.14 Použité přístroje

- Analytické váhy ABT 220-5DM (Kern)
- Blotovací aparatura Trans-Blot® SD Cell (BIO-RAD)
- Centrifuga 3K30 (SIGMA)
- Elektroforetická vana Mini PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD)
- Fluorometr PAM-2000 (Walz)
- Fytkomora SGC 170 (Weiss Gallenkamp)
- Gel skener Amersham Imager 600RGB (GE HealthCare Life Sciences)
- Gradientová aparatura s peristaltickou pumpou PCD21 (Kouřil)
- Homogenizátor T25 basic (IKA, Německo)
- Míchačka magnetická s ohřevem C-MAG HS 7 (IKA)
- Integrální radiometr Li-COR LI-250A (Biosciences)
- Spektrofotometr SPECORD 250 PLUS (Analytik Jena)
- Systém pro doutnavý výboj PELCO Discharge System easiGlow (Ted Pella)
- Termoblok Dry Bath Incubator MD-010 (Major Science)
- Transmisní elektronový mikroskop 2010F (JEOL)

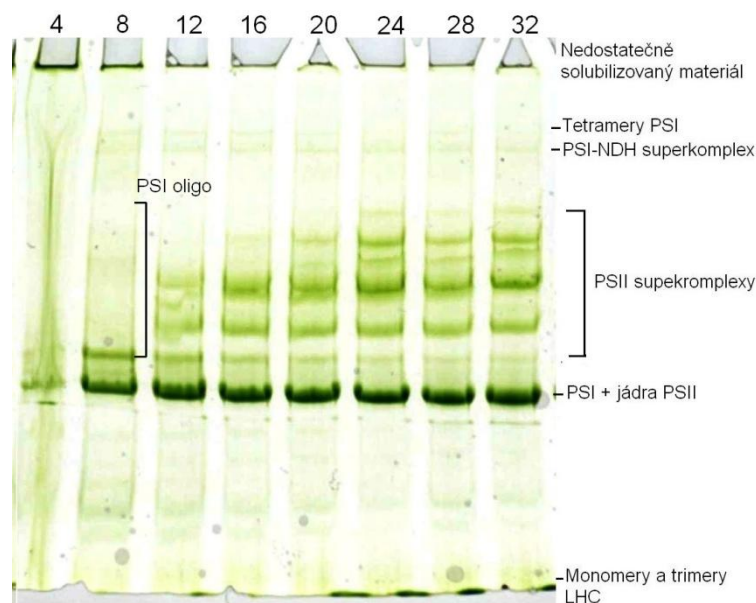
- Třepačka výkyvná (WAVETEC)
- Vortex V-32 (Biosan)
- Zdroj stejnosměrného napětí Power Pac 1000 (BIO-RAD)

5 Výsledky

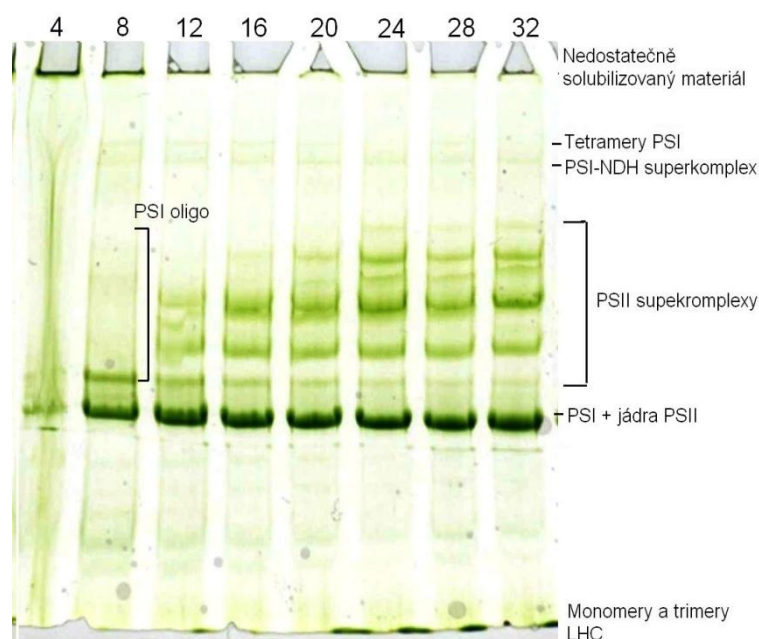
Cílem experimentální části bakalářské práce bylo posoudit změny v množství a struktuře PSI-NDH superkomplexu v thylakoidních membránách ječmene setého (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos), pěstovaného při různé intenzitě světla (20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). V rámci izolace PSI-NDH superkomplexu bylo nutné optimalizovat metodu CN-PAGE pro napěstované varianty rostlin, zejména určit optimální hmotnostní poměr detergentu DM/chl použitý pro solubilizaci thylakoidních membrán. Pro posouzení vlivu pěstebního světla na množství PSI-NDH superkomplexu byla poté použita denzitomerická analýza gelů s fotosyntetickými superkomplexy. Změny v množství superkomplexu v jednotlivých variantách rostlin byly také posouzeny pomocí metody Western blotting a fluorescenční analýzy. K posouzení případných strukturních změn izolovaného PSI-NDH superkomplexu byla použita transmisní elektronová mikroskopie.

5.1 Izolace PSI-NDH superkomplexu

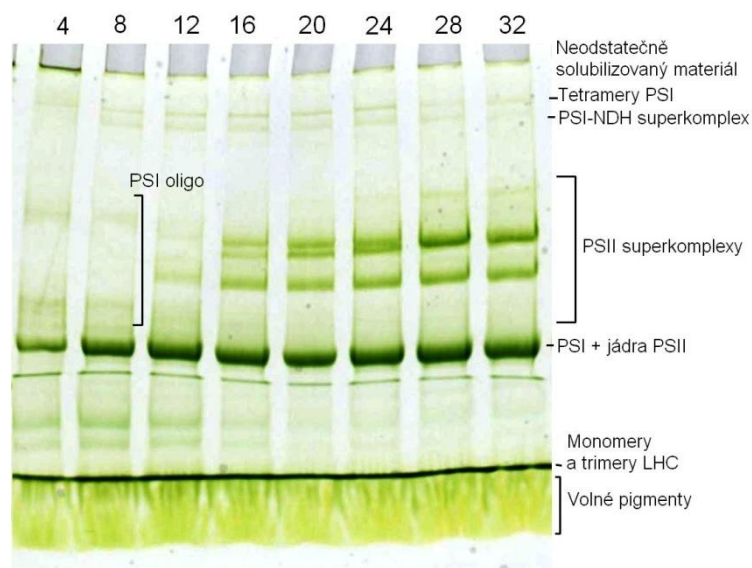
K úspěšné izolaci PSI-NDH superkomplexu z thylakoidních membrán šesti pěstebních variant ječmene setého (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos) (20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bylo nutné zvolit optimální hmotnostní poměr detergentu k chlorofylu *a* a *b* (DM/chl). Pro solubilizaci superkomplexu byl použit detergent dodecyl- β -D-maltosid. Byla vybrána široká škála poměrů DM/chl, aby bylo možné posoudit dopad na solubilizaci membrán. Zvoleny byly následující poměry DM/chl: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 a 32. Při těchto poměrech DM/chl byla provedena CN-PAGE jednotlivých vzorků všech pěstebních variant na gradientovém polyakrylamidovém gelu s 4-8% rozsahem koncentrací. Detaily metodiky CN-PAGE jsou popsány v kap. 4.5. Elektroforetogramy z provedené CN-PAGE jsou znázorněny na Obr. 6 až 11. Popis jednotlivých elektroforetogramů byl proveden na základě srovnání s již publikovanými výsledky (Kouřil *et al.*, 2014 a Nosek *et al.*, 2017).



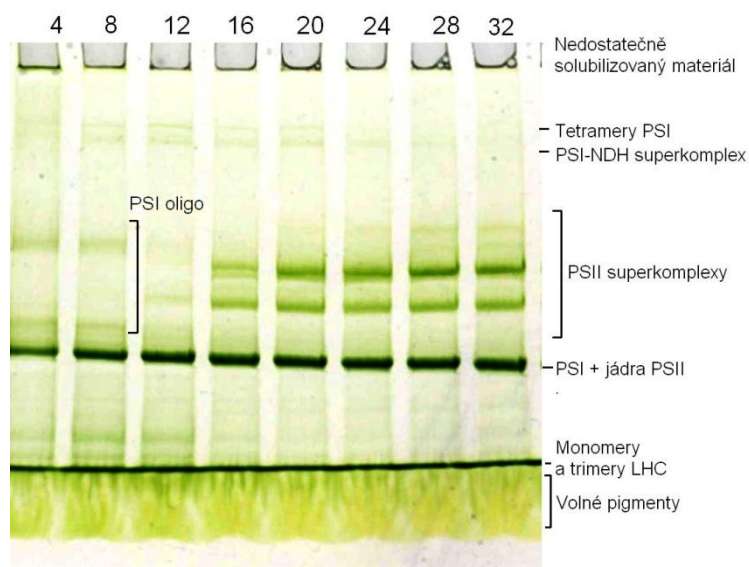
Obrázek 6: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pěstební varianty 20 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují zvyšující se hmotnostní poměr dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylům *a* a *b*. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSI oligo označuje oligomery fotosystému I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.



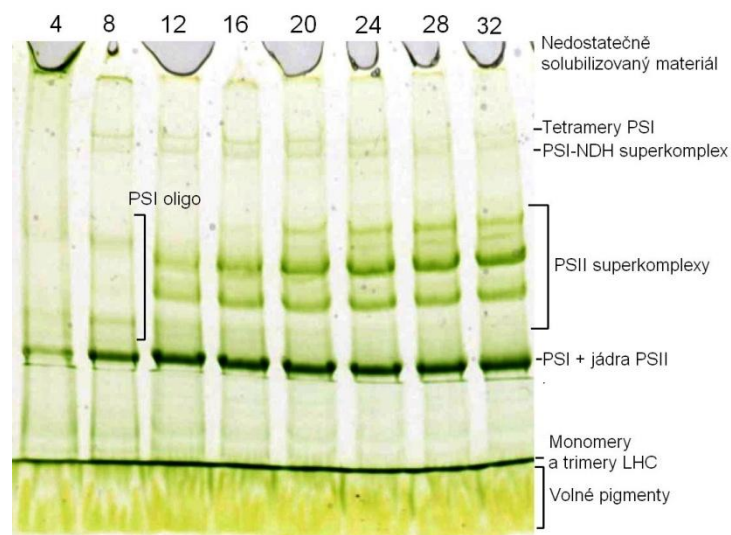
Obrázek 7: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pěstební varianty 50 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují zvyšující se hmotnostní poměr dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b*. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSI oligo označují oligomery fotosystému I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.



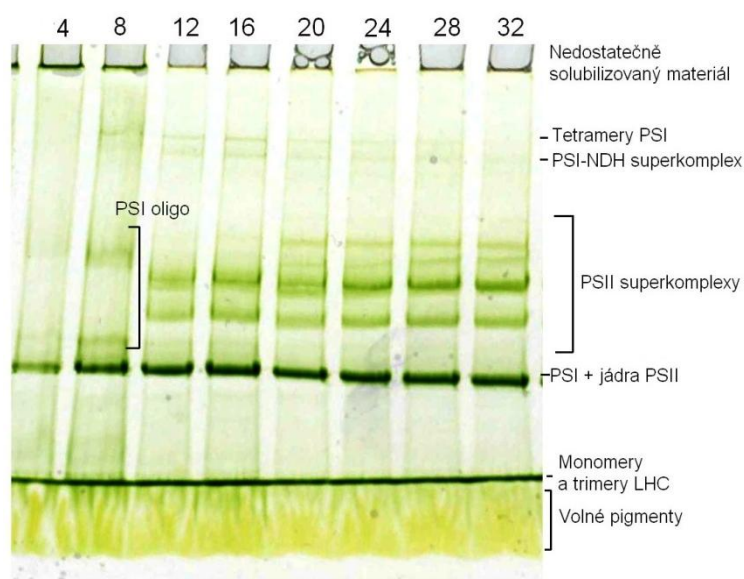
Obrázek 8: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pěstební varianty $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují zvyšující se hmotnostní poměr dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b*. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSI oligo označuje oligomery fotosystému I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.



Obrázek 9: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pěstební varianty $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují zvyšující se hmotnostní poměr dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b*. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSI oligo označuje oligomery fotosystému I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.

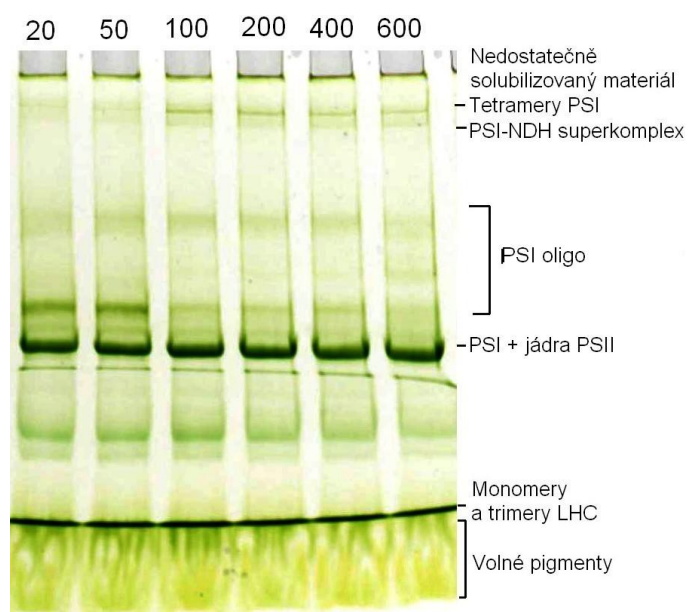


Obrázek 10: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pěstební varianty $400 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují zvyšující se hmotnostní poměr dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b*. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSI oligo označuje oligomery fotosystému I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.

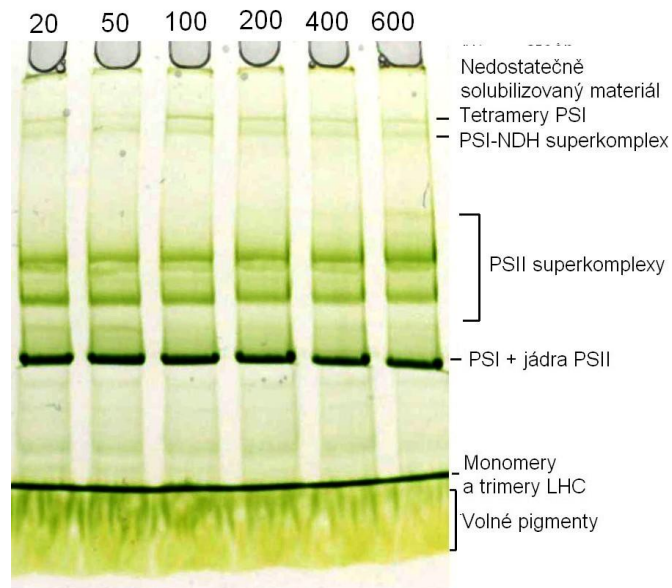


Obrázek 11: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pěstební varianty $600 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují zvyšující se hmotnostní poměr dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b*. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSI oligo označuje oligomery fotosystému I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.

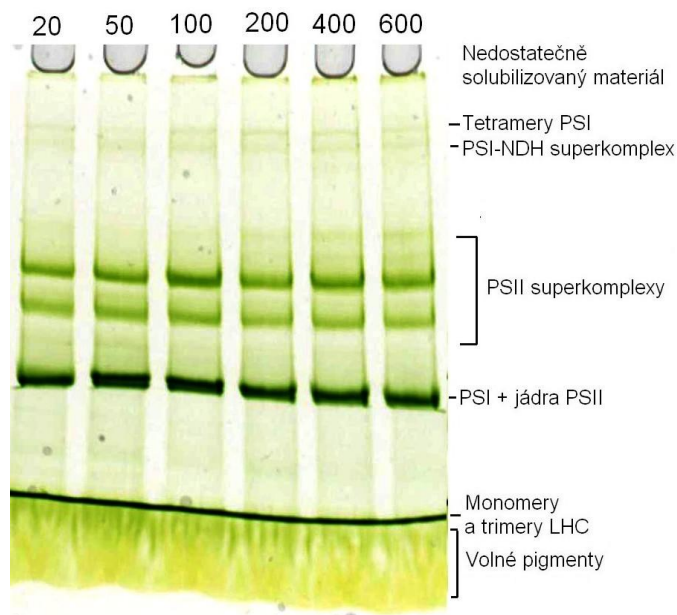
Po posouzení vlivu detergentu na solubilizaci thylakoidních membrán byly vybrány čtyři hmotnostní poměry DM/chl pro účely denzitometrického stanovení nárůstu či poklesu PSI-NDH superkomplexu ve všech pěstebních variantách. Poměr DM/chl 8 byl vybrán jako referenční na základě studie Kouřil *et al.*, 2014, kde se ukázalo, že právě tento poměr je optimální pro udržení intaktního superkomplexu. Dále byly zvoleny další tři poměry DM/chl, při kterých nedocházelo k usazení nesolubilizovaného materiálu na dně jamek a při nichž by měla být zaručena dokonalá solubilizace thylakoidů. Jednalo se o poměry DM/chl 16, 20 a 24. Výsledné elektroforetogramy CN-PAGE separace jsou zobrazeny na Obr. 12 až 15.



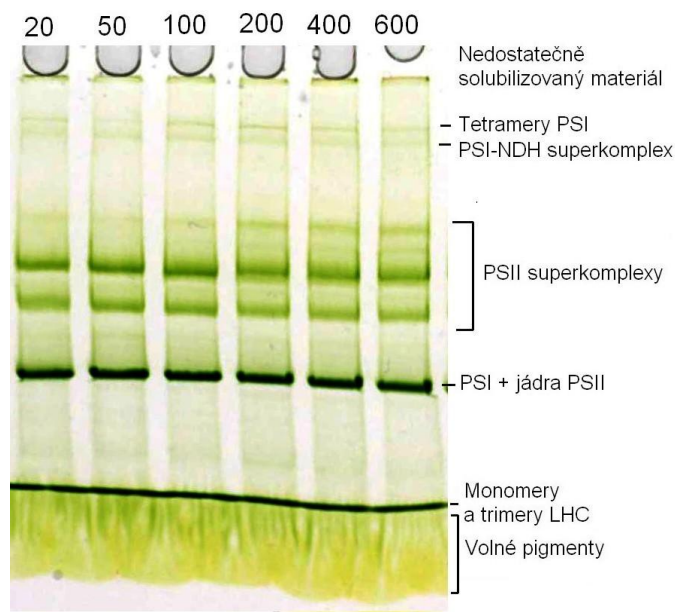
Obrázek 12: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pro všechny pěstební varianty při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylům *a* a *b* 8. Čísla v záhlaví označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSI oligo označuje oligomery fotosystému I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.



Obrázek 13: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pro všechny pěstební varianty při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylům *a* a *b* 16. Čísla v záhlaví označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.



Obrázek 14: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pro všechny pěstební varianty při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b* 20. Čísla nahoře označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.

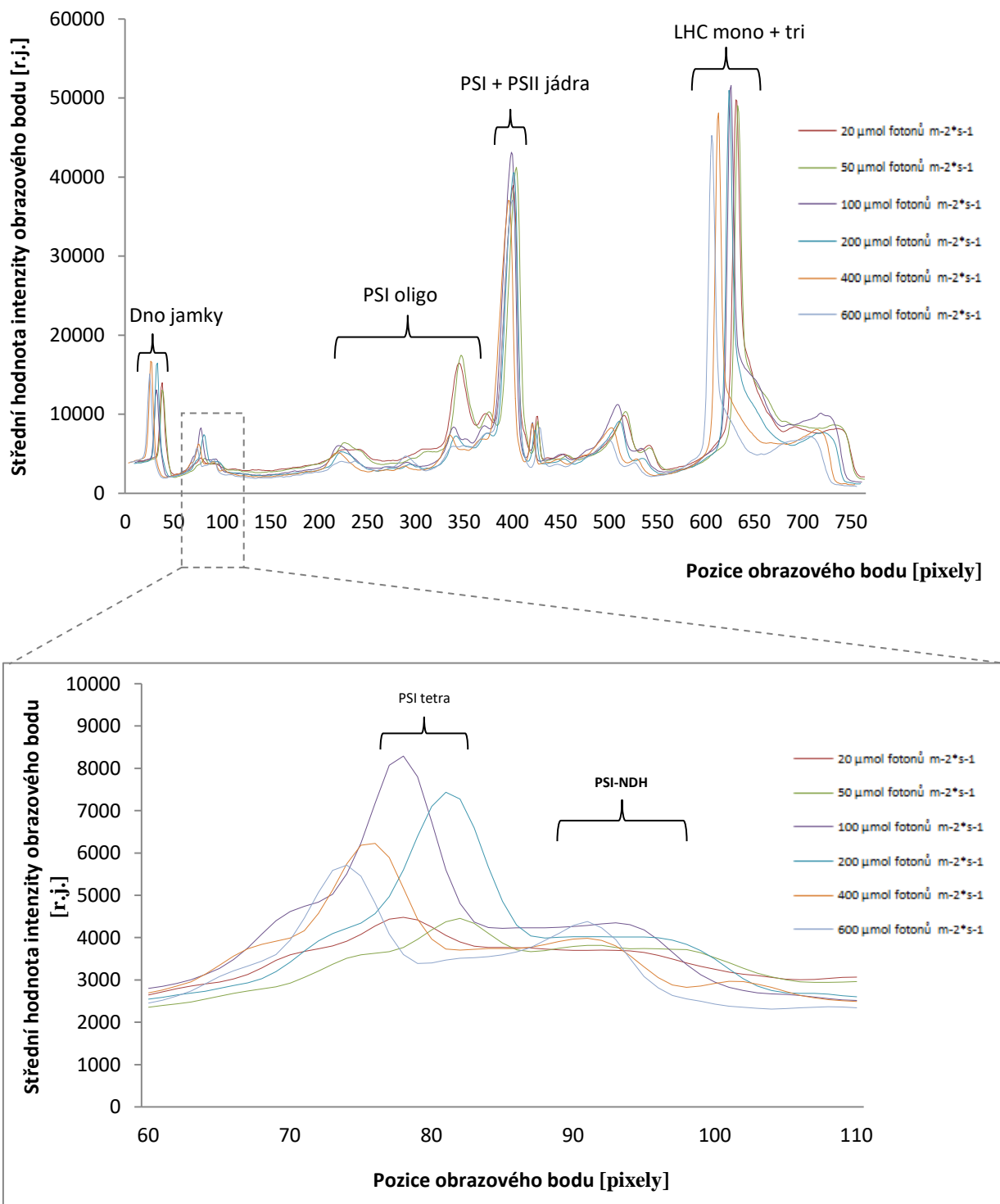


Obrázek 15: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE pro všechny pěstební varianty při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b* 24. Čísla nahoře označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V pravém sloupci jsou popsány separované fotosyntetické komplexy odpovídající jednotlivým pásům. PSI označuje fotosystém I, PSII označuje fotosystém II a LHC světlosběrné komplexy.

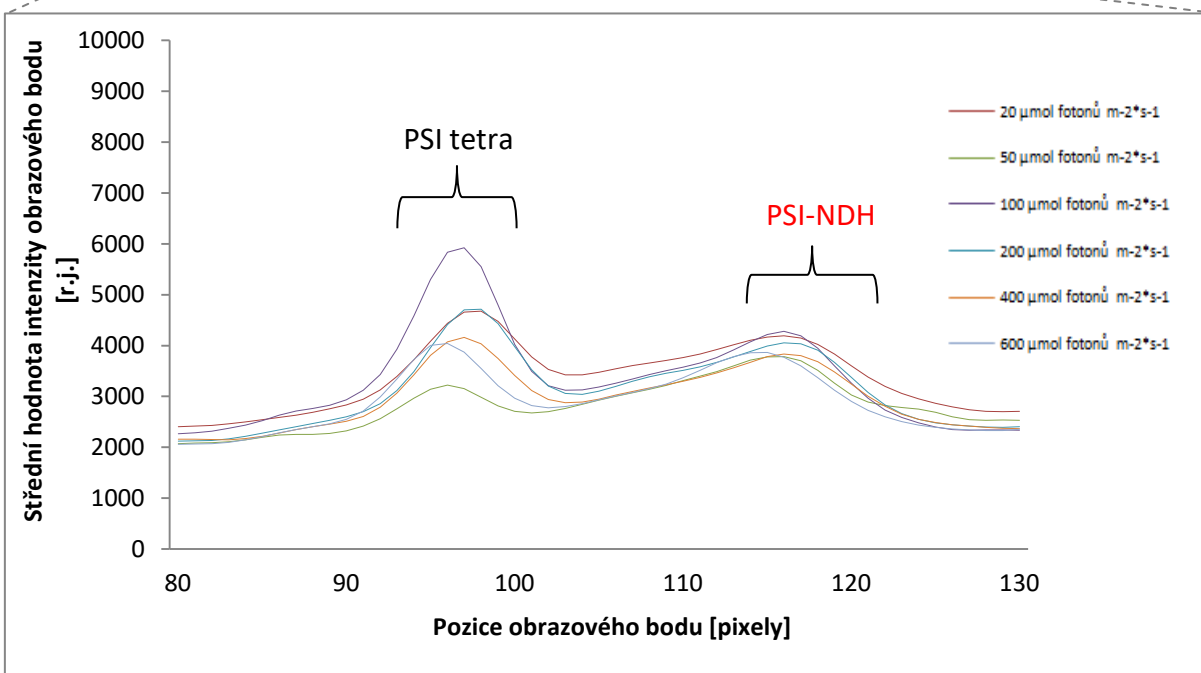
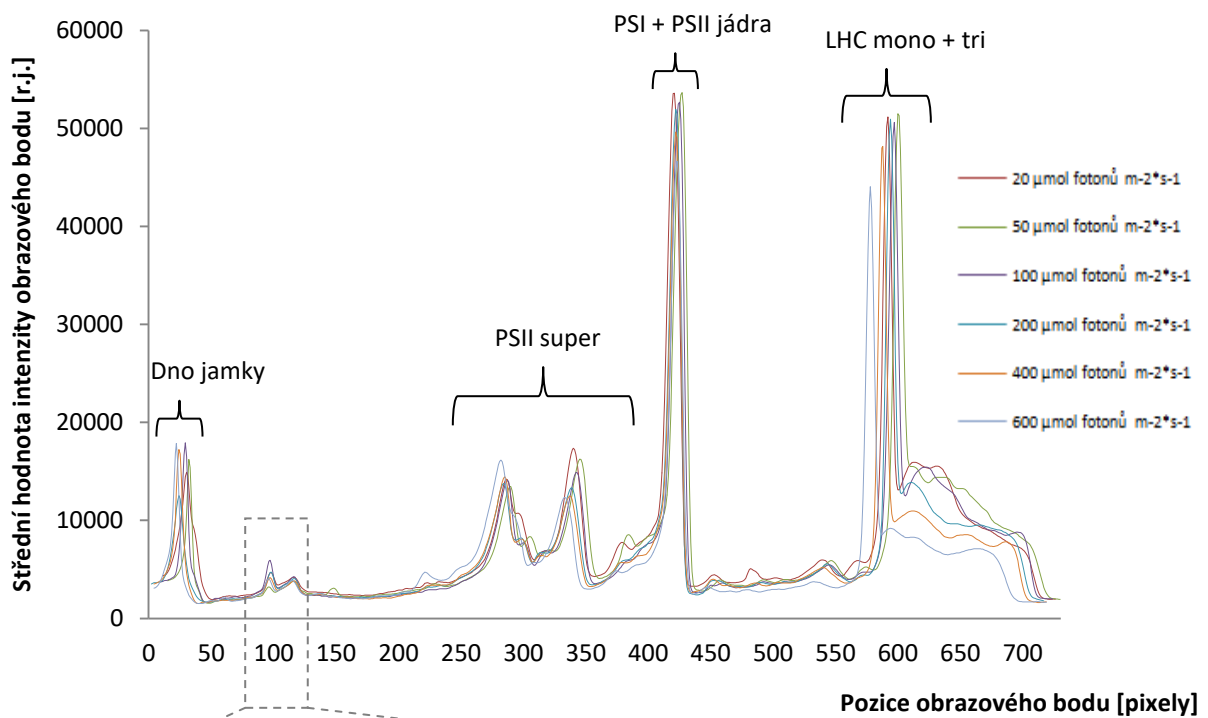
5.2 Kvantitativní stanovení PSI-NDH superkomplexu

5.2.1 Denzitometrie

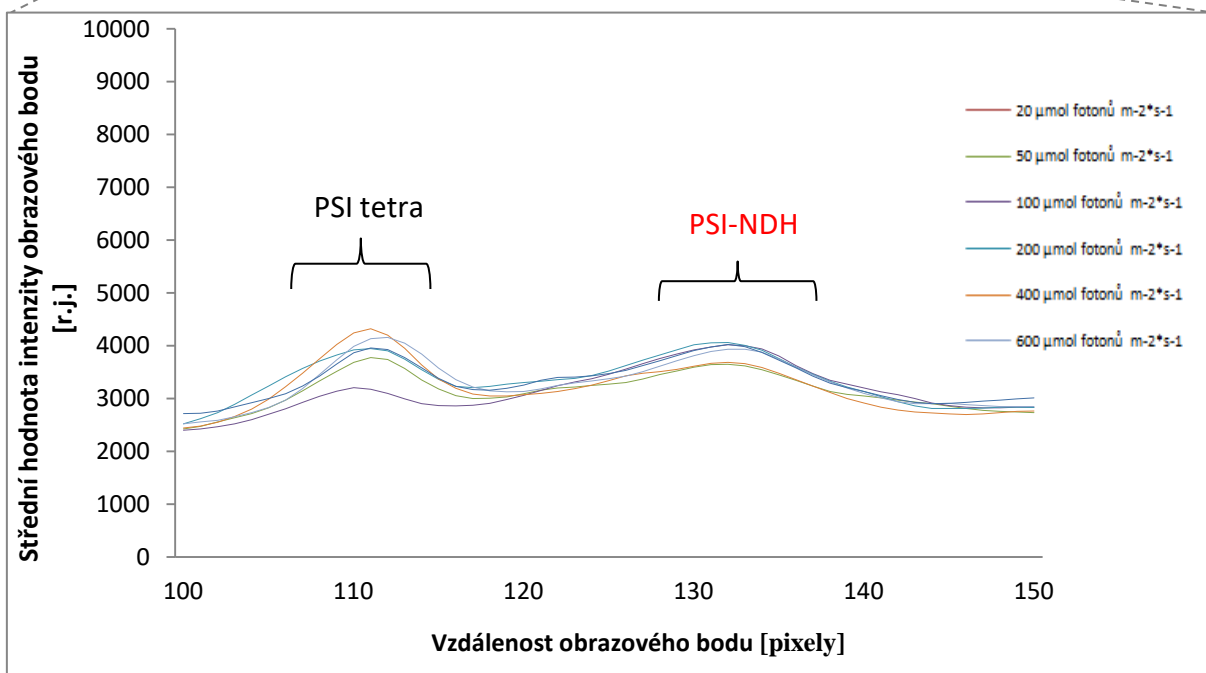
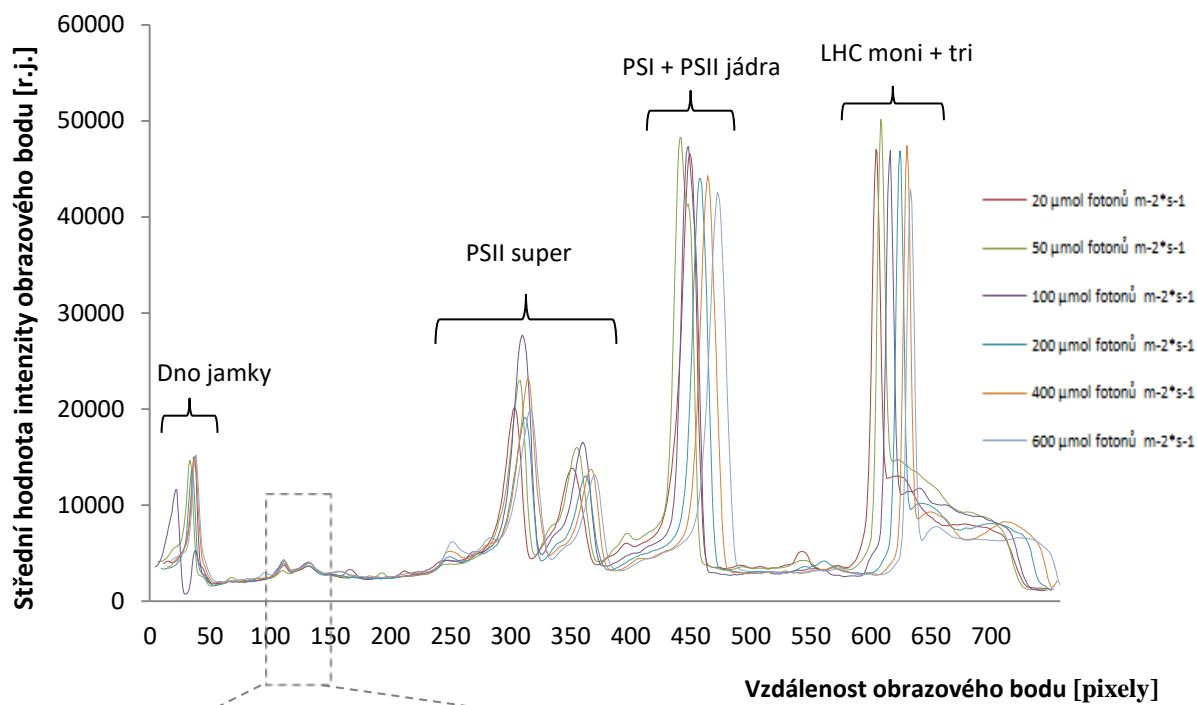
Na výsledných elektroforetogramech (Obr. 12 až 15) byla následně provedena denzitometrická analýza jednotlivých pásů, jež je možné vidět na Obr. 16 až 19. Porovnáním pásů, které představují PSI-NDH superkomplex, není zřetelný žádný znatelný nárůst ani pokles denzit vzorků jednotlivých pěstebních variant rostlin na elektroforetogramech s hmotnostním poměrem DM/chl 16, 20 a 24 (Obr. 17, 18 a 19). Nepatrné výkyvy v denzitách pásů s PSI-NDH superkomplexe napříč pěstebními variantami vykazuje elektroforetogram se zvoleným hmotnostním poměrem DM/chl 8 (Obr. 16). Tyto změny v denzitách však byly pravděpodobně způsobeny rozostřením pásů v gelu, neboť celková plocha pod denzitometrickou křivkou náležející PSI-NDH superkomplexu napříč pěstebními variantami je shodná.



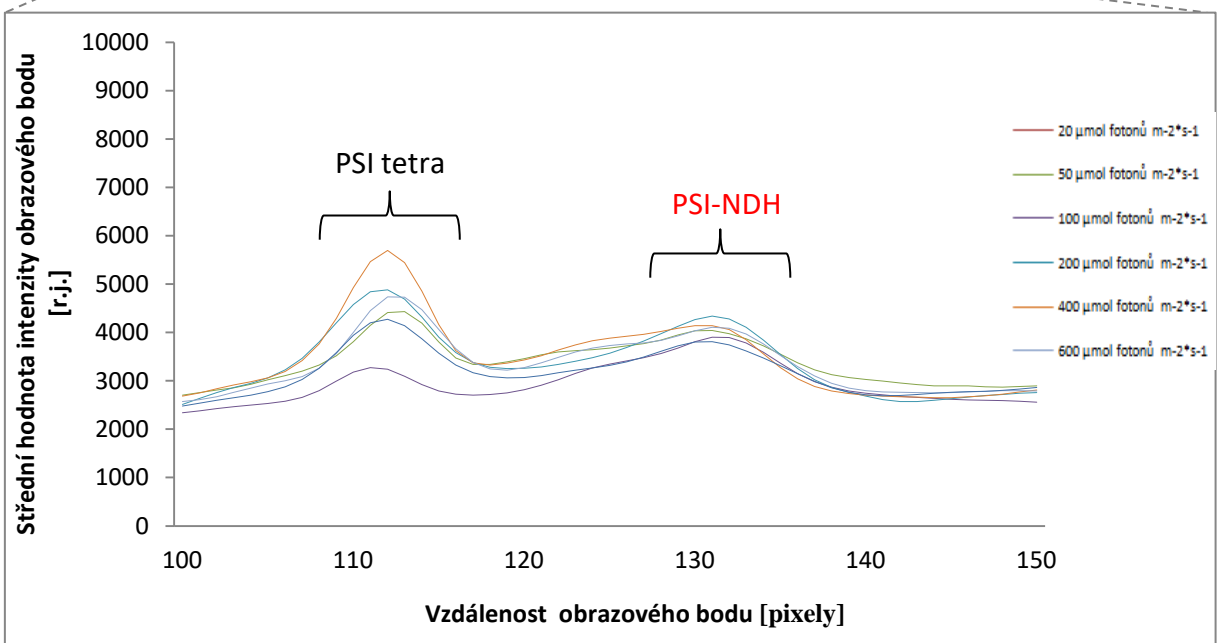
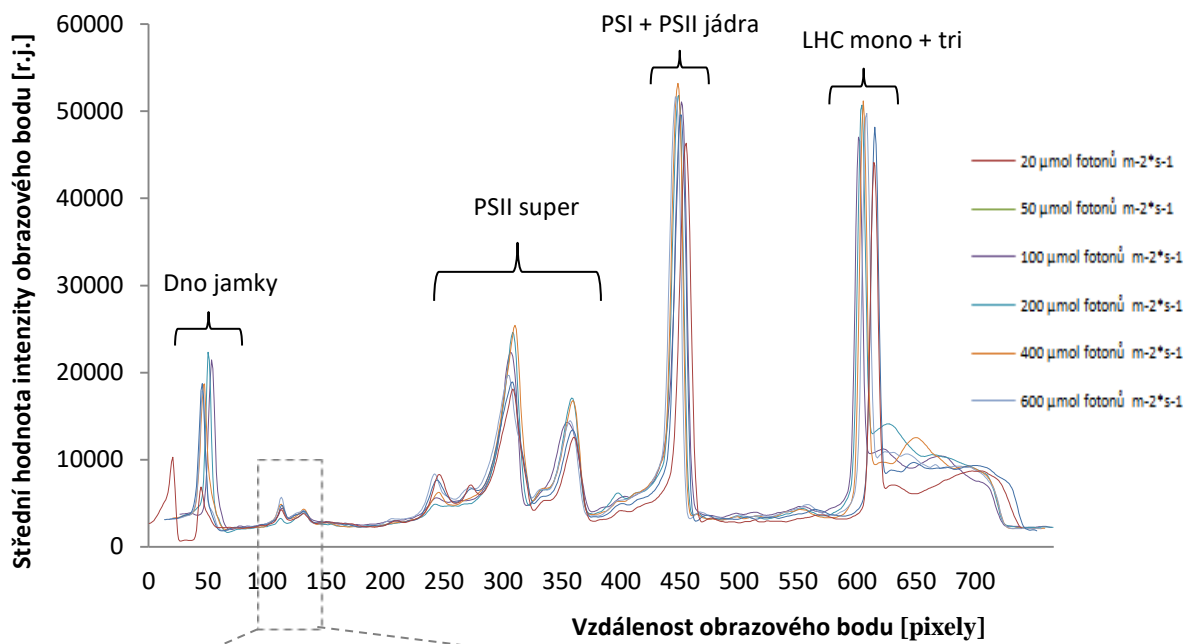
Obrázek 16: Kvantifikace PSI-NDH superkomplexu denzitometrickou analýzou elektroforetogramu po CN-PAGE separaci všech pěstebních variant solubilizovaných při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b* 8. Čísla vpravo označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$. V horní části obrázku je možné vidět denzitu všech pásů elektroforetogramu všech šesti pěstebních variant, kde PSI oligo označuje oligomery fotosystému I a LHC mono + tri označuje monomery a trimery světlosběrných komplexů. Na dolním obrázku je možné vidět denzitu pásů, které představují PSI-NDH superkomplex a tetramery fotosystému I, označené PSI tetra.



Obrázek 17: Kvantifikace PSI-NDH superkomplexu denzitometrickou analýzou elektroforetogramu po provedené CN-PAGE pro všechny pěstební varianty při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b* 16. Čísla vpravo označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V horní části obrázku je možné vidět denzitu všech pásů elektroforetogramu všech šesti pěstebních variant, kde PSII super označuje superkomplexy fotosystému II a LHC mono + tri označuje monomery a trimery světlosběrných komplexů. Na dolním obrázku je možné vidět denzitu pásů, které představují PSI-NDH superkomplex a tetramery fotosystému I, označené PSI tetra.



Obrázek 18: Kvantifikace PSI-NDH superkomplexu denzitometrickou analýzou elektroforetogramu po provedené CN-PAGE pro všechny pěstební varianty při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b* 20. Čísla vpravo označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V horní části obrázku je možné vidět denzitu všech pásů elektroforetogramu všech šesti pěstebních variant, kde PSII super označuje superkomplexy fotosystému II a LHC mono + tri označuje monomery a trimery světlosběrných komplexů. Na dolním obrázku je možné vidět denzitu pásů, které představují PSI-NDH superkomplex a tetrametry fotosystému I, označené PSI tetra.

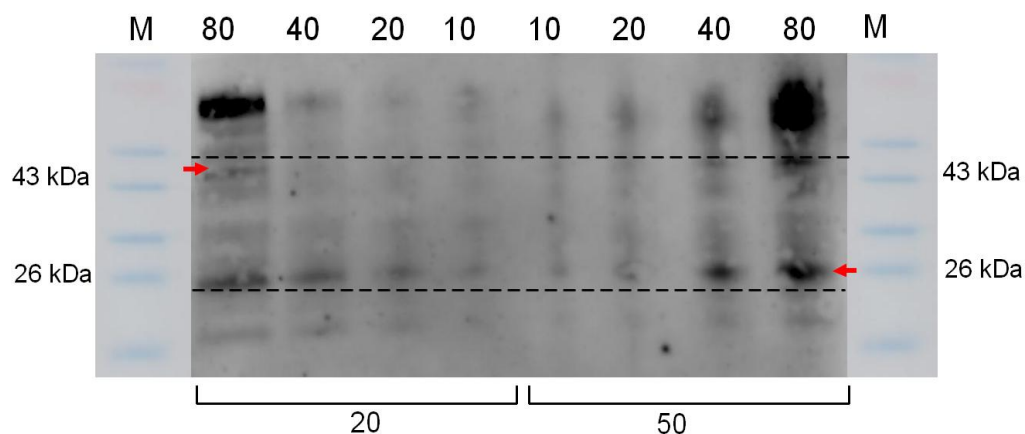


Obrázek 19: Kvantifikace PSI-NDH superkomplexu denzitometrickou analýzou elektroforetogramu po provedené CN-PAGE pro všechny pěstební varianty při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b* 24. Čísla vpravo označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V horní části obrázku je možné vidět denzitu všech pásů elektroforetogramu všech šesti pěstebních variant, kde PSII super označuje superkomplexy fotosystému II a LHC mono + tri označuje monomery a trimery světlosběrných komplexů. Na dolním obrázku je možné vidět denzitu pásů, které představují PSI-NDH superkomplex a tetramery fotosystému I, označené PSI tetra.

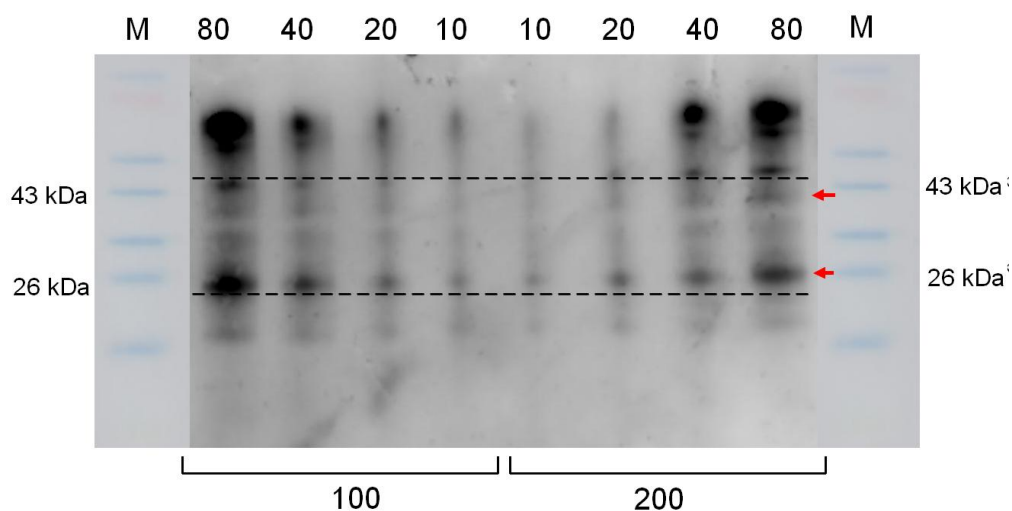
5.2.2 Western blotting

Denzitometrická analýza CN-PAGE elektroforetogramů ukázala, že pravděpodobně nedochází k žádnému markantnímu nárůstu ani poklesu v množství PSI-NDH superkomplexu u žádné z pěstebních variant rostlin. K ověření, zda nedochází k nárůstu či poklesu v množství pouze samotného NDH komplexu, byla provedena imunoanalýza vůči H podjednotce NDH komplexu na proteinových izolátech získaných z thylakoidních membrán všech pěstebních variant rostlin.

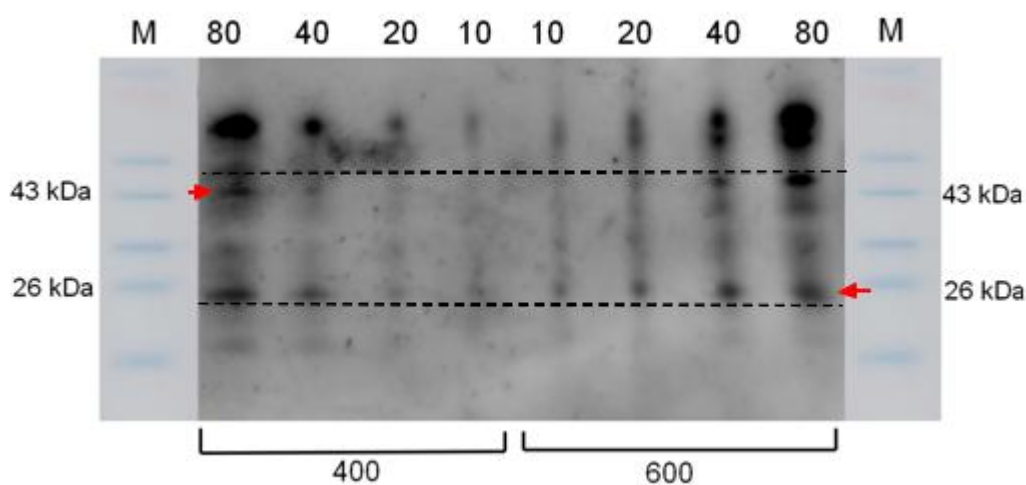
Nejprve byla optimalizována metodika za účelem nalezení vhodného množství proteinů nanášených do jedné elektroforetické jamky. Byla tedy provedena SDS-PAGE separace proteinů izolovaných ze všech pěstebních variant a nanášené množství proteinů bylo 10, 20, 40 a 80 μg proteinů na jamku. Výsledné membrány z provedené optimalizace imunoanalýzy jsou znázorněny na Obr. 20 až 22. Díky molekulovému hmotnostnímu markeru byla zvolena oblast, kde by se s největší pravděpodobností měla H podjednotka NDH komplexu vyskytovat. Jednalo se o oblasti s molekulovou hmotností 25 a 45 kDa. 45 kDa je očekávaná hmotnost proteinu a 25 kDa je zdánlivá hmotnost proteinu podle produktového listu výrobce protilátky.



Obrázek 20: Snímek membrány po provedeném Western blottingu vůči H podjednotce NDH komplexu. Čísla dole označují pěstební variantu 20 a 50 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují množství proteinů v μg nanášené do jamky SDS-PAGE gelu. Na okrajích jsou zobrazeny hmotnosti molekulového markeru. Místo výskytu H podjednotky NDH komplexu je vyznačeno přerušovanými čarami. Pásky, které NDH komplexům pravděpodobně odpovídají, jsou označeny šipkami.



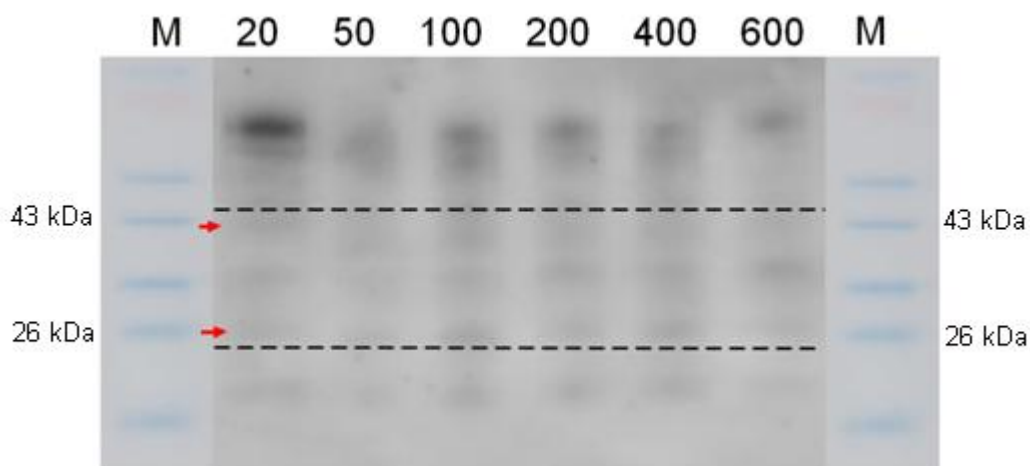
Obrázek 21: Snímek membrány po provedeném Western blottingu vůči H podjednotce NDH komplexu. Čísla dole označují pěstební variantu 100 a 200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují množství proteinů v μg nanášené do jamky SDS-PAGE gelu. Na okrajích jsou zobrazeny hmotnosti molekulového markeru. Místo výskytu H podjednotky NDH komplexu je vyznačeno přerušovanými čarami. Pásky, které NDH komplexům pravděpodobně odpovídají, jsou označeny šipkami



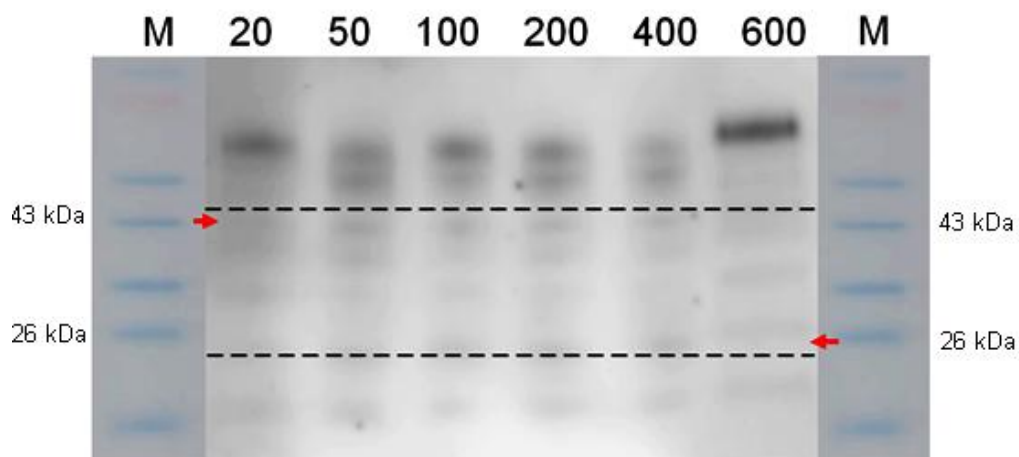
Obrázek 22: Snímek membrány po provedeném Western blottingu vůči H podjednotce NDH komplexu. Čísla dole označují pěstební variantu 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Čísla v záhlaví označují množství proteinů v μg nanášené do jamky SDS-PAGE gelu. Na okrajích jsou zobrazeny hmotnosti molekulového markeru. Místo výskytu H podjednotky NDH komplexu je vyznačeno přerušovanými čarami. Pásky, které NDH komplexům pravděpodobně odpovídají, jsou označeny šipkami

Na všech třech snímcích blotovacích membrán (Obr. 20 až 22) je patrné, že napříč pěstebními variantami nedocházelo ke zřetelnému poklesu ani nárůstu intenzity signálu v pásech odpovídajících podjednotce tohoto komplexu. Jak je ovšem možné usoudit z velkého množství pásů, protilátka vůči H podjednotce NDH komplexu se vážala nespecificky a dávala tak vzniknout falešnému signálu napříč celou membránou.

Z důvodu nespecifické vazby protilátky bylo tedy přistoupeno k důkladnějšímu promývání membrán promývacím TBS roztokem o vyšší koncentraci soli. Byla provedena SDS-PAGE separace proteinových izolátů ze všech pěstebních variant a množství proteinů nanášených na jednu jamku bylo 40 a 80 μg . Tato množství byla zvolena na základě předchozí optimalizace, kdy tato množství poskytla dostatečný signál. Snímky těchto membrán jsou znázorněny na Obr. 23 a 24.



Obrázek 23: Snímek membrány po provedeném Western blottingu vůči H podjednotce NDH komplexu při množství proteinů 40 μg nanášeném do jamky SDS-PAGE gelu. Čísla v záhlaví označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Na okrajích jsou zobrazeny hmotnosti molekulového markeru. Místo výskytu H podjednotky NDH komplexu je vyznačeno přerušovanými čarami. Pásky, které NDH komplexům pravděpodobně odpovídají, jsou označeny šipkami



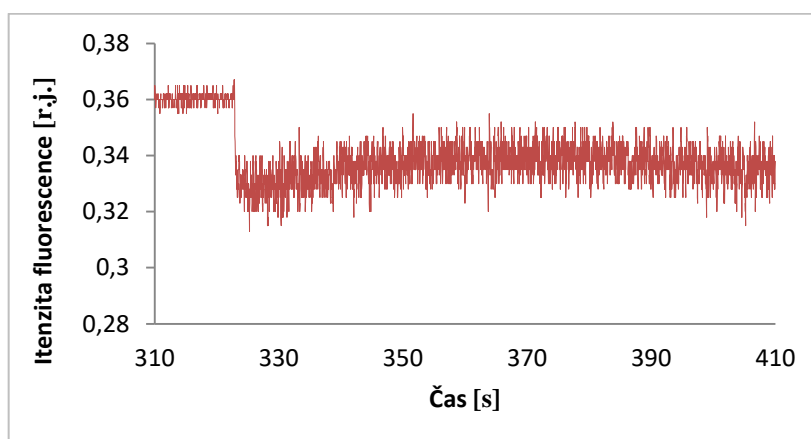
Obrázek 24: Snímek membrány po provedeném Western blottingu vůči H podjednotce NDH komplexu při množství proteinů 80 μg nanášeném do jamky SDS-PAGE gelu. Čísla v záhlaví označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Na okrajích jsou zobrazeny hmotnosti molekulového markeru. Místo výskytu H podjednotky NDH komplexu je vyznačeno přerušovanými čarami. Pásky, které NDH komplexům pravděpodobně odpovídají, jsou označeny šipkami

Na těchto membránách je patrné, že se i přes důkladnější promytí protilátka vázala nespecificky a signál byl detekovatelný na celé membráně. I zde bylo pomocí hmotnostního markeru určeno místo pravděpodobného výskytu H podjednotky NDH komplexu. Pásky přisouzené této podjednotce však naznačují, že nejspíše nedošlo k nárůstu ani poklesu v množství NDH komplexu u žádné z pěstební varianty rostlin.

5.2.3 Fluorescenční měření

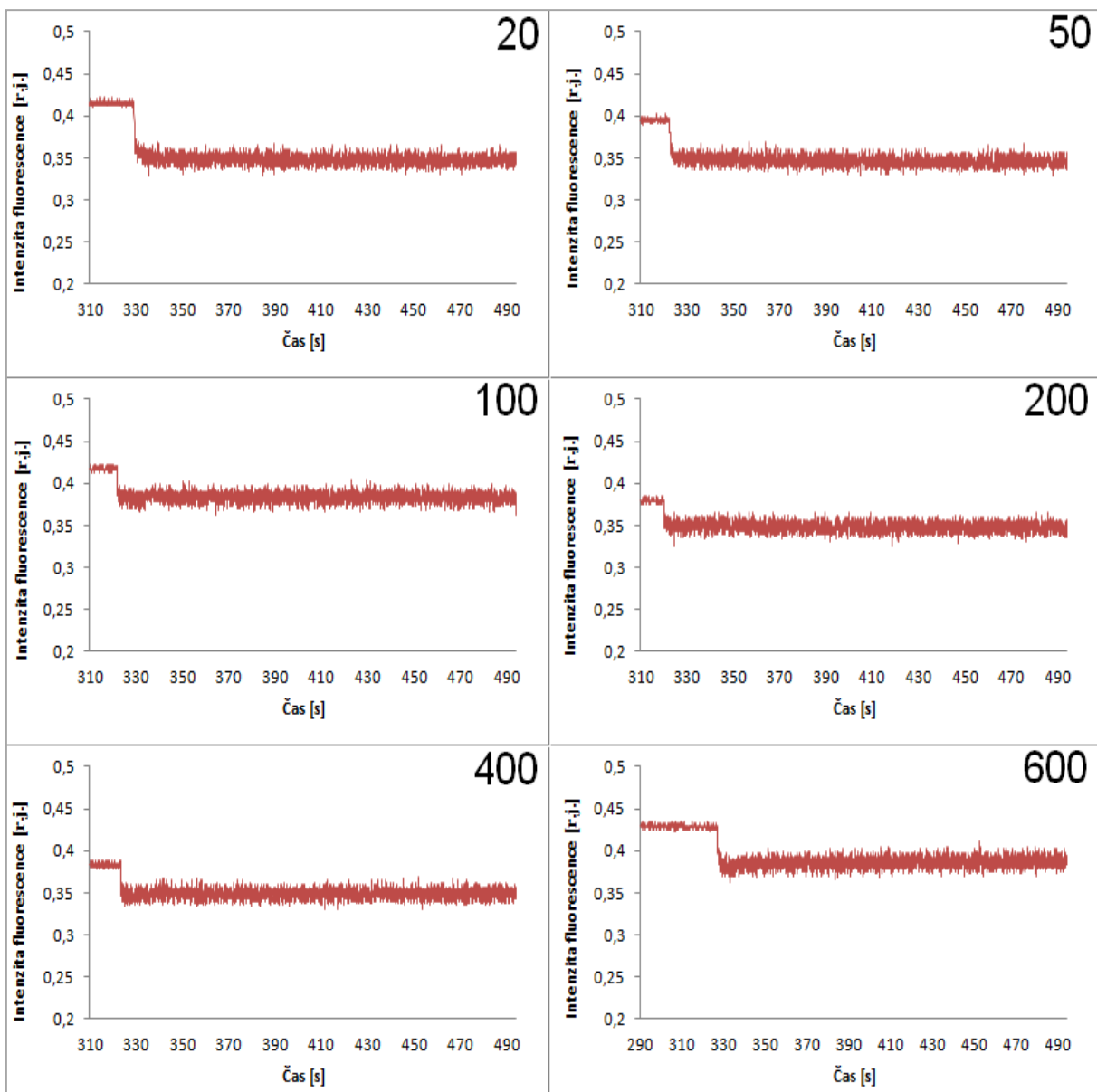
K fluorescenčnímu stanovení změn v množství PSI-NDH komplexu bylo přistoupeno z toho důvodu, že jak nativní elektroforéza, tak imunoanalýza nenaznačily žádné změny v množství PSI-NDH superkomplexu, ani samotného NDH komplexu u žádné z pěstebních variant rostlin.

K ověření účinnosti této techniky byla nejprve použita rostlina tabáku (*Nicotiana tabacum*), na základě studie Shikanaie *et al.*, 1998. (viz Obr. 25). Princip tohoto stanovení je založen na sledování nárůstu minimální fluorescence po vypnutí aktinického světla. Nárůst intenzity fluorescence je přisuzován spuštění cyklického elektronového transportu řízeného PSI-NDH komplexem a míra nárůstu fluorescence tedy odpovídá množství tohoto superkomplexu.



Obrázek 25: Ověření metodiky fluorescenčního stanovení množství PSI-NDH superkomplexu u tabáku (*Nicotiana tabacum*). Aktinické světlo bylo vypnuto v čase 320 s, nárůst fluorescence je pozorovatelný v čase 330 s – 350 s.

Jak je z Obr. 25 patrné, po vypnutí aktinického světla došlo k pozvolnému nárůstu minimální fluorescence. Na základě toho měření, které ověřilo funkčnost metodiky, se tedy přistouplilo k měření jednotlivých pěstebních variant rostlin. Výsledky měření jsou shrnuty na Obr. 26.



Obrázek 26: Srovnání nárůstu minimální fluorescence po vypnutí aktinického světa u jednotlivých pěstebních variant rostlin. Čísla v pravém rohu každého grafu označují varianty rostlin pěstovaných při intenzitě světla 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

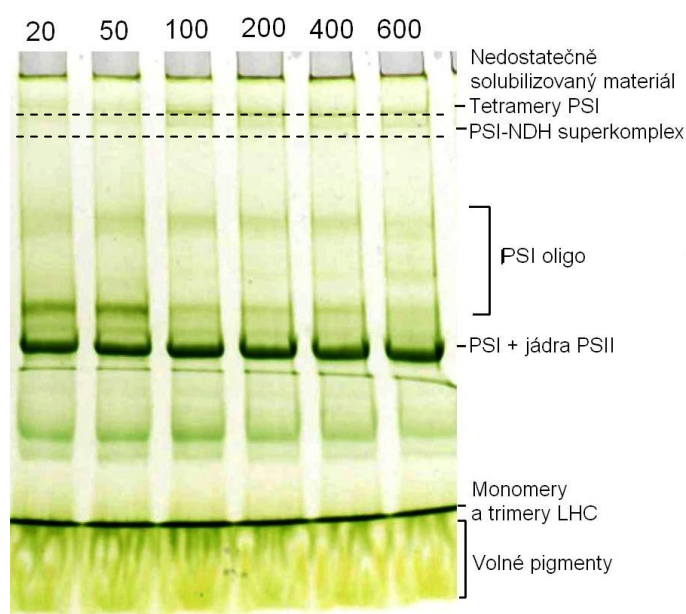
Z Obr. 26 je patrné, že u žádné z pěstebních variant rostlin nedocházelo po vypnutí aktinického světla k nárůstům minimální fluorescence, které by byly srovnatelné se srovnávacím měřením na tabáku (Obr. 25).

Všechna měření (CN-PAGE, imunoanalýza i fluorescence) provedená na ječmeni (*Hordeum vulgare* L.) naznačují, že různá intenzita pěstebního světla nemá výrazný vliv na množství PSI-NDH superkomplexu. Měnicí se pěstební světlo by však mohlo ovlivnit

strukturu superkomplexu, proto bylo provedeno snímkování PSI-NDH superkomplexu separovaného pomocí CN-PAGE transmisním elektronovým mikroskopem.

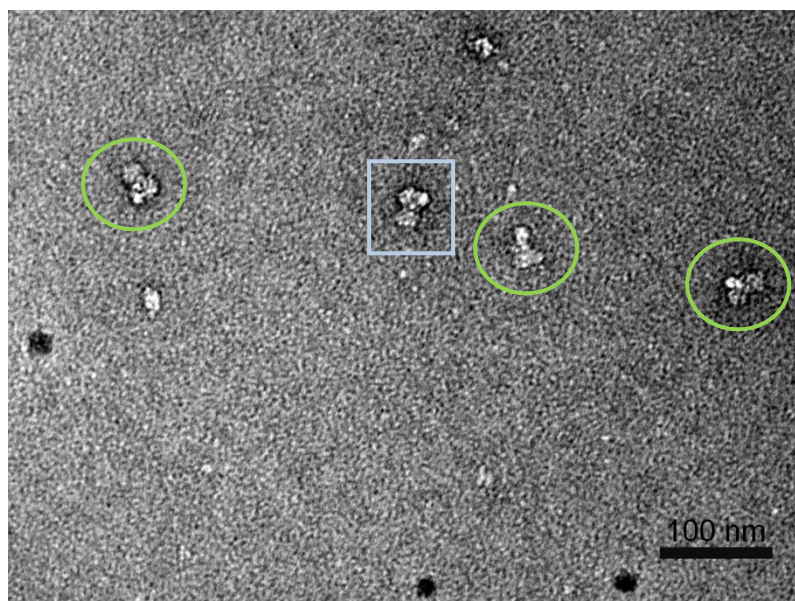
5.3 Strukturní analýza PSI-NDH superkomplexu

Pro posouzení vlivu různé intenzity pěstebního světla na strukturu PSI-NDH superkomplexu byly použity thylakoidní membrány izolované ze všech pěstebních variant rostlin solubilizované pomocí β -DM při hmotnostním poměru DM/chl 8. Solubilizované membrány byly následně separovány CN-PAGE (Obr. 27). Pásky odpovídající PSI-NDH byly vyřezány a použity pro přípravu vzorku pro elektronovou mikroskopii.

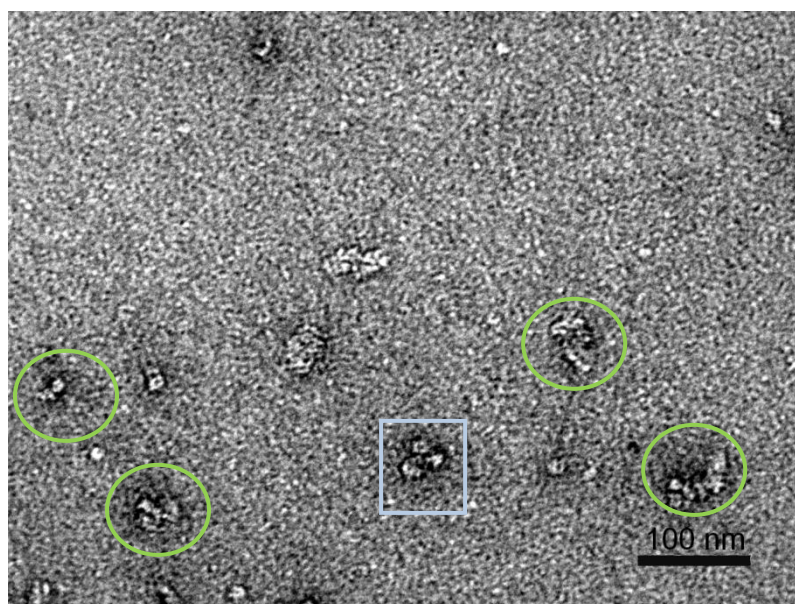


Obrázek 27: Elektroforetogram po provedené CN-PAGE thylakoidních membrán všech pěstebních variant rostlin solubilizovaných při hmotnostním poměru dodecyl- β -D-maltosidu k chlorofylu *a* a *b* 8. Čísla nahoře označují pěstební varianty 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Přerušované čáry označují pásky s PSI-NDH superkomplexem, které byly vyříznuty a použity pro účely elektronové mikroskopie.

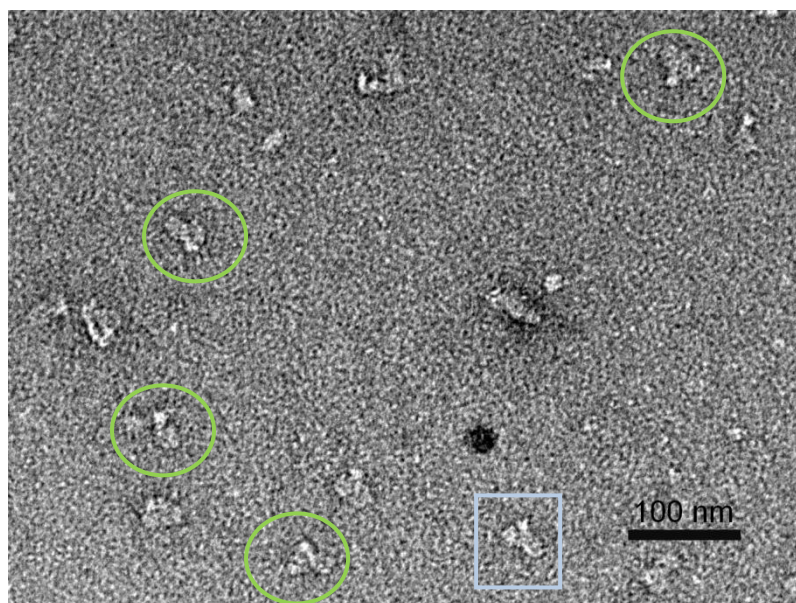
Na Obr. 28 až 33 jsou uvedeny snímky z elektronového mikroskopu vzorků PSI-NDH superkomplexu připravených ze všech pěstebních variant.



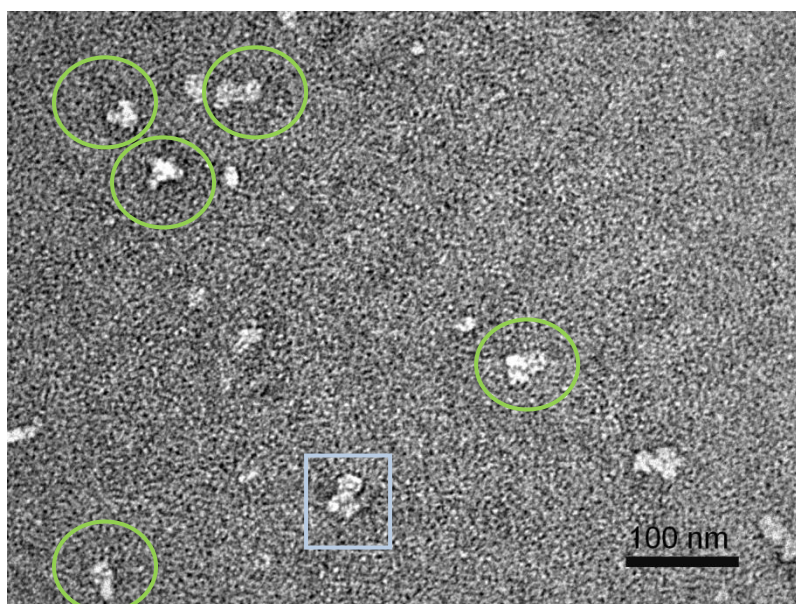
Obrázek 28: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu PSI-NDH superkomplexu izolovaného z pěstební varianty $20 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. PSI-NDH superkomplexy jsou zvýrazněny zeleným orámováním, v modrém rámečku je zvýrazněn nejlépe viditelný PSI-NDH superkomplex, použitý dále pro srovnání. Zvětšení $40\,000\times$.



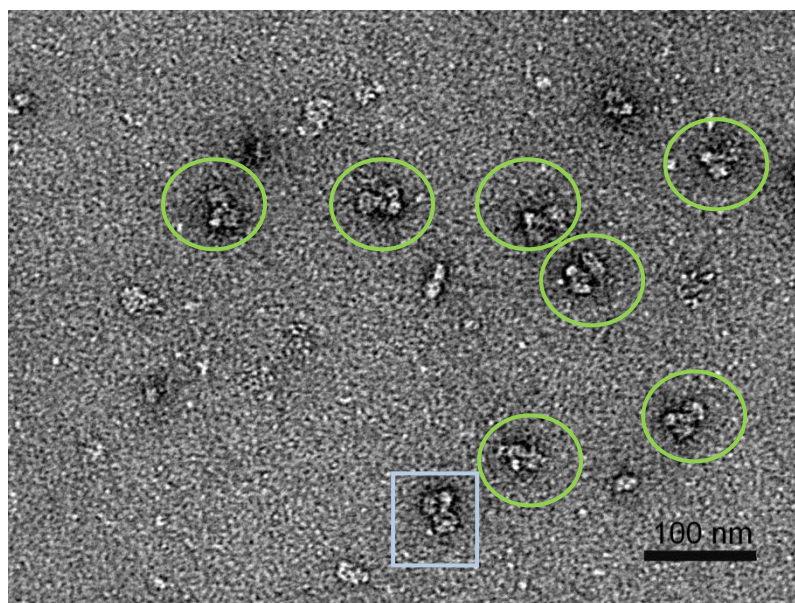
Obrázek 29: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu PSI-NDH superkomplexu izolovaného z pěstební varianty $50 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. PSI-NDH superkomplexy jsou zvýrazněny zeleným orámováním, v modrém rámečku je zvýrazněn nejlépe viditelný PSI-NDH superkomplex, použitý dále pro srovnání. Zvětšení $40\,000\times$.



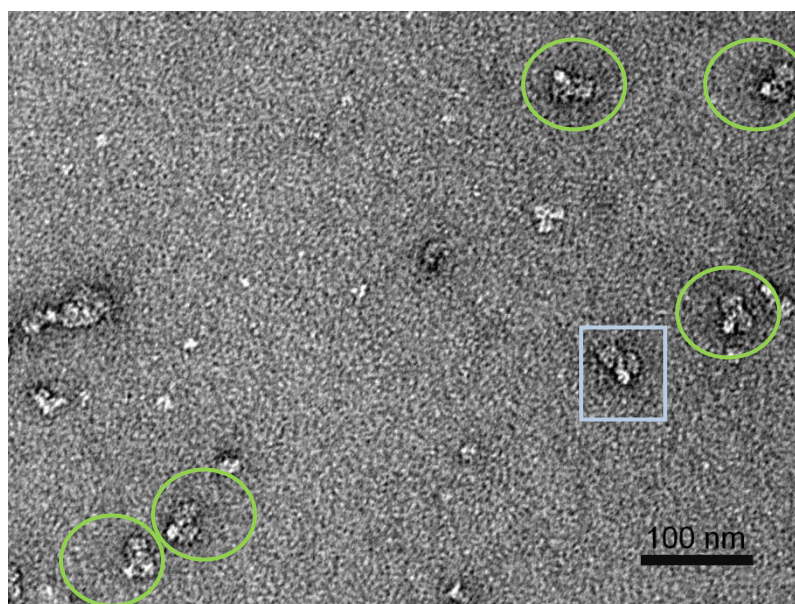
Obrázek 30: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu PSI-NDH superkomplexu izolovaného z pěstební varianty $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. PSI-NDH superkomplexy jsou zvýrazněny zeleným orámováním, v modrém rámečku je zvýrazněn nejlépe viditelný PSI-NDH superkomplex, použitý dále pro srovnání. Zvětšení $40\,000\times$.



Obrázek 31: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu PSI-NDH superkomplexu izolovaného z pěstební varianty $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. PSI-NDH superkomplexy jsou zvýrazněny zeleným orámováním, v modrém rámečku je zvýrazněn nejlépe viditelný PSI-NDH superkomplex, použitý dále pro srovnání. Zvětšení $40\,000\times$.

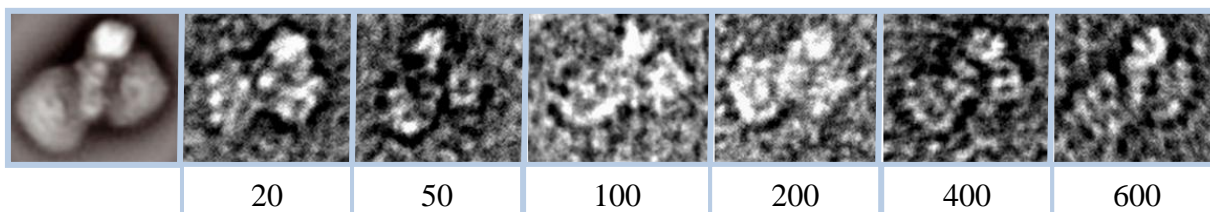


Obrázek 32: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu PSI-NDH superkomplexu izolovaného z pěstební varianty $400 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. PSI-NDH superkomplexy jsou zvýrazněny zeleným orámováním, v modrém rámečku je zvýrazněn nejlépe viditelný PSI-NDH superkomplex, použitý dále pro srovnání. Zvětšení $40\,000\times$.



Obrázek 33: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu PSI-NDH superkomplexu izolovaného z pěstební varianty $600 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. PSI-NDH superkomplexy jsou zvýrazněny zeleným orámováním, v modrém rámečku je zvýrazněn nejlépe viditelný PSI-NDH superkomplex, použitý dále pro srovnání. Zvětšení $40\,000\times$.

Pro posouzení strukturních změn PSI-NDH superkomplexu napříč různými pěstebními variantami rostlin byly z výše uvedených snímků vybrány nejlepší projekce PSI-NDH superkomplexu a srovnány s referenční strukturou PSI-NDH superkomplexu (Kouřil *et al.*, 2014). Srovnání projekci je uvedeno na Obr. 34.



Obrázek 34: Porovnání různých projekcí PSI-NDH komplexu. Vybrané projekce PSI-NDH superkomplexů ze snímků z transmisního elektronového mikroskopu jsou uvedeny v pravé části obrázku, čísla pod nimi označují pěstební variantu 20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V levé části je uvedena srovnávací struktura PSI-NDH superkomplexu ze studie Kouřil *et. al.* 2014. Zvětšení 40 000 \times .

6 Diskuze

Bylo nutné optimalizovat metodiku izolace PSI-NDH superkomplexu za účelem získání pásů s tímto komplexem v co nejvíce denzní podobě. Optimalizace CN-PAGE pro účely izolace PSI-NDH superkomplexu již proběhla ve studiích Kouřila *et al.*, 2014 či Noska, 2016, ale vzhledem k použitému širokému rozpětí intenzity pěstebního světla, která mohla ovlivnit odezvu rostlin na působení detergentu, bylo nutné metodiku znovu optimalizovat. Použito bylo široké rozmezí koncentrací detergentů, aby bylo možné posoudit dopad na solubilizaci membrán. Jako referenční byl použit hmotnostní poměr DM/chl 8, na základě již publikované studie Kouřila *et al.*, 2014. Vyšší hmotnostní poměry byly zvoleny, aby se zhodnotilo, zda při poměru 8 nedochází k nedostatečné solubilizaci membrán. Naopak nižší poměr (4) byl zvolen jako kontrolní, aby bylo možné posoudit, zda už tento nízký poměr není dostatečný a zda při vyšších poměrech DM/chl nedochází k poruše struktury PSI-NDH superkomplexu. Na elektroforetogramech, viz Obr. 6 až 11 je možné napříč všemi šesti pěstebními variantami vidět, že s rostoucím hmotnostním poměrem DM/chl docházelo k nárůstu denzity pásů odpovídajících PSII komplexům. Tento nárůst byl způsoben postupným pronikáním detergentu do gran a jejich účinnější solubilizací u zvyšujících se poměrů DM/chl. Se zvyšujícím se poměrem DM/chl docházelo též k vymizení oligomerů PSI, což bylo způsobeno pravděpodobně dvěma faktory. Prvním z nich je fakt, že PSI oligomery mohou být nestabilní, takže se zvyšující se koncentrací detergentu dochází k poruše jejich integrity. Druhým faktorem může být překrytí pásů na elektroforetogramu, které odpovídají oligomerům PSI, pásy se superkomplexy PSII, jejichž množství se zvyšuje s rostoucím poměrem DM/chl. Podobný efekt nárůstu denzity PSII komplexů s rostoucím poměrem DM/chl byl pozorován i jiných studiích zabývajících se separací fotosyntetických superkomplexů, např. Järvi *et al.* (2011) nebo Nosek (2016). U nižších poměrů DM/chl 4 a 8 byly patrné pouze pásy, které odpovídaly PSI, jelikož docházelo pouze k solubilizaci stromatu, ve kterém se PSI převážně vyskytuje. Z elektroforetogramů je dále vidět, že s rostoucím poměrem DM/chl ubýval nesolubilizovaný materiál ze dna jamek. Jak je dále možné z Obr. 6 až 11 vidět, s rostoucím poměrem DM/chl nedocházelo na první pohled k žádným změnám v denzitě pásů odpovídajících PSI-NDH superkomplexu. K detailnější kvantifikaci však bylo potřeba provést denzitometrickou analýzu.

Na základě provedené optimalizace byly zvoleny čtyři poměry DM/chl. Poměr DM/chl 8 byl zvolen jako referenční na základě studie Kouřila *et al.*, 2014, u kterého bylo

zaručeno, že PSI-NDH superkomplex bude izolován v intaktní podobě. Tři další poměry byly zvoleny z důvodu zajištění kvantitativní izolace PSI-NDH superkomplexu z thylakoidních membrán. Jednalo se o poměry DM/chl 16, 20 a 24. Byla provedena elektroforetická separace u všech šesti pěstebních variant při zvolených poměrech, viz Obr. 12 až 15. Ze snímků těchto elektroforetogramů byla následně provedena denzitometrická analýza, jež je možné vidět na Obr. 16 až 19. Denzitometrická analýza potvrdila předchozí odhad, že nedochází ke změnám v denzitě pásů s PSI-NDH superkomplexem napříč jednotlivými pěstebními variantami, ale ani napříč rostoucí koncentrací detergentu. Tento jev je pravděpodobně způsoben faktem, že PSI-NDH superkomplex hraje roli v ochraně rostlin před stresovými podmínkami, a je tak komplexem velmi odolným. Na Obr. 16 lze sice pozorovat nepatrné výkyvy v denzitách pásů s PSI-NDH superkomplexem napříč pěstebními variantami. Tyto změny v denzitách však byly pravděpodobně způsobeny rozostřením pásů v gelu, jelikož celková plocha pod denzitometrickou křivkou náležející PSI-NDH superkomplexu napříč pěstebními variantami je shodná.

Výsledky CN-PAGE spojené s denzitometrickou analýzou poukázaly na to, že s rostoucí intenzitou pěstebního světla nedochází ke zřetelným změnám v množství PSI-NDH superkomplexu napříč různými pěstebními variantami rostlin. Přistoupilo se tedy k ověření, zda se tak opravdu děje, či zda nedochází k nárůstu pouze samotného NDH komplexu, a to pomocí imunoanalýzy (Western blottingu). Výsledné membrány z provedené imunoanalýzy lze pozorovat na Obr. 20 až 24.

Na těchto membránách je možné vidět, že zvolená protilátka proti H podjednotce NDH komplexu se vážala nespecificky. K nespecifické vazbě protilátky bohužel docházelo i přesto, že byl použit účinnější vymývací protokol, který měl nespecifické vazbě protilátky zabránit (vymývání membrány bylo provedeno roztoky s vyšší koncentrací solí). Nebylo tak možné jednoznačně určit, který z pásů odpovídal H podjednotce NDH komplexu. Nespecificita vazby protilátky mohla být způsobena tím, že použitá protilátka byla navržena proti sekvenci H podjednotky NDH komplexu z rýže seté (*Oryza sativa*). Ovšem porovnáním sekvence H podjednotky NDH komplexu z rýže se sekvencí stejného proteinu z ječmene bylo zjištěno, že mezi oběma proteiny je velmi vysoká homologická zaručující účinnou vazbu protilátky. Tento fakt byl následně ověřen i konzultací s výrobcem protilátky. I přesto vysokou homologii se však protilátka vážala nespecificky. Imunoanalýzou tedy nebylo možné s jistotou potvrdit nárůst ani pokles produkce NDH komplexu mezi jednotlivými pěstebními variantami rostlin.

K fluorescenčnímu měření bylo přistoupeno z toho důvodu, že ani jedna z předešlých použitých metod (CN-PAGE spojená s denzitometrií, imunoanalýza) nepotvrdila žádné změny v množství PSI-NDH superkomplexu, ani samotného NDH komplexu u žádné z pěstebních variant rostlin. Nejprve bylo nutné ověřit, zda je tato metoda průkazná. K ověření byla použita rostlina tabáku (*Nicotiana tabacum*), na základě studie Shikanaie *et al.*, 1998 (viz Obr. 25). Měření ukázalo, že skutečně dochází k nárůstu minimální fluorescence u této referenční rostliny, která je přisuzována funkci PSI-NDH superkomplexu. Jak ovšem ukazuje Obr. 26, po vypnutí aktinického světla nedošlo k žádným zřetelným nárůstům minimální fluorescence u žádné z pěstebních variant rostlin ječmene. Tato skutečnost může být způsobena tím, že změny v intenzitě pěstebního světla nebyly pro ječmen tak významné, aby došlo ke změně v tvorbě PSI-NDH superkomplexu či aby došlo k iniciaci zvýšeného cyklického elektronového transportu zprostředkovaného PSI-NDH superkomplexem. Je tedy možné, že cyklický elektronový transport je u ječmene (*Hordeum vulgare*) řízen především PGRL1/PGR5 dráhou, což ovšem nelze s jistotou potvrdit, neboť nejsou k dispozici přímé důkazy. Nepřímé důkazy, tedy CN-PAGE spolu s denzitometrickou analýzou, fluorescenční měření a imunoanalýza, nicméně poukázaly na to, že jelikož pravděpodobně nedochází ke změnám v produkci PSI-NDH superkomplexu, je pravděpodobné, že cyklický elektronový transport zprostředkovaný PSI-NDH superkomplexem je zanedbatelný. Další možností je skutečnost, že se změnou v intenzitě pěstebního světla dochází pouze k nepatrné změně v množství PSI-NDH superkomplexu a že zvolené metody nebyly schopné její detekce.

Po zjištění, že pravděpodobně nedochází ke změnám v množství PSI-NDH superkomplexu napříč jednotlivými pěstebními variantami rostlin pěstovaných při různých intenzitách světla, byla provedena i strukturní analýza tohoto superkomplexu, aby se zjistilo, zda případné strukturní změny nemají vliv na roli cyklického elektronového transportu zprostředkovaného PSI-NDH superkomplexem. Strukturní analýza byla pouze doplňkovou metodou této práce. Bylo provedeno zhruba porovnání jednotlivých PSI-NDH superkomplexů ze snímků pořízených transmisí elektronovou mikroskopií (Obr. 28 až 33) a následně byly srovnány se strukturou PSI-NDH superkomplexu ze studie Kouřila *et al.*, 2014 (Obr. 34). Ze snímků je jednak patrné, že vzorky PSI-NDH komplexů nebyly příliš kontaminované cizorodými komplexy, což svědčí o účinnosti použité separační metody. Dále je zřejmé, že samotné superkomplexy se ve vzorcích vyskytovaly ve své neporušené struktuře, což poukazuje na kvalitu a šetrnost separace pomocí CN-PAGE. Dále se ukázalo, že vlivem různé

intenzity pěstebního světla nedošlo k žádným zřetelným změnám ve struktuře PSI-NDH superkomplexu. Jelikož však detailní strukturální studie nebyla hlavním cílem této práce, zůstává objasnění případných strukturních změn předmětem dalšího zkoumání.

7 Závěr

Teoretická část bakalářská práce byla věnována problematice PSI-NDH superkomplexu. V teoretické části práci byly shrnuty dosavadní poznatky, týkající se tohoto superkomplexu. Studie, které by se ovšem věnovaly problematice různé intenzity světla na PSI-NDH superkomplex, nebyly doposud publikovány. Praktická část této práce se proto věnovala vlivu intenzity pěstebního světla na produkci tohoto superkomplexu. Za tímto účelem bylo vypěstováno šest variant ječmene setého (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos), pěstovaných při šesti rozdílných intenzitách světla (20, 50, 100, 200, 400 a 600 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Aby byla zajištěna co nejkvalitnější izolace PSI-NDH superkomplexu z těchto rostlin, byla optimalizována metoda CN-PAGE.

K posouzení vlivu intenzity pěstebního světla byly zvoleny metody imunoanalýzy, fluorometrie a denzitometrie. Ani jedna z těchto metod však nepotvrdila nárůst ani pokles v produkci PSI-NDH superkomplexu napříč pěstebními variantami rostlin.

Byla tedy provedena i zběžná analýza případných změn ve struktuře PSI-NDH superkomplexu transmisí elektronovou mikroskopií. Ta však nenaznačila žádné znatelné změny struktury PSI-NDH superkomplexu u žádné z pěstebních variant rostlin.

8 Seznam použitých zkratek

| | |
|----------------------|---|
| AL | Aktinické světlo |
| CET | Cyklický elektronový transport |
| CN-PAGE | Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu |
| FNR | Ferredoxin-NADP ⁺ reduktasa |
| Cyt b ₆ f | Cytochrom b ₆ f |
| ACA | Aminokapronová kyselina |
| APS | Peroxodisíran amonný |
| Asc | Askorbát sodný |
| BN-PAGE | Modrá nativní elektroforéza |
| BSA | Hovězí sérový albumin |
| DM | Dodecyl-β-D-maltosidem |
| EDTA-Na | Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl |
| Fd | Ferredoxin |
| FNR | Ferredoxin-NADP ⁺ oxidoreduktasa |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina |
| LET | Lineární elektronový transport |
| LHCI | Světloběrný komplex fotosystému I |
| LHCII | Světloběrný komplex fotosystému II |
| ML | Měřicí světlo |
| NDH | NAD(P)H dehydrogenasa |
| OEC | Kyslík vyvíjející komplex |
| PGR5 | Proton gradient regulativ 5 komplex |

| | |
|------------------|---|
| PGRL1 | Proton gradient regulativ like 1 komplex |
| PQ | Plastochinonový „pool“ |
| PQH ₂ | Plastohydrochinon |
| PSI | Fotosystém I |
| PSII | Fotosystém II |
| Q _A | Plastochinon A |
| Q _B | Plastochinon B |
| ROS | Reaktivní forma kyslíku |
| SDS | Dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | Elektroforéza na polykarylamidovém gelu s detergentem dodecylsíránem sodným |
| SEM | Skenovací elektronová mikroskopie |
| TCA | Trichloroctová kyselina |
| TEM | Transmisní elektronová mikroskopie |
| Tricin | N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin |
| Tris | 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol |

9 Literatura

- Allen, J.F., Forsberg, J. (2001): Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science* 6: 317-326.
- Amunts, A., Nelson, N. (2008): Functional organization of a plant photosystem I: Evolution of a highly efficient photochemical machine. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 228-237.
- Amunts, A., Drory, O., Nelson, N. (2007): The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 angstrom resolution. *Nature* 447: 58-63.
- Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A., Nelson, N. (2010): Structure Determination and Improved Model of Plant Photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 285: 3478-3486.
- Anderson, J. M., Boardman, N. K. (1966): Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* 112: 403-421.
- Baradaran, R., Berrisford, J.M., Minhas, G.S., Sazanov, L.A. (2013): Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494: 443-448.
- Battchikova, N., Eisenhut, M., Aro, E.M. (2011): Cyanobacterial NDH-1 complexes: novel insights and remaining puzzle. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807: 935-944.
- Bengis, C., Nelson, N. (1975): Purification and Properties of the Photosystem I Reaction Center from Chloroplasts. *The Journal Of Biological Chemistry* 250: 2783-2788.
- Ben-Shem, A., Frolov, F., Nelson, N. (2003). Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426: 630-635.
- Ben-Shem, A., Frolov, F., Nelson, N. (2003): Evolution of photosystem I-from symmetry through pseudo-symmetry to asymmetry. *FEBS Letters* 564: 274–80.
- Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevskaya, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K.P., Pistorius, E.K., Kruip, J. (2001): A giant chlorophyll protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* 412: 745–748.
- Braukmann, T.W., Kuzmina, M., Štefanovič, S. (2009): Loss of all plastid ndh in Gnetales and conifers: extent and evolutionary significance for the seed plant phylogeny. *Curr Genet* 55: 323-337.

- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jonnes R.L. (2015): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Wiley Blackwell, ASPB, West Sussex, UK.
- Caffarri, S., Kouril, R., Kereiche, S., Boekema, E.J., Croce, R. (2009): Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *Embo Journal* 28, 3052- 3063.
- Casano, L.M., Martin, M., Sabater, B. (2001): Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplast NDH complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiology* 125: 1450-1458.
- Croce, R., G. Canino, F. R., Bassi, R. (2002): Chromophores Organization in the Higher Plant Photosystem II Antenna Protein CP26. *Biochemistry*. 41:7334–7343.
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schunemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., Leister, D. (2008): A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132: 273-285.
- Dey, P.M., Harborne, J.B. (1997): *Plant Biochemistry*. Academic Press, London.
- Dupuy, C., Auvray, X., Petipas, C. (1997): Anomeric Effects on the Structure of Micelles of Alkyl Maltosides in Water. *Langmuir* 13: 3965–3967.
- Farah, J., Rappaport, F., Choquet, Y., Joliot, P., Rochaix, J.D. (1995): Isolation of a a PsaF-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*: efficient interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center is mediated by the PsaF subunit. *Embo Journal* 14: 4976-4984.
- Fischer, N., Boudreau, E., Hippler, M., Drepper, F., Haehnel, W., Rochaix, J.D. (1999): A large fraction of PsaF is nonfunctional in photosystem I complexes lacking the PsaJ subunit. *Biochemistry* 38: 5546-5552.
- Govindjee, Kern, J.F., Messinger, J., Whitmarsh, J. (2010): Photosystem II. *Encyclopedia of Life Sciences*. ohn Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Haldrup, A., Naver, H., Scheller, H.V. (1999): The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant Journal* 17: 689-698.

- Haldrup, A., Simpson, D.J., Scheller, H.V. (2000): Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana* - The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31211-31218.
- Hayashida, N., Matsubayashi, T., Shinozaki, K., Sugiura, M., Inoue, K., Hiyama, T. (1987): The gene for the 9 kD polypeptide, a possible apoprotein for the iron-sulfur center-A and center-B of the photosystem I complex, in tobacco chloroplast DNA. *Current Genetics* 12: 247-250.
- Helenius, A., Simons, K. (1975): Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica Et Biophysica Acta* 415: 29-79.
- Hertle, A.P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U., Leister, D. (2013): PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic flow. *Molecular Cell* 49: 511-523.
- Hoj, P.B., Svendsen, I., Scheller, H.V., Moller, B.L. (1987): Identification of a Chloroplast-encoded 9-kDa Polypeptide as a 2[4FE-4S] Protein Carrying Centers A and B of Photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 262: 12676-12684.
- Chitnis, V.P., Chitnis, P.R. (1993): PSaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC-6803. *FEBS Letters* 336: 330-334.
- Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T., Aro, E.M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear encoded subunits. *Plant Cell Physiology* 52:1560-1568.
- Ihalainen, J. A., Gobets, B., Sznee, K., Brazzoli, M., Croce, R., Bassi, R., van Grondelle, R., Korppi-Tommola, J.E.I., Dekker, J.P. (2000): Evidence for two spectroscopically different dimers of light-harvesting complex I from green plants. *Biochemistry* 39: 8625–8631.
- Ishihara, S., Takabayashi, A., Ido, K., Endo, T., Ifuku, K., Sato, F. (2007): Distinct Functions for the Two PsbP-Like Proteins PPL1 and PPL2 in the Chloroplast Thylakoid Lumen of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145: 668-679.

- Ishikawa, N., Takabayashi, A., Ishida, S., Hano, Y., Endo, T., Sato, F. (2008): NDF6: a thylakoid protein specific to terrestrial plants is essential for activity of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* 49: 1066–1073.
- Jansson, S. (1994): The light-harvesting chlorophyll A/B binding-proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1184: 1-19.
- Jansson, S. (1999): A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 4: 236-240.
- Jansson, S., Andersen, B., Scheller, H.V. (1996): Nearest-neighbor analysis of higherplant photosystem I holocomplex. *Plant Physiology* 112: 409-420.
- 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.
- Jensen, P.E., Bassi, R., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H.V. (2007): Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1767: 335-352.
- Jensen, P.E., Haldrup, A., Zhang, S.P., Scheller, H.V. (2004): The PSI-O subunit of plant photosystem I is involved in balancing the excitation pressure between the two photosystems. *Journal of Biological Chemistry* 279: 24212-24217.
- Johnson, G.N. (2011): Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807: 384-389.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauss, N. (2001): Threedimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution. *Nature* 411: 909-917.
- Klimmek, F., Sjodin, A., Noutsos, C., Leister, D., Jansson, S. (2006): Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiology* 140: 793-804.
- Knoetzel, J., Mant, A., Haldrup, A., Jensen, P.E., Scheller, H.V (2002): PSI-O, a new 10-kDa subunit of eucariotci photosystem I. *Federation of European Biochemical Societies* 510: 145-8.

- Kouřil, R., Strouhal, O., Nosek, L., Lenobel, R., Chamrad, I., Boekema, E.J., Šebela, M., Ilik, P. (2014): Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex. *The Plant Journal* 77: 568-576.
- Kouřil, R., Zygadlo, A., Arteni, A.A., de Wit, C.D., Dekker, J.P., Jensen, P.E., Scheller, H.V., Boekema, E.J. (2005): Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 44: 10935- 10940.
- Liebl, U., Mockenstrum-Wilson, M., Trost, J., Brune, D., Blankenship, R., Vermaas, W. (1993): Single core polypeptide in the reaction center of the photosynthetic bacterium *Helicobacillus mobilis*: structural implications and relations to other photosystems. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 90: 7124-7128.
- Lichtenthaler, H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lunde, C., Jensen, P.E., Haldrup, A., Knoetzel, J., Scheller, H.V. (2000): The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* 408: 613-615.
- Mazor, Y., Borovikova, A., Nelson, N. (2015): The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 angstrom resolution. *Elife* 4.
- Mi, H., Endo, T., Asada, K. (1995): Thylakoid membrane-bound, NADPH-specific pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediates cyclic electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* *Plant Cell Physiology* 36: 661-668.
- Mi, H., Endo, T., Schreiber U., Ogawa T., Asada, K. (1994): NAD(P)H-dehydrogenase dependent cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: a study of dark-starved cells and spheroplasts, *Plant Cell Physiology* 35: 163-173.
- Miyake, C. (2010): Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions. *Plant Cell Physiology* 51: 1951–1963.

Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., Shikanai, T. (2004): Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579–582.

Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., Shikanai, T. (2002): PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 361-371.

Nelson, N. (2009): Plant Photosystem I - The Most Efficient Nano-Photochemical Machine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 9: 1709-1713.

Nosek, L. (2012): Použití 2D-CN/SDS-PAGE ke sledování změn v zastoupení pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán stresovaných rostlin. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Nosek, L. (2016): Structural characterization of photosynthetic supercomplexes in plants. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., Ozeki, H. (1986): Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.

Okegawa, Y., Kagawa, Y., Kobayashi, Y., Shikanai, T. (2008): Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 49: 825–834.

Pavlovič, A., Stolařík, 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.

Pearcy, R.W. (1990): Sunflecks and photosynthesis in plant canopies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 421-452.

Peng, L.W., Fukao, Y., Fujiwara, M., Takami, T., Shikanai, T. (2009): Efficient Operation of NAD(P)H Dehydrogenase Requires Supercomplex Formation with Photosystem I via Minor LHCI in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 3623-3640.

Peng, L.W., Shikanai, T. (2011): Supercomplex Formation with Photosystem I Is Required for the Stabilization of the Chloroplast NADH Dehydrogenase-Like Complex in Arabidopsis. *Plant Physiology* 155: 1629-1639.

Peng, L.W., Shimizu, H., Shikanai, T. (2008): The Chloroplast NAD(P)H Dehydrogenase Complex Interacts with Photosystem I in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 283: 34873-34879.

Peng, L.W., Yamamoto, H., Shikanai, T. (2011): Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochimica Et Biophysica Acta Bioenergetics* 1807: 945-953.

Procházka, S. (1998): *Fyziologie rostlin*. Academia. Praha.

Rochaix, J.D. (2011): Regulation of photosynthetic elektron transport. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807: 375-383.

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.

Shikanai, T. (2007): Regulation of photosynthesis via PSI cyclic electron transport. *Photosynthesis Research* 91: 246-246.

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

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchishinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., Sugiura, M. (1986): The komplette nukleotide-sequence of the tabacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *Embo Journal* 5: 2043-2049.

Schagger, 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 2-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217: 220-230.

- Schägger, H., von Jagow, G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199: 223-231.
- Schagger, H., Vonjagow, G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane-protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199: 223-231.
- Schmid, V., H., Cammarata, K.V., Bruns B.U., Schmidt, G., W. (1997): In vitro reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 7667-7672.
- Suorsa, M., Sirpiö, S., Paakkarinen, V., Kumari, N., Holmström, M., Aro, E.M. (2010): Two proteins homologous to PsbQ are novel subunits of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase. *Plant Cell Physiology* 51: 877–883.
- Takahashi, S., Badger, M. R. (2011): Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Science* 16: 53–60.
- Tittgen, J., Hermans, J., Steppuhn, J., Jansen, T., Jansson, B., Andersson, B., Nechushtai, R., Nelson, N., Herrmann, R.G. (1986): Isolation of cDNA clones for fourteen nuclear-encoded thylakoid membraneproteins. *Molecular Genetics and Genomics* 204: 258–265.
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Sugiura, M. (1994): Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergi*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 9794-9798.
- 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: 69-74.
- Wientjes, E., Oostergetel, G.T., Jansson, S., Boekema, E.J., Croce, R. (2009): The Role of Lhca Complexes in the Supramolecular Organization of Higher Plant Photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 284: 7803-7810.
- Wittig, I., Karas, M., Schägger, H. (2007): High resolution clear native electrophoresis for In-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 1215-1225.

- Wittig, I., Schagger, H. (2005): Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5, 4338-4346.
- Yabuta, S., Ifuku, K., Takabayashi, A., Ishihara, S., Ido, K., Ishikawa, N., Endo, T., Sato, F. (2010). Three PsbQ-like proteins are required for the function of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 51: 866–876.
- Yamamoto, H., Peng, L.W., Fukao, Y., Shikanai, T. (2011): An Src Homology 3 DomainLike Fold Protein Forms a Ferredoxin Binding Site for the Chloroplast NADH Dehydrogenase-Like Complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1480-1493.
- Yamori, W., Shikanai, T., Makino, A. (2015): Photosystem I cyclic electron flow via chloroplast NADH dehydrogenase-like complex performs a physiological role for photosynthesis at low light. *Scientific Reports* 5.
- Zhang, S.P., Scheller, H.V. (2004): Light-harvesting complex II binds to several small Subunits of photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 279: 3180-3187.