

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Použití 2D-CN/SDS-PAGE ke sledování změn
v zastoupení pigment-proteinových komplexů
thylakoidních membrán stresovaných rostlin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Autor: | Bc. Lukáš Nosek |
| Studijní program: | M1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 23. 4. 2012 |

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

V Olomouci dne

Lukáš Nosek

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce prof. RNDr. Petru Ilíkovi, Ph.D. za pomoc a rady, které mi v průběhu práce poskytl a za poskytnuté zázemí pro bezproblémový průběh všech experimentů. Děkuji také Mgr. Ondřeji Strouhalovi za odbornou pomoc při řešení experimentální části práce a za poskytnuté konzultace. Chtěl bych také poděkovat prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za pomoc a vstřícný přístup při měření na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru.

Bibliografická identifikace:

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Lukáš Nosek |
| Název práce | Použití 2D-CN/SDS-PAGE ke sledování změn v zastoupení pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán stresovaných rostlin |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2012 |
| Abstrakt | <p>V práci se zabývám problematikou dvourozměrné nativní polyakrylamidové elektroforézy (PAGE) a její aplikace při studiu vlivu vysokoteplotního a světelného stresu na kompozici pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán. Teoretická část pojednává o přednostech a nedostatcích techniky bezbarvé nativní elektroforézy (CN-PAGE). Tato technika je v dnešní době široce používaným nástrojem pro separaci proteinových komplexů a její hlavní předností je možnost separace komplexů s vysokým stupněm intaktnosti. V teoretické části je dále pojednáváno o složení fotosystémů I a II, jejich funkci a především o vlivu vysoké teploty a vysoké intenzity světla na jejich kompozici.</p> <p>V experimentální části je pojednáno o separaci vysokomolekulárních pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán pomocí CN-PAGE (první rozměr) s následnou identifikací pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF nebo pomocí LC-MS/MS. Hlavním výsledkem je úspěšná separace superkomplexů s fotosystémem I a II a zhodnocení jejich stability při vysokoteplotním stresu. Při použití nízké koncentrace neiontového detergentu (dodecyl maltosidu) se podařilo pomocí této metody separovat superkomplexy s fotosystémem I, které obsahují podjednotky enzymu NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasy.</p> |
| Klíčová slova | Bezbarvá nativní elektroforéza, CN-PAGE, pigment-proteinové komplexy, thylakoidní membrány, vysokoteplotní stres, světelný stres, NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa, fotosystém I, fotosystém II, <i>Hordeum vulgare</i> |
| Počet stran | 91 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification:

| | |
|--------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Bc. Lukáš Nosek |
| Title | Usage of 2D-CN/SDS-PAGE for determination of changes in pigment-protein complexes from thylakoid membranes of stressed plants |
| Type of thesis | Master |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | prof. RNDr. Petr Ilík, Ph.D. |
| The year of presentation | 2012 |
| Abstrakt | <p>I deal with problematics of two dimensional native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in this thesis and with it's application for determination of impact of heat and light stress on composition of pigment-protein complexes from thylakoid membranes.</p> <p>The theoretical part discusses about advantages and disadvantages of the clear-native electrophoresis (CN-PAGE). This technique is nowadays widely used for separation of pigment-protein complexes and it's main advantage is the possibility to remain the separated complexes in highly native state. In the theoretical part is further discussed about composition of photosystems I and II, their function and mainly about impact of high temperature and high intensity of light on their composition.</p> <p>The experimental part is focused on separation of high molecular-mass pigment-protein complexes from thylakoid membranes by CN-PAGE in first dimension with consequential identification of the subunits by SDS-PAGE and MALDI-TOF or by LC-MS/MS. The main result of this work is succesful separation of supercomplexes of photosystems I and II and assessment of their stability in high-temperature stress. Supercomplexes of photosystem I with NAD(P)H:quinone-oxidoreductase were obtained when low concentration of non-ionic detergent dodecyl-maltoside was used.</p> |
| Keywords | Clear-native electrophoresis, CN-PAGE, pigment containing protein complexes, thylakoid membranes, heat stress, light stress, NAD(P)H:quinone-oxidoreductase, photosystem I, photosystem II, <i>Hordeum vulgare</i> |
| Number of pages | 91 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

Obsah

| | |
|--|--------|
| Cíle práce | - 7 - |
| TEORETICKÁ ČÁST | - 8 - |
| 1. Úvod..... | - 9 - |
| 2. Bezbarvá nativní PAGE..... | - 9 - |
| 2.1. Původní CN-PAGE | - 10 - |
| 2.2. High resolution CN-PAGE | - 11 - |
| 2.2.1. Detergenty používané pro solubilizaci proteinů u hrCN-PAGE .. | - 12 - |
| 2.2.2. Poddruhy hrCN-PAGE | - 14 - |
| 2.2.3. Výběr vhodného detergentu a jeho koncentrace | - 16 - |
| 2.2.4. Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci | - 17 - |
| 2.2.5. Elektroforéza | - 17 - |
| 2.3. Shrnutí výhod CN- a hrCN-PAGE..... | - 19 - |
| 3. Vliv stresových faktorů na fotosyntetický aparát..... | - 19 - |
| 3.1. Struktura a funkce fotosyntetického aparátu..... | - 19 - |
| 3.1.1. Fotosystém I..... | - 20 - |
| 3.1.2. Fotosystém II..... | - 22 - |
| 3.2. Světelný stres a fotoinhibice | - 24 - |
| 3.2.1. Fotoinhibice PSI | - 24 - |
| 3.2.2. Fotoinhibice PSII | - 26 - |
| 3.3. Teplotní stres..... | - 28 - |
| 3.3.1. Vliv zvýšené teploty na PSII | - 28 - |
| 3.3.2. Vliv zvýšené teploty na PSI..... | - 29 - |
| EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | - 32 - |
| 4. Použitý materiál..... | - 33 - |
| 4.1. Rostlinný materiál | - 33 - |
| 4.2. Knopův roztok..... | - 33 - |
| 5. Použité chemikálie | - 34 - |
| 6. Použité metody | - 35 - |
| 6.1. Izolace thylakoidních membrán | - 35 - |
| 6.2. Určení koncentrace chlorofylů | - 36 - |
| 6.3. Teplotní a světelný stres | - 37 - |
| 6.4. Solubilizace thyl. membrán a příprava vzorku pro CN-PAGE | - 38 - |
| 6.5. CN-PAGE..... | - 39 - |
| 6.6. Skenování gelu po prvním rozměru..... | - 41 - |
| 6.7 Měření fluorescenčních emisních spekter | - 41 - |

| | |
|--|--------|
| 6.8. SDS-PAGE..... | - 41 - |
| 6.9. Barvení gelu po SDS-PAGE..... | - 43 - |
| 6.10. Skenování gelu po druhém rozměru | - 43 - |
| 6.11. Příprava vzorku pro MALDI-TOF..... | - 43 - |
| 6.12. Příprava vzorku pro LC-MS/MS..... | - 45 - |
| 7. Výsledky a diskuze | - 46 - |
| 7.1. Stanovení optimální koncentrace detergentu | - 46 - |
| 7.2. Identifikace pigment-proteinových komplexů..... | - 48 - |
| 7.2.1. Identifikace pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF..... | - 49 - |
| 7.2.2. Identifikace podjednotek pomocí LC-MS/MS | - 51 - |
| 7.3. Vysokoteplotní stres | - 54 - |
| 7.3.1. Teplotní rozmezí od 25 do 50°C | - 54 - |
| 7.3.2. Teplotní rozmezí od 40 do 90°C | - 56 - |
| 7.3.3. Ověření přítomnosti superkomplexů fotosystému I | - 75 - |
| 7.4. Světelný stres | - 77 - |
| Závěr | - 83 - |
| Literatura | - 84 - |
| Seznam použitých zkratk | - 88 - |
| Dodatek..... | - 89 - |

Cíle práce

Cílem práce bylo vypracovat přehled problematiky na téma použití „clear native“ polyakrylamidové elektroforézy (CN-PAGE) ve studiu pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán a zaměřit se na výhody této techniky oproti BN-PAGE. Mým úkolem bylo provést izolaci thylakoidních membrán z rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare*) a thylakoidní membrány poté vystavit působení stresových faktorů (vyšší teplota, zvýšená ozáření). Pigment-proteinové komplexy obsažené v thylakoidních membránách jsem měl následně elektroforeticky separovat pomocí dvourozměrné techniky 2D-CN/SDS-PAGE a proteiny v separovaných zónách identifikovat například pomocí MALDI-TOF a naměřené výsledky poté diskutovat.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

Elektroforéza obecně je separační technika, při které dochází k pohybu nabitých částic v elektrickém poli. K tomuto pohybu může docházet jak v plynném prostředí, tak i v prostředí kapalném s využitím gelových matric, které zamezují difúzi a mísení separovaných částic. Nativní elektroforéza je používána k separaci proteinů a proteinových komplexů se snahou zachovat tyto proteiny v nativním, nedenaturovaném a enzymaticky aktivním stavu. Gely s proteiny po nativní elektroforéze mohou být použity k mnoha dalším účelům. Hlavním z nich je převedení gelu z prvního, nativního rozměru na druhý, denaturující rozměr. V tomto rozměru je nejčastěji používána tzv. SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE), u které dochází k rozvolnění vyšších struktur proteinů a k vzájemné separaci podjednotek. Spojení technik CN-PAGE a SDS-PAGE je nazýváno dvourozměrnou nativní elektroforézou, zkráceně 2D CN/SDS-PAGE a gely po druhém rozměru jsou dobrým zdrojem purifikovaných proteinů vhodných pro identifikaci například technikou MALDI-TOF. Princip této identifikační techniky spočívá v přesném měření hmotnosti peptidů, které vznikly enzymatickým štěpením jednotlivých proteinů (Wittig & Schägger, 2008).

2. Bezbarvá nativní PAGE

Bezbarvá nativní polyakrylamidová elektroforéza, nejčastěji známá pod zkratkou CN-PAGE, je speciálním druhem elektroforézy. Vychází ze starší techniky, tzv. modré nativní elektroforézy (BN-PAGE) a byla poprvé použita v roce 1994 k separaci mitochondriálních komplexů dýchacího řetězce. V době svého vzniku byla tato metoda také používána k separaci mitochondriálních komplexů dýchacího řetězce ve spojení s BN-PAGE ve dvourozměrném systému, kdy v prvním rozměru byla použita technika CN-PAGE a ve druhém rozměru technika BN-PAGE. Pomocí spojení těchto dvou technik bylo dosaženo velmi dobrého vzájemného rozlišení proteinů. O několik let později byla technika CN-PAGE přepracována. Provedené změny jí přinesly vyšší rozlišovací schopnosti a byla pojmenována jako „high resolution CN-PAGE“ (hrCN-PAGE) (Schägger et al., 1994; Wittig et al., 2007).

2.1. Původní CN-PAGE

Technika CN-PAGE se ve svém původním provedení příliš nelišila od BN-PAGE a přesto, že přinášela mnoho výhod, měla i některá omezení. Tato nová technika se od BN-PAGE odlišovala pouze tím, že během přípravy vzorku ani během elektroforézy samotné nepoužívala modré barvivo Coomassie brilliant blue. Toto barvivo, díky svému negativnímu náboji a díky své schopnosti adsorbovat se na proteiny, bylo u BN-PAGE hlavním důvodem, proč při elektroforetické separaci mohlo dojít k pohybu proteinů k anodě. Protože CN-PAGE postrádá použití tohoto barviva, je možnost separace proteinů omezena pouze na ty, jejichž hodnota isoelektrického bodu (pI) leží pod hodnotou pH, při kterém je elektroforéza prováděna. Toto pH se pohybuje v neutrální oblasti v rozmezí 7.0 - 7.5. Pokud se totiž protein dostane do prostředí s pH vyšším, než je jeho pI, dojde k jeho deprotonizaci a tím k jeho zápornému nabití. Ze zmíněného tedy plyne, že u CN-PAGE mohly být separovány pouze kyselé proteiny (proteiny s nízkým pI). Nepřítomnost barviva Coomassie však přinesla i mnohé výhody. Použití barviva u BN-PAGE totiž znemožňuje stanovení katalytické aktivity separovaných proteinů a rovněž interferuje s detekcí fluorescenčně značených proteinů. Barvivo může také narušovat některé velmi labilní protein-proteinové interakce. CN-PAGE byla tedy ve své době považována za nejšetrnější elektroforetickou techniku vhodnou k separaci proteinů v katalyticky aktivní formě. Jak ale ve své práci z r. 1994 uvádí Schägger a kol. (Schägger et al., 1994), CN-PAGE nedosahovala takových rozlišovacích schopností, jako její příbuzná technika BN-PAGE. To bylo způsobeno zejména tím, že zatímco při separaci proteinových komplexů pomocí BN-PAGE měly všechny komplexy díky Coomassie blue výrazně záporný náboj a migrovaly v elektrickém poli relativně rychle, při použití CN-PAGE měly komplexy méně záporný náboj a tedy migrovaly pomaleji. Dobré rozlišení komplexů separovaných technikou CN-PAGE tedy značně záviselo na době elektroforézy. K dosažení optimální separace bylo nutné nalézt určitý kompromis. S rostoucí dobou separace sice docházelo k lepšímu zaostření určitých pásů s proteiny, naproti tomu došlo u některých pásů k výraznému zhoršení kvality separace. K solubilizaci proteinů byl v případě obou technik používán jemný neiontový detergent dodecyl β -D-maltosid, o kterém je blíže pojednáno v následujících kapitolách. V gelu po CN-PAGE bylo také nesnadné určit molekulovou hmotnost proteinů. Zatímco

v případě BN-PAGE byla zjištěna lineární závislost migrační vzdálenosti na log hmotnosti proteinových komplexů, u CN-PAGE docházelo ke zdatelným odchylkám. Lineární závislost vykazovaly pouze značně kyselé proteiny s pl nižším, než 5, 4 (Wittig & Schägger, 2008; Schägger et al., 1994; Wittig et al., 2007; Wittig & Schägger, 2005).

Technika CN-PAGE používá pro separaci proteinů lineární gradientový polyakrylamidový gel. Nejčastěji používaným je 5 – 18 % rozsah koncentrací se 4 % zaostřovacím gelem. Jelikož je však pohyblivost proteinů, které nesou pouze svůj vnitřní náboj, nepředvídatelná vzhledem k proteinům, které vazbou nabíjecího činidla získaly uniformní plošný náboj, je doporučeno začít experimenty s gelem se širším koncentračním rozsahem 4 – 20 %. Toto rozmezí umožňuje separaci proteinů v hmotnostním rozmezí 10^5 – 10^6 Da. Teprve po zhodnocení skutečného chování proteinů během elektroforézy je dobré zvolit optimální koncentrační rozsah. V gelu je rovněž nutná přítomnost detergentu, který zabraňuje zpětné agregaci separovaných proteinů. Tento detergent je v gelu přítomen pouze ve velmi nízké koncentraci, přibližně 0.03 % a je do gelu přidáván již před započítím polymerace. Během elektroforetické separace je důležité udržovat nízkou teplotu, zpravidla 4°C, aby nedošlo k tepelnému znehodnocení vzorku (Schägger et al., 1994; Wittig & Schägger, 2005).

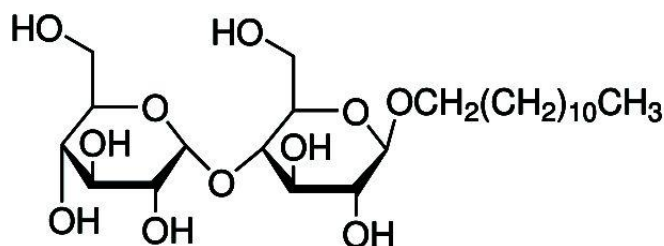
2.2. High resolution CN-PAGE

Tato nová elektroforetická technika, zkráceně označovaná jako hrCN-PAGE, v sobě spojuje výhody technik BN-PAGE a CN-PAGE, ze kterých vychází. Na jedné straně zachovává separované proteiny ve vysoce nativním stavu, na druhé straně je u separovaných proteinů dosaženo mnohem lepšího rozlišení. To bylo získáno kombinací bezbarvých aniontových a neiontových detergentů, které byly přidávány do katodového pufu. Použitá směs detergentů totiž, podobně jako barvivo Coomassie u techniky BN-PAGE, způsobila u proteinů posun náboje k záporné hodnotě, zvýšila pohyblivost proteinů směrem k anodě a značně zlepšila solubilizaci membránových proteinů, které jsou jinak za běžných podmínek ve vodném prostředí nerozpustné. První pokusy o nenedenaturující solubilizaci membránových proteinů byly provedeny již několik let před uvedením modré i bezbarvé nativní elektroforézy. Autoři Reinman a Thornber (Reinman & Thornber, 1979) se pokoušeli pomocí dodecylsírany sodného (SDS) přítomného v nízké

koncentraci solubilizovat a elektroforeticky separovat membránové fotosyntetické proteiny. Tento druh separace pro své typické zelené zabarvení vešel ve známost pod označením „zelené gely“. U techniky hrCN-PAGE byl však pro solubilizaci místo SDS použit jemný neiontový detergent. V katodovém pufru byl přítomen rovněž jemný neiontový detergent smíchaný s dalším jemným, tentokrát však aniontovým detergentem – deoxycholátem sodným. Tím došlo ke vzniku několika poddruhů techniky hrCN-PAGE, které se navzájem odlišovaly druhem detergentu, který byl použit ve směsi s deoxycholátem sodným. Těmito detergenty jsou dodecyl- β -D-maltosid a Triton X-100. U techniky hrCN-PAGE tak mohl být nastaven stupeň intaktnosti, s jakou mohly být proteinové komplexy separovány a celá metoda tak mohla být optimalizována pro specifické použití.

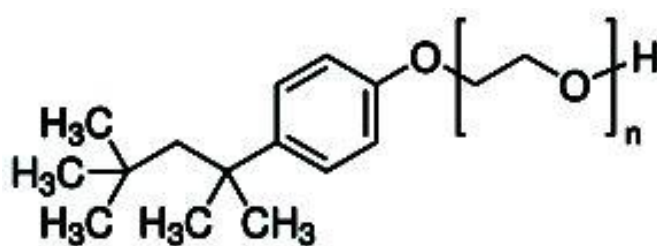
2.2.1. Detergenty používané pro solubilizaci proteinů u hrCN-PAGE

Jedním z detergentů používaných pro proteinovou solubilizaci je již zmíněný dodecyl- β -D-maltosid. Tento detergent spadá do skupiny tzv. neiontových detergentů, které ve své struktuře obsahují nenabitou hydrofilní část, na kterou je navázaný postranní, rovněž nenabitý hydrofobní řetězec. Přesto, že se jedná o jemný detergent, nedokáže zachovat některé velice slabé hydrofobní interakce mezi proteinovými komplexy. Vliv působení tohoto detergentu byl testován na mitochondriálních komplexech dýchacího řetězce. Tyto proteinové komplexy jsou v membráně přítomny jako jeden velký superkomplex, během elektroforetické separace však vlivem tohoto detergentu došlo k jeho rozpadu na jednotlivé subkomplexy. Struktura tohoto detergentu je znázorněna na obr. 1 (Wittig et al., 2007; Wittig & Schägger, 2009; Seddon et al., 2004).



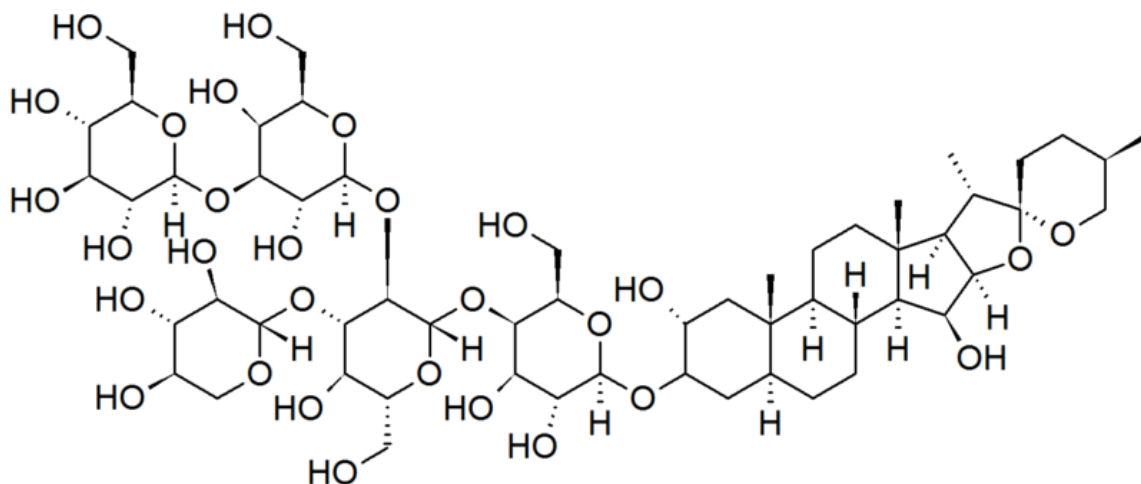
Obrázek 1 - Struktura dodecyl- β -D-maltosidu. Levá část obrázku zobrazuje nenabitou hydrofilní část detergentu – maltosu. V pravé polovině vidíme hydrofobní postranní řetězec o celkové délce 12 C.

Dalším detergentem, který je používán pro solubilizaci u hrCN-PAGE, je Triton X-100. Spadá do stejné skupiny detergentů jako dodecyl- β -D-maltosid a přesto, že se od něj svou strukturou značně odlišuje, má na proteiny velmi podobný vliv (Wittig & Schägger, 2009; Seddon et al., 2004). Jeho struktura je uvedena na obr. 2.



Obrázek 2 – Struktura detergentu Triton X-100. V levé části obrázku je zobrazena hydrofobní část, v pravé části obrázku hydrofilní polyoxyethylenová část, $n=9$. (Pokud $n=7-8$, jedná se o podobný detergent Triton X-114).

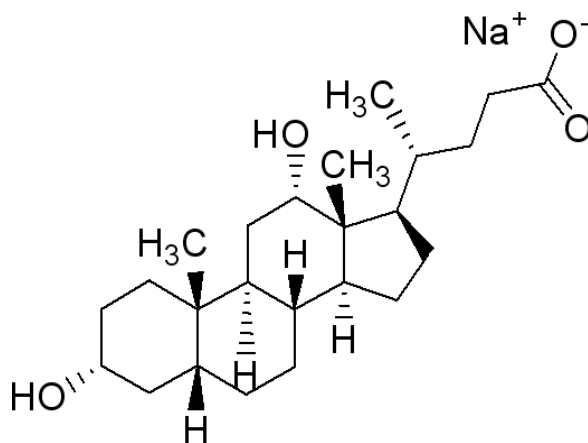
Posledním detergentem, který je u hrCN-PAGE běžně používán pro solubilizaci, je digitonin. Jedná se o jeden z nejjemnějších známých detergentů, je zařazen do stejné třídy jako předchozí dva a je používán v těch případech, kdy je důležité během separace zachovat i velmi slabé protein-proteinové interakce. Jeho molekula, zobrazená na obr. 3, je v porovnání s předchozími detergenty neobvykle velká a to je patrně hlavní příčinou jeho výjimečných solubilizačních schopností (Wittig et al., 2007; Wittig & Schägger, 2009; Seddon et al., 2004).



Obrázek 3 – Struktura digitoninu. Levá část molekuly obsahuje hydrofilní glykosidovou část, která je navázána na hydrofobní steroidní část vpravo. Je to glykosid spirostanového steroidu běžně se vyskytující v náprstníku nachovém (*Digitalis Purpurea*).

2.2.2. Poddruhy hrCN-PAGE

Důležitou pufrovou složkou všech podskupin techniky hrCN-PAGE je deoxycholát sodný. Tento detergent, který svými vlastnostmi leží na pomezí mezi iontovými detergenty a solemi žlučových kyselin, nese záporný náboj, který umožňuje migraci solubilizovaných proteinů směrem k anodě. Není používán pro samotnou solubilizaci proteinů, ale je pouze přidáván do katodového pufru, kde působí na proteiny podobně jako barvivo Coomassie u BN-PAGE. Struktura tohoto detergentu je zobrazena na obr. 4.



Obrázek 4 – Struktura deoxycholátu sodného.

Deoxycholát sodný je ve své podstatě aniontový detergent, je však relativně jemný a má na proteiny velmi slabý denaturační vliv. Od aniontových detergentů typu SDS se výrazně odlišuje svou steroidní strukturou, která v sobě kombinuje polární i nepolární část zároveň a postrádá tedy výrazněji ohraničený přechod mezi těmito dvěma částmi. Pro zajímavost je možné uvést, že tento detergent netvoří v roztoku kulovité micely jako většina ostatních detergentů, ale charakteristickým znakem této třídy detergentů je tvorba micel ve tvaru ledviny (Seddon et al., 2004; Lund et al., 1989).

Technika hrCN-PAGE je rozdělována na tři podskupiny označované jako hrCNE-1, hrCNE-2 a hrCNE-3 podle toho, který detergent a v jakém množství je spolu s deoxycholátem přítomen v katodovém pufru. Mezi tyto detergenty patří již zmíněný dodecyl- β -D-maltosid a Triton X-100. Hlavním důvodem, proč je v katodovém pufru přítomen i detergent používaný pro solubilizaci, je zabránění zpětné agregace separovaných proteinů. Podtyp techniky, druh a množství detergentu shrnuje Tab. 1.

Tabulka 1 – Podtypy hrCN-PAGE. Podtypy 1-3 se neliší pouze druhem detergentu, ale i jeho množstvím (Wittig et al., 2007; Wittig & Schägger, 2009).

| | hrCNE-1 | hrCNE-2 | hrCNE-3 |
|----------------------------------|---------|---------|---------|
| Dodecyl- β -D-maltosid (%) | 0.02 | - | 0.01 |
| Deoxycholát sodný (%) | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| Triton X-100 (%) | - | 0.05 | - |

Na mitochondriálních komplexech byl testován vliv použití těchto pufrových systémů. Z výsledků uvedených v práci autorů Wittigové a Schäggera z roku 2009 (Wittig & Schägger, 2009) plyne, že nejšetrnějším podtypem je hrCNE-3. Během elektroforetické separace s použitím tohoto systému došlo k velmi dobrému rozdělení celé řady proteinů a proteinových komplexů. Za šetrný může být tento systém označen po posouzení denzity proteinových pásů v oblasti vyšších molekulových hmotností, která je ve

srovnání s ostatními dvěma systémy nejvyšší. Protože gel po elektroforéze ve své spodní části obsahoval pouze proteinové pásy se slabou denzitou, je možné také tvrdit, že během separace docházelo jen k nepatrnému rozpadu proteinových komplexů. Druhým nejšetrnějším systémem je hrCNE-1. Gel po separaci sice také v oblasti velkých molekulových hmotností obsahoval proteinové pásy, tyto však nedosahovaly tak velké denzity a kvality jako u hrCNE-3. V oblasti malých molekulových hmotností bylo přítomno jen malé množství slabých proteinových pásů. Jako nejhorší může být označen systém hrCNE-2. Gel totiž ve své horní části obsahoval jen málo proteinových pásů, zato však byly proteinové pásy přítomny v oblasti malých molekulových hmotností. Z toho vyplývá, že během separace docházelo k rozpadu větších proteinových komplexů, které byly v předchozích případech zachovány v horní oblasti gelu. K uvedeným jevům docházelo při separaci proteinových komplexů solubilizovaných všemi třemi detergenty (dodecyl- β -D-maltosidem, Tritonem X-100 a digitoninem).

2.2.3. Výběr vhodného detergentu a jeho koncentrace

Volba správného detergentu vždy závisí na typu separace. Každý detergent má totiž své specifické vlastnosti a pokud vykazuje vhodné solubilizační schopnosti u jednoho typu separace, nemusí se stejně chovat i u jiného typu. Proto je dobré nejprve experimentálně ověřit, který detergent je pro naši potřebu nejvhodnější. To může být jednoduše provedeno tak, že uskutečníme elektroforetickou separaci studovaného materiálu solubilizovaného různými detergenty. Mnoho užitečných informací o použití a vlastnostech různých detergentů může být také získáno studiem literatury. Ale vzhledem k tomu, že různé zdroje poskytují poměrně odlišné informace, je vždy dobré zvolený detergent nanečisto otestovat a porovnat ho s ostatními.

Poté, co je vybrán detergent, je ještě nutné zvolit jeho vhodnou koncentraci. Studovaný biologický materiál je tedy podroben solubilizaci s různými množstvími zvoleného detergentu a výsledný vzorek elektroforeticky separován. Obecně platí, že čím vyšší je poměr detergentu ke vzorku, tím vyšší solubilizace je dosaženo a dochází tím tedy k rozpadu vyšších komplexních struktur (Wittig et al., 2007; Wittig & Schagger, 2009; Järvi et al., 2011; Ladig et al., 2011).

2.2.4. Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci

Pro přípravu vzorku je ze suspenze biologických membrán o známé koncentraci proteinů odebrána poměrná část, která odpovídá určitému množství proteinů v μg . Toto množství závisí na účelu experimentu a je zpravidla určováno experimentálně. Suspenze je následně smísená s detergentem, vzniklá směs doplněna reakčním pufrům na vhodný objem a po určité době inkubována. Po inkubaci je vzorek centrifugován při vysokém přetížení (18000-100000 g – záleží na typu vzorku). Tím dojde k odstranění nesolubilizovaných membrán, balastního materiálu a nežádoucích agregátů a takto připravený vzorek je přímo nanášen do jamek gelu (Wittig et al., 2007; Järvi et al., 2011).

2.2.5. Elektroforéza

Pro separaci proteinových komplexů technikou hrCN-PAGE je používán gradientový dělicí gel převrstvený vzorkovým zaostřovacím gelem. V dělicím gelu je postupně zvyšována koncentrace akrylamidu a použité koncentrační rozmezí závisí nejen na typu vzorku, ale také na druhu studovaných komplexů. Nejvíce používaným je 5 – 13 % rozsah se 4 % zaostřovacím gelem, který, jak je uvedeno v práci Schäggera a kol. z roku 1994 (Schägger et al., 1994), spolehlivě pokrývá hmotnostní rozmezí proteinů od 10^5 do 10^6 Da. Pokud je však nutné rozlišit i menší proteiny, je vhodné zvolit rozsah od 5 do 18 %. Je-li účelem experimentu separovat proteinové komplexy o velmi vysokých molekulových hmotnostech, je možné připravit gradientový gel o nižších koncentracích a s užším rozsahem. Použití uniformního dělicího gelu, tj. gelu o jedné dané koncentraci akrylamidu, není doporučeno. V tomto gelu totiž nedochází k řádnému zaostření pásů se separovanými proteiny a bylo pozorováno i rozmývání a rozšiřování těchto pásů. Použití gradientového gelu má oproti uniformnímu navíc tu výhodu, že poté, co proteinový komplex dosáhne určité hustoty gelu, dojde k „zastavení“ jeho dalšího pohybu a tím je dosaženo lepšího rozlišení (Schägger et al., 1994; Schägger & von Jagow, 1991).

Elektroforéza probíhá za nízké teploty, a to zpravidla při 4-7 °C. Je-li elektroforéza prováděna za běžné laboratorní teploty, může dojít k nevratnému tepelnému poškození vzorku, které může být způsobeno přehřátím elektroforetické jednotky a dochází také k rozostření proteinových pásů.

Dokud vzorek neprojde zaostřovacím gelem, je na elektrodách udržováno nízké napětí (přibližně 100 V). Jakmile však vzorek vstoupí do dělicího gelu, napětí je zvýšeno (až na 500 V) a hodnota proudu nastavena přibližně na 15 mA. Hodnoty proudu a napětí však nejsou pevně stanovené a závisí na typu vzorku, tloušťce a velikosti gelu. Elektroforetická separace může být rovněž prováděna za postupného zvyšování napětí. Celá separace zpravidla netrvá déle jak 3 hodiny (Schägger et al., 1994; Wittig et al., 2007; Järvi et al., 2011).

Po ukončení nativní elektroforézy mohou být separované proteinové komplexy rozděleny na jednotlivé podjednotky ve druhém, denaturujícím rozměru. Jako druhý rozměr je používána technika SDS-PAGE. Z gelu po prvním rozměru jsou vyřezány pásy, které odpovídají jednotlivým jamkám. Předtím, než jsou tyto pásy vloženy na gel pro druhý rozměr, jsou inkubovány v pufru obsahujícím SDS a redukční činidlo, nejčastěji dithiothreitol (DTT), aby došlo k rozvolnění vyšších protein-proteinových struktur a rozpadu komplexů na jednotlivé podjednotky. Proteiny v gelu po druhém rozměru mohou být obarveny barvivem Coomassie, případně kontrastovány stříbrem, vyřezány z gelu a identifikovány některou z běžných identifikačních technik.

2.2.6. CN-PAGE jako technika pro studium PPC thylakoidních membrán

Technika CN-PAGE dokáže zachovat membránové proteinové komplexy v původním, nedenaturovaném stavu a je pro jejich separaci úspěšně používána. Přesto, že je v dnešní době technika CN-PAGE používána spíše pro separaci mitochondriálních membránových proteinových komplexů (Wittig et al., 2007; Wittig & Schägger, 2005), nalézá v poslední době využití i pro separaci pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán. Byla použita např. autory Järvi a kol. (Järvi et al., 2011). Těmto autorům se podařilo úspěšným způsobem separovat pigment-proteinové komplexy thylakoidních membrán a z výsledků jejich práce plyne, že technika CN-PAGE je pro separaci těchto komplexů velmi vhodná. Ve spojení s SDS elektroforézou ve druhém rozměru také představuje mocný nástroj pro studium podjednotkového složení jednotlivých komplexů (Schägger et al., 1994).

Pro separaci pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán je nejprve nutné získat suspenzi thylakoidních membrán. Z této suspenze jsou

solubilizací detergenty uvolněny jednotlivé pigment-proteinové komplexy, které mohou být následně elektroforeticky separovány.

2.3. Shrnutí výhod CN- a hrCN-PAGE

Přesto, že původní technika CN-PAGE byla dříve používána jako referenční metoda k technice BN-PAGE a měla za úkol spíše vyzdvihnout výhody tehdy upřednostňované BN-PAGE, poskytuje ve srovnání s BN-PAGE i nesporné výhody. A to zvláště poté, co byla vyvinuta technika hrCN-PAGE.

První z výhod je možnost stanovení katalytické aktivity separovaných proteinů přímo v gelu. Barvivo Coomassie, používané u techniky BN-PAGE, totiž toto stanovení významným způsobem narušuje.

Dalším aspektem zvyhodňujícím CN-PAGE, resp. hrCN-PAGE, je možnost analýzy fluorescenčně značených proteinů. Tyto proteiny jsou fúzovány buď s fluorescenčním proteinem, nebo jen s fluorescenčním barvivem a po osvětlení světlem o vhodné vlnové délce emitují fluorescenční záření. Bylo zjištěno, že přítomnost barviva Coomassie zhasí až 95 % tohoto fluorescenčního signálu.

Bylo také zjištěno, že barvivo Coomassie může rozvolňovat některé velmi slabé protein-proteinové interakce. U techniky hrCN-PAGE je možné vhodným výběrem pufrového systému a detergentu použitého pro solubilizaci proteinů tento problém překonat (Wittig & Schägger, 2008; Wittig et al., 2007; Wittig & Schägger, 2005).

3. Vliv stresových faktorů na fotosyntetický aparát

Fotosyntetizující organismy jsou v přírodě vystaveny mnoha stresovým faktorům, které různými způsoby ovlivňují jejich fotosyntetický aparát. Mezi tyto faktory patří především změny teplot a intenzity světla. Protože rostliny nemají možnost se před působením těchto stresových faktorů ukrýt, dochází vlivem těchto změn k poškození fotosyntetického aparátu.

3.1. Struktura a funkce fotosyntetického aparátu

Oxygenní fotosyntéza je důležitým mechanismem, který spolu s asimilací oxidu uhličitého zajišťuje podmínky pro přežití mnoha organismů. Fotosyntéza je tvořena řadou chemických reakcí, které probíhají v chloroplastech a tyto reakce jsou katalyzovány proteinovými komplexy

fotosystému I a II, ATP syntasou a cytochrom b₆f komplexem. Všechny tyto proteinové komplexy jsou v chloroplastech přítomny v membránách thylakoidů. Thylakoidy jsou subkomponentou chloroplastů a tvoří trojrozměrnou síť membrán. Thylakoidy jsou rozdělovány na dvě oblasti. První z nich jsou tzv. grana tvořená shloučenými cylindrickými membránami a druhou oblastí jsou stromální thylakoidy tvořené jednoduchými lamelami. V granálních thylakoidech je přítomen především fotosystém II, na okrajích gran a v oblasti stromálních thylakoidů je převážnou měrou zastoupen fotosystém I (Nelson & Ben-Shem, 2004; Nelson & Yocum, 2006; Malkin & Niyogi, 2000).

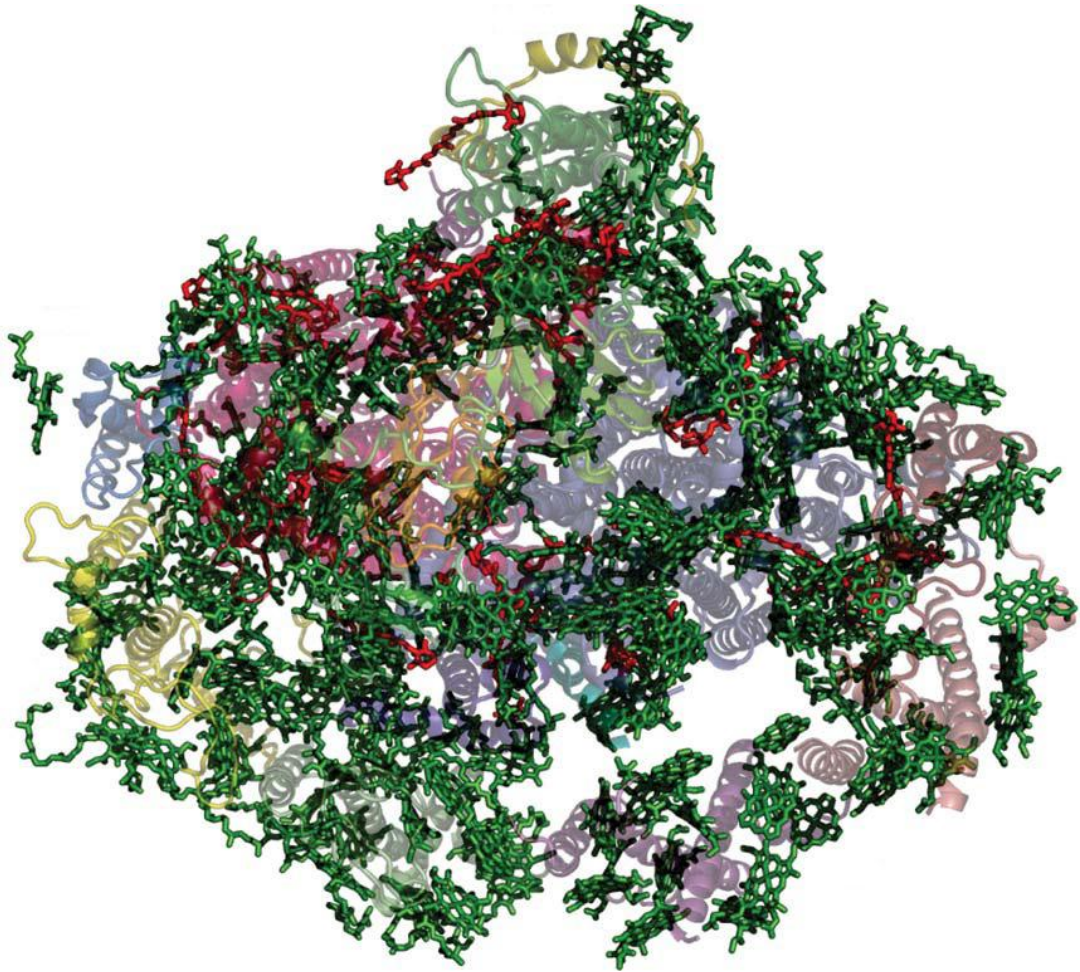
3.1.1. Fotosystém I

Fotosystém I (PSI) je velký, pigment-proteinový komplex v membránách thylakoidů sloužící jako světlem poháněná plastocyanin – ferredoxin oxidoreduktasa. Je považován za nejefektivnější fotoelektrický aparát na Zemi s kvantovým výtěžkem blízkým hodnotě 1. PSI přítomný v zelených rostlinách je složen ze dvou hlavních funkčních jednotek: centrálního jaderného komplexu a vnějšího světlosběrného komplexu (LHCI). Samotný jaderný komplex zelených rostlin je velmi podobný kompletnímu fotosystému I u sinic, zatímco světlosběrný komplex je přítomen pouze u vyšších zelených rostlin a zelených řas. Celý superkomplex PSI je tvořen celkem 13 podjednotkami jaderného komplexu, podjednotkami světlosběrného komplexu Lhca1-4, 173 molekulami chlorofylů, 15 karotenoidy, 2 fylochinony a 3 Fe₄S₄ klastry (Nelson & Ben-Shem, 2004; Nelson & Yocum, 2006; Hu et al., 2004; Hu et al., 2005; Amunts et al., 2010).

Jaderný komplex je tvořen 12 podjednotkami PsaA - PsaL, z nichž 2 – PsaA a PsaB - jsou téměř homologní. Tyto dvě podjednotky tvoří symetrický heterodimer a jejich původ je v duplikaci dávného mateřského genu. Heterodimer PsaA/B váže značné množství z celkových 173 molekul chlorofylů (více než 100 molekul). Všechny podjednotky zastávají buď strukturní funkci, účastní se přenosu energie nebo vážou některý z elektronových přenašečů. Elektronových přenašečů je ve fotosystému I celkem pět. Jsou to primární akceptor elektronů PSI A₀, sekundární akceptor elektronů PSI A₁ a Fe₄S₄ klastr A₂ (nazývaný také jako F_X), všechny lokalizované v heterodimeru PsaA/B, a další dva Fe₄S₄ klastry A₃ (F_A) a A₄ (F_B), přítomné v periferní

podjednotce PsaC. Poslední podjednotkou PSI je PsaR, jejíž funkce není zatím přesně známá a je tvořena polyalaninovým řetězcem. Některé zdroje uvádějí ještě další tři podjednotky PsaO, PsaN a PsaP (Nelson & Ben-Shem, 2004; Scheller & Haldrup, 2005; Amunts et al., 2010).

Světlosběrný komplex PSI (LHCI) je tvořen celkem šesti podjednotkami označovanými jako Lhca1-Lhca6. Za běžných podmínek jsou však na jaderný komplex vázány pouze podjednotky Lhca1-Lhca4. Zbylé dvě podjednotky se vyskytují pouze za velmi specifických podmínek. Lhca proteiny jsou chlorofyl vázící proteinové makromolekuly poloměsíčitého tvaru, které tvoří heterodimery Lhca1/4 a Lhca2/3. Oba heterodimery jsou k jádru PSI vázány na specifických místech a jsou navzájem nezastupitelné. Podjednotka Lhca1 obsahuje 15 molekul chlorofylů, Lhca2 14 molekul chlorofylů, Lhca3 17 molekul chlorofylů a podjednotka Lhca4 váže 15 molekul chlorofylů. Lhca komplexy zachycují světlo a přenášejí ho do reakčního centra. Díky absorpci Lhca komplexů ve vzdálené červené oblasti se také výrazně rozšiřuje oblast světelného spektra využitelného pro fotosyntézu. PSI hraje rovněž důležitou roli ve fotoprotekci (Malkin & Niyogi, 2000; Amunts et al., 2010). Celková struktura fotosystému I je zobrazena na obr. 5.



Obrázek 5 - Struktura fotosystému I. Pohled ze stromální strany. Zeleně jsou zobrazeny molekuly chlorofylů, červeně molekuly karotenoidů. Proteinové podjednotky tvořící kostru celého komplexu jsou v pozadí. Převzato z Nelson & Yocum, 2006, upraveno.

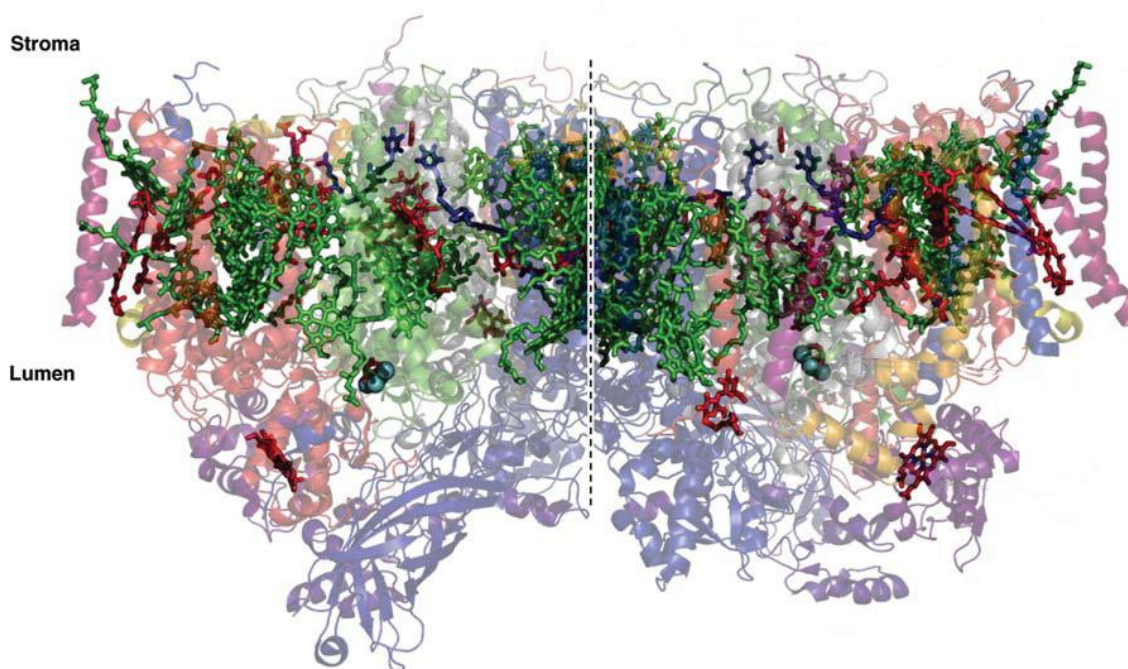
3.1.2. Fotosystém II

Fotosystém II (PSII) je podobně jako PSI pigment-proteinový komplex přítomný v thylakoidních membránách oxygenních fotosyntetických organismů. Probíhá v něm řada světlem indukovaných reakcí, jejichž výsledkem je přeměna světelné energie na chemickou a rozštěpení molekul vody za vzniku protonů a molekulárního kyslíku. V membránách je přítomen v dimerní formě. Každý monomer je složen z jaderné části a světlosběrného komplexu. Tento komplex dohromady obsahuje 27 – 28 podjednotek (Umena et al., 2011, Caffari et al., 2009).

Jaderný komplex je složen ze 17 transmembránových podjednotek, 3 periferních a řady kofaktorů. Mezi hlavní proteiny jaderného komplexu patří

D1 a D2 podjednotky, které váží donor elektronů P680 (dimer chlorofylu *a*) a všechny kofaktory elektronového transportního řetězce. Těmito kofaktory jsou feofytin, primární akceptor elektronů Q_A a sekundární akceptor elektronů Q_B . Dalšími proteiny jsou vnitřní antény fotosystému CP43 a CP47. Mimo proteinové podjednotky obsahuje každý monomer ještě 2 molekuly feofytinu, 11 molekul β -karotenu, 2 plastochinony, 2 atomy hemově vázaného železa, 1 atom nehemově vázaného železa, 4 atomy manganu, 3 atomy vápníku, 3 atomy chloru a 35 molekul chlorofylů vázaných ve vnitřních anténách (Umena et al., 2011).

Světlosběrný komplex PSII (LHCII), který hraje podstatnou roli ve zvyšování účinku fotosyntézy, je tvořen celkem 6 podjednotkami. Hlavní část LHCII je tvořena heterotrimerním komplexem složeným z podjednotek Lhcb1-3 a zbylé 3 podjednotky Lhcb4-6 jsou přítomny v monomerním stavu. Všechny podjednotky váží molekuly chlorofylů a xantofylů (Nelson & Ben-Shem, 2004; Nelson & Yocum, 2006). Strukturu PSII znázorňuje obr. 6.



Obrázek 6 – Struktura fotosystému II. Na obrázku je zachycen PSII v dimerním stavu bez LHCII z bočního pohledu. Jednotlivé monomery jsou odděleny přerušovanou čarou. V obrázku je rovněž uvedena orientace komplexu v membráně. Proteiny tvořící páteř celého pigment-proteinového komplexu jsou v pozadí, pigmenty jsou zvýrazněny. Zelenou barvou jsou zobrazeny molekuly chlorofylů, karotenoidy červeně a plastochinony modře.

V obrázku jsou patrné i klastry manganu (světle modré sférické objekty) a hemově vázané atomy železa. Převzato z Nelson & Yocum, 2006, upraveno.

3.2. Světelný stres a fotoinhibice

Světlo slouží jako hlavní zdroj energie pro fotosyntézu. Rostliny jsou v přírodě často vystaveny podmínkám, kdy množství světelné energie absorbované fotosyntetickým aparátem rostlin překročí míru, kterou jsou fotosystémy I a II schopny „absorbovat“ a může dojít k jejich poškození. Rostliny ale disponují mechanismy, které dokážou vliv přebytku absorbované energie eliminovat. Mezi tyto mechanismy patří například nezářivá tepelná disipace nebo dynamická regulace velikosti světloběrného komplexu asociovaného s fotosystémy. Pokud je ale kapacita protektivních mechanismů překročena, dochází u fotosyntetického aparátu k poškození. Toto poškození má za následek snížení efektivity fotosyntézy, které je přímo spojené se snížením asimilace oxidu uhličitého. Za určitých podmínek však může dojít k poškození fotosyntetického aparátu i působením světla o nízké intenzitě (Tjus et al., 1998; Yordanov & Velikova, 2000).

3.2.1. Fotoinhibice PSI

O poškození PSI vlivem světla o vysoké intenzitě není mnoho informací. Již dlouho je ale známo, že PSI je (ve srovnání s PSII) vůči působení světla o vysoké intenzitě velmi odolný a že je naopak velmi náchylný k poškození za podmínek, kdy je vystaven nízkým teplotám a osvětlován světlem o nízké intenzitě. Poškození PSI vlivem světla může být tedy rozděleno do dvou kategorií: poškození PSI vlivem světla o nízké intenzitě za nízkých teplot a poškození PSI vlivem intenzivního světla.

U rostlin, které jsou citlivé na chlad, často dochází za chladových podmínek k poškození PSI vlivem světla o nízké intenzitě. Předpokládá se, že poškození je způsobováno superoxidem nebo singletovým kyslíkem, které jsou produkovány samotným PSI. Za chladových podmínek totiž klesá rychlost asimilace oxidu uhličitého, která má za následek akumulaci redukováných elektronových přenašečů na akceptorové straně PSI. Mechanismus samotného poškození PSI spočívá v oxidativní destrukci FeS klastrů F_A , F_B a F_X , může však dojít i k poškození elektronových přenašečů, které v elektronovém transportním řetězci stojí před F_A . Dochází rovněž k destrukci samotného chlorofylového dimeru P700. Poté dochází k degradaci proteinových

podjednotek PSI. S destrukcí FeS klastrů F_A a F_B je totiž následně spojeno odpojení podjednotky jaderného komplexu PsaC, která tyto klastry váže a poté ještě dalších dvou stromálních podjednotek PsaD a PsaE. Jaderný komplex bez těchto podjednotek pak podléhá další degradaci. Po odstranění stromálních podjednotek dochází k disociaci LHCI od zbytku jaderného komplexu a následně k degradaci samotných podjednotek PsaA a PsaB (Scheller & Haldrup, 2005; Tjus et al., 1998).

Hlavními komponentami, které jsou za nízkých teplot zdrojem poškození a následného rozpadu u PSI, jsou reaktivní formy kyslíku. Mezi ně patří především superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylové radikály ($OH\cdot$). Ze superoxidu, který vzniká nejčastěji přímou redukcí molekuly kyslíku, následnými reakcemi vznikají další reaktivní kyslíkaté sloučeniny. Přímou reakcí dvou molekul superoxidu, případně enzymem superoxidodismutasou (SOD) katalyzovanou reakcí superoxidu s kyslíkem vzniká peroxid vodíku. Peroxid vodíku následně reaguje se světlem redukovanými FeS klastry za vzniku hydroxylového radikálu, který je extrémně reaktivní sloučeninou atakující veškeré buněčné komponenty a je také hlavním zdrojem poškození PSI. Fotoinhibiční poškození PSI je tedy silně závislé na aerobních podmínkách a také na přísunu elektronů z PSII. Rostliny však disponují mechanismy, které vznik různých forem reaktivních kyslíkatých radikálů eliminují. Je to především enzym askorbátperoxidasa (APX), který je přítomen ve stromatu chloroplastů v blízkosti PSI. Tento enzym katalyzuje reakci, která převádí peroxid vodíku na vodu. Nemůže tak docházet k destruktivní oxidaci FeS klastrů a vzniku hydroxylových radikálů. Mezi protektivní enzymy patří i SOD, který převádí superoxid na peroxid vodíku. Jeho funkce je však vázána na přítomnost funkčního enzymu APX. APX je však často cílem poškození u rostlin citlivých na chlad a pravděpodobně tak zodpovídá za vysokou citlivost PSI k poškození za nízkých teplot (Scheller & Haldrup, 2005; Yordanov & Velikova, 2000).

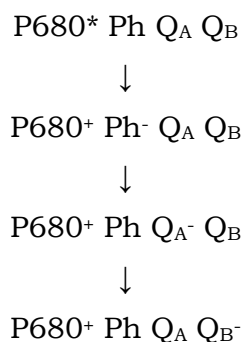
Poškození PSI vystaveného vysoké intenzitě světla za běžné pokojové teploty bylo dlouho opomíjeno. V thylakoidních membránách vystavených vysoké intenzitě světla totiž rychle dojde k inhibici PSII a tím je zastaven přísun elektronů pro PSI. Nedochozí tedy k redukcí kyslíku na akceptorové straně PSI a vzniku škodlivých, vysoce reaktivních kyslíkatých radikálů.

U rostlin dochází k obnově funkce světlem poškozeného PSI. Většina degradovaných podjednotek PSI je syntetizována *de novo* a pouze některé podjednotky LHCI jsou recyklovány. Opravami však není obnoveno původní množství poškozených PSI komplexů, v thylakoidních membránách je nevyvážený poměr PSI:PSII a musí dojít k úpravě množství PSII, aby byla zajištěna rovnováha v přenosu elektronů mezi oběma fotosystémy (Powles, 1984; Rajagopal et al., 2003; Hui et al., 2000).

3.2.2. Fotoinhibice PSII

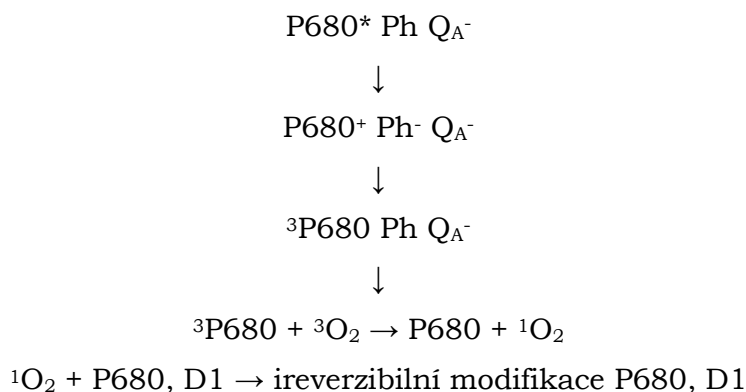
Fotosystém II slouží jako světlem poháněná oxidoreduktasa, která je schopna oxidovat vodu na molekulární kyslík a redukovat plastochinon, který následně poskytuje elektrony pro PSI. Oxidace vody v PSII však vyžaduje přítomnost velmi silného oxidantu. Přítomnost takto silného oxidantu a neustálý přísun excitační energie, který vytváří stále nové oxidanty, může vést u PSII k fotooxidačnímu poškození. Hlavním místem poškození je chlorofylový dimer P680 a podjednotka jaderného komplexu D1. Dochází u nich k ireverzibilním změnám a k následné inhibici fotosyntézy. Protože se rostliny nemohou dostat z dosahu působení stresového faktoru, vyvinuly specializovaný opravný mechanismus, který PSII navrácí do funkčního stavu.

Mechanismus poškození chlorofylového dimeru P680 a D1 podjednotky spočívá v zastavení přenosu elektronů z feofytinu na primární akceptor elektronů Q_A . Za normálních podmínek, kdy je světelná energie absorbovaná PSII bez problému zůžitkována, je většina přítomných molekul primárního akceptoru Q_A oxidovaných. Světlem excitovaný chlorofylový dimer P680 tedy předá elektron feofytinu (poločas 3 ps), který následně předává elektron oxidovanému primárnímu akceptoru Q_A (200 ps). Elektron z Q_A je dále předán na sekundární akceptor elektronů Q_B (400 – 600 μ s) a z něj je elektron následně přenášen dalšími elektronovými přenašeči až do PSI. Elektron odebraný z excitovaného P680 je doplněn elektronem získaným z molekuly vody oxidované v Mn-klastru komplexu vyvíjejícího kyslík (Melis, 1999). Schéma přenosu elektronů v PSII v případě, že Q_A je oxidovaný, ukazuje obr. 7:



Obrázek 7 – Schéma přenosu elektronů za stavu oxidovaného Q_A. P680*: excitovaný chlorofylový dimer, Ph: feofytin, Q_A, Q_B: primární stabilní a sekundární chinonový akceptor elektronů PSII. Upraveno podle Melis, 1999.

Je-li však komplex PSII vystaven světlu o vysoké intenzitě, není absorbovaná energie dostatečně rychle spotřebována a dochází k nahromadění redukovaných molekul Q_A. Redukovaný primární akceptor elektronů Q_A tak nemůže přijímat další elektrony. V PSII tedy dochází ke stavu, kdy excitovaný P680 předá elektron feofytinu, ale ten jej již nemůže předat dál Q_A. V tomto stavu vedle sebe po relativně dlouhou dobu (řádově desítky ns) koexistují oxidovaný P680 a redukovaný feofytin a může mezi nimi docházet k nábojové rekombinaci. To poté může vést až ke vzniku P680 v tripletním stavu. Přítomnost tripletního P680 je však efektivně eliminována jeho interakcí s kyslíkem, čímž ovšem vzniká vysoce reaktivní kyslík v singletním stavu. Jeho životnost je odhadována na desítky μs, což je dostatečně dlouhá doba na to, aby zreagoval buď se samotným P680, nebo s D1 podjednotkou jaderného komplexu PSII za vzniku ireverzibilních změn (Melis, 1999). Schéma přenosu elektronů uvnitř PSII při redukovaném Q_A ukazuje schéma na obr. 8:



Obrázek 8 – Schéma přenosu elektronů za stavu redukováného Q_A.

Rovnice ukazují mechanismus vzniku tripletního chlorofylového dimeru, ze kterého následnou nábojovou rekombinací vzniká vysoce reaktivní singletní kyslík. ³P680: chlorofylový dimer v tripletním stavu, ³O₂: molekula kyslíku v běžném, tripletním stavu, ¹O₂: molekula kyslíku v singletním stavu. Upraveno podle Melis, 1999.

Poté, co dojde k fotooxidačnímu poškození D1 podjednotky, je PSII rozvolněn a D1 podjednotka proteolyticky degradována. Je však následně znovu syntetizována, zpětně vložena do jádra PSII a je tím obnovena jeho funkčnost. Rychlost celého opravného procesu, který trvá přibližně 60 minut, je silně závislá na rychlosti degradace D1 podjednotky. Pokud je však rychlost, s jakou dochází ke vzniku poškozených PSII vyšší než rychlost, s jakou jsou tyto komplexy opravovány, dochází k poklesu množství funkčních PSII a k celkovému poklesu fotosyntetické aktivity (Melis, 1999; Aro et al., 1993).

3.3. Teplotní stres

Fotosyntéza je jedním z nejvíce termosenzitivních fyziologických procesů, které v rostlinách probíhají. U fotosyntetického aparátu rostlin, které jsou vystaveny vysoké teplotě, dochází vlivem zvyšující se teploty k mnoha strukturním i funkčním změnám. Vliv teploty na strukturu a funkci fotosystémů byl studován mnoha metodami. Patří mezi ně například infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR), měření fluorescenčních emisních spekter při teplotě 77K a také nativní elektroforéza (Hu et al., 2004; Hu et al., 2005; Lípová et al., 2010; Shi et al., 1998).

3.3.1. Vliv zvýšené teploty na PSII

První změna pozorovaná u PSII při zahřívání vzorku thylakoidních membrán je ztráta jeho schopnosti vyvíjet kyslík. Tato funkční změna nastává už při nízkých teplotách v rozmezí od 38 do 43°C a jak uvádí Shi a kol. (Shi et al., 1998), tato změna nesouvisí s tepelnou denaturací žádného proteinu. Pravděpodobně však souvisí s teplem-indukovanými změnami v interakci proteinů komplexu vyvíjejícího kyslík.

K prvním strukturním změnám, které u PSII nastávají v souvislosti se zvýšenou teplotou, dochází při teplotách okolo 40°C. Dochází zde k odpojování LHCII od jádra PSII. Pokud není PSII vystaven vyšším teplotám, jsou tyto změny reverzibilní (Sundby & Andersson, 1985). Další strukturní změny nastávají u PSII po vystavení teplotám blízkým 50°C. Dochází zde postupně k disociaci dimerů jádra PSII a disociace dimerů je dokončena při teplotě 57°C. Tyto změny jsou patrné z obr. 9, který ukazuje postupnou degradaci pigment-proteinových komplexů při lineárně se zvyšující teplotě (Lípová et al., 2010) pomocí nativní Deriphat-PAGE. Dochází zde k poklesu intenzity pásu s dimerním PSII (v obrázku označen jako CCII) ve prospěch pásu s monomerní formou jádra (pás označen jako RC-47). Po zahřátí vzorku thylakoidních membrán na teplotu 60°C dochází postupně k degradaci podjednotek jádra PSII (patrné na obr 9 jako úbytek pásu RC-47). Tyto strukturní změny korespondují s nárůstem intenzity fluorescence, která souvisí s ireverzibilními změnami ve struktuře PSII souvisejícími s inhibicí přenosu elektronů v PSII. Při teplotách vyšších než 70°C už dochází k úplné degradaci PSII.

Teplem-indukované změny v kompozici PSII souvisejí se strukturními změnami proteinů. Shi a kol. (Shi et al., 1998) uvádí, že s rostoucí teplotou, které je PSII vystaven, dochází ke změně sekundární struktury proteinů. Proteiny PSII jsou v nativním stavu přítomny ve formě α -helixů, ale vlivem rostoucí teploty postupně dochází ke změně α -helikální struktury na strukturu β -listu. Proteiny ve formě β -listu mohou navíc snadněji opouštět hydrofobní proteinový komplex, vstupovat do vodného prostředí a je tím podpořen rozpad komplexní struktury proteinových komplexů. K těmto změnám dochází v největší míře v teplotním rozmezí od 55 do 75°C, což je v souladu s výsledky prezentovanými v práci Lípové a kol. z roku 2010 (Lípová et al., 2010). Při teplotách nad 70°C, kdy je jádro PSII zdegradováno, dochází také k destrukci proteinů LHCII (Lípová et al., 2010).

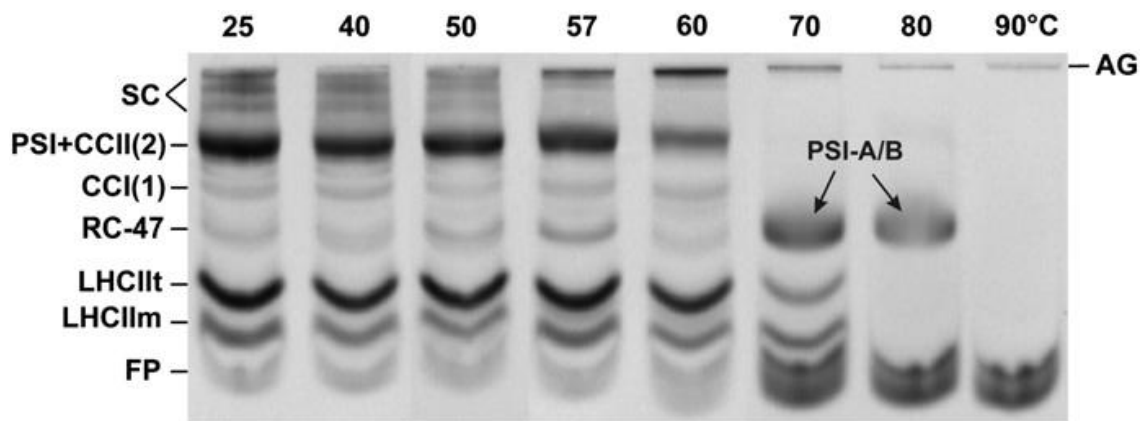
3.3.2. Vliv zvýšené teploty na PSI

Fotosystém I vystavený zvýšené teplotě podléhá podobně jako PSII mnoha strukturním změnám. Patří mezi ně nejen změny ve struktuře vyššího řádu, ale také změny sekundární struktury proteinů. PSI je však ve srovnání s PSII termostabilnější.

Mezi první změny, které u PSI nastávají v souvislosti se zvýšenou teplotou, patří odpojování světlosběrného komplexu LHCI od jaderného komplexu. Tyto změny nastávají postupně při teplotách v rozmezí od 40 do 50°C a byly pozorovány pomocí měření emisních fluorescenčních spekter. Při zahřívání vzorku dochází k nárůstu intenzity fluorescence při 680 nm, což odpovídá emisnímu maximu volných komplexů LHCI (Hu et al., 2004). V tomto teplotním rozmezí však nedochází k žádným výrazným změnám v sekundární struktuře proteinů, o čemž svědčí minimální změny v zastoupení α -helikálních a β -listových struktur měřené pomocí FT-IR (Hu et al., 2004) a také analýza pigment-proteinových komplexů pomocí měření cirkulárního dichroismu (CD). Technika měření CD spekter umožňuje detekci změn pozice pigmentových molekul v rámci proteinových komplexů a je proto využívána i při studiu strukturních změn pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán (Hu et al., 2005).

K výrazným změnám u PSI dochází po zahřátí na teplotu 60°C, kdy dochází ke značné redukci intenzity pásu s PSI (patrné na obr. 9). Při této teplotě dochází také ke tvorbě agregátů PSI, které zůstávají na dně jamky a nevstupují během elektroforézy do gelu (viz obr. 9) (Lípová et al., 2010). Při této teplotě také dochází k poklesu množství α -helikální struktury proteinů a k nárůstu množství β -listů. Rovněž z měření CD spekter vyplývá, že při této teplotě dochází k pozvolnému uvolňování pigmentových molekul z jejich původních vazebných pozic (Hu et al., 2004; Hu et al., 2005).

K největším změnám však dochází po zahřátí PSI na teplotu 70°C, kdy dochází k rozpadu PSI až na heterodimer tvořený podjednotkami PsaA/B. Vlivem zahřívání na teplotu 80°C dochází k dalšímu úbytku množství heterodimeru PsaA/B a po zahřátí na 90°C dochází k úplné degradaci těchto proteinů (Lípová et al., 2010). I z měření spekter pomocí infračervené spektroskopie a cirkulárního dichroismu vyplývá, že při zahřívání vzorku s PSI při teplotách převyšujících 70°C dochází k velmi dramatickým změnám. Dochází ke značnému nárůstu množství proteinů v konformaci β -listu na úkor α -helikální struktury a dochází rovněž ke značnému uvolňování pigmentových molekul z jejich původních vazebných pozic (Hu et al., 2004; Hu et al., 2005).



Obrázek 9 - Elektroforetogram pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán separovaných pomocí nativní Deriphat-PAGE.

SC: superkomplexy, PS1+CCII(2): fotosystém I s dimerem jádra fotosystému II, CCI(1): jádro fotosystému I, RC-47: jádro fotosystému II tvořené podjednotkami D1, D2 a CP47, LHCIItr, LHCIIm: trimerní, resp. monomerní forma LHCII, FP: volné pigmenty, AG: agregáty, PSIA/B: heterodimer jádra fotosystému I. Převzato z Lípová et al., 2010.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Použitý materiál

4.1. Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál, ze kterého byly získány thylakoidní membrány, byly použity mladé rostliny ječmene jarního (*Hordeum vulgare*). Rostliny byly pěstovány hydroponicky na inertním nosiči perlitu a byly zalévány Knopovým roztokem. Rostliny byly pěstovány ve fyto-komóře Microclima 1750 (Snijders Scientific, Tilburg, Nizozemí) v pěstebním režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Ozáření bylo 100 μmol fotonů $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosynteticky aktivního záření (rozsah vlnových délek 400 – 700 nm). Pěstování probíhalo po dobu 5 dnů při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti 60 – 65 %. Pro izolaci thylakoidních membrán byly použity pouze koncové části nepoškozených listů.

4.2. Knopův roztok

Pro zalévání rostlin byl používán Knopův roztok, který byl připraven následujícím způsobem: do 950 ml deionizované vody bylo přidáno 10 ml od každého z pěti zásobních roztoků (viz tab. 2) a nakonec byly přidány ještě 3 kapky 50 % roztoku FeCl_3 .

Tabulka 2 – Složení zásobních roztoků pro přípravu Knopova roztoku.

| Chemikálie | Množství chemikálie (g/l zásobního roztoku) |
|--|---|
| KCl | 7.1 |
| KH_2PO_4 | 14.3 |
| KNO_3 | 14.3 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 57.2 |
| MgSO_4 | 14.3 |

5. Použité chemikálie

| | |
|---|-----------|
| 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol | Biorad |
| 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol | Fluka |
| 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina | Sigma |
| Akrylamid | Biorad |
| Aminokapronová kyselina | Sigma |
| Askorbát sodný | Sigma |
| Bisakrylamid | Biorad |
| BSA | Sigma |
| Coomassie brilliant blue G-250 | Biorad |
| Deoxycholát sodný | Sigma |
| Diethyldithiokarbamová kyselina, sodná sůl | Sigma |
| Dihydrogenfosforečnan draselný | Lachema |
| Dithiothreitol | Biorad |
| Dodecylsírán sodný | Fluka |
| Dodecyl- β -D-maltosid | Applichem |
| Dusičnan draselný | Lachema |
| Dusičnan vápenatý, tetrahydrát | Hichem |
| Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl | Sigma |
| Glycerol | Penta |
| Glycin | Sigma |
| Hydroxid sodný | Lachner |
| Chlorid draselný | Lachema |
| Chlorid hořečnatý, hexahydrát | Lachner |
| Chlorid sodný | Lachema |
| Chlorid železitý | Aldrich |
| Jodacetamid | Sigma |
| Kyselina chlorovodíková | Lachner |
| Methanol | Lachema |
| Močovina | Fluka |
| Mravenčí kyselina | Merck |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin | Biorad |
| Octová kyselina | Lachema |
| Persírán amonný | Biorad |
| Sacharosa | Lachema |
| Sírán amonný | Lachner |
| Sírán hořečnatý | Lachema |
| Tricin | Biorad |
| Trifluoroctová kyselina | Merck |
| Trihydrogenfosforečná kyselina | Lachema |

6. Použité metody

6.1. Izolace thylakoidních membrán

Thylakoidní membrány byly izolovány podle protokolů uvedených v pracích autorů Dau a kol., 1995 a Hideg, 1994 (Dau et al., 1995; Hideg, 1994). Výsledný použitý protokol vznikl kombinací obou předchozích. Listy ječmene byly vloženy do vychlazené homogenizační nádoby, přelity homogenizačním pufrem (viz tab. 3) vychlazeným na teplotu 0 °C, rozstříhány nůžkami na drobnější kousky a homogenizovány. Homogenizace byla prováděna pomocí homogenizátoru T25basic (IKA Labortechnik, Staufen, Německo) v několika pětivteřinových intervalech při 13500 otáčkách min⁻¹. Homogenizační nádoba s homogenizovaným materiálem byla během práce ponořena v ledové lázni a mezi jednotlivými homogenizačními intervaly byl nástavec homogenizátoru ponořen v chlazené homogenizované směsi, aby bylo zabráněno nežádoucímu zahřívání homogenizovaného materiálu. Homogenizovaný rostlinný materiál byl následně přefiltrován přes čtyři vrstvy silonové sítky s velikostí oka 40 μm. Filtrát byl poté rozdělen do 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován v centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz, Německo). Centrifugace probíhala po dobu 6 minut při 5000 g a při 4 °C. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován ve vychlazeném resuspendačním pufru I (viz tab. 3). Resuspendovaný pelet byl znovu rozdělen do 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován 10 minut při 5000 g a 4 °C. Supernatant byl po centrifugaci odlit a pelet resuspendován ve vychlazeném resuspendačním pufru II (viz tab. 3), rozdělen do centrifugačních kyvet a centrifugován po dobu 3 minut při 200 g a 4 °C, aby došlo k odstranění případného škrobu, který ulpěl na stěnách kyvety. Supernatant byl přelit do čistých kyvet a centrifugován 5 minut při 5000 g a 4 °C. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v minimálním možném množství vychlazeného resuspendačního pufru II (přibližně 1-2 ml). U získané suspenze thylakoidních membrán byla změřena koncentrace chlorofylů *a* a *b*, poté byla rozdělena do malých mikrozkuvek a uložena v - 80 °C v hlubokomrazicím boxu. Těsně před použitím byla suspenze thylakoidních membrán naředěna resuspendačním pufrem II na koncentraci chlorofylů 1000 μg/ml. Veškerá práce probíhala při slabém zeleném osvětlení a rostlinný materiál byl uchováván v ledové lázni.

Tabulka 3 – Složení pufrů pro izolaci thylakoidních membrán

| | Chemikálie | Koncentrace |
|-----------------------------------|-------------------|-------------|
| Homogenizační pufr (pH 7.2) | Sacharosa | 400 mM |
| | HEPES | 35 mM |
| | NaCl | 400 mM |
| | MgCl ₂ | 4 mM |
| | Askorbát sodný* | 5 mM |
| | BSA* | 2 mg/ml |
| Resuspendační pufr I (pH 7.5) | HEPES | 25 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| | MgCl ₂ | 8 mM |
| | Na-EDTA | 1 mM |
| Resuspendační pufr II (pH 7.2) | Sacharosa | 400 mM |
| | HEPES | 50 mM |
| | NaCl | 15 mM |
| | MgCl ₂ | 5 mM |

*Přidáno těsně před použitím

6.2. Určení koncentrace chlorofylů

V suspenzi thylakoidních membrán byla stanovena celková koncentrace chlorofylů *a* a *b*. To bylo provedeno spektrofotometricky podle práce Lichtenthalera z roku 1987 (Lichtenthaler, 1987). Vhodné množství suspenze thylakoidních membrán (5 – 10 µl) bylo v mikrozkuhavce smícháno se 2 ml 80 % acetonu (v/v) a centrifugováno v centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz, Německo) při laboratorní teplotě po dobu 5 minut při 5000 g. U supernatantu (pigmentového extraktu) byla pomocí spektrofotometru UV550 (Thermo Spectronic, Rochester, USA) změřena absorbance při vlnových délkách 646.8, 663.2 a 750 nm a získané absorbance byly použity k výpočtu koncentrací chlorofylů podle 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 µg/ml

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

6.3. Teplotní a světelný stres

Pro elektroforetickou separaci pigment-proteinových komplexů pomocí CN-PAGE byly použity thylakoidní membrány vystavené buď vysokoteplotnímu, nebo světelnému stresu.

Vysokoteplotní stres

Do mikroskopavek bylo napipetováno přiměřené množství suspenze thylakoidních membrán o koncentraci chlorofylů 1000 $\mu\text{g/ml}$, mikroskopavky byly vodotěsně uzavřeny parafilmem a na 5 minut ponořeny ve tmě do vodní lázně JulaboED F12 (Julabo Labortechnik, Seelbach, Německo) vyhřáté na příslušnou teplotu. Thylakoidní membrány byly postupně zahřívány buď při teplotách 25, 30, 35, 40, 45 a 50 $^{\circ}\text{C}$, nebo při teplotách 40, 50, 55, 60, 70, 80 a 90 $^{\circ}\text{C}$ a takto připravené thylakoidní membrány byly přímo použity k přípravě vzorku.

Světelný stres

Vystavení thylakoidních membrán světelnému stresu proběhlo několika způsoby:

1. 16 μl suspenze thylakoidních membrán o koncentraci chlorofylů 1000 $\mu\text{g/ml}$ bylo v čiré průhledné mikroskopavce zředěno resuspendačním puforem II (viz tab. 3) na celkový objem 1 ml. Mikroskopavka byla uchycena do držáku a pomocí světelného zdroje KL1500 electronic (SCHOTT, Mainz, Německo) 5 minut osvětlována „studným“ bílým světlem o stanovené intenzitě. Intenzita světla byla přesně nastavena pomocí měřidla Li-cor LI-189 (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) a jeho intenzita byla postupně 100, 200, 400, 800, 1600 a 3200 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Osvětlený vzorek byl zcentrifugován na centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz, Německo) po dobu 5 minut při 5000 g a 4 $^{\circ}\text{C}$, supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 15 μl resuspendačního pufru II (viz tab. 3). Celý objem vzorku po konečné resuspendaci byl použit pro přípravu vzorku určeného k nanesení do jedné gelové jamky.
2. Vhodné množství suspenze thylakoidních membrán o koncentraci chlorofylů 1000 $\mu\text{g/ml}$ bylo nasáto do skleněné kapiláry o vnitřním průměru 1 mm a umístěno ve vodorovné poloze do speciální podomácku sestavené aparatury, která kapilárou otáčela rychlostí přibližně 1 otáčka za

sekundu. Suspenze v kapiláře byla osvětlována po dobu 5 minut způsobem popsaným v předchozím odstavci a poté byla použita k přípravě finálního vzorku. Byla použita A) čistá suspenze thylakoidních membrán B) suspenze thylakoidních membrán s přídavkem diethyldithiokarbamátu (DDC) v celkové koncentraci 5 mM, který sloužil jako inhibitor enzymu superoxiddismutasy (SOD).

3. Suspenze thylakoidních membrán o koncentraci chlorofylů 1000 µg/ml s přídavkem DDC v celkové koncentraci 10 mM byla nasáta do skleněné kapiláry a kapilára byla vložena do stojánku ve vodorovné poloze. Takto bylo připraveno 6 kapilár. Všechny kapiláry byly osvětlovány současně tak, že se nacházely v různé vzdálenosti od světelného zdroje. Vzdálenosti od zdroje světla byly zvoleny tak, aby intenzita světla dopadajícího na kapiláry odpovídala hodnotám 100, 200, 400, 800, 1600 nebo 3200 µmol fotonů m⁻² s⁻¹. Doba osvitu byla 3 hodiny. Takto připravené suspenze thylakoidních membrán byly následně přímo použity pro přípravu vzorku.

6.4. Solubilizace thyl. membrán a příprava vzorku pro CN-PAGE

Pro solubilizaci thylakoidních membrán nutnou pro jejich elektroforetickou separaci byl používán detergent dodecyl-β-D-maltosid (DM) v různých hmotnostních poměrech DM:chlorofyl(*a+b*). Do mikrozkušavky byl nejdříve napipetován C-pufř (400 mM sacharosa, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 50 mM HEPES/NaOH, 15 mM NaCl, 10 % glycerol, pH 7.2) a poté 10 % dodecyl-β-D-maltosid a do tohoto roztoku byla následně napipetována suspenze thylakoidních membrán. Pipetování suspenze thylakoidních membrán do směsi pufřu a detergentu probíhala dvěma způsoby:

1. Do řady připravených mikrozkušavek s pufřem a detergentem byla postupně pipetována suspenze thylakoidních membrán.
2. Do řady připravených mikrozkušavek s pufřem a detergentem byla přidána suspenze thylakoidních membrán pomocí 8-kanálové pipety tak, aby všechny vzorky thylakoidních membrán byly v kontaktu s detergentem stejně dlouhou dobu.

Celá směs byla jemně promíchána a následně zcentrifugována na centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz, Německo). Centrifugace probíhala 10 minut při 22000 g a při 4°C a jejím účelem bylo odstranění nesolubilizovaného materiálu. Supernatant po centrifugaci byl nanesen do jamek gelu.

Pro přípravu vzorku na jednu jamku bylo použito 16 μ l suspenze thylakoidních membrán o koncentraci chlorofylů 1000 μ g/ml. Množství suspenze bylo zvoleno tak, aby odpovídalo vhodnému množství chlorofylů potřebnému pro optimální elektroforetickou separaci. Množství C-pufu bylo vždy 34 μ l a bylo zvoleno tak, aby doplnilo suspenzi thylakoidních membrán na objem vhodný pro nanášení do jamek gelu. Množství 10 % DM bylo zvoleno tak, aby odpovídalo potřebnému poměru DM:chlorofyl(a+b).

6.5. CN-PAGE

Pro elektroforetickou separaci pigment-proteinových komplexů v prvním rozměru byla použita bezbarvá nativní elektroforéza. Samotná separace probíhala v 4 – 8 % gradientovém polyakrylamidovém dělicím gelu, který byl odspodu nastaven uniformním 8 % nastavovacím gelem a zhora překryt 4 % zaostřovacím gelem. Úlohou nastavovacího gelu bylo pouze vyplnění prostoru, protože při separaci proteinových komplexů na celé délce gelu by došlo k rozšíření a rozostření proteinových pásů. Nastavovací gel byl nalit do výšky 65 mm, výška gradientového dělicího gelu byla rovněž 65 mm a výška zaostřovacího gelu nad dělicím gelem byla 5 mm. Pro přípravu jednoho gelu byly namíchaný roztoky podle tab. 4.

Tabulka 4: Rostoky pro přípravu jednoho gelu pro první rozměr elektroforézy. 8 % F: roztok pro přípravu nastavovacího gelu, 4 % R, 8 % R: roztoky pro přípravu gradientového dělicího gelu, 4 % S: roztok pro přípravu zaostřovacího gelu.

| | 8 % F | 4 % R | 8 % R | 4 % S |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Glycerol (ml) | - | - | 1.30 | - |
| Gelový pufu (ml) | 2.15 | 1.10 | 1.10 | 0.85 |
| Voda (ml) | 8.65 | 4.85 | 3.00 | 3.70 |
| 50 % roztok akrylamidu (ml) | 2.10 | 0.50 | 1.05 | 0.40 |
| TEMED (ml) | 0.013 | 0.007 | 0.007 | 0.005 |
| 10 % APS* (ml) | 0.065 | 0.033 | 0.025 | 0.025 |

* přidává se těsně před použitím

Pro přípravu roztoků pro přípravu gelu a pro samotný průběh elektroforézy byly připraveny tyto zásobní roztoky:

- Gelový pufr, 6 x koncentrovaný (pH 7.0): 3 M aminokapronová kyselina, 0.3 M Bis-tris/HCl
- 50 % roztok akrylamidu (50 % T, 2.6 % C): na přípravu 100 ml roztoku použito 122 g akrylamidu a 3.3 g bisakrylamidu. T: celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C: koncentrace bisakrylamidu
- 10 % APS: 10 % roztok persíranu amonného
- Katodový pufr, 10 x koncentrovaný: 0.5 M Tricin, 0.15 M Bis-tris/HCl. Pro elektroforézu bylo ředěním zásobního roztoku připraveno 350 ml pufru, do kterého bylo přidáno 100 mg dodecyl- β -D-maltosidu, 200 mg deoxycholátu sodného a 4 kapky koncentrované kyseliny chlorovodíkové
- Anodový pufr, 1 x koncentrovaný (pH 7.0): 0.05 M Bis-tris/HCl

Byla sestavena aparatura pro nalévání gelu s 1 mm distančními pásky, jejíž těsnost bylo nutné ověřit pomocí deionizované vody. Voda byla odlita, prostor mezi skly vysušen a následně nalit 8 % nastavovací gel. Gel byl opatrně převrstven vodou a ponechán 30 minut v klidu, aby proběhla polymerace. Poté byla voda odsáta a nad nastavovacím gelem nalit 4 – 8 % gradientový dělicí gel. Gradient byl vytvořen pomocí gradientové peristaltické pumpy PCD21 (Kouřil, Kyjov, Česká republika). Celá aparatura byla nejprve promyta vodou, následně byl do komory dále od výtoku nalit 4 % dělicí gel, do komory blíže k výtoku 8 % dělicí gel, otevřen kohout mezi komorami a spuštěna pumpa. Gradientový gel byl po nalití převrstven vodou a ponechán 30 minut spontánní polymeraci. Po polymeraci byla odlita voda, mezi skla vložen hřebínek a nalit zaostřovací gel. Poloha hřebínku byla upravena tak, aby pod ním nezůstala žádná vzduchová bublina. Po polymeraci zaostřovacího gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a jamky promyty vodou. Následně byla sestavena elektroforetická aparatura Protean II xi Cell (Biorad, Hercules, USA), která byla napojena na termostat Polystat 12103-25 (Cole-Parmer, Chicago, USA). Poté byl nalit katodový a anodový pufr a do jamek gelu nanášeny vzorky připravené způsobem popsaným v kap. 6.4. Po nanášení všech vzorků byl připojen zdroj elektrického proudu Powerpac 1000 (Biorad, Philadelphia, USA) a spuštěna elektroforéza.

První rozměr elektroforézy probíhal při 4 °C a v přítomnosti těchto podmínek: Dokud solubilizované proteinové komplexy neprošly zaostřovacím

gelem a nevstoupily do dělicího gelu, byl na elektrodách udržován elektrický proud 15 mA a limit napětí nastaven na 100 V. Tento proces trval 15 minut. Poté byl elektrický proud zvýšen na 30 mA a limit napětí nastaven na 500 V. Separace proteinových komplexů v gradientovém dělicím gelu trvala 2 hodiny. Hodnoty proudu a napětí platí pro současné použití dvou gelů. Poté byla elektroforetická aparatura rozebrána, gel vyjmut a skenován.

6.6. Skenování gelu po prvním rozměru

Gel po prvním rozměru byl skenován na obyčejném kancelářském skeneru. Oskenovaný gel po prvním rozměru byl buď rozřezán na jednotlivé pásy a použit ve druhém rozměru, nebo z něho byly vyřezány vybrané proteinové pásy, u kterých byla měřena fluorescenční emisní spektra.

6.7 Měření fluorescenčních emisních spekter

Z gelu po prvním rozměru byly pomocí skalpelu vyřezány vybrané proteinové pásy a uloženy v mikroskopické kádince na ledové lázni, aby bylo zabráněno znehodnocení vzorku. U jednotlivých vzorků byla následně změřena emisní fluorescenční spektra při 77 K na fluorimetru F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japonsko). Pro excitaci byla použita vlnová délka 436 nm (excitace chlorofylu *a*). Detekce fluorescence probíhala v rozmezí vlnových délek 600 – 800 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla nastavena na 10 nm a spektrální šířka emisního monochromátoru na 5 nm. Měřený vzorek byl během měření ponořen v tekutém dusíku v průhledné Dewarově nádobě.

6.8. SDS-PAGE

Pigment-proteinové komplexy separované v prvním rozměru elektroforézy byly rozděleny na své podjednotky ve druhém, denaturujícím rozměru. Pro elektroforézu byl použit 12 – 19.5 % gradientový dělicí gel překrytý 5 % zaostřovacím gelem. Roztoky pro přípravu gelů byly namíchány podle rozpisu v tab. 5. Pro nalití gelu a pro samotnou elektroforézu byly použity stejné postupy a zařízení, jako u prvního rozměru.

Tabulka 5: Roztoky pro nalévání jednoho gelu pro druhý rozměr. 12 % R, 19.5 % R: roztoky pro přípravu gradientového dělicího gelu, 5 % S: roztok pro přípravu zaostřovacího gelu.

| | 12 % R | 19.5 % R | 5 % S |
|------------------------|--------|----------|-------|
| Sacharosa (g) | - | 1.8 | - |
| Močovina (g) | 7.7 | 7.7 | - |
| Gelový pufr (ml) | 4.20 | 4.20 | 1.20 |
| Voda (ml) | 3.90 | - | 3.25 |
| 50 % roztok akrylamidu | 4.45 | 7.20 | 0.50 |
| TEMED | 0.009 | 0.009 | 0.005 |
| 10 % APS* (ml) | 0.090 | 0.090 | 0.025 |

*přidává se těsně před použitím

Pro přípravu roztoků pro nalévání gelu a pro samotný průběh elektroforézy byly připraveny tyto zásobní roztoky:

- Gelový pufr (pH 8.6): 2.8 M Tris/HCl
- 50 % roztok akrylamidu (50 % T, 2.6 % C): na přípravu 100 ml roztoku použito 122 g akrylamidu a 3.3 g bisakrylamidu. T: celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C: koncentrace bisakrylamidu
- 10 % APS: 10 % roztok persíranu amonného
- Katodový pufr, 10 x koncentrovaný: 0.25 M Tris, 1.92 M glycin, 0.035 M SDS
- Anodový pufr, 20 x koncentrovaný (pH 8.3): 0.5 M Tris/HCl
- SDS pufr (pH 7.5): 0.025 M Tris/HCl, 0.035 M SDS, 0.030 M dithiothreitol

Z gelu po prvním rozměru byly vyřezány pásky, které odpovídaly vzorku z jedné jamky. Tyto pásky byly po dobu 20 minut inkubovány při laboratorní teplotě v SDS pufru. Mezitím byla zkompletována elektroforetická aparatura Protean II xi Cell (Biorad, Hercules, USA), nalit anodový a katodový pufr a celá aparatura připojena na termostat Polystat 12103-25 (Cole-Parmer, Chicago, USA). Po dokončení inkubace byly gelové pásky z prvního rozměru opatrně vloženy na 5 % zaostřovací gel a jejich poloha upravena tak, aby mezi pásky a zaostřovacím gelem nezůstaly žádné vzduchové bubliny. Poté byla aparatura

připojena ke zdroji elektrického proudu Powerpac 1000 (Biorad, Philadelphia, USA) a spuštěna elektroforéza.

SDS elektroforéza probíhala za těchto podmínek: Dokud proteiny nevstoupily z pásku z prvního rozměru do zaostřovacího gelu druhého rozměru a tímto gelem neprošly, byl na elektrodách udržován elektroický proud 20 mA a napětí nastaveno na limit 200 V. Tento proces trval 30 minut. Poté byla hodnota elektrického proudu zvýšena na 40 mA a limit napětí nastaven na 350 V. Separace proteinů v gradientovém dělicím gelu probíhala po dobu 11 hodin. Hodnoty proudu a napětí platí pro současné použití dvou gelů. Během celé doby separace byla udržována teplota 22 °C. Po ukončení elektroforézy byla elektroforetická aparatura rozebrána, gel vyjmut, obarven a skenován.

6.9. Barvení gelu po SDS-PAGE

Gel byl po druhém rozměru barven pomocí barviva Coomassie brilliant blue. Po vyjmutí gelu z elektroforetické aparatury byly proteiny v gelu nejprve po dobu 2 hodin fixovány v roztoku obsahujícím 40 % ethanolu a 10 % kyseliny octové. Po fixaci byl gel propláchnut ve vodě a vložen do barvicího roztoku a ponechán v něm přes noc. Na přípravu 250 ml barvicího roztoku bylo použito 205 mg Coomassie brilliant blue G-250, 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.35 ml 85 % H_3PO_4 a 50 ml methanolu. Po inkubaci v barvicím roztoku byl gel promyt 2 x 10 minut ve 20 % roztoku methanolu, poté 2 x hodinu ve vodě a následně skenován.

6.10. Skenování gelu po druhém rozměru

Obarvený gel po druhém rozměru byl skenován pomocí 2D skeneru Image scanner Powerlook 1120 USG (Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko) s použitím červeného filtru. Po oskenování byly z gelu vyřezány vybrané proteinové body pro identifikaci pomocí techniky MALDI-TOF.

6.11. Příprava vzorku pro MALDI-TOF

Proteiny přítomné v gelu po druhém rozměru byly identifikovány pomocí techniky MALDI-TOF. Pro identifikaci byla použita metoda tzv. „peptide mass fingerprinting“, kdy je nutné proteiny naštěpit na peptidy enzymem se známou štěpnou specifitou. Jako enzym byl použit trypsin, který štěpí proteiny na C-

konci bazických aminokyselin. Analýza probíhala na hmotnostním spektrometru Bruker Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker Daltonics, Brémy, Německo).

Z obarveného gelu byly vyřezány vybrané proteinové body a jednotlivě vloženy do mikrozkušavek. Do mikrozkušavky s gelem obsahujícím proteiny bylo přidáno 150 μ l acetonitrilu, čímž došlo k vysušení gelu. Acetonitril byl následně odebrán a do mikrozkušavky bylo přidáno 50 μ l redukčního roztoku. Vzorky s redukčním roztokem byly po dobu 30 minut inkubovány při 56 °C, poté redukční roztok odebrán a gely opět vysušeny 150 μ l acetonitrilu. Acetonitril byl odebrán a gel v mikrozkušavkách rehydratován v 50 μ l alkylačního roztoku. Alkylace probíhala 20 minut ve tmě, alkylační roztok byl následně odebrán a gely vysušeny 150 μ l acetonitrilu. Vysušený gel po redukcí a alkylaci vzorku přítomného v gelu byl následně odbarven přidávkem 200 μ l odbarvovacího roztoku. Ten byl po 30 minutách odebrán, gely vysušeny 150 μ l acetonitrilu a gely rehydratovány v roztoku trypsinu. Po 90 minutách inkubace vzorku v roztoku trypsinu, která probíhala při 0°C, byl zbylý roztok trypsinu odebrán a ke vzorku do mikrozkušavky přidáno 20 μ l štěpicího roztoku. Takto připravený vzorek byl vložen do inkubátoru a ponechán přes noc při 37 °C, čímž došlo k rozštěpení proteinů přítomných v gelu na peptidy. Po inkubaci byly vzorky zmrazeny, nebo použity k měření hmotnostních spekter.

Před měřením spekter bylo nutné nanést vzorky na ocelovou destičku, na které byly měřené vzorky vkládány do hmotnostního spektrometru. Na označené pozice na destičce bylo nejprve napipetováno 0.8 μ l vzorku (kapalina vzniklá po inkubaci) a ještě než kapička vzorku na destičce zaschla, bylo do ní přidáno 0.8 μ l roztoku matrice. Nanesené vzorky byly ponechány samovolnému vysušení a teprve poté vloženy s destičkou do přístroje.

Při enzymatickém štěpení vzorků byly používány tyto roztoky:

- Redukční roztok: 0.01 M dithiothreitol v 0.1 M hydrogenuhličitanu amonném
- Alkylační roztok: 0.055 M jodacetamid v 0.1 M hydrogenuhličitanu amonném
- Odbarvovací roztok: acetonitril a 0.1 M hydrogenuhličitan amonný v poměru 1:1

- Roztok trypsinu: 2 μ M trypsin v 0.05 M hydrogenuhličitanu amonném
- Štěpicí roztok: 0.025 M hydrogenuhličitan amonný
- Roztok matrice: 2 mg α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny rozpuštěno ve směsi 660 μ l acetonitrilu, 322 μ l vody a 8 μ l trifluoroctové kyseliny.

6.12. Příprava vzorku pro LC-MS/MS

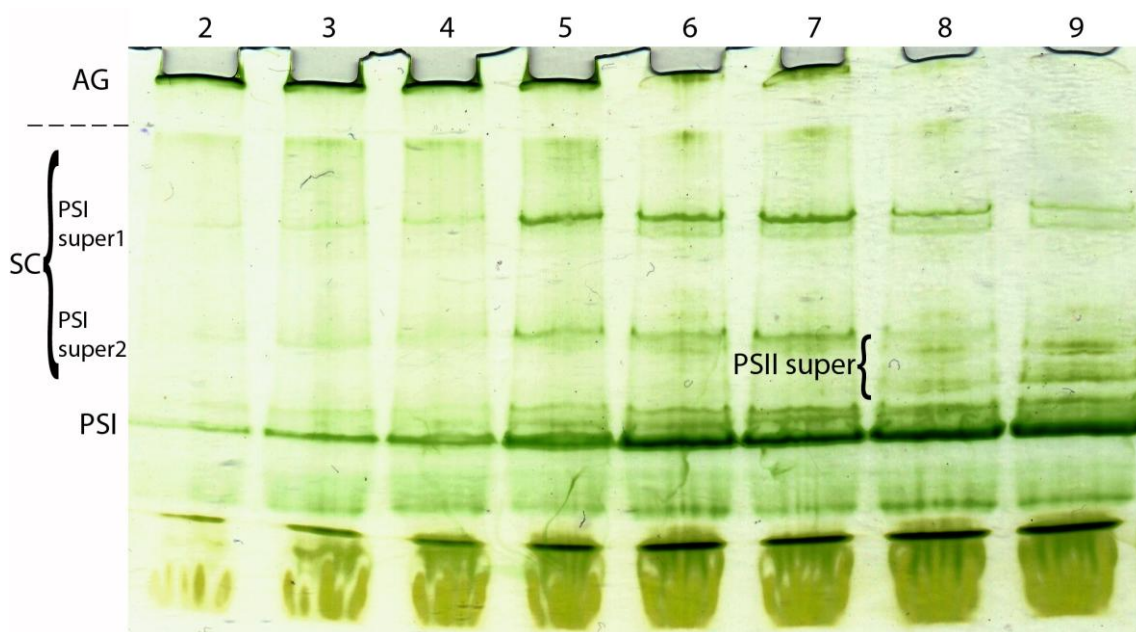
Příprava vzorku pro analýzu technikou LC-MS/MS probíhala shodným způsobem jako příprava vzorku pro analýzu technikou MALDI s několika rozdíly. Jako štěpicí enzym byla místo trypsinu používána elastasa a po rozštěpení proteinů přítomných v gelu na peptidy proběhlo jejich přečištění extrakcí na pevné fázi metodou ZipTip. Při tomto způsobu přečištění jsou peptidy navázány na hydrofobní adsorbent, zbaveny nežádoucích solí a následně z adsorbentu zpětně uvolněny. Po přečištění byl roztok, ve kterém byly peptidy rozpuštěny odpařen, peptidy rozpuštěny v 20 μ l 0.1% kyseliny mravenčí a vloženy do přístroje. Analýza probíhala na přístroji nanoLC-nESI-UHR-Q-TOF (Bruker Daltonics, Brémy, Německo).

7. Výsledky a diskuze

Tato práce je zaměřena na použití 2D-CN/SDS-PAGE pro studium vlivu teplotního a světelného stresu na složení pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán. Metoda 2D-CN/SDS-PAGE byla optimalizována pro separaci velkých pigment-proteinových superkomplexů s molekulovou hmotností nad 500 kDa. Tyto komplexy byly v gelu přítomny v relativně velkém množství a jejich zastoupení se snižovalo s rostoucí mírou stresu.

7.1. Stanovení optimální koncentrace detergentu

Pro úspěšnou separaci pigment-proteinových komplexů z thylakoidních membrán bylo nejprve nutné experimentálně stanovit vhodný hmotnostní poměr detergentu k chlorofylům $a + b$ (DM/chl). Pro solubilizaci pigment-proteinů thylakoidních membrán byl používán detergent dodecyl- β -D-maltosid. Detaily metodiky CN-PAGE jsou popsány v kap. 6.5. Výsledky separace pigment-proteinových komplexů po solubilizaci při hmotnostním poměru DM/chl=2 – 9 jsou uvedeny na obr. 10.



Obrázek 10 – Stanovení optimálního hmotnostního poměru detergentu k chlorofylům. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr DM/chl, který byl použit pro solubilizaci thylakoidních membrán. V horní části obrázku jsou vidět dna jamek, do kterých byl nanášen vzorek. Přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. AG: nesolubilizovaný materiál,

který zůstal na dnech jamek, SC: pigment-proteinové superkomplexy fotosystému I, PSI: fotosystém I, PSII super: superkomplexy fotosystému II.

Elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů byla prováděna na gradientovém polyakrylamidovém gelu s 4 – 8 % rozsahem koncentrací. Toto koncentrační rozmezí bylo zvoleno z toho důvodu, že při jeho použití docházelo k dobré separaci pigment-proteinových komplexů o velkých molekulových hmotnostech, které byly přítomny v celé horní polovině gelu. U ostatních pigment-proteinových komplexů o nižších molekulových hmotnostech však při použití tohoto koncentračního rozmezí k dobré separaci nedocházelo. To ovšem nebylo na škodu, protože tyto menší komplexy nebyly cílem zájmu této práce. Na přípravu vzorku na jednu jamku bylo použito takové množství suspenze thylakoidních membrán, které odpovídalo 16 μg chlorofylů *a* + *b*. Optimální množství chlorofylu bylo zvoleno jednak experimentálně a jednak na základě porovnávání výsledků různých prací. Při použití menšího množství chlorofylu byly proteinové pásy málo výrazné. Při použití vyššího množství chlorofylu byly proteinové pásy naopak příliš intenzivní, některé navzájem splývaly a bylo obtížné je vzájemně odlišit. Při použití velkého množství chlorofylu také docházelo k tzv. „smearingu“, kdy jsou jednotlivé pásy s pigment-proteiny kvůli velkému množství vzorku v gelu rozmazané a dochází k nárůstu intenzity zabarvení pozadí gelu.

Z obr. 10 je patrné, že u nižších hmotnostních poměrů DM/chl (2 - 4) nebyly přítomny téměř žádné superkomplexy a většina pigment-proteinů zůstala na dně jamek. Uspokojivé výsledky poskytlo použití hmotnostních poměrů DM/chl 5, 6 a 7. U všech tří poměrů byly přítomny výrazné pásy s pigment-proteiny v oblasti vysokých molekulových hmotností, které jsou na obr. 10 označeny jako PSI super1 a PSI super2. U vysokých hmotnostních poměrů DM/chl (8 a 9) naopak docházelo k přílišnému rozpadu superkomplexů PSI super1 a PSI super2 a objevily se další pásy s pigment-proteiny označené jako PSII super. Při použití hmotnostních poměrů DM/chl > 9 docházelo k podobné separaci pigment-proteinových komplexů, jako v případě použití hmotnostního poměru DM/chl = 9 s tím rozdílem, že došlo k zintenzivnění denzity pásů označených na obr. 10 jako PSII super. Při porovnávání intenzity pásů u různých hmotnostních poměrů DM/chl bylo zjištěno, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití hmotnostního poměru DM/chl = 6 a tento poměr byl používán pro solubilizaci thylakoidních

membrán použitých v dalších experimentech. Úspěšné separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán bylo dosaženo také při použití hmotnostního poměru DM/chl=5, ale různá opakování separace pigment-proteinových komplexů při použití tohoto hmotnostního poměru DM/chl neposkytovalo pokaždé stejné výsledky (data neukázána).

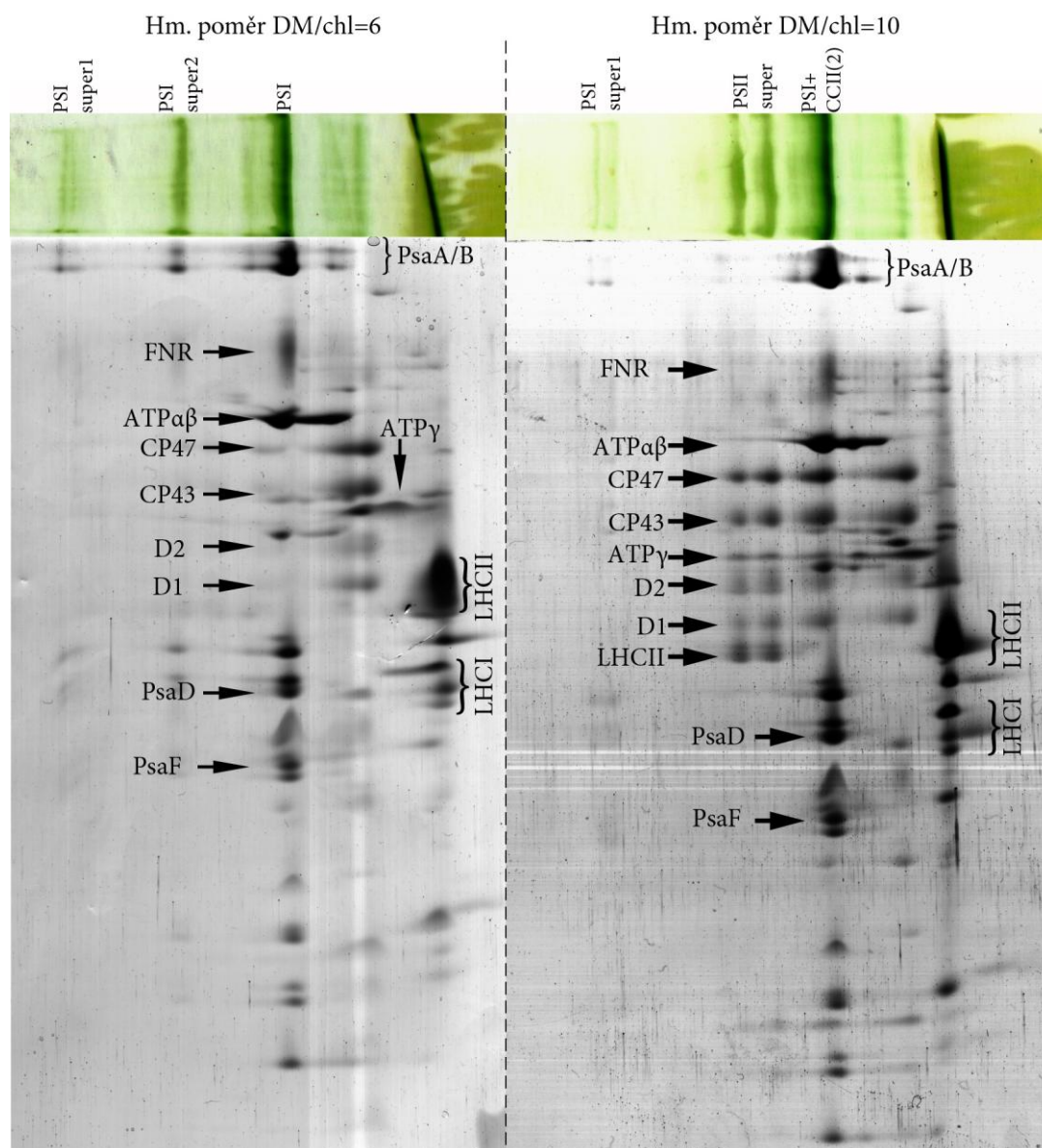
Z obr. 10 je dále vidět, že s rostoucím hmotnostním poměrem DM/chl ubývá nesolubilizovaný materiál ze dna jamek. Úbytek souvisí s použitým množstvím detergentu, který má vliv na míru solubilizace materiálu. Při posuzování vlivu množství detergentu na denzitu pásů vyvstala domněnka, že pásy přítomné v gelu v oblasti nejvyšších molekulových hmotností (označené na obr. 10 jako PSI super1 a PSI super2) náleží superkomplexům fotosystému I, které pocházejí ze stromálních thylakoidů a z okrajů gran. V případě zvýšení množství detergentu pravděpodobně došlo i k solubilizaci proteinů přítomných uvnitř gran a zároveň došlo k rozpadu pigment-proteinových superkomplexů přítomných v gelu v oblasti nejvyšších molekulových hmotností, což korespondovalo s objevením se dalších pásů v oblasti nižších molekulových hmotností. Tyto další pásy označené na obr. 10 jako PSII super byly na základě dosavadních zkušeností a také na základě výsledků prezentovaných v mojí bakalářské práci (Nosek, 2010) přisouzeny komplexům fotosystému II.

7.2. Identifikace pigment-proteinových komplexů

Pro identifikaci podjednotkového složení jednotlivých pásů s pigment-proteiny byla provedena separace podjednotek ve druhém rozměru pomocí SDS-PAGE. Pro elektroforetickou analýzu ve druhém rozměru byly použity vzorky separované v prvním rozměru pomocí CN-PAGE solubilizované při dvou různých hmotnostních poměrech DM/chl=6 a 10. Po elektroforetické separaci ve druhém rozměru byly vybrané proteinové „spoty“ vyřezány a identifikovány pomocí techniky MALDI-TOF. Kvůli metodickým problémům však nemohly být identifikovány veškeré spoty, hlavní podjednotky náležejícím jádrům obou fotosystémů se však identifikovat podařilo. Byla také provedena analýza podjednotkového složení pásů s pigment-proteiny pomocí techniky LC-MS/MS. Pro tuto analýzu byly podobně jako v případě SDS-PAGE použity vzorky solubilizované při dvou různých hmotnostních poměrech DM/chl. Prvním poměrem byl hmotnostní poměr DM/chl=6, u kterého byly v největší míře zastoupeny pigment-proteinové superkomplexy o velkých molekulových

hmotnostech, druhým poměrem byl hmotnostní poměr DM/chl=12, u kterého byly hojně zastoupeny superkomplexy s fotosystémem II. Výsledky separace a identifikace shrnují následující kapitoly.

7.2.1. Identifikace pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF



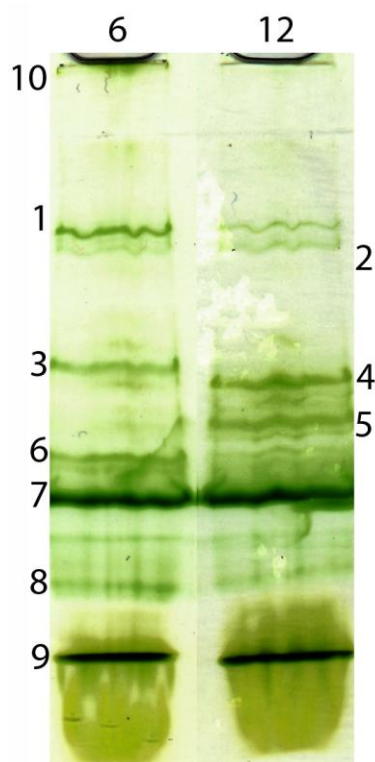
Obrázek 11 - Elektroforetogram se separovanými podjednotkami komplexů separovaných pomocí CN-PAGE. PsaA/B: podjednotky jádra PSI, LHCI: proteiny světloběrného komplexu fotosystému I, LHCII: proteiny světloběrného komplexu fotosystému II, FNR: ferredoxin:NADP⁺-oxidoreduktasa, ATPαβ: α a β podjednotka ATP synthasy, ATPγ: γ podjednotka ATP synthasy. Identifikace vybraných „spotů“ byla provedena technikou MALDI-TOF, která je popsána v kap. 6.11.

Obrázek 11 ukazuje výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán solubilizovaných při dvou různých hmotnostních poměrech DM/chl=6 a 10. Z obrázku 11 je patrné, že pigment-proteinové pásy označené v gelu po prvním rozměru jako PSI super1 a PSI super2 (přítomné u vzorků thylakoidních membrán solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=6 i 10), skutečně obsahovaly fotosystém I. V gelu druhého rozměru byla totiž u těchto pásů PSI super1 a PSI super2 prokázána přítomnost podjednotek jádra fotosystému I PsaA a PsaB. V hlavním pásu, který je v gelu po prvním rozměru vzorku solubilizovaného při hmotnostním poměru DH/chl=6 označen jako PSI (přítomen přibližně uprostřed), nebyly přítomny podjednotky fotosystému II. Z toho plyne, že pás označený jako PSI neobsahoval dimer jádra fotosystému II, který je v tomto pásu při separaci pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán technikou nativní elektroforézy běžně přítomen (viz např. Lípová et al., 2010, Nosek, 2010). Lípová a kol. ve své práci použila pro separaci pigment-proteinových komplexů techniku Deriphat-PAGE.

Z výsledků elektroforetické separace podjednotek pigment-proteinových komplexů ve druhém rozměru na obr. 11 také vyplývá, že pásy označené jako PSII super (přítomny v gelu po prvním rozměru u vzorku thylakoidních membrán solubilizovaných při hmotnostním poměru DH/chl=10), jsou skutečně tvořeny fotosystémem II. Analýza gelu po druhém rozměru v těchto pásech totiž prokázala přítomnost podjednotek D1, D2, CP43, CP47 a také podjednotek LHCII. Podjednotky fotosystému II byly přítomny také v hlavním pásu (označen jako PSI+CCII(2)), kde byly přítomny společně s podjednotkami fotosystému I. To koresponduje s výsledky prezentovanými v předchozím odstavci, protože při zvýšení množství detergentu došlo k důkladnější solubilizaci thylakoidních membrán, částečnému rozpadu fotosystému II a k objevení se dimeru jádra fotosystému II v pásu označeném jako PSI+CCII(2).

Na obr. 11 v gelu druhého rozměru je u obou vzorků z prvního rozměru patrná přítomnost enzymu ferredoxin:NADP⁺-oxidoreduktasy (FNR). Tento enzym je v thylakoidních membránách v blízkosti fotosystému I a zajišťuje redukci NADP⁺ na NADPH (Malkin & Niyogi, 2000). Není tedy ničím neobvyklým, že tento enzym byl přítomen právě v pásech s fotosystémem I (na obr. 11 označeny jako PSI a PSI+CCII(2)).

7.2.2. Identifikace podjednotek pomocí LC-MS/MS



Obrázek 12 – Výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán pomocí CN-PAGE s označením jednotlivých pásů použitých pro analýzu podjednotkového složení technikou LC-MS/MS. Čísla nad obrázkem označují hmotnostní poměr DM/chl, který byl použit pro solubilizaci vzorku thylakoidních membrán. Čísla po stranách obrázku označují jednotlivé pásy použité pro analýzu podjednotkového složení pigment-proteinových komplexů technikou LC-MS/MS.

Tabulka 6 – Výsledky analýzy složení jednotlivých pásů separovaných pomocí CN-PAGE (viz obr. 12) technikou LC-MS/MS. NHD: NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa, Psa: podjednotky fotosystému I, Lhca: podjednotky LHCI, Lhcb: podjednotky LHCII. Příprava vzorků pro analýzu technikou LC-MS/MS je detailněji popsána v kap. 6.12. Tabulka obsahuje pouze vybrané nalezené proteiny, kompletní výsledky analýzy jsou uvedeny v dodatku na konci práce.

| Číslo pásu | Podjednotkové složení |
|------------|---|
| 1 | PsaA, B, C, D, E, F, G, H, K, L, N, CP47, D2 Lhca1, Lhca2, Lhcb1, Lhcb3 NDH podj. H, K |
| 2 | PsaA, B, D, E, F, G, K, L, CP47, D2 Lhca1, Lhcb1, Lhcb3 NDH podj. 1, H, I, J, K, M |
| 3 | PsaA, B, C, D, E, F, G, H, K, L, N, CP43, CP47, D2, D1 Lhca1, Lhca2, Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb4, Lhcb6 |
| 4 | CP43, CP47, D2, D1, PsbL, R, W, Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb4, Lhcb5 |
| 5 | CP43, CP47, D2, D1, PsbH, L, W, PsaA |
| 6 | PsaA, B, C, D, E, F, G, H, K, L, N, CP43, CP47, D2 Lhca1, Lhca2, Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 |
| 7 | PsaA, B, C, D, E, F, G, H, K, L, N Lhca1, Lhca2, Lhcb3 |
| 8 | CP43, CP47, D2, D1 |
| 9 | CP43, CP47, D2, PsbR, S, PsaN, V Lhca1, Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6 |
| 10 | CP43, CP47, D2, D1, PsbR, PsaA, B, D Lhca1, Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6 |

Výsledky analýzy pásů s pigment-proteinovými komplexy technikou LC-MS/MS potvrdily dřívější výsledky získané analýzou gelů po druhém rozměru prezentované v kap. 7.2.1. Díky vysoké citlivosti této techniky byly v pásech označených na obr. 12 čísla 1 a 2 kromě podjednotek fotosystémů a světlosběrného komplexu nalezeny i podjednotky enzymového komplexu NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasy. Toto zjištění ale není ničím překvapujícím, protože tento enzymový komplex skutečně tvoří společně s fotosystémem I velký superkomplex zajišťující cyklický elektronový transport a chlororespiraci. Tento velký superkomplex je však značně nestabilní (Peng et al., 2009; Peng et al., 2011; Iwai et al., 2010; Järvi et al., 2011). Jeho přítomnost v gelu po prvním rozměru dokládá, že mnou použitá separační technika je velmi šetrná. Podobné superkomplexy s fotosystémem I a NDH se podařilo separovat i autorům Järvi a kol (Järvi et al., 2011). Tito autoři pro separaci pigment-proteinových komplexů použili techniku CN-PAGE i BN-PAGE a obě techniky poskytly podobné výsledky. Přesto, že tito autoři použili relativně řídký dělicí gel (3,5%), nebyly superkomplexy s enzymem NDH od ostatních pigment-proteinových komplexů dobře rozseparovány a nemohla tedy posouzena účinnost obou technik (Järvi et al., 2011). V pásech 1 a 2 byly také přítomny podjednotky fotosystému II D2 a CP47. Pravděpodobně se jedná o proteiny, které byly v thylakoidních membránách přítomny na okrajích gran a ve stromálních thylakoidech, kde dochází k opravám poškozeného fotosystému II. V pásu č. 3 byly nalezeny podjednotky fotosystému I, všechny podjednotky jádra fotosystému II D1, D2, CP43 a CP47 a také proteiny světlosběrného komplexu LHCI a LHCII. Přítomnost všech těchto podjednotek svědčí o tom, že v tomto pásu byly pravděpodobně přítomny komplexní struktury obou fotosystémů. Pásky označené na obr. 12 čísla 4 a 5 obsahovaly téměř výhradně podjednotky fotosystému II a proteiny LHCII, což dokládá, že tyto pásky byly tvořeny fotosystémem II a tyto výsledky jsou v souladu s výsledky prezentovanými v kap. 7.2.1. Pás označený na obr. 12 číslem 6 obsahoval podjednotky fotosystému I, podjednotky jádra fotosystému II D2, CP43 a CP47 a proteiny světlosběrných komplexů LHCI a LHCII. V pásu č. 7 byly identifikovány jen podjednotky fotosystému I společně s proteiny světlosběrného komplexu LHCI. Tyto výsledky opět korespondují s výsledky analýzy gelu po druhém rozměru. Pás č. 8 obsahoval pouze podjednotky jádra fotosystému II, což dokládá, že v tomto pásu byl přítomen monomer jádra fotosystému II. Pás č. 9 obsahoval především proteiny LHCI. Tento pás

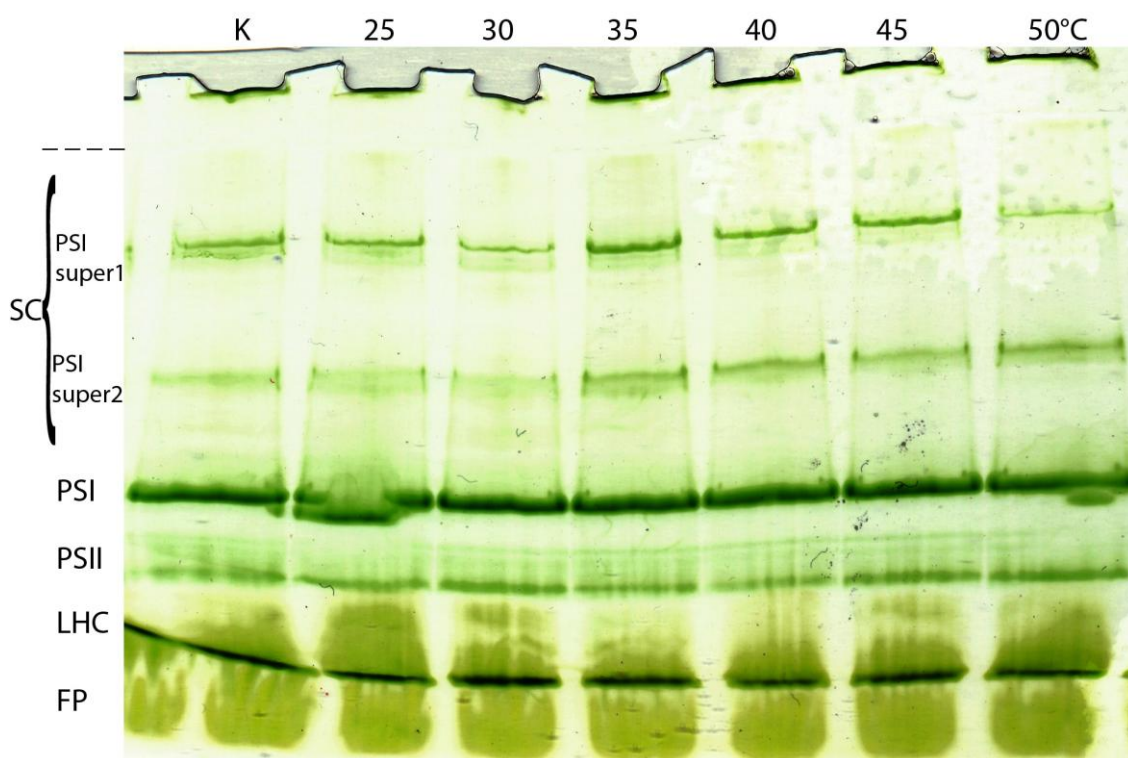
obsahoval také některé podjednotky fotosystému II, které v něm byly pravděpodobně přítomny v samostatné formě a nebyly tudíž součástí žádné komplexnější struktury. Na dně jamky u vzorku thylakoidních membrán solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=6 (vzorek označený na obr. 12 č. 10) byly přítomny především podjednotky fotosystému II společně s proteiny LHCII. To dokládá, že u fotosystému II nedošlo při solubilizaci poměrem DM/chl=6 k řádné solubilizaci a proto fotosystém II zůstal na dně jamky (to se projevilo jako zelené zbarvení horní části zaostřovacího gelu). U vyššího hmotnostního poměru DM/chl toto zelené zbarvení zaostřovacího gelu zmizelo, což koresponduje s tím, že se pásy s fotosystémem II objevily v gelu po prvním rozměru.

7.3. Vysokoteplotní stres

Thylakoidní membrány izolované z ječmene jarního (*Hordeum vulgare*) byly vystaveny vysokoteplotnímu stresu způsobem, který je popsán v kap. 6.3. (ohřev po dobu 5 minut při dané teplotě), thylakoidní membrány byly následně solubilizovány způsobem popsáným v kap. 6.4. a pigment-proteinové komplexy elektroforeticky separovány technikou CN-PAGE. Výsledky experimentů jsou shrnuty v následujících podkapitolách.

7.3.1. Teplotní rozmezí od 25 do 50°C

Vzorky thylakoidních membrán byly nejdříve vystaveny teplotnímu stresu v teplotním rozmezí od 25 do 50°C a pigment-proteinové komplexy v nich obsažené elektroforeticky separovány technikou CN-PAGE. U elektroforeticky separovaných pigment-proteinových komplexů byl poté studován vliv zvyšující se teploty na jejich kompozici. Výsledky elektroforetické separace ukazuje obr. 13:



Obrázek 13 - Elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených teplotnímu stresu v rozmezí teplot 25 – 50°C. Teploty, kterým byly po dobu 5 minut vystaveny jednotlivé vzorky, jsou uvedeny v záhlaví obrázku. K: kontrolní vzorek, který nebyl vystaven zvýšené teplotě SC: superkomplexy fotosystému I PSI super1 a PSI super2, PSI: fotosystém I, PSII: jádro fotosystému II, LHC: součásti světlosběrného komplexu, FP: volné pigmenty. Přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. Jednotlivé pásy byly identifikovány na základě srovnání s výsledky prezentovanými v kap. 7.2.

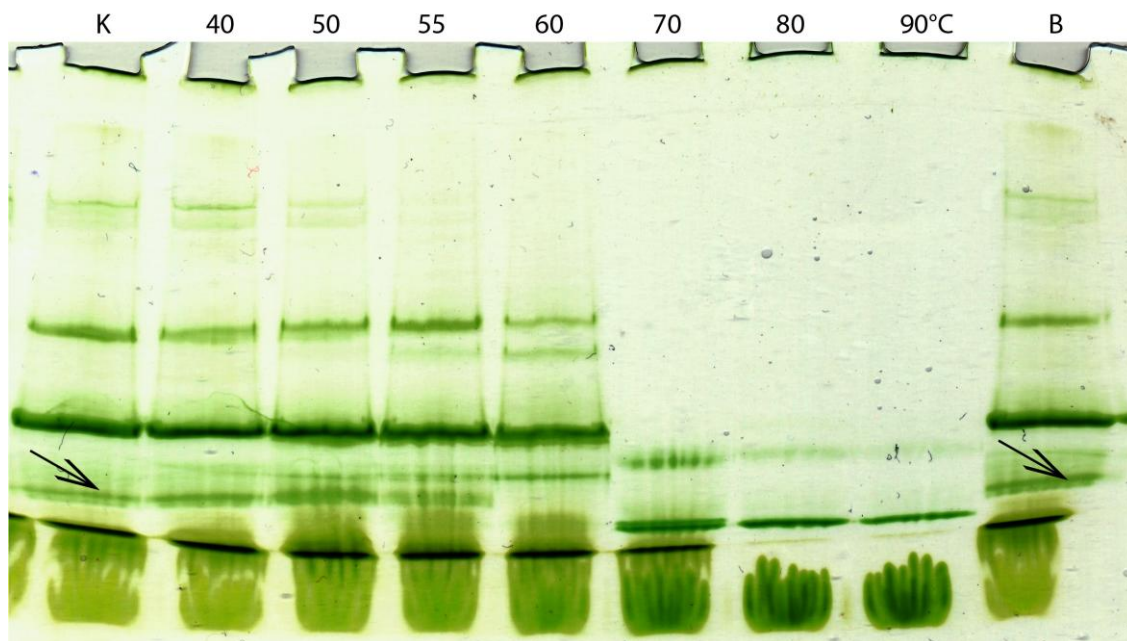
Na obrázku 13 je výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených teplotnímu stresu v rozmezí teplot 25 – 50°C. Z obr. 13 je patrné, že u pásů pigment-proteinových superkomplexů PSI super1 a PSI super2 přítomných v horní polovině obrázku nedocházelo se zvyšující se teplotou k žádným výrazným změnám, které by vypovídaly o negativním vlivu teploty na jejich kompozici. Přesto je možné si povšimnout poklesu denzity horního pásu PSI super1 u teploty 50°C. Současně s tímto poklesem je viditelný nárůst intenzity spodního superkomplexového pásu PSI super2. Zdvojení pásu PSI při teplotách 25 a 50°C nebylo způsobeno tepelným rozkladem pigment-proteinových komplexů

obsažených v těchto pásech, ale bylo pravděpodobně způsobeno nehomogenitou polyakrylamidového gelu.

Při celkovém posouzení výsledků elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů prezentovaných na obr. 13 není s rostoucí teplotou zřetelný žádný výrazný nárůst či úbytek intenzity některého z pásů a toto teplotní rozmezí (25 – 50°C) bylo vyhodnoceno jako nedostačující pro studium vlivu teplotního stresu na kompozici pigment-proteinových komplexů. Proto bylo přikročeno k experimentům, při kterých byly elektroforeticky separovány pigment-proteinové komplexy z thylakoidních membrán vystavených tepelnému stresu v širším rozmezí teplot.

7.3.2. Teplotní rozmezí od 40 do 90°C

Poté, co bylo teplotní rozmezí od 25 do 50°C, kterému byly vystaveny thylakoidní membrány, vyhodnoceno jako nedostačující pro studium vlivu tepelného stresu na kompozici pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán, byla provedena elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů izolovaných z thylakoidních membrán vystavených teplotám v širším rozmezí od 40 do 90°C. Výsledky ukazuje obr. 14.

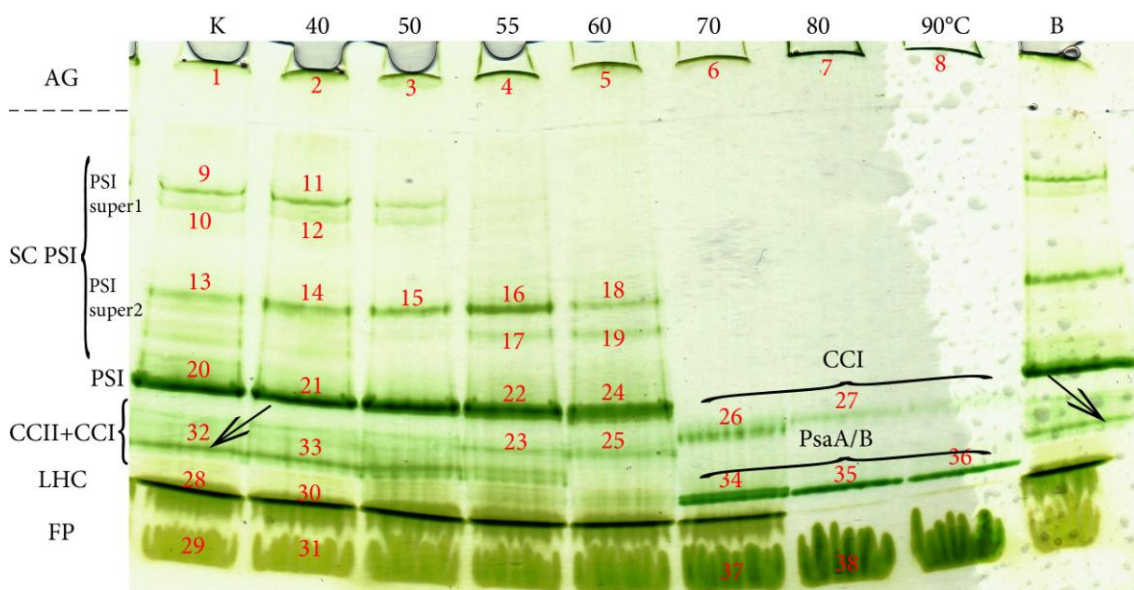


Obrázek 14 – Elektroforetogram zobrazující výsledky separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených vysokoteplotnímu stresu v rozmezí teplot 40 – 90°C. Teploty, kterým byly

vystaveny thylakoidní membrány, jsou uvedeny v záhlaví obrázku. K: kontrolní nezahříváný vzorek, B: slepý vzorek. Označení jednotlivých pásů viz obr. 15.

Na obr. 14 je zřetelně vidět, že teplotní rozmezí od 40 do 90°C, kterému byly thylakoidní membrány vystaveny, mělo na pigment-proteinové komplexy mnohem větší vliv, než teplotní rozmezí použité v případě předchozího experimentu (viz obr. 13). Na výsledky této elektroforetické separace však měla značný vliv tzv. „postupná solubilizace“. Tento jev je nejvíce patrný u kontrolního a slepého vzorku na proteinových pásech označených šipkou. Jednotlivé vzorky byly připraveny podle postupu, který je popsán v kap. 6.4. pod č. 1. Do řady mikrozkušavek s připraveným roztokem detergentu byly postupně pipetovány jednotlivé vzorky thylakoidních membrán, které tedy byly vystaveny působení detergentu po různě dlouhou dobu. U slepého vzorku (označen v obr. 14 písmenem B), který byl připravován nejdříve, došlo ve srovnání s kontrolním vzorkem (označen v obr. 14 písmenem K) připravovaným nejpozději k nárůstu intenzity označeného pásu, což svědčí o znatelném vlivu doby solubilizace. Kontrolní vzorek byl připraven z thylakoidních membrán, které nebyly vystaveny teplotnímu stresu, na přípravu slepého vzorku byly použity rovněž thylakoidní membrány, které nebyly vystaveny teplotnímu stresu. Slepý vzorek byl použit pouze na zaplnění krajní jamky, protože krajní jamky nebyly používány pro separaci hodnocených vzorků. Často u nich totiž docházelo k nežádoucímu stáčení pásů s proteiny. Výsledek této elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů tedy nebyl z důvodu možného zkreslení způsobeného odlišnou dobou solubilizace dále hodnocen.

V následujícím experimentu byla zopakována elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených vysokoteplotnímu stresu v rozmezí 40 – 90°C, jejichž solubilizace však byla provedena způsobem popsáním v kap. 6.4. pod č. 2. Při tomto způsobu solubilizace byly pomocí multikanálové pipety do řady připravených mikrozkušavek s roztokem detergentu napipetovány jednotlivé vzorky thylakoidních membrán, čímž byla zajištěna stejná doba solubilizace u všech vzorků současně. Výsledek této elektroforetické separace ukazuje obr. 15. U vybraných proteinových pásů byla poté změřena fluorescenční emisní spektra způsobem popsáním v kap. 6.7.

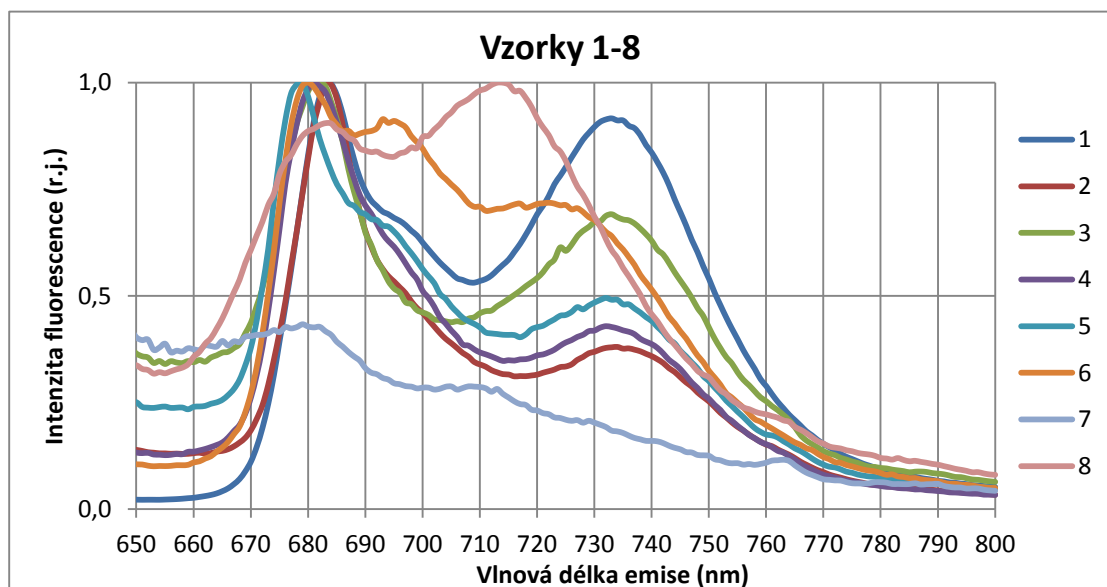


Obrázek 15 - Elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených vysokoteplotnímu stresu v rozmezí teplot 40 – 90°C po dobu 5 minut. U všech vzorků byla zajištěna stejná doba solubilizace. Teploty, kterým byly vystaveny jednotlivé vzorky thylakoidních membrán, jsou uvedeny v záhlaví obrázku. K: kontrolní vzorek připravený z thylakoidních membrán, které nebyly vystaveny zvýšené teplotě, B: slepý vzorek. Přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. AG: agregáty proteinových komplexů, které nevstoupily do gelu, SC PSI: superkomplexy fotosystému I, PSI: fotosystém I s navázanými LHCI, CCII+CCI: monomerní jádro fotosystému II bez LHCI a fotosystém I bez LHCI, LHC: komponenty světlosběrného komplexu, FP: volné pigmenty, CCI: fotosystém I bez navázaného LHCI, PsaA/B: podjednotky jádra fotosystému I PsaA/B. Šipky označují pigment-proteinové pásy, podle kterých byl posuzován vliv doby solubilizace, viz obr. 14. Červená čísla označují jednotlivé vzorky, které byly podrobeny fluorescenční identifikaci.

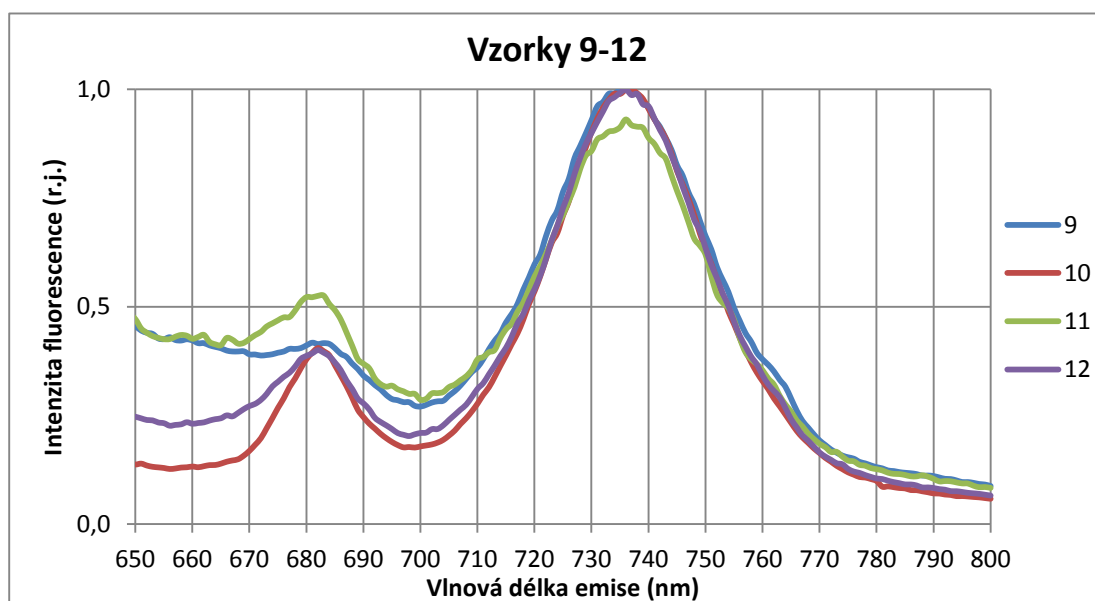
Na obr. 15 u proteinových pásů kontrolního a slepého vzorku označených šipkami je dobře patrné, že použitím jiného postupu při solubilizaci thylakoidních membrán byl vliv postupné solubilizace eliminován. Pro přípravu kontrolního i slepého vzorku byl stejně jako v případě předchozího experimentu použit stejný vzorek thylakoidních membrán (výsledky prezentovány na obr. 14).

Při posouzení výsledků elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů prezentovaných na obr. 15 je zřejmé, že zvyšující se teplota způsobila u pigment-proteinových komplexů postupný rozpad. U teplot do 60°C včetně je rozpad patrný zejména u superkomplexů fotosystému I přítomných v horní polovině gelu, u teplot převyšujících 70°C nebyly v gelu přítomny žádné superkomplexy, protože došlo k rozpadu všech komplexních struktur a v gelu zůstaly pouze zbytky fotosystému I.

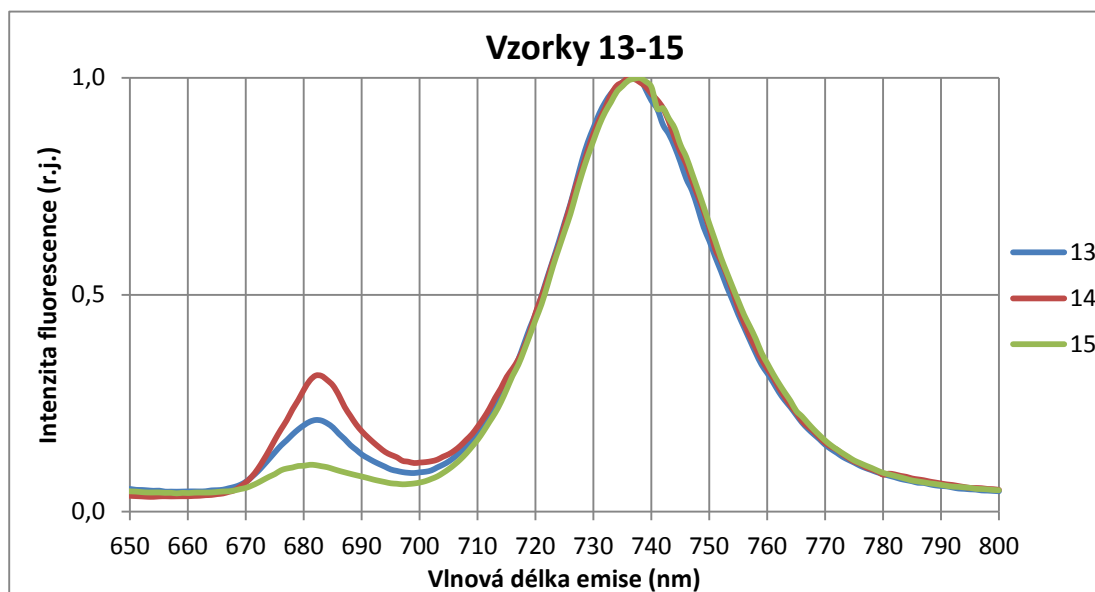
Pro lepší orientaci ve složení jednotlivých proteinových pásů s pigment-proteinovými komplexy thylakoidních membrán vystavených teplotnímu stresu byla u vybraných pásů změřena fluorescenční emisní spektra. Měření spekter bylo provedeno podle postupu, který je popsán v kap. 6.7. Excitace vzorků byla prováděna při vlnové délce 436 nm (preferenční excitace chl *a*) a všechna spektra byla normalizována na maximální hodnotu fluorescence jednotlivých vzorků. Výsledky měření fluorescenčních spekter jsou zobrazeny na následujících grafech na obr. 16 – 28. Z gelu byly také vyřezány vybrané celé pásy se separovanými pigment-proteinovými komplexy odpovídající vzorkům z jedné jamky a byla u nich provedena elektroforetická separace podjednotek pigment-proteinových komplexů ve druhém rozměru technikou SDS-PAGE. Výsledky separace podjednotek pigment-proteinových komplexů ve druhém rozměru jsou zobrazeny na obr. 29.



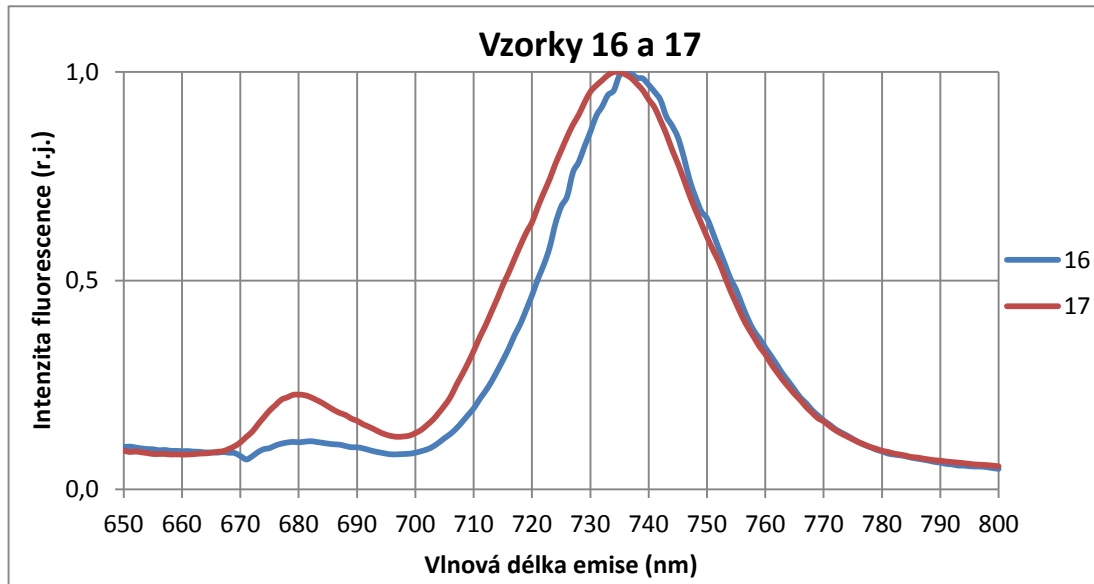
Obrázek 16 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 1 - 8 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



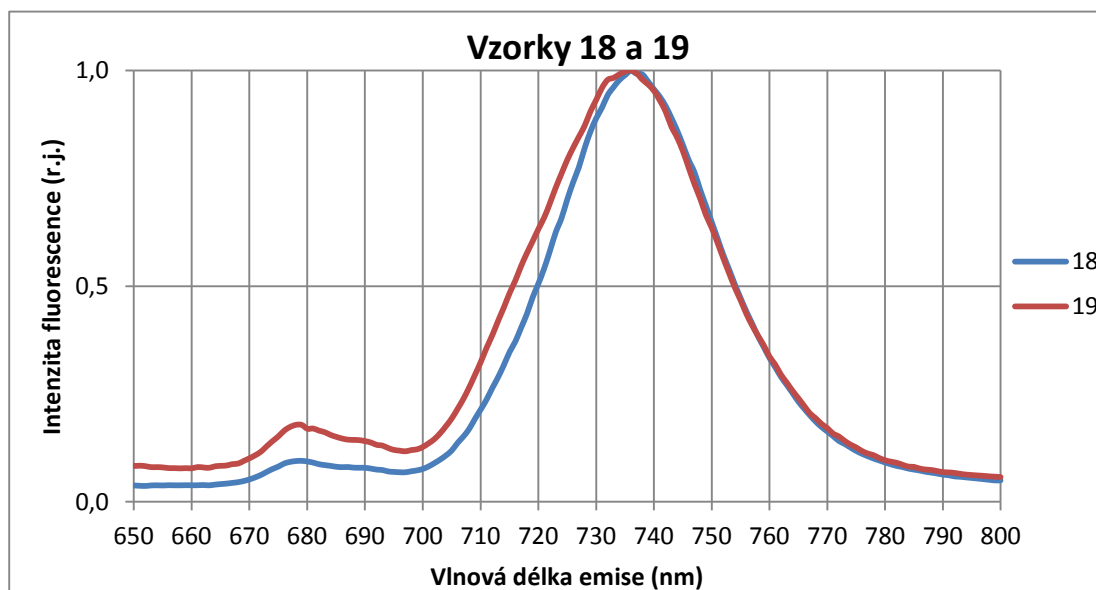
Obrázek 17 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 9 - 12 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



Obrázek 18 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 13 - 15 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.

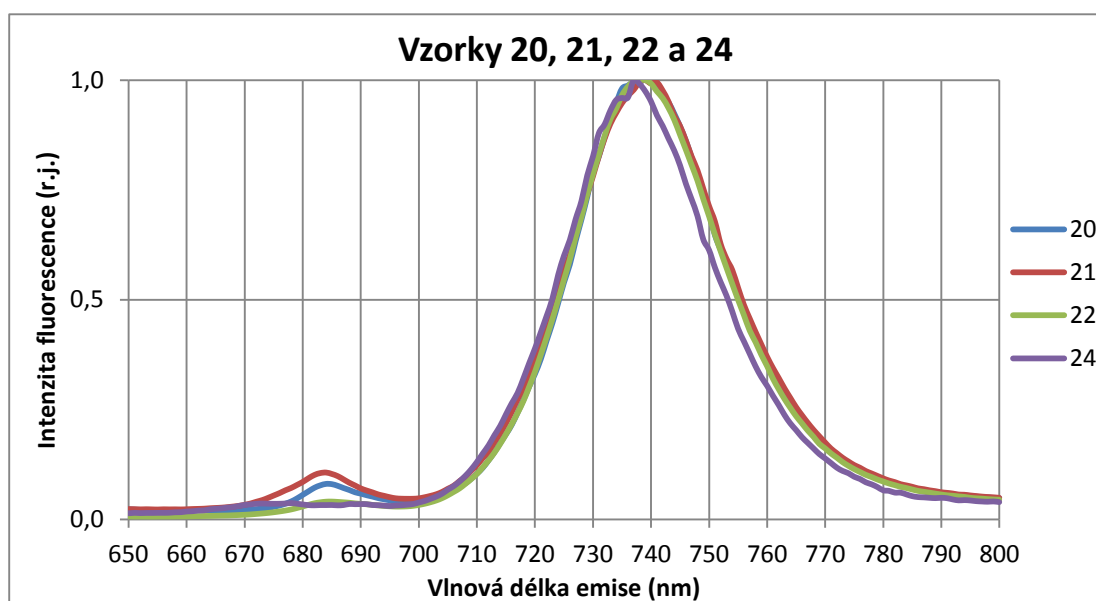


Obrázek 19 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 16 a 17 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



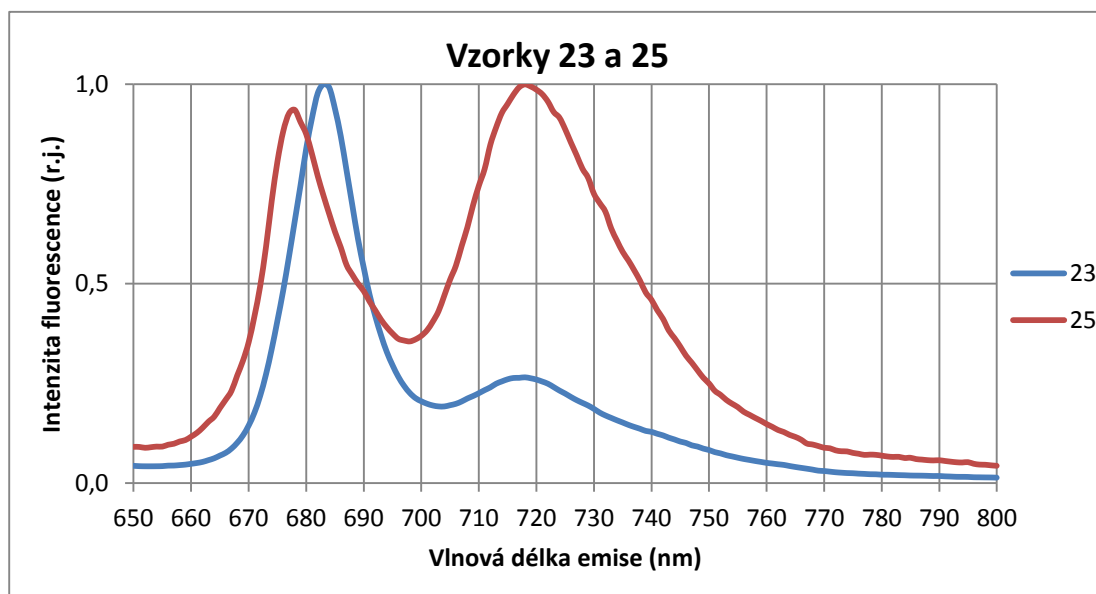
Obrázek 20 – Emisní fluorescenční spektra vzorků 18 a 19 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15.

Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.

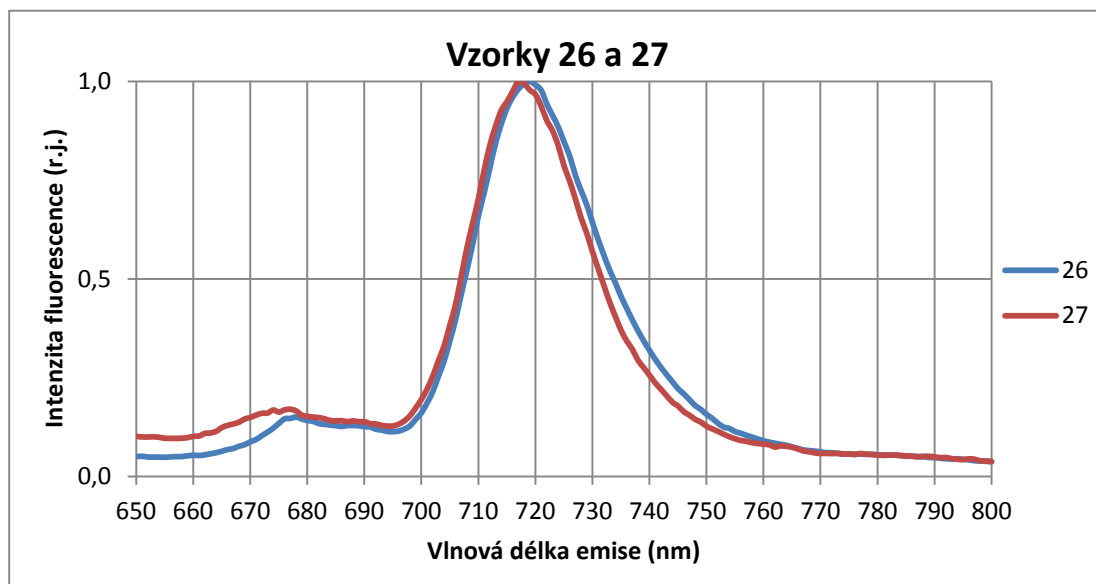


Obrázek 21 – Emisní fluorescenční spektra vzorků 20, 21, 22 a 24 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15.

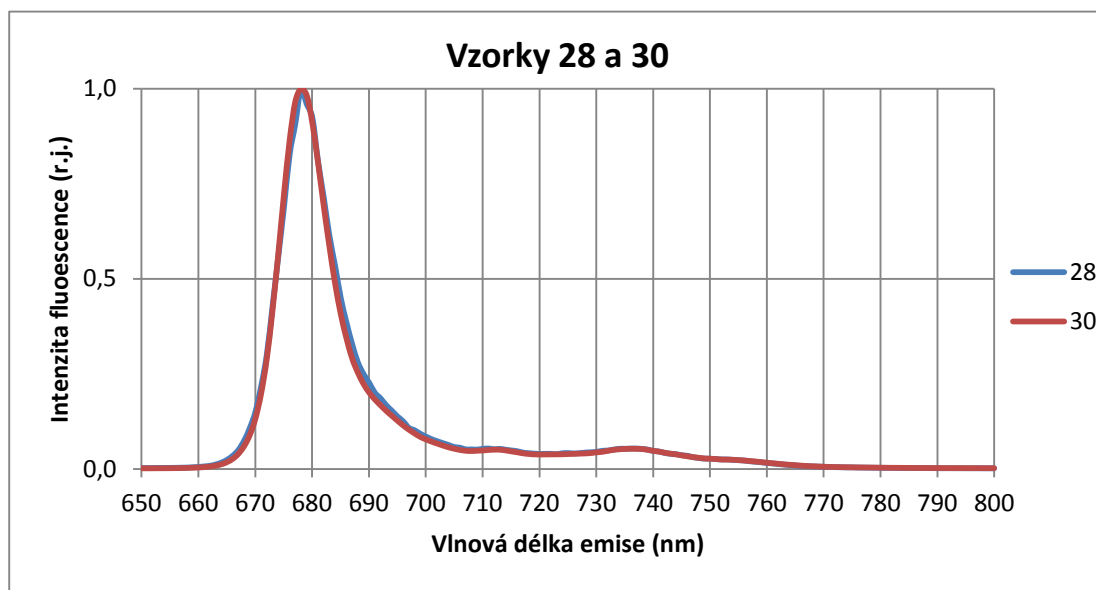
Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



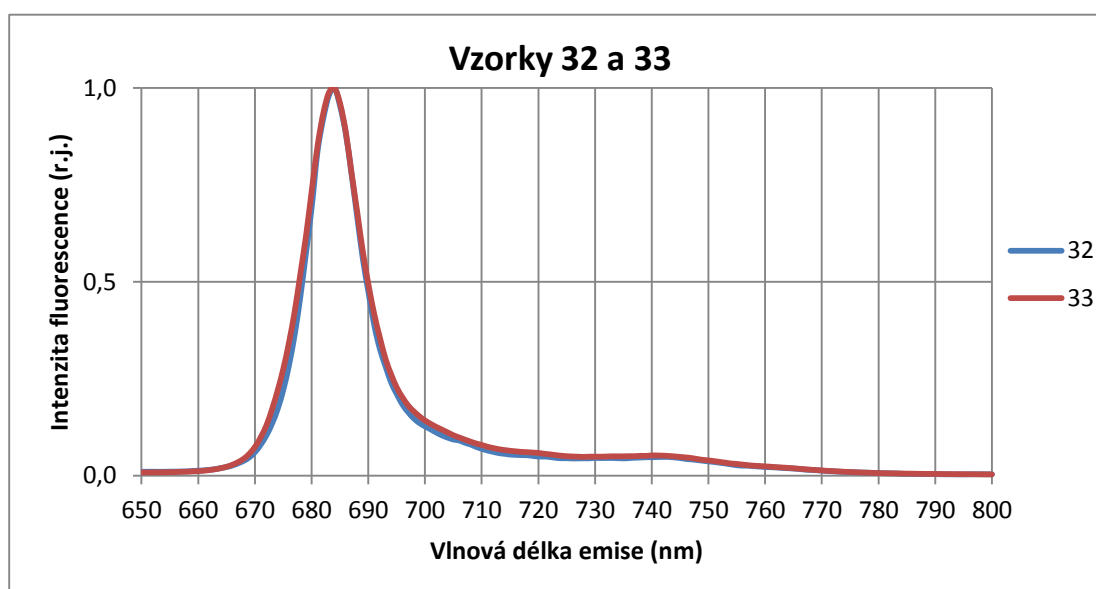
Obrázek 22 – Emisní fluorescenční spektra vzorků 23 a 25 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



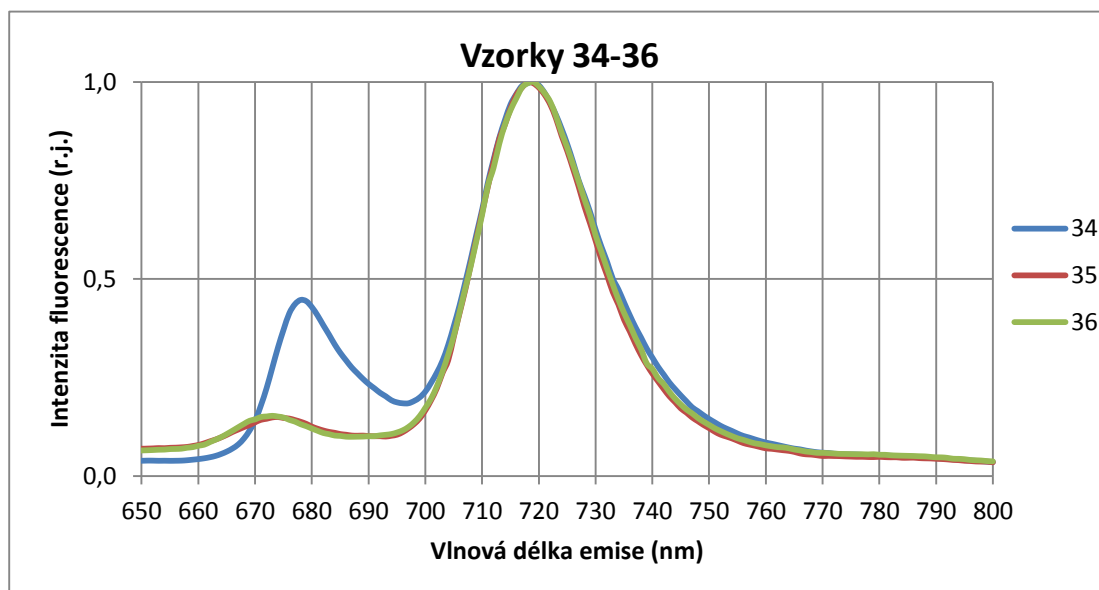
Obrázek 23 – Emisní fluorescenční spektra vzorků 26 a 27 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



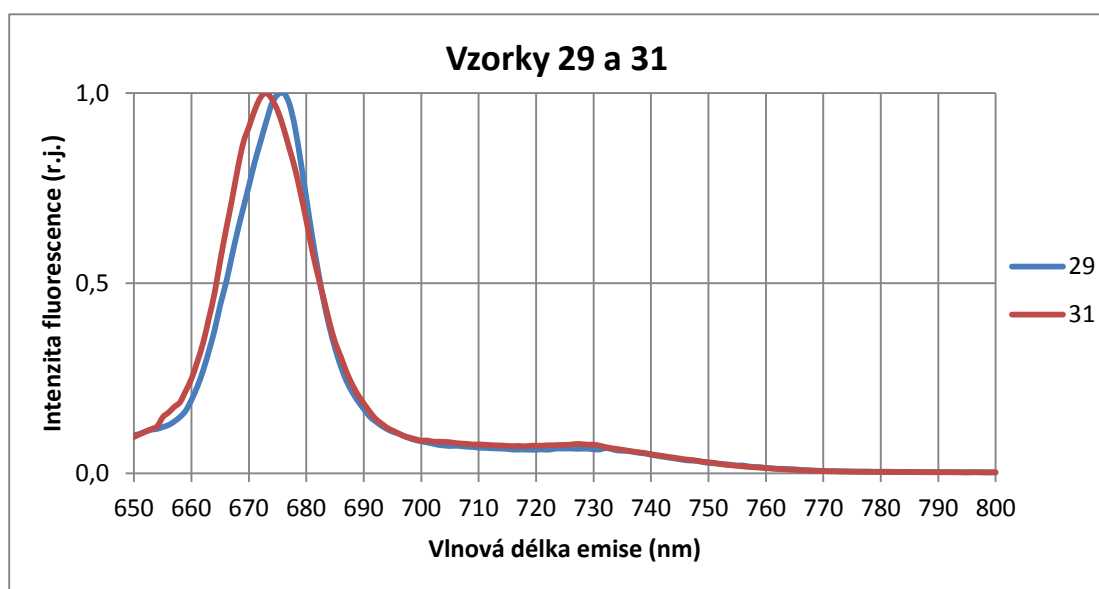
Obrázek 24 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 28 a 30 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



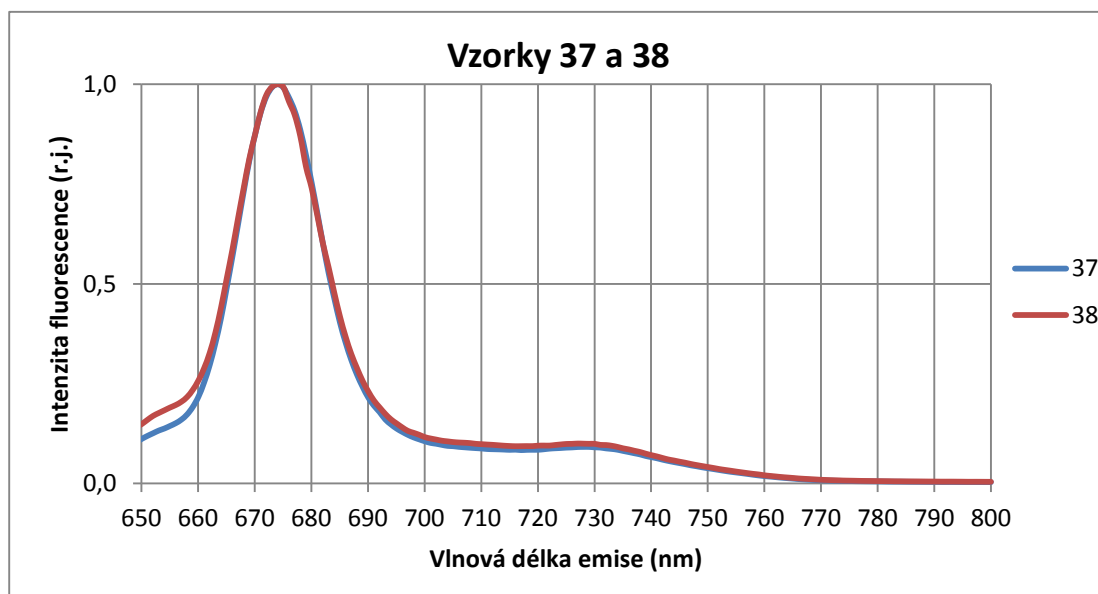
Obrázek 25 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 32 a 33 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



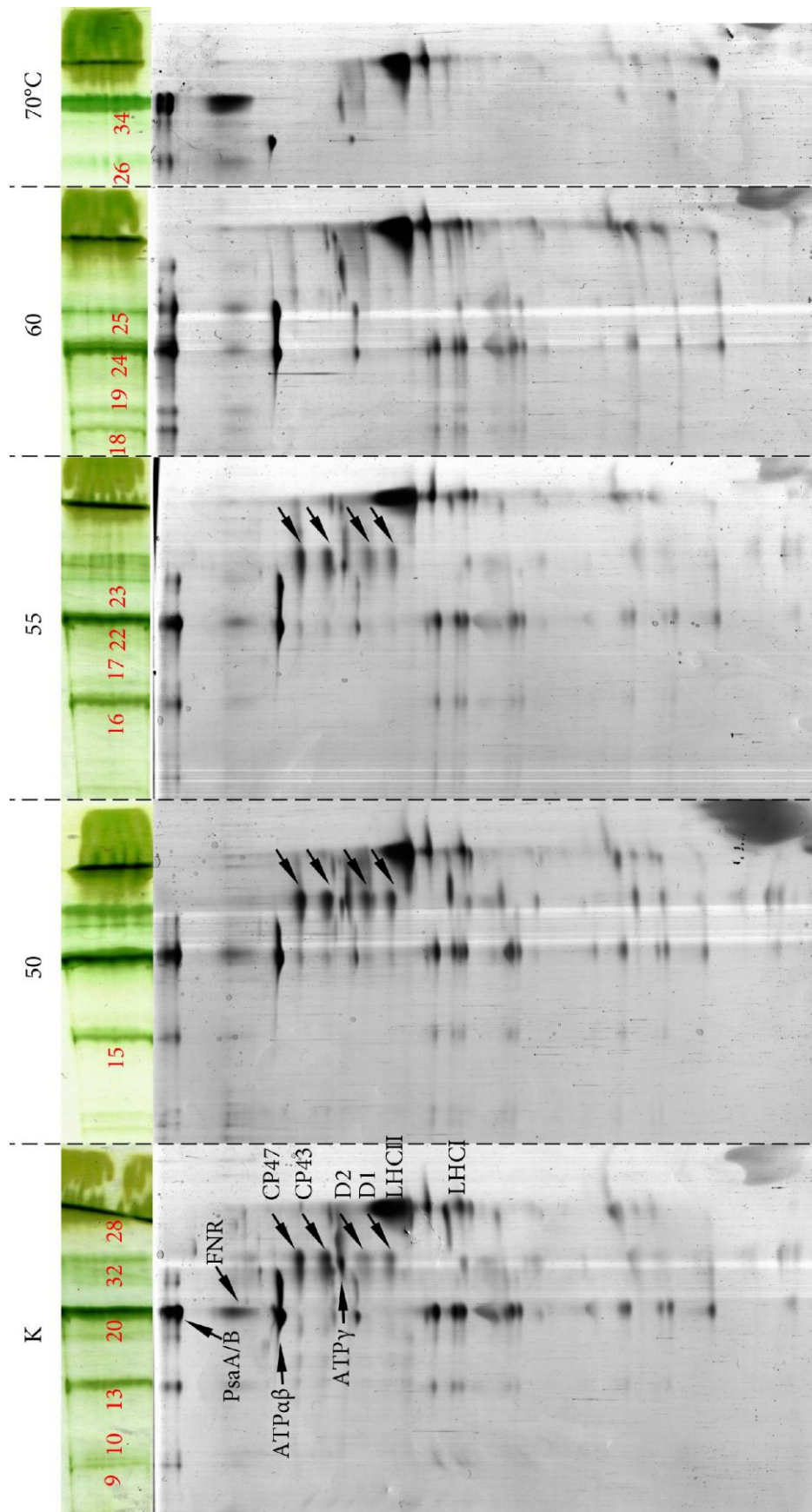
Obrázek 26 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 34 - 36 z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



Obrázek 27 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 29 a 31. z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



Obrázek 28 - Emisní fluorescenční spektra vzorků 37 a 38. z elektroforetického dělení pigment-proteinových komplexů, viz obr. 15. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 465 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



Obrázek 29 – Separace podjednotek pigment-proteinových komplexů ve druhém rozměru. V levé části obrázku je výsledek elektroforetické separace

pigment-proteinových komplexů pomocí CN-PAGE (viz obr. 15). Čísla na levé straně obrázku označují teploty, kterým byly po dobu 5 minut vystaveny vzorky thylakoidních membrán, K: elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán nevystavených zvýšené teplotě. Červená čísla označují pásy podrobené fluorescenční identifikaci (viz obr. 15). V pravé části obrázku je výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů ve druhém rozměru pomocí SDS-PAGE. PsaA/B: podjednotky PsaA a PsaB, ATP α β : α a β podjednotka ATP synthasy, ATP γ : γ podjednotka ATP synthasy, FNR: ferredoxin:NADP⁺-oxidoreduktasa, LHCI: podjednotky LHCI, LHCII: podjednotky LHCII.

Pro snazší vyhodnocení výsledků bylo celkové teplotní rozmezí rozděleno na dva užší celky. Prvním je teplotní rozmezí do 60°C (kontrolní vzorek, 40, 50, 55 a 60°C) a druhým je teplotní rozmezí nad 70°C (70, 80 a 90°C). Samostatně hodnocena jsou dna jamek.

Teplotní rozmezí do 60°C:

Mezi první změny, které jsou z výsledků elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů na obr. 15 patrné, patří mizení pásů označených čísly 9 – 12. Tyto pásy byly identifikovány jako superkomplexy fotosystému I (viz kap. 7.2.). Přítomnost fotosystému I je patrná i z fluorescenčních emisních spekter na obr. 17, protože emisní maximum při vlnové délce blízké 735 nm patří komplexu jádra fotosystému I a LHCI. Emisní maximum blízké hodnotě 682 nm patří proteinům světlosběrného komplexu LHCI. Emise při vlnové délce 682 nm by mohla náležet i fotosystému II, ale vzhledem k tomu, že podjednotky fotosystému II nebyly v tomto pásu nalezeny (viz kap. 7.2.), má emise při této vlnové délce původ pravděpodobně v LHCI (Petr Ilík, osobní sdělení). Pásy se superkomplexy fotosystému I, které s rostoucí teplotou postupně mizí, jsou v gelu přítomny pouze do teploty 50°C. U vzorků zahříváných na vyšší teploty tyto pásy již nejsou, což svědčí o jejich termolabilitě. V práci Lípové a kol. (Lípová et al., 2010), která se také zabývá separací tepelně stresovaných pigment-proteinových komplexů technikou nativní elektroforézy, dochází rovněž vlivem zvyšující se teploty k úbytku nespécifikovaných superkomplexů. Z výsledků její práce je patrné, že po zahřátí vzorku na teplotu převyšující 50°C došlo u pásů se superkomplexy k jejich vymizení.

Současně s postupným mizením pásů se superkomplexy fotosystému I v oblasti nejvyšších molekulových hmotností (PSI super1) je na obr. 15 patrný nárůst intenzity pásů se superkomplexy fotosystému I v oblasti nižších molekulových hmotností (pásky PSI super2 označené čísly 13 – 16). Přítomnost fotosystému I v těchto pásech plyne i z měření fluorescenčních emisních spekter na obr. 18 a 19. Nárůst intenzity pásů 13 – 15 patrně souvisí s tepelně indukovaným postupným rozpadem superkomplexů PSI super1 přítomných v gelu nad těmito pásky. Na obr. 15 je pod pásem č. 16 zřetelný další pás označený č. 17. Z fluorescenčního emisního spektra na obr. 19 je patrné, že je stejně jako pás č. 16 nad ním tvořen fotosystémem I (emisní maximum při vlnové délce 735 nm). Posun fluorescenčního emisního spektra k nižším vlnovým délkám u vzorku č. 17 oproti vzorku č. 16, který je zřetelný na obr. 19, byl způsoben dezintegrací komplexu fotosystému I a LHCI. V linii pásů se superkomplexy označených čísly 13 – 16, u kterých docházelo vlivem rostoucí teploty k nárůstu jejich intenzity, je u vzorku zahříváného při teplotě 60°C přítomen pás, u kterého došlo ve srovnání s předchozími pásky k poklesu jeho intenzity (pás č. 18). To pravděpodobně svědčí o určitém „druhém stupni“ rozkladu superkomplexů, kdy dochází k rozpadu i menších superkomplexů. Při teplotách do 50°C totiž docházelo především k rozpadu velkých superkomplexů přítomných v gelu v oblasti nejvyšších molekulových hmotností. Při teplotě 60°C, kdy v gelu již nebyly přítomny velké superkomplexy, došlo i k rozpadu menších superkomplexů. Pod pásem č. 18 je přítomen další pás označený číslem 19, u kterého došlo podobně jako u pásu č. 17 k dezintegraci komplexu fotosystému I s LHCI (viz posun fluorescenčního emisního spektra k nižším vlnovým délkám na obr. 20). Přítomnost podjednotek fotosystému I i proteinů LHCI je u všech dosud diskutovaných pásů dobře patrná i na gelu po druhém rozměru na obr. 29. Vzhledem k tomu, že se dosud nikomu nepodařilo tyto superkomplexy fotosystému I podobným způsobem separovat, není možné získané výsledky s ničím porovnat. Autorům Järvi a kol. a Lípové a kol. (Järvi et al., 2011; Lípová et al., 2010) se sice pigment-proteinové komplexy o vysokých molekulových hmotnostech separovat podařilo, ale tyto komplexy byly v gelu přítomny v jeho horní oblasti a byly od sebe vzájemně nedostatečně separované.

U nejintenzivnějších pásů, které jsou na obr. 15 označeny čísly 20, 21, 22 a 24, nedocházelo se zvyšující se teplotou k žádným viditelným změnám. Určité změny v kompozici těchto pásů však byly odhaleny pomocí měření

fluorescenčních emisních spekter a analýzou gelu po druhém rozměru. Z fluorescenčních emisních spekter těchto pásů na obr. 21 plyne, že byly tvořeny převážně fotosystémem I (emisní maximum při vlnových délkách větších než 735 nm). U pásu č. 20 (kontrolní vzorek) a pásu č. 21 (vzorek zahříváný při teplotě 40°C) se vyskytlo i další emisní maximum při vlnové délce blízké 685 nm, které svědčí o přítomnosti proteinů LHCI (Petr Ilík, osobní sdělení). Emisní maximum při 685 nm u vzorků zahříváných na vyšší teploty mizí, což bylo pravděpodobně zapříčiněno vymizením proteinů LHCI. Z gelu po druhém rozměru (viz obr. 29) však vyplývá, že se zvyšující se teplotou došlo v těchto pásích nejprve k objevení a poté k následnému vymizení podjednotek jádra fotosystému II. V pásu č. 20 kontrolního vzorku tyto podjednotky fotosystému II přítomny nebyly, k jejich objevení došlo až u vzorku zahřátého na teplotu 50°C a u vzorků zahříváných na vyšší teploty poté docházelo k jejich postupnému mizení. U vzorku zahřátého na 60°C tyto podjednotky fotosystému II již zcela zmizely. Důvod, proč se přítomnost fotosystému II neprojevila na fluorescenčních emisních spektrech, je pravděpodobně reabsorbce fluorescence. Podobné výsledky související s podjednotkami fotosystému II jsou prezentovány i v práci Lípové a kol., 2010 (Lípová et al., 2010). V její práci však byly podjednotky jádra fotosystému II přítomny i v pásu náležejícím fotosystému I u kontrolního vzorku, což svědčí o přítomnosti dimeru jádra fotosystému II v tomto pásu.

Dalšími pásy, které se objevily vlivem zahřívání vzorků thylakoidních membrán, jsou pásy označené na obr. 15 čísly 23 a 25 přítomné u vzorků zahříváných na teplotu 55 a 60 °C. Z měření jejich fluorescenčních spekter (viz obr. 22) plyne, že jak pás č. 23, tak i pás č. 25 byl tvořen heterodimerem jádra fotosystému I PsaA/B, jemuž náleží emisní maximum pod hodnotou 720 nm. Na obr. 22 je u fluorescenčních emisních spekter obou pásů přítomno další emisní maximum blízké vlnové délce 680 nm. Na spektru pásu č. 23 má toto maximum hodnotu 682 nm a pochází pravděpodobně z dimeru jádra fotosystému II, spektrum pásu č. 25 má toto maximum pod 680 nm, což svědčí o pravděpodobné přítomnosti dezintegrovaného chlorofylu (Petr Ilík, osobní sdělení). Tyto výsledky plynou i z analýzy gelu po druhém rozměru, kde jsou u obou pásů zřetelně viditelné podjednotky fotosystému I PsaA a PsaB a u pásu č. 23 rovněž podjednotky fotosystému II (viz obr. 29).

Mezi další pásy, u kterých docházelo vlivem zvýšené teploty ke změně intenzity, patří pásy označené na obr. 15 čísly 32 a 33 a další pásy ve stejné úrovni přítomné u vzorků zahříváných na teplotu 50, 55 a 60°C. Jak fluorescenční emisní spektra (emisní maximum blízké hodnotě 682 nm), tak i druhý rozměr elektroforézy potvrdil, že se jednalo o fotosystém II. S rostoucí teplotou docházelo nejprve k nárůstu intenzity těchto pásů a u vzorku zahříváného při 60°C tento pás zmizel. Postupný nárůst intenzity pásu s fotosystémem II a jeho zmizení koresponduje s objevením a zmizením podjednotek fotosystému II v hlavních pásech (pásy označené čísly 20, 21, 22 a 24). Zmizení fotosystému II při teplotě 60°C ze všech pásů svědčí o tom, že podjednotky fotosystému buď zdegradovaly, nebo zůstaly ve formě agregátů na dnech jamek (viz také Lípová et al., 2010).

Dalšími pásy přítomnými v gelu po prvním rozměru byly pásy světlosběrného komplexu (označené na obr. 15 čísly 28 a 30). Přítomnost světlosběrného komplexu v těchto pásech byla potvrzena jak měřením fluorescenčních emisních spekter (emisní maximum při vlnové délce 678 nm na obr. 24), tak i analýzou gelu po druhém rozměru (viz obr. 29). Z gelu po prvním i druhém rozměru je patrné, že vlivem zahřívání jednotlivých vzorků nedocházelo ke znatelným změnám v intenzitě ani složení těchto pásů.

Posledními pásy přítomnými v gelu po prvním rozměru na obr. 15 byly pásy s volnými pigmenty, u kterých docházelo vlivem zahřívání k postupnému nárůstu intenzity. Značný nárůst množství volných pigmentů svědčí o skutečnosti, že vlivem zvyšující se teploty docházelo k destrukci pigment-proteinových komplexů a tím k uvolnění pigmentových molekul z jejich původních vazebných pozic. Fluorescenční emisní spektrum na obr. 27 potvrzuje přítomnost volného chlorofylu *a* (emisní maximum blízké hodnotě 675 nm).

Teplotní rozmezí nad 70°C:

Oblast gelu po prvním rozměru se vzorky vystavenými teplotám 70, 80 a 90°C obsahovala ve srovnání se vzorky zahříványými při nižších teplotách jen velmi málo pásů s pigment-proteiny. Více než celá horní polovina gelu neobsahovala žádné proteinové pásy, což svědčí o značném degradačním vlivu vysokých teplot na pigment-proteinové komplexy. Pásy označené na obr. 15 čísly 26 a 27 (spolu s dalším neoznačeným pásem přítomným ve stejné úrovni) a pásy č. 34 – 36 byly podle měření fluorescenčních emisních spekter (viz obr.

23 a 26) tvořeny heterodimerem jádra fotosystému I PsaA/B (emisní maxima při 717 a 718 nm). V případě horních pásů č. 26 a 27 se však jednalo o jádro fotosystému I bez navázaných LHCI, v případě dolních pásů se jednalo o heterodimer jádra fotosystému I tvořený podjednotkami PsaA/B. Přítomnost proteinů jádra fotosystému I v těchto pásech potvrdil i druhý rozměr elektroforézy (obr. 29). V práci Lípové a kol. (Lípová et al., 2010) jsou v gelu po prvním rozměru u vzorků zahříváných při teplotách nad 70°C přítomny pouze pásy s heterodimerem jádra fotosystému I a tyto pásy navíc u vzorku zahřátého na 90°C zcela zmizely. Pásy s fotosystémem I bez LHCI nebyly v gelu vůbec přítomny, což svědčí o nižší šetrnosti použité elektroforetické separační techniky v práci Lípové a kol. (Lípová et al., 2010).

Pod těmito pásy byly přítomny pásy se světlosběrnými komplexy. U vzorku zahřátého na 70°C došlo ve srovnání se vzorky zahřívánými na nižší teploty (teplotní rozmezí do 60°C) ke snížení intenzity tohoto pásu a u teplot převyšujících 70°C tento pás úplně zmizel. To svědčí o úplné tepelné degradaci těchto proteinů. Podobné výsledky jsou publikovány také v práci Lípové a kol. (Lípová et al., 2010) kde u vzorků zahříváných při teplotách nad 70°C došlo rovněž k vymizení proteinů světlosběrného komplexu.

Posledními jsou pásy s volnými pigmenty, u kterých docházelo stejně jako v případě vzorků zahříváných při teplotách do 60°C k postupnému nárůstu intenzity. Fluorescenční emisní spektrum na obr. 28 potvrzuje přítomnost chlorofylu a (emisní maximum okolo hodnoty 675 nm).

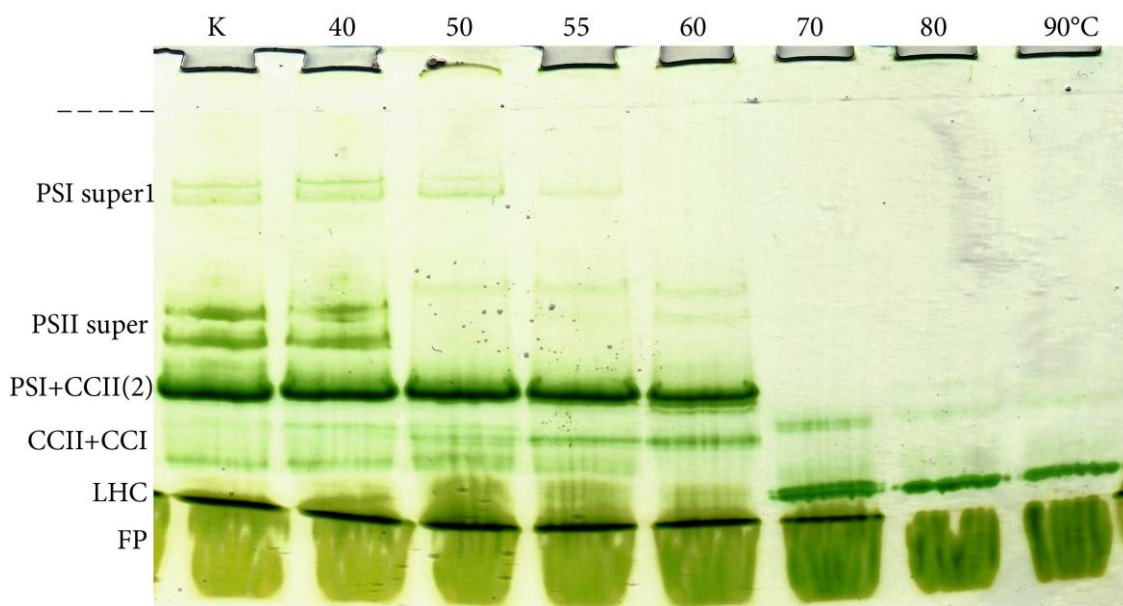
U tohoto teplotního rozmezí je možno si povšimnout zajímavého jevu. Zatímco u teplotního rozmezí do 60°C docházelo s postupným zahříváním vzorků k rozpadu určitých pásů a k nárůstu intenzity pásů pod rozpadajícími se pásy, v případě teplotního rozmezí nad 70°C k nárůstu některého pásu, který by souvisel s rozpadem jiného pásu, nedocházelo.

Na gelu druhého rozměru na obr. 29 je dobře vidět, že u vzorku zahřátého na 70°C došlo ke značnému nárůstu intenzity pásu, který obsahoval enzym ferredoxin:NADP⁺-oxidoreduktasu. Je známo, že tento enzymový komplex je asociovaný s fotosystémem I a proto není jeho přítomnost v pásu s fotosystémem I ničím překvapujícím (Malkin & Niyogi, 2000).

Dna jamek:

Podle výrazného zeleného zbarvení jamek gelu prvního rozměru na obr. 15 je zřetelné, že v jamkách ulpěly agregáty pigment-proteinových komplexů, které do gelu nevstoupily. Proteinové složení těchto agregátů nemohlo být analyzováno pomocí druhého rozměru elektroforézy, protože zaostřovací gel, ze kterého byly jamky tvořeny, byl příliš řídký a bylo obtížné s ním jakkoli manipulovat. Z fluorescenčních emisních spekter na obr. 16 je ale patrné, že u vzorků zahříváných na nižší teploty (do 60°C) byl v agregátech na dnech jamek přítomen fotosystém I (emisní maximum při 735 nm) i fotosystém II (emisní maximum při 682 nm). U vzorků zahříváných na vyšší teploty došlo v oblasti větších vlnových délek k posunu emisního maxima pod hodnotu 720 nm, což svědčí o odpojení proteinů LHCI od jádra fotosystému I. U fotosystému II také docházelo se zvyšující se teplotou k postupnému rozpadu. U teplot do 50°C je na fluorescenčním emisním spektru na obr. 16 patrné emisní maximum při vlnových délkách nad 680 nm, což svědčí o přítomnosti fotosystému II s navázaným LHCII. Se zvyšující se teplotou se u vzorků thylakoidních membrán zahříváných při 60 a 70°C objevuje další emisní maximum při 695 nm, které náleží volné vnitřní anténě fotosystému II CP47. To svědčí o rozpadu fotosystému II. U teplot 80 a 90°C se objevuje emisní maximum při vlnových délkách pod hodnotou 680 nm, což svědčí o přítomnosti volných proteinů LHCII (Petr Ilík, osobní sdělení).

Z výsledků prezentovaných v předchozím odstavci vyplývá, že v jamkách gelu zůstávalo značné množství nesolubilizovaného materiálu, především fotosystém II. V výsledků prezentovaných kapitolách 7.1. a 7.2. také plyne, že zvýšením hmotnostního poměru DM/chl použitého pro solubilizaci thylakoidních membrán dochází k lepší solubilizaci membrán a k uvolnění komplexů s fotosystémem II. Za účelem zjištění, jakou „odezvu“ budou mít komplexy fotosystému II na zvýšenou teplotu, tedy byla provedena separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených teplotnímu stresu solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=10.



Obrázek 30 - Elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán pomocí CN-PAGE vystavených teplotnímu stresu solubilizovaných hmotnostním poměrem DM/chl=10.

V záhlaví obrázku jsou uvedeny teploty, kterým byly vystaveny vzorky thylakoidních membrán. K: kontrolní vzorek. PSI super1: superkomplexy fotosystému I, PSII super: superkomplexy fotosystému II, PSI+CCII(2): fotosystém I a dimer jádra fotosystému II, CCII+CCI: jádro fotosystému II s jádrem fotosystému I, LHC: komponenty světlosběrného komplexu, FP: volné pigmenty. Přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. Označení jednotlivých pásů proběhlo na základě srovnání s výsledky identifikace v kap. 7.2.

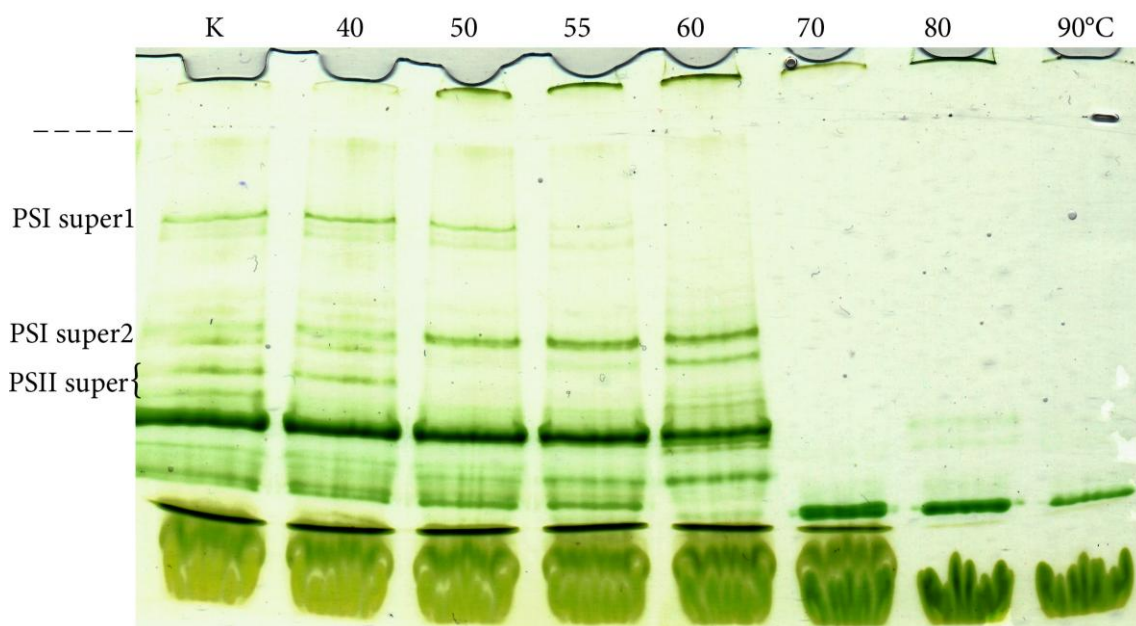
Na obrázku 30 je výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán, které byly solubilizovány při hmotnostním poměru DM/chl=10. V literatuře je zmiňováno, že při zahřátí vzorku thylakoidních membrán na teplotu blízkou 50°C dochází k rozpadu komplexní struktury fotosystému II (Lípová et al., 2010). To je dobře zřetelné i na obrázku 30, protože vlivem zahřátí vzorku thylakoidních membrán skutečně došlo ke zmizení pásů s fotosystémem II. Při srovnání elektroforetické separace na obr. 30 s výsledky elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=6 (viz obr. 15) je patrné, že superkomplexy fotosystému II jsou ve srovnání se superkomplexy fotosystému I

termolabilnější. Superkomplexy fotosystému II se rozpadly při teplotách převyšujících 40°C, zatímco superkomplexy fotosystému I byly v gelu přítomny i u vzorků thylakoidních membrán zahřívaných při teplotě 60°C. Obě elektroforetické separace se liší také v oblasti dna jamek, kde při použití většího množství detergentu nezůstalo žádné viditelné zelené zbarvení. Dá se tedy usuzovat, že při použití většího množství detergentu došlo ke kompletní solubilizaci veškerého materiálu, který neulpěl na dnech jamek. Další rozdíl je zřetelný v oblasti teplot od 70 do 90°C, kde v případě použití většího množství detergentu nejsou v gelu vůbec přítomny pásy s jádrem fotosystému I, ale pouze pásy s heterodimerem jádra fotosystému I PsaA/B.

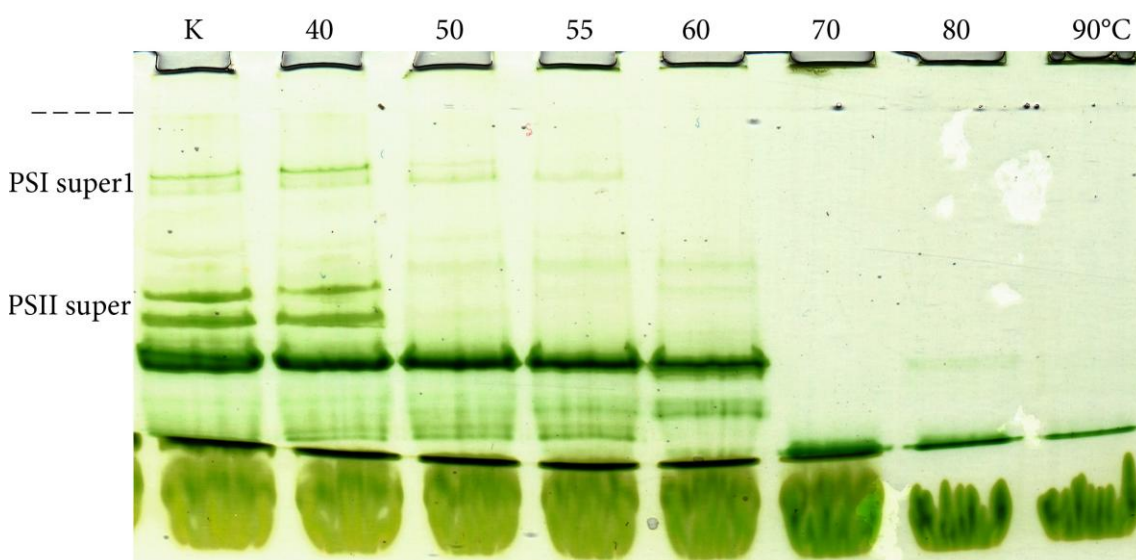
Výsledek elektroforetické separace na obr. 30 velmi připomíná výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán prezentovaný v práci Lípové a kol. (Lípová et al., 2010). V případě obou separací nejsou v gelu přítomny pásy s jádrem fotosystému I, ale pouze pásy s heterodimerem jádra fotosystému I tvořeným podjednotkami PsaA a PsaB. V práci Lípové a kol. však nedošlo k tak úspěšné separaci pigment-proteinových komplexů o velkých molekulových hmotnostech jako v případě mé práce.

7.3.3. Ověření přítomnosti superkomplexů fotosystému I

V literatuře je také často zmiňováno, že během elektroforetické separace proteinových komplexů může v gelu u těchto komplexů docházet ke vzniku agregátů, které jsou poté přítomny v horních oblastech gelu. Agregace by měla být potlačena přidáním většího množství detergentu používaného pro solubilizaci membrán do horního, katodového pufru. Kvůli ověření, zda horní pásy přítomné v gelu po prvním rozměru označené jako superkomplexy fotosystému I (viz kap. 7.2.) jsou opravdu tvořeny superkomplexy a nikoli oligomery fotosystému I, byl proveden experiment, při kterém byly elektroforeticky separovány pigment-proteinové komplexy thylakoidních membrán při použití dvojnásobného množství detergentu v katodovém pufru. Běžně bylo v pufru používáno takové množství detergentu dodecyl- β -D-maltosidu, které odpovídalo konečné koncentraci 0,03 %. V případě dvojnásobného množství byla použita koncentrace 0,06 %. Výsledky ukazují obr. 31 a 32.



Obrázek 31 - Výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů tepelně stresovaných thylakoidních membrán technikou CN-PAGE solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=6 při použití dvojnásobného množství detergentu v katodovém pufru. Teploty, kterým byly vystaveny thylakoidní membrány, jsou uvedeny v záhlaví obrázku. K: kontrolní vzorek, PSI super1, PSI super2: superkomplexy fotosystému I, PSII super: superkomplexy fotosystému II, přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem.



Obrázek 32 - Výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů tepelně stresovaných thylakoidních membrán technikou CN-PAGE solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=10 při použití

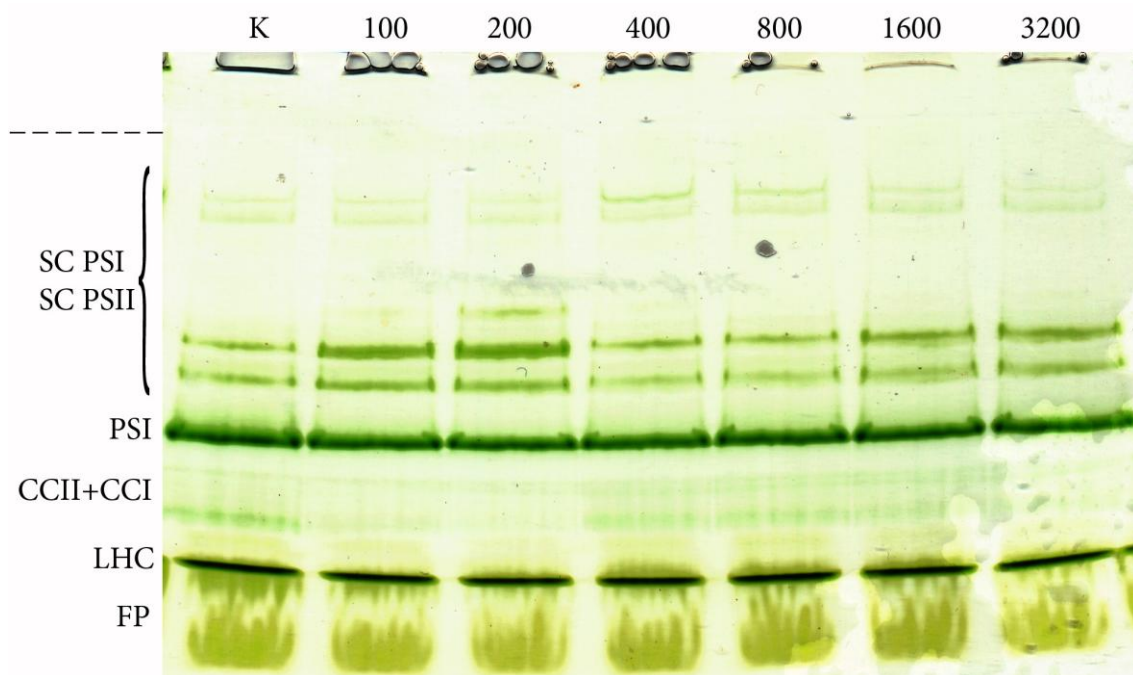
dvojnásobného množství detergentu v katodovém pufru. Teploty, kterým byly vystaveny thylakoidní membrány, jsou uvedeny v záhlaví obrázku. K: kontrolní vzorek, PSI super1: superkomplex fotosystému I, PSII super: superkomplexy fotosystému II, přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem.

Obr. 31 ukazuje elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů tepelně stresovaných thylakoidních membrán solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=6 s použitím dvojnásobného množství detergentu v katodovém pufru. Na obrázku 32 je elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů tepelně stresovaných thylakoidních membrán solubilizovaných při hmotnostním poměru DM/chl=10 s použitím dvojnásobného množství detergentu v katodovém pufru. Oba obrázky ukazují, že proteinové pásy přítomné v nejhornější oblasti gelu jsou i při použití dvojnásobného množství detergentu v katodovém pufru stabilní a že tedy nejsou tvořeny agregáty pigment-proteinových komplexů.

7.4. Světelný stres

Thylakoidní membrány izolované z ječmene jarního (*Hordeum vulgare*) byly vystaveny působení vysoké intenzity světla a byla provedena elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů v nich obsažených.

Vystavení thylakoidních membrán světelnému stresu bylo nejprve provedeno podle postupu, který je popsán v kap. 6.3., 1. oddíl. Suspenze thylakoidních membrán byla zředěna puftrem, vystavena působení světla, poté zcentrifugována a pigment-proteinové komplexy následně solubilizovány. Výsledky jsou na obr. 33.



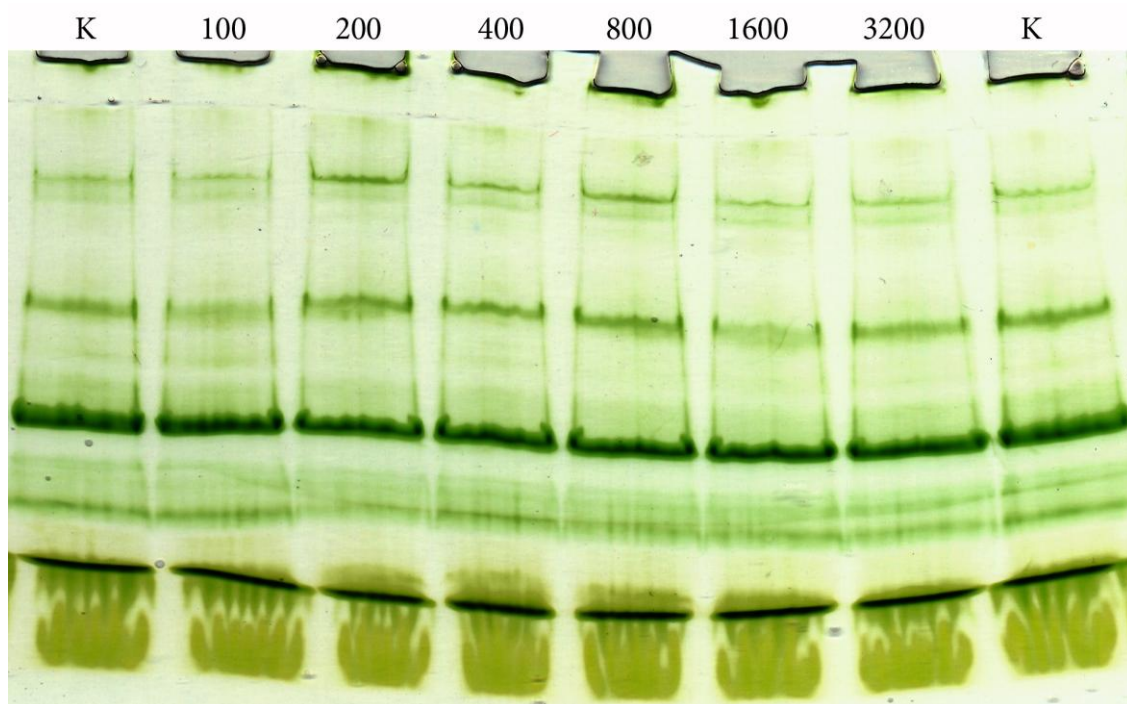
Obrázek 33 – Výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených světelnému stresu.

V záhlaví obrázku jsou uvedeny intenzity světla, kterým byly vystaveny jednotlivé vzorky thylakoidních membrán. Hodnoty intenzity světla jsou v $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. K: kontrolní vzorek nevystavený světelnému stresu. Přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. SC PSI: superkomplexy fotosystému I, SC PSII: superkomplexy fotosystému II, PSI: fotosystém I s navázaným LHCI, CCII+CCI: jádro fotosystému II s jádrem fotosystému I, LHC: komponenty světlosběrného komplexu, FP: volné pigmenty.

U kontrolního vzorku na elektroforetogramu na obr. 33 je patrné, že zde došlo k neočekávanému objevení pásů se superkomplexy fotosystému II. Při porovnání tohoto výsledku s výsledky na obr. 10 a 30 je zřejmé, že tyto pásy s komplexy fotosystému II byly v gelu přítomny při použití vyšších hmotnostních poměrů DM/chl. Výskyt těchto pásů byl pravděpodobně způsoben zpracováním vzorku před jeho vystavením světelnému stresu. Při ředění thylakoidních membrán, které bylo prováděno za účelem snadnější dostupnosti světla vzorkem, pravděpodobně došlo k určitému rozvolnění struktury thylakoidních membrán a komplexy fotosystému II mohly být následně snáze solubilizovány. Z obr. 33 je také patrné, že se zvyšující se intenzitou světla nedošlo u horních pásů se superkomplexy k žádným

změnám. Určité změny však nastaly u spodních pásů se superkomplexy, kde došlo zde nejprve k nárůstu a poté k poklesu intenzity těchto pásů. Tyto změny byly pravděpodobně způsobeny vlivem tzv. postupné solubilizace, o které je pojednáváno v kap. 7.3.2 a na obr. 14. U pásů náležejících jádru fotosystému II, světlosběrným komplexům a volným pigmentům nedošlo k žádným změnám.

Následně tedy byla provedena elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů z thylakoidních membrán, které byly vystaveny působení světla způsobem popsáním v kap. 6.3., oddíl 2A. a které byly solubilizovány způsobem popsáním v kap. 6.4., č. 2. Tyto vzorky byly během solubilizace vystaveny působení detergentu po stejně dlouhou dobu. Výsledky jsou na obr. 34.

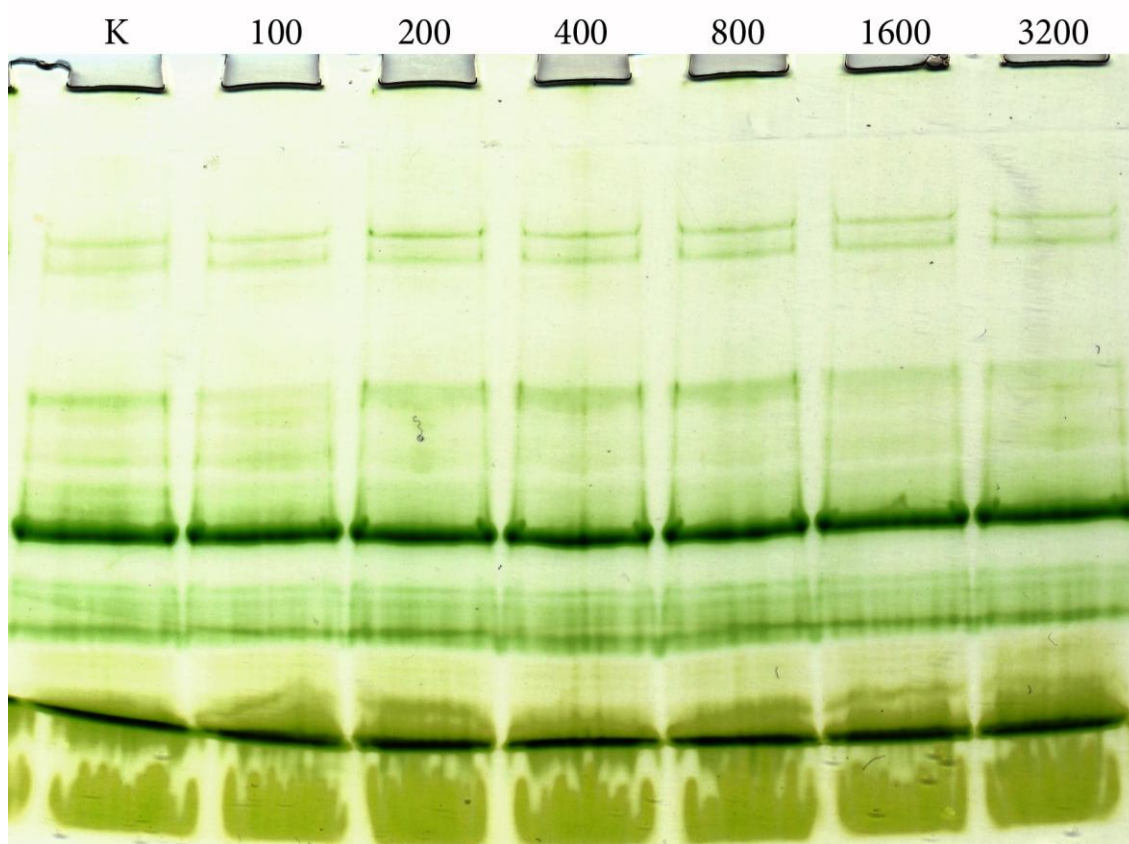


Obrázek 34 - Elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených světelnému stresu separovaných pomocí techniky CN-PAGE. V záhlaví jsou uvedeny intenzity světla, kterým byly vystaveny vzorky thylakoidních membrán (v $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) K: kontrolní vzorek. Popis jednotlivých pásů viz obr. 33.

Z obrázku je patrné, že vlivem zvyšující se intenzity světla nedošlo k žádným výrazným změnám v intenzitách pásů. U pásů se superkomplexy

sice docházelo k nárůstu i k poklesu jejich intenzity, ale tyto změny probíhaly u jednotlivých vzorků nepravidelně a mohly být způsobeny nehomogenitami v gelu.

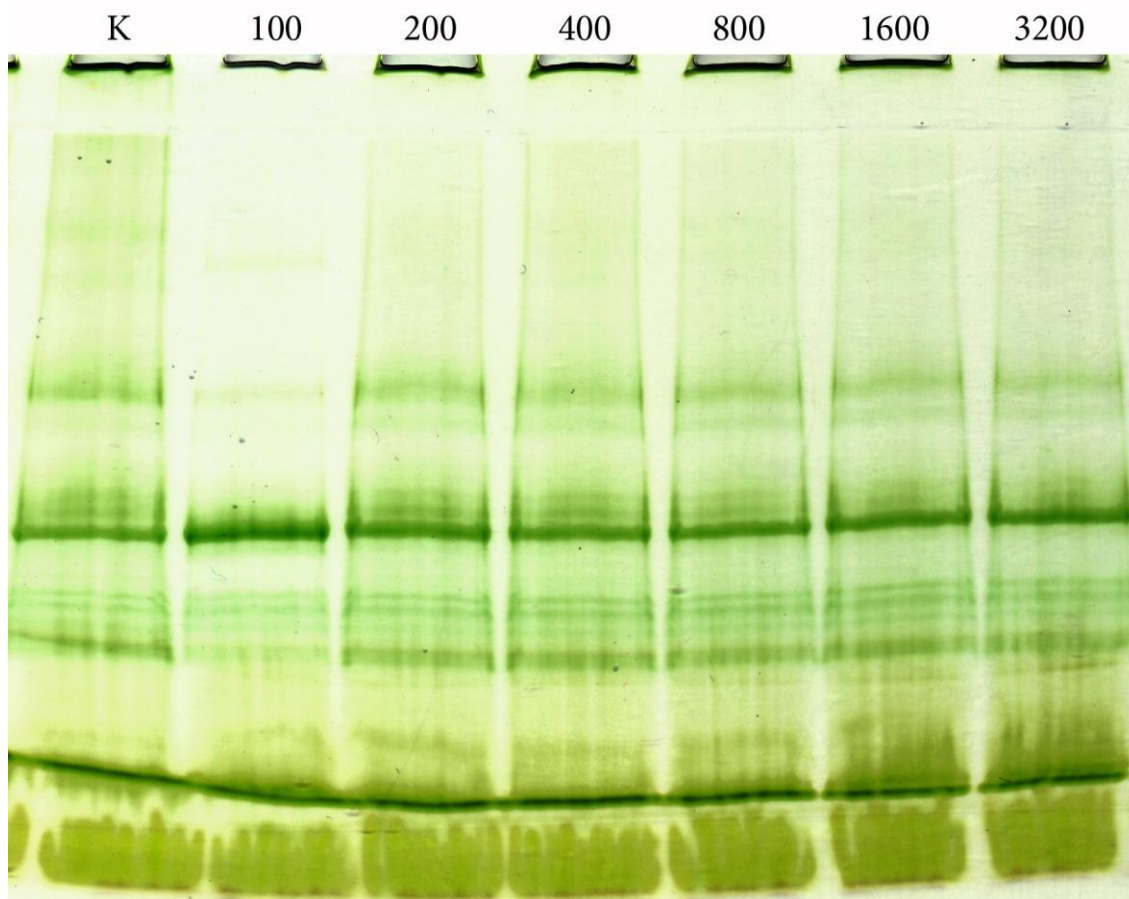
Byla tedy proto provedena separace pigment-proteinových komplexů s přídavkem diethyldithiokarbamátu (DDC), který slouží jako inhibitor enzymu superoxiddismutasy (viz kap. 6.3., 2B). Inhibice tohoto enzymu, který se účastní procesů chránících fotosystémy před účinky světelného stresu, by měla způsobit vyšší citlivost fotosystémů k vysoké ozáření (Hwang et al., 2004). Výsledky jsou zobrazeny na obr. 35.



Obrázek 35 - Elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených světelnému stresu s inhibovaným SOD. Čísla v horní části obrázku označují intenzitu světla, které byly vystaveny jednotlivé vzorky thylakoidních membrán (v $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). K: kontrolní vzorek. Označení jednotlivých pásů viz obr. 33.

Z obrázku 35 plyne, že ani po přídavku inhibitoru enzymu SOD nedošlo u žádného z pásů k žádným výrazným změnám. Horní pásy se superkomplexy zůstaly vlivem zvyšující se intenzity světla nezměněné.

Byla tedy provedena ještě jedna elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů z thylakoidních membrán vystavených světelnému stresu, u kterých byl však enzym SOD inhibován při větší koncentraci inhibitoru a thylakoidní membrány byly vystaveny působení světla po delší dobu (viz kap. 6.3. oddíl 3). Výsledky jsou shrnuty na obr. 36.



Obrázek 36 - Elektroforetogram separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených světelnému stresu. Čísla v horní části obrázku označují intenzitu světla, které byly vystaveny jednotlivé vzorky thylakoidních membrán (v $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). K: kontrolní vzorek. Označení jednotlivých pásů viz obr. 33.

Z obrázku 36 je patrné, že došlo k úplnému vymizení horních pásů se superkomplexy. Všechny vzorky u všech intenzit světla jsou úplně stejné a nedošlo u nich se zvyšující se intenzitou světla k žádným změnám. U všech proteinových pásů navíc došlo k jejich rozmazání. Vymizení horních pásů i rozmazání ostatních pásů bylo pravděpodobně způsobeno vlivem DDC, který podobně jako v případě předchozího experimentu způsobil u proteinů jejich

denaturaci. U vzorku ozařovaného při intenzitě světla $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ došlo ve srovnání s ostatními vzorky k výraznému zesvětlení pozadí a k nárůstu intenzity hlavního pásu s fotosystémem I. Vzhledem k tomu, že k podobnému jevu u jiných vzorků nedošlo, nebylo k tomuto jevu nalezeno žádné vysvětlení.

Pigment-proteinové komplexy vystavené světelnému stresu vykazovaly ve všech experimentech značnou stabilitu. Protože u nich přes veškerou snahu nedošlo k vytvoření žádné odezvy na zvyšující se intenzitu světla, které byly tyto komplexy vystaveny, byly veškeré další experimenty týkající se světelného stresu kvůli metodickým problémům přerušeny. Metodické problémy pravděpodobně plynuly z použití koncentrované suspenze thylakoidních membrán, do které obtížně pronikalo světlo. Při zředění suspenze thylakoidních membrán totiž docházelo k mizení superkomplexů fotosystému I a k objevení se superkomplexů s fotosystémem II. Problémy také mohly souviset s použitím skleněných kapilár, ve kterých byla suspenze thylakoidních membrán ozařována. V kapilárách byl k suspenzi thylakoidních membrán omezen přístup kyslíku, který je při inhibovaném SOD nutný k projevu fotoinhibice.

Závěr

V práci byla použita technika CN-PAGE pro separaci pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán, která byla optimalizována pro separaci komplexů o vysokých molekulových hmotnostech. U této techniky se podařilo najít optimální hmotnostní poměr detergentu k chlorofylům, který vedl k separaci 2 superkomplexů s fotosystémem I. Následnou analýzou pásů s těmito superkomplexy bylo zjištěno, že obsahují podjednotky enzymového komplexu NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasy. Tento enzymový komplex tvoří v membránách thylakoidů s fotosystémem I velký superkomplex zajišťující cyklický elektronový transport. Pomocí zvýšeného množství detergentu v elektroodovém pufru během elektroforetické separace bylo navíc ověřeno, že tyto velké struktury přisouzené superkomplexům fotosystému I nebyly pouze artefakty vzniklémi během elektroforetické separace. Podjednotky enzymového komplexu NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasy však byly nalezeny pouze u vzorků thylakoidních membrán, které nebyly plně solubilizovány, protože komplexy fotosystému II zůstaly ve formě agregátů na dně jamek. Při použití většího množství detergentu došlo k lepší solubilizaci thylakoidních membrán, což vedlo nejen k objevení se pásů se superkomplexy fotosystému II, ale také k rozpadu superkomplexů fotosystému I. Přítomnost superkomplexů s fotosystémem II po solubilizaci thylakoidních membrán vysokým poměrem detergentu k chlorofylům je v gelech nativní elektroforézy známa z literatury (např. separace pigment-proteinových komplexů pomocí BN-PAGE). K podobným jevům jako při použití vysokého poměru detergentu k chlorofylům docházelo i pouhým ředěním vzorku thylakoidních membrán. Při zředění suspenze thylakoidních membrán pravděpodobně došlo k rozvolnění nahloučených thylakoidů, což vedlo k jejich lepší solubilizaci.

U pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených vysokoteplotnímu stresu došlo vlivem zvyšující se teploty k jejich postupnému rozpadu. Bylo zjištěno, že komplexní struktury obou fotosystémů jsou v gelu prvního rozměru přítomny do teploty 60°C a bylo také zjištěno, že superkomplexy fotosystému I jsou termostabilnější, než superkomplexy fotosystému II. U pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán vystavených vysoké intenzitě světla nedošlo k žádným výrazným změnám, které by svědčily o vlivu vysoké ozářenosti na jejich kompozici.

Literatura

Amunts A., Toporik H., Borovikova A., Nelson N. (2010) Structure Determination and Improved Model of Plant Photosystem I. *J. Biol. Chem.* **285**, 3478-3486.

Aro E. M., Virgin I., Andresson B. (1993) Photoinhibition of photosystem-2 - inactivation, protein damage and turnover. *BBA* **1143**, 113-134.

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

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

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

Hu Z. H., Xu Y. N., Gong Y. D., Kuang T. Y. (2005) Effects of heat treatment on the protein secondary structure and pigment microenvironment in photosystem 1 complex. *Photosynthetica* **43**, 529-534.

Hu Z. H., Xu Y. N., Jiang G. Z., Kuang T. Y. (2004) Degradation and inactivation of photosystem I complexes during linear heating. *Plant Sci.* **166**, 1177-1183.

Hui Y., Jie W., Carpentier R. (2000) Degradation of the photosystem I complex during photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* **72**, 508-512.

Hwang H. J., Kim J. H., Eu Y. J., Moon B. Y., Cho S. H., Lee C. H. (2004) Photoinhibition of photosystem I is accelerated by dimethyldithiocarbamate, an inhibitor of superoxide dismutase, during light-chilling of spinach leaves. *J. Photoch. Photobio B* **73**, 79-85.

Iwai M., Takizawa K., Tokutsu R., Okamuro A., Takahashi Y., Minagawa J. (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* **464**, 1210-U134.

- 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. *Biochem. J.* **439**, 207-214.
- Ladig R., Sommer M. S., Hahn A., Leisegang M. S., Papasotiriou D. G., Ibrahim M., Elkehal R., Karas M., Zickermann V., Gutensohn M., Brandt U., Klösken R. B., Schleiff E. (2011) A high-definition native polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane complexes. *Plant J.* **67**, 181-194.
- Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method. Enzymol.* **148**, 350-382.
- Lípová L., Krchňák P., Komenda J., Ilík P. (2010) Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes in vivo. *BBA-Bioenergetics* **1797**, 63-70.
- Lund S., Orlowski S., de Foresta B., Champeil P., le Maire M., Moller J. V. (1989) Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**, 4907-4915.
- Malkin R., Niyogi K. (2000) Photosynthesis. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan B. B., Gruisem W., Lones R. L., ed.), pp. 568-628, American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA.
- Melis A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.* **4**, 130-135.
- Nelson N., Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **5**, 971-982.
- Nelson N., Yocum C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 521-565.
- Nosek L. (2010) Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Peng L., Fukao Y., Fujiwara M., Takami T., Shikanai T. (2009) Efficient Operation of NAD(P)H Dehydrogenase Requires Supercomplex Formation with Photosystem I via Minor LHCI in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 3623-3640.

- Peng L., Yamamoto H., Shikanai T. (2011) Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *BBA-Bioenergetics* **1807**, 945-953.
- Powles S. B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **35**, 15-44.
- Rajagopal S., Bukhov N. G., Carpentier R. (2003) Photoinhibitory light-induced changes in the composition of chlorophyll-protein complexes and photochemical activity in photosystem-I submembrane fractions. *Photochem. Photobiol.* **77**, 284-291.
- Reinman S., Thornber J. P. (1979) Electrophoretic isolation and partial characterization of 3 chlorophyll-protein complexes from blue-green-algae. *BBA-Bioenergetics* **547**, 188-197.
- Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *BBA-Bioenergetics* **1666**, 105-117.
- Shi H., Xiong L., Yang K. Y., Tang C. Q., Kuang T. Y., Zhao N. M. (1998) Protein secondary structure and conformational changes of photosystem II during heat denaturation studied by Fourier transform-infrared spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **446**, 137-147.
- Schägger H., von Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schägger H., Cramer W. A., von Jagow G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane-protein complexes by 2-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.
- Scheller H. V., Haldrup A. (2005) Photoinhibition of photosystem I. *Planta* **221**, 5-8.
- Sundby C., Andersson B. (1985) Temperature-induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem-II regulates its association with LHC-II. *FEBS Lett.* **191**, 24-28.
- Tjus S. E., Moller B. L., Scheller H. V. (1998) Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiol.* **116**, 755-764.

- Umena Y., Kawakami K., Shen J. R., Kamiya N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 angstrom. *Nature* **473**, 55-65.
- Wittig I., Schägger H. (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* **8**, 3974-3990.
- Wittig I., Karas M., Schägger H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for In-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1215-1225.
- Wittig I., Schägger H. (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**, 4338-4346.
- Wittig I., Schägger H. (2009) Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics* **9**, 5214-5223.
- Yordanov I., Velikova A. (2000) Photoinhibition of photosystem 1. *Bulg. J. Plant Physiol.* **26**, 70-92.

Seznam použitých zkratk

| | |
|----------------|--|
| 2D-CN/SDS-PAGE | Dvourozměrná elektroforéza, která v prvním rozměru využívá bezbarvou nativní elektroforézu a ve druhém rozměru elektroforézu s dodecylsíránem sodným |
| AB | Vodný roztok akrylamidu a bisakrylamidu |
| ACA | Aminokapronová kyselina |
| AG | Agregáty |
| APX | Askorbátperoxidasa |
| Bis-tris | 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |
| BN-PAGE | Modrá nativní elektroforéza |
| BSA | Hovězí sérový albumin |
| CN-PAGE | Bezbarvá nativní elektroforéza |
| DDC | Diethyldithiokarbamát |
| DM/chl | Poměr dodecyl- β -D maltosidu k chlorofylům <i>a + b</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina |
| LHCI | Světloběrný komplex fotosystému I |
| LHCII | Světloběrný komplex fotosystému II |
| PPC | Pigment-proteinové komplexy |
| PSI | Fotosystém I |
| PSII | Fotosystém II |
| SC | Superkomplexy |
| SDS | Dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | Polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsíránem sodným |
| SOD | Superoxiddismutasa |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tris | 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol |
| Triton X-100 | Polyethylenglykol-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether |

Dodatek

Kompletní výsledky LC-MS/MS analýzy proteinového složení pásů z gelu prvního rozměru na obr. 12.

| Číslo pásu | Proteinové složení pásu |
|------------|--|
| 1 | Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, A2 Photosystem I reaction center subunit II, III, IV, V, VI, XI Chlorophyll a-b binding protein 1B-20, 1B-21, 3, 7, 8, P4 Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B Photosystem I reaction center subunit psaK, N Photosystem I iron-sulfur center NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H, K Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein |
| 2 | Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, A2 Photosystem I reaction center subunit II, III, IV, V, XI Photosystem I reaction center subunit psaK NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 1, H, I, J, K, M Chlorophyll a-b binding protein 1, 1B, 1B-20, 1B-21, 3 Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Oxygen-evolving enhancer protein 1 Cytochrome b559 subunit alpha |
| 3 | Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, A2 Photosystem I reaction center subunit II, III, IV, V, VI, XI, Photosystem I reaction center subunit N Photosystem I reaction center subunit psaK Chlorophyll a-b binding protein 1, 1B-20, 1B-21, 2, 3, 7, 8 Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B Chlorophyll a-b binding protein CP29.2 Chlorophyll a-b binding protein CP24 10A Photosystem I iron-sulfur center Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein Photosystem Q(B) protein Oxygen-evolving enhancer protein 1, 1-1 Ferredoxin--NADP reductase Cytochrome b559 subunit alpha |
| 4 | Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Photosystem II reaction center protein L Photosystem II reaction center W protein Photosystem II 10 kDa polypeptide Photosystem Q(B) protein Oxygen-evolving enhancer protein 1 Chlorophyll a-b binding protein 1, 5, 22L, CP26, CP29.1, 151, 215 Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I, III Chlorophyll a-b binding protein AB80 Cytochrome b559 subunit alpha Cytochrome b559 subunit beta |

| | |
|---|--|
| | Ferredoxin--NADP reductase |
| 5 | Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Photosystem Q(B) protein Photosystem II reaction center protein H, L Photosystem II reaction center W protein ATP synthase subunit alpha, beta Oxygen-evolving enhancer protein 1 Chlorophyll a-b binding protein 1, 3, 5, 21, CP26, CP29.2 Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type III Cytochrome b559 subunit alpha, beta Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 Ferredoxin--NADP reductase |
| 6 | ATP synthase subunit a, b, c, alpha, beta, gamma ATP synthase delta chain ATP synthase epsilon chain Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, A2 Photosystem I reaction center subunit II, III, IV, V, VI, XI Photosystem I reaction center subunit N Photosystem I reaction center subunit psaK Chlorophyll a-b binding protein 1, 1B-20, 1B-21, 3, 5, 7, 8, 21, 151 Chlorophyll a-b binding of LHCII type 1 protein Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B Photosystem I iron-sulfur center Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Ribulose biphosphate carboxylase large chain Ferredoxin--NADP reductase Oxygen-evolving enhancer protein 1 Cytochrome b559 subunit alpha |
| 7 | ATP synthase subunit b, c, alpha, beta, gamma ATP synthase delta chain ATP synthase epsilon chain ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 1 Photosystem I reaction center subunit II, III, IV, V, VI, XI Photosystem I reaction center subunit N Photosystem I reaction center subunit psaK Photosystem I iron-sulfur center Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, A2 Chlorophyll a-b binding protein 1B-20, 1B-21, 3, 7 Ribulose biphosphate carboxylase large chain |
| 8 | ATP synthase subunit b ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 1, 2 Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Photosystem II reaction center protein H Photosystem II reaction center W protein Photosystem Q(B) protein Oxygen-evolving enhancer protein 1, 1-2, 2, 3 Plastocyanin Apocytochrome f Cytochrome b559 subunit alpha, beta Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit Cytochrome b6-f complex subunit 4 |

| | Fructose-bisphosphate aldolase |
|----|---|
| 9 | Chlorophyll a-b binding protein 1, 1B-21, 2, 5, 21, 22L, 22R, 25, CP24, CP24 10A, CP26, CP29.1, 151 Chlorophyll a-b binding protein type 2 member 1B Chlorophyll a-b binding protein AB80 Chlorophyll a-b binding protein of LHCI type I, III ATP synthase epsilon chain ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 1, 2, 8 Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Photosystem II 10 kDa polypeptide Photosystem II 22 kDa protein Oxygen-evolving enhancer protein 1, 2, 3 Plastocyanin Apocytochrome f Cytochrome b559 subunit alpha Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit Cytochrome b6-f complex subunit 4 Ferredoxin--NADP reductase Photosystem I reaction center subunit V Photosystem I reaction center subunit N Probable plastid-lipid-associated protein 3 |
| 10 | Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein Photosystem II D2 protein Photosystem Q(B) protein Photosystem II reaction center W protein Photosystem II 10 kDa polypeptide Oxygen-evolving enhancer protein 1 Chlorophyll a-b binding protein 1, 1B-20, 21, 22L, CP24, CP24 10B, CP26, CP29.1, 151 Chlorophyll a-b binding protein of LHCI type I, III Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, A2 Photosystem I reaction center subunit II Cytochrome b559 subunit alpha, beta |