

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Strukturní analýza proteinových komplexů
fotosyntetického aparátu rostlin pomocí
transmisní elektronové mikroskopie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Iveta Kozarová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	6.5. 2013

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

V Olomouci dne

Iveta Kozarová

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování RNDr. Romanu Kouřilovi, Ph.D. za jeho cenné rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce a za poskytnuté zázemí pro bezproblémový průběh všech experimentů. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Lukáši Noskovi za vstřícnost a pomoc při získání potřebných informací a podkladů a za odbornou pomoc při řešení experimentální části práce. Poděkování patří také Laboratoři mikroskopických metod za vstřícný přístup a umožnění získání dalších informací o zkoumaném vzorku transmisním elektronovým mikroskopem.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Iveta Kozarová
Název práce	Strukturní analýza proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin pomocí transmisní elektronové mikroskopie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biofyziky, CRH
Vedoucí práce	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá problematikou kombinace nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy pro separaci pigment-proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin a následně optimalizací jejich šetrné extrakce z gelu pro účely strukturní analýzy pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Teoretická část pojednává o výhodách a nevýhodách jednotlivých technik nativní elektroforézy a zejména o bezbarvé nativní elektroforéze (CN-PAGE). Tato technika je vynikajícím nástrojem pro separaci proteinů a proteinových komplexů v jejich intaktním stavu. Dále je v teoretické části popsáno složení základních komponent fotosyntetického aparátu rostlin (fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII)), pojednáváno o elektronové mikroskopii a o metodách přípravy vzorku pro elektronovou mikroskopii.</p> <p>Experimentální část se zabývá optimalizací podmínek izolace a separace PSII superkomplexů z thylakoidních a granálních membrán (BBY) ječmene jarního (<i>Hordeum vulgare</i>) a optimalizací procesu extrakce separovaných superkomplexů PSII z polyakrylamidového gelu pro účely elektronové mikroskopie. Jelikož byl kladen důraz na zachování intaktnosti separovaných superkomplexů, tak jako šetrný způsob extrakce byla testována samovolná eluce proteinů z gelu do pufru. Významným výsledkem experimentální práce je úspěšná separace superkomplexů PSII z BBY membrán, které se z hlediska výtěžnosti PSII komplexů osvědčily lépe, než thylakoidní membrány. Proces eluce separovaných superkomplexů PSII z polyakrylamidového gelu byl monitorován pomocí měření 77K fluorescenčních emisních spekter, která vypovídají jednak o koncentraci a dále pak o intaktnosti eluovaných superkomplexů PSII. Z obdržných výsledků vyplývá, že dvouhodinová eluce superkomplexů PSII byla optimální pro podmínky elektronové mikroskopie.</p>
Klíčová slova	Bezbarvá nativní elektroforéza, pigment-proteinový komplex, thylakoidní membrána, fotosystém II, elektronová mikroskopie, <i>Hordeum vulgare</i>
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Iveta Kozarová
Title	Structural analysis of protein complexes of photosynthetic apparatus of higher plants using a transmission electron microscopy
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biophysics, CRH
Supervisor	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>This work deals with a combination of native polyacrylamide gel electrophoresis for separation of pigment-protein complexes of photosynthetic apparatus of plants and a subsequent optimization of their gentle extraction from a gel for aims of structural analysis using transmission electron microscopy. The theoretical part deals with advantages and disadvantages of various techniques of native electrophoresis, especially about the clear-native electrophoresis (CN-PAGE). This technique is an excellent tool for the separation of proteins and protein complexes in their intact state. Furthermore, there is described a composition of essential components of the photosynthetic apparatus of plants (photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII)), electron microscopy in the theoretical part and methods of specimen preparation for the electron microscopy are introduced.</p> <p>The experimental part is focused on an optimization of conditions of isolation and separation of PSII supercomplexes from thylakoid and grana membranes (BBY) of spring barley (<i>Hordeum vulgare</i>) and an optimization of extraction process of separated PSII supercomplexes from polyacrylamide gel for the aims of the electron microscopy. Since an emphasis on maintaining of intactness of the separated supercomplexes was put, a spontaneous elution of proteins from gel into buffer was tested as gentle method of extraction. A successful separation of PSII supercomplexes from BBY membranes was an important result of the experimental work. It was proven that BBY membranes give a higher yield of PSII complexes compared to thylakoid membranes. The process of a spontaneous elution of the separated PSII supercomplexes from polyacrylamide gel was monitored by a measurement of 77K fluorescence emission spectra, which reflex both a concentration and an intactness of eluted PSII supercomplexes. The obtained results show that two-hour elution of PSII supercomplexes was optimal for conditions of electron microscopy.</p>
Keywords	Clear-native electrophoresis, pigment-protein complex, thylakoid membrane, photosystem II, electron microscope, <i>Hordeum vulgare</i>
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	- 7 -
TEORETICKÁ ČÁST.....	- 8 -
1 Úvod.....	- 9 -
2 Porovnání nativních elektroforetických technik.....	- 9 -
2.1 Modrá nativní elektroforéza.....	- 10 -
2.2 Bezbarvá nativní elektroforéza.....	- 10 -
2.3 „High-resolution“ bezbarvá nativní elektroforéza	- 11 -
2.3.1 Detergenty používané pro solubilizaci biologických membrán	- 12 -
2.3.1.1 Dodecyl- α -D-maltosid versus dodecyl- β -D-maltosid.....	- 13 -
2.3.1.2 Interakce detergentu s fosfolipidy.....	- 15 -
2.3.2 Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci.....	- 15 -
2.3.3 Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza	- 16 -
3 Fotosyntetický aparát.....	- 17 -
3.1 Fotosyntetická membrána	- 17 -
3.1.1 Lipidy v thylakoidní membráně	- 17 -
3.2 Funkce fotosyntetického aparátu	- 18 -
3.3 Fotosystém I	- 19 -
3.3.1 Jaderný komplex PSI	- 20 -
3.3.2 Světlosběrný komplex PSI	- 21 -
3.4 Fotosystém II	- 22 -
3.4.1 Jaderný komplex PSII	- 23 -
3.4.2 Světlosběrný komplex PSII	- 24 -
3.4.3 Superkomplexy PSII.....	- 24 -
3.4.4 Klastř Mn_4CaO_5	- 27 -
4 Elektronová mikroskopie	- 27 -
4.1 Příprava vzorku konvenční metodou	- 28 -
4.2 Alternativní metoda přípravy vzorku - „blotting sítkou“	- 28 -
4.3 Transmisní elektronový mikroskop	- 29 -

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 31 -
5 Materiál a metody	- 32 -
5.1 Rostlinný materiál	- 32 -
5.1.1 Knopův živný roztok	- 32 -
5.2 Použité chemikálie	- 32 -
5.3 Izolace thylakoidních membrán.....	- 33 -
5.4 Izolace BBY membrán.....	- 34 -
5.5 Stanovení koncentrace chlorofylů	- 36 -
5.6 Solubilizace membrán a příprava vzorku pro CN-PAGE.....	- 37 -
5.7 CN-PAGE	- 37 -
5.8 Skenování gelu.....	- 39 -
5.9 Eluce separovaných PSII superkomplexů z gelu	- 40 -
5.10 Monitorování intaktnosti separovaných PSII superkomplexů.....	- 40 -
5.11 Strukturní analýza pomocí elektronové mikroskopie	- 40 -
6 Výsledky a diskuze	- 42 -
6.1 Stanovení optimální koncentrace detergentu	- 42 -
6.2 Optimalizace procesu extrakce separovaných PSII superkomplexů	- 45 -
6.3 Ověření intaktnosti elovaných PSII superkomplexů	- 47 -
6.4 EM strukturní analýza.....	- 52 -
Závěr	- 56 -
Literatura	- 57 -
Seznam použitých zkratk	- 60 -

Cíle práce

Cílem práce bylo vypracovat přehled o problematice nativní elektroforézy, zejména CN-PAGE („clear-native polyacrylamide gel electrophoresis“), o složení a funkci základních komponent fotosyntetického aparátu rostlin (fotosystém I a fotosystém II) a o transmisní elektronové mikroskopii. Cílem experimentální části byla kombinace a optimalizace dvou metod, nativní gelové elektroforézy a transmisní elektronové mikroskopie, ve studiu struktury proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin. Nativní gelová elektroforéza je biochemická separační metoda určená pro separaci intaktních proteinových komplexů. Takto separované proteinové komplexy byly z polyakrylamidového gelu extrahovány a použity pro strukturní analýzu pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Důraz byl kladen převážně na optimalizaci kroku extrakce separovaných proteinů z gelu pro podmínky elektronové mikroskopie.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Úvod

Vynikajícím nástrojem pro separaci a analýzu pigment-proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin v jejich intaktním stavu je biochemická separační metoda nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza. Protože jde o separaci na gradientovém gelu, proteiny se v gelu zastaví v místě, kde velikost pórů gelu odpovídá velikosti proteinového komplexu (Wittig et al., 2007b; Wittig & Schägger, 2005). Následná extrakce proteinů pomocí elektroeluce může být příliš násilná a může vést k porušení struktury proteinových komplexů/superkomplexů. Z tohoto důvodu byla zkoumána možnost extrakce separovaných proteinů pomocí samovolné eluce z gelu, která byla optimalizována pro účely strukturní analýzy prostřednictvím transmisní elektronové mikroskopie.

2 Porovnání nativních elektroforetických technik

Mezi nativní elektroforetické techniky se řadí modrá nativní elektroforéza (BN-PAGE), bezbarvá nativní elektroforéza (CN-PAGE) a „high-resolution” bezbarvá nativní elektroforéza (hrCN-PAGE). Všechny uvedené techniky se liší ve složení katodového pufru (viz tab.1) a jsou využívány pro izolaci membránových proteinových komplexů a superkomplexů. Správné složení katodového pufru značně ovlivňuje schopnost zachování detergent-stabilních a dokonce i detergent-labilních protein-proteinových interakcí (Wittig & Schägger, 2009).

Tabulka 1 – Složení katodových pufrů určující různé varianty nativních elektroforetických technik. Katodové pufrы se liší přítomností či nepřítomností barviva Coomassie, neutrálního detergentu dodecylmaltosidu nebo Tritonu X-100 a aniontového detergentu deoxycholátu. Tricin nebo imidazol udržují stabilní pH. Převzato z Wittig & Schägger, 2009, upraveno.

	CNE	BNE	hrCNE-1	hrCNE-2	hrCNE-3
Tricin (mM)	50	50	50	50	50
Imidazol (mM)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Dodecylmaltosid (%)	–	–	0,02	–	0,01
Deoxycholát (%)	–	–	0,05	0,05	0,05
Triton X-100 (%)	–	–	–	0,05	–
Barvivo Coomassie (%)	–	0,02 nebo 0,002	–	–	–
pH	~7,0	~7,0	~7,0	~7,0	~7,0

2.1 Modrá nativní elektroforéza

V roce 1991 byla poprvé popsána modrá nativní elektroforéza, jejíž celý název zní modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza – BN-PAGE (Schägger & von Jagow, 1991). Modrá nativní elektroforéza byla původně vyvinuta pro izolaci proteinových komplexů nacházejících se v membránách mitochondrií. První analýza proteinových komplexů thylakoidních membrán pomocí BN-PAGE byla popsána v roce 1997 (Kügler et al., 1997). Pro solubilizaci membrán se používá jemný neutrální detergent (například digitonin, Triton X-100 nebo dodecylmaltosid). K udržení stabilního pH v rozmezí 7,0-7,5 se používá Bis-tris (2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxymethyl)-1,3-propandiol) nebo imidazolový pufr a k zavedení negativního náboje barvivo Coomassie brilliant blue G-250, které se adsorbuje na povrch proteinů. Tato změna náboje vede k redukci agregace proteinů, jelikož se negativně nabitě proteiny vzájemně odpuzují, což je zejména důležité pro hydrofobní proteiny v membráně. Barvivo se však neadsorbuje na hydrofilní proteiny s $pI > 7$. Všechny membránové proteiny, na které se barvivo Coomassie adsorbuje, migrují k anodě nezávisle na jejich isoelektrickém bodu. Jsou separovány podle poměru náboj/hmotnost a na základě klesající velikosti pórů gradientového polyakrylamidového gelu, tzn. dle jejich velikosti. Modře obarvené nativní proteinové pásy jsou detekovány již v průběhu BN-PAGE a usnadňují vyřezání pásů pro následnou elektroeluci či elektroblotting. Nevyhovujícím aspektem BN gelů je, že barvivo interferuje se stanovením fluorimetrické a katalytické aktivity. Pro fluorescenční detekci nejsou vhodné 1-D BN gely, protože barvivo zhasí okolo 95 % fluorescence. Naproti tomu, barvivo může být odstraněno 2-D SDS gely a fluorescenční detekce je tak umožněna. BN-PAGE slouží k purifikaci proteinových komplexů z biologických membrán, k určení molekulové hmotnosti a oligomerního stavu proteinových komplexů. Také bylo prokázáno, že nativní-PAGE musí být optimalizována pro každý biologický systém (Wittig & Schägger, 2009; Järvi et al., 2011; Wittig & Schägger, 2008; Wittig et al., 2007b).

2.2 Bezbarvá nativní elektroforéza

Jako tzv. „druhá volba“ byla v roce 1994 uvedena bezbarvá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza – CN-PAGE (Schägger et al., 1994). Oproti BN-PAGE proteiny u CN-PAGE migrují v závislosti na hodnotě pI vzhledem k hodnotě pH systému, a proto se kyselé proteiny ($pI < 7$) mohou pohybovat směrem k anodě. Nevýhodou je, že bazické proteiny ($pI > 7$) migrují ke katodě, nevstoupí do gelu a nemohou být elektroforeticky separovány. Nicméně stanovení katalytické aktivity a detekce fluorescenčně značených proteinů jsou výhody, jež CN-PAGE nabízí. Využití

jednorozměrné CN-PAGE spočívá hlavně v separaci nativních komplexů a superkomplexů (Wittig & Schägger, 2009).

Jak již bylo konstatováno, CN-PAGE může být použita ke stanovení nativní hmotnosti, pokud je isoelektrický bod proteinu nižší než hodnota pH, při níž je elektroforéza prováděna. Toto pH se pohybuje v rozmezí 7,0-7,5. V práci Schägger a kol. (Schägger et al., 1994) je uvedeno, že lineární závislost migrační vzdálenosti na logaritmu relativní molekulové hmotnosti proteinových komplexů byla zjištěna jen u BN-PAGE, kdežto u CN-PAGE docházelo k odchýlkám. Pouze kyselé proteiny s pI nižším než 5,4 vykazovaly lineární závislost, zatímco bazické proteiny migrovaly ke katodě, a proto nemohly být detekovány. Dále ve své práci Schägger a kol. (Schägger et al., 1994) uvádí, že CN-PAGE nedosahovala takových rozlišovacích schopností jako BN-PAGE a při použití CN-PAGE byla migrace proteinových komplexů pomalejší. K rychlejší separaci proteinů pomocí BN-PAGE dochází díky dodatečnému zápornému náboji, který proteiny získají po adsorpci barviva Coomassie. Z výše uvedených důvodů je pro standardní analýzu více vyhovující BN-PAGE, poněvadž bylo nesnadné u CN-PAGE stanovit molekulovou hmotnost proteinů. Avšak použití barviva Coomassie má své nevýhody (viz kapitola 2.1) a kromě toho může také narušovat některé velmi labilní protein-proteinové interakce. Tudíž je CN-PAGE interesantním nástrojem pro funkční proteomický výzkum (Wittig & Schägger, 2005).

2.3 „High-resolution” bezbarvá nativní elektroforéza

K eliminaci nevýhod a zachování výhod BN-PAGE a CN-PAGE byla vyvinuta CN-PAGE s vysokým rozlišením (hrCN-PAGE), u níž se rozlišují tři varianty hrCN-PAGE1-3 (viz tab. 1). Zachování výhod obou elektroforetických technik je umožněno záměnou barviva Coomassie v katodovém pufru, jež je u BN-PAGE, za bezbarvou směs aniontového a neutrálního detergentu. Stejně jako barvivo, tak tato směs detergentů obalí membránový protein nabitou micelou, což podstatně zlepšuje jeho migraci k anodě a rozpustnost během elektroforézy. První pokusy o nenedaturující solubilizaci membrán a elektroforetické separaci fotosyntetických proteinových komplexů byly uskutečněny již několik let před uvedením modré a bezbarvé nativní elektroforézy. Autoři Reinman a Thornber se snažili (Reinman & Thornber, 1979) solubilizovat a elektroforetický separovat membránové proteinové komplexy použitím aniontového detergentu dodecylsírany sodného (SDS) přítomného v nízké koncentraci. Protože většina analyzovaných fotosyntetických komplexů měla zelené zbarvení, stala se tato separace známá pod označením „zelené gely“. Místo běžně používaného aniontového detergentu SDS u zelených gelů, byl pro hrCN-PAGE žádoucí jemný neiontový

detergent. Jemný neiontový detergent dodecyl- β -D-maltosid nebo Triton X-100 je podle poddruhů této techniky přítomen v katodovém pufru spolu s aniontovým detergentem deoxycholátem sodným. Je důležité, aby oba, jak neutrální detergent (0,01% nebo 0,02% v/v DDM anebo 0,05% v/v Triton X-100), tak aniontový detergent (0,05% v/v deoxycholát), byly součástí katodového pufru, protože jejich zásluhou dochází k tvorbě smíšených micel a ke změnám kritických micelárních koncentrací (KMK) ve srovnání s KMK samotných detergentů. KMK povrchově aktivní látky označuje koncentraci, při níž povrchově aktivní látka začne tvořit micely, agregáty molekul detergentů dispergované v kapalném prostředí. Pokud je tato koncentrace vyšší, všechny přidávané molekuly asociují do micel, vážou k sobě ionty, které jsou tudíž v roztoku málo pohyblivé a elektrická vodivost klesá. Pod touto koncentrací jsou micelární koloidy v systému pouze ve formě unimerních molekul a ionty jsou v roztoku volně pohyblivé. Kdyby nebyl přítomen neutrální detergent, byla by koncentrace deoxycholátu (0,05% v/v) podstatně nižší než KMK samotného detergentu. Z tohoto důvodu se samotný deoxycholát nemůže vázat k proteinům. Z výsledků uvedených v práci autorů Wittigové a Schäggera (Schägger & Wittig, 2009) plyne, že nejšetnějším podtypem je hrCN-PAGE-3 (s vyšším poměrem neutrálního detergentu k aniontovému detergentu) a nejhorším je hrCN-PAGE-2. Díky všem výhodám a hlavně vysokému rozlišení hrCN-PAGE je tato technika velmi vhodná pro funkční proteomickou analýzu (Wittig & Schägger, 2009; Wittig et al., 2007a, Wittig et al., 2007b).

1D hrCN-PAGE gely mohou být ihned využity pro stanovení katalytické aktivity přímo v gelu a pro detekci a kvantifikaci proteinů, které byly předem označeny fluorescenčními značkami, jako jsou fluorescenční proteiny nebo reaktivní fluorescenční barviva. Značení proteinu reaktivním barvivem je zvláště užitečné pro kvantitativní analýzu nízkomolekulárních proteinů. Dalším zajímavým pozitivem této techniky je možnost sekvenčního značení proteinů celou řadou reaktivních barviv v různých stádiích solubilizace (membrána, superkomplex, individuální komplex, subkomplex a individuální podjednotka). Přístupnost či nepřístupnost reaktivního barviva ke specifickému proteinu v určitém kroku poukazuje na přístupné či nepřístupné proteinové domény, jež může pomoci k charakterizaci propojení jednotlivých komplexů v superkomplexech a ke zkoumání vyšších fyziologických supramolekulárních struktur biologických membrán (Wittig et al., 2007b).

2.3.1 Detergenty používané pro solubilizaci biologických membrán

Pro izolaci intaktních membránových proteinů a proteinových komplexů z biologických membrán jsou nepostradatelné detergenty. Hlavním cílem je dosáhnout

optimální extrakce a separace proteinových komplexů z membrány a zároveň zachování jejich nativní struktury a funkce. Mezi nejčastěji používané detergenty patří neiontové surfaktanty, jako například maltosidy, polyoxyethylenglykoly a alkyglukosidy. Neiontové detergenty narušují lipid-lipidové a lipid-proteinové interakce, ale nenarušují protein-proteinové interakce, což je důležité pro solubilizaci membránových proteinů. Proto jsou považovány za jemné detergenty. Mimo to platí, že detergenty z jedné homologické řady s delším alkylovým řetězcem a větší hydrofilní částí jsou jemnější než ty s kratším alkylovým řetězcem. Dalším významným faktorem membránové solubilizace je KMK detergentu (viz kap. 2.3). Koncentrace detergentu nad KMK umožňuje solubilizaci hydrofobních a amfipatických molekul.

Před nativní elektroforézou jsou thylakoidní membrány solubilizovány s jemným neiontovým detergentem přítomným v nízké koncentraci. Tímto detergentem může být dodecylmaltosid (DDM), tridecylmaltosid (TDM), digitonin, eventuálně Triton X-100. TDM má delší alifatický řetězec než DDM. S rostoucí délkou řetězce roste hydrofobicita, tedy schopnost penetrace detergentu do membrány a schopnost detergentu zachovat proteinové komplexy v intaktním stavu.

Charakteristickým rysem solubilizace thylakoidů digitoninem je vysoká koncentrace PSI v supernatantu, kdy značná část thylakoidní membrány zůstane po centrifugaci nesolubilizovaná v peletu. Patrně je jeho molekula příliš velká, což brání pronikání digitoninu do granálních thylakoidů. Celkově vzato je solubilizace thylakoidní membrány digitoninem selektivní a většinou je zaměřena na komplexy ve stromálních thylakoidech a na okrajích gran. Z toho vyplývá, že digitonin je naprosto vyhovující pro analýzu PSI-LHCII (fotosystém I s navázanými světlosběrnými komplexy fotosystému II) a dalších labilních megakomplexů ve stromálních thylakoidech či okrajích gran, avšak není vhodný pro kvantitativní analýzu thylakoidních proteinových komplexů vyšších rostlin (Pagliano et al., 2012; Järvi et al., 2011).

2.3.1.1 Dodecyl- α -D-maltosid versus dodecyl- β -D-maltosid

Do třídy detergentů obsahujících maltosid (surfaktant s velkou hydrofilní hlavičkou složenou ze sacharidu a s nenabitým alkylovým řetězcem s 12 uhlíky) patří dodecylmaltosid (DDM). Existují dva anomery této molekuly lišící se konfigurací alkylového řetězce na anomerním centru hydrofilní části – maltosy, axiální u dodecyl- α -D-maltosidu a ekvatoriální u dodecyl- β -D-maltosidu. Dále se liší rozdílnými interakcemi/penetracemi do membrány. Tyto strukturální rozdíly změní jejich fázové chování ve zředěných vodných roztocích (např. odlišný tvar micel, sférický u α -DDM,

zploštělý elipsoid u β -DDM; nižší KMK a nižší agregační číslo pro α -DDM než pro β -DDM).

$$\text{KMK}_{\alpha\text{-DDM}} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$$

$$\text{agregační číslo } \alpha\text{-DDM} = 75$$

$$\text{KMK}_{\beta\text{-DDM}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$$

$$\text{agregační číslo } \beta\text{-DDM} = 132$$

Výběr surfaktantu a jeho koncentrace může výrazně ovlivnit množství a oligomerní stav, v němž mohou být proteinové komplexy z thylakoidní membrány izolovány. Pokud je použita nejnižší koncentrace (např. 5 mM) DDM, dojde jen k částečné solubilizaci thylakoidů. V tomto případě jsou separovány pouze proteinové komplexy PSI ve směsi s membránovými fragmenty PSI a nejsou přítomny žádné superkomplexy PSII. Zatímco použitím vyšší koncentrace (nad 30 mM) dojde k úplné solubilizaci a jsou také separovány PSII proteinové komplexy a superkomplexy, identifikovány jako dimer PSII, PSI-LHCI (fotosystém I s navázanými světlosběnými komplexy fotosystému I) a PSII-LHCII (fotosystém II s navázanými světlosběnými komplexy fotosystému II) superkomplexy. U biologických membrán solubilizovaných α -DDM byla značná koncentrace PSII-LHCII superkomplexů a nižší koncentrace PSI-LHCI intermediátů, což odráží jemnost α -DDM v porovnání s jeho β -anomerem. β -DDM účinněji odpojuje LHCII monomery ze superkomplexů. Přestože je dodecyl- β -D-maltosid jemný detergent, nemůže zachovat některé labilní hydrofobní protein-proteinové interakce. A tak může být k membránové solubilizaci, pokud se jedná o izolaci labilních fyziologických proteinových komplexů, použit jeden z jemnějších detergentů. Kromě α -DDM patří mezi jemnější detergenty digitonin a neiontový detergent *N,N'*-bis(3-D-glukonamidopropyl)cholamid (BigCHAP), jenž se v poslední době například využívá k izolaci oligomerní ATP synthasy (Pagliano et al., 2012; Wittig et al., 2007b; Wittig & Schagger, 2009).

V práci z roku 2012 autoři Pagliano a kol. (Pagliano et al., 2012) rozdělili jednotlivé proteinové pásy dle jejich molekulové hmotnosti do sedmi skupin na základě předchozích studií a interpretace denaturujících druhých rozměrů (2D BN/SDS-PAGE) thylakoidů solubilizovaných 70 mM α -DDM a 70 mM β -DDM:

- >669 kDa několik proteinových pásů složených z PSII-LHCII superkomplexů;
- okolo 600 kDa intenzivně zelený proteinový pás PSI-LHCI komigrující s jádrem PSII dimeru v důsledku jejich podobné molekulové hmotnosti;
- okolo 480 kDa ostrý proteinový pás PSI viditelný zejména u membrán solubilizovaných β -DDM, pravděpodobně představuje přechodné stavy PSI-LHCI komplexů;

- okolo 300-250 kDa tři proteinové pásy ATP synthasy (280-300 kDa), jaderný PSII monomer (okolo 280 kDa) a dimerní komplex cytochromu *b₆/f* (okolo 250 kDa);
- okolo 140 kDa zeleně zbarvený proteinový pás obsahující LHCII podjednotky, nejspíše trimery;
- okolo 120 kDa monomerní komplex cytochromu *b₆/f*,
- okolo 70 kDa LHCII podjednotky, s velkou pravděpodobností monomery.

2.3.1.2 Interakce detergentu s fosfolipidy

Studium interakcí detergentů s fosfolipidy vedlo k vytvoření tří stadií pro detergent-lipid-proteinové interakce. Počáteční a koncové body solubilizace popisuje stádium I a III. Ve stádiu I jsou molekuly detergentů začleněny do fosfolipidové dvojvrstvy, zatímco ve stádiu III jsou v micelách detergentu solubilizovány všechny lipidy. Koexistence molekul detergentu inkorporovaných v lipidové dvojvrstvě s molekulami lipidů začleněnými v micelách detergentu je charakteristická pro stádium II. Tudíž solubilizace lipidů je ovlivněna jejich zastoupením v membráně. Thylakoidní membrána rostlin obsahuje nízký podíl fosfolipidu fosfatidylglycerolu (PG) a vysoký podíl glykolipidů monogalaktosyldiacylglycerolu (MGDG), digalaktosyldiacylglycerolu (DGDG) a sulfochinovosyldiacylglycerolu (SQDG). Membránová část grana thylakoidu je ze 75 % obsazena proteiny. Lze předpokládat, že v prvním stádiu detergent zaujme nemicelární formu, dále následují interakce detergent-detergent vedoucí k destabilizaci dvojvrstevné struktury a membránové fragmentaci. Další přídavek detergentu by způsobil tvorbu smíšených micel lipidů a detergentu. Membránové proteiny by byly vystaveny působení micel detergentu a došlo by k jejich solubilizaci (Pagliano et al., 2012).

2.3.2 Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci

U nativní elektroforetické separace aplikovaným vzorkem, který je nanášen do jamek gelu, může být směs solubilizovaných membránových proteinů, nebo částečně purifikované membránové proteiny anebo ve vodě rozpustné proteiny. Nejprve se ze suspenze o známé koncentraci proteinů odebere množství proteinů v řádech μg . Každý z těchto tří vzorků (směs solubilizovaných membránových proteinů, částečně purifikované membránové proteiny a ve vodě rozpustné proteiny) se však rozpouští v rozdílných sloučeninách či jejich koncentracích. Pokud jsou tyto tři vzorky separovány pomocí BN-PAGE, tak se barvivo Coomassie přidává jen ke vzorku směsi solubilizovaných membránových proteinů a do katodového pufru v odlišných koncentracích u jednotlivých vzorků. Například membránové proteiny jsou solubilizovány v koncentracích nižších než 2 % detergentu a v aminokapronové

kyselině, naopak nejsou solubilizovány v solích, hlavně draselných a s dvojmocnými kationty, protože by po přidání barviva Coomassie u BN-PAGE došlo k jeho precipitaci a znečištění proteinů. Kromě toho se u BN-PAGE přidává ke vzorku detergent a Coomassie v poměru 4/1 (g/g), ke katodovému pufru do suspenze do 2/3 gelu 0,02% Coomassie a na poslední třetině gelu 0,002% Coomassie pro lepší vizualizaci proteinových pásů. V koncentracích nižších než 0,2 % detergentu a soli maximálně do 200 mM NaCl jsou rozpuštěny částečně purifikované membránové proteiny. V tomto případě katodový pufr u BN-PAGE obsahuje 0,002% barvivo Coomassie. Nejvyšší koncentrace barviva Coomassie (0,02 %) v katodovém pufru u BN-PAGE se vyskytuje u ve vodě rozpustných proteinů. Tyto proteiny mohou být rozpuštěny v 15% glycerolu, 50 mM Bis-tris/HCl, pH 7,0. Po solubilizaci, doplnění vzniklé směsi reakčním pufrům a po určité době inkubace je odstraněn nesolubilizovaný materiál centrifugací při přetížení 18 000-100 000 g (závisí na typu vzorku) a při 4 °C. Vzorky jsou elektroforeticky separovány při nízké intenzitě světla a rovněž při 4 °C (Schägger et al., 1994; Järvi et al., 2012).

2.3.3 Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza

Jak BN-PAGE, tak CN-PAGE i hrCN-PAGE používá lineární gradientový polyakrylamidový gel s 4% zaostřovacím gelem pro separaci proteinových komplexů. Koncentrační rozsah 5-13 % tohoto gelu umožňuje separaci proteinů v hmotnostním rozmezí 10^5 - 10^6 Da. Pokud by se jednalo o rozlišení menších proteinů, upřednostňuje se 5-18% gradientový dělicí gel. U CN-PAGE se doporučuje začít v rozsahu koncentrací 4-20 %, jelikož je u ní elektroforetická pohyblivost proteinů založena na vnitřním náboji a je tedy pomalejší než u BN-PAGE. Oproti uniformnímu dělicímu gelu má gradientový gel určitou přednost. Poté, co proteinový komplex dosáhne dané hustoty gelu, jeho další pohyb se „zastaví“ a tím je dosaženo lepšího rozlišení (Schägger et al., 1994).

Elektroforetická separace musí probíhat při 4-7 °C, většinou při 4 °C. Teplota má velký vliv na stabilitu proteinových komplexů, proto je důležité dodržovat tyto teplotní podmínky. Na elektrodách je po dobu, než vzorek projde zaostřovacím gelem, udržován proud 15 mA a limit napětí je nastaven na 100 V. Separace probíhá v dělicím gelu za těchto podmínek: proud nastaven na 30 mA a limit napětí 500 V. Tyto hodnoty proudu a napětí však nejsou pevně dané a elektroforéza může být uskutečněna i za postupného zvyšování napětí. Celá separace nebývá delší než 3 hodiny (Schägger et al., 1994; Wittig et al., 2007b; Järvi et al., 2011).

3 Fotosyntetický aparát

Fotosyntetická produkce kyslíku a asimilace oxidu uhličitého jsou dva významné procesy, jež zajišťují podmínky pro přežití všech forem života. U vyšších rostlin probíhají fotosyntetické reakce uvnitř chloroplastů v thylakoidní membráně. Fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII) spolu se světlosběrnými komplexy (LHCI a LHCII), cytochrom *b₆/f* komplex a ATP syntasa jsou klíčové proteinové komplexy thylakoidní membrány katalyzující oxypenní fotosyntézu. Aby byla umožněna oxidace vody, PSII funguje jako oxidační činidlo s dostatečně vysokým redoxním potenciálem. Naopak nejnegativnější redoxní potenciál v přírodě je generován PSI (Nelson & Yocum, 2006; Pagliano et al., 2012).

3.1 Fotosyntetická membrána

Místem primárních fotosyntetických reakcí je thylakoidní membrána, která v chloroplastu obklopuje prostor zvaný lumen. Prostor vně thylakoidní membrány se nazývá stroma. Thylakoidní membrány vytváří grana, skupiny těsně na sebe přilehajících thylakoidů, která jsou vzájemně propojena stromálními thylakoidy. Bylo zjištěno, že v granálních thylakoidech se vyskytují zejména PSII a LHCII, zatímco ve stromálních thylakoidech se nachází převážně PSI a ATP syntasa. Cytochrom *b₆/f* komplex je rovnoměrně distribuován mezi těmito dvěma typy thylakoidů. Na okrajích gran se nachází převážně PSI komplex, PSII dimery a monomery i LHCII komplex (Pagliano et al., 2012; Dekker & Boekema, 2005; Järvi et al., 2011).

Zajímavé je to, že grana obsahují většinu pigmentů a to 82-84 %, zatímco zbývajících 16-18 % chlorofylů je lokalizováno ve stromálních lamelách. Je pozoruhodné, že více chlorofylu je asociováno s PSI než s PSII, asi o 14-20 % (Albertsson, 2001).

3.1.1 Lipidy v thylakoidní membráně

Lipidy, jež jsou součástí thylakoidní membrány, ji činí jedinečnou ve srovnání s ostatními biologickými membránami. Konkrétně thylakoidní membrána má vysoký podíl glykolipidů monogalaktosyldiacylglycerolu (MGDG), digalaktosyldiacylglycerolu (DGDG) a sulfochinovosyldiacylglycerolu (SQDG) a nízký podíl fosfolipidu fosfatidylglycerolu (PG). Na koextrakci lipidů s proteiny je závislá aktivita a intaktnost solubilizovaných proteinových komplexů. Přičemž například PG hraje klíčovou roli ve správné funkci a strukturní integritě fotosyntetických komplexů. Účinkem fosfolipas by mohlo dojít k potlačení aktivity PSII, což demonstruje důležitost lipidu PG v jeho

funkci. Navíc, molekula PG je nezbytná pro stabilizaci fotosyntetických komplexů, protože svou přítomností zvyšuje vytváření PSII dimerů a také PSI trimerů u sinic. Krystalograficky bylo zjištěno, že se v krystalické struktuře PSI vyskytovala jedna molekula MGDG a tři molekuly PG, kdežto každý monomer krystalické struktury PSII celkově obsahoval dvacet molekul lipidů - 6 MGDG, 5 DGDG, 5 PG a 4 SQDG (Pagliano et al., 2012).

3.2 Funkce fotosyntetického aparátu

PSII a PSI hrají klíčovou roli v lineárním a cyklickém přenosu elektronů v thylakoidní membráně. Poškozené komplexy PSII se dále účastní opravného cyklu (Järvi et al., 2011).

Při lineárním transportu jsou elektrony uvolněné z vody přeneseny prostřednictvím PSII a PSI na NADP^+ . Světlem poháněná oxidace vody, jež poskytuje elektrony PSI přes plastochinon, cytochrom b_6/f komplex a ve vodě rozpustný přenašeč elektronů – plastocyanin, je katalyzována PSII. PSI katalyzuje světlem poháněný transport elektronů z plastocyaninu na vnitřní straně membrány (lumen) na ferredoxin nacházející se na vnější straně membrány (stroma). Poté je redukovaný ferredoxin použit pro tvorbu NADPH, redukčního činidla konverze oxidu uhličitého na organické molekuly. Přenos elektronů je spojen s generováním transmembránového elektrochemického gradientu protonů, který využívá ATP synthasa k fosforylaci ADP na ATP (Dekker & Boekema, 2005; Amunts et al., 2010).

K cyklickému transportu okolo PSI dochází především ve stromálních lamelách. Při tomto transportu jsou elektrony z PSI přenášeny na Cyt b_6/f komplex a přes plastocyanin zpět na PSI. Zároveň dochází k přenosu protonů přes thylakoidní membránu, které se využívají na tvorbu ATP (Dekker & Boekema, 2005).

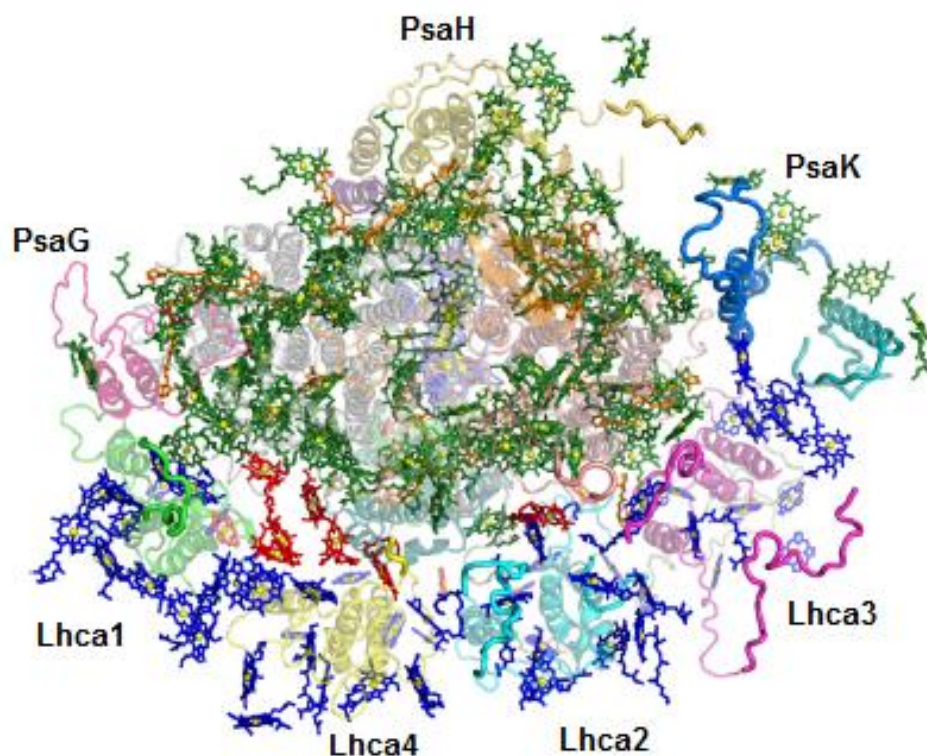
Na přesném prostorovém uspořádání proteinových podjednotek a relativní poloze kofaktorů je u fotosystému značně závislá schopnost přeměny sluneční energie. U zelených rostlin jsou nezbytné obě cesty přenosu elektronů. V blízkosti okrajů gran dochází k lineárnímu transportu díky využití PSII a cytochromu b_6/f komplexu z gran a díky komplexům PSI vyskytujících se poblíž (Dekker & Boekema, 2005; Amunts et al., 2010).

V granální membráně se nachází především PSII superkomplexy, ale monomery jaderných komplexů PSII mohou být lokalizovány i ve stromatu. S ohledem na PSII opravný cyklus má výskyt monomeru PSII ve stromatu thylakoidů fyziologický význam.

Nejcitlivější k oxidativnímu poškození radikály a aktivními formami kyslíku, které vznikly účinkem světla, je ze všech fotosyntetických proteinových komplexů PSII, jmenovitě jeho D1 podjednotka (viz kapitola 3.4.1). Z tohoto důvodu mají zelené rostliny pro poškozený D1 protein rychlý a účinný opravný mechanismus probíhající ve stromálních membránách. K tomu je nutný přesun PSII superkomplexu s poškozeným D1 proteinem z grana do stromatu, kde dojde k částečnému nebo úplnému rozdělení komplexu na jednotlivé podjednotky, proteolýze poškozeného D1 proteinu, inzerci nascentního D1 řetězce do membrány a nakonec následuje přesun zpět do grana a vznik PSII-LHCII superkomplexu (Dekker & Boekema, 2005).

3.3 Fotosystém I

PSI je považován za jeden z nejúčinnějších biologických makromolekulárních komplexů s kvantovým výtěžkem blízkým 1,0. Je tvořen 14 podjednotkami monomerního jaderného komplexu, podjednotkami světlosběrného komplexu Lhca1-4 (LHCI), 173 molekulami chlorofylů, 15 karotenoidy, 2 fylochinony a 3 klastry Fe_4S_4 . Také má tento fotosystém vazebná místa pro LHCII komplexy (Kargul et al., 2012; Amunts et al., 2010). Na obr. 1 je zobrazena celková struktura PSI.

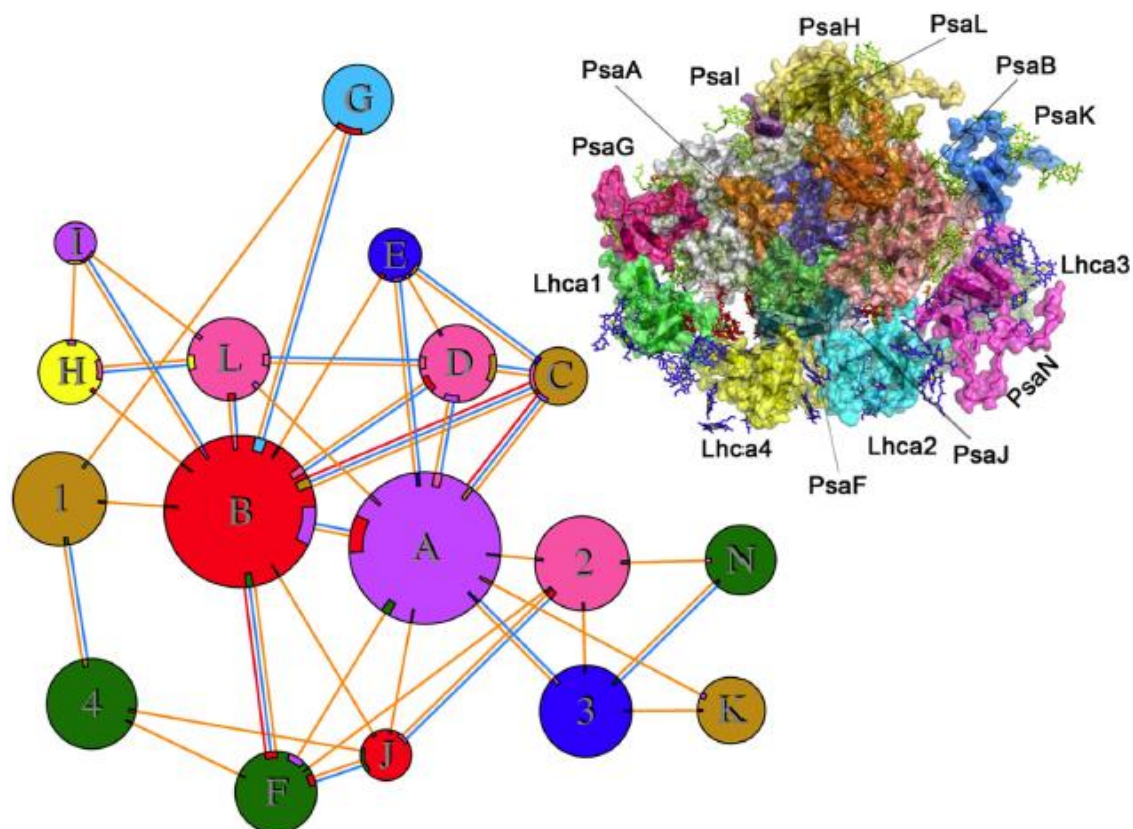


Obrázek 1 – Struktura fotosystému I. Na obrázku je znázorněn pohled ze stromální strany. Molekuly chlorofylů v jaderném komplexu jsou zobrazeny zeleně, molekuly chlorofylů ve světlosběrném komplexu LHCI modře, molekuly chlorofylů mezi těmito komplexy červeně, karotenoidy oranžově a ostatní molekuly chlorofylů a karotenoidů jsou šedé. Jednotlivé proteinové podjednotky jsou odlišeny barevně. Pozice podjednotek PsaG, PsaH, PsaK, Lhca1-4 jsou znázorněny. Převzato z Amunts et al., 2010.

3.3.1 Jaderný komplex PSI

PSI jaderný komplex je evolučně příbuzný s PSII jaderným komplexem. Již zmiňovaný jaderný komplex je složen ze dvou velkých membránových podjednotek (PsaA a PsaB), čtyř externích podjednotek (PsaC-E a PsaN), pěti malých (PsaF, PsaI-L), a tří větších interních podjednotek (PsaG, PsaH a PsaO). PsaN je jediný externí protein PSI, jenž je vystaven thylakoidnímu lumenu. U zelených rostlin a zelených řas se PSI jaderný komplex (~310-356 kDa) vyskytuje pravděpodobně jen jako monomer, kdežto u sinic a prochlorofyt může tvořit trimery. Například u špenátu byly pozorovány dimery a velké agregáty PSI. Jenomže strukturní analýza pomocí EM ukázala, že tyto agregáty byly vytvořeny uměle po solubilizaci membrány a nejednalo se tedy o nativní komplex. Důležitou roli v trimerizaci PSI u sinic hraje PsaL podjednotka. Trimery u zelených rostlin nemohou být tvořeny kvůli navázání PsaH podjednotky na PsaL

(Dekker & Boekema, 2005; Nelson & Yocum, 2006). Jednotlivé interakce mezi proteinovými řetězci a povrchovou strukturou PSI znázorňuje obr. 2.



Obrázek 2 – Schematický diagram interakcí mezi proteinovými řetězci a povrchová struktura PSI. Celková struktura je znázorněna ze stromální strany. V levé části obrázku jsou zobrazeny individuální podjednotky jako koule, jejichž velikost je úměrná velikosti povrchu daného proteinového řetězce. V pravé části jsou jednotlivé podjednotky odlišeny barevně. Převzato z Amunts et al., 2010.

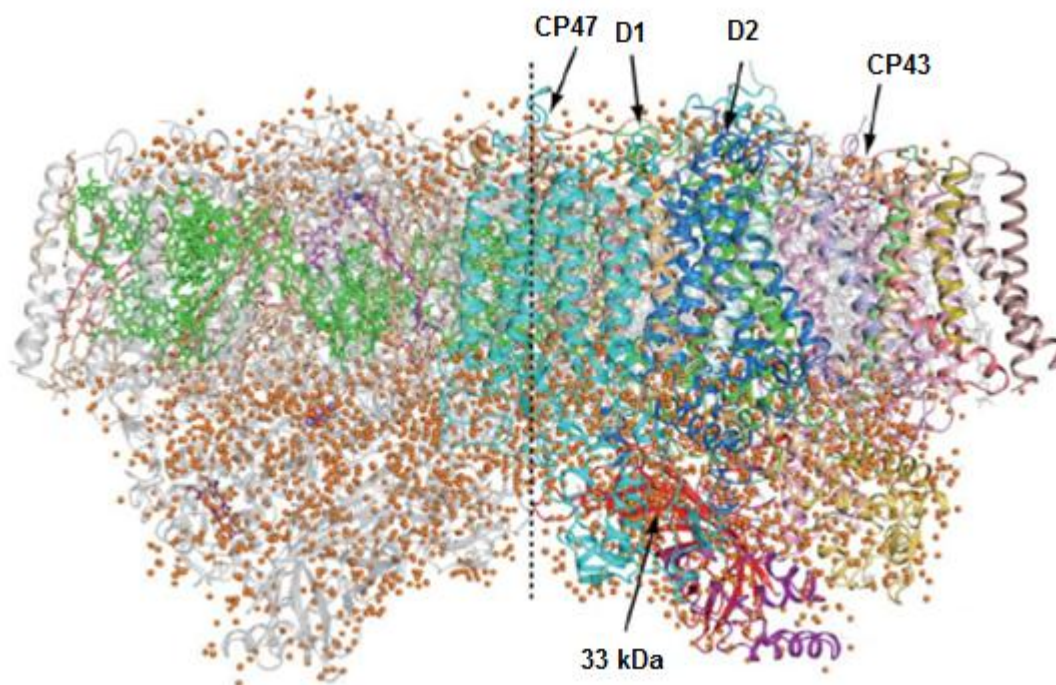
3.3.2 Světlosběrný komplex PSI

PSI zelených rostlin a zelených řas váže membránově vázanou periferní anténu, zvanou LHCI. Lhca jsou proteiny vázající chlorofyl *a/b* a formují LHCI do tvaru půlměsíce. Tento světlosběrný komplex se skládá ze čtyř odlišných polypeptidů značených jako Lhca1-4 s hmotnostmi okolo 25 kDa. Heterodimery tvoří podjednotky Lhca1 a Lhca4 i Lhca2 a Lhca3. Podjednotky LHCI obsahují různé množství chlorofylů. 15 molekul chlorofylů váže Lhca1, 14 chlorofylů Lhca2, 17 chlorofylů Lhca3 a 15 chlorofylů obsahuje Lhca4. Což vede celkově k 61 molekulám chlorofylů asociovaných s LHCI. LHCI se vážou na PSI a vytváří superkomplex PSI-LHCI s molekulovou

hmotností ~600-770 kDa. Kromě toho, že má komplex LHCI světlosběrnou funkci a absorbuje světelné záření i nad 700 nm, hraje důležitou roli ve fotoprotekci. Tento komplex je jedinečný jen pro rostliny a zelené řasy (Dekker & Boekema, 2005; Amunts et al., 2010; Kargul et al., 2012).

3.4 Fotosystém II

PSII je pigment-proteinový supramolekulární komplex v thylakoidní membráně rostlin, řas a sinic. Skládá se z 20 podjednotek, jejichž celková molekulová hmotnost je 350 kDa. Celková struktura PSII je zobrazena na obr. 3. V membránách je přítomen v dimerní formě. Každý PSII monomer obsahuje 19 proteinových podjednotek, 35 molekul chlorofylů, 2 molekuly feofytinu, 11 molekul β -karotenu, více než 20 molekul lipidů, 2 plastochinony, 2 atomy hemového železa, atom nehemového železa, 4 atomy manganu, 3 nebo 4 atomy vápníku (jeden z nich je v klastru Mn_4Ca) a 3 chloridové ionty (z nichž dva jsou v blízkosti Mn_4Ca klastru). Rovněž bylo u každého monomeru PSII zjištěno více než 1 300 molekul vody, což by odpovídalo 2 795 molekulám vody na dimer. Molekuly vody jsou organizovány do dvou vrstev nacházejících se na povrchu stromální a luminální strany. Některé z nich se dokonce vyskytují uvnitř membrány, kde má většina funkci ligandů pro chlorofyly (Caffarri et al., 2009; Umena et al., 2011).



Obrázek 3 – Celková struktura dimeru fotosystému II. Na obrázku je znázorněn pohled ve směru kolmém na rovinu membrány. Jednotlivé monomery jsou odděleny přerušovanou čarou. Na pravé straně jsou barevně zachyceny individuální podjednotky a na levé straně jsou tyto podjednotky zbarveny světle šedě. Naproti tomu jsou kofaktory na levé části obrázku zobrazeny barevně a na pravé části světle šedou barvou. Molekuly vody představují oranžové kuličky. Převzato z Umena et al., 2011, upraveno.

3.4.1 Jaderný komplex PSII

PSII jaderný komplex (~256 kDa) je složen ze čtyř velkých interních membránových podjednotek (PsbA-D), tří externích membránových podjednotek (PsbO-Q: jedná se o kyslík vyvíjející komplex, kde dochází ke štěpení vody) a z mnoha malých podjednotek. Zelené rostliny navíc obsahují dva malé proteiny (PsbR a PsbW), ale není zřejmé, kde jsou tyto proteiny lokalizovány.

Šest molekul chlorofylů *a* a dva feofytiny *a* se vážou na PsbA (~38,8 kDa) neboli D1 protein a PsbD (~38,4 kDa) neboli D2 protein, zatímco podjednotky PsbB (CP47; ~56,3 kDa) a PsbC (CP43; ~51,8 kDa) vážou 16 a 14 molekul chlorofylů *a* a mají funkci antén. Fotochemické reakční centrum, v němž probíhají primární reakce elektronového přenosu, je tvořeno PsbA a PsbD. Naproti tomu PsbB a PsbC mají světlosběrnou funkci, což znamená, že absorbují světelnou energii a přenášejí excitační

energii do reakčního centra. Ještě důležitější je, že ony rovněž přijímají excitační energii z periferní antény a přenáší ji opět do reakčního centra.

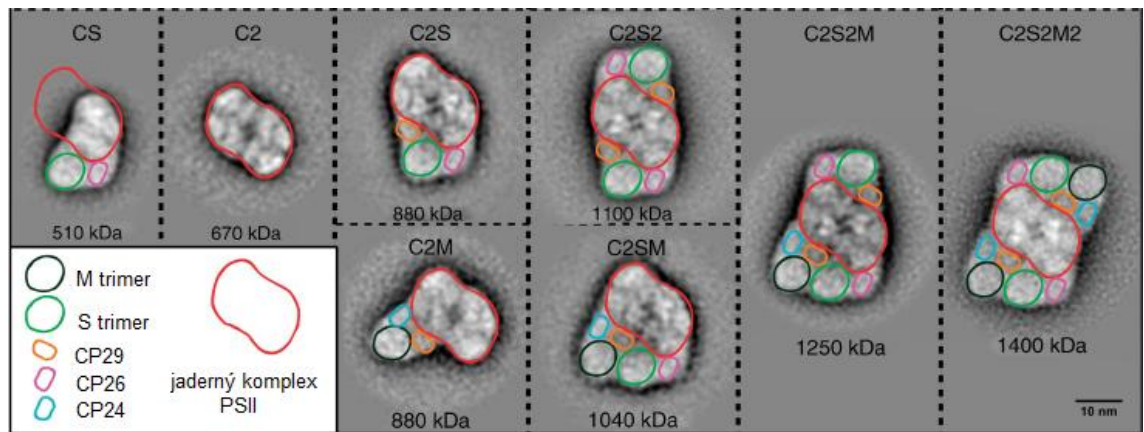
Bylo prokázáno, že PSII monomery mohou být zcela aktivní a že uspořádání dimerů je velmi podobné u sinic a zelených rostlin. Jestliže dimery opustí granální membránu, rozpadají se spontánně na monomery, a tím usnadňují uskutečnění PSII opravného cyklu ve stromálních částech membrány (Dekker & Boekema, 2005).

3.4.2 Světlosběrný komplex PSII

Periferní anténa PSII vyšších rostlin a eukaryotických řas se skládá z několika pigment-proteinových komplexů. U zelených rostlin mohou být rozlišeny dva druhy periferních anténních proteinů asociovaných s PSII. Nejhojněji zastoupeným komplexem je tzv. LHCII anténní komplex vyskytující se v trimerním stavu. Je tvořen různými kombinacemi tří velmi podobných proteinů, které jsou kódovány *lhcb1*, *lhcb2* a *lhcb3* geny vyskytujícími se v poměru přibližně 8:3:1. Druhý druh představují tři menší anténní komplexy - Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) a Lhcb6 (CP24), které se obvykle vyskytují v monomerní formě (Dekker & Boekema, 2005).

3.4.3 Superkomplexy PSII

Díky asociaci periferních anténních komplexů s dimery jaderných komplexů PSII dojde k vytvoření PSII-LHCII superkomplexů (obr. 4). Fotosyntetický výkon je optimalizován uspořádáním PSII a LHCII do superkomplexů. Aby byly superkomplexy PSII schopné se aklimatizovat na různé podmínky, měly by být modulární a flexibilní. Superkomplexy byly poprvé rozpoznány elektronovým mikroskopem po solubilizaci granálních membrán jemným detergentem vzhledem k jejich typickému obdélníkovému tvaru. Tento obdélníkový tvar se označuje jako „standard“ nebo C₂S₂ superkomplex obsahující téměř všechny PSII jaderné proteiny, avšak z periferní antény byly detekovány jen Lhcb1, Lhcb2, Lhcb4 a Lhcb5 genové produkty. Na jednu stranu monomeru PSII jaderného komplexu se váže Lhcb4 (CP29), na druhou stranu se váže Lhcb5 (CP26), kdežto LHCII trimer se očividně váže k oběma, jak k Lhcb4, tak k Lhcb5. Otázkou je, jestli (obdélníkový) PSII-LHCII představuje nativní uspořádání PSII v granálních membránách.



Obrázek 4 – EM analýza superkomplexů PSII. Na obrázku jsou znázorněny různé komponenty a superkomplexy PSII. CS: monomerní jaderný komplex s S-LHCII trimerem a anténou CP26, C: jaderný komplex, S: silně vázaný LHCII trimer, M: středně silně vázaný LHCII trimer. Molekulové hmotnosti každé komponenty jsou vypočteny na základě obsahu proteinu a stanoveny EM a SDS-PAGE. Převzato z Caffarri et al., 2009, upraveno.

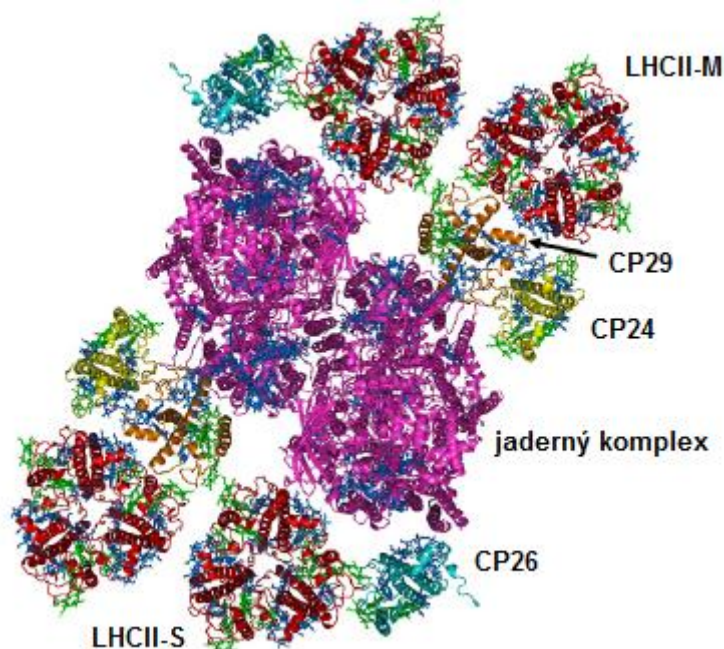
Obdélníkový superkomplex obsahuje dva trimery LHCII komplexů na dimer jaderného komplexu PSII. Pomocí elektronové mikroskopie byla zjištěna další dvě vazebná místa v dimerech jaderných komplexů PSII pro trimery. Tedy až se čtyřmi periferními LHCII trimery může být asociován dimerní jaderný komplex, C_2 . Tato vazebná místa byla označena „S“ („strongly“ vázaný LHCII trimer) a „M“ („moderately“ vázaný LHCII trimer) podle četnosti jejich výskytu. U PSII superkomplexů izolovaných ze špenátu bylo zjištěno ještě další vazné místo pro trimer LHCII, který je označován jako L-trimer („loosely“). Kromě toho připadají na jeden dimer jaderného komplexu PSII ještě další dva LHCII trimery, které jsou volné v membráně.

V souhrnu lze říci, že k dimernímu jadernému komplexu PSII se mohou vázat dva S-trimery a vytvořit tak superkomplex označovaný jako C_2S_2 . Dále se pak k němu mohou vázat dva M-trimery, které mohou spolu s S-trimery vytvořit superkomplex $C_2S_2M_2$, jenž je znázorněn na obr. 5. Jeho hmotnost je zhruba 1,1 MDa a váže asi 190 chlorofylů *a*, 80 chlorofylů *b* a 75 molekul karotenoidů. Superkomplexy špenátu $C_2S_2M_2L_{1-2}$ se vyskytují ojediněle. Obecně se uvádí, že celkové množství trimerů LHCII v thylakoidní membráně na jeden dimer jaderného komplexu PSII může být až osm.

Z Lhcb1 a Lhcb2 genových produktů je především složen S-LHCII trimer, poněvadž jen následující produkty byly detekovány v C_2S_2 superkomplexech. Naopak M-LHCII trimer je s největší pravděpodobností tvořen Lhcb1 a Lhcb3 genovými produkty, protože genový produkt Lhcb3 je přítomen u velkých superkomplexů. Genový

produkt Lhcb4 zaujímá jedinečné postavení v PSII makrostruktuře, jelikož jeho přítomnost je nezbytná k vytvoření PSII-LHCII superkomplexů.

V monomerním jaderném komplexu PSII jsou dvě hlavní dráhy přenosu energie, tj. z CP47 do reakčního centra a z CP43 do reakčního centra. Dvě hlavní dráhy přenosu energie do jaderného komplexu PSII jsou rovněž v superkomplexu. První dráha je z S-LHCII a/nebo CP26 do CP43 a přilehlého monomerního jaderného komplexu PSII a druhá vede z M-LHCII a CP24 přes CP29 do CP47 a vedlejšího monomerního jaderného komplexu PSII. Na přenosu energie mezi sousedními (super)komplexy v membráně se pravděpodobně v menší míře podílí chlorofyly *b* oproti chlorofylům *a*. Prostřednictvím specifických drah, které vyžadují jen molekuly chlorofylů *a* obzvláště v nízkoenergetických formách, je přenesena excitační energie z periferní antény do jaderného komplexu. Vazba mezi M-trimerem a superkomplexem je zprostředkována Lhcb3, což je monomerní jednotka naproti CP24 a hlavní komponenta M-trimeru. Na interakci mezi CP24 a Lhcb3 je závislé navázání M-trimeru, zatímco na stabilní navázání S-trimeru má velký vliv CP26 (Dekker & Boekema, 2005; Kouřil et al., 2012; Caffarri et al., 2009, Croce & van Amerongen, 2011).



Obrázek 5 – Navázání S-LHCII a M-LHCII trimerů k dimernímu jadernému komplexu. Na obrázku je znázorněn superkomplex $C_2S_2M_2$. Proteiny jaderného komplexu jsou zobrazeny tmavě purpurově, LHCII červeně, CP24 žlutě, CP29 oranžově a CP26 modrozeleně. Převzato z Croce & van Amerongen, 2011, upraveno.

3.4.4 Klastř Mn₄CaO₅

Zatímco superkomplexy jsou tvořeny PSI anebo PSII s navázanými světlosběrnými proteiny (LHCI, LHCII), tak navíc PSI vytváří komplexy se solubilními donory a akceptory elektronů. PSII netvoří žádné komplexy se solubilními proteinovými donory či akceptory elektronů, poněvadž využívá k oxidaci H₂O vázaný anorganický iontový klastř složený ze čtyř atomů Mn, jednoho Ca²⁺ a jednoho Cl⁻ iontu a produkuje elektrony pro redukci plastochinonu. Veškeré kovové atomy klastřu Mn₄CaO₅ byly spolu se všemi jejich ligandy lokalizovány z mapy elektronové hustoty. Pět kyslíkových atomů v klastřu slouží jako kyslíkové můstky, jež spojují pět kovových atomů. Ke klastřu Mn₄CaO₅ byly vázány i čtyři molekuly vody, z nichž některé mohou sloužit jako substráty pro tvorbu molekulárního kyslíku. Klastřem Mn₄Ca je katalyzována světlem indukovaná oxidace vody. Po štěpení dvou molekul vody na čtyři elektrony a čtyři protony, dochází k vytvoření jedné molekuly molekulárního kyslíku.

Kyslík vyvíjející komplex je u vyšších rostlin tvořen třemi podjednotkami PsbO, PsbP a PsbQ. Tyto proteinové podjednotky se nacházejí na lumenární straně membrány a podílí se na stabilizaci Mn klastřu potřebného pro efektivní vývoj kyslíku (Nelson & Yocum, 2006; Umena et al., 2011; Caffarri et al., 2009).

4 Elektronová mikroskopie

Pro studování proteinových a membránových struktur je široce používaná elektronová mikroskopie (EM), která je však stále méně rozšířena než difrakce rentgenového záření, kde řešení 3D struktury proteinů se stalo téměř rutinou. Na druhé straně, rentgenová difrakce má dvě nevýhody: zaprvé musí být získány správně uspořádané a dostatečně velké krystaly. Rentgenová analýza využívá vzorky o tloušťce pohybující se v řádech mikrometrů. Díky tomu, že interakce elektronů s hmotou jsou silnější než s rentgenovým zářením, je EM užitečná metoda pro obrazovou analýzu jednovrstevných 2D krystalů nebo jednotlivých proteinových molekul. Druhou nevýhodou je, že jsou získány pouze difrakční obrazce, kdežto EM poskytuje přímo informace o struktuře ve formě snímků.

Kontrast u elektronového mikroskopu je způsoben rozptylem elektronů. Rozptyl elektronů je úměrný atomovému číslu. Proto kontrast snímků biologických vzorků není příliš vysoký. Navíc jsou biologické vzorky citlivé k radičnímu poškození, ale to lze minimalizovat snížením dávky elektronů. Jelikož je nízká intenzita elektronového svazku, dojde k zhoršení detekce a snížení poměru signál/šum. Problém snímků

biologických vzorků s nízkým poměrem signálu ku šumu je řešen jednočásticovou analýzou. Průměrováním stovek nebo, je-li to možné, tisíců projekcí výrazně zlepšíme poměr signálu ku šumu a díky tomu získáme informaci o studovaném vzorku (Boekema et al., 2009; Knispel et al., 2012). Tedy pro strukturální studie biologických vzorků pomocí EM je stále jedna z nejdůležitějších metod, jednočásticová analýza. Oproti jiným metodám (X-ray krystalografii nebo nukleární magnetické rezonanci) má jednočásticová analýza dvě hlavní výhody. První, požadované množství vzorku je jen 5-10 ng. Druhá výhoda je, že může tolerovat určitý stupeň heterogenity vzorku.

4.1 Příprava vzorku konvenční metodou

Pro přípravu vzorku pro EM bývá standardně používána metoda negativního barvení. U této metody je kontrast zvýšen vložením biomolekul do roztoku solí těžkých kovů. Při sušení soli těchto kovů vyplní dutiny a prostory kolem molekul a naopak nepronikají do hydrofobních částí proteinů. Jako alternativa k negativnímu barvení byla vyvinuta kryo-EM, která vizualizuje proteiny v amorfní vrstvě ledu bez kontrastující látky. Kontrast je poměrně nízký v porovnání s negativním barvením, poněvadž je pouze způsoben rozdílem hustoty mezi amorfním ledem a proteinem, rozlišení je však lepší. Je zřejmé, že kryo-EM je vhodná například pro symetrické molekuly virů, ale ne pro heterogenní proteinové komplexy (např. vysokomolekulární, přechodné membránové komplexy).

Membránové proteiny mají nevýhodu v tom, že zůstávají monodisperzní v roztoku uvnitř neuspořádané vrstvy detergentu. Tato vrstva způsobuje rozmazání projekce po obvodu proteinu. Aby byl povrch uhlíkového filmu, kterým je potažena elektronmikroskopická měděná síťka, více hydrofilní, musí být upraven doutnavým výbojem. Tato jednoduchá úprava zlepšuje adsorpci proteinů na film a poskytuje lepší pozadí. Úprava filmu doutnavým výbojem je zvláště vhodná pro membránové proteiny, poněvadž se skládají z hydrofobních částí. Přibližně 5 μ l vzorku je nanášeno na měděnou síťku potaženou uhlíkem. Poté je síťka položena na kapku kontrastovacího činidla 2% octanu uranylu a zhotovený preparát se nechá zaschnout na vzduchu. Octan uranylu tvoří kolem částic amorfní vrstvu, která je stabilizuje a zlepšuje jejich kontrast (Boekema et al., 2009).

4.2 Alternativní metoda přípravy vzorku - „blotting síťkou“

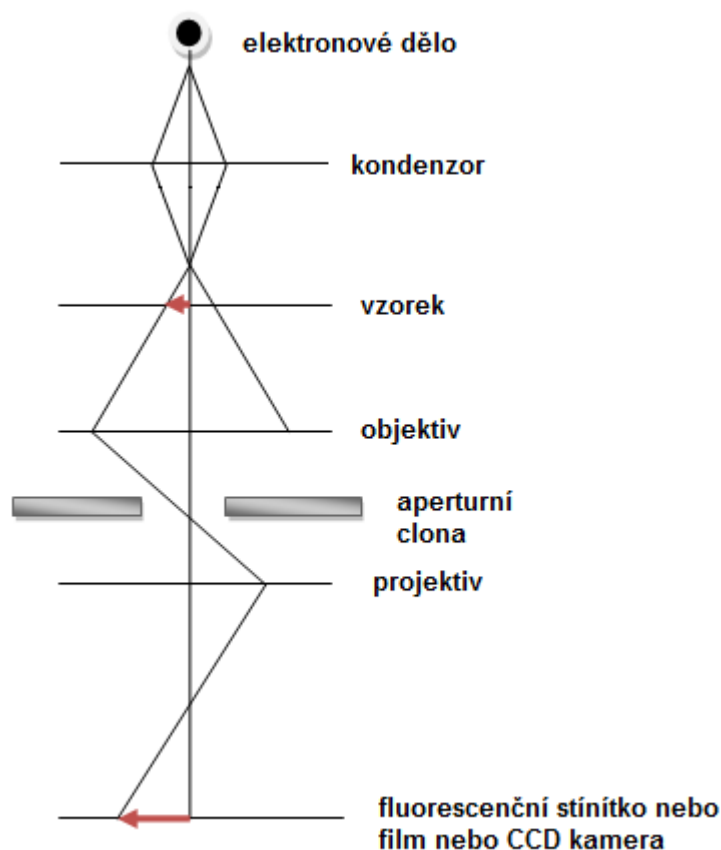
Pro purifikaci proteinu a přípravu vzorku pro elektronovou mikroskopii může být použita metoda „blotting síťkou“ (grid blotting). Blotting je jednoduchá a standardní metoda pro přímý přenos proteinových komplexů, které byly separovány nativní

gelovou elektroforézou, na elektronmikroskopické síťky. Postup je založen na separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu. Z gelové matrice jsou separované proteiny přeneseny na elektronmikroskopickou síťku a to následujícím způsobem: gel je rozřezán na dvě části, referenční a blotting (přenosnou). Referenční je obarvena barvivem Coomassie a poté odbarvena. Mezitím je část pro blotting stále uchovávána (maximálně 30 min.) při 4 °C ve vlhkém prostředí. Následně jsou obě části gelu spojeny a neobarvené proteinové pásy jsou lokalizovány manuálně extrapolací z poloh obarvených proteinových pásů. Nakonec jsou proteinové komplexy přeneseny umístěním elektronmikroskopické síťky přímo na gel, 5 µl elektroforetického pufru je nanášeno mezi síťku a gel, po dvou minutách je síťka z gelu odstraněna a dále následuje buď negativní barvení, nebo prudké zmrazení. Nicméně je tzv. blotting sítkou přijatelný jen pro určité rozmezí molekulových hmotností. Dolní mez je stanovena dle rozmezí jednočásticové analýzy, tedy nad 200 kDa. Horní mez molekulové hmotnosti je stanovena na základě průměrné velikosti pórů nativního gelu (do 1,5 MDa). Ačkoli byly u vyšších molekulových hmotností na snímku z elektronového mikroskopu pozorovány koncentračně závislé agregáty, bylo i pomocí této metody pozorováno dostatečné množství větších komplexů (např. 2,5 MDa) v intaktním stavu. A proto je „blotting sítkou“ použitelný pro celou řadu proteinových komplexů a má potenciál, aby se stal standardním postupem přípravy biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii. Potřebné zařízení je levné a daný postup nevyžaduje žádné speciální dovednosti, takže i nezkušení mohou připravit vysoce kvalitní vzorky pro elektronovou mikroskopii. Dokonce je vhodný pro náročné aplikace, v nichž je mnoho komplexů studováno jednočásticovou analýzou a identifikováno hmotnostní spektrometrií (Knispel et al., 2012).

4.3 Transmisní elektronový mikroskop

Transmisní elektronový mikroskop (TEM) je významný nástroj pro studium struktury biologických makromolekul a jejich proteinových komplexů. Zdrojem elektronů je elektronové dělo obsahující termoemisioní zdroj (např. wolframové vlákno nebo krystal LaB₆), ze kterého jsou elektrony tepelně emitovány. Na základě průchodu elektrického proudu dojde k zahřátí vlákna a úniku elektronů. Elektrony jsou urychlovány elektrickým polem a letí směrem ke kondenzoru. Kondenzor fokusuje elektronové paprsky na preparát, promítá „křížičku“ (Wehneltův válec v elektronovém dělu směřuje všechny elektrony do tzv. křížičky) na preparát a zajišťuje jeho homogenní a intenzivní ozáření. Dalším optickým systémem, jenž je vřazen do cesty elektronů, je systém elektromagnetických čoček, které pracují jako spojky a jsou fokusovatelné. Srdcem mikroskopu je objektivová čočka. Rozlišují se dva režimy měření, světlé pole, což je

standardní režim zobrazení, a temné pole. U metody světlého pole tvoří obraz paprsky přímo procházející preparátem a ostatní paprsky jsou odcloněny aperturní clonou. U metody temného pole je aperturní clona vysunuta tak, aby propustila jen paprsky procházející difrakčními maximy. Za objektivem je projektiv tvořený dalšími čočkami, které určující výsledné zvětšení TEM. Díky němu je obraz promítnut na fluorescenční stínítko, kde vznikne pozorovatelný obraz studovaného objektu. Daný obraz může být zachycen na fotografický film nebo zaznamenán digitálně pomocí CCD kamery. Získané snímky jsou vyhodnoceny obrazovou analýzou. Na obr. 6 je zobrazeno zjednodušené schéma dráhy elektronů v transmisním elektronovém mikroskopu.



Obrázek 6 – Zjednodušené schéma dráhy elektronů v transmisním elektronovém mikroskopu. Na obrázku jsou popsány a schematicky znázorněny základní části elektronového mikroskopu. Červená šipka symbolizuje objekt, který je mikroskopem zvětšen a zobrazen na fluorescenční stínítko nebo film nebo zaznamenán CCD kamerou.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Materiál a metody

5.1 Rostlinný materiál

Rostlinným materiálem byl ječmen jarní (*Hordeum vulgare*), který byl pěstován hydroponicky v Knopově živném roztoku na inertním nosiči, perlitu. Rostliny byly kultivovány ve fyto komoře Microclima 1750 (Snijders Scientific, Tilburg, Nizozemí) při intenzitě fotosynteticky aktivního záření $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a relativní vlhkosti 60-65 %. Pokusné rostliny byly pěstovány po dobu 8 dnů v režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma a pravidelně zalévány kultivačním živným roztokem.

5.1.1 Knopův živný roztok

Pro kultivaci byl použit Knopův roztok. Jeho příprava spočívala ve smíchání 950 ml destilované vody, 10 ml od každého z pěti zásobních roztoků (viz tab. 2) a 3 kapek 50% roztoku chloridu železitého.

Tabulka 2 – Složení zásobních roztoků a jejich hmotnostní koncentrace 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

5.2 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-Aldrich
Akrylamid	Biorad
Aminokapronová kyselina	Sigma-Aldrich
Askorbát sodný	Sigma-Aldrich
Bisakrylamid	Biorad
Benzamidin	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Deoxycholát sodný	Sigma-Aldrich

Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
Dodecyl- α -D-maltosid	Affymetrix
Dodecyl- β -D-maltosid	Applichem
Dusičnan draselný	Lachema
Dusičnan vápenatý, tetrahydrát	Hichem
Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl	Sigma-Aldrich
Glycerol	Penta
Glycin	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný	Lachner
Hydroxid draselný	Lachner
Chlorid draselný	Lachema
Chlorid hořečnatý, hexahydrát	Lachner
Chlorid sodný	Lachema
Chlorid železitý	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková	Lachner
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Biorad
Octan uranylu	Sigma-Aldrich
Persíran amonný	Biorad
Sacharosa	Lachema
Síran hořečnatý	Lachema
Tricin	Biorad
Triton X-100	Sigma-Aldrich

5.3 Izolace thylakoidních membrán

Pro vlastní experiment byly použity pouze listy ječmene jarního. Kombinací protokolů uvedených v pracích autorů Dau a kol. a Hideg (Dau et al., 1995; Hideg, 1994) byly připraveny thylakoidní membrány. Listy ječmene (50 g) byly vloženy do předem vychlazené homogenizační nádoby, přelity pufrem A1 (~200 ml) neboli homogenizačním pufrem vychlazeným na 0 °C, jehož složení je uvedeno v tab. 3. Následně byly rozstříhány na co nejmenší kousky a homogenizovány v šesti pětivteřinových intervalech při otáčkách 13 500 min⁻¹ pomocí homogenizátoru T25basic (IKA Labortechnik, Staufen, Německo). Po celou dobu homogenizace byla homogenizační nádoba chlazená, poněvadž při práci s homogenizátorem vzniká vlivem tření teplo. Poté byl homogenizovaný rostlinný materiál přefiltrován přes čtyři vrstvy silonové sítky s velikostí oka 40 μ m. Filtrát byl rozdělen do čtyř 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován v centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz,

Německo) po dobu 6 minut při 5 000 g a 4 °C. Po ukončení centrifugace byl supernatant odlit, pelet resuspendován přibližně v 20 ml vychlazeného pufru A2 (viz tab. 3) a centrifugován 10 minut při 5 000 g a 4 °C. Supernatant byl opět odlit a pelet resuspendován v asi 20 ml vychlazeného pufru A3 (viz tab. 3). Vzniklý roztok byl centrifugován 3 minuty pouze při 200 g a 4 °C. Účelem této centrifugace bylo odstranění případného škrobu, jenž ulpěl na stěnách kyvety. Supernatant byl přelit do čistých kyvet a centrifugován po dobu 5 minut při 5 000 g a 4 °C. Nakonec byl supernatant odlit a pelet resuspendován přibližně v 1 ml pufru A3. U takto připravené suspenze thylakoidních membrán byla změřena koncentrace chlorofylů (viz kapitola 5.5), která poté byla rozpipetována do malých mikrozkušavek a skladována při -80 °C. Veškerá práce s listy i během izolace thylakoidních membrán probíhala při nízké intenzitě zeleného světla a rostlinný materiál byl uchováván v ledové lázni, případně v chlazené centrifuze.

Tabulka 3 – Složení pufrů A1, A2 a A3 pro izolaci thylakoidních membrán.

	Chemikálie	Koncentrace
Pufr A1 pH 7,2	Sacharosa	0,4 M
	HEPES	35 mM
	NaCl	0,4 M
	MgCl ₂	4 mM
	Askorbát sodný *	5 mM
	BSA *	2 mg/ml
Pufr A2 pH 7,5	HEPES	25 mM
	NaCl	0,15 M
	MgCl ₂	8 mM
	Na-EDTA	1 mM
Pufr A3 pH 7,2	Sacharosa	0,4 M
	HEPES	50 mM
	NaCl	15 mM
	MgCl ₂	5 mM

*Přidáno těsně před použitím

5.4 Izolace BBY membrán

BBY membrány byly připraveny podle protokolu uvedeného v práci Caffarri a kol. (Caffarri et al., 2009). Protože BBY membrány reprezentují vnitřní části gran, jedná se tedy o membrány obohacené o PSII. Název „BBY“ je zkratkou tří jmen - Berthold,

Babcock a Yocum, kteří poprvé popsali protokol izolace thylakoidních membrán obohacených o PSII, a který byl autory Caffarri a kol. (Caffarri et al., 2009) částečně modifikován.

Pro izolaci BBY membrán byly veškeré použité pufrы (B1, B2, B3) vychlazeny na teplotu 0 °C. 50 gramů listů ječmene bylo vloženo do vychlazené homogenizační nádoby, přelito přibližně 200 ml pufru B1 (viz tab. 4), rozstříháno na drobnější kousky a homogenizováno. Homogenizace byla prováděna pomocí homogenizátoru T25basic (IKA Labortechnik, Staufen, Německo) v šesti pětivteřinových intervalech při 13 500 otáčkách min⁻¹. Následně byly homogenizované listy přefiltrovány přes čtyři vrstvy silonové sítky (velikost oka 40 μm) a filtrát byl rovnoměrně rozdělen do čtyř 50 ml centrifugačních kyvet. Centrifugace probíhala v centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz, Německo) po dobu 10 minut při 1 400 g a 4 °C. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v pufru B2 (~20 ml, viz tab. 4). Tento roztok byl centrifugován 10 minut při 4 000 g a 4 °C. Supernatant byl znovu odlit a pelet resuspendován v pufru B3 (~20 ml, viz tab. 4). Vzniklý roztok byl tentokrát centrifugován 10 minut při 6 000 g a 4 °C. Po centrifugaci byl pelet resuspendován přibližně v 1 ml pufru B3. V následujícím kroku byla stanovena koncentrace chlorofylů *a* a *b* (viz kapitola 5.5) a upravena na 2 500 μg/ml. V první fázi izolace vzniknou thylakoidní membrány, teprve až po inkubaci s Tritonem X-100 dojde k odstranění stromálních thylakoidů a okrajů gran, vzniknou tzv. BBY a to následujícím způsobem: thylakoidní membrány byly mírně míchány na ledové lázni po dobu 20 minut v roztoku, kde 13/16 celkového objemu tvořila suspenze thylakoidních membrán a zbylé 3/16 tvořil roztok 20% Tritonu X-100 (v/v), 15 mM NaCl a 5 mM MgCl₂, což změnilo celkovou koncentraci chlorofylů *a* a *b* na 2 100 μg/ml. Nesolubilizovaný materiál byl odstraněn 5 minutovou centrifugací při 3 500 g. Supernatant byl pak centrifugován po dobu 30 minut při 40 000 g. Na závěr byl pelet resuspendován v pufru obsahujícím 20 mM HEPES, 0,4 M sorbitol, 15 mM NaCl a 5 mM MgCl₂, pH 7,5 (~1 ml). Získaná suspenze BBY membrán byla pomocí pipety přenesena do mikrozkuvek a uložena v -80 °C v mrazicím boxu. Při práci s listy a během izolace membrán bylo třeba pracovat při slabém zeleném světle a rostlinný materiál uchovávat na ledové lázni.

Tabulka 4 – Složení pufrů B1, B2 a B3 pro izolaci BBY membrán.

	Chemikálie	Koncentrace
Pufr B1	Tricin/KOH	20 mM
pH 7,8	NaCl	0,4 M
	MgCl ₂	2 mM
	Benzamidin	0,2 mM
	Aminokapronová kyselina	1 mM
Pufr B2	Tricin/KOH	20 mM
pH 7,8	NaCl	0,15 M
	MgCl ₂	5 mM
	Benzamidin	0,2 mM
	Aminokapronová kyselina	1 mM
Pufr B3	HEPES	20 mM
pH 7,5	NaCl	15 mM
	MgCl ₂	mM

5.5 Stanovení koncentrace chlorofylů

Dle práce Lichtenthalera (Lichtenthaler, 1987) byla u suspenze thylakoidních membrán a BBY membrán spektrofotometricky stanovena koncentrace chlorofylů *a* a *b*. K danému množství suspenze biologických membrán (5 a 10 µl) byly přidány 2 ml 80% acetonu. Poté byly roztoky promíchány a centrifugovány v centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz, Německo). Centrifugace thylakoidních membrán i BBY membrán probíhala po dobu 10 minut při 20 000 g a při 4 °C. U supernatantu (pigmentového extraktu) byla spektrofotometrem UV550 (Thermo Spectronic, Rochester, USA) změřena absorbance při vlnových délkách 646,8; 663,2 a 750 nm. Z hodnot absorbancí byly pomocí Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987) vypočteny koncentrace chlorofylů *a* a *b*:

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

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

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

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

5.6 Solubilizace membrán a příprava vzorku pro CN-PAGE

Solubilizace membrán je důležitá pro jejich elektroforetickou separaci. V případě thylakoidních membrán byl pro solubilizaci používán detergent β -DDM a v případě BBY membrán byl používán α -DDM. Jak thylakoidní membrány, tak BBY membrány byly solubilizovány v různých hmotnostních poměrech DDM/chlorofyl($a+b$): 4 (0,6 μ l DDM na 16 μ g Chl na jamku o koncentraci Chl 1 000 μ g/ml), 6 (1,0 μ l DDM), 8 (1,3 μ l DDM), 10 (1,6 μ l DDM), 12 (1,9 μ l DDM), 14 (2,2 μ l DDM), 16 (2,6 μ l DDM), 18 (2,9 μ l DDM) a to následujícím způsobem. U vzorků thylakoidních membrán byl do mikrozkušavek nejprve napipetován pufr C1 (0,4 M sacharosa, 50 mM HEPES/NaOH, 15 mM NaCl, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10% glycerol, pH 7,2), poté 10% β -DDM a do tohoto roztoku byla 8-kanálovou pipetou přidána suspenze thylakoidních membrán, která byla předem naředěna pufr C1 na koncentraci chlorofylů 1 000 μ g/ml. Použití 8-kanálové pipety je nutné proto, aby všechny vzorky thylakoidních membrán byly v kontaktu s detergentem stejně dlouhou dobu. U vzorků BBY membrán byl do mikrozkušavek nejdříve napipetován pufr D1 (0,4 M sorbitol, 20 mM HEPES, 15 mM NaCl, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10% glycerol, pH 7,5), následně 10% α -DDM a nakonec byla přidána suspenze BBY membrán (koncentrace chlorofylů 3 000 μ g/ml) pomocí 8-kanálové pipety.

Všechny mikrozkušavky se vzniklou směsí byly jemně promíchány a centrifugovány na centrifuze 3-30K (Sigma, Osterode am Harz, Německo) po dobu 10 minut při 22 000 g a 4 °C. Účelem této centrifugace bylo odstranění nesolubilizovaného materiálu. Po centrifugaci byl supernatant nanášen do jamek gelu. K přípravě vzorku thylakoidních membrán bylo na jednu jamku použito 34 μ l pufru C1, různé množství 10% β -DDM dle poměru DDM/chlorofyl($a+b$) a 16 μ l suspenze thylakoidních membrán. Pro přípravu vzorku BBY membrán bylo na jednu jamku použito 44,5 μ l pufru D1, potřebné množství α -DDM dle poměru DDM/chlorofyl($a+b$) a 5,3 μ l suspenze BBY membrán. Množství pufru bylo zvoleno tak, aby doplnilo suspenzi membrán na objem vhodný pro nanášení do jamek gelu. Množství suspenze bylo navrženo tak, aby odpovídalo 16 μ g chlorofylů a a b na jamku pro optimální elektroforetickou separaci.

5.7 CN-PAGE

Pro elektroforetickou separaci pigment-proteinových komplexů byla použita bezbarvá nativní elektroforéza. Samotná separace probíhala v 4-8% gradientovém polyakrylamidovém dělicím gelu. Nejprve byl mezi skla do výšky 65 mm nalit 8%

nadstavovací gel (F), jehož úlohou je pouze vyplnění prostoru, aby nedošlo při separaci proteinových komplexů na celé délce gelu k rozostření a rozšíření proteinových pásů. Dále byl nad uniformní nadstavovací gel nalit gradientový dělicí gel (R). Výška gradientového dělicího gelu byla stejně jako u nadstavovacího gelu 65 mm. Tento gel byl shora překryt 4% zaostřovacím gelem (S) o výšce 5 mm. Podle tab. 5 byly namíchané jednotlivé roztoky pro přípravu jednoho polyakrylamidového gelu.

Tabulka 5 – Roztoky na přípravu jednoho polyakrylamidového gelu. 8% F: roztok na přípravu 8% nadstavovacího gelu, 4% R a 8% R: roztoky na přípravu 4% a 8% gradientového dělicího gelu, 4% S: roztok na přípravu 4% zaostřovacího gelu.

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

*Přidáno těsně před použitím

Pro přípravu jednotlivých roztoků k přípravě gelu a pro celkový průběh elektroforézy byly přichystány následující zásobní roztoky:

- Gelový pufr, 6x koncentrovaný (pH 7,0): 3 M aminokapronová kyselina a 0,3 M Bis-tris/HCl
- 50% roztok akrylamidu (AB): 50% T, 2,6% C, tzn. na přípravu 250 ml roztoku bylo použito 122 g akrylamidu a 3,3 g bisakrylamidu, T: celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C: podíl dimeru vůči monomeru („cross-linker“)
- 10% APS: 10% roztok persíranu amonného
- Katodový (horní) pufr, 10x koncentrovaný: 0,5 M Tricin, 0,15 M Bis-tris/HCl. Pro elektroforetickou separaci bylo ředěním zásobního roztoku připraveno 350 ml pufru, do něhož bylo přidáno 200 mg 0,05% deoxycholátu sodného, 100 mg 0,02% dodecyl-β-D-maltosidu (u vzorku thylakoidních membrán) nebo 100 mg 0,02% dodecyl-α-D-maltosidu (u vzorku BBY membrán) a 4 kapky koncentrované kyseliny chlorovodíkové
- Anodový (dolní) pufr, 1x koncentrovaný (pH 7,0): 0,05 M Bis-tris/HCl

V následujícím kroku byla sestavena aparatura pro nalévání gelu s 1 mm distančními pásky. Pomocí destilované vody byla ověřena těsnost elektroforetické

aparatury. Poté byla voda odlita a prostor mezi skly byl vysušen filtračním papírem. Jako první byl nalit 8% nastavovací gel, který byl ihned převrstven vodou a ponechán v klidu 30 minut. Po jeho polymeraci byla voda odsáta a nad něj byl nalit 4-8% gradientový dělicí gel. Gradient byl vytvořen prostřednictvím gradientové peristaltické pumpy PCD21 (Kouřil, Kyjov, Česká republika). Nejdříve byla celá aparatura promyta deionizovanou vodou. Do komory dále od výpusti byl nalit 4% dělicí gel a do komory blíže k výpusti 8% dělicí gel. Obě komory byly neustále míchány. Následně byl do obou komor přidán 10% APS a asi po jedné minutě míchání byl kohout mezi komorami otevřen a pumpa spuštěna. Po nalití byl gradientový gel opatrně převrstven vodou a ponechán tuhnout minimálně 30 minut. Ze ztuhlého gelu byla voda odsáta, mezi skla byl vložen hřebínek a nalit promíchaný 4% zaostřovací gel. Hřebínek byl nasazen tak, aby pod ním nezůstala žádná vzduchová bublina. Po 45-60 minutové polymeraci zaostřovacího gelu byl hřebínek z gelu vytáhnout a jamky byly promyty vodou. Díky tomuto kroku byl z jamek odstraněn nezpolymerizovaný akrylamid. Poté byla zkompletována elektroforetická aparatura Protean II xi Cell (Biorad, Hercules, USA), která byla připojena k termostatu Polystat 12103-25 (Cole-Parmer, Chicago, USA). Nakonec byl dolit anodový a katodový pufr a do jamek gelu byly nanесeny vzorky, jež byly připraveny způsobem popsáným v kapitole 5.6. Po nanесení všech vzorků byl připojen zdroj elektrického proudu Powerpac 1000 (Biorad, Philadelphia, USA) a spuštěna elektroforéza. Během elektroforézy byl anodový (dolní) pufr stále míchán.

Elektroforetická separace probíhala za těchto podmínek: elektrický proud 15 mA, limit napětí 100 V, doba 15 minut (pro zaostřovací gel) a elektrický proud 30 mA, limit napětí 500 V, doba 2 hodiny (pro gradientový dělicí gel). Hodnoty proudu a napětí platí pro současné použití dvou polyakrylamidových gelů. Samotná elektroforéza probíhala potmě a při 4 °C. Po ukončení elektroforézy byla elektroforetická aparatura rozebrána, gel vyjmut a skenován.

5.8 Skenování gelu

Polyakrylamidový gel byl skenován na běžném kancelářském skeneru Canon 5600F. Z oskenovaného gelu byly vyřezány vybrané proteinové pásy, u nichž byl optimalizován proces extrakce, a který byl monitorován pomocí měření 77K fluorescenčních emisních spekter.

5.9 Eluce separovaných PSII superkomplexů z gelu

Pro zachování intaktnosti separovaných superkomplexů byla jako šetrný způsob extrakce testována samovolná eluce proteinů z gelu do pufru. Nejprve byly z polyakrylamidového gelu pomocí skalpelu vyřezány vybrané proteinové pásy. U vzorku thylakoidních membrán byla testována na jemně „nasekaném“ proteinovém pásu různá doba eluce (2h, 4h, 8h a 16h) v 25 μ l C2 pufru obsahujícím 0,4 M sacharosu, 50 mM HEPES, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,17 mM β -DDM, pH 7,2. U vzorku BBY membrán byla rovněž testována časová závislost doby eluce na jemně „nasekaném“ proteinovém pásu v 25 μ l pufru D2 (0,4 M sorbitol, 20 mM HEPES, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,152 mM α -DDM, pH 7,5). Během vyřezávání, jemného „nasekávání“ proteinových pásů a pipetování pufru bylo nutné pracovat při zeleném světle a vzorky uchovávat v chladu při 4 °C. V průběhu eluce byly vzorky uloženy v mikrozkuřkách ve tmě a při 4 °C, aby bylo zabráněno znehodnocení vzorků. Proces extrakce separovaných superkomplexů PSII z gelu byl optimalizován pro účely elektronové mikroskopie. Po eluci byla jednak koncentrace a dále pak intaktnost eluovaných superkomplexů PSII ověřena měřeními 77K fluorescenčních emisních spekter.

5.10 Monitorování intaktnosti separovaných PSII superkomplexů

U jednotlivých vzorků thylakoidních a BBY membrán byla změřena nízkoteplotní emisní fluorescenční spektra za těchto podmínek: 77 K, excitace při 436 nm (chlorofyl *a*), excitace při 475 nm (chlorofyl *b*), detekce fluorescence v rozmezí vlnových délek 600-800 nm, spektrální šířka excitačního monochromátoru 10 nm a spektrální šířka emisního monochromátoru 5 nm. Spektra byla měřena přímo na gelu u vybraných proteinových pásů, na dnech jamek, u eluátů z jemně „nasekaných“ proteinových pásů a u vzorků zásobních suspenzí thylakoidních a BBY membrán, které se nanášely přímo do jamek gelu. Kvůli eliminaci reabsorpce fluorescence byla spektra měřena i u naředěných zásobních suspenzí thylakoidních a BBY membrán. Měření 77K fluorescenčních emisních spekter probíhalo na fluorimetru F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japonsko) a při měření byl vzorek ponořen v tekutém dusíku ve skleněné Dewarově nádobě. Z eluovaných vzorků s intaktním PSII superkomplexem a optimální koncentrací byl připraven vzorek pro EM.

5.11 Strukturní analýza pomocí elektronové mikroskopie

Vzorky pro elektronovou mikroskopii byly připraveny metodou negativního barvení. 5 μ l vybraného eluovaného vzorku bylo nanášeno po dobu jedné minuty

na elektronmikroskopickou měděnou síťku potaženou podpurným uhlíkovým filmem. Tento film byl předem upraven doutnavým výbojem, aby byl více hydrofilní a lépe adsorboval PSII superkomplexy. Po minutové adsorpci následovalo odsátí vzorku filtračním papírem. Poté bylo na síťku nanášeno 5 μ l 2% octanu uranylu a přibližně po jedné a půl minutě bylo odsáto. Takto připravené vzorky byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 2010 s urychlovacím napětím 100 kV, při zvětšení 40 000x a pokojové teplotě. Snímky byly pořízeny CCD kamerou KeenView ovládanou softwarem iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Německo).

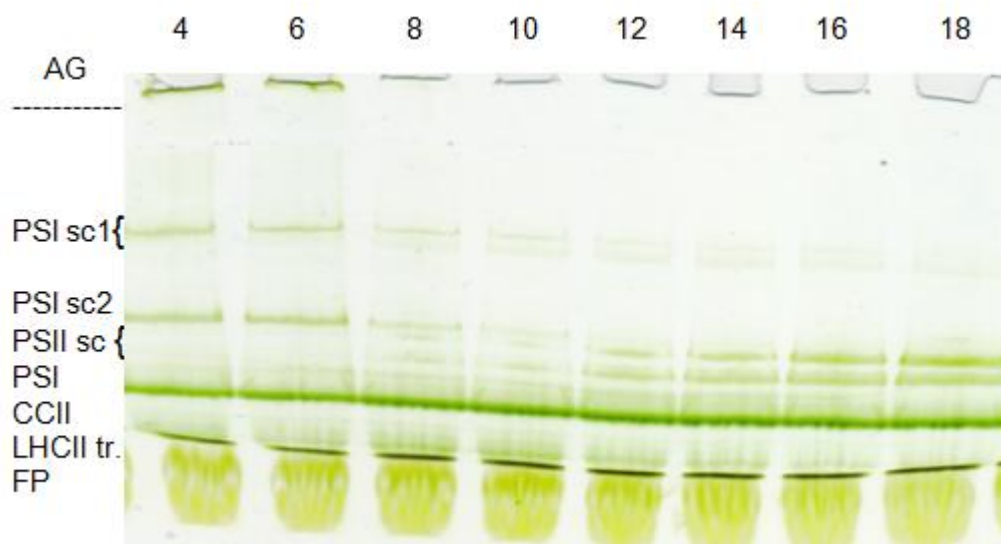
6 Výsledky a diskuze

Hlavním cílem experimentální části byla kombinace metod bezbarvé nativní elektroforézy a transmisní elektronové mikroskopie. Důraz byl kladen na optimalizaci kroku extrakce separovaných pigment-proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin pro podmínky elektronové mikroskopie. Poněvadž bylo důležité, aby se separované superkomplexy zachovaly v intaktním stavu, tak jako šetrný způsob extrakce byla zvolena smovlná eluce proteinů z polyakrylamidového gelu do pufru. Při přípravě vzorku pro elektronovou mikroskopii jsme vyzkoušeli i metodu „blotting sítkou“ (viz kapitola 4.2). Jednoduchá aplikace této metody však neposkytla kladný výsledek.

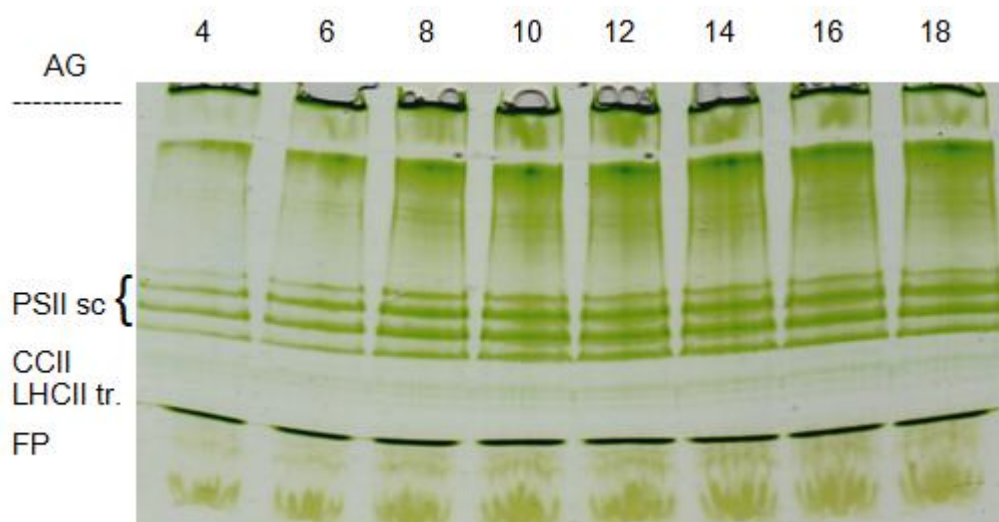
6.1 Stanovení optimální koncentrace detergentu

Aby byla elektroforetická separace pigment-proteinových komplexů úspěšná, bylo napřed nezbytné experimentálně stanovit vhodný hmotnostní poměr detergentu k celkovému množství chlorofylů *a* a *b* (DDM/chl). Pro solubilizaci thylakoidních membrán byl používán detergent β -DDM a pro solubilizaci BBY membrán α -DDM. Výsledky separace proteinových komplexů po solubilizaci při hmotnostním poměru DDM/chl = 4-18 jsou uvedeny na obr. 7 a 8.

Samotná separace proteinových komplexů byla prováděna na 4-8% gradientovém polyakrylamidovém dělicím gelu. Toto koncentrační rozmezí bylo zvoleno proto, poněvadž pro šetrnou separaci proteinových komplexů o velkých molekulových hmotnostech jsou vhodné řídké gely. Množství suspenze, jež je nanášena do jamek gelu, bylo experimentálně zvoleno tak, aby nebyly proteinové pásy málo výrazné a aby navzájem nesplývaly. K přípravě vzorku thylakoidních membrán i pro přípravu vzorku BBY membrán bylo na jednu jamku použito takové množství suspenze, které odpovídalo 16 μ l chlorofylů *a* a *b*. Jestliže by bylo použito vyšší množství chlorofylu, byly by proteinové pásy příliš intenzivní a některé by navzájem splývaly, tudíž by je bylo obtížné vzájemně odlišit. Rovněž by také docházelo při použití velkého množství chlorofylu k tzv. „smearingu“, kdy jsou jednotlivé proteinové pásy rozmazané kvůli velkému množství vzorku v gelu a dochází k nárůstu intenzity zbarvení pozadí gelu. Naopak když by bylo použito menší množství chlorofylu, byly by proteinové pásy málo výrazné.



Obrázek 7 – Stanovení optimálního hmotnostního poměru detergentu k chlorofylům po solubilizaci thylakoidních membrán β -DDM. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr, který byl použit pro solubilizaci thylakoidních membrán s β -DDM. V horní části obrázku jsou vidět dna jamek, do nichž byl vzorek nanášen. Přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. AG: nesolubilizovaný materiál, jenž zůstal na dnech jamek, PSI sc1: superkomplex 1 fotosystému I, PSI sc2: superkomplex 2 fotosystému I, PSII sc: superkomplexy fotosystému II, PSI: fotosystém I s navázanými LHCI, CCII: fotosystém II bez LHCI, LHCII tr.: trimer světlosběrného komplexu fotosystému II, FP: volné pigmenty.



Obrázek 8 – Stanovení optimálního hmotnostního poměru detergentu k chlorofylům po solubilizaci BBY membrán α -DDM. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr, který byl použit pro solubilizaci BBY membrán s α -DDM. V horní části obrázku jsou vidět dna jamek, do nichž byl vzorek nanášen. Přerušovaná čára označuje rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem. AG: nesolubilizovaný materiál, jenž zůstal na dnech jamek, PSII sc: superkomplexy fotosystému II, CCII: fotosystém II bez LHCII, LHCII tr.: trimer světlosběrného komplexu fotosystému II, FP: volné pigmenty.

Z obr. 7 je patrné, že u nižších hmotnostních poměrů DDM/chl byly především výrazné proteinové pásy PSI, ale pokud se hmotnostní poměr DDM/chl zvyšoval, začínaly se postupně vyskytovat proteinové pásy PSII a intenzita proteinových pásů PSI se snižovala. Z toho vyplývá, že s nižším poměrem detergentu ke vzorku dochází k selektivní solubilizaci PSI, poněvadž se nachází ve stromálních thylakoidech a na okrajích gran, a je tedy i pro minimální množství detergentu lépe přístupný. Teprve až při vyšším poměru detergentu ke vzorku jsou solubilizovány proteiny v granálních thylakoidech, v nichž je lokalizován převážně PSII.

Z obr. 8 vyplývá, že u hmotnostních poměrů DDM/chl = 4 a 6 nebyly proteinové pásy PSII superkomplexů příliš výrazné a u hmotnostních poměrů DDM/chl = 8-18 nebyl mezi intenzitami proteinových pásů PSII patrný velký rozdíl. Protože se jedná o separaci suspenze granálních membrán, reprezentují jednotlivé proteinové pásy v horní části obrázku fragmenty PSII superkomplexů, které se postupně uvolňují.

Při porovnání intenzity pásů separovaných PSII superkomplexů u různých hmotnostních poměrů DDM/chl bylo zjištěno, že nejlepšími výsledky bylo dosaženo při použití hmotnostního poměru DDM/chl = 18 pro solubilizaci thylakoidních membrán

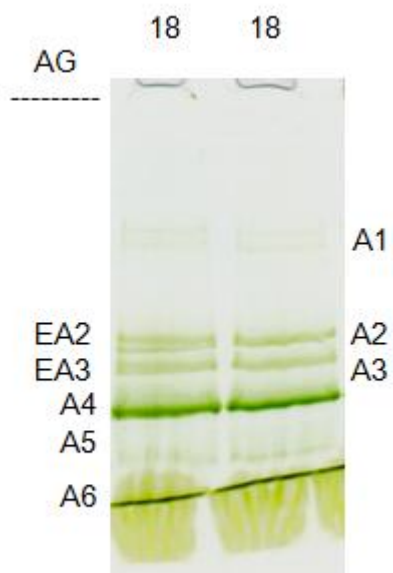
s β -DDM a 12 pro solubilizaci BBY membrán s α -DDM. Tyto poměry byly používány pro solubilizaci daných membrán v dalších experimentech.

Z obr. 7 je dále zřejmé, že s rostoucí koncentrací β -DDM ubývá nesolubilizovaný materiál ze dna jamek, což znamená, že solubilizace thylakoidních membrán byla účinnější. Kdežto na obr. 8 je vidět nesolubilizovaný materiál ve všech jamkách, protože α -DDM patří mezi jemnější detergenty. Jednotlivé proteinové pásy byly přisouzeny komplexům PSI a PSII na základě údajů v literatuře, mých dosavadních zkušeností a zkušeností vedoucího práce.

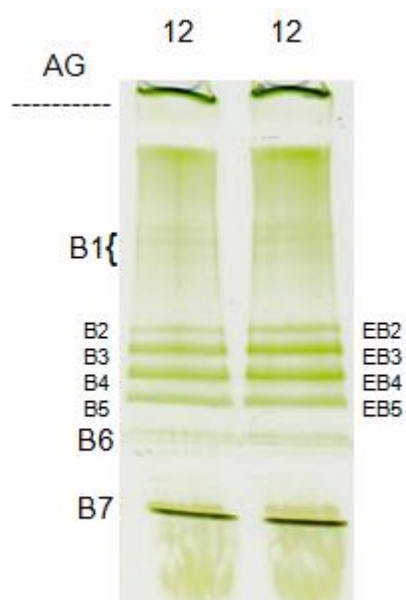
6.2 Optimalizace procesu extrakce separovaných PSII superkomplexů

V této práci byla zkoumána možnost extrakce separovaných proteinů pomocí samovolné eluce z gelu, která byla optimalizována pro účely strukturní analýzy transmisní elektronovou mikroskopií. Následná extrakce proteinů pomocí elektroeluce by mohla být příliš násilná a mohla by vést k porušení struktury proteinových komplexů/superkomplexů.

Nejprve byly z polyakrylamidového gelu pomocí skalpelu vyřezány vybrané proteinové pásy (viz obr. 9 a 10). U vzorku thylakoidních membrán byla testována na jemně „nasekaném“ proteinovém pásu různá doba eluce (2h, 4h, 8h a 16h) v 25 μ l C2 pufru obsahujícím 0,4 M sacharosu, 50 mM HEPES, 15 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,17 mM β -DDM, pH 7,2. U vzorku BBY membrán byla rovněž testována časová závislost doby eluce na jemně „nasekaném“ proteinovém pásu v 25 μ l pufru D2 (0,4 M sorbitol, 20 mM HEPES, 15 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,152 mM α -DDM, pH 7,5). Podmínky eluce jsou uvedeny v kapitole 5.9. Intaktnost separovaných komplexů byla měřena pomocí 77K fluorescenčních emisních spekter (viz kap. 6.3).



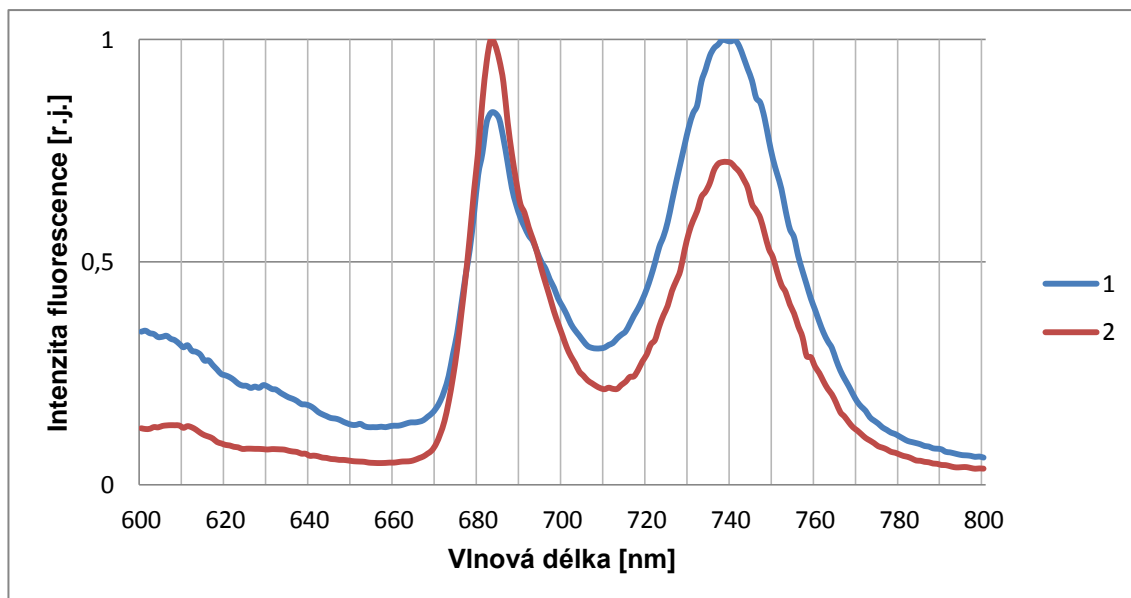
Obrázek 9 – Výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů thylakoidních membrán solubilizovaných β -DDM pomocí CN-PAGE s označením jednotlivých pásů použitých pro samovolnou eluci a pro měření 77K fluorescenčních emisních spekter. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr β -DDM/chl, který byl použit pro solubilizaci vzorku thylakoidních membrán. AG: nesolubilizovaný materiál, A1: superkomplex 1 fotosystému I, A2 a A3: superkomplexy fotosystému II, A4: fotosystém I s navázanými LHCI, A5: fotosystém II bez LHCII, A6: trimer světlosběrného komplexu fotosystému II, EA2 a EA3: proteinové pásy superkomplexů PSII použité pro eluci.



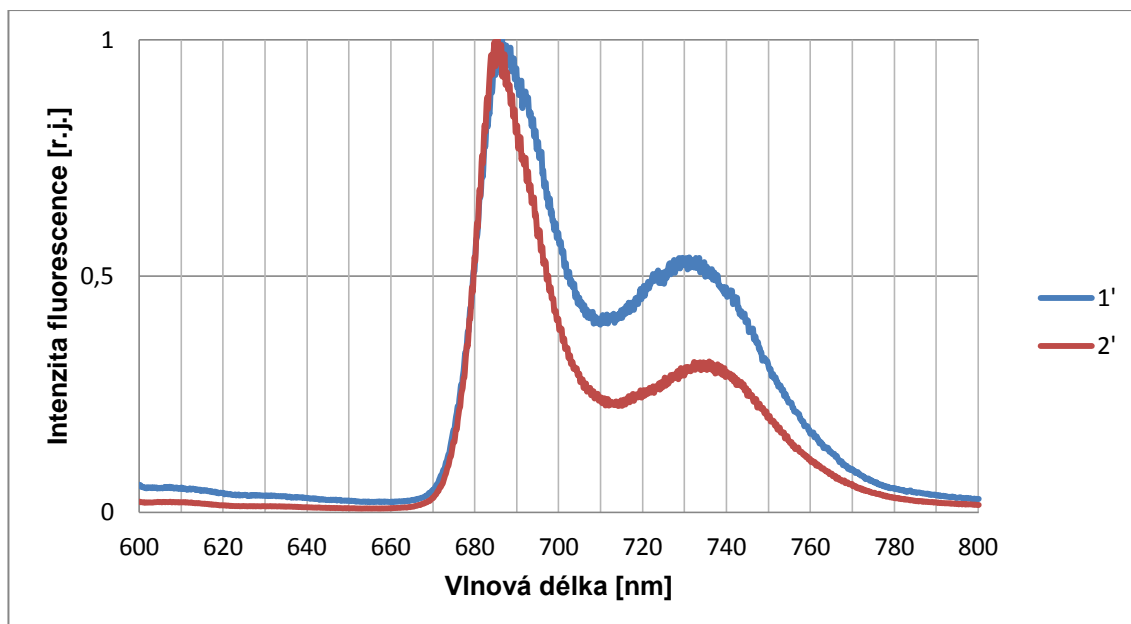
Obrázek 10 – Výsledek elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů BBY membrán solubilizovaných α -DDM pomocí CN-PAGE s označením jednotlivých pásů použitých pro samovolnou eluci a pro měření 77K fluorescenčních emisních spekter. Čísla nad jamkami označují hmotnostní poměr α -DDM/chl, který byl použit pro solubilizaci vzorku BBY membrán. AG: nesolubilizovaný materiál, B1: agregáty fotosystému II, B2-B5: superkomplexy fotosystému II, B6: fotosystém II bez LHCII, B7: trimer světlosběrného komplexu fotosystému II, EB2-EB5: proteinové pásy superkomplexů PSII použité pro eluci.

6.3 Ověření intaktnosti elovaných PSII superkomplexů

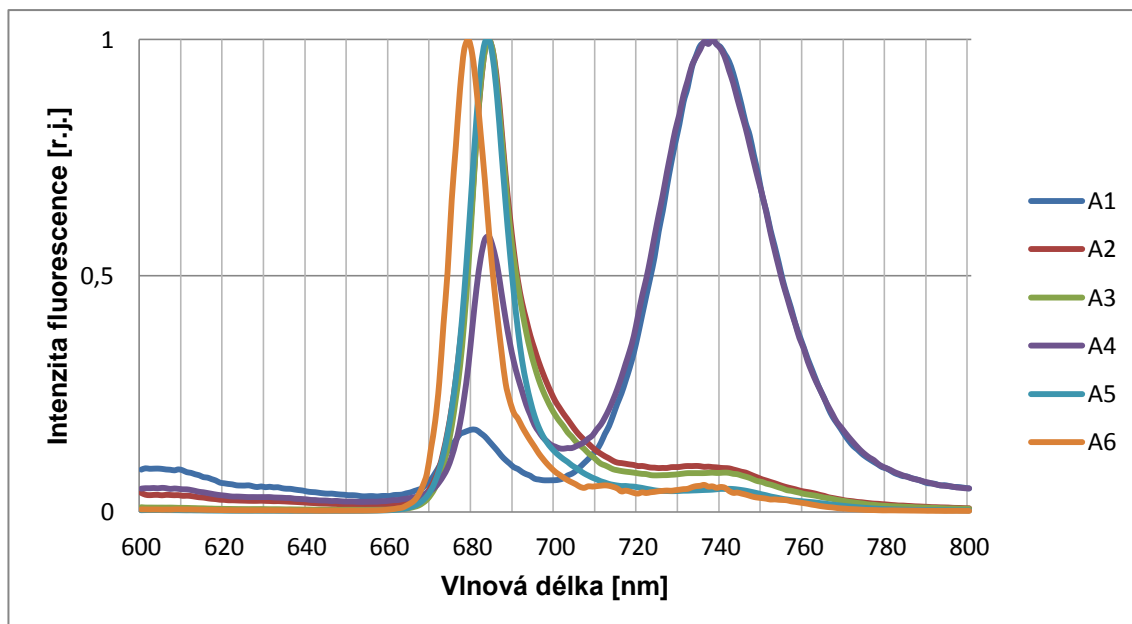
Po eluci byla jednak koncentrace a dále pak intaktnost eluovaných superkomplexů PSII ověřena měřením 77K fluorescenčních emisních spekter. Měření spekter bylo provedeno dle postupu, jenž je popsán v kap. 5.10. Prezentována jsou pouze emisní spektra při excitaci vzorků při vlnové délce 436 nm (preferenční excitace Chl *a*). Spektra byla měřena na izolovaných membránách (viz obr. 11 a 12), na separovaných komplexech PSII v gelu (viz obr. 13 a 14) a na vzorcích eluovaných po dobu 2 hodin (viz obr. 15 a 16). Také byla měřena spektra u vzorků, které byly eluovány po dobu 4, 8 a 16 hodin (výsledky nejsou uvedeny), ale u těchto spekter docházelo s rostoucí dobou eluce k rozpadu superkomplexů, čili k narušení jejich intaktnosti. Kromě toho se intenzita signálu u spekter vzorků s rostoucí dobou eluce příliš nelišila. Všechna spektra byla normalizována na maximální hodnotu fluorescence jednotlivých vzorků.



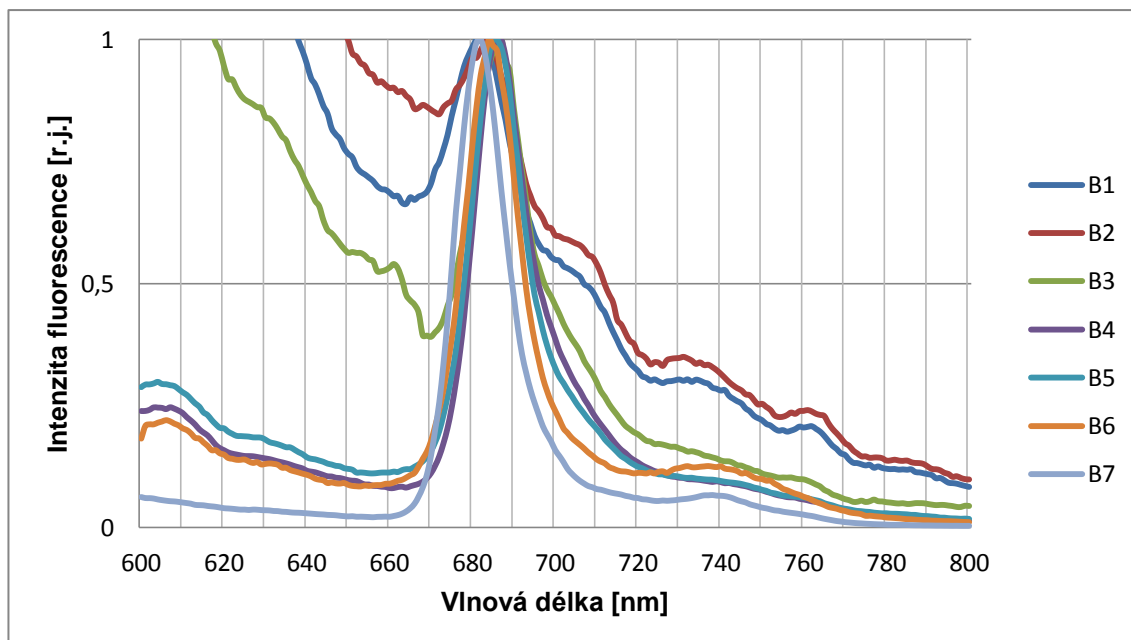
Obrázek 11 – 77K fluorescenční emisní spektra izolovaných thylakoidních membrán. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 436 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm. 1: thylakoidní membrány, 2: 20x naředěné (elučním pufrem C2) thylakoidní membrány.



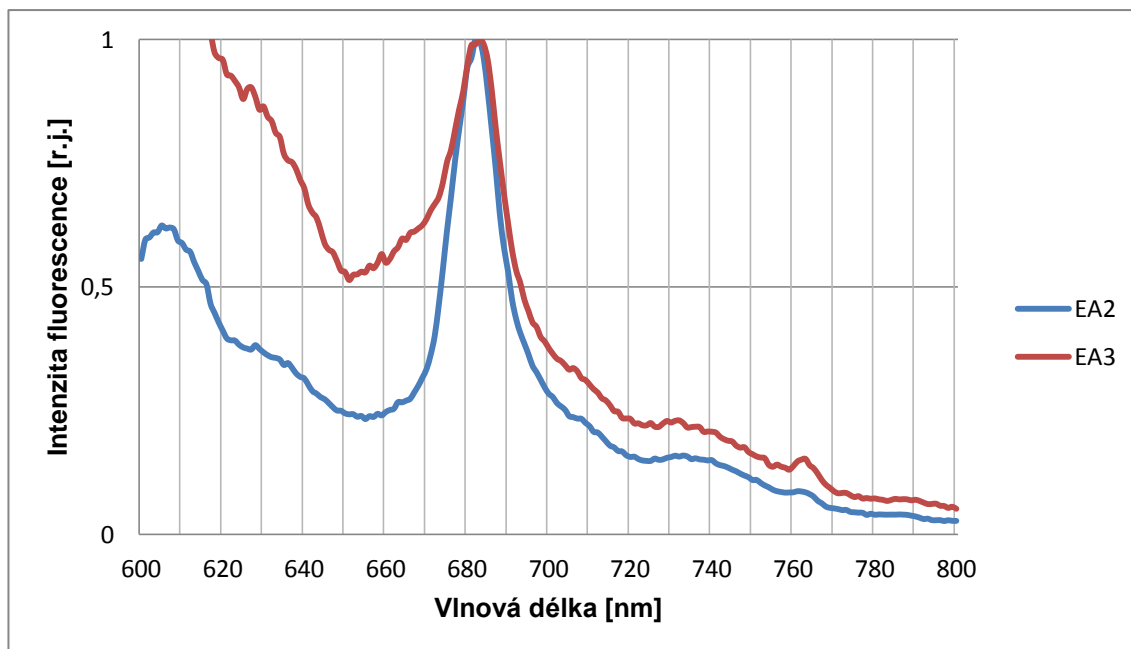
Obrázek 12 – 77K fluorescenční emisní spektra izolovaných BBY membrán. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 436 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm. 1': BBY membrány, 2': 20x naředěné (elučním pufrem D2) BBY membrány.



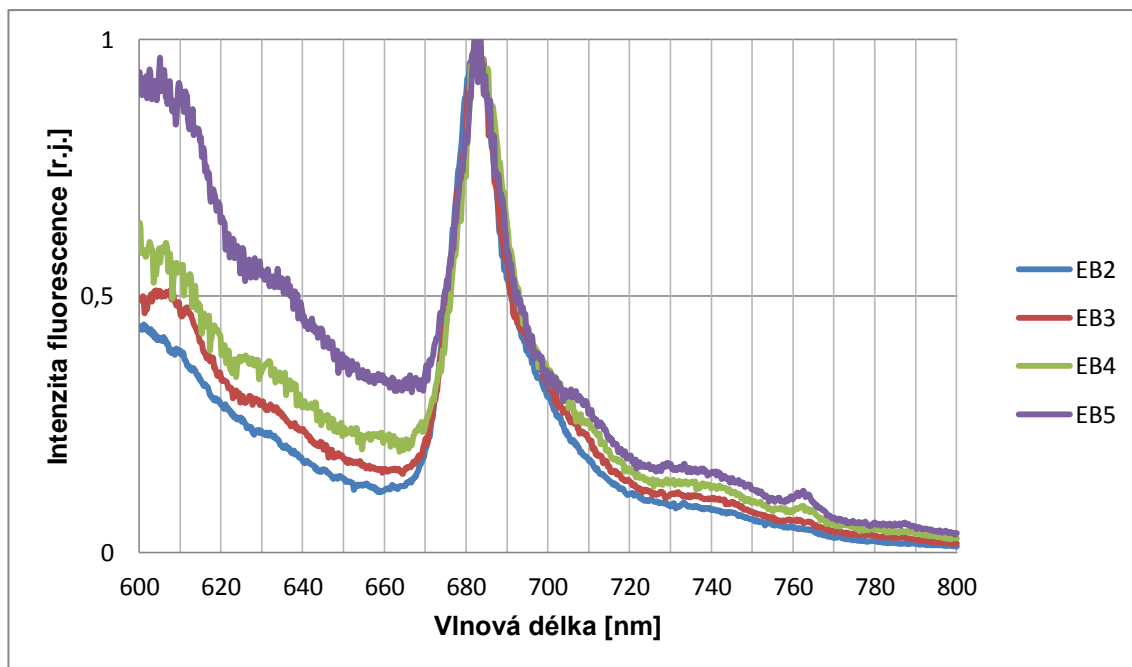
Obrázek 13 – 77K fluorescenční emisní spektra separovaných pigment-proteinových komplexů po solubilizaci thylakoidních membrán. A1: superkomplex 1 fotosystému I, A2 a A3: superkomplexy fotosystému II, A4: fotosystém I s navázanými LHCI, A5: fotosystém II bez LHCII, A6: trimer světlosběrného komplexu fotosystému II (viz obr. 9). Emisní fluorescenční spektra byla měřena přímo na gelu. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 436 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



Obrázek 14 – 77K fluorescenční emisní spektra separovaných pigment-proteinových komplexů po solubilizaci BBY membrán. B1: agregáty fotosystému II, B2-B5: superkomplexy fotosystému II, B6: fotosystém II bez LHCII, B7: trimer světlosběrného komplexu fotosystému II (viz obr. 10). Emisní fluorescenční spektra byla měřena přímo na gelu. Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 436 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



Obrázek 15 – 77K fluorescenční emisní spektra eluovaných pigment-proteinových komplexů po solubilizaci thylakoidních membrán. EA2 a EA3: proteinové pásy superkomplexů PSII (viz obr. 9). Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 436 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.



Obrázek 16 – 77K fluorescenční emisní spektra eluovaných pigment-proteinových komplexů po solubilizaci BBY membrán. EB2-EB5: proteinové pásy superkomplexů PSII (viz obr. 10). Excitace vzorků probíhala při vlnové délce 436 nm. Spektrální šířka excitačního monochromátoru byla 10 nm a emisního monochromátoru 5 nm.

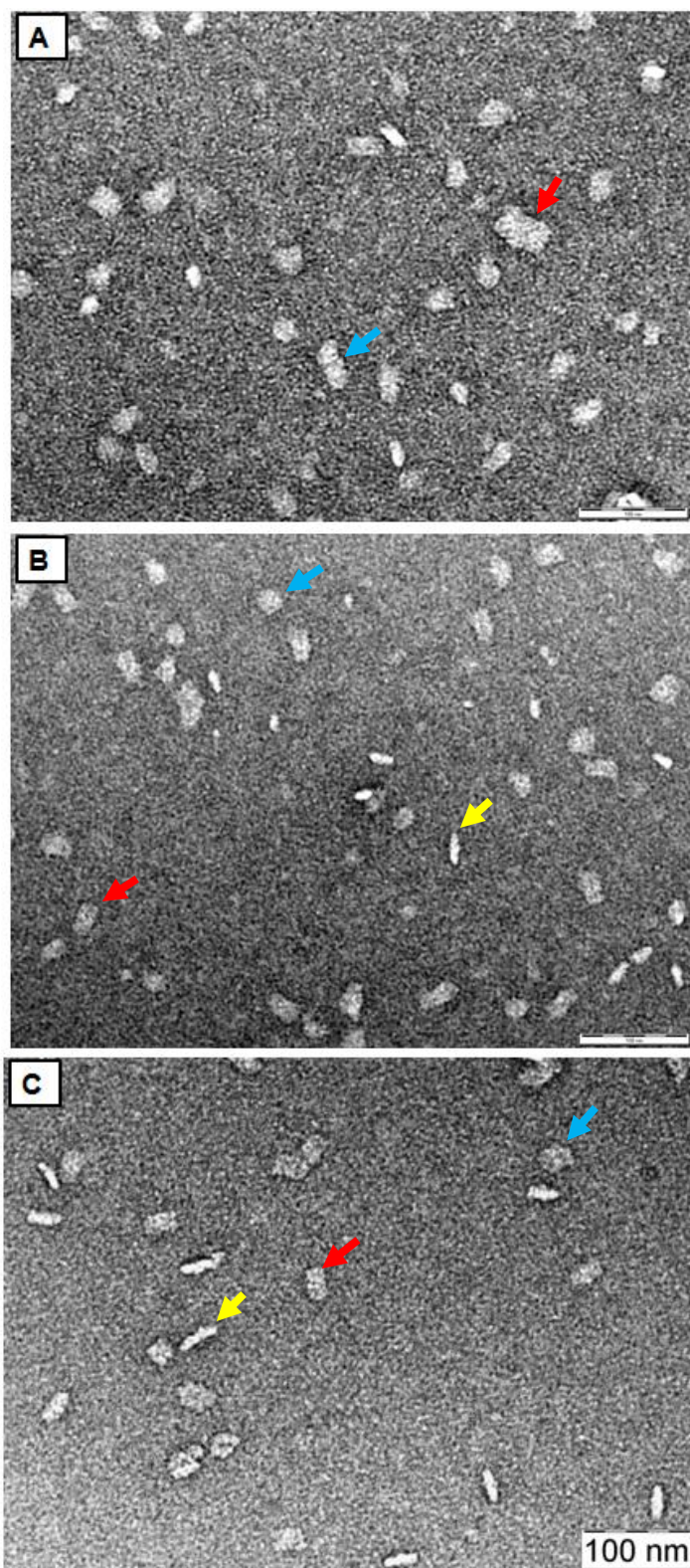
Přítomnost PSII a intaktnost eluovaných superkomplexů PSII je patrná z fluorescenčních emisních spekter na obr. 15 a 16, poněvadž emisní maximum při vlnové délce blízké 682 nm odpovídá komplexu PSII. Emisní maximum blízké hodnotě 735 nm patří PSI (viz obr. 11-13). Emise při vlnové délce okolo 678 nm odpovídá volným LHCII trimerům (viz obr. 13 a 14). Intenzita signálu v emisních spektrech vypovídá o uvolnění PSII superkomplexů z gelu (s rostoucí dobou eluce se intenzita emise výrazně neměnila). Pozice emisního maxima odpovídá emisi intaktního PSII superkomplexu. Důležité je to, že pozice emisního maxima u eluovaných PSII superkomplexů je podobná emisi PSII u thylakoidních, příp. BBY membrán (viz obr. 11, 12). Po 2hod eluci se neobjevuje emisní pás okolo 678-680 nm, který by odpovídal odpojeným LHCII trimerům od PSII komplexu.

6.4 EM strukturní analýza

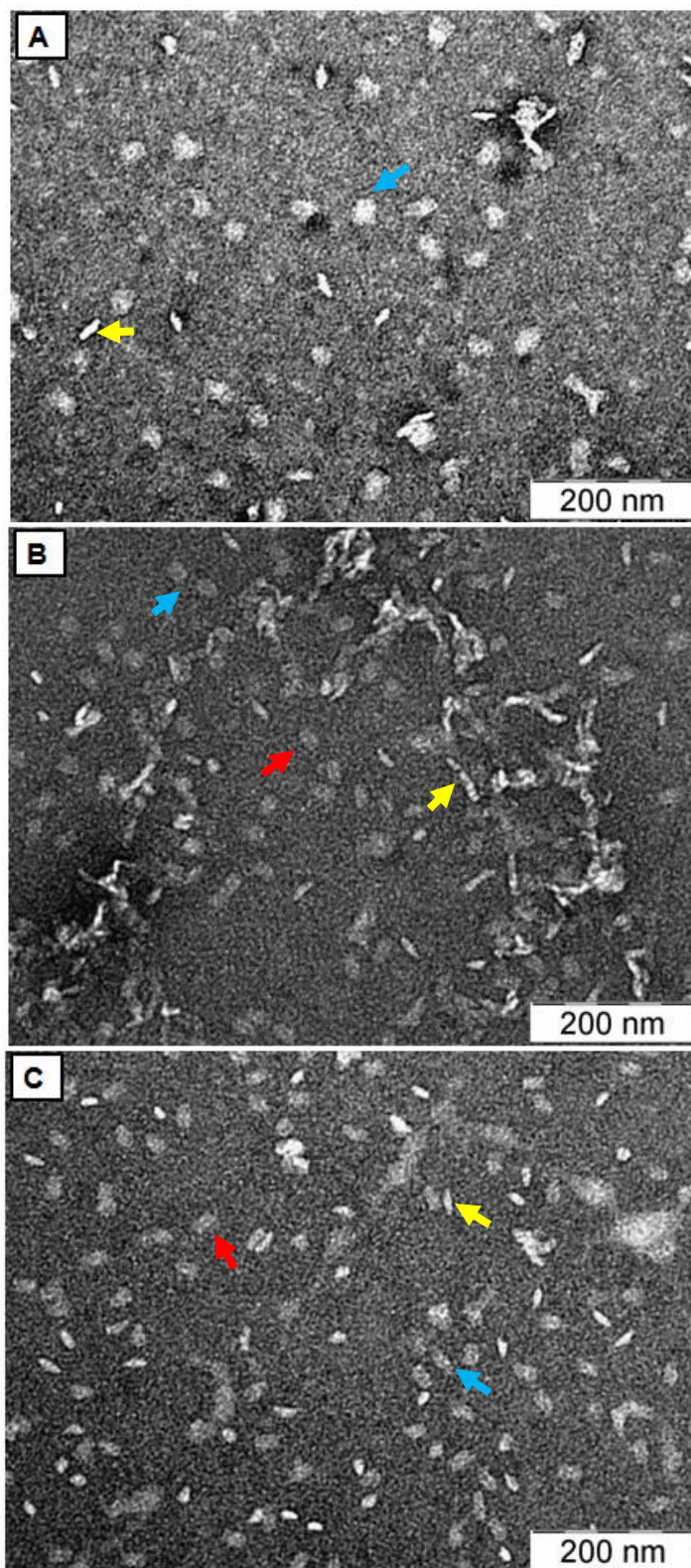
Příprava vzorku pro EM je popsána v kap. 5.11. Všechny vzorky byly pozorovány při zvětšení 40 000x a urychlovacím napětí 100 kV. Výsledky pozorování eluovaných superkomplexů PSII pod transmisním elektronovým mikroskopem jsou znázorněny

na obr. 17 a 18. Kritériem hodnocení bylo množství identifikovaných PSII superkomplexů, případně množství degradačních produktů.

U vzorku thylakoidních membrán solubilizovaných s β -DDM byla menší koncentrace eluovaných PSII superkomplexů, některé byly rozpadlé, například bez LHCII a také se zde vyskytovalo mnoho degradačních produktů (obr. 17) a artefaktů (obr. artefaktů nejsou zobrazeny). U vzorku BBY membrán solubilizovaných s α -DDM byl vysoký výtěžek PSII superkomplexů, hlavně tzv. „side view“ a menší výskyt artefaktů (obr. 18). Pro EM analýzu je důležitým faktorem koncentrace studovaného vzorku. Z tohoto důvodu se BBY membrány osvědčily lépe pro účely strukturní analýzy pomocí transmisní elektronové mikroskopie.



Obrázek 17 – Snímky A-C z EM - PSII superkomplexy izolované z thylakoidních membrán solubilizovaných s β -DDM. Barevné šipky názorně ukazují typy projekcí proteinových komplexů. Obdelníkové tvary PSII („top-view“): červené šipky, tzv. „side-view“ PSII: žluté šipky, menší objekty (pravděpodobně představují degradační produkty): modré šipky.



Obrázek 18 – Snímky A-C z EM - PSII superkomplexy izolované z BBY membrán solubilizovaných s α -DDM. Barevné šipky názorně ukazují typy projekcí proteinových komplexů. Obdelníkové tvary PSII („top-view“): červené šipky, tzv. „side-view“ PSII: žluté šipky, menší objekty (pravděpodobně představují degradační produkty): modré šipky.

Závěr

V této práci byly optimalizovány podmínky izolace a separace PSII superkomplexů z thylakoidních membrán a granálních membrán (BBY) ječmene jarního a zejména byl optimalizován krok extrakce separovaných PSII superkomplexů z polyakrylamidového gelu pro účely EM. Pro separaci pigment-proteinových komplexů byla použita CN-PAGE. U následující separační techniky byl nalezen optimální hmotnostní poměr detergentu k chlorofylům *a* a *b*, který vedl k solubilizaci a separaci PSII superkomplexů. Při použití většího množství detergentu dodecylmaltosidu došlo k lepší solubilizaci thylakoidních i BBY membrán, což vedlo nejen k objevení se proteinových pásů PSII superkomplexů, ale rovněž k rozpadu PSI superkomplexů. Významným výsledkem experimentální práce byla úspěšná separace PSII superkomplexů z BBY membrán, které se z hlediska výtěžnosti PSII komplexů osvědčily lépe pro následnou strukturní analýzu, než thylakoidní membrány.

Dále byl optimalizován proces extrakce separovaných PSII superkomplexů z polyakrylamidového gelu pro analýzu pomocí elektronové mikroskopie. Poněvadž byl kladen důraz na zachování intaktnosti separovaných superkomplexů, tak jako šetrný způsob extrakce byla zvolena samovolná eluce proteinů z gelu do pufru. Tento postup byl zvolen jako alternativa k extrakci proteinů pomocí elektroeluce, která může být příliš násilná a mohla by vést k porušení struktury proteinových komplexů/superkomplexů. Z obdržených výsledků vyplývá, že dvouhodinová eluce PSII superkomplexů byla z hlediska jejich koncentrace a intaktnosti optimální pro podmínky EM. Optimalizovaný způsob eluce PSII superkomplexů z gelu může být využit v dalších experimentech, např. při studiu vlivu teplotního stresu na strukturu PSII, případně pro účely strukturní analýzy dalších pigment-proteinových superkomplexů jako např. PSI superkomplexů.

Literatura

Albertsson P. A. (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci.* **6**, 349-354.

Amunts A., Toporik H., Borovikova A., Nelson N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem.* **285**, 3478-3486.

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

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

Croce R., van Amerongen H. (2011) Light-harvesting and structural organization of photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane. *J. Photoch. Photobio. B* **104**, 142-153.

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.

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

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.

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.

Kargul J., Olmos J. D. J., Krupnik T. (2012) Structure and function of photosystem I and its application in biomimetic solar-to-fuel systems. *J. Plant Physiol.* **169**, 1639-1653.

Knispel R. W., Kofler Ch., Boicu M., Baumeister W., Nickell S. (2012) Blotting protein complexes from native gels to electron microscopy grids. *Nat. Methods* **9**, 182-184.

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

Kügler M., Jansch L., Kruff V., Schmitz U. K., Braun H. P. (1997) Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Photosynth. Res.* **53**, 35-44.

Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**, 350-382.

Nelson N., Yocum C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 521-565.

Pagliano C., Barera S., Chimirri F., Saracco G., Barber J. (2012) Comparison of the α and β isomeric forms of the detergent n-dodecyl-D-maltoside for solubilizing photosynthetic complexes from pea thylakoid membranes. *BBA-Bioenergetics* **1817**, 1506-1515.

Reinman S., Thornber J. P. (1979) Electrophoretic isolation and partial characterization of three chlorophyll-protein complexes from blue-green-algae. *BBA-Bioenergetics* **547**, 188-197.

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 two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.

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

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., Carozzo R., Santorelli F. M., Schägger H. (2007) Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* **28**, 3811-3820.

Wittig I., Karas M., Schägger H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assay and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1215-1225.

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

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

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

Seznam použitých zkratk

2D BN/SDS-PAGE	dvourozměrná elektroforéza, která v prvním rozměru využívá modrou nativní elektroforézu a ve druhém rozměru elektroforézu s dodecylsíránem sodným
AB	vodný roztok akrylamidu a bisakrylamidu
BBY	Berthold, Babcock a Yocum, kteří poprvé popsali protokol izolace thylakoidních membrán obohacených o PSII
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
DDM/chl	hmotnostní poměr dodecylmaltosidu k chlorofylům <i>a</i> a <i>b</i>
DGDG	digalaktosyldiacylglycerol
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
KMK	kritická micelární koncentrace
MGDG	monogalaktosyldiacylglycerol
LHCI	světloběrný komplex fotosystému I
LHCII	světloběrný komplex fotosystému II
PG	fosfatidylglycerol
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
SC	superkomplexy
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
SQDG	sulfochinovosyldiacylglycerol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
Triton X-100	polyethylenglykol-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether