

3290

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra biochemie



**Nativní elektroforetické metody ve studiu thylakoidních
pigmentoproteinových komplexů kukuřice**

Michala Bubnová

Školitel: RNDr. Tomáš Kučera Ph.D

Diplomová práce

Praha 2009

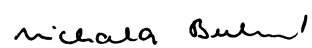
Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233145408

Prohlašuji, že jsem na své práci pracovala samostatně pod vedením svého školitele RNDr. Tomáše Kučery Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze 20. 4. 2009



Michala Bubnová

Děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Kučerovi Ph.D. za odborné vedení a rady, kterých se mi během vypracování mé práce dostávalo. Dále bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Danuši Sofrové, CSc. za cenné rady a ochotu řešit otázky vznikající během řešení mé diplomové práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům, prarodičům a bratrovi za podporu a pomoc, kterou jsem u nich nalézala po celou dobu svého studia.

Obsah

Obsah	- 1 -
Seznam použitých zkratk	- 4 -
1 Teoretický úvod	- 7 -
1.1 Fotosyntéza	- 7 -
1.2 Lokalizace fotosyntézy	- 8 -
1.3 Složení thylakoidních membrán	- 9 -
1.4 Fotosyntetická barviva, jejich vlastnosti a funkce	- 10 -
1.5 Fotosyntetický aparát	- 12 -
1.5.1 Fotosystém II	- 13 -
1.5.2 Cytochrom b₆/f	- 14 -
1.5.3 Fotosystém I	- 15 -
1.5.4 ATP-synthasa	- 17 -
1.5.5 Světlosběrné komplexy	- 18 -
1.6 Přenos elektronů přes fotosystémy	- 19 -
1.7 Sekundární fáze fotosyntézy	- 21 -
1.8 Fixace CO₂ u C₄ rostlin	- 22 -
1.9 Elektroforetické metody	- 25 -
1.9.1 Princip elektroforetických metod	- 25 -
1.9.2 Rozdělení elektroforetických metod	- 26 -
1.9.2.1 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	- 26 -
1.9.3 Intrepretace dat získaných při „červené“ nativní elektroforéze	- 28 -
1.10 Cíl práce	- 30 -
2 Materiál a metody	- 31 -
2.1 Biologický materiál	- 31 -
2.2 Použité chemikálie	- 32 -

2.3	Izolace thylakoidních membrán kukuřice	33 -
2.4	Spektroskopické metody	34 -
2.4.1	Stanovení obsahu chlorofylu v preparátech	34 -
2.5	Stanovení fotochemických aktivit	35 -
2.5.1	Stanovení fotochemických aktivit redukcí DCPIP	35 -
2.5.2	Stanovení fotochemických aktivit redukcí DCPIP v přítomnosti DPC	36 -
2.5.3	Stanovení fotochemické aktivity pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody	36 -
2.6	Elektroforetické metody	38 -
2.6.1	„Červená“ nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu [52] ..	38 -
2.6.1.1	Princip metody	38 -
2.6.1.2	Podmínky „červené“ nativní elektroforézy	38 -
2.6.1.3	Příprava vzorků pro „červenou“ nativní elektroforézu	40 -
2.6.1.4	Příprava standardů pro „červenou“ nativní elektroforézu	41 -
2.6.2	Bezbarvá nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	41 -
2.6.2.1	Princip metody	41 -
2.6.2.2	Podmínky bezbarvé nativní elektroforézy	41 -
2.6.2.3	Příprava vzorků pro bezbarvou nativní elektroforézu	42 -
2.6.2.4	Příprava standardů pro bezbarvou nativní elektroforézu	42 -
2.6.3	Reelektroforéza v přítomnosti SDS	42 -
2.6.4	Detekce bílkovin, barvení a uchování gelů	44 -
2.6.5	Stanovení relativní molekulové hmotnosti	45 -
2.7	Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy	46 -
2.7.1	Princip metody	46 -
2.7.2	Příprava vzorku na centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy -	46 -

2.7.3	Dělení pigmentoproteinových komplexů centrifugací v hustotním gradientu sacharosy	- 47 -
3	Výsledky	- 48 -
3.1	„Červená“ nativní elektroforéza	- 48 -
3.2	Bezbarvá nativní elektroforéza	- 60 -
3.3	Fotochemická aktivita	- 71 -
3.4	Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy	- 72 -
3.5	Reelektroforéza v přítomnosti SDS	- 73 -
4	Diskuse	- 75 -
5	Závěr	- 82 -
	Seznam použité literatury	- 83 -

Seznam použitých zkratek

A_0	molekula chlorofylu <i>a</i> v reakčním centru fotosystému I
A_1	molekula fylochinonu v reakčním centru fotosystému I
ADP.....	adenosindifosfát
AGE	elektroforéza na agarosovém gelu
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
b_{559}	cytochrom b_{559} tvořící součást fotosystému II
b_6/f	complex cytochromů b_6/f
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
Bis-Tris	bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan
BN-PAGE	modrá nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
BSA.....	hovězí sérový albumin
CAGE.....	elektroforéza na acetylcelulosovém gelu
CET	cyklický přenos elektronů
CF_0 - CF_1	složky chloroplastové ATP-synthasy
CN-PAGE	bezbarvá nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
D1, D2.....	proteiny fotosystému II s relativní molekulovou hmotností 32 a 34kDa
FAR.....	fotosynteticky aktivní záření
F_A , F_B , F_X	Fe-S centra v reakčním centru fotosystému II
Fd	ferredoxin
FeCy.....	ferrikyanid draselný
Hem b_L	nízkopotenciálový hem <i>b</i> cytochromu b_6/f
Hem b_H	vysokopotenciálový hem <i>b</i> cytochromu b_6/f
LET	lineární přenos elektronů

LHC I	světlosběrný komplex fotosystému I
LHC II	světlosběrný komplex fotosystému II
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OEC	komplex vyvíjející kyslík
P680	pigment reakčního centra fotosystému II s udaným absorpčním maximem
P700	pigment reakčního centra fotosystému II s udaným absorpčním maximem
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PBQ	fenyl- <i>p</i> -benzochinon
PC	plastocyanin
Pheo	feofytin
PVDF	polyvinyl difluorid
PQ	oxidovaná molekula plastochinonu
PQH ₂	rekukovaná molekula plastochinonu
PSI	fotosystém I
PSIRC	reakční centrum fotosystému I
PSII	fotosystém II
PsaA, PsaB	proteiny fotosystému I s molekulovou hmotností 83 a 82,4 kDa
Q _A , Q _B	molekuly plastochinonu poutající se k proteinům D1 a D2 PSII
Q _p , Q _n	vazebná místa (pro plastochinon) cytochromu <i>b₆f</i> na lumenální a stromální straně thylakoidní membrány
RCII	reakční centrum fotosystému II
RCI	reakční centrum fotosystému I
RuBisCO	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RN-PAGE	červená nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
SDS	dodecylsírán sodný

SDS-PAGE elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SGE elektroforéza na škrobovém gelu
S₀-S₄ redoxní stavy komplexu vyvíjejícího kyslík
TEMED N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tricine *n*-tris[hydroxymethyl]methylglycin
Tris tris(hydroxymethyl)-amonimethan
Tyr Z, Tyr D tyrosinové zbytky vázající se k fotosystému II

1 Úvod

1.1 Fotosyntéza

Veškerý život na Zemi je limitován nezbytně důležitým slunečním zářením, které vzniká vícestupňovou jadernou fúzí atomů vodíku za vzniku atomu helia. Jedná se však o formu energie, kterou jsou schopny využívat pouze fototrofní organismy. A právě tyto stojí na počátku potravního řetězce, neboť uskutečňují vstup energie do systému zvenčí. K těmto organismům řadíme především zelené rostliny, řasy (červené, hnědé a zelené), sinice a fotosyntetické bakterie. Energie kvant je využívána v procesech fotosyntézy. Díky tomuto ději fototrofní organismy zabudovávají anorganické molekuly CO_2 do organických látek, ať již stavebních či zásobních. Jedná se o energeticky velice náročný proces, neboť jde o převedení uhlíku z nejméně oxidované formy o nízké energii, tedy oxidu uhličitého, na sacharidy, sloučeniny o vysoké energii a s redukováným uhlíkem [1]. Podle prvotního donoru elektronu pro redukci CO_2 , lze fototrofní organismy rozdělit do dvou skupin:

- 1) U oxygenních fototrofních organismů, využívajících jako donoru elektronů H_2O , dochází při rozkladu vody k uvolňování molekulového kyslíku O_2 . k organismům využívajícím tento proces řadíme zelené rostliny, řasy a sinice.
- 2) V případě anoxygenních fototrofních organismů, jimiž jsou především fotosyntetické bakterie, žijící v různých anaerobních místech, v hlubších částech a na dně řady jezer, využívají jako donory elektronů jiné látky, např. H_2S nebo organické sloučeniny (sukcinát) [2].

Bez ohledu na původ redukčního ekvivalentu (H_2A) lze obecně celkovou stechiometrii fotosyntézy vystihnout následující rovnicí:



Samozřejmě se přeměny účastní kvantum zářivé energie a chlorofyl.

V těchto procesech je využíváno elektromagnetické záření absorbované fotosyntetickými barvivy jako jsou chlorofyly, karotenoidy a fykobiliny. Jedná se pouze o úzký interval záření produkovaného Sluncem. Energie těchto fotonů odpovídá vlnovým délkám 400–700 nm. Jelikož hodnota této energie kopíruje potřeby fotosyntetických reakcí, říká se mu také fotosynteticky aktivní radiace (FAR) [3].

V roce 1905 provedl Britský fyziolog F. F. Blackman sérii pokusů, na jejichž základě dospěl k závěru, že fotosyntéza má dvě prostorově oddělené, ale na sebe navazující fáze. První proces označil jako světelně a druhý jako teplotně závislý[4].

Světelná neboli primární fáze – děje spojené přímo s absorpcí a přeměnou světelné energie. Jde o transport elektronů, rozklad neboli fotolýzu vody a fotofosforylaci. Produkty primární fáze jsou ATP, NADPH a molekulový kyslík. Vše se odehrává v membráně thylakoidu a za dostatečného ozáření.

Temnostní neboli sekundární fáze – při tomto kroku jsou využívány produkty primární fáze (ATP, NADPH, redukovaný ferredoxin) a to nejen pro fixaci molekuly CO₂ do organických látek za tvorby sacharidů, ale i pro asimilaci anorganicky vázaného N a S, dále také k tvorbě mastných kyselin. Tento proces probíhá u eukaryotických organismů ve stromatu chloroplastu, u prokaryot, které nemají chloroplasty, probíhá v cytosolu. Označení tohoto kroku temnostní fází je poněkud zavádějící, neboť taktéž probíhá za světla, ale pro jednotlivé kroky již není intenzita záření limitující.

1.2 Lokalizace fotosyntézy

Centrem fotosyntézy u fotosynteticky aktivních buněk, řas a vyšších rostlin jsou chloroplasty. Jedná se o lipoproteinové útvary délky 5–10 μm a šířky 3–4 μm. Jejich množství v buňce se odvíjí od druhu buněk, ale i světelných vlastností stanoviště, většinou se však pohybuje v hodnotách od 40 do 200 [4]. Chloroplasty jsou ohraničeny dvojjednotkovou membránou. Obě membrány se od sebe liší zastoupením jednotlivých typů lipidů, integrálních a asociovaných proteinů, ale i funkčně. Vnitřní membrána vytváří složitý systém záhybů, který obklopuje viskózní hmotu nazývanou stroma. Stroma je hlavním místem sekundární fáze fotosyntézy a podobně jako u mitochondrií obsahuje DNA a ribosomy. Důležitou vlastností vnitřní membrány je vysoká selektivita pro transportované látky. Stroma obsahuje další membránový systém, tvořený jedním nebo několika měchýřky, nazývanými thylakoidy. Thylakoidy jsou ohraničeny membránou odvozenou od vnitřní obalové membrány chloroplastu a jejich vnitřní prostor se nazývá lumen. Jsou hlavním místem fotosyntézy u všech fotosynteticky aktivních buněk. V případě sinic a bakterií, které nemají chloroplasty, nesou tvar zploštělých dvojitých membrán probíhajících většinou souběžně s buněčnou stěnou. V případě vyšších rostlin je 10–20 thylakoidů stěsnáno do sloupcových útvarů nazvaných grana, těmito thylakoidům poté říkáme granální neboli stěsnané [5]. Naopak, hladké thylakoidy jsou v kontaktu se stromatem nazýváme stromální.

V chloroplastech vyšších rostlin jsou granální thylakoidy vzájemně pospojovány stromálními lamelami. Toto prostorové rozlišení je doprovázeno i rozdíly v zastoupení jednotlivých součástí fotosyntetického aparátu.

Jak jsem již výše zmínila, obsahují chloroplasty vlastní DNA a ribosomy, tato skutečnost je vysvětlena endosymbiotickým původem chloroplastů. Jedná se o takzvané primární endosymbionty, kteří vznikli asi před 2 miliardami let pohlcením jednobuněčné sinice a kterým chybí spojení s jadernou membránou a endoplasmatickým retikulem [6].

1.3 Složení thylakoidních membrán

Základní stavební jednotkou jsou jako ve všech biologických membránách lipidy (až 35–40 %) a proteiny (60–65 %). Mastné kyseliny v nich obsažené jsou ovšem silně desaturované, v některých případech obsahují až 3 dvojně vazby a to jim zajišťuje značnou tekutost (fluiditu). K těmto látkám patří sulfolipidy, jejichž podíl na tvorbě membrány je asi 5 až 7 %, a fosfatidylglycerol, tvořící thylakoidní membránu ze 7 až 10 %. Dalšími jsou galaktolipidy (monogalaktosyldiacylglyceroly a digalaktosyldiacylglyceroly), jejichž zastoupení v thylakoidní membráně je až 85 %. Sulfolipidy vznikají prokaryotickou cestou přímo v plastidech. Galaktolipidy mohou taktéž vznikat prokaryotickou cestou, nebo úpravou eukaryoticky syntetizovaných molekul pocházejících z endoplasmatického retikula. Jednou z velice důležitých a pro fotosyntézu nezbytných vlastností thylakoidní membrány je její nepropustnost pro protony.

Thylakoidní membrána je místem chemických reakcí, a z toho důvodu zde musí být přítomny struktury důležité pro její průběh. Hlavními složkami jsou fotosystémy II a I (PSII a PSI; z angl. *photosystem*), tvořené jádrem a periferními světlosběrnými komplexy (LHCII a LHCI; z angl. *light harvesting complex*). LHC i jádro obsahují fotosyntetické pigmenty (chlorofyly a karotenoidy) asociované se strukturními proteiny. Dalšími nezbytnými součástmi jsou cytochromový komplex *b₆/f*, ATP-synthasa a také mobilní molekuly jako plastochinon nebo plastocyanin.

Rozmístění všech těchto komplexů v thylakoidní membráně není homogenní. PSI a ATP-synthasa jsou umístěny v membránách thylakoidů stromálních, PSII je lokalizován především v granálních thylakoidech. Rozložení cyt *b₆/f* v obou druzích thylakoidů je přibližně stejné [7].

1.4 Fotosyntetická barviva, jejich vlastnosti a funkce

Pigmenty jsou látky nesoucí určitou barvu, což je dáno jejich schopností absorbovat záření o energii patřící do viditelné části spektra. Tato vlastnost je zapříčiněna především přítomností násobných vazeb, které jsou vzájemně v konjugaci. Rostliny díky svému pigmentovému zastoupení pohlcují záření z oblasti FAR, tedy 400–700 nm. Existují však bakterie s bakteriochlorofylem *a*, které absorbují záření o vlnové délce okolo 1000 nm. Látky podílející se na interakci se světlem jsou chlorofyly, karotenoidy a fykobiliny. U vyšších rostlin a zelených řas se vyskytují chlorofyl *a* a *b*, u hnědých a žlutých řas, rozsivek, obrněnek je to chlorofyl *a* a *c*, u sinic a ruduch je to chlorofyl *a*, *d* a fykobiliny [5, 13]. Primárním fotosyntetickým barvivem u oxygenních fototrofů je chlorofyl *a*, zbylé molekuly chlorofylu, stejně jako i karotenoidy a fykobiliny jsou takzvanými přídatnými fotosyntetickými pigmenty.

Skupinou číslo jedna v kategorii fotosyntetických pigmentů jsou bezpochyby chlorofyly. Jejich přítomnost v rostlinách je zřejmá již na první pohled. Absorbují v oblasti 400–500 nm (modré světlo) a 600–700 nm (červené světlo), jsou tedy nositeli zelené barvy, kterou propůjčují rostlinám. Jejich syntéza je většinou světelně indukovaná, což vysvětluje, skutečnost, že u rostlin rostoucích ve tmě žádné chlorofyly nenalezneme. Z chemického hlediska se jedná o porfyriny, tedy molekuly obsahující čtyři tetrapyrolly vzájemně pospojované do cyklu methinovými můstky. V centru leží koordinačně vázaný atom Mg^{2+} . Jednotlivá tetrapyrollová jádra jsou značena A až D. Výchozí látkou při biosyntéze je kyselina δ -aminolevulová (ALA), přesněji řečeno kondenzací dvou molekul ALA vznikne jedna molekula porfobilinogenu. Následnou kondenzací čtyř porfobilinogenů a řadou postupných modifikací, včetně vazby atomu Mg^{2+} , vzniká výsledná molekula chlorofylu. Hydrofilní vlastnosti chlorofylu jsou do značné míry překryty molekulou fytolu, která se váže přes atom uhlíku k jádru D. Jak jsem již výše zmínila, různé organismy obsahují různé druhy těchto zelených pigmentů. Nicméně v reakčním centru fotosystémů všech oxygenních fototrofů je takzvaný speciální pár či čtveřice, které jsou tvořeny pouze molekulami chlorofylu *a* a zodpovídají za vlastní přeměnu energie. Jednotlivé typy se od sebe liší substituenty vázanými ke kruhům B a D, což s sebou nese i posuny vrcholů v absorpčních spektrech [2].

Další podstatnou skupinou barviv vyskytujících se v některých výše uvedených fotoautotrofech jsou fykobiliproteiny, chromoproteiny s kovalentně vázanými molekulami pigmentů, fykobilinů. Z chemického hlediska jsou fykobiliny tvořeny lineárními substituova-

nými tetrapyrolovými řetězci. Jejich analogy v živočišné říši jsou biliny známé jako žlučová barviva, které také vznikají oxidačním otevřením porfyrinového kruhu [2]. Vazba s bílkovinou způsobuje nejen jejich rozpustnost ve vodě, ale má také vliv na spektroskopické vlastnosti. Mezi nejdůležitější patří allofykocyanin, fykocyanin a fykoerythrin [8]. Vyskytují se v anténních útvarech fykobilizomech, umístěných na vnější straně thylakoidní membrány u sinic, ruduch a skrytěnek.

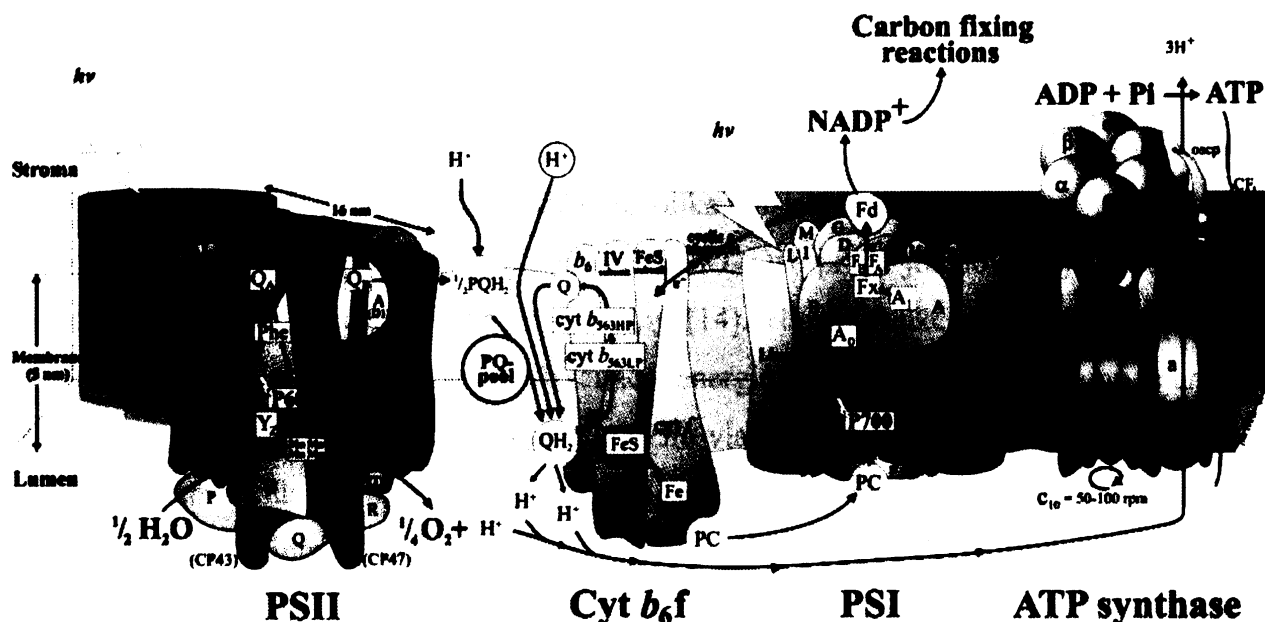
Ve fialové a modré oblasti spektra absorbuje ještě jeden druh fotosyntetických pigmentů – karotenoidy. Jedná se o terpenoidy a na základě chemické povahy je můžeme rozdělit na dvě podskupiny. První z nich jsou uhlovodíky, karoteny a druhou od karotenů odvozené kyslíkaté deriváty, xanthofyly. Jejich molekula je tvořena čtyřiceti atomy uhlíku a vzniká postupnou kondenzací osmi isoprenových jednotek, ve formě isopentenylpyrofosfátu (IPP). Ke kondenzaci dochází spojením čtyř souhlasně orientovaných molekul IPP, což znamená, že se spojuje pyrofosfátový „ocásek“ jedné molekuly s uhlíkatou „hlavičkou“ druhé. Dvě molekuly takto vzniklého geranylgeranylpyrofosfátu (diterpeny) spolu reagují „ocásky“ a vzniká tetraterpen se 40 atomy uhlíku. IPP je pětiuhlíkatá sloučenina syntetizovaná přes řadu meziproductů ze tří molekul acetyl-SCoA. Terminální konce uhlíkatých řetězců mohou vytvářet šestičlenný kruh, není to však podmínkou. Vzájemnou kombinací různě utvořených konců lze odvodit různé typy karotenů [2]. Co se zastoupení týče, je v chloroplastech vyšších rostlin z karotenů přítomen β -karoten a z xanthofylů pak lutein, violaxanthin, zeaxanthin a neoxanthin. Hlavní význam nespočívá v účasti na absorpci energie, ale především v ochraně před nadměrnou ozářeností (xantofylový cyklus).

1.5 Fotosyntetický aparát

V membráně thylakoidů jsou přítomny čtyři supramolekulární komplexy [9]:

- 1) **Fotosystém II** – komplex, který přes OEC zajišťuje rozklad vody a následné uvolňování molekulárního kyslíku. Hotovostí plastochinonu je funkčně spojen s cytochromem *b₆f*.
- 2) **Cytochrom *b₆f*** – tento komplex je mezičlánek v transportu elektronů mezi PSII a PSI.
- 3) **Fotosystém I** – zajišťuje redukci NADP^+ prostřednictvím ferredoxinu. Přebírá elektrony od plastocyaninu a postupně je přenáší na ferredoxin.
- 4) **ATP-synthasa** – za využití protonového gradientu, vytvořeného přenosem elektronů syntetizuje ATP.

Pro fotosyntézu jsou nezbytné i **světlosběrné komplexy** (LHC, z anglického *light harvesting complex*). Jedná se o pigmentoproteinové komplexy, na jejichž prostorové orientaci a uspořádání závisí účinnost přenosu energie absorbovaných kvant do reakčního centra. Na obrázku 1.1 je zobrazen fotosyntetický aparát primární fáze fotosyntézy, včetně schematického znázornění přenosu elektronů a protonů.



Obrázek 1.1 Uspořádání a struktura fotosyntetického aparátu v thylakoidní membráně. Převzato z [10].

Jak jsem již výše uvedla, rozmístění jednotlivých komplexů v membráně thylakoidů není homogenní, ale liší se v závislosti na přítomnosti gran. PSI se vyskytuje především v nestěsnaných lamelách, v těsném kontaktu se stromatem, odkud odebírá NADP^+ . Ve stejných místech jako PSI nalezneme i ATP-syntázu. Naproti tomu PSII nacházíme pouze uvnitř gran, ještě společně s cytochromem b_6/f , jehož distribuce je rovnoměrná. Toto uspořádání však není rigidní, ale dynamicky odpovídá na změny okolního prostředí [11].

1.5.1 Fotosystém II

Obecně se fotosystémy skládají z komplexu tvořícího jádro (angl. *core complex*) a ze světlosběrných systémů (LHCI a LHCII).

Jádro fotosystému II (PSII) tvoří reakční centrum (RCII) PSII, anténní komplex jádra vázající molekuly chlorofylu a (35–40 molekul), β -karoten (8–12) a strukturní proteiny. V thylakoidní membráně rostlin a sinic se PSII vyskytuje v podobě dimeru [12, 13, 14, 15]. Reakčním centrem se rozumí komplex integrálních bílkovin a kofaktorů, které se vážou k polypeptidům reakčního centra nekovalentními vazbami. Bílkovinný základ tvoří proteiny označované jako D1 (PsbA; 32 kDa) a D2 (PsbD; 34 kDa), skládající se každý z pěti transmembránových helixů. Toto uspořádání je podobné jak L a M podjednotce reakčního centra purpurových bakterií tak i C-terminální doméně proteinů PsaA a PsaB fotosystému I. Na základě této skutečnosti se předpokládá, že se fotosystémy všech organismů vyvinuly z jednoho společného předka. Reakční centrum je lemováno anténními proteiny CP47 (PsbB) a CP43 (PsbC) a obsahuje dále ještě dvě malé molekuly značené PsbE a PsbF, které vážou cytochrom b_{559} . Mimo těchto a ještě několika dalších proteinů, obsahuje PSII tři lumenální podjednotky. Jsou jimi PsbU, PsbV a PsbO. Dvě prvně jmenované jsou unikátní pro sinice, zatímco poslední pro vyšší rostliny [14]. Hlavní funkcí reakčního centra je vlastní fotochemická přeměna energie. Excitační energie získaná pohlcením fotonu je chlorofylem použita k rozdělení náboje a to díky jeho vlastnostem silného redukčního činidla (excitovaná molekula chlorofylu). Chlorofyl je tedy schopen předávat elektron akceptoru, který má nízký oxidoredukční potenciál. Vzniklá molekula chlorofylu je naopak silným oxidačním činidlem a má tak snahu elektron odebírat, v případě PSII, molekule vody za vzniku molekulového kyslíku.

Mezi prostetické skupiny, neboli kofaktory vázající se na polypeptidy D1 i D2 patří pigment reakčního centra, tedy čtyři molekuly chlorofylu a . Jsou uspořádány do dvou symetrických a navzájem spojených párů, značených P1, P2, P3 a P4. Chlorofyly nazvané P1 a

P2 jsou uspořádány paralelně s membránou [14]. Které z těchto čtyř molekul tvoří tzv. speciální pár, zůstává nezodpovězenou otázkou. Absorpční maximum speciálního páru leží v oblasti 680 nm, z toho důvodu se mu také říká P680. Dalšími kofaktory jsou dvě molekuly feofytinu (strukturně shodné s molekulou chlorofylu, ale bez atomu hořčíku v centru porfyrinového kruhu) a atom Fe^{2+} vázaný mezi D1 a D2 koordinačními vazbami na histidyly. Pouze k D1 je připoutána molekula plastochinonu Q_B , kdežto plastochinon Q_A se váže k polypeptidu D2 [3]. Výše uvedený cyt b_{559} je tvořen dvěma molekulami proteinu spojenými dvěma hemy, jeho funkce není zatím zcela objasněna. Posledními kofaktory jsou Tyr Z (tyrosin v pozici 161) a Tyr D, tyrosinové zbytky (především Tyr Z) dodávající elektron oxidovanému P680⁺.

S reakčním centrem PSII je prostřednictvím D1 také spojen komplex rozkládající vodu OEC (z angl. *oxygen evolving complex*) nebo WOC (z angl. *water oxidizing complex*). Je vázán na lumenální straně a není nezbytně nutnou součástí tohoto centra. OEC se skládá ze tří hydrofilních bílkovin o molekulových hmotnostech 33 kDa, 23 kDa a 17 kDa které výrazně napomáhají oxidaci vody [15]. Prvně jmenovaný se účastní stabilizace Mn klastru a dva následující jsou spojovány vazbou s atomy Ca^{2+} , Cl^- . Na manganový klastr se dočasně vážou elektrony, naproti tomu atomy Ca^{2+} , Cl^- , mají stabilizační funkci [3, 16]. OEC ve PSII zastává funkci donoru elektronu pro neustále se oxidující P680, k čemuž využívá rozkladu vody (Hillova reakce, fotolýza vody) za uvolňování molekuly kyslíku. K uvolnění jedné molekuly kyslíku jsou třeba dvě molekuly vody, OEC během tohoto cyklu projde pěti různými stavy, označovanými S_0 až S_4 , které se od sebe liší počtem nábojů (dolní index značí počet nashromážděných kladných nábojů). S_4 je stav plně oxidovaný, který vzniká po čtyřnásobném rozdělení nábojů v reakčním centru s následným odebráním elektronů P680⁺. Tento stav ihned přejde na počáteční S_0 (obsahující $4e^-$ a $2H^+$) za současného uvolnění molekuly O_2 a $2H^+$ do lumen. Zbylé dva H^+ se uvolňují již během rozkladu vody. Elektrony jsou transportovány pomocí tyrosinu na D1 v pozici 161 na P680⁺. Neopominutelnou funkcí tohoto systému je ochrana rostlin v přítomnosti vnějších stresových faktorů [17].

1.5.2 Cytochrom b_6/f

Cytochrom b_6/f je bílkovinný komplex umístěný v membráně thylakoidu, zajišťující funkční spojení mezi fotosystémy. Dále separuje elektrony a protony, přičemž protony přenáší z vnější na vnitřní stranu thylakoidní membrány, což se děje hned dvěma způsoby.

Prvním je oxidace plastochinolu a druhým tzv. Q-cyklus. Svým uspořádáním a funkcí se velice podobá bakteriálnímu cytochromu *bc₁*, stejně tak komplexu III v mitochondriálním transportním řetězci.

Skládá se z několika základních podjednotek, z nichž každá splňuje v komplexu určitou odlišnou funkci. Jak již název napovídá, součástí tohoto komplexu jsou molekuly cytochromů. První podjednotkou cytochromu *b₆/f* je cytochrom *b* se dvěma odlišnými hemy, které se dělí podle hodnoty jejich oxidoredukčního potenciálu na *b_p* a *b_n*. Hem *b_p* je uložen blíže pozitivnímu povrchu membrány a z důvodu hodnoty potenciálu v rozmezí -100–0 mV se také nazývá nízkopotenciálový a může se značit jako *b_L* (z angl. *low-potential heme*). Naproti tomu *b_n* je umístěn blíže negativnímu povrchu membrány, hodnota potenciálu se u něho pohybuje kolem +50 mV, díky čemuž se můžeme setkat s označením *b_H* (z angl. *high-potential heme*) [2]. V blízkosti každého hemu je vazebná „kapsa“ pro membránový chinon a taktéž se tyto útvary značí podle polohy blíže k negativnímu či pozitivnímu povrchu na *Q_n* a *Q_p*. Další podjednotkou komplexu je cytochrom *f* (cytochrom typu *c*) a Rieskeho protein (nazván podle svého objevitele Johna Rieskeho). Výjimečným ho činí [2Fe-2S] klastr, který je přes jeden z atomů železa vázán se dvěma histidinovými zbytky proteinu. Vazba druhého železa s methioninem je stejná jako v ostatních klastrech tohoto typu.

1.5.3 Fotosystém I

Fotosystém I (PSI) je další gigantický membránový komplex, u vyšších rostlin tvořený 19 proteinovými podjednotkami a 180 nekovalentně vázanými kofaktory (175 chlorofylů, 3 4Fe-4S klastry, 2 fylochinony) [18]. Tento systém nalezneme v thylakoidní membráně sinic v podobě trimeru. V případě vyšších rostlin je monomerní [14, 18].

Na 15 proteinů jádra je vázáno 6 dalších tvořících světlosběrné komplexy. Označení jednotlivých podjednotek se v různé literatuře liší, ale nejběžnější je značení podle genů kódujících tyto proteiny. Tedy *PsaA–PsaP* pro proteiny jádra a *Lhca1–Lhca6* pro anténní podjednotky. Mimo *PsaA*, *PsaB*, *PsaC*, *PsaI* a *PsaJ*, jejichž geny jsou umístěny v chloroplastech, kóduje všechny ostatní podjednotky jaderná DNA [18]. Pouze tři z výše jmenovaných devatenácti podjednotek jsou uzpůsobeny pro vazbu elektron transportních kofaktorů. Jsou jimi *PsaA*, *PsaB* a *PsaC*. *PsaA* s *PsaB* jsou vzájemně propojeny přes *F_X* (Fe-S klastr) a to tak, že každý z nich dodává do vazby dva cysteinové zbytky. Oblast tvořící spojovací smyčku obou proteinů je nejvíce konzervovanou oblastí celého fotosystému

[14]. V porovnání s bílkovinami D1 a D2 PSII jsou PsaA a PsaB dvakrát větší a některé jejich úseky se s těmito (CP43 a CP47) shodují, předpokládá se, že v evoluci vznikly všechny fotosystémy ze společného základu [3]. Hydrofilní podjednotka PsaC, vázající se k heterodimeru PsaA/PsaB na stromální straně membrány, obsahuje dvě Fe-S centra značená F_A a F_B . Jejich hlavním úkolem je přenos elektronů na ferredoxin. PsaF a PsaN jsou nezbytné pro interakci s lumenálním elektronovým donorem plastocyaninem. Plastocyanin (11 kDa) je transportní protein obsahující dva atomy mědi, vázající se v oxidovaném stavu na cytochromový komplex a na PSI ve stavu redukovaném. Je analogem cytochromu *c* přenášejícího elektron z komplexu III na komplex IV v mitochondriálním elektrontransportním řetězci. Dále pak PsaD a PsaE poskytují vazebné místo pro ferredoxin a PsaF je nezbytný při vazbě dimeru Lhca1/Lhca4. Stabilizaci anténního systému zajišťují další malé membránové proteiny (PsaF, PsaI–PsaL). Ostatní molekuly zajišťují především vazbu anténních komplexů a nebo stabilizují, ať již celý komplex, nebo jen vazbu či polohu jednotlivých podjednotek.

Nejdůležitějším a v tomto textu doposud nezmíněným kofaktorem je speciální pár PSI. Kofaktory elektrontransportního řetězce PSI můžeme rozdělit na dvě větve, označované jako větve A a větve B. Speciální pár PSI má absorpční maximum v oblasti 700 nm a proto se také nazývá P700. Nachází se v těsné blízkosti lumenálního povrchu PSI. Skládá se ze dvou stereochemicky odlišných molekul chlorofylu *a*, tato jejich odlišnost je navíc umocňována proteinovým prostředím. Stejně jako P680 u PSII i zde P700 působí jako primární donor elektronu; který přijímá od plastocyaninu. Odtud je elektron převeden přes molekulu chlorofylu značenou A na první stabilní elektronový akceptor, a tím je chlorofyl *a*, značený A_0 . Mezi tímto chlorofylem a klastrem F_X je ještě další elektronový akceptor a to fylochinon značený A_1 [14, 18]. A_1 i A_0 jsou přenašeče obdobné feofytinu reakčního centra PSII.

Ke stromální straně PSI je funkčně přidružena malá molekula obsahující 2Fe-2S klastr, je jí molekula ferredoxinu. Ferredoxin byl poprvé objeven v anaerobní bakterii *Clostridium pasterianum*, kde se účastní fixace dusíku. To znamená, že není pouze fotosyntetickou specialitou, ale má několik isoform vyskytujících se nejen v zelených rostlinách, řasách, sinicích, ale i například v nefotosyntetických částech rostlin jako jsou plody či kořeny. Fotosyntetický ferredoxin je v rostlinách zodpovědný za přenos elektronů z redukovaného PSI pomocí ferredoxin:NADP-oxidoreduktasy za vzniku NADPH. Tento je následně spotřebován v sekundární fázi fotosyntézy pro asimilaci CO_2 . Nefotosyntetické isoformy jsou zodpovědné za přeměnu NO_2^- na NH_4^+ , SO_4^{2-} na S^{2-} a tvorbu glutamové kyseliny z glutamátu

či 2-oxo-glutarátu [19]. Redukovaný ferredoxin má charakteristickou červeno-hnědou barvu (dáno přítomností 2Fe-2S klastru) a typické absorpční spektrum. Oxidací se ztrácí jak barva, tak i charakteristické spektrum. Klástr je umístěn na vrcholu molekuly a s proteinem je spojen přes čtyři konzervované cysteinové zbytky.

1.5.4 ATP-synthasa

Během světelné fáze fotosyntézy dochází současně s transportem elektronů také k přesunům protonů H^+ ze stromální na lumenální stranu membrány. Neděje se tak pouhým procházením přes membránu, neboť thylakoidní membrána, stejně tak jako mitochondriální, je nepropustná pro H^+ , ale pomocí přenašečů (plastochinonu) a dále rozkladem vody na OEC. Plastochinon odebírá protony ze stromální (pH 7,5 na světle) strany membrány a přenáší je do lumen (pH 4 na světle), což je spojeno se změnou pH a náboje na membráně [20]. Změna koncentrace H^+ je příčinou vzniku tzv. protonmotorické síly (PMF z angl. *proton motive force*), což je snaha o vyrovnání koncentrací iontů na obou stranách membrány.

$$PMF = \Delta\mu_{H^+} = \Delta pH + \Delta\psi \quad [J \cdot V^{-1} \cdot mol^{-1}]$$

Právě PMF je hlavním pohonem tvorby ATP z ADP a anorganického fosfátu (P_i z angl. *phosphate inorganic*). Tento buněčný proces, nazývaný fotofosforylace je katalyzován velkým transmembránovým proteinovým komplexem o relativní molekulové hmotnosti 400 kDa, ATP-synthasou. ATP-synthasu můžeme také nalézt pod názvem CF_1 - CF_0 [20], kde C značí chloroplast a F značí jednotlivé části, které jsou analogické s částmi mitochondriální ATP-synthasy (MF_1 - MF_0) a i částmi bakteriální ATP-synthasy (EF_1 - EF_0), kde písmeno E v názvu pochází od názvu bakterie *Escherichia coli*.

Jak jsem již uvedla, tento enzym se skládá ze dvou základních částí, tedy F_1 a F_0 . F_0 je integrální bílkovinný komplex, který slouží jako transportní kanál pro protony a zprostředkuje konformační změny v části F_1 . Skládá se z několika různých podjednotek, jejichž počet a druh se liší podle zdroje. Nejblíže chloroplastové ATP-synthase je mitochondriální, která se skládá ze čtyř základních podjednotek značených *a*, *b*, *c* a *d* (konkrétně $a_1b_2c_{9-12}d_3$) [21]. Dále obsahuje ještě několik minoritních podjednotek, jejichž úloha není zcela objasněna. Část *c* zajišťuje útvar pro průchod protonů přes membránu. Na rozdíl od ní jsou ostatní podjednotky zodpovědné především za komunikaci a správné umístění části F_1 . F_1 je hydrofilní útvar vyčnívající z membrány do prostoru stromatu a jeho části se značí α , β , γ , δ , ϵ (konkrétně $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$). α a β si jsou velice podobné, co do primární struktury i sbalení a tvoří majoritní část F_1 . β podjednotka obsahuje vlastní katalytické místo pro syntézu ATP.

Tento proces je urychlován díky podjednotce α . Zbylé tři podjednotky se vyskytují pouze jednou, jejich funkce je především strukturní a regulační. γ se účastní přenosu protonů a aktivace syntézy ATP na světle. δ spojuje dvě hlavní části, tedy CF_1 s CF_0 a ϵ blokuje hydrolýzu ATP při nedostatečné ozáření.

Část CF_1 představuje vlastní katalytický úsek enzymu, obsahuje tři vazebná místa pro nukleotid a zaujímá tři možné konformační stavy. Prvním z nich je O (z angl. *open*), v tomto kroku dochází k uvolnění ATP a vazbě ADP s P_i . Dalším krokem je L (z angl. *loose*), představuje volnou vazbu mezi ADP a P_i , v posledním konformačním stavu T (z angl. *tight*) se nukleotid pevně váže a vzniká ATP, jeho uvolněním cyklus přechází do stavu O. Tyto kroky jsou doprovázeny konformačními změnami a otáčením podjednotky CF_1 .

1.5.5 Světlosběrné komplexy

Membrána thylakoidů je velice rozmanitý útvar obsahující jednak pigmentoproteinové komplexy účastnící se vlastní fotosyntetické reakce, jednak množství tzv. světlosběrných pigmentoproteinových komplexů neboli antén. Jedná se o útvary zachycující záření, čímž dochází k jejich excitaci a postupnému přenosu excitace na další molekuly směrem k jádru fotosystému. Takto se může excitace přenést až na speciální pár chlorofylu jádra fotosystému a být využita pro fotosyntetickou reakci. Přenos energie z anténních komplexů do reakčního centra trvá méně než 10^{-10} s a jeho účinnost je více než 90%. Přenos závisí na relativní vzdálenosti mezi molekulami a také na jejich vzájemné orientaci. Jednosměrnost přenosu je dána uspořádáním pigmentů tak, že směrem k reakčnímu centru klesá množství energie potřebné k excitaci daných pigmentů. Z toho důvodu převažují ve světlosběrných komplexech umístěných blíže periferii chlorofyly *b* (maximum při nižších vlnových délkách) a speciální pár v reakčním centru je tvořen molekulami chlorofylu *a* [5, 22].

Vnitřní antény – bílkoviny vnitřních antén mají hydrofobní charakter a jsou součástí jádra fotosystému, podobně jako reakční centra jsou tyto antény pro všechny organismy s oxygenní fotosyntézou shodné. U PSII jsou tvořeny dvěma komplexy o molekulových hmotnostech 47 a 43 kDa. Naproti tomu vnitřní anténní systém PSI je tvořen molekulami chlorofylu, vázanými na bílkovinný dimer reakčního centra.

Vnější antény – k reakčnímu centru jsou obvykle vázány přes vnitřní antény, jejich počet je proměnlivý a odvíjí se od světelných podmínek. Některé z nich jsou i pohyblivé mezi PSI a PSII.

- a) Vněmembránové antény – jedná se o anténní komplexy přichycené na stromálním povrchu thylakoidních membrán. Nejznámějším typem jsou fykobilisomy vyskytující se u sinic a ruduch. Skládají se z fykobiliproteinových komplexů a u sinic je v nich uloženo až 50 % všech bílkovin [8]. Uspořádání pigmentů s různými optickými vlastnostmi vede k co nejefektivnějšímu přenosu do jádra PS. Skryténky mají také anténní komplexy obsahující fykobiliproteinové komplexy, ale jsou obsaženy v dutině thylakoidu [2, 23].
- b) Vnitromembránové antény – od vněmembránových se liší tím, že proteiny těchto komplexů jsou zanořeny v membráně thylakoidu. Vyskytují se u všech vyšších rostlin, purpurových bakterií a řas, kromě těch, které mají vněmembránové anténní komplexy.

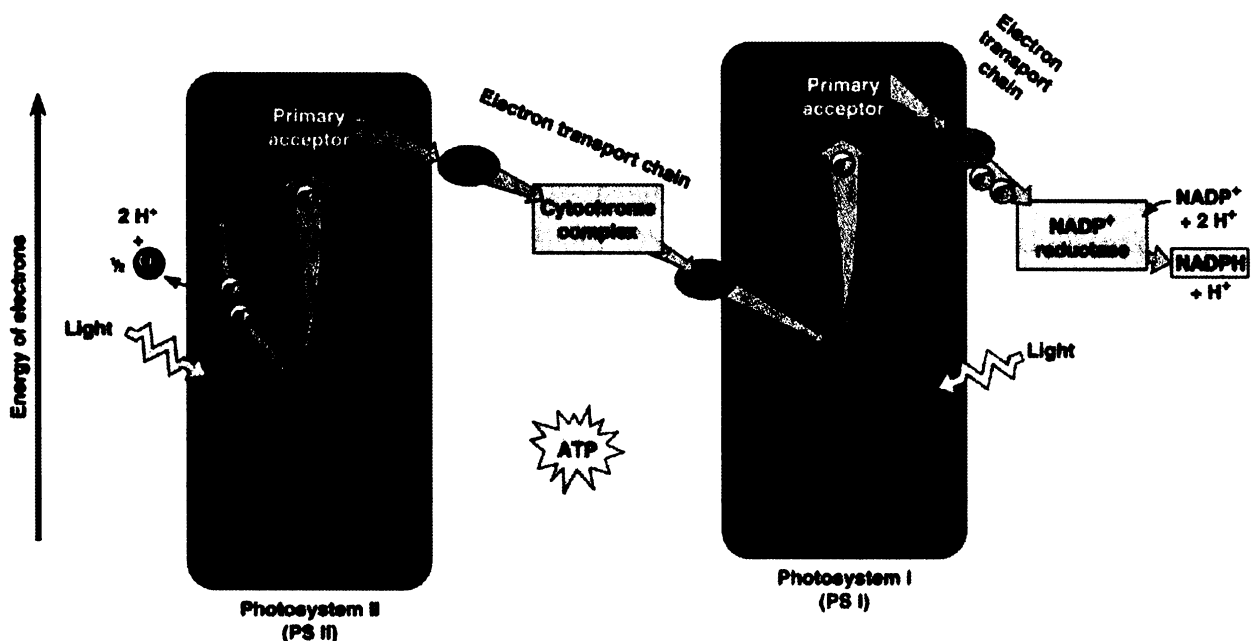
1.6 Přenos elektronů přes fotosystémy

V thylakoidní membráně dochází tedy k přenosu elektronů z molekuly vody na ferredoxin a dále na NADP^+ . K uvolnění jedné molekuly O_2 z PSII a tvorbě čtyř redukčních ekvivalentů potřebných k fixaci jedné molekuly CO_2 v Benson-Calvinově cyklu je třeba zachycení a účinného převedení 8 fotonů. Hlavní transportní dráhou elektronů je LET (z angl. *linear electron transfer*), vedoucí z PSII přes cytochrom b_6/f do PSI a dále na ferredoxin, při tomto procesu dojde k přenosu dvou H^+ do lumen thylakoidu (počítáno na přenos jednoho elektronu). Jiné alternativní způsoby přenosu elektronů jsou používány z důvodu regulace fotosyntetického procesu. Jedním z nich je i CET (z angl. *cyclic electron transfer*), vedoucí z PSI zpět na cytochrom b_6/f [17]. Na obrázku 1.2 jsou tyto procesy znázorněny v podobě tzv. Z-schématu.

LET začíná přenosem excitační energie ze světlosběných komplexů na speciální molekuly chlorofylu P680, který se dostává do excitovaného stavu P680^* a následně předává elektron primárnímu akceptoru PSII, feofytinu a (molekula chlorofylu a , kde je centrální hořčík nahrazen dvěma protony). Vzniklý P680^+ je jedním z nejsilnějších biologických oxidačních činidel, což mu umožňuje odebrat elektron molekule vody a vrátit se tak do původního stavu. Feofytin předá náboj plastochinonu Q_A , dále elektron přejde na Q_B , a ten v okamžiku, kdy se na něho přenesou dva elektrony, přijme dva protony ze stromatu, a tak vznikne PQH_2 neboli plastochinol. Redukovaná molekula plastochinonu PQH_2 se po transportu k cytochromu b_6/f naváže na vazebné místo lumenální strany membrány Q_p . Jeden elektron přechází na Rieskeho protein, cytochrom f a na mobilní přenašeč plastocyanin.

Druhý elektron prochází Q-cyklem, přičemž oba přenášené protony přejdou na lumenální stranu thylakoidu. Q-cyklus začíná putováním druhého elektronu přes cytochrom b_L a cytochrom b_H na molekulu PQ, navázanou na vazebném místě Q_n , čímž vzniká molekula semichinonu $Q\dot{-}$. Stejným způsobem se přenesou další dva elektrony, tím vznikne na vazebném místě Q_n molekula PQ^{2-} , která přijme dva protony ze stromatu, vznikne PQH_2 a ten se transportuje na vazebné místo Q_p . Zde předá oba elektrony, protony přejdou do lumen, čímž se cyklus uzavírá. Tato cesta přenosu slouží ke zvýšení počtu H^+ hromaděných v lumen, zvyšuje tak protonmotorickou sílu [2, 17]. Plastocyanin je mobilní přenašeč přenášející elektrony z cytochromového komplexu na PSI. V reakčním centru PSI jsou další speciální molekuly chlorofylu, tentokrát P700, které se po své excitaci zbavují elektronu za vzniku $P700^+$. Následuje přenos přes A_0 , A_1 , F_X , F_A , F_B až na konečný akceptor ferredoxin. Tento je schopen přeměnit $NADP^+$ na $NADPH$, ovšem za katalýzy ferredoxin: $NADP^+$ -reduktasou.

Rozdíl mezi CET a LET spočívá pouze v mobilitě molekuly ferredoxinu a její schopnosti předat elektron na vazebné místo Q_n cytochromu b_6/f . Osud tohoto elektronu je dále stejný jako při průchodu Q-cyklem.



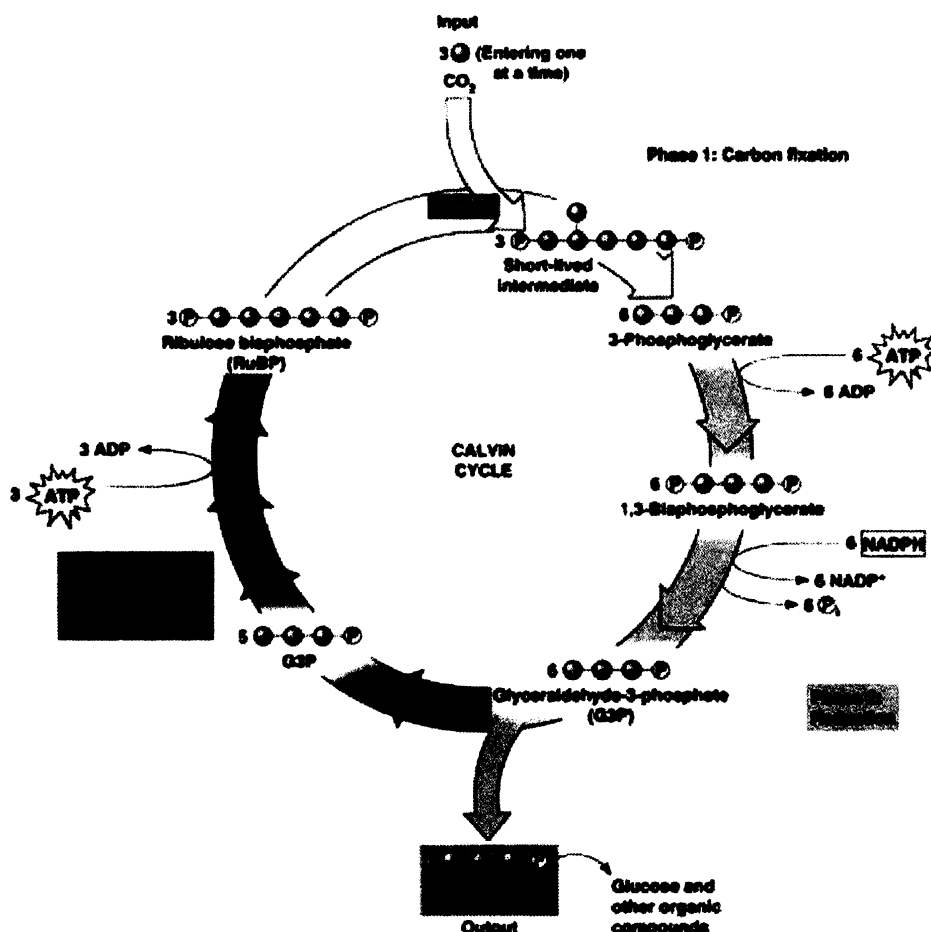
Obrázek 1.2 Z-schéma souhrnně znázorňující přenos elektronů přes thylakoidní membránu [24].

1.7 Sekundární fáze fotosyntézy

Sekundární neboli temnostní fáze je v užším slova smyslu syntéza sacharidů z CO_2 za pomoci produktů primární fáze fotosyntézy, tedy ATP a NADPH. Jak jsem již výše uvedla, označení temnostní vychází pouze ze skutečnosti, že světlo již není limitující pro tyto reakce. To znamená, že syntéza sacharidů probíhá jak za světla, tak za tmy, ale pouze do okamžiku, než dojde k vyčerpání produktů primární fáze. Obecně se jedná o velice komplexní proces, na kterém participuje velké množství enzymů. Centrem jejich působení je v případě eukaryotických buněk rostlin stroma chloroplastů, u fotosyntetických prokaryot je jím cytosol. Sled těchto dějů se nazývá podle svého objevitele Melvina Calvina a jeho spolupracovníků Calvinův cyklus. Můžeme se setkat i s označením redukční pentosofosfátový cyklus. Calvinův výzkum byl založen na sledování výskytu radioaktivně značeného ^{14}C , pocházejícího z $^{14}\text{CO}_2$ [4, 21].

Ústřední reakcí cyklu je karboxylace molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu za katalýzy enzymem známým pod označením RuBisCO. Jeho celý název je ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa. Co se týče zastoupení, udává se, že tento enzym v plně vyvinutých fotosynteticky aktivních listech rostlin zaujímá mezi 40–50 % celkového obsahu rozpustných proteinů [5]. Stává se tak nejrozšířenější bílkovinou celé biosféry a reakce jím katalyzovaná je z hlediska toku energie v přírodě nejvýznamnější ze všech biosyntetických reakcí. Jedná se o velký oligomerní protein skládající se z 8 velkých katalytických, v plastomu kódovaných podjednotek a 8 malých regulačních, jejichž geny se vyskytují v jádře buněk. Produktem této a tří na ní navazujících reakcí je glyceraldehyd-3-fosfát, který je v rovnováze s dihydroxyacetonfosfátem. Oba vstupují do složitého cyklu transketolových a transaldolových reakcí, jejichž úkolem je regenerace pentosového akceptoru. Schematické znázornění celého procesu je na obrázku 1.3.

Vzhledem k tomu, že prvním stabilním produktem je tříuhlíkatý glyceraldehyd-3-fosfát, říká se tomuto způsobu fixace CO_2 také C_3 cesta. Rostliny, které ji využívají, nazýváme obdobně C_3 rostlinami.

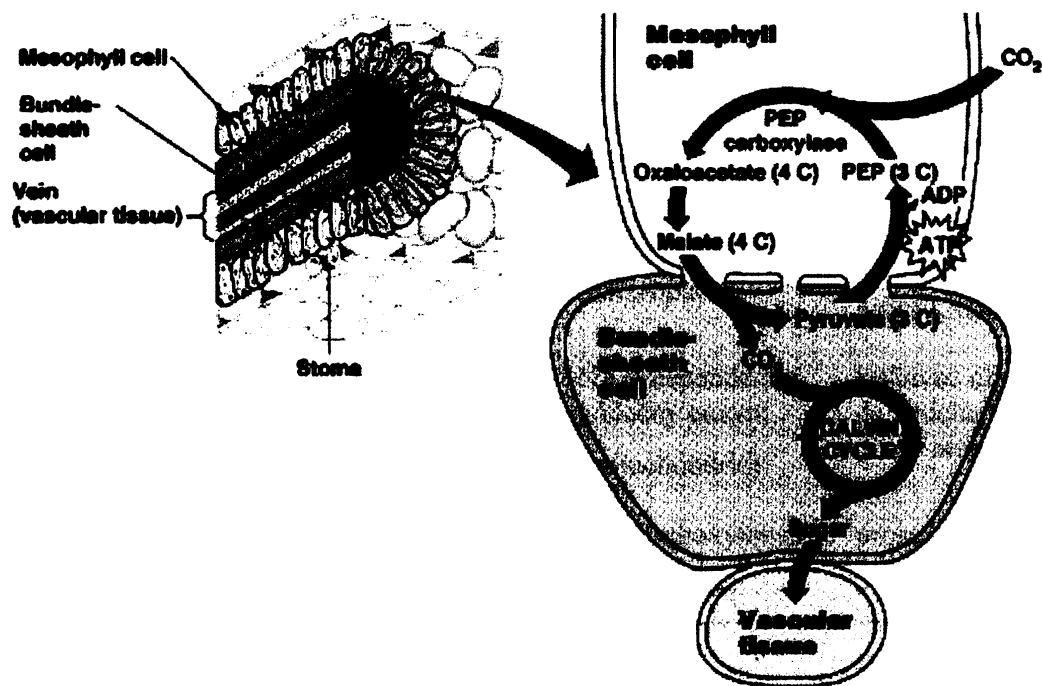


Obrázek 1.3 Calvinův cyklus. Barevné odlišnosti šipek znázorňují 3 fáze cyklu, fixaci uhlíku, redukci 3-fosfoglycerátu a regeneraci substrátu. Převzato z [25].

1.8 Fixace CO₂ u C₄ rostlin

Žádný z procesů probíhajících v živých organismech nepracuje se 100% účinností za všech podmínek. Nejinak je tomu i u fotosyntézy. Během evoluce docházelo na Zemi k výrazným klimatickým změnám, což vedlo k adaptaci organismů na nově vzniklé podmínky. A právě C₄ metabolismus u rostlin je jedním ze způsobů přizpůsobení vysoké ozářenosti a nedostatku vody. Při těchto stavech rostliny omezují otevírání průduchů, brání se tak nadbytečným ztrátám vody stromální transpirací. Na druhou stranu si tak odepírají dostatečný přísun CO₂, který je nezbytný pro karboxylasovou funkci RuBisCO a s ní spojené ukládání energie do molekul sacharidů. Při nízkých koncentracích CO₂ v okolí tohoto enzymu převažuje jeho oxygenasová aktivita, která vede ke snížení účinnosti fotosyntézy. Listy rostlin s tímto druhem metabolismu obsahují dva anatomicky odlišné druhy buněk, jedná se o tzv. Kranz anatomii [2, 5]. Buňky těsně obklopující cévní svazek se nazývají věnčité. Jejich chloroplasty velice intenzivně provozují reakce Calvinova cyklu a produkují metabolity, které jsou odváděny cévními svazky do nefotosyntetických částí rostlin. Tato

pochva z věnčitých buněk je obstoupena buňkami mesofylovými, které již nemají tak vysokou aktivitu enzymů Calvinova cyklu, ale zato jsou schopny s vysokou účinností karboxylovat fosfoenolpyruvát na oxalacetát. Čtyřuhlíkatý produkt fixace CO_2 v mezofylových buňkách (malát) je přenesen do buněk věnčitých, zde je dekarboxylován a vzniklý CO_2 vstupuje do Calvinova cyklu. Z obrázku 1.4 je patrné, že vzniklý pyruvát se transportuje zpět do buněk mesofylových.



Obrázek 1.4 Schematické znázornění procesů sekundární fáze fotosyntézy u C_4 rostlin. Převzato z [26].

Rozdíly mezi věnčitými a mesofylovými buňkami nalezneme i v uspořádání thylakoidů a aktivitě jednotlivých komplexů primární fáze fotosyntézy. Chloroplasty mesofylových buněk jsou velice podobné těm, které se vyskytují u C_3 rostlin, na rozdíl od chloroplastů věnčitých buněk, které postrádají granální uspořádání [27]. Na základě nedávné studie bylo však zjištěno, že pro některé terestrické rostliny tato funkční diferenciacce není esenciální [28]. Podobně jako v případě C_3 rostlin, označení C_4 vychází z počtu uhlíků v molekule prvního stabilního produktu. Na obrázku 1.4 je znázorněna primární fixace CO_2 , konkrétně HCO_3^- , za vzniku čtyřuhlíkatého oxalacetátu (první stabilní produkt) a jeho další osud v buňkách. Sekundární fixace probíhá stejným způsobem jako u C_3 rostlin.

Výhoda oproti C_3 metabolismu spočívá ve vysoké afinitě enzymu fosfoenolpyruvátkarboxylasy k HCO_3^- , což má za následek tvorbu oxalacetátu a následnou vysokou koncentraci CO_2 v okolí RuBisCO i při omezené transpiraci průduchy. Tato reakce je společná pro

všechny C4 rostliny. Na základě dalšího osudu oxalacetátu rozdělujeme C4 rostliny do tří skupin. V tabulce 1.1 jsou uvedeny názvy, přenášené sloučeniny, enzymy nezbytné pro dekarboxylaci a nakonec i zástupci jednotlivých kategorií.

Tabulka 1.1 Charakteristika jednotlivých typů C4 mechanismu koncentrace CO₂. Označení MB→VB znamená přenos z mesofylových buněk do věnčitých, v případě VB→MB opačný směr [2, 27].

<i>Označení typu</i>	<i>Přenášená sloučenina</i>		<i>Dekarboxylace enzym (místo)</i>	<i>Význační představitelé</i>
	MB→V B	VB→MB		
NADP-ME	malát	pyruvát	NADP dependentní jablečný enzym (chloroplast)	kukuřice, cukrová třtina, čirok dvojbarvý, rosička krvavá, proso hlíznaté
NAD-ME	aspartát	alanin	NAD dependentní jablečný enzym (mitochondrie)	laskavec ohnutý, lebeda, šrucha zelená, proso seté
PEP-CK	aspartát	alanin (PEP)	PEP karboxykinasa (cytoplasma)	proso největší, chloris

1.9 Elektroforetické metody

1.9.1 Princip elektroforetických metod

Název metody elektroforéza vznikl spojením dvou řeckých slov $\epsilon\lambda\epsilon\kappa\tau\rho\sigma$ (náboj) a $\phi\omega\rho\epsilon\sigma$ (pohyb), volně v překladu znamená transport pomocí elektřiny. Jedná se o metodu zabývající se separací především proteinů a proteinových komplexů v elektrickém poli na základě jejich rozdílného elektrického náboje, odlišné velikosti a tvaru.

Obecně lze pohyb částic v elektrickém poli popsat několika základními vztahy:

$$F_E = f(Q, E)$$

Tento vztah říká, že síla, kterou je v elektrickém poli částice urychlována (F_E) je funkcí náboje částice Q a intenzitou elektrického pole E (potenciálový spád). Sám pohyb samozřejmě závisí na znaménku elektrického náboje pohybující se částice. Výše uvedený vztah platí v prostředí, kde pohybující se částici není kladen žádný odpor, tedy v prostředí s nulovou viskozitou. Po vzájemném vyrovnání těchto dvou protisměrně působících sil, tedy odporu prostředí a tažné síly, způsobené nábojem na molekule, je pohyb ustálený. Jeho rychlost v je přímo úměrná náboji částice a intenzitě elektrického pole, ale nepřímo úměrná poloměru částice r a viskozitě prostředí η .

$$v = f(Q, E, 1/\eta, 1/r) [29]$$

V případě, že parametry související s typem částice a charakterem prostředí zahrneme do takzvané elektroforetické pohyblivosti, získáme následující vztah:

$$v = mE$$

$$v/E = m = Q/f$$

Veličina f ve výše uvedeném vztahu vyjadřuje frikční koeficient.

Chování proteinů v elektrickém poli je dáno přednostně jejich primární strukturou, tedy samotným aminokyselinovým složením. Aminokyseliny se od sebe liší především svým postranním řetězcem, který buď nese či nenese elektrický náboj. V lysinu, argininu a histidinu je náboj postranního řetězce kladný, v případě kyseliny asparagové a glutamové je záporný [30], ale to pouze při určitém pH. Pokud se dostane pH na hodnotu izoelektrického bodu (pI), dojde k vyrušení nábojů a proteiny se nemohou v elektrickém poli pohybovat. Na mobilitě bílkovin se významně podílí i jejich sekundární, terciární či kvartérní struktura. Jedná se o vyšší uspořádání, které zajišťuje proteinům prostorový tvar včetně sdružování

do homomerů neboli komplexů tvořených několika molekulami stejné bílkoviny, spojenými různými nekovalentními silami.

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že i naprosto totožné molekuly proteinů se mohou působením elektrického pole pohybovat různou rychlostí v závislosti na vnějších podmínkách, popřípadě schopnosti daných molekul vytvářet multimerní útvary.

1.9.2 Rozdělení elektroforetických metod

Elektroforetické metody lze dělit z několika rozdílných hledisek. Jedním z nejdůležitějších kritérií je druh použitého nosného média, na základě toho lze rozlišit elektroforézu na polyakrylamidovém (PAGE), agarosovém (AGE), acetylcelulosovém (CAGE) a škrobovém gelu (SGE). Jedním z možných způsobů dělení je i podle orientace nosného média, a to na horizontální, vertikální nebo kapilární uspořádání. Z hlediska použitého tenzidu a potažmo i stavu, ve kterém se dělené bílkoviny nacházejí, jsou důležité nativní a denaturující elektroforézy. Tenzidy používané pro solubilizaci obecně dělíme na ionizující (kationtové, aniontové a amfoterní) a neionizující [31].

1.9.2.1 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidový gel je obvykle deskovitý útvar různých rozměrů, závislých na použité aparatuře. Vzniká katalytickou polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS). Dlouhá vlákna polyakrylamidu jsou příčně spojována vlákny BIS. Koncentrace akrylamidu a vzájemný poměr s BIS určují velikost výsledných pórů. V případě používaného zásobního roztoku lze jeho koncentraci vyjádřit jako 49,5 % T a 3 % C (48g akrylamidu, 1,5g bisakrylamidu ve 100ml vody) [32]. Přičemž T vyjadřuje celkovou koncentraci obou monomerů v roztoku, která je dána vztahem:

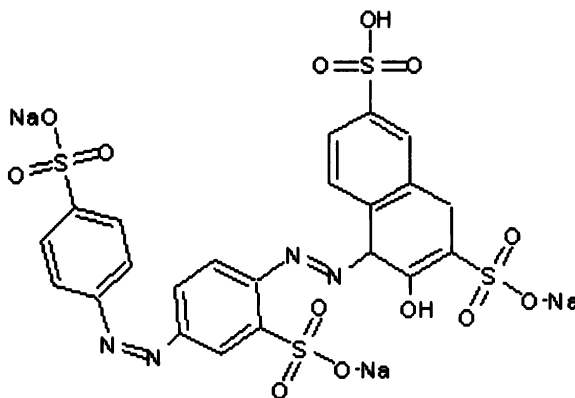
$$\% T = 100(a+b)/V$$

$$\% C = 100Bis (g)/[Acrylamide (g) + Bis (g)] [33]$$

Hodnota C udává procento zesíťení vzhledem k množství monomeru. Toto označení pochází od Hjertena z roku 1962 [54]. Polymerizační reakce je zahájena rozkladem peroxodisíranu amonného ((NH₄)₂S₂O₈), při tomto procesu dochází k vzniku volných radikálů, které jsou iniciátory reakce. TEMED působí jako katalyzátor polymerace a navíc způsobuje stabilizaci vzniklých radikálů. Existuje i řada inhibitorů polymerace, jakými je například kyslík a nebo sloučeniny síry [34].

1. SDS-PAGE (z angl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) je nejvíce používaný druh elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti tenzidu. SDS neboli dodecylsírany sodný je aniontový tenzid s dvanáctiuhlíkatým alifatickým řetězcem, způsobující denaturaci bílkovinných molekul tím, že se naváže na jejich hydrofobní části. SDS se na všechny proteiny váže víceméně ve stejném poměru a to 1,4g SDS na 1g bílkoviny, což odpovídá zhruba 1 molekule SDS na dva aminokyselinové zbytky [33, 34, 35]. SDS v kombinaci s dithiothreitem nebo β-merkptoethanolem naruší nejen kvartérní a terciární strukturu (přerušení disulfidických můstků), ale do značné míry i strukturu sekundární. Molekuly se rozvinou, získají válcovitý tvar a SDS svým negativním nábojem zcela překryje jejich přirozený náboj. Tím docílíme toho, že se molekula účinkem elektrického pole pohybuje pouze na základě molekulové hmotnosti.
2. Nativní elektroforéza představuje takový způsob dělení proteinů, při kterém jsou molekuly děleny ve své přirozené podobě, bez účinků denaturujících sloučenin. Nedochozí k výrazným konformačním změnám jako například při SDS-PAGE. Mezi nejběžněji používané nativní elektroforézy patří BN-PAGE (z angl. *blue native polyacrylamide gel electrophoresis*), sloužící především k výzkumu proteinů mitochondriálního dýchacího řetězce u bakterií, kvasinek, zvířat i rostlin. Bílkoviny se zde dělí ve své přirozené podobě, za použití mírných tenzidů a barviva Coomassie Blue, při zachování své enzymatické aktivity [36, 37]. Nejvíce používané neionizující tenzidy jsou n-dodecyl-β-D-maltosid, Triton X-100 a digitonin [31, 36]. Barvivo Coomassie Blue se naváže na solubilizovanou molekulu bílkoviny, a tím jí udělí negativní náboj, překrývající její přirozený. Vazbou barviva získají molekuly na jednotku hmotnosti stejný náboj a dělení je způsobeno vlivem gelu, který klade různě velkým molekulám různě velký odpor [36]. Pokud se budeme zabývat způsobem vazby, jde o elektrostatickou interakci zesílenou hydrofóbní vazbou [38], kde interagují sulfoskupiny barviva s bazickými aminokyselinami (lysin, arginin, histidin) proteinu a aminoskupiny barviva s karboxyly proteinu. Přičemž na jeden pozitivní náboj proteinu jsou vázány 1,5–3 molekuly barviva [39]. Kromě výpočtu molekulových hmotností můžeme touto technikou sledovat i oligomerní stavy a protein-proteinové interakce. Nevýhodou je relativně pevná vazba barviva k proteinu a její následná interference s dalšími technikami analyzujícími vlastnosti nativních proteinů [40, 41]. CN PAGE byla popsána nedlouho po vyvinutí BN-PAGE, protei-

ny se pohybují v nativním stavu bez přidání jakékoliv látky udílející náboj. Dělení je tedy závislé na přirozeném náboji, molekulové hmotnosti a tvaru proteinů. „Červená“ nativní elektroforéza je obdobou BN-PAGE, pouze s tím rozdílem, že namísto Coomassie Blue G-250 se využívá vazby Ponceau S (3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonát sodný). Ponceau S, jehož vzorec znázorňuje obrázek 1.5, je červená barva slabě se vážající k molekulám proteinu a udílející jim negativní náboj, což má za následek jejich pohyb od záporné elektrody (katody) ke kladné (anoda), stejně jako u BN-PAGE. Nejznámější využití této barvy nalezneme u Western blottingu, kde se používá pro rychlou a reverzibilní vizualizaci proteinů na nitrocelulosové a PVDF membráně. V některých případech CN-PAGE byl pomocí Ponceau S vizualizován konec elektroforézy [32]. Do vzorku bylo přidáváno v takovém množství, aby jeho koncentrace dosahovala 0,001 %.



Obrázek 1.5 Strukurní vzorec Ponceau S. 3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonát sodný.

1.9.3 Interpretace dat získaných při „červené“ nativní elektroforéze

Při vyhodnocování získaných dat jsem vycházela z tzv. Fergusonových grafů [42]. Jedná se o závislost $\log(100.R_f)$ na koncentraci monomeru akrylamidu v procentech, s použitím lineární regrese. R_f představuje relativní mobilitu pigmentoproteinového komplexu vzhledem k mobilitě malých molekul samotného barviva Ponceau S, které mají v systému nejvyšší rychlost. Směrnici této přímky je retardační koeficient k_r . Retardační koeficient je funkcí velikosti a tvaru (frikční koeficient) molekuly, nikoliv však funkcí náboje [43]. Y_o představuje relativní volnou elektroforetickou pohyblivost, která je dána povr-

chovým nábojem a T v následujícím vztahu zastupuje celkovou koncentraci akrylamidu [44].

$$\log R_f = \log Y_o - k_r T$$

Hedrick a Smith v roce 1968 [45] ukázali, že tato rovnice platí pro globulární proteiny a navrhli jednoduchý způsob stanovení relativní molekulové hmotnosti pomocí PAGE. Stanovili R_f ze série gelů o různé koncentraci pro řadu standardních proteinů o známé molekulové hmotnosti. Tím získali přímky, jejichž směrnici je k_r a ten vynesli v dalším grafu proti molekulové hmotnosti daných proteinů. Rovnice této závislosti je uvedena níže a lze z ní vypočítat molekulovou hmotnost neznámých proteinů. Parametry a a b v rovnici jsou empiricky zjištěné a platí pouze pro daný systém.

$$K_r = a + b.M$$

Cíl práce

- Separovat pigmentoproteinové komplexy kukuřice pomocí červené nativní elektroforézy.
- Na základě Fergusonových grafů objasnit, zda se při tomto postupu pigmentoproteinové komplexy a molekuly standardních proteinů dělí na základě svých molekulových hmotností. Porovnat s dělením pigmentoproteinových komplexů bezbarvou nativní elektroforézou.
- Identifikovat PSII na základě měření fotochemických aktivit.
- Ověřit zachování fotochemické aktivity fotosystému II během červené nativní elektroforézy a tím míru nativity tohoto způsobu dělení proteinů.

2 Materiál a metody

2.1 Biologický materiál

Studovaný materiál pocházel z listů kukuřice (*Zea mays*). Jednalo se o inbrední genotypy 2023 a CE704 a jejich křížence generace F1, 2023 × CE704, CE704 × 2023. Všechny genotypy byly vyšlechtěny šlechtitelskou stanicí CEZEA, Čejč u Hodonína a pěstovány na katedře genetiky a mikrobiologie PřF UK. Z každé rostliny ve věku cca. 6 týdnů byl sklizen a dále použit čtvrtý a pátý list.

Veškerý biologický materiál (nezpracované listy, izolát thylakoidních membrán i cytosolární frakce) byl uchováván v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Použité chemikálie

hovězí sérumalbumin (polyBSA, zesíťovaný glutaraldehydem), Imuna, Slovensko

ferritin, Sigma, USA

katalasa, Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R, Serva, Německo

akrylamid, Sigma, Německo

N,N'-methylenbisakrylamid (BIS), Serva, Německo

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva, Německo

tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Sigma, USA

ϵ -amino-*n*-kapronová kyselina, Sigma, USA

n-tris[hydroxymethyl]methylglycin (Tricine), Sigma, USA

bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan (Bis-Tris), Sigma, USA

n-dodecyl- β ,D-maltosid (dodecylmaltosid), Sigma, USA

kyselina octová, Lachema, ČR

kyselina trichloroctová, Lachema, ČR

Ponceau S, pro elektroforézu, Fluka, Švýcarsko

n-butanol, Lachema, ČR

1,5-difenyلكarbazid (DCP), Sigma, USA

2,6-dichlorfenolindofenol (DCPIP), Lachema, ČR

fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma, USA

2-merkptoethanol, Fluka, Švýcarsko

dodecylsírán sodný (SDS), Sigma, USA

glycerol, Lachema, ČR

sacharosa, Penta, ČR

Všechny ostatní použité chemikálie, které nejsou v tomto seznamu, byly stupně čistoty p.a.

2.3 Izolace thylakoidních membrán kukuřice

Základem izolačního postupu byla metoda podle Holé a kol. [46].

Pro izolaci jsem vždy používala osm listů kukuřice získaných z různých rostlin stejného genotypu. Jednalo se o jejich čtvrté, páté nebo šesté listy. Před vlastním izolačním procesem byl materiál uchovávan v hlubokomrazícím boxu. Abych docílila maximální šetrnosti a zachování aktivity získaných chloroplastů, prováděla jsem izolaci za tmy a při 4 °C.

Jednotlivé listy jsem nejprve zbavila zežloutlých okrajů, řapíků, ostatních hrubých částí a vždy zaznamenala hmotnost určenou ke zpracování. Vzhledem k malému množství listového materiálu byla homogenizace prováděna v třecí misce s tloučkem po zmrazení kapalným dusíkem. Tření jsem prováděla do okamžiku vzniku jemného prášku, který jsem následně smísila s 2,5 násobkem hmotnosti listů izolačního pufru IM (složení udává tabulka 2.1). K pufru jsem před smícháním přidala inhibitor proteas PMSF (roztok fenylmethylsulfonylfluoridu v bezvodém ethanolu) v konečné koncentraci 0,5 mM. Filtrace byla provedena po dokonalém promísání roztoku a rozmělněných listů přes 6 vrstev dětských separačních plen, přičemž filtrát byl jímán do baňky chlazené ledem. Šetrným vymačkáním svrchní vrstvy jsem zabránila průniku pěny s obsahem proteolytických enzymů. Následnou centrifugací filtrátu (1000 × g, 10 min, 4 °C) na centrifuze MPW 360 (Mechanika precyzyjna, Polsko) jsem získala v peletě izolované chloroplasty a v supernatantu hrubý extrakt obsahující cytosolovou frakci rozbitých buněk. V cytosolu je enzym PEPC, jehož aktivitu jsem následně stanovovala. Vzhledem ke skutečnosti, že toto měření nebylo předmětem mé diplomové práce, v dalším textu se jím již nezabývám. Peletu jsem ještě dvakrát promyla v téměř izolačním pufru, vždy s přidavkem inhibitoru proteas.

Výsledný sediment jsem důkladně resuspendovala v malém množství resuspendačního pufru, také s přidavkem PMSF v konečné koncentraci 0,5 mM. Množství přidaného pufru jsem odhadovala podle množství získaného sedimentu tak, aby výsledná koncentrace chlorofylu v jednotlivých preparátech byla 0,8–2,5 mg/ml, vždy zhruba do 1 ml.

V roztoku chloroplastů jsem stanovila obsah chlorofylu metodou dle Arnona [47]. Po označení a zmrazení v kapalném dusíku jsem vzorky izolovaných chloroplastů i hrubý cytosolární extrakt uchovávala při –78 °C.

Tabulka 2.1 Složení roztoků pro izolaci chloroplastů kukuřice (*Zea mays*).

<i>pufr</i>	<i>Tris-HCl</i> [mM]	<i>Sacharosa</i> [mM]	<i>Glycerol</i> [%]	<i>MgCl₂·6H₂O</i> [mM]	<i>pH</i>
Izolační	50	400	–	50	7,0
Resuspendační	50	400	40	6	7,0

2.4 Spektroskopické metody

Podstatou spektroskopických metod je interakce hmoty s elektromagnetickým zářením. Na základě druhu interakce, kterou pozorujeme, rozdělujeme tyto metody na absorpční, emisní či takové, při kterých zkoumáme odražené paprsky. Nejběžnější a instrumentálně nejméně náročné jsou ty, kde měříme úbytek záření po průchodu světla hmotou, tedy absorpční. Koncentraci absorbující látky vypočítáme z Lambertova-Beerova zákona. Při odvození vztahu pro tento zákon vycházíme ze skutečnosti, že při průchodu paprsků monochromatického světla se vzorkem, dochází ke zmenšení počáteční intenzity Φ_0 na hodnotu Φ . Poměr těchto dvou hodnot se nazývá transmitance, neboli propustnost prostředí.

$$A = -\log \Phi / \Phi_0 = -\log T = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Kde A je absorbance, T transmitance, ε molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$], c je koncentrace absorbující látky ve vzorku vyjádřená v $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a l optická dráha paprsku v kyvetě.

2.4.1 Stanovení obsahu chlorofylu v preparátech

Celkový obsah chlorofylu v preparátech jsem stanovovala metodou dle Arnona [47].

Vždy jsem 5 μl vzorku thylakoidních membrán napipetovala do 1,5 ml 80% acetonu a směs dokonale protřepala. Následovalo odstředění na centrifuze MPW 300 (Mechanika precyzyjna, Polsko), 5 minut při maximálních otáčkách. U takto připravených vzorků jsem změřila absorbanci proti 80% acetonu, který tvořil slepý vzorek. Každý izolát jsem takto proměřila třikrát a výslednou hodnotu koncentrace chlorofylu získala z průměrné hodnoty absorbance

Obsah chlorofylu jsem vypočítala ze vztahu: c (mg/ml) = $A_{652} \cdot 8,7$, kde A_{652} je absorbance vzorku při 652 nm. Specifický absorpční koeficient má při této vlnové délce hodnotu $34,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.5 Stanovení fotochemických aktivit

2.5.1 Stanovení fotochemických aktivit redukcí DCPIP

Fotochemickou aktivitu jsem určovala měřením fotoredukce nefyziologického akceptoru a donoru elektronů, 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCPIP) a 1,5-difenyلكarbazidu (DCP) [48, 49].

Fotochemickou aktivitu lze stanovit pomocí nefyziologického akceptoru elektronů, např. DCPIP. Množství uvolněného kyslíku při fotolýze vody odpovídá množství zredukovaných molekul DCPIP. Aktivita fotolýzy vody se určí jako počáteční rychlost redukce DCPIP po osvětlení vzorku.

Reakční směs obsahovala takové množství vzorku thylakoidních membrán, aby výsledně množství chlorofylu bylo 20 µg, dále pak roztok DCPIP (zásobní roztok 20 mg DCPIP v 10 ml H₂O) o výsledné koncentraci 30 µM a roztok RmH v takovém množství, aby konečný objem byl 2 ml. Měření jsem prováděla na spektrofotometru Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Německo) při 600 nm proti slepému vzorku, který neobsahoval DCPIP. Měrnou kyvetu se vzorkem jsem osvětlovala zářením z diaprojektoru (Malicolor, Německo) ve vzdálenosti 2 cm v intervalech 10, 20, 30, 60, 90 a 120 sekund. Před začátkem měření a po každém výše uvedeném intervalu jsem změřila absorbanci vzorku. Měření bylo prováděno za tmy. V případě měření rychlosti redukce v gelu jsem postupovala stejným způsobem, jen jsem místo vzorku do kyvety vkládala vyříznutý kousek gelu po elektroforéze, který obsahoval zónu, jejíž aktivita mě zajímala.

Grafem závislosti změn absorbance na čase jsem proložila hyperbolu. Hledaná počáteční rychlost redukce je derivace v nulovém čase. Při měření aktivit v preparátu thylakoidních membrán jsem jednotky převedla na µmol redukovaného DCPIP na mg chlorofylu za hodinu. Molární absorpční koeficient DCPIP má při 600 nm hodnotu $2,1 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. V případě většího množství výsledků jsem na základě následujícího vztahu vypočítala chybu měření.

$$S_r = [\sum(x_i - \bar{x}) / (n - 1)] \cdot 100 / \bar{x}$$

Tabulka 2.2 Složení pufru RMh používaného při stanovení fotoredukce DCPIP, pH roztoku je 6,5.

<i>sloučenina</i>	<i>Molární koncentrace</i>
KCl	10
HEPES	40

2.5.2 Stanovení fotochemických aktivit redukcí DCPIP v přítomnosti DPC

Pokud dojde během izolace nebo při uskladnění vzorku k poškození systému vyvíjejícímu kyslík, není PSII schopen oxidace vody. V takovém případě lze k měření aktivity elektronového transportu použít i nefyziologický donor elektronů, kterým je 1,5-difenyلكarbazid (DPC). Aktivitu stanovíme jako počáteční rychlost fotoredukce DCPIP po osvětlení vzorku v přítomnosti DPC.

Reakční směs obsahovala takové množství vzorku thylakoidních membrán, aby výsledná koncentrace chlorofylu byla 20 µg, dále pak roztok DCPIP (zásobní roztok 20 mg DCPIP v 10 ml H₂O) o výsledné koncentraci 30 µM, roztok DPC (zásobní roztok 18 mg DPC v 1,5 ml 100% methanolu) o výsledné koncentraci 0,3 mM a roztok RMh v takovém množství, aby konečný objem byl 2 ml.

Aktivitu jsem měřila stejným způsobem popsaným v kapitole 2.5.1. DCPIP a DPC spolu chemicky interagují, přičemž dochází také k poklesu absorbance během měření. Míru jejich vzájemné interakce jsem stanovila před každým měřením a pak ji následně zohlednila při výpočtu aktivity. Stanovení interakce jsem měřila stejným způsobem, jen s tím rozdílem, že slepý vzorek ani měrná kyveta neobsahovaly izolát thylakoidních membrán. Vše bylo také prováděno za tmy a výsledky vyhodnoceny způsobem popsaným v kapitole 2.5.1.

2.5.3 Stanovení fotochemické aktivity pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody

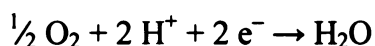
Dalším způsobem stanovení aktivity fotosystému II je monitorování vznikajícího kyslíku v přítomnosti nefyziologického akceptoru elektronů [50].

Clarkova kyslíková elektroda je elektrochemický článek produkující elektrický proud, který je úměrný koncentraci kyslíku v médiu, do kterého je elektroda ponořena. Katody a ano-

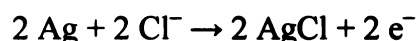
da jsou od reakční směsi odděleny teflonovou membránou, která je propustná pouze pro molekuly kyslíku, nikoliv pro ionty a vodu.

Složení Clarkovy kyslíkové elektrody je následující:

- Platinová katoda – kyslík je zde redukován podle rovnice



- Argentchloridová anoda – probíhá na ní následující reakce



Elektrody jsou vzájemně propojeny solným můstkem (50% nasycený roztok KCl).

K měření jsem používala Clarkovu kyslíkovou elektrodu firmy Hansatech (Velká Británie). Data byla snímána pomocí posuvného zapisovače.

Komůrka kyslíkové elektrody byla během měření temperována na teplotu 25 °C a osvětlována třemi nastavci s červenými diodami LED (660 nm) o celkové intenzitě 720 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Dokonalé míchání vzorku po celou dobu měření bylo zajištěno magnetickou míchačkou.

Před samotným měřením jsem nejprve musela komůrku nakalibrovat. To jsem prováděla při teplotě 25 °C. Nulová hodnota vývoje kyslíku byla nastavena přidáním několika krystalů dithioničitanu sodného do redestilované vody v komůrce kyslíkové elektrody. Za maximální hodnotu jsem brala 0,253 μmol kyslíku rozpuštěného v 1 ml redestilované vody při 25 °C.

Reakční směs obsahovala takové množství vzorku, které odpovídalo 10 μg chlorofylu a dále činidla, jejichž množství a koncentraci udává tabulka 2.11. Na objem 1 ml byla reakční směs doplněna pufrům o následujícím složení 5mM MgCl_2 , 10mM NaCl a 25mM MES.

Tabulka 2.11 Činidla použitá při měření aktivity fotosystému II pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody. Použité symboly jsou uvedeny v seznamu zkratk.

<i>čínidlo</i>	<i>Koncentrace zásobního roztoku (mmol/l)</i>	<i>Pipetované množství (μl)</i>	<i>Koncentrace v reakční směsi (mmol/l)</i>
FeCy	100	10	1,0
PBQ	20	15	0,3

Jednotlivé součásti reakční směsi jsem do komůrky přidávala za současného míchání a následně ji uzavřela víčkem s kapilárou pro únik přebytečné kapaliny. Po vystavení obsahu komůrky osvětlení jsem započala měření, které probíhalo po celou dobu nárůstu křivky elektrického napětí. Množství uvolněného kyslíku jsem vypočítala z parametrů křivky a vyjádřeno v $\mu\text{mol O}_2/\text{hod}$ na $10\mu\text{g}$ chlorofylu.

2.6 Elektroforetické metody

2.6.1 „Červená“ nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu [51]

2.6.1.1 Princip metody

Jak jsem již uvedla v úvodu, jedná se o elektroforetickou metodu, při níž se účinkem elektrického pole separují proteinové komplexy v neporušené podobě.

Do vzorku a katodového pufru se přidává červené barvivo Ponceau S, které udělí bílkovinám přítomným v komplexech negativní náboj. To způsobí, že dochází k jejich pohybu v elektrickém poli ve směru od katody k anodě. Vazba barviva na proteiny je založena pouze na slabé interakci, což má za následek, že ji lze z komplexů i separačních gelů snadno vymýt vodou.

2.6.1.2 Podmínky „červené“ nativní elektroforézy

Elektroforéza probíhala na polyakrylamidových deskách o rozměrech $110\text{ mm} \times 120\text{ mm} \times 1,0\text{ mm}$ (Whatman Biometra, The Multigel-Long) za stálého chlazení na $2\text{--}4\text{ }^\circ\text{C}$ a při konstantním proudu pohybujícím se v rozmezí $25\text{--}40\text{ mV}$. Za těchto podmínek elektroforéza probíhala $19\text{--}22\text{ h}$, ale doba trvání se lišila u různě koncentrovaných polyakrylamidových gelů. Celý proces probíhal ve tmě.

Při této práci jsem používala celkem pět různých koncentrací dělicích gelů, vzestupně s $5,94\%$, $6,93\%$, $7,92\%$, $8,91\%$ a $9,9\%$ koncentrací akrylamidu (%T). Řadící gel obsahoval u všech výše uvedených koncentrací $4\text{ hmotnostní procenta}$ akrylamidu. Elektroforézu jsem prováděla pro každou zvolenou koncentraci minimálně pětkrát. Důvodem bylo získání dostatečně velké množiny dat vhodných ke statistickému zpracování a jejich následného využití při sestavování Fergusonových grafů.

Při přípravě gelů jsem používala dokonale čistá skla, utěsněná silikonovými spacery a upevněná svorkami. Abych zabránila protékání katodového pufru, natírala jsem skleněné spacery vazelínou. Po nanesení prvního, tedy dělicího gelu mezi skla bylo nezbytné převrstvit hladinu *n*-butanolem. Zamezila jsem tak kontaktu polymerizujícího roztoku se vzduchem, neboť kyslík tento proces ruší. Po zpolymerizování dělicího gelu a před nanesením řadicího bylo nezbytné použitý butanol dokonale odstranit několikanásobným promytím destilovanou vodou. Během nanášení obou gelů a při zasouvání tzv. šablony jsem musela dbát zvýšené opatrnosti, aby nevznikaly bublinky, kvůli nimž by následně docházelo ke špatnému dělení nanesených komplexů. Vrstvu řadicího gelu s umístěnou šablonou jsem taktéž překryla *n*-butanolem. Šablona vytvořila pravidelné jamky, určené pro aplikaci vzorku. Skla s připravenými gely jsem připevnila do aparatury a zalila elektrodoými pufrů. Spodní část malopórového gelu byla v kontaktu s anodovým pufrům, zatímco horní část velkopórového pufru byla zalita roztokem katodového pufru. Oba pufrů se používají proto, aby byla zajištěna vodivost v aparatuře, a také aby vyrovnávaly změny pH, ke kterým dochází.

Barvivo jsem do vzorků přidávala v takovém množství, aby jeho koncentrace dosahovala 1,5 %. Jelikož se jedná o malou nabitou molekulu, je její pohyb zpomalován mnohem méně, než pohyb proteinových komplexů ve vzorcích. To je příčina výrazné červené zóny tvořící čelo elektroforetogramu. Ve snaze o doplnění takto uniklé barvy přidáváme do katodového pufru Ponceau S, podobně jako v případě BN-PAGE Coomassie Blue.

Tabulka 2.3 Složení zásobních roztoků pro „červenou“ nativní elektroforézu. Pro přípravu všech roztoků jsem používala redestilovanou vodu. Roztok APS jsem při každé práci připravovala čerstvý [50].

<i>roztok</i>	<i>složení</i>	<i>pH</i>
katodový pufr	50 mM Tricin, 15mM Bis-Tris/HCl a 0,012 % Ponceau S	7,0
anodový pufr	50 mM Bis-Tris/HCl	7,0
gelový pufr	150 mM Bis-Tris/HCl a 10 mM ϵ -amino- <i>n</i> -kapronová kyselina	7,0
AB směs	48 g akrylamidu a 1,5 g BIS ve 100 ml roztoku	–
10 % APS	0,1 g v 1 ml vody	–

Tabulka 2.4 Složení polymeračních směsí pro přípravu dělicího gelu o uvedených koncentracích [37, 50]. Pipetovaná množství jsou udávána v μl .

<i>roztok</i>	<i>koncentrace akrylamidu T</i>				
	5,94 %	6,93 %	7,92 %	8,91 %	9,9 %
gelový pufr	4000	4000	4000	4000	4000
AB směs	1440	1680	1920	2160	2400
redestilovaná voda	6476	6239	6005	5770	5536
10% APS	76	74	68	64	58
TEMED	7,6	7,4	6,8	6,4	5,8
celkový objem	12 ml	12 ml	12 ml	12 ml	12 ml

Tabulka 2.5 Složení polymeračních směsí pro přípravu dvou řadicích gelů o koncentraci akrylamidu 4 %. Pipetovaná množství jsou udávána v μl .

<i>roztok</i>	<i>koncentrace akrylamidu T</i>
	4 %
gelový pufr	2000
AB směs	500
redestilovaná voda	3448
10% APS	46
TEMED	4,6
celkový objem	6 ml

2.6.1.3 Příprava vzorků pro „červenou“ nativní elektroforézu

K 25 μl suspenze thylakoidních membrán jsem přidala 5 μl 10 % dodecylmaltosidu, 15 μl 10 % Ponceau S a doplnila do 100 μl solubilizačním pufrům o následujícím složení: 50 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0; 750 mM ϵ -amino-*n*-kapronová kyselina a 20% glycerol [51].

V této podobě jsem vzorky nanášela do jamek řadicího gelu.

2.6.1.4 Příprava standardů pro „červenou“ nativní elektroforézu

Jako hlavní standardy jsem používala apoferritin, hovězí sérumalbumin a katalasu, v rámci jednoho pokusu jsem použila ještě ureasu, carboanhydrasu, ovalbumin a laktalbumin. Proteiny jsem rozpustila v katodovém pufru, jehož složení udává tabulka 2.3 a zahustila sacharosou. Sacharosu jsem přidávala (na špičku špachtle) z důvodu zvýšení hustoty roztoku standardu, což má za následek, že proteiny se usadí na dně jamek řadícího gelu.

2.6.2 Bezbarvá nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

2.6.2.1 Princip metody

Bezbarvá nativní elektroforéza je elektroforetická metoda, která nám umožňuje rozdělení proteinů v nativním stavu s minimálním možným poškozením. Oproti BN-PAGE má nižší rozlišovací schopnost a je omezena pouze na proteiny, jejichž pI je nižší než hodnota pH použitých pufrů [32]. V takovém případě jsou proteiny nositeli záporného náboje a v elektrickém poli jsou nesené od katody k anodě. V případě SDS či BN-PAGE je k proteinům přidána látka, která jim chybějící negativní náboj uděluje. Během této alternativy elektroforetického dělení se tedy na rychlosti pohybu podílí přirozený náboj proteinu, jeho velikost (molekulová hmotnost) a v neposlední řadě i tvar.

Při řešení své diplomové práce jsem bezbarvou nativní elektroforézu prováděla pro porovnání s výsledky „červené“ nativní elektroforézy.

2.6.2.2 Podmínky bezbarvé nativní elektroforézy

Podmínky bezbarvé nativní elektroforézy byly totožné jako v případě její bezbarvé alternativy, viz kapitola 2.6.1.2. Abych docílila skutečně naprosto stejných podmínek, nepřidávala jsem do katodového pufru žádnou látku s negativním nábojem a malou molekulou, která by v systému putovala s čelem. Z toho důvodu probíhalo dělení vždy po dobu 21 h a při empiricky zjištěných 30–35 V. I v tomto případě jsem používala pět různých koncentrací gelů, v minimálně pěti opakováních.

Odlišnost ve složení roztoků se týkala pouze katodového pufru, který neobsahoval Pon-ceau S.

2.6.2.3 Příprava vzorků pro bezbarvou nativní elektroforézu

K 25 μ l suspenze thylakoidních membrán jsem přidala 5 μ l 10% dodecylmaltosidu, a doplnila do 100 μ l solubilizačním pufrům o následujícím složení: 50 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0; 750 mM ϵ -amino-*n*-kapronová kyselina a 20% glycerol. V této podobě jsem vzorky nanášela do jamek řadicího gelu.

2.6.2.4 Příprava standardů pro bezbarvou nativní elektroforézu

V přípravě standardů jsem se taktéž příliš nelišila od červené nativní elektroforézy. Základními standardy mi byly apoferritin, hovězí sérumalbumin a katalasa. Proteiny jsem rozpustila v katodovém pufru, jehož složení udává tabulka 2.4 a zahustila sacharosou. Sacharosu jsem přidávala (na špičku špachtle) z důvodu zvýšení hustoty roztoku standardu, což má za následek, že proteiny se usadí na dně jamek řadicího gelu.

2.6.3 Reelektroforéza v přítomnosti SDS

Reelektroforézu jsem prováděla na polyakrylamidových deskách o koncentraci akrylamidu 10 %. Jejich příprava je totožná jako v případě nativních elektroforéz. Složení zásobních roztoků udává tabulka 2.7. Pipetovaná množství použitá pro samotnou přípravu jsou zanesena v tabulce 2.8 a 2.9. Dělení jsem prováděla jako v předešlých případech přes noc, tedy cca 20 hodin při 30–35 V. Získané elektroforetogramy jsem barvila stříbrem.

Vzorky pro reelektroforézu byly kousky gelu obsahující separované pigmentoproteinové komplexy vyříznuté z gelu po červené nativní elektroforéze. Před aplikací na gel jsem proužky vystavila nejméně po dobu 3 hod účinkům solubilizačního roztoku [0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 20% glycerol (m/V), 4% SDS (m/V) a 10% 2-merkapt ethanol (m/V)] [32]. Solubilizace probíhala při teplotě cca 40 °C. Abych přenesla co největší množství proužků s pigmentoproteinovými komplexy po nativní elektroforéze do gelu s SDS, použila jsem pro přípravu řadicího gelu hřeben se širšími zuby.

Tabulka 2.6 Složení zásobních roztoků pro elektroforézu v přítomnosti SDS [9].

<i>roztok</i>	<i>složení</i>	<i>pH</i>
1,5M Tris/HCl	18,17 g Tris/HCl ve 100 ml redest. vody	8,8
0,5M Tris/HCl	6,6 g Tris/HCl ve 100 ml redest. vody	6,8
Elektrodový pufr	15 g Tris, 72 g glycinu, 5 g SDS v 1000 ml redest. vody	8,3
30% akrylamid	29,2 g akrylamidu a 0,8 g BIS ve 100 ml roztoku	–
10% APS	0,1 g v 1 ml vody	–
10% SDS	10 g SDS ve 100 ml redest. vody	–

Tabulka 2.7 Složení polymeračního roztoku pro přípravu dělicího gelu o koncentraci akrylamidu 10 % v přítomnosti SDS. Pipetovaná množství jsou udávána v μ l.

<i>roztok</i>	<i>koncentrace akrylamidu T</i>
	10 %
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	3000
30% akrylamid	4000
redestilovaná voda	4750
10% APS	120
10% SDS	120
TEMED	10
celkový objem	12 ml

Tabulka 2.8 Složení polymerační směsi pro přípravu dvou řadicích gelů o koncentraci akrylamidu 4 % v přítomnosti SDS. Pipetovaná množství jsou udávána v μ l.

<i>roztok</i>	<i>koncentrace akrylamidu T</i>
	4 %
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1500
30% akrylamid	800
redestilovaná voda	3565
10% APS	60
10% SDS	60
TEMED	15
celkový objem	6 ml

2.6.4 Detekce bílkovin, barvení a uchování gelů

Po skončení červené nativní elektroforézy jsem gely nejprve nechala 24 hodin naložené v deionizované vodě, abych docílila alespoň částečného vymytí Ponceau S. V případě bezbarvé nativní elektroforézy tento krok nebyl nutný. Následovala detekce bílkovin pomocí **Coomassie Brilliant Blue R250**. Jedná se o metodu nespecifického barvení, kdy se zviditelní přítomné bílkoviny, a to již od množství 0,1 μg v proužku [33].

Složení barvicího roztoku je následující: 0,25% roztok Coomassie Brilliant Blue R250 ve směsi ethanolu, kyseliny octové a deionizované vody v poměru 25:10:65. Před prvním použitím jsem roztok přefiltrovala přes filtrační papír, abych se zbavila případných zbytků nerozpuštěného barviva. Samotné barvení probíhalo zhruba 20 hodin, tedy do druhého dne, a pak následovalo několikadenní odbarvování. Odbarvovací lázeň měla stejné složení jako barvicí roztok, neobsahovala však Coomassie Brilliant Blue R250. V jedné odbarvovací lázni jsem gely nechávala přes noc; než došlo k odbarvení pozadí, vyměnila jsem lázně 5–6krát. Takto zpracované gely jsem uchovávala v lednici při teplotě 4 °C zatavené mezi dvěma částmi čiré fólie a s přísadkou azidu sodného, abych zabránila množení různých mikroorganismů a tím i znehodnocení.

Citlivější metodou detekce proteinů v gelech je **barvení stříbrem**. Touto metodou jsme schopni zachytit i tak malé množství jako je 0,1 ng proteinu [33]. Principem je redukce stříbrných iontů některými aminokyselinovými zbytky v proteinech, jako například methionin, cystein nebo bazické aminokyseliny arginin, lysin a histidin. Obarvené proteinové pásy jsou nositeli žluté, oranžové, přes hnědou až po černou barvu. Tyto barevné rozdíly jsou způsobeny rozptylem světla na vyredukovaných částicích stříbra [34]. V případě barvení SDS gelu s 2-merkaptethanolem se nám objeví dvě silné horizontální linie v oblasti 60 kDa a 67 kDa, tomu se dá zabránit, pokud použijeme menší množství tohoto redukčního činidla [33].

Barvicí postup jsem zahájila fixací gelu po SDS elektroforéze a to dvacetiminutovou inkubací v roztoku 50% methanolu a 12% kyseliny trichloroctové. Následovalo desetiminutové promývání v 10% ethanolu s 5% kyselinou octovou (promývací roztok) a zakončené desetiminutovou inkubací v 0,01% roztoku KMnO_4 . Po tomto kroku jsem gely po dobu deseti minut opět podrobila účinku promývacího roztoku a následně propláchla redestilovanou vodou. Následné desetiminutové vystavení účinkům 10% ethanolu a dvacetisekundovým promytím v destilované vodě, bylo zakončeno samotným barvením roztokem 0,1 %

AgNO₃ po dobu deseti minut. Odmytí přebytečného dusičnanu jsem prováděla ponořením gelu na dvacet sekund do redestilované vody. Následovala alkalizace v 10% roztoku NaCO₃, po dobu deseti minut, poté 3–4min vyvíjení tentokrát ve 20% NaCO₃, ale s přidavkem takového množství formaldehydu, aby jeho konečná koncentrace dosáhla 0,1 %. Dobu vystavení účinkům tohoto roztoku jsem volila v závislosti na intenzitě zabarvení jednotlivých proužků v gelu. Obarvený gel se nechá ustálit 1–2min v roztoku 10% ethanolu a 5% kyseliny octové a pak se celkem třikrát vždy po dobu třiceti minut promývá v redestilované vodě. Uchování a digitalizace byla totožná jako při barvení Coomassie Brilliant Blue R250.

2.6.5 Stanovení relativní molekulové hmotnosti

Relativní molekulové hmotnosti dělených pigmentoproteinových komplexů a jiných bílkovin přítomných ve vzorku jsem určovala porovnáváním jejich elektroforetické mobility s pohyblivostí použitých standardů o známé molekulové hmotnosti.

Jako standardy jsem použila apoferritin a katalasu od firmy Serva a hovězí sérumalbumin zesíťovaný glutaraldehydem (poly-BSA) od firmy Sevac. Jejich molekulové hmotnosti a hmotnosti případných homooligomerů jsou následující:

- Katalasa – monomer (Mr = 250 kDa)
 - dimer (Mr = 500 kDa)
- Apoferritin – monomer (Mr = 450 kDa)
 - dimer (Mr = 900 kDa)
 - trimer (Mr = 1 350 kDa)
- poly-BSA – monomer (Mr = 66 kDa)
 - dimer (Mr = 132 kDa)
 - trimer (Mr = 198 kDa)
 - tetramer (Mr = 264 kDa)

Pro stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů při elektroforéze v prostředí SDS jsem používala sadu standardních proteinů od firmy Sigma o následujícím složení:

- myosin (Mr 205 kDa)
- β-galaktosidasa (Mr 116 kDa)
- fosforylasa b (Mr 97 kDa)

- fruktosa-6-fosfát kinasa (Mr 84 kDa)
- hovězí sérumalbumin (Mr 66 kDa)
- glutamátdehydrogenasa (Mr 55 kDa)
- ovalbumin (Mr 45 kDa)
- glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (Mr 36 kDa)

Gely jsem digitalizovala ihned po skončení elektroforetického dělení i po obarvení. K tomu jsem využívala skeneru a získaná data jsem dále zpracovávala v programu Microsoft Office Excel 2003 a Sigma Plot 9.

2.7 Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy

2.7.1 Princip metody

Umožňuje dělení směsi látek na základě podobné sedimentační rychlosti. Pro přípravu gradientu se nejčastěji používá sacharosa a to tak, že hustota roztoku stoupá směrem ke dnu centrifugační kyvety. Na takto připravený koncentrační gradient se nanese směs látek o různé hustotě. Vlivem působení odstředivé síly částice putují v závislosti na své velikosti, tvaru, hustotě a samozřejmě jak na síle samotného odstředivého pole, tak i na viskozitě prostředí.

2.7.2 Příprava vzorku na centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy

Vzorky, které jsem podrobovala centrifugaci, byly izolované chloroplasty uchovávané v resuspendačním pufru (složení tabulka 2.1). Vzhledem k vysokému obsahu glycerolu a sacharosy v tomto pufru bylo nezbytné vzorky centrifugovat a stávající pufr nahradit roztokem o stejném složení, ale bez přídavku sacharosy a glycerolu. Během tohoto procesu jsem izolované chloroplasty nechala při teplotě 4 °C. Současně s výměnou pufrů proběhlo přidání dodecylmaltosidu v konečné koncentraci 20 mmol/l (peletu po centrifugaci jsem rozpustila v 1 ml resuspendačního pufru bez sacharosy a glycerolu; složení viz tabulka 2.1). Směs jsem homogenizovala za použití injekční stříkačky, kdy jsem vždy po nasátí suspenze směs vytlačila proti stěně zkumavky. Toto jsem několikrát opakovala. Před nanesením na sacharový gradient jsem ke vzorku přidala inhibitor proteas PMSF v konečné koncentraci

0,5 mM. Celkové množství vzorku nanášeného na sacharosový gradient se vždy pohybovalo cca kolem 1 ml.

2.7.3 Dělení pigmentoproteinových komplexů centrifugací v hustotním gradientu sacharosy

K dělení pigmentoproteinových komplexů kukuřice jsem používala šestnáctistupňový hustotní gradient sacharosy v pufru MNC, který obsahoval 0,03% (m/V) dodecylmaltosid a 0,5mM PMSF. Dodecylmaltosid a PMSF jsem do pufru přidávala těsně před použitím.

Nejprve jsem si připravila šestnáct roztoků sacharosy v rozmezí koncentrací 6,825 %, 7,125–13,95 % (s přírůstkem 0,525 %) a 21,45 %. Gradient jsem nanášela tzv. podvrstvováním, kdy jsem nejprve nanesla roztok o nejnižší koncentraci a pak postupně injekční stříkačkou nanášela další ke dnu kyvety. Tímto způsobem jsem do kyvet o objemu 32 ml podvrstvila 15 roztoků o objemu 1,8 ml, poslední a nejvíce koncentrovaný byl přidáván v objemu 2,2 ml. Abych docílila kontinuálního koncentračního gradientu, nechala jsem takto připravené kyvety přes noc v lednici. Vlivem difúze tak došlo k rozmytí ostrých koncentračních rozhraní.

Centrifugace probíhala na ultracentrifuze Beckman Coulter Optima LE–80K s rotorem SW 32 Ti při 30 000 rpm a teplotě 4 °C. Na základě několika pokusů jsem zjistila, že k vytvoření zón došlo po 10 hodinách. Vytvořené zóny jsem odsála pomocí injekční stříkačky, naředila puftrem MNC a znovu nechala centrifugovat. Centrifugace probíhala stejně jako v předchozím případě při 30 000 rpm, ale po dobu 12 hodin.

Jednotlivé zóny jsem nanášela na elektroforézu a měřila jejich fotochemickou aktivitu.

Tabulka 2.9 Složení pufru MNC, pH 5,7, používaného pro přípravu gradientu sacharosy.

<i>sloučenina</i>	<i>koncentrace (mmol/l)</i>
MES	25
NaCl	10
CaCl ₂	5

3 Výsledky

3.1 „Červená“ nativní elektroforéza

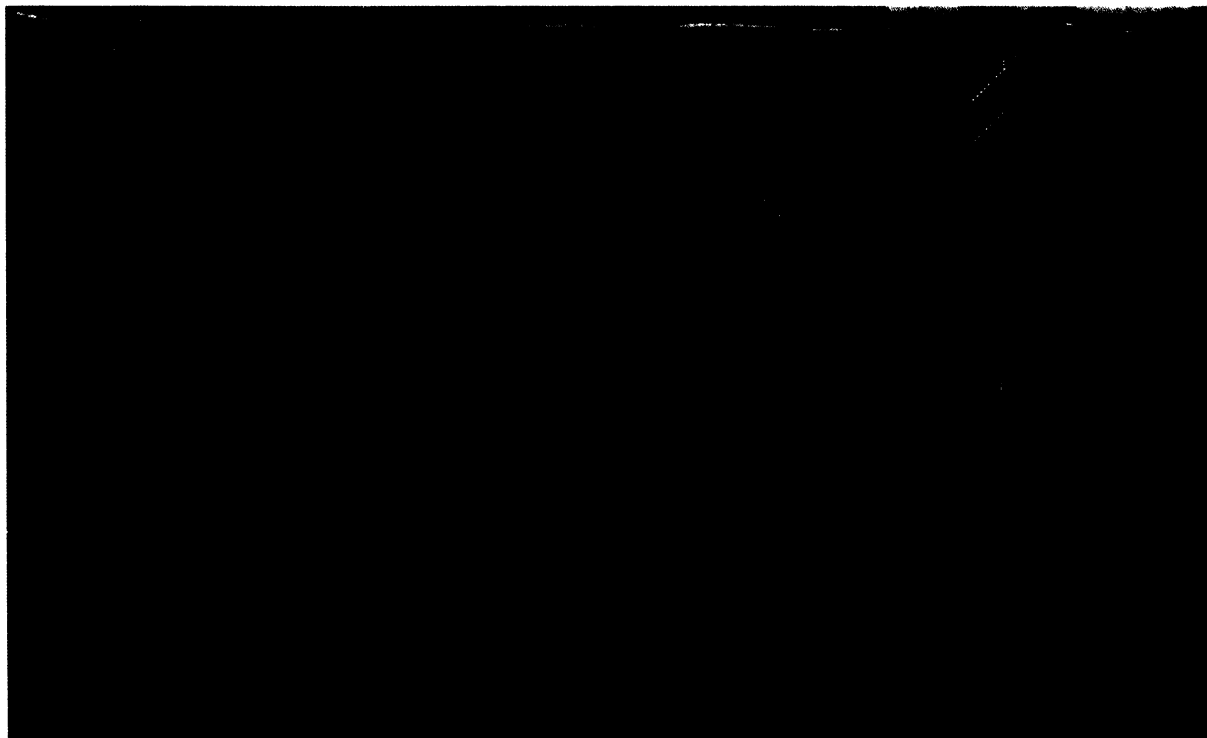
Při své práci jsem zpracovávala izolované pigmentoproteinové komplexy izolované z kukuřice a standardy (příprava viz kapitola 2.6.1.3 a 2.6.1.4), metodou „červené“ nativní elektroforézy, jejíž princip je popsán v kapitole 2.6.1.1. Používala jsem polyakrylamidové gely o pěti různých koncentracích, 5,94 %, 6,93 %, 7,92 %, 8,91 % a 9,9 % (příprava a podmínky viz kapitola 2.6.1.2). Celkem jsem připravila pět, v některých případech i více dobře interpretovatelných gelů od každé koncentrace akrylamidu. Získaná data jsem zpracovávala podle kapitoly 1.9.3.



Obrázek 3.1 Dělení pigmentoproteinových komplexů z chloroplastů kukuřice a standardních vzorků na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 8,91 % akrylamidu. Před obarvením.

Dráhy: 1 apoferritin, 2–4 BSA, 5–15 pigmentoproteinové komplexy, 16–18 apoferritin, 19–21 katalasa, 22–24 BSA.

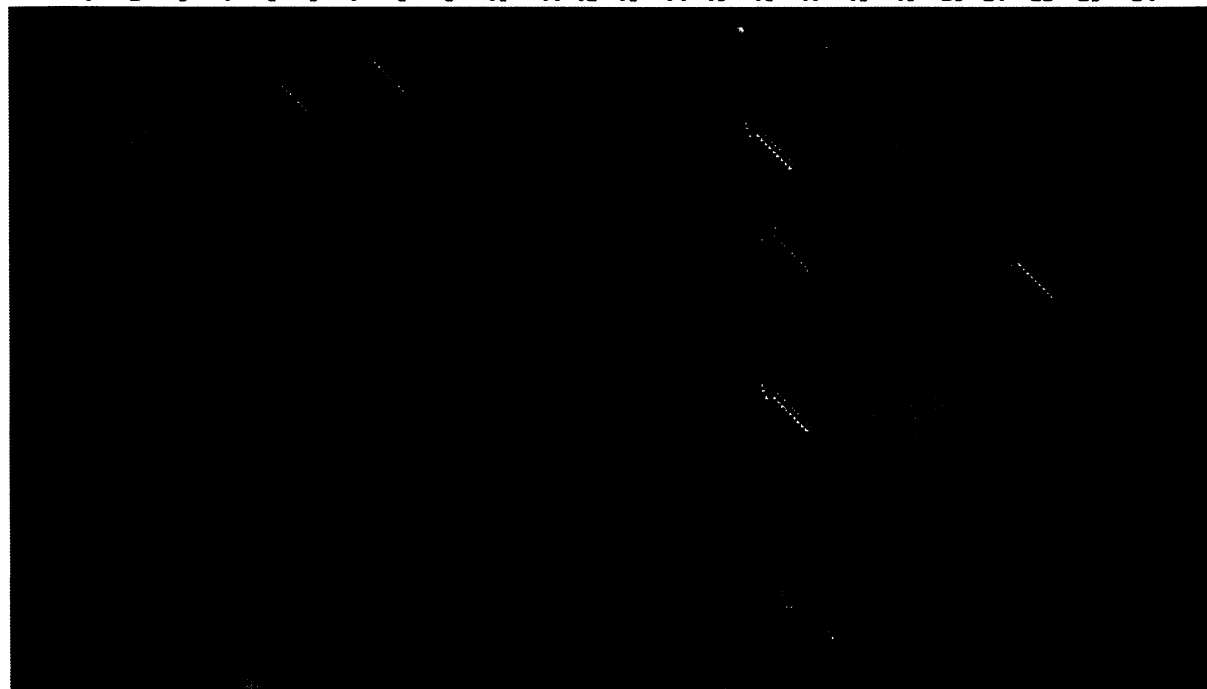
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Obrázek 3.2 Dělení pigmentoproteinových komplexů z chloroplastů kukuřice a standardních vzorků na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 8,91 % akrylamidu. Po obarvení.

Dráhy: 1 apoferritin, 2–4 BSA, 5–15 pigmentoproteinové komplexy, 16–18 apoferritin, 19–21 katalasa (na tomto gelu není vidět), 22–24 BSA.

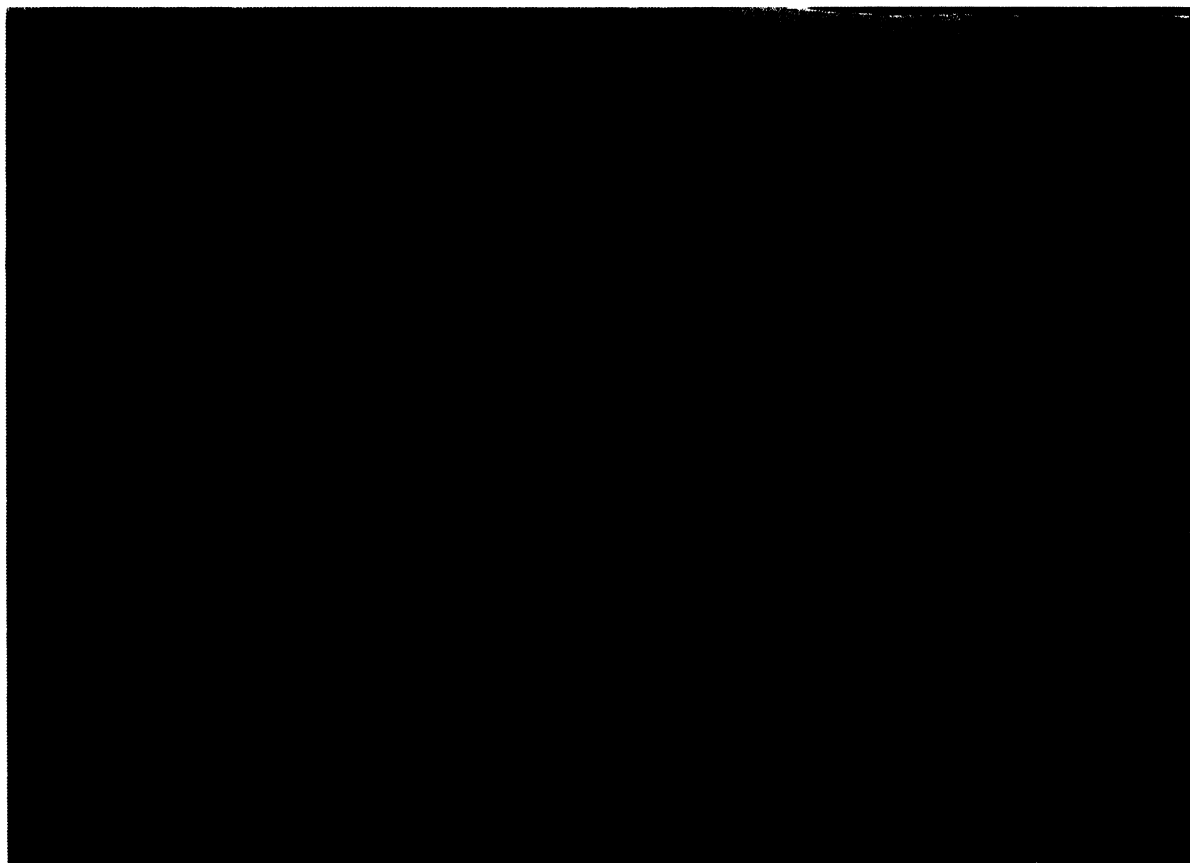
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Obrázek 3.3 Dělení pigmentoproteinových komplexů z chloroplastů kukuřice a standardních vzorků na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 7,92 % akrylamidu. Po obarvení.

Dráhy: 1–12 pigmentoproteinové komplexy, 13–15 BSA, 16–20 apoferritin, 21–24 katalasa.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Obrázek 3.4 Dělení pigmentoproteinových komplexů z chloroplastů kukuřice a standardních vzorků na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 6,93 % akrylamidu. Po obarvení.

Dráhy 1–5 a 20–24 pigmentoproteinové komplexy z kukuřice, 6–9 apoferritin, 10–13 BSA, 14–15 ovalbumin, 16–17 karboanhydrasa a 18–19 laktalbumin.

Tabulka 3.1 Monomer BSA (Mr 66 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,2186	0,00925	21,86	1,3397
8,91	0,2539	0,0054	25,39	1,4047
7,92	0,2963	0	29,63	1,4717
6,93	0,4768	0,0232	47,68	1,6783
5,94	0,7566	0,01997	75,66	1,8789

Tabulka 3.2 Dimer BSA (Mr 132 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce (n = 2–5).

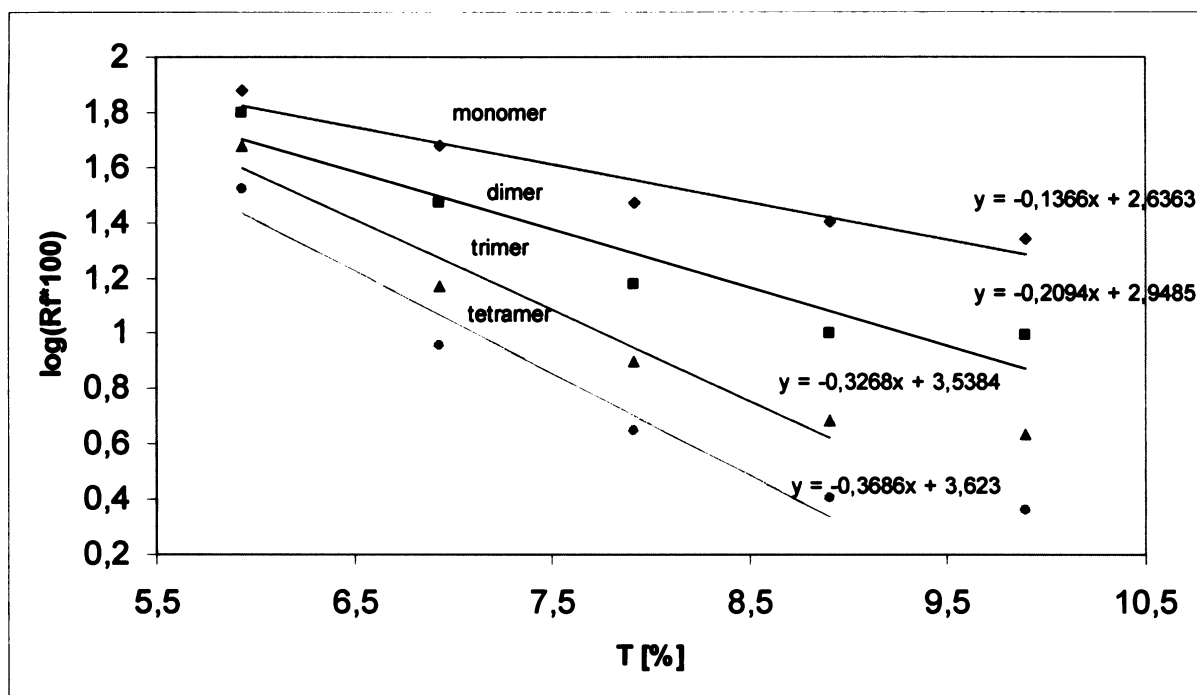
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,09917	0,01341	9,917	0,9964
8,91	0,10093	0,00307	10,093	1,004
7,92	0,1505	0,01431	15,05	1,1775
6,93	0,2982	0,00085	29,82	1,4745
5,94	0,6276	0,04293	62,76	1,7977

Tabulka 3.3 Trimer BSA (Mr 198 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce (n = 2–5).

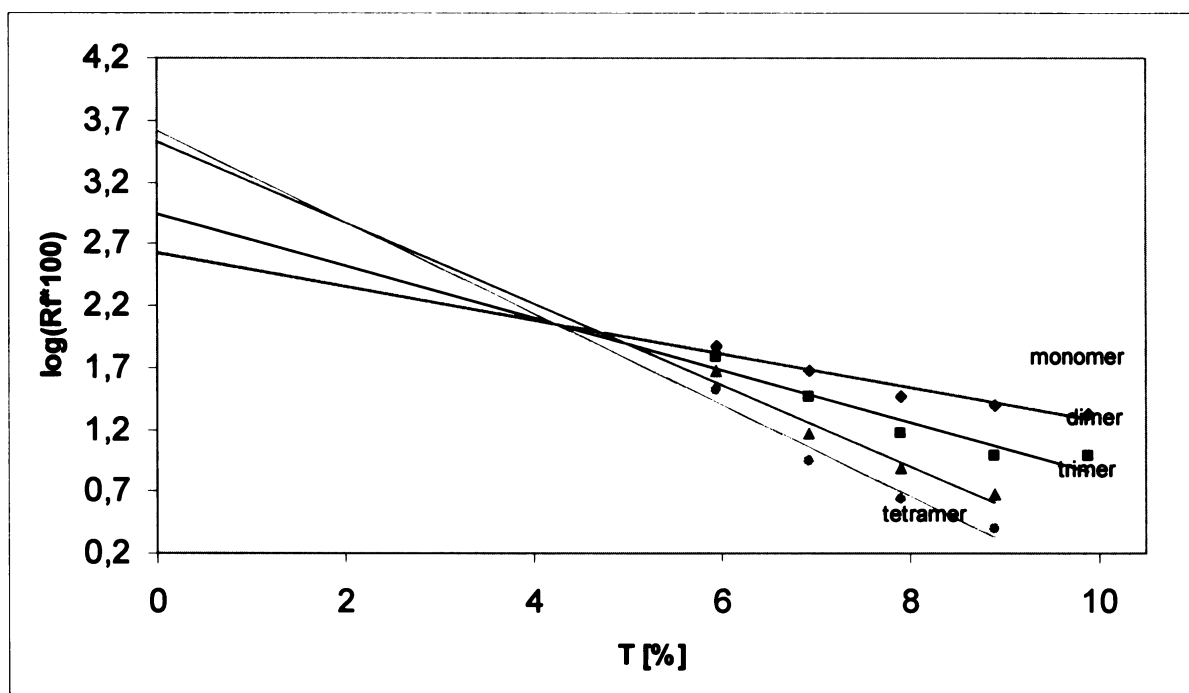
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,0434	0,005182	4,34	0,6375
8,91	0,04893	0,00045	4,893	0,6896
7,92	0,0804	0,01369	8,04	0,9053
6,93	0,1487	0,01629	14,87	1,1723
5,94	0,4777	0,03593	47,77	1,6792

Tabulka 3.4 Tetramer BSA (Mr 264 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce (n = 2–5).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,02299	0,002017	2,299	0,3615
8,91	0,02568	0,000985	2,568	0,4096
7,92	0,045	0,01465	4,5	0,6532
6,93	0,0908	0,003362	9,08	0,9581
5,94	0,3344	0,02505	33,44	1,5243



Obrázek 3.5 Fergusonův graf pro BSA při červené nativní elektroforéze.



Obrázek 3.6 Fergusonův graf pro BSA s použitím lineární regrese a protažením k ose y při červené nativní elektroforéze.

Tabulka 3.5 Monomer apoferritinu (Mr 450 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

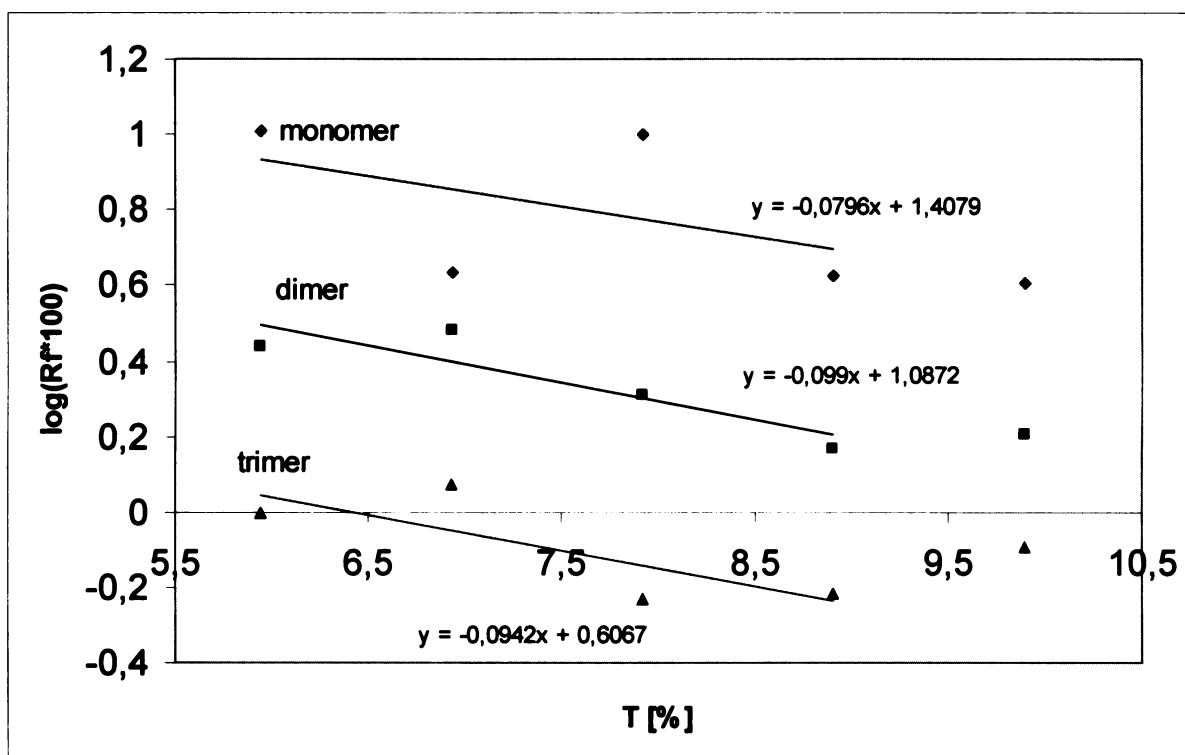
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,04032	0	4,032	0,6055
8,91	0,04223	0,00564	4,223	0,6256
7,92	0,09961	0,006195	9,961	0,9983
6,93	0,04312	0,00057	4,312	0,6347
5,94	0,1022	0,007706	10,22	1,0095

Tabulka 3.6 Dimer apoferritinu (Mr 900 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

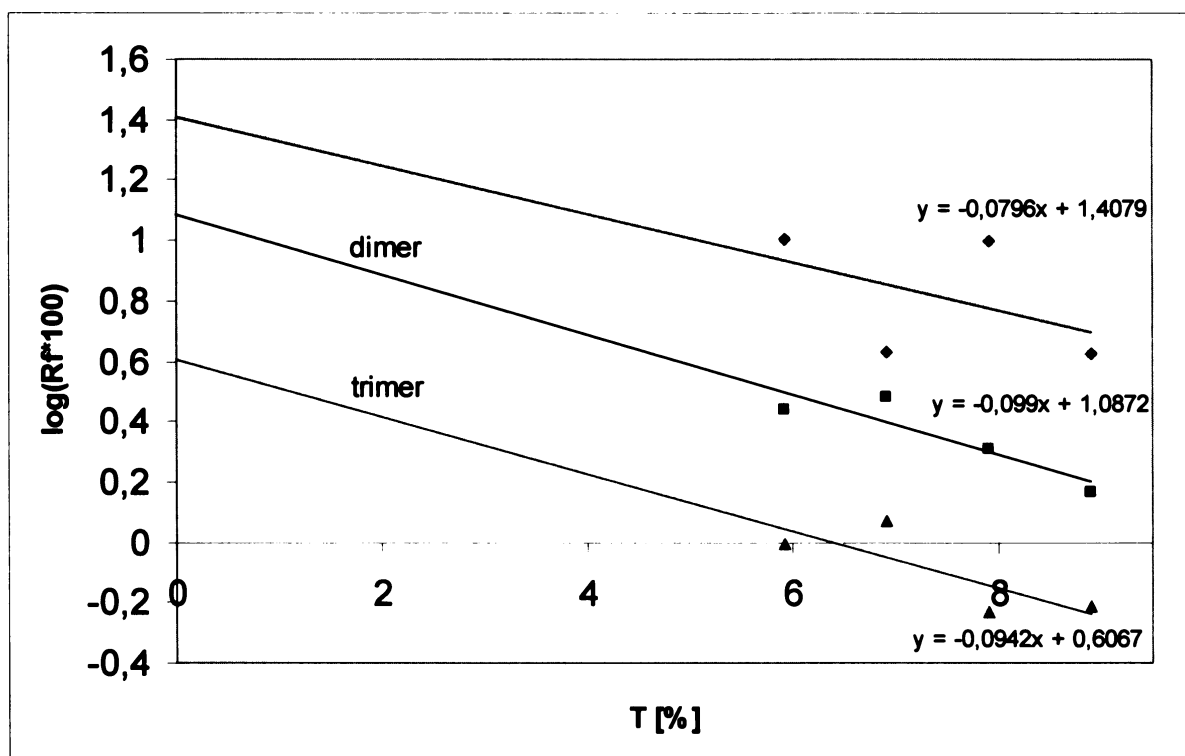
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,01613	0	1,613	0,2076
8,91	0,01484	0,002361	1,484	0,1714
7,92	0,02052	0,001408	2,052	0,3122
6,93	0,03058	0,00686	3,058	0,4854
5,94	0,02756	0,00389	2,756	0,4403

Tabulka 3.7 Trimer apoferritinu (Mr 1 350 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,008065	0	0,8065	-0,0934
8,91	0,006123	0,002616	0,6123	-0,213
7,92	0,005912	0,000417	0,5912	-0,2283
6,93	0,01186	0,002165	1,186	0,07409
5,94	0,00993	0,00022	0,993	-0,00305



Obrázek 3.7 Fergusonův graf pro apoferritin při červené nativní elektroforéze. Pohyblivost odpovídající 9,9 % akrylamidu a bisakrylamidu v gelu není do regrese zahrnuta v případě ani jednoho oligomeru apoferritinu, důvodem je odklon od linearity.



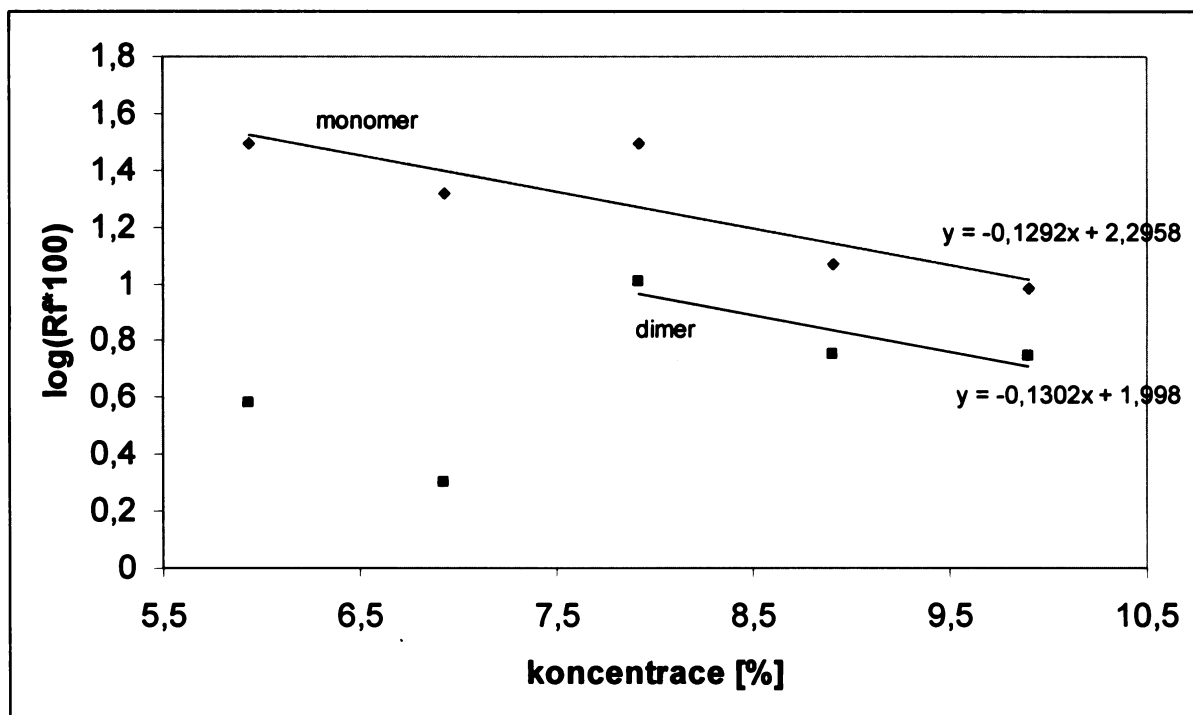
Obrázek 3.8 Fergusonův graf pro apoferritin při červené nativní elektroforéze. Za použití lineární regrese a s protažením k ose y

Tabulka 3.8 Monomer katalasa (Mr 250 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

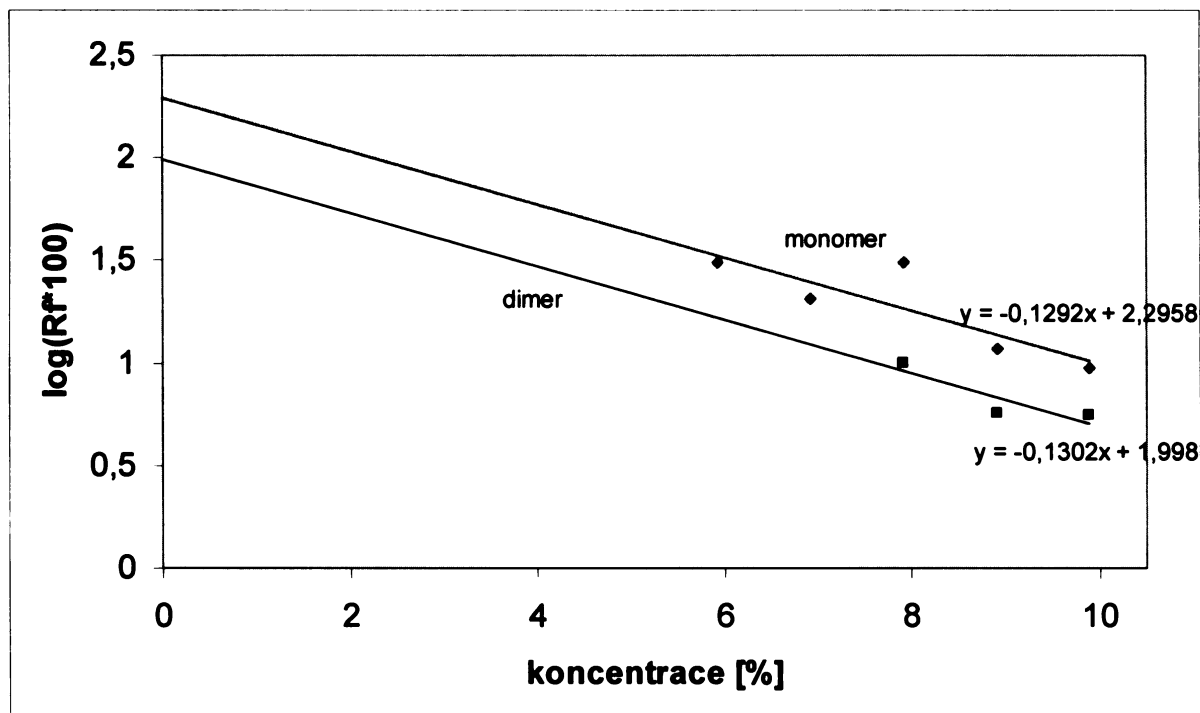
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,096	0	9,6	0,982271
8,91	0,1177	0,01278	11,77	1,070776
7,92	0,3117	0	31,17	1,493737
6,93	0,2088	0,069	20,88	1,31973
5,94	0,3142	0	31,42	1,497206

Tabulka 3.9 Dimer katalasa (Mr 500 kDa) při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,05617	0,00017	5,617	0,749504
8,91	0,05712	0,01088	5,712	0,756788
7,92	0,1017	0,00875	10,17	1,007321
6,93	0,02012	0,003985	2,12	0,303628
5,94	0,03859	0	3,859	0,586475



Obrázek 3.9 Fergusonův graf pro katalasu při červené nativní elektroforéze. Data získaná pro koncentraci 5,94 a 6,93 % nejsou zý důvodu výrazného odklonu brána v úvahu při dalším vyhodnocování.



Obrázek 3.10 Fergusonův graf pro katalasu s protažením k ose y při červené nativní elektroforéze.

Tabulka 3.10 Pigmentoproteinový komplex A při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,05462	0,0036	5,462	0,7374
8,91	0,06531	0,00101	6,531	0,8150
7,92	0,1149	0,00375	11,49	1,0603
6,93	0,1252	0,005907	12,52	1,0976
5,94	0,3107	0	31,07	1,4923

Tabulka 3.11 Pigmentoproteinový komplex B při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,03587	0,002494	3,587	0,5547
8,91	0,04784	0,004435	4,784	0,6798
7,92	0,07529	0,001215	7,529	0,8767
6,93	0,1012	0,007598	10,12	1,0052
5,94	0,2276	0,0043	22,76	1,3572

Tabulka 3.12 Pigmentoproteinový komplex C při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,02439	0,1046	2,439	0,3872
8,91	0,03431	0,00205	3,431	0,5354
7,92	0,05247	0,007519	5,247	0,7199
6,93	0,06024	0	6,024	0,7799
5,94	0,165	0,0097	16,5	1,2175

Tabulka 3.13 Pigmentoproteinový komplex D při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

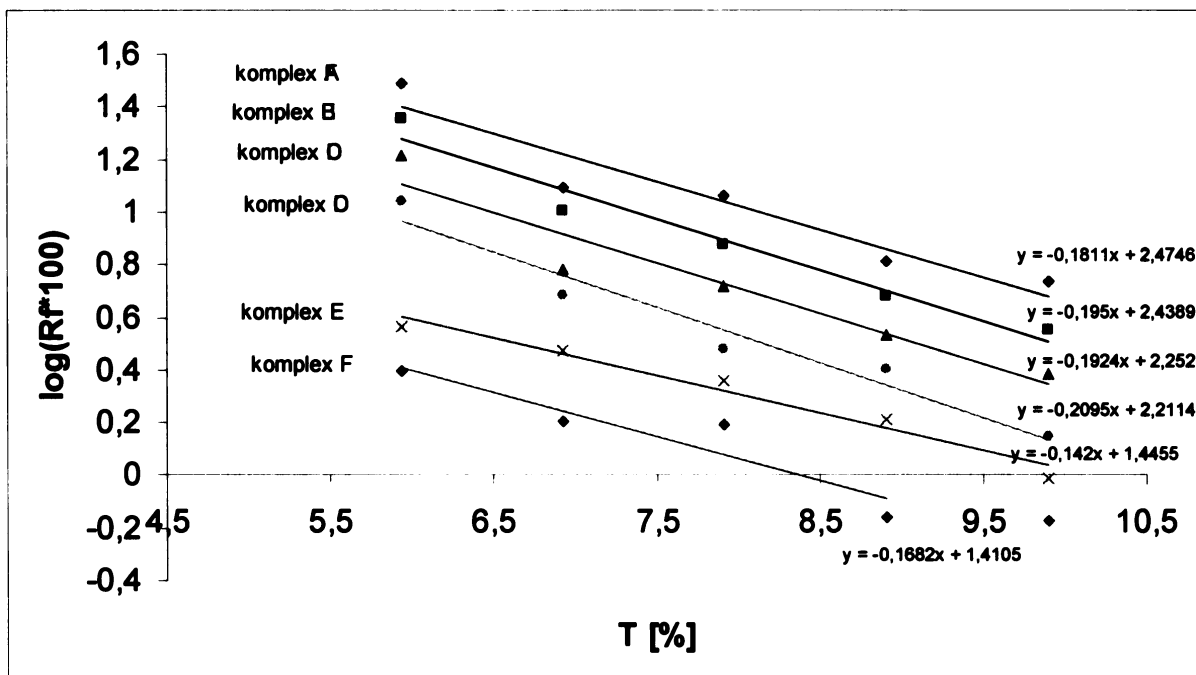
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,01405	0,001154	1,405	0,1477
8,91	0,02535	0,003686	2,535	0,4040
7,92	0,03013	0,00266	3,013	0,4790
6,93	0,04845	0,002883	4,845	0,6853
5,94	0,1107	0,009082	11,07	1,0441

Tabulka 3.14 Pigmentoproteinový komplex E při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

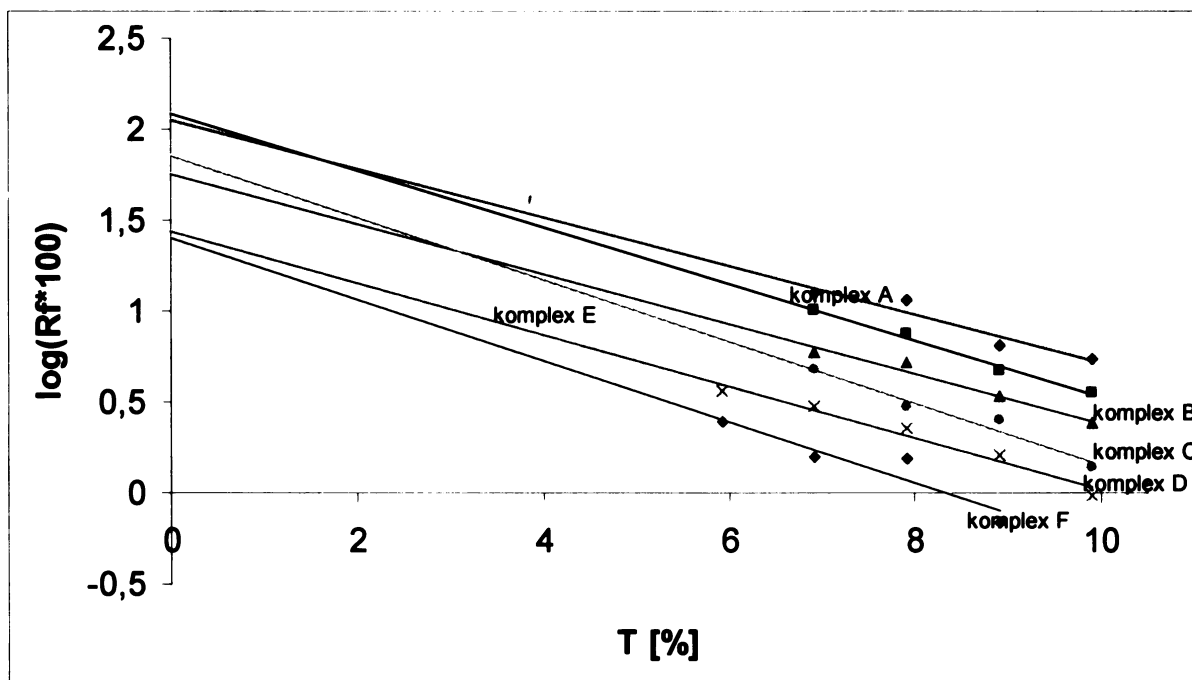
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,009795	0,000405	0,9795	-0,0090
8,91	0,01635	0,003378	1,635	0,2135
7,92	0,02284	0,001307	2,284	0,3587
6,93	0,02999	0,002487	2,999	0,4770
5,94	0,03651	0,002325	3,651	0,5624

Tabulka 3.15 Pigmentoproteinový komplex F při RN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,006777	0,001675	0,6777	-0,1690
8,91	0,007005	0,003038	0,7005	-0,1546
7,92	0,01571	0,002836	1,571	0,1962
6,93	0,01613	0	1,613	0,2076
5,94	0,02493	0,001775	2,493	0,3967



Obrázek 3.11 Fergusonův graf pro pigmentoproteinové komplexy z kukuřice při červené nativní elektroforéze. Z obrázku je patrné, že v případě komplexu F nebyla do lineární regrese zahrnuta hodnota pohyblivosti 9,9 % a to z důvodu odklonu od linearity.



Obrázek 3.12 Fergusonův graf pro pigmentoproteinové komplexy z kukuřice při červené nativní elektroforéze.

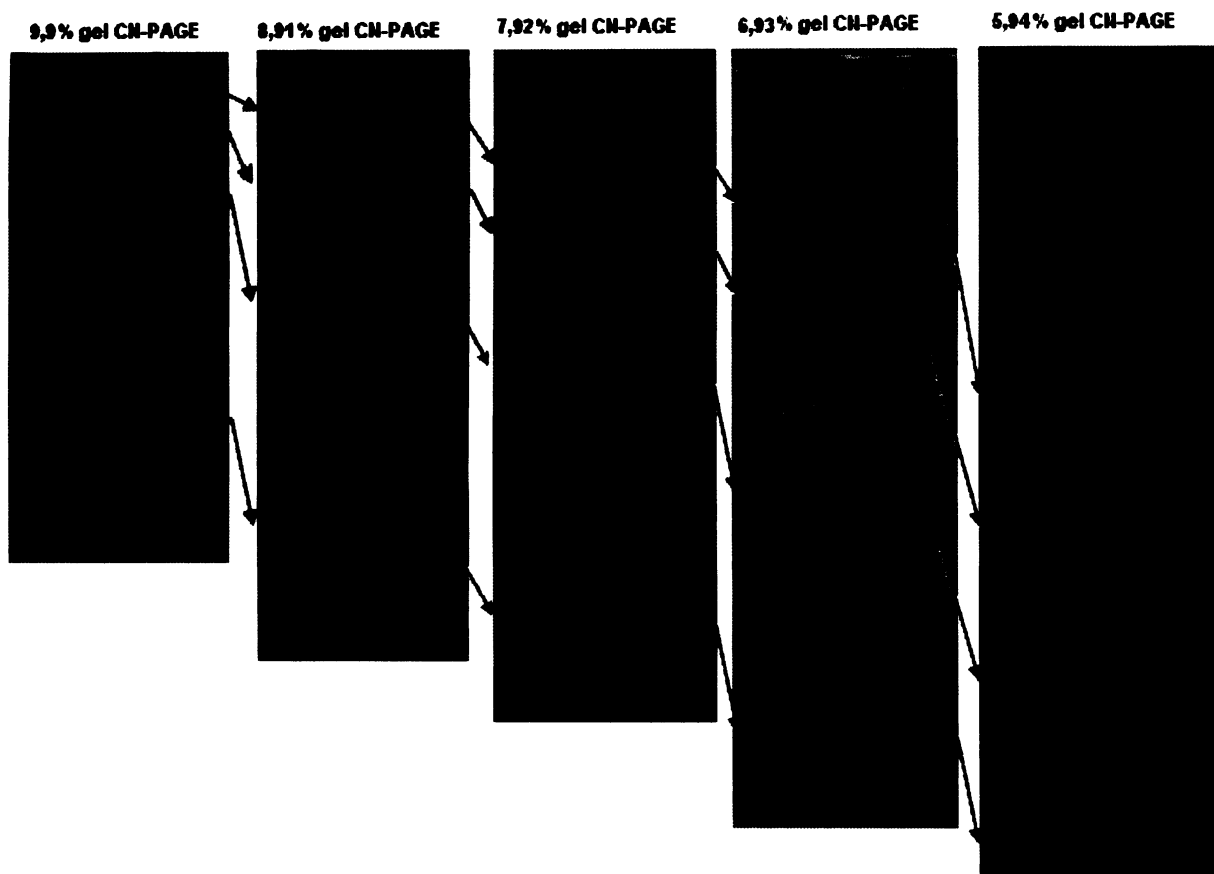
3.2 Bezbarvá nativní elektroforéza

Metodu bezbarvé nativní elektroforézy jsem ve své práci využila pro srovnání chování pigmentoproteinových komplexů kukuřice a použitých standardů. Výsledky jsem srovnávala s výsledky z „červené“ nativní elektroforézy, ty jsou uvedeny v kapitole 3.1. Elektroforéza probíhala za podmínek popsanych v kapitole 2.6.2.2. Stejně jako v případě RN-PAGE jsem vycházela z pěti dobře interpretovatelných gelů od každé koncentrace (9,9; 8,91; 7,92; 6,93 a 5,94 %) a výsledky zpracovávala způsobem popsáním v kapitole 1.9.3.



Obrázek 3.13 Dělení pigmentoproteinových komplexů z chloroplastů kukuřice a standardních vzorků na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 9,9 % akrylamidu. Po bezbarvé nativní elektroforéze a před obarvením.

Dráhy: 1–12 pigmentoproteinové komplexy, 13–24 standardy.



Obrázek 3.14 Srovnání dělení standardního vzorku BSA na různě koncentrovaných gelech během bezbarvé nativní elektroforézy . V každém pruhu je nejnižší položený vždy monomer, směrem nahoru následuje dimer, trimer a tetramer.

Tabulka 3.16 Monomer BSA (66 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	$R_f \cdot 100$	$\text{Log}(R_f \cdot 100)$
9,9	0,5766	0,02133	57,66	1,760875
8,91	0,7222	0,04141	72,22	1,858657
7,92	0,8284	0,02104	82,84	1,91824
6,93	0,9346	0,02527	93,46	1,970626
5,94		Putoval s čelem		

Tabulka 3.17 Dimer BSA (132 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

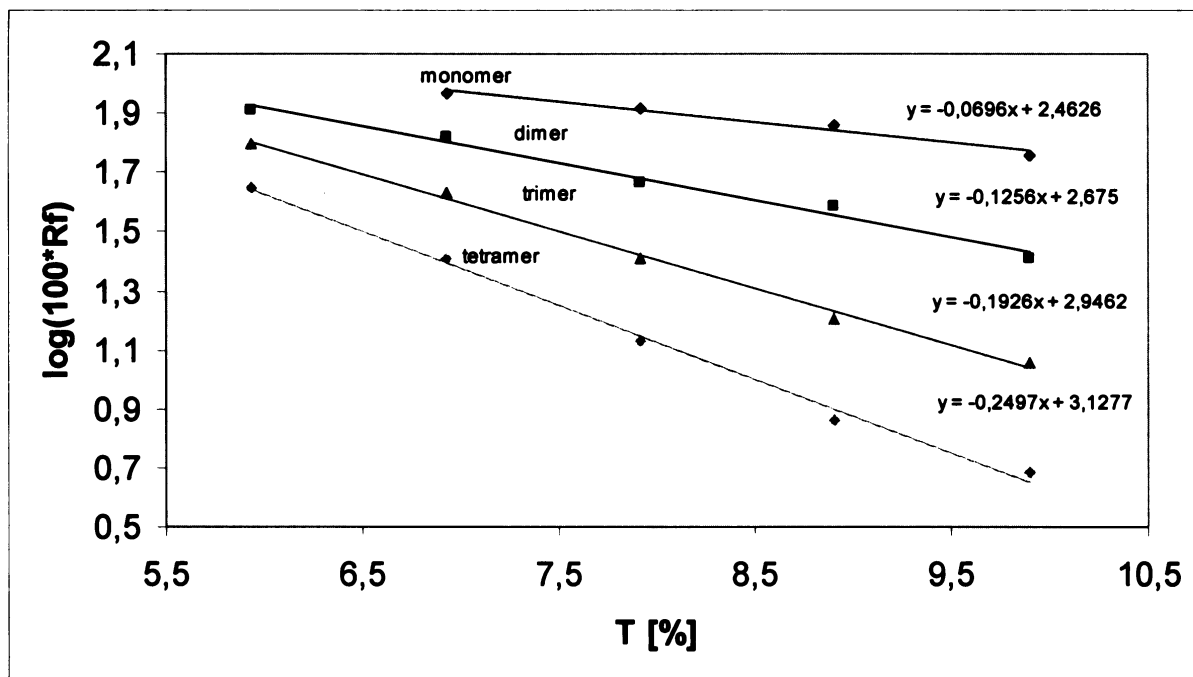
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,2562	0,06024	25,62	1,408579
8,91	0,3871	0,03583	38,71	1,587823
7,92	0,4677	0,03423	46,77	1,669967
6,93	0,6589	0,05175	65,89	1,81882
5,94	0,8221	0,03654	82,21	1,914925

Tabulka 3.18 Trimer BSA (198 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

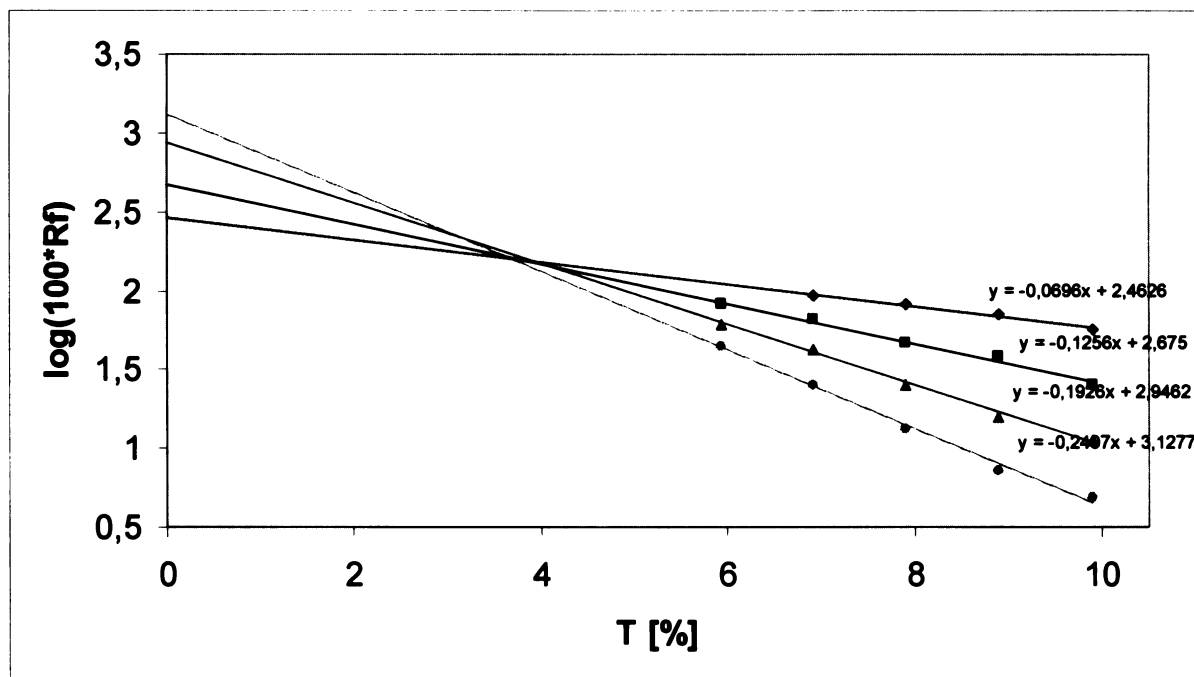
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,1141	0,027	11,41	1,057286
8,91	0,1606	0,02815	16,06	1,205746
7,92	0,2577	0,02759	25,77	1,411114
6,93	0,4293	0,04574	42,93	1,632761
5,94	0,6268	0,05872	62,68	1,797129

Tabulka 3.19 Tetramer BSA (264 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,04895	0,005012	4,895	0,689753
8,91	0,07328	0,009491	7,328	0,864985
7,92	0,1348	0,0194	13,48	1,12969
6,93	0,2577	0,04537	25,77	1,411114
5,94	0,4497	0,04831	44,97	1,652923



Obrázek 3.15 Fergusonův graf pro BSA při bezbarvé nativní elektroforéze. Monomer BSA se díky své velikosti pohyboval s čelem a z toho důvodu se závislost pro tento oligomer skládá ze čtyř bodů.



Obrázek 3.16 Fergusonův graf pro BSA při CN-PAGE s protažením k ose y při bezbarvé nativní elektroforéze.

Tabulka 3.20 Monomer apoferritinu (Mr 450 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

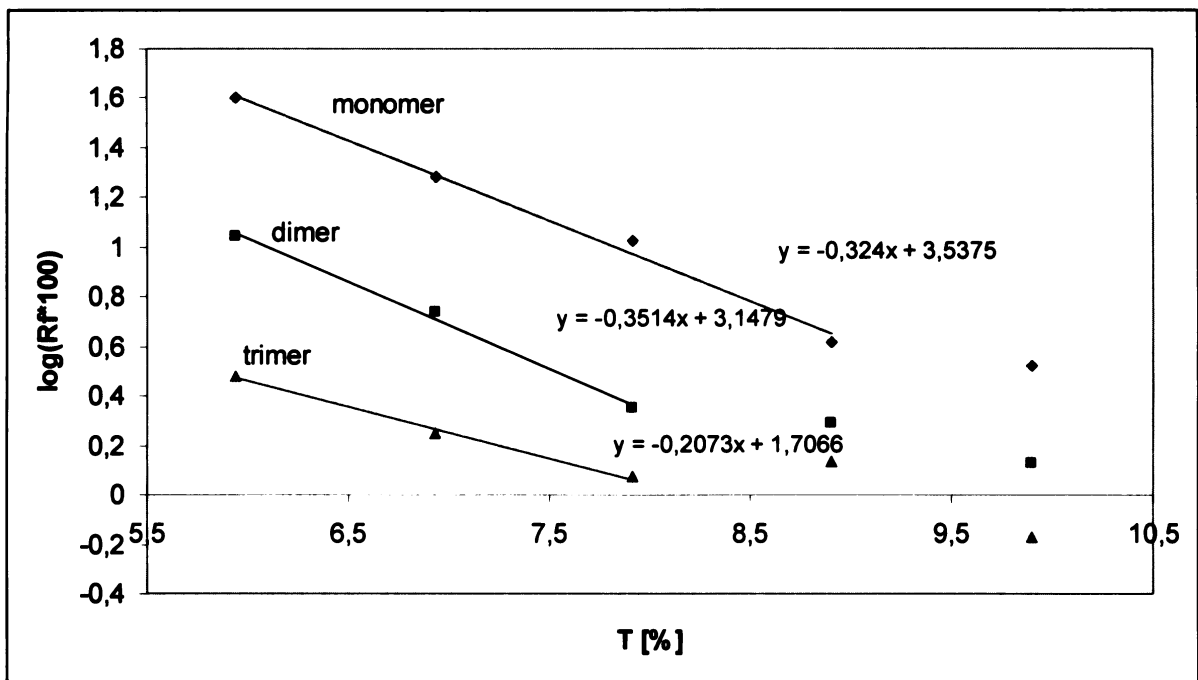
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,03333	0,00439	3,333	0,522835
8,91	0,0414	0,001906	4,14	0,617
7,92	0,1062	0,003544	10,62	1,026125
6,93	0,1927	0,03283	19,27	1,284882
5,94	0,398	0,05876	39,8	1,599883

Tabulka 3.21 Dimer apoferritinu (Mr 900 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

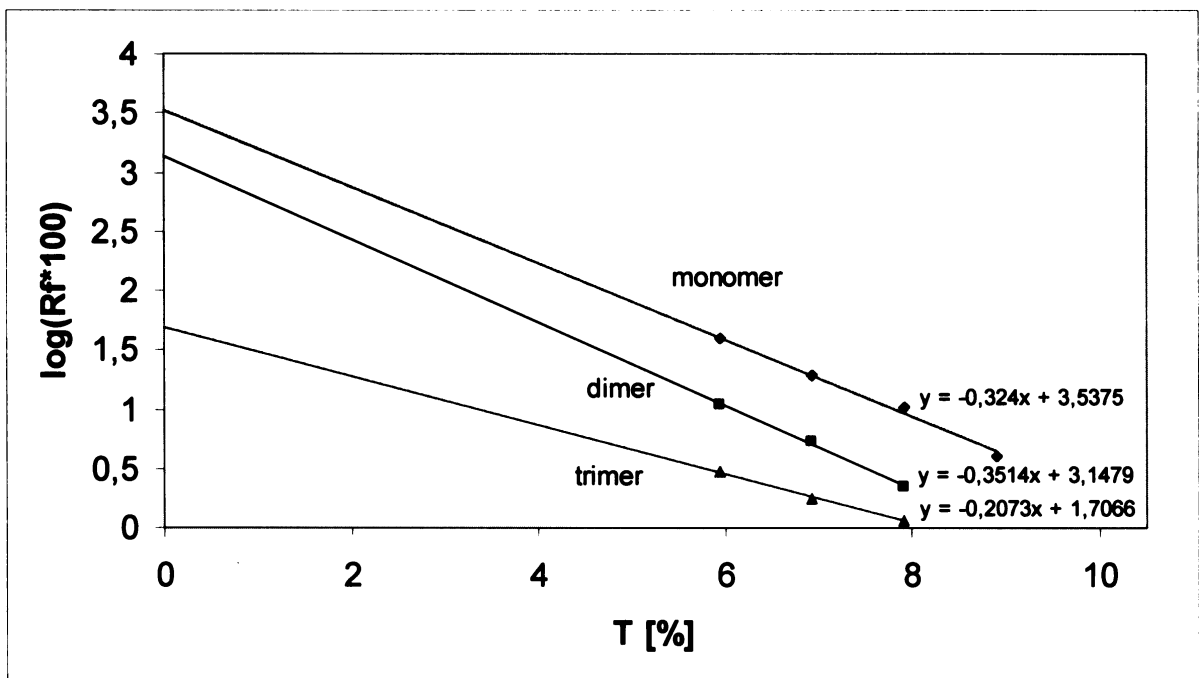
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,01355	0,00077	1,355	0,131939
8,91	0,01973	0,00036	1,973	0,295127
7,92	0,02253	0,003364	2,253	0,352761
6,93	0,05467	0,005819	5,467	0,737749
5,94	0,1118	0,02037	11,18	1,048442

Tabulka 3.22 Trimer apoferritinu (Mr 1 350 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,006819	0,000325	0,6819	-0,16628
8,91	0,01362	0,001513	1,362	0,134177
7,92	0,01186	0,000872	1,186	0,074085
6,93	0,01782	0,005067	1,782	0,250908
5,94	0,03052	0,007164	3,052	0,484585



Obrázek 3.17 Fergusonův graf pro apoferritin při bezbarvé nativní elektroforéze.



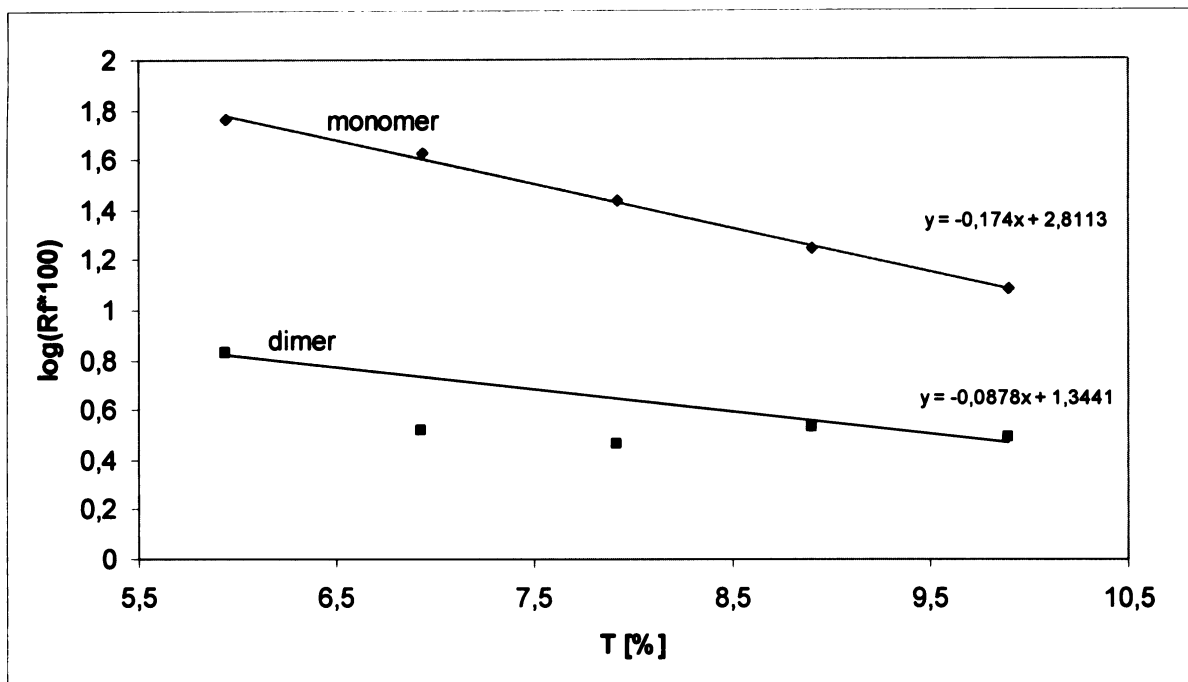
Obrázek 3.18 Fergusonův graf pro apoferritin s použitím lineární regrese a protažením k ose y při bezbarvé nativní elektroforéze.

Tabulka 3.23 Monomer katalasy (Mr 250 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

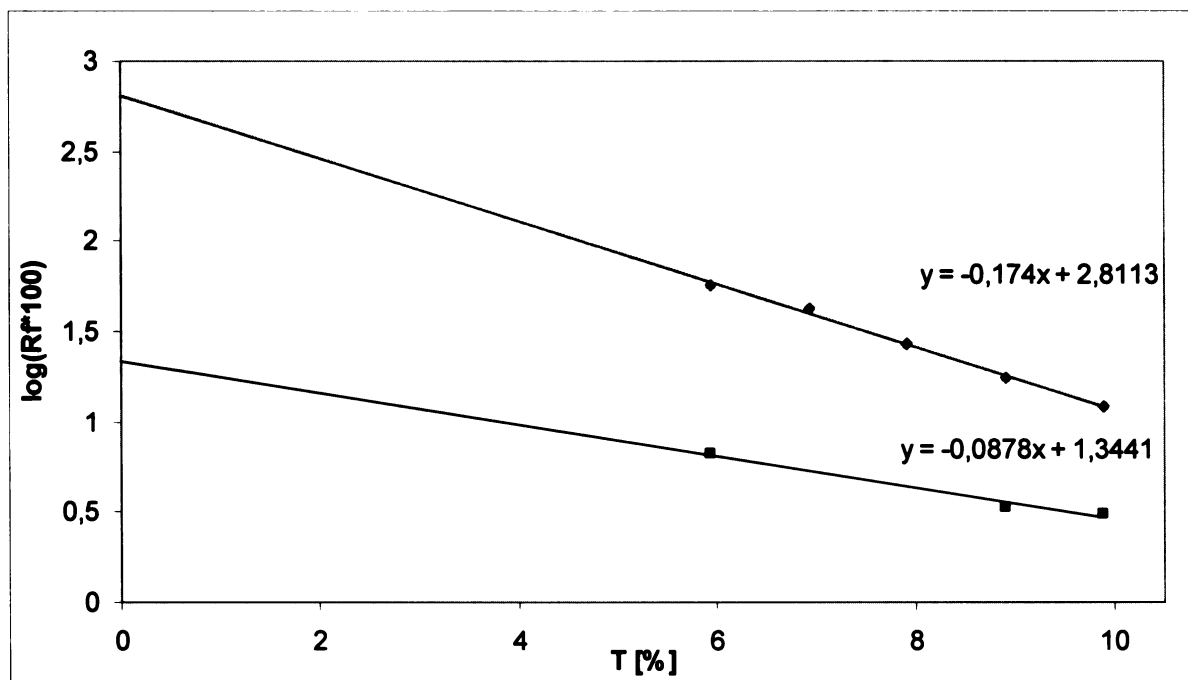
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,1227	0,01444	12,27	1,088845
8,91	0,178	0,005723	17,8	1,25042
7,92	0,2741	0,03139	27,41	1,437909
6,93	0,4259	0,04514	42,59	1,629308
5,94	0,5762	0,0366	57,62	1,760573

Tabulka 3.24 Dimer katalasy (Mr 500 kDa) při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchytky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,0313	0,001465	3,13	0,495544
8,91	0,03416	0,006682	3,416	0,533518
7,92	0,02945	0,002256	2,945	0,469085
6,93	0,03302	0,002933	3,302	0,518777
5,94	0,06751	0,007658	6,751	0,829368



Obrázek 3.19 Fergusonův graf pro katalasu při bezbarvé nativní elektroforéze. V případě dimeru katalasy nejsou do regrese započítány body odpovídající koncentraci 6,93 a 7,92 % akrylamidu s bisakrylamidem.



Obrázek 3.20 Fergusonův graf pro katalasu s použitím lineární regrese a s protažením k ose y při bezbarvé nativní elektroforéze. Pohyblivosti odpovídající koncentraci gelu 6,93 a 7,92 % jsem do regrese nezahrnula.

Tabulka 3.25 Pigmentoproteinový komplex B při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,1645	0,02292	16,45	1,216166
8,91	0,1387	0,0247	13,87	1,142076
7,92	0,2639	0,004518	26,39	1,421439
6,93	0,3575	0,02459	35,75	1,553276
5,94	0,5218	0,01612	52,18	1,717504

Tabulka 3.26 Pigmentoproteinový komplex C při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

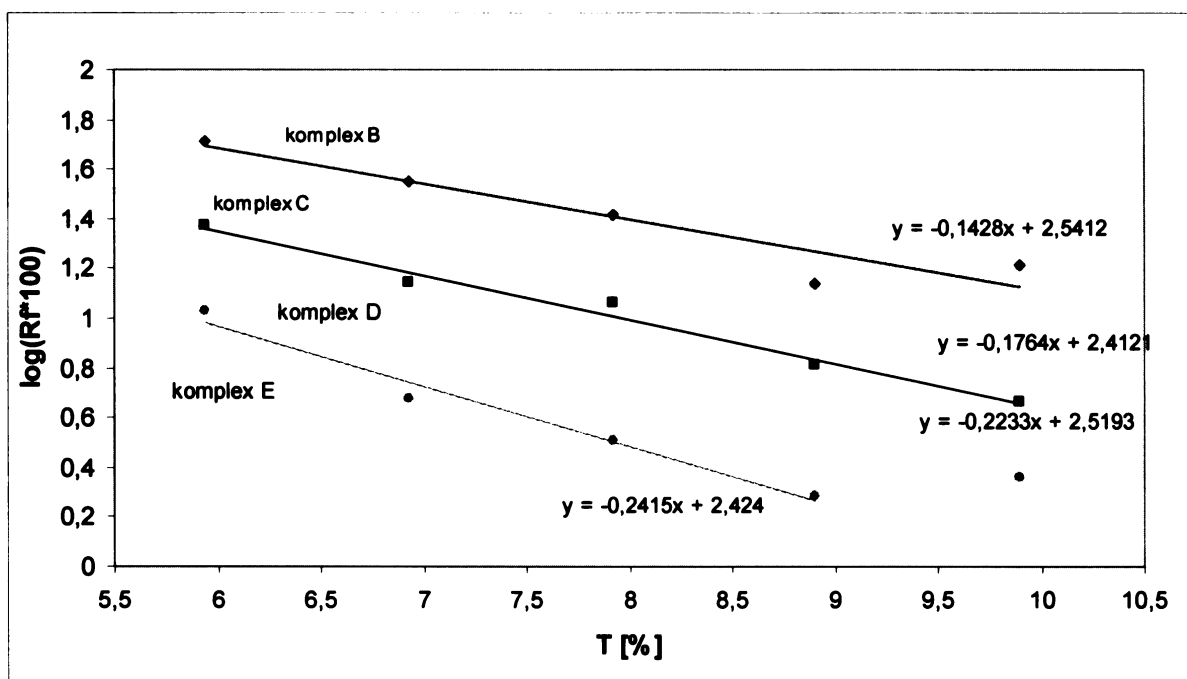
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,1645	0,003471	16,45	1,216166
8,91	0,1387	0,009667	13,87	1,142076
7,92	0,2639	0,008631	26,39	1,421439
6,93	0,3575	0,01005	35,75	1,553276
5,94	0,5218	0,000698	52,18	1,717504

Tabulka 3.27 Pigmentoproteinový komplex D při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

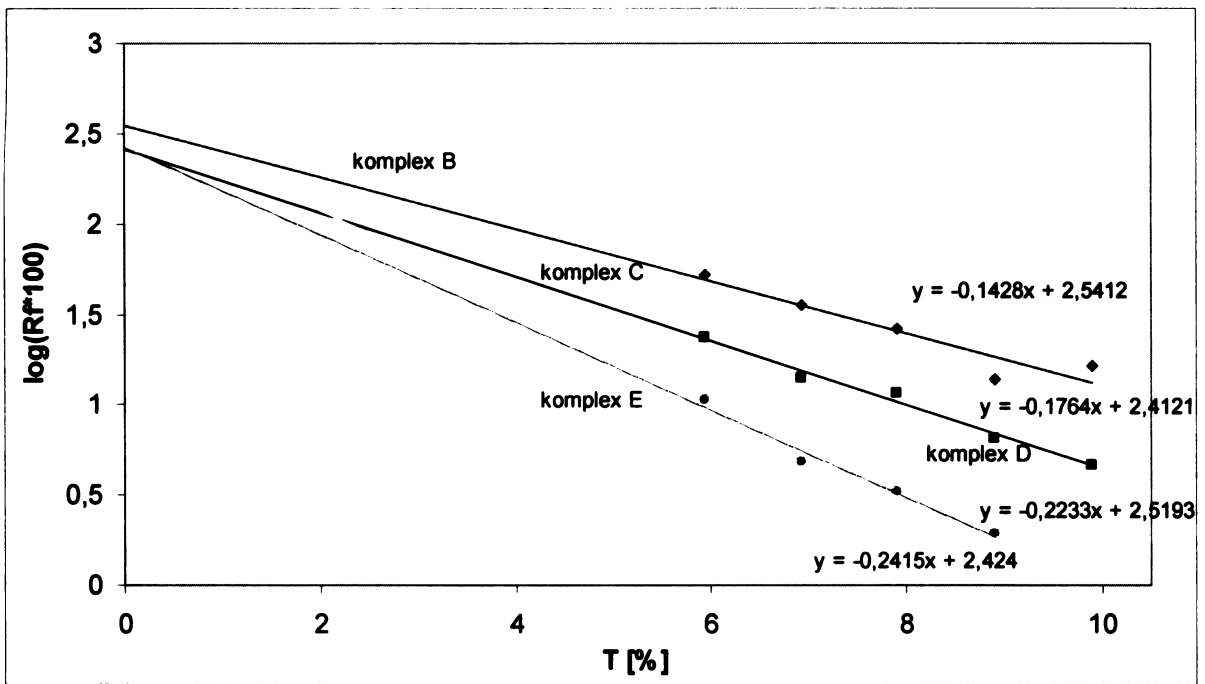
<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	R_f*100	$\text{Log}(R_f*100)$
9,9	0,03612	0,002294	3,612	0,557748
8,91	0,03134	0,003719	3,134	0,496099
7,92	0,06683	0,001393	6,683	0,824971
6,93	0,08419	0,01071	8,419	0,925261
5,94	0,1583	0,005882	15,83	1,199481

Tabulka 3.28 Pigmentoproteinový komplex E při CN-PAGE. Hodnoty retenčních faktorů při pěti zvolených koncentracích pro sestavení Fergusonova grafu. Sloupec s označením S_R obsahuje směrodatné odchylky od průměrné hodnoty retenčních faktorů uvedených v tabulce ($n = 2-5$).

<i>koncentrace %</i>	<i>Retenční faktor</i>	S_R	$R_f \cdot 100$	$\text{Log}(R_f \cdot 100)$
9,9	0,0233	0,00396	2,33	0,367356
8,91	0,01955	0,001181	1,955	0,291147
7,92	0,03283	0,001919	3,283	0,516271
6,93	0,04818	0,006372	4,818	0,682867
5,94	0,1078	0,006451	10,78	1,032619



Obrázek 3.21 Fergusonův graf pro pigmentoproteinové komplexy při bezbarvé nativní elektroforeze. V případě komplexů D a E nejsou do regrese zahrnuty body 9,9 a 8,91 %.



Obrázek 3.22 Fergusonův graf pro pigmentoproteinové komplexy kukuřice při bezbarvé nativní elektroforéze.

3.3 Fotochemická aktivita PSII

Fotochemickou aktivitu fotosystému II jsem stanovila postupem popsáním v kapitole 2.5. Stanovení jsem prováděla pro porovnání aktivity fotosystému II ve vzorcích před a po červené nativní elektroforéze. Na základě toho jsem se snažila zjistit, zda dojde během elektroforetického dělení k zachování fotochemické aktivity či nikoliv. Každé měření jsem prováděla třikrát, výslednou hodnotu jsem získala z jejich aritmetického průměru a vypočítáním směrodatné odchylky.

Tabulka 3.29 Fotochemická aktivita vzorku před a po elektroforéze. Vzorky jsou jednotlivé alikvoty získané z jedné izolace. Aktivita je vztažená na množství chlorofylu přidávaného do reakční směsi, takže hodnoty jsou pouze ilustrativní. Aktivitu fotosystému II z gelu jsem stanovila proto, abych zjistila, zda dochází během dělení k jejímu zachování či nikoliv. Reálná hodnota vztažená na množství chlorofylu tedy není podstatná. Hodnoty fotochemické aktivity v nepřítomnosti DCP nejsou v tabulce uvedeny. Důvodem byl nepatrný pokles absorbance.

vzorek	<i>Fotoredukce DCPIP</i> <i>[H₂O→DCPIP]</i>	<i>Fotoredukce DCPIP</i> <i>[DCP→DCPIP]</i>	<i>Fotoredukce DCPIP</i> <i>[DCP→DCPIP]</i>
	$\mu\text{molDCPIP}_{red}/20\mu\text{g}_{chlor.}\cdot\text{hod}$	$\mu\text{molDCPIP}_{red}/20\mu\text{g}_{chlor.}\cdot\text{hod}$	$\mu\text{molDCPIP}_{red}/\text{hod}$ <i>Po elfo z gelu</i>
1	–	10,9±14,44	4,87
2	–	10,84±1,67	5,61

Tabulka 3.30 Hodnoty fotochemické aktivity fotosystému II po centrifugaci v hustotním gradientu (9,1–28,6% sacharosy) měřené Clarkovou kyslíkovou elektrodou. Vzorek izolovaných chloroplastů kukuřice.

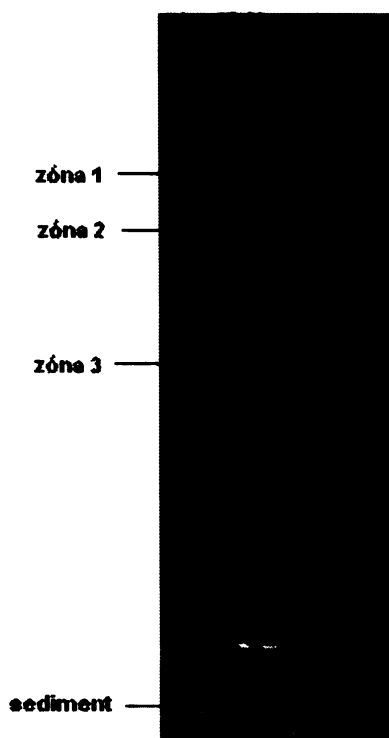
vzorek	<i>Fotoredukce DCPIP</i> <i>[H₂O→PBQ]</i>
	$\mu\text{molO}_{2red}/10\mu\text{g}_{chlor.}\cdot\text{hod}$
Zóna 1	8,349
Zóna 2	4,554

Tabulka 3.31 Hodnoty fotochemické aktivity fotosystému II po centrifugaci v hustotním gradientu (6,825–21,45 % sacharosy) měřené Clarkovou kyslíkovou elektrodou.

<i>vzorek</i>	<i>Fotoredukce DCPIP [H₂O→PBQ] μmolO_{2red}/10μg_{chlor}.hod</i>
Zóna 1	7,654
Zóna 2	1,531

3.4 Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy

Izolované chloroplasty z listů kukuřice jsem podrobila centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy. Princip a postup je popsán v kapitole 2.7. Cílem bylo oddělit oba fotosystémy a ty následně podrobit červené nativní elektroforéze. Vzhledem k malému množství získaných zón se mi nepodařilo jejich zahustění tak, aby množství nanesené na elektroforézu bylo po obarvení viditelné. V případě zóny jedna a dvě jsem měřila jejich fotochemickou aktivitu, abych zjistila, o jaký z fotosystémů se jedná. Výsledky měření fotochemických aktivit jednotlivých zón měřených Clarkovou elektrodou jsou uvedeny v tabulce 3.30 a 3.31.



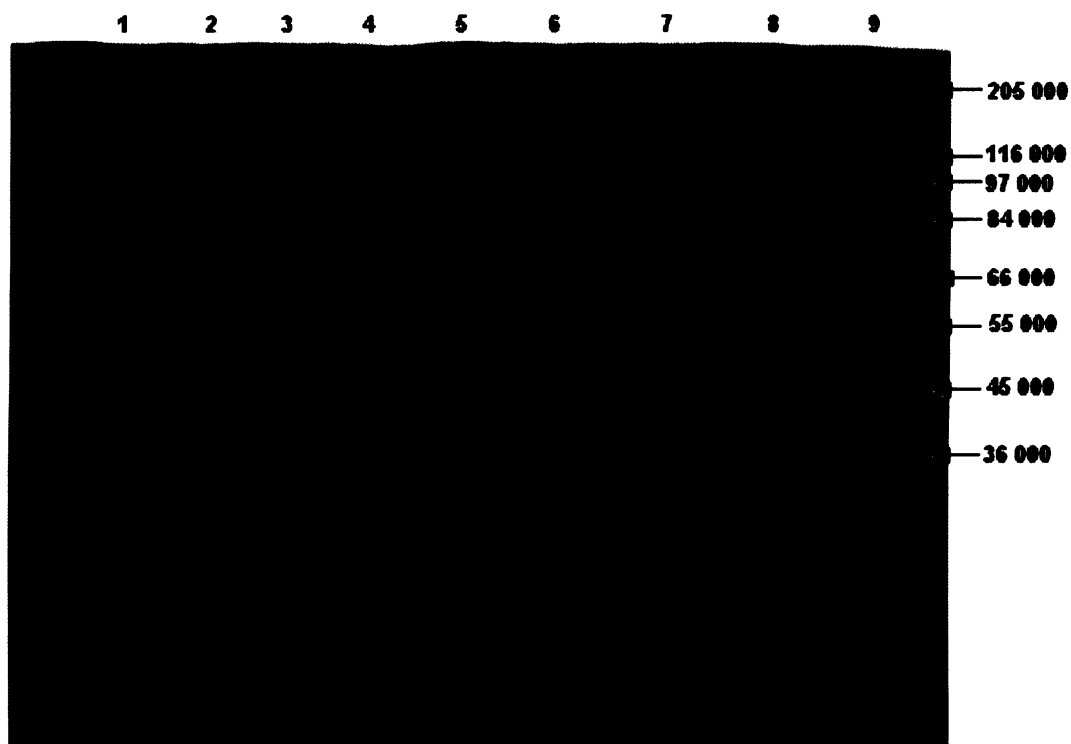
Obrázek 3.23 Kyveta s jednotlivými zónami po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy.

3.5 Reeлектрофорэза в прѣтомности SDS

Po proběhnutí červené nativní elektroforézy na gelu o koncentraci T = 9,9 % jsem okem patrné zelené zóny podrobila reelektroforéze v přítomnosti SDS. Důvodem byla identifikace jednotlivých pigmentoproteinových komplexů. Konkrétně se jednalo o tři výrazné zóny. Reeлектрофорэза probíhala za podmínek popsaných v kapitole 2.6.3. Abych zachytila i malé množství dělených proteinů, po proběhnutí elektroforézy jsem gely barvila stříbrem (obrázek 3.23).

Tabulka 3.32 Relativní molekulové hmotnosti thylakoidních membrán kukuřice separované reelektroforézou. Barevné odlišení vyjadřuje pravděpodobnou příslušnost k jednotlivým fotosystémům, světlezelená PSI a tmavě zelená PSII.

<i>Proužek</i>	<i>1.</i>	<i>2.</i>	<i>3.</i>
	80	84	82
	70	73	73
Relativní	33	58	55
molekulová	14	48	46
hmotnost		35	40
kDa			33
			25

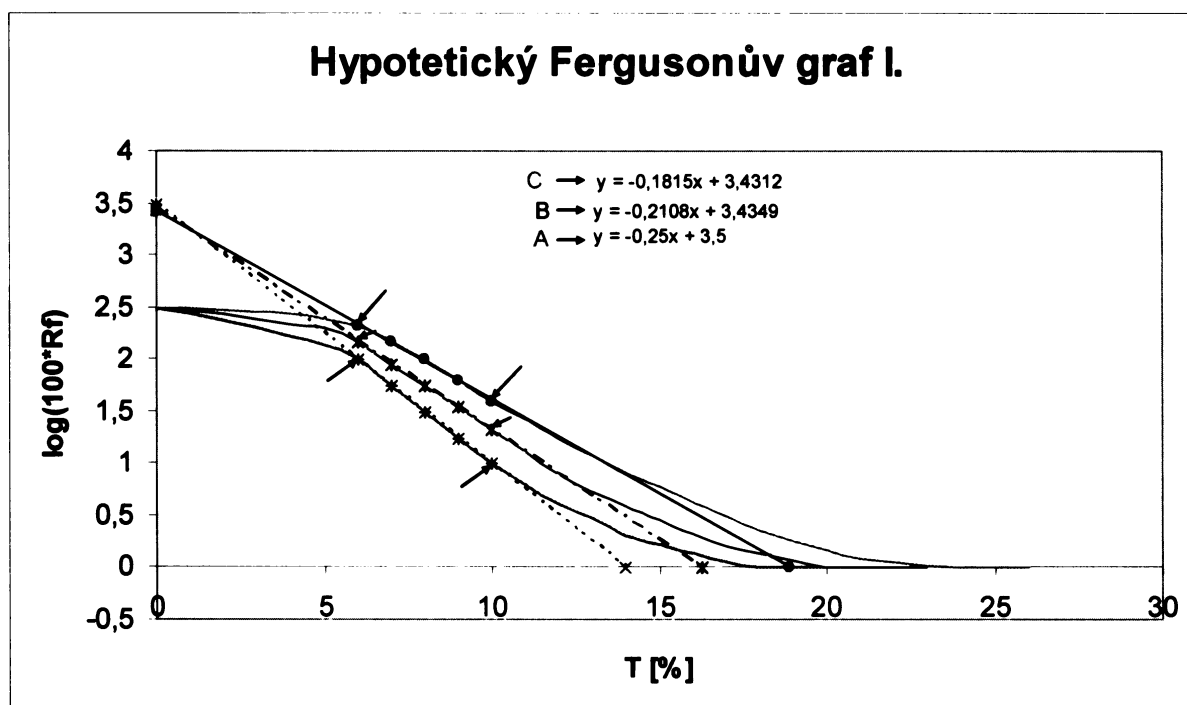


Obrázek 3.24 SDS reelektroforéza po červené nativní elektroforéze, barveno stříbrem. Dráhy: 1–2 obsahuje třetí, tedy nejnižše položený širší pruh v červeném gelu; 4–5 druhý viditelný zelený pruh; 6–7 první tedy nejpomaleji putující komplex na červené nativní elektroforéze, 8 volná, 9 standard pro SDS elektroforézu.

4 Diskuse

Tato diplomová práce se zabývá dvěma nativními elektroforetickými metodami, „červenou“ a bezbarvou nativní elektroforézou při studiu fotosyntetických pigmentoproteinových komplexů kukuřice, *Zea mays*.

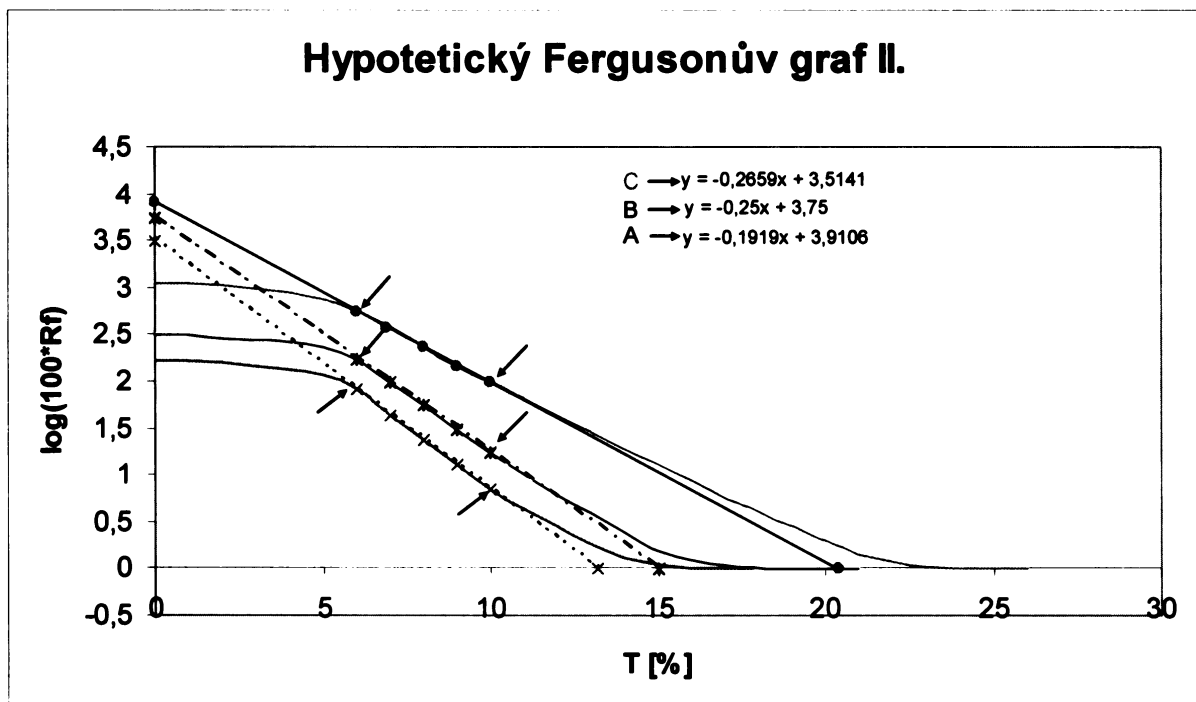
Zabývala jsem se mimo jiné otázkou, zda se při červené nativní elektroforéze molekuly dělí pouze na základě molekulové hmotnosti a nebo se při dělení uplatňují i jiné, pro daný protein charakteristické a přirozené vlastnosti, jako je například jeho náboj, velikost nebo tvar. Pro pochopení významu této metody je velice důležitá skutečnost, že se jedná o nativní elektroforézu, tedy nástroj k dělení proteinů v jejich přirozeném stavu. Při vyhodnocování a interpretaci získaných dat jsem vycházela z tzv. Fergusonových grafů [44]. Na základě znalosti těchto závislostí jsem sestavila hypotetické grafy, které simulují obě možnosti. Tedy případ, kdy se molekuly dělí podle své molekulové hmotnosti a případ, kdy se na dělení uplatňují i jiné faktory.



Graf 4.1 Hypotetický Fergusonův graf, kde se dělené bílkoviny pohybují nepřímo úměrně své molekulové hmotnosti. Šipkami je označena oblast, zůstávající lineární i v reálném systému. Označení A, B, C náleží bílkovinám či jejich komplexům s látkami nebilkovinné povahy.

Z grafu je patrné, že v případě volné pohyblivosti, tedy stavu, kdy je koncentrace akrylamidu nulová, mají všechny molekuly stejný $\log(100R_f)$ a tedy se i pohybují stejnou rychlostí. Což vlastně znamená, že tyto molekuly, bez ohledu na velikost, jsou nositeli stejně velkého náboje na jednotku hmotnosti. Se zvyšující se koncentrací akrylamidu v systému

dochází ke stále většímu uplatňování odporu prostředí a tedy i molekulové hmotnosti separovaných molekul. Tím se vysvětluje rozchod jednotlivých přímk z bodu $[0;y]$. Pokud budeme sledovat průběh přímk až k ose x , tedy bodům $[x;0]$, zjistíme, že díky zvyšující se koncentraci akrylamidu dosáhnou látky nulové pohyblivosti v různých bodech. Separáčn gel působí jako síto o určité velikosti pórů, kterým se mohou pohybovat pouze molekuly určité velikosti. Z tohoto důvodu se hodnota koncentrace akrylamidu, při které se již molekula nepohybuje liší v závislosti na velikosti molekuly a tedy i molekulové hmotnosti. Toto je však pouze ideální, v reálném systému nefungující model. Výše popsaná závislost je lineární jen v určitém rozmezí koncentrací, které jsou podle mých výsledků specifické pro každý dělený protein. K odklonu od linearity dochází v případě velmi vysokých či naopak nízkých R_f [44]. To však nic nemění na skutečnosti, že se jak křivky, tak přímky stětvávají na ose y v jednom bodě.



Graf 4.2 Hypotetický Fergusonův graf, kde je pohyblivost molekul ovlivněna nejen molekulovou hmotností, ale i velikostí náboje, kterého jsou nositeli, a tvarem. Šipkami je označena oblast zůstávající lineární i v reálném systému. Označení A, B, C náleží bílkovinám, či jejich komplexům s látkami nebílkovinné povahy.

Druhý Fergusonův graf popisuje situaci, kdy se molekuly dělí nejen na základě molekulové hmotnosti. Přímky v grafu popisují chování bílkovin v ideálním systému. Fakt, že osu y protínají v různých hodnotách, vypovídá o jejich rozdílné volné pohyblivosti. Tedy, pokud je koncentrace akrylamidu nulová, zanedbáme odpor prostředí, je rozdílná pohyblivost pravděpodobně způsobena rozdílným nábojem separovaných molekul, vztaženým na jednotku hmotnosti. Ze stejného důvodu se ani křivky popisující chování molekul v reálném

systemu nestřetávají ve stejném bodě. Se zvyšující se koncentrací akrylamidu dochází, stejně jako v předchozím případě, k uplatňování funkce gelu jako molekulového síta a tím k zadržování větších molekul. Odklon od linearity v případě vysokých či nízkých hodnot R_f je patrný i zde.

Při objasňování chování proteinů během tohoto způsobu dělení jsem každý standardní protein i pigmentoproteinové komplexy vyhodnocovala zvlášť. V kapitole výsledků jsou vždy uvedeny tabulky s daty, na jejichž základě byla sestavena dvojice grafů. První z nich obsahuje relativní pohyblivosti daných molekul při všech koncentracích. Do lineární regrese však byly započítány pouze body chovající se podle očekávaných trendů. Na základě druhého grafu je posuzováno chování jednotlivých proteinů. Stejným způsobem jsem zpracovávala výsledky získané z bezbarvé nativní elektroforézy. V dalším textu jsou vždy diskutovány výsledky červené nativní elektroforézy s výsledky bezbarvé společně. Na obrázcích 3.1 až 3.4 jsou znázorněny polyakrylamidové gely červené nativní elektroforézy před a po obarvení, s vyznačenými pigmentoproteinovými komplexy a standardními proteiny.

Data získaná dělením molekul poly-BSA během RN-PAGE jsou zanesena v obrázcích 3.5 a 3.6. Vzhledem k odklonu od linearity při 9,9 % v případě trimeru a tetrameru není do regrese tato jejich pohyblivost započítána. Z obrázku 3.6 je patrné, že dochází k protnutí přímek před osou y , což znamená, že větší molekuly mají větší volnou pohyblivost. S rostoucí velikostí molekuly dochází ke zvyšování hustoty náboje na jednotku hmotnosti. Volnou pohyblivostí se označuje hodnota R_f při nulové koncentraci akrylamidu. Zvyšováním koncentrace gelu v tomto případě docílíme lepšího dělení proteinů až od bodu, ve kterém se přímky protínají. V porovnání s výsledky z bezbarvé nativní elektroforézy, které jsou znázorněny na obrázcích 3.15 a 3.16 můžeme vidět, že zanesením barviva do systému nedocílíme žádného výrazného zlepšení. Na základě pozorování jednotlivých pokusů i výsledných grafů lze konstatovat, že molekuly se dělí o poznání lépe, pokud k nim není přidáno Ponceau S.

Další používanou standardní molekulou byl apoferritin. Jeho dělení jsem v polyakrylamidovém gelu vždy našla tři výrazné proužky, jednalo se monomer, dimer a trimer. Na obrázku 3.7 je znázorněno jejich chování v používaném koncentračním rozmezí. V případě všech tří oligomerů jsem v regresi neuvažovala data získaná z gelů o 9,9 % T. Na následujícím obrázku (3.8) si můžeme všimnout skoro rovnoběžného průběhu přímek. Takováto situace běžně nastává v případě izoforem určitých proteinů [53]. Skutečnost že protínají osu y v různých bodech, vypovídá o jejich rozdílných nábojích. Směrnice všech přímek je

však totožná, což obvykle znamená, že molekuly mají stejnou velikost. V případě apoferritinu ovšem nelze použít takové vysvětlení pro průběh závislosti. Porovnáním s průběhem křivek v hypotetických grafech s výsledky bezbarvé nativní elektroforézy (obrázek 3.17 a 3.18) a s mými dřívějšími výsledky [54] lze předpokládat spíše sbíhání přímek ve směru zvyšující se koncentrace gelu. Na základě hypotetických Fergusonových grafů lze říci, že pokud se přímky v závislosti sbíhají ve směru osy x , nacházíme se v pravé části hypotetických grafů. Jinými slovy, že zvolené koncentrace jsou pro takto velké molekuly příliš vysoké. I přesto mohu konstatovat, že při dělení molekul apoferritinu se s největší pravděpodobností uplatňují i tvar a přirozený náboj.

Třetím z používaných standardů byla katalasa. Na obrázku 3.9 jsou znázorněny všechny získané body. Z nejištěných důvodů poskytovala dimerní molekula při červené nativní elektroforéze v gelu o koncentraci 5,94 a 6,93 % velice odchýlené hodnoty, tyto nebyly do lineární regrese započítávány. Porovnáním s výsledky z bezbarvé nativní elektroforézy (obrázek 3.19 a 3.20) vidíme v případě dimerní formy obdobné trendy. V obou případech se k ose y protažené přímky chovají podobně jako v případě molekul apoferritinu. Vysvětlení tohoto trendu je stejné jako u molekul apoferritinu, zvolené koncentrační rozmezí bylo pro dělení katalasy příliš vysoké.

Dělením pigmentoproteinových komplexů kukuřice během červené nativní elektroforézy jsem se snažila objasnit jaké jejich vlastnosti se při tomto ději uplatňují. Při pohledu na obrázky 3.11 a 3.12 je v porovnání s hypotetickými grafy jasné, že na dělení participují i jiné vlastnosti než jen molekulová hmotnost daných proteinů. Menší molekuly mají v tomto případě vyšší volnou pohyblivost, tedy větší hustotu náboje. Na obrázku 3.12 jsou viditelné tři dvojice komplexů, které osu y vždy protínají ve stejném bodě. Porovnáním těchto závislostí s průběhem chování komplexů při bezbarvé nativní elektroforéze nalézáme velké rozdíly. Tuto skutečnost velice zřetelně dokládá obrázek 3.22, kde je patrný průsečík všech přímek na ose y v jednom jediném bodě. S rostoucí velikostí komplexů tedy nedochází ke zvyšování ani snižování hustoty náboje na molekule. Následkem toho je snižující se mobilita a tedy i rozchod přímek ve směru koncentrovanějších polyakrylamidových gelů způsoben pouze brzděním větších molekul zmenšujícími se póry gelu. Na základě těchto výsledků lze říci, že přidáním Ponceau S ke vzorkům thylakoidních pigmentoproteinových komplexů nedocílíme lepších vlastností během dělení, právě naopak. V případě standardních proteinů nebyly rozdíly v chování tak výrazné jako právě zde. Příčinou bude s největší pravděpodobností způsob interakce barviva s proteiny. Porovnáme-li strukturní vzorec Co-

omassie Blue, u něhož je způsob vazby znám (viz kapitola 1.9.2.1), s Ponceau S (obrázek 1.5 str. 28), je hned na první pohled patrný rozdíl v počtu a druhu funkčních skupin účastnících se vazby. Ponceau S je nositelem čtyř sulfoskupin nesoucích negativní náboj a interagujících s kladně nabitými postranními zbytky aminokyselin proteinu. Naproti tomu Coomassie má ligandy tohoto druhu pouze dva. Je ovšem nositelem tří aminoskupin, které neobsahuje Ponceau S. Co se týče hydrofobicity molekul je na tom Coomassie o poznání lépe, čímž lze snadno vysvětlit jeho obtížné odstranění z bílkovin v porovnání s pouhým vymytím vodou v případě Ponceau S. Shrňeme-li tyto skutečnosti, lze předpokládat, že vazba Ponceau S s proteiny je bez ohledu na podíl hydrofobicity zprostředkována pouze přes kladné náboje bazických aminokyselin. Distribuce těchto skupin na povrchu proteinu se liší v závislosti na druhu molekuly. Tím lze vysvětlit chování standardů i komplexů během elektroforetického dělení. Barvivo se na jednotlivé proteiny váže velice individuálně a tím i specificky ovlivňuje jejich pohyblivost. Situace je ještě významně ztížena vlivem pH. pH všech používaných roztoků v systému mělo hodnotu 7. V takovémto prostředí se budou k anodě pohybovat pouze bílkoviny mající pI nižší než 5,4 [32], tedy molekuly, které jsou nositeli dostatečně velkého negativního náboje. Ostatní bílkoviny se bez vazby látky udílející jim negativní náboj budou pohybovat opačným směrem. Většina významných thylakoidních pigmentoproteinů má hodnotu pI v rozmezí od 4,8 do 6,0. Výsledné pI komplexů je dáno příspěvkem jednotlivých podjednotek. Pro vazbu Ponceau S je nezbytné velké množství kladně nabitých aminoskupin, které jsou při takto zvoleném pH do značné míry disociovány. Zcela jistě se určité množství barviva na tyto bílkoviny naváže a usnadní jim tak dělení během procesu elektroforézy. To je v souladu s nepublikovanými výsledky [51]. Vazbou barviva na molekuly některých, v bezbarvém systému nedetekovatelných, bílkovin docílili jejich dělení.

Na základě provedených pokusů a pozorování lze předpokládat, že rychlost pohybu pigmentoproteinových komplexů kukuřice je ovlivněna nejen velikostí dělených molekul, ale také jejich tvarem a v neposlední řadě rozdílnou vazbou červeného barviva.

Stanovení fotochemické aktivity pigmentoproteinových komplexů kukuřice, konkrétně aktivity PSII byl jeden z dalších řešených úkolů mé diplomové práce.

Měření jsem prováděla dvěma způsoby. Spektrofotometricky, kde jsem používala jako nefyziologický akceptor elektronů DCPIP a elektrochemicky pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody. Druhý způsob měření je velice citlivý na poškození fotosystému, přesněji řečeno na poškození komplexu vyvíjejícího kyslík. V tabulce 3.29 jsou uvedeny hodnoty fotoche-

mických aktivit fotosystému II z izolovaných vzorků před a po dělení červenou nativní elektroforézou. Hodnoty aktivit bez přídavku DCP nejsou v tabulce zaznamenány, z důvodu malé změny měřených hodnot a následně obtížné vyhodnotitelnosti. Vlivem skladování a manipulace se vzorky došlo totiž k poškození komplexu vyvíjejícího kyslík. O poškození fotosystému vypovídá i nízká hodnota aktivity v přítomnosti DCP. Porovnáme-li tyto hodnoty s daty získanými měřením fotochemické aktivity v kousku gelu s obsahem komplexů, vidíme, že došlo ke snížení aktivity přibližně na 50 % původní hodnoty. Na snížení aktivity může mít svůj vliv také skutečnost, že v gelu nejsou fotosystémy dostatečně přístupné chemickým látkám potřebným k reakci, což má za následek nižší redukci DCPIP a tedy i menší pokles absorbance. Díky zachování funkčnosti PSII lze červenou nativní elektroforézu považovat za relativně šetrnou metodu vzhledem k děleným molekulám.

Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy byla další metodou vhodnou pro separaci jednotlivých thylakoidních fotosyntetických komplexů. Během prováděných pokusů jsem zjistila, že nejlepšího dělení bylo docíleno při použití šestnáctistupňového gradientu v rozmezí koncentrací 6,825–21,45 %, viz obrázek 3.23. To je patrné z hodnot fotochemických aktivit měřených Clarkovou kyslíkovou elektrodou zanesených v tabulkách 3.30 a 3.31. V tabulce 3.30 jsou hodnoty aktivity jednotlivých zón získaných po centrifugaci v rozmezí 9,1–28,6 %. Obě zóny zde vykazují aktivitu fotosystému II. Změnou koncentračního rozmezí na výše uvedených 6,825–21,45 % byla téměř všechna aktivita PSII naměřena v zóně dvě. Vzhledem k malému množství nanášených pigmentoproteinových komplexů a malému objemu centrifugačních kyvet se mi nepodařilo jednotlivé zóny zakoncentrovat natolik, abych je mohla následně samotné rozdělit na deskách červené nativní elektroforézy.

Reelektroforézou v přítomnosti SDS jsem se snažila o identifikaci jednotlivých zelených proužků viditelných v neobarveném gelu po červené nativní elektroforéze. Na obrázku 3.24 je znázorněn gel o koncentraci 9,9 % T po obarvení stříbrem. Reelektroforéze jsem podrobovala tři vždy viditelné zelené proužky. Na základě analýzy molekulových hmotností získaných proužků, zanesených v tabulce 3.32, jsem dospěla k závěru, že nejpomaleji putující zóna obsahuje pravděpodobně PSI. Proteinové molekuly o relativních molekulových hmotnostech 80 a 70 kDa, příslušející základnímu heterodimeru PSI, se ovšem vyskytují ve všech třech zónách. Bereme-li v úvahu celkovou velikost tohoto komplexu a výskyt ostatních proteinů, je příslušnost zóny jedna k PSI nejpravděpodobnější. Reelektroforéza

zóny dvě a tři poskytuje profil, svědčící pro přítomnost PSII. Protein o relativní molekulové hmotnosti pohybující se kolem 25 kDa bude pravděpodobně světlosběrný komplex vázající se ve velkém množství k PSII. Za proteiny vnitřní světlosběrné antény CP43 a CP47 lze s největší pravděpodobností považovat molekuly o relativní molekulové hmotnosti 46 a 55 kDa. Pás v oblasti 33 kDa by svojí velikostí mohl odpovídat proteinům D1 a D2.

5 Závěr

- Metodou červené nativní elektroforézy se mi podařilo separovat thylakoidní pigmentoproteinové komplexy kukuřice *Zea mays*. Následnou reelektroforézou a hrubým určením proteinového složení jsem identifikovala jednotlivé zóny.
- Na základě Fergusonových grafů lze konstatovat, že thylakoidní pigmentoproteinové komplexy kukuřice se během červené nativní elektroforézy dělí nejen na základě svých molekulových hmotností, ale že se na jejich pohyblivosti podílí i tvar a přirozený náboj. Vazba barviva Ponceau S se různí v závislosti na struktuře dělených molekul. V případě standardních proteinů rychlost pohybu taktéž ovlivňuje velikost, náboj a tvar. Podle výsledků bezbarvé nativní elektroforézy lze říci, že thylakoidní pigmentoproteinové komplexy kukuřice se během ní dělí podle svých molekulových hmotností. Používané standardy nikoliv. Abychom touto metodou mohli také určovat molekulové hmotnosti, musíme nejprve nalézt vhodné standardní proteiny.
- Stanovením fotochemických aktivit v kousku gelu a zónách vzniklých po centrifugaci jsem dospěla k závěru, že první zóna v hustotním gradientu, a stejně tak i nejnižše položený zelený proužek v gelu, obsahují fotosystém II.
- Stanovením fotochemických aktivit získaných proužků po červené nativní elektroforéze a jejich porovnáním s hodnotami aktivit před dělením lze říci, že pravděpodobně nedochází k výraznému poškození fotosystému II. Díky tomu lze červenou nativní elektroforézu považovat za nativní způsob dělení thylakoidních pigmentoproteinových komplexů.

Seznam použité literatury

- [1] Vodrážka, Z.: Biochemie, Academia, Praha (2002)
- [2] Seidlová, F., Šetlík, I., Šantrůček J.: Fyziologie rostlin, skriptum Biologická fakulta JČU, (1998)
- [3] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha (1998)
- [4] Moore, R., Denis Clark, W., Kingsley Stern, R., Vodopich, D.: Botany, Wm. C. Brown Communications, Dubuque (1995)
- [5] Pavlová, L.: Fyziologie rostlin, skriptum PFF UK, (2005)
- [6] Kalina, T.: The origin of chloroplasts and the position of eukaryotic algae in the six-kingdom system of life, *Czech Phycology* 1, 1–4, (2001)
- [7] Vacha, F., Adamec, F., Valenta, J., Vacha, M.: Spatial location of photosystem pigment–protein complexes in thylakoid membranes of chloroplasts of *Pisum sativum* studied by chlorophyll fluorescence, *J. Lumin.* 122–123, 301–303, (2007)
- [8] Grotjohann, I., Trojme, P.: Structure of cyanobacterial Photosystem I, *Photosynth. Res.* 85, 51–72, (2005)
- [9] Herbstová, M.: Studium oligomerních struktury fotosystému II vyšších rostlin a sinic, Diplomová práce PFF UK, katedra biochemie, Praha (2004)
- [10] Obrázek převzat (10.12.2008) z
<http://photosynthesis.sbcs.qmul.ac.uk/nield/psIIimages/oxygenicphotosynthmodel.html>
- [11] Kirchhoff, H., Haase, W., Haferkamp, S., Schott, T., Borinski, M., Kubitscheck, U., Rögner, M.: Structural and functional self-organization of photosystem II in grana thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1180–1188, (2007)
- [12] Santini, C., Tidu, V., Tognon, G., Ghiretti Magaldi, A., Bassi, R.: Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization *in vivo*, *Eur. J. Biochem.* 221, 307–315, (1994)
- [13] Chen, M., Bibby, T.S., Nield, J., Larkum, A.W.D., Barber, J.: Structure of a large photosystem II supercomplex from *Acaryochloris marina*, *FEBS Lett.* 579, 1306–1310, (2005)

- [14] Fromme, P., Yu, H., DeRuyter, S.Y., Jolley, C., Chauhan, D.K., Melkozernov, A., Grotjohann, I.: Structure of photosystems I and II, *C. R. Chim.* **9**, 188–200, (2006)
- [15] Tsiotis, G., Walz, T., Spyridaki, A., Lustig, A., Engel, A., Ghanotakis, D.: Tubular crystals of a photosystem II core complex, *J. Mol. Biol.* **259**, 241–248, (1996)
- [16] Ifuku, K., Nakatsu, T., Shimamoto, R., Yamamoto, Y., Ishihara, S., Kato, H., Sato, F.: Structure and function of the PsbP protein of photosystem II from higher plants, *Photosynth. Res.* **84**, 251–255, (2005)
- [17] Kanervo, E., Suorsa, M., Aro, E.M.: Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane, *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 1072–1080, (2005)
- [18] Jensen, E.P., Bassi, R., Boekema, E.J., Dekker, J.P, Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H.V.: Structure, function and regulation of plant photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 335–352, 2007
- [19] Fukuyama, K.: Structure and function of plant-type ferredoxins, *Photosynth. Res.* **81**, 298–301, (2004)
- [20] Miles, B.: Photosystems I and II, March 17, (2003), převzato z www.tamu.edu/classes/bmiles/lectures/photosystems.pdf
- [21] Voet, D., Voet, J.G.: Biochemistry, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, (2004)
- [22] Melkozernov, A.N., Blankeship, E.R.: Structural and functional organization of the peripheral light-harvesting system in photosystem I, *Photosynth. Res.* **85**, 33–50, (2005)
- [23] Doust, A.B., Wilk, K.E., Curmi, P.M.G., Scholes, G.D.: The photophysics of cryptophyte light-harvesting, *J. Photochem. Photobiol. A* **184**, 1–17, (2006)
- [24] Převzato z <http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/biologz.html>, dne 10.12.2008
- [25] Převzato z <https://eapbiofield.wikispaces.com/Ch+10+Photosynthesis+LEW?f=print>, dne 10.12.2008
- [26] Převzato z <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/Image187.gif>, dne 15.12.2008
- [27] Romanovska, E., Drozak, A.: Comparative analysis of biochemical properties of mesophyll and bundle sheath chloroplasts from various subtypes of C4 plants grow at moderate irradiance, *Acta Biochim. Pol.* **53**, 709–719, (2006)

- [28] Voznesenskaya, E.V., Franceschi, V.R., Kiirats, O., Freitag, H., Edwards, G.E.: Kranz anatomy is not essential for terrestrial C4 plant photosynthesis, *Nature* **414**, 543–546, (2001)
- [29] Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, skriptum PFF UK, (2005)
- [30] Alberts, B., Gray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing, Ústí nad Labem, (1998)
- [31] Gooding, K.M., Regnier, F.E., Decker, M.: *HPLC of biological macromolecules*, Second edition, New York, (2002)
- [32] Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G.: 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, (1994)
- [33] Bollag, D.M., Edelstein, S.J.: *Protein Methods*, Wiley-Liss, New York, (1991)
- [34] Přednáška Elektromigrační metody, převzato z http://mat.skola-biotechnologie.cz/2007/VIII.workshop/Lecture_5a6.ppt, dne 25.2.2009
- [35] Braun, R.J., Kinkl, N., Beer, M., Ueffing, M.: Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins, *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1033–1045, (2007)
- [36] Eubel, H., Braun, H.-P., Millar, J.H.: Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions, *Plant Methods* **1**, 11, (2005)
- [37] Schägger, H., von Jagow, G.: Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal. Biochem.* **199**, 223–231, (1991)
- [38] Fazekas de St. Groth, S., Webster, R.G., Datyner, A.: Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips, *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 377–391, (1963)
- [39] Tal, M., Silberstein, A., Nusser, E.: Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins?, *J. Biol. Chem.* **260**, 9976–9980, (1980)
- [40] Wittig, I., Schägger, H.: Advantages and limitations of clear-native PAGE, *Proteomics* **5**, 4338–4346, (2005)

- [41] Wittig, I., Braun, H.-P., Schägger, H.: Blue native PAGE, *Nat. Protoc.* 1, 418–428, (2006)
- [42] Ferguson, K.A.: Starch-gel electrophoresis—application to the classification of pituitary proteins and polypeptides, *Metabolism* 13, 985–1002, (1964)
- [43] Werner, W.E.: Ferguson plot Analysis of high molecular weight glutenin subunits by capillary electrophoresis, *Cereal Chem.* 72, 248–251, (1995)
- [44] Allen, K.D., Staehelin, A.L.: Resolution of 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system, *Anal. Biochem.* 194, 214–222, (1991)
- [45] Hedrick J.L., Smith, A.J.: Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis, *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155–164, (1968)
- [46] Holá, D., Kočová, M., Körnerová, M., Sofrová, D., Sopko, B.: Genetically based differences in photochemical activities of isolated maize (*Zea mays* L.) mesophyll chloroplasts, *Photosynthetica* 36, 187–197, (1999)
- [47] Arnon, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* 24, 1–15, (1949)
- [48] Sviteková, L.: Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát sinice *Synechococcus elongatus*, Diplomová práce PŘF UK, katedra biochemie, (2006)
- [49] Antolíková, E.: Změny ve fotosyntetickém aparátu kukuřice vlivem kademnatých iontů, Diplomová práce PŘF UK, katedra biochemie, (2007)
- [50] Pavlatová, L.: Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát vyšších rostlin, Diplomová práce PŘF UK, katedra biochemie, (2006)
- [51] Liberda, J.: osobní sdělení
- [52] Hames, B.D., Rickwood, D.: Gel electrophoresis of proteins. A practical approach, Oxford University Press, New York, (1998)
- [53] Bubnová, M., Elektroforetické metody ve studiu fotosyntetických pigmentoproteinových komplexů, Bakalářská práce PŘF UK, katedra biochemie, (2007)
- [54] Hjerten, S., Mosbach, R.: “Molecular-sieve” chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide, *Anal. Biochem.* 3, 109–118, (1962)

<i>Jméno a příjmení adresa</i>	<i>Číslo OP</i>	<i>Datum vypůjčení</i>	<i>Poznámka</i>