

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra Biochemie

# **Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát vyšších rostlin.**

Lucie Pavlátová

Školitel: RNDr. Tomáš Kučera Ph.D.

Diplomová práce

Praha 2006

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



32222179EE

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

V Praze 4. května 2006

  
Lucie Pavlátová

Děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D., paní Prof. RNDr. Danuši Sofrové, CSc a RNDr. Alici Šonské, Dr. za odborné vedení a rady kterých se mi během vypracování mé diplomové práce dostávalo.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. J. Mosingerovi, CSc. za pomoc se spektry a také Mgr. Janě Dobré za zaučení a cenné rady.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, sestře, babičkám, dědovi, strýci, tetě a bratranci za podporu, které se mi z jejich strany po celou dobu studia dostávalo.

# Obsah

Obsah.....	1
Seznam zkratk.....	4
1. Teoretický úvod.....	6
1.1 Význam fotosyntézy.....	6
1.2 Lokalizace fotosyntézy u vyšších rostlin.....	6
1.3 Složení thylakoidních membrán.....	6
1.4 Průběh fotosyntézy.....	7
1.5 Fotosyntetické pigmenty.....	8
1.6 Uspořádání fotosyntetického aparátu.....	10
1.6.1 Světlosběrný anténní systém fotosystému II.....	10
1.6.1.1 Vnitřní anténa fotosystému II.....	11
1.6.1.2 Vnější anténa fotosystému II.....	11
1.6.2 Fotosystém II.....	12
1.6.2.1 Funkce fotosystému II.....	14
1.6.2.2 Kyslík vyvíjející komplex.....	15
1.6.3 Komplex cytochromů <i>b<sub>6</sub>/f</i> .....	16
1.6.4 Světlosběrný anténní systém fotosystému I.....	16
1.6.5 Fotosystém I.....	16
1.6.5.1 Funkce fotosystému I.....	17
1.6.6 ATP-synthasa.....	18
1.7 Vliv iontů těžkých kovů na fotosyntetický aparát.....	18
1.7.1 Vliv kadmnatých iontů na rostliny.....	19
1.7.2 Metalothioneiny rostlin – fytochelatiny.....	21
1.7.2.1 Biosyntéza fytochelatinů.....	22
1.8 Cíl práce.....	24
2. Materiál a metody.....	25
2.1 Biologický materiál.....	25
2.1.1 Špenát.....	25
2.2 Seznam použitých chemikálií.....	25
2.3 Izolace thylakoidních membrán.....	26

2.4 Spektroskopické metody.....	27
2.4.1 Stanovení celkového obsahu chlorofylu v preparátech z vyšších rostlin.....	27
2.4.2 Stanovení interakce pufru a $\text{Cd}^{2+}$ .....	28
2.5 Elektroforetické metody.....	28
2.5.1 „Červená“ nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	28
2.5.1.1 Princip metody.....	28
2.5.1.2 Podmínky „červené“ nativní elektroforézy.....	29
2.5.1.3 Příprava vzorků pro „červenou“ nativní elektroforézu.....	31
2.5.1.4 Příprava standardů pro „červenou“ nativní elektroforézu.....	31
2.5.1.5 Příprava vzorků pro „červenou“ nativní elektroforézu po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy.....	32
2.5.2 Reelektroforéza v přítomnosti SDS.....	32
2.5.3 Detekce bílkovin, barvení a sušení gelů.....	32
2.5.4 Stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů.....	33
2.6 Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy.....	34
2.6.1 Princip metody.....	34
2.6.2 Příprava vzorku na centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy.....	34
2.6.3 Dělení pigmentoproteinových komplexů centrifugací v hustotním gradientu sacharosy.....	34
2.7 Měření fotochemických aktivit.....	35
2.7.1 Měření fotochemické aktivity fotoredukci DCPIP.....	36
2.7.2 Měření fotochemických aktivit fotoredukci DCPIP za přítomnosti DPC.....	37
2.7.3 Měření fotochemické aktivity pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody.....	37
2.8 Inkubace thylakoidních membrán s kademnatými ionty.....	39
3. Výsledky.....	40
3.1 Fotochemické aktivity.....	40
3.1.1 Vliv kademnatých iontů během třicetiminutové inkubace.....	40
3.1.2 Okamžitý vliv kademnatých iontů bez inkubace.....	41
3.2 Stanovení interakce pufru a $\text{Cd}^{2+}$ .....	48
3.3 Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy.....	55
3.4 Elektroforetická analýza.....	55

3.4.1 „Červená“ nativní elektroforéza zón po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy s různým gradientem akrylamidového dělicího gelu.....	55
3.4.2 „Červená“ nativní elektroforéza thylakoidních membrán špenátu v přítomnosti různé koncentrace chloridu kademnatého.....	58
3.4.3 Reelektroforéza v přítomnosti SDS.....	59
4. Diskuse.....	62
5. Závěr.....	66
Seznam literatury.....	67

## Seznam zkratek

A <sub>0</sub>	molekula chlorofylu <i>a</i> v reakčním centru fotosystému I
A <sub>1</sub>	molekula fylochinonu v reakčním centru fotosystému I
ADP	adenosindifosfát
APS	persíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
<i>b</i> <sub>559</sub>	cytochrom <i>b</i> <sub>559</sub> tvořící součást fotosystému II
<i>b</i> <sub>6/f</sub>	komplex cytochromů <i>b</i> <sub>6/f</sub>
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
Bis-Tris	bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	hovězí sérový albumin
Car	karoten
CF <sub>0</sub> CF <sub>1</sub>	složky chloroplastové ATP-synthasy
CP24, CP26, CP29	pigmentoproteinové komplexy vnější antény fotosystému II relativní molekulovou hmotností 24 000, 26 000 a 29 000
CP43, CP47	pigmentoproteinové komplexy fotosystému II s relativní molekulovou hmotností 43 000 a 47 000
D1, D2	proteiny fotosystému II s relativní molekulovou hmotností 32 000 a 34 000
DCPIP	2,6-dichlorfenolindofenol
DPC	1,5-difenyلكarbazid
FAR	fotosynteticky aktivní radiace
F <sub>A</sub> , F <sub>B</sub> , F <sub>X</sub>	FeS centra v reakčním centru fotosystému I
Fd	ferredoxin
FeCy	ferrikyanid draselný
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina)
Chl <sub>Z</sub> D <sub>1</sub> , Chl <sub>Z</sub> D <sub>2</sub>	chlorofyly <i>a</i> vázající se na D1 a D2
LHC I	světloběrný komplex fotosystému I
LHC II	světloběrný komplex fotosystému II
MF <sub>0</sub> MF <sub>1</sub>	složky mitochondriální ATP-synthasy
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát

OEC	komplex vyvíjející kyslík
OEE1, OEE2, OEE3	proteiny komplexu vyvíjející kyslík s relativní molekulovou hmotností 33 000, 23 000 a 16 000
P <sub>680</sub>	pigment reakčního centra fotosystému II s udaným absorpčním maximem
P <sub>700</sub>	pigment reakčního centra fotosystému I s udaným absorpčním maximem
PBQ	fenyl- <i>p</i> -benzochinon
PC	plastocyanin
PEPC	fosfoenolpyruvátcarboxylasa
PetG, PetL, PetM, PetN	podjednotky komplexu cytochromů <i>b<sub>6</sub>/f</i>
Pheo	feofytin
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
Ponceau S	3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonát sodný
PS1	fotosystém I
PS2	fotosystém II
PsaA, PsaB	proteiny fotosystému I s relativní molekulovou hmotností 83 000 a 82 400
Q <sub>A</sub> , Q <sub>B</sub>	molekuly plastochinonu
RuBisCO	ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa/oxygenasa
S <sub>0</sub> –S <sub>4</sub>	redoxní stavy komplexu vyvíjející kyslík
SDS	dodecylsírán sodný
TMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tricin	<i>n</i> -tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr <sub>Z</sub>	tyrosylový zbytek proteinu D1 v pozici 161



# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Význam fotosyntézy

Fotosyntéza je jediný pochod, kterým mohou živé systémy poutat energii elektromagnetického záření, které k nám přichází ze Slunce a převádět ji na energii chemické vazby. Organismy schopnými fotosyntézy jsou zelené rostliny, řasy, sinice a fotosyntetické bakterie. Rostliny k fotosyntéze nevyužívají celé spektrum záření, ale jen určité vlnové délky (400–700 nm). Toto záření se označuje zkratkou FAR (fotosynteticky aktivní radiace). Fotosyntetické bakterie jsou ale schopné využít záření až do vlnových délek kolem 1000 nm [1].

## 1.2 Lokalizace fotosyntézy u vyšších rostlin

Fotosyntéza u vyšších rostlin probíhá v chloroplastu. Chloroplast se skládá z vnější a vnitřní membrány, mezi nimiž je mezimembránový prostor. Vnitřní membrána ohraničuje stroma ve kterém jsou zploštěné váčky zvané thylakoidy. Shluky na sobě naskládaných thylakoidů se nazývají grana. Grana jsou vzájemně spojena stromální lamelou. Fyziologický význam gran je předmětem spekulací. Zřejmě umožňují prostorově rozdělit fotosystém I (v nestěsnaných membránách omývaných stromatem) a fotosystém II (ve stěsnaných membránách). Možným důvodem separace obou fotosystémů může být to, že fotosystém I využívá záření o nízké energii a při blízkém kontaktu by mohl přebírat excitony z fotosystému II [1].

## 1.3 Složení thylakoidních membrán

Thylakoidy vznikají jako vchlípeniny vnitřní obalové membrány během vývoje chloroplastu. Thylakoidní membrána, stejně jako jiné membrány, se skládá z lipidové dvojvrstvy. Až 80 % všech lipidů tvoří polární monogalaktosyldiacylglyceroly a digalaktosyldiacylglyceroly. Další 10 % tvoří záporně nabitě sulfolipidy

(sulfochinovosyldiacylglyceroly). Nenasycené acylové řetězce těchto lipidů dodávají thylakoidní membráně její tekutou povahu. Zbýlých 10 % zaujímají fosfolipidy [2].

Proteiny tvoří 60–65 % suché hmotnosti membrány. Mají zde jak strukturní, tak i funkční význam. Vytváří supramolekulární komplexy s fotosyntetickými barvivy, zejména chlorofyly.

#### 1.4 Průběh fotosyntézy

Na počátku zachytí dopadající foton molekula chlorofylu, která je součástí světlosběrné antény. Dojde k excitaci elektronů molekuly chlorofylu. Elektrony se mohou vrátit do základního stavu vyzařením přebytku energie fluorescencí (ta je *in vivo* nízká), převedením excitační energie na teplo, nebo předáním energie do reakčního centra. Dále budeme uvažovat pouze poslední případ. Chlorofyl reakčního centra může excitaci zachytit, protože jeho nejnižší excitovaný stav má nižší obsah energie nežli nejnižší excitované stavy molekul chlorofylu v anténě [2]. Elektron z excitované molekuly chlorofylu v reakčním centru je předán příslušnému primárnímu akceptoru, který je takto redukován. Oxidovaná molekula chlorofylu z reakčního centra je redukována elektronem z terminálního donoru elektronu.

Podle terminálního donoru můžeme dělit fotosyntetizující organismy do dvou skupin:

**1) Anoxygenní fotosyntetické organismy** – nevyvíjejí kyslík. Jako donor elektronů využívají např. sulfan,  $\text{Fe}^{2+}$  nebo jednoduché organické molekuly. Jsou vývojově starší. Do této skupiny patří heliobakterie, zelené a purpurové bakterie.

**2) Oxygenní fotosyntetické organismy** – vyvíjejí kyslík. Jako donor elektronů využívají vodu. Tento typ fotosyntézy je evolučně mladší. Patří sem zelené rostliny, řasy a sinice.

Reakce probíhající během fotosyntézy můžeme rozdělit do dvou fází:

**A) Primární fáze** (tzv. „světelná“)

Tato fáze zahrnuje všechny pochody spojené s absorpcí a přeměnou světelné energie. Patří sem absorpce a přenos excitační energie do reakčního centra, fotolýza vody, transport elektronů a fotofosforylace. Vzniká ATP, NADPH a  $\text{O}_2$ . Reakce primární fáze jsou závislé na světle jako zdroji energie.

**B) Sekundární fáze** (tzv. „temnotní“)

Využívá produkty vzniklé v primární fázi. ATP slouží jako zdroj energie a NADPH jako redukční činidlo při redukci oxidu uhličitého na sacharidy. Tato fáze není bezprostředně závislá na světle.

### 1.5 Fotosyntetické pigmenty

Ve fotosyntetickém aparátu mají barviva tři úkoly:

**A) Vlastní fotochemická přeměna energie v reakčních centrech [3].** Tento úkol zastává v oxgyenní fotosyntéze pouze **chlorofyl a**.

**B) Zachycení fotonů a přenos excitace soustavou molekul barviv do reakčního centra[3].** Zde se uplatňují pigmenty tvořící s bílkovinnými molekulami komplexy světlosběrných antén. Patří sem **chlorofyly, fykobiliny a xanthofyly**.

**C) Ochrana fotosyntetického aparátu před nežádoucí nebo nadměrnou excitací [3].** Za nežádoucí je považována tripletová excitace molekuly chlorofylu. (Ve fotosyntéze působí chlorofyl normálně ve stavu singletní excitace.) Při srážce molekuly chlorofylu v tripletním stavu s molekulou kyslíku (která je také v tripletním stavu), přechází chlorofyl do základního stavu a molekula kyslíku do stavu singletního. Tento singletní kyslík je velmi reaktivní a oxiduje jak barviva, tak i bílkoviny fotosyntetického ústrojí. Nežádoucí excitaci chlorofylu brání **karoteny** v reakčních centrech a také některé **xanthofyly** v anténách. Tato „ochranná“ barviva přebírají od chlorofylu tripletní excitaci, která na nich zaniká, aniž způsobí škody, protože karotenoidy v tripletním stavu s kyslíkem nereagují.

Před nadměrnou excitací chrání fotosyntetický aparát některé **xanthofyly**, které přejímají excitaci od molekul chlorofylu a zhasí ji (přemění ji na teplo).

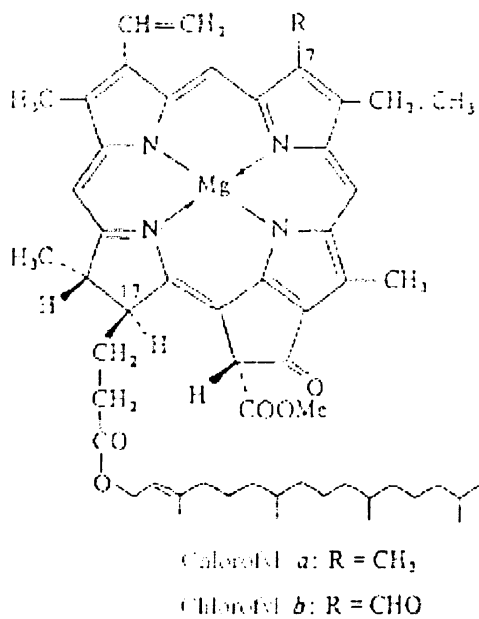
Z chemického hlediska můžeme pigmenty rozdělit do dvou skupin:

**1) Tetrapyroly.**

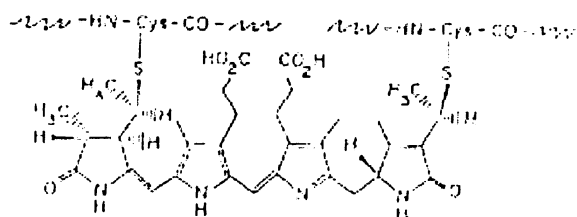
- a) S uzavřeným kruhem – chlorofyly (obr. 1.1) a bakteriochlorofyly
- b) S otevřeným kruhem – fykobiliny (obr. 1.2)

**2) Polyisopreny (karotenoidy).**

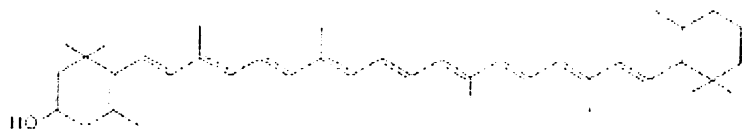
- a) Uhlovodíky – karoteny
- b) Kyslíkaté deriváty – xanthofyly (obr. 1.3)



**Obrázek 1.1** Strukturní vzorce chlorofylů *a* a *b*.



**Obrázek 1.2** Strukturní vzorec fykoerythobilinu s vyznačením místa vazby na protein.

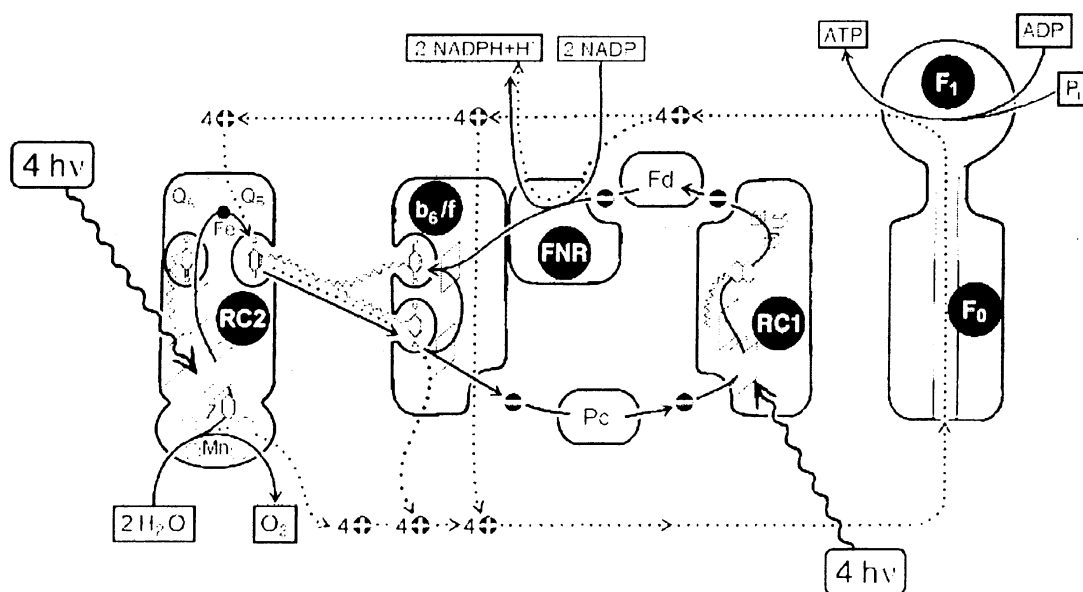


**Obrázek 1.3** Strukturní vzorec  $\beta$ -Cryptoxanthinu. (Je to kyslíkatý derivát  $\beta$ -karotenu.)

## 1.6 Uspořádání fotosyntetického aparátu vyšších rostlin

Fotosyntetický aparát vyšších rostlin se skládá z pěti supramolekulárních komplexů:

- 1) **LHCII** (light-harvesting complex) – světloběrný systém fotosystému II
- 2) **fotosystém II** (PS2)
- 3) komplex **cytochromů  $b_6/f$**
- 4) **fotosystém I** (PS1)
- 5) **ATP-synthasa**



**Obrázek 1.4** Schéma uspořádání a činnosti přenašečů elektronů a protonů v membráně oxygenní fotosyntézy [3]. RC2 – reakční centrum PS2, RC1 – reakční centrum PS1,  $b_6/f$  – komplex cytochromů  $b_6/f$ , FNR – *ferredoxin: NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktasa*, F<sub>0</sub> a F<sub>1</sub> – podjednotky ATP-synthasy, Fd – ferredoxin, Pc – plastocyanin, Q<sub>A</sub> – pevně vázaný plastochinon, Q<sub>B</sub> – volně vázaný plastochinon, Mn – čtyři kroužky naznačují čtyři ionty manganu, Z – tyrosylový zbytek v pozici 161 na bílkovině D1. Světloběrné antény zde nejsou vyznačeny.

### 1.6.1 Světloběrný anténní systém fotosystému II

V thylakoidní membráně jsou kromě pigmentoproteinových komplexů účastnících se vlastní přeměny energie také anténní světloběrné pigmentoproteinové komplexy. Tyto světloběrné antény mají za úkol zachytit a předat excitaci do reakčního centra. Světloběrné antény se vyskytují u všech fotosyntetických organismů, protože bez nich by

fotosyntetické komplexy přenosu elektronu byly nevyužity, neboť jejich vlastní absorpce je nedostačující.

Světlosběrné antény rozdělujeme podle těsnosti spojení s reakčním centrem:

A) **Vnitřní antény** (internal antennae) – jsou těsně spjaté s reakčním centrem a vyskytují se v neměnném stechiometrickém poměru k reakčnímu centru.

B) **Vnější antény** (external antennae) – jsou spojeny s reakčním centrem přes vnitřní anténu, jejich množství je proměnlivé (závisí například na osvětlení během růstu rostliny). Některé antény se mohou dokonce přesouvat mezi PS2 a PS1 v závislosti na osvětlení.

### 1.6.1.1 Vnitřní anténa fotosystému II

Vnitřní anténu fotosystému II tvoří dva pigmentoproteinové komplexy CP47 a CP43 o relativní molekulové hmotnosti 45–51 a 40–45 kDa [4]. (Zkratka CP pochází z anglického „*chlorophyll-carrying protein*“, čísla udávají relativní molekulovou hmotnost určenou pomocí SDS elektroforézy v kDa.) Oba pigmentoproteinové komplexy se skládají z jedné podjednotky se šesti transmembránovými helixy [5,6]. CP43 a CP47 jsou poměrně pevně vázány na polypeptidy D1 a D2 reakčního centra fotosystému II. Každý protein váže pět molekul  $\beta$ -karotenu [4], CP47 obsahuje 16 a CP43 14 molekul chlorofylu *a* [7].

### 1.6.1.2 Vnější anténa fotosystému II

Vnější anténa fotosystému II se skládá z pohyblivého světlosběrného komplexu LHCII a ze spojovacích (tzv. minoritních) anténních pigmentoproteinů fotosystému II.

A) LHCII vyskytuje se ve formě trimerů a za normálních podmínek obsahuje zhruba 50 % chlorofylu v chloroplastu. Každý monomer obsahuje šest molekul chlorofylu *a*, šest molekul chlorofylu *b*, dvě molekuly luteinu a další xanthofyly, jejichž množství závisí na druhu rostliny a osvětlení během růstu [3]. Relativní molekulová hmotnost monomeru se pohybuje kolem 25 kDa, skládá se přibližně z 230 aminokyselin, které vytváří tři  $\alpha$ -helixy procházející membránou. Do stromatu vyčnívá C-konec polypeptidu obsahující mnoho aminokyselinových zbytků s kladným nábojem (arginin a lysin), a také smyčka spojující dva  $\alpha$ -helixy. Na jednom z těchto řetězců vystavených do stromatu dochází k fosforylaci LHCII, která má velký význam pro přesuny LHCII [3]. Fosforylace a defosforylace LHCII probíhá za přítomnosti kinas a fosfatas. Celý proces je závislý na

stavu plastochinonové hotovosti v membráně. Defosforylovaný LHCII je vázán na PS2. Pokud v hotovosti převažuje plastochinol, dojde k aktivaci kinasy, která LHCII fosforyluje a tím ho uvolní od PS2. LHCII se tak může přesunout a připojit k PS1 a předat mu část excitační energie. Reoxidace plastochinolu deaktivuje kinasu. LHCII je prostřednictvím fosfatasy defosforylován a vrací se zpět k PS2 [8].

**B)** Minoritní anténní komplexy – jsou to chlorofylproteiny, které spojují LHCII s PS2. Obsahují chlorofyl *a* i *b* v různém poměru. Označují se zkratkou CP s udáním relativní molekulové hmotnosti, tedy např. CP24, CP26, CP29 [3].

## 1.6.2 Fotosystém II

Fotosystém II zprostředkovává oxidaci vody a redukcí plastochinonu, proto jej můžeme nazvat světlem řízená *H<sub>2</sub>O: plastochinon oxidoreduktasa* [9].

Reakční centrum PS2 se skládá ze dvou bílkovin D1 a D2 o relativní molekulové hmotnosti 32 kDa tvořící heterodimer. (Polypeptidy D1 a D2 označujeme písmenem **D**, protože vytváří neostré **difúzní** pruhy při SDS elektroforéze). Proteiny D1 a D2 kódují chloroplastové geny, jsou vysoce konzervované u všech organismů s oxygenním typem fotosyntézy. Tyto polypeptidy jsou vzájemně „propletené“ a pevně vázané na pigmentoproteiny CP47 a CP43, které tvoří vnitřní anténu. Reakční centrum PS2 se tedy skládá pouze z polypeptidů D1 a D2, cytochromu *b<sub>559</sub>* a podjednotky PsbI (i po izolaci jsou schopné separace náboje).

Kofaktory účastníci se redox reakcí v reakčním centru fotosystému II:

- **P<sub>680</sub>** – je umístěn v heterodimeru D1/D2 blízko lumenálního povrchu [9]. Po převzetí excitační energie funguje jako primární donor elektronu. P<sub>680</sub> se zřejmě skládá ze čtyř molekul chlorofylu *a* [10,11]. (Písmeno P značí, že se jedná o pigment a 680 nm je jeho absorpční maximum.)
- **Feofytin** – je vázán na proteinu D1. Jedná se o molekulu chlorofylu *a*, která má místo iontu Mg<sup>2+</sup> dva protony. Slouží jako primární akceptor, elektron přebírá od primárního donoru – P<sub>680</sub>.
- **Plastochinony Q<sub>A</sub> a Q<sub>B</sub>** – plastochinon Q<sub>A</sub> je pevně vázán na proteinu D2 a plastochinon Q<sub>B</sub> je volněji vázán na proteinu D1. Q<sub>A</sub> působí jako akceptor elektronu z feofytinu. Q<sub>B</sub> postupně přijímá dva elektrony od Q<sub>A</sub>. Redukovaný Q<sub>B</sub> přechází do

hotovosti redukovaných chinonů, které jsou pak donorem elektronů pro reakce katalyzované cytochromem  $h_6/f$ .

- **$\beta$ -karoten** – v reakčním centru PS2 jsou vázány dvě molekuly  $\beta$ -karotenu Car<sub>507</sub> a Car<sub>489</sub>. Jejich funkcí je ochránit fotosystém II před kyslíkem v singletovém stavu, který by ho mohl oxidačně poškodit. (Vznik singletového kyslíku je způsoben zablokováním transportu elektronů z feofytinu.) Oba karoteny se liší svou polohou vůči membráně. Car<sub>507</sub> je orientován paralelně, Car<sub>489</sub> kolmo k membráně. *In vivo*, u organismů s oxygenní fotosyntézou, karoteny zaujímají konformaci *trans*. (V bakteriálním reakčním centru zaujímají konformaci 15-*cis* [12].)

Na rozdíl od  $\beta$ -karotenů světlosběrných antén, karoteny reakčního centra nezhášejí tripletní excitaci P<sub>680</sub>. Důvodem je velká vzdálenost karotenu a P<sub>680</sub> (18–20 Å [13]), která nedovoluje překryv orbitalů a tím ani změnu spinu. Další příčinou je nižší redoxní potenciál  $\beta$ -karotenu (1,0 V) ve srovnání s potenciálem P<sub>680</sub> (1,2 V).

Jestliže se zablokuje dodávka elektronů z vody přes tyrosinový zbytek Tyr<sub>Z</sub>, jeden z karotenů vázaných na polypeptid D2 v těsné blízkosti cytochromu  $h_{559}$  se zapojí do cyklického transportu elektronů přes cytochrom  $h_{559}$  [14,15] a redukuje oxidovaný P<sub>680</sub><sup>+</sup>.

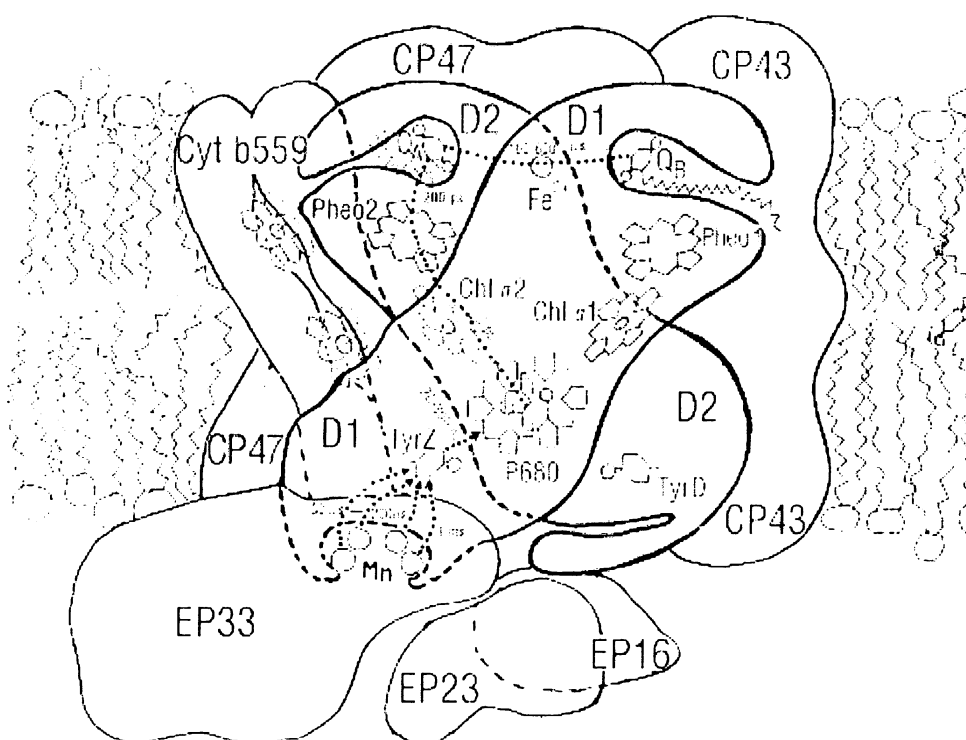
Karoteny mají v reakčním centru také strukturní funkci. Oxidovaný  $\beta$ -karoten je zřejmě signálem k odbourání proteinu D1, tím se významně podílí na regulaci aktivity fotosystému II.

- **Chlorofylové molekuly Chl<sub>Z</sub> D1 a Chl<sub>Z</sub> D2** – jsou to dva periferní chlorofyly *a*, které se váží na proteiny D1 a D2 přes histidin v poloze 118. Zřejmě se podílejí na přenosu energie do reakčního centra.
- **Tyr<sub>Z</sub>** – jedná se o tyrosinový zbytek v poloze 161 na polypeptidu D1. Jeho úkolem je redukovat P<sub>680</sub><sup>+</sup> elektronem z kyslík vyvíjejícího komplexu.
- **Nehemově vázaný ion Fe<sup>2+</sup>** – je vázán na čtyři histidinové zbytky příslušející polypeptidům D1 a D2. Ion Fe<sup>2+</sup> není pro přenos elektronů nezbytný, ale zvyšuje jeho účinnost.
- **Shluk iontů manganu** – nachází se v komplexu vyvíjejícím kyslík, jedná se o čtyři ionty manganu vázané k polypeptidu D1. Při rozštěpení molekuly vody dojde k uvolnění elektronů, které redukují nejprve klastr manganu, a ten pak reakční centrum P<sub>680</sub><sup>+</sup> přes tyrosinový zbytek v pozici 161 (Tyr<sub>Z</sub>).



- **Cytochrom  $b_{559}$**  – skládá se ze dvou podjednotek:  $\alpha$  (9 kDa) a  $\beta$  (4,5 kDa). Každou podjednotku tvoří jeden  $\alpha$ -helix kódovaný chloroplastovými geny. Polypeptidy jsou spojené do heterodimeru pomocí dvou hemů, které jsou vázány přes jeden histidinový zbytek z každé podjednotky.

Fotosystém II obsahuje ještě několik malých podjednotek o relativní molekulové hmotnosti do 10 kDa, jejichž funkce není zcela objasněná.



**Obrázek 1.5** Schéma struktury jádra PS2 s připojeným komplexem vyvíjejícím kyslík. EP16, EP23 a EP33 – bílkoviny s relativní molekulovou hmotností 16, 23 a 33 kDa. Ostatní symboly viz seznam zkratk. Tečkované šipky vyznačují cestu přenosu elektronu z vody na  $Q_B$ . U jednotlivých kroků jsou udány charakteristické časy přenosu. Upraveno dle [3].

### 1.6.2.1 Funkce fotosystému II

Fotosystém II katalyzuje oxidaci vody a redukci plastochinonu. Sled reakcí je následující: Nejdříve se absorbují kvanta energie světloběrnými komplexy. Pigment, který pohltí foton, je excitován na vyšší energetickou hladinu. Pokud je pigment umístěn v komplexu LHCII, excitace putuje přes minoritní anténu (CP29, CP26, CP24) a vnitřní světloběrnou

anténu (CP47 a CP43), až dorazí do  $P_{680}$ , které je tvořeno čtyřmi molekulami chlorofylu  $\alpha$ . Reakční centrum  $P_{680}$  přijme foton, a tak se dostane do excitovaného singletového stavu ( $P_{680}^*$ ). Stává se primárním donorem elektronu, který předá molekule feofytinu (Pheo). Dojde k rozdělení náboje za vzniku radikálového páru ( $P_{680}^{+\cdot}$  Pheo $^{\cdot-}$ ). Elektron z feofytinu je předán dále na plastochinon  $Q_A$ , vzniká radikálový pár  $P_{680}^{+\cdot}$   $Q_A^{\cdot-}$ .

$P_{680}^{+\cdot}$  oxiduje tyrosin v poloze 161 na polypeptidu D1 (Tyr $_Z$ ). ( $P_{680}^{+\cdot}$  je jedním z nejsilnějších oxidačních činidel, která se vyskytují v organismech.) Oxidovaný Tyr $_Z$  se deprotonizuje a vzniká tak neutrální radikál (Tyr $_Z^{\cdot}$ ). Zároveň se redukuje  $P_{680}^{+\cdot}$ . Radikálový pár Tyr $_Z^{\cdot}$   $Q_A^{\cdot-}$  je stabilizován předáním elektronu z  $Q_A^{\cdot-}$  na plastochinon  $Q_B$ , vznikne tedy semichinonový radikál  $Q_B^{\cdot-}$ . Tento radikál je schopen přijmout druhý elektron, stává se tedy chinolovým aniontem  $Q_B^{2\cdot-}$ , záhy přijímá ještě dva protony ze stromálního povrchu membrány a vzniká tak plastochinol  $Q_BH_2$ , který se odpoutá od polypeptidu D1 a putuje ke komplexu cytochromů  $b_6/f$ , kde předá své elektrony. Na uvolněné místo na proteinu D1 se váže plastochinon pocházející z hotovosti v membráně.

Oxidovaný Tyr $_Z^+$  je redukován kyslík vyvíjejícím komplexem. Poskytnutý elektron pochází z molekuly vody, tedy terminálního donoru.

### 1.6.2.2 Kyslík vyvíjející komplex

Kyslík vyvíjející komplex se často označuje anglickou zkratkou OEC (*oxygen evolving complex*). Vyskytuje se na lumenální straně fotosystému II a je tvořen čtyřmi ionty manganu,  $Ca^{2+}$  a  $Cl^-$  ionty. Dále jsou přítomny tři proteiny OEE1 (33 kDa), OEE2 (23 kDa) a OEE3 (16 kDa). (Zkratka „OEE“ pochází z anglického *oxygen evolution enhancer*.) Na těchto proteinech jsou vazebná místa pro ionty  $Cl^-$  a  $Ca^{2+}$ , které jsou pro správnou funkci kyslík vyvíjejícího komplexu naprosto nezbytné.

OEC je schopen navázat dvě molekuly vody a odebrat z nich postupně elektrony a protony tak, aby se v posledním kroku uvolnil kyslík.

Celý proces probíhá tzv. S-cyklem, nebo se též nazývá Kokův cyklus. Shluk iontů manganu podléhá pěti stavům:  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  a  $S_4$ . Po každé separaci nábojů v reakčním centru fotosystému II odebere  $P_{680}^{+\cdot}$  pomocí Tyr $_Z$  jeden elektron z OEC a posune jej tím o jeden stav výš. Stav  $S_4$  je nestabilní a ihned přechází do stavu  $S_0$  za současného uvolnění kyslíku.

### 1.6.3 Komplex cytochromů *b<sub>6</sub>/f*

Komplex cytochromů *b<sub>6</sub>/f* katalyzuje oxidaci plastochinolu a redukcí plastocyaninu:  $Q_BH_2 + 2 PC(Cu^{2+}) \rightarrow Q_B + 2 PC(Cu^+) + 2 H^+$ ,

proto ho můžeme nazvat *plastochinol: plastocyanin oxidoreduktasa*.

Jeho funkcí je přenos elektronů mezi fotosystémem II a fotosystémem I. Zároveň s oxidací plastochinolu se uvolní dva protony, které jsou vyloučeny na lumenálnímu povrchu thylakoidní membrány. Přenos elektronů komplexem cytochromů *b<sub>6</sub>/f* tak vytváří značnou část gradientu koncentrace protonů, který je pak využíván k pohonu syntézy ATP.

Komplex cytochromů *b<sub>6</sub>/f* je integrální membránový proteinkomplex vyskytující se ve formě dimeru. Skládá se ze čtyř hlavních podjednotek: cyt *f* (31 kDa), cyt *b<sub>6</sub>* (24 kDa), Rieskeho Fe/S protein (19 kDa) a podjednotka IV (17 kDa). Tyto čtyři polypeptidy jsou pro oxidoredukční aktivitu komplexu nezbytné. Dále obsahuje další čtyři podjednotky (PetG, PetL, PetM a PetN) s malou relativní molekulovou hmotností jejichž funkce je zřejmě strukturální, protože pokud chybí podjednotka PetG a PetM, je celý komplex nestabilní [17,18].

### 1.6.4 Světlosběrný anténní systém fotosystému I

Světlosběrné antény rozdělujeme podle těsnosti spojení s reakčním centrem:

**A) Vnitřní antény** (internal antennae) – jsou tvořeny přibližně 90 molekulami chlorofylu *a* navázaných na proteinové podjednotky PsaA a PsaB reakčního centra PS1.

**B) Vnější antény** (external antennae) – jsou tvořeny čtyřmi chlorofylproteiny Lhc1 (22 kDa), Lhc2 (23 kDa), Lhc3 (25 kDa) a Lhc4 (22 kDa), které obsahují zejména chlorofyl *a*, méně pak chlorofyl *b* a karotenoidy. Tyto čtyři chlorofylproteiny jsou spojovacím článkem mezi vnitřní anténou PS1 a fosforylovaným LHCII, který se může připojit k PS1.

### 1.6.5 Fotosystém I

Jádro fotosystému I je dimer složený ze dvou téměř identických podjednotek PsaA (83 kDa) a PsaB (82,4 kDa), na kterých jsou navázány molekuly pigmentů vnitřní světlosběrné

antény a kofaktory účastníci se přenosu elektronů a procesu separace nábojů. Mezi kofaktory patří:

- $P_{700}$  – primární donor elektronu složený ze dvou molekul chlorofylu *a*. Zde dochází (stejně jako ve fotosystému II) ke světlem indukované separaci náboje.
- $A_0$  – molekula chlorofylu *a* sloužící jako akceptor elektronu. V redukovaném stavu je počítána mezi neúčinnější redukční činidla v biologických systémech ( $E_0' = -1,1$  V).
- $A_1$  – molekula fylochinonu.
- $F_X$  – shluk [4Fe-4S] fungující jako další akceptor elektronu.

Fotosystém I obsahuje dále čtyři vnější podjednotky PsaC, PsaD, PsaE a PsaF. Na polypeptid PsaC (9 kDa) jsou navázány další kofaktory:

- $F_A$  a  $F_B$  – shluky [4Fe-4S] sloužící jako sekundární akceptory předávající elektrony dále na ferredoxin (Fd).

Polypeptidy PsaD a PsaE chrání podjednotku PsaC před oxidačními vlivy okolí. PsaD obsahuje vazné místo pro ferredoxin (Fd) a podjednotka PsaE napomáhá správné orientaci Fd v prostoru, a tím i jeho interakci s enzymem *ferredoxin: NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktasou*. Polypeptid PsaF je umístěn na lumenálním povrchu a obsahuje vazné místo pro plastocyanin.

Ke komplexu fotosystému I počítáme ještě několik malých podjednotek: PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM a PsaN, které se zřejmě podílejí na stabilizaci kvartérní struktury fotosystému I. Dále obsahuje také polypeptidy PsaG a PsaH u kterých se předpokládá, že by mohly vázat anténní komplexy LHC I [19].

### 1.6.5.1 Funkce fotosystému I

Fotosystém I katalyzuje přenos elektronů z redukovaného plastocyaninu na  $NADP^+$  za využití světelné energie. Můžeme jej tedy nazvat *plastocyanin: NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktasa*.

Nejprve dojde k absorpci kvanta záření pigmentem světlosběrné antény. Excitace je záhy předána dimeru chlorofylů *a*  $P_{700}$  (pigment s absorpčním maximem při 700 nm). Elektron z excitovaného  $P_{700}^*$  (primárního donoru) je dále přenesen na molekulu chlorofylu *a* označovanou jako  $A_0$ . Vznikne tedy redukovaný  $A_0^-$  a oxidovaný  $P_{700}^+$ .  $P_{700}^+$  přijme elektron z redukovaného plastocyaninu a vrátí se tak do původního stavu ( $P_{700}$ ). Redukovaný  $A_0^-$  předá elektron molekule fylochinonu  $A_1$ . Elektron je pak postupně transportován přes tři shluky [4Fe-4S] označované  $F_X$ ,  $F_A$ ,  $F_B$  až na rozpustný elektronový

přenašeč ferredoxin. Nakonec se elektron přenese z ferredoxinu přes flavodoxin (*ferredoxin: NADP<sup>+</sup> - oxidoreduktasa*) na NADP<sup>+</sup> za vzniku NADPH + H<sup>+</sup>.

### 1.6.6 ATP-synthasa

ATP-synthasa je transmembránový komplex neobsahující pigmenty, který se také někdy nazývá komplex CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> (CF pochází z angl. *chloroplast factor*) a je značně podobný mitochondriálnímu komplexu MF<sub>0</sub>MF<sub>1</sub>.

ATP-synthasa katalyzuje tvorbu ATP z ADP a anorganického fosfátu za využití gradientu pH, který vzniká činností komplexů elektrontransportního řetězce.

Komplex CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub> se skládá z integrálního membránového komplexu CF<sub>0</sub> a periferního komplexu CF<sub>1</sub>. CF<sub>0</sub> funguje jako protonový kanál, kterým se vypouští přebytek protonů z lumen thylakoidu do stromatu. Skládá se ze čtyř polypeptidů I–IV. Na stromálním povrchu komplexu CF<sub>0</sub> je navázán komplex CF<sub>1</sub>. Komplex CF<sub>1</sub> je složen z pěti podjednotek: α (55,4 kDa), β (53,9 kDa), γ (35,7 kDa), δ (20 kDa), ε (14,7 kDa). Podjednotky jsou ve stechiometrickém poměru 3:3:1:1:1. Polypeptidy α a β nesou vlastní katalytické místo enzymu, podjednotka γ funguje jako protonová brána, protein δ propojuje CF<sub>0</sub> a CF<sub>1</sub> a polypeptid ε inhibuje za tmy katalytickou aktivitu komplexu, blokuje tak nevhodnou hydrolyzu ATP [2].

ATP-synthasa se vyskytuje v nestěsnaných částech thylakoidních membrán.

### 1.7 Vliv iontů těžkých kovů na fotosyntetický aparát

Těžké kovy jsou definovány jako kovy s hustotou větší než 5 g/cm<sup>3</sup>. Mezi ně patří jak toxické kovy (např. Cd, Hg, Pb, As), tak i kovy, které jsou v nízkých koncentracích pro organismy esenciální (např. Cu, Mn, Co, Zn). Protože se ve své diplomové práci zabývám vlivem Cd<sup>2+</sup> na fotosyntetický aparát, budu dále používat termín „toxické kovy“.

Toxické kovy se vlivem průmyslových a zemědělských aktivit člověka dostávají do životního prostředí. Bohužel jsou nedegradovatelné, a tak se postupem času akumulují v různých stupních potravního řetězce.

Rostliny přijímají ionty těžkých kovů kořenovým systémem a přímo z atmosféry prostřednictvím znečištěného povrchu listu. Toxické kovy se hromadí v různých

rostlinných orgánech, zejména v kořenech a listech podle převládajícího způsobu příjmu daného toxického kovu.

Rostlina je schopná se bránit působení iontů toxických kovů několika způsoby:

- a) Transportní blokáda – retence v kořenech, vazba iontů kovů na buněčné stěny, ovlivnění permeability membrány.
- b) Tvorba fytochelatinů.
- c) Uskladnění ve vakuolách.

Z četných laboratorních pokusů lze vyvodit, že fotosyntéza je velmi citlivá na působení iontů toxických kovů. Tyto kovy vytvářejí elektrofilní kationty pro které je typická silná afinita k síře, a proto atakují thiolové skupiny enzymů včetně enzymů Calvinova cyklu [20]. Kationty těžkých kovů se rovněž velmi ochotně navazují jak na karboxylovou skupinu, tak i na aminoskupinu [20]. Vlivem iontů těžkých kovů může dojít ke změně ve funkci membrán chloroplastů a v neposlední řadě také ovlivňují funkci obou fotosystémů [21].

### 1.7.1 Vliv kademnatých iontů na rostliny

Kadmium se přirozeně vyskytuje v půdě, ale jeho obsah se mění podle druhu matečné horniny a intenzity zvětrávání. Vlivem činnosti člověka, jako je spalování fosilních paliv, používání některých fosforečných hnojiv, produkce biologických odpadů a samozřejmě průmysl, dochází k mnohonásobnému vzrůstu koncentrace kadmia v prostředí.

Rostliny přijímají kademnaté ionty zejména kořeny [22], ale také z atmosféry povrchovou kontaminací [23].

Celkově způsobují kademnaté ionty u rostlin chlorózu, kroucení listů a redukci růstu kořenů i stonků.

Vysoké koncentrace  $Cd^{2+}$  mají velice negativní vliv na fotosyntetický aparát rostlin. Kademnaté ionty inhibují biosyntézu chlorofylu reakcí s thiolovými skupinami enzymů syntézy kyseliny 5-aminolevulové a dehydratasy kyseliny 5-aminolevulové [24]. Další možností ovlivnění fotosyntézy na úrovni pigmentů je náhrada centrálního atomu hořčíku kadmiem (lze také nahradit jinými těžkými kovy – Hg, Cu, Ni, Zn a Pb) [25]. Takto substituovaný chlorofyl není schopen zachytávat světelné záření. Vlivem kademnatých iontů dochází u vyšších rostlin k poklesu celkového obsahu chlorofylu a poměru

chlorofylu *a/b* [26]. Dále také  $\text{Cd}^{2+}$  způsobuje změny ve struktuře a složení světlosběrného chlorofyl-proteinového komplexu fotosystému II [27, 28].

Pěstování sóji, kukuřice a rajčat v přítomnosti kademnatých iontů má za následek změny v ultrastruktuře chloroplastů [29,30]. U rostlin rajčete byl pozorován úbytek počtu chloroplastů na jednotku plochy listu a také úbytek jejich objemu. Dále bylo zjištěno vymizení gran [29].

Kademnaté ionty výrazně inhibují aktivitu fotosystému II. Mají negativní vliv na elektronový transport jak na akceptorové, tak i donorové straně fotosystému II [31,32]. Jedním z možných míst působení kademnatých iontů by mohl být Tyr<sub>Z</sub>, tedy tyrosylový zbytek v poloze 161 na proteinu D1 [33]. Mikroskopickou analýzou chloroplastů špenátu byla prokázána tvorba shluků chloroplastů vystavených působení kademnatých iontů [34]. Pěstováním hrachu a fazole v přítomnosti různých koncentrací kademnatých iontů (0,05mM–5mM) bylo zjištěno, že se kadmium akumuluje v chloroplastu, kde způsobuje iontovou nerovnováhu. Dále byla v počátcích působení  $\text{Cd}^{2+}$  prokázána zvýšená aktivita fotosystému II [35]. Několik hodin po začátku působení  $\text{Cd}^{2+}$  byl zjištěn zvýšený biologický obrat proteinu D1, který však při dlouhodobém stresu naopak klesal [35].

Dalším místem negativního působení kademnatých iontů je kyslík vyvíjející komplex. Jejich vlivem dochází ke změnám polypeptidového složení OEC nebo k interakci s ionty  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , které jsou pro správnou funkci kyslík vyvíjejícího komplexu nezbytné [35, 36, 37].  $\text{Cd}^{2+}$  také ovlivňuje syntézu plastochinonu, který se může stát limitujícím faktorem vedoucím k inhibici světelné fáze fotosyntézy [29].

Kademnaté ionty také ovlivňují fotosystém I, který je však méně citlivý než fotosystém II. Místem působení  $\text{Cd}^{2+}$  je poslední krok elektronového transportního řetězce –

*Ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa* [38].

Rostliny vystavené kademnatým iontům vykazují deficit železa. V experimentech *in vitro* bylo prokázáno, že na inhibici *Ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasy* se kromě kademnatých iontů podílí také nedostatek železnatých iontů [38]. Nedostatek železa také snižuje aktivitu RuBisCO [39].

Toxický efekt kademnatých iontů spočívá rovněž v inaktivaci různých enzymů reakcí s jejich thiolovými skupinami. Ionty  $\text{Cd}^{2+}$  inhibují dva klíčové enzymy fotosyntetické fixace  $\text{CO}_2$ : *ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasu/oxygenasu* (RuBisCO) a *fosfoenolpyruvátkarboxylasu* (PEPC) *in vitro* i *in vivo*. Z izolovaných enzymů je PEPC

citlivější na působení iontů toxických kovů než RuBisCO. Koncentrace 5  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Cd}^{2+}$  je dostačující k úplné inhibici aktivit obou enzymů [40]. Dalšími enzymy, jejichž aktivita je také ovlivněna kadmennými ionty, jsou např. *3-fosfoglycerátkinasa*, *glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa*, *ribulosa-5-fosfátkinasa*, *fruktosa-1,6-bisfosfatasa*, *aldolasa* a další enzymy Calvinova cyklu [41].

Kadmenné ionty také ovlivňují lipidové složení membrán chloroplastů, jejich vlivem dochází k peroxidaci lipidů, která může vést až k degradaci membrány [32].

### 1.7.2 Metalothioneiny rostlin – fytochelatiny

Metalothioneiny jsou nízkomolekulární polypeptidy vyznačující se vysokým obsahem cysteinu a nepřítomností aromatických aminokyselin a histidinu [42]. Tyto peptidy jsou schopné vázat těžké kovy. Syntéza metalothioneinů je vyvolána přítomností iontů těžkých kovů v prostředí. Míra indukce syntézy metalothioneinů různými ionty kovů byla sledována u rostliny *Rauvolfia serpentina*, ionty kovů byly seřazeny do řady:

$\text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Sb}^{3+} > \text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{As}^{5+} > \text{Cu}^+ > \text{Sn}^{2+} > \text{Au}^{3+} > \text{Bi}^{3+}$  [43].

Za nejsilnější induktor metalothioneinů jsou považovány právě kadmenné ionty.

Metalothioneiny se dělí do tří skupin [42]:

MTI – metalothioneiny I. třídy – jsou živočišné metalothioneiny skládající se z 61 aminokyselin. Obsahují 20 cysteinových zbytků, které váží 7 dvojmocných nebo 12 jednomocných iontů kovů do dvou různých shluků [44].

MTII – metalothioneiny II. třídy – se skládají z 60–63 aminokyselin. Byly prokázány u kvasinek, sinic a hub.

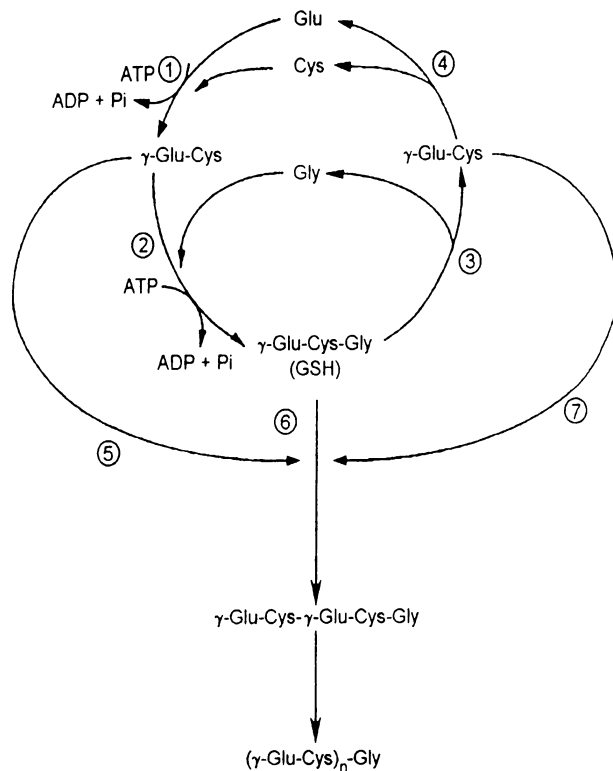
MTIII – metalothioneiny III. třídy – jsou fytochelatiny s obecným vzorcem  $(\gamma\text{-glutamyl-cysteinyl})_n\text{-glycin}$  ( $n = 2\text{--}11$ ) a *iso*-fytochelatiny (májí na místě C-terminálního glycinu jinou aminokyselinu) [45]. Vyskytují se také u řas a u některých druhů hub.

Hlavní úlohou fytochelatinů je vázat těžké kovy a dopravit je na místo uskladnění – do vakuoly. Další funkcí rostlinných metalothioneinů je navázání a přenos esenciálních kovů k nově syntetizovaným apoenzymům [45].



### 1.7.2.1 Biosyntéza fytochelatinů

Fytochelatiny jsou syntetizovány zřejmě v cytosolu buněk [44]. Nejprve vznikají nízkomolekulární proteinové komplexy, které se ve vakuolách spojují do vysokomolekulárních komplexů [44]. Fytochelatiny jsou přes tonoplast přenášeny pomocí ATP vázajících transportních proteinů (jedná se o integrální proteiny tonoplastu). Transport probíhá proti koncentračnímu spádu. Tyto transportní proteiny přenášejí jak apometalothioneiny a nízkomolekulární proteinové komplexy obsahující  $\text{Cd}^{2+}$ , tak i vysokomolekulární komplexy s obsahem  $\text{Cd}^{2+}$ , ale s nižší účinností [42].



**Obrázek 2.6** Biosyntéza a degradace glutathionu  $[(\gamma\text{-glutamyl-cysteinyl})_n\text{-glycinu}]$  v rostlinách a možné způsoby biosyntézy fytochelatinů. Enzymatické kroky jsou:

- 1)  $\gamma$ -glutamylcysteinylsyntetasa
- 2) glutathionsyntetasa
- 3) karboxypeptidasa
- 4)  $\gamma$ -glutamylcyklotransferasa
- 5) syntéza fytochelatinů opakovanou adicí jednotek  $\gamma$ -glutamylcysteinu na glutathion; zdrojem  $\gamma$ -glutamylcysteinu je přímá syntéza (krok 1)
- 6) syntéza fytochelatinů kondenzací molekul glutathionu se ztrátou glycinu v každém kroku
- 7) opakovaná adice  $\gamma$ -glutamylcysteinu na glutathion; zdrojem  $\gamma$ -glutamylcysteinu je katabolický rozklad glutathionu karboxypeptidasou (krok 3) [46].

## **1.8 Cíl práce**

- 1) Najít vhodné podmínky pro dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán vyšších rostlin pomocí „červené“ nativní elektroforézy.
- 2) Zjistit zda pufrы používané při práci s pigmentoproteinovými komplexy tvoří komplexy s kadmnatými ionty.
- 3) Zjistit vliv různých, zejména nízkých, koncentrací kadmnatých iontů na aktivitu fotosystému II.

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Biologický materiál

#### 2.1.1 Špenát

Ke studiu fotosyntetických dějů jsem používala špenát (*Spinacea oleracea L.*), zakoupený v obchodě *Fruit de France*.

### 2.2 Seznam použitých chemikálií

*n*-dodecyl- $\beta$ ,D-maltosid (dodecylmaltosid), Sigma, USA

hovězí sérumalbumin, Sevac, ČR

ferritin, Serva, Německo

katalasa, Serva, Německo

Brilliant Blue R, Sigma, USA

akrylamid, Sigma, USA

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

N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TMED), Serva, Německo

dodecylsírán sodný (SDS), Sigma, USA

tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Serva, Německo

glycerol, Lachema, ČR

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

1,5-difenyلكarbazid (DPC), Sigma, USA

ferrikyanid draselný (FeCy), Lachema, ČR

fenyl-*p*-benzochinon (PBQ), Sigma, USA

glycin, Reanal, Maďarsko

2-merkptoethanol, Fluka, Švýcarsko

N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina) (HEPES), Sigma, USA

$\epsilon$ -amino-*n*-kapronová kyselina, Sigma, USA

*n*-tris(hydroxymethyl)methylglycin (Tricin), Sigma, USA

bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris), Sigma, USA

fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), Sigma, USA

2-morfolinethansulfonová kyselina (MES), Boehringer Mannheim GmbH, Německo

3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonát sodný

(Ponceau S), Loba Feinchemie, Rakousko

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

### **2.3 Izolace thylakoidních membrán špenátu**

Základem byla modifikovaná metoda izolace thylakoidních membrán špenátu podle Eshaghiho a kol. [47].

Den před izolací jsem zakoupila špenát. Listy jsem omyla studenou vodou od nečistot, zbavila hlavní žilnatiny a uložila na noc do lednice bez přístupu světla. (Ve tmě a chladu se odbourá přebytečný škrob, který by mohl při izolaci interferovat.)

Celou izolaci jsem prováděla v přítmí a za stálého chlazení ledem. Špenátové listy jsem krátce homogenizovala v mixéru (Eta 012, ČR) v poměru asi 100 g listů na 500 ml pufru 1, složení udává tabulka 2.1. Homogenát jsem přefiltrovala přes tři vrstvy dětských separačních plen. Filtrát jsem jímala do kádinky za stálého chlazení ledem. Svrchní vrstvu jsem opatrně vymáčkala tak, aby se do filtrátu dostalo co nejméně pěny, která by mohla obsahovat nežádoucí proteolytické enzymy. Získaný filtrát jsem odstředila (1000 × g, 3 min, 4 °C) na centrifuze Universal 32R (Hettich, Německo). Sediment jsem promyla v témže pufru a za stejných podmínek odstředila.

Promytý sediment jsem resuspendovala pomocí štětečku v 5 mM MgCl<sub>2</sub> a suspezi jsem zředila v poměru 1:1 pufrům 2 (tabulka 2.1). Následovala centrifugace (3000 × g, 10 min, 4 °C). Výsledný sediment jsem promyla v pufru 3 (tabulka 2.1) a za stejných podmínek odstředila.

Izolované thylakoidní membrány jsem resuspendovala v pufru 4 (tab. 2.1) a naředila je tímto pufrům tak, aby výsledná koncentrace chlorofylu byla asi 1,5–2,0 mg/ml. Získaný preparát jsem zamrazila v kapalném dusíku a uchovávala v hlubokomrazicím boxu při teplotě –78 °C.

**Tabulka 2.1** Složení pufrů pro izolaci thylakoidních membrán špenátu.

pufr	HEPES (mmol/l)	sacharosa (mmol/l)	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O (mmol/l)	NaCl (mmol/l)	MES (mmol/l)	pH
1	50	300	5	—	—	7,5
2	—	400	5	15	50	6,0
3	—	—	5	10	25	6,0
4	—	300	5	10	25	6,0

## 2.4 Spektroskopické metody

Spektroskopické metody jsou založeny na interakci mezi elektromagnetickým zářením a zkoumaným vzorkem. Při této interakci dochází buď k příjmu (absorpci) nebo vyzáření (emisi) záření vzorkem. Nejčastěji se sleduje absorpce záření při průchodu zkoumanou látkou. Spektroskopické stanovení koncentrace vychází z Lambertova-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon c L$$

kde  $A$  je absorbance,  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient,  $c$  molární koncentrace látky ve vzorku a  $L$  je délka absorbujícího prostředí. Všechna měření jsem prováděla v kyvetách s optickou dráhou 1 cm.

### 2.4.1 Stanovení celkového obsahu chlorofylu v preparátech z vyšších rostlin [48]

5  $\mu$ l vzorku jsem napipetovala do 1,5 ml 80% acetonu, protřepala a odstředila na centrifuze MPW 300 (Polsko) 5 minut při maximálních otáčkách. Následně jsem změřila absorbanci na spektrofotometru Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Německo) při 652 nm proti 80 % acetonu.

Obsah chlorofylu jsem vypočítala ze vztahu:  $c$  (mg/ml) =  $A_{652} \cdot 8,7$ , kde  $A_{652}$  je absorbance při 652 nm. Specifický absorpční koeficient chlorofylu v 80% acetonu a při této vlnové délce je  $34,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . 80% roztok acetonu jsem připravovala denně čerstvý.

## 2.4.2 Stanovení interakce pufru a $\text{Cd}^{2+}$

Možnou interakci pufru a kadmennatých iontů jsem určovala měřením absorpčních spekter na spektrofotometru Heλios α (ThermoSpectronic, Velká Británie) v rozmezí 190–500 nm nebo na spektrofotometru Varien (Cary 1E, USA) v oblasti 200–500 nm.

Vzorky jsem ředila tak, aby absorbance byla v takovém rozmezí, které je přístroj ještě schopen přesně změřit.

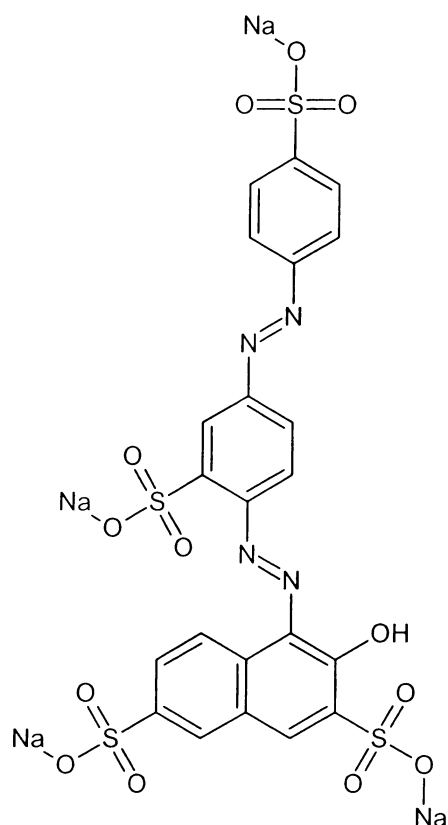
Zda pufr reaguje s  $\text{Cd}^{2+}$  jsem stanovila proměřením absorpčních spekter samotného pufru a samotné sloučeniny  $\text{Cd}^{2+}$ . Tato dvě spektra jsem sečetla a získala tak teoretické spektrum. Spektrum vzorku který obsahoval obě výše zmíněné složky, jsem poté skutečně změřila a porovnála se spektrem teoretickým. Pokud by k interakci nedocházelo, spektrum experimentální i teoretické by bylo stejné. Každé měření jsem pětkrát opakovala ( $n = 5$ ).

## 2.5 Elektroforetické metody

### 2.5.1 „Červená“ nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

#### 2.5.1.1 Princip metody [49]

Neporušené proteinové membránové komplexy můžeme separovat pomocí „červené“ nativní elektroforézy. Do vzorku a katodového pufru se přidává červené barvivo Ponceau S, které vyvolá změnu náboje na proteinech. Všechny proteinové komplexy s navázaným barvivem mají záporný náboj a v elektrickém poli se pohybují k anodě. V gelu tedy nedochází k dělení na základě různého náboje, ale na základě různé molekulové hmotnosti. Ponceau S se váže na bílkoviny pouze slabými interakcemi, můžeme ho tedy vymýt z gelu i bílkovin destilovanou vodou.



**Obrázek 2.1** Strukturní vzorec 3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonát sodný (Ponceau S).

### 2.5.1.2 Podmínky „červené“ nativní elektroforézy

Elektroforéza probíhala na deskách polyakrylamidového gelu o rozměrech 100 mm × 100 mm × 0,75 mm (OWL, typ P8DS, USA) v chladové místnosti při teplotě 4–7 °C při konstantním napětí 30 V. Elektroforéza probíhala 15–20 hodin v závislosti na použitém koncentračním gradientu akrylamidu.

Pro tuto elektroforézu jsem používala dělicí gely s několika lineárními koncentračními gradienty akrylamidu: 2,5–20 %; 3,5–15 %; 3,5–16 %; 4–11 %; 4–12 %; 4–13 %, 4–14 %. U gradientu 2,5–20 % jsem používala 2,45% řadící gel, u ostatních gradientů 3%.

Na přípravu gelů s lineárním koncentračním gradientem jsem používala míšič gradientu. Jedná se o dvě válcové komůrky z průhledného plastu spojené úzkou trubičkou uzavíratelnou kohoutem. Jeden váleček je napojen na výstupní hadičku. V každé válcové



nádobě bylo jedno míchadlo. Mísíč gradientu byl umístěn na laboratorním zvedáčku s elektromagnetickou míchačkou. Do válcové nádoby s výstupní hadičkou jsem pipetovala směs o vyšší koncentraci akrylamidu. V druhé nádobě byla směs s nižší koncentrací akrylamidu. Výstupní hadičku jsem umístila mezi dvě skla upevněná ve speciálním stojánku. Po otevření kohoutu se obě směsi začaly vzájemně mísit. V nezpolymerované vytékající směsi se tak postupně snižovala koncentrace akrylamidu.

Tím došlo k vytvoření lineárního koncentračního gradientu akrylamidu. Po vytečení veškeré směsi z mísiče gradientu jsem kapalinu mezi skly převrstvila malým množstvím redestilované vody (asi 150  $\mu$ l). Po zpolymerování dělicího gelu jsem vodu odsála filtračním papírem a nalila na něj řadicí gel. Vzápětí jsem mezi skla zasunula tzv. hřeben, který v řadicím velkopórovém gelu vytvořil jamky pro aplikaci vzorků.

Skleněné desky se zpolymerovaným gelem jsem upevnila na aparaturu, kterou jsem umístila do elektroforetické vany. Spodní část malopórového dělicího gelu byla v kontaktu s anodovým pufrům a jamky řadicího velkopórového gelu s katodovým pufrům.

**Tabulka 2.2** Složení zásobních roztoků pro „červenou“ nativní elektroforézu. Pro přípravu všech roztoků jsem používala redestilovanou vodu. Roztok APS jsem připravovala denně čerstvý.

roztok	složení	pH
katodový pufr	50 mM Tricin, 15 mM 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 $\epsilon$ -amino- <i>n</i> -kapronová kyselina	7,0
AB směs	48 g akrylamidu a 1,5 g BISu ve 100ml roztoku	–
10% APS	0,1 g v 1 ml vody	–

**Tabulka 2.3** Složení polymeračních směsí pro přípravu dělicího gelu o koncentraci akrylamidu 2,5–20 %.

roztok	koncentrace akrylamidu	
	2,5 %	20 %
gelový pufr	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
AB směs	150 $\mu$ l	1200 $\mu$ l
redestilovaná voda	1830 $\mu$ l	317 $\mu$ l
glycerol	—	0,6 g (476 $\mu$ l)
10% APS	18,5 $\mu$ l	6 $\mu$ l
TMED	1,85 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l
celkový objem	3 ml	3 ml

**Tabulka 2.4** Složení polymeračních směsí pro přípravu jednoho řadicího gelu o koncentraci akrylamidu 2,45 %.

roztok	koncentrace akrylamidu
	2,45 %
gelový pufr	1333 $\mu$ l
AB směs	204,2 $\mu$ l
redestilovaná voda	2365 $\mu$ l
10% APS	88,8 $\mu$ l
TMED	8,8 $\mu$ l
celkový objem	4 ml

### 2.5.1.3 Příprava vzorků pro „červenou“ nativní elektroforézu

K 25  $\mu$ l suspenze thylakoidních membrán (které odpovídalo 52  $\mu$ g chlorofylu) jsem přidala 5  $\mu$ l 10% dodecylmaltosidu (m/V), 15  $\mu$ l 10% Ponceau S (m/V) a doplnila do 100  $\mu$ l solubilizačním pufrům (50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0; 750 mM  $\epsilon$ -amino-*n*-kaptoprová kyselina a 20% glycerol). Takto připravené vzorky jsem nanasla do jamek v gelu.

### 2.5.1.4 Příprava standardů pro „červenou“ nativní elektroforézu

Jako standardy jsem používala apoferitin, hovězí sérumalbumin a katalasu. Proteiny jsem rozpustila v katodovém pufru (složení viz tab. 2.2) a zahustila sacharosou. (Sacharosy jsem přidávala pouze na špičku špachtle.)

### **2.5.1.5 Příprava vzorků pro „červenou“ nativní elektroforézu po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy**

K 40  $\mu\text{l}$  zóny 1 (47  $\mu\text{g}$  chlorofylu), 50  $\mu\text{l}$  zóny 2 (36  $\mu\text{g}$  chlorofylu), 50  $\mu\text{l}$  nadsedimentu (36  $\mu\text{g}$  chlorofylu) a 25  $\mu\text{l}$  sedimentu (58  $\mu\text{g}$  chlorofylu) jsem přidala 5  $\mu\text{l}$  10% dodecylmaltosidu (m/V), 15  $\mu\text{l}$  10% Ponceau S (m/V) a doplnila do 100  $\mu\text{l}$  solubilizačním pufrem (složení viz kap. 2.5.1.3).

### **2.5.2 Reelektroforéza v přítomnosti SDS**

Elektroforézu jsem prováděla na gradientovém gelu o koncentraci akrylamidu 8–16 % (viz tab. 2.11). Z gelu po „červené“ nativní elektroforéze jsem vyřízla jednotlivé proužky separovaných komplexů. Pruhy jsem umístila na Petriho misky a zakapala solubilizačním pufrem o složení: 4% SDS, 1,5% merkaptoethanol a 20% glycerol v 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8). Inkubace probíhala dvě hodiny. Poté jsem proužky nasáté pufrem vpravila pomocí špachtličky do jamek v gelu.

Gely jsem nalévala způsobem popsáním v kapitole 2.5.1.2.

### **2.5.3 Detekce bílkovin, barvení a sušení gelů**

Proteiny jsem detekovala pomocí Brilliant Blue R. Používala jsem jeho 0,25% roztok ve směsi 96% ethanolu, koncentrované kyseliny octové a destilované vody v objemových poměrech 25 : 10 : 65 s obsahem 1 % kyseliny trichloroctové (m/V).

Barvicí lázeň jsem před prvním použitím přefiltrovala, abych se zbavila zbytků nerozpuštěného barviva. Gely jsem barvila zhruba 20 hodin (přes noc). Po obarvení jsem barvicí lázeň slila, gel jsem opláchla destilovanou vodou a ponořila do odbarvovacího roztoku o složení: 96% ethanol, koncentrovaná kyselina octová a destilovaná voda v objemových poměrech 25 : 10 : 65. Odbarvovací lázeň jsem několikrát vyměnila. Pokud bylo pozadí polyakrylamidového gelu bezbarvé ponořila jsem jej do fixační lázně (10% ethanol a 5% glycerol v destilované vodě). Gely jsem uchovávala buď ponořené ve fixační lázni, nebo jsem je usušila. Před vlastním sušením byl gel ponořen (nejméně 1 hodinu) ve fixační lázni. Sušení gelu probíhalo mezi dvěma vrstvami mokrého celofánu upevněnými

pomocí kuliček mezi dva plastové rámečky. Sušení probíhalo při laboratorní teplotě přibližně 24 hodin.

#### 2.5.4 Stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů

Relativní molekulovou hmotnost polypeptidů a pigmentoproteinových komplexů jsem určila porovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s mobilitou standardů o známé molekulové hmotnosti.

Pro určení molekulové hmotnosti polypeptidů v prostředí SDS jsem používala sadu proteinů od firmy Sigma o složení:

- myosin ( $M_r = 205\ 000$ )
- $\beta$ -galaktosidasa ( $M_r = 116\ 000$ )
- fosforylase b ( $M_r = 97\ 000$ )
- fruktosa-6-fosfát kinasa ( $M_r = 84\ 000$ )
- hovězí sérumalbumin ( $M_r = 66\ 000$ )
- glutamát-dehydrogenasa ( $M_r = 55\ 000$ )
- ovalbumin ( $M_r = 45\ 000$ )
- glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa ( $M_r = 36\ 000$ )

Dále jsem používala polylysozym s molekulovou hmotností monomeru 14 300 a polyBSA s molekulovou hmotností monomeru 66 000.

Pro určení molekulových hmotností pigmentoproteinových komplexů separovaných pomocí „červené“ nativní elektroforézy jsem použila ferritin a katalasu od firmy Serva a hovězí sérumalbumin od firmy Sevac:

- ferritin – monomer ( $M_r = 450\ 000$ )
  - dimer ( $M_r = 900\ 000$ )
  - trimer ( $M_r = 1\ 350\ 000$ )
- hovězí sérumalbumin – monomer ( $M_r = 66\ 000$ )
  - dimer ( $M_r = 132\ 000$ )
- katalasa – monomer ( $M_r = 250\ 000$ )
  - dimer ( $M_r = 500\ 000$ )

Gely jsem digitalizovala pomocí skeneru. Molekulové hmotnosti jsem odečítala z kalibrační křivky vytvořené v programu Sigma Plot.

## **2.6 Centrifugace v hustotním gradientu sacharosu**

### **2.6.1 Princip metody**

Tato metoda umožňuje dělení směsi látek o podobné sedimentační rychlosti. Gradient sacharosu se připravuje tak, aby se hustota roztoku směrem ke dnu centrifugační kyvety zvětšovala. Pro přípravu koncentračního gradientu se nejčastěji používá sacharosa.

Na gradient se pak nanese směs makromolekul s různou hustotou. Vlivem působení odstředivé síly částice putují rychlostí, která závisí na jejich velikosti, tvaru, hustotě, dále záleží na síle odstředivého pole, hustotě a viskozitě prostředí. Makromolekula se zastaví a zakoncentruje na místě, které odpovídá její hustotě. Tak se vytvoří zóny, které by měly obsahovat látky ve vysoce purifikovaném stavu.

### **2.6.2 Příprava vzorku na centrifugaci v hustotním gradientu sacharosu**

K suspenzi izolovaných thylakoidních membrán jsem za stálého míchání na ledu přikapala roztok dodecylmaltosidu v pufru 3 (složení viz tab. 2.1) tak, aby konečná koncentrace chlorofylu byla 0,5 mg/ml a dodecylmaltosidu 20 mmol/l. Následně jsem směs homogenizovala pomocí injekční stříkačky. (Jehlu injekční stříkačky jsem přitiskla na stěnu kádinky a nasátou suspenzi pomalu protlačila ven.) Homogenizaci jsem několikrát opakovala. K homogenizovanému vzorku jsem přidala inhibitor proteas PMSF tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,5 mM. 1,5 ml takto připraveného vzorku jsem nanesla na sacharosový gradient v 70ml kyvetách.

### **2.6.3 Dělení pigmentoproteinových komplexů centrifugací v hustotním gradientu sacharosu**

K dělení pigmentoproteinových komplexů jsem používala šestnáctistupňový hustotní gradient sacharosu v pufru MNC (složení viz tab. 2.5), který obsahoval 0,03% (m/V) dodecylmaltosid a 0,5mM PMSF. Dodecylmaltosid a PMSF jsem do pufru přidávala až těsně před použitím.

Nejprve jsem si připravila šestnáct roztoků o koncentraci sacharosu: 9,1 %, 9,5–18,6 %

(s přírůstkem 0,7 %) a 28,6 %. Gradienty jsem nanášela tzv. podvrstvováním. (Nejdříve se nanáší nejméně koncentrovaný roztok a nakonec nejvíce koncentrovaný roztok.) Do kyvet o objemu 70 ml jsem podvrstvila patnáct roztoků po 4 ml, poslední šestnáctá vrstva byla 4,5 ml 28,6% roztoku sacharosy. Takto nanesený gradient jsem nechala přes noc v lednici, aby se díky difúzi ustavil kontinuální koncentrační gradient sacharosy.

Centrifugace probíhala na ultracentrifuze Beckman Optima LE-80K (USA) s rotorem Ti 45 při 36 000 rpm a teplotě 4 °C. Zóny se vytvořily již po 8 hodinách centrifugace.

Jednotlivé zóny jsem odsála pomocí injekční stříkačky, naředila pufrům MNC (viz tab. 2.5) s přídatkem 0,03 % dodecylmaltosidu a 0,5 mM PMSF a opět je nechala centrifugovat v rotoru Ti 45, při 4 °C a 43 000 rpm. Doba centrifugace byla přibližně 12 hodin (přes noc).

Získaný sediment jsem resuspendovala v minimálním objemu stejného pufru a změřila jsem celkový obsah chlorofylu (viz kap. 2.4.1). Nakonec jsem preparát zamrazila v kapalném dusíku a uskladnila v hlubokomrazícím boxu při teplotě -78 °C.

**Tabulka 2.5** Složení pufru MNC, pH 5,7 používaného pro přípravu gradientu sacharosy.

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

## 2.7 Měření fotochemických aktivit

Fotochemickou aktivitu fotosystému II jsem určovala měřením fotoredukce nefyziologického akceptoru elektronů 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCPIP) a měřením množství kyslíku, které se uvolní během fotolýzy vody pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody.

### 2.7.1 Měření fotochemické aktivity fotoredukce DCPIP

Fotochemickou aktivitu PS II můžeme stanovit pomocí umělého, tzn. nefyziologického akceptoru elektronů DCPIP (2,6-dichlorfenolindofenol). Množství uvolněného kyslíku při fotolýze vody odpovídá množství zredukovaných molekul DCPIP. Aktivita fotolýzy vody se určí jako počáteční rychlost redukce DCPIP při osvětlení vzorku.

Reakční směs obsahovala takové množství vzorku, které odpovídalo 20 µg chlorofylu, dále roztok DCPIP (zásobní roztok 20 mg DCPIP/10 ml H<sub>2</sub>O) o výsledné koncentraci 30 µM a roztok RmH (složení udává tab. 2.6) v takovém množství, aby výsledný 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 osvětlování a po každém výše uvedeném časovém intervalu jsem změřila absorbanci vzorku. Měření jsem prováděla za tmy.

Grafem závislosti změn absorbance na čase jsem proložila hyperbolu. Derivace v nulovém čase je hledaná počáteční rychlost. Jednotky jsem převedla na µmoly zredukovaného DCPIP na mg chlorofylu za hodinu. (Molární absorpční koeficient DCPIP při 600 nm má hodnotu 21 000 l/mol cm.) Průměrnou chybu jsem vypočetla podle vzorce:

$$S_r = \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n - 1} \cdot \frac{100}{\bar{x}}$$

**Tabulka 2.6** Složení pufru RmH používaného při stanovení fotoredukce DCPIP, pH roztoku je 6,5.

sloučenina	molární koncentrace (mmol/l)
KCl	10
HEPES	40

### 2.7.2 Měření fotochemických aktivit fotoredukce DCPIP za přítomnosti DPC

Pokud je poškozen komplex vyvíjející kyslík (OEC), fotosystém II není schopen oxidace vody. V tomto případě můžeme použít nefyziologický donor elektronů 1,5-difenykarbazid (DPC). Aktivitu měříme jako počáteční rychlost fotoredukce DCPIP při osvětlení vzorku za přítomnosti DPC.

Reakční směs obsahovala takové množství vzorku, které odpovídalo 20 µg chlorofylu, roztok DCPIP (zásobní roztok 20 mg DCPIP/10 ml H<sub>2</sub>O) o výsledné koncentraci 30 µM, roztok DPC (zásobní roztok 18 mg DPC/1,5 ml 100% methanolu) o výsledné koncentraci 0,3 mM a roztok RMh (složení viz tab. 2.6) v takovém množství, aby výsledný objem byl 2 ml.

Aktivitu jsem měřila způsobem popsaným v kapitole 2.7.1. DCPIP a DPC spolu chemicky interagují, proto jsem před vlastním měřením stanovila míru jejich vzájemné interakce a tu jsem pak zohlednila při výpočtu aktivity. Vzájemnou reakci DCPIP a DPC jsem změřila výše popsaným způsobem, pouze s tím rozdílem, že reakční směs ani slepý vzorek neobsahovaly žádný chlorofyl.

Měření jsem prováděla za tmy. Roztok DPC jsem připravovala denně čerstvý.

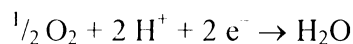
Průměrnou chybu měření jsem vypočetla podle vztahu v kapitole 2.7.1.

### 2.7.3 Měření fotochemické aktivity pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody

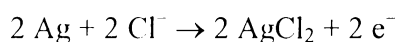
V tomto případě jsem stanovovala aktivitu fotosystému II měřením množství uvolněného kyslíku v přítomnosti nefyziologického akceptoru elektronů.

Clarkova kyslíková elektroda je elektrochemický článek produkující elektrický proud, který je úměrný koncentraci kyslíku v médiu, do kterého je elektroda ponořena. Katoda a anoda jsou od reakční směsi odděleny hydrofobní teflonovou membránou, která je propustná pouze pro molekuly kyslíku a nepropustná pro ionty a vodu.

Clarkova kyslíková elektroda se skládá z platinové katody, kde je kyslík redukován:



a z argentchloridové anody, kde probíhá reakce:



Elektrody jsou vzájemně spojeny pomocí solného můstku (50% nasycený roztok KCl).



K měření jsem používala Clarkovu kyslíkovou elektrodu firmy Hansatech (Velká Británie), která byla připojena k počítači. Data byla snímána aplikací vytvořenou v integrovaném vývojovém prostředí Control Panel (Alcor-Moravské přístroje, ČR).

Komůrka kyslíkové elektrody byla během měření temperována termostatem na 30 °C a osvětlována třemi nastavci s červenými diodami LED (660 nm) o celkové intenzitě 720  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ . Komůrka byla umístěna na magnetické míchačce, což zabezpečilo dokonalé promíchání vzorku.

Před vlastním měřením bylo nutné elektrodu nakalibrovat. Kalibrace probíhala při teplotě 30 °C. Nulovou hodnotu jsem nastavila redestilovanou vodou, ze které jsem odstranila kyslík přidáním několika krystalů pevného dithioničitanu sodného. Hodnota 100 odpovídala množství kyslíku rozpuštěného v redestilované vodě při teplotě 30 °C (tj. 0,230  $\mu\text{mol O}_2/\text{ml}$ ).

Reakční směs obsahovala takové množství měřeného vzorku, které odpovídalo 10  $\mu\text{g}$  chlorofylu a dále činidla, jejichž množství a koncentraci udává tabulka 2.7.

Reakčním médiem byl pufr 3 (složení viz tab. 2.1), kterým byla reakční směs doplněna na 1 ml.

**Tabulka 2.7** Činidla použitá při měření aktivity PS2 pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody. Symboly viz seznam zkratk.

činidlo	koncentrace zásobního roztoku (mmol/l)	pipetované množství ( $\mu\text{l}$ )	koncentrace reakční směsi (mM)
FeCy	100	10	1,0
PBQ	20	15	0,3

Jednotlivé složky reakční směsi jsem do komůrky přidávala za stálého míchání magnetickou míchačkou. Komůrku jsem následně uzavřela zátkou s kapilárou pro únik přebytečné kapaliny a vystavila směs osvětlení o intenzitě 720  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ . Měření maximální rychlosti vývoje kyslíku jsem opakovaně zaznamenávala, dokud křivka elektrického napětí rostla. Doba každého měření byla 5 sekund. Množství vyvíjeného kyslíku bylo vypočítáno ze směrnice nárůstu elektrického napětí v čase a vyjádřeno v  $\mu\text{mol O}_2/\text{hod}$  na 10  $\mu\text{g}$  chlorofylu.

Průměrnou chybu měření jsem vypočetla podle vztahu v kapitole 2.7.1.

## 2.8 Inkubace thylakoidních membrán s kademnatými ionty

Přípravu vzorků pro inkubaci s kademnatými ionty ukazuje tab. 2.8. Použité thylakoidní membrány měly koncentraci chlorofylu 1,82 mg/ml.

**Tabulka 2.8** Příprava vzorků pro inkubaci s kademnatými ionty.

číslo vzorku	konečná koncentrace CdCl <sub>2</sub> ve vzorku (mM)	množství thylakoidních membrán (μl)	množství 250mM zásobního roztoku CdCl <sub>2</sub> (μl)
1	0	1500	0
2	5	1470	30
3	10	1440	60
4	15	1410	90

Takto připravené vzorky jsem inkubovala 30 minut ve tmě, při teplotě 4 °C. Poté jsem je odstředila na centrifuze MPW-360 (2 200 × g, 10 min, 4 °C), supernatant obsahující přebytečné kademnaté ionty jsem slila a získaný sediment jsem resuspendovala v malém množství pufru 3 (složení viz tab. 2.1). Následovalo promytí vzorku zhruba desetinásobným množstvím pufru 3 a centrifugace za stejných podmínek (2 200 × g, 10 min, 4 °C). Nakonec jsem sediment resuspendovala v 1 ml pufru 3.

## 3. Výsledky

### 3.1 Fotochemické aktivity

Vliv kadmnatých iontů na fotochemické aktivity thylakoidních membrán špenátu jsem studovala metodami popsanými v kapitole 2.7.

Pro jednoduchost budu v této práci nazývat kontrolní thylakoidní membrány vzorkem Cd<sub>0</sub> a thylakoidní membrány vystavené působení CdCl<sub>2</sub> v různé konečné koncentraci Cd<sub>koncentrace (mM)</sub>. Pokusy byly 3–5krát opakovány. Průměrnou chybu jsem vypočetla podle vzorce v kap. 2.7.1.

#### 3.1.1 Vliv kadmnatých iontů během třicetiminutové inkubace

Měření fotochemických aktivit jsem prováděla postupem popsaným v kapitole 2.7. Způsob, jakým jsem inkubovala vzorky s kadmnatými ionty, je uveden v kapitole 2.8. Hodnoty naměřených aktivit PS2 v thylakoidních membránách špenátu jsou uvedeny v tab. 3.1. Výsledky v procentech v tab. 3.2.

**Tabulka 3.1** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu inkubovaných 30 minut v 0; 5; 10 a 15 mM CdCl<sub>2</sub>. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n = 3).

vzorek	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mg <sub>Chl</sub> .hod)	fotoredukce DCPIP [DPC → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mg <sub>Chl</sub> .hod)	PS II- vývoj O <sub>2</sub> [H <sub>2</sub> O → PBQ] (μmolO <sub>2</sub> /mg <sub>Chl</sub> .hod)
Cd <sub>0</sub>	20,72 ± 3,73	42,09 ± 4,08	37 ± 5,00
Cd <sub>5</sub>	32,58 ± 3,95	51,63 ± 10,55	47 ± 5,00
Cd <sub>10</sub>	20,10 ± 2,86	38,42 ± 3,28	40 ± 5,00
Cd <sub>15</sub>	24,41 ± 4,41	36,81 ± 4,72	16 ± 3,50

**Tabulka 3.2** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu vyjádřené v procentech. Předposlední sloupec udává nárůst aktivity ve vzorcích měřených s umělým donorem elektronu (DPC) oproti vzorkům, kde donorem elektronů byla voda. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1.

vzorek	fotoredukce DCPIP [ H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)	fotoredukce DCPIP [DPC → DCPIP] (%)	nárůst aktivity (%)	PS II- vývoj O <sub>2</sub> [H <sub>2</sub> O → PBQ] (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 18,02	100,00 ± 9,70	103,14	100,00 ± 13,52
Cd <sub>5</sub>	157,24 ± 12,12	122,67 ± 20,43	58,47	127,03 ± 10,64
Cd <sub>10</sub>	97,01 ± 14,25	91,28 ± 8,53	91,14	108,11 ± 12,50
Cd <sub>15</sub>	117,81 ± 18,07	87,46 ± 12,82	50,80	43,24 ± 21,88

Výraznější inhibiční vliv kademnatých iontů na aktivitu fotosystému II jsem zaznamenala při měření aktivity vývoje kyslíku u vzorku inkubovaného v 15 mM koncentraci CdCl<sub>2</sub>. Aktivita vzorku měřená bez přítomnosti umělého donoru obsahující 5 mM CdCl<sub>2</sub> byla naopak výrazně zvýšená. Fotochemické aktivity thylakoidních membrán špenátu měřené v přítomnosti umělého donoru elektronů DPC značně vzrostly u všech měřených koncentrací kademnatých iontů.

### 3.1.2 Okamžitý vliv kademnatých iontů bez inkubace

Fotochemické aktivity neinkubovaných vzorků jsem měřila způsobem popsaným v kapitole 2.7. Roztok CdCl<sub>2</sub> o dané koncentraci jsem přidávala přímo do kyvety, ve které měření bezprostředně poté probíhalo.

**Tabulka 3.3** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu měřené v přítomnosti různých koncentrací CdCl<sub>2</sub>. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n = 5) v jednotkách μmolDCPIP<sub>red</sub>/mgChl.hod. Pro měření každého sloupce výsledků jsem použila jinou porci thylakoidních membrán (1–4), všechny však pocházely ze stejné izolace.

vzorek	1	2	3	4
	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mgChl.hod)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mgChl.hod)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mgChl.hod)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mgChl.hod)
Cd <sub>0</sub>	58,54 ± 4,45	57,58 ± 2,30	50,51 ± 5,36	53,09 ± 10,45
Cd <sub>0,1</sub>	59,06 ± 4,93			
Cd <sub>0,2</sub>	57,00 ± 2,93			
Cd <sub>0,3</sub>	53,69 ± 8,27			
Cd <sub>0,4</sub>	47,27 ± 3,87			
Cd <sub>0,5</sub>	49,40 ± 7,05			
Cd <sub>0,6</sub>	32,52 ± 3,17	53,94 ± 3,89		
Cd <sub>0,8</sub>		57,78 ± 2,37		
Cd <sub>1</sub>		50,99 ± 2,31		
Cd <sub>2</sub>		45,91 ± 3,41		
Cd <sub>3</sub>		44,53 ± 2,17	60,56 ± 3,71	
Cd <sub>4</sub>			59,33 ± 6,31	
Cd <sub>5</sub>			50,32 ± 2,50	
Cd <sub>6</sub>			48,29 ± 3,37	
Cd <sub>7</sub>			39,31 ± 3,18	52,64 ± 2,67
Cd <sub>9</sub>				41,31 ± 5,59
Cd <sub>11</sub>				46,50 ± 4,57
Cd <sub>13</sub>				42,81 ± 4,58
Cd <sub>15</sub>				38,07 ± 5,41

**Tabulka 3.4** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu vyjádřené v procentech. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1.

vzorek	1	2	3	4
	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 7,60	100,00 ± 4,00	100,00 ± 10,61	100,00 ± 19,69
Cd <sub>0,1</sub>	100,89 ± 8,35			
Cd <sub>0,2</sub>	97,37 ± 5,14			
Cd <sub>0,3</sub>	91,72 ± 15,41			
Cd <sub>0,4</sub>	80,75 ± 8,19			
Cd <sub>0,5</sub>	84,39 ± 14,27			
Cd <sub>0,6</sub>	55,55 ± 9,76	93,68 ± 7,21		
Cd <sub>0,8</sub>		100,35 ± 4,11		
Cd <sub>1</sub>		88,56 ± 4,54		
Cd <sub>2</sub>		79,73 ± 7,42		
Cd <sub>3</sub>		77,34 ± 4,88	119,90 ± 6,12	
Cd <sub>4</sub>			117,46 ± 10,64	
Cd <sub>5</sub>			99,62 ± 4,97	
Cd <sub>6</sub>			95,60 ± 6,97	
Cd <sub>7</sub>			77,83 ± 8,09	99,15 ± 5,07
Cd <sub>9</sub>				77,81 ± 13,52
Cd <sub>11</sub>				87,59 ± 9,83
Cd <sub>13</sub>				80,64 ± 10,71
Cd <sub>15</sub>				71,71 ± 14,21

**Tabulka 3.5** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu v závislosti na čase. Vzorky neobsahovaly kadmenné ionty. V prvním sloupci je uveden čas ukončení posledního měření daného vzorku. Jednotlivá měření na sebe plynule navazovala. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n = 5). Pro měření každého sloupce výsledků jsem použila jinou porci thylakoidních membrán (1–2), obě však pocházely ze stejné izolace.

čas (min)	1	2
	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mg <sub>chl</sub> .hod)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mg <sub>chl</sub> .hod)
~ 20	39,46 ± 3,96	44,00 ± 4,11
~ 40	45,97 ± 4,32	47,87 ± 1,84
~ 60	45,14 ± 3,94	42,91 ± 3,97
~ 80	43,61 ± 4,81	43,30 ± 3,09
~ 100	39,24 ± 3,67	47,24 ± 2,05
~ 120	40,71 ± 2,66	37,92 ± 3,70
~ 130	41,00 ± 3,01	39,18 ± 4,83

**Tabulka 3.6** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu v závislosti na čase vyjádřené v procentech. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1.

doba měření (min)	1	2
	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)
~ 20	100,00 ± 10,04	100,00 ± 9,34
~ 40	116,50 ± 9,40	108,80 ± 3,85
~ 60	114,39 ± 8,73	97,52 ± 9,26
~ 80	110,52 ± 11,02	98,41 ± 7,14
~ 100	99,44 ± 9,35	107,36 ± 4,35
~ 120	103,17 ± 6,54	86,18 ± 9,75
~ 130	103,90 ± 7,35	89,05 ± 12,33

**Tabulka 3.7** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu měřené v přítomnosti různých koncentrací CdCl<sub>2</sub>. Kontrola k jednotlivým koncentracím kadmennatých iontů je uváděna vždy ve stejném řádku tabulky. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n = 3).

kontrola	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mg <sub>chl</sub> .hod)	vzorek	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (μmolDCPIP <sub>red</sub> /mg <sub>chl</sub> .hod)
Cd <sub>0</sub>	42,05 ± 4,17	Cd <sub>0,05</sub>	a <sub>0,05</sub> = 44,49 ± 3,01
Cd <sub>0</sub>	33,30 ± 5,76	Cd <sub>0,06</sub>	a <sub>0,06</sub> = 37,12 ± 1,86
Cd <sub>0</sub>	39,39 ± 5,75	Cd <sub>0,07</sub>	a <sub>0,07</sub> = 40,54 ± 1,56
Cd <sub>0</sub>	33,54 ± 6,25	Cd <sub>0,08</sub>	a <sub>0,08</sub> = 37,71 ± 2,44
Cd <sub>0</sub>	41,83 ± 2,94	Cd <sub>0,1</sub>	a <sub>0,1</sub> = 46,11 ± 5,12
Cd <sub>0</sub>	41,36 ± 4,34	Cd <sub>0,5</sub>	a <sub>0,5</sub> = 38,24 ± 4,43
Cd <sub>0</sub>	37,18 ± 2,67	Cd <sub>1</sub>	a <sub>1</sub> = 31,81 ± 4,65
Cd <sub>0</sub>	45,23 ± 1,64	Cd <sub>3</sub>	a <sub>3</sub> = 43,16 ± 2,82
Cd <sub>0</sub>	38,39 ± 0,99	Cd <sub>5</sub>	a <sub>5</sub> = 36,69 ± 1,73
Cd <sub>0</sub>	41,62 ± 3,99	Cd <sub>7</sub>	a <sub>7</sub> = 40,97 ± 5,13
Cd <sub>0</sub>	33,87 ± 2,44	Cd <sub>11</sub>	a <sub>11</sub> = 21,17 ± 2,96
Cd <sub>0</sub>	39,33 ± 4,01	Cd <sub>15</sub>	a <sub>15</sub> = 26,37 ± 3,24
Cd <sub>0</sub>	36,78 ± 2,16	Cd <sub>30</sub>	a <sub>30</sub> = 20,74 ± 3,08
Cd <sub>0</sub>	32,57 ± 1,03	Cd <sub>60</sub>	a <sub>60</sub> = 9,93 ± 1,07
Cd <sub>0</sub>	39,70 ± 4,22	Cd <sub>120</sub>	a <sub>120</sub> = 3,83 ± 1,08

**Tabulka 3.8** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu měřené v přítomnosti různých koncentrací CdCl<sub>2</sub> vyjádřené v procentech. Kontrola k jednotlivým koncentracím kadmnatých iontů je uváděna vždy ve stejném řádku tabulky. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1.

kontrola	fotoredukce DCPIP [ H <sub>2</sub> O → DCPIP ] (%)	vzorek	fotoredukce DCPIP [H <sub>2</sub> O → DCPIP] (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 9,91	Cd <sub>0,05</sub>	105,80 ± 6,76
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 17,29	Cd <sub>0,06</sub>	111,47 ± 5,02
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 14,59	Cd <sub>0,07</sub>	102,92 ± 3,84
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 18,62	Cd <sub>0,08</sub>	112,43 ± 6,47
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 7,04	Cd <sub>0,1</sub>	110,23 ± 11,10
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 10,49	Cd <sub>0,5</sub>	92,46 ± 11,58
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 7,19	Cd <sub>1</sub>	85,56 ± 14,61
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 3,62	Cd <sub>3</sub>	95,42 ± 6,53
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 2,58	Cd <sub>5</sub>	95,57 ± 4,71
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 9,58	Cd <sub>7</sub>	98,44 ± 12,51
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 7,19	Cd <sub>11</sub>	62,50 ± 13,98
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 10,20	Cd <sub>15</sub>	67,05 ± 12,27
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 5,86	Cd <sub>30</sub>	56,39 ± 14,83
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 3,15	Cd <sub>60</sub>	30,49 ± 10,74
Cd <sub>0</sub>	100,00 ± 10,62	Cd <sub>120</sub>	9,65 ± 28,22



**Tabulka 3.9** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu měřené v přítomnosti různých koncentrací  $\text{CdCl}_2$  a za přítomnosti umělého donoru elektronů (DPC). Kontrola k jednotlivým koncentracím kadmnatých iontů je uváděna vždy ve stejném řádku tabulky. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 3$ ).

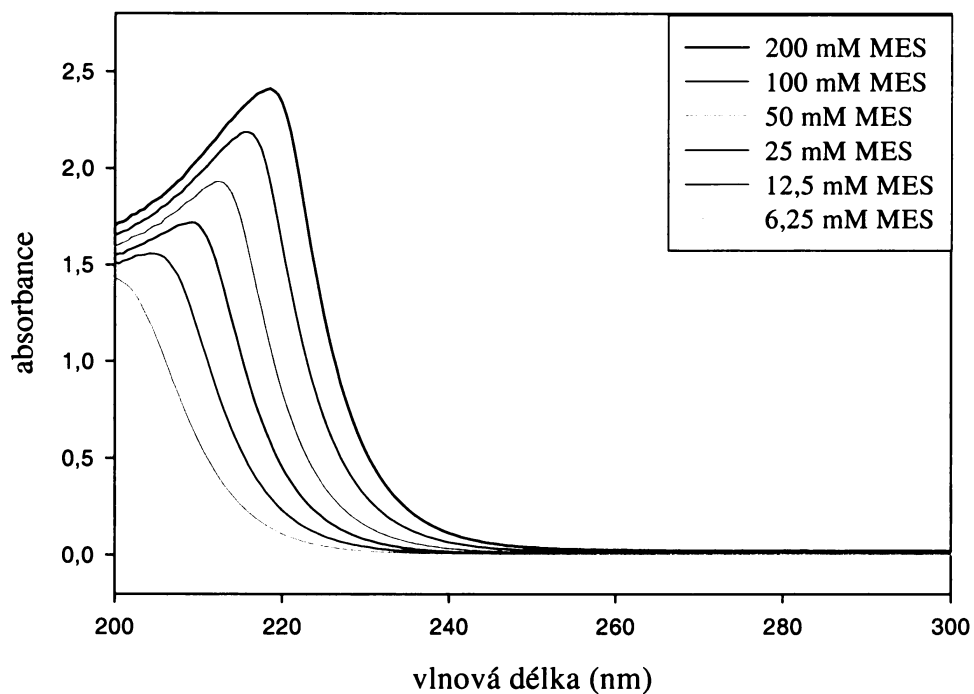
kontrola	fotoredukce DCPIP [DPC $\rightarrow$ DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{Chl.hod}}$ )	vzorek	fotoredukce DCPIP [DPC $\rightarrow$ DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{Chl.hod}}$ )
$\text{Cd}_0$	$39,68 \pm 6,24$	$\text{Cd}_{0,05}$	$48,64 \pm 3,30$
$\text{Cd}_0$	$45,20 \pm 3,35$	$\text{Cd}_{0,06}$	$52,12 \pm 1,17$
$\text{Cd}_0$	$47,54 \pm 2,24$	$\text{Cd}_{0,07}$	$48,89 \pm 3,09$
$\text{Cd}_0$	$43,44 \pm 1,29$	$\text{Cd}_{0,08}$	$38,94 \pm 1,62$
$\text{Cd}_0$	$43,08 \pm 6,52$	$\text{Cd}_{0,1}$	$51,74 \pm 7,50$
$\text{Cd}_0$	$47,02 \pm 5,49$	$\text{Cd}_{0,5}$	$51,40 \pm 2,78$
$\text{Cd}_0$	$43,27 \pm 1,87$	$\text{Cd}_1$	$42,13 \pm 3,27$
$\text{Cd}_0$	$42,16 \pm 1,51$	$\text{Cd}_3$	$34,64 \pm 2,39$
$\text{Cd}_0$	$46,99 \pm 2,18$	$\text{Cd}_5$	$36,99 \pm 1,38$
$\text{Cd}_0$	$49,46 \pm 2,96$	$\text{Cd}_7$	$40,60 \pm 2,47$
$\text{Cd}_0$	$43,95 \pm 4,41$	$\text{Cd}_{11}$	$33,31 \pm 2,00$
$\text{Cd}_0$	$42,96 \pm 3,46$	$\text{Cd}_{15}$	$30,06 \pm 2,65$
$\text{Cd}_0$	$40,68 \pm 4,17$	$\text{Cd}_{30}$	$15,94 \pm 1,30$
$\text{Cd}_0$	$42,57 \pm 1,31$	$\text{Cd}_{60}$	$14,16 \pm 0,87$
$\text{Cd}_0$	$39,47 \pm 2,04$	$\text{Cd}_{120}$	$8,33 \pm 0,45$

**Tabulka 3.10** Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán špenátu měřené v přítomnosti různých koncentrací  $\text{CdCl}_2$  a za přítomnosti umělého donoru elektronů (DPC) vyjádřené v procentech. Kontrola k jednotlivým koncentracím kadmnatých iontů je uváděna vždy ve stejném řádku tabulky. Symboly viz seznam zkratk a kap. 3.1.

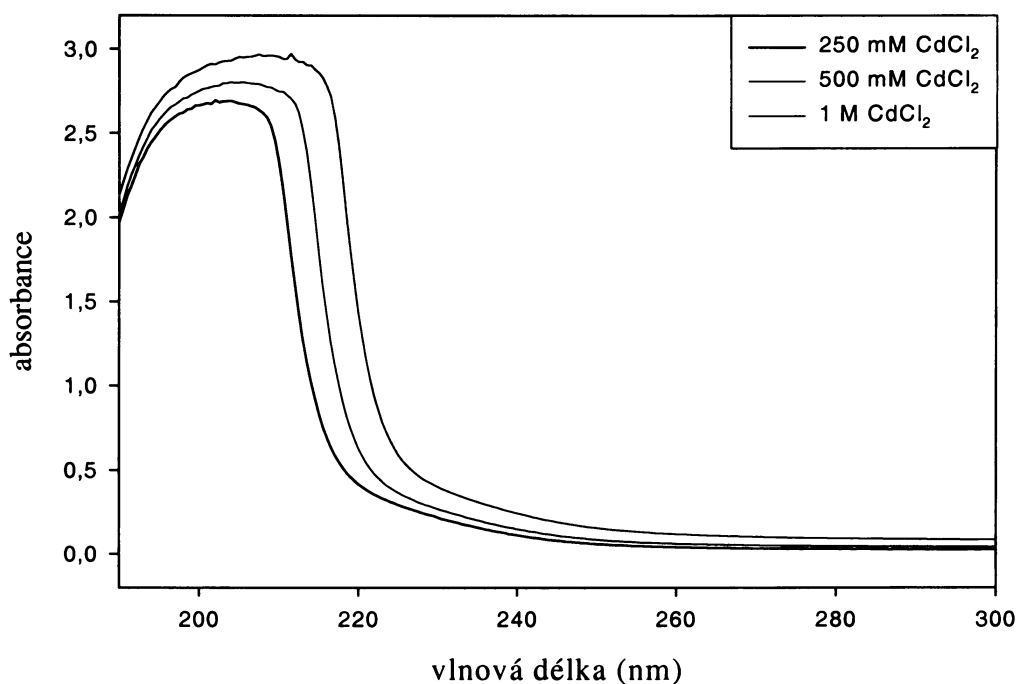
kontrola	fotoredukce DCPIP [DPC → DCPIP] (%)	vzorek	fotoredukce DCPIP [DPC → DCPIP] (%)
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 15,73$	$\text{Cd}_{0,05}$	$122,58 \pm 6,78$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 7,41$	$\text{Cd}_{0,06}$	$115,31 \pm 2,24$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 4,72$	$\text{Cd}_{0,07}$	$102,84 \pm 6,32$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 2,97$	$\text{Cd}_{0,08}$	$89,64 \pm 4,16$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 15,14$	$\text{Cd}_{0,1}$	$120,10 \pm 14,49$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 11,68$	$\text{Cd}_{0,5}$	$109,32 \pm 5,40$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 4,33$	$\text{Cd}_1$	$97,37 \pm 7,75$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 3,58$	$\text{Cd}_3$	$82,16 \pm 6,90$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 4,63$	$\text{Cd}_5$	$78,72 \pm 3,72$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 5,99$	$\text{Cd}_7$	$82,09 \pm 6,08$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 10,04$	$\text{Cd}_{11}$	$75,79 \pm 6,01$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 8,06$	$\text{Cd}_{15}$	$69,97 \pm 8,81$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 10,24$	$\text{Cd}_{30}$	$39,18 \pm 8,13$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 3,07$	$\text{Cd}_{60}$	$33,26 \pm 6,11$
$\text{Cd}_0$	$100,00 \pm 5,16$	$\text{Cd}_{120}$	$21,10 \pm 5,44$

### 3.2 Stanovení interakce pufru a $\text{Cd}^{2+}$

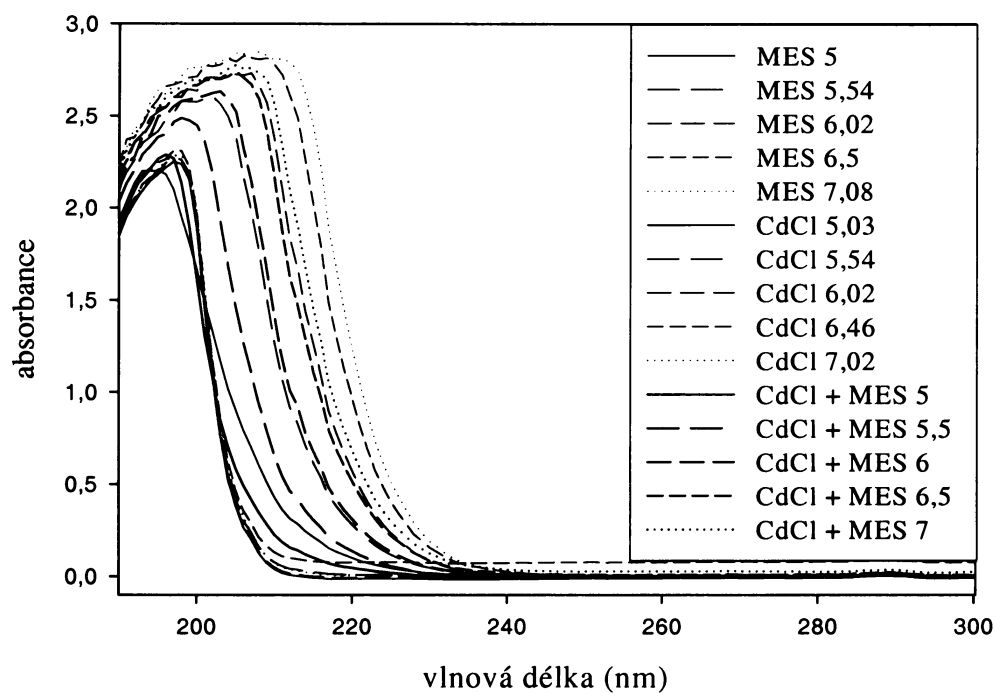
Interakci pufru a kademnatých iontů jsem stanovovala postupem uvedeným v kapitole 2.4.2.



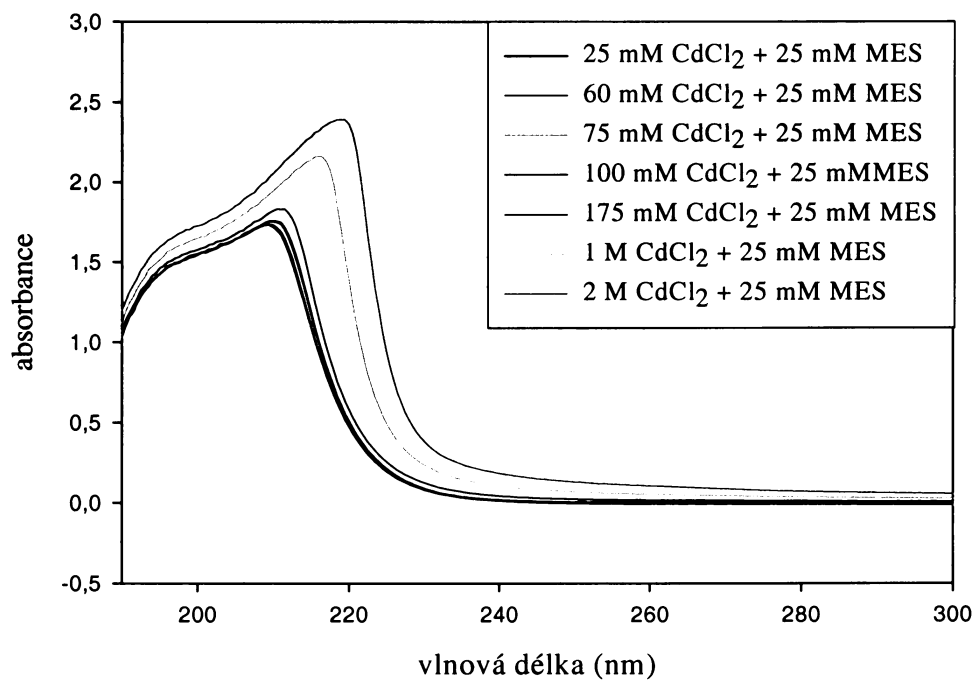
**Graf 3.1** Spektra MESu o různé koncentraci.



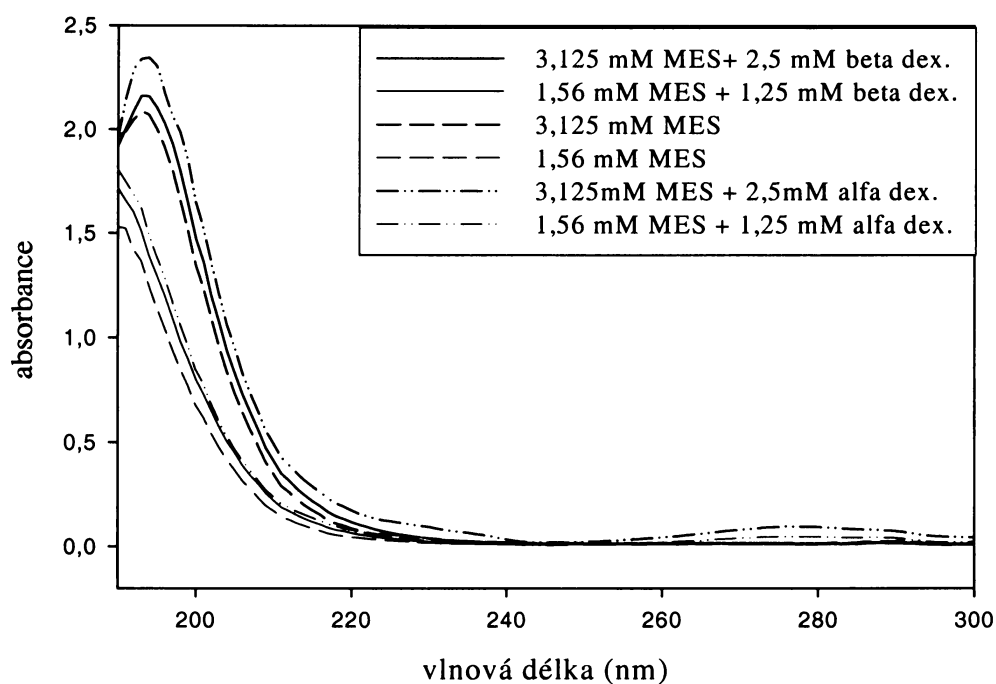
**Graf 3.2** Spektra chloridu kademnatého o různé koncentraci



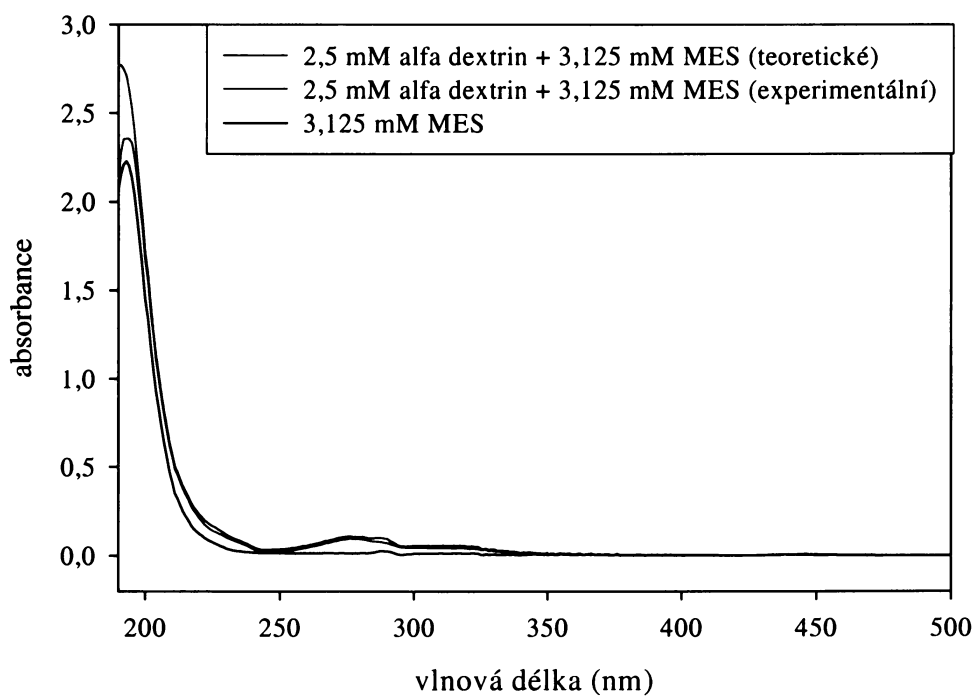
**Graf 3.3** Spektra samotného MESu, CdCl<sub>2</sub> a experimentální spektra MESu a CdCl<sub>2</sub> při různém pH. Koncentrace MESu i CdCl<sub>2</sub> je 25mM.



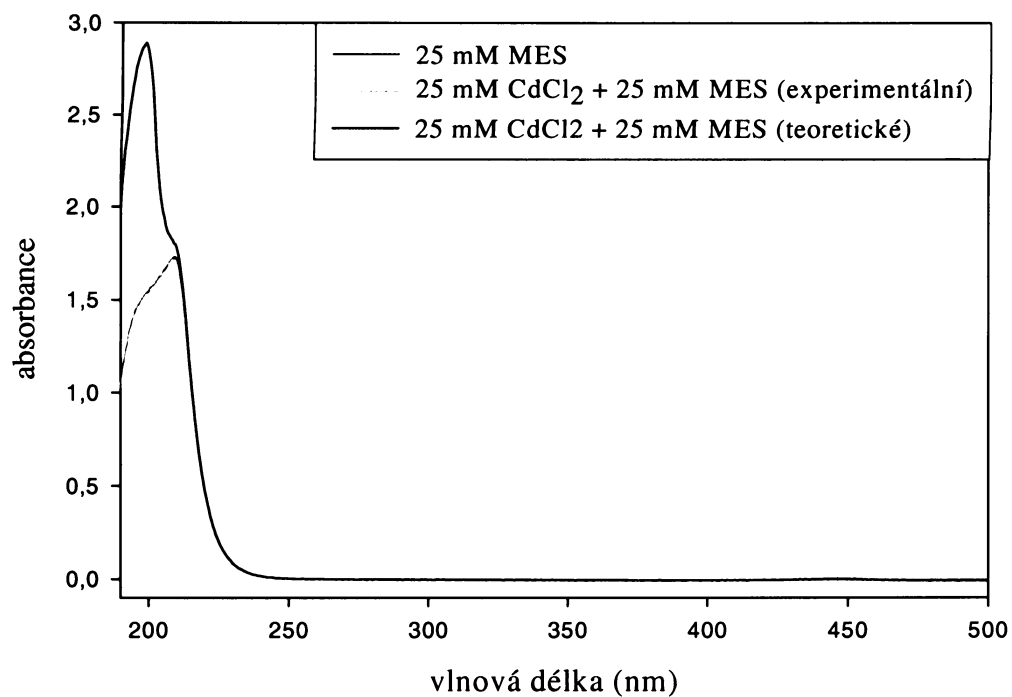
**Graf 3.4** Experimentální spektra MESu a chloridu kadmennatého o různé koncentraci.



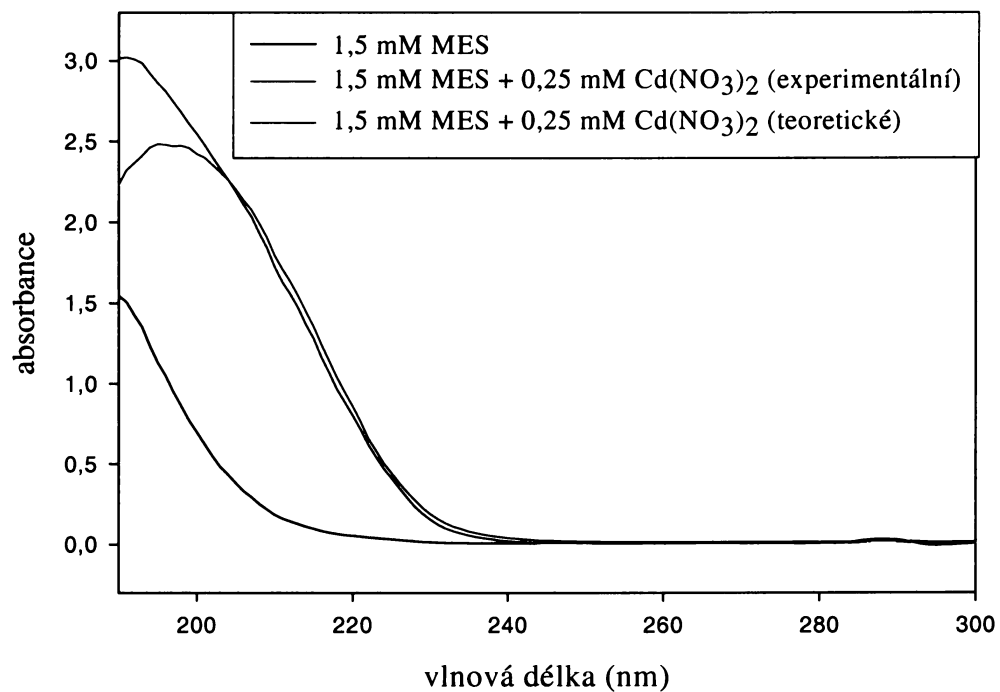
**Graf 3.5** Spektra MESu a  $\alpha$  a  $\beta$  dextrinu o dvou různých koncentracích.



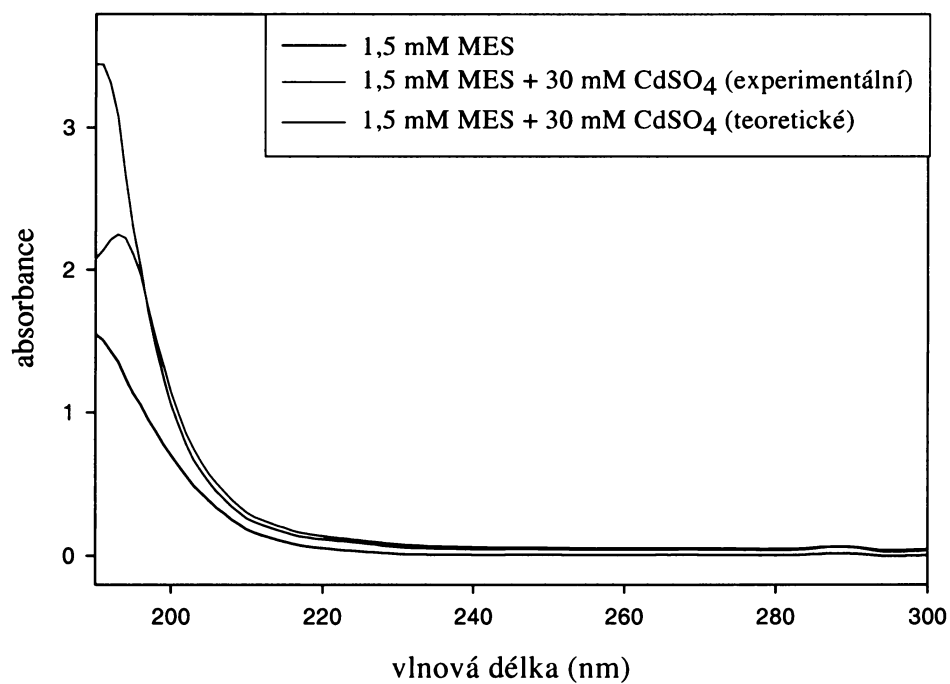
**Graf 3.6** Spektra MESu a  $\alpha$  dextrinu. Měření vzájemné interakce.



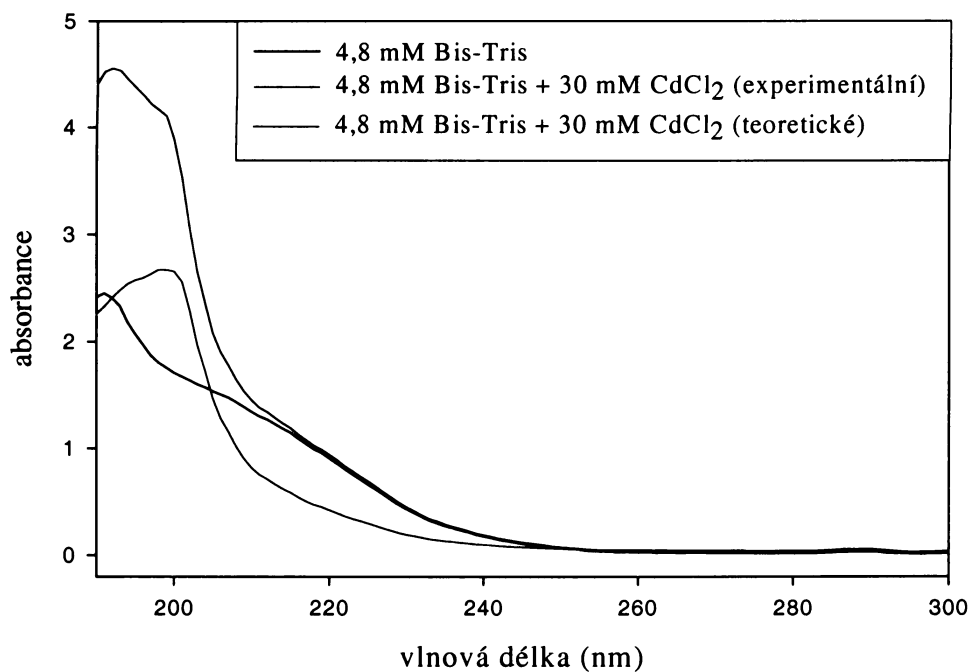
**Graf 3.7** Měření vzájemné interakce MESu a chloridu kadmnatého.



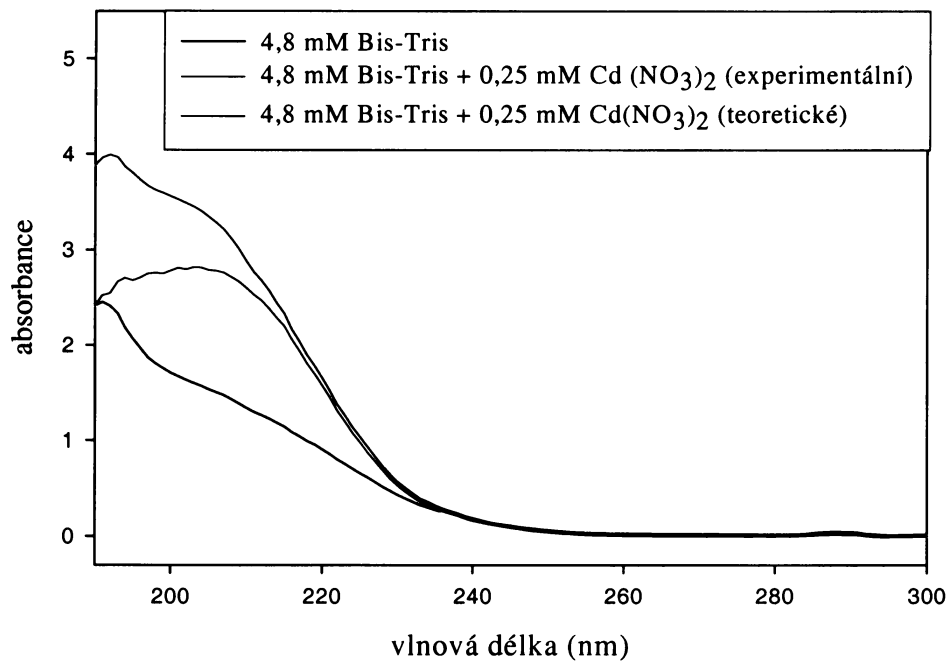
**Graf 3.8** Měření vzájemné interakce MESu a dusičnanu kadmnatého.



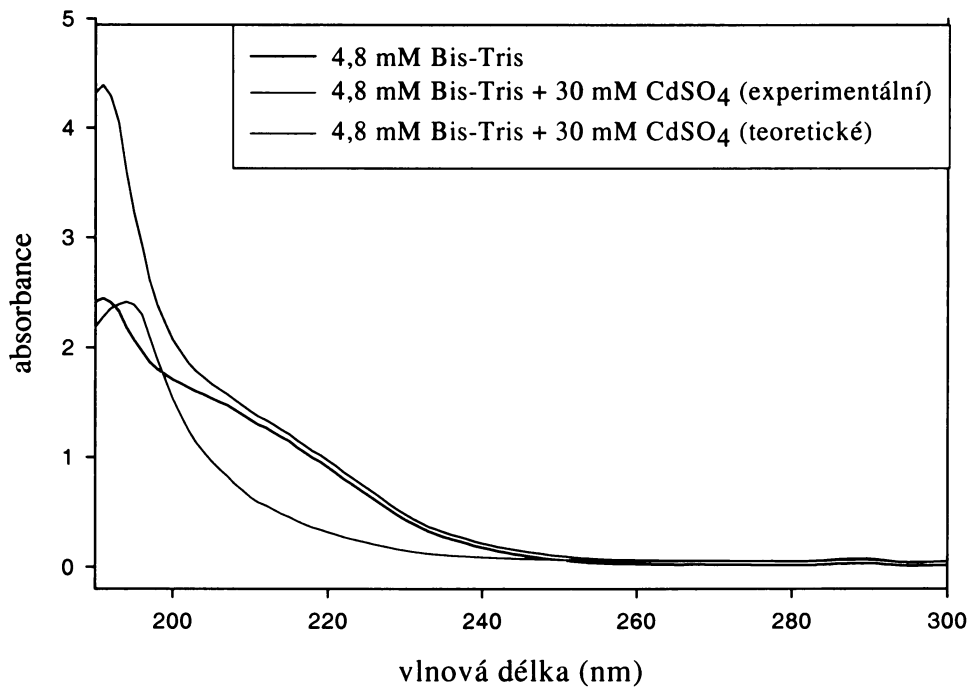
**Graf 3.9** Měření vzájemné interakce MESu a síranu kadmnatého.



**Graf 3.10** Měření vzájemné interakce Bis-Trisu a chloridu kadmnatého.

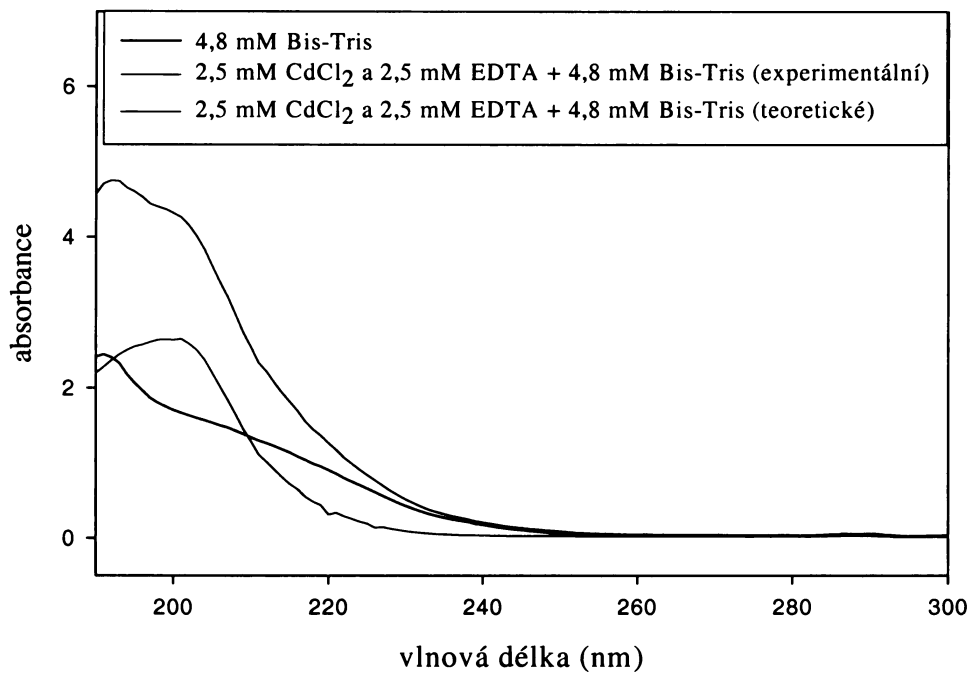


**Graf 3.11** Měření vzájemné interakce Bis-Trisu a dusičnanu kademnatého.

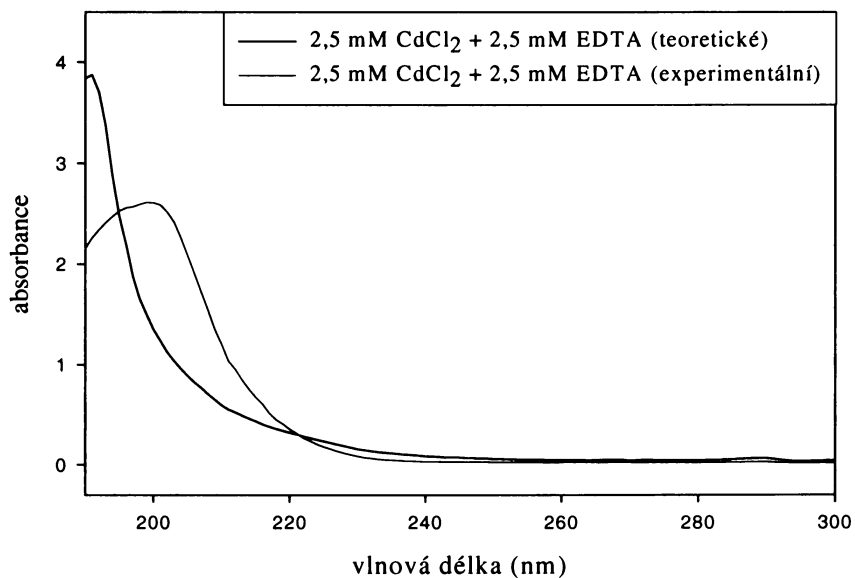


**Graf 3.12** Měření vzájemné interakce Bis-Trisu a síranu kademnatého.





**Graf 3.13** Měření vzájemné interakce Bis-Trisu a chloridu kadmnatého s kyselinou ethylendiamintetraoctovou.

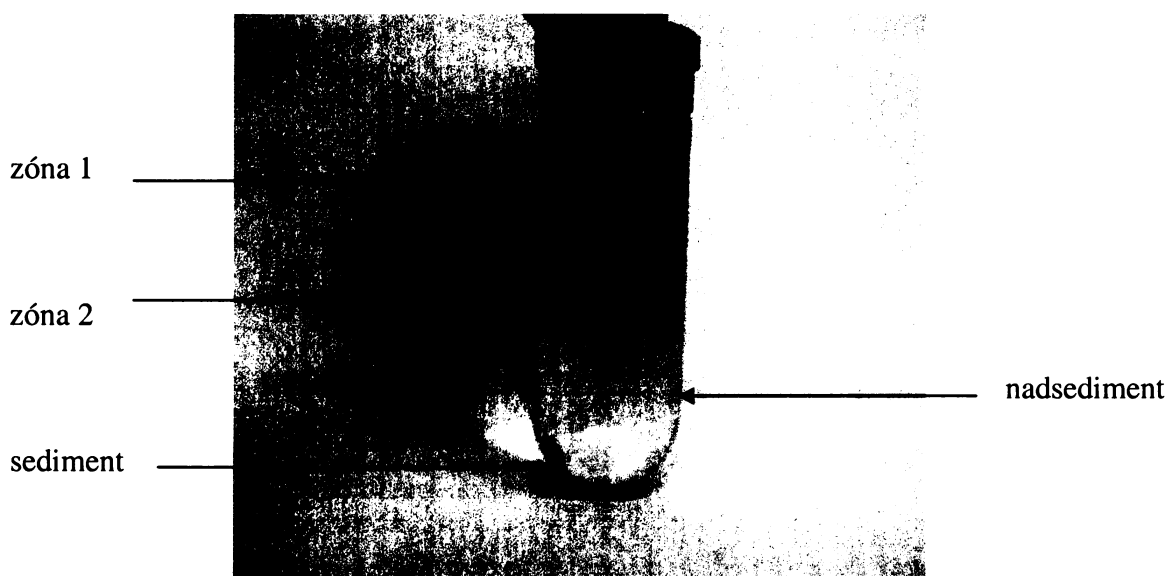


**Graf 3.14** Měření vzájemné interakce chloridu kadmnatého a kyseliny ethylendiamintetraoctové.

### 3.3 Centrifugace v hustotním gradientu sacharosy

Vzorky thylakoidních membrán špenátu jsem připravila dle kapitoly 2.6.2 a podrobila centrifugaci v šestnáctistupňovém hustotním gradientu sacharosy (kap. 2.6.3).

Během centrifugace se pigmentoproteinové komplexy thylakoidních membrán špenátu rozdělily do dvou zelených zón (viz. obr. 3.1)



**Obrázek 3.1** Rozdělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán špenátu v hustotním gradientu sacharosy.

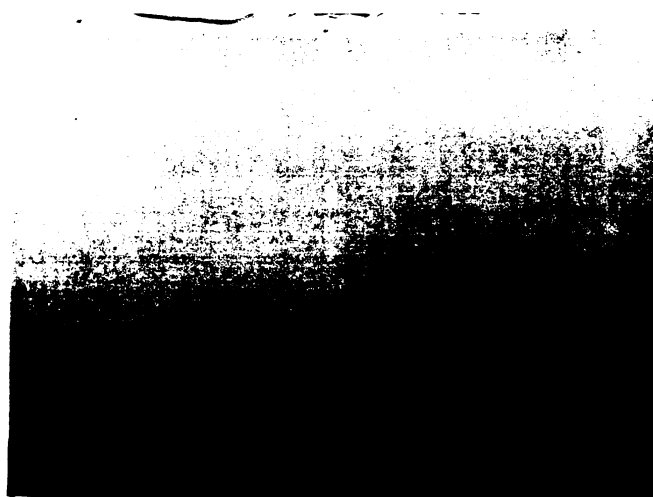
### 3.4 Elektroforetická analýza

Pigmentoproteinové komplexy thylakoidních membrán špenátu i zón po centrifugaci v sacharosovém hustotním gradientu jsem analyzovala pomocí „červené“ nativní elektroforézy (viz kap. 2.5.1). Následně jsem pigmentoproteinové komplexy (thylakoidních membrán a zóny 2) získané nativní elektroforézou analyzovala reelektroforézou v přítomnosti SDS (viz kap. 2.5.2).

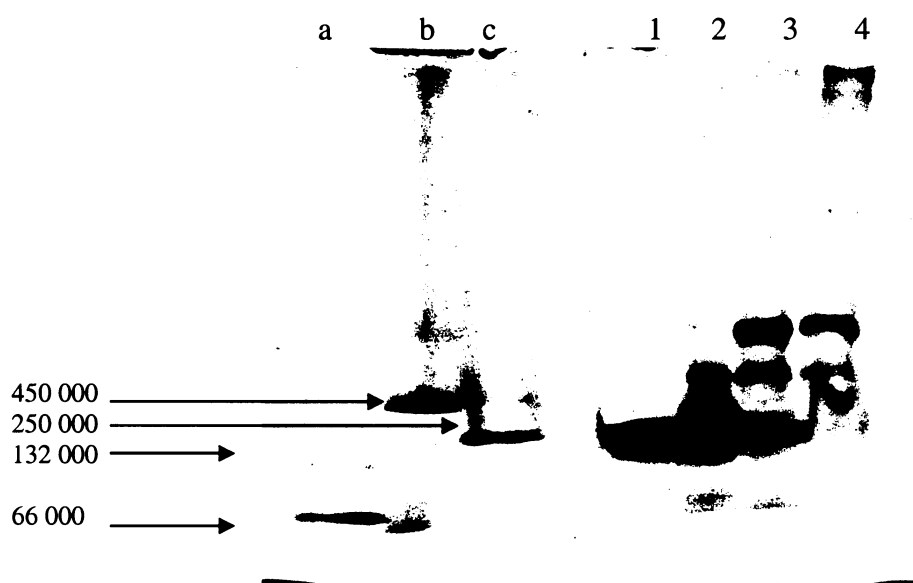
#### 3.4.1 „Červená“ nativní elektroforéza zón po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy s různým gradientem akrylamidového dělicího gelu.

V této fázi jsem se pokusila optimalizovat dělení pigmentoproteinových komplexů pomocí různého gradientu akrylamidu. Vyzkoušela jsem gradienty: 2,5–20 %; 3,5–15 %; 3,5–16 %; 4–11 %; 4–12 %; 4–13 %; 4–14 %. Jako nejvhodnější se ukázal gradient

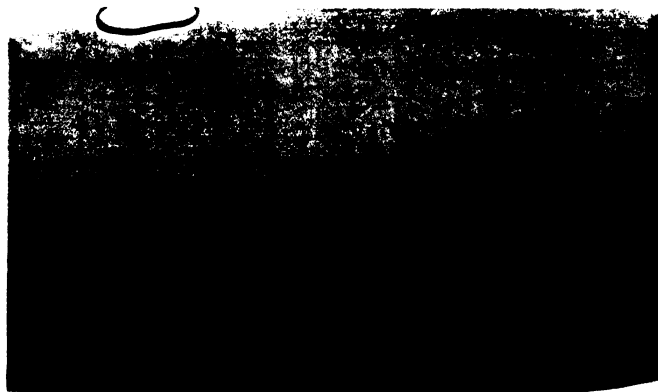
2,5–20 %, který jsem dále používala. Na obr.3.2 a 3.3 je pro ilustraci zobrazen gel s nejmenším rozmezím koncentrací akrylamidu a na obr. 3.4 a 3.5 gel s největším rozmezím koncentrací akrylamidu.



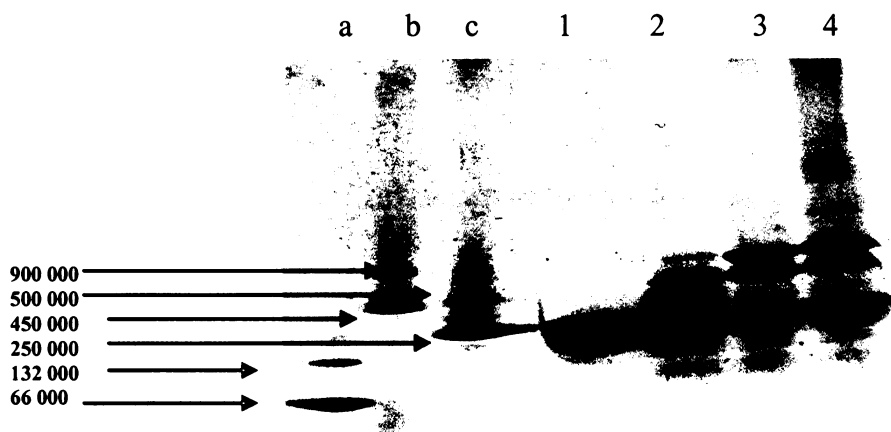
**Obrázek 3.2** Elektroforetické dělení pigmentoproteinů z jednotlivých zón na 4–11% gradientu akrylamidu. Před obarvením.



**Obrázek 3.3** Elektroforetické dělení pigmentoproteinů z jednotlivých zón na 4–11% gradientu akrylamidu. Po obarvením. Dráhy: a – BSA; b – ferritin; c – katalasa; 1 – zóna 1; 2 – zóna 2; 3 – nadsediment; 4 – sediment



**Obrázek 3.4** Elektroforetické dělení pigmentoproteinů z jednotlivých zón na 2,5–20% gradientu akrylamidu. Před obarvením.



**Obrázek 3.5** Elektroforetické dělení pigmentoproteinů z jednotlivých zón na 2,5–20% gradientu akrylamidu. Po obarvení. Dráhy: a – BSA; b – ferritin; c – katalasa; 1 – zóna 1; 2 – zóna 2; 3 – nadsediment; 4 – sediment

**Tabulka 3.11** Průměry relativních molekulových hmotností pigmentoproteinových komplexů zón po centrifugaci v sacharosovém hustotním gradientu (n = 10). Dělené na různých gradientech akrylamidu. Relativní molekulové hmotnosti psané zeleně byly před obarvením zelené.

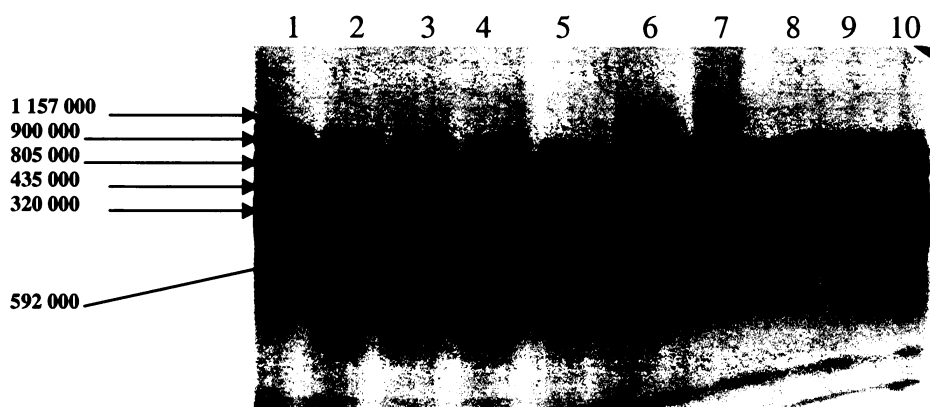
vzorek	zóna 1	zóna 2	nadsediment	sediment
relativní molekulová hmotnost (kDa)	310	1279	1279	1279
	216	738	1068	738
		589	738	310
		454	310	216
		362	256	
		310		
		216		

### 3.5 „Červená“ nativní elektroforéza thylakoidních membrán špenátu v přítomnosti různé koncentrace chloridu kademnatého.

Pomocí „červené“ nativní elektroforézy jsem analyzovala pigmentoproteinové složení thylakoidních membrán při různé koncentraci kademnatých iontů (0; 0,05; 0,06; 0,5; 1; 5; 11; 30; 60 a 120 mM CdCl<sub>2</sub>). Thylakoidní membrány jsem vystavila okamžitému vlivu kademnatých iontů. Pro elektroforetické rozdělení thylakoidních membrán špenátu jsem použila 2,5 – 20 % gradient akrylamidu.



**Obrázek 3.11** Elektroforetické dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán špenátu vystavených okamžitému vlivu kademnatých iontů o různých koncentracích CdCl<sub>2</sub>. Použitý gradient akrylamidu je 2,5 – 20 %. Před obarvením.

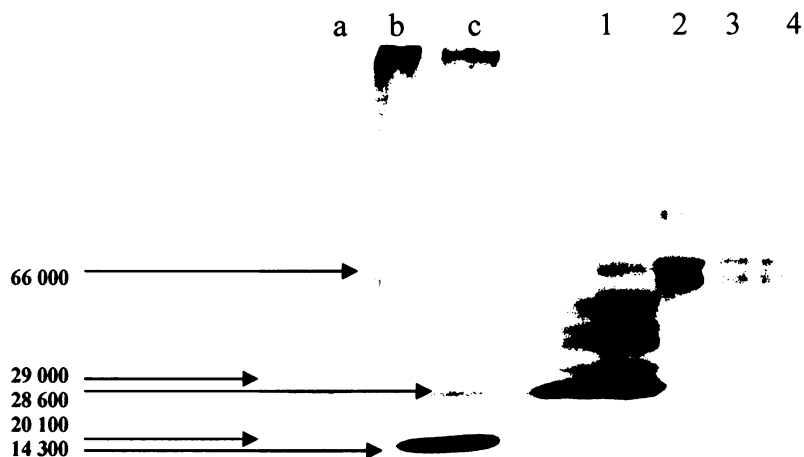


**Obrázek 3.12** Elektroforetické dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán špenátu vystavených okamžitému vlivu kadmnatých iontů o různých koncentracích  $\text{CdCl}_2$ . Použitý gradient akrylamidu je 2,5 – 20 %. Po obarvení. Dráhy: 1 –  $\text{Cd}_0$ ; 2 –  $\text{Cd}_{0,05}$ ; 3 –  $\text{Cd}_{0,06}$ ; 4 –  $\text{Cd}_{0,5}$ ; 5 –  $\text{Cd}_1$ ; 6 –  $\text{Cd}_5$ ; 7 –  $\text{Cd}_{11}$ ; 8 –  $\text{Cd}_{30}$ ; 9 –  $\text{Cd}_{60}$ ; 10 –  $\text{Cd}_{120}$ .

### 3.6 Reelektroforéza v přítomnosti SDS

Na obrázku 3.13 je reelektroforetické dělení proužků pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán špenátu získané „červenou“ nativní elektroforézou. Relativní molekulové hmotnosti thylakoidních membrán jsou uvedeny v tabulce 3.18.

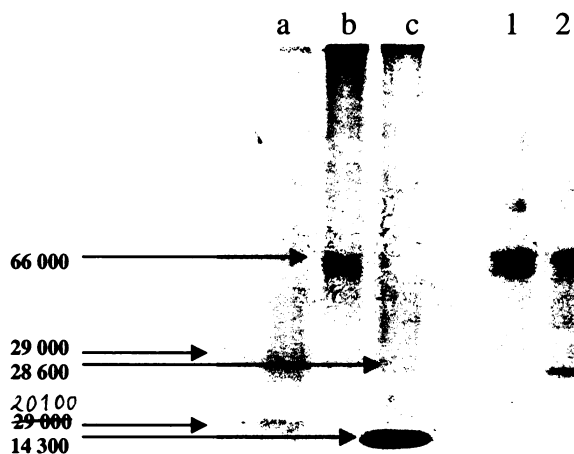
Na obrázku 3.14 je reelektroforéza z proužků po „červené“ nativní elektroforéze zóny 2 (získané centrifugací v sacharosovém hustotním gradientu). Příslušné relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v tab. 3.19.



**Obrázek 3.13** Reelektroforéza pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán špenátu separovaných v prvním rozměru pomocí „červené“ nativní elektroforézy. Dráhy: a – směsný standard, b – polyBSA, c – polylysozym, 1 – proteiny o rel. mol. hm. asi 300 kDa, 2 – proteiny o rel. mol. hm. asi 800 kDa, 3 – proteiny o rel. mol. hm. asi 900 kDa, 4 – proteiny o rel. mol. hm. asi 1 200 kDa.

**Tabulka 3.12** Relativní molekulové hmotnosti thylakoidních membrán špenátu separované reelektroforézou. Relativní molekulové hmotnosti psané zeleně byly před obarvením zelené.

proužek	1	2	3	4
relativní molekulová hmotnost (kDa)	68	104	80	80
	52	80	62	62
	50	62		
	43	28		
	38	23		
	33	22		
	27			
	24			



**Obrázek 3.14** Reelektroforéza pigmentoproteinových komplexů zóny 2 separované v prvním rozměru pomocí „červené“ nativní elektroforézy. Dráhy: a – směsný standard, b – polyBSA, c – polylysozym, 1 – proteiny o rel. mol. hm. asi 730 kDa, 2 – proteiny o rel. mol. hm. asi 310 kDa

**Tabulka 3.13** Relativní molekulové hmotnosti zóny 2 separované reelektroforézou. Relativní molekulové hmotnosti psané zeleně byly před obarvením zelené.

proužek	1	2
relativní molekulová hmotnost (kDa)	105	69
	69	61
	61	41
		28



## 4. Diskuse

Tato diplomová práce se zabývá vlivem kademnatých iontů na fotosyntézu vyšších rostlin. Jako zástupce vyšších rostlin byl vybrán špenát (*Spinacea oleracea L.*).

Dříve než jsem vystavila izolované thylakoidní membrány špenátu kademnatým iontům, snažila jsem se zjistit, zda kademnaté ionty s puforem MES (2-morfolinethansulfonová kyselina) nevytvářejí komplexy. Příslušné konstanty stability těchto komplexů totiž nejsou uvedeny v dostupných databázích ani odborné literatuře.

Změřila jsem spektrum samotného MESu při různých koncentracích (graf 3.1). Čím byla koncentrace MESu větší, tím víc se spektrum posouvalo směrem k větším vlnovým délkám. To vedlo k hypotéze, že MES zřejmě vytváří agregáty, které absorbují při větší vlnové délce než monomery. Tvorbu agregátů jsem se pokusila potvrdit měřením spekter MESu a dextrinů. (Dextriny jsou antiagregační činidla.) Zjistila jsem, že MES s  $\alpha$ -dextrinem prokazatelně interaguje (viz grafy 3.5 a 3.6).

Z grafu 3.2 vyplývá, že ani chlorid kademnatý se nechoval podle Lambertova-Beerova zákona. Kademnaté soli mají poměrně velký sklon k tvorbě komplexů [50]. Nápadně pevná je zejména vazba mezi kademnatými a halogenidovými ionty [50]. Chlorid kademnatý je ve vodném roztoku jen neúplně disociován a vytváří autokomplexy [50]. Měřila jsem také spektra MESu a  $\text{CdCl}_2$  při různém pH (graf 3.3), abych zjistila, zda se netvoří hydroxid kademnatý. Na chlorid kademnatý různé pH skoro nepůsobí.

Dále jsem změřila spektrum samotného MESu a MESu s chloridem kademnatým, obě spektra byla stejná (graf 3.7). To vedlo k hypotéze, že na zbytky sulfonové kyseliny, které ční z agregátu MESu, se váží kademnaté ionty. Agregáty způsobují disperzi, kademnaté ionty tedy neabsorbují [51].

Také jsem měřila spektra 25mM MESu a chloridu kademnatého o různé koncentraci (graf 3.4). Zjistila jsem, že zřejmě až do koncentrace 60 mM  $\text{CdCl}_2$  váže MES všechny kademnaté ionty a spektra tak zůstávají stejná.

Dále jsem zkusila použít kademnaté ionty v jiné formě:  $\text{CdSO}_4$  a  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ . Naměřená spektra jasně prokázala, že k interakci pufru s kademnatými ionty dochází (viz grafy 3.8 a 3.9).

Proto jsem zkoušela, jak bude reagovat jiný pufr, Bis-Tris (viz seznam zkratk). Interakci pufru s kademnatými ionty jsem také prokázala u všech měřených sloučenin kadmia.

Nežádoucí reakci jsem se pokusila zabránit přidáním kyseliny ethylendiamintetraoctové k roztoku kademnatých iontů. Z naměřeného spektra (graf 3.13 a 3.14) vyplývá, že část kademnatých iontů se navázala do komplexu s kyselinou ethylendiamintetraoctovou a část zůstala volná a interagovala s pufrem. Tvorba komplexů kyseliny ethylendiamintetraoctové s kademnatými ionty je závislá na pH, přičemž daný komplex má největší konstantu stability při pH 9 [52]. Zvýšení pH však není v našem případě žádoucí.

Zjistila jsem tedy, že při používání MESu a Bis-Trisu není možné určit v jaké formě kademnaté ionty působí. Něco podobného bylo zjištěno i u HEPESu (viz seznam zkratek) [34,53]. Další pokusy byly prováděny s tím, že jsem brala v úvahu pouze celkovou koncentraci kademnatých iontů. (Různé formy  $\text{Cd}^{2+}$  však mohou interagovat různě.)

Dále jsem vystavila thylakoidní membrány špenátu širokému rozmezí koncentrací kademnatých iontů od 0,05mM do 120mM  $\text{CdCl}_2$ . Zaměřila jsem se zejména na nízké koncentrace, protože u sinic byla zaznamenána stimulace aktivity fotosystému II právě při nižších koncentracích kademnatých iontů [53, 54]. Bylo prokázáno, že vyšší rostliny jsou na působení kademnatých iontů citlivější než sinice [34]. Možnou stimulaci aktivity fotosystému II jsem tedy hledala při koncentracích kademnatých iontů o několik řádů nižších, než při jaké byla zaznamenána stimulace fotosyntetické aktivity sinic (10 a 100mM  $\text{CdCl}_2$ ). Thylakoidní membrány špenátu jsem vystavovala převážně okamžitému vlivu kademnatých iontů, protože inkubace (viz kap. 2.8) s tolika různými koncentracemi kademnatých iontů by byla časově náročná.

Jak je vidět v tab. 3.3 a 3.4, došlo v první sadě měření ( $\text{Cd}_0$ – $\text{Cd}_{0,6}$ ) k výraznému poklesu aktivity posledního měřeného vzorku ( $\text{Cd}_{0,6}$ ). Proto jsem v následující sadě měření znovu změřila čerstvý vzorek se stejnou koncentrací kademnatých iontů, naměřená aktivita byla výrazně vyšší. Stejný trend jsem zaznamenala i u ostatních sad měření. Proto jsem se následně pokusila zjistit, jak se mění aktivita thylakoidních membrán špenátu na čase (tab. 3.5 a 3.6). Žádný vliv na aktivitu jsem ale nezaznamenala. Proto bychom se mohli domnívat, že se s časem nemění aktivita vzorku, ale citlivost pigmentoproteinových komplexů ke kadmiu. Měření fotochemické aktivity fotoredukcí DCPIP je metoda, která se v naší laboratoři běžně používá, ale dosud nebylo zjišťováno, jak se mění aktivita vzorku s časem od rozmrazení. Obvykle totiž nebylo třeba tolika měření s jedním vzorkem, aby se tento faktor uplatnil. Abych tento nežádoucí vliv vyloučila, měřila jsem střídavě kontrolní vzorek a vzorek s kademnatými ionty.

U thylakoidních membrán špenátu vystavených okamžitému vlivu kademnatých iontů

došlo k statisticky průkaznému poklesu aktivity až u koncentrace 11 mM, kdy aktivita klesla průkazně o 16 % (tab.3.7 a3.8). Do této koncentrace kademnatých iontů byl jakýkoli vliv na aktivitu fotosystému II statisticky neprůkazný.

V přítomnosti umělého donoru elektronů (tab. 3.9 a 3.10) jsem naměřila statisticky průkaznou stimulaci aktivity při dvou nejnižších měřených koncentracích kademnatých iontů (0,05 a 0,06 mM). Aktivita průkazně vzrostla o 0,07 % u koncentrace 0,05 mM CdCl<sub>2</sub> a o 5,66 % u koncentrace 0,06 mM CdCl<sub>2</sub>. K statisticky průkaznému poklesu aktivity došlo již u koncentrace 3 mM a to o 7,36 %. K poklesu aktivity došlo i u koncentrace 0,08 mM CdCl<sub>2</sub>, ale tato hodnota bude zřejmě odlehlá, protože u následujících koncentrací (0,1; 0,5 a 1 mM) k žádnému průkaznému poklesu aktivity nedošlo.

Thylakoidní membrány špenátu jsem vystavila také třicetiminutové inkubaci s 5, 10 a 15mM CdCl<sub>2</sub>. Stimulaci aktivity fotosystému II jsem naměřila v přítomnosti umělého donoru elektronů u koncentrace kademnatých iontů 5 mM. Aktivita vzrostla průkazně o 27,10 %. Pokles aktivity vývoje kyslíku jsem zaznamenala u koncentrace CdCl<sub>2</sub> 15 mM a to o 21,36 %. Ostatní výsledky byly statisticky neprůkazné.

Pigmentoproteinové komplexy jsem separovala pomocí centrifugace v sacharosovém hustotním gradientu. Podařilo se mi oddělit PS1 od PS2. Obě zóny obsahovaly pouze fotosystém I. Fotosystém II klesl až do nadsedimentu a sedimentu. Příčinou by mohlo být použití úhlového rotoru.

Dalším cílem mé diplomové práce bylo optimalizovat podmínky „červené“ nativní elektroforézy. Zkoumala jsem dělení zón po centrifugaci v sacharosovém hustotním gradientu na různém gradientu akrylamidu. Zjistila jsem, že na gradientu akrylamidu 2,5–20 % se pigmentoproteinové komplexy zón po centrifugaci dělí nejlépe. Také jsem vyzkoušela různé tenzidy (decyl-β-D-maltosid, oktyl-β-D-glukopyranosid a *n*-dodecyl-β-D-maltosid). Jako nejvhodnější se ukázal *n*-dodecyl-β-D-maltosid. Pigmentoproteinové komplexy thylakoidních membrán špenátu separované pomocí „červené“ nativní elektroforézy jsem dále analyzovala reelektroforézou v prostředí SDS (viz tab. 3.18).

Reelektroforéza thylakoidních membrán ukázala, že v pigmentoproteinu o relativní molekulové hmotnosti asi 300 kDa je zřejmě fotosystém II. Jeho reelektroforéza poskytuje typický profil, svědčící pro jeho přítomnost. Pigmentoprotein o molekulové hmotnosti 27 kDa přísluší zřejmě světlosběrným komplexům, které jsou ve velké míře navázány na PS2. Proteiny o relativní molekulové hmotnosti 43 a 38 kDa jsou zřejmě pigmentoproteiny

vnitřní světlosběrné antény CP47 a CP43. Pás o relativní molekulové hmotnosti 33 kDa jsou zřejmě proteiny D1, D2 a periferní podjednotka OEC (33 kDa).

Z profilu reelektroforézy pigmentoproteinů o relativních molekulových hmotnostech asi 800 kDa, 900 kDa a 1200 kDa usuzujeme na přítomnost fotosystému I v různých oligomerních formách. Pigmentoprotein o relativní molekulové hmotnosti 800 kDa přísluší zřejmě trimeru PS1. Pigmentoproteiny o relativní molekulové hmotnosti 900 a 1200 kDa budou pravděpodobně vyšší agregáty PS1, které se zřejmě tvoří za podmínek solubilizace či elektroforézy. Domníváme se, že pigmentoproteinové pásy o relativní molekulové hmotnosti 80 a 62 kDa přísluší základnímu heterodimeru PS1. Pigmentoprotein o relativní molekulové hmotnosti 28 kDa přísluší zřejmě světlosběrnému komplexu PS1.

Reelektroforéza zóny 2 po centrifugaci v sacharosovém hustotním gradientu ukázala na přítomnost PS1. Domníváme se, že proteiny s molekulovou hmotností 64 a 69 kDa budou zřejmě podjednotky PsaA a PsaB.

Také jsem studovala změny pigmentoproteinového složení thylakoidních membrán špenátu při různých koncentracích kademnatých iontů. Již při koncentraci kademnatých iontů 5mM zcela vymizel protein o relativní molekulové hmotnosti 592 kDa. Dále došlo k mírnému zeslabení pásů pigmentoproteinů o relativních molekulových hmotnostech 900 a 800 kDa, které přísluší různým oligomerním stavům PS1.

## 5. Závěr

- 1) Podařilo se mi nalézt vhodné podmínky „červené“ nativní elektroforézy, při kterých došlo k oddělení fotosystému I a fotosystému II. Gradient akrylamidu 2,5--20 % se ukázal jako nejvhodnější k dělení jak velkých, tak i malých proteinů. K solubilizaci vzorků byl nejvhodnější *n*-dodecyl- $\beta$ ,D-maltosid.
- 2) Zjistila jsem, že oba zkoumané pufrы, bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris) a 2-morfolinethansulfonová kyselina (MES), vytvářejí komplexy s kademnatými ionty ve všech používaných sloučeninách kadmia, tj.  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$  a  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ . Není tedy možné určit, v jakých formách kademnaté ionty působí.
- 3) Fotochemická aktivita thylakoidních membrán špenátu vystavených okamžitému působení kademnatých iontů byla stimulována při nízkých koncentracích (řádově desítky  $\mu\text{M}$ ) Nárůst fotochemické aktivity měřený bez přítomnosti umělého donoru byl statisticky neprůkazný.

U inkubovaných vzorků jsem naměřila nárůst fotochemické aktivity při koncentraci kademnatých iontů 5 mM.

## Seznam použité literatury

- [1] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha (1998)
- [2] Voet, D., Voetová, J.G.: Fotosyntéza, v knize Biochemie, Victoria Publishing, Praha (1995)
- [3] Seidlová, F., Šetlík, I.: Fyziologie rostlin, Biologická fakulta JČU, České Budějovice (1998)
- [4] Hansson, Ö., Wydrzynski, T.: Photosynth.Res. 23, 131–162 (1990)
- [5] Bricker, T. M.: Photosynth. Res. 24, 1–13 (1990). Citováno ze [9].
- [6] Satyre, R. T., Wrobel-Boerner, E. A.: Photosynth. Res. 40, 11–19 (1994). Citováno ze [9].
- [7] Dekker, J.P., Boekema, E. J.: Biochim. Biophys. Acta 1706, 12–39 (2005)
- [8] Bennett, J.: Physiol.Plant. 60, 583–590 (1984).
- [9] Kučera, T., Sofrová, D.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 564–588 (2004)
- [10] Dekker, J.P., Van Grondelle, R.: Photosynth.Res. 63, 195–208 (2000)
- [11] Trojme, P., Kern, J., Loll, B., Biesiadka, J., Saenger, W., Witt, H. T., Krauss, N., Zouni, A.: Philos. Trans. R. Soc. B – Biol. Sci. 357, 1 337–1 344 (2002)
- [12] Telfer, A.: Philos. Trans. R. Soc. B – Biol. Sci. 357, 1 431–1439 (2002)
- [13] Telfer, A., Barber, J.: Role of carotenoid bound to the photosystem II reaction centre, v knize Photosynthesis: from light to the biosphere ( Mathis, P., ed.), svazek IV, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, str.15–20 (1995). Citováno ze [12].
- [14] Faller, P., Maly, T., Rutherford, W., MacMillan, F.: Biochemistry 40, 320–326 (2001)
- [15] Hanley, J., Deligiannakis, Y., Pascal, A., Faller, P., Rutherford, W.: Biochemistry 38, 8189–8195 (1999)
- [16] Karnauchov, I., Hermann, R., G., Klösgen, R., B.: FEBS Lett. 408, 206–210 (1997)
- [17] Takahashi, Y., Rahire, M., Breyton, C., Popot, J.-L., Joliot, P., Rochaix, J.-D.: HMBO J. 15, 3498–3506 (1996). Citováno ze [16].
- [18] Berthold, D., A., Schmidt, C., L., Malkin, R.: J. Biol. Chem. 270, 29293–29298

- (1995). Citováno ze [16].
- [19] Ke, B.: Phycobiliproteins and phycobilisomes, v knize Photosynthesis. Photobiochemistry and Photobiophysics (Ke,B.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, str.251–269 (2001)
- [20] Kafka, Z., Punčochářová, J.: Chemické Listy 96, 611 – 617 (2002)
- [21] Prasad, M.N.V., Strzalka, K.: Impact of Heavy Metals on Photosynthesis, v knize Heavy Metal Stress in Plants, (Prasad M. N.V., Hagemeyer J., ed.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 117–138 (1999)
- [22] Haghiri, F.: J. Environm.Qual 2, 93–96 (1973)
- [23] Hovmand, M.F., Tjell, J.C., Mosback, H.: Environm.Pollut 30, 27–38 (1983)
- [24] Padmaja, K., Prasad, D.D.K., Prasad, A.R.K.: Photosynthetica 24, 399–405 (1990)
- [25] Kupper, H., Kupper, F., Spiller, M.:Photosynth. Res. 58, 123–133 (1998)
- [26] Prasad, M.N.V.: Environ. Exp. Bot. 35, 525–540 (1995)
- [27] Krupa, Z., Skórzyńska, E., Maksymiec, W., Baszyński, T.: Photosynthetica 21, 156–164 (1987)
- [28] Krupa, Z.: Physiol. Plant. 73, 518–524 (1988)
- [29] Baszyński, T., Wajda, L., Król, M., Wolińska, D., Krupa, Z., Tukendorf, A.: Physiol.Plant. 48, 365–370 (1980)
- [30] Ghoshrony, S., Nadakavukaren, K. J.: Environ. Exp. Bot. 30, 187–192 (1990)
- [31] Clijsters, H., Van Assche, F.: Photosynth. Res. 7, 31–40 (1985)
- [32] Vassilev, A., Lidon, F., Scotti, P., Da Graca, M., Yordanov, I.: Biol. Plant. 48, 153–156 (2004)
- [33] Šeršeň, F., Kráľová, K.: Photosynthetica 39, 575–580 (2001)
- [34] Nováková, M.: Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát fotoautotrofních organismů. Vzájemné porovnání sinic a vyšších rostlin. Diplomová práce, PŘF UK Praha (2003)
- [35] Geiken, B., Masojídek, J., Rizzuto, M., Pompili, M. L., Giardi, M. T.: Plant cell Environ. 21, 1265–1273 (1998)
- [36] Ouzounidou, G., Lannoyea, R., Karataglis, S.: Plant Science 89, 221–226 (1993)
- [37] Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T., Baszyński, T.:Physiol. Plant. 91, 715–721 (1994)
- [38] Siedlecka, A., Baszyński, T.: Physiol. Plant. 87, 199–202 (1993)

- [39] Siedlecka, A., Krupa, Z.: *Photosynthetica* 36, 321–331(1999)
- [40] Stiborová, M., Doubravová, M., Březinová, A., Friedrich, A.: *Photosynthetica* 20, 418–425 (1986)
- [41] Siedlecka, A., Krupa, Z., Samuelsson, G., Öquist, G., Garderström, P.: *Plant Physiol. Biochem.* 35, 951–957 (1997)
- [42] Smýkalová, I.: *Biologické listy* 65, 81–102 (2000)
- [43] Grill, E., Winnacker, E.–L., Zenk, M.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 439–443 (1987). Citováno ze [42].
- [44] Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, Ch., Jackson, P.J.: *Biochem. J.* 295, 1–10 (1993)
- [45] Zenk, M.H.: *Gene* 179, 21–30 (1996)
- [46] Steffens, J.C.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 553–575
- [47] Eshaghi, S., Andersson, B., Barber, J.: *FEBS Lett.* 446, 23–36 (1999)
- [48] Arnon, D.I.: *Plant Physiol.* 24, 1–15 (1949)
- [49] Liberda, J.: osobní sdělení
- [50] Remy, H.: Sloučeniny kadmia, v knize *Anorganická chemie, svazek II*, SNTL, Praha, str. 458–465 (1971)
- [51] Mosinger, J.:osobní sdělení
- [52] Berka, A., Feltl, L., Němec, I.: *Chelatometrie*, v knize *Příručka k praktiku z kvantitativní analytické chemie*, SNTL, Praha, str. 174–180 (1985)
- [53] Tůmová, E., Sofrová, D.: *Photosynthetica* 40, 103–108 (2002)
- [54] Nováková, M., Matějová, E., Sofrová, D.: *Photosynthetica* 42, 425–430 (2004)



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka