

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra biochemie

**Vliv kadmennatých iontů na fotosyntetický aparát sinice**  
***Synechococcus elongatus***

Lucia Sviteková

Školitel: RNDr. Tomáš Kučera, PhD.

Diplomová práce

Praha, 2006

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

V Praze 30.8.2006

Lucia Sviteková

Děkuji svému školitelovi RNDr. Tomáši Kučerovi, PhD za odborné vedení a pozornost, kterou mi věnoval při vypracování mé diplomové práce.

Také bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Danuši Sofrové, CSc. za cenné rady a Mikrobiologickému ústavu AV ČR v Třeboni za kultivaci sinic.

Děkuji všem ostatním, kteří mi jakoukoliv mírou pomohli k dokončení mé diplomové práce.

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>4</b>
<b>Seznam zkratek</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Teoretický úvod</b> .....	<b>9</b>
1.1 Obecná charakteristika fotosyntézy .....	9
1.1.1 Lokalizace fotosyntézy .....	11
1.1.2 Fotosyntetické pigmenty .....	12
1.2 Fotosyntetický aparát.....	16
1.2.1 Světloběrný systém fotosystému II .....	17
1.2.2 Fotosystém II.....	17
1.2.3 OEC-komplex vyvíjející kyslík .....	18
1.2.4 Komplex cyt b <sub>6</sub> /f.....	19
1.2.5 Fotosystém I a světloběrný systém.....	20
1.2.6 ATP-synthasa .....	21
1.3 Sinice.....	21
1.3.1 Klasifikace sinic.....	22
1.3.2 Fotosyntéza u sinic.....	23
1.3.3 Rozdíly ve fotosyntéze sinic a vyšších rostlin.....	24
1.4 Vliv kadmenných iontů na fotosyntézu rostlin.....	25
1.4.1 Ionty kadmia a jeho toxické vlastnosti .....	25
1.4.2 Bioremediace toxických kovů kontaminujících vody a půdy ....	27
1.5 Cíl práce .....	29
<b>2 Materiál a metody</b> .....	<b>30</b>
2.1 Biologický materiál.....	30
2.2 Seznam chemikálií.....	31
2.3 Izolace thylakoidních membrán sinic .....	33
2.4 Centrifugace v sacharosovém hustotním gradientu /36/.....	34
2.4.1 Princip metody /37/.....	34
2.4.2 Příprava vzorků pro centrifugaci v sacharosovém hustotním gradientu.....	34
2.4.3 Dělení pigmentoproteinových komplexů centrifugací v sacharosovém hustotním gradientu .....	35
2.5 Elektroforetické metody .....	36
2.5.1 „Červená“ nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	36
2.5.2 Detekce bílkovin, barvení a sušení gelů .....	40
2.5.3 Stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů.....	41
2.6 Spektroskopické metody.....	42
2.6.1 Stanovení koncentrace chlorofylu a.....	42
2.7 Příprava tenzidového extraktu .....	43
2.8 Měření fotochemických aktivit.....	43
2.8.1 Měření fotochemických aktivit fotoredukací DCPIP .....	43

2.8.2	Měření fotochemických aktivit fotoredukací DCPIP za přítomnosti DPC.....	44
2.9	Inkubace thylakoidních membrán sinic s kademnatými ionty .....	45
<b>3</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>48</b>
3.1	Fotochemické aktivity.....	48
3.1.1	Fotochemické aktivity kontrolních vzorků thylakoidních membrán sinic bez inkubace s kademnatými ionty .....	48
3.1.2	Fotochemické aktivity vzorků dodecylmaltosidového extraktu bez inkubace s Cd <sup>2+</sup> ionty.....	50
3.1.3	Měření fotochemické aktivity thylakoidních membrán sinic po 30minutové inkubaci s Cd <sup>2+</sup> ionty.....	51
3.1.4	Časová závislost.....	57
3.1.5	Fotochemické aktivity vzorků thylakoidních membrán sinic po 30ti minutové inkubaci s iontama kadmia v koncentraci 0 až 200 mM.....	58
3.2	Elektroforetická analýza .....	62
3.2.1	„Červená“ nativní elektroforéza sedimentu thylakoidních membrán sinic v hustotním gradientu sacharózy .....	62
3.2.2	„Červená“ nativní elektroforéze thylakoidních membrán sinic a thylakoidních membrán špenátu. ....	63
3.2.3	„Červená“ nativní elektroforéza thylakoidních membrán sinic v přítomnosti různé koncentrace chloridu kademnatého. ....	65
<b>4</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>74</b>
	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>75</b>

## Seznam zkratek

A<sub>0</sub> – molekula chlorofylu a

A<sub>1</sub> – molekula fylochinonu

ADP – adenosindifosfát

APC – cylindrické jádro fykobilisomů

APS – persíran amonný

ATP – adenosintrifosfátu

Bis – N,N'-methylen-bis-akrylamid

Bis-Tris – Bis (2-hydroxyethyl)amino tris (hydroxymethyl)methan

BSA – hovězí sérový albumin

CF<sub>0</sub>, CF<sub>1</sub> – složky ATP-synthasy

CP 43, CP 47 – proteiny s molekulovou hmotností 43 a 47 kDa

D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> – proteiny s molekulovou hmotností 32 a 34 kDa

DM – n-dodecyl-β, D-maltosid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DCPIP – 2,6-dichlorfenolindofenol

DPC – 1,5-difenyلكarbazid

F<sub>a</sub>, F<sub>b</sub> – shluky [4Fe-4S], sekundární akceptory předávající elektrony na ferredoxin

Fer – ferritin

Fd – ferredoxin

Fx – shluk [4Fe-4S], akceptor elektronů

Gra-3-P – glyceraldehyd-3-fosfát

HEPES – N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(ethansulfonová kyselina)

LHC – svetloběrný komplex

LHC I – svetloběrný komplex fotosystému I

LHC II – svetloběrný komplex fotosystému II

MES – 2-morfolinethansulfonová kyselina

NADPH – nikotinamidadenosindinukleotidfosfát

OEC – komplex vyvíjející kyslík

P33, P 23, P 27 – proteiny s molekulovou hmotností 33, 23, 27 kDa

P680 – pigment reakčního centra fotosystému II s udaným maximem absorpce

P700 – pigment reakčního centra fotosystému I s udaným maximem absorpce

PC (Pcy) – plastocyanin

PC – fykocyaniny

PE – fykoerythrin

PEC – fykoerythrocyaniny

PEPC – fosfoenolpyruvátcarboxylasa

Pheo – feofytinu

PMSF – fenylmethylsulfonyl fluorid

PQ – plastochinon

PS I – fotosystém I

PS II – fotosystém II

PsaA, PsaB – podjednotky dimeru fotosystému I s molekulovou hmotností 83 a 82,4 kDa

PsaC, PsaD, PsaE, PsaF – vnější podjednotky fotosystému I

PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM, PsaN – malé podjednotky fotosystému I

PsaG, PsaH – polypeptidy vážoucí anténní komplexy LHC I

Q – chinon

Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> – molekuly plastochinonu

Rbu-5-P – ribulosa-5-fosfát

RC – reakční centrum

RNA – ribonukleová kyselina

RuBisCO – ribulosa-1,5-bis-fosfátkarboxylasa/oxygenasa

S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub> – redoxní stavy komplexu vyvíjející kyslík

Sd – sediment z thylakoidních membrán sinic po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy

TEMED – N, N, N', N'-tetramethylethylendiamid

TM – thylakoidní membrány

TMs – thylakoidní membrány sinic

TMš – thylakoidní membrány špenátu

Tricine – n-tris(hydroxymethyl)methylglycin (Tricine)

Tris – tris(hydroxymethyl)-aminomethan

X – molekula ferredoxinu

Y<sub>Z</sub> – tyrosylový zbytek proteinu D<sub>1</sub> v pozici 161



# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Obecná charakteristika fotosyntézy

Život na Zemi je závislý na Slunci. Rostliny, řasy a bakterie vážou světelnou energii a pomocí fotosyntézy ji přeměňují na energii chemickou. Využitím této energie poskytují fotosyntetizující organismy nejen základní živiny, ale i molekuly kyslíku nutné pro existenci heterotrofních organismů, které využívají tento produkt k dýchání.

Podstatou fotosyntézy je absorpce zářivé energie pomocí molekul pigmentů a využití energie zachycených fotonů k syntéze sacharidů z oxidu uhličitého a sloučeniny schopné poskytnout vodík.

Obecnou rovnicí fotosyntézy lze zapsat:



kde  $\text{H}_2\text{D}$  je donor vodíku (resp. protonů a elektronů); D je jeho oxidovaná forma;  $\text{CH}_2\text{O}$  je vzniklý sacharid.

Absorpcí fotonu s vhodnou energií se molekula fotosyntetického pigmentu dostane do excitovaného stavu, v reakčním centru pak následuje oxidace a přenesení elektronu na primární akceptor. Z molekuly pigmentu se stane kation, který je redukován primárním donorem. Výsledkem sledu oxidačně-redukčních reakcí v procesu přeměny energie je redukovaný terminální akceptor, oxidovaný terminální donor a opět elektricky neutrální molekula pigmentu.

Existují dva typy fotosyntetizujících organismů:

- 1) Používající anoxygenní typ fotosyntézy; patří sem purpurové bakterie, zelené bakterie a heliobakterie, kterým jako elektronový donor slouží redukované organické sloučeniny nebo sulfan. Produktem fotosyntézy není kyslík.

- 2) Používající oxygenní typ fotosyntézy; patří sem sinice, řasy, vyšší rostliny, kde se uplatňuje oxidace vody na kyslík. Voda slouží jako donor elektronů a protonů.

S přenosem elektronů dochází ve fotosyntéze i k přenosu protonů, vzniká rozdíl koncentrace  $H^+$  iontů na obou stranách thylakoidních membrán. (protonový gradient). Při vyrovnávání gradientu se uvolňuje energie, která se přeměňuje na energii chemickou. Fotosyntéza zahrnuje dva typy pochodů:

- 1) Reakce závislé na světle (fotochemické reakce) – využívají energii světla k vytvoření redukovaného nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) a makroergické sloučeniny adenosintrifosfátu (ATP). Energie světelná se zde přeměňuje v energii chemickou /1/.
- 2) Reakce nezávislé na světle (temnostně-chemické reakce) v nichž NADPH a ATP pohání syntézu sacharidů z oxidu uhličitého a vody /1/.

Fotosyntetický aparát světelné fáze fotosyntézy tvoří pět supramolekulárních komplexů:

- 1) Světlosběrný anténní systém
- 2) Fotosystém II (PS II)
- 3) Komplex cytochromů typu  $b_6/f$
- 4) Fotosystém I (PS I)
- 5) ATP-synthasa

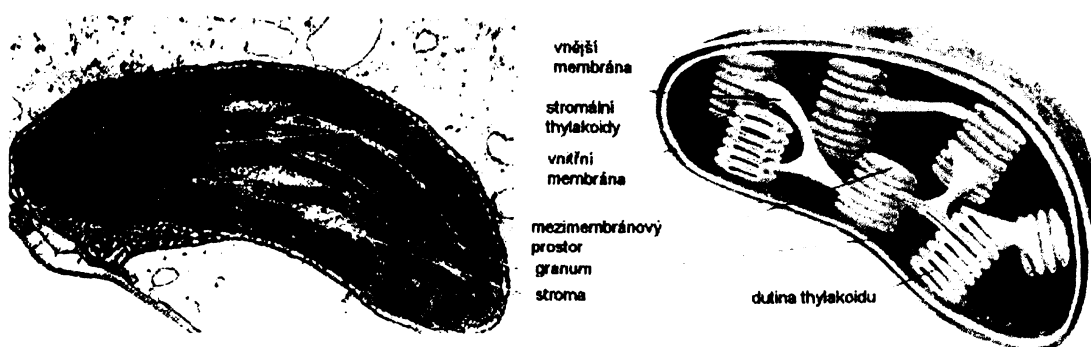
Reakce nezávislé na světle, které využívají ATP a NADPH k tvorbě sacharidů, představuje Calvinův cyklus. Tvoří ho dvě části:

- 1) Produkční část – tři molekuly Rbu-5-P (ribulosa-5-fosfát) reagují se třemi molekulami oxidu uhličitého, vznikne šest molekul Gra-3-P (glyceraldehyd-3-fosfát), přičemž se spotřebuje devět molekul ATP a šest molekul NADPH /1/.

- 2) Regenerační část – uhlíkové atomy pěti molekul Gra-3-P, se přeskupují reakcemi podobnými pentosofosfátové dráze. Výsledkem je regenerace tří molekul Rbu-5-P, s nimiž cyklus začala jedna molekula Gra-3-P /1/.

### 1.1.1 Lokalizace fotosyntézy

U eukaryot (řasy, vyšší rostliny), probíhá fotosyntéza v chloroplastu.



Obrázek 1.1

Elektronová mikrografie (a) a schematický nákres (b) chloroplastu z kukuřice /1/.

Je to buněčná organela bohatá na membrány. Může být v buňce jedna nebo jich může být více. Jeho nejběžnější tvar je elipsoid dlouhý asi 5  $\mu\text{m}$ . Má silně propustnou vnější obalovou membránu a nepropustnou vnitřní obalovou membránu, přičemž obě jsou odděleny mezimembránovým prostorem. Prostor obklopený vnitřní membránou obsahuje stroma, což je koncentrovaný roztok enzymů s molekulami DNA, RNA a ribosomy, kde se syntetizují chloroplastové bílkoviny. Ve stromatu se nachází třetí soustava membrán tzv. thylakoidy. Jsou to ploché váčky poskládané do sloupců. Tak vytvářejí grana, která jsou propojena thylakoidy probíhajícími jednotlivě stromatem označovanými jako lamely. Thylakoidy vznikají jako vchlípeniny vnitřní obalové membrány /2/.

Lipidy, které obsahují thylakoidní membrány jsou z 10 % fosfolipidy, z 80 % nepolární mono- a digalaktosyldiacylglyceroly a zbývající procenta představují

sulfolipidy resp. Sulfochinovosyldiacylglyceroly /3/. Vytvářejí dvouvrstvu, hydrofobními konci orientovanou k sobě a hydrofilními od sebe.

Dále pak obsahují proteiny, které mají funkční i strukturní funkci /4/.

Reakce závislé na světle probíhají v thylakoidních membránách. U fotosyntetizujících prokaryot v plazmatické membráně a nebo v bohatě členěných vchlípeninách této membrány, které se nazývají chromatofory.

### **1.1.2 Fotosyntetické pigmenty**

Existují tři kategorie fotosyntetických pigmentů:

- 1) Chlorofyly (porfyríny)
- 2) Fykobiliny (lineární substituované tetrapyrolové řetězce)
- 3) Karotenoidy (isoprenoidy)

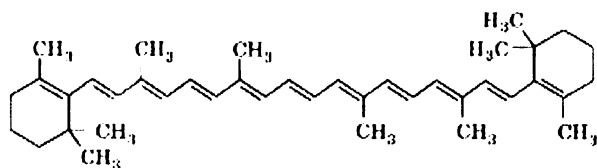
Jejich funkcí je zachycení kvanta záření a přenos energie excitovaného stavu na chlorofyl a v reakčním centru.

#### Chlorofyly

Jsou hlavním fotoreceptorem ve fotosyntéze, fungují jako světlosběrné antény absorbující fotony. Základní strukturou je porfyrin. Porfyriny jsou tetrapyroly vzájemně spojené methinovými můstky s velkým počtem konjugovaných dvojných vazeb. Chlorofyly obsahují centrální atom hořčíku. Mají podobnou strukturu, liší se v substituentech na uhlících v poloze 2 až 10, přítomností fytylu nebo farnesyly, jedním nebo dvěma dehydrogenovanými jádry a v  $\delta$ -methinovém můstku /5/.



1) karoteny (např.  $\beta$  karoten)



Obrázek 1.3

Strukturní vzorec  $\beta$ -karotenu /6/.

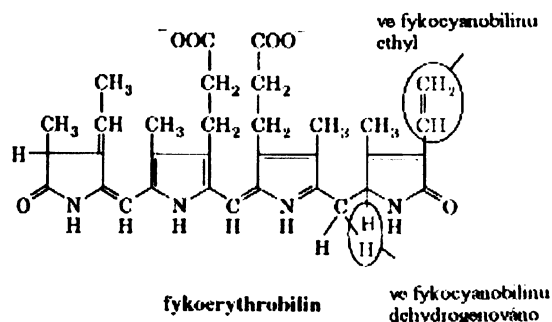
2) xantofyly – jsou kyslíkaté deriváty karotenů a hojný výskyt mají především v anténních komplexech /5/

Karotenoidy slouží jako doplňkové pigmenty přenášející absorbovanou světelnou energii na molekuly chlorofylu. Dále chrání fotosyntetický aparát před nevratnou fotooxidací.

Fykobiliny

Jsou lineární tetrapyrolová barviva, vyskytují se v sinicích a některých skupinách řas. Patří sem:

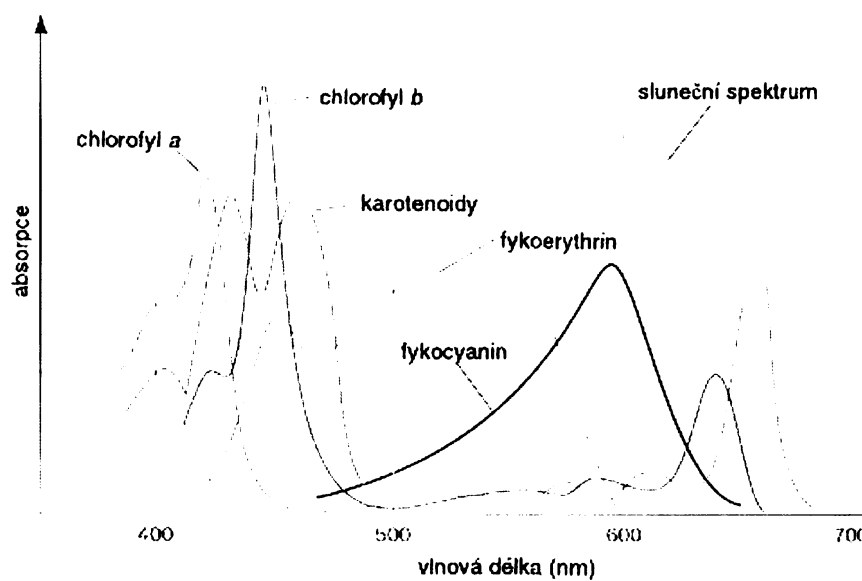
- Fykoerythrocyaniny (PEC, absorpční maximum je 575 nm)
- Fykoerythrin (PE, absorpční maximum je 565-575 nm) – vázány spolu s PEC v okrajových částech vnější tyče fykobilisomu
- Fykocyany (PC, absorpční maximum je 615-640 nm) – tvoří část vnějších tyčí fykobilisomů sousedících s jejich jádrem
- Alofykocyany (APC, absorpční maximum je 650-655 nm) – jsou hlavní složkou cylindrického jádra fykobilisomu /8/



Obrázek 1.4.

Strukturální vzorce fykobilinů /1/.

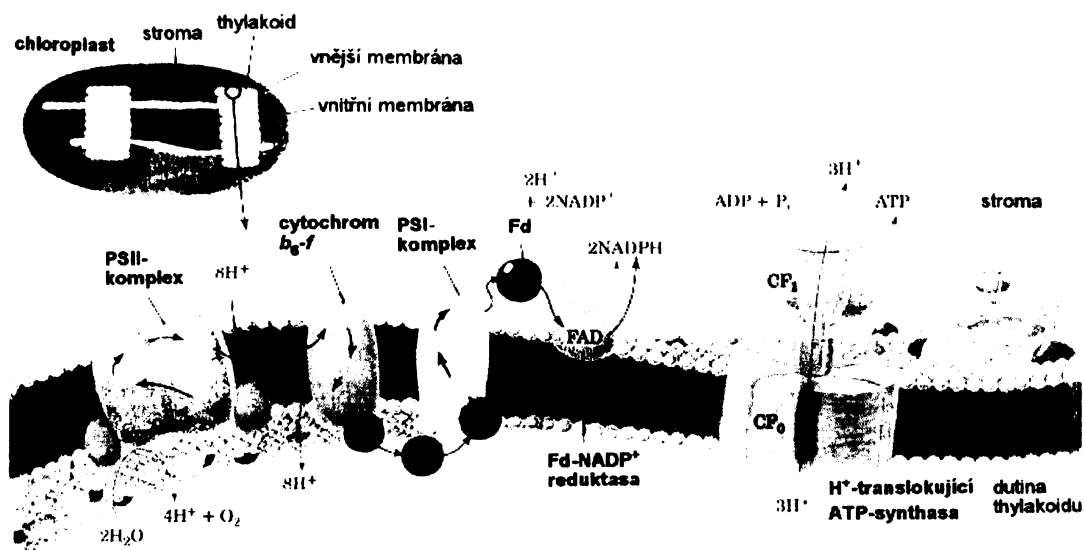
Fykobiliny jsou kovalentně vázány s bílkoviny ve fykobiliproteinech, které tvoří fykobilisomy (rozsáhlé vnější antény sinic). Ty jsou připoutány k vnějšímu povrchu fotosyntetických membrán, takže soustřeďují excitační energii do reakčního centra z poměrně velké vzdálenosti, ale s vysokou účinností.



Obrázek 1.5

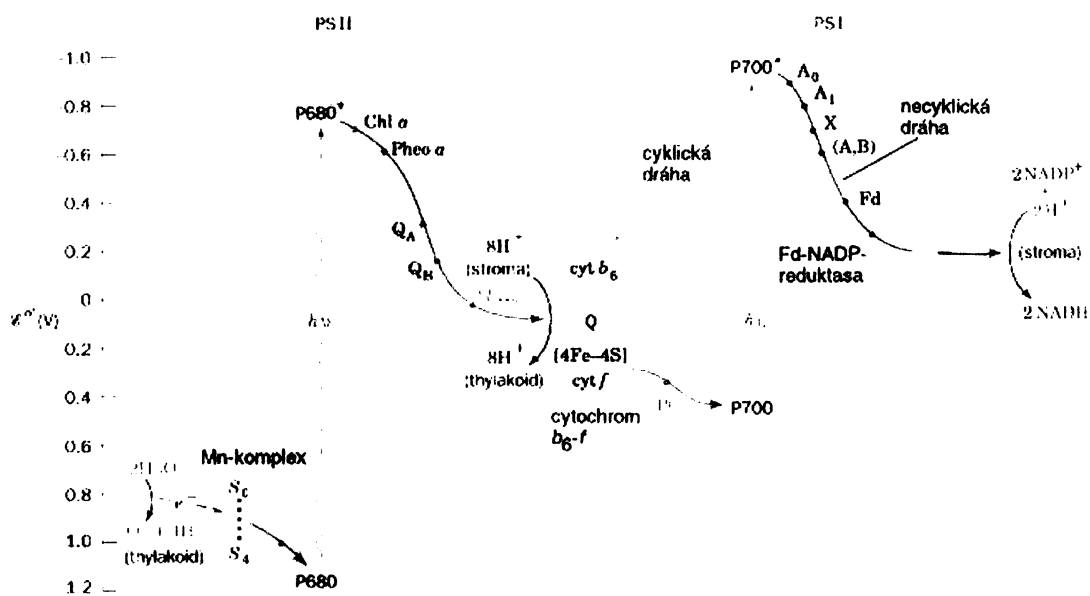
Absorpční spektra různých fotosyntetických barviv. Chlorofyly mají dva absorpční pásy, jeden v červené a jeden v modré oblasti. Fykoerythrin absorbuje modré a zelené světlo, kdežto fykocyanin absorbuje žluté světlo. Všechna tato barviva dohromady absorbují většinu viditelného světla ve slunečním spektru /7/.

## 1.2 Fotosyntetický aparát



Obrázek 1.6a

Schematické znázornění thylakoidní membrány a složek jejího řetězce přenosu elektronů /1/.



Obrázek 1.6b

Podrobný náčrt fotosyntetického schématu se škálou redoxních potenciálů /1/.



### 1.2.1 Světlosběrný systém fotosystému II

Hlavním úkolem světlosběrných systémů je absorpce světelné energie a její předávání molekulám chlorofylu v reakčním centru (RC). Světlosběrnou anténu PS II rozdělujeme na:

- 1) Vnitřní (proximální) část – je tvořena dvěma chlorofyl-proteiny CP 47 a CP 43 (z anglického „chlorophyll-carrying protein“, čísla udávají zdánlivou relativní molekulovou hmotnost určenou SDS elektroforézou v tisících).

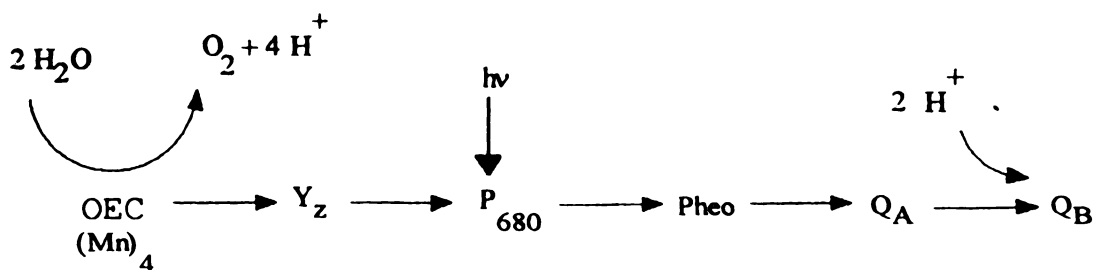
Oba tyto pigmentoproteiny obklopují reakční centrum PS II a molekuly chlorofylu vázané na tyto proteiny absorbují světelnou energii nebo ji přijímají z vnější části antény a předají ji reakčnímu centru PS II. Předpokládá se, že pigmenty jsou vázány na proteiny prostřednictvím histidinových zbytků /9/.

- 2) Vnější (distální) část – základní funkční podjednotkou je trimer proteinu, který tvoří světlosběrný komplex LHC (z anglického „light-harvesting complex“). Je to pigmentoproteinový komplex zanořený do thylakoidní membrány, který je prostřednictvím minoritních antén v přímém kontaktu s vnitřní částí antény. Vnější anténa, na rozdíl od vnitřní antény, se může od PS II uvolnit a přesunout k PS I. Je to podmíněné její fosforylací /1/.

### 1.2.2 Fotosystém II

Fotosystém II zprostředkuje oxidaci vody a redukci plastochinonu. Nazýváme ho proto  $H_2O$  – plastochinon-oxidoreduktasou /9/. Oxidace vody probíhá pouze u organismů s oxygenním typem fotosyntézy. Zachycená energie je z anténních komplexů přenesena do reakčního centra fotosystému II, kde probíhá vlastní proces oddělení nábojů. Reakční centrum fotosystému II je tvořeno heterodimerem dvou membránových proteinů  $D_1$  a  $D_2$ , podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$  cytochromu  $b_{559}$  a menšími proteiny. Zmíněný heterodimer váže další kofaktory a prosthetické skupiny důležité pro oxidačně-redukční reakce navazující na separaci nábojů.

K té dochází na chlorofylovém dimeru P680 (podle absorpčního maxima), který leží v centru heterodimeru. Z P680 je elektron přenášen na molekulu feofytinu (Pheo) a vzniklý kation P680<sup>+</sup> je rychle redukován donorem-tyrosylovým zbytkem proteinu D<sub>1</sub>. Redukci tyrosylového zbytku zajistí tzv. OEC (z anglického „oxygen-evolving complex“). Elektron z feofytinu přechází přes primární plastochinonový akceptor vázaný na molekulu proteinu D<sub>2</sub> (Q<sub>A</sub>) na sekundární plastochinonový akceptor vázaný na molekulu proteinu D<sub>1</sub> (Q<sub>B</sub>). Přijetím jednoho elektronu se z Q<sub>B</sub> stává semichinonový radikál, který je schopen přijmout další elektron za vzniku chinolového aniontu. Ten přijme z cytoplazmatické strany membrány dva protony a v plně redukované formě opouští vazebné místo na D<sub>1</sub>. Své elektrony předá komplexu cyt b<sub>6</sub>/f. Do vazebného místa se na D<sub>1</sub> naváže nová molekula plastochinonu pocházející z plastochinonového zásobníku (z anglického „pool“). Q<sub>B</sub> je zde molekulou, v níž se dva světlem poháněné jednoelektronové přenosy spojí ke dvouelektronové chemické redukci /1/.



Obrázek 1.7

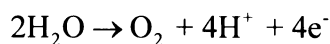
Pořadí elektronových přenašečů mezi komplexem vyvíjejícím kyslík (OEC) a plastochinonem Q<sub>B</sub>(symboly viz seznam zkratk) /10/.

### 1.2.3 OEC-komplex vyvíjející kyslík

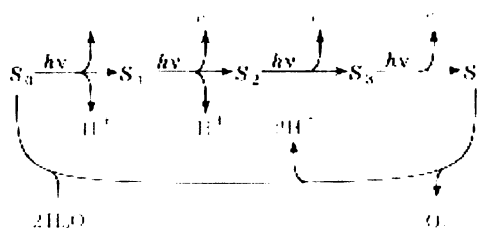
Kyslík v atmosféře je produkován procesem probíhajícím v komplexu hydrofilních proteinů OEC (z anglického „oxygen-evolving complex“).

Komplex je uložen na luminální straně thylakoidní membrány a skládá se ze tří proteinů P 33, P 23 a P 17 (u sinic jsou pouze dva) /11/.

Pro vznik jedné molekuly kyslíku se musí oxidovat dvě molekuly vody:



Oxidace vody probíhá pětistupňovou reakcí na shluku čtyř atomů manganu. Tento shluk podléhá „S-cyklu“ s redoxními stavy OEC označovanými S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub>. Každý krok cyklu představuje oxidačně-redukční reakci s absorpcí jednoho fotonu. Přejít ze stavu S<sub>4</sub> na stav S<sub>0</sub> je doprovázen uvolněním molekuly kyslíku do dutiny thylakoidu a souběžně v každém kroku (kromě přechodu S<sub>2</sub>-S<sub>3</sub>) dojde k uvolnění protonu /1/.



Obrázek 1.8

Schéma „S-cyklu“, jímž v chloroplastech vzniká O<sub>2</sub> /1/.

### 1.2.4 Komplex cyt b<sub>6</sub>/f

Podílí se na lineárním transportu elektronů z vody na NADP<sup>+</sup>. Jeho úkolem je přenášet elektrony z plastochinonu na plastocyanin a protony z vnější strany thylakoidní membrány na vnitřní stranu, podobně jako v dýchacím řetězci. Komplex se skládá se čtyř větších a několika menších transmembránových proteinů (cytochrom f, cytochrom b<sub>6</sub>, Rieskeho protein, který obsahuje shluk dvou atomů železa a dvou atomů síry a podjednotky IV) /12/. Funkcí komplexu je odebírat elektrony z redukováného plastochinonu a předávat je plastocyaninu (rostliny) nebo cytochromu b<sub>553</sub> (sinice).

Přenos elektronů je doprovázen přenosem protonů přes thylakoidní membránu, čímž se komplex podílí na vzniku protonového gradientu k syntéze ATP v komplexu ATP-synthasy.

Existuje v monomérní nebo dimérní formě a aktivitu vykazuje pouze jeho dimérní forma /13/.

### **1.2.5 Fotosystém I a světlosběrný systém**

Světelná energie je ve fotosystému I (PS I), tak jako ve fotosystému II, využívána k pohonu endergonické reakce. Podobně jako u světlosběrného systému PS II i zde rozeznáváme vnější a vnitřní část anténního komplexu. Důležitý rozdíl ve vnější anténě PS I oproti PS II je v tom, že proteiny LHC II jsou reverzibilně fosforylovány. Vnitřní anténa je spojena s vnější anténou a je tvořena částmi proteinů základního heterodimeru reakčního centra nesoucím chlorofyl **a**. Vnější anténa bývá označována jako LHC I (z anglického „light-harvesting complex“) a nachází se kolem PS I tak, aby se zářivé energie zachytilo co nejvíce /3/.

Absorbované sluneční záření se přenáší z fosforylovaného LHC II na LHC I, pak do PS I, kde se využije na přenos elektronu proti směru spádu oxidačně-redukčního potenciálu z plastocyaninu na  $\text{NADP}^+$ . Jde tedy o systém plastocyanin – ferredoxin-oxidoreduktasu.

Jádro fotosystému I je dimer /14/ složený ze dvou téměř identických podjednotek PsaA (83 kDa) a PsaB (82,4 kDa) /15/, na který jsou navázány molekuly pigmentu vnitřní světlosběrné antény a kofaktory účastníci se přenosu elektronů a procesu separace nábojů. Fotosystém I obsahuje dále 4 vnější podjednotky PsaC, PsaD, PsaE, PsaF /15/. Ke komplexu fotosystému I počítáme ještě několik malých podjednotek PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM a PsaN, které stabilizují kvartérní strukturu fotosystému I /16/. Polypeptidy PsaG a PsaH pravděpodobně vážou anténní komplexy LHC I /16/. Na heterodimer se vážou molekuly chlorofylu **a**, které přenáší energii zachycenou světlosběrným systémem PS I do chlorofylu reakčního centra, označovaného jako P700

(absorpční maximum při 700 nm). P700 je tvořen dimerem chlorofylu **a**. PS I obsahuje další složky účastnící se přenosu elektronů. Je to molekula chlorofylu **a** označovaná jako  $A_0$ , dále transport pokračuje přes molekulu fylochinonu  $A_1, Fe_4S_4(F_x)$ ,  $Fe_4S_4$  ( $F_a$  nebo  $F_b$ ), ferredoxinu, flavodoxinu až na konečný akceptor  $NADP^+$ . Kromě tohoto lineárního, necyklického toku elektronů se může PS I podílet i na cyklickém toku okolo PS I. V případě cyklického i necyklického toku ubývá protonů ve stromální části thylakoidní membrány, tedy vně thylakoidy a tak vzniká protonový gradient /17/.

### 1.2.6 ATP-synthasa

Probíhá zde uskladnění chemické energie vkládané do molekul ATP vznikajících z adenosindinukleotid fosfátu ADP a anorganického fosfátu. Hybnou silou pro syntézu je koncentrační rozdíl protonů na obou stranách thylakoidní membrány.

Složení ATP-synthasy:

- 1) integrální membránový komplex  $CF_0$  (protonový kanál), propouští přebytek protonů z lumen na stromální stranu thylakoidní membrány a je tvořen čtyřmi proteiny /18/
- 2) periferní membránový komplex  $CF_1$  (je spojovacím faktorem mezi tvorbou NADPH a tvorbou ATP)

Na syntézu jedné molekuly ATP je zapotřebí přes thylakoidní membránu přenést tři až čtyři protony /19, 20/.

## 1.3 *Sinice*

Patří mezi gramnegativní eubakterie. Jsou autotrofní a současně jsou nejstaršími kyslík produkujícími organizmy na Zemi (fosílie staré  $3,5 \cdot 10^9$  let pochází z formace Apex Basalt v Austrálii) a v současní době je platně popsáno 241 rodů /8/. Mohou tvořit kolonie nebo se vyskytují jako jednotlivé buňky až vlákna. Některé vláknité formy mají specializované buňky heterocysty, ve kterých probíhá fixace vzdušného dusíku a akinety, což jsou klidové buňky

určené k přetrvání nepříznivých období. Nacházíme u nich i silné slizové pochvy, do kterých ukládají různé látky (barviva, krystaly vápence) jako ochranu proti nárůstu epifytů /21/.

Buňky sinic neobsahují chloroplasty a thylakoidy jsou uloženy přímo v cytoplazmě. Jsou silně adaptabilní a vyskytují se ve sladkých vodách, v povrchových vrstvách půdy nebo v horkých pramenech a tvoří i součást mořského fytoplanktonu.

### 1.3.1 Klasifikace sinic

Rozděluje je do čtyř řad:

1) Chroococcales – jednotlivé buňky, tvoří někdy kolonie

- Chroococcus
- Microcystis – součást vodních květů

2) Oscillafoccales – jednoduchá nevětvená vlákna bez specializovaných buněk

- Arthrospora
- Oscillatoria (drkalka)
- Phormidium (půdní sinice)

3) Nostocales – vlákna, někdy nepravě větvená, s heterocystami

- Anabaena (vodní květy)
- Gloeotrichia (makroskopické kulovité kolonie vyskytující se ve vodě nebo na vodních rostlinách)
- Nostoc (jednořadka – půdní rod s makroskopickými koloniemi)

4) Stigonematales – pravě se větvcí se vlákna s heterocystami

- Mastigocladus (horké prameny)
- Stigonema

U vláknitých sinic (vlákno vzniká, je-li stélka navíc kryta slizovou pochvou) je řada buněk propojena plazmatickými vlákny tzv. trichomy.

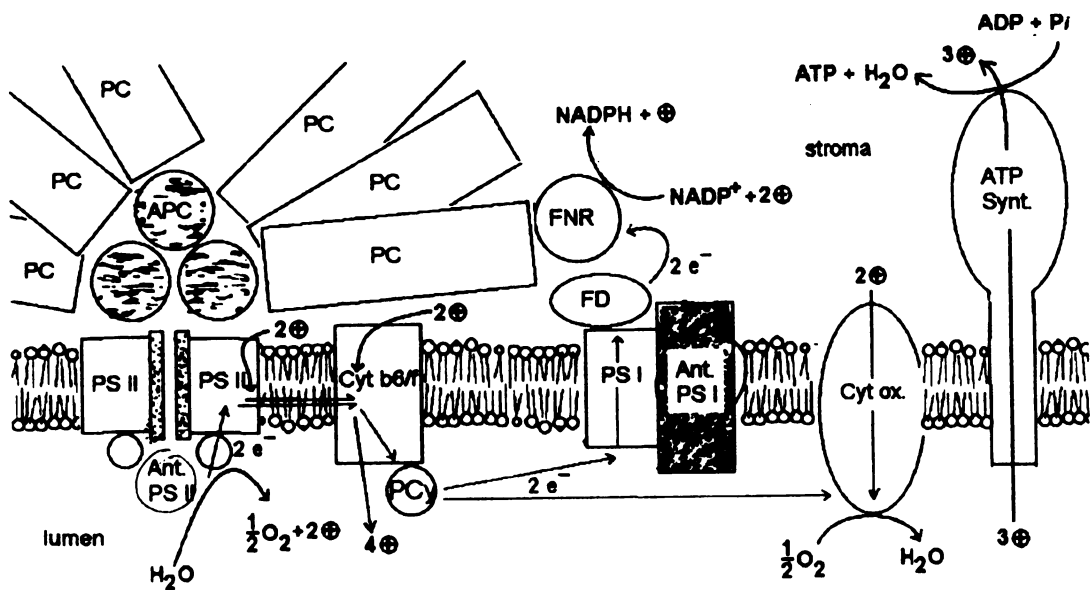
Větvení u sinic je dvojího druhu:

- 1) Pravé – způsobené změnou roviny dělení buněk /21/
- 2) Nepravé – vzniká přerušáním vlákna po odumření buňky nebo přeměnou heterocysty /21/

### **1.3.2 Fotosyntéza u sinic**

Fotosyntéza probíhá v thylakoidech, které se formují u sinic obvykle v jednoduché váčky a nedochází k sdružování a formování do gran. Hlavním barvivem je chlorofyl **a**, přídatnými barvivy jsou xantofyly a  $\beta$ -karoten, které pomáhají zachytávat záření v modré části světelného spektra a karotenoidy navíc chrání buňky před působením volných radikálů. Fykobiliny jsou uspořádány do tělísek zvaných fykobilisomy a uložených na povrchu thylakoidů. Fungují jako světlosběrné antény. Jako donor elektronů sinice používají vodu a jako zdroj uhlíku oxid uhličitý. Odpadním produktem je kyslík.

Mají schopnost chromatické adaptace, tj. při horších světelných podmínkách mohou měnit poměry fotosyntetických barviv tak, aby jejich světlosběrné antény zachytily maximum využitelného záření.



Obrázek 1.9

Fotosyntetický aparát sinic. Ant. PS I, II, anténa fotosystému I, II; APC, cylindrické jádro fykobilisomů; ATP Synt, ATP synthasa; Cyt b<sub>6</sub>/f, cytochrom b<sub>6</sub>/f komplex; Cyt ox, cytochrom oxidasa; FD, feredoxin; FNR, feredoxin- NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa; PC, vnější část fykobilisomů; PCy, plastocyanin; PS I, II, fotosystém I, II /22/.

### 1.3.3 Rozdíly ve fotosyntéze sinic a vyšších rostlin

- 1) Thylakoidní membrány u sinic jsou přímo v cytoplazmě a neorganizované do gran.
- 2) Sinice neobsahují chlorofyl b a hlavními světlosběrnými pigmenty jsou fykobiliny seskupené ve fykobilisomech lokalizovaných na povrchu thylakoidních membrán /23/, zatímco cévnaté rostliny obsahují chlorofyl a i b a světlosběrný chlorofyl-proteinový komplex je integrální součástí thylakoidní membrány.
- 3) Elektronového transportu se při fotosyntéze a při respiraci u sinic účastní stejný plastochinonový zásobník (z anglického „pool“) a stejný komplex cytochromu b<sub>6</sub>/f, zatímco v cévnatých rostlinách je fotosyntéza a respirace omezena na oddělené orgány /24/.



## ***1.4 Vliv kademnatých iontů na fotosyntézu rostlin***

Kontaminace životního prostředí škodlivými látkami se stává stále vážnějším problémem. Nejnebezpečnějšími kontaminanty jsou těžko odbouratelné toxické látky, procházející potravní pyramidou od základních producentů v jejich nejnižších patrech, až ke konzumentům na jejím vrcholu. K takovým látkám patří i těžké kovy. Jsou to kovy s hustotou větší než  $5 \text{ g cm}^{-3}$  /25/. Významná skupina těchto kovů má toxické účinky. Některé z nich jsou však v nízkých koncentracích pro buňku nepostradatelné (Cu, Mn, Co). Toxické kovy jsou těžké kovy, které nejsou esenciální pro živé buňky a zároveň mají toxické účinky (Cd, Hg, Pb, As).

### **1.4.1 Ionty kadmia a jeho toxické vlastnosti**

Kadmium nemá toxické účinky jenom na člověka. Prokázaly se také jeho negativní vlivy u rostlin a dalších fotoautotrofních organismů. To jsou hlavně nejvýznamnější producenti zemské biomasy a vstupní brána pro ionty toxických kovů do ostatních organismů včetně člověka. Nastanou-li pro ně nepříznivé podmínky, nemají možnost, na rozdíl od většiny živočichů, se přemístit do vhodnějšího prostředí. Během evoluce byly tedy nuceny vyvinout jiné způsoby reakce na přítomnost stresujících faktorů. V případě toxických kovů jde především o různé způsoby imobilizace, např. sorpce na pevné buněčné struktury, uskladnění ve vakuolách, či chelatace metalothioneiny (speciální peptidy s vysokým obsahem cysteinu, jejichž syntéza je aktivována právě přítomností těžkých kovů). Tyto postupy umožňují rostlinám do jisté míry eliminovat toxicitu těžkých kovů ve vlastních buňkách. Neumožňují však jejich vyloučení z těla, v němž se takto akumulují a nejsou tedy odstraněny ani z potravního řetězce. Avšak některé krytosemenné rostliny jsou schopny hyperakumulace toxických kovů /26/, tj. akumulace v koncentracích několikrát vyšších, než je v okolní půdě nebo vodě. To znamená, že tyto rostliny mohou být pěstovány v kontaminovaném prostředí a vzniklá biomasa odstraněna i

s akumulovanými ionty těžkých kovů. Mluvíme o procesu fytoremediace /27/, který se uplatňuje jako způsob dekontaminace půdy.

Vlastnost hyperakumulace byla pozorována též u některých druhů sinic a využita k podobnému účelu při dekontaminaci vodního prostředí.

Ionty kadmia mají na rostliny negativní vliv hned v několika krocích:

- 1) Způsobují změny v lipidovém složení thylakoidních membrán.
- 2) Mají vliv na supramolekulární komplexy obou fotosystémů PS I, PS II /28/.
- 3) Ionty kadmia ochotně reagují s thiolovými skupinami proteinů (včetně enzymů). To je mechanismus, kterým kademnaté ionty inhibují syntézu chlorofylu.
- 4) V některých případech mohou ionty kadmia soutěžit o vazebná místa esenciálních kovů, například nahrazují ionty hořčíku v molekulách chlorofylu, které potom nemohou plnit svou světlosběrnou či redoxní úlohu.

Jako další známé vlastnosti iontů kadmia na existenci rostlin byly zaznamenány tyto výsledky (při koncentraci kademnatých iontů 0 – 100 mmol/l, v naší laboratoři):

- 1) Prokazatelný vliv na fotochemické pochody v thylakoidních membránách i enzymatické reakce fixace oxidu uhličitého (RubisCo, PEPC). Enzymy fixace oxidu uhličitého jsou značně inhibovány a vysoké koncentrace iontů kadmia mohou vést až k ireversibilní disociaci podjednotek (RubisCO) nebo k úplné inhibici enzymu /29, 30/.
- 2) Aktivita fotosystému II při vyšších koncentracích kademnatých iontů byla výrazně snížena, nižší koncentrace však mají stimulační účinek /31/.
- 3) Inhibice fotosystému I je mírnější /32/.

- 4) Sinice *Synechococcus elongatus* jsou výrazně odolnější vůči působení kadmenných iontů než vyšší rostliny a akumulují tyto ionty tím více, čím je vyšší jejich výchozí koncentrace v kultivačním mediu /32/.

### **1.4.2 Bioremediace toxických kovů kontaminujících vody a půdy**

V povrchových i v podzemních vodách jsou přirozeně všechny kovy. Mnohé z nich jsou pro život v stopových množstvích nepostradatelné, ale ve vyšších koncentracích mohou být škodlivé. Hlavně škodlivé jsou kovy s toxickými vlastnostmi, které patří mezi nejvýznamnější anorganické kontaminanty vod a půd (As, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, U, a Zn). Dekontaminace oblastí znečištěných toxickými kovy představuje jeden z důležitých předmětů výzkumu současné vědy.

Bioremediace /33/ je definována jako používání živých organismů, resp. jejich částí (např. enzymů), na eliminaci nebo snižování environmentálního nebezpečství akumulace toxických xenobiotik. Jako živé organismy se používají bakterie, plísňe, kvasinky, ale také řasy, plankton a rostliny.

Remediační techniky je možno rozdělit do dvou skupin:

- 1) Nepřímé remediace (ex situ), zaobírají se úpravou (sanací) vytěžené půdy na místě nebo speciálními úpravami mimo místa znečištění podle konkrétních podmínek.
- 2) Přímé remediace (in situ), uskutečňují se přímo na místě úpravou (sanací) znečištěné půdy nebo vody.

Při remediacích těžkých kovů můžeme použít tři typy technik – oslabení, stabilizaci a odstranění polutantu /33/.

Remediační techniky, vyvinuté pro anorganické polutanty, jsou hlavně fytoremediace, t.j. využití rostlin při remediaci znečištěné půdy. Patří k nim:

- fytoextrakce in situ – je extrakce polutantů z půdy svým kořenovým systémem a uskladnění jejich zelené biomasy. Přičemž celý proces je

možné periodicky opakovat až do požadovaného snížení celkového znečištění. Získaná biomasa se následně zpracuje tak, aby došlo k zakoncentrování polutantu a to mikrobiálně (kompostováním), tepelně (zpopelněním nebo spalováním) nebo chemicky /33/.

- fytostabilizace – je využití schopnosti rostlin chemicky fixovat nebo stabilizovat polutanty v půdě. Proces zahrnuje sorpci a srážení, komplexaci a oxidačně-redukční procesy /33/.

Další remediační metody s menším využitím rostlin jsou:

- vyplavování extrakce in situ (podobná metoda a postup jako u vyplavování)
- elektrokinetika
- Zpevňování (stabilizace)
- vitifikace in situ

Fytoremediaci chápeme v bližším významu jako sanační postup, který využívá schopnosti rostlin kumulovat těžké kovy bez závažnějších poškození jejich metabolismu. Rostliny a sinice se využívají na fixaci, akumulaci a rozklad nebezpečných kontaminantů ze životního prostředí.

## ***1.5 Cíl práce***

- Aplikovat „červenou“ nativní elektroforézu na dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinic.
- Zjistit vliv různých koncentrací kadmnatých iontů na aktivitu fotosystému II a zastoupení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinice *Synechococcus elongatus*.

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Biologický materiál

Při vypracování diplomové práce, jsem pro studium fotosyntézy používala termofilní sinici *Synechococcus elongatus Nægeli*, forma *thermalis* Geitl. Kmen Kovrov 1972/8 pochází ze sbírek Sibiřského oddělení tehdejší AV SSSR v Krasnojarsku.

Tento druh sinice velmi dobře snáší kultivaci i při umělých podmínkách a je dlouhodobě dopěstováván v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Třeboni. Buňky se pěstují při 57 °C v kultivačních nádobách válcovitého tvaru, které se kontinuálně probublávají vzduchem obohaceným 2 % oxidu uhličitého a osvětlují žárovkami Osram 500 W (max. 200 W/m<sup>2</sup>). Kultivačním roztokem bylo modifikované médium podle Kratze a Meyerse /34/, jehož složení udává tabulka 2.1.

Sloučenina	Koncentrace (mmol/l)
KNO <sub>3</sub>	10,0
NaNO <sub>3</sub>	11,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,7
HgSO <sub>4</sub>	2,10
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
Chelatonát železitostirný (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> FeNa)	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,14
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,025
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0025
CaSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0025
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0025
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0007

Tabulka 2.1.

Složení kultivačního media. pH roztoku je 7,6.

## 2.2 Seznam chemikálií

Chemikálie použité při vypracování této práce:

- n-dodecyl-β, D-maltosid (dodecylmaltosid), Sigma, USA
- lysozym, Drůbežářský průmysl, Praha
- hovězí sérumalbumin (BSA), Imuna, Slovensko (Sevac, ČR)
- Brilliant Blue R, Sigma, USA
- N, N'-methylenbisakrylamid (Bis), Serva, Německo
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamid (TEMED), Serva, Německo

- tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Fluka, Švýcarsko
- 2,6-dichlorfenolindofenol (DCPIP), Lachema, ČR
- 1,5-difenyلكarbazid (DCP), Lachema, ČR
- 2-merkapthoethanol, Fluka, Švýcarsko
- N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(ethansulfonová kyselina) (HEPES), Sigma, USA
- $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , pentahydrát chloridu kademnatého, Lachema, ČR
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , hexahydrát chloridu hořečnatého, Lachema, ČR
- 2-morfolinethansulfonová kyselina (MES), Boehringer Mannheim GmbH, Německo
- Protein standard mixture, Sigma, USA
- Ferritin (Fer), Serva, Německo
- Katalasa, Serva, Německo
- Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris), Sigma, USA
- $\epsilon$ -amino-n-kapronová kyselina, Sigma, USA
- n-tris(hydroxymethyl)methylglycin (Tricine), Sigma, USA
- fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), Sigma, USA
- 3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonát sodný (Ponceau S), Loba Feinchemie, Rakousko
- Akrylamid, Sigma, USA
- Glycin, Reanal, Maďarsko

Všechny ostatní použité chemikálie, neuvedené v tomto seznamu, byly ve stupni čistoty p.a.



### ***2.3 Izolace thylakoidních membrán sinic***

Metoda pro izolaci thylakoidních membrán sinic byla modifikována podle Schatze a Witta /35/. Obsahuje několik kroků.

Po odstranění kultivačního média centrifugací ( $2500 \times g$ , 10 min.,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , odpovídá 4000 rpm na centrifuze MPW-3600), jsem sediment jednou až dvakrát promyla roztokem MH (složení udává tabulka 2.2.). Promytí spočívá v resuspendování sedimentu ve zhruba desetinásobném objemu promývacího roztoku a jeho následném odstranění centrifugací za stejných podmínek.

Promyté buňky jsem resuspendovala ve 100 ml pufru MHM (složení udává tabulka 2.2.), který obsahoval 0,2 % (m/V) lysosymu. Následovala inkubace dvě hodiny při  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  za stálého míchání na třepače Elpan typ 357, Polsko. Lysosym štěpí buněčnou stěnu buněk sinice *Synechococcus elongatus* a získáme tzv. sféroplasty, které jsou stabilní pouze v izotonickém pufru MHM. Získané sféroplasty jsem odstředila ( $2500 \times g$ , 10 min.,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), promyla pufram MHM a část převedla do pufru MHM tak, aby koncentrace chlorofylu byla v rozmezí 1,0 – 2,0 mg/ml. Zbylou část sféroplastů jsem vystavila osmotickému šoku resuspendováním v hypotonickém roztoku MH. Osmolýzou došlo k vylištění buněčného obsahu ze sféroplastů a současně k uvolnění modrých fykobilinoproteinů do roztoku. Po centrifugaci ( $2500 \times g$ , 10 min.,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) jsem sediment thylakoidních membrán několikrát promyla roztokem MH, dokud zbarvení supernatantu nebylo jen slabě modré. Promyté thylakoidní membrány jsem také resuspendovala v roztoku MHM tak, aby suspenze měla koncentraci chlorofylu cca 1,0 mg/ml.

Roztok	Koncentrace (mM)	Sloučenina	m (g)	pH	V (l)
MH	5	MgCl <sub>2</sub>	1,0167	6,5	1
	20	HEPES	4,766		
MHM	5	MgCl <sub>2</sub>	1,0167	6,5	1
	20	HEPES	4,766		
	500	D-manitol	91,09		

Tabulka 2.2.

Složení roztoků použitých při izolaci thylakoidních membrán

## ***2.4 Centrifugace v sacharosovém hustotním gradientu /36/***

### **2.4.1 Princip metody /37/**

Tato metoda umožňuje dělení látek o podobné sedimentační rychlosti. Hustotní gradient 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 na síle odstředivého pole, hustotě a viskozitě prostředí.

Makromolekuly se zastaví a zakoncentrují na místě, které odpovídá jejich hustotě. Tak se vytvoří zóny, které by měly obsahovat látky ve vysoce purifikovaném stavu.

### **2.4.2 Příprava vzorků pro centrifugaci v sacharosovém hustotním gradientu**

K suspenzi izolovaných thylakoidních membrán jsem za stálého míchání na ledu přikapávala roztok dodecylmaltosidu v pufru (složení viz tabulka 2.3.) 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 nanasla na sacharosový gradient v 70ml kyvetách.

Sloučenina	Koncentrace (mmol/l)
MES	25
NaCl	10
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5

Tabulka 2.3.

Složení pufru pro přípravu vzorků k centrifugaci v sacharosovém hustotním gradientu(pH=6,0)

### **2.4.3 Dělení pigmentoproteinových komplexů centrifugací v sacharosovém hustotním gradientu**

K dělení pigmentoproteinových komplexů jsem používala šestnáctistupňový hustotní gradient sacharosy v pufru MNC (složení viz tabulka 2.4.), který obsahoval 0,03 % (m/V) dodecylmaltosid a 0,5 mM PMSF. Dodecylmaltosid a PMSF jsem do pufru přidávala až těsně před použitím.

Nejprve jsem připravila šestnáct roztoků o koncentraci sacharosy 9,1 %, 9,5 % – 18 % (s přírůstkem 0,7 %) a 28,6 %. Gradienty jsem nanášela tzv. podvrstvováním (nejdříve se nanáší nejméně koncentrovaný roztok a nakonec nejvíce koncentrovaný).

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 připravené gradienty jsem nechala přes noc stát v lednici, aby se pomocí difuze ustavil koncentrační gradient sacharosy.

Centrifugace probíhala na ultracentrifuze Beckman Optima LE-80K (USA) s rotorem Ti 45 při 36000 rpm a teplotě 4 °C. Zóny se vytvořily již po 9 hodinách centrifugace. Jednotlivé zóny jsem odsála pomocí injekční stříkačky, naředila pufrům MNC pětkrát (složení pufru viz tabulka 2.4.) s přídavkem 0,03 % dodecylmaltosidu a 0,5 mM PMSF a opět nechala centrifugovat v rotoru Ti-45 při 4 °C a 43000 rpm po dobu 12 hodin. Získaný sediment jsem resuspendovala v minimálním objemu stejného pufru a změřila celkový obsah chlorofylu (viz kapitola 2.6.1.). Nakonec jsem preparát zamrazila v kapalném dusíku a uskladnila v hlubokomrazícím boxu při teplotě -78 °C.

Sloučenina	Koncentrace (mmol/l)
sacharosa	250
MES	25
NaCl	10
CaCl <sub>2</sub>	5

Tabulka 2.4.

Složení pufru MNC pro dělení pigmentoproteinových komplexů v hustotním gradientu sacharosy (pH=5,7)

## ***2.5 Elektroforetické metody***

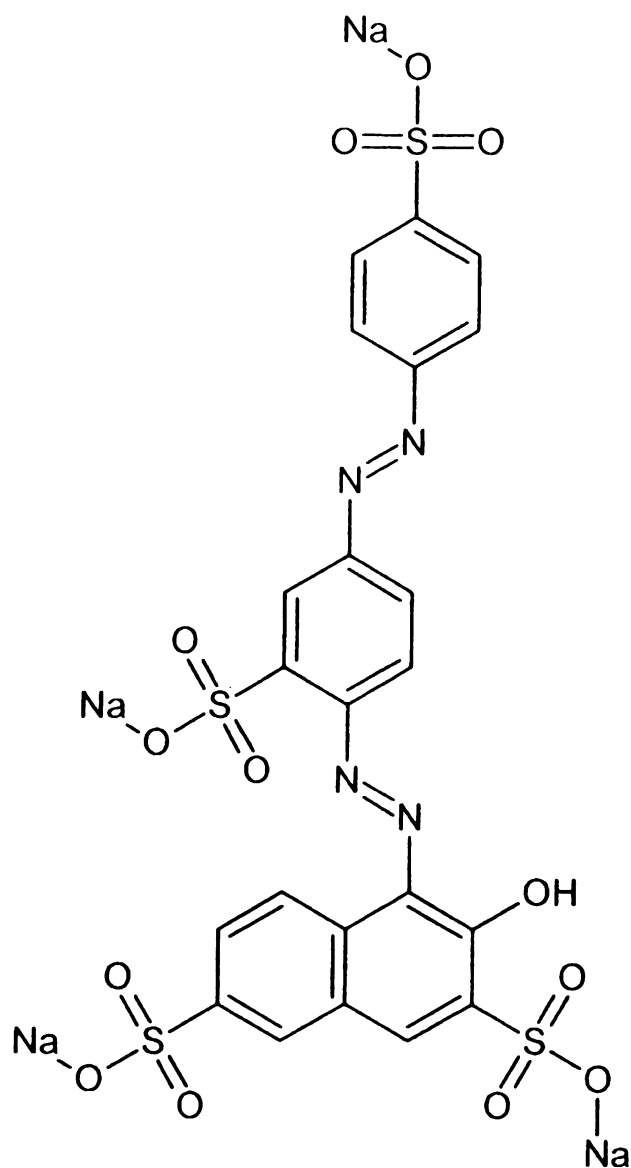
### **2.5.1 „Červená“ nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

#### **2.5.1.1 Princip metody**

Vysokomolekulární membránové proteinové 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 relativní molekulové hmotnosti.

Ponceau S se váže na bílkoviny pouze slabými interakcemi, můžeme ho tedy vymýt z gelu i bílkovin pomocí destilované vody.



Obrázek 2.1

Strukturní vzorec 3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenylazo)fenylazo]-2,7-naftalendisulfonátu sodného (Ponceau S)

### **2.5.1.2 Podmínky „červené“ nativní elektroforézy**

Elektroforéza probíhala na deskách polyakrylamidového gelu o rozměrech 100 mm × 1000 mm × 0,75 mm (OWL, typ P8DS, USA) v chladové místnosti, při teplotě asi 4 °C a konstantním napětí 30 V, v rozmezí 15-20 hodin, v závislosti na použitém koncentračním gradientu.

Pro tuto elektroforézu jsem používala dělicí gely s lineárními koncentračními gradienty akrylamidu 4–13 % a řadící gel s koncentrací 3 %. Na přípravu gelu slouží tzv. mísič gradientu, což jsou dvě válcové komůrky z průhledného plastu u dna spojené úzkou trubičkou uzavíratelnou kohoutkem. Jeden váleček je napojen na výstupní hadičku. V každé válcové nádobě bylo jedno míchadélko a mísič byl umístěn na zvedáčku s elektromagnetickou míchačkou.

Do válcové nádoby s výstupní hadičkou jsem pipetovala směs o vyšší koncentraci akrylamidu. Po otevření nádoby se obě směsi začaly vzájemně mísit. Tím došlo k vytvoření lineárního koncentračního gradientu akrylamidu. Po vytečení kapalin, jsem mezi skly kapalinu převrstvila malým množstvím redestilované vody. Po zpolymerování gelu jsem přebytečnou kapalinu odsála filtračním papírem a nalila na něj řadící gel. Následně jsem zasunula hřebeny, které vytvářejí v gelu jamky pro aplikaci vzorků.

Maloporový dělicí gel byl v elektroforetické vaně ve styku s anodovým pufrem, řadící velkoporový s katodovým pufrem.

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

K 25 µl suspenze thylakoidních membrán (odpovídá 52 µg chlorofylu) jsem přidala 5 µl 10 % dodecylmaltosidu (m/V), 15 µl 10 % Ponceau S (m/V) a doplnila solubilizačním pufrem (viz tabulka 2.5.).

Připravené vzorky jsem nanasla do jamek.

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

Jako standardy jsem používala apoferritin, hovězí sérumalbumin a katalasu. Proteiny jsem rozpustila v katodovém pufru (složení viz tabulka 2.5.) a nakonec zahustila malým množstvím sacharosu.

Pufr (název)	Složení
Gelový pufr, pH = 7	0,138 g 150 mM Bis-Tris; 0,1312 g 10 mM $\epsilon$ -amino-n-kapronová kyselina doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O
AB směs	48 g akylamid; 1,5 g Bis doplnit do 100 ml redestilovanou H <sub>2</sub> O
Katodový pufr, pH = 7	8,96 g 50 mM tricin; 3,13 g 15 mM Bis-Tris; 0,12 g 12 % Ponceau S doplnit do 1 l H <sub>2</sub> O
Anodový pufr, pH = 7	10,46 g 50 mM Bis-Tris doplnit do 1 l H <sub>2</sub> O
Solubilizační pufr, pH = 7	1,046 g 50 mM Bis-Tris; 9,84 g 700 mM $\epsilon$ -amino-n-kapronová; 20 % glycerol doplnit do 100 ml H <sub>2</sub> O

Tabulka 2.5.

Složení zásobních roztoků (pufrů) používaných při „červené“ nativní elektroforéze.

Sloučenina	Objem (μl)	
	Gelový pufr	4 %
1000		1000
AB směs	240	795
Glycerol	-	476
10 % APS	16	10
TEMED	1,6	1
Redestilovaná H <sub>2</sub> O	1742	718
<b>Celkový objem</b>	<b>6000,0</b>	

Tabulka 2.6.

Složení polymerační směsi pro přípravu 6 ml dělicího gelu o koncentraci akrylamidu 4–13 %. (10 % APS jsem vždy připravovala čerstvý)

Sloučenina	Objem (μl)
Gelový pufr	1333
AB směs	250
Redestilovaná H <sub>2</sub> O	2380
10 % APS	33,3
TEMED	3,3
<b>Celkový objem</b>	<b>4000,0</b>

Tabulka 2.7.

Složení polymerační směsi pro přípravu řadícího gelu o koncentraci akrylamidu 3 %. (10 % APS jsem vždy připravovala čerstvý).

### 2.5.2 Detekce bílkovin, barvení a sušení gelů

Proteiny jsem detekovala pomocí Brilliant Blue R. Používala jsem jeho 0,2 % (m/V) roztok ve směsi 96 % ethanolu, koncentrované kyseliny octové a



destilované vody v objemových poměrech 25 : 10 : 65 s obsahem 1 % (m/V) kyseliny trichloroctové.

Barvicí lázeň jsem před prvním použitím přefiltrovala, abych se zbavila zbytků nerozpuštěného barviva. Gely jsem barvila zhruba 20 hodin. Po obarvení jsem barvicí lázeň slila, gel jsem opláchla destilovanou vodou a ponořila do odbarvovací lázně 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 barevné. Když pozadí gelu bylo bezbarvé, ponořila jsem ho do fixační lázně o složení 10 % ethanol a 5 % glycerol v destilované vodě.

Gely jsem uchovávala ponořené ve fixační lázni, nebo jsem je sušila. Před vlastním sušením byl gel ponořen nejméně jednu hodinu ve fixační lázni.

Sušení gelu probíhalo mezi dvěma vrstvami mokrého celofánu, upevněného pomocí kuliček mezi dva plastové rámečky, při laboratorní teplotě cca 24 hodin.

### **2.5.3 Stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů**

Relativní molekulovou hmotnost polypeptidů a pigmentoproteinových komplexů jsem určila porovnáváním 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 (Mr 205 000)
- fosforylasa **b** (Mr 97 000)
- hovězí sérumalbumin (Mr 66 000)
- ovalbumin (Mr 45 000)

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

Pro určení molekulové hmotnosti pigmentoproteinových komplexů pomocí „červené“ nativní elektroforézy jsem používala ferritin a katalasu od firmy Serva a hovězí sérum albumin od firmy Sevac:

- ferritin – monomer (Mr 450 000), dimer (Mr 900 000), trimer (Mr 1 350 000)
- hovězí sérumalbumin – monomer (Mr 66 000), dimer (Mr 132 000)
- katalasa – monomer (Mr 250 000), dimer (Mr 500 000)

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

## ***2.6 Spektroskopické metody***

Metody jsou založené na interakci hmoty s elektromagnetickým zářením s různou vlnovou délkou. Sleduje se absorpce záření při průchodu vzorkem. Spektrofotometrické stanovení koncentrace využívá princip Lambertova – Beerova zákona:  $A = -\log T = I_0/I = \epsilon c_m l$ , kde absorbance  $A$  a transmitance  $T$  jsou mírami absorpce záření při průchodu vzorkem,  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient,  $c_m$  je molární koncentrace a  $l$  optická dráha paprsku vzorkem. Všechna měření jsem absolvovala s kyvetou s optickou dráhou 1 cm.

### **2.6.1 Stanovení koncentrace chlorofylu a**

Stanovení koncentrace jsem prováděla metodou podle Ogawy a Vernona /38/.

5  $\mu$ l vzorku jsem napipetovala do 1,5 ml 100 % methanolu, směs jsem protřepala a odstředila na centrifuze MPW 300 5 minut při maximálních otáčkách. Pak jsem absorbanci změřila při 666 nm proti 100 % methanolu na spektrofotometru Spekol 11 (Carl Zeiss, Německo) a koncentraci chlorofylu jsem vypočítala podle vztahu:

$$C \text{ (mg/l)} = 4,04 A_{666}$$

kde  $A_{666}$  je absorbance vzorku při 666 nm, relativní molekulová hmotnost chlorofylu a je 892 a jeho molární absorpční koeficient ve 100 % methanolu při 666 nm je  $65\,800\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

## ***2.7 Příprava tenzidového extraktu***

Na přípravu tenzidového extraktu jsem použila n-dodecyl- $\beta$  D-maltosid od firmy Sigma (USA). Tenzid byl přidán k suspenzi thylakoidních membrán o koncentraci 1,12 mg/ml v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 1 % (m/V) /39/.

Vzorek jsem inkubovala s tenzidem 30 minut při laboratorní teplotě, ve tmě, za stálého míchaní. Po skončení inkubace jsem vzorek odstředila na centrifuze Beckman L7 – 65 (USA) s rotorem SW 60 při 4 °C a při 50 000 ot/min ( $350\,000\times g$ ,  $r_{\max}=12\text{ cm}$ ) po dobu 60 minut.

## ***2.8 Měření fotochemických aktivit***

Pro stanovení fotochemické aktivity PS II jsem používala měření fotoredukce nefyziologického akceptoru elektronů 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCPIP).

### **2.8.1 Měření fotochemických aktivit fotoredukcí DCPIP**

Aktivita fotolýzy vody se v tomto případě měří jako počáteční rychlost, s jakou se redukuje 2,6-dichlorfenolindofenol při osvětlení vzorku. Reakční směs obsahovala takové množství měřeného vzorku, které odpovídalo 20  $\mu\text{g}$  chlorofylu, dále roztok DCPIP (zásobní roztok: 20 mg DCPIP v 10 ml vody) o výsledné koncentraci 30  $\mu\text{M}$  a RMh (složení udává tabulka 2.11.) 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) ze vzdálenosti 3 cm v intervalech 0, 10, 20, 30, 60, 90 a 120 vteřin. Po každém časovém intervalu jsem změřila absorbanci.

Z grafu (výstup z programu SigmaPlot) závislosti změn absorbance na čase jsem určila počáteční rychlost fotoredukce DCPIP v  $\mu\text{mol}$  redukovaného DCPIP / mg chl. hod. Molární absorpční koeficient pro DCPIP má hodnotu  $2,4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Průměrná chyba byla vypočtena podle vztahu:

$$a = \sum_{i=1}^n \frac{|x_i - \bar{x}|}{n} \cdot \frac{100}{\bar{x}},$$

kde  $n$  je počet měření,  $i$  je pořadí měření,  $x_i$  je naměřená hodnota v daném pořadí a  $\bar{x}$  je průměrná hodnota všech naměřených hodnot.

Sloučenina	Koncentrace (mmol/l)
KCl	10
HEPES	40

Tabulka 2.8.

Složení reakčního media (RMh) používaného při stanovení fotoredukce DCPIP. pH = 6,5.

### 2.8.2 Měření fotochemických aktivit fotoredukací DCPIP za přítomnosti DPC

Aktivita se měří jako počáteční rychlost s jakou je redukován 2,6– dichlorfenolindofenol při osvětlení vzorku za přítomnosti umělého donoru elektronů difenylkarbazidu (DPC).

Reakční směs obsahovala takové množství měřeného vzorku, které odpovídá  $20 \mu\text{g}$  chlorofylu, roztok DCPIP (zásobní roztok:  $20 \mu\text{g}$  DCPIP / 10 ml vody) o výsledné koncentraci  $30 \mu\text{M}$ , roztok DPC (zásobní roztok : 18 mg DPC / 1,5 ml 100 % methanol) v konečné koncentraci  $0,3 \text{ mM}$  a roztok RMh (složení udává tabulka 2.11.) v takovém množství, aby výsledný objem byl 2 ml.

Měření aktivity jsem prováděla stejným způsobem popsáním v kapitole 2.8.1.

Slepý vzorek obsahoval DPC o výsledné koncentraci 0,3 mM. Protože DCPIP a DPC spolu chemicky reagují, musela jsem tuto skutečnost zohlednit při výpočtu hodnoty redukovaného DCPIP. Do jaké míry tyto dvě sloučeniny spolu reagují, jsem měřila popsáním způsobem, kdy reakční směs ani slepý vzorek neobsahovaly chlorofyl. Roztok DPC jsem připravovala denně čerstvý.

## ***2.9 Inkubace thylakoidních membrán sinic s kademnatými ionty***

Příprava vzorků pro inkubaci s kademnatými ionty (viz tabulka 2.9.): použité thylakoidní membrány měly koncentraci chlorofylu v rozmezí 1,12 – 1,5 mg/ml.

Konečná koncentrace CdCl <sub>2</sub> ve vzorku (mmol/l)	Množství thylakoidních membrán (μl)	Množství zásobního roztoku CdCl <sub>2</sub> (μl)	Koncentrace zásobního roztoku CdCl <sub>2</sub> (mmol/l)
0	1000	0	250
2	992	8	250
4	984	16	250
5	2952	60	250
6	976	24	250
7	2916	84	250
8	968	32	250
10	960	40	250
50	800	200	250
60	760	240	250
70	720	280	250
75	700	300	250
80	680	320	250
100	600	400	250
150	400	600	250
200	200	800	250
800	840	160	5000

Tabulka 2.9.

Příprava vzorků thylakoidních membrán pro inkubaci s ionty kadmia.

Takto připravené vzorky jsem inkubovala 30 minut ve tmě při teplotě 4 °C. Další zpracování spočívalo v odstředění na centrifuze MPW-360 (4000 × g, 10 min., 4 °C), slití supernatantu obsahujícího přebytečné kademnaté ionty a promytí 10násobným objemem roztoku MHM (složení viz tabulka 2.3.). Nakonec jsem sedimenty resuspendovala v takovém objemu roztoku MHM,

který odpovídal objemu vzorku na počátku inkubace (objem thylakoidních membrán plus objem roztoku kadmia) inkubace roztokem. Vzorke jsem uchovávala v hlubokomrazícím boxu, zmražené tekutým dusíkem při teplotě -78 °C.

## 3 Výsledky

### 3.1 Fotochemické aktivity

Do jaké míry byly thylakoidní membrány sinic poškozené toxickým působením kademnatých iontů jsem sledovala popsánymi metodami.

Pro zjednodušení budu dále v této práci nazývat kontrolní thylakoidní membrány sinic vzorkem Cd<sub>0</sub> a thylakoidní membrány vystavené vlivu CdCl<sub>2</sub> v konečné koncentraci 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 50, 60, 70, 75, 80, 100, 150, 200 a 800 mM vzorkem Cd<sub>2</sub>, Cd<sub>4</sub>, Cd<sub>5</sub>, Cd<sub>6</sub>, Cd<sub>7</sub>, Cd<sub>8</sub>, Cd<sub>10</sub>, Cd<sub>50</sub>, Cd<sub>60</sub>, Cd<sub>70</sub>, Cd<sub>75</sub>, Cd<sub>80</sub>, Cd<sub>100</sub>, Cd<sub>150</sub>, Cd<sub>200</sub> a Cd<sub>800</sub>. Dodecylmaltosidový extrakt bude mít symbol DM.

Pokusy byly opakovány 3-4 krát a výsledky uvádím v tabulkách 3.1-3.17.

#### 3.1.1 Fotochemické aktivity kontrolních vzorků thylakoidních membrán sinic bez inkubace s kademnatými ionty

Fotochemické aktivity neinkubovaných vzorků jsem měřila postupem popsáním v kap. 2.8. Reakčním médiem byl hypotonický roztok RMh (složení udává tab. 2.8).

Pak jsem procentuálně porovnávala hodnoty aktivit v přítomnosti umělého donoru elektronů 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] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl}}\cdot\text{hod}$ )	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl}}\cdot\text{hod}$ )
Cd <sub>0</sub>	60,57±0,32	67,01±0,85
Cd <sub>0</sub>	61,42±0,48	68,22±1,04
Cd <sub>0</sub>	60,03±0,94	66,91±1,91

Tabulka 3.1.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=3).

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00±0,53	110,63±1,26	10,63
Cd <sub>0</sub>	100,00±0,78	111,07±1,52	11,07
Cd <sub>0</sub>	100,00±1,56	111,46±2,85	11,46

Tabulka 3.2.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic (viz tab. 3.1.) vyjádřené v procentech. Poslední sloupec udává změnu aktivity v přítomnosti umělého donoru elektronů DPC. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1.

U všech vzorků jsem pozorovala narůstající fotochemickou aktivitu v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.

### 3.1.2 Fotochemické aktivity vzorků dodecylmaltosidového extraktu bez inkubace s $\text{Cd}^{2+}$ ionty.

Fotochemické aktivity neinkubovaných vzorků jsem měřila postupem popsáním v kap. 2.8. Reakčním médiem byl hypotonický roztok RMh (složení udává tab. 2.8.) a dodecylmaltosidový extrakt jsem připravila způsobem popsáním v kapitole 2.7.

Pak jsem procentuálně porovnávala hodnoty aktivit v přítomnosti umělého donoru elektronů DPC oproti vzorkům, kde donorem elektronů byla voda. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1.

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[ $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$ ] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl.}}\cdot\text{hod}$ )	Fotoredukce DCPIP[ $\text{DPC} \rightarrow \text{DCPIP}$ ] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl.}}\cdot\text{hod}$ )
DM	26,38±0,55	45,31±1,17
DM	24,14±0,69	47,17±2,36
DM	26,19±0,33	45,66±1,28

Tabulka 3.3.

Hodnoty fotochemických aktivit dodecylmaltosidového extraktu sinic. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=3).

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
DM	100,00±2,08	171±2,58	71,15
DM	100,00±2,86	195,40±5,03	95,40
DM	100,00±1,26	174,34±2,80	74,34

Tabulka 3.4.

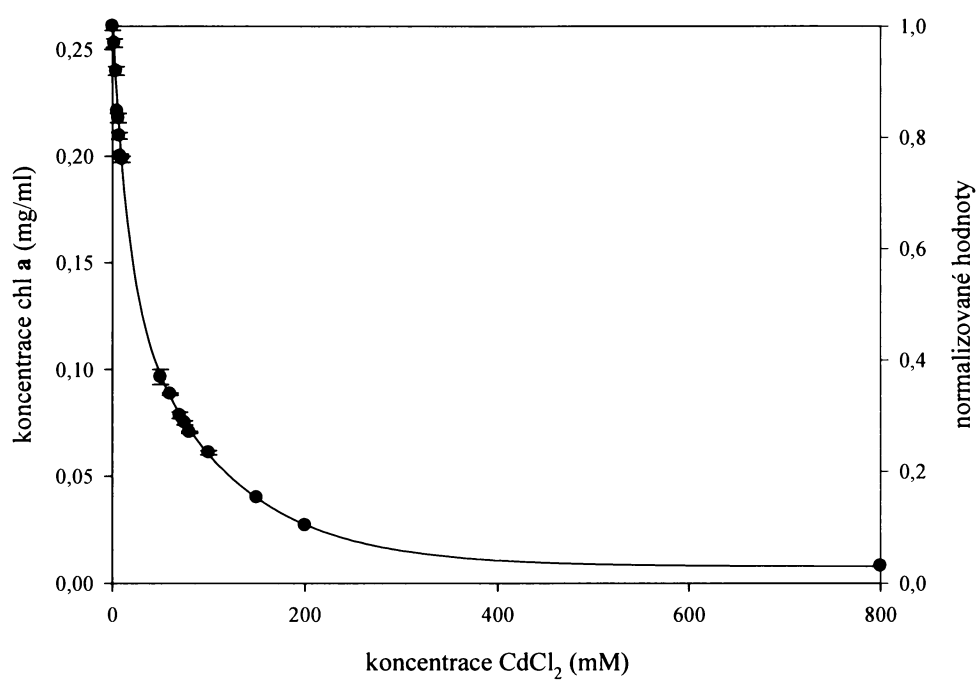
Hodnoty fotochemických aktivit dodecylmaltosidového extraktu sinic (viz tab. 3.3) vyjádřené v procentech. Poslední sloupec udává změnu aktivity v přítomnosti umělého donoru elektronů DPC. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1.

U všech vzorků jsem pozorovala narůstající fotochemickou aktivitu v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.

### **3.1.3 Měření fotochemické aktivity thylakoidních membrán sinic po 30minutové inkubaci s Cd<sup>2+</sup> ionty.**

Způsob jakým jsem měřila fotochemické aktivity popisuje kap. 2.8. Hodnoty naměřených aktivit udávají tabulky 3.5 – 3.11. jednotky aktivit jsou vztaženy na mg chlorofylu a stejného množství thylakoidních membrán sinic před 30 minutovou inkubací s kadmiovými ionty.

### Závislost koncentrace chlorofylu a na koncentraci CdCl<sub>2</sub>



Graf 3.1.

Závislost koncentrace chlorofylu a na koncentraci CdCl<sub>2</sub>. Osa y<sub>1</sub> z leva udává přepočtené koncentrace chlorofylů a pod vlivem iontů kadmia, osa y<sub>2</sub> následnou normalizaci koncentrací chlorofylu a, kde kontrola s koncentrací kademnatých iontů 0mM je brána jako hodnota výchozí. Osa x představuje koncentrace CdCl<sub>2</sub>

Vzorek	Koncentrace chl a (mg/ml)	Normalizované hodnoty
Cd <sub>0</sub>	0,270	1
Cd <sub>2</sub>	0,250	0,93
Cd <sub>4</sub>	0,232	0,86
Cd <sub>5</sub>	0,225	0,83
Cd <sub>6</sub>	0,218	0,81
Cd <sub>7</sub>	0,212	0,79
Cd <sub>8</sub>	0,210	0,78
Cd <sub>10</sub>	0,195	0,72
Cd <sub>50</sub>	0,098	0,36
Cd <sub>60</sub>	0,088	0,32
Cd <sub>70</sub>	0,079	0,29
Cd <sub>75</sub>	0,076	0,28
Cd <sub>80</sub>	0,072	0,27
Cd <sub>100</sub>	0,060	0,22
Cd <sub>150</sub>	0,040	0,15
Cd <sub>200</sub>	0,027	0,10
Cd <sub>800</sub>	0,008	0,003

Tabulka 3.5.

Koncentrace chlorofylu a a jeho normované hodnoty

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl}}\cdot\text{hod}$ )	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl}}\cdot\text{hod}$ )
Cd <sub>0</sub>	15,24±0,92	22,03±0,92
Cd <sub>10</sub>	16,40±0,76	18,16±0,91
Cd <sub>80</sub>	5,08±0,25	6,61±0,11
Cd <sub>800</sub>	0,28±0,01	0,41±0,01

Tabulka 3.6.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=4).

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00±6,04	0,00	100,00±4,17	0,00
Cd <sub>10</sub>	105,52±3,32	5,52	80,83±3,59	-19,17
Cd <sub>80</sub>	33,08±1,34	-66,92	29,77±0,46	-70,23
Cd <sub>800</sub>	1,84±0,14	-98,16	1,90±0,08	-98,10

Tabulka 3.7.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic (viz tab. 3.6.) vyjádřené v procentech. Poslední sloupce udávají změnu aktivit porovnávanou s kontrolou Cd<sub>0</sub> jak u fotoredukce s donorem elektronů vodou, tak i v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.

U fotoredukce [H<sub>2</sub>O→DCPIP], byl patrný stimulační efekt iontů kadmia naměřených u vzorku Cd<sub>10</sub>. Vzorky Cd<sub>80</sub> a Cd<sub>800</sub> již vykazují inhibiční efekt působením kademnatých iontů a pokles aktivity.

U fotoredukce [DPC→DCPIP], všechny vzorky vykazují pokles fotochemických aktivit.

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mgchl}\cdot\text{hod}$ )	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mgchl}\cdot\text{hod}$ )
Cd <sub>0</sub>	19,40±0,52	36,22±20,79
Cd <sub>2</sub>	26,42±0,99	41,26±0,38
Cd <sub>4</sub>	32,72±0,79	37,45±0,35
Cd <sub>6</sub>	24,27±1,50	30,12±0,98
Cd <sub>8</sub>	18,36±0,32	25,23±0,89
Cd <sub>10</sub>	20,12±0,94	28,26±0,28

Tabulka 3.8.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=8).

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00±1,77	0,00	100,00±2,18	0,00
Cd <sub>2</sub>	68,46±3,56	-31,54	120,93±3,32	20,93
Cd <sub>4</sub>	105,33±3,44	5,33	120,70±0,95	20,70
Cd <sub>6</sub>	82,71±5,01	-17,29	102,36±1,24	2,36
Cd <sub>8</sub>	45,57±1,34	-54,43	96,71±0,75	-3,29
Cd <sub>10</sub>	56,42±2,70	-43,58	87,91±0,32	-12,39

Tabulka 3.9.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic (viz tab. 3.8.) vyjádřené v procentech. Poslední sloupec udává změnu aktivit porovnávanou s kontrolou Cd<sub>0</sub> jak u fotoredukce s donorem elektronů vodou, tak i v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mgchl.hod}$ )	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mgchl.hod}$ )
Cd <sub>0</sub>	19,13±0,28	9,02±0,23
Cd <sub>4</sub>	17,08±0,54	8,87±0,25
Cd <sub>5</sub>	17,10±0,12	9,54±0,26
Cd <sub>6</sub>	20,44±0,36	16,34±0,82
Cd <sub>7</sub>	20,22±0,31	10,91±0,13

Tabulka 3.10.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=4).

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00±1,46	0,00	100,00±2,01	0,00
Cd <sub>4</sub>	87,78±2,88	-12,22	96,56±2,32	-3,44
Cd <sub>5</sub>	84,60±0,56	-15,33	103,38±2,43	3,38
Cd <sub>6</sub>	104,86±1,42	4,86	178,19±2,18	78,19
Cd <sub>7</sub>	132,24±1,21	4,46	119,46±0,88	19,46

Tabulka 3.11.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic (viz tab. 3.10.) vyjádřené v procentech. Poslední sloupce udávají změnu aktivit porovnávanou s kontrolou Cd<sub>0</sub>, jak u fotoredukce s donorem elektronů vodou, tak i v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.



U fotoredukce [H<sub>2</sub>O→DCPIP] byl vidět nárůst fotochemických aktivit u vzorků v koncentračním rozmezí kademnatých iontů Cd<sub>6</sub> a Cd<sub>7</sub>, podobně tak tomu bylo i u fotoredukce [DPC→DCPIP].

Porovnáním obou typů fotoredukcí, prokazuje typ fotoredukce [DPC→DCPIP] vyšší nárůst fotochemických aktivit vlivem toxických vlastností kademnatých iontů u vzorku Cd<sub>6</sub>.

### 3.1.4 Časová závislost

Fotochemické aktivity kontroly Cd<sub>0</sub> a vzorku Cd<sub>6</sub> jsem měřila postupem popsáním v kap.2.8. Po rozmrazení vzorků jsem jednotlivé měření fotochemických aktivit u každého vzorku prováděla v čase 0 až 50 min. Reakčním médiem byl hypotonický roztok RMh (složení udává tab. 2.8.). Procentuální vyjádření je založeno na porovnávání aktivit kontroly Cd<sub>0</sub> s aktivitami vzorku Cd<sub>6</sub>, jak u fotoredukce [H<sub>2</sub>O→DCPIP], tak i u fotoredukce s nefyziologickým donorem elektronů DPC.

	Vzorek Cd <sub>0</sub>	Vzorek Cd <sub>6</sub>	
t/min	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
0	100,00±12,39	191,97±0,18	91,97
10	100,00±6,42	93,15±0,96	-6,85
20	100,00±5,14	200,20±0,07	100,20
30	100,00±4,89	206,33±5,67	106,33
50	100,00±7,23	186,45±0,15	86,45

Tabulka 3.12.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic vyjádřené v procentech. Poslední sloupec udává změnu aktivit v procentech porovnáním aktivit kontroly Cd<sub>0</sub> se vzorkem Cd<sub>6</sub> (donorem elektronů je voda).

	Vzorek Cd <sub>0</sub>	Vzorek Cd <sub>6</sub>	
t/min	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
0	100,00±19,79	293,22±1,18	193,22
10	100,00±14,93	171,03±0,87	71,03
20	100,00±17,33	367,65±3,66	267,65
30	100,00±2,47	306,23±0,78	206,23
50	100,00±4,42	261,13±1,58	161,13

Tabulka 3.13.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic vyjádřené v procentech. Poslední sloupec udává změnu aktivit v procentech porovnáním aktivit kontroly Cd<sub>0</sub> se vzorkem Cd<sub>6</sub> (donorem byl DPC).

Z naměřených aktivit je zřejmé u obou případů fotoredukce, že čas nemá vliv na fotochemické aktivity thylakoidních membrán sinic. Kadmnaté ionty u vzorku Cd<sub>6</sub> vykazovaly silně stimulační efekt jak v případě donoru elektronů vody, tak i v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.

### **3.1.5 Fotochemické aktivity vzorků thylakoidních membrán sinic po 30ti minutové inkubaci s iontama kadmia v koncentraci 0 až 200 mM.**

Způsob jakým jsem měřil fotochemické aktivity je popsán v kap.2.8. Použitým reakčním médiem byl hypotonický roztok RMh (složení udává tab. 2.8.).

Hodnoty naměřených aktivit udávají tabulky 3.14 až 3.17.

Vzorek	Fotoredukce	Fotoredukce
	DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl.}}\cdot\text{hod}$ )	DCPIP[DPC→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl.}}\cdot\text{hod}$ )
Cd <sub>0</sub>	6.71±0,56	5,11±0,38
Cd <sub>10</sub>	4,38±0,01	4,71±0,07
Cd <sub>50</sub>	4,33±0,22	5,59±0,10
Cd <sub>75</sub>	2,25±0,14	4,42±0,04
Cd <sub>100</sub>	1,76±0,15	1,76±0,08
Cd <sub>150</sub>	1,19±0,18	0,31±0,02
Cd <sub>200</sub>	0,53±0,09	0,18±0,01

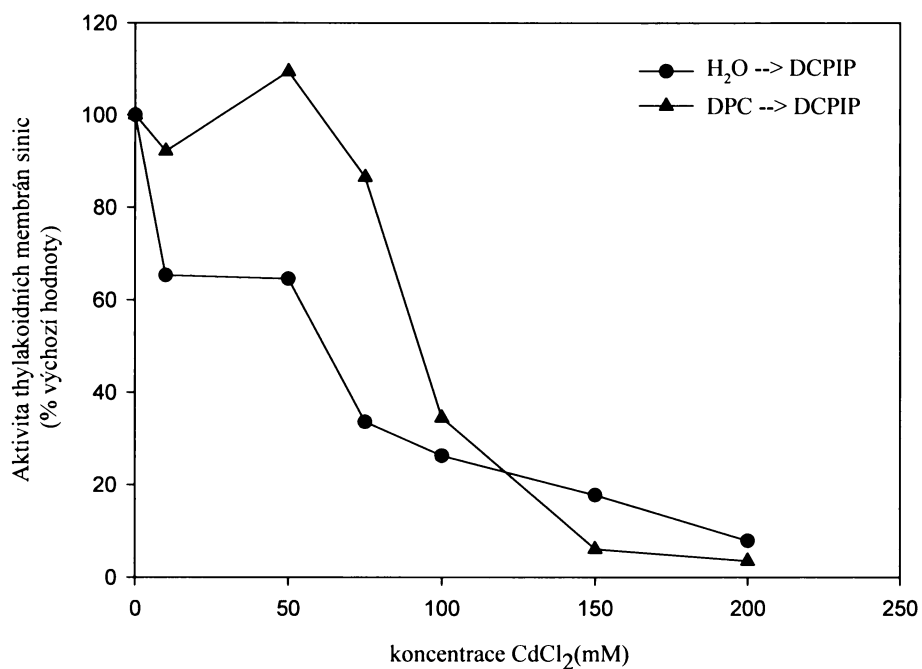
Tabulka 3.14.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=3).

Vzorek	Fotoredukce	Změna	Fotoredukce	Změna
	DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	aktivity (%)	DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	aktivity (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00±8,34	0,00	100,00±1,53	0,00
Cd <sub>10</sub>	63,99±0,16	-36,01	90,20±1,30	-9,8
Cd <sub>50</sub>	63,25±1,91	-36,75	107,17±0,36	7,17
Cd <sub>75</sub>	32,91±2,42	-67,09	85,07±1,47	-14,93
Cd <sub>100</sub>	24,49±1,91	-75,51	33,37±1,59	-66,63
Cd <sub>150</sub>	17,68±2,31	-82,32	6,03±0,98	-93,97
Cd <sub>200</sub>	7,59±1,67	-92,41	3,43±1,3	-96,57

Tabulka 3.15.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic (viz tab.3.14.) v procentech. Poslední sloupec udává změnu aktivity vzorků porovnávanou s kontrolou, jak u fotoredukce s donorem elektronů vodou, tak i v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.



Graf 3.2.

Závislost aktivity fotoredukce H<sub>2</sub>O→DCPIP a DPC→DCPIP na koncentraci CdCl<sub>2</sub>

Vzorek	Fotoredukce	Fotoredukce
	DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl.}}\cdot\text{hod}$ )	DCPIP[DPC→DCPIP] ( $\mu\text{molDCPIP}_{\text{red}}/\text{mg}_{\text{chl.}}\cdot\text{hod}$ )
Cd <sub>0</sub>	4,81±0,56	4,62±0,08
Cd <sub>50</sub>	2,61±0,19	2,82±0,06
Cd <sub>60</sub>	1,19±0,25	1,17±0,09
Cd <sub>70</sub>	0,96±0,08	2,44±0,30
Cd <sub>75</sub>	2,08±0,04	2,61±0,08
Cd <sub>80</sub>	0,57±0,04	0,54±0,14

Tabulka 3.16.

Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic. Symboly viz Seznam zkratk a kap. 3.1. Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=3).

Vzorek	Fotoredukce DCPIP[H <sub>2</sub> O→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)	Fotoredukce DCPIP[DPC→DCPIP] (%)	Změna aktivity (%)
Cd <sub>0</sub>	100,00±11,59	0,00	100,00±1,72	0,00
Cd <sub>50</sub>	52,92±2,55	-47,01	59,76±1,01	-40,24
Cd <sub>60</sub>	21,36±0,45	-76,64	56,49±2,43	-43,51
Cd <sub>70</sub>	44,02±2,33	-55,98	51,62±3,60	-48,38
Cd <sub>75</sub>	12,25±0,60	-87,75	12,06±0,87	-87,94
Cd <sub>80</sub>	20,21±1,83	-79,79	20,78±3,16	-79,22

Tabulka 3.17.

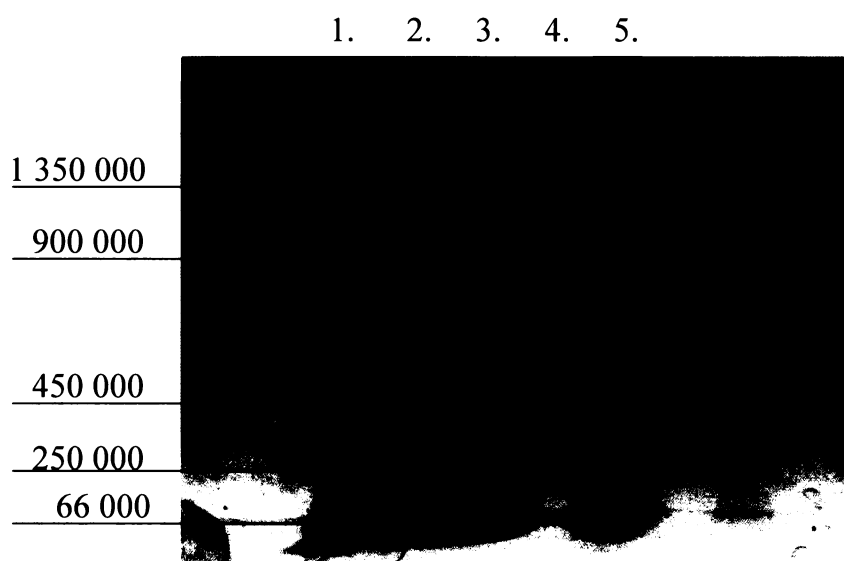
Hodnoty fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic (viz tab.3.16.) v procentech. Poslední sloupec udává změnu aktivity vzorků porovnávanou s kontrolou, jak u fotoredukce s donorem elektronů vodou, tak i v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů DPC.

Z naměřených hodnot fotochemických aktivit thylakoidních membrán sinic plyne, že koncentrace kademnatých iontů v hodnotách 50 až 200mM nevykazuje stimulační efekt na thylakoidní membrány jak u fotoredukce s donorem elektronů vodou, tak i v přítomnosti nefyziologického donoru elektronů – DPC. Dá se však říci, že inhibiční efekt u fotoredukce s umělým donorem elektronů DPC (DPC→DCPIP) je o několik procent mírnější, než u fotoredukce H<sub>2</sub>O→DCPIP.

## 3.2 Elektroforetická analýza

### 3.2.1 „Červená“ nativní elektroforéza sedimentu thylakoidních membrán sinic v hustotním gradientu sacharózy

Vzorky thylakoidních membrán sinic jsem připravila postupem popsáním v kap.2.4.2. a podrobila centrifugaci v šestnáctistupňovém hustotním gradientu sacharózy (viz kap.2.4.3.). Během centrifugace se pigmentoproteinové komplexy thylakoidních membrán sinic (pro zjednodušení je budu označovat symbolem TMs) rozdělili do dvou zelených zón a sedimentu. Sediment (pro zjednodušení jej budu dále označovat symbolem Sd) jsem následně analyzovala pomocí „červené“ nativní elektroforézy.(viz kap.2.5.1.)



Obrázek 3.1.

Elektroforetické dělení Sd na 4 – 13 % gradientu akrylamidu po obarvení. Dráhy: 1-ferritin, 2-Sd, 3-Sd, 4-katalasa, 5-BSA

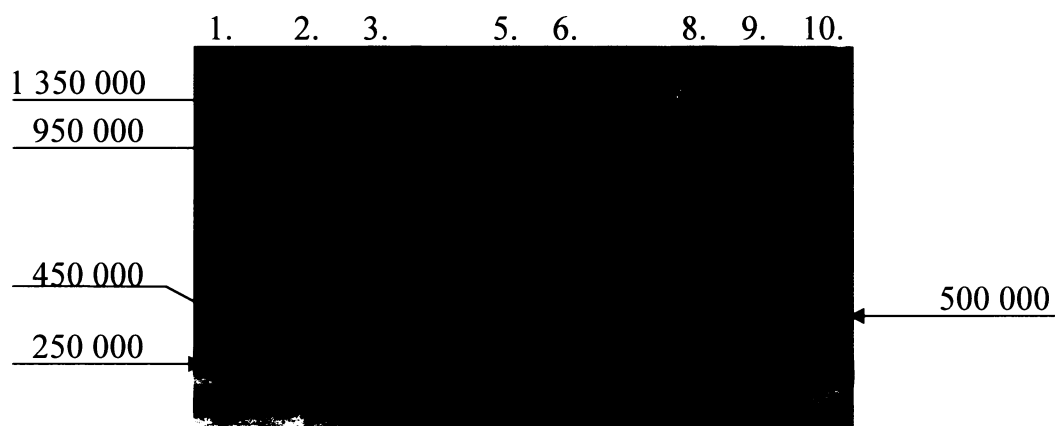
Vzorek	Relativní molekulová hmotnost (kDa)
Sd	64
Sd	70
Sd	112
Sd	179
Sd	260
Sd	399
Sd	440
Sd	562
Sd	630
Sd	820
Sd	910

Tabulka 3.18.

Relativní molekulové hmotnosti pigmentoproteinových komplexů sedimentu (Sd) po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy.

### **3.2.2 „Červená“ nativní elektroforéza thylakoidních membrán sinic a thylakoidních membrán špenátu.**

Pomocí „červené“ nativní elektroforézy (viz kap.2.5.1.) jsem analyzovala pigmentoproteinové složení thylakoidních membrán sinic (TMs) a thylakoidních membrán špenátu. (pro zjednodušení budu označovat thylakoidní membrány špenátu symbolem TMš).



Obrázek 3.2.

Elektroforetické dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinic TMs a thylakoidních membrán špenátu TMš. Dráhy: 1-katalasa, 2-ferritin, 3-TMš, 5-TMs, 6-TMs, 8-TMš, 9-ferritin, 10-BSA.

Relativní Molekulová Hmotnost (kDa)	TMš	TMs
	260	280
	480	590
	590	610
	740	740
	830	853
		980
	1150	1 150
		1 290

Tabulka 3.19.

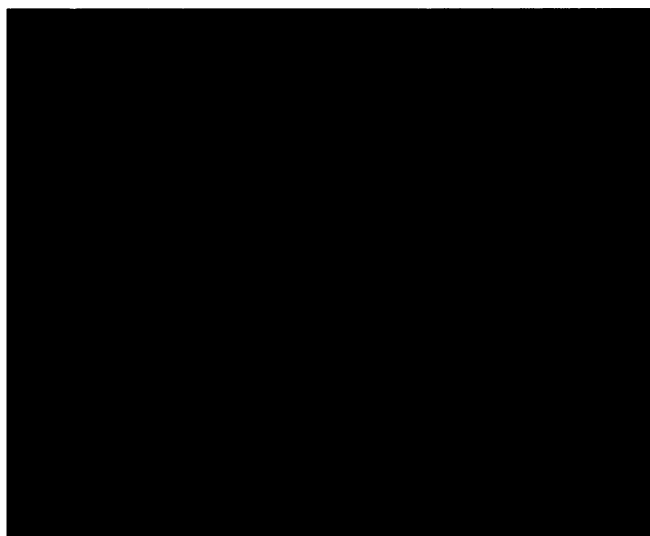
Relativní molekulové hmotnosti thylakoidních membrán sinic (TMs) a špenátu (TMš) separované „červenou“ nativní elektroforézou.



### 3.2.3 „Červená“ nativní elektroforéza thylakoidních membrán sinic v přítomnosti různé koncentrace chloridu kademnatého.

Pomocí „červené“ nativní elektroforézy (kap.2.5.1.) jsem analyzovala pigmentoproteinové složení thylakoidních membrán sinic (TMs)

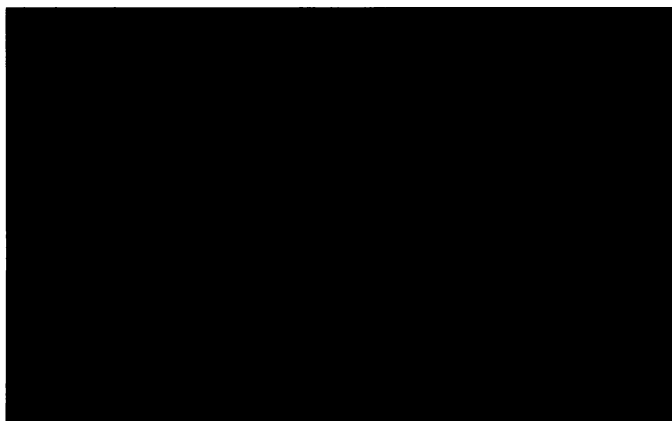
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.



Obrázek 3.3a.

Elektroforetické dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinic (TMs) po 30ti minutové inkubaci s ionty kadmia před obarvením. Dráhy: 1-ferritin, 2-katalasa, 3-BSA, 4-Cd<sub>6</sub>, 5-Cd<sub>10</sub>, 6-Cd<sub>80</sub>, 7-Cd<sub>800</sub>, 8-BSA, 9-katalasa, 10-ferritin

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.



Obrázek 3.3b.

Elektroforetické dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinic (TMs) po 30ti minutové inkubaci s ionty kadmia a DM extraktu před obarvením. Dráhy: 1-DM, 2-Cd<sub>6</sub>, 3-Cd<sub>10</sub>, 4-Cd<sub>80</sub>, 5-Cd<sub>800</sub>, 6-Cd<sub>800</sub>, 7-Cd<sub>80</sub>, 8-Cd<sub>10</sub>, 9-Cd<sub>6</sub>, 10.DM

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.



Obrázek 3.4.

Elektroforetické dělení pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinic (TMs) vystavených 30ti minutové inkubaci s iontama kadmia o koncentraci CdCl<sub>2</sub> (6,10 80 a 800 mM) po obarvení. Dráhy: 1-ferritin, 2-katalasa, 3-BSA, 4-Cd<sub>6</sub>, 5-Cd<sub>10</sub>, 6-Cd<sub>80</sub>, 7-Cd<sub>800</sub>, 8-BSA, 9-katalasa, 10-ferritin.

	Vzorek			
	Cd <sub>6</sub>	Cd <sub>10</sub>	Cd <sub>80</sub>	Cd <sub>800</sub>
Relativní molekulová hmotnost (kDa)	71	70	70	70
	73	72	72	72
	280	280	280	280
	398	398	398	398
	460	460	460	460
	562	561	561	561
	891	891		
	1 150	1 150		

Tabulka 3.20.

Relativní molekulové hmotnosti pigmentoproteinových komplexů TMs vystavených 30ti minutové inkubaci s iontami kadmia o různé koncentraci CdCl<sub>2</sub>

## 4 Diskuse

Tato diplomová práce se zabývá vlivem kadmnatých iontů na fotosyntetický aparát sinice *Synechococcus elongatus* jako zástupce prokaryotických organismů.

V posledních letech se problematice toxických kovů věnuje velká pozornost. Někteří autoři, např. /45, 46, 47, 48/, se zabývali studiem vlivu kadmnatých iontů jako stresoru na intaktní rostlinné organizmy. Další skupinu autorů tvoří ti, kteří se věnují toxickému působení iontů kadmia na organismus řas: /49, 50, 51/. V odborné literatuře lze najít i práce, ve kterých se sleduje vliv kadmnatých iontů na sinice: /52, 53/.

Naše práce zabývající se vlivem kadmnatých iontů na thylakoidní membrány sinic *Synechococcus elongatus* tedy přispívá k výše uvedeným pracím.

Fotosyntetické preparáty jsem analyzovala pomocí metod postihujících vliv kadmnatých iontů na fotochemické aktivity a na pigmentoproteinové komplexy těchto preparátů.

Nejdříve jsem thylakoidní membrány sinic izolované z buněk, které rostly za standardních podmínek charakterizovala pomocí fotochemické aktivity fotosystému II za přítomnosti umělého akceptoru elektronů 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCPIP) a také za přítomnosti umělého donoru elektronů 1,5-difenyلكarbazidu (DPC) bez inkubace s kadmnatými ionty.

Zde byl pozorován nárůst fotochemické aktivity porovnáním obou fotoredukci právě u fotoredukce DPC→DCPIP (t.j. v přítomnosti umělého donoru elektronů 1,5-difenyلكarbazidu) zhruba o 10 % původní hodnoty. (původní hodnoty představovaly fotochemické aktivity redukce H<sub>2</sub>O→DCPIP) OEC komplex se zachoval téměř nepoškozený.

Totéž stanovení jsem prováděla na extraktu připraveném pomocí neiontového tenzidu n-dodecyl-β,D-maltosidu (dodecylmaltosid), který slouží pro extrakci supramolekulárních komplexů. Porovnávala jsem fotochemické aktivity

fotoredukce  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$  a  $\text{DPC} \rightarrow \text{DCPIP}$ . Aktivita narostla průměrně o 80 % původní hodnoty u fotoredukce v přítomnosti DPC (původní hodnoty opět představovaly fotochemické aktivity fotoredukce  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$ ). OEC komplex byl tedy poškozen více, než v thylakoidních membránách v prvním případě (ve skutečnosti ale méně, než z poloviny).

Dále jsem inkubovala s kademnatými ionty thylakoidní membrány sinic izolované z buněk, které rostly za standardních podmínek. Stejnými metodami jako v předchozí části jsem studovala efekt kademnatých iontů na fotochemické aktivity a pigmentoproteinové komplexy těchto membrán.

Podobně jako výsledky diplomové práce Evy Tůmové /40/, i moje výsledky poukazyvaly na to, že i přesto, že kadmium je považováno za jeden z hlavních toxických těžkých kovů, působil v nízkých koncentracích (t. j. koncentrace 2, 4, 5, 6 a 7 mM) mírně stimulačně na fotochemické aktivity fotosystému II. Nárůst oproti kontrole (bez kademnatých iontů) byl 10-20% a týkal se pouze fotoredukce s DPC.

Analogické zjištění lze nalézt i v práci Karavaeva a kol. /41/, kteří sledovali změny ve fotosyntetickém aparátu u listů fazolu *Vicia faba*. Rostliny rostly v přítomnosti  $10^{-7}$ - $10^{-3}$  M vodného roztoku  $\text{CdCl}_2$ . Autoři zjistili, že změny ve fotosyntetickém aparátu rostlin v přítomnosti iontů toxického kovu nejsou specifické a jednoznačné. Nízké koncentrace ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M) stimulují fotosyntetickou aktivitu, zatímco vysoké koncentrace iontů v růstovém médiu ( $10^{-4}$ - $10^{-3}$  M) tuto aktivitu potlačují.

Stanovením fotochemických aktivit fotosystému II pomocí fotoredukce  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$  a  $\text{DPC} \rightarrow \text{DCPIP}$  thylakoidních membrán sinic inkubovaných s kademnatými ionty v rozmezí koncentrace  $\text{CdCl}_2$  0-200mM, stimulační efekt vykazovaly pouze nižší koncentrace  $\text{CdCl}_2$  (t. j. hodnoty v sadě měření 0-10 mM u fotoredukce  $\text{DPC} \rightarrow \text{DCPIP}$ ), vyšší koncentrace již vykazovaly silně inhibiční efekt na fotochemické aktivity. Mohu tedy své výsledky ztotožnit se závěrem Karavaeva a kol. /41/ a potvrdit názor, že kademnaté ionty způsobují inhibici

fotochemické aktivity fotosystému II zejména ve svých vyšších koncentracích. Rozdíl je ale v tom, že zatímco Karavaev a kol. /41/ aplikoval svoje stanovení na celé rostliny a pozoroval inhibiční efekt kademnatých iontů mohl být způsoben v biosyntetických změnách, naše výsledky jsou získány přímým působením iontů kadmia na thylakoidní membrány sinic.

Z našich výsledků lze dále usuzovat, že cílem působení kademnatých iontů je pravděpodobně oxidační (donorová) strana fotosystému II, (část elektronového transportního řetězce mezi vodou a reakčním centrem fotosystému II) Fotochemické aktivity mají v přítomnosti umělého donoru elektronů 1,5-difenyلكarbazidu trend méně klesat. (koncentrace kademnatých iontů 0-10 mM).

Dále jsem se zabývala pozorováním časové závislosti fotochemických aktivit inkubovaných thylakoidních membrán sinic s koncentrací kademnatých iontů 6 mM oproti membránám bez kademnatých iontů po dobu 50 minut. Pozorovala jsem zda má tato krátká doba vliv na fotochemické aktivity. Aktivity jsem měřila dříve popsáním způsobem s oběma typy fotoredukce s tím rozdílem, že jsem proměřovala vždy pouze jeden vzorek a to ihned po rozmrazení a pak v intervalech po deseti minutách po dobu 50 minut. Pak jsem totéž zopakovala i s druhým vzorkem. Ze získaných hodnot byl jednak vidět nárůst aktivit v přítomnosti umělého donoru elektronů, což potvrzuje naši domněnku, že cílem působení kademnatých iontů je pravděpodobně oxidační (donorová) strana fotosystému II. Hodnoty aktivit vzorku s koncentrací kademnatých iontů 6 mM se však v časové závislosti významně neměnily. Nepoukázaly na žádný trend inhibice nebo stimulace s časem. Lze tedy říci, že s časem nedochází k významné změně v aktivitách studovaných vzorků, ani k odchýlkám mezi vzorkami s ionty  $Cd^{2+}$  a bez nich.

Při vyhodnocení zmíněných výsledků je ale nutno brát v úvahu fakt, že ionty kadmia mohou mít vliv na množství chlorofylu **a**.

Pokud jsou thylakoidní membrány vystaveny různým koncentracím kadmnatých iontů, mohou tyto ionty způsobit změny v koncentraci chlorofylu a. Po vynesení koncentrace chlorofylu a u všech vzorků proti koncentraci kadmnatých iontů se tento fakt potvrdil a koncentrace chlorofylu a s rostoucí koncentrací iontů kadmia klesala. Výrazně nízkou koncentrací chlorofylu a vykazoval vzorek Cd<sub>800</sub> (koncentrace kadmia je zde 800mM). Pagliano a kol. /42/ dospěli k závěru, že kadmnaté ionty neovlivňují množství proteinů PS II a že nízké koncentrace kadmnatých iontů vykazují stimulační efekt na fotochemické aktivity thylakoidních membrán rýže v přítomnosti DPC. Usuzujeme tedy, že klesá pouze množství chlorofylu a nikoliv proteinů, na něž je vázán, a že tedy lze pomocí funkce proložené grafem 3.1. vyjádřit množství vzorku tak, aby nebylo vztaženo na chlorofyl, ale na množství thylakoidních membrán. Proto jsou námi získané aktivity přepočteny na úbytek chlorofylu a s rostoucí koncentrací kadmnatých iontů (viz graf 3.1.).

Vizuálně vzorky s různou koncentrací kadmnatých iontů nejevily barevné změny. Nepatrně světlejší byly vzorky s koncentrací kadmia 800 mM (posun ke žluté barvě). Úbytek chlorofylu je tedy způsoben zřejmě posunem absorpčního maxima, k čemuž pravděpodobně dochází záměnou centrálního atomu chlorofylu za kadmium. Tato záměna může mít za následek posun absorpčního maxima o několik desítek nm /43/. Při malé šířce vrcholu v absorpčním spektru chlorofylu pak takto změněné molekuly při spektrofotometrickém stanovení nemusíme zaznamenat. Proto by bylo vhodné v budoucnosti sledovat závislost změn v absorpčním spektru chlorofylu na různých koncentracích kadmnatých iontů a tuto hypotézu potvrdit či vyvrátit.

Iontový poloměr kadmia je sice zhruba o polovinu větší než iontový poloměr hořčíku, pyrolová jádra kolem centrálního atomu by se však při takovéto substituci mohla vychýlit směrem nad rovinu porfyrinového skeletu a tak tuto záměnu umožnit /43/. Takto deformovaný porfyrin může být důvodem barevné změny chlorofylu.

Protože fotochemické aktivity fotosystému klesají poněkud pomaleji než koncentrace chlorofylu, kademnaté ionty působí zřejmě více na chlorofyl vnitřní antény, než reakčního centra (graf 3.2.).

Pigmentoproteinové komplexy jsem separovala pomocí centrifugace v sacharosovém hustotním gradientu. Podařilo se mi oddělit PS I a PS II. Obě zóny obsahovaly pouze fotosystém I. Fotosystém II klesl do sedimentu. Příčinou mohlo být použití úhlového rotoru. Proto jsem, při elektroforetickém stanovení pigmentoproteinových komplexů, tento fakt brala v úvahu a jako vzorky jsem používala kromě thylakoidních membrán sinic sediment po centrifugaci v hustotním gradientu sacharosy a snažila se najít právě v něm fotosystém II. Reeлектрофорéza v prostředí SDS /44/ po separaci pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinic pomocí „červené“ nativní elektroforézy (viz kap. 3.2.1.) ukázala, že v pigmentoproteinu o relativní molekulové hmotnosti 300 kDa je zřejmě fotosystém II. Jeho reeлектрофорéza poskytuje typický profil, svědčící o jeho přítomnosti. Z profilu reeлектрофорézy pigmentoproteinů o relativních molekulových hmotnostech asi 900 kDa a 1200 kDa (kap. 3.2.3.) usuzujeme na přítomnost fotosystému I v různých oligomérních formách /44/.

Také jsem pozorovala změny pigmentoproteinového složení thylakoidních membrán sinic při různých koncentracích kademnatých iontů (kap. 3.2.3.) Při koncentracích 80 a 800 mM zcela vymizely pigmentoproteiny s relativní molekulovou hmotností kolem 900 a 1200 kDa odpovídající zřejmě PS I, u vzorku s koncentrací kadmia 80 mM zeslábly pásy pigmentoproteinů o molekulové hmotnosti 398 kDa, 460 kDa a 561 kDa. Vzorek 800 mM měl zesláblé pásy pigmentoproteinů o molekulových hmotnostech 460 a 561 kDa.

Při porovnání thylakoidních membrán sinic a špenátu se jednotlivé elektroforetické pásy na „červené“ nativní elektroforézy příliš neměnily (kap. 3.2.2.).



Pro podrobnější závěry by bylo vhodné pokračovat v identifikaci pigmentoproteinových komplexů thylakoidních membrán sinic pomocí „červené“ nativní elektroforézy s následnou aplikací reelektroforézy v prostředí SDS.

## 5 Závěr

1. Přímé působení kademnatých iontů na thylakoidní membrány sinic snižuje množství chlorofylu **a**.
2. Ve fotosystému II kademnaté ionty pravděpodobně působí více na chlorofyl vnitřní antény než na chlorofyl reakčního centra.
3. Byl pozorován mírně stimulační efekt kademnatých iontů na aktivitu fotosystému II v přítomnosti umělého donoru elektronů 1,5-difenylkarbazidu v koncentracích  $\text{CdCl}_2$  do 10 mM.
4. Inhibiční vliv iontů kadmia na fotosystém II postihuje zřejmě jeho donorovou stranu.
5. Při rostoucí koncentraci kademnatých iontů se v thylakoidních membránách nevyskytovaly pigmentoproteinové komplexy s relativní molekulovou hmotností 900 a 1200 kDa odpovídající pravděpodobně fotosystému I.

## Seznam literatury

- 1) Voet, D., Voetová, J. G.: Fotosyntéza, v knize Biochemie, Victoria Publishing, Praha (1995)
- 2) Kutík, J., Beneš, K.: Biologické listy 56, 292-318 (1991)
- 3) Jansson, S.: Biochem. Biophys. Acta 1184, 1-19 /1984)
- 4) Sprague, S. G. J.: Bioenerg. Biomembrane 19, 691-703 /1987)
- 5) Leblová, S., Sofrová, D.: Biochemie fotosyntézy, skriptum PřF UK Praha, str. 12-21 (1982)
- 6) Šípal, Z., Azenbacher, P., Peč, P., Pospíšil, J., Růžička, I.: Biochemie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha (1992)
- 7) Kolektiv: Biochemie, skriptum PřF UK Praha, str. 183-200 (2003)
- 8) Kalina, T.: Systém a vývoj sinic a řas, skriptum PřF UK Praha, str. 33 (1994)
- 9) Hansson, Ö., Wydrzynski, T.: Photosynth. Res. 23, 131-162 (1990)
- 10) Babcovo, G. T., Barry, B. A., Debus, R. J., Hoganson, C. W., Ataman, M., Macintosh, L., Sitkole, I., Yocum, C. F.: Biochemistry 28, 9559-9565 (1989)
- 11) Ghanotakis, D. F., Yocum, C. F.: Photosynth. Res. 7, 97-114 (1985)
- 12) Bryant, D. A.: Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 214, 423-500 (1986)
- 13) Juany, D., Every, R. M., Cheng, R. H., Heymann, J. B., Schäger, H., Sled, V., Ohnishi, T., Baker, T. S., Frajer, W.A.: Biochemistry 33, 4401-4409 (1994)
- 14) Faller, P., Maly, T., Rutherford, W., Mcmillan, F.: Biochemistry 40, 320-326 (2001)
- 15) Berthold, D.A., Schmidt, C.L., Malkin, R.: J. Biol. Chem. 270, 29293-29298 (1995). Citováno ze (16)

- 16) Ke, B.: Phycobiliproteins and phycobilisomes, v knize Photosynthesis. Photobiochemistry and Photobiophysics (Ke, B.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, str. 251-269 (2001)
- 17) Chitnis, P. R., Xu, Q., Chitnis, V. P., Nechushtai, R.: Photosynth. Res. 44, 23-40 (1995)
- 18) Lawler, D. W.: Photosynthesis : Molecular, Physiological and Enviroment Processes, Longman Scientific & Technical, Harlow, England, str. 115-117 (1993)
- 19) Pänke, O., Rumberg, B.: Kinetic analysis of the proton translocating ATP synthasa from spinach, v knize Photosynthesis : from Light to Biosphere (Mythus, P., ed. ), Volume III, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, str. 143-146 (1995)
- 20) Rumberg, B., Berry, S.: Fefind measurment of the  $H^+$ / ATP coupling ratio at the ATP synthase of chloroplasts, v knize Photosynthesis : from Light to Biosphere (Mythus, P., ed. ), Volume III, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, str. 139-142 (1995)
- 21) Kolektiv: Systém a vývoj sinic a řas, skriptum PřF MU, Brno, str. 115-127 (1998)
- 22) Dědic, R.: Influence of UV-B radiation on photosynthetic protective mechanism, Thesis, Faculty of Matematics and Physis, Praha, str. 6-12 (1998)
- 23) Hladík, J., Sofrová, D.: Photosynthetica 17, 267-288 /1983)
- 24) Öquist, G., Cambell, D., Clarke, A. K. a Gustaffson, P.: Photosynth. Res., 151-158 (1995)
- 25) Masarovičová, E.: Handbook of Plant and Crop Sress (Pessarakli, M. Ed.), Dekker, M., New York and Basel str. 569 (1999)
- 26) Ma, J.F., Veno, D., Lheo, F. J., McGrath, S. P.: Planta, str. 220 a 731 (2005)

- 27) Ensley, B. D.: Current Topics in Plant Biochemistry, Physiology and Molecular Biology (Randálů, D., Raskin, I., Baker, A., Blevins, D., Smith, R. Eds, ) University of Missouri, Columbia (Missouri, USA), str. 569 (1995)
- 28) Prasad, M.N., Strzalka, K.: Heavy Metal Stress in Plants (Prasad, M.N.V., Hagenmeyer, J. Eds), Spinger Verlag, Berlin-Heidelberg, str. 117 (1999)
- 29) Malik, D., Sheoran, I.S., Singh, R.: Plant Physiol. Biochem, 30, 222-223 (1992)
- 30) Stiborová, M.: Biochem. Physiol. Pflanzen, str. 183-371 (1998“
- 31) Nováková, M.: Diplomová práce, PŘF UK, Praha (2003)
- 32) Tůmová, E., Sofrová, D.: Photosynthetica, str. 40-103 (2002)
- 33) Dercová, K., Makovníková, J., Barančíková, G., Buffa, J.: Chemické listy 99, 682-693 (2005)
- 34) Kratz, W.A., Mezera, J.: Am. J. Bot. 42, 282-287 (1955)
- 35) Schatz, G.H., Witt, H.T.: Photobiochem. Photobiophys. 7, 1-14 (1984)
- 36) Dobrá, J.: osobní sdělení
- 37) Liberda, J.: osobní sdělení
- 38) Ogawa, T., Vernon, L.P.: Photobiochem. Photobiophys. Acta 226, 88-97 (1971)
- 39) Šetlíková, E., Sofrová, D., Prášil, O., Budáč, P., Koblížek, M., Setlím, I.: Photosynthetica 27, 183-200 (1999)
- 40) Tůmová, E.: Diplomová práce, PŘF UK, Praha (2001)
- 41) Karavaev, V.A., Baulin, A.M., Gordienko, T.V., Donydkov, S.A., Tikhonov, A.N.: Russian J. Plant Physiol. 48, 38-44 (2001)
- 42) Pagliano, C., Raviolo, M., Vechia Dalla, F., Gabbrielli, R., Gonelli, C., Rascio, N., Barbato, R.: J. Photochem. Photobiol. B. 84, str.70-78 (2006)
- 43) Kotek, J.: osobní sdělení

- 44) Pavlátová, L.: osobní sdělení
- 45) Krupa, Z., Siedlecka, A.: Cd/Fe interaction and its effects on photosynthetic capacity of primary bean leaves, v knize Photosynthesis:from Light to Biosphere (Mythus, P., ed.), Volume IV, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, str. 621-624 (1995)
- 46) Láng, F., Sárvári, E., Szigeti, Z., Forot, F., Vsej, E.: Effects of heavy metals on the photosynthetic apparatus in cucumber, v knize Photosynthesis: from Light to biosphere (Mythus, P., ed), Volume IV, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, str. 533-536 (1996)
- 47) Moreno.Caselles, J., Moral, R., Perez-Murcia, M.D.: J. Plant Nutrition 23, 243-250 (2000)
- 48) Carr, H.P., Darino, F.A., Yang, M.S., Wong, M.H.: Bull Environ. Cintám. Toxicko. 60, 433-440 (1998)
- 49) Fargašová, A.: Biologia 54, 661-666 (1999)
- 50) Smýkalová, I.: Modelové populace řas rodu *Chorella* v přítomnosti  $As^{5+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  iontů. Kandidátská disertační práce. Argonom. Fak. ČZU Praha, katedra chemie (1999)
- 51) Takatera, K., Watanabe, T.: Anal. Sci. 8, 469-473 (1992)
- 52) Nekasová, O.D., Orleanskii, V. K., Nikandrov, V.V.: Russian J, Plant Physiol. 47, 234-241 (2000)
- 53) Nováková, M., Matějková, E., Sofrová, D.: Photosynthetica 42, 425-430 (2004)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka