

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 04 Biologie

2014/2015

Vliv cytokininů na biosyntézu chlorofylu ve tmě u smrku ztepilého (*Picea abies*) a modřínu opadavého (*Larix decidua*)

Effect of cytokinins on chlorophyll biosynthesis in the darkness in Norway spruce (*Picea abies*) and European larch (*Larix decidua*)

Autor: Miroslav Peřina

Škola: Gymnázium Jakuba Škody Přerov
Komenského 29, 750 11

Kraj: Olomoucký

Konzultanti: Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.
Mgr. Tibor Stolárik
Centrum regionu Haná, Oddělení biofyziky
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého, Olomouc

Přerov 2015



Přírodovědecká
fakulta

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorských a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Přerově dne 24. 3. 2015

podpis:

Poděkování

Zde bych rád poděkoval především panu Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D., který mou práci vedl a po celou dobu mi byl nápomocen, za jeho čas a ochotu. Dále děkuji panu Mg. Tiboru Stolárikovi za pomoc a podnětné nápady.

Poděkování patří také panu Mgr. Marku Kűchlerovi, který bezchybně zvládl veškerou organizaci, a co se SOČ týče, zodpověděl mi všechny dotazy ohledně formální úpravy práce.

Dále děkuji PřF Univerzity Palackého Olomouc a CR Haná za poskytnutí potřebných prostor a vybavení.

ANOTACE

Tato práce se zabývá doposud nezkoumaným fenoménem, a to vlivem cytokininů, konkrétně benzylaminopurinu (BAP), na biosyntézu chlorofylu ve tmě u smrku ztepilého (*Picea abies*) a modřínu opadavého (*Larix decidua*). Cílem práce bylo pomocí spektrofotometru zjistit koncentrace chlorofylů (chlorofyl *a*, *b*) a karotenoidů ve vzorcích semenáčků zmíněných jehličnanů pěstovaných o různé koncentraci cytokininu na světle či ve tmě. Vedle analýzy změn koncentrace rostlinných pigmentů byla také provedena analýza koncentrace protochlorofylidu (Pchl_{id}), jakožto nejdůležitějšího prekurzoru chlorofylů. Dále byl studován a zkoumán výskyt a fungování dvou klíčových enzymů, na světle závislé NADPH:protochlorofylid oxidoreduktázy (POR) a na světle nezávislé protochlorofylid oxidoreduktázy (DPOR), které katalyzují redukci Pchl_{id}, klíčovou reakci v průběhu biosyntézy chlorofylu. Dále byla analyzována přítomnost proteinů, na které se vážou asimilační pigmenty a přítomnost regulačních enzymů, např. glutamyl-tRNA reduktáza (GluTR).

V teoretické části práce je čtenář seznámen s principem biosyntézy chlorofylu z biochemického a fylogenetického hlediska, světelně závislou a nezávislou redukcí Pchl_{id}, strukturou DPOR a principem fungování cytokininů. Hlavní část práce předkládá výsledky ve formě grafů a obrázků, v závěru jsou poté shrnuty výsledky a prodiskutovány jednotlivé teze a možné využití práce v praxi.

Výsledkem práce je souhrn grafů a obrázků dokazujících pozitivní účinek BAP na akumulaci chlorofylů u smrku a modřínu, především při koncentraci 10^{-6} mol·l⁻¹. Dále však byly nalezeny markantní rozdíly mezi schopností biosyntézy Chl_s ve tmě, jelikož smrk si ve tmě udržoval stálé množství Chl, zatímco u modřínu docházelo k etiolizaci. Bylo zjištěno, že tyto rozdíly jsou způsobeny především nefunkčností polypeptidu ChlB (který je součástí DPOR) a snížením exprese enzymu GluTR. Dále bylo zjištěno, že hlavní regulační funkci u biosyntézy Chl má právě enzym GluTR a jeho transkripční a post-translační regulace.

Všechna měření probíhala v CR Haná, Oddělení biofyziky.

Klíčová slova: Biosyntéza chlorofylu, Světelně závislá protochlorofylid oxidoreduktáza, Světelně nezávislá protochlorofylid oxidoreduktáza, Cytokininy, Benzylaminopurin, Jehličnany.

ANNOTATION

This work deals with so far unstudied phenomenon, an effect of cytokinins, specifically of benzylaminopurine (BAP) on chlorophyll biosynthesis in Norway spruce (*Picea abies*) and European larch (*Larix decidua*) grown in the darkness. The aim of the work was to determine chlorophylls (chlorophyll *a,b*) and carotenoids concentrations in samples, grown in various concentrations of cytokinin in the light or in the dark, using a spectrophotometer. In addition, the concentration of protochlorophyllide (Pchl_{id}), the most important precursor of chlorophyll, was also analyzed. The presence and functioning of two key enzymes – light dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) and light independent protochlorophyllide oxidoreductase (DPOR), which catalyse the regulatory reduction of Pchl_{id}, was also examined. Furthermore, the presence of pigment-binding proteins and the presence of regulatory enzymes, for. ex. glutamyl-tRNA reductase (GluTR) was analysed.

The theoretical part includes the principle of chlorophyll biosynthesis from biochemical and phylogenetic perspective, description of light dependent and independent Pchl_{id} reduction, DPOR structure and operating principle of cytokinins. The main part of the work presents results in graphs and figures, in the end the results are summarized and individual theses and possible use in practise is discussed.

The result is a summary of graphs and figures, which demonstrate the positive effect of BAP on chlorophyll accumulation in spruce and larch, especially at a concentration of $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Furthermore, striking differences were found between the ability of Chls biosynthesis in the dark, because in spruce, constant amount of Chls was kept, in contrast to larch, which produced no Chls and was etiolated. It was found, that these differences are primarily caused by malfunction of the ChlB polypeptide (which is a part of DPOR) and by reduction of expression of GluTR enzyme. Furthermore, it was found that the main regulatory enzyme in the Chl biosynthesis is particularly the GluTR enzyme and its transcriptional and post-translational regulation.

All measurements were performed in the Centre of the Region Hana, Department of Biophysics.

Keywords: Chlorophyll biosynthesis, Light dependent and light independent protochlorophyllide oxidoreductase, Cytokinins, Benzylaminopurine, Conifers.

OBSAH

Úvod	6
I. Teoretická část	7
1. Funkce a lokalizace chlorofylů a bakteriochlorofylů	7
2. Obecné schéma biosyntézy chlorofylů a bakteriochlorofylů	8
2.1 Evoluční rozšíření světelně závislé a nezávislé biosyntézy chlorofylu	10
3. Světelně závislá biosyntéza Chl: stručný přehled	11
4. Světelně nezávislá biosyntéza Chl	11
4.1 První evidence dvou odlišných cest redukce Pchlid	11
4.2 Výzkum světelně nezávislé biosyntézy Chl u různých skupin	12
4.2.1 Analýza genu <i>frxC</i>	12
4.2.2 Světelně nezávislá cesta u anoxygenních fotosyntetických bakterií	12
4.2.3 Světelně nezávislá cesta u eukaryot	13
4.2.4 Zelenání ve tmě a evoluční distribuce genů <i>chlB</i> , <i>chlN</i> a <i>chlL</i>	13
5. Světelně nezávislá protochlorofylid oxidoreduktáza (DPOR)	14
5.1 Regulace exprese DPOR	14
5.2 Struktura a mechanismus DPOR, podobnost s nitrogenázou	15
5.3 Dostupné biochemické vlastnosti DPOR	16
6. Vznik více možných mechanismů syntézy Chl v evoluci	17
6.1 Akumulace Chl u jehličnanů rostoucích ve tmě a na světle	17
7. Cytokininy a jejich mechanismus účinku na syntézu Chl	19
8. Metodika	20
8.1 Rostlinný materiál a podmínky růstu	20
8.2 Analýza pigmentů	21
8.3 Analýza proteinů a enzymových subjednotek - Western blotting	25
II. Výsledky	33
1. Analýza pigmentů	33
1.1 Koncentrace chlorofylů u jehličnanů rostoucích na světle	34
1.2 Koncentrace chlorofylů u jehličnanů rostoucích ve tmě	36
1.3 Koncentrace karotenoidů u jehličnanů rostoucích na světle a ve tmě	38
1.4 Koncentrace Pchlid u jehličnanů rostoucích ve tmě	39
2. Analýza proteinů a enzymových subjednotek – Western blotting	41
Závěr a diskuze	44
Seznam použitých zkratk	48
Reference	49

Úvod

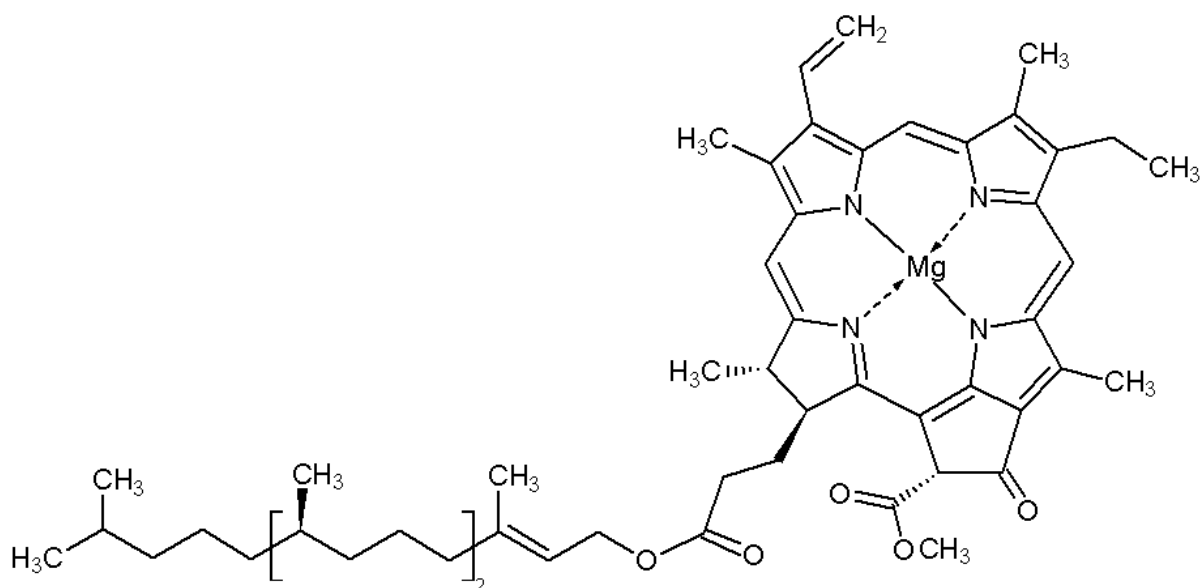
Chlorofyl v rostlinách patří mezi nejrozšířenější organické molekuly na naší planetě. Proto se i studiu jeho biosyntézy věnuje velká pozornost. Chlorofyl se v rostlinách je syntetizován biosyntetickou dráhou, která je u krytosemenných rostlin závislá na světle, proto jsou krytosemenné rostliny ve tmě tzv. etiolované, tj. neobsahují chlorofyl. Nahosemenné a další nižší rostliny mají však kromě světelně závislé dráhy, i světelně nezávislou dráhu biosyntézy chlorofylu. To znamená, že ve tmě nevykazují typické známky etiolizace a obsahují chlorofyl. Kromě světla ovlivňuje syntézu chlorofylu mnoho jiných faktorů. Jedním z nich mohou být rostlinné hormony ze skupiny cytokininů. Cytokinininy se podílejí na regulaci celé řady životních procesů v rostlinné buňce, kromě jiného mají stimulační úlohu při biosyntéze chlorofylu světelně závislou cestou.

Cílem této práce bylo testovat účinek cytokininů, konkrétně benzylaminopurinu (BAP), na biosyntézu a akumulaci chlorofylu v klíčcích dělohách smrku ztepilého a modřínu opadavého a testovat tak obecný vliv cytokininů na světelně nezávislou dráhu biosyntézy chlorofylu. Informace o akumulaci chlorofylů byly získány na základě spektrofotometrických měření u vzorků jehličnanů rostoucích při různých koncentracích BAP jak na světle, tak ve tmě. Širším cílem práce bylo poté určit přítomnost obou enzymů katalyzujících redukcí protochlorofylidu (klíčovou reakci v průběhu biosyntézy chlorofylu), a to NADP:Protochlorofylid oxidoreduktázy (LPOR) a ve-tmě-aktivní protochlorofylid oxidoreduktázy (DPOR), spolu s analýzou dalších proteinů a enzymů spojených s biosyntézou chlorofylu. Informace o koncentraci proteinů a enzymů byly získány imunologicky, pomocí metody Western blotting. Největší pozornost byla věnována rozdílům v akumulaci pigmentů a množství proteinů/enzymů mezi smrkem a modřínem, později rozdílům mezi vzorky téhož druhu rostoucími v rozdílných koncentracích cytokininu.

I. Teoretická část

1. Funkce a lokalizace chlorofylů a bakteriochlorofylů

Chlorofyly (Chls) a bakteriochlorofyly (Bchls) představují jednu z nejširších tříd přírodních pigmentů, jejichž biosyntéza je významnou metabolickou činností ekosféry. Tyto makrocyclické Mg-tetrapyrroly absorbují světelnou energii a podílejí se na nábojové separaci v biologických membránách. Oba tyto procesy jsou klíčové pro anaerobní fotosyntézu u anoxygenních fotosyntetických bakterií (obsahujících bakteriochlorofyly) a pro oxygenní fotosyntézu u sinic, prochlorobakterií, řas a rostlin (obsahujících chlorofyly). *In vivo*, Chls a Bchls se vyskytují jako nekovalentně vázané chromofory pigment-proteinových komplexů, jako světlo-sběrné antény či reakční centra fotosystémů I a II v tylakoidní membráně. Chls a Bchls představují dvě skupiny strukturně příbuzných pigmentů, jejichž předními představiteli jsou chlorofyl *a* (Chl *a*), chlorofyl *b* (Chl *b*) a bakteriochlorofyl *a* [1][6].



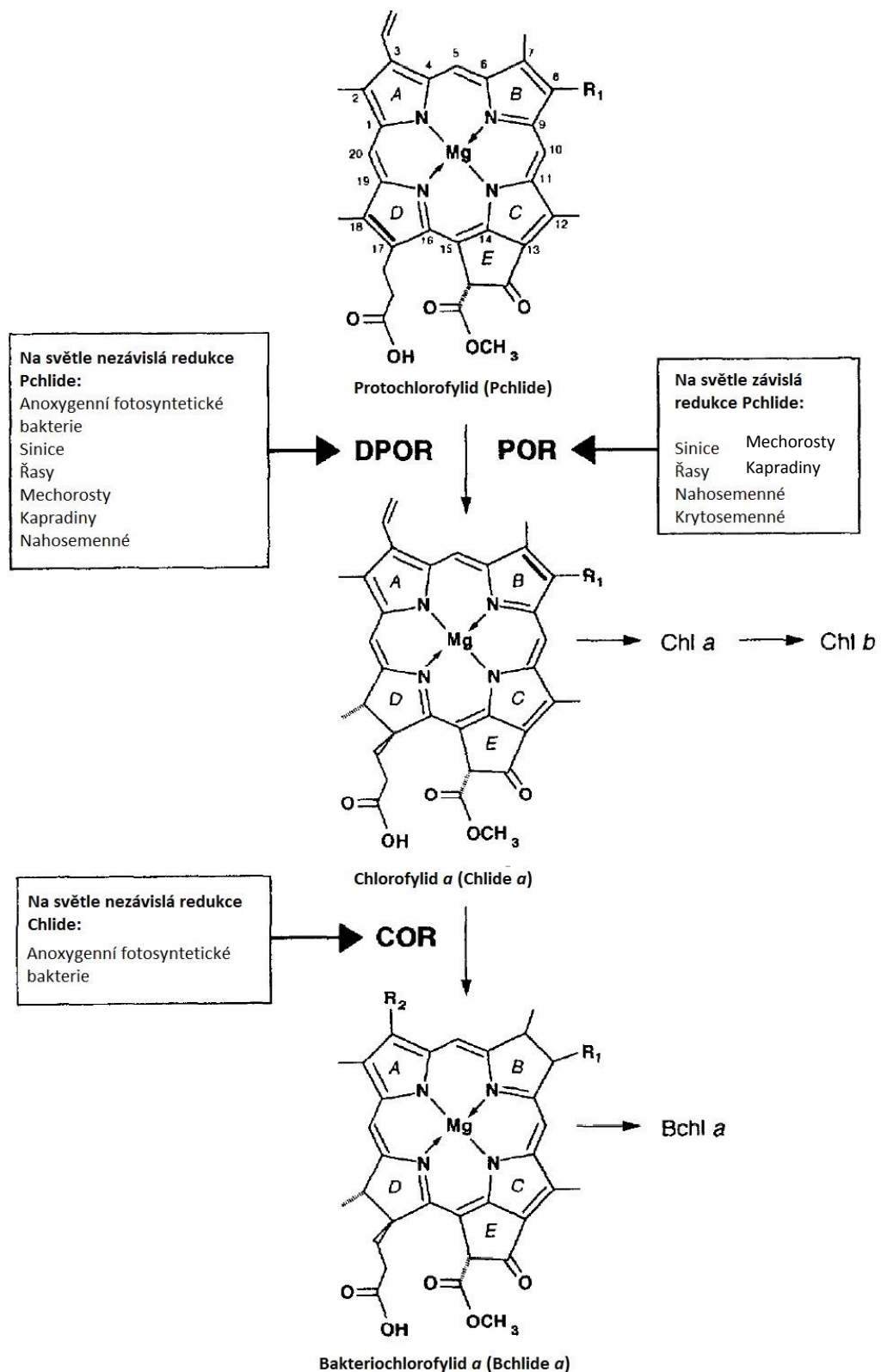
Obr. 1: Chlorofyl *a* [A]

2. Obecné schéma syntézy chlorofylů a bakteriochlorofylů

Jako univerzální prekurzor C₅ makrocyclických tetrapyrrolů slouží kyselina 5-aminolevulová (jinak také (5-)ALA, δ -ALA). Společné meziproducty biosyntézy všech tetrapyrrolů (hořčík-obsahující Chls a Bchls, nikl-obsahující koenzym F₄₃₀, kobalt-obsahující vitamin B₁₂, železo-obsahující hemy a sirohemy, lineární tetrapyrroly...) jsou sestaveny díky komplexní sérii biochemických reakcí vyžadujících stromálně i membránově vázané enzymy. Dělicím bodem syntézy Chls/Bchls a hemu je tetrapyrrol *protoporfyrin IX*, vzniklý kondenzací osmi molekul 5-ALA. Větvení syntézy se odvíjí od enzymatického vstupu iontu Mg²⁺ (Chl/Bchl) nebo Fe²⁺ (hem).

Následující reakce přeměňující *Mg-protoporfyrin IX* na Chl či Bchl, jsou specifické pro každý fotosyntetický organismus. Pro vlastní práci a celou její teoretickou část je nejdůležitějším meziproductem syntézy Chl/Bchl *protochlorofylid* (Pchlid), odvozený od Mg-obsahujícího *protoporfyrinu IX* (obr. 2). Tento pigment se *in vivo* vyskytuje jako směs forem nesoucích jak 3,8 divinylové, tak i 3-vinyl-8-ethylové řetězce, jejichž výskyt se různí mezi organismy a je závislý na prostředí [1].

Stereospecifickou *trans*-redukcí dvojně vazby mezi C-17 a C-18 v D-pyrrolovém kruhu v Pchlid vzniká *chlorofylid a* (Chlide). Tato *trans*-redukce je katalyzována dvěma druhy enzymů, z nichž jeden vyžaduje světlo jako kofaktor, druhý však nikoliv (viz sekci 2.1). Chlide *a* je poté následně esterifikován na řetězci propionové kyseliny (vázané na C-17 v cyklu D) isoprenoidním postranním řetězcem. Jako esterifikační substráty, díky kterým vzniká Chl *a* mohou sloužit fityl pyrofosfát či geranylgeranyl pyrofosfát, v konečné fázi doprovázené redukcí tří vnitřních dvojných vazeb v postranním řetězci. Chl *b* pravděpodobně vzniká z prekurzoru pro Chl *a*, a to oxidací 7-methylové skupiny. U anoxygenních fotosyntetických bakterií existuje více možných variant konečných fází biosyntézy Bchl *a*. Jednou z nejpravděpodobnějších se však jeví syntéza *bakteriochlorofylidu a* (Bchl *a*) z Chlide *a* redukcí dvojně vazby mezi C-7 a C-8, katalyzovanou enzymem Chlide oxidoreduktáza (COR) a následnou hydratací a oxidací 3-vinylové boční skupiny [1][6][8].



Obr. 2 Pozdní fáze syntézy chlorofylů a bakteriochlorofylů. U Pchlide je použito číselné schéma pro atomy uhlíku v makrocyclické tetrapyrrolové kostře. Nomenklatura pyrrolových cyklů je uvedena velkými písmeny kurzívou. Zvýrazněná je dvojná vazba v cyklu D u Pchlide (redukována jak enzymem DPOR, tak POR) a dvojná vazba v cyklu B u Chlide (redukována enzymem COR). Boční řetězec R_1 označuje vinylovou či ethylovou skupinu, řetězec R_2 reprezentuje vinylovou, hydroxyetylovou či acetylovou skupinu. V rámečcích jsou vypsány organismy, u nichž byla zjištěna přítomnost genů kódujících POR, DPOR nebo COR [B].

2.1 Evoluční rozšíření světelně závislé a nezávislé biosyntézy chlorofylu

Na základě toho, zda enzymatická redukce Pchl_{ide} na Chl_{ide} vyžaduje světlo jako esenciální kofaktor, či ne, byly popsány dvě různé cesty produkce chlorofylu. U organismů, kde redukce Pchl_{ide} probíhá pouze při osvětlení, je syntéza Chl a tímto i zelenání nazýváno jako světelně závislé. Pokud však může být Pchl_{ide} redukován i ve tmě a zelenání probíhá i bez přístupu světla, pak je syntéza Chl nazývána jako světelně nezávislá. Mnoho fotosyntetizujících organismů je schopno jak světelně závislé, tak nezávislé biosyntézy chlorofylu, čímž využívá obou typů redukce Pchl_{ide} k akumulaci normální hladiny chlorofylu.

Světelně závislá biosyntéza Chl je považována za univerzální schopnost oxygenních fotosyntetických organismů, které zahrnují následující: krytosemenné, nahosemenné (jehličnany, cykasy, ginko, *Gnetophyta*), kaprad'orosty, kapradiny, přesličky, plavuně, mechorosty, mechy, hlevíky, játrovky, řasy (*Chrysophyta*, *Pyrrophyta*, *Euglenophyta*, *Cyanophyta*, *Chlorophyta* – zelené řasy, *Phaeophyta*, *Rhodophyta*) a oxygenní fotosyntetické eubakterie (*Eubacteriophyta*).

Ve většině výše zmíněných skupin organismů spolu světelně nezávislá a závislá biosyntéza Chl koexistují. Etiolované krytosemenné rostliny však úplně postrádají světelně nezávislou cestu. U jehličnanů a nižších rostlin se většině případů světelně nezávislá cesta vyskytuje, avšak existují výjimky, které nedokáží akumulovat Chl při růstu ve tmě (např. *Ginko biloba*, *Gnetum ula*, *Euglena gracilis*, *Cyanidium caldarium*). Na druhou stranu, nejstarší skupiny fotosyntetických organismů, anoxygenní fotosyntetické bakterie (*Eubacteriophyta*) produkují Bchl výhradně světelně nezávislou cestou.

U organismů zelenajících ve tmě se objevují kvantitativní změny v jejich schopnosti akumulovat Chl. Prudká, světelně nezávislá biosyntéza Chl vedoucí k zelenání je ve většině případů omezena na děložní lístky (lodyhy) nahosemenných rostlin. Ovšem pro toto pravidlo je zde rostoucí počet výjimek, např. sekundární jehlice druhu *Metasequoia glyptostroboides* a primární jehlice borovice *Pinus pinea* si udržují schopnost zelenání ve tmě. Na druhou stranu, ve tmě pěstované děložní lístky (lodyhy) modřínu, jako např. *Larix decidua*, produkují velmi malé množství Chl a proto ve tmě zelenají velmi málo ^{[1][8]}.

3. Světelně závislá biosyntéza Chl: stručný přehled

Světlem katalyzovanou redukci Pchlíde na Chlíde zprostředkovává jádrem kódovaný a v plastidech lokalizovaný enzym NADPH:Pchlíde oxidoreduktáza (POR). Tato redukce reprezentuje klíčový regulační krok ve světelně závislé biogenezi chloroplastů krytosemenných rostlin, jelikož Chl *a* a Chl *b* jsou potřebné pro stabilní akumulaci na chlorofyl-navázaných proteinů (kódovaných v jádře i v plastidech) ve fotosystémech I a II na vnitřních plastidových tylakoidních membránách. Navíc k tomu, světelně závislá redukce Pchlíde je signifikantním mechanismem produkce Chl, zajišťující normální vývoj chloroplastů i u eukaryot schopných zelenání ve tmě. V poslední době byly u krytosemenných rostlin (*Arabidopsis thaliana* a ječmen) a také u některých druhů nahosemenných identifikovány dva rozdílné POR-geny, kódující rozdílně regulované POR-enzymy, nazvané PORA a PORB. Avšak u sinic a zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* se vyskytuje pouze jeden POR-gen a stejná data nejsou pro kapradiny, mechorosty ani prochlorobakterie k dispozici [1].

4. Světelně nezávislá biosyntéza Chl

4.1 První evidence dvou odlišných cest redukce Pchlíde

V průběhu studií různých druhů zelených řas v 50. letech byl získán první důkaz existence více než jednoho biologického mechanismu redukce Pchlíde. Vedle organismů, které typicky postrádají schopnost zelenat ve tmě, byli díky klasické genetické analýze identifikováni mutanti řas, kteří vykazovali tzv. ve tmě žluté (*yellow-in-the-dark*) fenotypy, dále označované jako (y). Ve většině případů u těchto mutantů řas rostoucích ve tmě dochází ke změně pigmentace z důvodu akumulace malého množství Pchlíde, absence Chl a zachování žlutých karotenoidů, primárně odpovědných za barvu fenotypu. Avšak bylo zjištěno, že tyto y-mutanti jsou stále schopni zelenání při osvětlení. Mutanti vykazující žluté fenotypy byli nalezeni u druhu *Chlamydomonas reinhardtii* a u některých kultur rodu *Chlorella* a *Scenedesmus*. U *C. reinhardtii* bylo identifikováno sedm různých v jádře kódovaných y-lokusů spojených se zmíněným fenotypem, avšak odpovídající produkty genů přímo neparticipují na světelně nezávislé redukci Pchlíde. Spojením faktu, že y-mutanti řas si zachovávají schopnost zelenat na světle, a že toto světlem indukované zelenání může být odbouráno odlišnou jadernou mutací, byl poskytnut důkaz, že geneticky oddělené cesty pro světelně nezávislou a světelně závislou biosyntézu Chl musí koexistovat [6][2].

4.2 Výzkum světelně nezávislé biosyntézy Chl u různých skupin

4.2.1 Analýza genu frxC

Velkým pokrokem v poznávání světelně nezávislé biosyntézy Chl bylo porovnání sekvencí DNA a srovnávací analýza plastidového genomu mechorostu *Marchantia polymorpha* a dvou krytosemenných, tabáku (*Nicotiana tabacum*) a rýže (*Oryza sativa*). Většina sekvenovaných plastidových genů a otevřených čtecích rámců (ORF) byla nalezena a zakonzervována ve všech třech zkoumaných genomech. Jeden z otevřených čtecích rámců, zpočátku nazývaný frxC (kvůli strukturní podobnosti předpokládaného genového produktu s eubakteriálními ferredoxiny) byl poprvé nalezen u druhu *Marchantia polymorpha* a navíc byla nalezena strukturní homologie mezi proteinovým produktem tohoto genu a proteinové subjednotky NifH Fe-eubakteriálního enzymu nitrogenázy. Plastidově kódovaný frxC gen druhu *M. polymorpha* představoval paradox, jelikož eukarota, na rozdíl od některých prokaryot nejsou schopna přímé fixace molekulárního dusíku. Následně byl také gen frxC izolován z druhu *Plectonema boranyum*, vláknité sinice, a bylo dokázáno jeho represe při podmínkách umožňující fixaci dusíku. Jak je popsáno dále (v sekci 5), později bylo zjištěno, že gen frxC není přímo zapojen do fixace dusíku, ale je spíše jedním z determinantů světelně nezávislé redukce Pchl_{ide} ^[1].

4.2.2 Světelně nezávislá cesta u anoxygenních fotosyntetických bakterií

Velký pokrok byl učiněn díky studiu biosyntézy fotopigmentů u mutantů rodu *Rhodobacter*. Tyto fialové anoxygenní bakterie produkují BChl *a* a fotosyntetizují v prostředí bez kyslíku. Všechny vyprodukované BChl vychází ze světelně nezávislé redukce Pchl_{ide}, jelikož anoxygenní bakterie postrádají enzym POR. *R. capsulatus*, fakultativní fototrop, byl podroben důkladné genetické analýze, s cílem najít mutanty deficientní v některých aspektech fotosyntézy. Celkem u něj bylo nalezeno 43 genů spjatých s fotosyntetickou funkcí, které kódují všechny genetické informace potřebné k produkci BChl z protoporfyrinu IX. Poté bylo zjištěno, že u druhů *R. capsulatus* a *R. sphaerooides* existují tři genové lokusy, známé jako *bchB*, *bchN* a *bchL*, potřebné ke světelně nezávislé redukci Pchl_{ide}. Tři nalezené geny byly poté i molekulárně charakterizovány, došlo k nalezení jejich prokaryotických i eukaryotických homologů. Posledním krokem bylo zjištění, že polypeptidy BchB, BchN a BchL odpovídající 3 zmiňovaným genům tvoří dohromady multi-subjednotkovou světelně nezávislou (ve tmě aktivní) Pchl_{ide} oxidoreduktázu (DPOR) u anoxygenních fotosyntetických bakterií ^[1].

4.2.3 Světelně nezávislá cesta u eukaryot

Dalším důležitým pokrokem byla identifikace nových y-mutantů druhu *C. reinhardtii*. Zatímco předchozí y-mutace, vedoucí ke striktně světelně závislému zelenání, byla zmapována na jaderném genomu, nově charakterizovaní mutanti vznikli z delecí v rámci plastidové DNA. Postupně byly díky genetickým analýzám a porovnávání genů spojených s biosyntézou Chl u druhů *C. reinhardtii* a *P. boranyum* nalezeny také tři geny, označené jako *chlB*, *chlN* a *chlL*, spojené se světelně nezávislou redukcí Pchl_{ide} u eukaryot.

Navíc k molekulární charakterizaci zmíněných genů, byla nalezena analogie mezi DPOR (jejími subjednotkami) a nitrogenázou u některých eubakterií. V průběhu dalšího výzkumu byly zmíněné geny *chlB*, *chlN* a *chlL* identifikovány i např. u druhů *Marchantia polymorpha* a *Chlamydomonas moewusii* a nyní jsou považovány za vzor pro všechny strukturní subjednotky DPOR u kyslík-vytvářejících prokaryot a eukaryot. Funkce jádrem kódovaných y-genů a jejich produktů, které by mohly regulovat světelně nezávislou redukcí Pchl_{ide} musí být ještě prozkoumána ^{[9][5]}.

4.2.4 Zelenání ve tmě a evoluční distribuce genů *chlB*, *chlN* a *chlL*

Vzhledem k faktu, že většina nahosemenných, kaprad'orostů a řas produkujících Chl ve tmě, byla evoluční distribuce genů *chlB*, *chlN* a *chlL* objektem značného zájmu. Tento fenomén byl zkoumán přes PCR, DNA-DNA hybridizaci a kompletní analýzu nukleotidové sekvence vybraných plastidových genomů. Jak bude prodiskutováno dále, schopnost většiny organismů redukovat Pchl_{ide} při absenci světla je sice spojena s přítomností genů *chlB*, *chlN* a *chlL*, avšak ne vždy platí, že přítomnost genů nutně poskytuje schopnost syntetizovat chlorofyl ve tmě. Zatím zanalyzované sekvence plastidových genomů v celé své velikosti obsahovaly buď všechny tři, nebo ani jeden ze zmiňovaných genů. Navíc k již dříve zmíněným druhům byly tyto geny nalezeny v plastidových genomech řasy *Cyanophora paradoxa* (obsahuje cyanely), červené řasy *Porphyra purpurea* a zelené řasy *Chlorella vulgaris*. Na rozdíl od výše zmíněných, v plastidových genomech krytosemenných, jako např. u tabáku (*Nicotiana tabacum*), rýže (*Oryza sativa*) a kukuřice (*Zea mays*) nebyly nalezeny žádné homology genů *chlB*, *chlN* a *chlL*. Všechna DNA izolovaná z organismů zelenajících ve tmě obsahovala nukleotidové sekvence, hybridizující se sondou na *chlL* a *chlB* geny. Je však zajímavé, že někteří zástupci menšiny nahosemenných a kapradin nesyntetizujících Chl ve tmě, mají zachované neporušené geny *chlB* a *chlL* nebo jejich příbuzné pseudogeny ^[1].

Ginko kupříkladu obsahuje DNA sekvence, které hybridizují se sondou na *chlL* gen a dokonce neporušený *chlB* gen, na rozdíl od kapradiny *P. nudum* a liánovce *Gnetum gnemon*, u nichž došlo k evidentní delecí většiny odpovídající genové sekvence a ani jeden ze tří výše uvedených zástupců nemá schopnost zelenání ve tmě. Genom modřínu však obsahuje homology nejen *chlL*, ale i obou dalších genů spojených se světelně nezávislou syntézou Chl, a přesto je jeho syntéza chlorofylu ve tmě nevýrazná. Tyto výsledky zdůrazňují opatrnost, se kterou by měly být vytvářeny závěry založené pouze na detekci genových sekvencí DNA-DNA hybridizací. V souhrnu bylo potvrzeno, že krytosemenné rostliny a některé eukaryotické organismy nezelenající ve tmě ztratily v průběhu evoluce geny *chlB*, *chlN* a *chlL* nebo došlo k jejich potlačení na základě mutací a staly se z nich pseudogeny^[1].

5. Světelně nezávislá protochlorofylid oxidoreduktáza (DPOR)

5.1 Regulace exprese DPOR

Zatím zlomkové informace o regulaci exprese genů *chlB*, *chlN* a *chlL* u oxygenních fotosyntetických organismů ukazují, že model akumulace jednotlivých mRNA kódujících subjednotky DPOR je specifický pro každý organismus. Zajímavým faktem je, že světlo zvyšuje akumulaci mRNA pro některé geny u určitých organismů, což pozdvihuje předtím přehlíženou hypotézu pozitivní světelné regulace na redukční kapacitu DPOR.

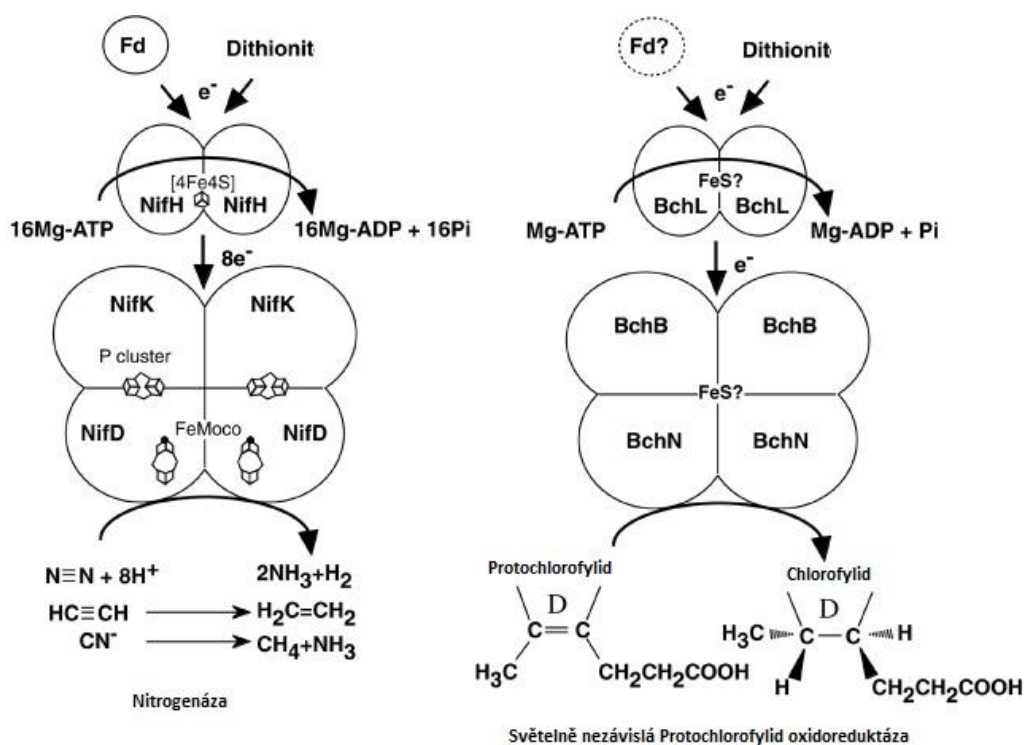
U sinic (*P. boranyum*) bylo zjištěno, že pro expresi genu *chlL* je potřebné inhibovat fixaci dusíku, tedy je vyžadována přítomnost kombinovaných zdrojů dusíku a/nebo molekulárního kyslíku. U eukaryot, např. druhu *C. reinhardtii* je mRNA pro *chlB* akumulována v mnohonásobně větším množství u stále osvětlených kultur, ve srovnání s kulturami rostoucími ve tmě. Za použití buněčných kultur mechorostu *Marchantia paleacea* (játrovky) mohla být akumulace mRNA pro *chlB*, *chlN* a *chlL* demonstrována v buněčné linii, která zelenala stejně dobře ve tmě, jako na světle. U buněčné linie, která rostla pouze na světle, docházelo ke větší akumulaci všech třech mRNA, což ukázalo přímou souvislost mezi silou exprese a schopností zelenat ve tmě. U nahosemenných (*Pinus sylvestris*) je základní exprese genů *chlB*, *chlN* a *chlL* stejná u lodyh vystavených světlu i u lodyh rostoucích ve tmě, avšak nárůst akumulace odpovídajících mRNA v lodyhách je indukovaný světlem. U modřínu *Larix kaempferi* probíhá exprese genů *chlN* a *chlL* lodyh vystavených světlu tak jako u lodyh rostoucích ve tmě, avšak neúčinná exprese genu *chlN* ve spojení s produkcí nefunkčního polypeptidu ChlB (z důvodu neúplné post-transkripční edice genu *chlB*) vede k narušení schopnosti zelenat ve tmě^{[2][4]}.

5.2 Struktura a mechanismus DPOR, podobnost s nitrogenázou

Struktura subjednotek DPOR byla vysoce konzervována v průběhu miliard let evoluce od anoxygenních fotosyntetických bakterií až po nahosemenné rostliny. Subjednotky BchN, BchB a BchL enzymu DPOR jsou u bakterie *Rhodobacter capsulatus* asi z 30-60 % identické s polypeptidy ChlN, ChlB a ChlL tohoto enzymu u sinic, řas, mechorostů, kapradin a nahosemenných. V rámci oxygenních fotosyntetických organismů se mezidruhová konzervace sekvencí polypeptidů ChlN, ChlB a ChlL pohybuje okolo 60-90 %. Srovnání aminokyselinových sekvencí také ukázalo, že polypeptid BchL/ChlL je ze všech tří nejvíce strukturně zakonzervován.

V počátcích byla struktura a funkce jednotlivých polypeptidů tvořících DPOR odvozena na základě již dříve zmíněné podobnosti s eubakteriálním enzymem nitrogenázou, jehož vlastnosti jsou zde nyní stručně shrnuty. Nitrogenáza, na kyslík citlivý enzymový komplex, se skládá z elektron-donorujícího dimeru NifH Fe (tzv. komponent II, či dinitrogenázní reduktáza) a katalytického tetrameru proteinových jednotek NifD Mo-Fe a NifK Mo-Fe (tzv. komponent I, či dinitrogenáza). Dimer proteinu NifK obsahuje dvě vazebná centra pro Mg-ATP a sdílené redoxní centrum 4Fe-4S, jehož sulfidové ligandy jsou poskytnuty dvěma zakonzervovanými cysteinovými zbytky pro každý NifH monomer. Ve spojení s hydrolyzou Mg-ATP, jsou z redukovaného ferredoxinu transportované elektrony přes redoxní centrum NifH do Mo-, Fe- a S- obsahujících redoxních center v katalytickém tetrameru NifD a NifK, kde probíhá první krok fixace dusíku, tedy jeho redukce na amoniak.

Funkční analýzy ve spojení s dostupnými biochemickými informacemi ukázaly dvě zásadní informace. Zaprvé, že konečným akceptorem všech redukčních ekvivalentů je Pchl_a a zadruhé že musí existovat určité Pchl_a-vázející katalytické subjednotky, později identifikované jako BchB/ChlB – BchN/ChlN tetramer. Strukturní konzervace spojená s vysokou podobností dvou biochemických konverzí u *R. capsulatus* (světelně nezávislé enzymy DPOR a COR) vedly k přesvědčivé domněnce, že tyto dvě rozdílné, avšak enzymově příbuzné aktivity vznikly genovou duplikací toho samého genu a že tímto způsobem mohly vzniknout i dvě rozdílné biochemické dráhy: fixace dusíku a světelně nezávislá biosyntéza chlorofylu ^{[4][5][1]}.



Obr. 3 Srovnání molekulární struktury nitrogenázy (vlevo) a světelně nezávislé Pchlide oxidoreduktázy (vpravo). Model DPOR je založen na podobnosti sekvencí s nitrogenázou a charakteristickým vlastnostem sledovaným *in vitro* [C].

5.3 Dostupné biochemické vlastnosti DPOR

Až do roku 2000, ve kterém Fujita et al. (2000) jako první zrekonstruovali DPOR *in vitro* (z purifikovaných polypeptidových subjednotek), neexistovaly žádné biochemické důkazy o předpokládaném fungování DPOR. Avšak tato rekonstrukce zřetelně potvrdila předpokládanou strukturu DPOR, složenou (tak jako nitrogenáza) ze dvou oddělených komponentů – proteinu BChl (tvoří dimer) a komplexu proteinů BchN-BchB (tvoří tetramer). Dále bylo zjištěno, že aktivita DPOR je *in vitro* závislá na ATP, na regeneraci ATP a na reduktantu dithioninu. Akčoliv *in vivo* reduktant DPOR zatím nebyl geneticky popsán, největším kandidátem je ferredoxin (zároveň s dithionitem), vzhledem k velké strukturní podobnosti BchL a NifH, které získává elektrony z ferredoxinu a dithionitu. Na základě imunologických a biochemických metod bylo také zjištěno, že ke správné aktivitě DPOR jsou potřebné jak rozpuštěné polypeptidové subjednotky, tak membránové frakce s navázanými proteiny. I přestože díky rekonstrukci a první biochemicko-imunologické analýze bylo získáno mnoho informací o DPOR, stále zůstávají některé důležité otázky neobjasněny, např. stechiometrie hydrolýzy ATP a přísunu elektronů DPOR nebo předvídaná schopnost DPOR redukovat násobné vazby i u jiných substrátů, než je Pchlide [4][5][2].

6. Vznik více možných mechanismů syntézy Chl v evoluci

Většina fotosyntetických organismů od sinic až po nahosemenné syntetizuje Chl jak pomocí světelně závislého enzymu POR, tak pomocí světelně nezávislého enzymu DPOR. Proto byla položena otázka, zda přítomnost obou paralelních mechanismů redukce Pchlide může za určitých environmentálních podmínek přinést selektivní výhodu či ne. Zatím nebyla nalezena přímá funkce pravděpodobně energeticky náročné produkce Chl pouze ve tmě (a tedy při absenci fotosyntézy). Avšak pokud si vezmeme jako příklad semenáčky jehličnanů, můžeme spekulovat o schopnosti akumulovat Chl a započít vývoj chloroplastů ještě před světelnou expozicí (na rozdíl od krytosemenných, které to nedokážou) jako o růstové výhodě v průběhu raných fází vývoje. Relativní důležitost světelně závislé a nezávislé biosyntézy Chl byla zjišťována měřením akumulace Chl u fotosyntetických organismů rostoucích na světle či ve tmě, především u zelených řas, sinic a jehličnanů ^{[1][8]}.

6.1 Akumulace Chl u jehličnanů rostoucích ve tmě a na světle

Jehličnany, jak už bylo zmíněno výše, mají unikátní schopnost řízené akumulace Chls a na Chl-vázajících se proteinů. Byla potvrzena pozitivní korelace mezi úrovní exprese podjednotek ChlBNL DPOR a účinností syntézy Chl ve tmě, přičemž nejefektivnější biosyntéza Chls byla vysledována v dělohách semenáčků. Obecně je biosyntéza Chl doprovázena akumulací proteinů pro oba fotosystémy (PSI a PSII).

Určité druhy borovice byly studovány v závislosti na přínosech světelně závislé a nezávislé biosyntézy chlorofylu k jeho celkové akumulaci při různých podmínkách. Bylo zjištěno, že dělohy 14- až 21-denních semenáčků akumulovaly mnohem více Chl než hypokotyly, navíc k tomu ve tmě rostoucí dělohy a hypokotyly akumulovaly 20-25 % a 12 % obsahu Chl nalezeného ve stejných orgánech rostoucích na světle.

V rámci jehličnanů existuje však i mezidruhová diverzita v účinnosti syntézy Chl při růstu ve tmě, ale např. *Larix decidua* vykazuje pouze nízkou schopnost syntetizovat Chl, zatímco *Picea abies* akumuluje nejvyšší množství Chl z celé čeledi borovicovitých (*Pinaceae*). Syntéza chlorofylu závisí na různých environmentálních faktorech. Demko et al. (2009) např. studovali regulační mechanismy ovlivňující temnostní syntézu Chl právě u *P. abies* a *L. decidua*, se zaměřením na syntetickou kapacitu ALA a redukci Pchlide spolu s výkonností exprese *chlLNB* genů a akumulací subjednotek DPOR ^{[2][1][3]}.

Demko et al. použili k analýze 7- a 14- denní semenáčky rostoucí jak ve tmě, tak ve střídavém režimu den/noc a dále také 14-denní semenáčky rostoucí ve tmě po 24 hodinovém osvětlení. Bylo zjištěno, že u temnostně rostoucích semenáčků *P. abies* probíhá nepřetržitá syntéza Chl v průběhu celého vývoje, u 14-denních semenáčků byl také pozorován nepatrný nárůst syntetické kapacity ALA a celkového obsahu Chl ve srovnání se 7-denními. Po osvětlení 7- i 14- denních semenáčků došlo k nárůstu Chl a zároveň k poklesu poměru Chl *a/b* a poklesu hladiny Pchlidle na nedetekovatelné množství. Na rozdíl od *P. abies* se vývoj plastidů u *L. decidua* ve tmě podstatně lišil. Semenáčky syntetizovaly Chl pouze v prvních fázích vývoje a dále už vykazovaly pouze pokles obsahu Chl (podle poměru Chl *a/b* byl pokles u obou pigmentů stejnoměrný), u 14-denních došlo také k poklesu koncentrace Pchlidle a syntetické kapacity ALA ve srovnání se 7-denními.

Koncentrace polypeptidů ChlB a ChlL se u *P. abies* neměnily v průběhu temnostního vývoje ani po iluminaci, zatímco hladina polypeptidu ChlB u *L. decidua* byla maximální u 7-denních semenáčků a poté už vykazovala pouze pokles, dokonce i po osvětlení [2].



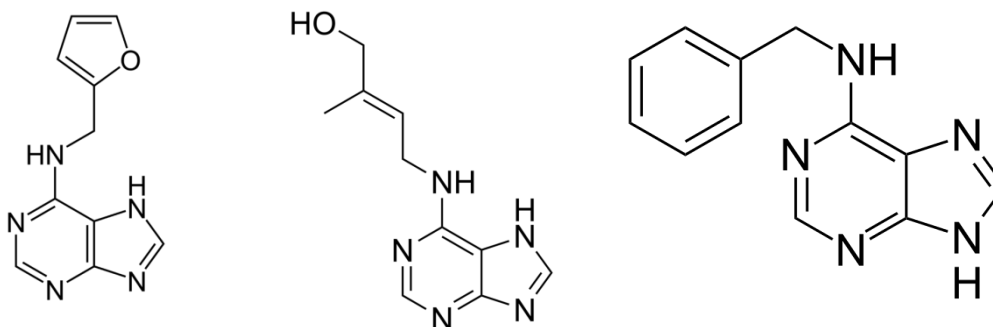
Obr. 4 Semenáčky *P. abies* a *L. decidua* ve dvou vývojových stádiích. **a** 7-denní ve tmě rostoucí *P. abies*. **b** 14-denní ve tmě rostoucí *P. abies*. **d** 7-denní ve tmě rostoucí *L. decidua*. **e** 14-denní ve tmě rostoucí *L. decidua*. U každého semenáčku je v pravém dolním rohu měřítko = 1cm [D].

7. Cytokininy a jejich mechanismus účinku na syntézu Chl

Cytokininy jsou fytohormony, které hrají důležitou funkci v mnoha metabolických a vývojových procesech rostlin. Cytokininy byly objeveny v 50. letech 20. století, po předchozím nálezů látek z cytokininovou aktivitou v kokosovém mléce. První čistý cytokinin *kinetin* byl izolován v roce 1955. Cytokininy byly objeveny primárně pro svou schopnost stimulovat buněčné dělení, avšak po jejich nalezení bylo zjištěno, že ovlivňují i mnohé další procesy jako je listová senescence, apikální dominance, formace a aktivita apikálních meristémů, vývoj květů, klíčení semen atd. Cytokininy však také ovlivňují světelně regulovaný vývoj, zahrnující autotrofní metabolismus, růst listů a klíčících děloh. V průběhu objevování a analýzy cytokininů bylo zjištěno, že cytokininová aktivita je podmíněna přítomností aminopurinu. Hormonální cytokininy se vyskytují jako volné molekuly (přírodně nejrozšířenějším je *zeatin*), avšak také jako vázané „hypermodifikované“ báze v tRNA, které se aktivují do podoby volné báze při hydrolýze tRNA.

Mechanismus účinku cytokininů je poměrně složitý a spočívá ve změně genové exprese. Cytokininové receptory CRE jsou vázány na plazmatickou membránu, po navázání cytokininu na receptor dojde k dimerizaci a následně ke vzájemné fosforylaci dimerových podjednotek na aminokyselině histidinu. Vzniklý fosfát je poté převeden na aspartát (konjugovaná báze kys. asparagové) a z aspartátu se dále přenesení na histidin proteinu HPT (*histidin fosfotransfer*), který prochází do jádra, kde ovlivní genovou expresi.

Účinky cytokininů na vývoj chloroplastů a syntézu Chl byly již dříve sledovány, avšak pouze ve spojení se světlem. Bylo zjištěno, že etiolované listy ošetřené cytokininy tvoří chloroplasty s extenzivnějšími grana a syntetizují větší množství fotosyntetických barviv a enzymů po osvětlení ^{[7][8]}.



Obr. 5 Tři vybraní zástupci cytokininů, zleva: kinetin, zeatin, benzylaminopurin [E].

8. Metodika

8.1 Rostlinný materiál a podmínky růstu

Semena smrku (*Picea abies*) a modřínu (*Larix decidua*) získaná ze Semenolesu Liptovský Hrádek (Slovensko) byla na 6 h namočená a poté zasetá do dostatečně navlhčeného perlitu. Klíčení probíhalo při různých podmínkách prostředí, pro experimenty na důkaz DPOR a na zjištění koncentrace Pchlidy byly rostliny pěstovány 16 dní v úplné tmě při 25°C. Následně pro experimenty, ve kterých figurovalo světlo, byly rostliny pěstovány 14 dní při intenzitě světla $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR a cirkadiálním rytmu (12h/12h světlo/tma) Veškerá manipulace se semenáčky rostoucími ve tmě a následně se světlo-citlivými extrakty byla prováděna při tlumeném zeleném světle, jehož bezpečnost byla předtím ověřena na etiolovaných listech ječmene.

V každém experimentu figurují čtyři různé vzorky, od obou analyzovaných jehličnanů, a to podle vzrůstající koncentrace benzylaminopurinu (BAP) v roztoku: kontrola, 10^{-7} , 10^{-6} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. BAP byl vybrán z důvodu snadné dostupnosti a také proto, že jeho cytokininová aktivita ještě nebyla sledována u rostlin pěstovaných na světle, či dokonce ve tmě. Jelikož se BAP nerozpouští ve vodě, byl rozpuštěn v čistém roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) a následně zředěn na výslednou koncentraci 0,5 % DMSO. Kontrolní rostliny obdržely pouze roztok o 0,5% koncentraci DMSO.

8.2 Analýza pigmentů

a) Zjišťování koncentrace chlorofylů a karotenoidů

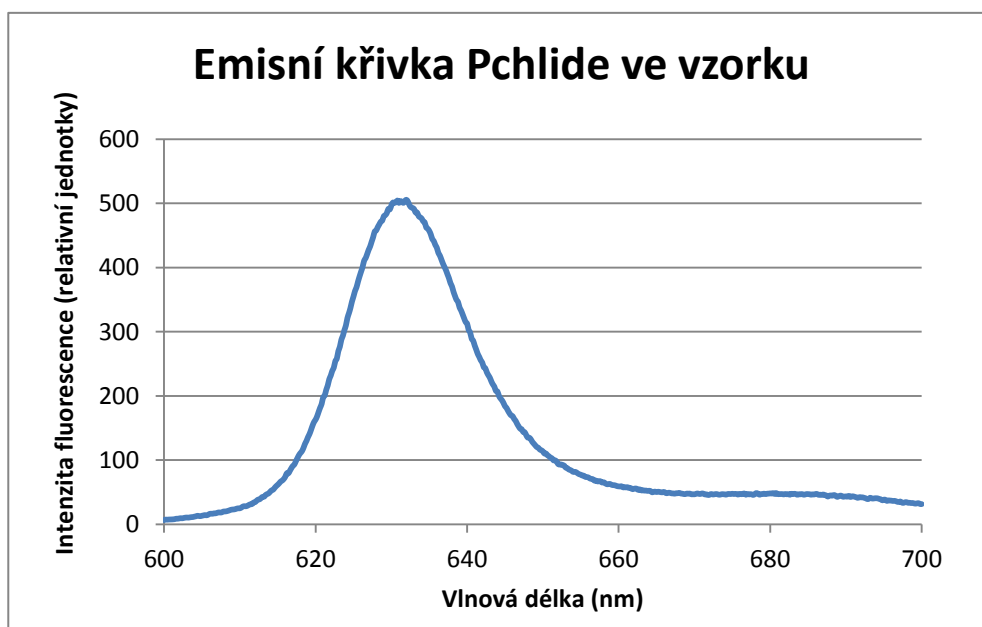
Vzorky (50 mg klíčnicích děloh) byly pomocí tlučku v temné místnosti (s tlumeným zeleným světlem) rozdrčeny ve třecí misce a zhomogenizovány v 80% vychlazeném acetonu s přídavkem písku a $MgCO_3$ k zamezení degradace pigmentů (acidifikace a feofytinizace). Poté byl vzniklý extrakt pigmentů kvantitativně převeden do 15ml Falcon zkumavky, doplněn acetonem na objem 10 ml a 10 minut centrifugován v centrifuze SIGMA 3-30 K Sartorius při rychlosti 10000g a teplotě 4°C. Po centrifugaci (v případě nutnosti byla provedena i druhá centrifugace supernatantu) byl extrakt spektrofotometricky kvantifikován za použití dvoukomorového spektrofotometru UV 500 Visible spectro. Jednotlivé extrakty byly vždy přepipetovány do kyvety a vloženy do detekční části spektrofluorometru. Absorbance jednotlivých pigmentů byly měřeny v následujících vlnových délkách: Chl *a* v 663,2 nm, Chl *b* v 646,8 nm a karotenoidy ve 470 nm (v udaných vlnových délkách se nachází maximální absorpce světla zmíněných pigmentů a absorbance je tedy nejvyšší), následně byla koncentrace pigmentů vypočítána podle Lichtenthalera (1987) a přepočítána na nmol/g čerstvé hmoty.

Pigment (rozpuštěný v 80% acetonu)	Výpočet ($\mu\text{g/g}$ čerstvé hm.)
Chl <i>a</i>	$11.75 A_{663,2} - 2.350 A_{646,8}$
Chl <i>b</i>	$18.61 A_{646,8} - 3.960 A_{663,2}$
Karotenoidy	$(1000 A_{470} - 2.270 \text{ Chl } a - 81.4 \text{ Chl } b)/227$

Tab. 1 Výpočet koncentrace jednotlivých pigmentů na základě absorbance acetonového extraktu.

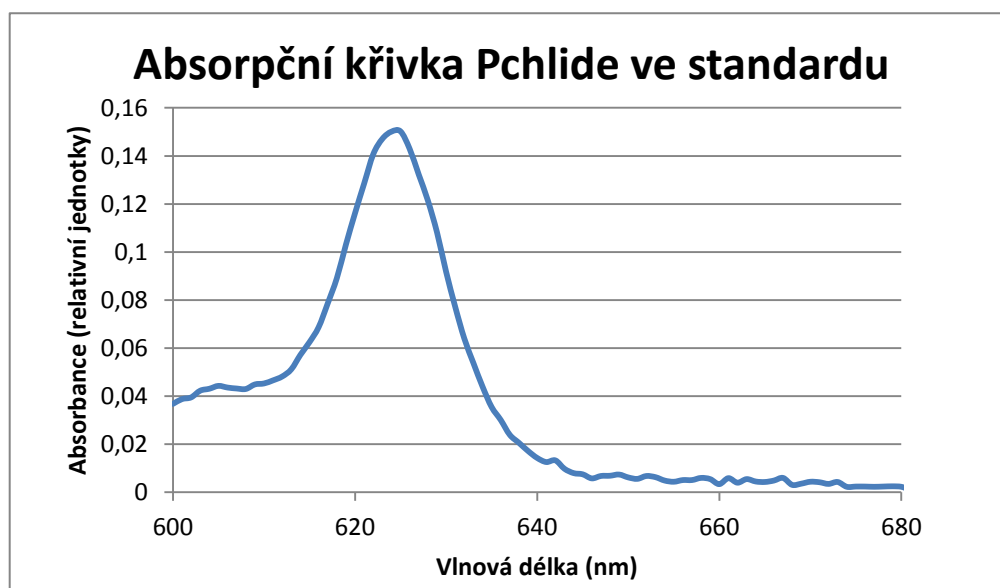
b) Zjišťování koncentrace Pchlíde

Jelikož zjišťování koncentrace Pchlíde je velice citlivý experiment, bylo nutno důkladně denaturovat vzorky a až do homogenizace pracovat ve tmě při co nejvíce tlumeném zeleném světle. Od každého vzorku bylo naváženo opět přibližně 100 mg rostlinného materiálu (klíčnicích děloh), který byl poté 2 minuty denaturován nad vroucí vodní parou. Poté byl materiál převeden do třecí misky, kde byl homogenizován v 3 ml alkalizovaného 90% acetonu (100% aceton s přidávkem 0,1 M NH_4OH v poměru 9:1) s pískem a MgCO_3 . Získaný extrakt byl poté převeden do Falcon zkumavky. Vzhledem k nízkému obsahu Pchlíde ve vzorku a nízké molární absorptivitě vzhledem k Chl bylo nutné provést fázovou separaci pigmentů ze vzorků. Proto byly přidány do všech vzorků 3 ml hexanu, roztok byl důkladně protřepán a po delším stání se v něm oddělily dvě frakce: hexanová (obsahující esterifikované tetrapyrroly – Chls a karotenoidy) a acetonová (obsahující Pchlíde). Hexanová frakce byla odpipetována a celý vzorek byl ještě dvakrát promyt, nejdříve 2 ml a poté 1 ml hexanu. Po třetím promytí byla již acetonová frakce připravena k determinaci obsahu Pchlíde. Prvním krokem k určení obsahu Pchlíde ve vzorku bylo měření fluorescence pomocí spektrofluorometru v excitační vlnové délce 450 nm a emisní 635 nm (šířka excitační štěrby 10 nm, šířka emisní štěrby 5 nm) (**obr. 6**). U všech vzorků byl takto zjištěna intenzita fluorescence v dané vlnové délce.



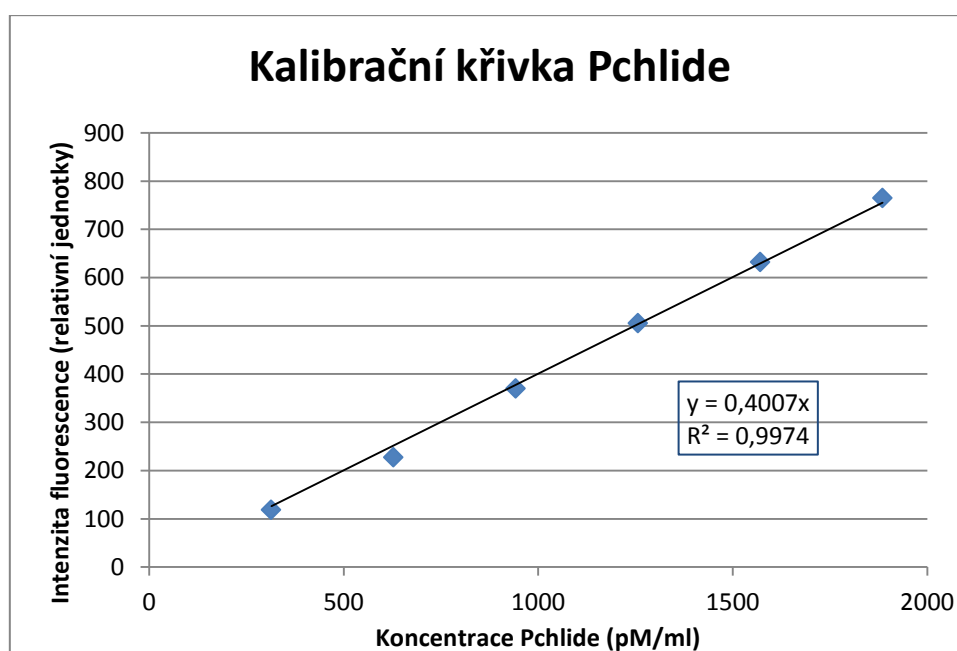
Obr. 6 Emisní křivka Pchlíde, změřená u vybraného vzorku pomocí spektrofluorometru, s maximální fluorescencí (emise) ve vlnové délce 635 nm.

Aby však ve vzorcích mohl být Pchlíde kvantifikován, musel být připraven Pchlíde-standard, pomocí něhož byly poté změřeny hodnoty intenzity fluorescence při známých koncentracích, byla vytvořena kalibrační křivka a nakonec vypočítána koncentrace Pchlíde ve vzorcích. Pchlíde-standard byl připraven z etiolovaných děloh ječmene, rostoucích asi 10 dní ve tmě. Bylo odebráno asi 5 g děloh, které byly následně denaturovány 2 minuty nad vroucí vodní párou. Poté byl materiál zhomogenizován ve třecí misce s přídavkem písku a MgCO_3 v alkalizovaném acetonu (9 dílů 100% acetonu: 1 díl 0,1 N NH_4OH). Získaný extrakt byl převeden do Falcon zkumavky a centrifugován 5 minut v centrifuze SIGMA 3-30 K Sartorius při rychlosti 5000 g. Supernatant byl převeden do nové zkumavky a karotenoidy byly třikrát vymyty přidáním stejného objemu 100% hexanu. V rámci zvýšení stability Pchlíde byl extrakt převeden do etheru. K acetonu bylo přidáno 5 ml diethyl-etheru, 2 ml nasyceného roztoku KH_2PO_4 a 2ml nasyceného roztoku NaCl, směs byla důkladně protřepána a po rozdělení byla etherová fáze odpipetována do nové zkumavky. Zbytky acetonu byly poté ještě z etheru vymyty vodou a etherová fáze byla převedena znovu do čisté, skleněné zkumavky (jelikož ether interaguje s plastem). Poté byla koncentrace Pchlíde v extraktu určena spektrofotometricky, změřením absorbance v 623 nm a za použití vztahu $A = c \cdot l \cdot e$, vycházejícího z Lambert-Beerova zákona, kde A = absorbance, c = molární koncentrace, l = tloušťka vrstvy roztoku (výška kyvety), e = molární extinkční (absorpční) koeficient, který se pro Pchlíde v diethyletheru rovná $3,56 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dawson et. al 1986).



Obr. 7 Absorpční křivka Pchlíde, změřená spektrofotometrem při přípravě standardu, s peakem ve vlnové délce 623 nm.

Posledním krokem k zjištění koncentrace Pchlíde v primárních vzorcích bylo vytvoření kalibrační křivky a následný přepočet. Kalibrační křivka je lineární závislostí intenzity fluorescence na koncentraci Pchlíde. Pro její změření je potřeba si vytvořit cca 5 roztoků standardu o známé koncentraci a změřit intenzitu fluorescence při stejných parametrech jako u primárních vzorků. V našem případě to bylo 25, 50, 75, 100, 125 a 150 μ l Pchlíde-standardu doplněno 90% acetonem s 0,1M NH_4OH na objem 1 ml a u každého z těchto roztoků byla změřena intenzita fluorescence v excitační vlnové délce 450 nm a emisní 635 nm (šířka excitační štěrbin 10nm, šířka emisní štěrbin 5nm). Ze získaných hodnot již byla vytvořena kalibrační křivka (**obr. 8**).



Obr. 8 Kalibrační křivka – závislost intenzity fluorescence měřené spektrofluorometrem na koncentraci Pchlíde ve vzorku.

Nakonec již mohla být pomocí kalibrační křivky zpětně dopočítána koncentrace Pchlíde v primárních vzorcích, u nichž jsme na začátku zjistili intenzitu fluorescence. Koncentrace Pchlíde byla poté přepočítána na nmol/g čerstvé hmoty, tak jako u koncentrace Chls a karotenoidů.

8.3 Analýza proteinů a enzymových subjednotek – Western blotting

Western blot (v literatuře označovaný jako imunoblot) je analytická metoda používaná k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny v biologickém vzorku. Využívá gelovou elektroforézu k separaci proteinů podle jejich molekulové velikosti, následně jsou proteiny přeneseny („přebloťovány“) z gelu na povrch membrány, kde jsou detekovány specifickými protilátkami.

Čerstvé etiolované rostlinné vzorky (50 mg) byly zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při -70°C . Poté byly vzorky zhomogizovány v tekutém dusíku v třecích miskách na jemný prášek. Prášek byl přenesen do 1,5 ml mikrozkuvek, do kterých bylo následně napipetováno 700 μl DTE extrakčního roztoku a zkumavky byly 10 minut protřepávány na třepače Multivortex V-32.

DTE extrakční roztok: 28 mM DTT (dithiotreitol), 28 mM Na_2CO_3 , 175 mM sacharózy, 5% SDS (dodecylsírán sodný), 10 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), 1 tabletky antiproteáz na 50 ml.

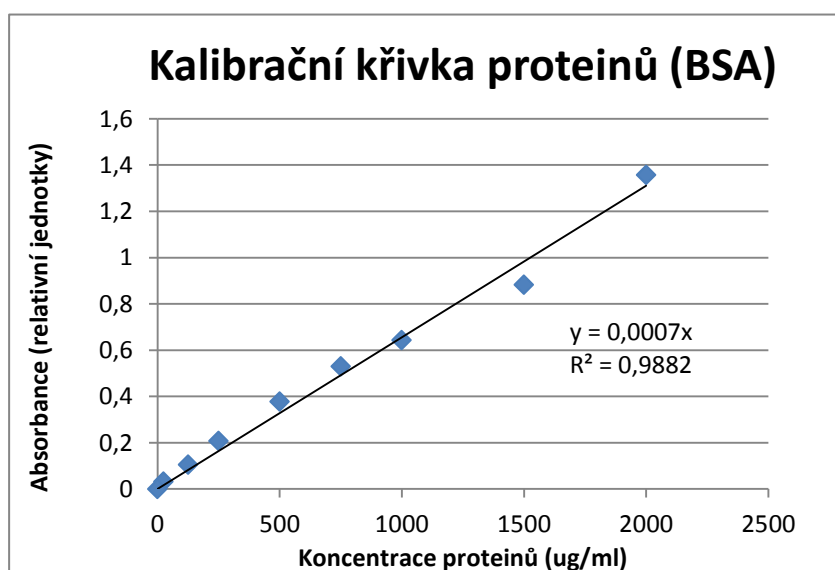
Po protřepání vzorků byly tyto denaturovány 30 minut při 70°C v termoblocích. Po denuraci byly vzorky zcentrifugovány 10 minut v centrifuze SIGMA 3-30 K Sartorius při rychlosti 19150g. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován do nových mikrozkuvek, ze kterých byly vytvořeny 50 μl alikvóty, které byly zamrazeny.

Následně bylo potřeba stanovit koncentraci proteinů, což bylo provedeno s pomocí BCA kitu. Od každého vzorku bylo odpipetováno 50 μl do 500 μl 10% TCA (kyselina trichloroctová, která sráží proteiny) a zcentrifugováno 10 min při rychlosti 15000g. Supernatan byl vylit a pelet vysušen (v otevřených mikrozkuvkách, v termobloku na 40°C). Po vysušení byl supernatant rozpuštěn ve 50 μl 0,1 M NaOH. Zároveň bylo odebráno 50 μl z 9 kalibrovaných vzorků, které obsahují přesně známé koncentrace proteinů (tab. 2). V případě mé práce je stanovení koncentrace proteinů založeno na BCA (bicinchoninic acid) testu. Zásobní roztok BCA obsahuje bicinchoninovou kyselinu, uhličitan a hydrogenuhličitan sodný a vinan sodný, reakční roztok pentahydrát síranu sodného. Vyvíjecí roztok vzniká po smísení zásobního a reakčního v poměru 50:1. Do všech vzorků a kalibračky byl napipetován 1 ml vyvíjecího roztoku a zkumavky byly inkubovány 30 minut při 37°C .

Zkumavka	0,1M NaOH	BSA (2000 µg/ml)	výsledná konc.BSA
A	0 µl	300 µl	2000µg/ml
B	125 µl	375 µl	1500 µg/ml
C	325 µl	325 µl	1000 µg/ml
D	175 µl	175 µl ze zkumavky B	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl ze zkumavky C	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl ze zkumavky E	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl ze zkumavky F	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl ze zkumavky G	25 µg/ml
I	400 µl	0 µl	0 µg/ml

Tab. 2 BCA kit – návod na vytvoření kalibračních roztoků používaných k vytvoření kalibrační křivky na základě kolorimetrické absorbance měřené spektrofotometrem, za účelem zjištění koncentrace proteinů ve vlastních vzorcích.

Po inkubaci proteinů byla jejich koncentrace stanovena kolorimetricky, měřením absorbance v 562 nm spektrofluorometrem UV 500 Visible spectro. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda, absorbance byla měřena od zkumavky I – A, až poté vzorky. Hodnota I byla odečtena od všech výsledků. Následně byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci proteinu (BSA) (tab. 2) Pomocí křivky byly zpětně dopočítány koncentrace proteinů ve vzorcích a byly určeny objemy vzorků pro nanášení do jamek při elektroforéze, tak aby hmotnost obsažených proteinů byla u všech vzorků stejná.



Obr. 9 Kalibrační křivka proteinů – závislost absorbance na koncentraci proteinů ve vzorku.

Dalším krokem byla už dříve zmiňovaná elektroforéza, konkrétně SDS-PAGE elektroforéza (polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného), na kterou bylo nejprve potřeba si připravit polyakrylamidové gely.

15% separační gel (objemy na namíchání 2 gelů): 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethan protonovaný HCl) pufru (pH = 8,8), 3,5 ml destilované H₂O, 4 ml 30% akrylamidu/ bis-akrylamidu, 100 µl 10% SDS (dodecylsírán sodný), 100 µl 10% persíranu amonného, 10 µl TEMEDu (tetramethylethylendiamid)

5% startovací gel (objemy na namíchání 2 gelů): 1,25ml 0,5M Tris-HCl pufru, 3,05 ml destilované H₂O, 650µl 30% akrylamidu/ bis-akrylamidu, 50 µl 10% SDS, 50µl 10% persíranu amonného, 6 µl TEMEDu

Pravidlem při přípravě gelů je, že používáme rukavice a gel neprotřepáváme, pouze párkrát přepipetujeme. Persíran amonný vždy připravujeme čerstvý a rovněž s ním netřepeme. Nejdříve byla připravena skla na PAGE-elektroforézu, a to přiložením silného skla s vybroušeným prostorem na tenké ploché sklo tak, že po přiložení mezi skly vznikne asi 1 mm mezera. Takto přiložená skla byla upevněna do držáku a do prostoru mezi nimi byl napipetován 15% separační gel, asi 0,5 cm pod vyznačený zelený okraj. Gel byl převrstven isopropanolem a byl nechán ztuhnout (v rámci jedné hodiny). Po ztuhnutí byl isopropanol vylit a jeho zbytek odsát filtračním papírem. Byl připraven startovací gel, který byl dolit až po okraj skel. Následně byl mezi skla do startovacího gelu vsunut tzv. hřeben a znovu byl gel nechán ztuhnout. Skla se ztuhlými gely byla vyjmuta z držáku a připevněna na boky elektroforetické aparatury. Bloky byly poté vsunuty do drážek hlavní nádoby elektroforetické aparatury

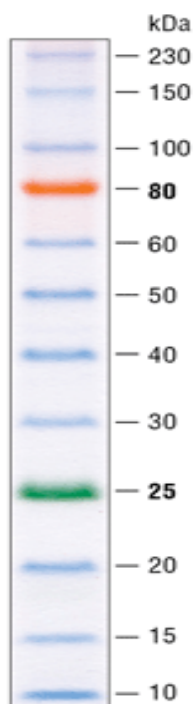
Mezitím byly připraveny elektrolyty pro elektroforézu, tzv. *Upper buffer* (vnitřní tlumivý roztok) a *Lower buffer* (vnější tlumivý roztok).

Upper buffer: 6,05 g Tris báze (čistý tris(hydroxymethyl)aminomethan rozpuštěný ve 100 ml destilované H₂O, s pH upraveným na 6,8; 0,4 g SDS

Lower buffer: 36,4 g Tris báze ve 100 ml destilované H₂O, s pH upraveným na 8,8; 0,8 g SDS

Těsnost skel a správné upevnění v bloku bylo ověřeno nalitím vnitřního tlumivého roztoku dovnitř bloku, asi do poloviny. Jelikož roztok nikde neprotékal, bylo možno vytáhnout hřeben z prostoru mezi skly a dolit tlumivý roztok po okraj.

V této fázi bylo již vše připraveno k nanášení vzorků do jamek vzniklých po vytažení hřebene. Předem rozmrazené alikvóty jednotlivých vzorků, které byly v průběhu přípravy skel a gelů 10 minut inkubovány v termoblocích na 70°C, byly smíseny s bromfenolovou modří (s přidavkem glycerolu) v poměru 5dílů vzorku: 1díl barvy a důkladně protřepány. Poté byly již přesné objemy jednotlivých vzorků (zjištěné díky kalibraci) nanášeny do jamek, do první jamky byl vždy nanesen tzv. žebřík, což je marker molekulové hmotnosti určený pro gelovou elektroforézu. Jedná se o směs proteinových standardů, která se při elektroforéze separuje stejně jako proteiny ve vzorku a tak pomáhá určit molekulární hmotnost (velikost) analyzovaných proteinů (obr. 10). Po nanesení vzorku a žebříku byl do hlavní nádoby dolit vnější tlumivý roztok až po rysku, nádoba byla uzavřena víkem s elektrickými kontakty a připojena ke zdroji (200V). Poté byla elektroforéza spuštěna (asi na 1,5 hodiny) a zastavena byla ve stavu, kdy barva dosahovala asi 0,5 cm od dna.



Obr. 10 Rozseparovaný žebřík po proběhlé elektroforéze. Směs markerů vytvoří charakteristický „žebřík“, díky kterému je poté možno určit molekulovou hmotnost specifického proteinu [F].

Principem PAGE-elektroforézy je rozdílná schopnost pohybu malých a velkých molekul proteinů skrz prostory polyakrylamidového gelu v elektrickém poli. Malé proteiny (s nízkou molekul. hmotností) se snáze pohybují, proto se v gelu dostávají dále od jamek, tedy níže. Velké proteiny (s vysokou molekul. hmotností) musí překonávat velký odpor, proto zůstávají v horní části. Bromfenolová modř s glycerolem je do vzorků přidávána proto, že gelem protéká poměrně snadno jako předvoj samotného vzorku a proto může indikovat průběh elektroforézy a také stav, kdy je už třeba elektroforézu ukončit. PAGE-elektroforéza nám umožňuje separovat jednotlivé proteiny ze vzorku na základě jejich velikosti a poté je specificky analyzovat.

Po ukončení elektroforézy byly tlumivé roztoky vylity a skla obsahující gel byla opatrně z bloků vyjmuta. Skla byla opatrně oddělena a z gelů byly opatrně ořezány horní jamkové části. Dalším krokem k imunodetekci proteinů je přenesení („přeblotování“) elektroforeticky separovaných proteinů na membránu, v našem případě na nitrocelulózovou. K přenesení proteinů na membránu potřebujeme blotter (blotovací zařízení), blotovací roztok a transferový roztok.

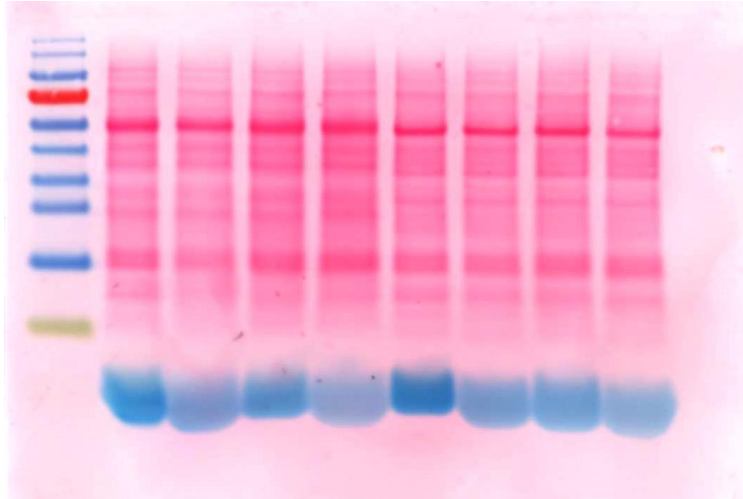
Blotovací roztok (10x konc.): 15,1 g Tris-báze, 72 g glycinu a 0,01g SDS doplnit do 1000 ml destilované H₂O

Transferový roztok (1x): 700 ml destilované H₂O, 100 ml 10x blotovacího roztoku, 200 ml methanolu

Na blotovací zařízení byly umístěny v blotovacím roztoku navlhčené podušky (savé blotovací papíry) a nitrocelulózové membrány. Na každou nitrocelulózovou membránu byl opatrně přenesen gel s elektroforeticky separovanými proteiny. Gel byl přikryt další poduškou, která byla pokapána transferovým roztokem a vyválena skleněným válečkem, aby byly odstraněny vzduchové bubliny. Podušky byly ještě jednou pokapány transferovým roztokem, překryty druhou částí blotovacího zařízení a bloter byl poté uzavřen krytem a připojen ke zdroji. Blotování probíhalo 1 hodinu při 200 mA (1membrána = 50 mA).

K přenosu proteinů dochází působením elektrického proudu, jelikož bloter je realizován jako soustava anody (spodní díl) a katody (horní díl) a záporně nabitě proteiny obalené SDS jsou unášeny směrem dolů, tedy z gelu na membránu.

Po ukončení blotování byly membrány obarveny v roztoku Ponceau S (0,1 g Ponceau S a 100 ml 5% kyseliny octové), čímž byla ověřena správnost přenosu proteinů na membránu (proteiny se obarví).



Obr. 11 Nitrocelulózová membrána s nanesenými proteiny po blotování, obarvená Ponceau S. Dva výrazné pruhy reprezentují velkou (51-58 kDa) a malou (12-15 kDa) podjednotku RuBisCo.

Membrány byly poté odbarveny v 1x TBST (Tris-pufrovaný roztok soli s Tweenem 20) dvakrát po pěti minutách, aby byla důkladně vymyta barva a poté byly membrány inkubovány přes noc v blokovacím roztoku.

TBS (Tris-pufrovaný roztok soli, 10x konc., pH= 7,4): 7,5 g Tris-báze a 44g NaCl doplnit do 500 ml destilovanou H₂O, pH upravit konc. HCl.

1x TBS = 100 ml 10x TBS + 900 ml destilované H₂O

TBST (Tris – pufrovaný roztok soli + Tween 20): 100 ml 10xTBS a 1 ml Tween 20 (detergent) dolít do 1000 ml destilovanou H₂O

Blokovací roztok: 100 ml TBST, 5 g sušeného odtučněného mléka nebo BSA (hovězí sérový albumin)

Membrána je inkubována v blokovacím roztoku, protože je třeba její povrch tzv. zablokovat. V normálním stavu se na její povrch váží jak antigeny, tak i protilátky, tedy jakékoliv proteiny. Proteiny mléčného kaseinu se při inkubaci naváží na místa, kam se dosud nenavázaly proteiny při přenosu a po přidání protilátky jsou již molekuly imunoglobulinů nuceny vázat se na svůj specifický epitop na přebloetovaných antigenech (proteinech ze vzorku). Blokování výrazně snižuje šum a eliminuje falešné výsledky.

Po inkubaci v blokovacím roztoku přes noc byly membrány vymývány asi 10 minut v 1x TBS. Membrány byly poté inkubovány ve specifických primárních protilátkách (o adekvátním ředění) asi hodinu na třepačce.

Byly použity následující primární protilátky:

anti D1 - protilátka proti proteinu D1, který se nachází v reakčním centru fotosystému II, kde se na něj vážou chlorofyly. Ředění: 1:30000.

anti Lhcb 2, 4, 5 – protilátky proti světlo-sběrným komplexům (Light-harvesting complex) fotosystému II, které vážou chlorofyly a karotenoidy. Ředění: 1:3000.

anti LPOR – protilátka proti jednotlivým proteinovým subjednotkám světelně závislé protochlorofylid oxidoreduktázy. Ředění: 1:2000.

anti GluTR – protilátka proti enzymu GluTR (glutamyl-tRNA reduktáza), který se účastní syntézy ALA na začátku biosyntetické dráhy chlorofylů. Ředění: 1:50.

anti ChlB – protilátka proti proteinové subjednotce ChlB, součásti DPOR – na světle nezávislé protochlorofylid oxidoreduktázy. Ředění: 1:250.

Primární i sekundární protilátky se ředí v TBS s 5% odtučněným mlékem, primární protilátky jsou uchovávány v mrazáku a mohou se používat opakovaně. Sekundární protilátka je vždy vytvořena čerstvá a je jen na jedno použití.

Primární protilátky se v průběhu inkubace membrány specificky navážou na své epitopy, které se nacházejí na proteinech, ke kterým jsou protilátky určeny.

Po inkubaci byly membrány vymývány hodinu na třepačce (aby se vymyly nenavázané protilátky), s tím že vymývací roztok byl každých 10 min vyměněn. Promývání probíhalo 5x v TBST a nakonec jednou v 1x v TBS. Po vymytí primární protilátky byly membrány inkubovány v sekundární protilátce. Sekundární protilátka je komerčně dodávaná a určená proti široké škále primárních protilátek. Sekundární protilátky se vážou na primární protilátky a jsou konjugovány s určitým reportérovým enzymem, v našem případě se jedná o křenovou peroxidázu (HRP, z angl. *horseradish peroxidase*), ředěnou 1:10000.

Inkubace sekundární protilátky probíhá taktéž jednu hodinu na třepačce a následně je membrána od sekundární protilátky vymývána hodinu 5x v TBST a naposledy jednou v 1x TBS. Poté již byly membrány připraveny k detekci (vyvolání výsledků).

Vyvolání vzorků proběhlo ve fotokomoře, v případě mé práce pomocí Immobilon-chemiluminiscenčního substrátu. Vymytá membrána byla položena na podložní desku a přelita 1 ml Immobilon substrátu (míchá se před detekcí každé membrány, 500 µl roztoku peroxidu vodíku a 500 µl roztoku luminolu). Poté se nechal substrát působit a deska byla vložena do čtecího zařízení. Reportérový enzym (peroxidáza) přeměňuje substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením kvanta světla. Množství světla je poté přímo úměrné množství peroxidázy, které je přímo úměrné množství detekovaného proteinu. Uvolňované světlo bylo detekováno CCD-kamerami ve foto-scanneru Li-COR C-DiGit.

II. Výsledky

1. Analýza pigmentů

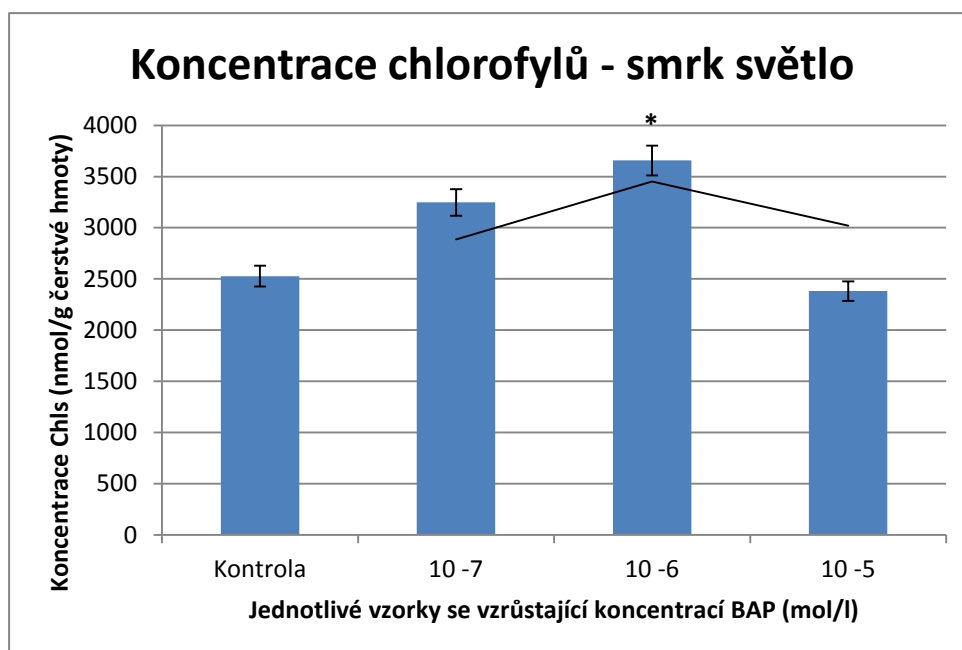
Jelikož bylo nashromážděno velké množství dat, měření bylo cílené a byly zajištěny konstantní podmínky, jsou výsledky této práce směřodonné a mohou být základem pro další zkoumání tohoto typu.

Pro lepší přehlednost a porozumění jsou získané výsledky zpracovány ve formě grafů, které jsou segmentovány podle typu experimentu.

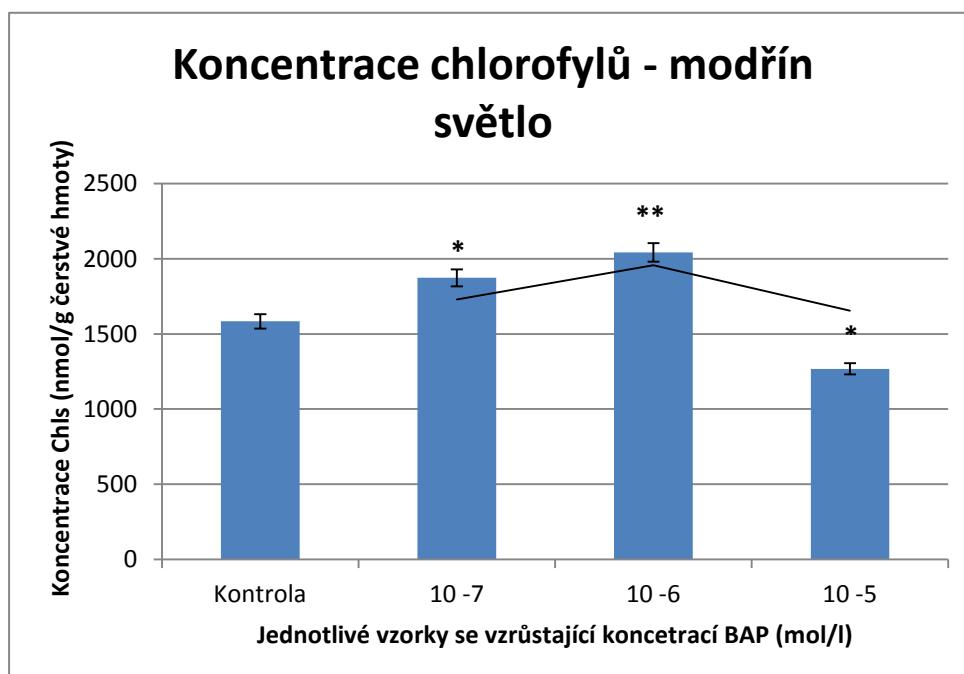
Ve všech grafech v této sekci je zobrazena závislost koncentrace určité skupiny pigmentů (Chls, karotenoidy, Pchlid) na koncentraci cytokininu BAP v roztoku (značená v $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), v němž byly jehličnany kultivovány. V každém grafu figurují čtyři koncentrace BAP a to: Kontrola (0), 10^{-7} , 10^{-6} a 10^{-5} $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro lepší přehlednost a možnost porovnávání byly všechny koncentrace pigmentů přepočítány na nmol/g (čerstvé hmotnosti rostlinného vzorku).

V grafech jsou použity chybové úsečky se standardní chybou měření a pohyblivá spojnice trendu. U dat pro všechny grafy byl proveden statistický test, a to dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů, ve kterém byly vždy srovnány jednotlivé koncentrace BAP s kontrolou. Statistický test určuje signifikanci rozdílů mezi kontrolou a vzorky, sloupce označené (*) jsou od kontroly signifikantně rozdílné na hladině 0,05 (významná rozdílnost), sloupce označené (**) poté na hladině 0,01 (vysoce významná rozdílnost).

1.1 Koncentrace chlorofylů u jehličnanů rostoucích na světle



Obr. 12 Graf závislosti koncentrace Chls na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích smrku rostoucích na světle.



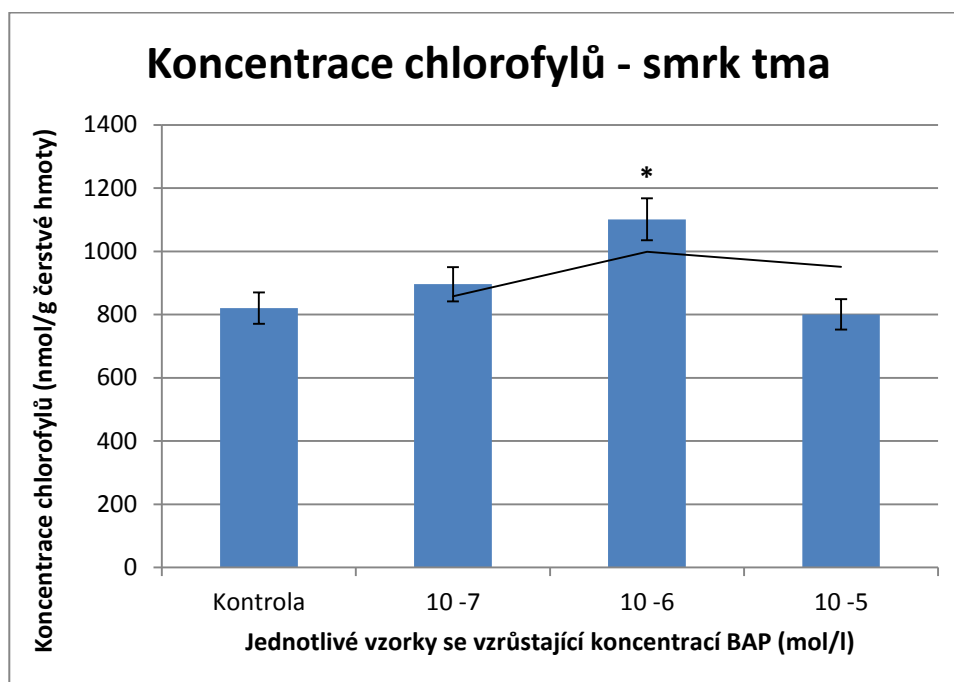
Obr. 13 Graf závislosti koncentrace Chls na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích modřínu rostoucích na světle.

U obou jehličnanů mají grafy závislosti koncentrace chlorofylů na koncentraci BAP stejný průběh a trend. U koncentrace $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dochází k nárůstu koncentrace Chls, u modřínu signifikantně. Koncentrace 10^{-6} vykazuje nejvyšší akumulaci Chls ze všech vzorků, tedy tato koncentrace má největší pozitivní účinek na nárůst koncentrace Chls u zkoumaných rostlin a také vykazuje významnou (smrk) a vysoce významnou (modřín) rozdílnost ve srovnání s kontrolou. Koncentrace 10^{-5} však už vykazuje pokles koncentrace Chls i vzhledem ke kontrole, tento pokles je způsoben podstatnou inhibicí růstu (viz. obr). Důležitým parametrem výše uvedených grafů je také samotná koncentrace Chls, která je u smrku podstatně vyšší (2400-3600 nmol/g) než u modřínu (1300-2000 nmol/g).

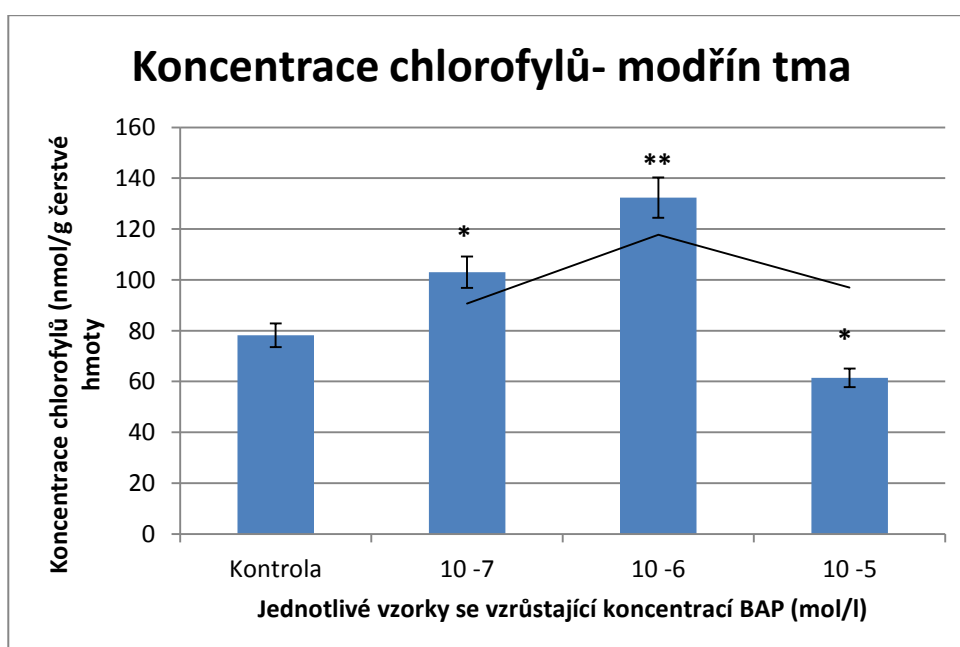


Obr. 14 Vizuální srovnání semenáčků smrku (nahore) a modřínu (dole) rostoucích na světle při jednotlivých koncentracích BAP. V pravém dolním rohu je měřítko 1 cm.

1.2 Koncentrace chlorofylů u jehličnanů rostoucích ve tmě



Obr. 15 Graf závislosti koncentrace Chls na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích smrku rostoucích ve tmě.



Obr. 16 Graf závislosti koncentrace Chls na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích modřínu rostoucích ve tmě.

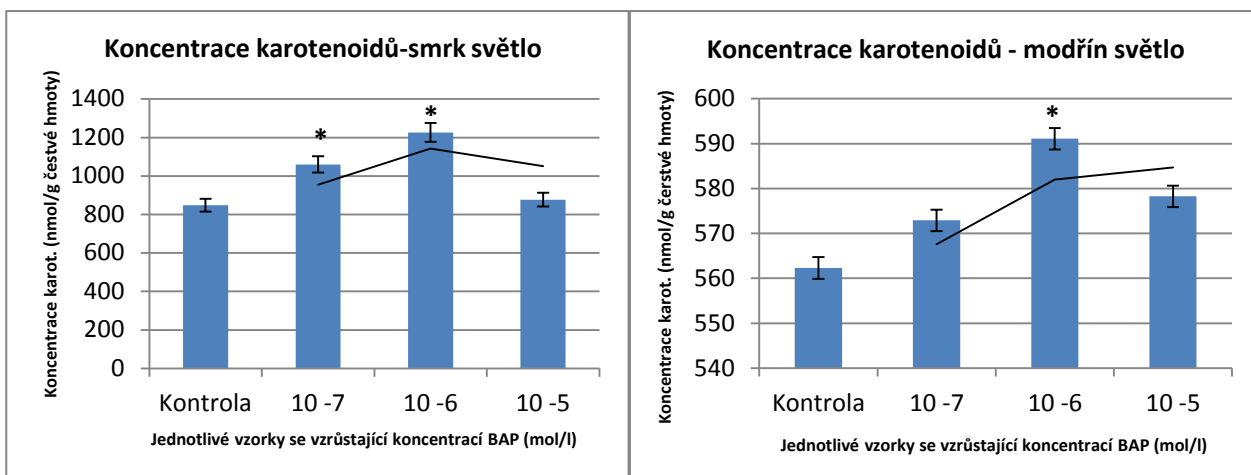
Grafy závislosti koncentrace Chls na koncentraci BAP u jehličnanů rostoucích v tmě mají stejný průběh a trend jako grafy u jehličnanů rostoucích na světle, uvedené výše. Taktéž dochází u obou druhů při koncentraci 10^{-7} k nárůstu, nejvyšší koncentrace Chls dosahují vzorky při koncentraci BAP 10^{-6} a u koncentrace 10^{-5} dochází taktéž k poklesu. Ovšem samotná koncentrace Chl se u smrku a modřínu v případě růstu ve tmě razantně liší, zatímco u smrku je to 800-1100 nmol/g, u modřínu pouze 60-130 nmol/g.

Pokud srovnáme koncentraci Chls u vzorků rostoucích na světle a ve tmě (procentuálním podílem), pak u smrku je v průměru 68,2 % pokles v koncentraci Chls, u modřínu v průměru 94,4 % pokles, což dokazuje také obr. 17.

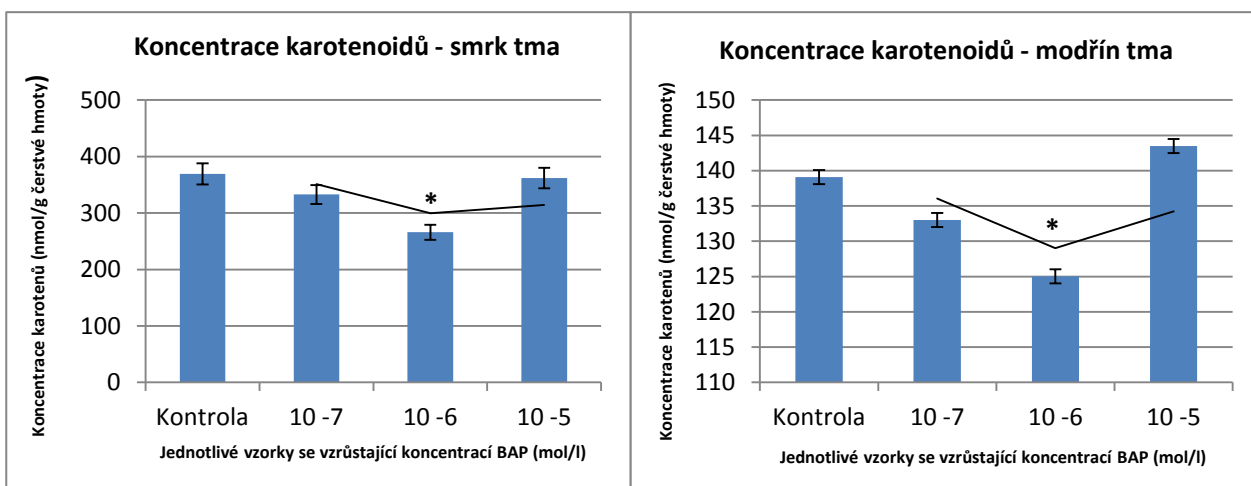


Obr. 17 Vizuální srovnání semenáčků smrku (nahore) a modřínu (dole) rostoucích ve tmě při jednotlivých koncentracích BAP. V pravém dolním rohu je měřítko 1 cm.

1.3 Koncentrace karotenoidů u jehličnanů rostoucích na světle a ve tmě



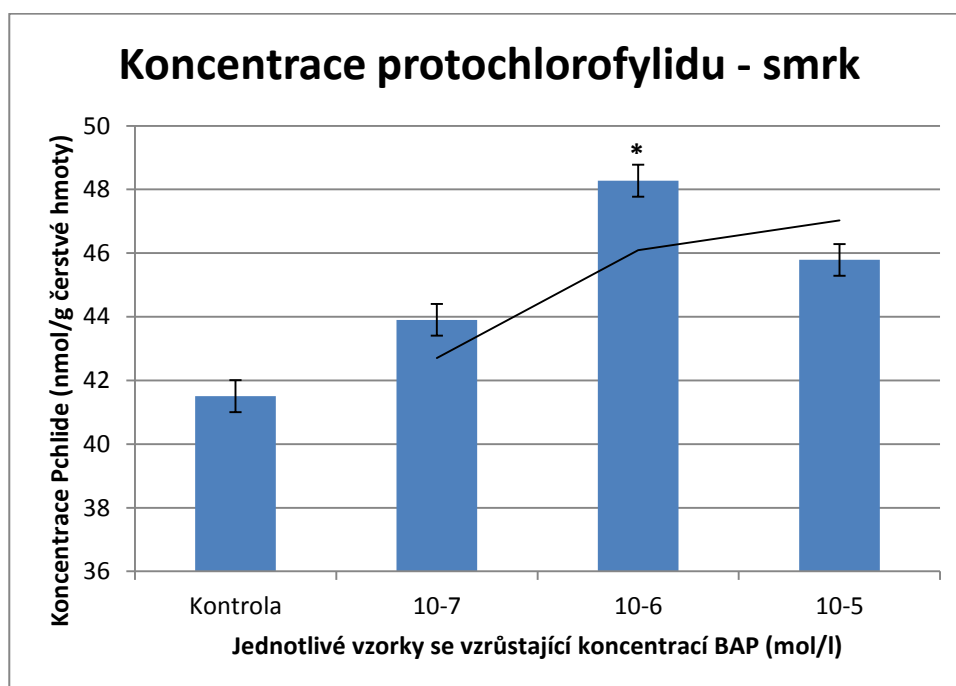
Obr. 18 Grafy závislosti koncentrace karotenoidů na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích smrku (vpravo) a modřínu (vlevo) rostoucích na světle.



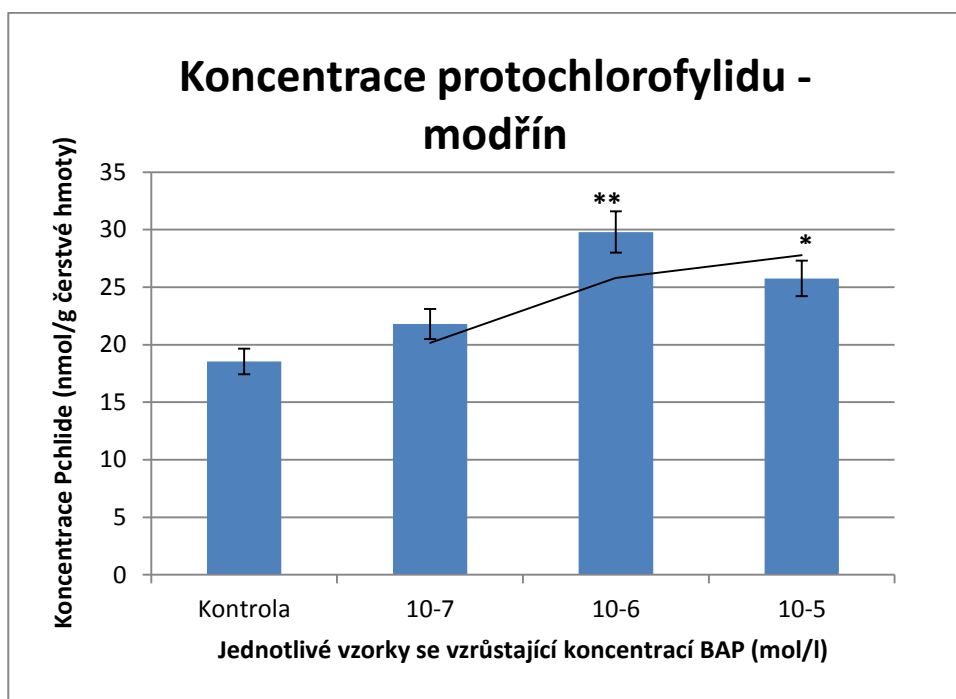
Obr. 19 Grafy závislosti koncentrace karotenoidů na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích smrku (vpravo) a modřínu (vlevo) rostoucích ve tmě.

Grafy závislosti koncentrace karotenoidů na koncentraci BAP u jehličnanů rostoucích na světle mají stejný trend a průběh jako výše uvedené grafy u koncentrací Chls na světle i ve tmě. Avšak rozdíl vidíme v grafech závislosti koncentrace karotenoidů na koncentraci BAP u jehličnanů rostoucích ve tmě, kde je trend přesně opačný. Jak u modřínu, tak i u smrku je koncentrace karotenoidů ve tmě poměrně vyrovnaná ale směrem od kontroly ke koncentraci 10⁻⁷ dochází k poklesu, minimum akumulovaných karotenoidů odpovídá koncentraci 10⁻⁶ a u koncentrace 10⁻⁵ dochází opět k nárůstu. Jehličnany rostoucí ve tmě akumulovaly menší množství karotenoidů ve srovnání se vzorky rostoucími na světle, procentuální pokles ze světla na tmu byl u smrku 78,5 % a u modřínu 77,2 %. Obecně je však koncentrace karotenoidů vyrovnanější, než koncentrace Chls.

1.4 Koncentrace Pchlíde u jehličnanů rostoucích ve tmě



Obr. 20 Graf závislosti koncentrace Pchlíde na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích smrku rostoucích ve tmě.



Obr. 21 Graf závislosti koncentrace Pchlíde na vzrůstající koncentraci BAP ve vzorcích modřínu rostoucích ve tmě.

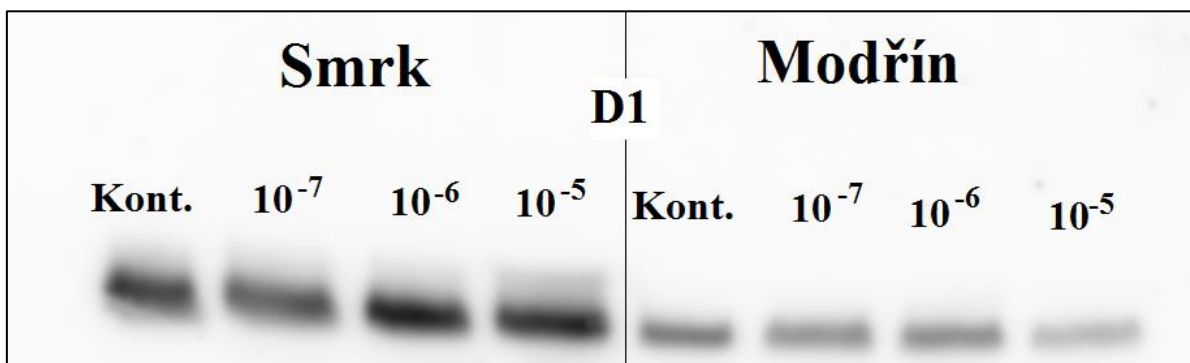
Grafy závislosti koncentrace Pchlíde na koncentraci BAP u vzorků jehličnanů rostoucích ve tmě mají podobný průběh a trend jako většina výše uvedených grafů, s již charakteristickým nárůstem při koncentraci 10^{-7} a dosažením maxima kumulovaného pigmentu při koncentraci 10^{-6} . U Pchlíde dochází poté u koncentrace 10^{-5} k mírnému poklesu, avšak pokles není tak rapidní jako u Chls a karotenoidů a koncentrace Pchlíde u 10^{-5} podstatně převyšuje kontrolu. Jelikož je Pchlíde pouze prekurzorem Chls, jeho koncentrace je vzhledem ke koncentraci chlorofylů velmi malá. Rozdíly v koncentraci Pchlíde mezi smrkem a modřínem nejsou tak markantní jako u koncentrace Chls na světle i ve tmě.



Obr. 22 Vzhled etiolovaných dělůh ječmene použitých k vytvoření Pchlíde-standardu.

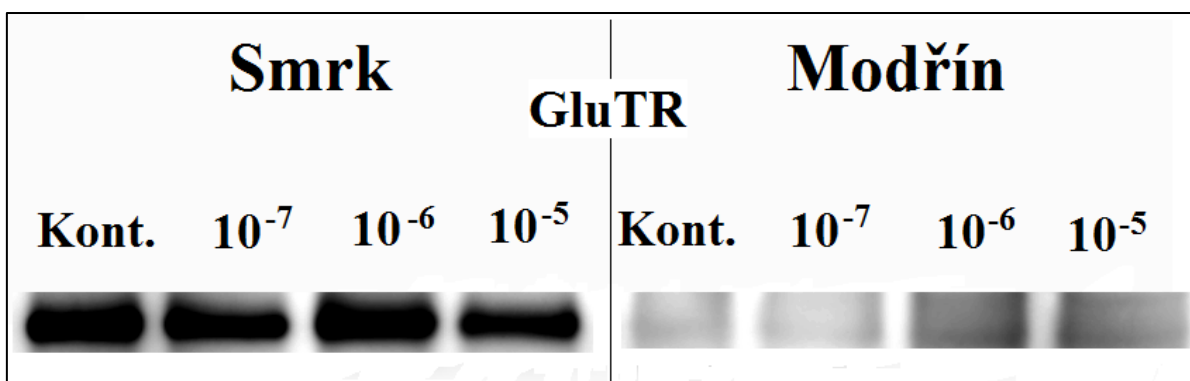
2. Analýza proteinů a enzymových subjednotek – Western blotting

Všechny obrázky v této sekci jsou snímky vytvořené pomocí chemiluminiscenčního fotoscanneru. Primárním cílem této sekce výsledků je potvrdit či vyvrátit přítomnost určitého proteinu či enzymu. Jelikož byla nanášena stejná množství proteinů ze vzorků je tato metoda i semikvantitativní, avšak výsledky je nutné brát s rezervou, jelikož u Western blottingu se asi odchylka do 15 % v intenzitě chemiluminiscence nebere za směrodatnou.



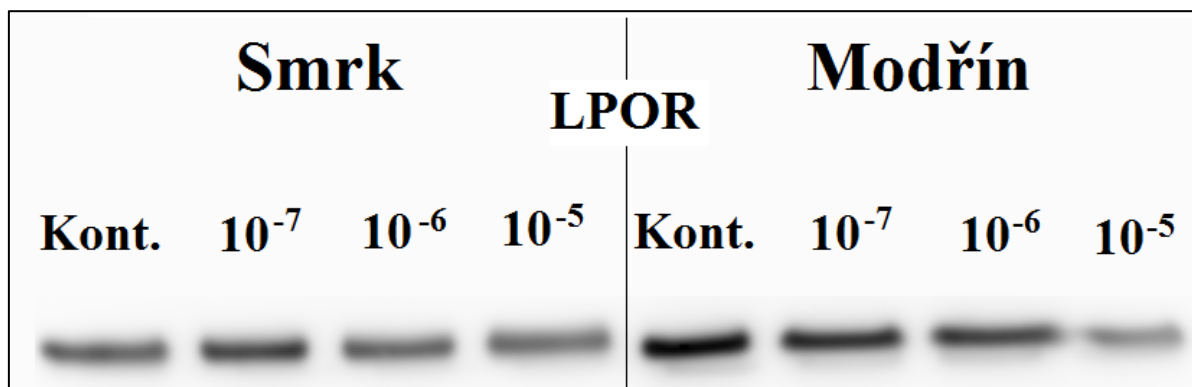
Obr. 23 Chemiluminiscenční snímek membrány po Western blottingu a vyvolání pro protein D1 u smrku a modřínu pěstovaných ve tmě se vzrůstající koncentrací BAP.

Při imunologické analýze proteinu D1 nacházejícího se ve fotosystému II byla potvrzena jeho přítomnost jak u smrku, tak i u modřínu (obr. 23), přibližná molekulová hmotnost tohoto proteinu byla 30 kDa. U smrku se nacházelo v průměru asi trojnásobně větší množství tohoto proteinu, než u modřínu. V rámci smrku je množství proteinu D1 i při změnách koncentrace BAP vyrovnané, v rámci modřínu je toto množství také vyrovnané, až na koncentraci 10^{-5} , kde došlo k výraznějšímu poklesu.



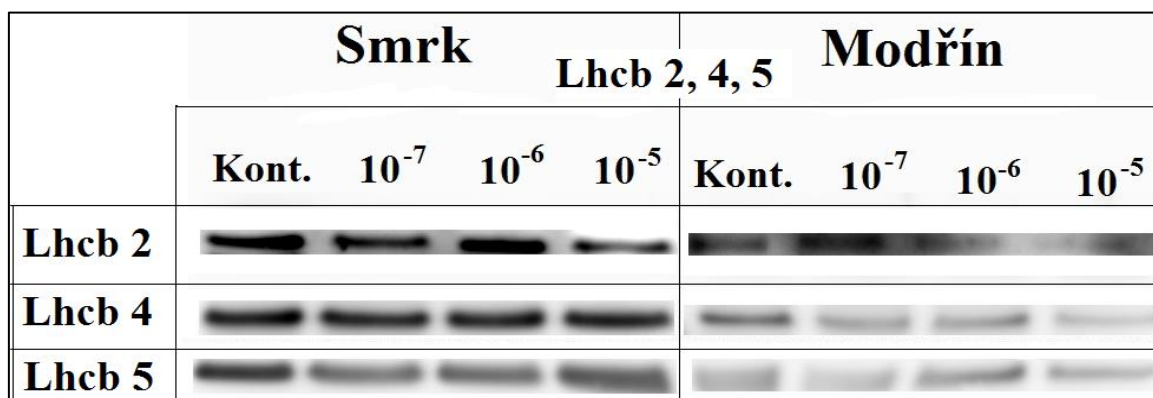
Obr. 24 Chemiluminiscenční snímek membrány po Western blottingu a vyvolání pro enzym GluTR u smrku a modřínu pěstovaných ve tmě se vzrůstající koncentrací BAP.

Při imunologické analýze enzymu GluTR, regulujícího klíčovou reakci vedoucí ke tvorbě ALA, byla jeho přítomnost ve velkém množství potvrzena u smrku, avšak u modřínu se nacházel v téměř nedetekovatelném množství, což ukazuje, že u modřínu nedochází ve tmě k expresi genů pro tvorbu tohoto enzymu podobně jako u etiolovaných krytosemenných rostlin (obr. 24). Přibližná molekulová hmotnost tohoto enzymu byla 58 kDa. Odchytky mezi množství enzymu GluTR při různých koncentracích jsou u smrku zanedbatelné, pouze u koncentrace 10^{-5} došlo k výraznějšímu poklesu.



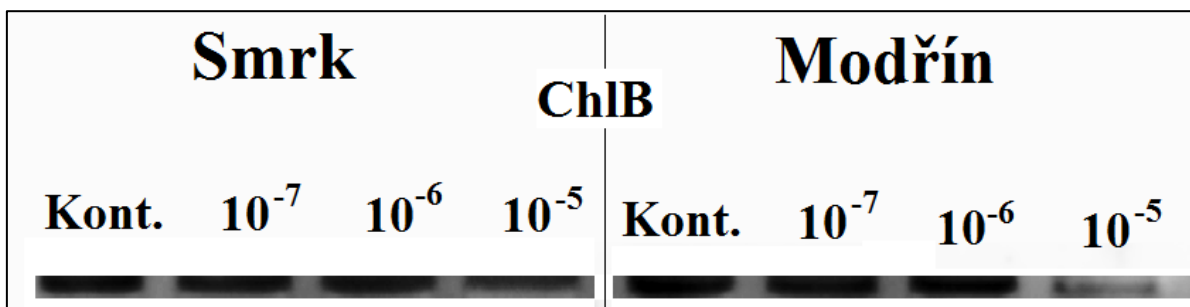
Obr. 25 Chemiluminiscenční snímek membrány po Western blottingu a vyvolání pro enzym (L)POR u smrku a modřínu pěstovaných ve tmě se vzrůstající koncentrací BAP.

Při imunologické analýze enzymu (L)POR, který katalyzuje světelně závislou redukci Pchlidy, byla jeho přítomnost potvrzena jak u smrku, tak i u modřínu. Přibližná molekulová hmotnost tohoto enzymu byla 36 kDa. V případě tohoto enzymu bylo množství u obou zkoumaných jehličnanů srovnatelné, u smrku byly odchytky v množství enzymu při různých koncentracích zanedbatelné, u modřínu také, opět až na výraznější pokles u koncentrace 10^{-5} .



Obr. 26 Chemiluminiscenční snímek membrány po Western blottingu a vyvolání pro světlosběrné proteinové komplexy Lhcb 2, 4, 5 u smrku a modřínu pěstovaných ve tmě se vzrůstající koncentrací BAP.

Při imunologické analýze světlosběrných proteinových komplexů Lhcb 2, 4, 5 byla jejich přítomnost potvrzena jak u smrku, tak i u modřínu (Obr. 26). U smrku se však tyto komplexy vyskytovaly v průměru asi ve třikrát větším množství, než tomu bylo u modřínu. Molekulová hmotnost těchto komplexů byla v průměru 25 kDa. Množství těchto proteinových komplexů v rámci jednotlivých jehličnanů jsou vyrovnaná i při různých koncentracích BAP, pouze tak jako u ostatních dochází k mírnému poklesu u koncentrace 10^{-5} u modřínu.



Obr. 27 Chemiluminiscenční snímek membrány po Western blottingu a vyvolání pro proteinovou subjednotku ChlB (součást DPOR) u smrku a modřínu pěstovaných ve tmě se vzrůstající koncentrací BAP.

Při imunologické analýze polypeptidu ChlB, tvořícího část DPOR, byla jeho přítomnost potvrzena u smrku i u modřínu, ve srovnatelném množství. Molekulová hmotnost tohoto polypeptidu byla přibližně 57 kDa. Odchytky v množství polypeptidu byly v rámci jednotlivých jehličnanů zanedbatelné, opět pouze u koncentrace 10^{-5} byl výraznější pokles.

Závěr a diskuze

V této práci byl sledován vliv koncentrace benzylaminopurinu, cytokininového derivátu, na biosyntézu chlorofylu u smrku ztepilého (*Picea abies*) a modřínu opadavého (*Larix decidua*). Podobnou problematikou, a to regulací biosyntézy u jehličnanů se zabývali Demko et al. (2009) ^[2]. Vlivem kinetinu (jeden z cytokininů) na brzké fáze syntézy tetrapyrrolů v krytosemenných rostlinách se zabývali např. Yaronskaya et al. (2006) ^[9]. Vliv cytokininů na biosyntézu chlorofylu ve tmě prakticky nebyl znám, až na omezené údaje v práci (Dražič a Bohdanovič, 2000) ^[3]. Díky téměř minimálním odchylkám tato práce dokonale potvrzuje, že klíčící rostliny ošetřené cytokininy, konkrétně testovaným benzylaminopurinem akumulují větší množství chlorofylů než neošetřené rostliny. Největší pozitivní účinek na biosyntézu chlorofylů byl vysledován u koncentrace BAP 10^{-6} mol·l⁻¹, u vzorků rostoucích na světle. Dále byly nalezeny markantní rozdíly mezi schopností syntézy chlorofylu u smrku a modřínu rostoucích ve tmě. Zatímco u smrku došlo pouze k částečnému poklesu koncentrace Chls (ve srovnání s rostlinami rostoucími na světle) a semenáčky smrku byly schopné syntetizovat Chl i ve tmě, u modřínu se ve tmě vyskytovalo pouze stopové množství Chls a semenáčky modřínu vykazovaly typické znaky etiolizace. I přesto byly u rostlin rostoucích ve tmě získány ty samé výsledky, a to že u koncentrace BAP 10^{-6} byla koncentrace akumulovaných chlorofylů nejvyšší. Dále bylo také zjištěno, že koncentrace BAP 10^{-5} již nemá pozitivní účinek, spíše účinkuje pleiotropně, zásadně mění morfologii semenáčků a zpomaluje jejich růst. Primárním výstupem této analýzy je tedy odhalení, že schopnost syntetizovat Chl se mezi smrkem a modřínem liší, a to především při růstu ve tmě. Tyto rozdíly jsou způsobené pravděpodobně souhrou více faktorů, především u modřínu jsou sice zachovány geny *chlB*, *chlN* a *chlL*, ale vzniklý polypeptid ChlB je z důvodu nesprávné post-transkripční edice nefunkční a dále exprese genů pro tvorbu enzymu GluTR je u modřínu ve tmě výrazně inhibována.

Získaná data, konkrétně koncentrace Chl u kontrolních (neošetřených BAP) vzorků smrku a modřínu rostoucích na světle a ve tmě se shodují s daty Demka et al. (2009). Koncentrace Chls u vzorků ošetřených BAP je poté signifikantně vyšší než koncentrace Chls u neošetřených vzorků.

Analýzou vlivu koncentrace BAP na koncentraci karotenoidů bylo u vzorků rostoucích na světle dosaženo podobných výsledků se stejným trendem jako u koncentrace Chls ve vzorcích rostoucích jak na světle, tak ve tmě (tedy maximální koncentrace pigmentu při koncentraci BAP $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), čímž byl dokázán všeobecný pozitivní účinek na biosyntézu fotosyntetických pigmentů. Jelikož koncentrace karotenoidů měřená rostlin rostoucích ve tmě se podstatně lišila (směrem od kontroly docházelo k poklesu, ne k nárůstu), bude nutné provést ještě detailnější výzkum zaměřený na koncentraci karotenoidů.

K vystopování regulačního bodu v průběhu syntézy Chls byla později analyzována také závislost koncentrace Pchlíde, (klíčového prekurzoru chlorofylů) na koncentraci BAP v živném roztoku. Při analýze koncentrace Pchlíde bylo dosaženo opět stejných výsledků s totožným trendem jako u Chls ve tmě i na světle a u karotenoidů na světle a také byl potvrzen pozitivní vliv cytokininů na vzrůst koncentrace Pchlíde, především u koncentrace BAP 10^{-6} .

Zjištění že u BAP-ošetřených semenáčků má koncentrace Pchlíde stejný trend jako koncentrace Chls ukázalo, že nárůst koncentrace Pchlíde u koncentrace BAP 10^{-6} je způsoben pravděpodobně zvýšeným metabolickým tokem tetrapyrrolů, a podnítilo další analýzu, s cílem najít hlavní regulační krok v biosyntéze chlorofylů. Proto byl proveden Western blotting s cílem analyzovat vliv koncentrace BAP na množství fotosyntetických proteinů a také enzymů regulujících biosyntézu chlorofylu. U dvou hlavních analyzovaných enzymů (DPOR a (L)POR) nebyly nalezeny žádné signifikantní změny při rozdílné koncentraci BAP, jen pokles při nejvyšší koncentraci u modřínu. Při analýze enzymu GluTR, který se účastní rané fáze biosyntetické dráhy pro syntézu Chls (konkrétně předchází syntéze ALA) byl nalezen markantní rozdíl v množství tohoto enzymu mezi smrkem a modřínem. Tento poznatek také potvrzuje hypotézu z práce od Yaronskaya et. al (2006), a to že primární regulace biosyntézy Chls je zajištěna enzymem GluTR.

Pokud shrneme poznatky získané pigmentovou analýzou a Western blottingem, můžeme říct, že byly nalezeny významné změny na úrovni produktů (Chls), avšak ne na úrovni fotosyntetických enzymů či proteinů. Vzhledem k neměnné koncentraci proteinu D1, na který se vážou Chls ve fotosystému II je možné tvrdit, že nabytéčné Chls vytvořené na základě působení BAP se akumulují buď ve fotosystému I nebo zůstávají volné.

Dále je také důležité zmínit, že pokles v množství fotosyntetických proteinů a enzymů u koncentrace BAP 10^{-5} koreluje s poklesem koncentrace pigmentů a je způsoben pleiotropním efektem již příliš vysoké koncentrace BAP a zpomalením růstu.

Výsledky imunologické analýzy ukázaly, že DPOR a (L)POR jsou sice klíčovými enzymy v biosyntéze Chls, avšak nejsou limitujícím faktorem, nemohou tedy regulovat tuto biologickou cestu, jelikož pokud např. zvýšíme koncentraci předchozích prekurzorů, zvýší se tím koncentrace všech následujících metabolitů, to znamená, že tyto enzymy nepracují při saturační koncentraci svých substrátů. Dále bylo demonstrováno, že nárůst koncentrace Chls nemusí nutně znamenat zvýšení koncentrace enzymů, které se účastní jejich biosyntetické cesty (DPOR, (L) POR), ale je spíše projevem změny exprese regulačního enzymu GluTR.

Regulační enzym GluTR řídí vstup prekurzorů do biosyntetické dráhy a tím reguluje množství konečných, nově vytvořených Chls. Je regulován cirkadiálními cykly a chrání rostliny před oxidativním poškozením z nadměrného množství Chls. GluTR je důležitý regulační enzym, jehož aktivita je v krytosemenných rostlinách regulovaná transkripčně a post-translačně. Transkripční aktivace spočívá v indukci přepisu tohoto genu při odpovědi na světlo, které rostlina vnímá přes fytochromy. Fakt, že tento enzym byl v mé práci detekován i ve smrku rostoucím ve tmě indikuje, že u organismů vlastnících DPOR není enzym GluTR výhradně regulovaný světlem. Navíc je GluTR regulovaný i post-translačně, což se často projevuje při střídání dne a noci. Při náhlém vypnutí světla klesá tvorba ALA následkem hromadění Pchlidle u krytosemenných rostlin, které ho nejsou schopné redukovat na Chlide. Pchlidle interaguje s regulačním proteinem FLU, který dále interaguje s GluTR a tento enzym vypíná, přičemž koncentrace enzymu v buňce zůstává zachovaná. Fakt, že nárůst koncentrace chlorofylu vlivem BAP nebyl doprovázen nárůstem koncentrace GluTR, naznačuje možnou post-translační regulaci v BAP-stimulované syntéze chlorofylů, což bere do úvahy výsledky, že došlo také ke změně koncentrace regulační molekuly Pchlidle. Jakým způsobem Pchlidle reguluje GluTR v krytosemenných rostlinách není známo, protože i navzdory jeho vysoké koncentraci ve tmě, není enzym GluTR celkově inhibovaný a syntéza ALA a chlorofylů částečně probíhá. Bylo zjištěno, že čím větší je schopnost syntetizovat chlorofyly ve tmě, tím větší je koncentrace Pchlidle (například porovnání smrku a modřínu v mé práci). Vztah mezi akumulací Pchlidle a jeho interakcí s GluTR a tím pádem i regulace syntézy chlorofylů v nahosemenných rostlinách ve tmě vyžaduje ještě další výzkum.

Obecně se dá říci, že měřením koncentrace fotosyntetických pigmentů můžeme zjistit momentální fyziologii rostliny a fungování jejího fotosyntetického aparátu. Díky poznatkům zjištěným při analýzách v této práci můžeme efektivněji regulovat biosyntézu Chl při dalším výzkumu a zároveň mohou být nově získané informace použity např. v zemědělství či genovém inženýrství. Jelikož byl dokázán pozitivní vliv BAP na biosyntézu Chl, v budoucnu bude možné použít BAP jako další možný růstový regulátor použitelný ke zvýšení výnosů zemědělských plodin a kompenzaci negativních environmentálních faktorů figurujících v zemědělské výrobě.

Širší využití poznatků této práce by bylo možné i v lesnictví, především k zjišťování rozdílů v akumulaci Chls u ekotypově různých zástupců jehličnanů, k porovnávání nároků na světlo a přizpůsobení se světelným podmínkám. Tato práce může také sloužit jako základ analýzy výstavby sekundárních jehlic v závislosti na hladině chlorofylů u jehličnanů.

Pokud spojíme informace získané z genetických a imunologických analýz, bylo možné vyzkoušet vytvořit rostlinné mutanty krytosemenných rostlin, schopné zelenat ve tmě.

Seznam použitých zkratek

(5)ALA	Kyselina aminolevulová
BAP	Benzylaminopurin
BCA	Kyselina bicinchoninová
Bchl(s)	Bakteriochlorofyl(y)
BSA	Hovězí sérový albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
DPOR	Světelně nezávislá protochlorofylid oxidoreduktáza
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
GluTR	Glutamyl-tRNA reduktáza
HRP	Křenová peroxidáza
Chl (<i>a,b</i>)	Chlorofyl (<i>a,b</i>)
Chls	Chlorofyly
Chlide	Chlorofylid
Lhcb (1,2,3,4,5..)	Světlosběrný komplex (anténa) (1,2,3,4,5..)
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
ORF	Otevřený čtecí rámeček
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAR	Fotosynteticky aktivní záření
PCR	Polymerázová řetězová reakce
POR (LPOR)	Na světle závislá protochlorofylid oxidoreduktáza
Pchlide	Protochlorofylid
PS I, II	Fotosystém I, II
SDS	Dodecylsírany sodný
TBS	Roztok Tris-báze
TBST	Roztok Tris-báze s přísávkem Tweenu 20
TCA	Kyselina trichloroctová
TEMED	Tetramethylethylendiamid
Tris (-HCl, -báze)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (s HCl, čistý)

Reference

Literatura

- [1] Armstrong GA (1998) Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *J Photochem Photobiol B Biol* 43: str. 87–100. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00063-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00063-3)
- [2] Demko V., Pavlovič A., Valková D., Slovákova L., Grimm B., Hudák J. (2009) A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in *Larix decidua* and *Picea abies* seedlings. *Planta* (2009) 230: str. 165–176. dostupné z DOI 10.1007/s00425-009-0933-3.
- [3] Drazic G, Bogdanovic M (2000) Gabaculine does not inhibit cytokinin- stimulated biosynthesis of chlorophyll in *Pinus nigra* seedlings in the dark. *Plant Sci* 154: str. 23–29
- [4] Fujita Y, Bauer CE (2000) Reconstitution of Light-independent Protochlorophyllide Reductase from Purified Bchl and BchN-BchB Subunits: IN VITRO CONFIRMATION OF NITROGENASE-LIKE FEATURES OF A BACTERIOCHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS ENZYME *J. Biol. Chem.* 2000, 275: str. 23583-23588., dostupné z doi: 10.1074/jbc.M002904200
- [5] Fujita Y, Bauer CE (2003) The light-independent protochlorophyllide reductase: a nitrogenase-like enzyme catalyzing a key reaction for greening in the dark. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R (eds) *The porphyrin handbook*. Academic/Elsevier Science, London, str. 109-156
- [6] Scheer H., Chemistry of chlorophylls, in: H. Scheer (Ed.), *Chlorophylls*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, str. 3-30.
- [7] Taiz L., Eduardo Zeiger (2010) *Plant physiology* 5th. edition. kap. 21, s. 495-513. Dostupné z: <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=21&id=218&search=cytokinins>
- [8] Wettstein van D., Gough S., Kannangara C.G., Chlorophyll Biosynthesis, *Plant Cell* 7 (1995) str. 1039-1057
- [9] Yaronskaya E, Vershilovskaya I, Poers Y, Alawady AE, Averina N, Grimm B. (2006) Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta* 224(3): str. 700-709.

Obrazové přílohy

[A] **Obr. 1**

<http://files.urticadioica.webnode.sk/200000004-29fce2af71/chlorofyl%20a%202.gif>
(Převzato dne 26. 12. 2015, poslední revize 25. 3. 2015)

[B] **Obr. 2**

Armstrong GA (1998) Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *J Photochem Photobiol B Biol* 43: str. 88. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00063-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00063-3) (Převzato dne 30. 1. 2015, poslední revize 25. 3. 2015)

[C] **Obr. 3**

Fujita Y, Bauer CE (2000) Reconstitution of Light-independent Protochlorophyllide Reductase from Purified Bchl and BchN-BchB Subunits: IN VITRO CONFIRMATION OF NITROGENASE-LIKE FEATURES OF A BACTERIOCHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS ENZYME *J. Biol. Chem.* 2000, 275: str. 23587, dostupné z doi: 10.1074/jbc.M002904200 (Převzato dne 20. 2. 2015, poslední revize 25. 3. 2014)

[D] **Obr. 4**

Demko V., Pavlovič A., Valková D., Slováková L., Grimm B., Hudák J. (2009) A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in *Larix decidua* and *Picea abies* seedlings. *Planta* (2009) 230: str. 165–176. dostupné z DOI 10.1007/s00425-009-0933-3. (Převzato dne 28. 2. 2015)

[E] **Obr. 5**

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1b/Kinetin.png/320px-Kinetin.png>

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/bb/Zeatin.png/640px-Zeatin.png>

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/44/Benzylaminopurine.svg/512px-Benzylaminopurine.svg.png>

(Převzato 15. 3. 2015, poslední revize 25. 3. 2015)

[F] **Obr. 10**

https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/B2959D82746046CF8CD003F737B83692/Gel%20Photos/P7711_thumb.gif
(Převzato 15. 3. 2015, poslední revize 25. 3. 2015)

Obr. 6 – 9 a 11 - 27 vlastní.