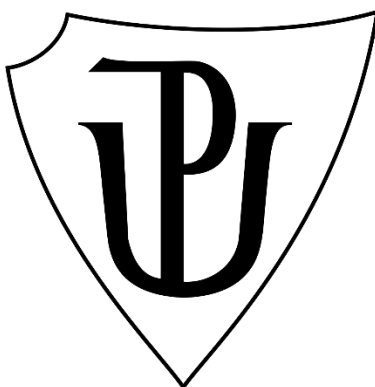


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biotechnológií



**Proteín SOQ a jeho interakcia so svetlozbernými
komplexmi fotosystému II**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: **Gabriela Grofová**
Študijný program: B0512A130007 Biotechnológie a génové inžinierstvo
Špecializácia: Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia: Prezenčná
Vedúca práce: **Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.**
Rok: 2022

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

Pod'akovanie

Ďakujem mojej vedúcej bakalárskej práce, Mgr. Ive Ilíkovej, Ph.D., za odborné vedenie, za pomoc vždy, keď som ju v priebehu práce potrebovala, za užitočné rady a najmä za trpezlivosť počas vypracovávania experimentálnej časti práce a jej spisovania. Taktiež by som chcela poďakovať prof. RNDr. Petrovi Ilíkovi, Ph.D., za umožnenie vypracovania fyziologickej charakterizácie rastlín na oddelení Katedry biofyziky a za odborné rady a pomoc pri vyhodnocovaní nameraných výsledkov.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora: Gabriela Grofová
Názov práce: Proteín SOQ a jeho interakcia so svetlozbernými komplexmi PSII
Typ práce: bakalárska
Pracovisko: Ústav experimentálnej botaniky AV ČR,
Katedra biofyziky
Vedúci práce: Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2022

Abstrakt: Cieľom tejto bakalárskej práce bolo zistiť, či niektorá svetlozberná anténa rastlinného fotosystému II alebo proteín UIP interaguje s proteínom SOQ1 v rámci qH typu nefotochemického zhášania chlorofylovej fluorescencie. V predošlých výskumoch bol objavený proteín SOQ1, ktorý negatívne reguluje dovtedy neznámy typ nefotochemického zhášania, ktorý dostal názov qH. Molekulárny mechanizmus procesu qH ešte nie je celý objasnený, no výskumy naznačujú, že proteín SOQ1 by mohol interagovať so svetlozbernými anténami pri fotosystéme II alebo proteínom UIP, a tým toto zhášanie regulovať.

V tejto práci boli skrížením odpovedajúcich jednoduchých mutantov *A. thaliana* pripravené dvojité mutanty *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*, ktoré boli následne charakterizované pomocou merania chlorofylovej fluorescencie. Získané výsledky naznačujú, že svetlozberná anténa Lhcb6 nemá úlohu v qH type nefotochemického zhášania, ale neznámy proteín UIP funguje ako jeho represor. Na zistenie presného mechanizmu zapojenia proteínu UIP do procesu qH budú potrebné ďalšie experimenty.

Kľúčové slová: nefotochemické zhášanie, proteín SOQ1, chlorofylová fluorescencia, qH typ nefotochemického zhášania

Počet strán: 60
Počet príloh: 0
Jazyk: slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Gabriela Grofová

Title: SOQ protein and its interaction with light-harvesting complexes of Photosystem II

Type of thesis: bachelor

Department: Institute of Experimental Botany AS CR,
Department of Biophysics

Supervisor: Mgr. Iva Ilíková, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract: The aim of this bachelor thesis was to determine whether some of the light-harvesting antenna of Photosystem II or UIP protein interact with SOQ1 protein within the qH type of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. In previous research, the SOQ1 protein was discovered as a negative regulator of a previously unknown type of non-photochemical quenching, which was named qH. The molecular mechanism of the qH process is not yet fully understood, but research suggests that the SOQ1 protein could interact with photosystem II light-harvesting antennae or the UIP protein, and thereby regulate this quenching.

In this work, double mutants *soq1 lhcb6* and *soq1 uip* were prepared by crossing the corresponding single mutants of *A. thaliana*, which were subsequently characterized by measuring chlorophyll fluorescence. The obtained results suggest that the Lhcb6 light-harvesting antenna does not play a role in the qH type of non-photochemical quenching, but the unknown UIP protein acts as its repressor. Further experiments will be needed to determine the exact mechanism of UIP protein involvement in the qH process.

Keywords: Non-photochemical quenching, SOQ protein, chlorophyll fluorescence, qH type of non-photochemical quenching

Number of pages: 60

Number of appendices: 0

Language: slovak

CIELE PRÁCE

TEORETICKÁ ČASŤ

- 1 Vypracovať prehľad problematiky na predložení tému.

PRAKTICKÁ ČASŤ

- 1 Analyzovať mieru aktivácie SOQ-dependentného (qH) zhášania u mutantov *Arabidopsis thaliana* bez vybraných svetlozberných komplexov. Pomocou kríženia dostupných inzerčných línií pripraviť a vyselektovať homozygotné mutantné línie *Arabidopsis thaliana* bez proteínu SOQ a vybraných svetlozberných komplexov. Urobiť fyziologickú charakterizáciu týchto mutantov so zameraním na analýzu nefotochemického zhášania typu qH.
- 2 Namerané výsledky diskutovať. Pokúsiť sa formulovať hypotézu o možnom mechanizme zapojenia svetlozberných antén do qH zhášania.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	3
2.1 Fotosyntéza a štruktúra PSII.....	3
2.1.1 Chloroplast a svetlozberné pigmenty.....	4
2.1.2 Fotosystém II	6
2.1.2.1 Jadro PSII.....	7
2.1.2.2 Svetlozberné antény – LHCII	8
2.2 Nefotochemické zhášanie a procesy s ním spojené.....	9
2.2.1 Zhášanie závislé na energii - qE	9
2.2.1.1 Xantofylový cyklus.....	9
2.2.2 Zhášanie závislé na zeaxantíne - qZ	10
2.2.3 Stavové prechody - qT.....	11
2.2.4 Fotoinhibícia - qI	12
2.3 Charakteristika qH	14
2.3.1 Vzťah qH s ostatnými typmi NPQ.....	15
2.3.1 Štruktúra proteínu SOQ1	15
2.3.1.1 Domény proteínu SOQ1	16
2.3.2 Interakcia medzi SOQ1 a ostatnými tylakoidnými proteínmi	17
2.4. Chlorofylová fluorescencia a zhášacia analýza	19
2.4.1 Dôležité parametre pri meraní chlorofylovej fluorescencie	19
2.4.2 Zhášacia analýza	21
2.5 Inzerčné mutanty a PCR genotypovanie.....	23
2.5.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> – rastlinný modelový organizmus	23
2.5.2 T-DNA inzerčné línie	23
2.5.2.1 Dedičnosť mutantných alel.....	24
2.5.3 Analýza genotypov T-DNA mutantov.....	26
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
3.1 Materiál.....	29
3.1.1 Rastlinný materiál.....	29
3.1.2 Chemikálie a komerčné kity	29
3.1.3 Technický materiál	29
3.1.4 Počítačové programy na spracovanie výsledkov	30
3.2 Metódy	31
3.2.1 Príprava a genotypizácia dvojitéch mutantov <i>soq1 lhcb6</i> a <i>soq1 uip</i>	31

3.2.1.1 Pestovanie rastlinného materiálu	31
3.2.1.2 Priama a nepriama metóda prípravy vzorky na PCR reakciu.....	31
3.2.1.3 Podmienky PCR reakcie	32
3.1.3 Elektroforéza na agarózovom géli	32
3.2.2 Fyziologická charakterizácia rastlín	32
3.2.2.1 Pestovanie rastlinného materiálu	32
3.2.2.2 Stanovenie obsahu chlorofylu v listoch.....	33
3.2.2.3 Dual-PAM	33
3.2.2.4 Štatistické vyhodnotenie.....	34
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	35
4.1 Príprava dvojitéch mutantov <i>soq1 lhcb6</i> a <i>soq1 uip</i>	36
4.1.1 Kríženie a F1 generácia	36
4.1.2 F2 generácia.....	37
4.1.3 F3 generácia.....	40
4.2 Fyziologická charakterizácia rastlín	44
4.2.1 Obsah chlorofylu v listoch.....	44
4.2.2 Fotochémiá fotosystému II	45
4.2.3 Nefotochemické zhasanie	47
5 ZÁVER.....	53
6 POUŽITÁ LITERATÚRA.....	55
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	59

1 ÚVOD

Fotosyntéza patrí medzi najdôležitejšie biochemické procesy v prírode. Vďaka nej sa slnečná energia vo forme fotónov premieňa na chemickú energiu vo forme energeticky bohatých zlúčenín, ktoré sú nevyhnutné pre život. Jedným z vedľajších produktov je kyslík vo forme molekuly O₂, ktorý využívajú aeróbne organizmy na respiráciu. V priebehu evolúcie sa proces fotosyntézy zdokonaľoval tak, aby sa maximalizoval výtťažok energeticky bohatých zlúčenín vzhľadom na množstvo zachytených kvánt svetla.

Jedným z adaptačných procesov je nefotochemické zhášanie (NPQ). Vďaka danému mechanizmu dokážu fotosyntetické organizmy optimalizovať fotosyntetickú dráhu vzhľadom na meniace sa svetelné podmienky, umožňuje najmä neškodne uvoľňovať prijatú svetelnú energiu, aby nedochádzalo ku poškodeniu fotosyntetického aparátu. Existuje niekoľko rôznych typov NPQ: qE – proces závislý na energii, ide o najčastejšiu formu, qZ – zhášanie závislé na zeaxantíne, qT – jeho podstatou je presun svetlozberných antén medzi fotosystémom I a II, qI alebo fotoinhibícia – nastáva pri poškodení fotosystému II svetlom (Brooks *et al.*, 2013). Spomínané procesy sú už relatívne dobre preskúmané a známe už dlhšiu dobu. Brooks *et al.* (2013) popísali nový a dovtedy neznámy typ nefotochemického zhášania, ktorý dostal neskôr označenie qH.

qH je pomaly relaxujúci typ nefotochemického zhášania závislý na proteíne SOQ (používa sa aj označenie SOQ1). Tento proteín bráni spúšťaniu daného procesu, pokiaľ je rastlina vystavená podmienkam s vysokou intenzitou svetla. Ako bolo neskôr preukázané, qH nie je závislé na žiadnom z dovtedy známych komponentov, ktoré sú potrebné na správnu funkciu ostatných typov NPQ. Taktiež bola stanovená štruktúra proteínu SOQ1 a jeho lokalizácia v tylakoidnej membráne. Konkrétny mechanizmus vzniku a regulácie qH ešte nie je známy. Výskumy ukázali potenciálnych interakčných partnerov proteínu SOQ1 vo svetlozberných anténach PSII, ako aj z radov proteínov prítomných v okolí spomínaného fotosytému II (Brooks *et al.*, 2012).

Predchádzajúci skrínig inzerčných mutantov *A. thaliana* v génoch pre svetlozberné komplexy a niektoré ďalšie proteíny, ktoré by potenciálne mohli interagovať s proteínom SOQ, stanovil svetlozbernú anténu Lhcb6 a proteín s neznámou funkciou (UIP) ako najlepších kandidátov na ďalšie skúmanie procesu qH (Ilíková, nepublikované výsledky). Stanovenie správneho interakčného partnera pre proteín SOQ by mohlo viesť pochopeniu jeho presnej funkcie, a tým aj postupnému pochopeniu celého mechanizmu qH.

V priebehu tejto práce boli vyselektované dvojité knockout mutanty *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Následne prebehla fyziologická charakterizácia daných mutantných rastlín so zameraním na nefotochemické zhášanie pomocou fluorescenčnej analýzy, výsledky boli interpretované a diskutované v súvislosti s predchádzajúcimi štúdiami.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

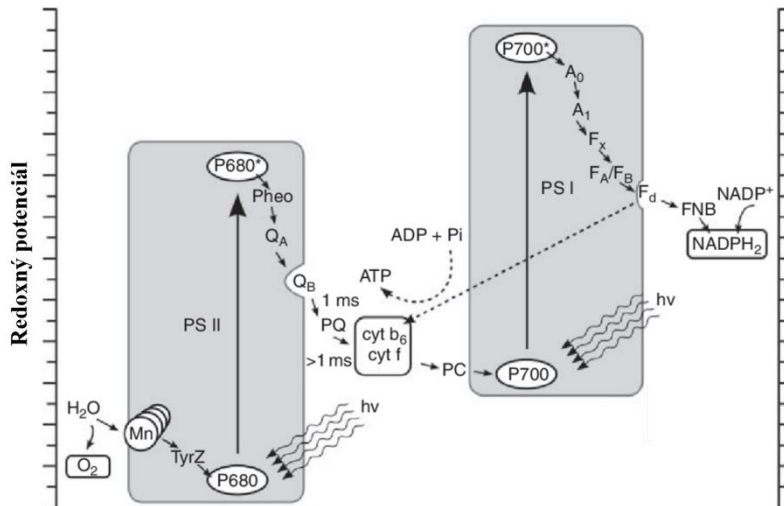
2.1 Fotosyntéza a štruktúra PSII

Fotosyntéza je komplexný proces spočívajúci v premene svetelnej energie na energiu chemických väzieb. V prírode sa vyskytuje oxygénna a anoxygénna fotosyntéza, pričom v prípade oxygéneho typu je jedným z výsledných produktov kyslík. V nasledujúcich kapitolách je popísaný a charakterizovaný práve tento typ fotosyntézy.

Fotosyntetické deje sa dajú rozdeliť na 2 fázy vzhľadom na nevyhnutnosť prítomnosti svetelného žiarenia. Prvá fáza predstavuje reakcie závislé na svetle, ktoré bez energie dopadajúcich fotónov nemôžu prebiehať. Dôležitú úlohu vo svetelnej fáze majú rôzne pigmenty, ktorú budú podrobnejšie opísané v nasledujúcej kapitole. Pigmenty sú združené do veľkých pigment-proteínových komplexov, pričom komplexy fotosystém I a II medzi sebou prenášajú elektróny a výsledkom je vznik energeticky bohatých molekúl. Produktmi svetelných reakcií fotosyntézy sú ATP, NADPH a O₂ vznikajúci rozkladom vody.

Počas svetelných reakcií sú fotóny dopadajúceho žiarenia zachytávané svetlozbernými komplexmi a prenášané do reakčného centra fotosystému I a II (PSI a PSII), kde je ich energia využitá na excitáciu molekuly chlorofylu a. V reakčnom centre následne dochádza ku separácii náboja a vysoko-energetický elektrón putuje systémom prenášačov až na finálny akceptor NADP⁺, ktorý je redukovaný na NADPH. Elektróny sú získavané rozkladom vody v komplexe vyvíjajúcom kyslík pri PSII. Rozkladom vody a transportom H⁺ zo strómy chloroplastu do tylakoidného lumenu vzniká protónový gradient, ktorý využíva ATP syntáza na tvorbu ATP (Johnson, 2016). Fotosyntetické reakcie prebiehajúce na svetle sa dajú zakresliť ako Z-schéma fotosyntézy (Obr. 1). Prísun excitačnej energie musí byť regulovaný, pretože jej nadbytok spôsobí saturáciu fotosyntetického aparátu. Molekuly chlorofylu a s dlhou dobou životnosti excitácie môžu preniesť excitačnú energiu na kyslík a vytvoriť tak jeho reaktívne formy (ROS). ROS následne môžu oxidovať iné molekuly, čo vedie k poškodeniu fotosyntetického aparátu (Khorobrykh *et al.*, 2020).

Druhá fáza fotosyntézy, známa aj ako Calvinov cyklus alebo tmavá fáza, zahŕňa reakcie, ktoré nepotrebujú svetelnú energiu, aby mohli prebiehať. Vysoko-energetické molekuly (ATP, NADPH) vznikajúce pri svetelných reakciách sú v Calvinovom cykle využité pri fixácii CO₂ a jeho redukcii na sacharidy. Kľúčovým enzýmom Calvinovho cyklu je Rubisco, ktoré katalyzuje naviazanie CO₂ na 5-uhlíkatý cukor ribulózu-1,5-



Obr. 1 Z-schéma fotosyntézy zobrazujúca prenos elektrónov z PSII na PSI. Elektróny sa prenášajú v smere rastúceho redoxného potenciálu. Najnižší redoxný potenciál majú excitované molekuly chlorofylu a v jadre PSI a PSII, prevzaté (Masojídek, 2013) a upravené.

bisfosfát. Vzniknutý produkt sa rozpadá na 2 molekuly 3-fosfoglycerátu. 3-fosfoglycerát je následne niekoľkými krokmi premenený na glyceraldehyd-3-fosfát. Vzniknutý produkt je potom využitý pri syntéze glukózy. Z 3 naviazaných molekúl CO_2 vzniká 6 molekúl glyceraldehyd-3-fosfátu, pričom iba jedna je využitá na ďalšiu syntézu. Zvyšných 5 molekúl slúži na regeneráciu ribulóza-1,5-bisfosfátu (Johnson, 2016).

Rastliny si vzhľadom k neustále sa meniacim svetelným podmienkam vytvorili systém mechanizmov, ktoré im umožňujú prispôbiť sa týmto zmenám. Patrí sem aj nefotochemické zhášanie, ktoré sa aktivuje v prípade, že je svetelná intenzita príliš vysoká, a teda excitačnej energie je priveľa. Tvorí ho niekoľko procesov, každý s rozdielnymi vlastnosťami, ale majú spoločný cieľ: uvoľňovať prebytočnú energiu tak, aby nedošlo k poškodeniu okolitých molekúl (Li *et al.*, 2009).

2.1.1 Chloroplast a svetlozberné pigmenty

Fotosyntetický aparát slúžiaci na premenu svetelnej energie na chemickú sa v bunkách rias a vyšších rastlín nachádza v špecifických organelách nazývaných chloroplasty. Tieto organely s dvojitou membránou na povrchu obsahujú 2 hlavné súčasti: tylakoidnú membránu, ktorá obsahuje ATP syntázu, svetlozberné komplexy a všetky súčasti svetelných reakcií, a strómu vyplňajúcu prostredie medzi obalom a tylakoidnou membránou. Stróma chloroplastu obsahuje enzýmy Calvinovho cyklu (Mirković *et al.*, 2017).

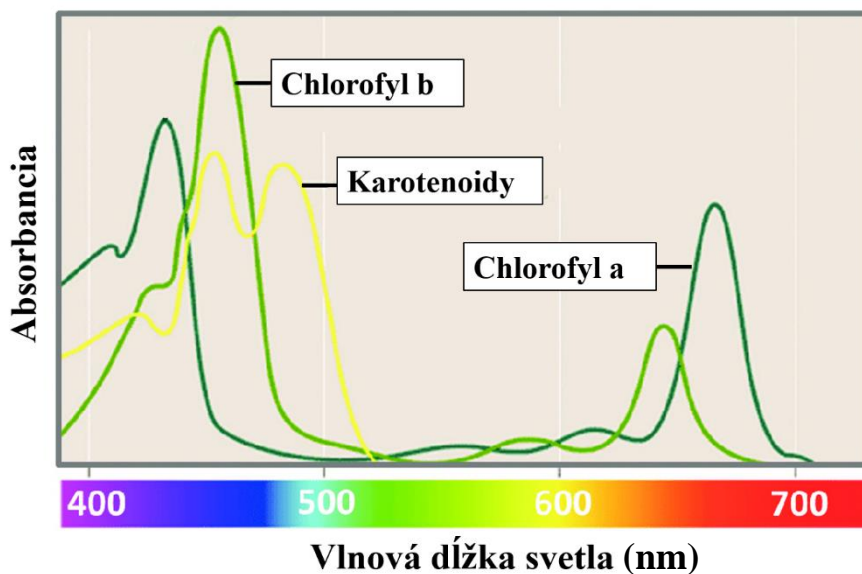
Tylakoidná membrána má 2 podoby: tylakoidy grán a tylakoidy strómy. Graná majú tvar plochých diskov poukladaných na sebe do podoby stĺpca a nachádza sa v nich predovšetkým PSII. Tylakoidy strómy sú tenké kanály prepájajúce graná a obsahujú najmä PSI a ATP syntázu. PSI a PSII sú najdôležitejšie pigment-proteínové komplexy v svetelnej fáze fotosyntézy, pretože obsahujú reakčné centrum, kde dochádza k separácii náboja a samotnej excitácii elektrónov. Tylakoidná membrána a jej komponenty nie sú uložené náhodne, ale jej štruktúra a pozícia všetkých komponentov favorizuje efektivitu zachytenia svetelnej energie a následný prenos elektrónov (Ruban & Johnson, 2015).

Štruktúra tylakoidnej membrány sa môže meniť v závislosti na svetelných podmienkach prostredia. Zmeny zabezpečujú správne fungovanie fotosyntetických procesov, vďaka preskupovaniu proteínových komplexov je zaistená ochrana všetkých súčastí, prípadne obnova poškodených. Vďaka tomuto mechanizmu je zabezpečená adaptácia fotosyntetických organizmov na rôzne okolité prostredie a meniace sa svetelné podmienky (Kirchhoff, 2013).

Svetelná energia je zachytávaná pomocou asimilačných pigmentov. Najdôležitejším asimilačným pigmentom vyšších rastlín je chlorofyl a, ale významne sa na asimilácii podieľa aj chlorofyl b. Základom štruktúry molekuly chlorofylu je tetrapyrolový kruh s koordináčne viazaným atómom horčíka. Rôzne typy chlorofylov sú výsledkom odlišných substituentov na tetrapyrolovom jadre. Dané pigmenty sa medzi sebou líšia v chemickej štruktúre, čo má za následok rôzne absorpčné spektrá a rastlina tak dokáže efektívne využiť širšiu škálu dopadajúcich vlnových dĺžok. Chlorofyl a a chlorofyl b absorbujú najlepšie svetlo v červenej a modrej oblasti viditeľného svetla (Mirkovic *et al.*, 2017).

Dôležitú úlohu v procese fotosyntézy majú karotenoidy. Podobne ako chlorofyl absorbujú modré svetlo, ale ich absorpčné maximá sú o niečo posunuté (Obr. 2). Okrem absorpcie svetla sú dôležité ako ochrana pred škodlivými účinkami nadmernej intenzity svetla, pretože sú schopné neškodne uvoľňovať nadbytočnú excitačnú energiu a podieľajú sa na procesoch nefotochemického zhášania. Ďalšou významnou funkciou karotenoidov je vychytávanie reaktívnych foriem kyslíka, čím chránia okolité molekuly pred oxidačným poškodením (Mirkovic *et al.*, 2017; Edge & Truscott, 2004).

Karotenoidy je možné rozdeliť na 2 veľké podskupiny: karotény a xantofyly. Xantofyly sa líšia od karoténov prítomnosťou atómu kyslíka vo svojej štruktúre a hrajú dôležitú rolu pri zhášaní prebytočnej energie. Ich absorpčné spektrá majú také hodnoty,



Obr. 2 Absorpčné spektrum chlorofylov a, b a karotenoidov. Absorpčné maximá chlorofylu a sú 430 a 662 nm, chlorofylu b 455 nm a 644 nm (Croce & van Amerongen, 2014; Johnson, 2016). Karotenoidy majú absorpčné maximá pri vlnových dĺžkach okolo 470 nm (Mirkovic *et al.*, 2017); prevzaté (Guidi *et al.*, 2017) a upravené.

aby sa energia dokázala prenášať z tripletového chlorofylu na molekulu xantofylu a mohla tak byť uvoľnená (Latowski *et al.*, 2011).

Svetelná energia je zachytená najmä svetlozbernými anténami. Tieto obsahujú viac molekúl pigmentov ako reakčné centrum, teda dokážu zachytiť fotón s väčšou pravdepodobnosťou. Prenos energie z molekuly na molekuly sa uskutočňuje v smere klesajúcej energie potrebnej na jej excitáciu. Pigmenty najvzdialenejšie od jadra absorbujú najenergetickejšie žiarenie modrých vlnových dĺžok a prenášajú ho smerom k reakčnému centru ku pigmentom, ktorých absorpčné spektrum je posunuté viac ku dlhším červeným vlnovým dĺžkam. S každým prenosom sa časť energie stratí vo forme tepla (Mirkovic *et al.*, 2017).

2.1.2 Fotosystém II

Fotosystém II (PSII, P680) je proteínový komplex nachádzajúci sa na tylakoidnej membráne. Je tvorený reakčným centrom, kde dochádza ku separácii náboja, ktoré je obklopené svetlozbernými anténami zachytávajúcimi svetelnú energiu vo forme fotónov. Vyskytuje sa ako dimér, obsahuje v reakčnom centre 2 molekuly chlorofylu s absorpčným maximom 680 nm. Excitované elektróny sú zachytávané primárnym akceptorom feofytínom a ďalej sú prenášané na plastochinón. Súčasťou PSII je aj kyslík vyvíjajúce centrum (OEC), kde dochádza k oxidácii vody, ktorá je použitá ako donor elektrónov pre chlorofyl v reakčnom centre (Nelson & Yocum, 2006).

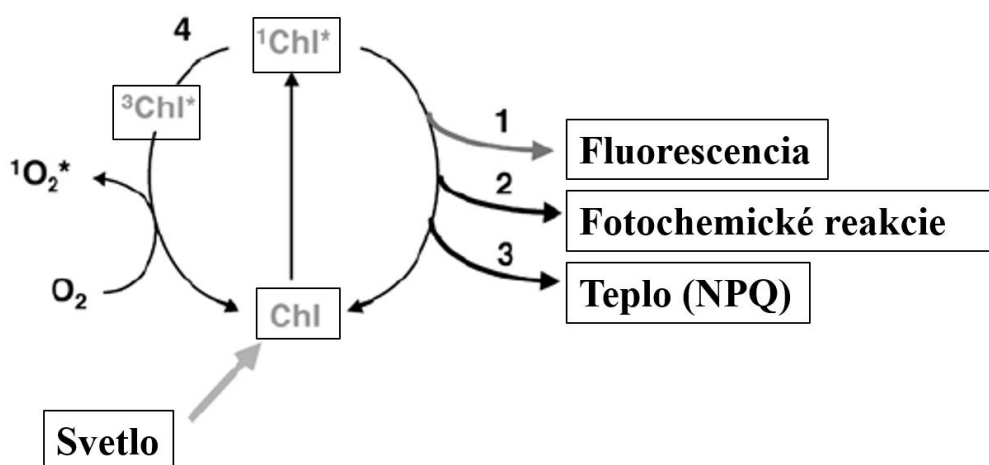
2.1.2.1 Jadro PSII

Štruktúra PSII sa dá rozdeliť na jadro (core), ktoré je obklopené vonkajšími svetlozbernými anténami. Samotné jadro je tvorené približne 20 proteínovými podjednotkami, obsahuje reakčné centrum a vnútorné svetlozberné antény CP43 a CP47. Reakčné centrum je tvorené proteínovými podjednotkami D1 a D2. Obsahuje dokopy 6 molekúl chlorofylu a 2 molekuly feofytínu. Vnútorné antény CP43 a CP47 obsahujú ďalšie molekuly pigmentu, konkrétne 13 a 16 molekúl chlorofylu a spolu s niekoľkými beta-karoténmi. Tieto pigmenty prenášajú excitačnú energiu do reakčného centra, pričom sú od neho v dostatočne bezpečnej vzdialenosti, aby nedochádzalo k ich oxidácii po separácii náboja (Croce & van Amerongen, 2013).

Podjednotky D1 a D2 sa vyskytujú ako heterodimér a obsahujú naviazané všetky kofaktory nutné pre správnu funkciu fotochemických reakcií, ktoré sa v jadre odohrávajú. Po separácii náboja v reakčnom centre D1 podjednotka redukuje chlorofyl P680⁺. Elektróny na redukciu sú získané z tyrozínového zvyšku, ktorý ich získa späť z OEC (Shi *et al.*, 2004).

D1 podjednotka je vzhľadom na vznikajúce oxidujúce produkty náchylná na poškodenie. Pokiaľ je prijatej svetelnej energie príliš veľa, môže dôjsť k tvorbe ROS, buď na donorovej strane PSII v OEC, kde vzniká molekulárny kyslík, alebo na akceptorovej strane PSII, kde sú elektróny prijaté plastochinómom (Aro *et al.*, 1993).

Po absorpcii svetelného kvanta dochádza ku excitácii molekuly chlorofylu a. Relaxácia excitovanej molekuly do základného stavu môže nastať viacerými spôsobmi (Obr. 3). Energia môže byť vyžiarená vo forme fotónu dlhšej vlnovej dĺžky alebo vo



Obr. 3 Možné spôsoby de-excitácie chlorofylu; prevzaté (Müller *et al.*, 2001).

forme tepla, môže dôjsť ku separácii náboja v reakčnom centre na molekulách P680⁺ s následným fotochemickým reakciám (dej nazývaný aj fotochemické zhášanie), alebo môže dôjsť k zmene singletového stavu molekuly chlorofylu na tripletový. Tripletový stav je nežiaduci, pretože takáto molekula chlorofylu dokáže excitovať okolité molekuly kyslíka a vznikajú jeho rôzne reaktívne formy (Müller *et al.*, 2001). Aby sa zabránilo tvorbe ROS a možnému oxidačnému poškodeniu PSII, rastliny si vyvinuli niekoľko mechanizmov na neškodnú disipáciu prebytočnej excitačnej energie vo forme tepla, ktoré sa spolu nazývajú nefotochemické zhášanie (viď kapitola 2.1.3).

2.1.2.2 Svetlozberné antény – LHCI

Druhou súčasťou fotosystému II sú svetlozberné antény (LHCI). Ide o veľké pigment-proteínové komplexy zložené z niekoľkých podjednotiek, z ktorých každá viaže molekuly pigmentov zachytávajúcích svetelnú energiu, čím dokážu zabezpečiť maximálny zisk energie aj pri nízkej svetelnej intenzite. Excitačná energia je následne prenesená od vonkajších svetlozberných antén smerom k reakčnému centru, pričom sa uplatňuje tzv. koncept lievika (Kouřil *et al.*, 2011).

LHCI proteíny sú tvorené rôznymi izoformami proteínov LHCB1-6. Majoritné svetlozberné antény sú tvorené produktmi génov *LHCB1-3*, pričom tieto proteíny tvoria heterotriméry. Zvyšné 3 proteíny LHCB4-6 tvoria minoritné svetlozberné antény, ktoré sa vyskytujú ako monoméry. LHCB4 proteín je známy aj ako CP29, LHCB5 tvorí minoritnú anténu CP24 a gén *LHCB6* kóduje anténu CP24 (Jansson, 1994).

V rámci fotosystému II môže byť s reakčným centrom asociovaných niekoľko vonkajších svetlozberných komplexov LHCI. Ich preskupovanie medzi PSII a PSI je podstatou qT typu nefotochemického zhášania, a tak slúžia na rovnomernú excitáciu oboch fotosystémov. Vonkajšie svetlozberné komplexy tvoria spolu s jadrom superkomplex PSII. Najčastejšie vyskytujúcou sa formou superkomplexu je C₂S₂M₂. C₂ označuje dimér jadra PSII, S₂ reprezentuje triméry LHCI proteínov kódovaných génmi *LHCB1* a *LHCB2*, pričom tieto sú silne naviazané na jadro. Poslednou súčasťou je M₂, alebo dva triméry, ktoré sú slabšie naviazané na jadro a sú tvorené proteínmi LHCB1-3 (Boekema & Semchonok, 2019).

2.2 Nefotochemické zhášanie a procesy s ním spojené

Energetický výťažok fotosyntézy závisí od intenzity svetla dopadajúceho na fotosyntetizujúce pletivo. S rastúcou intenzitou sa zvyšuje až do momentu, kedy je excitačnej energie príliš veľa a všetky primárne akceptory sú obsadené. Vtedy môže nastať poškodenie PSII v dôsledku prenosu energie na kyslík a vzniku ROS. V prírode sa intenzita osvetlenia neustále mení, čomu sa rastliny museli prispôbiť. V priebehu evolúcie sa vyvinuli mechanizmy nefotochemického zhášania, ktoré má za úlohu zhášať excitované molekuly chlorofylu vo svetlozberných anténach, aby sa znížilo množstvo energie prenášanej do reakčného centra. Patrí sem niekoľko procesov, ktoré sa líšia na základe potrebných komponentov na správne fungovanie a aj na základe rôznej kinetiky (Melis, 1999).

2.2.1 Zhášanie závislé na energii - qE

Ide o najrýchlejší, najčastejšie sa vyskytujúci a najpreskúmanejší proces. Zháša až 75 % absorbovanej prebytočnej energie a jeho aktivácia a relaxácia prebieha v rámci sekúnd až minút (Demmig-Adams *et al.*, 1996). Je to primárny mechanizmus, ktorým sa rastlina vyrovnáva s rôznou intenzitou svetla. qE je spúšťané nízkym pH v lumene tylakoidu, ktoré vzniká, keď je protónový gradient tvorený rýchlejšie, ako dokáže byť využívaný ATP syntázou. pH gradient vzniká na svetle a čím je vyšší, tým vyššia je aj miera qE, ktoré prebytočnú energiu uvoľní ako teplo. Okrem nízkeho pH v lumene tylakoidu je súčasťou qE aj xantofylový cyklus a 22-kDa proteín PsbS. V dôsledku nízkeho pH dochádza ku aktivácii enzýmu violaxantín deepoxidáza (VDE), ktorý premieňa violaxantín na zeaxantín (Li *et al.*, 2002).

PsbS patrí medzi LHC proteíny, ale odlišuje sa od proteínov tvoriacich svetlozberné komplexy tým, že neobsahuje pevne naviazané molekuly chlorofylu (Fan *et al.*, 2015). Samotné nefotochemické zhášanie neprebíha na tomto proteíne, slúži skôr ako jeho regulátor. Boli objavené glutamátové zvyšky siahajúce do lumenu tylakoidu, vďaka ktorým dochádza pri zmene pH ku zmene konformácie proteínu PsbS, čím sa reguluje qE (Li *et al.*, 2002). Presný spôsob, akým dochádza ku regulácii qE, ešte nie je známy. Niektoré modely opisujú ako možný princíp qE procesu zmeny v tvorbe agregátov LHCI svetlozberných antén (Brooks *et al.*, 2013).

2.2.1.1 Xantofylový cyklus

Jedným zo základných mechanizmov, ako sa rastliny chránia nielen voči účinkom nadmernej intenzity svetla, ale aj stresu zo sucha, chladu, či zasolenia, je xantofylový

cyklus. V dôsledku stresu dochádza k tvorbe a hromadeniu reaktívnych foriem kyslíka, ktoré napádajú okolité molekuly a môžu viesť až k bunecnej smrti (Lennon *et al.*, 1991). Xantofylový cyklus odbúrava aj reaktívne formy kyslíka vznikajúce v dôsledku vysokej svetelnej intenzity a je súčasťou procesov nefotochemického znášania qE a qZ (Latowski *et al.*, 2011).

Doteraz bolo popísaných 6 typov xantofylového cyklu, pričom typ závislý na enzýme violaxantín de-epoxidáza (VDE) je najrozšírenejší a najpreskúmanejší (Latowski *et al.*, 2011). V každom druhu xantofylového cyklu dochádza k premene epoxidovaných foriem xantofylov na de-epoxidované, pričom táto premena je závislá na prítomnosti svetla a uľahčuje disipáciu prebytočnej energie (Latowski *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2001).

V najznámejšom type, v cykle závislom na violaxantín de-epoxidáze, je hlavným produktom vznikajúcim na svetle zeaxantín (Latowski *et al.*, 2011). Kľúčovým enzýmom je violaxantín de-epoxidáza, ktorá premieňa violaxantín na zeaxantín. Zatiaľ čo violaxantín je schopný absorpcie a prenosu svetelnej energie na iné molekuly, zeaxantín nie. Pokiaľ zeaxantín prijme excitačnú energiu, jediný spôsob jeho relaxácie je disipácia tejto energie vo forme tepla. VDE je aktivovaná nízkym pH v lumene, ktoré je dôsledkom vysokej svetelnej intenzity a spôsobuje dimerizáciu enzýmu a jeho naviazanie na kofaktor kyselinu askorbovú. Nízke pH tiež umožňuje enzýmu naviazanie na LHCII komplexy, kde sa nachádzajú xantofyly. Energia sa prenáša z excitovaného chlorofylu na zeaxantín a je neškodne uvoľnená vo forme tepla. Medzikrokom pri premene violaxantínu na zeaxantín je antheraxantín. Pri skončení pôsobenia stresových podmienok sa zeaxantín premieňa naspäť pomocou enzýmu zeaxantín epoxidázy (Obr. 4) (Latowski *et al.*, 2004; Misra *et al.*, 2006).

2.2.2 Zhášanie závislé na zeaxantíne - qZ

Tento typ zhášania potrebuje na svoju indukciu zeaxantín. Na rozdiel od qE na jeho indukciu nie je potrebný proteín PsbS a ani nízke pH v lumene, pokiaľ je zeaxantín už prítomný. Má pomalšiu kinetiku než qE, aktivuje a deaktivuje sa v priebehu 15 – 30 minút. Kinetika qZ je podobná qT (viď nižšie), ale na rozdiel od qT nepotrebuje STN7 kinázu (Nilkens *et al.*, 2010). Dlhšia doba relaxácie môže v rastline slúžiť na zapamätanie si svetelných podmienok, a tak pripraviť jedinca na dlhší čas pri vysokej svetelnej intenzite (Brooks *et al.*, 2012). qZ pravdepodobne prebieha v LHCII anténach, v miestach, kde sa vyskytujú naviazané xantofyly pomalšie premieňané na zeaxantín. Ide hlavne o minoritné svetlozberné komplexy, kde dochádza k pomalšej konverzii

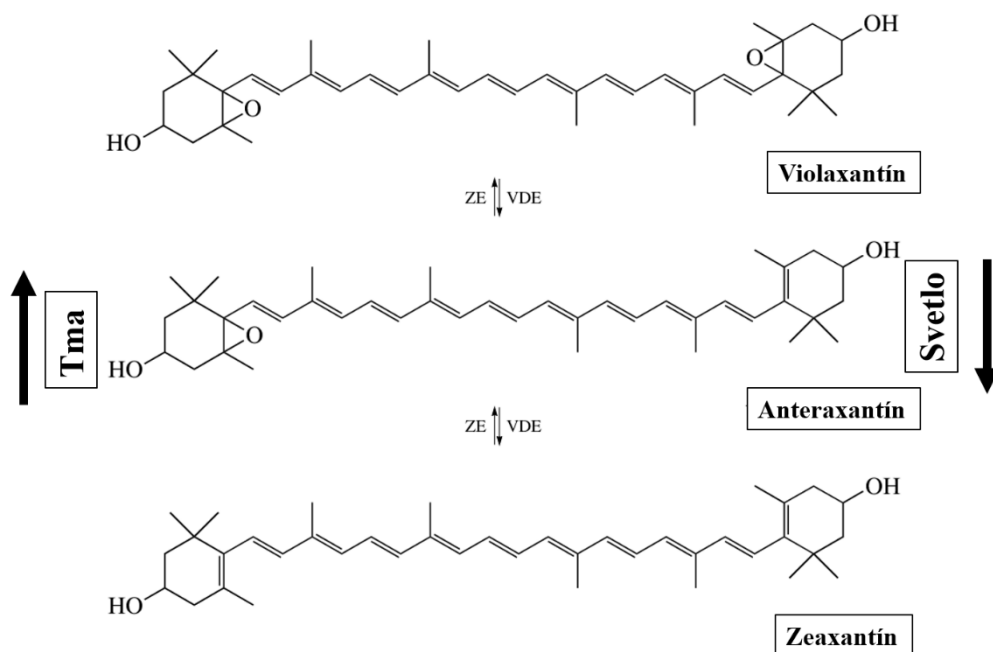
xantofylov. qZ je zodpovedné za konformačnú zmenu v štruktúre minoritnej antény CP26, ku ktorej dochádza po substitúcii violaxantínu zeaxantínom (Dall’Osto *et al.*, 2005).

2.2.3 Stavové prechody - qT

Stavové prechody slúžia na udržanie rovnováhy v excitácii PSI a PSII. Oba fotosystémy majú mierne odlišné absorpčné spektrum a v neustále sa meniacich svetelných podmienkach môže nastať stav, keď má jeden fotosystém viac dostupných fotónov potrebnej vlnovej dĺžky pre jeho excitáciu. Proces qT umožňuje optimalizovať efektivitu a energetický výnos fotosyntézy pri rôznej intenzite dopadajúceho svetla s rozdielnymi vlnovými dĺžkami (Murata, 1969).

Rovnovážna excitácia PSI a PSII je dosiahnutá pomocou migrácie a asociácie rôzneho počtu LHCII komplexov medzi fotosystémami. V tme, pri ďalekom červenom svetle a silnom osvetlení, sú LHCII asociované s PSII (stav 1). Pokiaľ je PSII preferované excitovaný, napr. pri slabom osvetlení, LHCII sa presunú k PSI (stav 2) (Anderson & Andersson, 1988). Stavové prechody neprebiehajú v podmienkach s vysokou intenzitou osvetlenia, pretože dochádza k inaktivácii STN7 kinázy ako kľúčového enzýmu (Schuster *et al.*, 1986).

qT je aktivované ako odpoveď na redukovaný plastochinónový „pool“ (PQ pool). PQ pool je tvorený molekulami plastochinónu, patrí k najvýznamnejším prenášačom elektrónov vo svetelnej fáze fotosyntézy - zabezpečuje prenos elektrónov od PSII na



Obr. 4 Xantofyllový cyklus; prevzaté (Misra *et al.*, 2006) a upravené.

cytochróm b_6f komplex. Pokiaľ je PSII preferovane excitovaný, PQ pool je redukovaný. Interakcia redukovaného plastochinónu a cytochróm b_6f komplexu má za následok reverzibilnú fosforyláciu niektorých LHCII komplexov a ich presun k PSI. Fosforylácia prebieha pomocou enzýmu STN7 kináza, ktorá sa nachádza blízko cytochróm b_6f komplexu (Vener *et al.*, 1997; Zito *et al.*, 1999). Pokiaľ sa podmienky zmenia a PSI je preferovane excitovaný, PQ pool je oxidovaný a STN7 kináza sa deaktivuje. LHCII proteíny sú defosforylované pomocou enzýmu PPH1/TAP38 fosfatáza (Pribil *et al.*, 2010; Shapiguzov *et al.*, 2010).

2.2.4 Fotoinhibícia - qI

Fotoinhibícia môže byť chápaná ako pojem majúci dva významy. Ide predovšetkým o vyjadrenie poškodenia jadra PSII nadmerným osvetlením. Zahŕňa niekoľko mechanizmov, z ktorých žiadny nie je dokonale preskúmaný a ich presná funkcia ostáva nateraz záhadou. Pokiaľ sa pojem fotoinhibícia použije v súvislosti s NPQ, označuje pomalé reverzibilné procesy, ktorých cieľom je znížiť efektivitu PSII (Osmond, 1994; Adams III *et al.*, 2008).

qI je najpomalší mechanizmus, ktorého postupná deaktivácia prebieha až hodinu, a nastáva v prípade odpovede na stres spôsobený vysokou intenzitou svetla alebo teplotou (Powles, 1984; Osmond, 1994). Najnáchylnejšia na poškodenie je D1 podjednotka jadra PSII (Ohad *et al.*, 1984). Jedna z potenciálnych funkcií qI môže byť regulované znižovanie expresie fotosyntetických génov a blokovanie reakčného centra PSII (Adams *et al.*, 2013). Pokiaľ dôjde ku zablokovaniu fotochemických reakcií v jadre PSII, nevznikajú ROS. qI chráni pred oxidatívnym stresom a nepriamo uchováva nepoškodený aj PSI, pretože je obmedzený prísun elektrónov od PSII (Tikkanen *et al.*, 2014).

Rastliny neustále nahrádzajú a opravujú poškodené D1 podjednotky, aby nebol ovplyvnený výťažok fotosyntézy. Mechanizmus výmeny D1 podjednotky je zložitý, pretože musí dôjsť k rozpadu jadra PSII, prenosu jednotlivých súčastí do stromálnych tylkoidov, nahradeniu nefunkčnej podjednotky novým proteínom a transport celého komplexu naspäť do grán (Yokthongwattana & Melis, 2008). Na obnove D1 podjednotiek sa podieľa niekoľko proteínových faktorov lokalizovaných na tylakoidnej membráne a v lumene. Menovite ide o LQY11, HHL1 a MPH2 (Jin *et al.*, 2014; Liu & Last, 2017; Lu *et al.*, 2011).

Ochrannú funkciu pred nadmernou intenzitou svetla má aj relatívne nový proces spadajúci do kategórie NPQ, ktorý bol nazvaný qH. qH má podobnú rýchlosť aktivácie

a relaxácie ako qI. qI sa skladá z niekoľkých procesov, pričom qH by sa dalo považovať za jeden z nich. Ako samostatný typ NPQ bolo qH označené na jeho odlíšenie a vymedzenie v rámci fotoinhibičných procesov. qH má vlastné charakteristiky a molekulárne mechanizmy, ktoré umožňujú jeho funkciu, no nie všetky sú už známe (Malnoë *et al.*, 2018).

2.3 Charakteristika qH

qH je pomaly reverzibilný typ nefotochemického zhášania prebiehajúceho vo svetlozberných komplexoch PSII, ktorý bol popísaný a objavený relatívne nedávno. Jeho súčasťou je dovtedy neznámy proteín nazvaný SOQ1. SOQ1 slúži na potlačenie tohto typu zhášania, pokiaľ sa rastlina nenachádza v stresových podmienkach spôsobených vysokou svetelnou intenzitou (Malnoë, 2018).

Proteín SOQ1 bol popísaný prvý raz v rámci screeningového experimentu u *npq4* mutantných rastlín *A. thaliana* vystavených EMS mutagenéze (Brooks *et al.*, 2013). Mutant *npq4* nemá správne fungujúci qE proces, pretože nedokáže správne syntetizovať PsbS proteín. Cieľom výskumu bolo takéto rastliny podrobiť EMS mutagenéze a objaviť ďalšie proteíny potenciálne súvisiace s NPQ. Spomedzi niekoľko tisíc vzoriek niektoré jedince vykazovali vyššiu úroveň NPQ ako ich rodičovské rastliny. Následnou analýzou boli vylúčené vzorky obsahujúce mutácie v známych komponentoch pre NPQ a ostali vzorky, u ktorých bola identifikovaná mutácia v neznámom proteíne. Tento proteín bol pomenovaný SUPPRESSOR OF QUENCHING 1 (SOQ, SOQ1), vzhľadom na jeho funkciu, keďže potlačuje práve nefotochemické zhášanie typu qH (Brooks *et al.*, 2013).

Okrem nevyhnutnej inaktivácie proteínu SOQ1 je na indukciu qH potrebný malý proteín plastidový lipokalín (LCNP). LCNP sa nachádza v tylakoidnom lumene a jeho expresia sa zvyšuje počas stresu zo sucha, či pri vysokej intenzite svetla, čím pomáha chrániť bunku pred tvorbou ROS a ich negatívnym vplyvom (Malnoë *et al.*, 2018). Lipokalíny sú skupina proteínov viažucich malé hydrofóbne molekuly, ktoré sa nachádzajú v rôznych organizmoch od baktérií po rastliny (Grzyb *et al.*, 2006). Expresia LCNP narastá, pokiaľ je bunka vystavená abiotickému stresu zo sucha a chladu (Levesque-Tremblay *et al.*, 2009).

Súčasný model funkcie qH predpokladá negatívny účinok SOQ1 proteínu na LCNP, ktorý tak nedokáže modifikovať lipidové zložky tylakoidnej membrány, nedochádza ku konformačným zmenám na LHCII anténach a qH je potlačené. V stresových podmienkach je vplyv SOQ1 eliminovaný a LCNP môže indukovať qH zhášanie. Deaktivácia qH prebieha pomaly a je sprostredkovaná na stromálnej strane tylakoidnej membrány proteínom ROQH1, ktorý patrí medzi dehydrogenázy-reduktázy (Amstutz *et al.*, 2020; Malnoë, 2018).

2.3.1 Vzťah qH s ostatnými typmi NPQ

Po identifikácii nového typu NPQ prebiehali experimenty na zistenie, či daný typ má súvis s dovtedy známymi mechanizmami. Keďže qH bolo objavené v *npq4* mutantných rastlinách, tento proces určite nezávisí na prítomnosti proteínu PsbS. Zvyšné komponenty nevyhnutné pre spustenie qE boli testované ako prvé. *soq1* mutant bol vystavený nigericínu, ktorý bráni tvorbe pH gradientu naprieč tylakoidnou membránou. Výsledky ukázali, že v porovnaní s WT rastlinou mal mutant vyššiu úroveň NPQ, teda qH vyvolané absenciou funkčného SOQ1 proteínu nie je závislé na protónovom gradiente (Brooks *et al.*, 2013).

Následne sa *soq1* mutant skrížil s mutantmi *npq1* a *npq2*, ktoré majú narušenú premenu violaxantínu na zeaxantín, teda nemajú funkčnú qE a qZ zložku NPQ. Dvojitý mutant *soq1 npq1* a *soq1 npq2* nemali funkčné qE a qZ zhášanie, ale procesy s dlhou relaxáciou, medzi ktoré patrí qH, boli u daných rastlín prítomné s vyššími hodnotami než u rodičovských rastlín. qH preto nemá súvis s xantofylovým cyklom. Testy pokračovali meraním množstva karotenoidov a xantofylov u *soq1* mutanta, ale nenašli sa žiadne výrazné rozdiely, čo taktiež potvrdzuje predchádzajúce výsledky (Brooks *et al.*, 2013).

Tretí experiment mal ukázať súvis medzi qH a qT. *soq1* mutant bol skrížený s *stn7* mutantom, ktorý má nefunkčnú STN7 kinázu nevyhnutnú na fosforyláciu svetlozberných antén a vznik qT (Bellafiore *et al.*, 2005). Dvojitý mutant mal opäť vyššiu hladinu NPQ než jednoduchý *stn7* mutant, teda qH nesúvisí so stavovými prechodmi (Brooks *et al.*, 2013).

Na záver sa zisťovala miera poškodenia a regenerácie D1 podjednotky PSII pri vysokej intenzite svetla. Linkomycín blokuje syntézu chloroplastových proteínov, čím bráni aj nahradzovaniu nefunkčných podjednotiek PSII a indukuje silné qI zhášanie. Výsledky ukázali takmer identické správanie WT a mutanta *soq1*, dokonca NPQ mutanta bolo o niečo vyššie. qH tak nemá súvis so žiadnym z predošle známych komponentov nevyhnutných pre aktiváciu procesov nefotochemického zhášania (Brooks *et al.*, 2013).

2.3.1 Štruktúra proteínu SOQ1

SOQ1 je 114-kDa chloroplastový transmembránový proteín zložený z 1055 aminokyselín. Detailná štruktúra nie je známa, avšak je zložený z 3 domén nachádzajúcich sa na oboch stranách tylakoidnej membrány a C-terminálneho fragmentu obsahujúceho 159 aminokyselinových zvyškov (Obr. 5). Je kódovaný génom *SOQ1* (At1G56500) a nachádza sa na chromozóme 1 u *A. thaliana*. Pôvodný mutantný fenotyp

v experimentoch Brooks *et al.* (2013) bol spôsobený bodovou mutáciou v danom géne, ktorá má za následok predčasné ukončenie proteosyntézy a nefunkčný génový produkt. Inzerčný mutant *soq1-3* (SALK_139953c) pripravený vložením T-DNA do sekvencie génu má za následok presne rovnaký fenotypický prejav a používa sa na ďalší výskum, okrem iného aj v tejto práci (Brooks *et al.*, 2013; Malnoë, 2018).

2.3.1.1 Domény proteínu SOQ1

1. Haloacidická dehalogenázová hydroláza (HAD)

HAD je skupina enzýmov, ktoré používajú aspartátový zvyšok ako nukleofil v aktívnom mieste a pôsobia na rôzne substráty. Ich funkcia je veľmi rôznorodá a spočíva v prenose fosforylových skupín. Patria sem fosfatázy, ATPázy, fosfonatázy, fosfomutázy cukrov. Pre správnu funkciu HAD enzýmu je potrebný aspartát slúžiaci ako nukleofil a Mg^{2+} ako kofaktor (Burroughs *et al.*, 2006; Koonin & Tatusov, 1994). HAD doména proteínu SOQ1 sa nachádza v stróme a nie je nevyhnutná pre plný NPQ fenotyp. Najvyššia substrátová špecificita sa ukázala pre fosforylované cukry, konkrétne pre ribóza-5-fosfát a pre fosforylované fruktózy. Presná štruktúra HAD domény z proteínu SOQ1 ešte nebola získaná (Brooks *et al.*, 2013).

2. Tioredoxínová doména (Trx)

Trx doména sa nachádza v lumene a je nevyhnutná pre správnu funkciu qH (Brooks *et al.*, 2013). Tioredoxíny sú vo všeobecnosti konzervované enzýmy, ktoré katalyzujú reverzibilnú formáciu disulfidických väzieb v proteínoch, čím spôsobujú ich konformačné zmeny vedúce k ich aktivácii (Martin, 1995). Trx doména, ktorá je súčasťou proteínu SOQ1, obsahuje tioredoxínový „fold“ a aj netypický konzervovaný CCINC motív vo svojom aktívnom mieste (Brooks *et al.*, 2013). Celá štruktúra domény pozostáva z 5 β -vlákien usporiadaných do centrálného jadra, ktoré je obklopené 6 α -helixmi. Trx doména proteínu SOQ1 sa líši od klasického Trx-foldu, pretože obsahuje navyše 2 α -helixy, a nachádza sa na vrchnej strane NHL domény, s ktorou je spojená slučkou o dĺžke 28 aminokyselinových zvyškov. Medzi oboma doménami dochádza k tvorbe niekoľkých vodíkových väzieb, čo vedie k ich lepšej interakcii (Yu *et al.*, 2021). Cysteínové zvyšky obsiahnuté v aktívnom mieste katalyzujú premenu disulfidov a spôsobujú redukciu, prípadne oxidáciu daného proteínu, čím prispievajú k prenosu redoxného

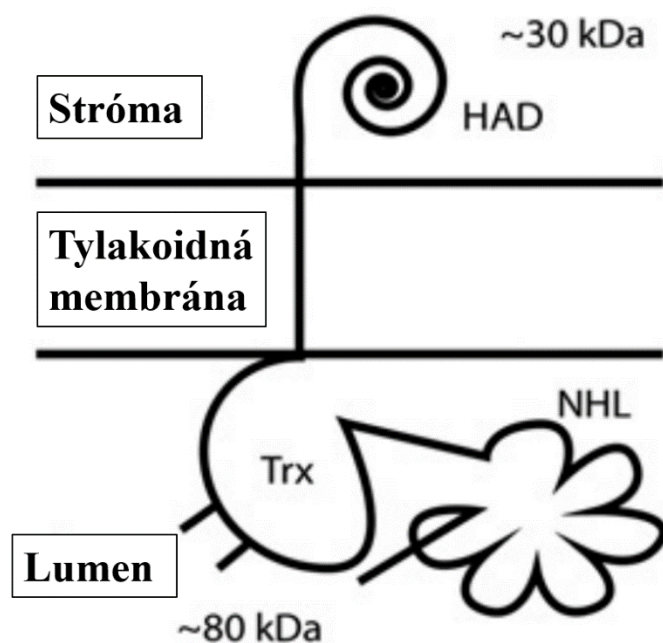
potenciálu naprieč membránami (Holmgren, 1985). V prípade mutácií v CCINC motíve proteín SOQ1 nie je schopný potláčať qH, čo viedlo k názoru, že mechanizmus jeho pôsobenia je spätý s redoxnou reguláciou cieľových proteínov (Brooks *et al.*, 2013).

3. β -propeller (NHL)

Podobne ako predchádzajúca Trx doména sa NHL doména nachádza v lumene a je nevyhnutná pre plnú funkciu SOQ1 proteínu (Brooks *et al.*, 2013). Obsahuje 6 β -skladaných súčastí usporiadaných okolo centrálného kanála, pričom každá bola tvorená rôznym počtom β -listov. 5 častí obsahuje 4 obyčajné antiparalelné β -listy a posledná, 6. súčasť je zložená len z 3 antiparalelných β -vlákien. Posledná súčasť obsahuje dlhú C-terminálnu štruktúru spájajúcu okrajové časti a uzatvárajúcu celú štruktúru do kruhu. Okruh aminokyselinových vlákien obklopuje centrálny prázdny priestor s 2 otvormi na povrchoch NHL domény. Vzhľadom na prítomnosť vodíkových väzieb sú otvory na oboch stranách odlišné. Vrchný otvor domény je menší a plytkejší než spodný. NHL doména sa nachádza uprostred medzi Trx doménou a C-terminálnym fragmentom (Yu *et al.*, 2021). Tento štruktúrny motív väčšinou slúži na väzbu substrátu alebo proteín-proteínové interakcie. Funkcie proteínov s NHL doménami sú však rôzne, od katalýzy, signalizácie, viazania ligandov až po interakcie s okolitými proteínmi (Chen *et al.*, 2011). Presný mechanizmus interakcie NHL domény s ostatnými časťami proteínu SOQ1 ešte nie je známy. Mutácie spôsobené v sekvencii aminokyselín NHL domény vedú k strate funkcie SOQ1 proteínu a bránia potlačeniu qH (Brooks *et al.*, 2013).

2.3.2 Interakcia medzi SOQ1 a ostatnými tylakoidnými proteínmi

SOQ1 proteín sa nachádza na tylakoidnej membráne a reguluje qH typ nefotochemického zhášania. Pre správne fungovanie celého procesu musí dochádzať k interakcii s ostatnými proteínmi nachádzajúcimi sa v jeho okolí. Výskumy ukázali, že SOQ1 má určitý doteraz presne neznámy vplyv na organizáciu proteínov na tylakoidnej membráne. Keďže sa zapája do procesu NPQ, je veľká pravdepodobnosť interakcie medzi ním a LHCI anténami, no konkrétny typ interakcie a konkrétny partnerský proteín zatiaľ nie je známy. Pomocou yeast-two-hybrid experimentu boli identifikované 2 ďalšie proteíny, ktoré ukazovali určitú mieru interakcie s proteínom SOQ1. Išlo o slabú interakciu s proteínom



Obr. 5 Schematické rozloženie jednotlivých domén proteínu SOQ1 na tylakoidnej membráne; prevzaté (Brooks et al., 2013) a upravené.

HCF136, ktorý sa nachádza v lumene a zúčastňuje sa skladania komplexu PSII s jeho obnovou, a o niečo silnejšiu interakciu s At2g26340, čo je malý lumenálny proteín s neznámou funkciou (Brooks *et al.*, 2012). Tento zatiaľ neanotovaný proteín je pre potreby tejto práce ďalej označovaný ako „unknown interacting protein“ (UIP).

2.4 Chlorofylová fluorescencia a zhášacia analýza

Meranie chlorofylovej fluorescencie je jednou z najpoužívanejších techník pri stanovení celkovej výkonnosti fotosyntézy. Pri absorpcii svetla chlorofylom existujú 3 potenciálne spôsoby využitia jeho energie: 1. fotochemické reakcie; 2. disipácia prebytočnej energie vo forme tepla; 3. emisia fotónu dlhšej vlnovej dĺžky, teda fluorescencia. Všetky 3 procesy sú v neustálej konkurencii a zvýšenie hodnôt jedného vedie k poklesu iného a naopak. Vďaka tomu sa pri zistení parametrov jedného procesu dokážu určiť ostatné.

Fluorescencia je najľahšie merateľná a podáva obraz o celom fotosyntetickom fungovaní listu. Iba veľmi malé množstvo energie je vyžiarenej vo forme fluorescencie za normálnych podmienok (1-2 % prijatého svetla). Emisné spektrum chlorofylu je oproti jeho absorpčnému spektru posunuté k dlhším vlnovým dĺžkam. Intenzita vyžiareného svetla sa dá zmerať pomocou detektora, ktorý sníma len emitované vlnové dĺžky (Maxwell & Johnson, 2000).

2.4.1 Dôležité parametre pri meraní chlorofylovej fluorescencie

Na analýzu funkcie fotosyntetického aparátu je potrebné odlíšiť fotochemické a nefotochemické zhášanie. Fotochemické zhášanie sa môže zredukovať po pridaní látok inhibujúcich fotochemické reakcie, napr. Diuron. V súčasnosti sa táto metóda nevyužíva, pretože ich aplikácia je nepraktická. Namiesto nich sa používajú rôzne intenzity svetelných zábleskov v rôznom časovom trvaní (Maxwell & Johnson, 2000).

Meranie chlorofylovej fluorescencie začína adaptovaním rastliny na tmu počas doby okolo 30 minút. Ako prvé sa zapne svetlo s príliš nízkou intenzitou, aby sa spustila fotosyntéza, no umožní zmerať minimálnu hodnotu fluorescencie - F_0 . Následne sa aplikuje silný svetelný záblesk (saturačný pulz), ktorý uzavrie všetky reakčné centrá (Murchie & Lawson, 2013). Pokiaľ primárny plastochinónový akceptor Q_A prijme elektrón v rámci fotosyntetického transportu od PSII, nemôže prijať ďalší, až kým prvý prijatý neodovzdá nasledujúcemu prenášačovi. Ďalší excitovaný elektrón v reakčnom centre PSII tak nemôže byť presunutý z chlorofylu ďalej, takže nedochádza k fotochemickej reakcii. Excitačná energia sa vyžaruje vo forme fluorescencie v maximálnej možnej miere, pretože jej nekonkuruje žiadna fotochemická reakcia a neprebiehajú ani žiadne procesy NPQ. Zmeria sa hodnota maximálnej fluorescencie F_m .

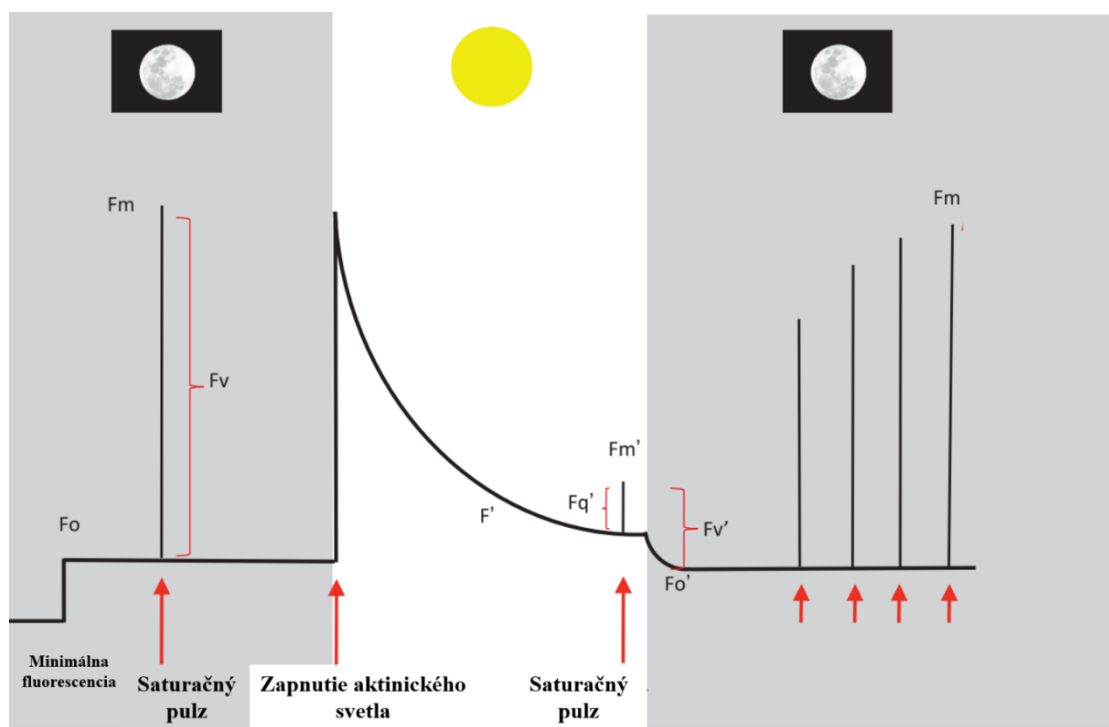
Následne je rastlina vystavená kombinácii kontinuálneho svetla s nižšou intenzitou oproti saturačným pulzom a v určených intervaloch sa opäť aplikujú saturačné pulzy. Aktinické svetlo je dostatočne intenzívne, aby v jeho prítomnosti prebiehala fotosyntéza,

takže v priebehu pár minút dôjde k postupnej oxidácii fotosyntetického aparátu, reakčné centrá sa otvoria a intenzita fluorescence sa vráti do štandardných hodnôt. Ide o fotochemické zhášanie fluorescence, pretože rastie podiel absorbovanej energie využitej na fotochemické reakcie (Murchie & Lawson, 2013).

Spolu s fotochemickým zhášaním rastie aj intenzita nefotochemického zhášania, kedy sa energia uvoľní vo forme tepla. Po ubehnutí určitého času, ktorý je druhovo špecifický, ale väčšinou v rozmedzí 15 - 20 minút, nastane rovnováha všetkých procesov (Obr. 6) (Johnson *et al.*, 1990; Maxwell & Johnson, 2000).

Po dosiahnutí rovnováhy sa získa hodnota „steady-state“ fluorescence, ktorá sa už ďalej v čase nemení. F'_m označuje hodnotu fluorescence, ktorá sa získa pri aplikácii saturačných pulzov počas osvetlenia, a odpovedá hodnote F_m zníženej o nefotochemické zhášanie.

Ďalším dôležitým parametrom je F_t , teda fluorescence v danom čase t , a posledným často používaným parameter je F_0 , čo odpovedá intenzite fluorescence bez prítomnosti



Obr. 6 Schematický priebeh experimentu pri meraní parametrov chlorofylovej fluorescence s rastlinou adaptovanou na tmu. Na začiatku sa zmerajú minimálna a maximálna hodnota fluorescence a vypočíta ich rozdiel F_v . Po zapnutí aktinického svetla sa hodnoty fluorescence znížia a dosiahne sa rovnováha. Na rastline už adaptovanej na svetlo sa zmerajú opäť minimálna a maximálna fluorescence po aplikácii saturačných pulzov a ich rozdiel sa označuje F_v' ; prevzaté (Murchie & Lawson, 2013) a upravené.

fotosynteticky aktívneho svetla, ktoré má veľmi slabú intenzitu a slúži iba na indukciu fluorescencie. (Maxwell & Johnson, 2000)

2.4.2 Zhášacia analýza

Zhášacia analýza je jeden z typov merania chlorofylovej fluorescencie, na základe ktorého sa dajú vyhodnotiť parametre charakterizujúce fotochemické a nefotochemické procesy:

1. Fotochemické procesy

Obraz o prebiehajúcich fotochemických procesoch podávajú parametre F'_m a F_t . Na ich základe sa dá stanoviť kvantový výťažok fotochémiie PSII. Udáva podiel svetla absorbovaného PSII, ktoré bolo využité na fotochemické reakcie, a teda indikuje stav celkových fotosyntetických procesov (Genty *et al.*, 1989). Kvantový výťažok sa vypočíta takto:

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_t)/F'_m$$

Podobne ako kvantový výťažok fotochémiie PSII je dôležitým parametrom hodnota fotochemického zhášania qP. qP udáva množstvo reakčných centier PSII, ktoré sú otvorené. Zmeny tohto parametra nastávajú po zatvorení reakčných centier v dôsledku príliš vysokej intenzity svetla. Fotochemické zhášanie sa vypočíta podľa nasledujúceho vzťahu:

$$qP = (F'_m - F_t)/(F'_m - F'_0)$$

Podiel medzi kvantovým výťažkom fotochémiie PSII a fotochemickým zhášaním reprezentuje posledný dôležitý parameter: F_v/F_m . Udáva hodnotu maximálnej efektivity PSII, teda kvantový výťažok pri 100 % otvorení reakčných centier. Tento parameter v prípade rastlín adaptovaných na tmu ukazuje potenciálny výkon PSII a celkovej fotosyntézy. Štandardná hodnota F_v/F_m sa pri väčšine rastlinných druhov pohybuje na úrovni 0,83 (Björkman & Demmig, 1987). Pokiaľ je hodnota nižšia než štandardná, rastlina sa buď nachádza v stresových podmienkach ovplyvňujúcich funkciu PSII, napr. poškodenie príliš vysokou svetelnou intenzitou, vysoká teplota, atď., alebo je to dôsledok pretrvávajúcich NPQ procesov relaxujúcich veľmi pomaly (Genty *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1993). F_v/F_m sa vypočíta podľa nasledovného vzťahu:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

2. Nefotochemické procesy

Východným parametrom pre výpočet NPQ je maximálna hodnota fluorescencie pri vzorke adaptovanej na tmu - F_m . Zmeny v intenzite energie disipovanej vo forme tepla sa odrážajú na maximálnej hodnote fluorescencie. Hodnota NPQ udáva relatívnu zmenu v tepelnej disipácii vzhľadom na daný parameter a vypočíta sa podľa nasledujúceho vzťahu:

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

NPQ je lineárne závislé na množstve energie uvoľnenej vo forme tepla a nadobúda hodnoty 0,5 až 3,5 pri saturačných svetelných pulzoch (Bilger & Björkman, 1990; van Kooten & Snel, 1990).

2.5 Inzerčné mutanty a PCR genotypovanie

2.5.1 *Arabidopsis thaliana* – rastlinný modelový organizmus

Modelové organizmy slúžiace na výskum a analýzu procesov prebiehajúcich v živých organizmoch majú v modernom vedeckom svete jednoznačne svoje miesto. Postupom času sa prešlo od skúmania niekoľkých rôznych druhov k jednému konkrétnemu, ktorý sa tak dostával do popredia a poznatky o jeho fungovaní či štruktúre sa začali hromadiť. Na základe prvotných výsledkov sa dalo ľahšie stavať a čoraz pokročilejšie technológie umožnili detailnejšie a hlbšie analýzy. Poznatky získané skúmaním modelových organizmov sa následne dali dobre aplikovať na ostatné, najmä ekonomicky významné druhy. Ako modelový organizmus pre rastliny a občas aj štúdium eukaryotickej bunky ako takej sa používa *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana (Arábkovka Thalova) je kvitnúca rastlina z čeľade kapustovité (*Brassicaceae*). Vyskytuje sa takmer po celom svete, od Severnej Ameriky cez Európu po Áziu. Rôzne geografické lokality, kde sa *Arabidopsis* vyskytuje, podnietili vznik niekoľkých ekotypov. Ekotypy Columbia a Landsberg sú štandardne využívané v molekulárnej biológii, genetike a aj v rastlinnej fyziológii.

Ide o malú rastlinu dosahujúcu výšku 15 - 20 cm s krátkym generačným cyklom trvajúcim cca 6 týždňov od vyklíčenia po dozretie semien. Listy *Arabidopsis* vyrastajú v prízemnej ružici a sú pokryté trichómami, vďaka čomu sa môžu využívať na štúdium morfogenézy a bunecnej diferenciácie. Kvety sú malé biele a dokážu sa samoopeliť. Plodom sú hojne sa vyskytujúce šešule na každej rastline, ktoré obsahujú veľké množstvo malých semien.

Dôvodov, prečo sa práve *Arabidopsis* stala modelovým organizmom v rastlinnom výskume, je niekoľko. Ide najmä o jej relatívne malý genóm, ktorý je plne osekvenovaný, rastliny sú nenáročné na pestovanie, vďaka svojej veľkosti nezaberajú veľa priestoru, a v priebehu roka je možné dostať až niekoľko generácií (Meinke *et al.*, 1998).

2.5.2 T-DNA inzerčné línie

Mutagenéza patrí medzi najvýznamnejšie metódy štúdia génov. Na základe fenotypického prejavu mutácie je možné analyzovať funkciu génu a jeho význam pre biochemické a bunecné procesy. Fenotyp mutantného jedinca sa porovná s fenotypom jedinca divokého typu (wild type, WT), čo umožní určiť funkciu skúmaného génu. Na štúdium funkcie génov sa využívajú 2 typy mutantných jedincov: knock-down, keď je gén exprimovaný v menšej miere než u WT rastliny, alebo knock-out, keď je gén plne

nefunkčný. Najčastejšie využívanou metódou na prípravu knock-out mutantov je inzercia T-DNA baktériou *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens obsahuje Ti plazmid, z ktorého sa po infikovaní rastlinnej bunky do jej chromozómu vloží časť sekvencie, tzv. transfer-DNA, alebo T-DNA. V prirodzenom prostredí T-DNA obsahuje gény pre syntézu rastlinných hormónov a opínov. Rastlinné hormóny indukujú rast nádorov na hostiteľskej rastline, opíny sú vylučované z buniek a slúžia ako zdroj potravy pre baktérie (Christie & Gordon, 2014). T-DNA sekvencia v plazmide sa dá nahradiť inou, želanou sekvenciou, ktorá má byť vnesená do rastlinného chromozómu. Miesto vloženia T-DNA v chromozóme je náhodné a v prípade, že k vloženiu dôjde v oblasti nejakého génu, je tento gén väčšinou vypnutý. Pre fyziologické analýzy sú najlepšou voľbou línie s T-DNA vloženou v sekvencii exónu skúmaného génu, pretože je tak zaručené jeho vypnutie. Pokiaľ je T-DNA vložená v inej časti sekvencie génu, nemusí viesť k jeho úplnému znefunkčneniu (Krysan *et al.*, 1999; O'Malley *et al.*, 2015; Wang, 2008).

V rámci niekoľkých projektov sa vedeckým skupinám postupne podarilo vytvoriť viac ako 260 000 rôznych inzerčných mutantov *Arabidopsis thaliana*, ktoré sa využívajú vo výskume po celom svete. T-DNA mutantné línie vytvorené v rámci týchto projektov sú usporiadané do niekoľkých kolekcí, napríklad SALK, GABI-KAT, SAIL a WISC, ktoré vznikli mutagenézou ekotypu Columbia (Col-0). Najpoužívanejšia vo výskume je kolekcia SALK (Alonso *et al.*, 2003; O'Malley *et al.*, 2015; Rosso *et al.*, 2003 Sessions *et al.*, 2002; Woody *et al.*, 2007). V súčasnosti existuje knock-out mutaná línia *Arabidopsis* takmer pre každý jeden jej gén (Meinke *et al.*, 1998).

2.5.2.1 Dedičnosť mutantných alel

Mutantná alela môže byť prítomná u diploidnej *Arabidopsis thaliana* v jednej alebo dvoch kópiách. Pokiaľ je prítomná len jedna kópia, daný jedinec je heterozygotný a plný mutantný fenotyp sa nemusí prejaviť, pretože gén má zachovanú funkciu vďaka prítomnosti druhej klasickej alely. Mutantný jedinec s dvomi kópiami je homozygotný, a v tomto prípade je gén plne nefunkčný. Vo výskume je najvýhodnejšie využiť homozygotné jedince, pretože porovnaním s WT jedincom sa relatívne jednoducho analyzuje funkcia a význam génu. V niektorých prípadoch je možné využiť aj heterozygotného jedinca, pokiaľ je mutácia prítomná v oboch alelách letálna (Krysan *et al.*, 1999).

Dedičnosť mutantných alel z rodiča na potomka podlieha Mendelovým zákonom. Vďaka tomu je možné po analýze genotypu určitého jedinca určiť štiepny pomer zloženia mutantných alel v rámci potomstva. 3 základné zákony genetiky formuloval v 19. storočí Johann Gregor Mendel na základe experimentov s hrachom siatym (*Pisum sativum*) a ich stručné znenie je nasledovné:

- 1. Zákon uniformity F1 generácie** – Pri krížení homozygotných rodičov v jednom znaku sú všetci potomkovia v F1 generácii geotypovo a fenotypovo rovnakí. Každý z potomkov má heterozygotnú výbavu alel, pričom pokiaľ je nejaká z alel dominantná, určí fenotyp všetkých jedincov.
- 2. Zákon segregácie alel v F2 generácii** – Pri krížení jedincov z F1 generácie (heterozygotov) dochádza ku kombinovaniu alel a jedince v F2 generácii sú geotypovo a fenotypovo odlišní. Rôzne kombinácie genotypov sa vyskytujú v určitých pomeroch. Pri monohybridnom krížení je genotypový a fenotypový štiepny pomer, pokiaľ je medzi alelami vzťah neúplnej dominancie, 1:2:1. Pokiaľ je jedna alela plne dominantná nad druhou, fenotypový štiepny pomer je 3:1 v prospech dominantnej alely.
- 3. Zákon o voľnej kombinateľnosti alel** – Alely z rôznych génov sa môžu voľne kombinovať, čím sa vytvára toľko odlišných kombinácií v gamétach, koľko ich je možných. Každá alela má rovnakú pravdepodobnosť dostať sa do pohlavnej bunky a byť tak prenesená na potomka.

Niekedy je potrebné získať rastlinu s dvomi alebo viacerými rôznymi mutantnými génmi. Pokiaľ je výsledný fenotyp viacnásobného mutanta iný ako fenotyp WT jedinca či jednoduchých mutantov, proteíny kódované ovplyvnenými génmi pravdepodobne spolu nejakým spôsobom interagujú. Viacnásobné mutanty je možné pripraviť krížením jednoduchých mutantov obsahujúcich žiadané gény. Fenotypový a genotypový štiepny pomer sa dá ľahko zistiť rôznymi metódami, pričom najpraktickejší je Punnetov štvorec.

Punnetov štvorec je prehľadná tabuľka, ktorá má po obvode vypísané všetky možné kombinácie alel, ktoré môže rodičovský jedinec vytvoriť. Vnútro tabuľky tvoria vzájomné kombinácie vždy jednej alely od jedného rodiča a druhej alely od druhého rodiča. Kombinácie alel predstavujú možnú genetickú výbavu potomkov a Punnetov štvorec umožňuje určiť pravdepodobnosť, s akou sa medzi potomkami vyskytne. V prípade dvojitéch mutantov je väčšinou snaha získať jedinca, ktorý obsahuje všetky 4 alely mutantné, teda recesívny homozygot v oboch znakoch. Frekvencia recesívnych homozygotov pri dihybridnom krížení je 1:15 (Tab. 1).

Tab. 1: Punnettov štvorec pri krížení dvoch heterozygotných rodičov v oboch znakoch. Žltou vyznačený recesívny homozygot v oboch znakoch.

Rodičovské gaméty	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

V prípade, že sa gény nachádzajú na rovnakom chromozóme, uplatňuje sa medzi nimi väzba génov. Čím je menšia vzdialenosť medzi génmi na chromozóme, tým väčšia je pravdepodobnosť, že budú zdedené spoločne. Pre gény vo väzbe neplatí zákon o voľnej kombinovateľnosti alel a jediná možnosť, ako môže dôjsť k ich vzájomnému oddeleniu u potomkov, je crossing-over. Ak gény ležia príliš blízko pri sebe, pravdepodobnosť crossig-over v mieste medzi nimi sa blíži nule. Génová väzba výrazne ovplyvňuje genotypový a fenotypový štiepny pomer v rámci potomstva a určenie štiepných pomerov značne komplikuje. V prítomnosti génovej väzby môže byť selekcia dvojitého mutantu podstatne náročnejšia (Snustad & Simmons, 2012).

2.5.3 Analýza genotypov T-DNA mutantov

U mutantných rastlín sa často nedá iba na základe vonkajšieho fenotypového prejavu rozpoznateľného voľným okom určiť jeho genotyp. Preto sa prítomnosť T-DNA inzercie v genotype rastliny zisťuje metódou PCR.

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) bola prvý raz popísaná v roku 1984 a odvtedy si právom vyslúžila titul jednej z najpoužívanějších a najdostupnejších metód v molekulárnej biológii a genetike. Princíp metódy je v namnožení určitého úseku DNA pomocou enzýmu DNA polymeráza. Po niekoľkých cykloch vznikajú až milióny kópií pôvodnej molekuly. Výhodou tejto metódy je spoľahlivé zistenie prítomnosti hľadanej sekvencie DNA, aj keď je vzorka málo purifikovaná. DNA polymeráza potrebuje na spustenie replikácie určitý oligonukleotid (primer) komplementárny k vláknu DNA, ktoré má byť replikované. Pomocou konkrétneho primeru pre skúmaný gén je možné vďaka PCR určiť, či je jeho sekvencia vo vzorke prítomná alebo nie, prípadne v akej kvantite. Ako už vyplýva z názvu, reakcia prebieha v cykloch. Jeden cyklus je zložený z troch častí: denaturácia DNA reťazca, pripájanie primerov na komplementárne sekvencie (annealing) a samotná replikácia.

Pre správny priebeh PCR sú potrebné 4 zložky: úsek DNA, ktorý treba namnožiť, 2 typy primerov (ľavý – LP, FP, označujúci ľavú hranicu, kde začína génová sekvencia,

a pravý – RP, ktorý ohraničuje pravý koniec replikovanej sekvencie), ktoré nasadajú na vlákno DNA, enzým DNA polymeráza a voľné nukleotidy. Prvá časť cyklu prebieha za zvýšenej teploty (90 – 98 °C), aby došlo k denaturácii dvojzávitnice DNA a jej rozdeleniu na 2 samostatné reťazce.

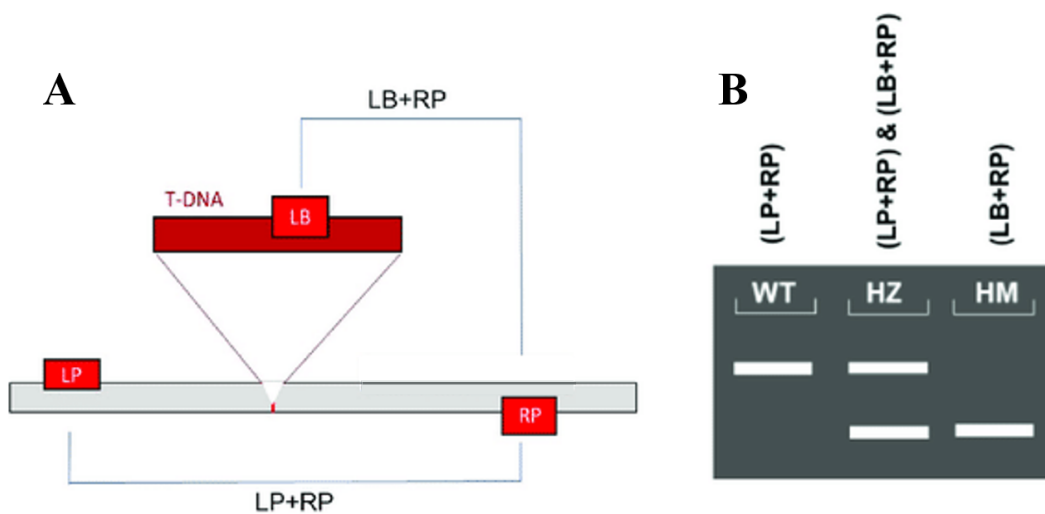
Následne prichádzajú na rad DNA primery. Primer je krátka sekvencia nukleotidov umožňujúca začiatok replikácie DNA polymerázou. Vďaka komplementarite reťazcov sa primer viaže vždy len na určité miesto v DNA reťazci, čo robí PCR reakciu vysoko špecifickou. Annealing prebieha pri nižšej teplote, medzi 50 a 65 °C, pričom každý primer má svoju špecifickú teplotu použitia.

V závere prvého cyklu DNA polymeráza rozpoznáva naviazaný primer a na jeho posledný nukleotid pridáva prvý nukleotid syntetizovaného vlákna. Vlákna s naviazanými primermi slúžia vďaka komplementarite báz ako šablóna pre vznik nových. Výsledkom je vznik presných kópií pôvodnej dvojzávitnice DNA. Bilanciou prvého cyklu sú dve identické molekuly, pričom každá obsahuje jedno staré materské a jedno novonasyntetizované vlákno a cyklus sa opakuje na oboch nových molekulách. Po stanovenom počte cyklov reakcia skončí dosyntetizovaním nových vlákien a k ďalšej denaturácii už nedochádza. Replikácia prebieha pri teplote 65 – 75 °C, čo je teplota, pri ktorej by väčšina enzýmov denaturovala, preto sa v PCR reakcii využíva polymeráza získaná z termofilných organizmov, napr. *Thermus aquaticus*. (Gibbs, R.A., 1990; Saiki *et al.*, 1988)

Pomocou PCR sa dá veľmi rýchlo namnožiť jediná molekula DNA na množstvo viditeľné pomocou gélovej elektroforézy. Agarózová elektroforéza umožňuje rozdelenie DNA fragmentov na základe ich veľkosti a následnú vizualizáciu. Záporne nabitý fragmenty DNA putujú v jednosmernom elektrickom poli ku kladne nabitej elektróde a počas pohybu sú zadržované v póroch gélu. Malé fragmenty prechádzajú pórmi najrýchlejšie, preto doputujú najďalej. Veľké fragmenty sú zadržované a gélom prechádzajú pomalšie. Rozdielna rýchlosť rôznych veľkých fragmentov umožňuje ich rozdelenie.

Vzorky z agarózovej elektroforézy treba následne vizualizovať. Používajú sa farbivá viažuce sa na DNA, ako EtBr, SYBR gold, Crystal violet a ďalšie. V tejto práci bol na vizualizáciu použitý EtBr (2,7-diamino-10-etyl-9-fenyl-fenantridinium bromid), ktorý sa viaže medzi bázy v DNA. EtBr je fluorescenčné farbivo, ktoré po excitácii UV svetlom emituje fotóny vo viditeľnej oblasti svetla a umožňuje tak pozorovať prítomnosť DNA fragmentov v géli.

Komplementarita primerov ku konkrétnej DNA sekvencii umožňuje určiť alelické zloženie daného jedinca. Primer viažuci sa v rámci sekvencie T-DNA umožňuje amplifikáciu od počiatku génu po inzerčnú sekvenciu. Pokiaľ je mutantná alela prítomná, amplifikácia nastane pri využití T-DNA špecifického primeru, zatiaľ čo v alele divokého typu k replikácii nedôjde. Primer špecifický pre WT alelu umožní replikáciu WT alely, ale mutantná alela replikovaná nebude (Obr. 7A). Vizualizáciou na géli sa tak dá pri kombináciách primerov pre alely divokého typu a pre T-DNA určiť genotyp skúmanej vzorky (Obr. 7B) (Ylmaz *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).



Obr. 7 PCR genotypovanie T-DNA inzerčných mutantov; A - schematické znázornenie primerov nasadajúcich na vlákno DNA, T-DNA je rozpoznávaná LB primerom; B - vizualizácia amplicónov pomocou gélovej elektroforézy pre možné kombinácie prítomných alel; prevzaté (Batth *et al.*, 2020) a upravené.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Rastlinný materiál

- *Arabidopsis thaliana* – ekotyp Columbia (Col-0, WT)

T-DNA inzerčné mutanty *A. thaliana*:

- *soq1* (*soq1-3*, SALK_139953c)
- *lhcb6* (SALK_077953)
- *lcnp* (SALK_133049c)
- *uip* (SALK_099844)
- *soq1 lhcb6* – vznikol skrížením mutantov *A. thaliana* s T-DNA inzerciou v géne *SOQ1* (SALK_139953c) a v géne *LHCB6* (SALK_077953)
- *soq1 uip* - vznikol skrížením mutantov *A. thaliana* s T-DNA inzerciou v géne *SOQ1* (SALK_139953c) a v géne *UIP* (SALK_099844)

3.1.2 Chemikálie a komerčné kity

- 0,5x TBE (Tris/Borate/EDTA) pufer
- agaróza (Sigma, USA)
- destilovaná voda
- etanol 70% a 96 %
- etídium bromid
- čistiaci prostriedok na GMO – Krystal SANAN KLASIK
- NucleoSpin® Plant II kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Thermo Scientific™ Phire™ Plant Direct PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.3 Technický materiál

- 96-jamkové mikrodostičky (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Analytické váhy (Scaltec instruments GmbH, Nemecko)
- Centrifúga (Labnet International, Inc., USA)
- DUAL-Pam-100 (Walz, Nemecko)
- Fytotron (Weiss Gallenkamp, Veľká Británia)
- Horizontálna elektroforetická komôrka (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Chlorofylmeter SPAD-502DL (Konica Minolta, Inc., Japonsko)
- Lyofilizátor (LaboGene, Dánsko)
- Malá centrifúga (VWR, Inc., USA)
- Mikroskúmavky (Eppendorf, Nemecko)
- Mikrovlnná rúra, papierové vrecúška, pinzety, lepiaca páska
- Mixer Mill (Retsch GmbH, Nemecko)
- Sada automatických pipiet (Nichipet, USA)
- Smartfón s fotoaparátom (Asus, Taiwan)

- Spektrofotometer NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Thermal cycler (Bio-Rad, USA)
- UV transilluminátor (Syngene International Limited, India)
- Vodný ohrievač (Grant Instruments Ltd, Anglicko)
- Zdroj jednosmerného napätia (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.4 Počítačové programy na spracovanie výsledkov

- Microsoft Excel a Powerpoint (MS Office, USA)

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava a genotypizácia dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*

3.2.1.1 Pestovanie rastlinného materiálu

Všetky experimenty boli vykonané na rastlinách *A. thaliana*, konkrétne na inzerčných mutantoch z kolekcie SALK. Použité boli rôzne genotypy, menovite: divoký typ – Columbia (WT), mutantné línie s T-DNA inzerciou v géne pre proteín SOQ1 a v géne *LHCB6* a *UIP*. Vzájomným krížením daných línií boli pripravené rastliny homozygotné v oboch génoch, teda homozygotný mutant *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*.

Semená boli pred výsevom vložené do mikroskúmavky s vodou, zabalené v alobale a stratifikované pri teplote 4 °C po dobu 72 hodín v tme. Po stratifikácii boli semená vysiate do kvetináčov, pričom do jedného kvetináča sa ich vysialo 5, a uložené do fytotronu pri podmienkach deň – 16 h, 19 °C, intenzita svetla 130 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$, noc – 8 h, 18 °C, tma. Vlhkosť vzduchu bola konštantná po celý deň 65 %. Vo veku 3 týždňov boli jednotlivé vyklíčené rastliny presadené do samostatných kvetináčov.

3.2.1.2 Priama a nepriama metóda prípravy vzorky na PCR reakciu

Genotypovanie bolo realizované priamou PCR metódou podľa protokolu Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Master Mix, pričom bol nasledovaný postup odporúčaný výrobcom.

Priama príprava vzorky pozostávala zo separácie kúska listu z minimálne 2-týždňovej rastliny o veľkosti približne 1x2 mm² nožnicami. Po každom oddelení vzorky boli nožnice postupne sterilizované v skúmavkách s čistiacim prostriedkom na GMO Krystal SANAN KLASIK, 70 % etanolom a destilovanou vodou. Po odobratí bola časť listu vložená do mikroskúmavky s 20 μl dilučného pufru, ktorý bol súčasťou použitého komerčného kitu, a rozotretá špičkou pipety o steny skúmavky. Získaný slabo-zelený extrakt sa použil v PCR reakcii.

Nepriama príprava vzorky sa využila iba raz, na záver genotypovania, a pozostávala z izolácie čistej DNA. Najskôr bolo treba rastlinný materiál homogenizovať. Do mikroskúmaviek boli vložené po 2 - 3 listy zo 4-týždňových rastlín a ponechané cez noc vysušiť a lyofylizovať. Následne sa k listom pridali sklenené guľičky a materiál sa homogenizoval v mlynčeku 3 min pri 130 otáčkach min⁻¹.

Samotná izolácia DNA prebiehala podľa protokolu doporučeného výrobcom využitého komerčného kitu NucleoSpin® Plant II kit. V prvom kroku v homogenizovanej vzorke došlo k lýze buniek a degradácii RNA za použitia pufru PL1, RNAzy a inkubácie

pri 65 °C. Vzniknutý lyzát sa prečistoval v NucleoSpin® Filtri. K získanému filtrátu sa pridal PC pufer na zvýšenie väzbovosti DNA, ktorá sa lepšie naviazala na NucleoSpin® Column v priebehu druhej filtrácie. NucleoSpin® Column sa trikrát premyl na prečistenie vzorky. Premytie prebiehalo raz v PW1 pufre a dvakrát v PW2 pufre. Na záver sa izolovaná DNA uvoľnila z NucleoSpin® Column pomocou dvojitého filtrovania PE elučným pufrom, ktorý bol predhriaty na teplotu 65 °C. Koncentrácia získanej DNA sa stanovila spektrofotometricky pre každú vzorku pri vlnových dĺžkach 260 nm a 280 nm na NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA). Na použitie v PCR reakcii bola získaná DNA z každej vzorky DNA nariadená na koncentráciu 10 ng/μl.

3.2.1.3 Podmienky PCR reakcie

Samotná PCR reakcia prebiehala v 96 jamkovej mikrodosťičke s využitím komerčného kitu Thermo Scientific™ Phire™ Plant Tissue Direct PCR Master Mix. Postupovalo sa podľa protokolu odporúčaného výrobcom. Jedna reakčná zmes mala objem 10 μl, pričom ju tvorilo 4,55 μl vody, 5 μl Phire Plant Direct PCR Master Mix, 0,2 μl zmesi primerov s koncentráciou 25 μmol.l⁻¹ a 0,25 μl vzorky. Sekvencie použitých primerov sú uvedené v tabuľke 2. Po pridaní všetkých zložiek sa reakcia nechala prebiehať v krokoch podľa PCR protokolu s podmienkami uvedenými v tabuľke 3. Teplota potrebná pre nasadenie primerov (annealing) sa získala pomocou nástroja na stránke Thermo Fisher Scientific Home Page (<https://www.thermoscientific.com/pcrwebtools>).

3.1.3 Elektroforéza na agarózovom géli

Na vizualizáciu výsledkov PCR reakcie bola použitá metóda elektroforézy na agarózovom géli. Bol použitý 1,2 % gél, ktorý vznikol zmiešaním príslušného množstva agarózy v 0,5x TBE (Tris/borate/EDTA) pufre. Agaróza sa nechala v pufre rozpustiť v mikrovlnnej rúre a po ochladení sa roztok nalial do vane s elektroforetickými hrebeňmi, kde sa nechal stuhnúť. Na gél sa okrem vzoriek naniesol aj veľkostný marker GeneRuler™ Express DNA Ladder. Elektroforéza prebiehala 55 minút pri napätí 4 V.cm⁻¹. Po ukončení elektroforézy sa gél nechal nafarbiť po dobu 15 - 20 minút v EtBr a odfotil v UV transiluminátore (400 ms).

3.2.2 Fyziologická charakterizácia rastlín

3.2.2.1 Pestovanie rastlinného materiálu

Na fyziologickú charakterizáciu boli okrem pripravených dvojitých homozygotných mutantov využité aj ďalšie genotypy, menovite išlo o mutanty *soq1*, *lcnp*, *lhcb6*, *uip* a WT. Semená sa v mikroskúmavkách nechali stratifikovať 48 hodín pri 4 °C v tme a boli

Tab. 2: Typy a sekvencie primerov použitých v PCR genotypovaní.

Sledovaný gén	Typ primeru	Sekvencia primeru
<i>SOQ1</i>	FP	AGGAGGTGTTGCTTCAGTCA
	RP	TAACATGCACATTCTGTCACAC
<i>LHCB6</i>	FP	GGTGAGGAACGAAGAACCAA
	RP	CCAAACTCCCGACTTTACCA
<i>UIP</i>	FP	GGTCCTGCTAGCTCTCTTCG
	RP	AGACAACCCTTGTTTCTTGGAGA
LBb1 – T-DNA inzercia	univerzálny	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

Tab. 3: Protokol využívaný na PCR reakciu pri genotypovaní.

Cyklický krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
Iniciálna denaturácia	98	5 min	1
Denaturácia	98	5 s	34
Annealing	63	5 s	
Samotná replikácia	72	1 min	
Finálna replikácia	72	1 min	1
Ukončenie reakcie	4	∞	

vysiate do kvetináčov. Rastliny boli pestované vo fytotrone pri podmienkach: deň – 8 h, 21 °C, intenzita svetla 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; noc – 16 h, 21 °C. Po celý deň bola konštantná 65 % vlhkosť. Na experimenty sa využili rastliny staré 7 týždňov.

3.2.2.2 Stanovenie obsahu chlorofylu v listoch

Na určenie množstva chlorofylu v listoch sa využila nedeštruktívna metóda, konkrétne chlorofylmeter (SPAD-502DL, Japonsko). Chlorofylmeter využíva absorbciu niektorých vlnových dĺžok chlorofylom a na základe nameraných hodnôt určí koncentráciu v relatívnych jednotkách SPAD (soil-plant analysis development), ktoré sú odvodené podľa názvu prístroja SPAD-502DL. Na výpočet sa používa absorbancia pri dvoch rôznych vlnových dĺžkach – 650 nm (blízko absorpčného maxima chlorofylu) a 940 nm (chlorofyl absorbuje len minimálne). Merané listy sa bez oddelenia z rastliny vsunuli do meracieho klipu a klip sa uzavrel, čím sa spustilo meranie. Výsledný obsah chlorofylu sa vypočítal ako priemer z 8 listov rôznych rastlín rovnakého genotypu.

3.2.2.3 Dual-PAM

Aktivita PSI a PSII bola meraná pomocou prístroja Dual-PAM-100 (Walz, Nemecko). Dual-PAM umožňuje simultánne merať pomalý fluorescenčný indukčný jav a zmeny absorbancie P700. Rastliny boli pred meraním vždy adaptované na tmu po dobu 30 min.

Meranie sa uskutočnilo na jednom oddelenom liste, ktorý sa umiestnil medzi meracie hlavice prístroja. Stopka listu bola počas celej doby merania vložená v kvapke vody.

Meranie prebiehalo podľa nasledujúceho protokolu:

- meracie svetlo bolo 24 μE ;
- aktinické svetlo s intenzitou 1280 μE bolo zapnuté počas prvej polovice protokolu, v druhej polovici protokolu sa vzorka nachádzala v tme;
- saturačné pulzy mali intenzitu 10000 μE a trvali 300 ms, aplikovali sa 10 s, 30 s a 60 s po zapnutí aktinického svetla a následne v 60 s intervaloch až do ukončenia merania.

3.2.2.4 Štatistické vyhodnotenie

Namerané hodnoty boli porovnávané medzi sebou pomocou t-testu v programe Microsoft Excel a štatisticky významný rozdiel sa stanovoval ako $p < 0,05$.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Proteín SOQ1 potláča relatívne neznámu a nie veľmi preskúmanú formu NPQ – qH. Nefotochemické zhášanie využívajú rastliny na prispôbenie sa meniacim sa svetelným podmienkam. Predošlé výsledky ukázali, že SOQ1 interaguje s ostatnými proteínmi na tylakoidnej membráne, avšak identita jeho interakčných partnerov zatiaľ ostáva neznáma (Brooks *et al.*, 2013). Jednou z možností sú LHCI antény, ale na preukázanie tohto tvrdenia sú potrebné ďalšie výskumy. Okrem možnej interakcie s LHCI proteínmi sa pomocou yeast-two-hybrid experimentu naznačila slabá interakcia SOQ1 s proteínom HCF136 a s malým neznámym proteínom (UIP) kódovaným génom At2g26340 (viď. kapitola 2.3.2) (Brooks *et al.*, 2012).

Hypotéza, že SOQ1 môže interagovať s LHCI anténami viedla k pilotnému skríningu inzerčných mutantov *A. thaliana* so zmeneným zložením svetlozberných antén. Zhášanie qH sa v prírode vyskytuje ako reakcia na stresové podmienky, napr. pri kombinácii vysokej intenzity svetla a chladu. Presne tieto podmienky využili Malnoë *et al.* (2018) k zisteniu, že chloroplastový lipokalín LCNP je zapojený do qH typu zhášania. Počas screeningového experimentu boli listy *A. thaliana* rôznych genotypov vystavené vysokej intenzite svetla v kombinácii s nízkou teplotou na indukciu qH. Cieľom screeningu bolo zistiť, či sa u niektorého z nich neobjaví výrazná zmena v qH. Testované genotypy zahŕňali WT, *lhcb4.3*, *lhcb3*, *lhcb5*, *lhcb6*, *lhcb7*, *lcnp*, *uip*, *soq1*, dvojité mutant *lhcb4.1 lhcb4.2*, trojitý mutant *NoM (lhcb5 lhcb4.1 lhcb4.2)* a päťnásobný mutant *lhcb3 lhcb6 lhcb4.1 lhcb4.2 lhcb4.3*. Výsledky pilotného experimentu neukázali žiadneho potenciálneho kandidáta, pretože žiadny z použitých mutantov nemal pri daných podmienkach výraznejšie ovplyvnenú úroveň NPQ (Ilíková, nepublikované výsledky).

Keďže v pilotnom experimente sa nepodarilo získať žiadneho kandidáta spomedzi použitých genotypov, bol výber uskutočnený na základe poznatkov z literatúry. Proteín UIP kódovaný génom At2g26340 bol identifikovaný ako možný interakčný partner proteínu SOQ1 (Brooks *et al.*, 2013), preto bol vybraný ako jeden z kandidátov. Minoritná anténa LHCB6 je nevyhnutná pre správnu funkciu a organizáciu svetlozberných komplexov PSII a jej neprítomnosť viedla k zmenám v qE a qZ typu NPQ počas experimentov s meraním chlorofylovej fluorescencie (Kovács *et al.*, 2006), preto bola zvolená ako druhý kandidátny proteín pre testy.

Mutantné rastliny *lhcb6* a *uip* boli skrížené s *soq1*. Výsledné dvojité mutanty umožňujú skúmanie interakcie chýbajúcich proteínov vďaka zmenám vo fenotype oproti

jednoduchým mutantom a WT. Postupnou selekciou došlo až k získaniu oboch želaných dvojitých mutantov v homozygotnom stave. Následne sa vybrané rastliny nechali dopestovať do semien a záverečným cieľom experimentov tejto práce bola ich fyziologická charakteristika zameraná najmä na zhášaciu analýzu.

4.1 Príprava dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*

Prvým cieľom práce bola príprava dvoch dvojitohomozygotných rastlín *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Genotypy jedincov vo všetkých generáciách boli zisťované pomocou PCR reakcie s následnou vizualizáciou získaných amplikónov pomocou elektroforézy na agarózovom géli a inkubáciou v EtBr.

PCR reakcia prebiehala podľa protokolu odporúčaného výrobcem komerčného kitu. Každá vzorka bola otestovaná 4 dvojicami primerov, pričom sa zisťovala prítomnosť WT a mutantnej alely. Všetky vzorky boli testované na prítomnosť T-DNA inzercie v géne *SOQ1*. Primery špecifické pre gény *LHCB6* a *UIP* sa použili vždy iba na vzorky jedincov, ktorých rodičia obsahovali odpovedajúcu mutantnú alelu. Jednotlivé kombinácie použitých primerov spolu s veľkosťou ich predpokladaných produktov sú v tabuľke 4.

Kombinácia primerov FP+RP umožňuje identifikovať prítomnosť aspoň jednej kópie WT alely, tj. bez T-DNA inzercie. Prítomnosť T-DNA inzercie medzi miestami väzby FP a RP primeru zabráni amplifikácii segmentu DNA, ktorý ohraničujú. T-DNA inzercia je relatívne dlhá sekvencia, ktorá po vložení do génu znemožní vznik jeho fungujúceho produktu. Pri PCR reakcii sa FP a RP primery v prítomnosti inzercie nachádzajú príliš ďaleko od seba a počas tretieho kroku cyklu sa segment, ktorý ohraničujú, nestihne zreplikovať.

Amplifikácia pri použití LBb1 primeru spolu s FP alebo RP naopak nastane len, pokiaľ aspoň jedna z dvojice alel obsahuje T-DNA inzerciu. Použitie FP alebo RP sa určuje na základe orientácie T-DNA inzercie v géno. Primer LBb1 viažuci sa na T-DNA inzerciu umožňuje jej identifikáciu. Pokiaľ mala vzorka amplifikáciu v oboch prípadoch, išlo o heterozygotného jedinca, ktorý mal vo svojom genotype jednu WT alelu a jednu alelu obsahujúcu T-DNA inzerciu.

4.1.1 Kríženie a F1 generácia

Ako rodičovské rastliny pri príprave dvojitých mutantov boli použité homozygotné mutanty *soq1* (SALK_139953c), *lhcb6* (SALK_077953) a *uip* (SALK_099844). Prvotným krížením mutantov *soq1* s *lhcb6* a *soq1* s *uip* bola získaná F1 generácia. Podľa Mendelových zákonov je F1 generácia uniformná, pričom všetci potomkovia sú hetero-

Tab. 4: Kombinácie primerov využitých na detegovanie jednotlivých alel.

Sledovaný gén	Kombinácia primerov	Predpokladaná veľkosť amplifikačného produktu (bp)	Detegovaná alela
<i>SOQ1</i>	FP + RP (oba <i>SOQ1</i>)	1182	WT <i>SOQ1</i>
	<i>SOQ1</i> FP + LBb1	550	Inzercia v <i>SOQ1</i>
<i>LHCB6</i>	FP + RP (oba <i>LHCB6</i>)	731	WT <i>LHCB6</i>
	<i>LHCB6</i> FP + LBb1	300	Inzercia v <i>LHCB6</i>
<i>UIP</i>	FP + RP (oba <i>UIP</i>)	940	WT <i>UIP</i>
	<i>UIP</i> FP + LBb1	450	Inzercia v <i>UIP</i>

zygotní. Ku segregácii alel dochádza až v F2 generácii a rôzne kombinácie alel sa vyštípiť s rôznym pomerom. F2 generácia bola získaná samoopelením jedincov F1 generácie. Križenie a pestovanie rastlín F1 generácie prebiehalo ešte pred začiatkom tejto práce. Získané semená F2 generácie boli zasadené a až tieto rastliny sa využili na genotypovanie.

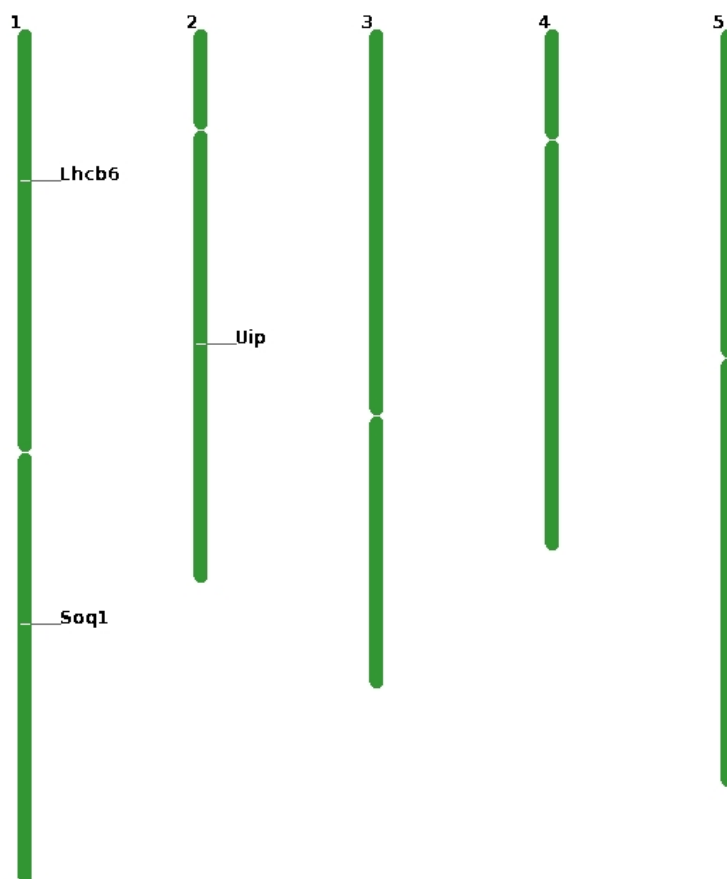
4.1.2 F2 generácia

Rozloženie alel v populácii potomkov po križení podlieha Mendelovým zákonom a v prípade dihybridného križenia naň môže vplyvať aj väzba génov. Frekvencie rôznych genotypov sa dajú ľahko dohľadať pomocou Punnettovho štvorca (viď kapitola 2.5.2.1). V F2 generácii bolo genotypovaných 40 potomkov z línie *soq1 lhcb6* a 27 z línie *soq1 uip*. Predpokladaný výskyt dvojnásobných homozygotov v F2 generácii je podľa Punnettovho štvorca 1:15, takže obe populácie sú dostatočne veľké, aby sa v nich aspoň jeden jedinec s hľadaným genotypom vyskytoval.

U línie *soq1 lhcb6* je treba brať do úvahy fakt, že gény *SOQ1* a *LHCB6* ležia u *A. thaliana* oba na chromozóme 1 (Obr. 8) a uplatňuje sa medzi nimi väzba génov. Výskyt génov na rovnakom chromozóme sťažuje ich rekombináciu, avšak je možná, keďže sa gény nachádzajú na rozdielnych chromatídach. Výsledný štiepny pomer v potomstve je v prítomnosti génovej väzby nižší než 1:15 a presne by sa dal určiť výpočtom s použitím genetickej mapy *A. thaliana*. U línie *soq1 uip* génová väzba neplatí, pretože gén *UIP* sa nachádza na chromozóme 2 a dedičnosť podlieha iba Mendelovým zákonom.

Línia *soq1 lhcb6*

Z F2 generácie z línie *soq1 lhcb6* sa na genotypovanie použilo 40 rastlín. Všetky rastliny mali napohľad rovnaký fenotyp, takže žiadna kombinácia génov sa nedala odlíšiť na základe jednoduchého pozorovania. V prvom kole genotypovania sa spomedzi všetkých



Obr. 8 Chromozómová mapa s lokalizáciou génov *LHCB6*, *SOQ1* a *UIP* u *A. thaliana*. Pripravené pomocou Arabidopsis Home Page (<https://www.arabidopsis.org/jsp/ChromosomeMap/tool.jsp>)

40 vzoriek ukázali rastliny č. 11,13 a 14 ako dvojité homozygotné mutanty. Taktiež sa podarilo identifikovať rastliny, ktoré boli homozygotné mutanty v jednom znaku a heterozygotné v druhom. Išlo o rastliny č. 17, 22 a 30, ktoré by mohli byť v krajnom prípade použité na ďalšie experimenty, pokiaľ by dvojitá mutácia ovplyvnila rast a vývoj rastlín natoľko, že by sa nepodarilo získať semená na ďalšie experimenty (Obr. 9).

Keďže bola využitá priama metóda pri príprave vzoriek a nie izolovaná DNA, bolo nezanedbateľné riziko falošne negatívnych výsledkov PCR amplifikácie z dôvodu možnej prítomnosti kontaminantov inhibujúcich PCR reakciu. Z tohto dôvodu boli vytipované vzorky podrobené genotypovaniu ešte raz.

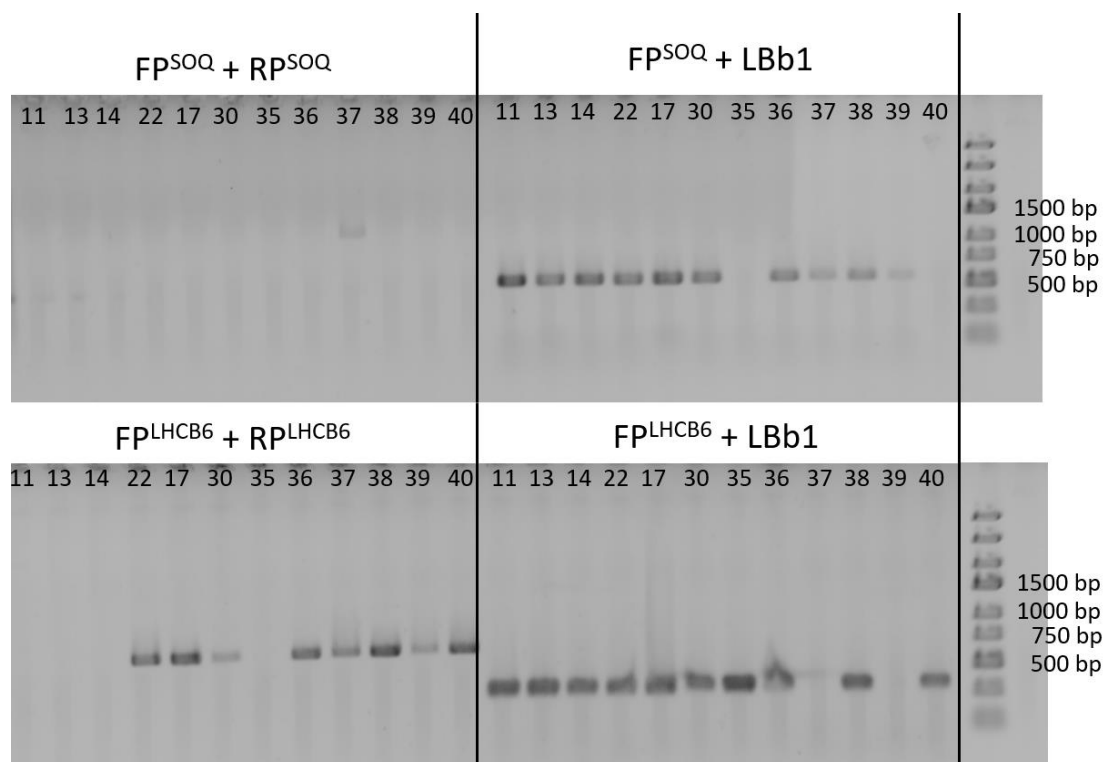
Vzorky 17 a 22 sa potvrdili ako homozygotné mutanty v jednom znaku a heterozygotné v druhom. Číslo 13 malo veľmi slabú amplifikáciu pri WT primeroch z génu *soq1*, takže jeho dvojito homozygotný genotyp ostával otázný. Pri vzorke 11 pribudla amplifikácia pri WT primeroch génu *SOQ1*, takže sa tento jedinec zaradil do skupiny ku 17 a 22 (Obr. 10). Vzorky 14 a 30 boli nakoniec heterozygotné v oboch

znakoch a ďalej sa s nimi nepracovalo. V prvom kole genotypovania nastal zrejme problém pri amplifikácii s použitím primerov WT alely génu *SOQ1*. Pri opakovanom experimente sa vzorky pôvodne homozygotné v tomto géne ukázali ako heterozygotné a pribudli práve amplifikácie tejto alely. V F2 generácii nebol identifikovaný žiadny dvojité homozygot, preto bolo potrebné genotypovaniu podrobiť aj F3 generáciu.

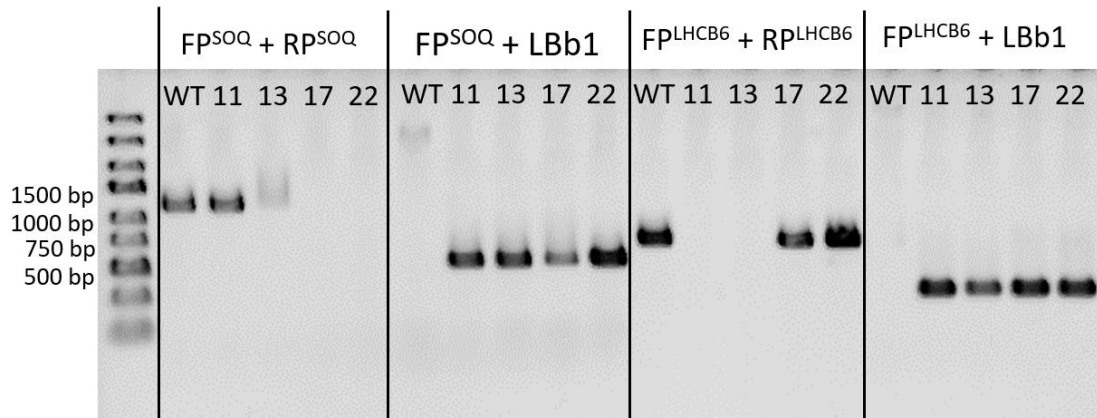
Línia *soq1 uip*

V prípade kríženia *soq1* s *uip* bolo testovaných 27 jedincov z F2 generácie. Podobne ako v predošlom prípade, ani teraz sa jednotlivé genotypy nedali odlíšiť na základe vonkajšieho fenotypového prejavu. V prvom kole sa podarilo identifikovať 3 vzorky obsahujúce všetky 4 mutantné alely – išlo o rastliny č. 8, 19, 26. Vzorka 25 vyšla ako homozygotný mutant v géne *UIP*, ale pre gén *SOQ1* sa neobjavila žiadna amplifikácia (Obr. 11).

Pri opakovanom genotypovaní vytipovaných kandidátnych rastlín sa bohužiaľ ani jedna z 3 vzoriek 8,19 a 26 nepotvrdila ako dvojité homozygot. Vzorka 8 a 26 bola heterozygotná pre gén *SOQ1* a homozygotný mutant v géne *UIP*. Jedinec č. 19 mal oproti predošlým dvom vymenenú kombináciu alel (Obr. 12). Opakovaná genotypizácia rastliny



Obr. 9 Vizualizácia výsledkov PCR genotypovania vybraných rastlín z F2 generácie z kríženia *soq1* x *lhcb6*. Jamky sú označené číslami vzoriek a primermi použitými na genotypovanie.

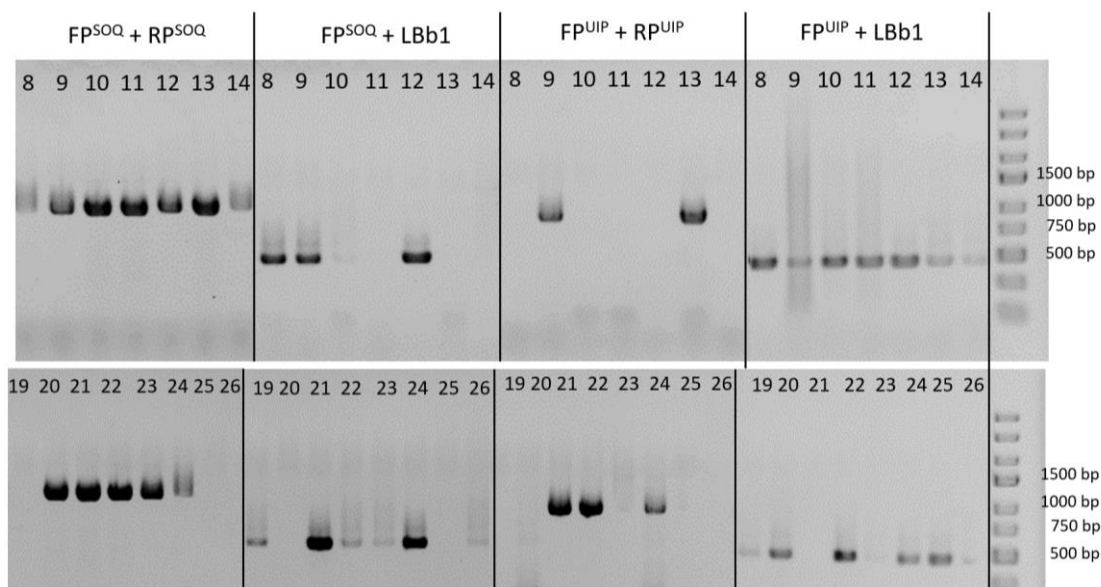


Obr. 10 Vizualizácia výsledkov pri opakovanom PCR genotypovaní vybraných rastlín z F2 generácie z kríženia *soq1* x *lhcb6* . Jamky sú označené číslami vzoriek a použitými primermi.

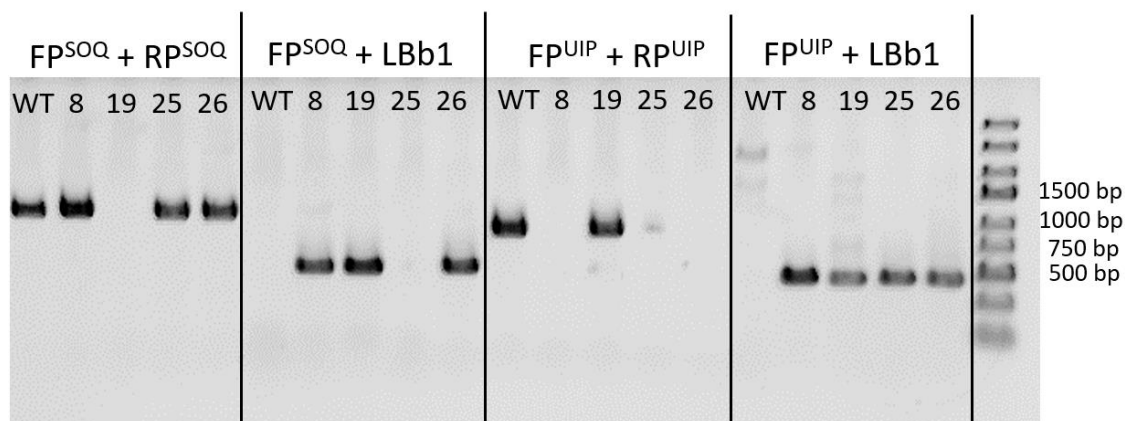
č. 25 ukázala, že vzorka je homozygotná pre WT alelu génu *soq1* a ďalej sa s ňou nepracovalo.

4.1.3 F3 generácia

Na záver genotypizácie F2 generácie sa žiadny zo skúmaných jedincov nepotvrdil ako dvojnásobný homozygot, preto bolo treba pristúpiť ku zasadeniu F3 generácie. Aby sa maximalizovala šanca na zisk čo najväčšieho počtu dvojitého homozygotných jedincov



Obr. 11 Vizualizácia výsledkov PCR genotypovania vybraných rastlín z F2 generácie z kríženia *soq1* x *uip* . Jamky sú označené číslami vzoriek a primermi použitými na genotypovanie.



Obr. 12 Vizualizácia výsledkov pri opakovanom PCR genotypovaní vybraných rastlín z F2 generácie z kríženia *soq1* x *uip*. Jamky sú označené číslami vzoriek a použitými primermi.

v F3 generácii, rodičmi sa stali tie jedince z každej populácie, ktorí boli homozygotní mutanti v jednom skúmanom znaku a heterozygotní v druhom (*soq1 lhb6* – vzorky 13, 17; *soq1 uip* – vzorky 8 a 19). Homozygotný rodič prenesie na potomstvo jedine mutantnú alelu, u heterozygotného jedinca sa alely vyštíepia v pomere podľa Mendelových zákonov 1:3, čo bol aj očakávaný štiepny pomer v F3 generácii.

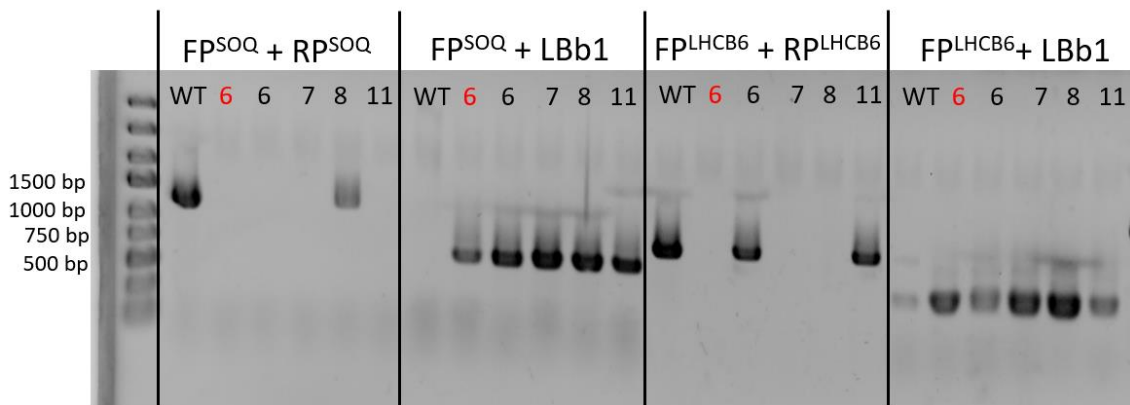
Na vysiatie F3 generácie sa vybrané rastliny nechali samoopeliť a semená sa nechali dozrieť. Vysadilo sa 15 potomkov od každého rodiča, každá rastlina bola nanovo očíslovaná a celá F3 generácia bola, podobne ako F2, podrobená genotypizácii v dvoch kolách. Očakávaný výskyt hľadaných mutantov bol 1:3, takže populácia bola dostatočne veľká, aby sa konečne podarilo identifikovať jedincov s hľadaným genotypom.

Línia *soq1 lhb6*

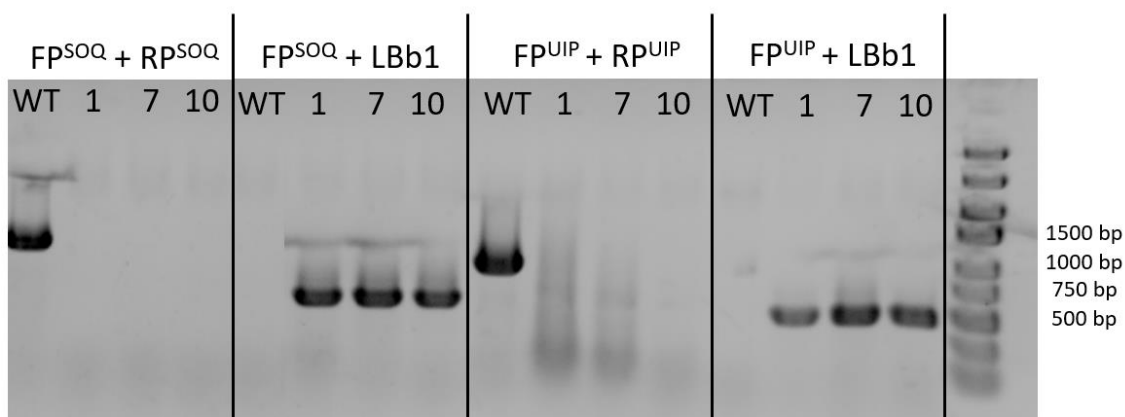
Od rodiča č. 13 sa najskôr podarilo izolovať jedného potomka s hľadanou kombináciou génov (vzorka 6), no ani ten sa pri opakovanej PCR reakcii nepotvrdil. Druhou využitou rastlinou z F2 generácie bolo č.17. V tomto prípade sa najskôr ukazovali 4 potenciálni kandidáti s hľadaným genotypom a pri opakovanom experimente boli potvrdení 2 – vzorky 7 a 8. (Obr. 13). Očakávaná frekvencia homozygotov v potomstve bola 1:3, reálna bola 2:15.

Línia *soq1 uip*

V potomstve získanom od rodiča č.8 sa už v prvom kole neobjavil žiadny jedinec s hľadanou kombináciou alel. Je tak pravdepodobné, že rodičovská rastlina mala iný genotyp, než ukázalo posledné genotypovanie kandidátov F2 generácie. U druhého rodiča z tejto línie (č. 19) sa ukázali v prvom kole 3 jedince s dvojito homozygotným zložením alel (vzorky 1,7,10), ktoré sa následne aj potvrdili (Obr. 14).



Obr. 13 Vizualizácia výsledkov pri opakovanom PCR genotypovaní vybraných rastlín z F3 generácie z kríženia *soq1-3* x *lhcb6*. Jamky sú označené číslami vzoriek a použitými primermi. Červenou označená vzorka 6 pochádzajúca od rodičovskej línie 13.



Obr. 14 Vizualizácia výsledkov pri opakovanom PCR genotypovaní vybraných rastlín z F3 generácie z kríženia *soq1* x *uip*. Jamky sú označené číslami vzoriek a použitými primermi.

Frekvencia homozygotných potomkov je, podobne ako u rodiča č.17, 1:5, čo je relatívne blízko predpokladanej frekvencie na základe Mendelových zákonov.

Izolácia DNA

Záverom selekcie dvojitého homozygotných mutantov bola izolácia DNA z vybraných 6 vzoriek (lína *soq1 lhcb6* – vzorky 7,8; línia *soq1 uip* – vzorky 1,7,10) a jej následné podrobenie PCR reakcii rovnakým spôsobom, ako boli testované priame vzorky počas celého genotypovania.

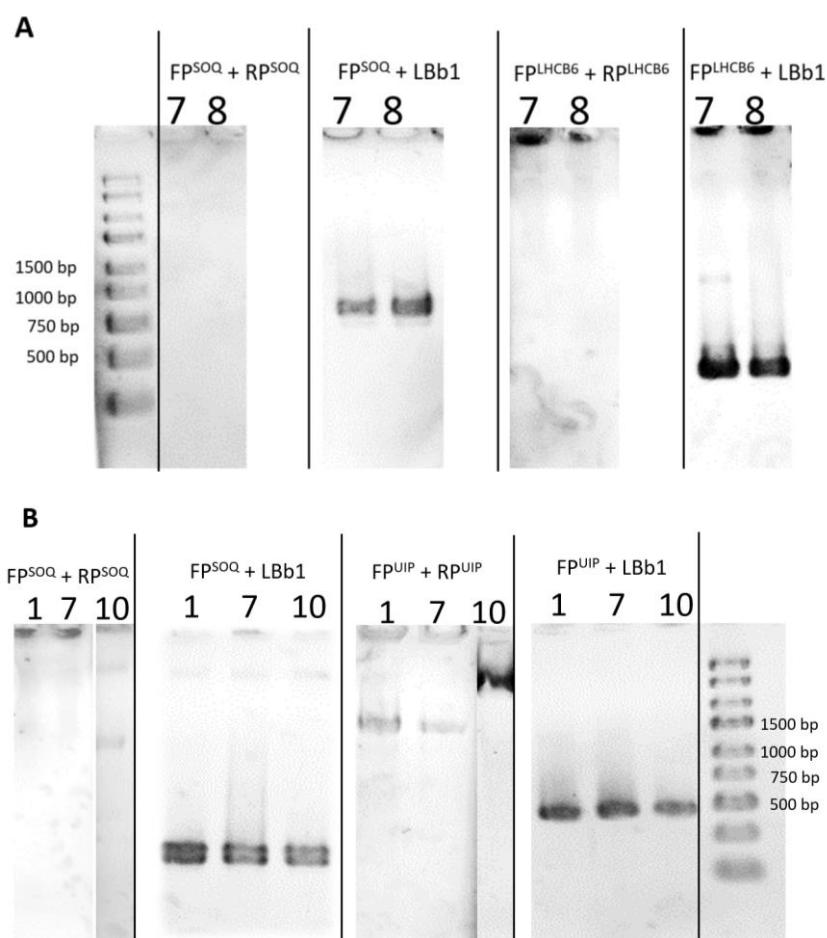
Izolácia čistej DNA predstavuje nepriamu prípravu vzorky na genotypovanie, je časovo náročnejšia, ale za to výsledky sú presné, pretože nedochádza k žiadnemu narušeniu priebehu reakcie kontaminujúcimi molekulami.

Tesne po samotnej izolácii DNA bola stanovená spektrofotometricky jej koncentrácia v 1 μ l pomocou prístroja NanoDrop. Z každej vzorky sa podarilo vyizolovať iné množstvo DNA (Tab. 5). Na použitie v PCR reakcii bola koncentrácia upravená riedením destilovanou vodou tak, aby finálna koncentrácia predstavovala 10 ng/ μ l.

Tab. 5: Koncentrácia izolovanej DNA. Vzorky začínajúce 17 označujú potomkov rastliny 17 línie *soq1 lhcb6*, vzorky začínajúce 19 označujú potomkov rastliny 19 línie *soq1 uip*.

Testovaná rastlina	Koncentrácia DNA (ng/μl)
WT	22,4
17-7	22,8
17-8	33,7
19-1	26,6
19-7	14,2
19-10	36,4

PCR genotypovanie s použitím čistej DNA potvrdilo 5 z 5 dvojitéch homozygotných mutantov (Obr. 15 A,B). Všetky dvojito homozygotné rastliny boli dopestované do semien, aby sa mohla nasadiť F4 generácia. Potomkovia čisto homozygotných rodičov zdedia rovnakú kombináciu alel, ako mali rodičia. Vo veku 7 týždňov boli rastliny F4 generácie použité na fyziologickú charakterizáciu.



Obr. 15 Vizualizácia výsledkov PCR genotypovania vybraných rastlín z F3 generácie línií *A. thaliana soq1 lhcb6* č.17 (A) a *soq1 uip* č.19 (B) s prípravou vzorky priamou metódou izoláciou DNA. Jamky sú označené číslami vzoriek a použitými primermi. Obrázky vznikli spojením fragmentov z viacerých gélov.

4.2 Fyziologická charakterizácia rastlín

Fyziologická charakterizácia pripravených mutantov prebiehala na rastlinách starých 7 týždňov a bola zameraná hlavne na charakterizáciu nefotochemického zhášania u vybraných rastlín *A. thaliana*. Hlavným cieľom bolo zistiť, či dvojité mutanty *soq1 lhcb6* a *soq1 uip* budú mať priebeh NPQ odlišný ako jednoduché mutanty, čo by naznačovalo interakciu medzi proteínom SOQ1 a LHCB6 alebo UIP.

Pre ilustráciu jednotlivých genotypov rastlín v období testovania bola vytvorená fotodokumentácia reprezentatívnych jedincov (Obr. 16). Fotografia ukazuje aj to, že dvojité mutanty mali voľným okom pozorovateľný mierne odlišný fenotyp – boli o niečo menšie než ostatné rastliny. U jednoduchých mutantov sa mutácie nijak navonok fenotypovo neprejavili.

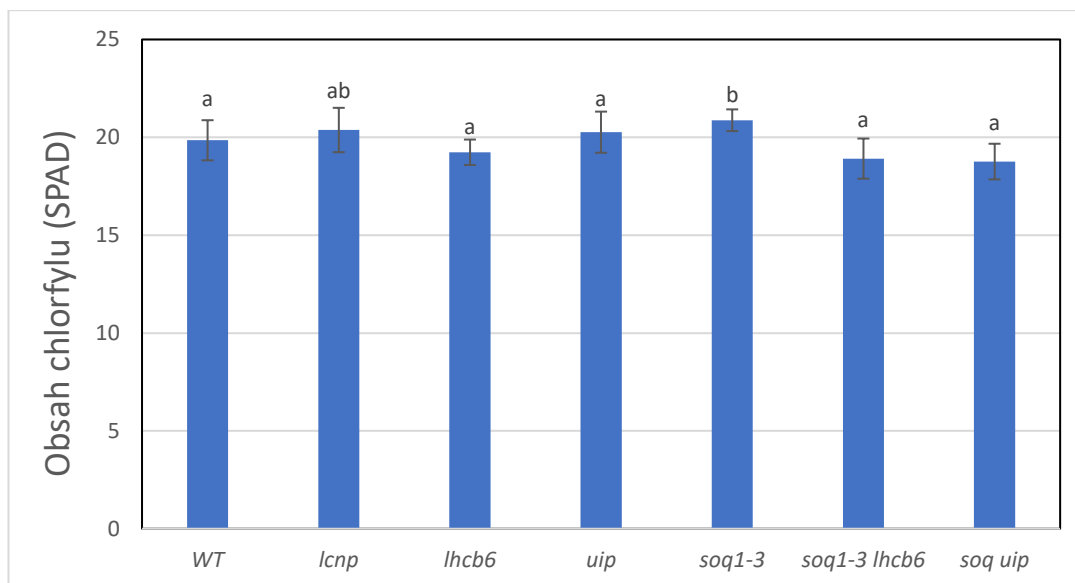
4.2.1 Obsah chlorofylu v listoch

Celkový obsah chlorofylu v listoch má veľký fyziologický význam pre rastliny. Znížený obsah chlorofylu oproti štandardným hodnotám môže indikovať, že sa rastlina nachádza v stresových podmienkach.

Výsledný obsah chlorofylu u WT možno porovnať s hodnotami získanými od ostatných genotypov. Veľké rozdiely pozorované neboli. Najvyššiu koncentráciu chlorofylu na meranú plochu mal mutant *soq1* a štatisticky významný rozdiel oproti všetkým ostatným hodnotám sa potvrdil pomocou t-testu. Najnižšie hodnoty mali oba



Obr. 16 Reprezentatívne rastliny z každého genotypu použitého na fyziologickú charakterizáciu; hore zľava – WT, *soq1 lhcb6*, *soq1 uip*; dole zľava *soq1*, *uip*, *lhcb6*, *lcnp*. Mierka je 7 cm.



Obr. 17 Priemerná koncentrácia chlorofylu na meranú plochu u rastlín divokého typu (WT), jednoduchých mutantov *lcnp*, *lhcb6*, *uip* a *soq1-3*, a dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SD, n = 8. Skupiny dát bez štatistickej významného rozdielu podľa t-testu ($p < 0,05$) sú označené rovnakým písmenom.

dvojité mutanty, avšak rozdiel oproti zvyšným meraným rastlinám nie je štatisticky významný. Výsledky ukazujú, že jednotlivé mutácie nemajú veľmi veľký vplyv na obsah chlorofylu v listoch (Obr. 17).

4.2.2 Fotochémiá fotosystému II

Meranie fyziologických parametrov začalo stanovením hodnoty minimálnej a maximálnej fluorescence pre listy rastlín adaptovaných na tmú. Minimálna fluorescence (F_0) sa získava pri osvetlení listu svetlom s nízkou intenzitou, ktorá nevedie k zatváraniu reakčných centier fotosystému II (RCII). Po adaptácii na tmú sú takto na počiatku merania všetky reakčné centrá otvorené. Pokiaľ je hodnota F_0 zvýšená oproti štandardnej hodnote získanej pri optimálnych podmienkach, môže to znamenať zníženie efektivity PSII v dôsledku jeho poškodenia alebo zvýšenú emisiu antén odpojených od RCII (Ilíková *et al.* 2021).

Následne po zmeraní F_0 je aplikovaný silný saturačný pulz, ktorý všetky RCII uzavrie, čím sa umožní zmeranie maximálnej fluorescence F_m . Keďže rastlina bola adaptovaná na tmú, fotochemické a nefotochemické zhasanie je pri aplikácii tohto saturačného pulzu nulové, teda excitačná energia sa z molekúl chlorofylu emituje vo forme fluorescence v najväčšom možnom množstve. Pokiaľ je hodnota F_m alebo F_0 znížená oproti štandardnej, môže to signalizovať, že dochádza ku kompetícii medzi vyžarovaním energie ako fluorescence a disipácie vo forme tepla. F_m a F_0 sa následne využívajú na výpočet maximálneho výťažku fotochémiie PSII (Maxwell & Johnson, 2000).

F₀

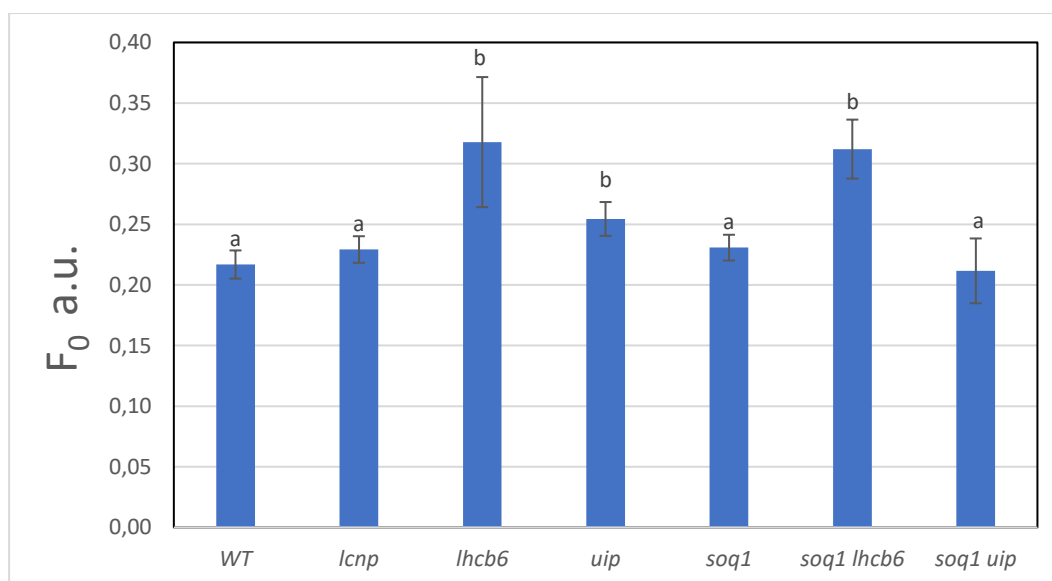
Z použitých genotypov nebola u štyroch (*WT*, *lcnp*, *soq1* a *soq1 uip*) pozorovaná výrazne rozdielna hodnota. Jednoduchý mutant *lhcb6*, *uip* a dvojitý mutant *soq1 lhcb6* mali hodnotu F₀ zvýšenú (Obr. 18). Chýbajúca svetlozberná anténa LHCB6 vedie k zvýšeniu F₀ hodnoty, ako už bolo zistené v predchádzajúcich štúdiách. Dôvodom môže byť nesprávne pripojenie LHCII k PSII, čo vedie k neefektívnemu prenosu excitačnej energie do RCII (Kovács *et al.*, 2006).

F_m

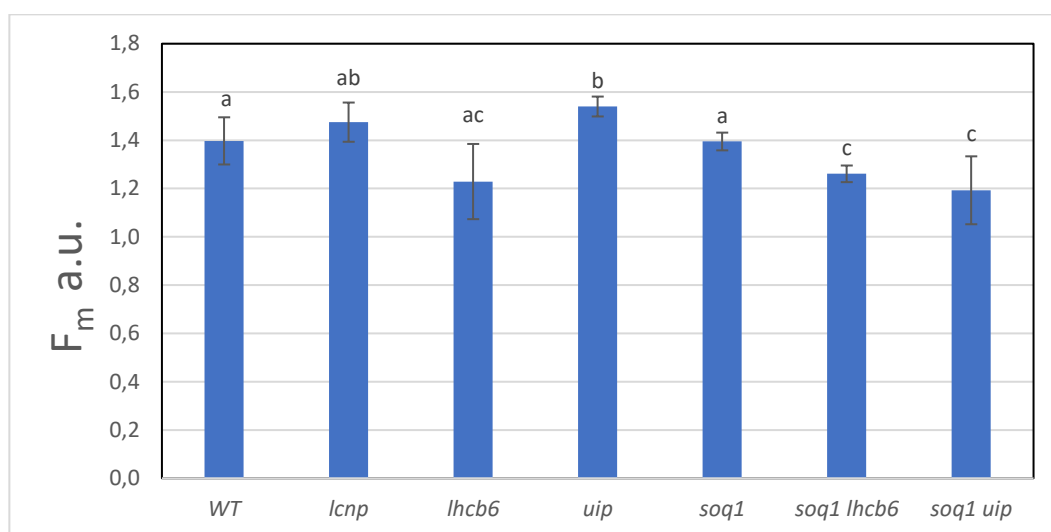
Rastliny *WT*, *lcnp*, *lhcb6* a *soq1* mali hodnoty, ktoré sa štatisticky nelíšili. Genotyp *lhcb6* a oba dvojité mutanty mali podobné hodnoty. Jednotlivé testované vzorky genotypu *lhcb6* mali rozdielne hodnoty, čo sa prejavilo pri výpočte priemeru a viedlo k veľkej smerodajnej odchýlke. Najnižšiu hodnotu mali oba dvojité mutanty (Obr. 19). U dvojitého mutanta *soq1 lhcb6* je zjavný vplyv chýbajúcej svetlozbernej antény LHCB6, ktoré ovplyvňuje podobne ako F₀ aj F_m (Kovács *et al.*, 2006). Vplyv proteínu UIP a jeho absencie na hodnoty F₀ a F_m je ťažko určiť, keďže tento proteín zatiaľ nie je veľmi preskúmaný.

F_v/F_m

Parameter F_v/F_m sa používa v rastlinnej fyziológii na detekciu stresu rastlín. Fyziologické štandardné hodnoty sú okolo 0,8, ktoré rastlina nadobúda za optimálnych vonkajších podmienok. Hodnoty nižšie ako 0,8 značia, že rastlina sa nachádza v stresových podmien-



Obr. 18 Minimálna fluorescencia u testovaných rastlín divokého typu (*WT*), jednoduchých mutantov *lcnp*, *lhcb6*, *uip* a *soq1*, a dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SD, n = 4-5. Skupiny dát bez štatisticky významného rozdielu podľa t-testu ($p < 0,05$) sú označené rovnakým písmenom.



Obr. 19 Maximálna fluorescencia u testovaných rastlín divokého typu (WT), jednoduchých mutantov *lcnp*, *lhcb6*, *uip* a *soq1*, a dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, $n = 4-5$. Skupiny dát bez štatisticky významného rozdielu podľa t-testu ($p < 0,05$) sú označené rovnakým písmenom.

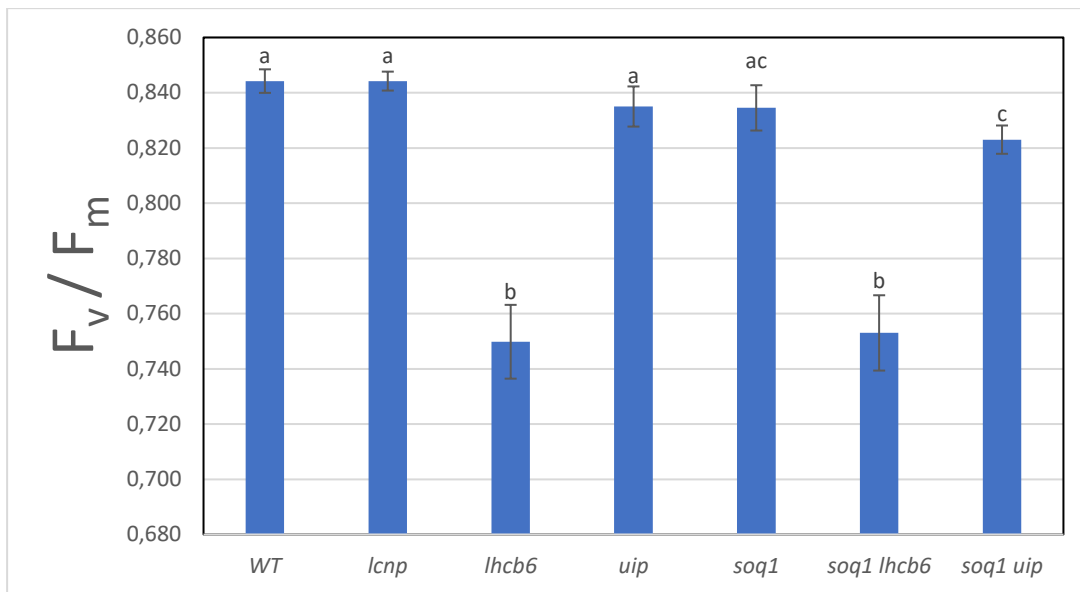
kach (Björkman & Demmig, 1987). Tento parameter závisí od otvorených reakčných centier a svetlozberných antén, ktoré nie sú správne naviazané v rámci PSII superkomplexu (vid' ďalej). Čím väčší stres, tým menej je otvorených reakčných centier a pomer F_v/F_m sa znižuje (Maxwell & Johnson, 2000).

Okrem mutantov *lhcb6* a *soq1 lhcb6* mali všetky genotypy hodnoty nad 0,8 a podobné WT, čo značí, že PSII nie je v stresových podmienkach. Mutant *soq1 uip* má o niečo nižšiu hodnotu ako WT, ale stále je v okolí hodnoty 0,8, a jeho hodnota je podobná jednoduchému *soq1* mutantu. Jednoduché mutanty *soq1* a *uip* majú hodnoty takmer rovnaké (Obr. 20).

Nepriítomnosť svetlozbernej antény LHCB6 znižuje pomer F_v/F_m , čo sa ukázalo aj v tomto meraní. LHCB6 má významný vplyv na funkciu celej fotosyntetickej dráhy, môže byť nevyhnutná na správne viazanie M-trimérov v rámci PSII superkomplexu. Nesprávna organizácia LHCB6 u mutantov *lhcb6* môže viesť k zníženiu efektivity prenosu zachytenej energie do reakčného centra, čo má za následok zvýšenie F_0 a zníženie pomeru F_v/F_m (Kovács *et al.*, 2006).

4.2.3 Nefotochemické zhášanie

Jedným z najdôležitejších cieľov fyziologickej charakterizácie vybraných rastlín bolo zhodnotiť priebeh ich nefotochemického zhášania (NPQ) pri prechode z tmy na svetlo. Rôzne mechanizmy spadajúce pod indukciu NPQ umožňujú rastlinám vyrovnávať sa s



Obr. 20 Pomer F_v/F_m u testovaných rastlín divokého typu (WT), jednoduchých mutantov *lcnp*, *lhcb6*, *uip* a *soq1*, a dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, n = 4-5. Skupiny dát bez štatisticky významného rozdielu podľa t-testu ($p < 0,05$) sú označené rovnakým písmenom.

meniacimi sa svetelnými podmienkami v prostredí a eliminovať tým svetlom indukované poškodenie fotosyntetického aparátu (Melis, 1999). Proteín SOQ1 a LCNP majú významnú úlohu pri qH type NPQ (Brooks *et al.*, 2013; Malnoë *et al.*, 2018), qE typ je zas ovplyvňovaný prítomnosťou proteínu LHCB6 (Kovács *et al.*, 2006). Porovnaním profilov indukcie a relaxácie NPQ u dvojitých mutantných rastlín, ktoré neobsahujú proteín SOQ a buď LHCB6 alebo UIP, s kontrolnými genotypmi by sa mohla odhaliť možná rola LHCB6 alebo UIP v rámci qH.

U WT rastlín bol priebeh NPQ štandardný. So zapnutím aktinického svetla sa NPQ postupne zvyšovalo. Spočiatku bol nárast rýchlejší, ale od cca 120. sekundy merania sa rast spomalil. V polovici merania došlo k vypnutiu aktinického svetla a NPQ relaxovalo v krátkom časovom úseku po vypnutí veľmi rýchlo. Následne sa relaxácia spomalila a postupne sa blížila takmer k nule. Išlo o qE typ zhášania, ktorý sa aktivuje a relaxuje najrýchlejšie. Na záver merania qE už prítomné nie je a posledná hodnota v grafe značí úroveň pomalšie relaxujúcich procesov NPQ (qZ, qH, qI). Priebeh NPQ u všetkých testovaných genotypov rastlín zobrazuje graf na obrázku 21.

Priebeh NPQ u *lcnp* rastlín bol len minimálne odlišný od WT. Avšak proteín LCNP je dôležitý v qH type NPQ, na ktorého aktiváciu a relaxáciu je treba dlhší časový interval oproti qE. Ako sa predpokladalo, chýbajúci proteín LCNP neovplyvnil qE a na záver merania boli prítomné pomaly relaxujúce procesy bez qH (Malnoë *et al.* 2018).

U mutantov *lcnp* qH zhášanie neprebíha, preto sa táto hodnota dá použiť ako referenčná pre jeho výpočet u ostatných genotypov (viď ďalej).

Jednoduché mutanty s chýbajúcim LHCB6 proteínom mali nástup NPQ najrýchlejší, no jeho najvyššia hodnota bola v porovnaní s ostatnými nižšia. Tento výsledok odpovedá predpokladom, keďže LHCB6 minoritná anténa ovplyvňuje qE typ zhášania a jej neprítomnosť znižuje jeho hodnotu (Kovács *et al.*, 2006).

Chýbajúci samostatný proteín UIP viedol k o niečo vyšším hodnotám NPQ oproti WT, ale nárast nebol veľmi významný. Celkovo sa dá konštatovať, že genotypy WT, *lhcb6*, *lcnp* a *uip* mali priebeh zhášania veľmi podobný s malými odlišnosťami spôsobenými chýbajúcou LHCB6 anténou, ako bolo popísané vyššie.

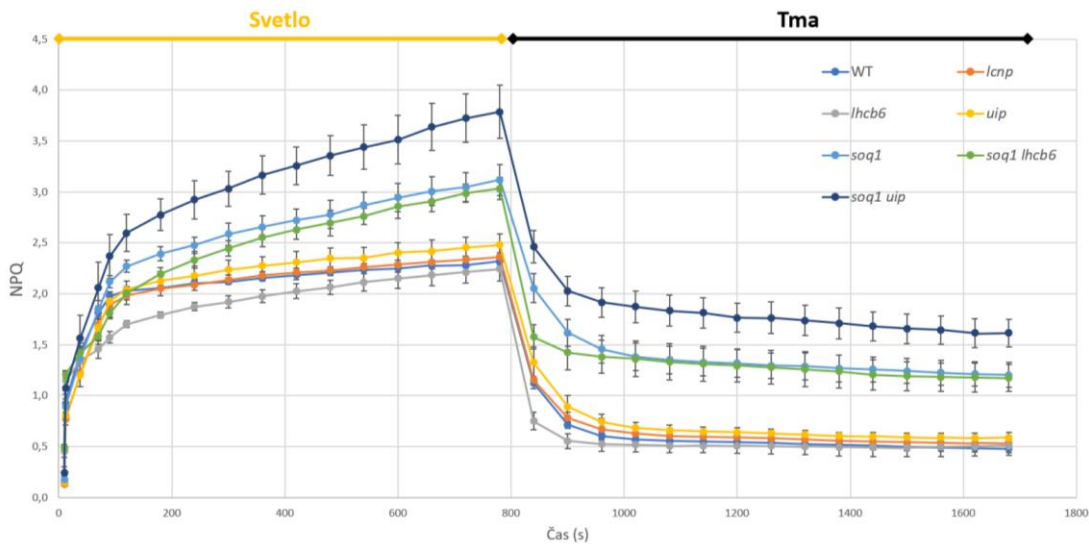
Mutant neobsahujúci proteín SOQ1 mal podľa očakávania hodnoty NPQ vyššie než WT. Proteín SOQ1 bráni vzniku qH typu zhášania a tým v prirodzených podmienkach znižuje celkovú úroveň NPQ. Mutant *soq1* nedokáže tento proteín syntetizovať a priebeh qH tak nie je obmedzovaný. Dôsledkom je vyššia celková úroveň NPQ u týchto rastlín (Brooks *et al.*, 2013).

Dvojitý mutant *soq1 lhcb6* mal priebeh NPQ veľmi podobný priebehu ako mutant *soq1*. Tento výsledok naznačuje, že LHCB6 anténa pravdepodobne nepatrí medzi interakčných partnerov proteínu SOQ1 a nemá vplyv na proces qH.

U mutantu *soq1 uip* boli pozorované najvyššie namerané hodnoty NPQ zo všetkých použitých genotypov. Spočiatku mala krivka štandardný priebeh, no od 120. sekundy merania boli pozorované výrazne odlišné hodnoty. V najvyššom bode (pri 780 s) bola hodnota NPQ dvojitého mutantu vyššia oproti samotnému *soq1*. qE v prípade dvojitého mutantu relaxovalo podobne ako pri ostatných genotypoch, takže sa dá predpokladať, že tento typ NPQ ovplyvnený nebol. Avšak, na záver merania ostala hodnota celkového NPQ stále relatívne vysoko oproti ostatným testovaným rastlinám, takže pomaly relaxujúce procesy ako napr. qZ alebo qH boli stále prítomné. Proteín UIP tak s veľkou pravdepodobnosťou nejakým spôsobom interaguje s SOQ1 a ovplyvňuje qH.

qE vs. qH

Na záver analýzy NPQ boli vypočítané hodnoty qE a qH pre všetky genotypy testovaných rastlín. Pre získanie výslednej hodnoty qE bola použitá hodnota v bode 780. sekunda, kedy došlo k vypnutiu aktinického svetla a NPQ procesy začali relaxovať. Táto hodnota bola znížená o hodnotu v poslednom bode na konci merania ktorá odpovedala už len pomaly relaxujúcim procesom. Pre výpočet qH bola použitá posledná hodnota merania,



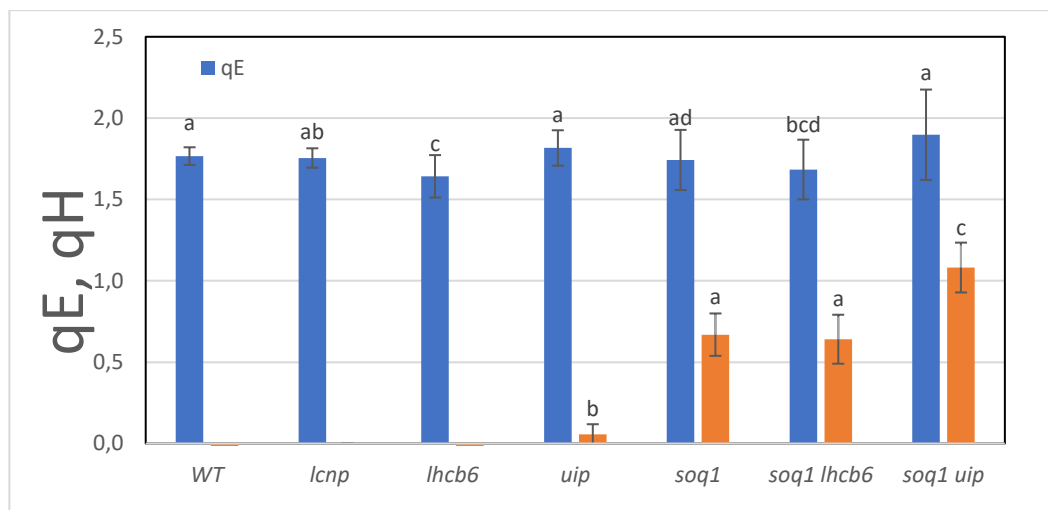
Obr. 21 Priebiech NPQ u testovaných rastlín divokého typu (WT), jednoduchých mutantov *lcnp*, *lhcb6*, *uip* a *soq1*, a dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, n = 4-5.

od ktorej sa odrátala posledná hodnota získaná meraním *lcnp*, pretože u tohto mutantu je qH rovné 0. Vypočítané hodnoty pre qE a qH všetkých genotypov sú na obrázku 22.

Výsledné qE sa pohybovalo okolo 1,7. Rastliny WT, *lcnp*, *soq1*, *uip* a *soq1 uip* mali hodnoty veľmi podobné, čo odpovedalo predpokladom, keďže ani SOQ1 a ani LCNP nijako qE neovplyvňujú. Rozdiely neboli ani medzi mutantmi *soq1 lhcb6* a *lhcb6* a taktiež medzi jednoduchým mutantom *soq1* a *soq1 lhcb6*. Jednoduchý a dvojitý mutant s chýbajúcou LHCB6 anténou aj spolu mali nižšiu hodnotu ako WT, čo napovedá opäť o efekte chýbajúcej tejto svetlozbernej antény (Kovács *et al.*, 2006).

Procesy qH boli pozorované iba u genotypov *uip*, *soq1* a oboch dvojitých mutantov. Hodnota získaná pre jednoduchý mutant *soq1* sa dá v prípade qH použiť ako referenčná. Dvojitý mutant s chýbajúcim proteínom LHCB6 mal podľa t-testu štatisticky rovnakú hodnotu qH ako *soq1*, takže o výraznom vplyve chýbajúcej antény LHCB6 na qH sa v tomto prípade hovorí nedá. Druhý dvojitý mutant, *soq1 uip*, mal hodnotu qH najvyššiu zo všetkých použitých genotypov. O pravdepodobnej úlohe proteínu UIP v tomto type zhášania vypovedá aj nízka, no predsa získaná, hodnota qH u samostatného *uip* mutantu.

Vysoká hodnota qH u mutantu *soq1 uip* poskytuje priestor na ďalšie skúmanie funkcie proteínu UIP v rámci nefotochemického zhášania. Výsledky naznačujú, že jeho prítom-



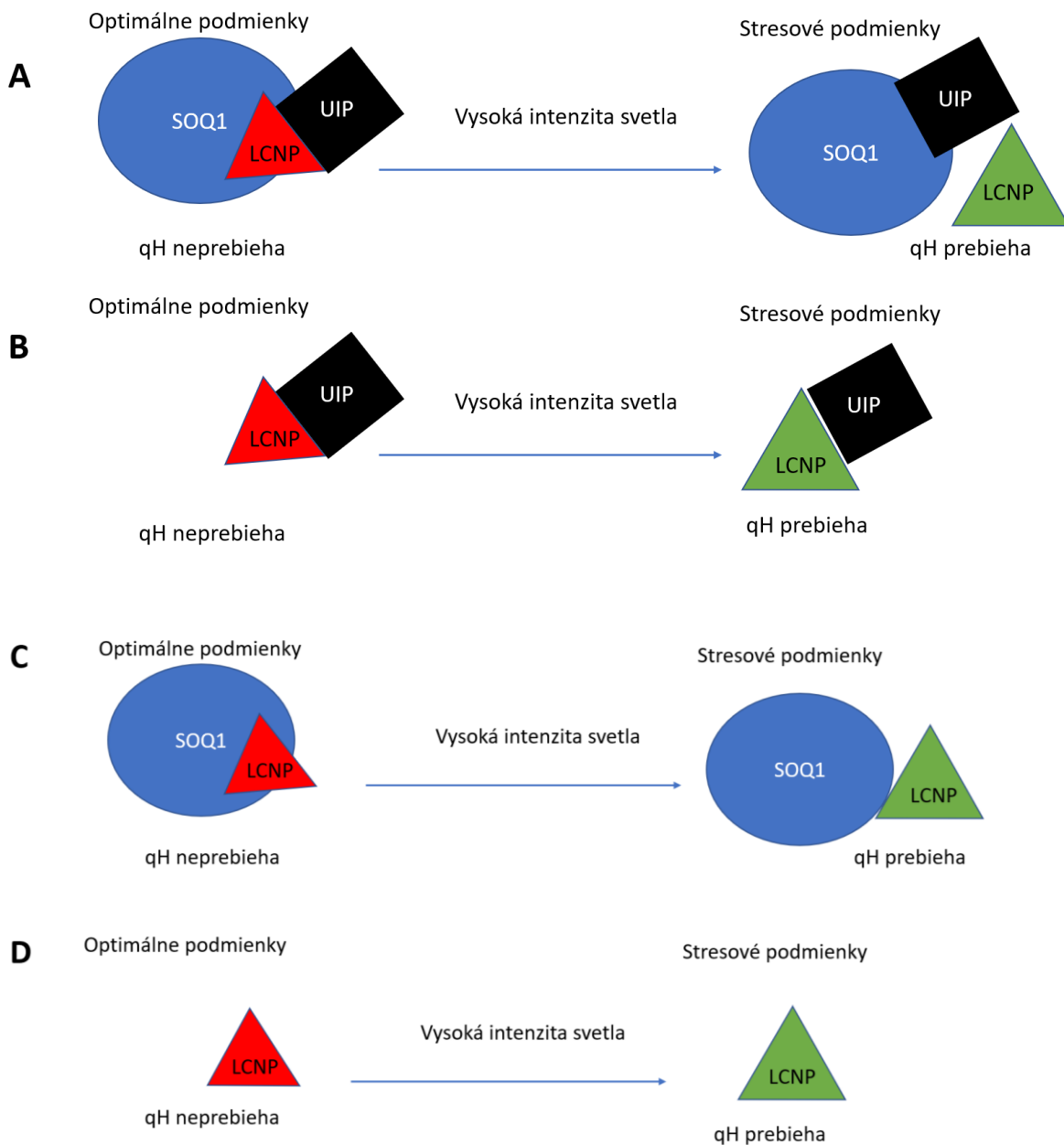
Obr. 22 Výsledné vypočítané hodnoty qE a qH testovaných rastlín divokého typu (WT), jednoduchých mutantov *lcnp*, *lhcb6*, *uip* a *soq1*, a dvojitých mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD, n = 4-5. Skupiny dát bez štatisticky významného rozdielu podľa t-testu ($p < 0,05$) sú označené rovnakým písmenom.

nosť zabezpečuje potlačanie tohto typu zhášania, keďže mutanty s chýbajúcim proteínom mali hodnoty vyššie. Keďže tento proteín je veľmi málo preskúmaný a nepozná sa jeho štruktúra, nedá sa veľmi uvažovať o jeho presnej funkcii a molekulárnej podstate jeho interakcie v procesoch NPQ. Avšak z výsledkov sa dá odvodiť, že UIP všeobecne pôsobí ako represor indukcie qH typu NPQ, či už v optimálnych podmienkach, alebo stresových podmienkach, pri vysokej intenzite osvetlenia, ktorá bola použitá počas merania.

V prirodzených optimálnych podmienkach proteín SOQ1 potláča qH, ktoré je indukované proteínom LCNP. Vzhľadom na to, že UIP taktiež pôsobí ako represor qH, je možná jeho interakcia aj s LCNP. Jednoduchý mutant *soq1* mal úroveň qH vyššiu než WT, čo bolo predpokladané vzhľadom na známu funkciu proteínu SOQ1. Proteín UIP je prítomný a qH u tohto mutantu nedosahuje takých vysokých hodnôt ako u dvojitého mutantu v kombinácii s *soq1*. Samotný mutant v proteíne UIP mal nízku, no predsa pozorovanú úroveň qH, čím sa potvrdzuje jeho represívna funkcia v tomto type zhášania. Prítomnosť proteínu SOQ1 u tohto mutantu síce väčšinu qH zhášania potlačí, ale neprítomnosť druhého represora k určitej indukcii vedie. Tento fakt prispieva k výsledkom Brooks *et al.* (2012), keď bola naznačená slabá interakcia medzi SOQ1 a UIP. Pokiaľ rastline oba represory chýbajú, qH nie je ničím obmedzené a jeho úroveň je najvyššia spomedzi pozorovaných (Obr. 23).

Získané výsledky ukazujú funkciu neznámeho proteínu UIP v procesoch nefotochemického zhášania. Na zistenie presnej podstaty, ako sa tento proteín do procesov zapája, budú nutné ďalšie experimenty. Zistenie štruktúry a následne

rozpoznanie možných motívov, či väzbových miest alebo identifikácia ďalších interakčných partnerov by mohli pomôcť k objasneniu mechanizmu vplyvu proteínu UIP na qH.



Obr. 23 Schematicky znázornená možná interakcia medzi represormi qH proteínom SOQ1 a UIP s aktivátorom LCNP. A - WT; prítomné sú všetky proteíny, qH prebieha len počas stresových podmienok, kedy sa množstvo aktívnych represorov znižuje a LCNP tento proces spúšťa. Proteín SOQ1 a UIP spolu určitým doteraz presne neobjasneným spôsobom interagujú; B – mutant *soq1*; SOQ1 ako jeden z represorov nie je prítomný, qH prebieha vo väčšej miere; C – mutant *uip*; druhý represor, proteín UIP, nie je prítomný, qH prebieha ale nie až tak intenzívne ako v prípade B; D – dvojitý mutant *soq1 uip*; žiadny represor nie je prítomný, qH prebieha v maximálnej možnej miere.

5 ZÁVER

V teoretickej časti tejto bakalárskej práce bolo cieľom predstaviť zhrnutie poznatkov získaných z literatúry na tému fotosyntézy a nefotochemického zhášania spolu s jednotlivými procesmi, ktoré pod NPQ spadajú. Druhá podstatná téma spracovaná v teoretickej časti bola proteín SOQ1 a jeho funkcia v rámci nefotochemického zhášania. Získané poznatky ohľadom tohto proteínu viedli k hypotéze, že proteín SOQ1 môže interagovať so svetlozbernými komplexmi v rámci PSII a táto hypotéza bola počas experimentálnej časti otestovaná.

Experimentálna časť zahŕňala prípravu dvojitéch mutantov *soq1 lhcb6* a *soq1 uip*. Zvolené potenciálne interakčné proteíny boli nakoniec vybrané na základe poznatkov z literatúry, keďže pilotný skrining mutantov vo svetlozberných anténach PSII neukázal žiadneho kandidáta na interakciu s proteínom SOQ1.

Postupne boli analyzované všetky vzorky rastlín F2 generácie, ktoré sa získali krížením jednoduchých mutantov, a pre potvrdenie správnosti výsledkov sa rastliny, ktoré sa v prvom kole ukázali ako homozygotné dvojité mutanty, podrobili genotypizácii ešte raz. Ani v jednom prípade F2 generácie sa hľadaný genotyp nepotvrdil, preto bolo potrebné dopestovať F3 generáciu. V F3 generácii sa podarilo izolovať jedince s hľadaným dvojito-homozygotným genotypom a výsledok bol ešte potvrdený PCR reakciou na čistej izolovanej DNA.

Získané mutanty *soq1 lhcb6* a *soq1 uip* boli následne dopestované do semien a jedince F4 generácie sa použili na fyziologickú charakterizáciu so zameraním predovšetkým na priebeh NPQ u testovaných rastlín. V prípade proteínu LHCB6 nebola dokázaná žiadna spojitosť s proteínom SOQ1 a ani s qH typom zhášania. Neprítomnosť svetlozbernej antény LHCB6 viedla iba k zmenám minimálnej, maximálnej fluorescencie a pomeru F_v/F_m , ako bolo už prezentované v predošlých štúdiách (Kovács *et al.*, 2006).

Jednoduchý mutant *uip* mal určitú nízku hodnotu qH na záver merania a dvojitý mutant *soq1 uip* mal hodnotu qH najvyššiu zo všetkých testovaných genotypov. Z týchto výsledkov vyplýva, že proteín UIP funguje ako represor indukcie qH typu zhášania a je pravdepodobné, že nejakým spôsobom interaguje s proteínom SOQ1. Tento výsledok prispieva k zisteniam Brooks *et al.* (2012), kde bola slabá interakcia medzi SOQ1 a UIP prvý raz popísaná. Aký je presný mechanizmus zapojenia UIP do procesov NPQ ostáva nateraz záhadou.

Výsledky odhaľujú nový neznámy proteín, ktorý je zapojený do procesov NPQ. Identita a skutočná funkcia proteínu UIP nie je známa. Na objasnenie jeho presnej role a molekulárneho mechanizmu, akým sa do procesov NPQ zapája, bude treba ďalšie experimenty. V budúcnosti bude treba tento nateraz neznámy proteín preskúmať, čo sa týka jeho štruktúry, lokalizácie v rámci bunky a jeho ďalších interakčných partnerov.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Adams III, W. W., Zarter, C. R., Mueh, K. E., Amiard, V., & Demmig-Adams, B. (2008). Energy Dissipation and Photoinhibition: A Continuum of Photoprotection. V B. Demmig-Adams, W. W. Adams, & A. K. Mattoo (Ed.), *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment* (Roč. 21, s. 49–64). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-3579-9_5
- Adams, W. W., Muller, O., Cohu, C. M., & Demmig-Adams, B. (2013). May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynthesis Research*, 117(1–3), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9849-7>
- Amstutz, C. L., Fristedt, R., Schultink, A., Merchant, S. S., Niyogi, K. K., & Malnoë, A. (2020). An atypical short-chain dehydrogenase–reductase functions in the relaxation of photoprotective qH in Arabidopsis. *Nature Plants*, 6(2), 154–166. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0591-9>
- Anderson, J. M., & Andersson, B. (1988). The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends in biochemical sciences*, 13(9), 351–355. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90106-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90106-5)
- Aro, E.-M., Virgin, I., & Andersson, B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1143(2), 113–134. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90134-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90134-2)
- Bath, R., Jain, M., Kumar, A., Nagar, P., Kumari, S., & Mustafiz, A. (2020). Zn²⁺ dependent glyoxalase I plays the major role in methylglyoxal detoxification and salinity stress tolerance in plants. *PloS one*, 15(5), e0233493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233493>
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., & Rochaix, J.-D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433(7028), 892–895. <https://doi.org/10.1038/nature03286>
- Bilger, W., & Björkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, 25(3), 173–185. <https://doi.org/10.1007/BF00033159>
- Björkman, O., & Demmig, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170(4), 489–504. <https://doi.org/10.1007/BF00402983>
- Boekema, E., & Semchonok, D. (2019). Organization of photosynthetic membrane proteins into supercomplexes. V R. Croce, R. van Grondelle, H. van Amerongen, & I. van Stokkum (1st ed.), *Light Harvesting in Photosynthesis* (Roč. 1, s. 207–215). CRC Press, Taylor and Francis Group. <https://www.crcpress.com/Light-Harvesting-in-Photosynthesis/Croce-Grondelle-Amerongen-Stokkum/p/book/9781482218350>
- Brooks, M. D. (2012). A Suppressor of Quenching Regulates Photosynthetic Light Harvesting. UC Berkeley. USA. Dissertation thesis.
- Brooks, M. D., Sylak-Glassman, E. J., Fleming, G. R., & Niyogi, K. K. (2013). A thioredoxin-like/-propeller protein maintains the efficiency of light harvesting in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), E2733–E2740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305443110>
- Burroughs, A. M., Allen, K. N., Dunaway-Mariano, D., & Aravind, L. (2006). Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 361(5), 1003–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.049>
- Dall’Osto, L., Caffarri, S., & Bassi, R. (2005). A Mechanism of Nonphotochemical Energy Dissipation, Independent from PsbS, Revealed by a Conformational Change in the Antenna Protein CP26. *The Plant Cell*, 17(4), 1217–1232. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.030601>
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W., Barker, D. H., Logan, B. A., Bowling, D. R., & Verhoeven, A. S. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98(2), 253–264. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.980206.x>

- Edge, R., & Truscott, T. G. (2004). Carotenoid Radicals and the Interaction of Carotenoids with Active Oxygen Species. V H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton, & R. J. Cogdell (eds.) *The Photochemistry of Carotenoids* (Roč. 8, s. 223–234). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/0-306-48209-6_12
- Fan, M., Li, M., Liu, Z., Cao, P., Pan, X., Zhang, H., Zhao, X., Zhang, J., & Chang, W. (2015). Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(9), 729–735. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3068>
- Genty, B., Briantais, J.-M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1), 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Grzyb, J., Latowski, D., & Strzałka, K. (2006). Lipocalins – a family portrait. *Journal of Plant Physiology*, 163(9), 895–915. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.007>
- Guidi, L., Tattini, M., & Landi, M. (2017). How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light? V E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Ed.), *Chlorophyll*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67887>
- Chen, C. K., Chan, N. L., & Wang, A. H. (2011). The many blades of the β -propeller proteins: conserved but versatile. *Trends in biochemical sciences*, 36(10), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.07.004>
- Jansson, S. (1994). The light-harvesting chlorophyll *ab*-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1184(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90148-1)
- Ilíková, I., Ilík, P., Opatíková, M., Arshad, R., Nosek, L., Karlický, V., Kučerová, Z., Roudnický, P., Pospíšil, P., Lazár, D., Bartoš, J., & Kouřil, R. (2021). Towards spruce-type photosystem II: consequences of the loss of light-harvesting proteins LHCB3 and LHCB6 in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 187(4), 2691–2715. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab396>
- Jin, H., Liu, B., Luo, L., Feng, D., Wang, P., Liu, J., Da, Q., He, Y., Qi, K., Wang, J., & Wang, H.-B. (2014). HYPERSENSITIVE TO HIGH LIGHT1 Interacts with LOW QUANTUM YIELD OF PHOTOSYSTEM III and Functions in Protection of Photosystem II from Photodamage in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(3), 1213–1229. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122424>
- Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255–273. <https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- Kautsky, H., Appel, W., & Amann, H. (1960). [Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation. Part XIII. The fluorescence and the photochemistry of plants]. *Biochemische Zeitschrift*, 332, 277–292.
- Khorobrykh, S., Havurinne, V., Mattila, H., & Tyystjärvi, E. (2020). Oxygen and ROS in Photosynthesis. *Plants*, 9(1), 91. <https://doi.org/10.3390/plants9010091>
- Kirchhoff, H. (2013). Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynthesis Research*, 116(2–3), 481–487. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9843-0>
- Koonin, E. V., & Tatusov, R. L. (1994). Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *Journal of molecular biology*, 244(1), 125–132. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1711>
- Kouřil, R., Oostergetel, G. T., & Boekema, E. J. (2011). Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.007>
- Kovács, L., Damkjaer, J., Kerešiče, S., Ilíková, I., Ruban, A. V., Boekema, E. J., Jansson, S., & Horton, P. (2006). Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *The Plant cell*, 18(11), 3106–3120. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045641>
- Latowski, D., Grzyb, J., & Strzałka, K. (2004). The xanthophyll cycle—Molecular mechanism and physiological significance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(2), 197–212. <https://doi.org/10.1007/s11738-004-0009-8>

- Latowski, D., Kuczyńska, P., & Strzałka, K. (2011). Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*, 16(2), 78–90. <https://doi.org/10.1179/174329211X13020951739938>
- Lennon, S. V., Martin, S. J., & Cotter, T. G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*, 24(2), 203–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1991.tb01150.x>
- Li, X.-P., Phippard, A., Pasari, J., & Niyogi, K. K. (2002). Structure—Function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) in vivo. *Functional Plant Biology*, 29(10), 1131. <https://doi.org/10.1071/FP02065>
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B., & Niyogi, K. K. (2009). Sensing and Responding to Excess Light. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 239–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844>
- Liu, J., & Last, R. L. (2017). A chloroplast thylakoid lumen protein is required for proper photosynthetic acclimation of plants under fluctuating light environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(38), E8110–E8117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712206114>
- Lu, Y., Hall, D. A., & Last, R. L. (2011). A Small Zinc Finger Thylakoid Protein Plays a Role in Maintenance of Photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23(5), 1861–1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.085456>
- Malnoë, A., Schultink, A., Shahrasbi, S., Rumeau, D., Havaux, M., & Niyogi, K. K. (2018). The Plastid Lipocalin LCNP Is Required for Sustained Photoprotective Energy Dissipation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 30(1), 196–208. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00536>
- Martin, J. L. (1995). Thioredoxin—A fold for all reasons. *Structure*, 3(3), 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00154-X)
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. V A. Richmond & Q. Hu (1st ed.). *Handbook of Microalgal Culture* (s. 21–36). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Melis, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science*, 4(4), 130–135. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01387-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01387-4)
- Mirkovic, T., Ostroumov, E. E., Anna, J. M., van Grondelle, R., Govindjee, & Scholes, G. D. (2017). Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. *Chemical Reviews*, 117(2), 249–293. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00002>
- Misra, A. N., Latowski, D., & Strzałka, K. (2006). The xanthophyll cycle activity in kidney bean and cabbage leaves under salinity stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(1), 102–109. <https://doi.org/10.1134/S1021443706010134>
- Müller, P., Li, X.-P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Murata, N. (1969). I. LIGHT-INDUCED CHANGE OF CHLOROPHYLL a FLUORESCENCE IN. *Biochim. Biophys. Acta*, 10.
- Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEMS I AND II. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 521–565. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350>
- Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., & Jahns, P. (2010). Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(4), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.001>
- Ohad, I., Kyle, D. J., & Arntzen, C. J. (1984). Membrane protein damage and repair: Removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes. *Journal of Cell Biology*, 99(2), 481–485. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.2.481>

- Osmond, C.B. (1994). What Is Photoinhibition? Some Insights from Comparisons of Shade and Sun Plants. In: Baker, N.R. and Bowyer, J.R., Eds., *Photoinhibition of Photosynthesis. From Molecular Mechanisms to the Field*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1-24.
- Powles, S.B. (1984). Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35, 15-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.000311>
- Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R., & Leister, D. (2010). Role of Plastid Protein Phosphatase TAP38 in LHCII Dephosphorylation and Thylakoid Electron Flow. *PLoS Biology*, 8(1), e1000288. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000288>
- Ruban, A. V., & Johnson, M. P. (2015). Visualizing the dynamic structure of the plant photosynthetic membrane. *Nature Plants*, 1(11), 15161. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.161>
- Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Samol, I., Andres, C., Kessler, F., Rochaix, J.-D., Vener, A. V., & Goldschmidt-Clermont, M. (2010). The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4782–4787. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913810107>
- Shi, L.-X., & Schröder, W. P. (2004). The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1608(2–3), 75–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.12.004>
- Snustad, P. D., & Simmons, M. J. (2015). *Principles of Genetics* (7th ed.). Wiley.
- Tikkanen, M., Mekala, N. R., & Aro, E.-M. (2014). Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(1), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.001>
- van Amerongen, H., & Croce, R. (2013). Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis Research*, 116(2–3), 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9824-3>
- van Kooten, O., & Snel, J. F. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25(3), 147–150. <https://doi.org/10.1007/BF00033156>
- Vener, A. V., van Kan, P. J. M., Rich, P. R., Ohad, I., & Andersson, B. (1997). Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome b_f mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1585–1590. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1585>
- Yokthongwattana, K., & Melis, A. (2008). Photoinhibition and Recovery in Oxygenic Photosynthesis: Mechanism of a Photosystem II Damage and Repair Cycle. V B. Demmig-Adams, W. W. Adams, & A. K. Mattoo (1st ed.), *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment* (Roč. 21, s. 175–191). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-3579-9_12
- Yu, Guimei & Pan, Xiaowei & Hao, Jingfang & Shi, Lifang & Zhang, Yong & Wang, Jifeng & Xiao, Yang & Yang, Fuquan & Lou, Jizhong & Chang, Wenrui & Malnoë, Alizée & Li, Mei. (2021). Structure of SOQ1 lumenal domains identifies potential disulfide exchange for negative regulation of photoprotection, qH. [10.1101/2021.03.16.435614](https://doi.org/10.1101/2021.03.16.435614).
- Zito, F. (1999). The Q_o site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *The EMBO Journal*, 18(11), 2961–2969. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.2961>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

μE	$\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$
a.u.	„arbitrary units“
EMS	ethyl-methyl sulfonát
EtBr	etídium bromid
F'_m	maximálna fluorescencia pri vzorke adaptovanej na svetlo
F_m^0	relatívna hodnota maximálnej fluorescencie pri vzorke adaptovanej na tmu
F_0	minimálna fluorescencia
F1	prvá filiálna generácia
F2	druhá filiálna generácia
F_m	maximálna fluorescencia
F_t	fluorescencia v čase t
F_v	variabilná fluorescencia
F_v'	variabilná fluorescencia rastliny adaptovanej na svetlo
HAD	haloacidická dehalogenáza
HHL1	„hypersensitive to high light“
LCNP	plastidový lipokalín
LHC	svetlozberný komplex
LHCII	svetlozberné komplexy fotosystému II
LP, FP	ľavý („forward“) ohraničujúci primer
LQY1	„low quantum yield of PSII“
MPH2	„maintenance of PSII under high light“
NoM	mutant s chýbajúcimi minoritnými svetlozbernými anténami
NPQ	nefotochemické zhášanie
OEC	kyslík vyvíjajúce centrum
P	parentálna generácia
$P680^+$	oxidovaný stav reakčného centra fotosystému II
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PQ	plastochinón
PSI, P700	fotosystém I
PSII, P680	fotosystém II
QA	plastochinón A

qE	zhášanie závislé na energii
qH	zhášanie závislé na proteíne SOQ a LCNP
qI	fotoinhibičné zhášanie
qP	fotochemické zhášanie
qT	zhášanie závislé na stavových prechodoch
qZ	zhášanie závislé na zeaxantíne
RCII	reakčné centrum fotosystému II
ROS	reaktívne formy kyslíka
RP	pravý („reverse“) ohraničujúci primer
SOQ, SOQ1	„supressor of quenching“; proteín regulujúci qH typ NPQ
T-DNA	transferová DNA
Ti-plazmid	„tumor-inducing plasmid“; plazmid spôsobujúci nádory
Trx	tioredoxín
UIP	„unknown interacting protein“; neznámy proteín s možnou interakciou s proteínom SOQ1
VDE	violaxantín de-epoxidáza
WT	rastlina divokého typu