

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2014

Filip Charvát

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Využití fluorescenčních metod pro studium světloběrné funkce
fotosyntetických antén u sinic.**

Bakalářská práce

Filip Charvát

Školitel: Mgr. Radek Kaňa, PhD.

České Budějovice 2014

Bibliografické údaje

Charvát, F., 2014: Využití fluorescenčních metod pro studium světlosběrné funkce fotosyntetických antén u sinic. [Application of fluorescent methods for studying light harvesting function of photosynthetic antennae in cyanobacteria. Bc. Thesis, in Czech] – 51p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Measurement of variable chlorophyll fluorescence is an useful method for photosynthesis research. In this work, I have adjusted FRRF (Fast Repetition Rate Fluorescence) method for studying photoprotective mechanisms in cyanobacteria. I used FRRF for testing specific cyanobacteria mutants with changed phycobilisome composition.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 22. 4. 2014

.....

Filip Charvát

Poděkování

Rád bych poděkoval mému školiteli Mgr. Radkovi Kaňovi, PhD. za jeho rady, pomoc, připomínky, trpělivost a čas při práci na mé bakalářské práci. Dále bych chtěl poděkovat všem mým kolegům na Mikrobiologickém ústavu v Třeboni za jejich ochotu a vstřícnost především Prof., RNDr. Ondřejovi Prášilovi, PhD. za to, že mi zde umožnil pracovat při mém studiu. Také bych chtěl poděkovat mé rodině za morální a finanční podporu po dobu mého studia. Dále děkuji všem mým nejbližším za jejich podporu.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Fotosyntéza.....	1
1.1.1	Mechanismy fotoprotekce u sinic.....	3
1.2	Sinice.....	6
1.3	Experimentální metody variabilní fluorescence.....	8
1.3.1	Variabilní fluorescence a systém měření metodou FRRF.....	8
1.3.2	Parametry metody FRRF.....	9
1.3.3	Experimentální aparatura pro měření FRRF.....	13
2	Metodická část.....	14
2.1	Modelové organismy a jejich kultivace.....	14
2.1.1	Příprava kultury.....	15
2.2	Fluorescenční měření.....	16
2.3	Fitovani experimentálních křivek.....	16
3	Výsledky.....	16
3.1	Metodické experimenty pro optimalizaci metody FRRF.....	16
3.1.1	Role délky adaptace na tmu.....	17
3.1.2	Vliv teploty během temnotní adaptace na chybu měření.....	18
3.1.3	Aktinicky efekt ST záblesků.....	20
3.1.4	Oscilační efekt ST záblesků.....	21
3.1.5	Automatizace zpracování dat.....	22
3.2	Testování a sestavení optimálního měřícího protokolu pro studium NPQ a stavových přechodů u sinic.....	23
3.3	Série experimentů se specifickými mutanty sinice <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 se změněnou funkcí světlosběrných antén.....	31
4	Diskuze.....	35
5	Závěr.....	38
6	Reference.....	38
7	Přílohy.....	40

Použité zkratky

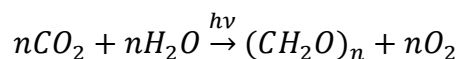
FRRF – metoda rychloobrátkové fluorescence, „*Fast Repetition Rate Fluorescence*“
ST záblesk – Jednoobrátkový záblesk, „*Single Turnover flash*“
 σ – Efektivní absorpční průřez fotosystémů II
p – Konektivita reakčních center fotosystémů II
 F_0 – Minimální fluorescence
 F_M – Maximální fluorescence
PSI (II) – Fotosystém I (II)
OCP – Oranžový karotenoidový protein, „*Orange Carotenoid Protein*“
ATP – Adenosin Trifosfát
PC – Plastocyanin
FNR – Ferredoxin-NADP⁺ reduktasa
Fd – ferredoxin
LHCI (II) – Světlo sběrný komplex fotosystému I (II), „*Light-Harvesting Complex*“
NADPH – Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfát
APC – Allofykocyanin
PBS – Fykobilisom, „*Phycobilisome*“
DNA – Deoxyribonukleová kyselina
RUBISCO – Ribulosa-1,5-Bisfosfát Karboxylasa/Oxygenasa
PCC – „*Pasteur Culture Collection*“
ATCC – „*American Type Culture Collection*“
FD – délka mikropulsů, „*Flashlet Duration*“
DD – „*Dark Duration*“
FSD – sekvence mikropulsu během jednoobrátkového záblesku „*Flashlet Sequence Duration*“

FV – Intenzita záblesku, „*Flash Voltage*“
LED – Světlo emitující dioda „*Light Emiting Diode*“
AD převodník – analogově-digitální převodník
OD – Optická hustota, „*Optical Density*“
NPQ – Nefotochemické zhášení „*Non Photochemical Quenching*“
PMD – „*Pre Measurement Duration*“
ALDD(n) – (n) Doba spoždění aktinického světla, „*Actinic Light Delay Duration*“
ALD – Délka svícení aktinického světla, „*Actinic Light Duration*“
FSDD(n) – (n) Doba spoždění ST záblesku, „*Flash Sequence Delay Duration*“
AMD – Délka čekání na konci měření, „*After Measurement Duration*“
AALFS(n) – (n) Doba před zapnutím ST záblesku po skončení aktinického světla, „*(n) After Actinic Light Flashlet Sequence*“
WT – divoký kmen, „*Wild Type*“
AAL – Oranžové aktinické světlo, „*Amber Actinic Light*“
BAL – Modré aktinické světlo, „*Blue Actinic Light*“
AF – Oranžový ST záblesk, „*Amber Flash*“
BF – Modrý ST záblesk, „*Blue Flash*“
HBAL – Vysoká intenzita modrého aktinického světla, „*High Blue Actinic Light*“

1 Úvod

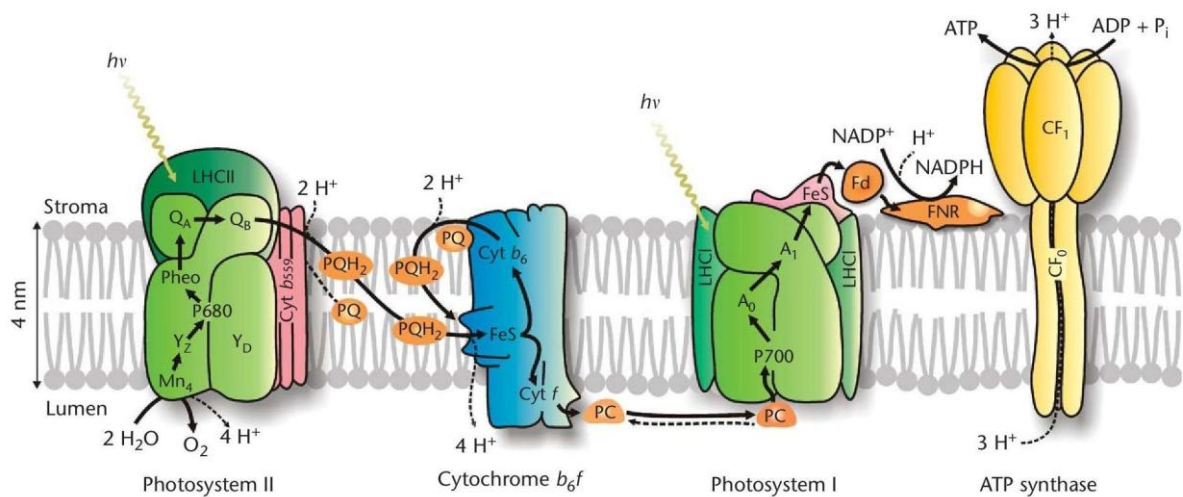
1.1 Fotosyntéza

Fotosyntetická produkce kyslíku a asimilace CO_2 je hlavní faktor, který stanovuje složení biosféry (Nelson and Yocum 2006) a poskytuje všem životním formám potravu. Podíl chemosyntézy je na celkové bilanci zanedbatelný (Masinovskij and Věchet 1986). Světelné fotosyntetické reakce rostlin, řas a sinic probíhají na tylakoidní membráně za účasti fotosystému I, fotosystému II, komplexu Cytochromů b_6/f a ATPasy (Nelson and Yocum 2006). Temnostní fotosyntetické reakce označené jako Calvinův – Bensonův cyklus fixují uhlík do cukru za využití energie vyprodukované ve světelné fázi. Za fotosyntézu se označuje velký soubor reakcí, které se dají zjednodušeně vyjádřit sumární rovnicí:



Uvedený vztah je souhrnné vyjádření všech reakcí, při nichž vznikají organické látky asimilací oxidu uhličitého za pomoci energie dodané světelným zářením (Procházka, Macháčková et al. 1998).

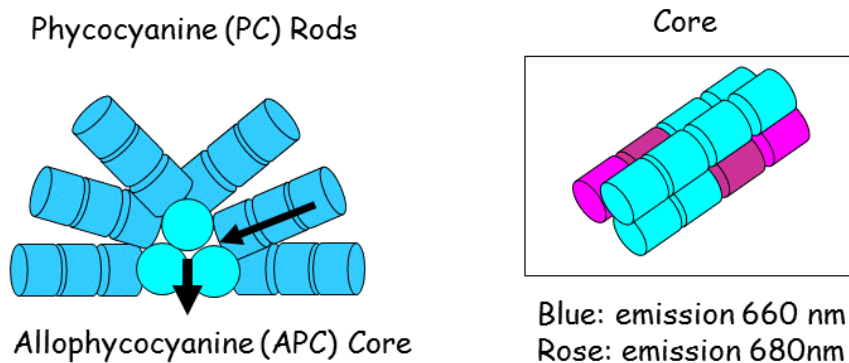
Fotosystém II (PSII) je jedním ze dvou pigmentovaných proteinových komplexů tylakoidní membrány. Využívá světelnou energii absorbovanou světlosběrnými anténami II pro oxidaci vody, ze které přenáší elektron přes tyrosin a reakční centrum P680 na feofytin, chinon a a chinon b. Dvakrát zredukovaný plastochinon pak opouští tento proteinový komplex a redukuje cytochrom b_6/f . Odtud se elektron z PSII může přes plastocyanin dostat až do fotosystému I (Procházka, Macháčková et al. 1998).



Obrázek 1: Struktura tylakoidní membrány s fotosyntetickými proteinovými superkomplexy (Govindjee, Kern et al. 2010). („*Photosystem II*“ – Fotosystém II, „*Photosystem I*“ – Fotosystém I, *Cytochrome b₆f*“ – Cytochrom b₆f, PC – Plastocyanin, „*ATP synthase*“ – ATPsyntasa, FNR – Ferredoxin-NADP⁺-oxidoreduktasa, Fd – Ferredoxin, LHCII – Světlosběrný komplex II, LHCI – Světlosběrný komplex I.

Fotosystém I (PSI) je druhý pigmentovaný proteinový komplex tylakoidní membrány. Souhrnem svých funkcí představuje plastocyanin-ferredoxin oxidoreduktasu. PSI využívá světelnou energii absorbovanou světlosběrnými anténami PSI k separaci náboje v reakčním centru, oxiduje plastocyanin a redukuje ferredoxin. Ten může dále redukovat pool plastochinonů nebo za pomoci flavoproteinu FNR (Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktasy) je využít (za použití dvou protonů ze stromatu) k redukcí NADP⁺ na NADPH⁺ (Procházka, Macháčková et al. 1998).

Sinice využívají místo světlosběrného komplexu I a II fykobilisomy. Fykobilisomy jsou světlosběrné pigmentované proteinové komplexy, které jsou připojené na vnější straně tylakoidní membrány sinic (Gantt and Conti 1966). Zachycují fotony a předávají excitaci do reakčních center PSI a PSII (Govindjee, Kern et al. 2010). Fykobilisomy sinic, se skládají z jádra a několika tyček které pravoúhle přiléhají na jádro. Jádro fykobilisomu se skládá z několika proteinových podjednotek uspořádaných do tří cylindrických částí. Každý cylindr je složen ze čtyř trimerických allofykocyaninů (viz Obrázek 2). Některé podjednotky jádra (viz Obrázek 2) obsahují speciální proteinové podjednotky ApcD, ApcF, ApcE (Kirilovsky, Kana et al. 2013).

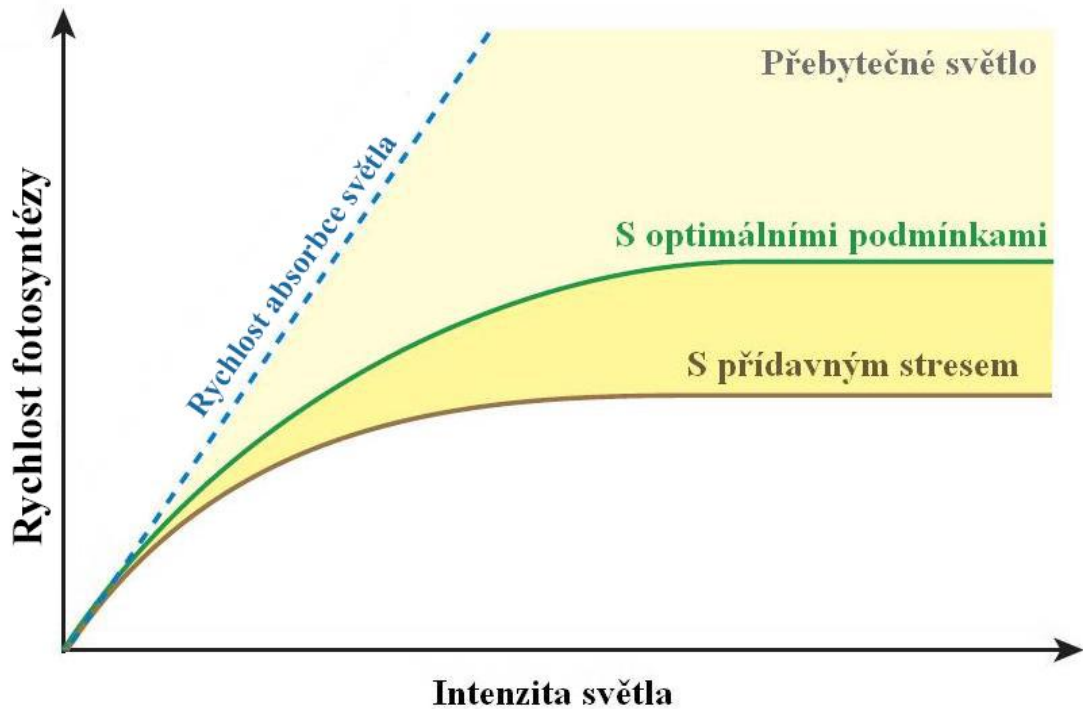


Obrázek 2: Struktura fykobilisomu vyskytující se v sinici *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kirilovsky, Kana et al. 2013). V jádru fykobilisomu (Core) se vyskytují specializované proteiny a to ApcD v části označené světlefialovou barvou a ApcE v části označené tmavě fialovou barvou.

Excitace vznikající zachycením fotonu pigmentem ve vnější části fykobilisomu se předává z tyček do jádra fykobilisomu (viz černé šipky v obrázku Obrázek 2) odkud poté putuje do reakčního centra PSI nebo PSII.

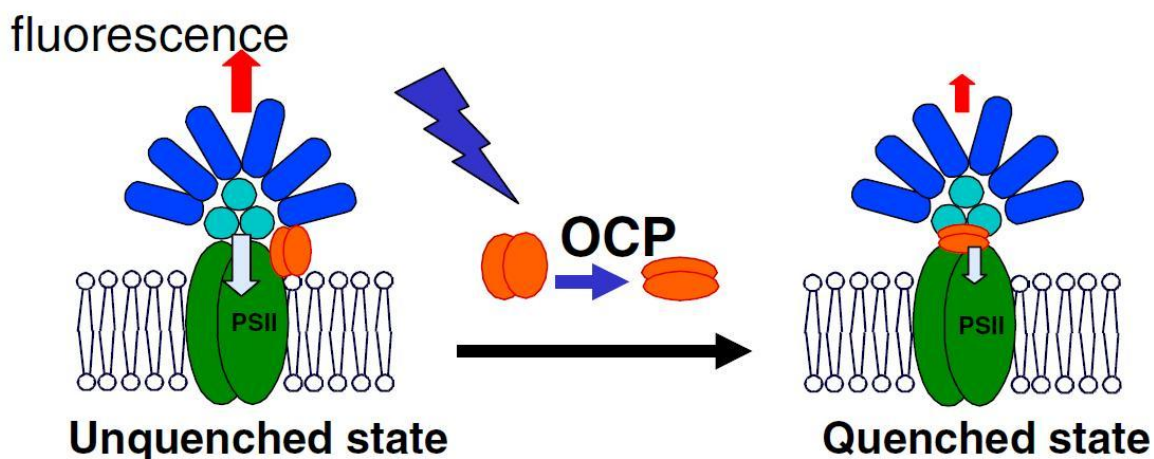
1.1.1 Mechanismy fotoprotekce u sinic

Vystavení fotosyntetického aparátu příliš vysoké intenzitě světelného záření může způsobit jeho poškození. Proto se u fotosyntetizujících organismů vyvinuly různé způsoby ochrany (fotoprotekce) před poškozením zvýšeným ozářením.



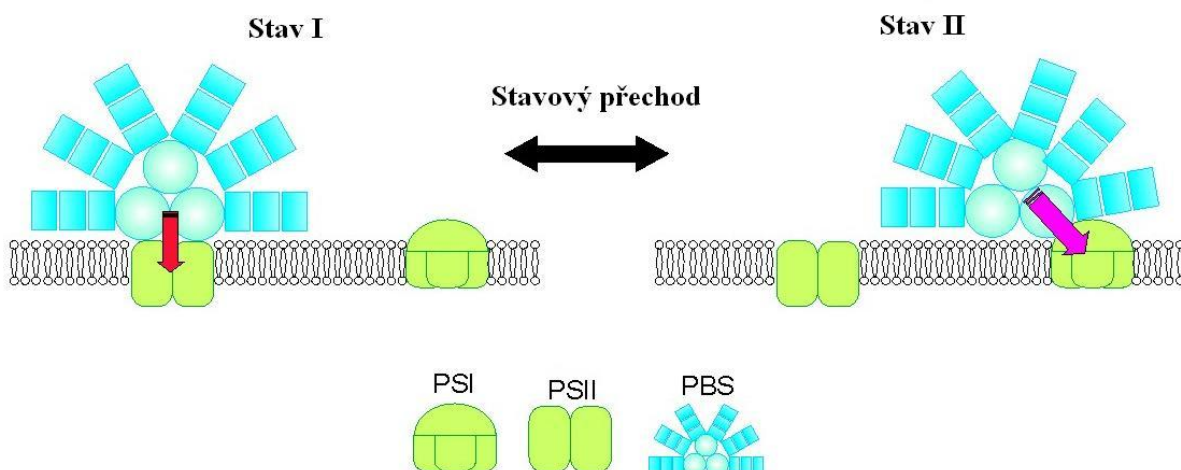
Obrázek 3: Znáornění teoretické a reálné úrovně fotosyntézy za různé intenzity světla (Li, Wakao et al. 2009).

Jedním z mechanismů fotoprotekce u sinic je tzv. nefotochemické zhášení. Tento proces využívá protein OCP (z anglického *Orange Carotenoid Protein*), který se váže na jádro fykobilisomů a znemožní další přesun excitace do fotosystému, nadbytečná absorbovaná energie se pak disipuje ve fykobilisomu (viz Obrázek 4). OCP se vyskytuje ve dvou formách v oranžové a červené kdy pouze červená je fotoprotektivně aktivní (Kirilovsky 2007).



Obrázek 4: Fotoprotektivní mechanismus nefotochemického zhášení řízený proteinem OCP (Kirilovsky 2007). (PSII – Fotosystém II, OCP – „Orange Carotenoid Protein“). Nezhášený stav („Unquenched state“) je při nízké intenzitě světla kdy OCP neblokuje předávání excitace do reakčního centra. Zhášený stav („Quenched state“) je při vysoké intenzitě světla kdy OCP blokuje přechod excitace do reakčního centra.

Dalším mechanismem fotoprotekce u sinic je redistribuce excitační energie mezi fotosystémy I a II takzvanými stavovými přechody (viz Obrázek 5), jenž mění efektivní velikost antén fotosystému II (Melis, Mullineaux et al. 1989). Rozlišujeme dva stavy, Stav 1 je indukovaný absorpcí světla fotosystémem I což vede k navýšení efektivního absorpčního průřezu fotosystému II. Stav 2 je naopak indukovaný absorpcí světla fotosystémem II což vede k navýšení efektivního absorpčního průřezu fotosystému I (Kirilovsky 2007; Kirilovsky, Kana et al. 2013).

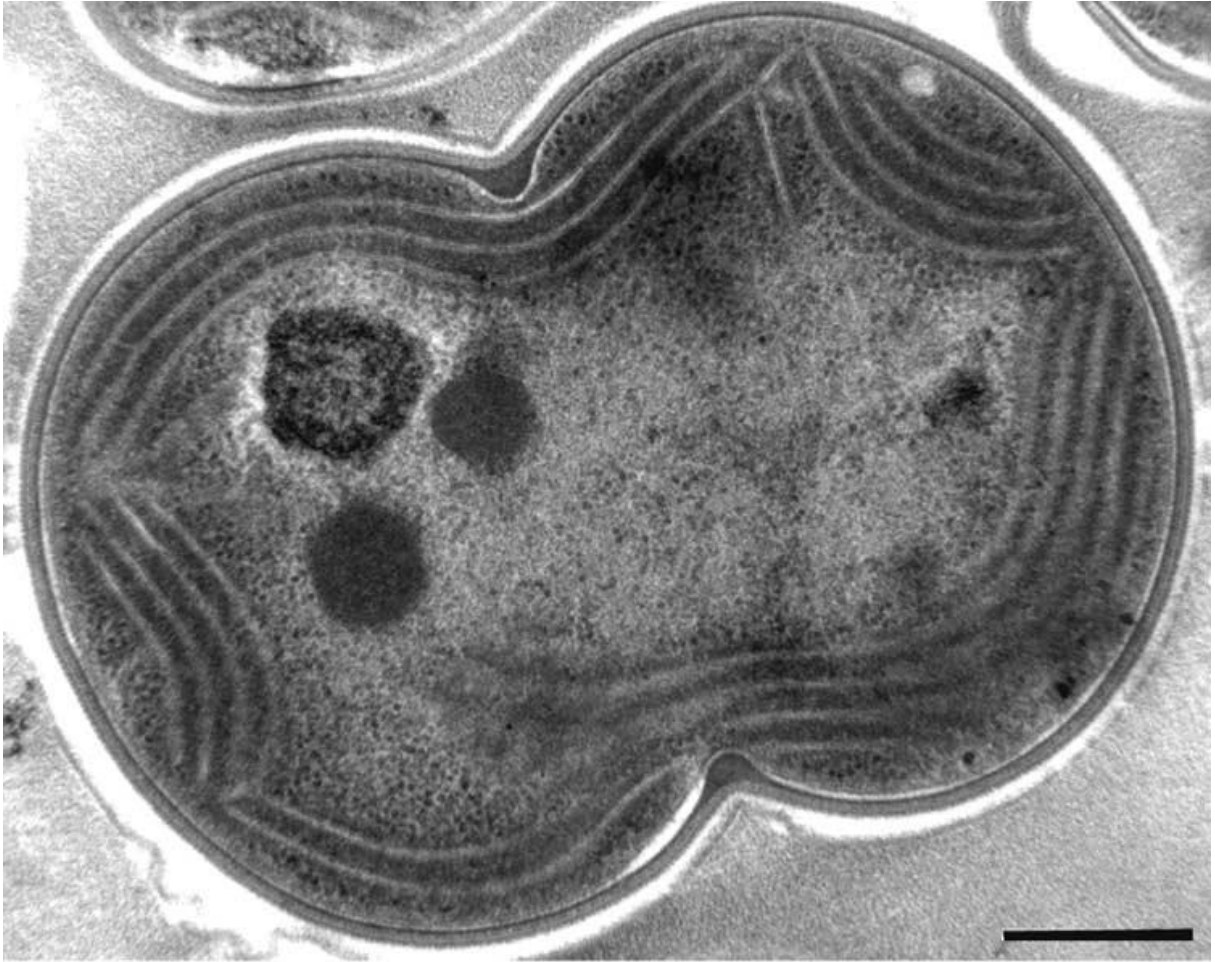


Obrázek 5: Stavový přechod - přesun fykobilisomu mezi fotosystémy (Kirilovsky, Kana et al. 2013). (PSI – Fotosystém I, PSII – Fotosystém II, PBS – Fykobilisom.)

Další typy fotoprotekce již nejsou rychlého charakteru a jsou representovány změnami v expresi genů nebo systematicky získanou aklimatizací (Li, Wakao et al. 2009).

1.2 Sinice

Sinice jsou jednoduché mixotrofní prokaryotické organismy (Fott 1967). Jsou to jedny z nejstarších známých fotosyntetizujících organismů, byly nalezeny již v prekambických sedimentech starých zhruba tři miliardy let (Schopf and Barghoor.Es 1967). Neobsahují jádro, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum ani plastidy (Van Den Hoek, Mann et al. 1995). Genetická informace je ve složitě vinutých kruhových molekulách DNA, které nejsou nijak odděleny od protoplasm. Sinice obsahují tylakoidy v jejichž membráně je obsažen fotosyntetický aparát i proteiny dýchacího řetězce (Schmetterer 2004). Na povrchu tylakoidu se vyskytují fykobilisomy, světlosběrné komplexy které přenáší excitace do obou fotosystémů. Fykobilisomy obsahují pigmenty modré (c-fykocyanin, allofykocyanin) a někdy i červený (fykoerytrin). V buňce sinic jsou také obsaženy karboxisomy které obsahují RUBISCO. Celá buňka je uzavřena v buněčné stěně, jejíž vrstevnatá struktura vykazuje gramm negativní reakci (Kaštovský and Hauer 2003).



Obrázek 6: Řez sinicí *Synechocystis* sp. PCC 6803 zobrazený pomocí transmisní elektronové mikroskopie připravený metodou vysokotlaké kryofixace (Blankenship 2008). Měřítka představuje 0,4 μm .

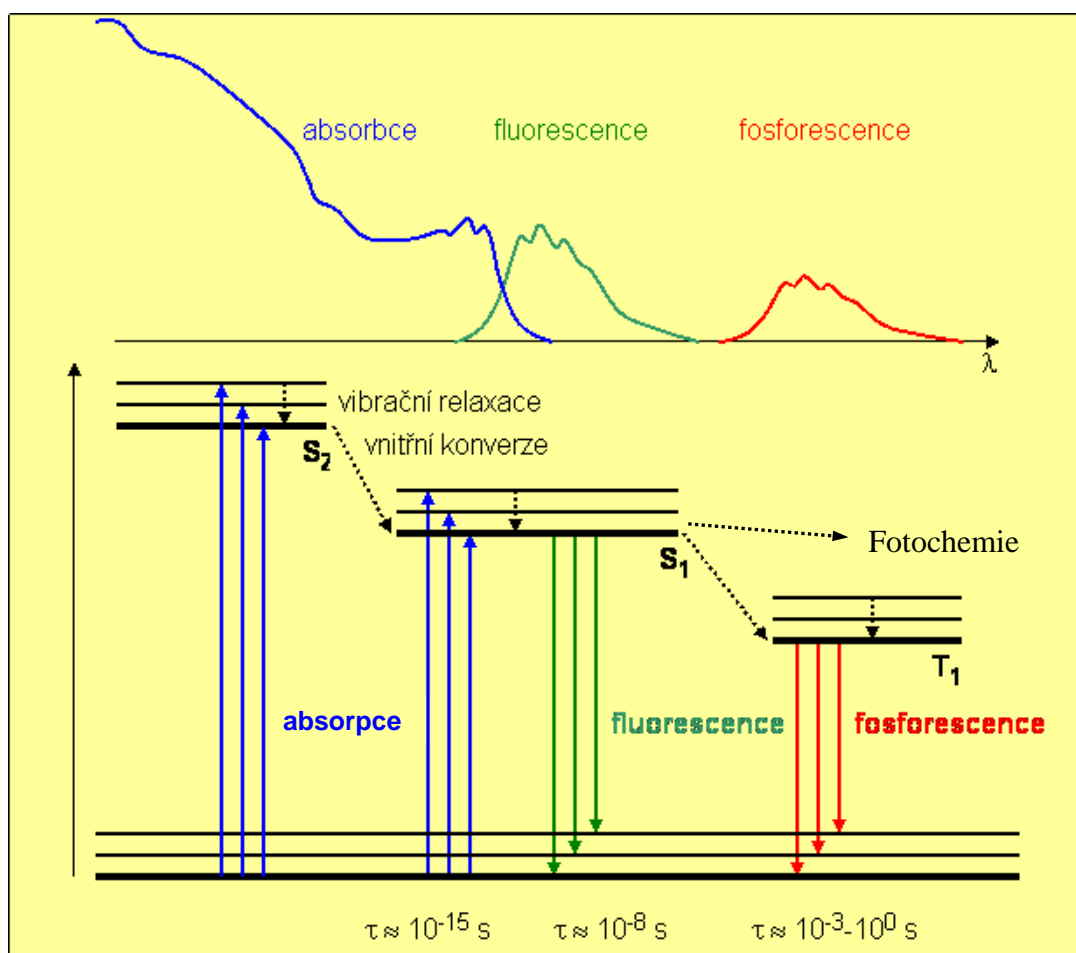
Synechosystis je rod sladkovodních sinic, které jsou schopny se živit jak autotrofně, oxygenní fotosyntézou, tak heterotrofně glykolýzou a oxidační fosforylací (Stanier, Kunisawa et al. 1971). Tyto dva druhy výživy se mohou během dne střídat dle cirkadiálních hodin (Kondo and Ishiura 2000). Zástupce *Synechocystis* sp. PCC6803 (Obrázek 6) je oblíbeným modelovým organismem, protože má malý (3,6Mb) kompletně sekvenovaný genom (Kaneko, Sato et al. 1996) a relativně snadno přijímá a do svého genomu integruje exogenní DNA. Této snadné transformovatelnosti se využívá při tvorbě specifických mutantních kmenů vhodných pro studium funkce fotosystémů a s fotosyntézou spojených proteinů (Viola, Ruhle et al. 2014). Tato sinice byla původně izolována v roce 1968 ze sladkovodního jezera v Kalifornii (Stanier, Kunisawa et al. 1971). Dnes je udržována ve sbírce sinic Pasteurova ústavu v Paříži (*Pasteuer Culture Collection*, kmen PCC6803) a

v americké sbírce *American Type Culture Collection*, kde má označení ATCC 27184 (Rippka, Deruelles et al. 1979).

1.3 Experimentální metody variabilní fluorescence

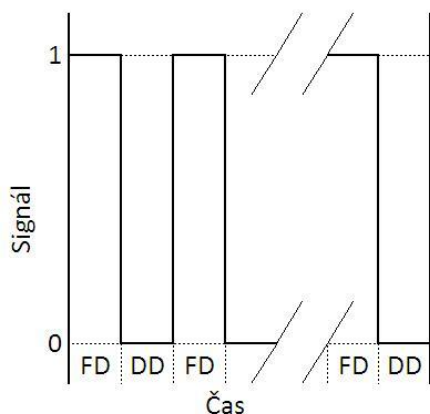
1.3.1 Variabilní fluorescence a systém měření metodou FRRF

Při dopadu světelné energie na světlosběrné antény dochází k excitaci chlorofylu. Excitační energie se poté postupně předává dál, až do reakčního centra kde dojde k nábojové separaci a redukci feofytinu a následně chinonu A. Pokud je řetězec pro předávání excitací přehlcený, může po velmi krátké době (~ 10 ns) dojít k deexcitaci chlorofylu a to uvolněním tepelné energie nebo světelného kvanta ve formě fluorescence (viz Obrázek 7) (Lakowicz 2006). Předpokládá se tedy, že variabilní fluorescence chlorofylu je přímo úměrná množství zredukovaných reakčních center především chinonu A.



Obrázek 7: Jablonského schéma excitace (psych.lf1.cuni.cz/).

Pro měření rychlých změn fluorescence lze použít metodu nazvanou „*fast repetition rate fluorescence*“ (FRRF). Tato metoda umožňuje nezávisle měřit účinnost primárních fotochemických reakcí fotosystémů II, zejména pak efektivní velikost antén a konektivitu PSII (Kolber, Prasil et al. 1998).



Obrázek 8: Sekvence mikropulzů v průběhu jednoobrátkového saturačního záblesku (ST záblesku). Schéma zobrazuje časový průběh zapínání (logická 1) a vypínání (logická 0) jednotlivých mikropulzů v průběhu ST záblesku (FD – „Flashlet Duration“ – délka mikropulzu, DD – „Dark Duration“ – doba mezi mikropulzy). Tato měřicí sekvence je dále označována jako FSD („Flashlet sequence duration“). ST záblesk je složen z přibližně 100-200 μs mikropulzů (o délce 0,5 μs až 2 μs) oddělených 0,5 μs až 2 μs od sebe.

Technika FRRF je založena na měření přechodové fluorescence indukované sérií krátkých nesaturačních excitačních mikropulzů (v délce okolo 1 μs) kde intenzita, trvání a interval mezi mikropulzy se dá nezávisle kontrolovat. Série krátkých mikropulzů vyvolává saturační jednoobrátkový záblesk (ST záblesk v délce cca 100-200 μs) který je typický pro FRRF metodu (viz Obrázek 8). Tento ST záblesk excituje reakční centrum pouze jednou, plastochinon se redukuje pouze jedním elektronem. Protože plastochinon potřebuje k opuštění fotosystému II být redukován dvakrát, tento systém nezpůsobí rozeběhnutí dalších fotochemických reakcí za PSII (Kolber, Prasil et al. 1998).

1.3.2 Parametry metody FRRF

Fluorescenční indukční křivky měřené během ST záblesků metodou FRRF odrážejí postupné uzavírání reakčních center PSII. Můžeme je tedy popsat matematickým modelem, jehož parametry odpovídají specifickým vlastnostem fotosystémů II a to především efektivní velikosti antén PSII (σ) a konektivitě reakčních center PSII (p). Dalšími zjišťovanými parametry jsou hodnota minimální (F_0) a maximální (F_M) fluorescence. Matematický model

autorů Kolber a kolektiv (Kolber, Prasil et al. 1998) simuluje průběh fluorescenční indukční křivky během ST záblesku podle rovnice (3) za využití rovnic (1) a (2). Rovnice (1) počítá intenzitu záření int v kyvetě během mikropulzu z nastavené intenzity ST záblesků (FV) a z maximální intenzity jednotlivých LED zdrojů (I) udávané výrobcem fluorimetru (pro oranžové světlo $50\,000\ \mu\text{mol kvant} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a pro modré světlo $90\,000\ \mu\text{mol kvant} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

$$int = FV \cdot I \cdot 6,022 \cdot 10^{-9} \quad (1)$$

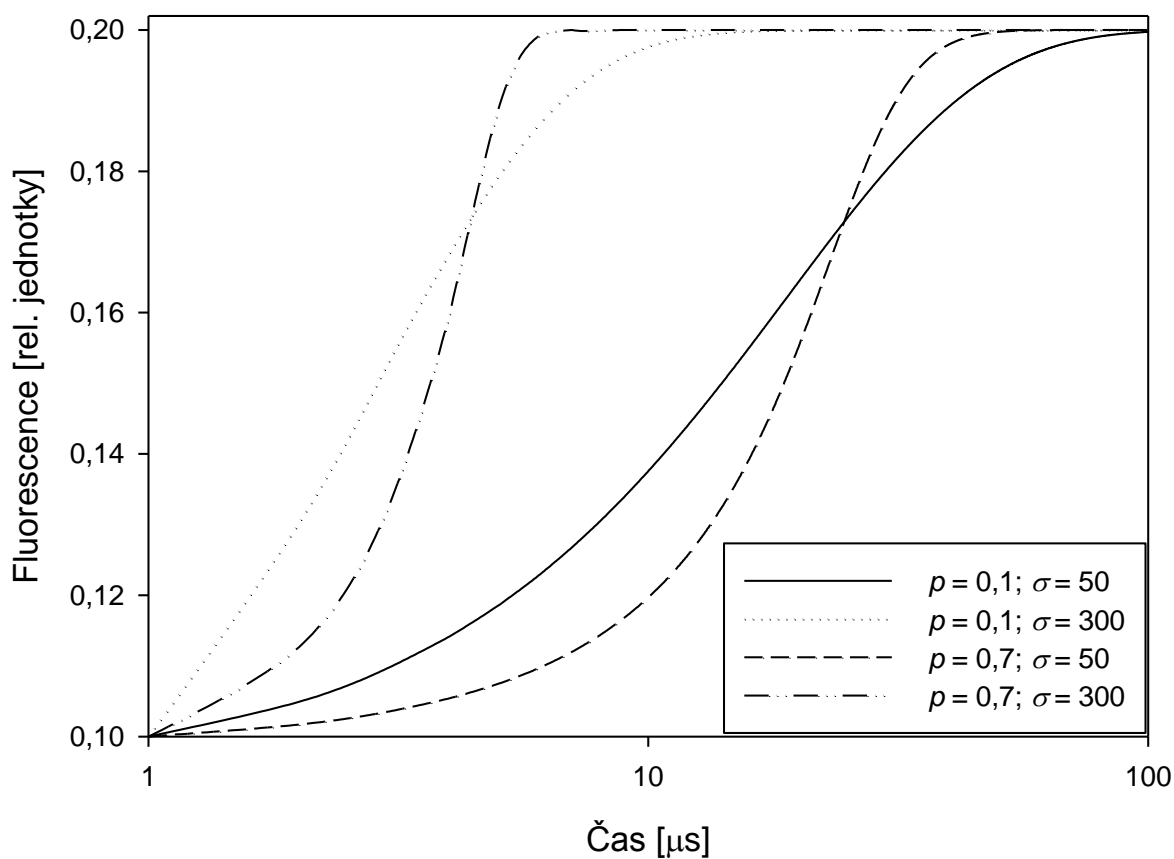
Rovnice (2) charakterizuje počet uzavřených reakčních center po i -tém mikropulzu. Počet uzavřených center na začátku Cn_0 je roven nule. Následující mikropulzy poté uzavírají některá reakční centra a počet uzavřených center se zvyšuje. Při výpočtu počtu uzavřených reakčních center pomocí rovnice (2) je potřeba znát parametry efektivní velikost antén PSII σ , délku trvání jednoho mikropulzu (FD) a konektivitu reakčních center PSII p .

$$Cn_i = Cn_{(i-1)} + \frac{\sigma \cdot int \cdot FD \cdot (1 - Cn_{(i-1)})}{1 - Cn_{(i-1)} \cdot p} \quad (2)$$

Z výsledků získaných rovnicí (2), tedy počtu uzavřených reakčních center po i -tém mikropulzu Cn_i , se může při znalosti minimální a maximální fluorescence F_0 a F_M a konektivity reakčních center PSII p dopočítat hodnota fluorescence pro daný i -tý mikropulz pomocí vzorce:

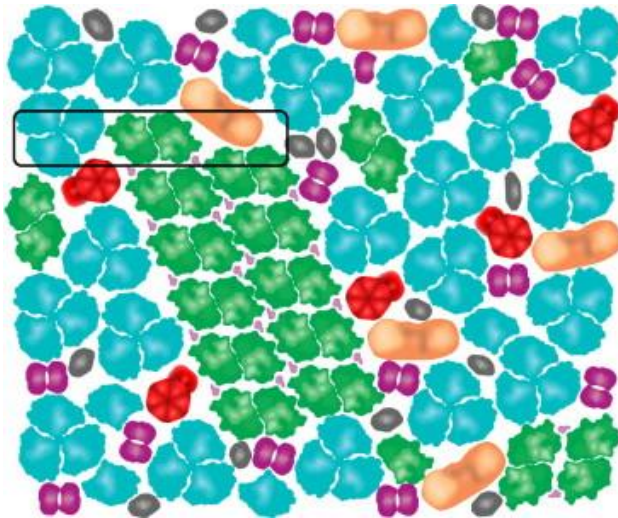
$$Ffit_i = F_0 + \frac{(F_M - F_0) \cdot Cn_i \cdot (1 - p)}{1 - Cn_i \cdot p} \quad (3)$$

Hodnoty F_0 , F_M , σ a p nejsou předem známy a představují tak výstupní parametry získané fitováním experimentálních dat (průběh fluorescence během ST záblesku, viz Obrázek 9) matematickým modelem popsaným v rovnici (3) při využití rovnic (1) a (2).



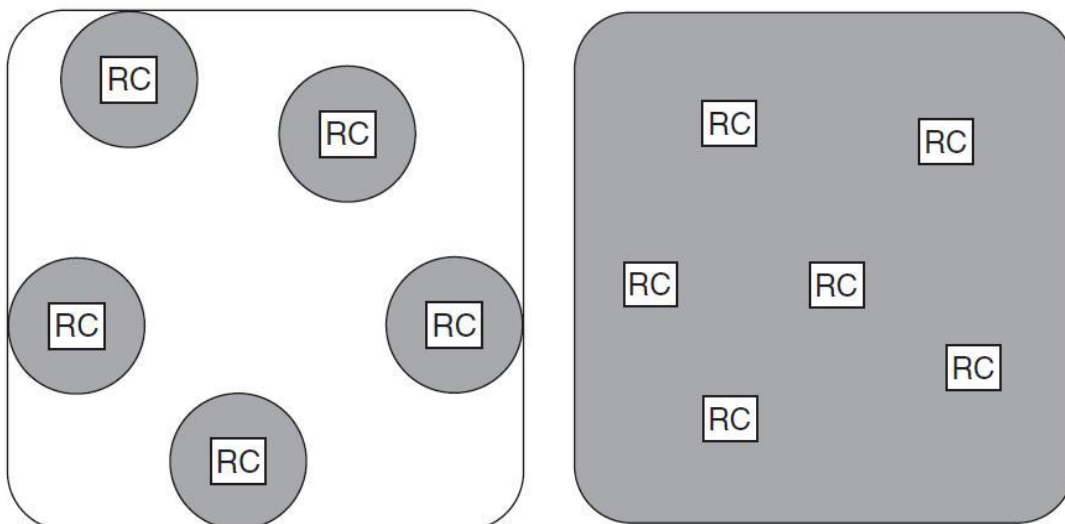
Obrázek 9: Průběh fluorescence během ST záblesku pro různé parametry. Parametr F_0 a F_M určuje maximální a minimální hodnotu. Pro tento výpočet byly tyto hodnoty zvoleny $F_0 = 0,1$ a $F_M = 0,2$.

Typický průběh fluorescence během jednoho ST záblesku (vyvolaného sadou mikropulzů) je zobrazen v Obrázek 9. Jelikož míra fluorescence je v podstatě míra neschopnosti využít excitační energii reakčním centrem tak vysoká konektivita p způsobí snížení fluorescence z důvodu přesměrování excitační energie ze zavřeného reakčního centra fotosystémů II do jiného otevřeného. Tento efekt se projeví na fluorescenční indukční křivce vyšším sklonem směrnice v její střední části. Efektivní velikost antén σ vyjadřuje plochu, která se stoprocentní pravděpodobností pohltí kvantum záření (Maksimov, Kuzminov et al. 2011). Pokud je tato hodnota velká, dochází k rychlejšímu zavírání reakčních center a k následné zvýšené intenzitě fluorescence. Proto k saturaci dochází dříve.



Obrázek 10: Shluk dimerů fotosystému II indukovaný modrými ST záblesky (Folea, Zhang et al. 2008). Zeleně je znázorněn fotosystém II, modře fotosystém I, fialově je cytochrom b_6/f , červeně ATPsyntasa, okrově NDH-1 komplex a šedivě cytochrom oxidasa.

Při použití modrého měřicího světla fluorescence vychází z chlorofylu ve fotosystému II, a proto její úroveň odráží jeho množství. Běžné hodnoty pro efektivní velikost antén PSII při použití modrých ST záblesků se u sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 pohybují v rozmezí $30 - 60 \text{ \AA}^2$. Oranžové měřící světlo je zachycováno fykobilisomy a proto fluorescence indukovaná oranžovými ST záblesky je úměrná jejich množství. Běžné hodnoty pro efektivní velikost antén PSII při použití oranžových ST záblesků se u sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 pohybuje v rozmezí $300 - 430 \text{ \AA}^2$ (viz Obrázek 2)

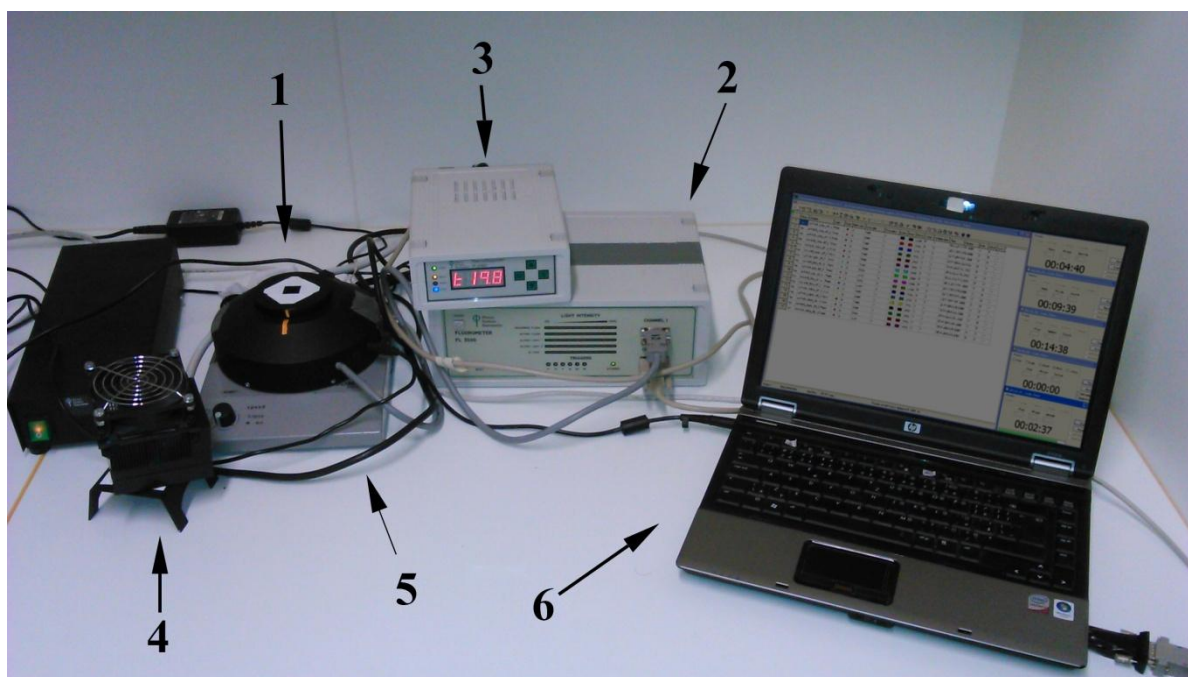


Obrázek 11: Model zobrazující reakční centra (RC) s nulovou konektivitou (na levo) a se stoprocentní konektivitou (na pravo) (Blankenship 2008).

Při příchodu excitace k uzavřenému reakčnímu centru, reakční centrum není schopno tuto excitaci využít a energie se přemění na teplo nebo vyzáří jako fluorescence. Konektivita popisuje, s jakou pravděpodobností může uzavřené reakční centrum přichodící excitaci odklonit do jiného neuzavřeného reakčního centra, které jí dále může využít. Obě extrémní situace jsou zobrazeny v Obrázek 11.

1.3.3 Experimentální aparatura pro měření FRRF

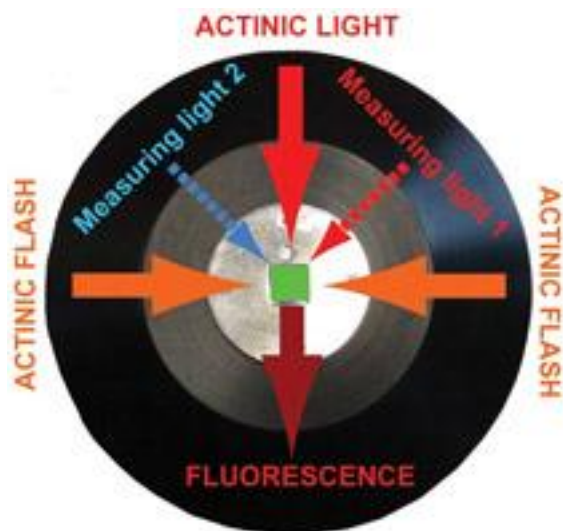
Pro měření FRRF je potřeba fluorimetr který je schopen mikrosekundových světelných záblesků (mikropulzů). Příkladem je aparatura vyvinutá na třeboňském pracovišti „Fast Fluorometer FL 3500-F a dnes vyráběná firmou PSI (Photon Systems Instruments). Tento přístroj je schopen detekovat fluorescenci s časovým rozlišením do 1 μ s. Jako zdroj světla využívá modrých (455 nm) a oranžových (617 nm) měřících a aktinických LED (viz Obrázek 12).



Obrázek 12: Měřící aparatura *Fast Fluorometer FL 3500-F* od firmy Photon System Instruments (PSI, Brno, Česká republika) použitá pro metodu FRRF. Jednotlivé součásti aparatury jsou: 1 – měřící hlava fluorimetru s kyvetovým prostorem, 2 – kontrolní jednotka fluorimetru, 3 – ovládací část jednotky pro kontrolu teploty, 4 – temperovací hlava, 5 – magnetická míchačka, 6 – ovládací počítač.

Fluorimetr *FL 3500-F* (viz Obrázek 12) se skládá z měřící hlavy, kontrolní jednotky fluorimetru, temperovací hlavy, ovládací temperanční jednotky a magnetické míchačky. Měřící hlava (viz Obrázek 13) obsahuje slot na standardní kyvetu (10 x 10 mm, maximální

objem 4 ml), a dále jsou zde umístěny LED zdroje aktinického a měřicího světla, PIN diodový detektor s integrovaným 500 Hz 16 bitovým AD převodníkem.



Obrázek 13: Detailní schéma měřicí hlavy fluorimetru FL 3500-F s kyvetovým prostorem. Schéma znázorňuje pozici jednotlivých měřicích a aktinických LED diod (Photon Systems Instruments 2002).

Kontrolní jednotka fluorimetru propojuje měřicí hlavu a počítač s obslužným programem FluorWin, který kompiluje měřicí protokol a zaznamenává naměřené výsledky. Pro přesnou kontrolu teploty slouží temperační hlavice se speciálním nástavcem pro vložení do kyvety. Pro zamezení sedimentace vzorku slouží magnetické míchadlo, které je možno ovládat pomocí měřicího protokolu a vypínat v době vlastního měření k zabránění interference magnetické míchací části se zářením procházejícím kyvetou.

2 Metodická část

2.1 Modelové organismy a jejich kultivace

Jako modelový organismus jsem použil sinici *Synechocystis* sp. PCC 6803. Pro studium jsem využil mutanty s různě pozměněnými funkcemi fotosyntetického aparátu. Transformované (mutantní) kmeny byly získány od Prof. Diany Kirilovské (CEA, Sacley, Francie).

Tabulka I: Přehled použitých mutantů sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Název transformovaného kmene	Typ transformace	Efekt na fenotyp sinice	Rezistence
WT – Divoký typ	Není.	Není.	Není.
Δ OCP	Mutant nesyntetizuje OCP.	Nedochází k OCP indukované fotoprotekci.	Není.
Δ ApcD	V jádře PBS je ApcD nahrazen α APC.	Nedochází k ST. Možný pouze stav I.	Streptomycin / Spektinomycin
Δ ApcF	V jádře PBS je ApcF nahrazen β APC.	Nedochází k ST. Možný pouze stav II.	Streptomycin / Spektinomycin
Δ ApcC	Jádro PBS ApcC podjednotku	Zatím neznámý	Streptomycin / Spektinomycin
Δ ApcE – C190S	Protein ApcE není schopen vázat fykocyanobilin.	Zatím neznámý	Streptomycin / Spektinomycin
Δ AB	PBS neobsahuje jádro.	Tvoří pouze tyčky fykobilisomů	Streptomycin / Spektinomycin
CK	PBS neobsahuje fykocyanin.	Tvoří pouze jádra fykobilisomů	Kanamycin
PAL	Nemá PBS.	Nemá PBS.	Není.

2.1.1 Příprava kultury

Zásobní kultura byla udržována na 1 % agarových plotnách za použití sladkovodního média BG-11(Allen 1968) s přídatkem pufru TES, při 28°C, na kontinuálním bílém světle o intenzitě 20 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Z důvodu možné kontaminace divokým kmenem („Wild type“) bylo do agarových ploten pro specifické mutanty přidáno antibiotikum, vůči kterému byl příslušný mutant rezistentní. Fluorescenční měření byla prováděna na sinicích kultivovaných v roztoku, v sterilních 250 ml Erlenmayerových baňkách s buničinovou či molitanovou zátkou. Objem připravované kultury byl cca 120 ml z důvodu účinnějšího míchání na automatické třepače. Vzorek rostl cca 2 – 7 dní v závislosti na rychlosti růstu

různých mutantů na bílém světle s intenzitou $30 \mu\text{mol kvant} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a s neustálým třepáním o intenzitě 120 rpm. Měření bylo možné provést, pokud vzorek měl optickou hustotu (OD) při 730 nm 0,05 až 0,25 což odpovídá optické hustotě při 630 nm 0,07 až 0,35.

2.2 Fluorescenční měření

Fluorescenční měření metodou FRRF byla prováděna na zařízení „Fast Fluorometer FL 3500-F“ od firmy Photon System Instruments (Brno, Česká republika). Před samotným měřením byl vzorek 15 min adaptován na tmu (viz kapitola 3.1.1) při udržování konstantní teploty 28°C. Při metodických experimentech se využívalo protokolů s různým počtem ST – záblesků bez aktinického světla (viz kapitola 3.2). Pro experimenty se specifickými mutanty *Synechocystis* sp. PCC6803 jsem použil protokol č. 2 se všemi kombinacemi aktinických a měřících světél barvy modré ($\lambda = 455 \text{ nm}$) a oranžové ($\lambda = 617 \text{ nm}$). První ST záblesk proběhl na začátku ve tmě, poté bylo zapnuto aktinické světlo během kterého se aplikovalo 8 ST záblesků logaritmičtě rozmístěných po celé délce trvání aktinického světla za sebou. Po skončení aktinického světla proběhl ještě poslední ST záblesk ve tmě. Tato série ST záblesků byla zvolena jako standardní protokol. V průběhu měření byla v kyvetě udržována konstantní teplota 28°C a vzorek byl před měřením krátkodobě promíchán magnetickým míchadlem pro omezení role sedimentace, míchání bylo v průběhu měřicí sekvence vypnuto.

2.3 Fitování experimentálních křivek

Fitování jsem prováděl v prostředí programu Microsoft Excel 2010 s využitím skriptovacího jazyku „Visual Basic for Applications“ a doplňku „Solver“ (Řešitel) který je uzpůsoben k hledání lokálních extrémů na matematické funkci čehož jsem při fitování využil. Zpracování a fitování dat probíhalo automaticky, za využití nově sestaveného makra v Excelu (viz část 3.1.5)

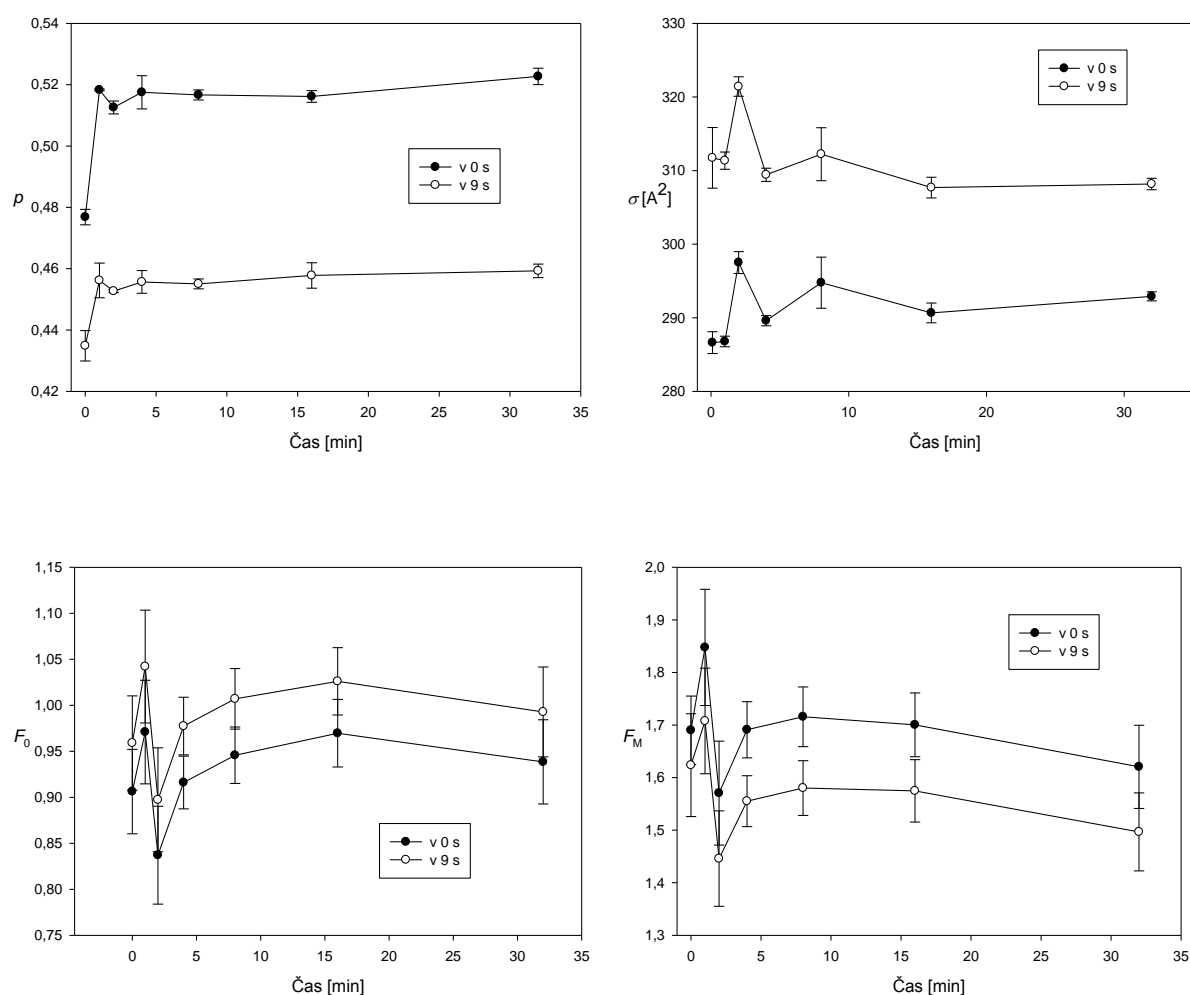
3 Výsledky

3.1 Metodické experimenty pro optimalizaci metody FRRF

Cílem optimalizace metody FRRF bylo snížit minimální dobu potřebnou pro měření, zvýšit přesnost výsledků a opakovatelnost a navrhnout optimální měřicí protokol pro studium nefotochemického zhášení a stavových přechodů u sinic.

3.1.1 Role délky adaptace na tmu

Před měřením fotochemické aktivity PSII je nutné vzorek adaptovat na tmu. To se standardně provádělo uložení kyvety se vzorkem do držáku v neprůsvitném boxu. Po dvaceti minutách byla kyveta s adaptovaným vzorkem na tmu vložena do kyvetového prostoru přístroje *FL 3500-F*. Z důvodů potřeby co nejvíce zkrátit dobu potřebnou k provedení jednoho měření jsem provedl experimenty se vzorky po různé době adaptace na tmu. Cílem bylo, zjistit jaký minimální čas je potřeba k adaptaci na tmu u sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803. Výsledný graf je zobrazen v Obrázek 14.



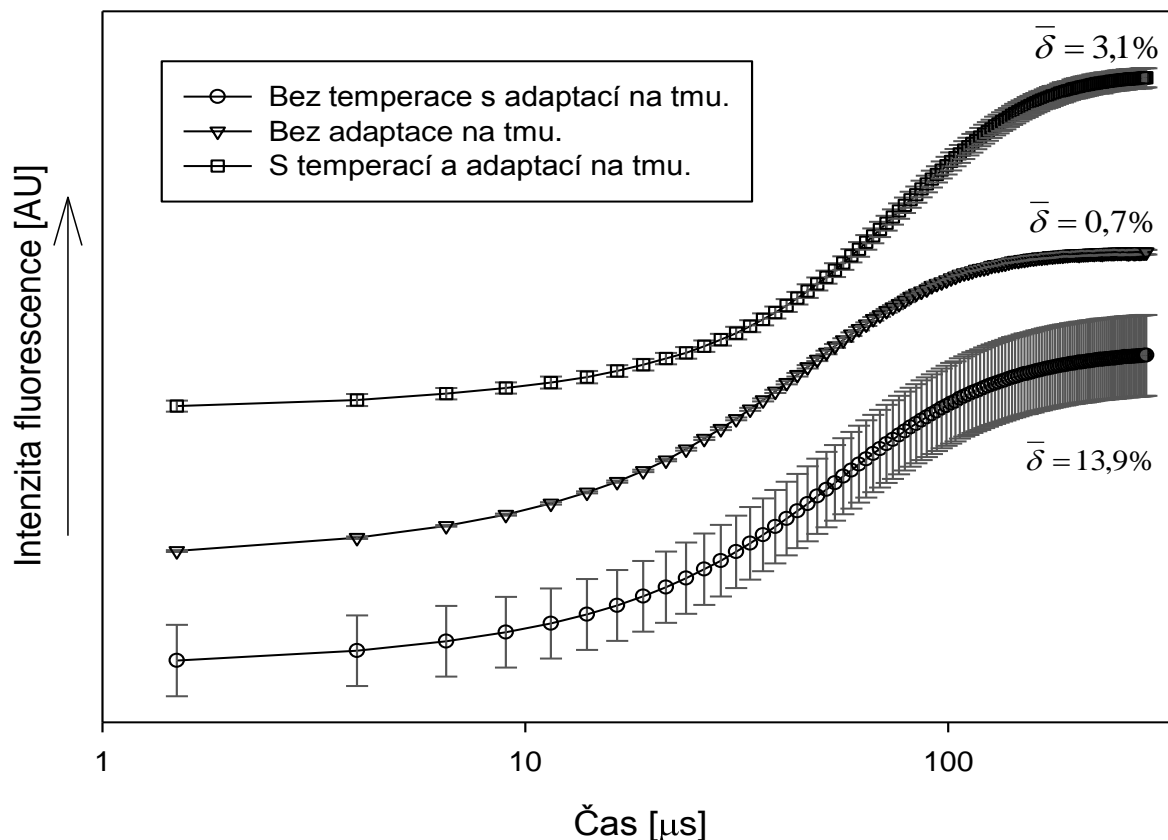
Obrázek 14: Závislost hodnoty parametrů fluorescence získaných metodou FRRF na délce adaptace na tmu. Pro každou dobu adaptace na tmu byla aplikována sekvence deseti oranžových ST záblesků oddělených jednosekundovou relaxační dobou. Křivka označená „v 0 s“ zobrazuje kinetiku parametrů vytvořenou z prvního ST záblesku z použité série, křivka označená „v 9 s“ zobrazuje kinetiku parametrů vytvořenou z desátého ST záblesku

série. Aktinické světlo nebylo v protokolu použito. Data reprezentují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky pro tři opakování.

V grafu Obrázek 14 jednotlivé křivky zobrazují časový průběh změny fluorescenčních parametrů během adaptace vzorku na tmu. Na začátku se vyskytovaly fluktuace v hodnotách parametrů, které přibližně postupně mizí. Po 15 minutách adaptace na tmu byla hodnota efektivní velikosti antén PSII dostatečně stabilizovaná, a proto se tato doba zdá být nejideálnější dobou potřebnou pro adaptaci sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 na tmu. Patnáctiminutové adaptace na tmu jsem poté využil při všech dalších měřeních.

3.1.2 Vliv teploty během temnotní adaptace na chybu měření.

Pro posouzení vlivu teploty během temnotní adaptace jsem použil protokol s jedním oranžovým ST zábleskem a bez zapnutí aktinického světla. Měření jsem devětkrát opakoval, pro každé opakování jsem použil nový vzorek. Před měřením byly vzorky 15 min adaptovány na tmu buď za pokojové teploty bez teplotní temperance anebo byly temperovány na růstovou teplotu 28°C. Jako kontrolu jsem použil vzorek odebraný přímo z růstových podmínek, tedy bez adaptace na tmu. Výsledné křivky jsou zobrazeny v Obrázek 15.



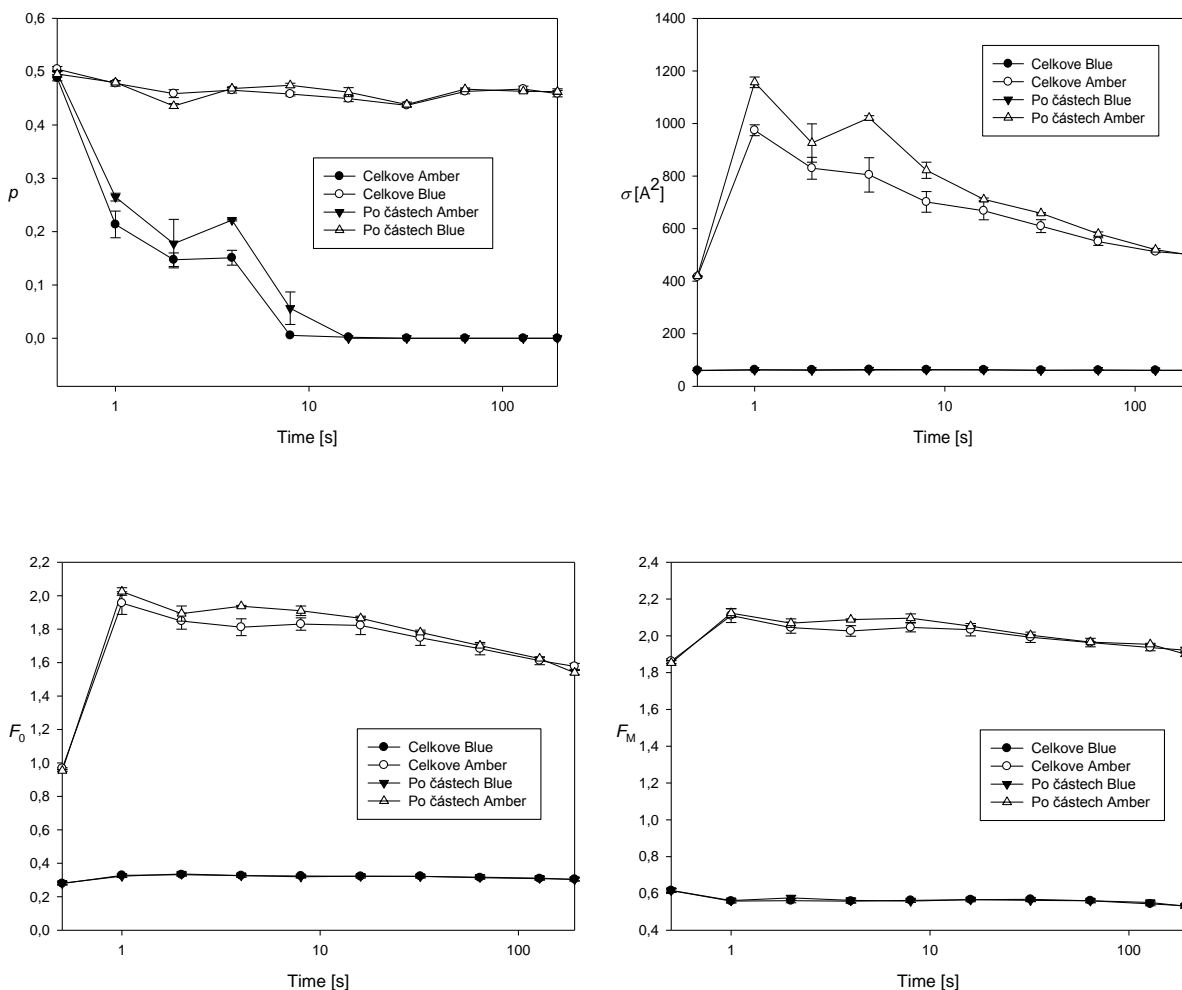
Obrázek 15: Srovnání variability v průběhu indukčních křivek fluorescence během ST záblesku. Křivky byly posunuty na ose y z důvodu přehlednosti. Jednotlivé křivky reprezentují průměrné hodnoty z devíti opakování se zobrazenou relativní odchylkou.

Vzorky adaptované na tmu bez temperance (křivka v grafu Obrázek 15 označená Bez temperace s adaptací na tmu) vykazovaly velkou relativní odchylku, rovnou 13,9%. Jediná manipulace se vzorkem probíhající před samotným měřením, která mohla způsobit tuto variabilitu byla adaptace na tmu. Provedl jsem tedy další měření, tentokrát bez adaptace na tmu. Vzorek byl odebrán ze zásobní kultury a bezprostředně poté proměřen ve fluorimetru. Výsledná křivka je zobrazena v grafu Obrázek 15 označena „Bez adaptace na tmu“. U tohoto měření byla průměrná relativní odchylka mnohem menší, a to 0,7%. Usoudil jsem, že jedním z možných vlivů bude proměnná teplota vzorku při procesu adaptace na tmu. Proto jsem provedl další měření kdy teplota vzorku během adaptace na tmu byla udržována konstantní zařízením Termomixer. Toto měření provedené po adaptaci na tmu při konstantní teplotě je zobrazeno v grafu Obrázek 15 (viz křivka „S temperací a adaptací na tmu“) již vykazovalo mnohem nižší variabilitu a průměrná relativní odchylka dosáhla 3,1 %. Tímto

jsem dosáhl více než čtyřnásobného zpřesnění výsledků. Pro všechna další měření jsem využíval temperace během adaptace na tmu.

3.1.3 Aktinicky efekt ST záblesků.

Pro efektivní měření je nejlepší změřit co nejvíce dat na jednom vzorku. Při opakovaném měření na jednom vzorku ale nastává problém, neboť předchozí měření může ovlivnit následující. Tento efekt jsem ověřil experimentálně, měření proběhlo s prvním ST zábleskem bez aktinického světla a následujících devět ST záblesků s aktinickým světlem. Jednotlivé ST záblesky byly logaritmicky rozloženy během měření. Výsledky srovnávacího měření jsou zobrazeny v grafu Obrázek 16.



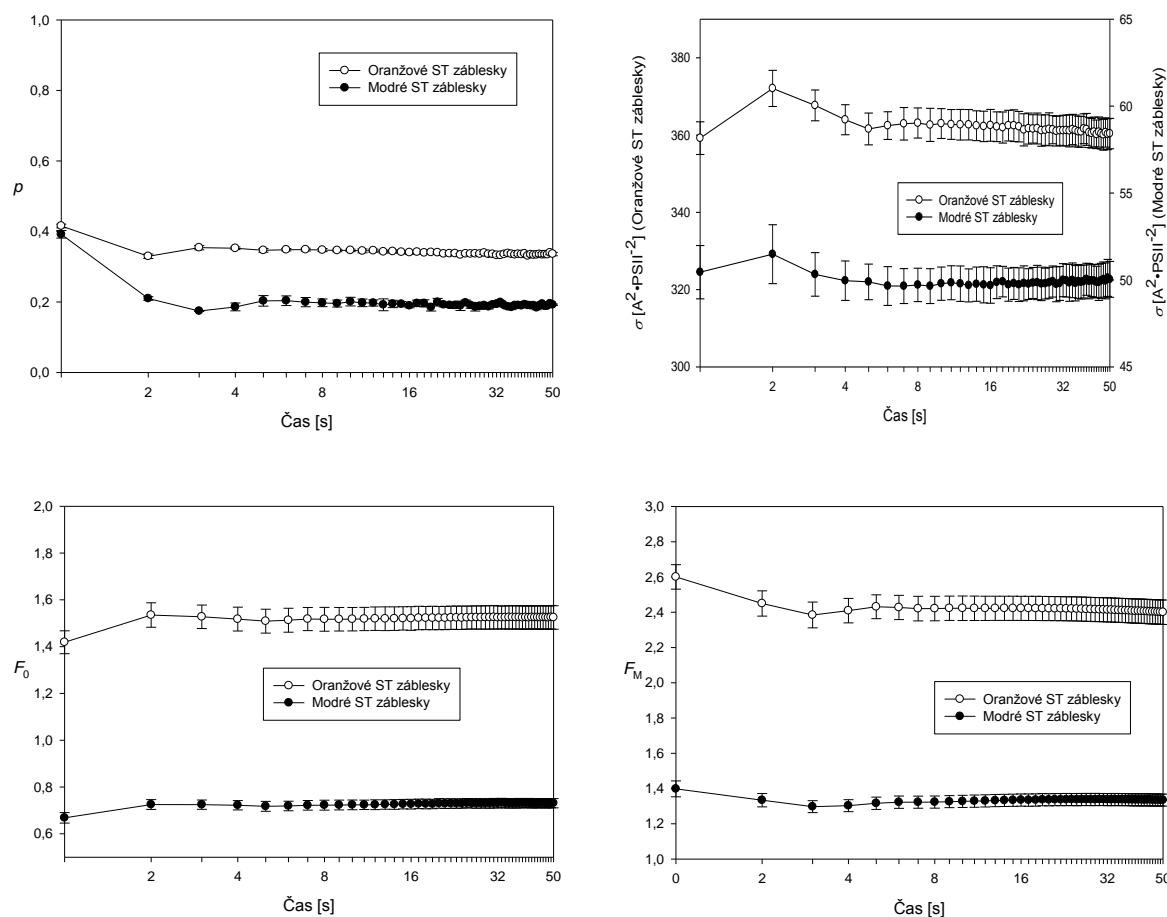
Obrázek 16: Změna parametrů FRRF měření za použití protokolu č. 2. Pro měření jsem zvolil kombinaci oranžového aktinického světla s oranžovými ST záblesky a modrého aktinického světla s modrými ST záblesky. V měření označeném „Celkově“ bylo všech deset měření provedeno na jednom vzorku. V měření označeném „Po částech“ byl pro každý

měřený bod použit nový vzorek. První a poslední ST záblesk byl aplikován bez aktinického světla v pozadí.

Rozdíly mezi jednotlivými typy měření nejsou nijak velké. To znamená, že měřící ST záblesky mají pouze minimální aktinický efekt a mohou být použity v měření v sekvenci za sebou.

3.1.4 Oscilační efekt ST záblesků.

Při analýze výsledků testovacích měření jsme si všimli, že první ST záblesk provedený ve tmě neodpovídá předpokládanému chování, protože u na tmě adaptovaných vzorků osciluje aktivita komplexu vyvíjejícího kyslík s periodou 4. Proto jsem provedl měření, ve kterém jsem proměřil vzorek bez aktinického světla a ST záblesky jsem rozložil lineárně s odstupem jedné sekundy. Z jednoho vzorku jsem takto získal 50 bodů pro vytvoření kinetiky změny fluorescenčních parametrů.



Obrázek 17: Efekt oscilací parametrů FRRF metody.

Zjistil jsem, že oscilační efekt utichá kolem 10. záblesku. Tohoto poznatku jsem využil zařazením série 10 ST záblesku na začátek protokolu (viz část 3.2, protokol č. 4) pro získání referenčního hodnoty σ a p ve tmě.

3.1.5 Automatizace zpracování dat.

Pro zjištění fluorescenčních parametrů z křivky ST záblesků je nutné experimentální data matematicky nafitovat teoretickým modelem (viz kapitola 1.3.2). Naměřená křivka ST záblesků se dá popsat matematickou funkcí, jejíž parametry jsou efektivní velikost antén PSII (σ), konektivita reakčních center PSII (p), minimální (F_0) a maximální (F_M) fluorescence; všechny tyto parametry charakterizují fotosystém II.

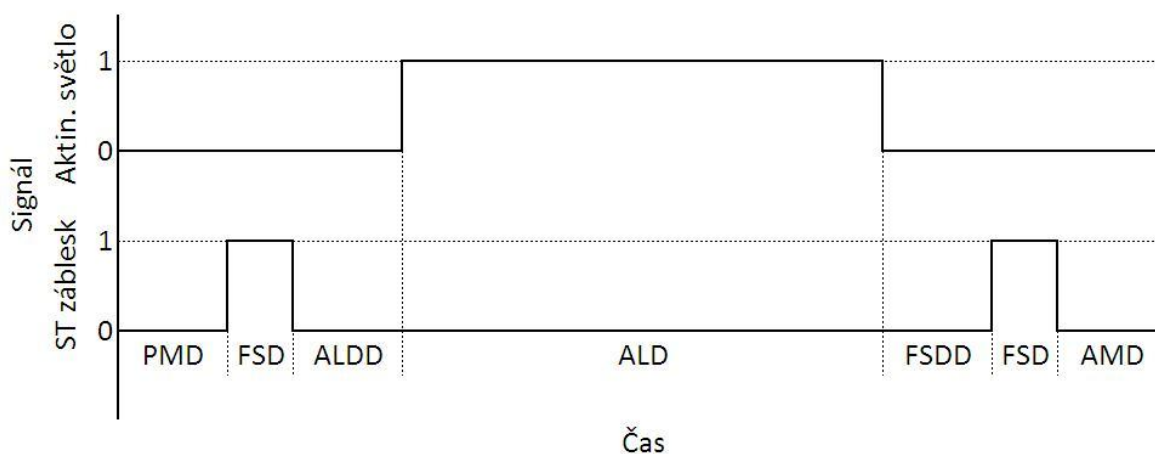
Pro automatizaci zpracování experimentálních dat jsem napsal makro, které automaticky zpracovává naimportovaná experimentální data a zároveň fituje modelem popisující průběh ST záblesků (viz část 1.3.2). Exportovaná experimentální data obsahují sérii křivek s časovým průběhem fluorescence během ST záblesků a mají specifický charakter. Obsahují hlavičku, která má seznam všech naměřených datových řad s parametry použitého protokolu (délka, intenzita, vlnová délka mikropulzů a aktinického světla). Dále následuje tělo, kde jsou jednotlivé datové řady ST záblesků jako sloupce oddělená tabulátory.

Makro pro import a fitování experimentálních dat se skládá z několika částí. Na začátku makro upraví importovaná data, proběhne extrakce potřebných parametrů z hlavičky dat (délka, vlnová délka, počet mikropulzů a intenzita aktinického světla), následuje odstranění hlavičky dat a vytvoření nové hlavičky vhodnější pro další zpracování dat. Experimentální data se poté podle potřeby separují po jednotlivých ST záblescích. V dalším kroku makro, na základě vstupních parametrů modelu zadaných uživatelem počáteční F_0 , F_M , σ , p , provede proceduru fitování dle rovnic (viz kapitola 1.3.2) a výsledky fitování uloží k experimentálním datům do nového listu. Do makra jsem vložil i možnost nastavit počáteční parametry, dále počet opakování kroku fitování. Makro umožňuje také vypnutí jednotlivých částí pro vyšší kontrolu během testů. Výstup makra se skládá z hlavičky (označení vzorku, označení typu ST záblesku, parametry potřebné k fitování (délka, vlnová délka mikropulzů a intenzita aktinického světla) a výsledných parametrů matematické funkce (F_0 , F_M , σ , p)). Tělo se skládá z dat experimentálních a matematickým modelem dopočítaných. Tato úprava výsledků má výhodu, že se dají snadno provést testy na zjištění správnosti fitu a v případě potřeby obsahuje všechny potřebné parametry k provedení

nového fitování. Toto nově sestavené makro jsem použil k zpracování všech dalších výsledků.

3.2 Testování a sestavení optimálního měřicího protokolu pro studium NPQ a stavových přechodů u sinic.

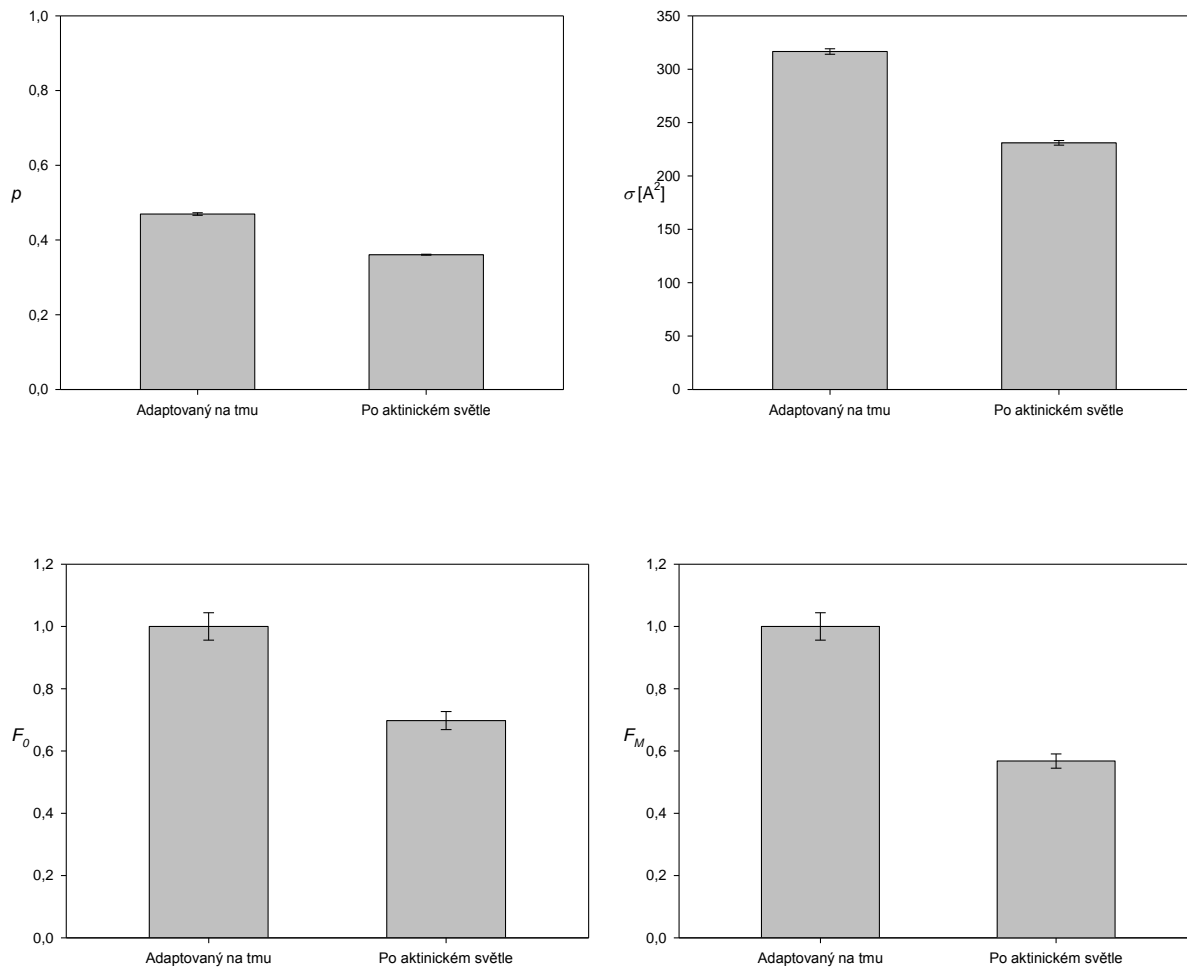
Pro studium stavových přechodů je třeba proměřit vzorek jak ve stavu I tak ve stavu II (viz část 1.1.1). První testovaný protokol pro studium změny parametrů fotochemického zhášení a stavových přechodů vlivem aktinického světla jsem sestavil ze dvou ST záblesků aplikovaných ve tmě (s vypnutým aktinickým světlem) mezi kterými byl vzorek vystaven po určitou časovou dobu aktinickému světlu (modré $\lambda = 455$ nm nebo oranžové $\lambda = 617$ nm). Standardní měřicí protokol, který jsem optimalizoval, se skládal z následujících charakteristických částí: PMD – „*Pre Measurement Duration*“ – doba před aplikací prvních ST záblesků pro na tmu adaptovaný vzorek, FSD – „*Flashlet Sequence Duration*“ – délka trvání ST záblesku, ALDD – „*Actinic Light Delay Duration*“ – délka zpoždění začátku periody aktinického světla, ALD – „*Actinic Light Duration*“ – délka aplikace aktinického světla, FSDD – „*Flash Sequence Delay Duration*“ - délka zpoždění ST záblesku po ukončení periody aktinického světla, AMD – „*After Measurement Duration*“ – doba po aplikaci ST-záblesků ve tmě do konce protokolu. Grafické znázornění průběhu testování prvního typu protokolu (protokol č. 1) je zobrazeno v obrázku Obrázek 18.



Obrázek 18: Schématické znázornění protokolu č. 1. pro měření změny způsobené aktinickým světlem. (PMD – „*Pre Measurement Duration*“ – doba před aplikací prvních ST záblesků pro na tmu adaptovaný vzorek, FSD – „*Flashlet Sequence Duration*“ – délka trvání ST záblesku, ALDD – „*Actinic Light Delay Duration*“ – délka zpoždění začátku periody aktinického světla, ALD – „*Actinic Light Duration*“ – délka aplikace aktinického světla, FSDD – „*Flash Sequence Delay Duration*“ - délka zpoždění ST záblesku po

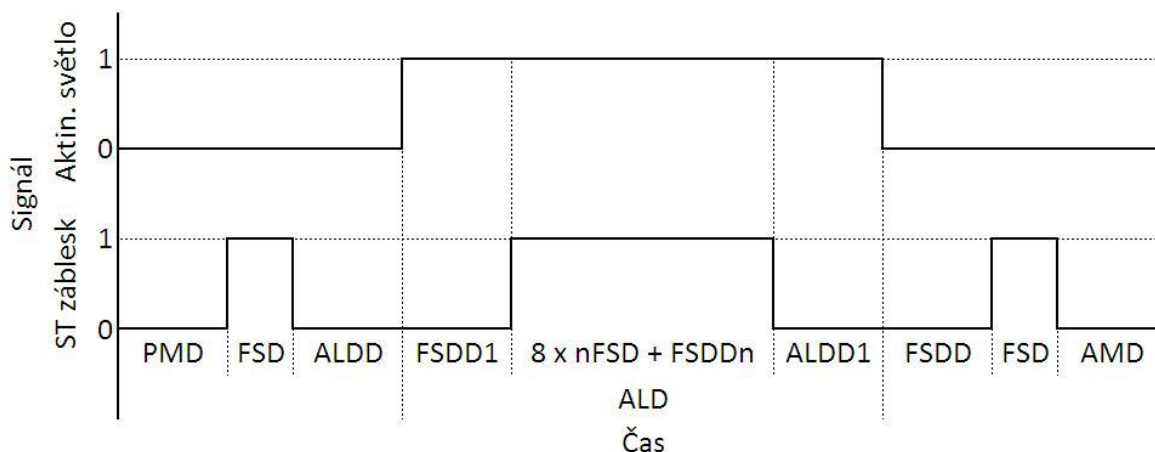
ukončení periody aktinického světla, AMD – „*After Measurement Duration*“ – doba po aplikaci ST-záblesků ve tmě do konce protokolu.) Hodnota 1 odpovídá době, kdy bylo zapnuté aktinické světlo (nebo ST záblesk), hodnota 0 době bez zapnutého aktinického světla (nebo ST záblesku). Ukázková experimentální data získaná měřicím protokolem č. 1 jsou prezentována v grafu Obrázek 19.

Časové rozložení jednotlivých příkazů v protokolu č. 1. bylo libovolně nastavitelné. Standardně byly nastaveny parametry PMD = 1 s, ALDD = 1 ms, ALD 120 s, FSDD = 250 ms a AMD = 3 s. V protokolu schematicky zobrazeném v obrázku Obrázek 18 jsou zobrazeny dvě křivky, první odpovídá době spuštění aktinického světla a druhá času kdy byly aplikovány ST záblesky. Parametry vyznačené v obrázku Obrázek 18 odpovídají názvům proměnných v protokolu. Hodnota FSD (doba) je parametr nepřímo nastavitelný počítal se v protokolu jako součet délky mikropulzu (1 μ s) a délky mezery (1 μ s) vynásobený jejich počtem (120). FSD neboli „*Flashlet Sequence Duration*“ je pouze jiný název pro celkovou dobu trvání ST záblesku („*Flash Duration*“). Tento název jsem zvolil, protože proměnná FD již byla přiřazena pro dobu trvání mikro záblesku („*Flashlet Duration*“). Výsledek aplikace protokolu na sinici PCC 6803 je zobrazena v Obrázek 19. Výsledkem tohoto měření byly změny velikosti antén a konektivity během nefotochemického zhášení vyvolaného modrým světlem u sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803.



Obrázek 19: Změna způsobená aktinickým světlem. Efekt nefotochemického zhášení byl vyvolán vysokou intenzitou modrého aktinického světla ($1000 \mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) a měřen oranžovými ST záblesky. Pro měření byl použit protokol č. 1.

Po použití protokolu č. 1 výsledky obsahují pouze sérii hodnot parametrů před a po aplikaci aktinického světla (viz Obrázek 19). Aktinické světlo mezi ST záblesky jsem použil pro vyvolání stavových přechodu (oranžové) a nefotochemického zhášení (vysoká intenzita modrého světla). Změny parametrů FRRF poté odpovídají efektu stavových přechodů a nefotochemického zhášení. Pro podrobnější studium především stavových přechodů však bylo mnohem výhodnější, kdyby byla vidět kinetika změny parametru během aplikace aktinického světla, tedy v periodě ALD. Proto jsem do předchozího typu protokolu přidal další část, která proměřovala vzorek ještě během aktivity aktinického světla. ST záblesky během periody ALD jsem rozmístil logaritmicky, protože krátce po vystavení sinic aktinickému světlu dochází k nejdramatičtějším změnám ve fotosyntéze a tyto změny jsou pomalejší s postupující dobou na světle.

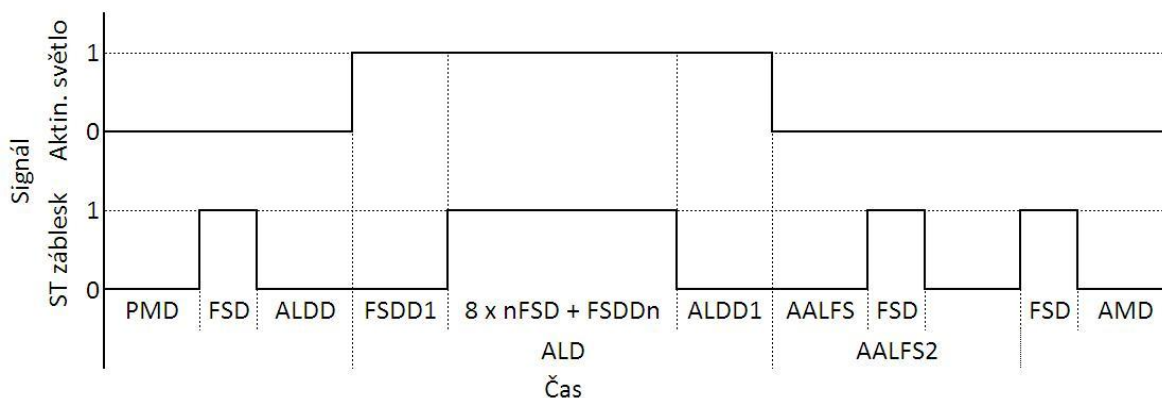


Obrázek 20: Schematické znázornění protokolu č. 2 s měřením kinetiky v průběhu aktinického světla. (PMD – „*Pre Measurement Duration*“ – doba před aplikací prvních ST záblesků pro na tmu adaptovaný vzorek, FSD – „*Flashlet Sequence Duration*“ – délka trvání ST záblesku, ALDD(1) – „*Actinic Light Delay Duration (1)*“ – délka zpoždění začátku periody aktinického světla (1), ALD – „*Actinic Light Duration*“ – délka aplikace aktinického světla, FSDD(1) – „*Flash Sequence Delay Duration(1)*“ - délka zpoždění ST záblesku po ukončení periody aktinického světla (1), AMD – „*After Measurement Duration*“ – doba po aplikaci ST-záblesků ve tmě do konce protokolu.) Hodnota 1 odpovídá době, kdy bylo zapnuté aktinické světlo (nebo ST záblesk), hodnota 0 době bez zapnutého aktinického světla (nebo ST záblesku). Výsledky měření na sinici PCC 6803 jsou zobrazeny v Obrázek 25 a Obrázek 26.

Nový typ protokolu je schematicky znázorněn v Obrázek 20. Během protokolu bylo aplikováno osm nových ST záblesků v době aplikace aktinického světla (ALD). Časové rozmístění ST záblesků bylo počítáno od začátku aktinického světla jako n -tá mocnina 2 kde n je pořadové číslo ST záblesku počítané od nuly. Ve výsledku byla délka aktinického světla PMD prodloužena o 11 s na celkových 131 s. Ostatní parametry se nezměnily a nové byly standardně nastaveny na $FSDD1 = 500$ ms a $ALDD1 = 3$ s. Aplikace ST záblesku v periodě ALD (viz Obrázek 20) umožnila studium kinetiky procesů během ozáření, tyto výsledky jsou popisovány v části 3.3. Většina výsledků prezentovaných v části 3.3 je tedy změřena pomocí protokolu č. 2. Následující změny v měřících protokolech jsem pouze otestoval v několika předběžných měřeních.

Další vylepšení protokolu jsem provedl úpravou poslední fáze měření, tedy doby po vypnutí aktinického světla. Chtěli jsme zaznamenat kinetiku parametrů σ a p po vypnutí světla. Tyto změny jsou velmi rychlé (řádově desítky až stovky ms) a minimální doba nutná pro opakování ST záblesku bez ovlivnění předchozím ST zábleskem je 1 s. V protokolech

č. 1 a č. 2 byl poslední ST záblesk po aktinickém světle aplikován v čase 250 ms po vypnutí světla. Pokud budeme chtít měřit i tuto část protokolu značně to prodlouží dobu měření jednoho vzorku, protože se jednotlivé ST záblesky nebudou moci měřit najednou, ale pro každý ST záblesk se bude muset použít nový vzorek. K zobrazení kinetiky průběhu σ a p potřebujeme dostatečné množství bodů, aby kinetika byla zobrazena s dostatečným rozlišením. V tomto případě bylo potřeba minimálně 8 ST záblesků k dostatečně výraznému zobrazení kinetiky. Osm nových ST záblesků v tomto případě znamená osminásobné prodloužení doby potřebné k proměření jedné křivky po vypnutí světla, protože na každý bod je potřeba nový vzorek. Pokud ale změříme dva ST záblesky v jednom měření, snížilo by to potřebnou dobu dvakrát. Dva následující ST záblesky ale nemohou být moc blízko po sobě z důvodu možného vzájemného ovlivnění. Pokud znova použijeme binární logaritmické škálování pro rozložení jednotlivých ST záblesků a uzpůsobíme ho vynásobením 75 zjistíme že šestý ST záblesk by byl proveden v 1,2 s což by znamenalo změřit jeden vzorek pouze pětkrát a zároveň by se počet ST záblesků použitých k zjištění kinetiky navýšil na 10.

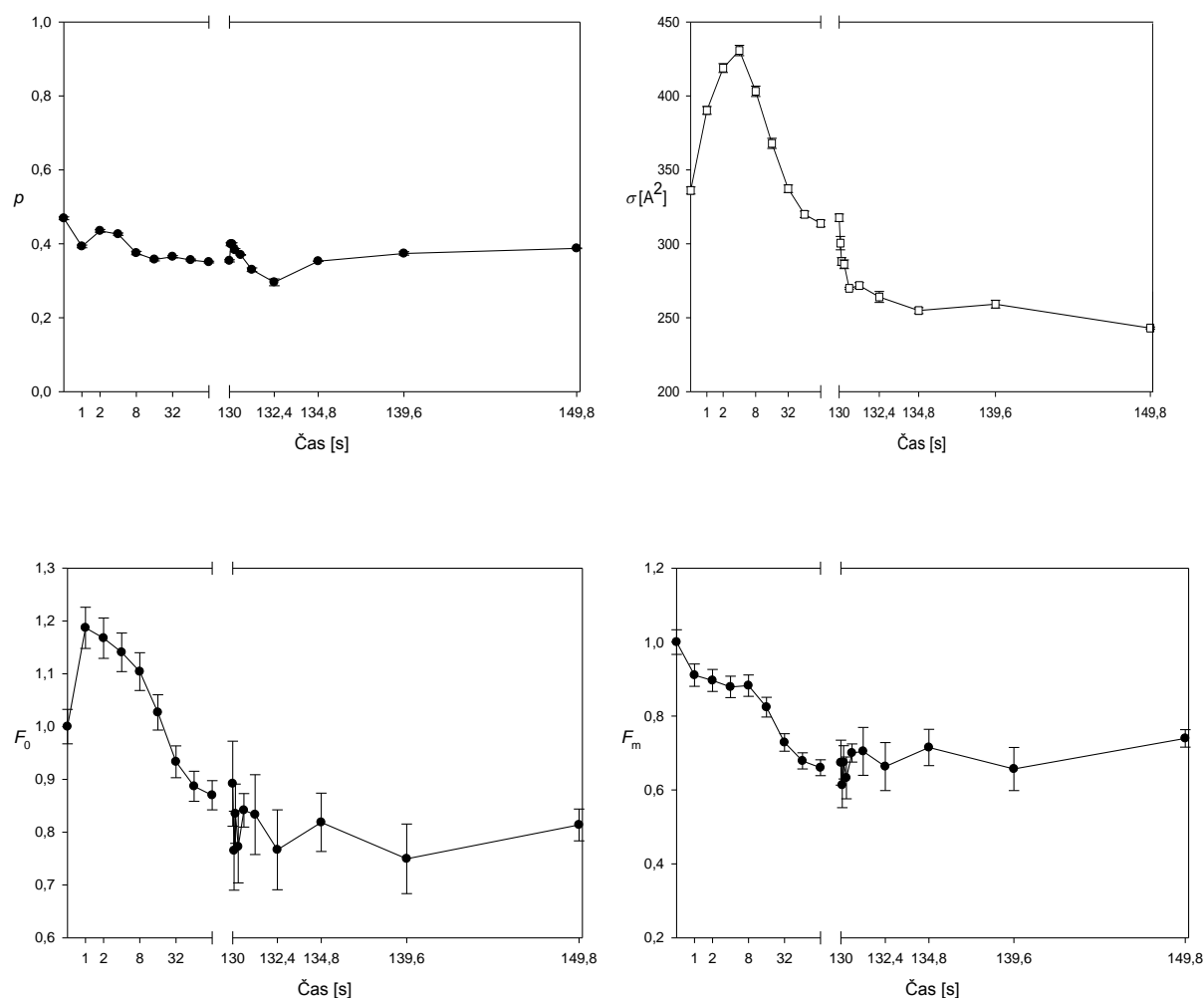


Obrázek 21: Schematické znázornění protokolu č. 3. s měřením kinetiky během a po vypnutí aktinického světla. (PMD – „Pre Measurement Duration“ – doba před aplikací prvních ST záblesků pro na tmu adaptovaný vzorek, FSD – „Flashlet Sequence Duration“ – délka trvání ST záblesku, ALDD(n) – „Actinic Light Delay Duration (n)“ – délka zpoždění začátku periody aktinického světla (n), ALD – „Actinic Light Duration“ – délka aplikace aktinického světla, FSDD(n) – „Flash Sequence Delay Duration(n)“ - délka zpoždění ST záblesku během periody aktinického světla (n), AALFS(n) – „(n) After Actinic Light Flashlet Sequence“ – délka zpoždění ST záblesku po skončení periody aktinického světla, AMD – „After Measurement Duration“ – doba po aplikaci ST záblesků ve tmě do konce protokolu.) Hodnota 1 odpovídá době, kdy bylo zapnuté aktinické světlo (nebo ST záblesk), hodnota 0 době bez zapnutého aktinického světla (nebo ST záblesku.) Ukázková experimentální data získaná měřením protokolem č. 3 jsou prezentována v grafu Obrázek 22.

Nový typ protokolu č. 3, jehož schematické znázornění je zobrazeno v Obrázek 21. Tento protokol obsahuje pět možných nastavení doby, kdy se zapínají dva poslední ST záblesky. Uživatel postupně tyto nastavení mění pro nový vzorek. Složením těchto pěti křivek dohromady lze získat kinetiku parametrů σ a p po vypnutí světla. Tyto nastavení poté mění proměnné AALFS a AALFS2 podle zadaných parametrů. Po prostřídání všech možností nastavení dostaneme časování pro jednotlivě ST záblesky vyjádřené vzorcem:

$$T_0 = 0; T_n = 75 * 2^{n-1} \quad (4)$$

Kde n je pořadové číslo ST záblesku počítané od nuly. Výsledné časování se počítá od vypnutí aktinického světla a je v milisekundách. Aplikace ST záblesku po vypnutí aktinického světla umožnila studium kinetiky procesů po ozáření.

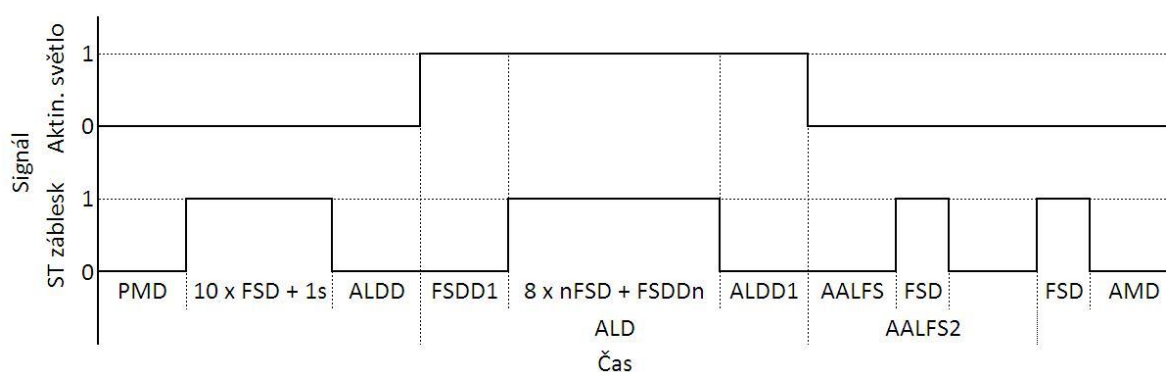


Obrázek 22: Průběh parametrů metody |FRRF za použití protokolu č. 3. *Synechocystis* sp. PCC 6803 – WT. Změna fluorescenčních parametrů s měřením po vypnutí aktinického

světla. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření bylo použito aktinické světlo o intenzitě $1000 \mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. První a posledních deset ST záblesku (od času 130 s dále) bylo provedeno bez aktinického světla.

Průběh fluorescenčních parametrů získaný z měření pomocí protokolu č. 3 (viz Obrázek 22) je v první části stejný jako při měření pomocí protokolu č. 2. Vidíme zde velký pokles v hodnotách jak minimální tak maximální fluorescence a jelikož zde byla aplikována vysoká intenzita aktinického světla tak to jasně ukazuje na nefotochemické zhášení vyvolané OCP. Tento efekt je také charakterizován počátečním nárůstem a poté značným poklesem efektivní velikosti antén PSII. Po vypnutí aktinického světla pozorujeme u hodnot konektivity nepatrnou oscilaci, hodnoty maximální a minimální fluorescence také mírně oscilují, ale nijak drasticky se nemění. U efektivní velikosti antén PSII však pozorujeme značný na začátku rychlý pokles, který se přibližně po 800 ms po vypnutí aktinického světla začíná stabilizovat.

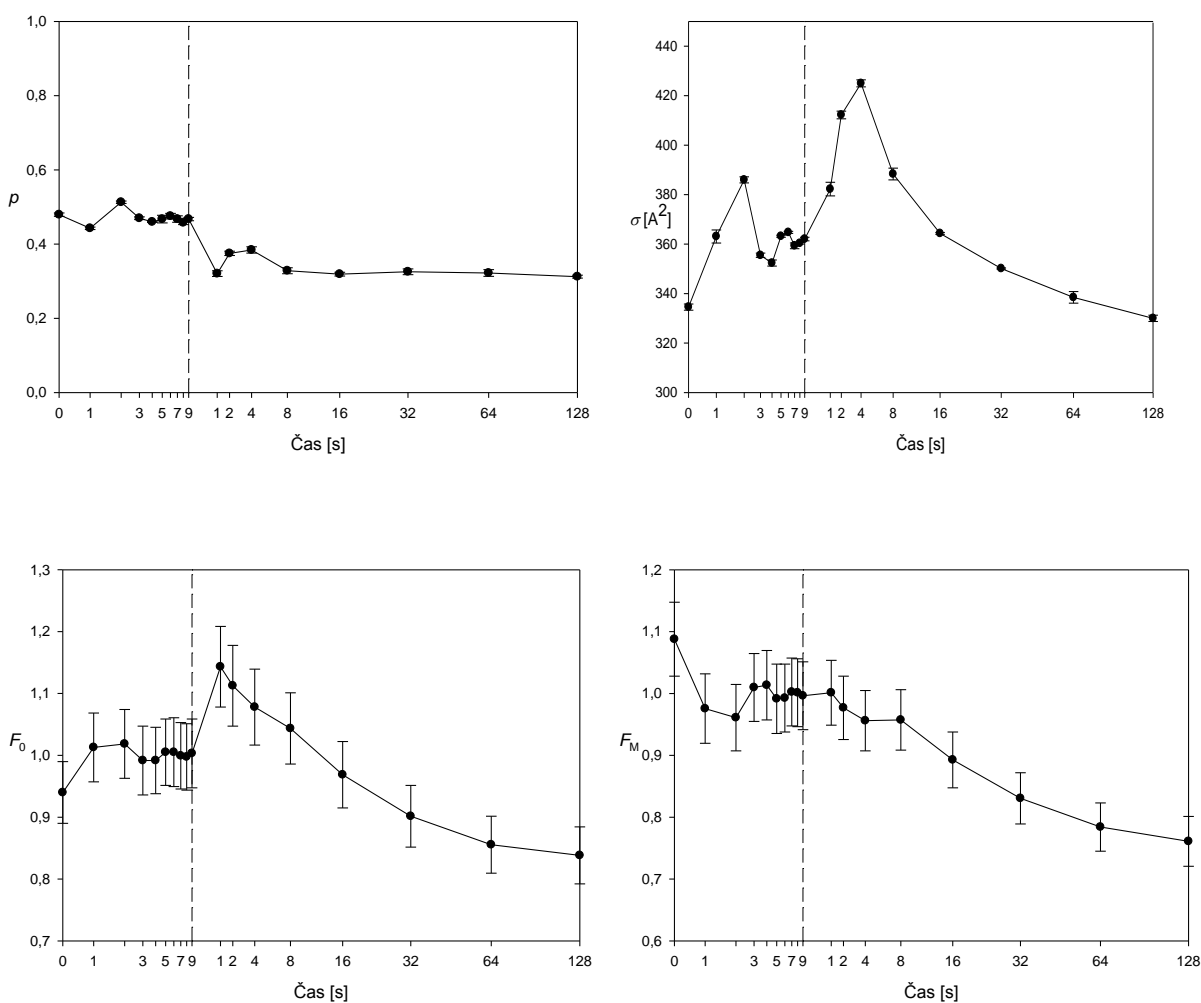
Při analýze výsledků jsme zjistili, že bod naměřený na začátku podléhá oscilačnímu efektu způsobenému fotochemií komplexu vyvíjejícího kyslík (viz kapitola 3.1.4). Proto jsem sestavil další protokol kde jsem přidal na začátek měření sérii deseti ST záblesků tak abychom získali ustálenou hodnotu p a σ neovlivněnou oscilacemi komplexu vyvíjejícího kyslík.



Obrázek 23: Schematické znázornění protokolu č. 4. s měřením kinetiky během a po vypnutí aktinického světla, ke kterému je dodána část pro odstranění oscilace před zapnutím aktinického světla. (PMD – „Pre Measurement Duration“ – doba před aplikací prvních ST záblesků pro na tmu adaptovaný vzorek, FSD – „Flashlet Sequence Duration“ – délka trvání ST záblesku, ALDD(n) – „Actinic Light Delay Duration (n)“ – délka zpoždění začátku periody aktinického světla (n), ALD – „Actinic Light Duration“ – délka aplikace aktinického světla, FSDD(n) – „Flash Sequence Delay Duration(n)“ - délka zpoždění ST záblesku během periody aktinického světla (n), AALFS(n) – „(n) After Actinic Light

Flashlet Sequence“ – délka zpoždění ST záblesku po skončení periody aktinického světla, AMD – „After Measurement Duration“ – doba po aplikaci ST záblesků ve tmě do konce protokolu.) Hodnota 1 odpovídá době, kdy bylo aplikované aktinické světlo (nebo ST záblesk), hodnota 0 době bez aplikovaného aktinického světla (nebo ST záblesku.) Ukázková experimentální data získaná měřením protokolem č. 4 jsou prezentována v grafu Obrázek 24.

Protokol č. 4 vychází z protokolu č. 3., liší se pouze novou částí, která je složena z deseti ST záblesků oddělených jednosekundovým intervalem, která je umístěna místo prvního ST záblesku v protokolu č. 3.



Obrázek 24: Průběh parametru metody FRRF za použití protokolu č. 4. *Synechocystis* sp. PCC 6803 – WT. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na průměrnou hodnotu třech posledních ST záblesků které proběhly bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 4 bez opakování pro zjištění kinetiky po vypnutí aktinického světla a aktinické světlo o intenzitě $1000 \mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Z vyšší časové náročnosti na kompletní změření vzorku pomocí

protokolu č. 4 jsem neměřil kinetiku po vypnutí aktinického světla která je totožná s druhou polovinou křivek zobrazených v Obrázek 22. Prvních 10 bodů bylo měřeno ve tmě, další pak na aktinickém světle v pozadí.

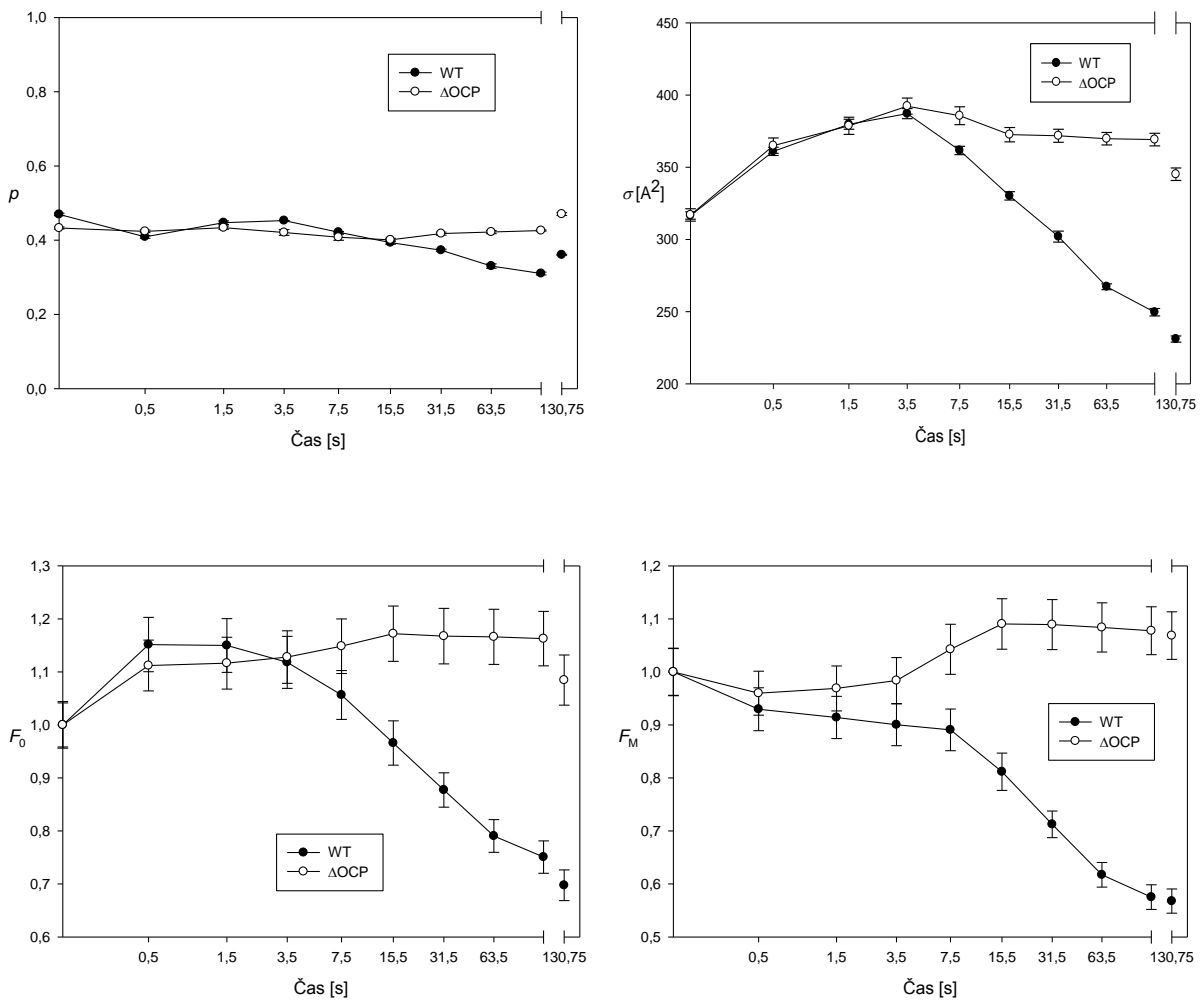
Deset ST záblesků na začátku měření vykazují oscilaci s mírnou periodicitou s velikostí o čtyřech ST záblescích. Tato oscilace však po osmi ST záblescích natolik vymizí, že hodnota vypadá stabilní. Touto stabilizací využívám pro vytvoření referenčního bodu k provedení normalizace pro hodnoty minimální a maximální fluorescence. Následující průběh křivek je již totožný s průběhem získaném pomocí protokolu č. 2 nebo s první částí křivky získané pomocí protokolu č. 3.

3.3 Série experimentů se specifickými mutanty sinice

***Synechocystis* sp. PCC 6803 se změnou funkcí světloběrných antén.**

Cílem měření bylo prostudovat změny efektivní velikosti antén a konektivity reakčních center PSII během podmínek stimulujících stavové přechody a nefotochemické zhášení u sinic. Proto jsem se zaměřil na studium divokého kmene sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 a jeho mutantů Δ OCP, Δ ApcD, Δ CK. Dále jsem v rámci měření prostudoval chování parametrů σ a p i u některých dalších mutantů se změněnými fykobilisomy (viz kapitola 2.1). Všechny naměřené výsledky jsou v přílohách a zde popisují pouze vybrané mutanty a vybraná nastavení protokolu.

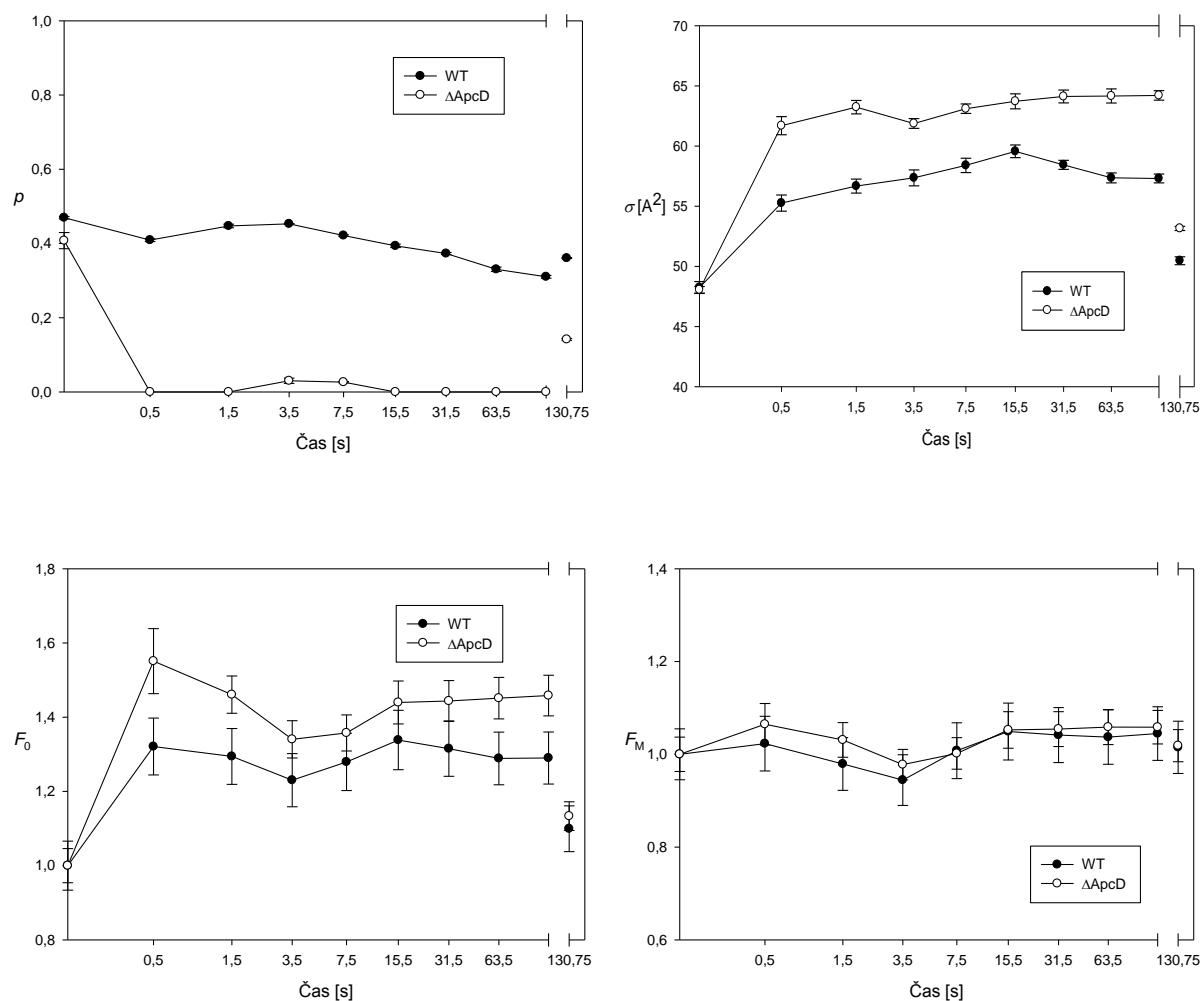
Efekt nefotochemického zhášení popsany v kapitole 1.1.1 jsem studoval na mutantu sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δ OCP, který nesyntetizuje OCP. V grafu Obrázek 25 jsou zobrazeny změny jednotlivých fluorescenčních parametrů (σ , p , F_0 , F_M) pro divoký typ („Wild type“) sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 a jejího mutantu Δ OCP.



Obrázek 25: Porovnání sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 (WT) s jejím mutantem Δ OCP. Porovnání zobrazuje NPQ indukované modrým aktinickým světlem o intenzitě $1000 \mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a oranžovým světlem měřícím. Hodnoty fluorescencí byly normalizovány na první naměřený bod měřený bez aktinického světla. Pro měření jsem použil protokol č.2 (viz kapitola 3.2). Každé měření jsem opakoval třikrát a pro každé opakování jsem připravil nový vzorek. Vzorek jsem 15 min adaptoval na tmu při teplotě 28°C , poté jsem změřil jednotlivé indukční fluorescenční křivky.

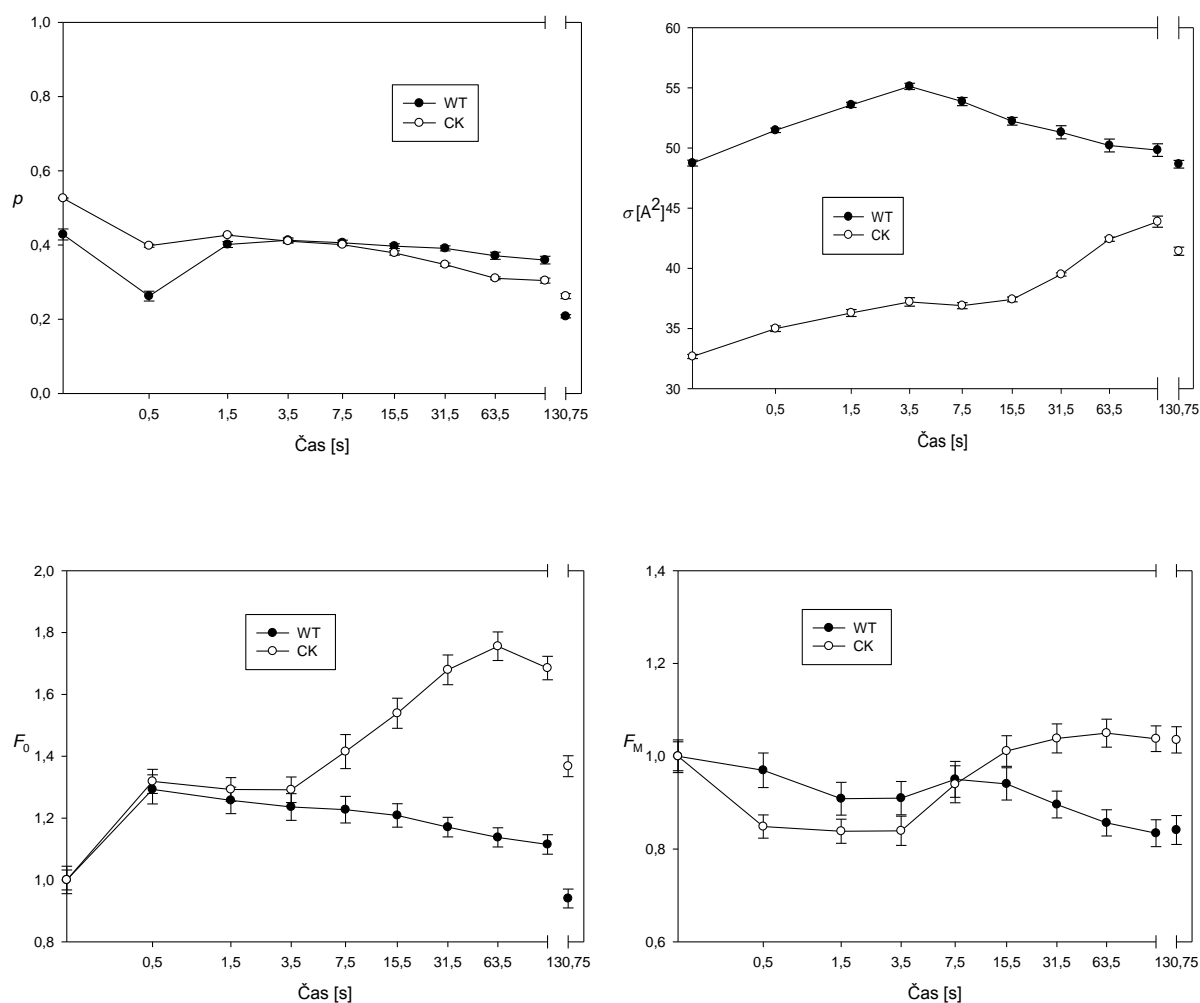
Na nefotochemické zhášení má velký vliv OCP proto u divokého typu sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 vidíme dramatický pokles hodnot F_0 a F_M při aplikaci silného modrého aktinického světla. Tento efekt je způsoben zhášením variabilní fluorescence za pomoci OCP. Mutant Δ OCP nemá protein OCP k dispozici, proto u něj nedochází k nefotochemického zhášení indukovanému tímto proteinem. V grafech Obrázek 25 se konektivita reakčních center nijak výrazně nemění, naopak efektivní velikost antén se do 3,5 s zvětšuje a poté z důvodu nefotochemického zhášení nastane rychlý pokles u divokého typu, který však nepozorujeme u mutantu Δ OCP.

Stavové přechody popsané v kapitole 1.1.1 jsou dalším fotoprotektivním mechanismem sinic. Ke studiu jsem využil mutantu $\Delta ApcD$ u něhož nedochází ke stavovým přechodům, protože je zablokován ve stavu 2. Vzorek adaptovaný na tmu je ve stavu II to znamená, že většina fykobilisomu je připojených k fotosystému I. Vystavením oranžovému aktinickému světlu se začnou fykobilisomy přesouvat a připojovat na fotosystém II a tím nastane stav I.



Obrázek 26: Porovnání sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 (WT) s jejím mutantem $\Delta ApcD$. Porovnání zobrazuje stavové přechody indukované oranžovým aktinickým světlem o intenzitě $75 \mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a modrým světlem měřícím. Hodnoty fluorescencí byly normalizovány na první naměřený bod měřený bez aktinického světla. Pro měření byl použit protokol č. 2. Každé měření jsem opakoval třikrát a pro každé opakování jsem připravil nový vzorek. Vzorek jsem 15 min adaptoval na tmu při teplotě 28°C , poté jsem změřil jednotlivé indukční fluorescenční křivky.

Přesun fykobilisomu z fotosystému I na fotosystém II u divokého typu je charakterizován mírným nárůstem velikosti efektivního absorpčního průřezu do cca 30 s na světle a následným poklesem (viz Obrázek 26). Oproti tomu mutant ΔApcD je již ve tmě ve stavu 1, a k nárůstu nedochází, protože není schopen předávat energii fotosystému I - proto k stavovému přechodu nedochází.



Obrázek 27: Porovnání sinice *Synechocystis sp. PCC 6803* (WT) s jejím mutantem CK. Změny byly indukované modrým aktinickým světlem o intenzitě $1000 \mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a měřeny modrými ST záblesky. Hodnoty fluorescence byly normalizovány na první naměřený bod měřený bez aktinického světla.

Fykobilisomy mutantu CK tvoří pouze jádro. Porovnáním s divokým typem CK mutant vykazuje značný nárůst minimální fluorescence od 3,5 s po zapnutí aktinického světla. Hodnota minimální fluorescence roste a ke konci aktinického světla se buď

stabilizuje, nebo mírně poklesne. Hodnota maximální fluorescence má sinusoidální charakter s počátečním poklesem oproti mnohem mírnějším změnám probíhajících u divokého typu. Hodnoty konektivity jsou téměř identické a v podstatě neměnné. Hodnota efektivní velikosti antén vykazuje do 3,5 s stejný trend jako divoký typ, pouze je skoro dvojnásobná po dosažení této doby začne efektivní velikost antén mutanta CK klesat do velikosti která byla na začátku oproti mírné stagnaci a následnému nárůstu efektivní velikosti antén u divokého typu.

4 Diskuze

Fotosyntéza je velice důležitý biologický proces, který je základem pro veškerý život na zemi a jeho absence by měla na něj zásadní dopad (Blankenship 2008). Studium fotosyntézy je proto velice důležitou součástí znalosti světa kolem nás. Kompletní porozumění fotosyntetických procesu bychom mohli využít k velmi výhodnému získávání energie (Listorti, Durrant et al.). Studium fluorescence a metoda FRRF je jedním z mnoha přístupů studia fotosyntézy, a využívá se k studiu hlavně fotosystému II.

Efektivitu a reprodukovatelnost měření fluorescenčních parametrů metodou FRRF ovlivňuje řada aspektů, ve své práci jsem se ale zaměřil pouze na ty, které se zdály mít největší vliv. První problém byl určení minimální doby potřebné na adaptaci na tmou. Pro měření fluorescence se standardně používala 20 minutová doba adaptace na tmou (Kana, Kotabova et al. 2012). Při měření fotoprotektivních mechanismů tak se standardně vychází ze vzorku adaptovaného na tmou a poté se sleduje reakce na aktinické světlo. Pro zvýšení efektivitu měření jsem se snažil tuto dobu co nejvíce snížit. Z metodického experimentu viz 3.1.1, vyplývá, že vzorek se stává adaptovaným na tmou již po 15 – ti minutách. Tímto jsem snížil minimální dobu potřebnou pro změření jednoho vzorku.

Pro zvýšení reprodukovatelnosti měření jsem provedl metodický experiment viz 3.1.2. Jelikož se jedná o opakování stejného měření, je nutné, aby relativní odchylka byla co nejmenší. Vyšší relativní odchylka má značný vliv na reprodukovatelnost měření intenzity fluorescencí ostatní parametry nejsou tímto jevem tolik ovlivněny. Zjistil jsem, že průměrná relativní odchylka měření bez temperace během adaptace na tmou byla 13,9% (viz část 3.1.2). Laboratorní měření s nebiologickými vzorky se považuje za přesné, pokud hodnota relativní odchylky je menší než jedno procento. Po přezkoumání postupu jsem došel k názoru, že ke změnám vzorku může docházet jedině v průběhu adaptace na tmou, ta obvykle probíhala

nejdříve pouze v polystyrenovém držáku v neprůsvitném boxu, kde nebyla udržována konstantní teplota. Pro potvrzení mé domněnky jsem provedl kontrolní měření vzorku po odběru z růstových podmínek, tentokrát přímo bez adaptace na tmu. Výsledné křivka je zobrazena v grafu Obrázek 15 označena „Bez adaptace na tmu“. Průměrná relativní odchylka dosáhla v tomto měření 0,7 %. Tímto jsem potvrdil, že změny vzorku vznikají během adaptace na tmu. V úvahu připadaly čtyři možné vlivy, které by to mohly způsobovat. Prvním vlivem je sedimentace kultury, ale to jsem eliminoval mícháním vzorku těsně před měřením. Druhý možný vliv je krátkodobý, ale nekontrolovatelný osvit vzorku při přenášení z neprůsvitného boxu do fluorimetru. Celé měření probíhá v temné místnosti s minimální intenzitou osvětlení, ale přesto monitor počítače nebo jiné nezbytné zdroje světla by mohly vzorek ovlivnit. Tento vliv jsem se snažil eliminovat manipulací se vzorkem mimo oblasti se zvýšenou intenzitou osvětlení. Třetí možný vliv je pak biologická variabilita mezi vzorky, která způsobuje odchylky v měření. Tento problém se nedá odstranit, pokud pracujeme s živými organismy. Čtvrtým a nejpodstatnějším vlivem je nekontrovaná teplota vzorku způsobující fluktuace v teplotě. Samotný fluorimetr má temperovací hlavici, která je schopna udržovat konstantní teplotu vzorku po dobu měření (Photon Systems Instruments 2002). Nicméně během 15-ti minutové adaptace na tmu (např. v neprůsvitném boxu v laboratoři) byl vzorek vystaven podstatně nižší teplotě (teplotě laboratoře, cca 22°C) než při které byl pěstován a zároveň měřen (28°C). Pro eliminaci tohoto problému bylo potřeba najít nejvhodnější způsob jak kontrolovat teplotu vzorku v průběhu adaptace na tmu. Jelikož teplota ve vodní lázni byla z důvodu namočení kyvety zvenku nepoužitelná, bylo nutné použít míchací a temperační jednotku *Thermomixer comfort* od firmy *Eppendorf*. Měření provedené po adaptaci na tmu při kontrované teplotě zobrazeno v grafu Obrázek 15 označeno „S temperací a adaptací na tmu“ již vykazovalo mnohem nižší rozdíly a průměrná relativní odchylka dosáhla 3,1 %. Kontrola teploty během adaptace na tmu tedy měla značný vliv na chybu měření, došlo o 4,5 násobné zmenšení relativní odchylky měření. Nyní je hodnota průměrné relativní odchylky ovlivněna pouze biologickými procesy v buňkách, proto je tato hodnota již dostačující.

Posoudil jsem i aktinický efekt měřícího světla na výsledky získané metodou FRRF. V metodě FRRF jsou dva hlavní zdroje světla. Aktinicky je určen pro vyvolání změny ve vzorku (stimulace NPQ nebo stavových přechodů), ST záblesky proměřují aktuální stav vzorku. Jednoobrátkové záblesky v metodě FRRF by neměly nijak ovlivňovat měřený vzorek (Kolber, Prasil et al. 1998). Tento předpoklad jsem ověřil experimentálně (viz

Obrázek 16) a zjistil jsem, že v počáteční fázi aktinického světla ST záblesky mají určitý aktinický efekt který však není nijak velký.

Prozkoumal jsem i vliv oscilací z vývoje kyslíku během prvních ST záblesků ve tmě (Govindjee, Kern et al. 2010). Efekt oscilace je způsoben dozníváním fotochemického procesu spojeného s vývojem kyslíku v manganovém komplexu. Pro moje účely ale byla nejdůležitější informace, že přibližně po 10 ST záblescích se efekt stabilizuje. Z tohoto poznatku jsem vycházel a stanovil jsem 10. ST záblesk provedený na začátku protokolu bez aktinického světla jako stabilní a oscilací neovlivněný.

Sestavil jsem a otestoval také několik protokolů pro studium mechanismu fotoprotekce u sinic. První protokol byl navržen pro studium efektu aktinického světla na modelovém organismu. Princip spočíval v zjištění stavu provedením dvou ST – záblesků, jednoho na začátku a jednoho na konci měření a mezi nimi zapnout aktinické světlo na určitou dobu která vyvolá změnu. Standardní doba zapnutí aktinického světla (Vredenberg, Durchan et al. 2012) byla prodloužena na 120 s z důvodu zajištění vyšší stability intenzity fluorescence. Druhý protokol zobrazoval i kinetiku během aplikace aktinického světla. Tento protokol jsem také využil ke změření všech dostupných mutantů sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803. Následující protokoly, protokol č. 3 (zobrazoval navíc kinetiku po vypnutí aktinického světla) a protokol č. 4 (odstraňoval oscilaci počátečního ST záblesku zařazením pomocí sekvence ST záblesku na začátek protokolu ve tmě) jsem pouze otestoval.

Protokoly č. 2, č. 3 a č. 4 jsem pak aplikoval na mutanty fykobilisomů (viz příloha), v interpretacích jsem se zaměřil na mutanty Δ OCP, Δ ApcD a CK. Nefotochemické zhášení indukované OCP (viz Mechanismy fotoprotekce) snižuje variabilní fluorescenci v průběhu vystavení vzorku vysoké intenzitě modrého světla. Tento efekt nastává u divokého typu na rozdíl od OCP deficitního mutantu Δ OCP (viz Obrázek 25). Mutant sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δ ApcD má protein ApcD v jádře fykobilisomu nahrazený α APC. Protein ApcD je potřeba k přenosu energie z fykobilisomu do fotosystému I proto můžeme uvažovat, že tento mutant je ve stavu I (Jallet, Gwizdala et al. 2012). V grafu Obrázek 26 je proces stavových přechodů vidět mírným poklesem efektivního absorpčního průřezu od 15 s u divokého typu zatímco mutant Δ ApcD má průběh stabilní. Tímto jsem potvrdil, že u divokého typu dochází ke stavovému přechodu, zatímco u ApcD deficitního mutantu ne. Tento efekt ale nebyl podle očekávání dostatečně výrazný a proto je potřeba protokol pro studium stavových přechodů ještě doladit.

5 Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem zlepšil přesnost měření metody FRRF úpravou postupu přípravy vzorku před měřením. Sestavil a otestoval jsem optimální měřicí protokoly pro studium nefotochemického zhášení a stavových přechodů. Automatizoval jsem proces vyhodnocování výstupních experimentálních dat. Za využití těchto výsledků jsem provedl sérii experimentů s mutanty s pozměněnou funkcí světlosběrných komplexu sinice *Synechocystis* PCC 6803. Mnou vyvinuté protokoly se hodí k měření nefotochemického zhášení a kinetiky fluorescenčních parametrů v různých situacích. Za použití stavajících protokolů nejsou zatím stavové přechody dostatečně výrazně vidět.

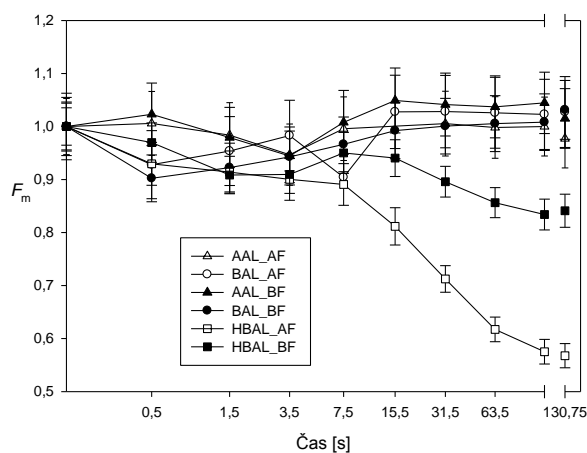
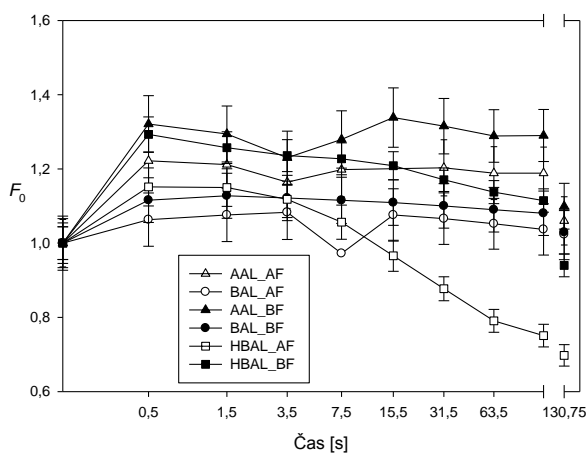
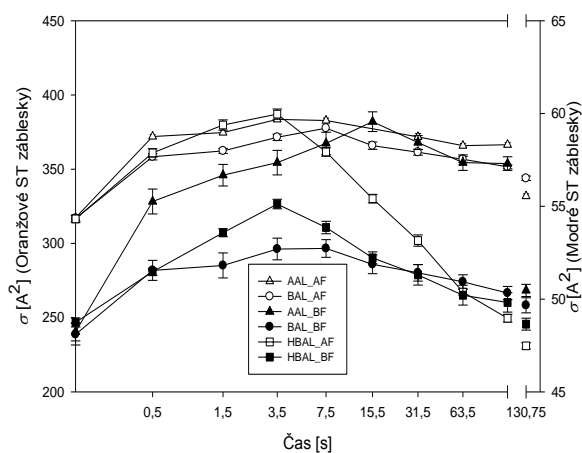
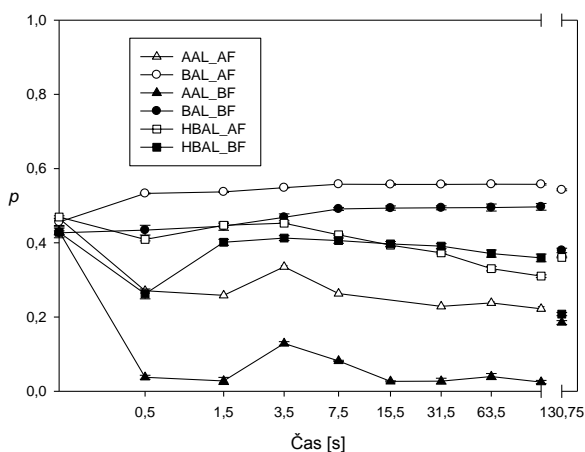
6 Reference

- Allen, M. M. (1968). "SIMPLE CONDITIONS FOR GROWTH OF UNICELLULAR BLUE-GREEN ALGAE ON PLATES." *Journal of Phycology* **4**(1): 1-&.
- Blankenship, R. E. (2008). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, Blackwell Science Ltd.
- Folea, I. M., P. Zhang, et al. (2008). "Domain organization of photosystem II in membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 investigated by electron microscopy." *FEBS Letters* **582**(12): 1749-1754.
- Fott, B. (1967). *Sinice a Řasy*. Praha, Academia.
- Gantt, E. and S. F. Conti (1966). "Phycobiliprotein localization in algae." *Brookhaven symposia in biology* **19**: 393-405.
- Govindjee, J. F. Kern, et al. (2010). *Photosystem II*. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. J. W. Sons. Ltd: Chichester.
- Jallet, D., M. Gwizdala, et al. (2012). "ApcD, ApcF and ApcE are not required for the Orange Carotenoid Protein related phycobilisome fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1817**(8): 1418-1427.
- Kana, R., E. Kotabova, et al. (2012). "The slow S to M fluorescence rise in cyanobacteria is due to a state 2 to state 1 transition." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1817**(8): 1237-1247.
- Kaneko, T., S. Sato, et al. (1996). "Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement)." *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **3**(3): 185-209.
- Kaštovský, J. and T. Hauer. (2003). "Oddělení Cyanobacteria." Retrieved 10. 1., 2014, from <http://www.sinicearasy.cz/134/Cyanobacteria>.
- Kirilovsky, D. (2007). "Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism." *Photosynthesis Research* **93**(1-3): 7-16.
- Kirilovsky, D., R. Kana, et al. (2013). *Mechanisms modulating energy arriving at reaction centers in cyanobacteria*. *Non-Photochemical Quenching and Thermal Energy*

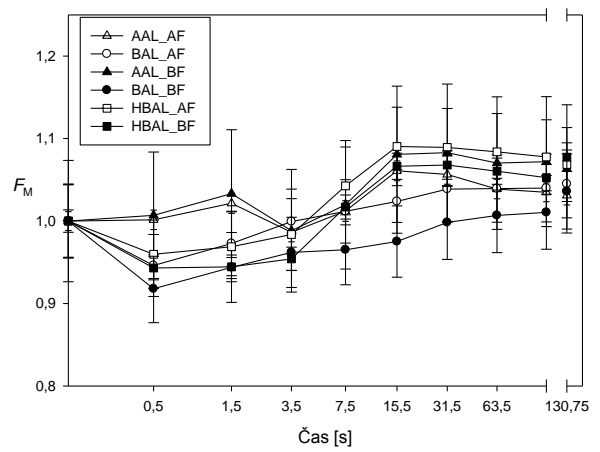
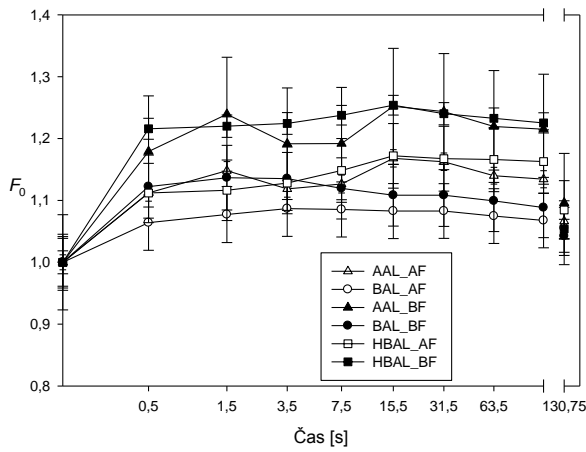
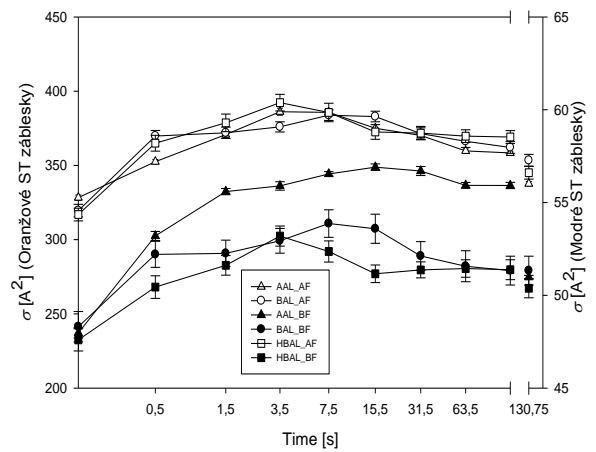
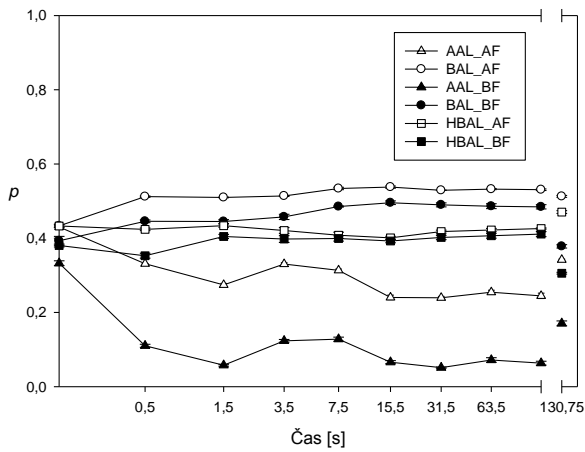
- Dissipation In Plants, Algae and Cyanobacteria. B. Demmig-Adams, W. Adams, G. Garab and E. Govindjee, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Kolber, Z. S., O. Prasil, et al. (1998). "Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1367**(1-3): 88-106.
- Kondo, T. and M. Ishiura (2000). "The circadian clock of cyanobacteria." *Bioessays* **22**(1): 10-15.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA, Springer Science+Business Media, LLC.
- Li, Z. R., S. Wakao, et al. (2009). Sensing and Responding to Excess Light. *Annual Review of Plant Biology*. Palo Alto, Annual Reviews. **60**: 239-260.
- Listorti, A., J. Durrant, et al. *Artificial photosynthesis: Solar to fuel*, Nature Publishing Group.
- Maksimov, E. G., F. I. Kuzminov, et al. (2011). "Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**(1-2): 285-291.
- Masinovskij, Z. and B. Věchet (1986). *Evoluční aspekty fotobiologie*. Praha, Academia.
- Melis, A., C. W. Mullineaux, et al. (1989). "ACCLIMATION OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS TO PHOTOSYSTEM-I OR PHOTOSYSTEM-II LIGHT - EVIDENCE FROM QUANTUM YIELD MEASUREMENTS AND FLUORESCENCE SPECTROSCOPY OF CYANOBACTERIAL CELLS." *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **44**(1-2): 109-118.
- Nelson, N. and C. F. Yocum (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*. Palo Alto, Annual Reviews. **57**: 521-565.
- Photon Systems Instruments, s. r. o. (2002). "Fast Fluorometer FL 3500-F." Retrieved 8. 4., 2014, from <http://www.psi.cz/products/fluorometers/fast-fluorometer-fl-3500-f>.
- Procházková, S., I. Macháčková, et al. (1998). *Fyziologie rostlin*. Praha, Academia.
- psych.lf1.cuni.cz/. "Principy fluorescenční spektroskopie." Retrieved 10. 4., 2014, from <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>.
- Rippka, R., J. Deruelles, et al. (1979). "GENERIC ASSIGNMENTS, STRAIN HISTORIES AND PROPERTIES OF PURE CULTURES OF CYANOBACTERIA." *Journal of General Microbiology* **111**(MAR): 1-61.
- Schmetterer, G. (2004). *Cyanobacterial Respiration. The Molecular Biology of Cyanobacteria*. D. Bryant, Springer Netherlands. **1**: 409-435.
- Schopf, J. W. and Barghoor, E. S. (1967). "ALGA-LIKE FOSSILS FROM EARLY PRECAMBRIAN OF SOUTH AFRICA." *Science* **156**(3774): 508-&.
- Stanier, R. Y., R. Kunisawa, et al. (1971). "PURIFICATION AND PROPERTIES OF UNICELLULAR BLUE-GREEN ALGAE (ORDER CCHROOCOCCALES)." *Bacteriological Reviews* **35**(2): 171-&.
- Van Den Hoek, C., D. G. Mann, et al. (1995). *Algae: An introduction to phycology*, Cambridge University Press, 40 W. 20th Street, New York, New York 10011-4211, USA; Cambridge University Press, The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge CB2 1RP, England.
- Viola, S., T. Rühle, et al. (2014). "A single vector-based strategy for marker-less gene replacement in *Synechocystis* sp PCC 6803." *Microbial Cell Factories* **13**.

Vredenberg, W., M. Durchan, et al. (2012). "The analysis of PS II photochemical activity using single and multi-turnover excitations." *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **107**: 45-54.

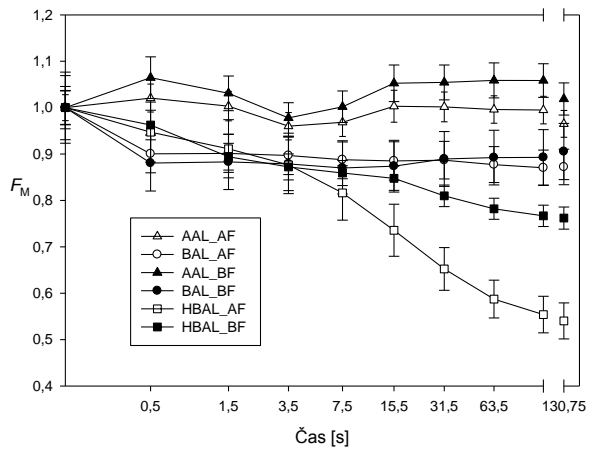
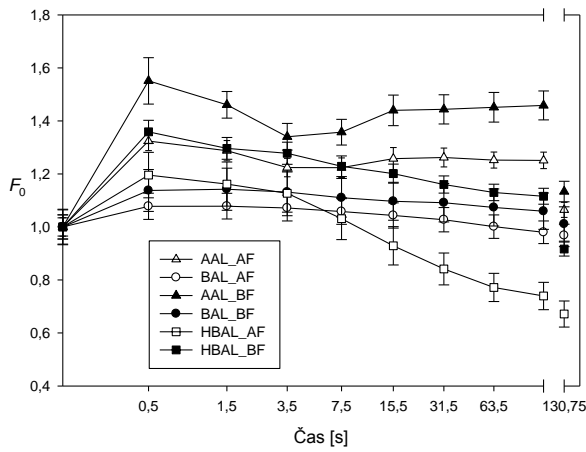
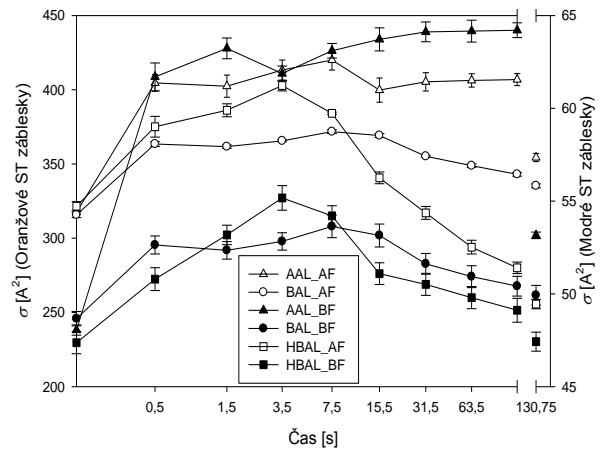
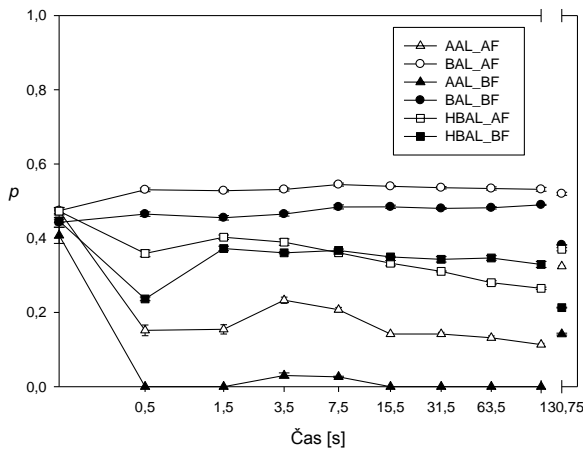
7 Přílohy



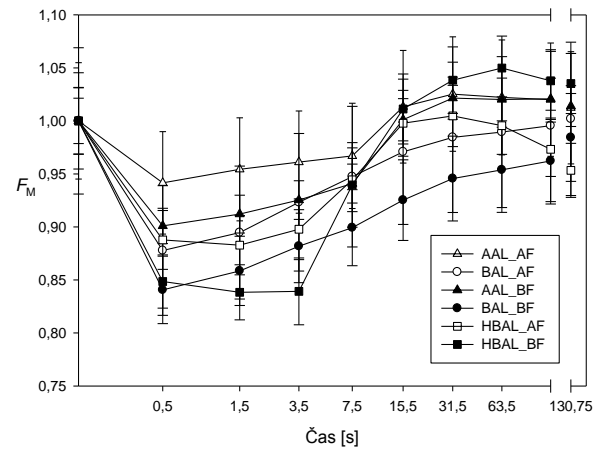
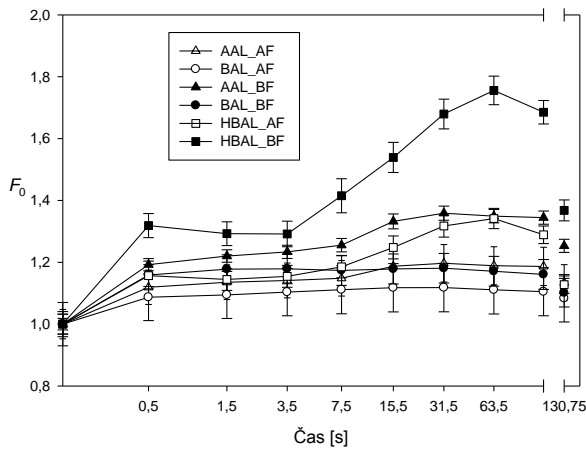
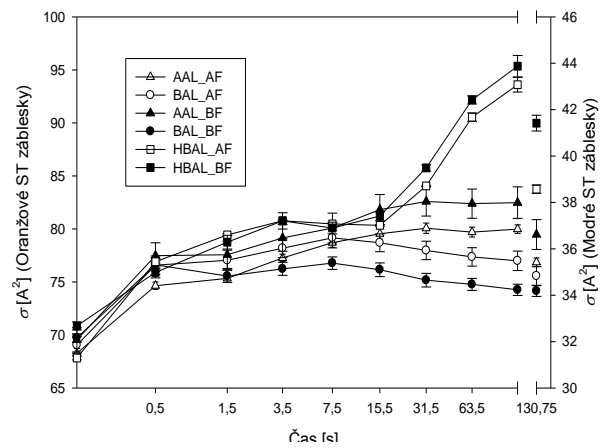
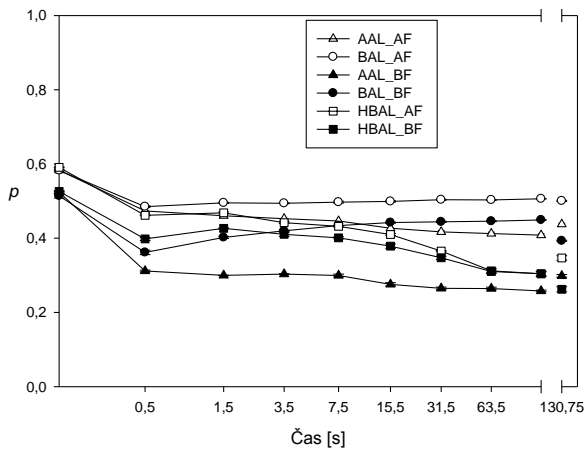
Příloha 1 : *Synechocystis* sp. PCC 6803 – WT. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



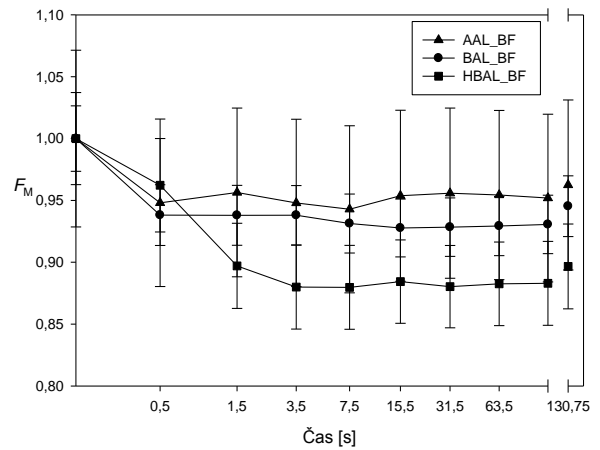
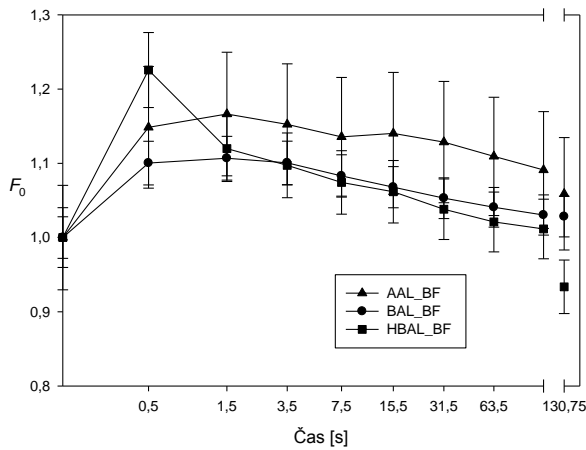
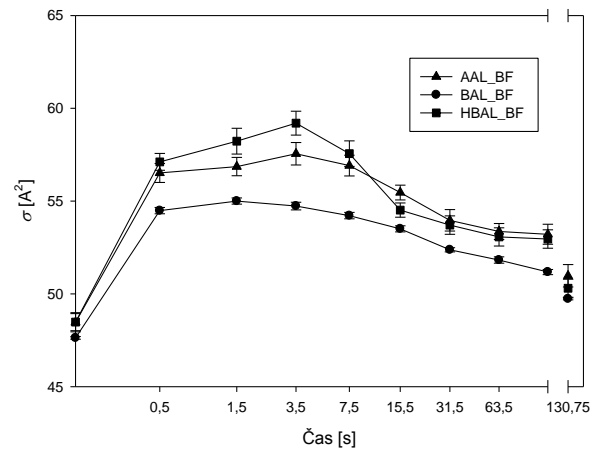
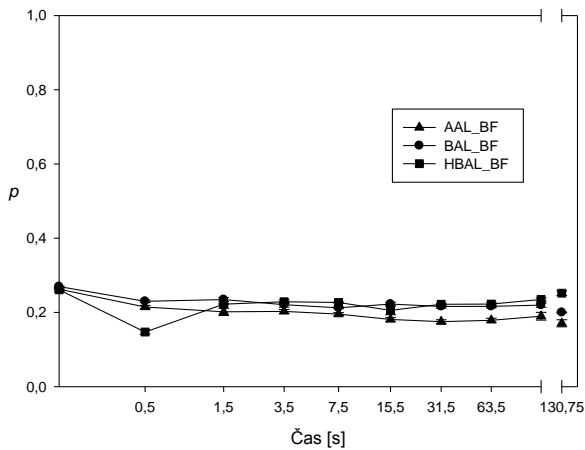
Příloha 2: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – Δ OCP. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



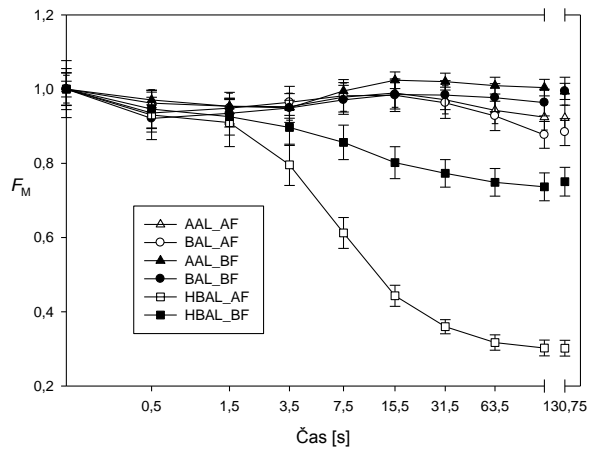
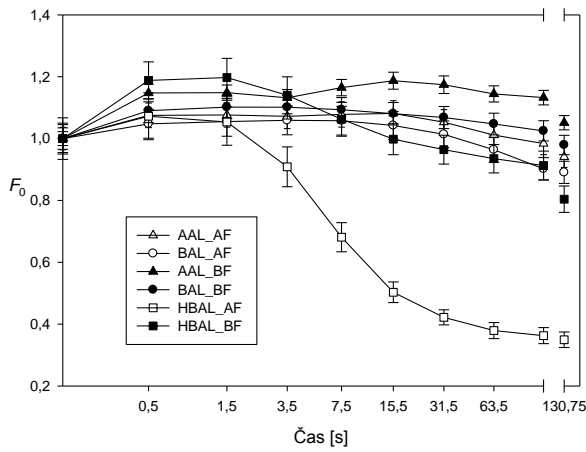
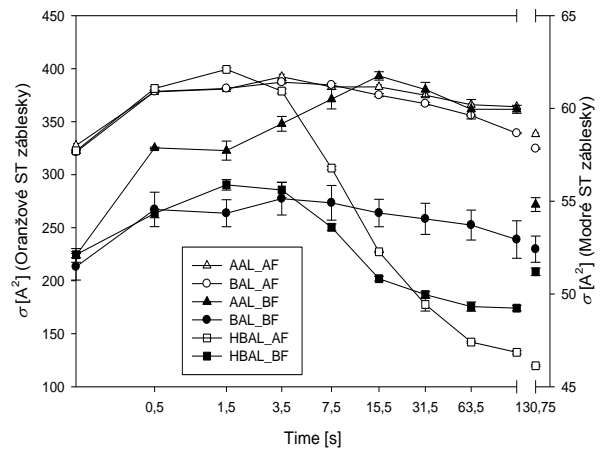
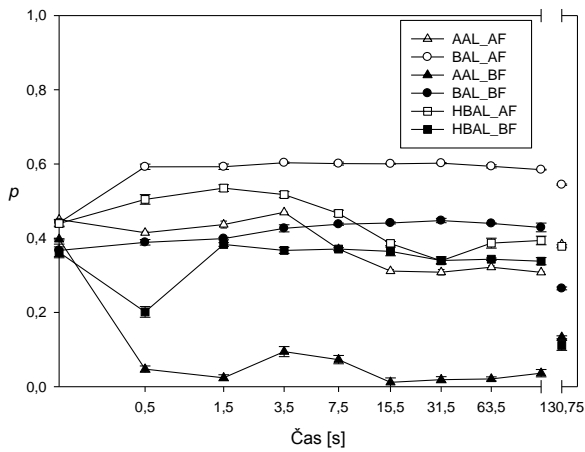
Příloha 3: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – Δ ApcD. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



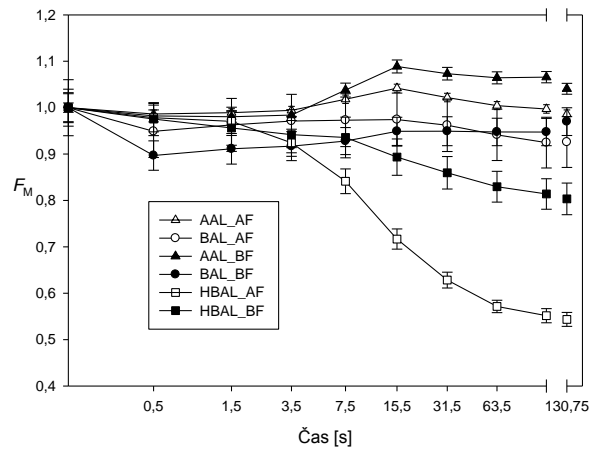
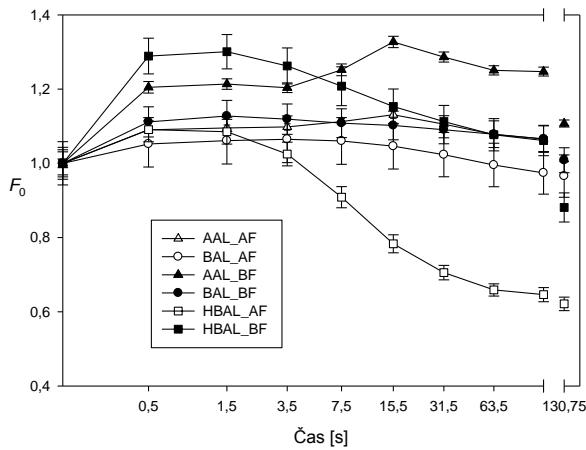
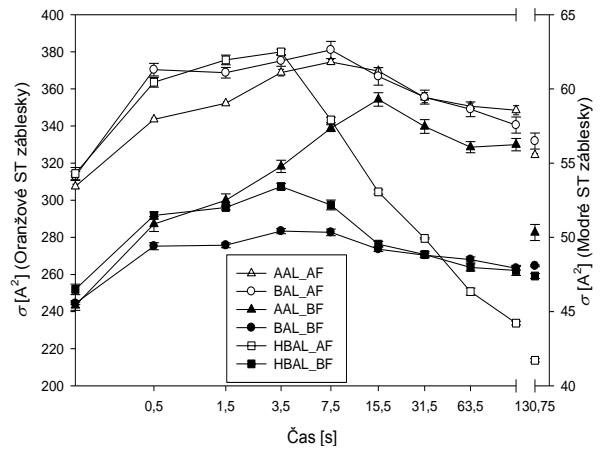
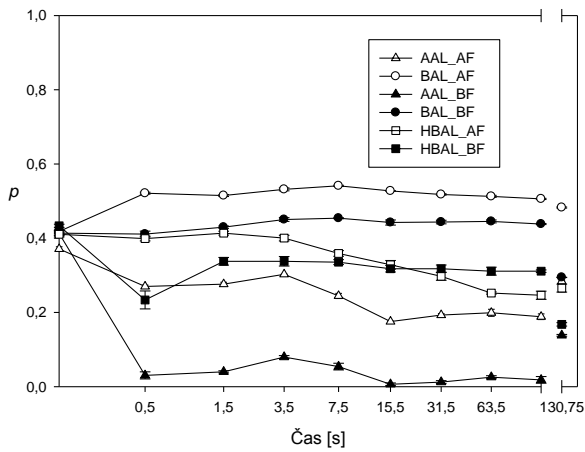
Příloha 4: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – CK. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



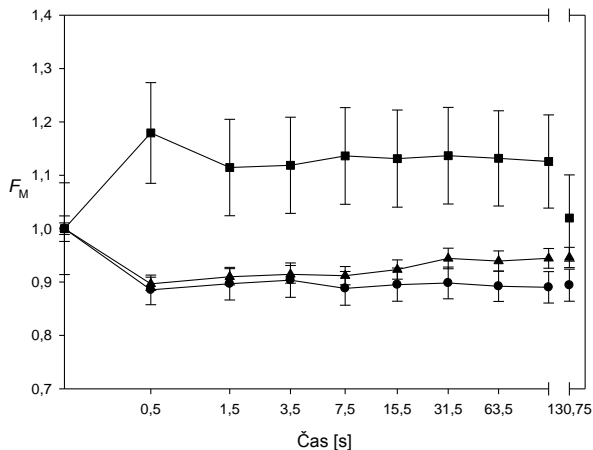
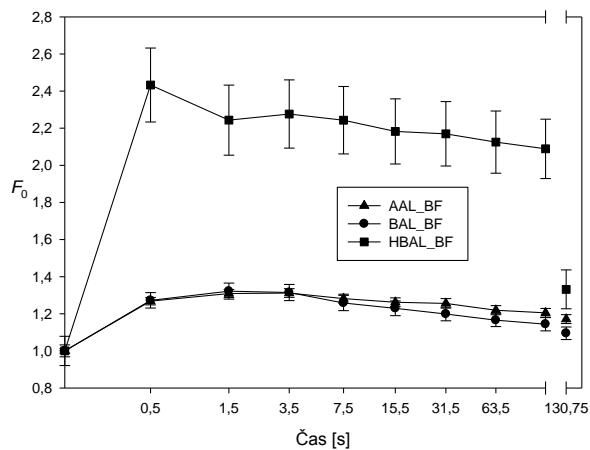
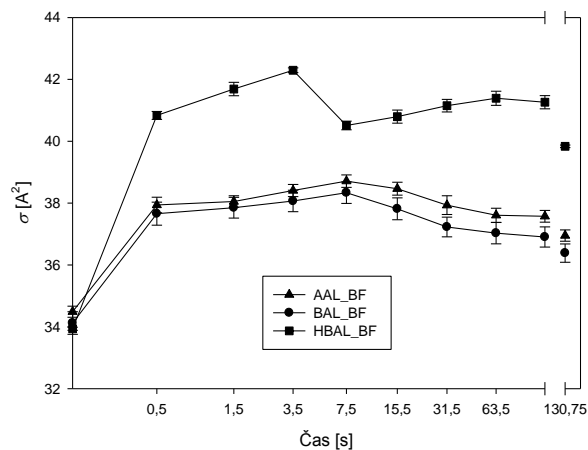
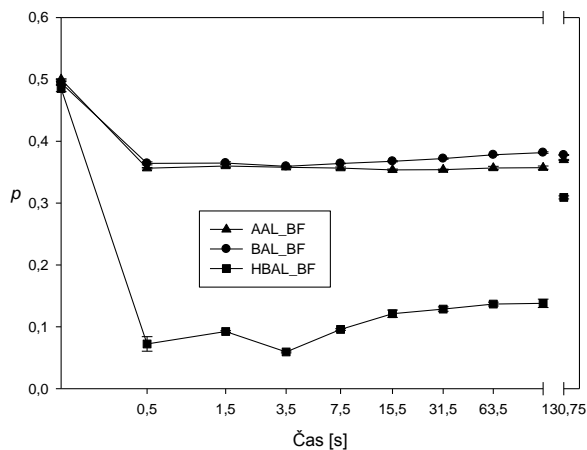
Příloha 5: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – Δ AB. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Výsledky pro oranžové ST záblesky se nepodařilo nařadit. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



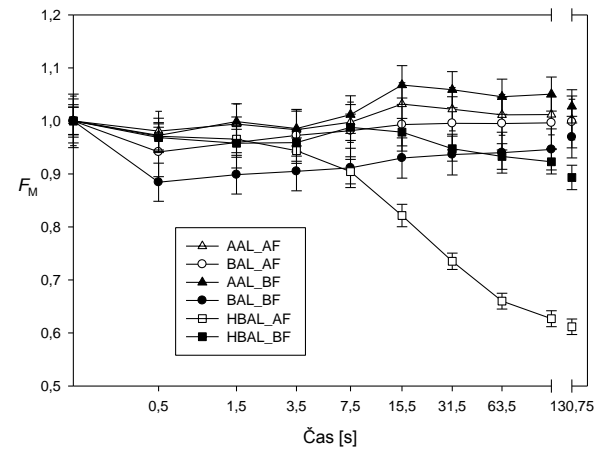
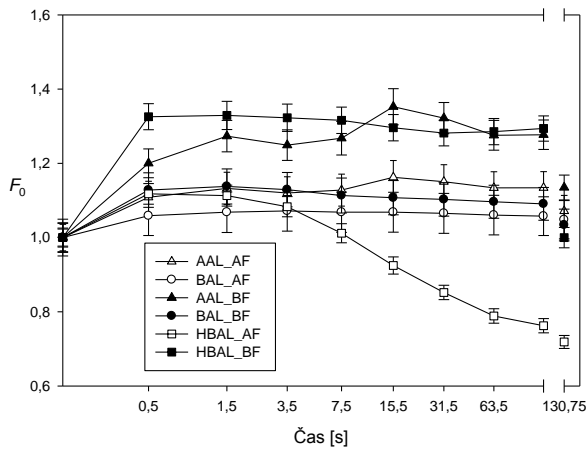
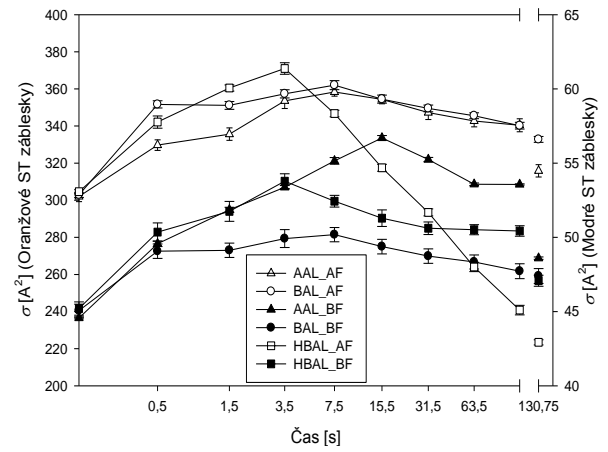
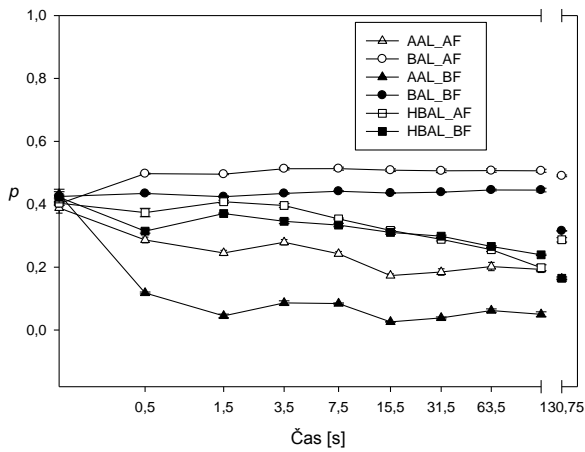
Příloha 6: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – Δ ApcC. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



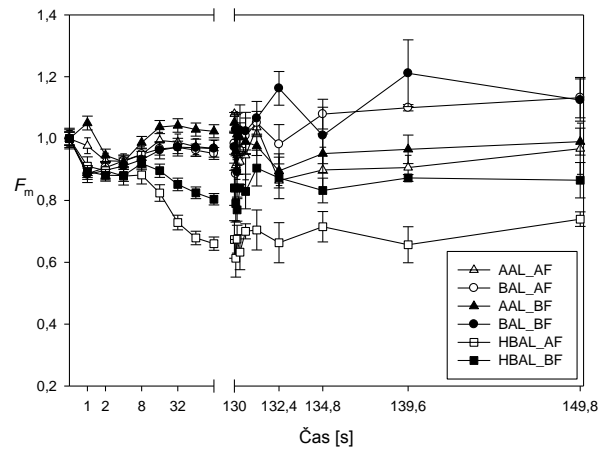
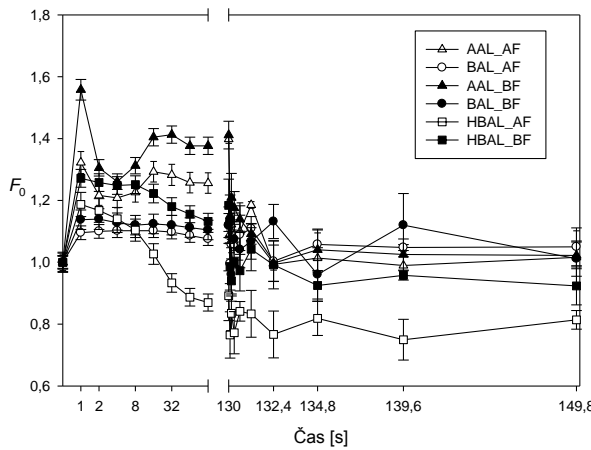
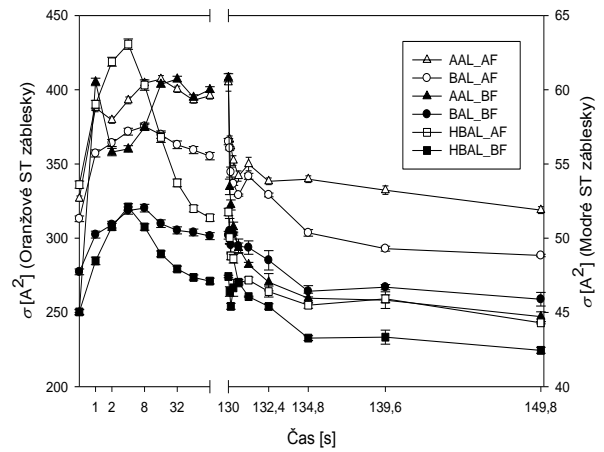
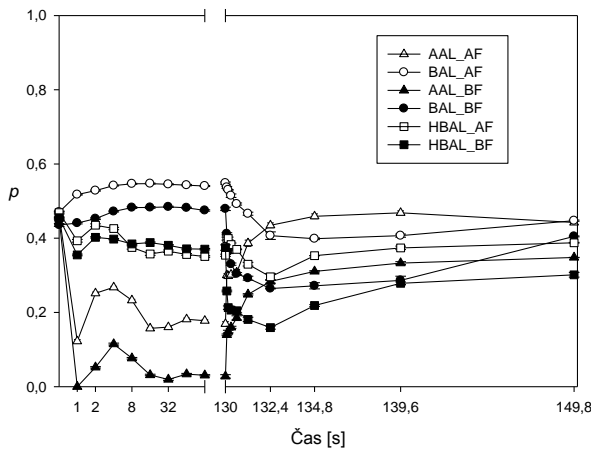
Příloha 7: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – ΔApcF . Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



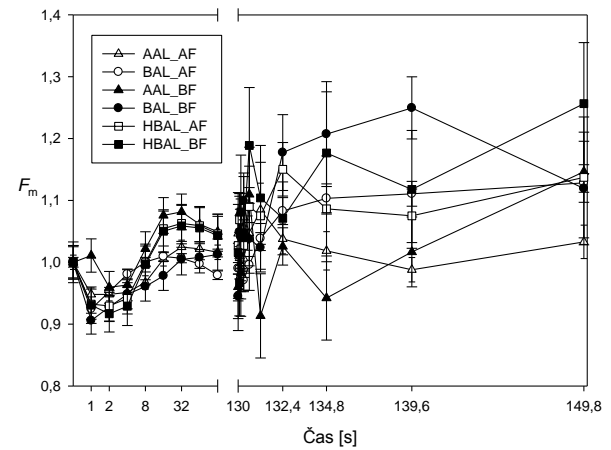
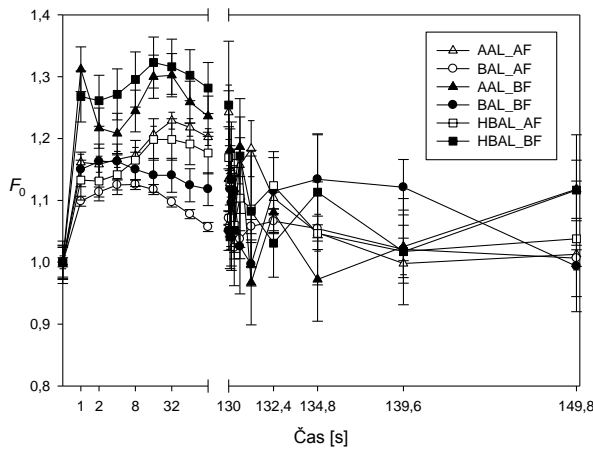
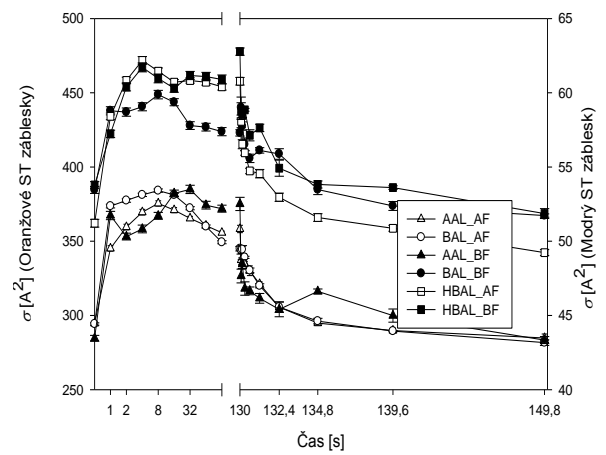
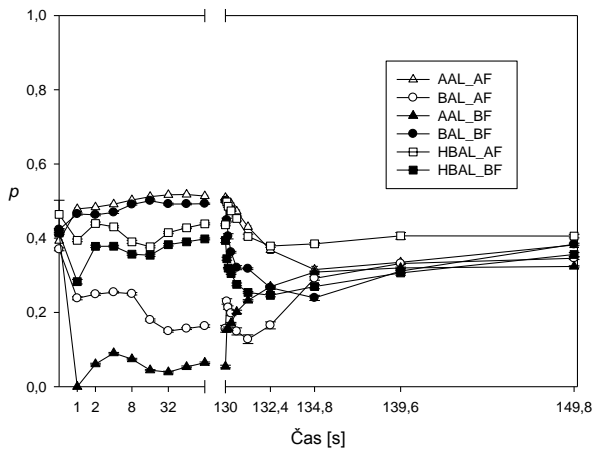
Příloha 8: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – PAL. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Výsledky pro oranžové ST záblesky se nepodařilo nařadit. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



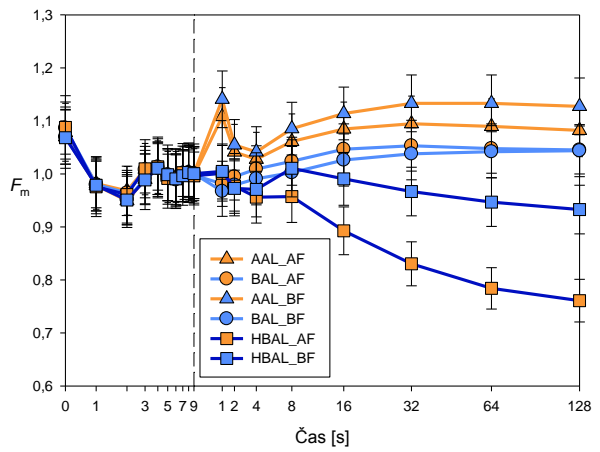
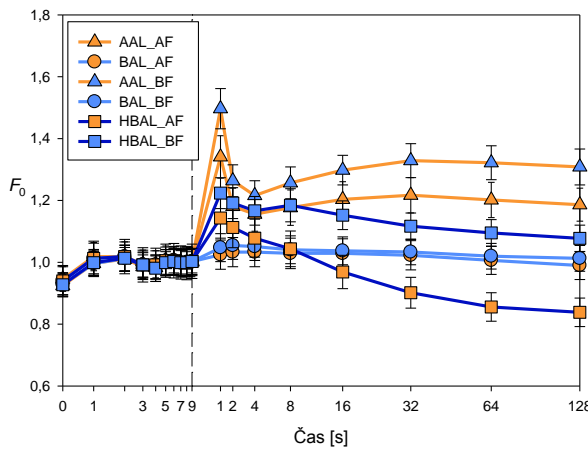
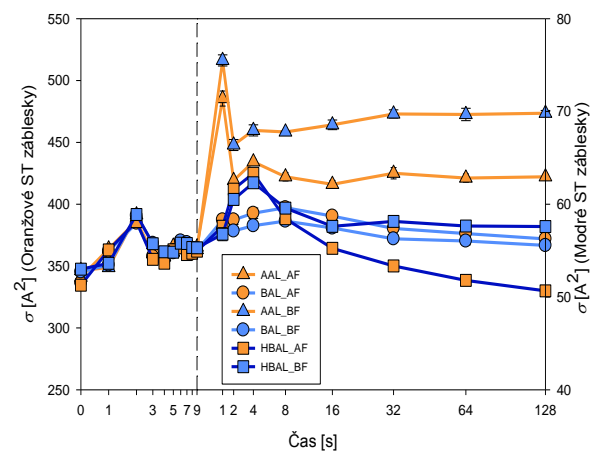
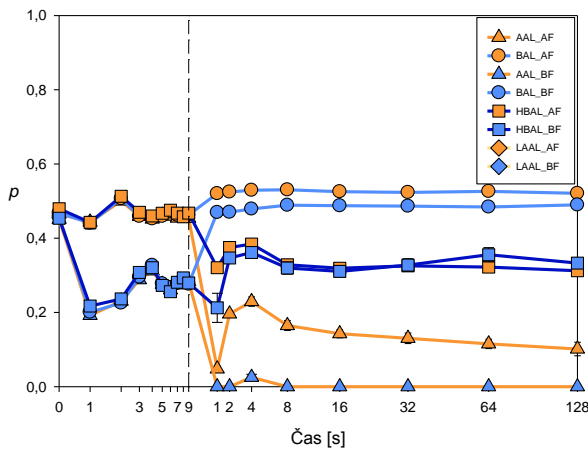
Příloha 9: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – Δ ApcE – C190S. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 2 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



Příloha 10: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – WT. Změna fluorescenčních parametrů s měřením po vypnutí aktinického světla. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 3 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



Příloha 11: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – Δ OCP. Změna fluorescenčních parametrů s měřením po vypnutí aktinického světla. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence F_M byly normalizovány na první měření v protokolu které proběhlo bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 3 a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.



Příloha 12: *Synechocystis* sp. PCC 6803 – WT. Změna fluorescenčních parametrů. Hodnoty minimální fluorescence F_0 a maximální fluorescence FM byly normalizovány na průměrnou hodnotu třech posledních ST záblesků které proběhly bez aktinického světla. K měření byl použit protokol č. 4 bez opakování pro zjištění kinetiky po vypnutí aktinického světla a aktinické světlo o intenzitě 75 a 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Křivky reprezentují data získaná pro následující parametry: AAL – oranžové aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, BAL – modré aktinické světlo o intenzitě 75 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, HBAL – modré aktinické světlo o intenzitě 1000 $\mu\text{mol kvant} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, AF – oranžové ST záblesky, BF – modré ST záblesky.