

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

**Modelování vlivu elektrických polí vytvářených přenašeči elektronů ve
fotosystému II na chlorofylovou fluorescenční indukci**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Barbora Chmelinová

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dušan Lazár, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Hui Lu, M. Eng

Olomouc 2014

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Doc. RNDr. Dušanovi Lazárovi, Ph. D. za vysoce odborné a zároveň vstřícné vedení práce.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením pana Doc. RNDr. Dušana Lazára, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce. Souhlasím se zveřejněním této práce v knihovně a na internetových stránkách UP v Olomouci a jejích pracovištích.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Souhrn

O (ne)schopnosti organismu využít absorbovanou energii světla pro fotochemické reakce vypovídá chlorofylová fluorescence. Ta nám pak nepřímo umožňuje sledovat funkční stav složek fotosyntetického transportního řetězce elektronů. Jednou z metod měření chlorofylové fluorescence je tzv. fluorescenční indukční jev, jehož počáteční nárůst (fluorescence rise, FLR) je studován v této práci. Jde o detekci časového průběhu intenzity fluorescence při osvětlení vzorku předem adaptovaného na tmu s charakteristickým průběhem znázorňující O-J-I-P křivka.

Jednou z posledních hypotéz je, že J-I-P část křivky, tzv. termální fáze, je způsobena blíže nedefinovanou osvětlením-indukovanou strukturní změnou v PSII, přičemž tato strukturní změna by mohla být indukována elektrickým polem vytvořeným okolo přenašečů elektronů v PSII. Z tohoto důvodu se studium role samotných lokálních elektrických polí na tvar křivky fluorescenční indukce jeví jako vhodné.

Místo experimentálního měření křivky se v této práci využívá teoretického - matematického modelování. Modelování nám ukazuje, které parametry mají na FLR vliv a které parametry ne.

V práci vycházíme z vylepšeného modelu Dušana Lazára (2013), ve kterém jsme navíc původní rychlostní konstanty vyměnili za rychlostní konstanty vypočítané pomocí Marcusovy teorie tunelového jevu a následně jsme model rozšířili o vliv elektrického pole, které vytvářejí elektrony setrvávající na přenašečích v PSII. Simulace se prováděly ve třech variantách a to pro optimalizovanou rychlost přenosu elektronů, neoptimalizovanou rychlost přenosu elektronů, kdy změna Gibbsovy energie je časově závislá na množství zredukovaného akceptoru A s nábojem Q a pro neoptimalizovanou rychlost přenosu elektronů, kdy změna Gibbsovy energie je časově závislá na množství již zoxidovaného donoru D s nábojem q a zároveň i na množství zredukovaného akceptoru A s nábojem Q.

Simulace ukazují, že lokální elektrická pole sice ovlivňují tvar křivky fluorescenční indukce, ale ne očekávaným způsobem.

Summary

The phenomenon of chlorophyll fluorescence provides information about an organisms (dis)ability to use absorbed light energy for photochemical reactions. It is an indirect way how to observe functional state of photosynthetic electron transport chain components. One of the method of chlorophyll fluorescence is the so-called fluorescence induction whose initial rise (fluorescence rise, FLR) is studied in this thesis. This method is based on detecting time course fluorescence intensity, while a dark-adapted sample is illuminated, characterized by a typical O-J-I-P curve.

One of a recent hypothesis is that the J-I-P part of the curve, the so-called thermal phase, is caused by an unspecified light-induced structural change in PSII while this change can be induced by electric fields formed around electron transporters in PSII. Because of this reason, a study of a role of the local electric fields themselves on the shape of the fluorescence induction curve seems to be suitable.

In the submitted thesis, *in silico* experiments – mathematic modelling – is used instead of real experimental measurements. The modelling shows parameters which affect FLR and those ones which do not.

The thesis uses the improved Dušan Lazár's model (2013) where original rate constants known from literature were replaced by rate constants calculated according to Marcus's tunnel phenomenon theory and then the model was extended by influence of an electric fields created by electrons remaining in PSII transporters. Simulation was conducted for three cases: one for optimized rates of electron transport, one for non-optimized rates of electron transport where the change in Gibbs' energy is time-dependent on the amount of reduced acceptor A with charge Q and for non-optimized rate of electron transport where the change in Gibbs' energy is time-dependent both on the amount of already oxidized donor D with charge q and on the amount of reduced acceptor A with charge Q.

Although the simulations show that the local electric fields affect the shape of the fluorescence induction curve, the effect is not in an expected way.

SEZNAM ZKRATEK

A	akceptor
D	donor
DCMU	3-(3',4'-dichlorofenyl)-1, 1-dimethylmočovina
F_0	minimální fluorescence
F_M	maximální fluorescence
FC	Franck-Condonův princip
FLR	fluorescenční indukční nárůst
ΔG	Gibbsova (volná) energie
ΔG^0	Gibbsova (volná) energie aktivovaného komplexu
ΔG^{el}	Gibbsova (volná) energie ovlivněna elektrickým polem
K	rovnovážná konstanta
k_x	rychlostní konstanta
k_B	Boltzmannova konstanta
LHCII	světlosběrný komplex fotosystému II

OEC	komplex vyvíjející kyslík
P ₆₈₀	dimer chlorofylu <i>a</i> , primární donor elektronu ve fotosystému II
Pheo	feofytin, primární akceptor elektronů ve fotosystému II
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
Q _A	chinon A, první chinonový akceptor elektronů ve fotosystému II
Q _B	chinon B, druhý chinonový akceptor elektronů ve fotosystému II
RC	reakční centrum
T	teplota [K]
Y _Z	tyrosin Z, sekundární donor elektronů ve fotosystému II
λ	reorganizační energie

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1 Fotosystém II	3
2.2 Fluorescence	4
2.3 Přenos elektronů.....	6
2.3.1 Komplex štěpící vodu	6
2.3.2 Přenos v RC PSII	7
2.4 Matematický popis pro přenos elektronů.....	8
2.4.1 Marcusova teorie.....	9
2.5 Vliv elektrického pole.....	14
3. CÍLE PRÁCE	17
4. SOFTWARE PRO SIMULACI	18
5. MODELOVÁNÍ	19
5.1 Modely FLR	19
5.2 Model Dušana Lazára z roku 2003	21
5.3 Vylepšený model Dušana Lazára z roku 2013	23
5.4 Rozšíření PSII modelu z roku 2013.....	24
5.4.1 Optimalizovaný přenos elektronu.....	24
5.4.2 Neoptimalizovaný přenos elektronu.....	28
5.4.3 Rozšíření o vliv elektrického pole.....	29
6. VÝSLEDKY A DISKUZE	30
6.1 Vylepšený model Dušana Lazára z roku 2013.....	30
6.2 Optimalizovaný přenos elektronu.....	31
6.3 Neoptimalizovaný přenos elektronu.....	32
6.4 Vliv elektrického pole na dopředné rychlostní konstanty	34
6.5 Vliv elektrického pole na dopředné i zpětné rychlostní konstanty	36
7. ZÁVĚR	38
8. SEZNAM LITERATURY	39

1. ÚVOD

U studia fyziologie rostlin a fotosyntézy se nejčastěji využívá metoda, při které se měří chlorofylová fluorescence. Jednou z metod, jak tuto fluorescenci změřit, je metoda tzv. fluorescenčního indukčního jevu, popřípadě pouze jeho počátečního nárůstu (fluorescence rise, FLR), což je závislost intenzity fluorescence na době osvětlení fotosyntetizujícího vzorku předem adaptovaného na tmu. Charakteristický průběh FLR, měřeného *in vivo* při velké intenzitě excitovaného světla, se označuje jako O–J–I–P křivka. Jednotlivé vlny, které jsou naměřené, se obvykle objevují v časech okolo 2 ms (J), 30 ms (I) a 200 - 500 ms (P). Pokud je rostlina vystavena stresu, na experimentálně měřené FLR se v čase přibližně 400 μ s objeví ještě jedna vlna označovaná jako vlna K. Po vlně K, J i P se může někdy objevit pokles intenzity fluorescence do lokálních minim, běžně označované jako D. Podle stávajících interpretací, křivka FLR odráží převážně funkci fotosystému II (PSII), a tedy pochopením křivky FLR můžeme lépe pochopit funkci PSII (Lazár 2003).

V poslední době se stále častěji využívá teoretické modelování pro pochopení principu, na jehož základě jsme získali experimentálně naměřená data. Simulace nahrazuje totiž části experimentu a tím nám ukazuje, jak se mění formy modelu v závislosti na změnách vybraných parametrů. Je ale zapotřebí mít na paměti, že nemůže existovat dokonalý model, který by absolutně kopíroval experiment, a proto se kvalitativní shoda mezi teoreticky získanými hodnotami a experimentálně naměřenými daty bere za dostačující.

V této práci vycházíme z vylepšeného modelu Dušana Lazára z roku 2013, který popisuje reakce v PSII. Model v sobě zahrnuje donaci elektronů z komplexu, který vyvíjí kyslík, na tyrosin Z a následný přenos elektronů na primární donor elektronů v PSII. Dále popisuje rovnováhu mezi excitovanými stavy a primární nábojovou separací, nábojovou stabilizací a následný přenos elektronu až na plastoquinonový (PQ) pool. Takto formulovaný model je jedním z nejpodrobnějších modelů popisující reakce přenosu elektronu v PSII a používaný pro simulaci FLR (Chmelinová 2012). Pokud v modelu změníme parametry (jako například rychlostní konstanty) můžeme pak sledovat změny v teoretickém FLR a ty následně porovnat s experimentálně získanými výsledky. V bakalářské práci jsme v modelu změnili hodnoty dopředných rychlostních konstant. Tato změna je určena vytvořením elektrického pole, které vytváří jednotlivé

elektrony při přenosu z jednoho přenašeče na druhý (Chmelinová 2012). V této bakalářské práci jsme prokázali, že vliv elektrického pole na jednotlivých přenašečích elektronů není zanedbatelný, jak se do té doby myslelo (Chmelinová 2012). Protože i nadále existují rozdíly mezi teoreticky namodelovanou a experimentálně získanou FLR, rozhodli jsme se v této práci, oproti práci bakalářské, změnit matematický přístup ve výpočtu rychlostních konstant. Dále takto nově získané rychlostní konstanty ovlivníme velikostí elektrického pole vytvářeného při přenosu elektronů přes jednotlivé přenašeče a následně získanou teoretickou FLR porovnáme s experimentálně získanými daty.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosystém II

Pro popis struktury a funkce fotosystému II (dále jen PSII) na molekulární a atomové úrovni se využívá rentgenová krystalová strukturní analýza. První takto získané krystaly aktivního PSII byly dimerní formy z cyanobakterie (sinice) *Thermocynechococcus vulcanus* (jejichž 3D struktura měla rozlišení 3,7 Å; Kamiya a kol. 2003), a proto bakterie (např. *Rhodobacter sphaeroides*) posloužily jako cenný analog k popisu struktury a funkce PSII u zelených řas a vyšších rostlin. V dnešní době, kdy už umíme získat 3D krystalovou strukturu i z vyšších rostlin (izolace z *Nicotiana tabacum* s rozlišením této struktury kolem 7 Å; Piano a kol. 2010), můžeme konstatovat, že obě struktury jsou si velice podobné.

Monomerický PSII vyšších rostlin má eliptickou strukturu o molekulární hmotnosti 250 kDa a velikost této formy je 2 x 10 x 8 nm. Tento monomer vždy obsahuje světlosběrný komplex (obsahující převážně chlorofyly), reakční centrum (RC) s molekulou P₆₈₀ napojenou na proteiny a komponenty enzymového komplexu, který vyvíjí kyslík (OEC) oxidací vody. Každá jednotka pak má nejméně 20 různých polypeptidových řetězců, přičemž většina podjednotek je umístěna v membráně. Dvě vnitřní podjednotky s pěti transmembránovými šroubovicemi tvoří RC PSII. (Müh 2012). V RC je po jedné kopii polypeptidů D₁, D₂, cytochrom b₅₅₉, antény reakčního centra CP43, CP47, obsahující cca 40 chlorofylů, protein o hmotnosti 33 kDa, a další polypeptidy s nízkou molekulovou hmotností (Lawlor 2001). RC tvoří dvě polypeptidové jednotky D₁ a D₂ (které jsou podobné jako podjednotky nacházející se u bakteriálního reakčního centra označovány jako L a M), které jsou produktem genů psbA (D₁) a psbD (D₂) a proto mají různé hmotnosti, a tak i různou funkci, načež se v konstrukci nachází jako heterodimery. Součástí D₁ je tyrosin 161 (označován jako Y_Z, který zprostředkovává přenos elektronů z OEC na RC), feofytin (Pheo nebo se také používá označení H či H_{D1}, jehož chemická struktura je podobná struktuře chlorofylu, avšak Mg²⁺ je nahrazen dvěma protony) a druhý chinonový akceptor elektronů označován jako Q_B. Polypeptid D₂ má k sobě navázaný tyrosin 160, označován jako Y_D, a molekulu prvního chinonového akceptoru elektronů Q_A (Chmelinová 2012). Tyto polypeptidy jsou k sobě „navázány“ přes P₆₈₀. Spektroskopická analýza ukazuje, že P₆₈₀

je dimer Chl a jako je tomu u P_{870} u purpurových fotosyntetizujících bakterií (Voet a Voetová 2011). Heterodimer D_1/D_2 je umístěn na jednom konci elipsy jádra PSII, na druhém konci jádra se nachází proteiny CP43 a CP47, jejichž funkcí je záchyt a přenos excitační energie k RC. Proteiny jsou hydrofobní s šesti transmembránovými helixy a amino a karboxylovými skupinami orientovanými do stromatu (Chmelinová 2012). Mezi 5. a 6. helixem umístěným na straně lumenu jsou velké smyčky, které zapříčiňují kontakt CP47 s 33 kDa proteinem OEC a pravděpodobně tak utvářejí místo pro manganový klastr OEC. CP43 je antiparalelní a proto se monomery jádra PSII na sebe navazují se záměrem vytvořit dimer. Rozměry dimeru PSII jsou 20 x 12 x 8 nm a molekulární hmotnost činí okolo 450 kDa (Lawlor 2001). Dimer pak vždy obsahuje stejné komponenty ve stejných poměrech jako je tomu u monomerní jednotky (Chmelinová 2012).

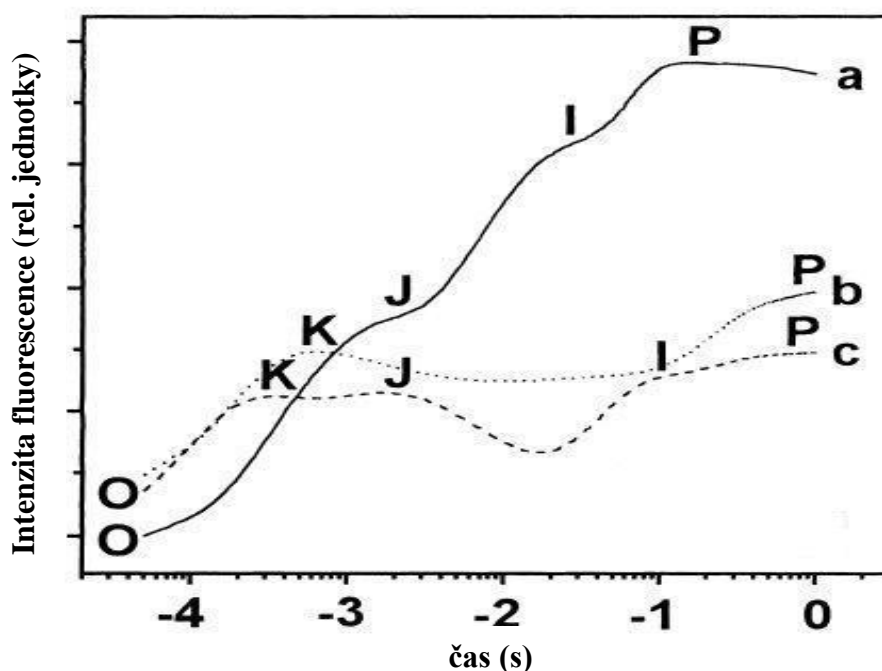
V RC se dále vyskytují cytochrom b_{559} (nacházející se ve více různých oxidačně-redukčních stavech), β -karoteny (pravděpodobně jejich funkce je ochrana při fotoinhibici) a světloměrný komplex LHCII sloužící jako hlavní sběrač excitační energie pro PSII, která je pak použita pro uvolnění elektronu z P_{680} (Chmelinová 2012).

2.2. Fluorescence

Jako fluorescence se označuje děj, při kterém dochází k zářivé deaktivaci obvykle prvního singletního excitovaného stavu do základního stavu. U fotosyntetizujících organismů fluorescence odráží (ne)schopnost organismu využít absorbovanou energii pro fotochemickou reakci. Jde o konkurenční proces k využití excitační energie na fotochemickou nábojovou separaci (přenos elektronu z P_{680} na Pheo), a tak tedy nepřímo umožňuje sledovat funkční stav složek fotosyntetického transportního řetězce.

Jednou z možností měření fluorescence chlorofylu je detekce fluorescenčního indukčního jevu (FIJ), což je závislost intenzity fluorescence na čase, během osvětlení fotosyntetizujícího vzorku po jeho předchozí adaptaci na tmu. V závislosti na použité intenzitě osvětlení, časovém rozlišení fluorometru a fyziologickém stavu vzorku lze naměřit mnoho různých „typů“ FIJ. V případě, že se FIJ měří se standardním vzorkem, např. vyšší rostliny, při pokojové teplotě, při použití saturační intenzity světla a s maximálním stávajícím časovým rozlišením fluorometrů, fluorescence nejprve rychle

roste (tzv. fluorescence rise – FLR) a poté pomalu klesá. Charakteristický průběh FLR znázorňuje křivka O-J-I-P (viz obrázek 1), která se měří za velké intenzity excitačního světla. Předpokládá se, že variabilní fluorescence pochází pouze z PSII (fluorescence vzniklá z PSI z celého signálu FLR za pokojové teploty je maximálně okolo 20% a tento signál je konstantní (Lazár 2003)), ale z teoretické práce Lazára z roku 2013 vyplývá, že světlem indukované redoxní změny v PSI jsou schopné vést k variabilní fluorescenci z PSI a tato fluorescence může nezanedbatelnou měrou přispívat k „celkové“ variabilní fluorescenci. Uvedená tvrzení vytvořená na základě simulací jsou však třeba ještě experimentálně ověřit nebo vyvrátit (Lazár 2013).



Obrázek č.1.: Experimentálně naměřené křivky FLR na předem adaptovaných listů hrachu a brambor na tmu (20 min) při osvětlení velkou intenzitou excitačního světla ($3400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ červeným světlem (λ okolo 650 nm)). Křivka a) je kontrolní list hrachu, křivka b) je list hrachu inkubovaný při 47°C po dobu 5 min a křivka c) je list bramboru inkubován při 44°C po dobu 13min. Kroky O-K-J-I a P jsou označené a jsou snadno odlišitelné pouze na logaritmické časové ose. (převzato Lazár 1999).

Minimální fluorescenci F_0 lze naměřit v době, kdy jsou všechna RC PSII otevřená, což vzhledem k nábojové separaci znamená, že jsou všechny P_{680} v redukované formě a všechny Pheo jsou oxidované. Podle tohoto konceptu, nenulová minimální fluorescence F_0 je potom ta fluorescence, která je emitovaná poté, co je nastolena rovnováha excitací mezi všemi světlosběrnými pigmenty a P_{680} a před

nábojovou separací (Chmelinová 2012). Maximální fluorescence F_M (někdy označovaná jako F_P) nastává, pokud jsou RC zavřené, tedy ve chvíli, je-li P_{680} oxidované a/nebo Pheo se nachází v redukované formě. Pojmy otevřená a zavřená RC PSII jsou však velmi často, avšak ve více aproximativním přístupu, také vysvětlovány pomocí redoxního stavu Q_A : je-li Q_A oxidované, je RC otevřené a je-li redukované, je RC zavřené (Lazár 2003). Otevřené a zavřené RC PSII mají ale i jiné definice.

Po F_0 (označované O) následuje ve FLR první krok, který za všech intenzit světla odráží akumulaci redukovaného Q_A kontrolovaného intenzitou světla. Tento první krok se nazývá fotochemická fáze a ve FLR křivce odpovídá části O-J. Po fotochemické fázi nastává tzv. termální fáze – tato fáze závisí na teplotě měření. Na křivce FLR jí pak odpovídají vlny J-I-P. Termální fáze odráží nejen akumulaci redukovaného Q_A , ale taky nahromadění přenašečů elektronů za Q_A a to na Q_B (Lazár 2003).

Termální fáze je dvojfázová. Skládá se z první fáze, J-I, a pak následuje fáze druhá, I-P, obě měřené za vysokých intenzit světla. Fáze odráží nejen akumulaci různých kombinací redukovaného Q_A a Q_B , ale i heterogenitu PSII. Vlna I může také odrážet redoxní reakce odehrávající se za PSII, konkrétně v donoru elektronu v PSI, P_{700} , a jeho okolí (Chmelinová 2012). Toto tvrzení vychází z faktu, že maximum oxidace P_{700} nastává v pozici vlny I ve FLR. Takže v křivce FLR, konkrétně v krocích J-I-P, je pravděpodobně zobrazená účast všech elektronových přenašečů v rámci tylakoidní membrány (Lazár 2003). Novou teorií pro vznik termální fáze FLR je, že tato fáze je způsobena blíže nedefinovanou osvětlením indukovanou strukturální změnou v PSII, která způsobí nárůst fluorescence (Schansker a kol. 2011, 2014). Bylo navrženo, že tato strukturální změna může být indukována elektrickým polem vytvořeným okolo přenašečů elektronů v PSII (Schansker a kol. 2011, 2014). Z tohoto důvodu se studium role samotných lokálních elektrických polí na tvar křivky FLR jeví jako vhodné.

2.3. Přenos elektronů

2.3.1. Komplex štěpící vodu

Enzymový komplex štěpící vodu za uvolnění kyslíku (water splitting complex (WSC)) neboli také komplex vyvíjející kyslík (oxygen evolving complex (OEC)), je umístěný v tylakoidní membráně na lumenové straně (Chmelinová 2012). OEC

obsahuje 4 atomy manganu, které v cyklu postupně prochází pěti různými oxidačními stavy, které se obvykle označují S_0 až S_4 . Každý krok mezi S_0 a S_4 je oxidačně-redukční reakce poháněná absorpcí jednoho fotonu.

Dvě molekuly vody se navážou k OEC, který usnadňuje vznik kyslíku tak, že postupně z vody odebírá jednotlivé elektrony a protony. V posledním kroku dojde k uvolnění molekuly O_2 do lumenu. Během tohoto děje OEC prochází řadou oxidačních stavů, které představují kombinace iontů manganu o různém mocenství, tedy Mn^{3+} , Mn^{4+} a Mn^{5+} (Voet a Voetová 2011). Některé teorie uvádějí, že stavy S_0 , S_1 a S_2 odpovídají komplexům Mn_4O_4 , které mají strukturu kubanu, a stavy S_3 a S_4 pak odpovídají Mn_4O_6 , jehož struktura je adamantan. Při přechodu ze stavu S_4 na S_0 dojde ve struktuře k přesmyku, a tedy adamantan se přemění na kuban, a dojde tak k uvolnění kyslíku.

Nejbližším spojovacím článkem v řetězci přenosu elektronů je molekula tyrosinu 161 (Y_Z), která odebírá elektrony z OEC a předává je na oxidovanou formu P_{680} , čímž ji redukuje.

2.3.2. Přenos v RC PSII

PSII obsahuje molekuly chlorofylu a i b, které jsou vázané na proteinové nosiče, což umožňuje PSII absorbovat energii dodanou ze světlosběrných komplexů. Absorpční maximum PSII se pohybuje v oblasti 670 – 680 nm (Kaplanová a kol. 1987). LHCII dodává excitační energii RC, přijetím této energie se vytváří excitovaný stav na P_{680} (dimer molekul chlorofylů). P_{680} ale může absorbovat tuto energii pouze tehdy, je-li v redukované formě, nachází-li se P_{680} v oxidovaném stavu, excitační energii nemůže absorbovat a přesouvá ji do jiných RC s redukovaným P_{680} (nebo, podle některých autorů, může oxidovaný P_{680} excitační energii zhášet). Redukovaný P_{680} absorbuje excitační energii, čímž se vytvoří excitovaný stav P_{680}^* , který vede k uvolnění elektronu z P_{680} za vzniku P_{680}^+ . P_{680} je tedy primární donor elektronů v PSII. Podle novějších prací by však primárním donorem elektronů měla být molekula doprovodného chlorofylu (acc chl_{D1}) umístěná na proteinu D1 mezi feofytinem (H_{D1}) a P_{680} . V této souvislosti je také diskutována možná role doprovodného chlorofylu umístěného na proteinu D2 (acc chl_{D2}) mezi feofytinem na D2 (H_{D2}) a P_{680} . P_{680} by pak byl až sekundární donor elektronů. Z toho důvodu se v některých pracích pod pojmem P_{680}

obecně uvažuje tetramer chlorofylů P_{680} , $acc\ chl_{D1}$ a $acc\ chl_{D2}$. Pro jednoduchost v modelování však předpokládáme, že primární donor elektronů v PSII je P_{680} . Uvolněný elektron přijímá primární akceptor elektronů Pheo (ve struktuře PSII se nachází 2 feofytiny H_{D1} a H_{D2} , ale H_{D2} se neúčastní elektronového transportu a tvoří tzv. inaktivní větev transportu elektronu v PSII). Přenos elektronu z P_{680} na Pheo se nazývá nábojová separace, zpětnému přenosu se říká nábojová rekombinace. Nábojová stabilizace se pak jmenuje proces, při kterém se předává elektron z Pheo na Q_A . Kationt nehemového železa (Fe^{2+}) pomáhá přenášet elektron z Q_A na Q_B . Q_B je dvouelektronový akceptor a tak elektron přijímá jak v oxidované formě (Q_B) tak ve formě redukované (semichinon, Q_B^-) za vzniku Q_B^{2-} . Q_B^{2-} poté přijímá 2 protony ze stromálního povrchu tylakoidní membrány za vzniku elektricky neutrální formy plastochinolu, Q_BH_2 . Tato neutrální forma je pouze slabě vázaná na PSII a snadno se uvolňuje do tylakoidní membrány, čímž se stává redukovanou formou plastochinonu (PQ) z poolu v membráně (Chmelinová 2012). V Q_B -kapse PSII tak zůstane volné místo, na které se naváže oxidovaná molekula PQ z poolu, čímž vznikne v PSII oxidované Q_B . PQ pool se oxiduje předáním elektronů na komplex cytochrom b_6/f (Vodrážka 2002).

2.4. Matematický popis pro přenos elektronů

Jak ale k přenosu elektronu mezi jeho donorem a akceptorem dochází? Na tuto otázku se začalo odpovídat v druhé polovině dvacátého století vypracováním dvou teorií, a to teorie vnitřního a vnějšího elektronového přenosu. Obě tyto teorie získaly ocenění nejvyšší, Nobelovu cenu.

Henry Taube obdržel Nobelovu cenu roku 1983 za tehdy průkopnickou teorii „vnitřního přenosu elektronu“ (inner sphere electron transfer nebo také bonded electron transfer). Přenos elektronů se děje pomocí vytvoření chemické (kovalentní) vazby mezi donorem a akceptorem. Touto vazbou vznikne komplex, ve kterém dojde k následnému přenosu elektronů. K vytvoření komplexu nemůže dojít mezi přenašeči umístěnými v proteinech, tedy tento typ přenosu elektronu se děje převážně v reakcích, ve kterých dochází k tvorbě přechodných kovových komplexů.

Rychlost reakcí, při kterých dochází ke strukturním změnám reaktantů, se popisuje pomocí Eyringovy „teorie přechodného stavu“ (transition state theory, TST). Aby tato teorie byla naformulovaná, bylo zapotřebí předchozích dílčích výsledků jednotlivých vědců vycházejících ze dvou rozdílných oblastí fyziky, a to z termodynamiky a statistické mechaniky.

V biologických systémech je ale vnitřní přenos elektronů vzácný, a to protože redoxní místa jsou „obalena“ objemnými proteiny, které je chrání, a tím zamezují spojení do přechodného stavu. V biologických systémech se proto uplatňuje jiný typ přenosu elektronu, a to ten, kdy elektron je nucen se pohybovat prostorem od svého donoru k akceptoru. Tento děj popisuje teorie „vnějšího přenosu elektronů“ (outer sphere electron transfer) (Taube 2012).

2.4.1. Marcusova teorie

Teorii vnějšího přenosu elektronů představil v roce 1956 Rudolph A. Marcus. Hlavním aspektem teorie je popis míry vnějšího přenosu elektronů od donoru k akceptoru v biologických systémech, kdy před přenosem, v jeho průběhu a po něm jsou donor s akceptorem fyzicky oddělené entity a po celou dobu přenosu tedy nedochází k žádným strukturním změnám reaktantů. Tento přenos se uskutečňuje díky tunelovému jevu, který je právě popsán v Marcusově teorii R. A. Marcusem, který za ni roku 1992 dostal Nobelovu cenu.

Marcusova teorie nám tedy předkládá matematický aparát pro zjištění rychlostní konstanty přenosu elektronu. Před samotným popisem tunelového jevu pomocí této teorie je ale třeba nadefinovat jiná fyzikální pravidla a jiné principy, které Marcusova teorie využívá.

Fermiho zlaté pravidlo

V kvantové mechanice jde o vzorec, který umožňuje vypočítat pravděpodobnost přechodu za jednotku času, tedy slouží pro popis „rychlosti přenosu“ (transition rate) z jednoho energetického kvantového stavu $|i\rangle$ do jiných koncových kvantových stavů systému $\langle f|$ způsobeného obecně časově proměnnou energetickou poruchou, popsanou Hamiltoniánem H' . Rozměr této rychlosti přenosu je shodný s rozměrem rychlostní konstanty reakce 1. řádu.

Platí tedy:

$$T_{i \rightarrow f} = \frac{2\pi}{\hbar} |(\langle f | H' | i \rangle)|^2 \rho, \quad (1)$$

kde $\langle f | H' | i \rangle$ je maticový element poruchy mezi počátečním a koncovým stavem zapsaným bra-ket značením a ρ je hustota koncových stavů (= počet stavů na jednotku energie).

Franck-Condonův princip

Franck-Condonův princip (označován jako FC) popisuje přechod mezi energetickými stavy dané látky. V klasické (= nekvantové) podobě říká, že nejpravděpodobněji dojde k přechodu mezi elektronovými stavy převážně ve vertikálním směru. Během přechodu (10^{-15} s) nestačí jádra změnit polohu. Přechod se tak děje převážně mezi body obratu klasického vibračního pohybu, a to proto, že se v těchto polohách jádra nejčastěji vyskytují (výjimku tvoří stavy $v = 0$, zde je největší pravděpodobnost výskytu v rovnovážné poloze (u dvourozměrného řezu nadplochou v prostoru je to na ose paraboly), to je důsledek kvantové mechaniky). V kvantové podobě FC princip říká, že nejpravděpodobněji dojde k elektronově-vibračnímu přechodu, u kterého se nejvíce překrývají vibrační vlnové funkce počátečního a koncového stavu dané látky. Tedy pravděpodobnost tohoto přechodu (intenzita elektronově-vibračního přechodu) je úměrná kvadrátu překryvového integrálu mezi vibračními vlnovými funkcemi počátečního a koncového stavu dané látky (pozn.: kvadrát vlnové funkce představuje hustotu pravděpodobnosti). Vibračními vlnovými funkcemi se myslí vlnová funkce jádra a to proto, že hmotnost dané látky, tedy její vibrace, je dána hmotností jejího jádra.

Tunelový jev

Přenos elektronů v proteinech se děje pomocí tunelového jevu. Elektron se v proteinech přenáší na relativně velké vzdálenosti v porovnání s rozměry samotného atomu $0,3 - 3 \text{ \AA}$. V roce 1966 De Vault a Chance dedukovali, že elektron je schopný „tunelovat“ mezi svým donorem a akceptorem do vzdálenosti až 30 \AA . Experimentální měření rychlosti přenosu elektronů v proteinech, jejichž struktura je přesně známa, ukázala, že tunelový jev se děje většinou do vzdálenosti 14 \AA . Existují i studie, které ukazují, že elektron se přenáší i do vzdálenosti 18 a 27 \AA (Page a kol. 1999). Za těchto vzdáleností je interakce donoru a akceptoru elektronu malá a dá se na ní aplikovat

Fermiho zlaté pravidlo jako aproximace pro vyjádření rychlosti přenosu elektronů pro neadiabatické (dochází k výměně tepla) reakce 1. řádu. V analogii s rovnicí (1) pak ve značení obvyklém v literatuře platí (Moser a Dutton 1992):

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} V^2 FC, \quad (2)$$

kde V je maticový element poruchy (= interakce) mezi počátečním a koncovým stavem. Porucha V závisí na elektronových stavech donoru a akceptoru elektronu, a to protože se přenáší právě elektron, a je úměrná překryvu elektronových vlnových funkcí právě donoru a akceptoru elektronu (značeno také jako H_{AB} , nebo H_{DA} – elektronové párování - coupling mezi donorem elektronu D a akceptorem elektronu A , který hraje roli H' v rovnici (1)). Největší změny ve V jsou v biologických systémech v důsledku poklesu překryvu elektronových vlnových funkcí donoru a akceptoru elektronu s jejich rostoucí vzdáleností. Vychází se z předpokladu, že k tunelování elektronu dochází mezi redoxními centry s úzkými potenciálovými jámami přes energetickou bariéru neměnné výšky (určenou aktivační energií reakce E_a ; viz dále). Proto platí:

$$V^2 = V_0^2 e^{-\beta r}, \quad (3)$$

kde r je vzdálenost redoxních center „edge to edge“, tedy od „hrany ke hraně“. Koeficient β je úměrný odmocnině z energetické bariéry (E_a) a říká nám jak dobře vlnové funkce (velikost jejich poklesu v závislosti na vzdálenosti) prostupují prostorem (= mediem, proteinem) mezi akceptorem a donorem elektronů. Pro různé chemické systémy je β různá a volí se v intervalu $1 - 2 \text{ \AA}^{-1}$ (Marcus a Sutin 1985). Pro fotosyntetické proteiny bylo zjištěno, že je $\beta = 1,4 \pm 0,2 \text{ \AA}^{-1}$ (Moser 1992, Page a kol. 1999) a pro vakuum je $\beta = 2,8 \text{ \AA}^{-1}$ (tamtéž).

FC v rovnici (2) je hustota stavů určena podle FC principu a odráží překryv vlnových funkcí jader donoru a akceptoru elektronu. Podle Marcuse a Sutina (1985) lze donor a akceptor elektronu a jejich jaderné vlnové funkce aproximovat harmonickými oscilátory s oscilacemi se shodnou frekvencí, odpovídající kvantové energii $\hbar\omega$ s typickou hodnotou okolo 70 meV (Moser 1992), ale s rozdílnými rovnovážnými pozicemi a rozdílnými volnými energiemi těchto oscilátorů. Pak překryv jaderných

vlnových funkcí donoru a akceptoru elektronu má průběh Gaussova rozdělení v závislosti na volné energii reakce a je možné jej napsat jako:

$$FC = (4\pi\lambda k_B T)^{-\frac{1}{2}} e^{-\frac{(\Delta G^0 - \lambda)^2}{4\lambda k_B T}}, \quad (4)$$

kde λ je reorganizační energie, která je potřebná k narušení rovnovážné pozice jádra donoru elektronu do pozice jádra akceptoru elektronu (kdy elektron pořád zůstává nepřenesený na donoru elektronu). FC se dá také vyjádřit i semiklasicky, popřípadě provést i kvantové korekce (viz Moser a Dutton 1992). Kvantová korekce je třeba pro případy, kdy $\hbar\omega$ je větší než $2k_B T$ ($k_B T$ je tzv. Boltzmanova tepelná energie a má pro pokojovou teplotu hodnotu 25,7 meV). Typické $\hbar\omega = 70$ meV (viz výše) je sice větší než $2k_B T$ (51,4 eV), ale ne o hodně, takže pro pokojovou teplotu je popis FC hustoty stavů podle rovnice (4) relativně přesný (Moser a Dutton 1992). Dosazením rovnice (4) do rovnice (2) a patřičným přeznačením dostaneme vztah pro velikost rychlostní konstanty k přenosu elektronu tunelovým jevem (Marcus a Sutin 1985):

$$k = \left(\frac{2\pi}{\hbar}\right) (4\pi\lambda k_B T)^{-\frac{1}{2}} H_{AB}^2 e^{-\frac{(\Delta G^0 - \lambda)^2}{4\lambda k_B T}}, \quad (5)$$

kde k_B určuje, že se rovnice vztahuje k reakci mezi jednou molekulou donoru elektronu a jednou molekulou akceptoru elektronu (pokud by se rovnice vztahovala k jednomu molu reaktantů, pak by všude v rovnici místo k_B byla univerzální plynová konstanta R). Dále H_{AB} je maticový element popisující elektronový coupling mezi donorem a akceptorem elektronů udávající stupeň překryvu elektronových vlnových funkcí donoru a akceptoru elektronů.

Uvažujeme-li Diracovu konstantu $\hbar = h/2\pi$, rovnici (5) můžeme napsat jako (Davidson 1996):

$$k = \left(\frac{4\pi^2}{h}\right) (4\pi\lambda k_B T)^{-\frac{1}{2}} H_{AB}^2 e^{-\frac{(\Delta G^0 - \lambda)^2}{4\lambda k_B T}}, \quad (6)$$

která je ekvivalentní rovnici (Gray a Winkler 2003):

$$k = \left(\frac{4\pi^2}{h^2 \lambda k_B T} \right)^{-1/2} H_{AB}^2 e^{-\frac{(\Delta G^0 - \lambda)^2}{4\lambda k_B T}} \quad (7)$$

Dosazením rovnice (3) do rovnice (6) a přeznačením (V za H_{AB}) dostaneme pro k i rovnici (Davidson 1996):

$$k = k_0 e^{-\beta(r-r_0)} e^{-\frac{(\Delta G^0 - \lambda)^2}{4\lambda k_B T}}, \quad (8)$$

kde k_0 je charakteristická frekvence jader (obvykle 10^{13} s^{-1}) a r_0 je kontaktní vzdálenost atomů (obvykle 3 Å).

Pro vztah mezi aktivační energií reakce E_a , ΔG^0 a λ , Marcus odvodil rovnici:

$$E_a = \frac{1}{4} \lambda \left(1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda} \right)^2 = \frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda}. \quad (9)$$

Obecný empirický vztah pro výpočet dekadického logaritmu velikosti rychlostní konstanty pro přenos elektronů tunelovým jevem je (Moser a Dutton 1992):

$$\log k = 15 - 0,6r - \frac{3,1(\Delta G^0 + \lambda)^2}{\lambda}, \quad (10)$$

kde r je vzdálenost přenašečů „edge to edge“ v Å, ΔG^0 je „řídící síla“ v eV a λ je reorganizační energie v eV. λ je u různých proteinů v intervalu 300 - 1300 meV (Moser 1992) s typickou hodnotou $\lambda = 0,9 \pm 0,2 \text{ eV}$ (Page a kol. 2003).

Obecně platí, že rychlost přenosu elektronů tunelovým jevem je dána hodnotami ΔG_0 , λ a r . Jak vyplývá přímo z pravé strany rovnice (9), pokud je přenos elektronu optimalizovaný ($\Delta G_0 = -\lambda$), pak aktivační energie E_a je nulová (nulová výška energetické bariéry) a určujícím faktorem pro rychlost přenosu elektronu je pak pouze vzdálenost mezi donorem a akceptorem elektronu. Pro optimalizovaný přenos elektronu a dané r však může hrát roli FC hustota stavů, konkrétně vzájemný vztah mezi velikostmi ΔG_0 a λ , pro určení směru přenosu elektronu, jak bylo navrženo Moserem a

Duttonem (1992). To je ale pouze pro případ, kdy přenosu elektronu předchází excitování donoru elektronu (například ve fotosyntéze), kdy dopředný přenos elektronu s optimalizovaným ΔG_0 a λ je z excitovaného stavu donoru elektronu a zpětný přenos elektronu se uvažuje do základního stavu původního donoru elektronu. Tedy v celkové reakci přenosu elektronu a určení směru přenosu elektronu je vliv energie excitovaného stavu, kde neuvažování této energie při zpětném přenosu elektronu do základního stavu způsobí dosažení inverzní Marcusové oblasti, čili přenos elektronu zpět již není optimalizovaný, a proto jeho rychlost klesá.

Zpětná rychlostní konstanta přenosu k_- , se pak vypočítá na základě definice rovnovážné konstanty podle Boltzmannovy distribuce jako (Kipp a kol. 2008):

$$k_- = \frac{k_+}{e^{-\frac{\Delta G^0}{k_B T}}}, \quad (11)$$

kde k_+ je rychlostní konstanta dopředná vypočítaná podle Marcusovy teorie (viz výše), T je teplota v Kelvinech a k_B je Boltzmannova konstanta.

2.5. Vliv elektrického pole

Elektrony setrvávající na daném přenašeči okolo sebe vytvářejí elektrické pole, které následně ovlivňuje ostatní přenášené elektrony. Velikost intenzity elektrického pole okolo bodového náboje je definována vztahem:

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon r} Q, \quad (12)$$

kde ϵ je absolutní permitivita, která se vyjadřuje jako $\epsilon = \epsilon_0\epsilon_r$, kde ϵ_0 je permitivita vakua a ϵ_r je relativní permitivita prostředí okolo elektrického náboje, Q je velikost bodového náboje a r je vzdálenost od bodového náboje.

V závislosti na velikosti intenzity těchto polí se stále mění elektrostatická potenciální energie. Tato energie je rovna práci, kterou vykoná elektron při přenosu z jednoho přenašeče na druhý. Práce, která se vykoná přenosem elektronu po dráze proti

elektrickým silám, je rovna záporně vzatému integrálu po této dráze ze složky elektrické síly ve směru pohybu:

$$W = - \int_{s_1}^{s_2} F ds, \quad (13)$$

kde F je elektrická (Coulombova) síla působící na náboj, ds je diferenciál posunutí po dráze (Feynman a kol. 2001).

Z chemického hlediska dochází ke změně Gibbsovy volné energie v závislosti na potenciální energii elektrického pole na daném přenašeči elektronů, a tím se pak mění rychlost přenosů elektronů, a tedy i rychlostní konstanty v těchto fotochemických reakcích. Pro jednoduchost budeme uvažovat u reverzibilního přenosu elektronu z donoru D na akceptor A pouze lokální ovlivnění náboje v dané reakci a jiné náboje v PSII nebudeme uvažovat. Jiné náboje neuvažujeme proto, že vliv elektrického pole je závislý na vzdálenosti a tak vliv nábojů na jiných akceptorech na námi sledovanou reakci je zanedbatelně malý. Dále v prvním přiblížení předpokládáme, že v každém čase se přenáší jednotkový náboj elektronu q a rychlost tohoto přenosu elektronu je ovlivněna celkovým nábojem na akceptoru A (dáno součinem $Q \times A(t)$, viz dále), kam se elektron přenáší. Tedy na počátku reakce, v čase $t = 0$, je elektron na donoru D a na akceptoru A se žádný elektron nenachází. V čase t se určité množství elektronu již přeneso na akceptor A . Tím vzniká elektrické pole, které následně začne ovlivňovat následný přenos elektronu na tento akceptor A . Čili, elektrické pole, které již zredukovaný akceptor A vytváří, začne odpuzovat elektron následně přenášený z donoru D právě na akceptor A , a tím se modifikuje rychlost vzniku akceptoru A (Chmelinová 2012).

Toto elektrické působení je dynamický jev, který se v čase kontinuálně mění. Z toho vyplývá, že výsledná změna Gibbsovy energie ΔG^{el} je časově závislá na množství zredukovaného akceptoru A s nábojem Q :

$$\Delta G^{el} = \Delta G^0 + \frac{qQA(t)}{4\pi\epsilon r}, \quad (14)$$

kde ΔG^0 je původní změna Gibbsovy energie bez ovlivnění elektrickým polem, q je jednotkový náboj elektronu přenášeného z donoru elektronu D , Q je jednotkový náboj na akceptoru elektronu A , $A(t)$ je relativní časově proměnné (podle diferenciálních

rovnice z modelu) množství již zredukovaného akceptoru (v intervalu 0 – 1), r je vzdálenost mezi donorem D a akceptorem A, což v modelu znázorňuje vzdálenost mezi jednotlivými přenašeči v PSII v dané reakci a ϵ je absolutní permitivita prostředí ($\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$, hodnoty ϵ_r jsou uvedeny v tabulce 1). Takto nadefinované působení elektrického pole na změnu Gibbsovy energie je chápáno jako první přiblížení skutečnosti z důvodu jednoduchosti výpočtů.

Tabulka č. 1.: Hodnoty relativní permitivity pro PSII.

	ϵ_r *
OEC-Y_z	7,4
Y_z-P₆₈₀	4,7
P₆₈₀-Pheo	3
Pheo-Q_A	3
Q_A-Q_B	4

* hodnoty jsou průměrné hodnoty z literatury (Chamorro 2005, 2007)

V druhém přiblížení uvažujeme, že je hypoteticky možné přenášet i pouze část jednotkového náboje (dáno součinem $q \times D(t)$, kde $D(t)$ je relativní časově proměnné (podle diferenciálních rovnic z modelu) množství donoru elektronu (v intervalu 0 – 1)) a tedy ΔG^{el} je časově závislá na změně množství donoru D a současně i na změně množství zredukovaného akceptoru A nábojem Q:

$$\Delta G^{el} = \Delta G^0 + \frac{qD(t)QA(t)}{4\pi\epsilon r}, \quad (15)$$

kde význam značení je stejný jako v rovnici 14.

3. CÍLE PRÁCE

Na základě faktu, že teplotní fáze fluorescenčního indukčního jevu by mohla souviset s elektrickým polem vytvořeným okolo přenašečů elektronů v PSII (viz kapitola 2.2.), cílem práce je pomocí matematických simulací prověřit, zda-li tato elektrická pole samotná mohou ovlivnit tvar křivky fluorescenčního indukčního jevu. Ve vylepšeném původním modelu Dušana Lazára z roku 2003 publikovaném v článku (Lazár 2013) popisující přenos elektronů v PSII a okolo něj, na rozdíl od bakalářské práce, nejsou použité hodnoty rychlostních konstant známé z literatury, ale jejich hodnoty jsou vypočtené na základě Marcusovy teorie. K určení hodnot rychlostních konstant bylo zapotřebí změřit vzdálenosti přenašečů „edge to edge“ za pomoci publikovaných struktur a užitím speciálního software. Dále bylo potřeba z literatury určit velikosti změny Gibbsovy energie mezi jednotlivými přenašeči. Model byl následně rozšířený o vliv elektrického náboje na přenašečích elektronů, který má vliv na velikost rychlostních konstant přenosu elektronů a byl nasimulován fluorescenční indukční jev. Výsledky simulace jsou diskutovány a porovnány s experimentálně naměřenými křivkami.

4. SOFTWARE PRO SIMULACI

Průběh fluorescenčního signálu FLR je simulovaný pomocí programu Gepasi verze 3.21 (P. Mendes, The University of Wales, Aberystwyth, U.K.), který byl navržen pro simulaci chemických a biochemických kinetik. Gepasi používá pro integraci soustavy řádných diferenciálních rovnic (Ordinary Differential Equation (ODE)) proceduru LSODA, což je jedna z verzí procedury LSODE (Livermore Solver of Ordinary Differential Equations). LSODA je sofistikovaný algoritmus, který měří tuhost soustavy ODE a mění integrační metodu dynamicky podle míry tuhosti. Adamsova metoda s proměnným krokem a proměnným řádem až do 12. řádu se používá pro netuhé oblasti. Pro tuhé oblasti se používá Gearova nebo BDF metoda s proměnným krokem a s proměnným řádem až do 5. řádu. (Lazár 2003).

Vizualizace FLR křivek je následně provedena pomocí programu Matlab 6.5.1. (MathLab. INC. Natick, USA). Tento program se využívá zejména pro matematické výpočty, vykreslení funkcí a dat, implementaci algoritmů a také jako programovací jazyk.

5. MODELOVÁNÍ

Žádný dokonalý model nemůže existovat, neboť simulací vždy aproximujeme jen úsek reality. Simulace tak plní roli ukazatele, jak se stavové proměnné (= modelové formy) mění v závislosti na změnách parametrů modelu. Právě tato závislost pak napomáhá experimentátorovi určit, které z parametrů jsou důležité a které parametry naopak důležité nejsou. Kvalitativní shoda, v biologických systémech, mezi experimentem a modelem, je pak dostačujícím cílem modelování.

Existují dvě možnosti modelování, a to fitování a simulace.

A) Fitování

Při fitování matematická rutina hledá hodnoty parametrů modelu za účelem dostat co nejlepší shody mezi experimentálními a modelovanými křivkami. Tyto matematické metody pro shodu automaticky fitují (napasovávají) vybrané parametry modelu, a to je slabé místo způsobu tohoto modelování. Problémem totiž je, že existuje více teoretických řešení, protože změna hodnoty jednoho parametru v modelu může být nahrazena změnou hodnoty parametru jiného, aniž by se ztratila „shoda“ mezi teorií a experimentem, čímž je správnost takto získaných hodnot parametrů modelu zpochybněna (Lazár 2009).

B) Simulace

Simulace, na rozdíl od fitování, používá předdefinované hodnoty parametrů modelu na základě literatury. Simulovaná křivka se pak porovnává s daty získanými experimentálně při stejných počátečních podmínkách. Mezi simulací a experimentem nemůžeme nikdy dosáhnout absolutní shody. Velkou výhodou však je, že nám simulace dává možnost nalezení parametrů modelu ovlivňující vybranou vlastnost simulované křivky (Lazár 2009).

5. 1. Modely FLR

Křivka O-J-I-P je převážně modelovaná na základě modelů popisující přenos elektronů pouze v PSII a PQ poolu. Fluorescenční měření na intaktních systémech ukazuje i podíl přenosu elektronů za PSII na FLR (Lazár 2009). Podle literatury se na jednotlivých fázích FLR podílí mnoho procesů. Převládá však názor, že variabilní fluorescence pochází pouze z PSII. Dogmaticky se tvrdí, že PSI nevytváří variabilní

fluorescenci, a tedy, že PSI přispívá do FLR pouze v čase neměnnou konstantní (nevariabilní) hodnotu fluorescence, čili přispívá k minimální fluorescenci F_0 (Lazár 2013).

Pro popis funkce PSII byly navrženy tři modely, které popisují vždy určitou část elektronového přenosu:

A) Kokův model (Kok 1970)

Kokův model byl navržen pro popis funkce donorové strany PSII. Představuje donaci 4 elektronů z OEC při cyklické a postupné oxidaci jeho manganového klastru přes stavy značené jako S_0 , S_1 , S_2 a S_3 zpět na S_0 , kde dolní index značí oxidační stav manganového klastru OEC. Při přechodu ze stavu S_3 na S_0 dochází k vývoji kyslíku.

B) Model dvouelektronové brány (Bouges-Bocquet 1973)

Model dvouelektronové brány (two-electron gate, TEG) představuje přenos na akceptorové straně PSII. Znázorňuje tedy přenos elektronů z Q_A na Q_B a zároveň bere v úvahu, že Q_B je dvouelektronový přenašeč na rozdíl od Q_A . Tento model se využívá převážně při simulaci křivky FLR měřené v tylakoidních membránách při osvětlení nízkou intenzitou excitovaného světla charakterizované kroky O-I-P, rozšířenější verze tohoto modelu se využívá k modelování kroků O-J-I-P (Lazár 2003).

C) Model reverzibilního radikálového páru (Breton 1983)

Model reverzibilního radikálového páru (RRP) popisuje užití energie vedoucí k primární fotochemii (oddělení nábojů, jejich rekombinaci a stabilizaci) v „otevřeném“ (Q_A) a „zavřeném“ (Q_A^-) PSII (Lazár 2003). Model tedy představuje přenos elektronů z P_{680} přes Pheo na Q_A . Model byl časem rozšířen, a to proto, že původně byl navržen pro simulaci poklesu fluorescence v pikosekundové a nanosekundové oblasti po tvorbě excitovaných stavů pomocí velmi krátkých laserových pulsů. Tím pádem neobsahoval o mnoho pomalejší redukci P_{680}^+ donorovou stranou PSII (Lazár 2009).

Nejčastěji se v literatuře FLR simuluje na základě vylepšeného TEG modelu (např. Lazár a kol. 1997), model RRP se používá pro simulaci FLR za přítomnosti 3-(3',4'-dichlorofenyl)-1,1-dimethylmočoviny (DCMU). DCMU je inhibitor přenosu elektronů z Q_A na Q_B , kdy se DCMU naváže do Q_B kapsy PSII a tím znemožní přenos elektronů z Q_A^- dále (Lazár a Pospíšil 1999).

5.2. Model Dušana Lazára z roku 2003

V roce 2003 byl publikován Dušanem Lazárem nový model pro simulaci FLR. Tento model spojil všechny tři výše uvedené modely (Kokův, TEG i RRP) a doplnil je o některé chybějící kroky (např. přenos elektronů spojený s Y_Z). Vychází pak z předpokladu, že FLR je pouze vlastností PSII, tedy popisuje pouze kroky přenosu elektronů v PSII, a tak se neberou v úvahu reakce popisující transport elektronů za PQ poolem.

Vlastnosti tohoto modelu jsou:

- (i) tvorba excitovaných stavů je popsána rychlostní konstantou k_L , která je úměrná intenzitě excitačního světla.
- (ii) deaktivace excitovaných stavů se děje pomocí nábojové separace mezi P_{680} a Pheo (jde o reakce s rychlostními konstantami k_1^o a k_1^c), nežádivé deaktivace ve světlosběrnéanténě (LHA, k_{HD}^{LHA}), zhášení excitovaných stavů pomocí P_{680}^+ (k_{HD}^P), zhášení excitovaných stavů pomocí oxidovaného plastochinonu z PQ pool (k_{HD}^{PQ}), pomocí přenosu excitační energie mezi uzavřeným a otevřeným RCII (k_{UU}) a přes emisi fluorescence (k_F).
- (iii) fluorescenční signál během FLR je definován jako zářivá deaktivace excitovaných stavů užitím rychlostní konstanty fluorescence k_F .
- (iv) v každém redoxním stavu Q_B (Q_B , Q_B^- , Q_B^{2-}) je primární fotochemie (oddělení náboje, rekombinace a stabilizace) popsána RRP modelem pro oba redoxní stavy Q_A , pro oxidované, tak i pro redukované (k_1^o , k_1^c , k_2^o , k_1^c , k_1^c , k_2^c).
- (v) když je Q_A v redukované formě, elektron je přenesen na Q_B ve smyslu TEG modelu, to znamená, že elektron je přenesen z Q_A^- na Q_B nebo na Q_B^- s různými rychlostními konstantami (k_{AB1} , k_{BA1} , k_{AB2} , k_{BA2}).
- (vi) když je Q_B dvojnásobně redukovaný (implicitně se předpokládá okamžitá protonace), je vyměněný za molekulu PQ z PQ poolu ($k_{(PQ/B)ex}$, $k_{(B/PQ)ex}$).
- (vii) když je P_{680} oxidovaný oddělením náboje při nábojové separaci, je redukovaný elektronem z Y_Z (k_{Pred} , k_{Pox}).
- (viii) když je Y_Z oxidovaný, redukce Y_Z^+ je popsána Kokovým modelem pro funkci OEC (k_{01} , k_{12} , k_{23} , k_{30}).
- (ix) rekombinace nábojů mezi P_{680}^+ a Q_A^- ($k_{(P/A)rec}$).

Obecně lze říci, že v modelu Lazára (2003) se uvažují pouze ty reakce, které mají časovou konstantu menší než 1 sekunda, což je přibližně doba, po kterou se detekuje FLR. Reakce a jejich rychlostní konstanty uvedené v tomto modelu jsou obecně přijaté v literatuře (Lazár 2003).

V PSII se ale realizují i reakce a využívají přenašeče elektronů, které nejsou v modelu zahrnuty. Jsou to například tyto přenašeče či reakce:

- (i) Y_D (tyrosin 160, nacházející se v proteinu D_2 v PSII) – ten není zapojen do přenosu elektronů přes PSII.
- (ii) Fe^{2+} nacházející se mezi Q_A a Q_B – jeho účinek na kinetiku přenosu elektronů není v literatuře dosud popsán.
- (iii) cytochrom b_{559} – ten se na přenosu elektronů v PSII podílí, ale jen za stresových podmínek (např. při fotoinhibici), ale v tomto případě je časová konstanta této reakce větší než 1 s.
- (iv) kroky spojené s protonací redukovaného Q_B a záměny Q_B^{2-} s PQ z PQ poolu – ty se v literatuře neshodují.
- (v) nábojová rekombinace mezi kladnými náboji uloženými na donorové straně PSII a zápornými náboji uloženými na akceptorové straně PSII – jejich časové konstanty jsou větší než 1s.
- (vi) zhášení excitovaných stavů v RC pomocí jeho dvou β -karotenů – za fyziologických podmínek (nestresové podmínky) mají tyto reakce nízký výtěžek.
- (vii) anihilace excitovaných stavů – je zde nutná velmi vysoká intenzita světla (například laserové impulsy) z důvodů, aby byla dostatečná hustota excitovaných stavů, to ale není případ měření FLR (Lazár 2003).

Relativní počáteční množství dané modelové formy v modelu a hodnoty rychlostních konstant jednotlivých reakcí jsou vstupními parametry pro jednotlivé simulace. Relativní počáteční množství konkrétní modelové formy i rychlostní konstanty jsou známé z literatury (viz. Lazár 2003 a Chmelinová 2012).

5.3. Vylepšený model Dušana Lazára 2013

Lazár a Jablonský v roce 2009 ukázali, že různé přístupy/předpoklady použité při formulaci kinetiky v modelu PSII vedou k rozdílným simulovaným FLR křivkám.

Původní model Lazára z roku 2003, popisující reakce elektronového transportu vyskytujícího se v PSII a sloužící tak k simulacím FLR pocházejícího z PSII, byl sestaven na základě určitých předpokladů, které podle Lazára a Jablonského (Lazár a Jablonský 2009) můžou mít vliv na tvar a velikost simulovaného FLR. Proto, aby byl model přesnější, bylo potřeba ho vylepšit. To znamená, že je potřeba jisté reakce naformulovat trochu jinak – lépe. Tedy jednodušeji řečeno, zlepšení u modelu znamená, že jisté reakce byly formulované jinak ve vylepšeném modelu z roku 2013, než jak byly naformulované v původním modelu z roku 2003.

Rozdíl ve vylepšeném modelu z roku 2013 jsou:

- i) Namísto jedné reakce druhého řádu použité pro popis Q_B^{2-}/PQ výměny v PSII modelu z roku 2003 se ve vylepšeném PSII modelu z roku 2013 pro tuto výměnu používají dvě následné reakce: v první reakci protonované Q_B^{2-} (Q_BH_2) je uvolněno do tylakoidní membrány a stává se tak plastochinonovou molekulou (PQH_2). Výsledkem reakce je, že Q_B kapsa je prázdná. V následující reakci se plastochinonová molekula z PQ poolu naváže do prázdné Q_B kapsy v PSII a stává se tak Q_B z PSII (Lazár 2013).
- ii) Kyslík vyvíjející komplex (OEC) a tyrosin (Y_Z) jsou vázány na PSII, což znamená, že můžeme použít kinetiku prvního řádu namísto kinetiky druhého řádu pro popis elektronového transportu mezi OEC a Y_Z a mezi Y_Z a P_{680} . To však vede k obrovskému nárůstu počtu modelových forem (stavové veličiny), protože je třeba vzít v úvahu všechny možné kombinace všech redoxních stavů elektronových přenašečů v PSII. To má za následek 386 redoxních forem modelu – obyčejných diferenciálních rovnic (Lazár 2013).

Počáteční podmínky jakožto i hodnoty rychlostních konstant jsou stejné jak ve vylepšeném modelu z roku 2013 tak v původním modelu z roku 2003 (viz Lazár 2003, Chmelinová 2012). Výjimku tvoří rychlostní konstanty pro popis reakce Q_B^{2-}/PQ výměny. V případě původního modelu šlo o jednu reakci druhého řádu, dopřednou a zpětnou, konstanty pak byly definované jako: $k_{\text{exch}}^f = 250 \text{ s}^{-1}$ a $k_{\text{exch}}^b = 250 \text{ s}^{-1}$. Ve vylepšeném modelu je výměna popsána dvěma po sobě následnými reakcemi (vyvážení Q_B^{2-} za vzniku volného místa v Q_B kapse a navázání PQ molekuly z poolu do tohoto

volného místa) s dopřednými a zpětnými rychlostními konstantami: $k_{\text{unbind}}^f = k_{\text{bind}}^f = 500 \text{ s}^{-1}$ a $k_{\text{unbind}}^b = k_{\text{bind}}^b = 500 \text{ s}^{-1}$ (Lazár 2013).

Dvojnásobné zvýšení hodnot rychlostních konstant v druhém přístupu je proto, že dvě následné reakce musí po sobě postupovat s dvojnásobnou rychlostí ve srovnání s případem, kdy výměna je popsána pouze jednou reakcí druhého řádu (Lazár a Jablonský 2009).

5. 4. Rozšíření PSII modelu z roku 2013

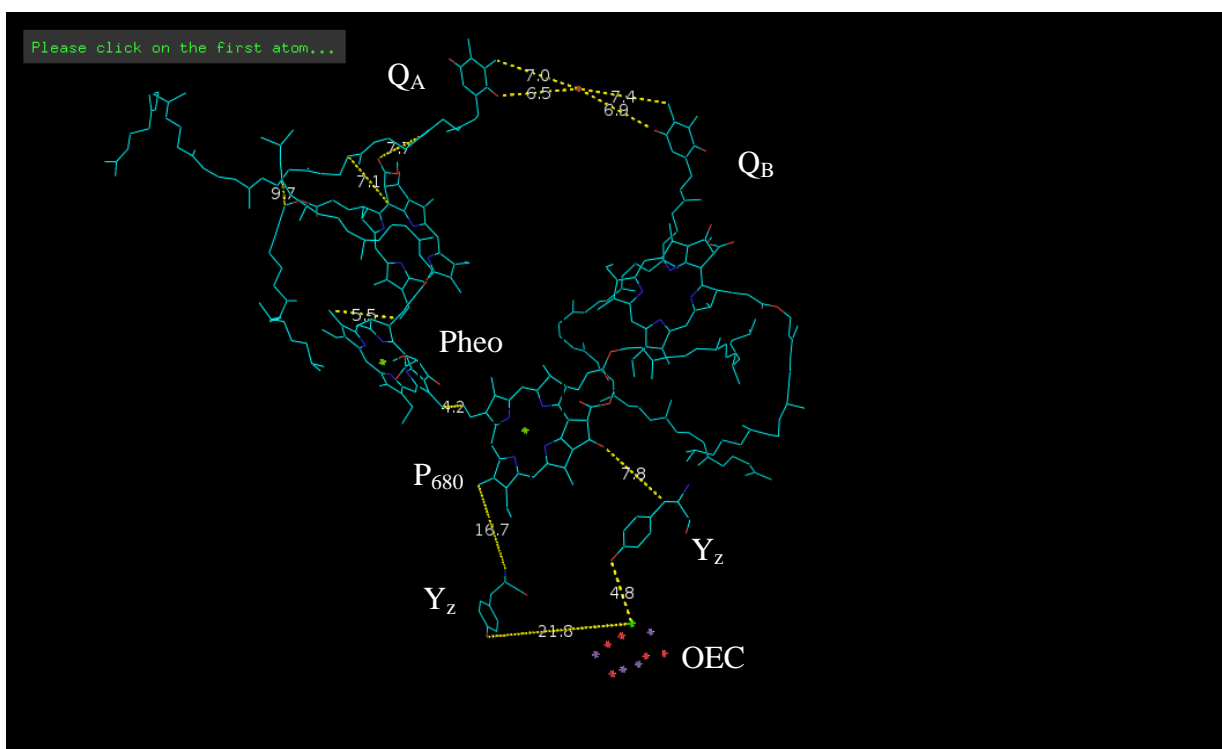
V bakalářské práci jsme si dali za úkol zjistit, zda elektrické pole, které je vytvářeno vznikem aniontů a kationtů přenašečů elektronů v PSII v důsledku fotosyntetického přenosu elektronů, může mít vliv na tvar simulované křivky FLR (Chmelinová 2012). V této bakalářské práci nám pak nasimulované křivky jasně ukázaly, že vliv elektrického pole na jednotlivých přenašečích elektronů není zanedbatelný, jak se do té doby myslelo. Proto jsme se rozhodli v tomto tématu pokračovat s pozměněným, exaktnějším přístupem. Dalším důvodem pro toto studium byl i možný vliv lokálních elektrických polí na tvar křivky fluorescenční indukce, jak je popsáno v kapitole 2.2.

Zatímco v bakalářské práci jsme využívali hodnoty rychlostních konstant známé z literatury, v diplomové práci hodnoty těchto rychlostních konstant počítáme z Marcusovy teorie pro rychlost přenosu elektronu, která je vhodná pro popis přenosu elektronů ve fotosyntéze. Nemusíme tak vycházet z hodnot rychlostních konstant, které jsou známé z literatury a které byly mnohdy zjištěné pro různé experimentální podmínky.

5. 4. 1. Optimalizovaný přenos elektronu

Nejjednodušší přístup pro výpočet rychlostní konstanty přenosu elektronu je uveden v rovnici (10). Pro výpočet dekadické hodnoty rychlostní konstanty máme v rovnici tři neznámé a to: vzdálenost (r), „řídící sílu“ (ΔG^0) a reorganizační energii (λ). Jak bylo řečeno výše, pokud se $\Delta G^0 = -\lambda$, pak se jedná o tzv. optimalizovaný přenos elektronu (vzhledem k jeho rychlosti), kde určujícím faktorem pro rychlost přenosu elektronu je vzdálenost mezi akceptorem elektronu a jeho donorem. V literatuře jsou

tyto vzdálenosti měřeny vždy „od středu po střed“ („center to center“), tedy od středu donoru elektronů ke středu akceptoru elektronů. Protože je však přenášený elektron na molekule delokalizovaný (Vodrážka 2002), je relevantní ve výpočtu použít vždy nejkratší vzdálenost mezi přenašeči. Je tedy potřeba zjistit vzdálenost „od hrany ke hraně“ („edge to edge“). Abychom mohli tuto vzdálenost proměřit, využili jsme proteinovou databázi PDB (Protein Data Bank). V databázi je zapotřebí zvolit co nejvhodnější rentgenovou strukturu PSII s co nejlepším rozlišením a co nejnovější. My jsme zvolili strukturu od Umeny a kolektivu z roku 2011 s rozlišením 1,9 Å (v PDB má tato struktura kód 3ARC). Námi zvolenou strukturu jsme analyzovali pomocí softwaru PyMol (vytvořen Warrenem L. Delano a distribuováno Delano Scientific LLC). Jde o software určený pro molekulární vizualizaci. Z celé struktury vyselektujeme jen přenašeče elektronů a změříme nejkratší vzdálenosti, viz obrázek 2.



Obrázek 2. Změřené vzdálenosti mezi jednotlivými přenašeči.

Müh a kolektiv v roce 2012 publikovali „edge to edge“ vzdálenosti přenašečů v PSII. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2 a nám slouží pouze jako hodnoty srovnávací s hodnotami námi naměřenými. Porovnáním pak můžeme prohlásit, že námi naměřené hodnoty jsou shodné a tak je možné je použít pro výpočet rychlostních konstant.

Tabulka 2. Přehled vzdáleností mezi přenašeči elektronů v PSII.

	vzdálenost z literatury [Å] (centre to centre)*	vzdálenost z literatury [Å] (edge to edge)**	vzdálenost naměřená [Å] (edge to edge)***
OEC-Y _z	5,4	4,8	4,8
Y _z -P ₆₈₀	12,4	9,5	7,8
P ₆₈₀ -Pheo	18	5	5,5
Pheo-Q _A	12	8,4	7,1
Q _A -Q _B	18,7	13,4	13,4

*průměrné hodnoty z literatury (Zouni a kol. 2001, Ferreira a kol. 2004), nepřesnost v určení ± 1 Å

**převzato z Müh a kolektiv (2012), nepřesnost v určení ± 1 Å

***hodnoty vzdálenosti námi určené

Jak bylo řečeno dříve, pro výpočet dopředných rychlostních konstant optimalizovaného stavu je zapotřebí určit vzdálenosti přenosu, pro hodnoty rychlostních konstant zpětných je zapotřebí znát hodnoty změny Gibbsovy energie mezi přenašeči. Tyto hodnoty přebíráme z literatury a to od Grabolle a Daua (2005) pro akceptorovou stranu PSII a od od Grabolle a Daua (2007) pro stranu donorovou. Tyto hodnoty jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3. Hodnoty rozdílu středních redoxních potenciálu mezi přenašeči a od nich odvozená změna Gibbsovy energie.

Přenos	$\Delta E_{1/2}$ (V)	ΔG (eV)
OEC → Y _z	-0,1	-0,1*
Y _z → P ₆₈₀	-0,03	-0,03*
P ₆₈₀ * → Pheo	-0,1	-0,1**
Pheo ⁻ → Q _A	-0,47	-0,47**
Q _A ⁻ → Q _B	-0,1	-0,1**
Q _A ⁻ → Q _B ⁻	-0,1	-0,1**

* hodnoty převzaté z Grabolle a Dau (2007)

**hodnoty převzané z Grabolle a Dau (2005)

Grabolle a Dau (2005) se rozhodli experimentálně stanovit velikost změny volných energií ΔG na základě rovnovážných konstant. Přímé stanovení redoxních potenciálů titrací nelze dosáhnout, protože vystavení proteinu potenciálu okolo 1V je výsledkem mnoha ničivých vedlejších reakcí. Kromě toho časově závislé „pracovní potenciály“ mohou být významné tak, že redoxní potenciál stanovený právě titrací nemusí být dostatečný pro diskuzi (Grabolle a Dau 2005). Experimentálně určené

změny volné energie ΔG pak odpovídají rozdílu středních redoxních potenciálů $\Delta E_{1/2}$ podle vztahu:

$$q\Delta E_{1/2} = \Delta G, \quad (16)$$

kde q představuje elementární náboj (Grabolle a Dau 2005).

Do rovnice (10) upravené pro optimalizovaný přenos dosadíme hodnoty vzdáleností přenašečů elektronů z tabulky 2 a vypočítáme tak dopředné rychlostní konstanty pro donorovou a akceptorovou stranu pro optimalizovaný přenos. Do rovnice (11) dosadíme námi vypočítané dopředné rychlostní konstanty a hodnoty změn Gibbsových energií pro přenosy elektronů mezi jednotlivými přenašeči a vypočteme tak zpětné rychlostní konstanty. Přehled takto získaných rychlostních konstant je uveden v tabulce 4, kde pro porovnání jsou uvedené i hodnoty těchto rychlostních konstant podle literatury reprezentované sadou hodnot jak byly použité v práci Lazár (2003).

Tabulka 4. Přehled rychlostních konstant pro optimalizovaný přenos elektronu a hodnot těchto konstant užitých v Lazár (2003).

Přenos	k_+ [s^{-1}]	k_- [s^{-1}]	k_+^* [s^{-1}]	k_-^* [s^{-1}]
$P_{680}^* \rightarrow \text{Pheo}$	5×10^{11}	$1,02 \times 10^{10}$	3×10^9	3×10^8
$\text{Pheo}^- \rightarrow Q_A$	$5,5 \times 10^{10}$	$6,25 \times 10^2$	$2,3 \times 10^9$	0
$Q_A^- \rightarrow Q_B$	$9,12 \times 10^6$	$1,86 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	$1,75 \times 10^2$
$Q_A^- \rightarrow Q_B^-$	$9,12 \times 10^6$	$1,86 \times 10^5$	$1,75 \times 10^3$	$3,5 \times 10^1$
$Y_z \rightarrow P_{680}$	2×10^{10}	$6,23 \times 10^9$	5×10^7	$1,7 \times 10^6$
$\text{OEC} \rightarrow Y_z$	$1,32 \times 10^{12}$	$1,23 \times 10^{10}$	2×10^4	0

k_+ dopředná rychlostní konstanta

k_- zpětná rychlostní konstanta

* hodnoty z literatury (Lazár 2003)

Z tabulky 4 plyne, že hodnoty rychlostních konstant pro optimalizovaný přenos jsou vždy větší než hodnoty známé z literatury, kde největšího rozdílu (o 8 řádů !) je dosaženo pro rychlostní konstantu přenosu elektronu z OEC na Y_z . Vzhledem k velké rozdílnosti hodnot všech rychlostních konstant (optimalizovaný přenos \times hodnoty z literatury) lze pak očekávat, že křivky fluorescenční indukce simulované pro hodnoty rychlostních konstant pro optimalizovaný přenos a podle literatury budou vykazovat jiné tvary.

5. 4. 2. Neoptimalizovaný přenos elektronu

Podle Marcusovy teorie jsou pro výpočet rychlostních konstant neoptimalizovaného přenosu elektronu určující tři proměnné a to vzdálenost r , změna Gibbsovy energie ΔG a reorganizační energie λ . Pro výpočet dopředných rychlostních konstant využíváme opět rovnici (10) a do ní dosazujeme hodnoty vzdáleností z tabulky 2 a hodnoty ΔG uvedené v tabulce 3. Za reorganizační energii λ dosazujeme hodnoty v intervalu 0,7 – 1,1 eV. Tento interval byl vybrán proto, že, jak již bylo zmíněno dříve, typická hodnota reorganizační energie je $0,9 \pm 0,2$ eV (Page a kol. 2003). Zpětné rychlostní konstanty jsou počítané ze vztahu (11). Výsledné hodnoty takto získaných rychlostních konstant jsou uvedené v tabulce 5. Značení rychlostních konstant zachováváme v této práci takové, jako bylo použito v práci Lazár (2003) a následně bylo odcitováno v bakalářské práci (Chmelinová 2012) a to proto, že zbylé konstanty zachováváme neměnné jako v těchto pracích a zde je necitujeme.

Tabulka 5. Dopředné a zpětné rychlostní konstanty (obě mají rozměr s^{-1}) pro neoptimalizovaný přenos elektronu pro reorganizační energii λ v intervalu 0,7 – 1,1 eV.

přenos		$\lambda=0,7$	$\lambda=0,8$	$\lambda=0,9$	$\lambda=1,0$	$\lambda=1,1$
$P_{680}^* \rightarrow \text{Pheo}$	k_1^0	$1,28 \times 10^{10}$	$6,33 \times 10^9$	$3,13 \times 10^9$	$1,55 \times 10^9$	$7,62 \times 10^8$
	k_{-1}^0	$2,61 \times 10^8$	$1,29 \times 10^8$	$6,38 \times 10^7$	$3,16 \times 10^7$	$1,55 \times 10^7$
$\text{Pheo}^- \rightarrow Q_A$	k_1^c	$3,2 \times 10^{10}$	$2,08 \times 10^{10}$	$1,27 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^9$	$4,18 \times 10^9$
	k_{-1}^c	$3,63 \times 10^2$	$2,36 \times 10^2$	$1,44 \times 10^2$	$0,83 \times 10^2$	$0,47 \times 10^2$
$Q_A^- \rightarrow Q_B$	k_{AB1}	$2,32 \times 10^5$	$1,15 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$1,39 \times 10^4$
	k_{BA1}	$4,73 \times 10^3$	$2,35 \times 10^3$	$1,16 \times 10^3$	$5,73 \times 10^2$	$2,83 \times 10^2$
$Q_A^- \rightarrow Q_B^-$	k_{AB2}	$2,32 \times 10^5$	$1,15 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$1,39 \times 10^4$
	k_{BA2}	$4,73 \times 10^3$	$2,35 \times 10^3$	$1,16 \times 10^3$	$5,73 \times 10^2$	$2,83 \times 10^2$
$Y_z \rightarrow P_{680}$	k_{Pred}	$2,15 \times 10^8$	$1,05 \times 10^8$	$5,16 \times 10^7$	$2,53 \times 10^7$	$1,24 \times 10^7$
	$k_{P_{0 \times}}$	$6,7 \times 10^7$	$3,27 \times 10^7$	$1,61 \times 10^7$	$7,89 \times 10^6$	$3,86 \times 10^6$
$\text{OEC} \rightarrow Y_z$	$k_{e.d.}$	$4,26 \times 10^{10}$	$2,13 \times 10^{10}$	$1,06 \times 10^{10}$	$5,24 \times 10^9$	$2,59 \times 10^9$
	$k_{-e.d.}$	$3,98 \times 10^8$	2×10^8	$9,9 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$	$2,42 \times 10^7$

Porovnáním hodnot rychlostních konstant z tabulek 5 a 4 je patrné, že pokud není přenos elektronu optimalizovaný (tabulka 5), logicky dojde ke snížení rychlosti přenosu elektronu. Toto snížení je největší (o 3 řády) pro přenos z OEC na Y_z , z Y_z na P_{680} a také pro nábojovou separaci. Naopak rychlostní konstanty pro stabilizaci se téměř nemění v závislosti na tom, je-li přenos elektronu optimalizovaný, či ne.

5. 4. 3. Rozšíření o vliv elektrického pole

Přestože jsme oproti bakalářské práci změnili přístup k zjištění hodnot rychlostních konstant, rozšíření o vliv elektrického pole má stejný princip.

Pro rychlostní konstantu dopředné reakce $k^{Q(t)}$ bude pak platit upravený vztah (10), který lze přepsat následovně:

$$k^{Q(t)} = 10^{(15-0,6r-\frac{3,1(\Delta G+\lambda)^2}{\lambda})}. \quad (17)$$

Po dosazení rovnice (14) do rovnice (17) dostaneme:

$$k^{Q(t)} = 10^{(15-0,6r-\frac{3,1((\Delta G^0+\frac{qQA(t)}{4\pi\epsilon r})+\lambda)^2}{\lambda})}. \quad (18)$$

Změna rychlostní konstanty dopředné reakce popsané v rovnici (18) je použita pro první část modelování ve vylepšeném modelu, kde se předpokládá vliv elektrického pole pouze na dopředné rychlostní konstanty u přenosu elektronu v PSII.

Pro druhou část modelování se použil vztah (17) a do něj dosazená rovnice (15). Pak dopředná rychlostní konstanta se vypočítá ze vztahu:

$$k^{Q(t)} = 10^{(15-0,6r-\frac{3,1((\Delta G^0+\frac{qD(t)QA(t)}{4\pi\epsilon r})+\lambda)^2}{\lambda})}. \quad (19).$$

Rychlostní konstanta pro zpětný přenos se počítá z rovnice (11), ale za ΔG^0 se dosazuje vliv elektrického pole vyjádřený podle rovnic (14) a (15), což vede k

$$k_{-}^{Q(t)} = \frac{k_{+}^{Q(t)}}{e^{-\frac{qQD(t)}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T} + \Delta G^0}}, \quad (20)$$

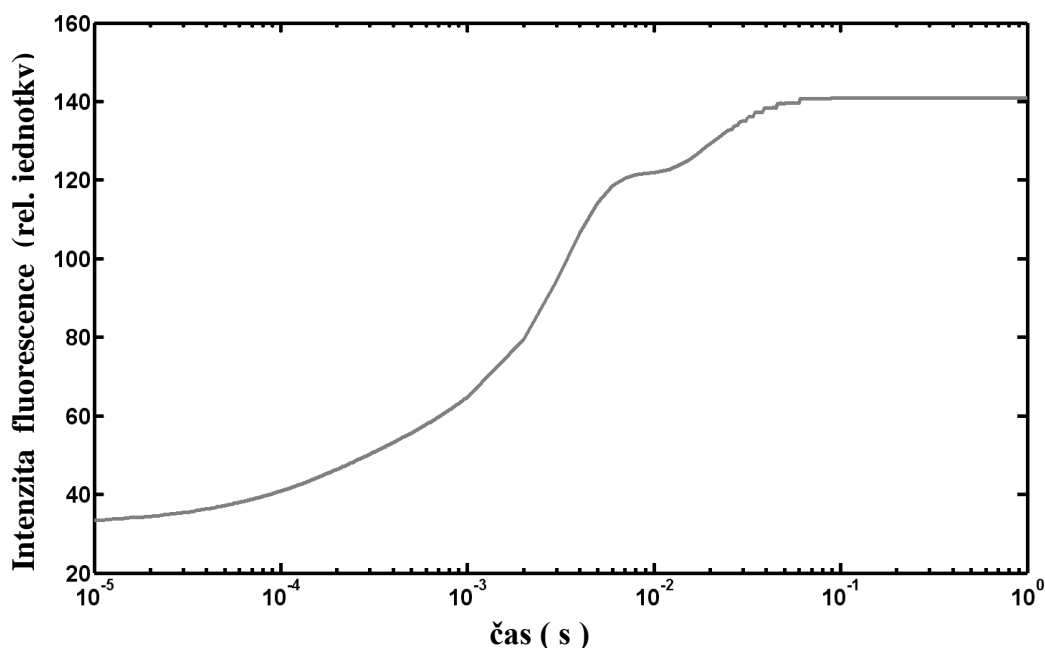
respektive k

$$k_{-}^{Q(t)} = \frac{k_{+}^{Q(t)}}{e^{-\frac{qD(t)QA(t)}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T} + \Delta G^0}}. \quad (21)$$

6. Výsledky a diskuze

6.1. Vylepšený model Dušana Lazára z roku 2013

Protože použitý model D. Lazára z roku 2003 zahrnuje „pomalé“ přenosy (přechody mezi S-stavy v OEC, rekombinace elektronů mezi P_{680}^+ a Q_A^- , přenos elektronů z Q_A^- na Q_B , výměna Q_B^{2-} s PQ molekulou z PQ pool a oxidace/redukce redukováného/oxidovaného PQ poolu) i „rychlé“ přenosy elektronů (přenosy mezi Y_Z na P_{680} , nábojová separace, rekombinace a stabilizace) simulujeme křivku FLR v široké časové škále, což je od 1 ps do 1 s. Simulovat v široké časové škále můžeme také proto, že fluorescence během simulace FLR je definovaná jako zářivá deaktivace excitovaných stavů přes rychlostní konstantu fluorescence k_f ($6,7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, Chmelinová 2012). Protože současné fluorometry standardně detekují křivku FLR s časovým rozlišením ne menším než 10 μs , jsou naše simulace provedené v časové škále od 10 μs do 1 s.

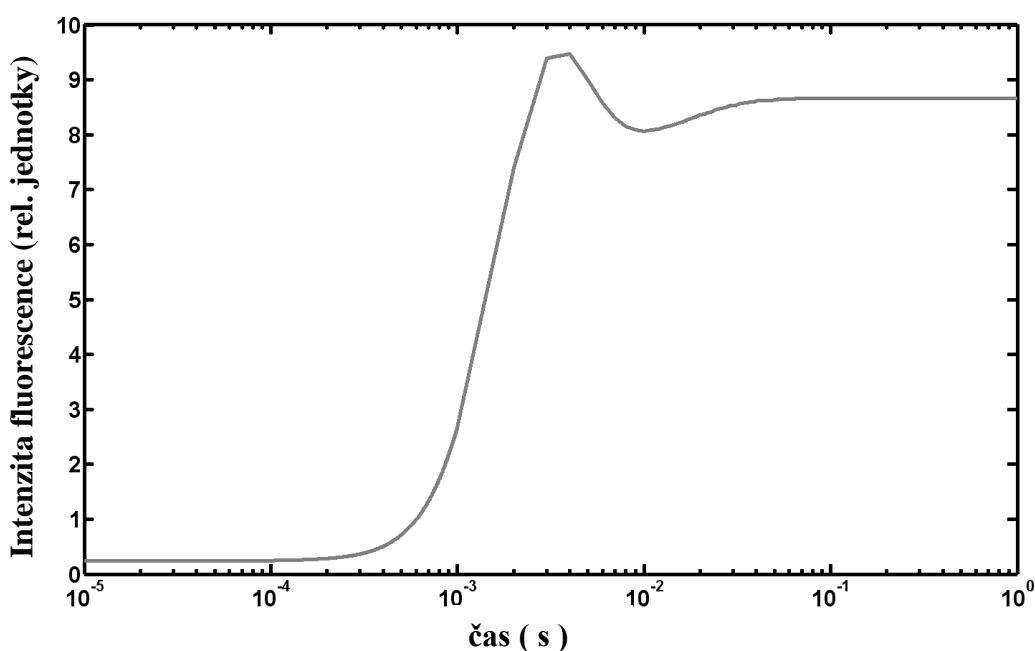


Obrázek 3. FLR simulovaná na základě vylepšeného PSII modelu Lazára z roku 2013, kde rychlostní konstanty mají hodnoty užití v Lazár (2003), viz tabulka 4. Osa x má logaritmické členění.

Na obrázku 3 je vizualizace FLR z vylepšeného PSII modelu Dušana Lazára 2013. Z počáteční hodnoty fluorescence (značená jako O), která představuje minimální fluorescenci F_0 pohybující se v čase okolo 60 μs , se signál zvedá k vlně, která je

experimentálně měřená jako vlna J, nacházející se v čase 2 ms. Fluorescenční signál pak strmě stoupá a dosahuje lokálního maxima v čase 8 ms. Tato vlna se svojí pozicí přibližuje experimentálně naměřené vlně J. Po dosažení lokálního maxima fluorescenční signál udržuje svoji hodnotu do času 10 ms a poté signál pozvolně roste do svého globálního maxima, které je dosaženo v čase okolo 80 ms, což přibližně souhlasí s pozicí experimentálně měřené vlny I. Model nenasimuloval experimentálně měřený nárůst fluorescence z vlny I do maxima P. Tato neschopnost byla brána jako argument proto, že reakce v modelu jsou nedostatečné pro simulaci „správné“ FLR křivky (Chmelinová 2012). Proto je potřeba tento model ještě rozšířit i o jiné děje související s přenosem elektronu. Jedním z těchto dějů je právě vliv lokálních elektrických polí.

6.2. Optimalizovaný přenos elektronu



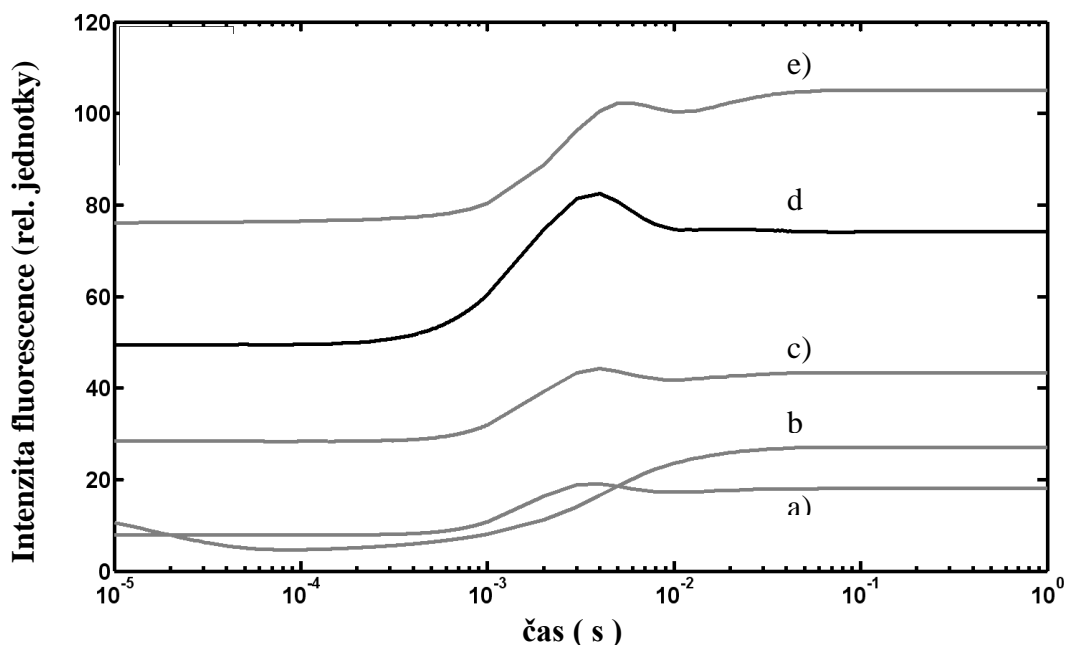
Obrázek 4. Křivky simulované FLR pro velikosti rychlostních konstant vypočítané z Marcusovy teorie pro optimalizovaný přenos elektronu (rovnice 10, kde $\Delta G_0 = -\lambda$, viz tabulka 4). Osa x má logaritmické členění.

Křivka uvedena na obrázku 4 je simulace křivky FLR, kdy jsou pozměněné pouze hodnoty rychlostních konstant. Tyto hodnoty byly vypočítané na základě Marcusovy teorie tunelového jevu pro optimalizovanou rychlost přenosu elektronu (rovnice 10, kde $\Delta G_0 = -\lambda$, viz tabulka 4), ostatní předpoklady jsou stejné jako u křivky zobrazené na obrázku 3. Počáteční hodnota fluorescenčního signálu (O) klesla.

Následuje strmý nárůst do globálního maxima okolo 4 ms, což odpovídá vlně J. Dále dochází k poklesu do lokálního minima v čase 10 ms (dip D) a opětovnému nárůstu do lokálního maxima okolo 50 ms, což přibližně odpovídá experimentálně naměřené vlně I. Celkově v celé naměřené křivce došlo k poklesu intenzity fluorescence při porovnání se simulací z obrázku 3.

Rozdíly mezi obrázky 3 a 4 je možné vysvětlit na základě údajů v tabulce 4, kde jsou uvedeny hodnoty rychlostních konstant námi vypočítané na základě Marcusovy teorie a k porovnání jsou uvedeny i hodnoty z literatury. Námi vypočítané hodnoty pro rychlostní konstanty pro optimalizovaný přenos jsou obecně jiné než ty, co se obvykle uvádějí v literatuře, a proto je průběh FLR obecně jiný. Protože, jak již bylo zmíněno dříve, rychlostní konstanty pro optimalizovaný přenos jsou obecně větší než rychlostní konstanty podle literatury, pak fluorescenční signál, definovaný jako deaktivace excitovaného stavu přes rychlostní konstantu fluorescence, je menší, protože díky zvýšeným hodnotám rychlosti přenosu elektronu pro optimalizovaný stav dochází k snížení akumulace excitovaných stavů a tudíž i k poklesu fluorescenčního signálu.

6.3. Neoptimalizovaný přenos elektronu

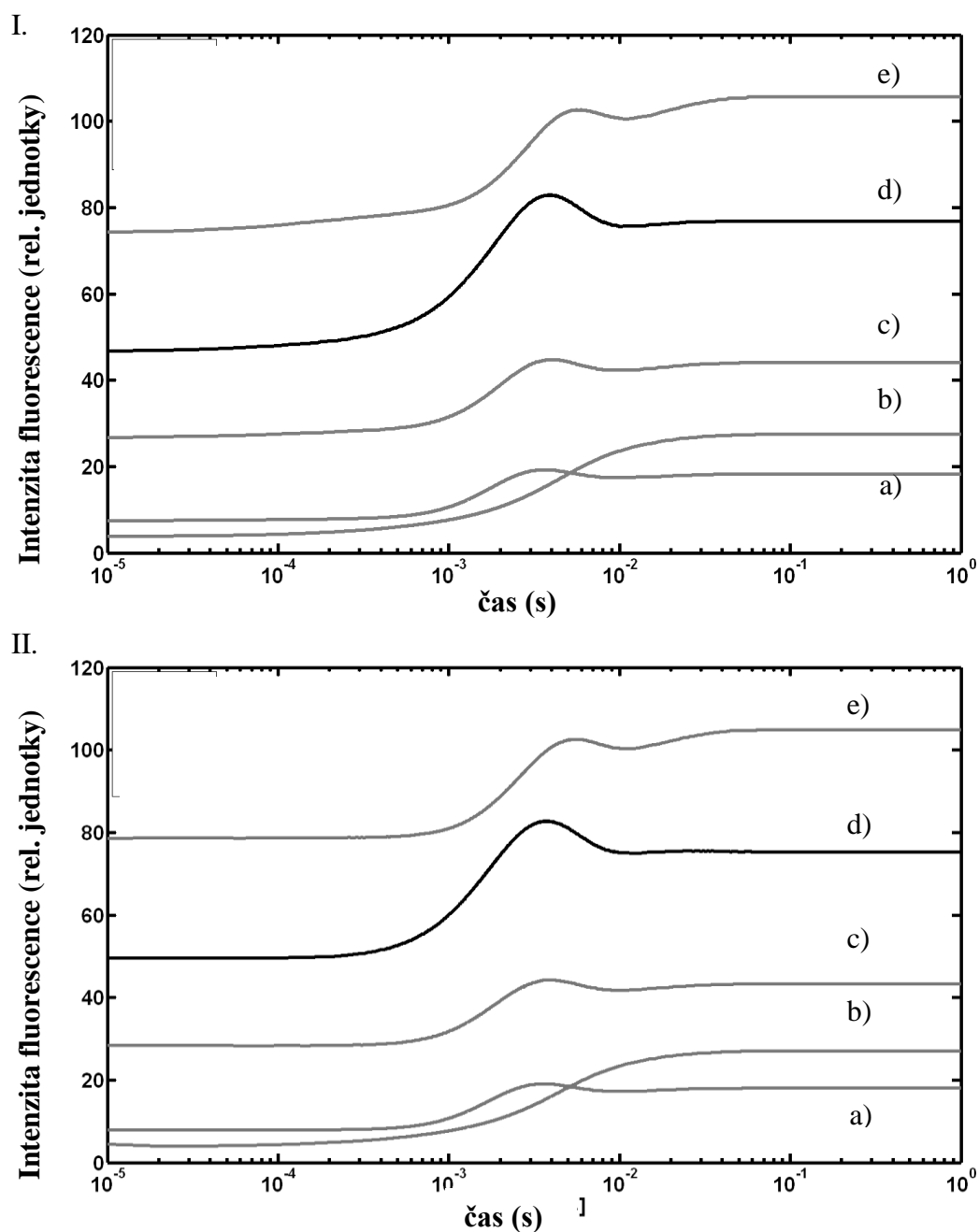


Obrázek 5. Křivky FLR simulované pro různé hodnoty reorganizační energie a) 0,7 eV, b) 0,8 eV, c) 0,9 eV, d) 1,0 eV, e) 1,1 eV, použité pro výpočet rychlostních konstant přenosu elektronu (rovnice 10, hodnoty rychlostních konstant z tabulky 5). Osa x má logaritmické členění.

Na obrázku 5 jsou vyobrazené křivky FLR, kde jsou pozměněny rychlostní konstanty. Ty byly vypočítané podle Marcusovy teorie pro neoptimalizovaný přenos (rovnice 10), kdy byly použity hodnoty uvedené v tabulce 5. I tyto hodnoty, jako u simulace pro optimalizovaný stav, jsou větší, než byly hodnoty použité z literatury, a to se projevilo na výsledné simulaci. S rostoucí hodnotou reorganizační energie klesají velikosti rychlostních konstant, což vede k nárůstu fluorescenčního signálu, protože dochází k zvýšení akumulace excitovaných stavů. Kromě křivky b) u všech křivek signál z počátku roste do lokálního maxima, které je dosaženo v časech kolem 5 – 7 ms, dosahuje svého lokálního maxima a pak signál klesá do lokálního minima okolo 10 ms. U křivky e) po minimum signál ještě jednou vzrostl do maxima, které bylo dosaženo okolo 80 ms. Křivka b) začíná poklesem intenzity do minima v čase okolo 100 μ s. Po minimum následuje pozvolný růst intenzity do maxima, které je dosaženo v čase okolo 50 ms.

Porovnáním křivek z obrázku 5 a křivky z obrázku 4 lze obecně říci, že tyto křivky jsou většinou velmi podobné (dosažení lokálního maxima v časech 4 – 7 ms, pokles signálu do minima v čase 10 ms, následný pozvolný nárůst signálu), což svědčí o faktu, že pro tvar křivky fluorescenční indukce nehraje velkou roli, zdali jsou rychlosti přenosu elektronů optimalizované nebo ne. Na druhé straně, křivky z obrázků 4 a 5 jsou výrazně jiné od křivky na obrázku 3. Tento rozdíl je, jak již bylo zmíněno dříve, způsobený výrazně odlišnými hodnotami rychlostních konstant. Otázkou pak zůstává, co je příčinou rozdílu hodnot experimentálně zjištěných rychlostních konstant a hodnot exaktně vypočítaných na základě uznávané teorie.

6.4. Vliv elektrického pole na dopředné rychlostní konstanty



Obrázek 6 . Křivky FLR simulované pro hodnoty dopředných rychlostních konstant (I.) podle rovnice (18) a (II.) podle rovnice (19). Zpětné rychlostní konstanty odpovídají hodnotám uvedené v tabulce 5. Simulace jsou provedeny pro různé hodnoty reorganizační energie a) 0,7 eV, b) 0,8 eV, c) 0,9 eV, d) 1,0 eV, e) 1,1 eV. Osa x má logaritmické členění.

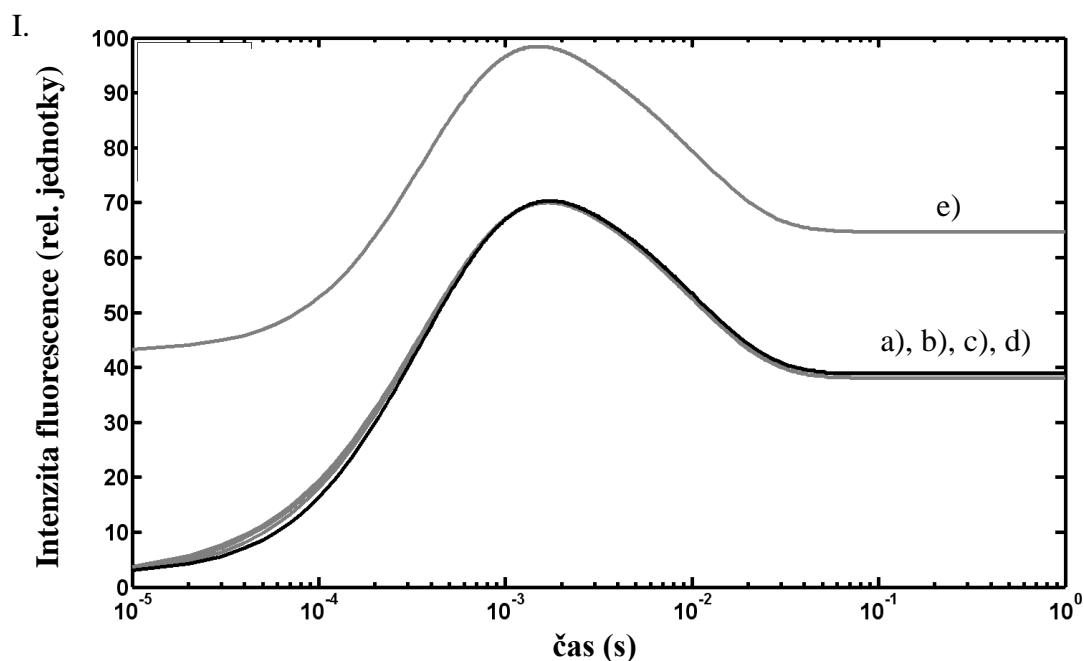
V modelu je více dopředných reakcí než zpětných a tak v diplomové práci uvažujeme nejdříve pro jednoduchost vliv elektrického pole pouze na náboj, který se přenáší v dopředné reakci. Výsledky těchto simulací jsou znázorněny na obrázku 6.

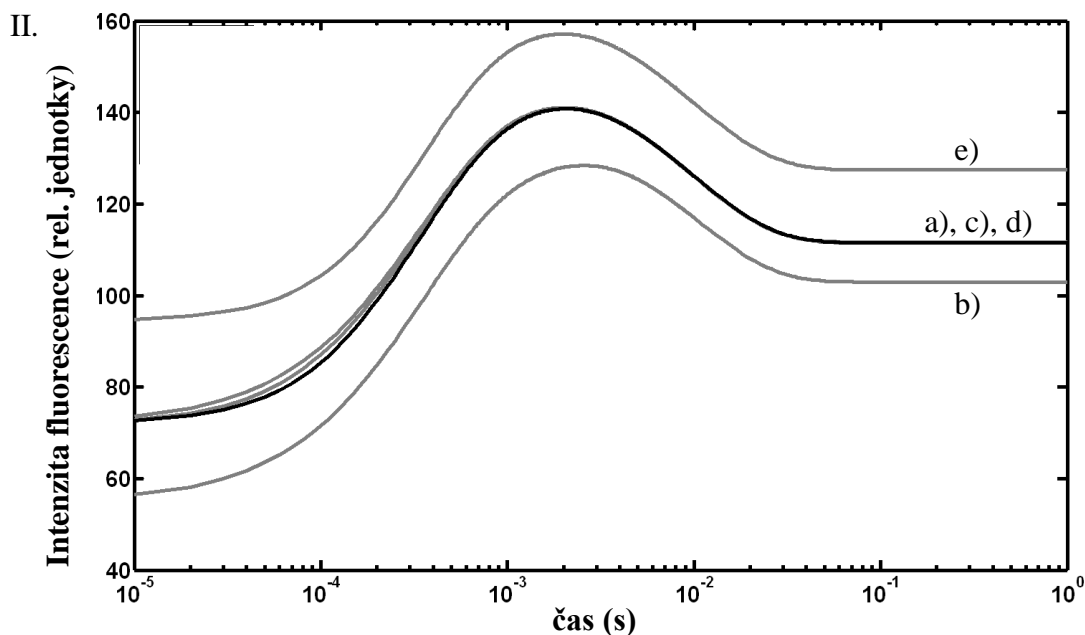
Nejdříve jsme simulovali FLR s vlivem elektrického pole na dopředné rychlostní konstanty podle rovnice (18) a hodnoty zpětných rychlostních konstant byly použity ty, které jsou uvedeny v tabulce 5. Křivky jsou znázorněny na obrázku 6-I. Tak jako na obrázku 5, s rostoucí hodnotou reorganizační energie roste i intenzita fluorescence. U všech nasimulovaných křivek dochází k nárůstu signálu, který okolo 6 ms nabývá svého lokálního maxima. U křivky e) je toto lokální maximum posunuté k času 8 ms. Po jeho dosažení signál klesá do lokálního minima okolo 11 ms, kdy u křivek a), c) a d) signál už téměř nemění svoji intenzitu v čase. U křivky e) následuje ještě nárůst signálu, kdy globálního maxima je dosaženo v 90 ms. Výjimku tvoří opět křivka b), u které signál roste pozvolněji a svého globálního maxima dosahuje až okolo 60 ms. Na obrázku 6-II. jsou křivky FLR simulované pro hodnoty rychlostních konstant podle rovnice (19). Uvažujeme tedy, že ΔG^{el} je časově závislá na změně množství donoru D a současně i na změně množství zredukovaného akceptoru A nábojem Q. Křivky FLR simulované druhým přístupem jsou tvarově velmi podobné těm z obrázku 6-I. (kde ΔG^{el} je časově závislá jen na množství zredukovaného akceptoru A s nábojem Q). Rozdíly jsou minimální, dochází k nárůstu intenzity fluorescence, a k posunu lokálních maxim a minim. Lokální maxima křivky a), c) a d) jsou umístěna v čase okolo 5 ms a po nich jsou lokální minima dosažena v čase 10 ms. U křivky e) je v čase 7 ms lokální maximum intenzity fluorescence, která následně klesá do lokálního minima (okolo 11 ms) a pak zase stoupá. V 90 ms je umístěné globální maximum této simulované FLR. Křivka b) má monotónnější průběh, kdy signál intenzity fluorescence pozvolna roste a v čase okolo 50 ms nabývá svého maxima.

Jak jde vidět na simulacích, když jsme uvažovali ovlivnění změn Gibbsovy energie elektrickým polem pouze pro dané dopředné reakce, křivky FLR na obrázcích 6 jsou podobné se simulacemi znázorněnými na obrázku 5. Je tak zřejmé, že změna Gibbsovy energie způsobená elektrickým polem je minimální a vliv tohoto elektrického pole na hodnoty dopředných rychlostních konstant je zanedbatelný.

6. 5. Vliv elektrického pole na dopředné i zpětné rychlostní konstanty

Poslední simulace byly provedeny pro vliv elektrického pole přenašečů elektronů nejen na dopředné rychlostní konstanty, ale i pro vliv tohoto pole na hodnoty zpětných rychlostních konstant. Opět byly použity dva přístupy a simulace byly provedeny podle rovnic (18) a (20), pro změny dopředných a zpětných rychlostních konstant, respektive podle rovnic (19) a (21). Jak je vidět, oproti simulacím na obrázku 6, kdy elektrické pole ovlivňovalo pouze dopředné rychlostní konstanty a vliv elektrického pole na tyto konstanty a i na tvar křivky fluorescenční indukce byl minimální, za předpokladu, že elektrické pole ovlivňuje i zpětné rychlostní konstanty, dochází k výrazným změnám ve tvaru křivek fluorescenční indukce, viz obrázek 7, a tudíž elektrické pole výrazně ovlivňuje hodnoty zpětných rychlostních konstant.





Obrázek 7. Křivky FLR simulované pro hodnoty dopředných a zpětných rychlostních konstant (I.) podle rovnic (18) a (20) a (II.) podle rovnic (19) a (21). Simulace jsou provedeny pro různé hodnoty reorganizační energie a) 0,7 eV, b) 0,8 eV, c) 0,9 eV, d) 1,0 eV, e) 1,1 eV. Osa x má logaritmické členění.

Na obrázku 7-I je zobrazený průběh FLR pro simulace, kde se dopředné a zpětné rychlostní konstanty měnily na základě rovnic (18) a (20). U křivek a), b), c) a d) došlo oproti křivkám na obrázku 6-I ke snížení počáteční hodnoty fluorescenčního signálu. Globální maximum se nachází v čase okolo 2 ms a oproti předchozím simulovaným FLR je intenzita signálu vyšší. Po dosažení maxima dochází k pozvolnému poklesu do lokálního minima dosaženého v čase 60 ms. U křivky e), kdy je použita reorganizační energie o hodnotě 1,1 eV, došlo k významnému nárůstu intenzity fluorescence oproti předchozím simulovaným křivkám FLR. Průběh je ale jinak identický jako u křivek a), b), c) a d).

Na obrázku 7-II jsou simulované křivky FLR, kde rychlostní konstanty dopředných a zpětných reakcí se počítají podle rovnic (19) a (21). Oproti obrázku 7-I opět došlo ke zvýšení intenzity fluorescence. Průběh simulovaných křivek je ale identický s obrázkem 7-I. Globálního maxima je dosaženo v čase 2 ms a následuje pozvolný pokles signálu do lokálního minima umístěného v čase 60 ms. Zajímavý je celkový pokles signálu intenzity fluorescence pro reorganizační energii o hodnotě 0,8 eV (křivka b).

7. Závěr

Cílem diplomové práce bylo pomocí simulací prověřit, zdali lokální elektrická pole vytvářená okolo přenašečů elektronů v PSII mohou výrazně ovlivnit tvar křivky FLR a zdali takto nasimulované křivky budou podobné experimentálně změřeným křivkám. Za tím účelem jsme nejdříve provedli simulaci křivek FLR, kde rychlostní konstanty nebyly brány z literatury, ale počítány na základě Marcusovy teorie tunelového jevu. Už takto nasimulované křivky FLR měly jiný průběh než křivky standardně měřené, což bylo způsobeno obecně většími hodnotami rychlostních konstant počítaných pomocí Marcusovy teorie oproti hodnotám rychlostních konstant známých z literatury. Dále jsme zjistili, že pouze v případě, kde se uvažuje vliv elektrického pole i na hodnoty zpětných rychlostních konstant, dochází k výrazné změně tvaru křivek FLR. Tyto křivky však nemají klasický tvar a připomínají tvar křivek měřený za vysokoteplotního stresu. Lze tedy říci, že simulace ukazují, že lokální elektrické pole sice ovlivňuje tvar křivky FLR, ale ne očekávaným způsobem. Otázkou zůstává, co je příčinou rozdílu hodnot experimentálně zjištěných rychlostních konstant a hodnot exaktně vypočítaných na základě Marcusovy teorie. I když výsledky této práce nedopadly podle očekávání, tato práce určitě přispěla k lepšímu pochopení fluorescenčního indukčního jevu.

8. Seznam literatury

- Bouges-Bocquet B. (1973) Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts, *Biochemica et Biophysica Acta* 314, 250 – 256
- Breton J. (1983) The emission of chlorophyll in vivo. Antenna fluorescence or ultrafast luminescence from reaction center pigments. *FEBS* 159, 1 – 5
- Davidson V.L. (1996) Unraveling the kinetic complexity of interprotein electron transfer reactions, *Biochemistry* 35, 14035 – 14039
- De Vault D., Chance B. (1966) Studie of photosynthesis using a pulsed laser, *Biophysical Journal* 6, 825 – 847
- Ferreira K. N., Iverson T. M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen – evolving center, *Science* 303, 1831 – 1838
- Feynman R.P., Leighton R.B., Sands M. (2001) Feynmanovy přednášky z fyziky s řešenými příklady 2, Fragment, Praha
- Grabolle M., Dau H. (2005) Energetics of primary and secondary electron transfer in photosystem II. membráně particles of spinach revisited on basis of recombination – fluorescence measurements, *Biochemica et Biophysica Acta* 1708, 209 – 218
- Grabolle M., Dau H. (2007) Efficiency and role of loss processes in light – driven water oxidations by PSII, *Physiologia Plantarum* 131, 50 – 63
- Gray H.B., Winkler J.R. (2003) Electron tunneling through proteins, *Quarterly Reviews of Biophysics* 36, 341-372
- Chamarovskiy C. S., Chamarovskiy S. K., Semenov A. Yu., (2005) Dielectric and photoelectric properties of photosynthetic reaction centers, *Biochemistry* 70, 315 – 322
- Chamarovskiy S. K., Cherepanov D. A., Chamarovskiy C. S., Semenov A. Yu., (2007) Correlation of electron transfer rate in photosynthetic reaction centers with intraprotein dielectric properties, *Biochemica et Biophysica Acta* 1767, 441 – 448

- Chmelinová B. (2012) Teoretické modelování vlivu elektrického pole přenašečů elektronů ve fotosystému II na fluorescenční indukci chlorofylu, Bakalářská práce UP Olomouc
- Kamiya N., Shen J.R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution, *Proceeding of the National Academy of Science of the U.S.A.* 100, 98–103
- Kaplanová M., Nauš J., Vacek K. (1987) *Fyzikální základy fotosyntézy*, Státní pedagogické nakladatelství Praha, Praha
- Klipp E., Liebermeister W., Wierling Ch., Kowalet A., Lehrach H., Herwig R. (2008) *Systems Biology*. Wiley – VCH Verlag GmbH & CoKGaA, Weinheim
- Kok B., Forbush B., McGloin M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution – I.A linear four step mechanism, *Photochemistry and Photobiology* 11, 457 – 475
- Lawlor D.W. (2001) *Photosynthesis Third Edition*, Springer, New York
- Lazár D., Nauš J., Matoušková M., Flašarová M. (1997) Mathematical modeling of changes in chlorophyll fluorescence induction caused by herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 57, 200-210
- Lazár D. (1999) Chlorophyll a fluorescence induction, *Biochimica et Biophysica Acta* 1412, 1 – 28
- Lazár D., Pospíšil P. (1999) Mathematical simulation of chlorophyll a fluorescence rise measured with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barley leaves at room and high temperatures. *European Biophysical Journal* 28, 468-477
- Lazár D. (2003) Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studie by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogenity, *Journal of Theoretical Biology* 220, 469 – 503
- Lazár D. (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light, *Functional Plant Biology* 33, 9 – 30

- Lazár D., Jablonský J. (2009) On the approaches applied in formulation of a kinetic model of photosystem II: different approaches lead to different simulations of the chlorophyll a fluorescence transients. *Journal of Theoretical Biology* 257, 260–269
- Lazár D., Schansker G. (2009) Model of chlorophyll a fluorescence Transients. In: Laisk A, Nedbal N: *Photosynthesis in silico* (2009) Springer, Dordrecht, 85-123
- Lazár D. (2013) Simulations show that a small part of variable chlorophyll a fluorescence originates in photosystem I and contributes to overall fluorescence rise, *Journal of Theoretical Biology* 335, 249 – 264
- Marcus R.A., Sutin N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology, *Biochimica et Biophysica Acta* 811, 365 – 322
- Moser C.C. (1992) Nature of biological electron transport, *Nature* 355, 796-802
- Moser C.C., Dutton P.L. (1992) Engineering protein structure for electron transfer function in photosynthetic reaction centres, *Biochimica et Biophysica Acta* 1101, 171 – 176
- Müh F., Glöckner C., Hellmich J., Zouni A. (2012) Light-induced quinone reduction in photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 44 – 65
- Page C.C., Moser C.C., Chen X., Dutton L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402, 47–52
- Page C.C., Moser C.C., Dutton L. (2003) Mechanism for electron transfer within and between proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 551–556
- Piano D., El Alaoui S., Korza J.H., Filipek R., Sabala I., Haniewicz P., Buechel C., De Sanctis D., Bochtler M. (2010) Crystallization of the Photosystem II core complex and its chlorophyll binding subunit CP43 from transplastomic plants of *Nicotiana tabacum*, *Photosynthesis Research* 106, 221–226
- Schansker G., Tóth S.Z., Kovács L., Holzwarth A.R., Garab G. (2011) Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll a fluorescence rise, *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1807, 1032 – 1043

- Schansker G., Tóth S.Z., Holzwarth A.R., Garab G. (2014) Chlorophyll *a* fluorescence: beyond the limits of the Q_A model, *Photosynthesis Research* 120, 43 – 58
- Taube H. (2012) *Electron transfer reactions of complex ions in solution*, Academic Press, INC., California
- Umena Y., Kawakami K., Shen J. R., Kamiya N. (2011) Crystal structure of oxygen – evolving photosystem II at a resolution of 1,9 Å, *Nature* 473, 55 – 61
- Vodrážka Z. (2002) *Biochemie*. Akademia, Praha
- Voet D., Voetová J. G. (2010) *Biochemistry*, John Wiley & Sons
- Zouni A., Witt H.-T., Kern J., Fromme P., Krauß N., Saenger W., Orth P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 749 – 43