

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Štúdium vzťahu medzi zmenami v elektrickom napätí naprieč tylakoidnou membránou, redoxným stavom donorovej strany fotosystému I a fluorescenciou chlorofylu, spôsobené osvetlením vzorku.



Vypracoval: Bc. Tímea Dunová
Štúdijný obor: Biofyzika
Vedúci diplomovej práce: prof. doc. RNDr. Dušan Lazár, Ph.D.

Olomouc 2022

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora: Bc. Tímea Dunová

Názov práce: Štúdium vzťahu medzi zmenami v elektrickom napätí naprieč thylakoidnou membránou, redoxným stavom donorovej strany fotosystému I a fluorescenciou chlorofylu, spôsobené osvetlením vzorku.

Typ práce: Experimentálna

Pracovisko: Katedra biofyziky

Vedúci práce: prof. doc. RNDr. Dušan Lazár, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Abstrakt:

Pri prenose elektrónov a protónov v membráne chloroplastov sa vytvára protón motívna sila, potrebná pre syntézu ATP. Sila sa skladá z dvoch zložiek, pričom jedna z nich popisuje napätie vzniknuté na membráne chloroplastov. Veľkosť tohto napätia je odzrkadlená v signáli P515, ktorý je jedným zo signálov popisujúcich elektrické vlastnosti rastlín. Hlavným cieľom diplomovej práce bolo preskúmať prepojenie signálu P515 so signálom fluorescencie chlorofylu. Vďaka možnosti zaznamenávania dvoch signálov súbežne sa popri meraniach chlorofylovej fluorescencie zaznamenal aj signál I820. V experimentálnej časti boli počas meraní aplikované abiotické stresové faktory na rastlinné vzorky. Pri spracovaní sa využili štatistické koeficienty pre lepší a presnejší popis závislostí. Súvislosti boli po spracovaní pozorované pri všetkých meraniach.

Kľúčové slová: fluorescencia chlorofylu, protón motívna sila, membránové napätie, redoxný stav P700,

Počet strán: 55

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Tímea Dunová

Title of thesis: Study of the relationship between changes in electrical voltage across the thylakoid membrane, the redox state of the donor side of the photosystem I and chlorophyll fluorescence caused by sample illumination.

Type of thesis: Experimental

Department: Department of biophysics

Supervisor: prof. doc. RNDr. Dušan Lazár, Ph.D.

The year of defence: 2022

Abstract:

Proton motive force (PMF) occurs during the transport of electrons and protons through the chloroplast membrane. This force is used to generate ATP molecules, and it is divided into two components. The first component shows electrical voltage on the thylakoid membrane, which is reflected into signal P515, and the second is caused by different pH on both sides of membrane. The aim of this work was to explore connections between P515 and chlorophyll fluorescence. In the experimental part of this work, we applied abiotic factors to samples. The statistical coefficients were used for a better and accurate description of dependencies. Our main finding demonstrates both of the signals describe the electrical properties of plants as measurements of I820 were made in parallel with measurements of chlorophyll fluorescence.

Key words: chlorophyll fluorescence, proton motive force, electric voltage, redox state of P700

Number of pages: 55

Number of attachments: 0

Language: Slovak

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, pod vedením prof. doc.
RNDr. Dušana Lazára, Ph.D. a s použitím literatúry uvedenej v závere práce.

V Olomouci dňa.....

Rada by som touto cestou poďakovala vedúcemu diplomovej práce prof. doc. RNDr. Dušanovi Lazárovi, Ph.D., za cenné rady a pripomienky, odborné vedenie a veľkú trpezlivosť behom písania riešenia mojej diplomovej práce. V neposlednej rade by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľom za podporu a pomoc pri písaní práce.

Zoznam skratiek

- $\Delta\mu_{H^+}$ – elektrochemický gradient protónov
 $\Delta\psi$ – napäťová zložka protón motorickej sily
 ΔpH – chemická zložka protón motorickej sily
 A_0 – molekula chlorofylu *a*
 A_1 – fylochinón
AMK – aminokyseliny
ATP – adenosíntrifosfát
 b_6^L – nízkopotenciálový hem
 b_6^H – vysokopotenciálový hem
CB cyklus – Calvin-Bensonov cyklus
CET – cyklický elektrónový transport
cyt *f* – cytochrom *f*
cyt b_6/f – cytochróm b_6/f
 D_1 – proteín reakčného centra fotosystému II
 D_2 – proteín reakčného centra fotosystému II
 E_m – redoxný potenciál
EDL – electrická dvojlipidová vrstva
ETC – elektrónový transportný reťazec
FAD – flavínadenínindinukleotid
Fd – ferredoxín
FNR – ferredoxín-NADP⁺ reductáza
I820 – redoxný stav P700
LET – lineárny elektrónový transport
LHC – svetlozberné anténne komplexy
LHCI – svetlozberné anténne komplexy fotosystému I
LHCII – svetlozberné anténne komplexy fotosystému II
NADP⁺ – kation nikotínamidadenínindinukleotidfosfát
NADPH – redukovaná forma NADP⁺
NPQ – nefotochemické zhášanie
OEC – kyslík vyvíjajúci komplex
P680 – molekula chlorofylu *a* v PSII
P680⁺ – oxidovaná forma molekuly chlorofylu *a* v PSII

P680* – excitovaná molekula chlorofylu *a* v PSII
Pc – plastocyanín
Pc⁻ – redukovaný plastocyanín
Pheo – feofytín
pmf – protón motorická sila
PSI – fotosystém I
PSII – fotosystém II
PQ – plastochinón
Q_A – chinónový jednoelektrónový prenášač
Q_A⁻ – redukovaná forma jednoelektrónového prenášača
Q_B – chinónový dvojelektrónový prenášač
Q_B⁻ – plastosemichinón
Q_B²⁻ – úplne zredukovaný dvojelektrónový prenášač
Q_BH₂ – zredukovaný chinón B
qP – fotochemické zhasanie
RCI – reakčné centrá fotosystému I
RCII – reakčné centrá fotosystému II
TM – tylakoidná membrána
Y_Z – tyrozínový zvyšok Z
Y_D – tyrozínový zvyšok D

OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 PREHLAD PROBLEMATIKY.....	2
2.1 FOTOSYNTÉZA A SVETELNÁ FÁZA.....	2
2.1.1 PMF.....	2
2.1.2 SVETLOZBERNÉ ANTÉNNE KOMPLEXY.....	3
2.2 KOMPLEX VYVÍJAJÚCI KYSLÍK.....	5
2.3 FOTOSYSTÉM II.....	6
2.4 PLASTOCHINÓN a CYTOCHROM b ₆ /f.....	7
2.4.1 PLASTOCYANÍN.....	8
2.5 FOTOSYSTÉM I.....	9
2.5.1 FERREDOXÍN.....	10
2.5.2 TRANSPORTNÉ DRÁHY ELEKTRÓNOV.....	10
2.6 FERREDOXÍN NADP ⁺ REDUKTÁZA.....	11
2.7 ATP-SYNTÁZA.....	12
2.7.1 ÚČASŤ IÓNOV A IÓNOVÝCH KANÁLOV PRI FOTOSYNTÉZE.....	13
2.8 SIGNÁLY.....	15
2.8.1 P515.....	15
2.8.2 I820.....	16
2.8.3 FLUORESCENCIA CHLOROFYLU.....	17
3 CIEĽ PRÁCE.....	21
4 MATERIÁLY A METÓDY.....	22
4.1 SADENIE A PESTOVANIE.....	22
4.2 POSTUP MERANIA.....	22
4.3 SPRACOVANIE VÝSLEDKOV.....	24

5 VÝSLEDKY.....	25
5.1 INTENZITA.....	25
5.1.1 FLUORESCENCIA CHLOROFYLU.....	25
5.1.2 I820.....	26
5.1.3 P515.....	27
5.1.4 KORELÁCIA MEDZI FLUORESCENCIOU CHLOROFYLU A P515...28	
5.2 TEPLTNÁ ZÁVISLOSŤ.....	32
5.2.1 FLUORESCENCIA CHLOROFYLU.....	33
5.2.2 I820.....	34
5.2.3 P515.....	35
5.2.4 KORELÁCIA MEDZI FLUORESCENCIOU CHLOROFYLU A P51.....38	
6 DISKUSIA.....	44
6.1 KORELÁCIA MEDZI FLUORESCENCIOU CHLOROFYLU A P515 PRI RASTÚCEJ INTENZITE.....	44
6.2 KORELÁCIA MEDZI FLUORESCENCIOU CHLOROFYLU A P515 PRI RASTÚCEJ TEPLOTE.....	46
6.3 VIACNÁSOBNÉ MERANIE SO ZATEMŇOVACOU FÁZOU.....	47
6.4 FYZIKÁLNY MECHANIZMUS ZMIEN FLUORESCENCIE CHLOROFYLU V ZÁVISLOSTI NA P515.....	48
7 ZÁVER.....	49
8 ZOZNAM LITERATÚRY.....	50
9 INTERNETOVÉ ZDROJE.....	55

1. Úvod

Fotosyntéza je vysoko komplexný proces, v ktorom sú zapojené mnohé mechanizmy. Priebeh tohto procesu sa spája s už potvrdenými a existujúcimi elektrickými vlastnosťami rastlín. Tieto vlastnosti sú ovplyvňované s transportom elektrónov a protónov, ktorý je zas spojený s tvorbou ATP molekúl, cez membránu chloroplastov. Vo fotosystéme II sa celý opis transportu elektrónov začína procesom rozkladu vody.

Hlavnou témou diplomovej práce bude teda preskúmať spomínané elektrické signály v rastlinách a ich možné existujúce vzájomné súvislosti. Pre splnenie vytýčených cieľov bude potrebné všetky signály správne premerať, a neskôr vo výsledkoch spracovať do lineárnych závislostí. Pridaním abiotických stresov, ako zvyšovanie teploty a intenzity do meraní sa budeme snažiť zvýrazniť závislosti. Takýto prístup môže priniesť nový pohľad na problematiku a nové spojitosti.

Presnejší opis procesov fotosyntézy nám umožní pokroková metóda skúmania. V tejto metóde využijeme pre naše merania elektrických signálov prístroj DUAL-PAM-100, pomocou ktorého budeme osvetľovať vzorky listov *Arabidopsis*. Využívaním rôznych komponentov zo spomínaného prístroja budeme v experimentálnej časti postupne prevádzať presné a efektívne merania zmien vo fotosyntetizujúcom organizme. Táto technika merania využíva posuny v absorpčných spektrách rastlinných pigmentov. Už v minulosti sa pozorovali osvetlením vzoriek listov *Arabidopsis* najväčšie zmeny absorbancie objavené pri vlnovej dĺžke 535 nm, ktoré úzko súvisia s protón motorickou silou.

Okrem posunov pri 535 nm môžeme pozorovať zmeny fluorescencie chlorofylu, ako indikátora efektívnosti konverzie energie vo fotosystémoch. S meraniami spomenutej fluorescencie chlorofylu sú spojené merania redoxného stavu P700. Všetky tri signály budú spracované vo výsledkoch a porovnané s publikovanými prácami v časti diskusie. Na konci tejto práce sú očakávané pozitívne výsledky vo forme vzájomných súvislostí medzi signálmi.

2. Prehľad problematiky

2.1. Fotosyntéza a svetelná fáza

Fotosyntéza je jeden z najdôležitejších dejov v prírode, vďaka tomuto jedinečnému deju môžu na Zemi existovať chemotrofné organizmy. Energiu pre priebeh poskytuje slnečné žiarenie, ktoré zachytávajú fotoreceptory (najmä rôzne typy chlorofylov doplnené o karotenoidy). Ďalšou skupinou závislou od priebehu fotosyntézy sú aeróbne organizmy. Pre aeróbne organizmy sú najdôležitejšie molekuly kyslíka vyprodukované v priebehu svetelnej fáze, ktoré sa však považujú z nášho hľadiska za sekundárny produkt. Počas svetelnej fáze, inak sa nazývajúca aj primárna fáza, sa slnečná energia využíva najmä na tvorbu makroergických molekúl ATP a NADPH. Vzniknuté makroergické molekuly sa využívajú v nasledujúcej sekundárnej fáze, a to konkrétne na fixáciu molekúl CO₂ v Calvin–Bensonovom cykle (CB cykle). V tejto práci sa zaoberáme procesmi počas primárnej fáze, prebiehajúcimi na tylakoidnej membráne (TM) a v jej blízkom okolí. Priebeh tejto fáze je spojený s tokom elektrónov, či už lineárnym alebo cyklickým.

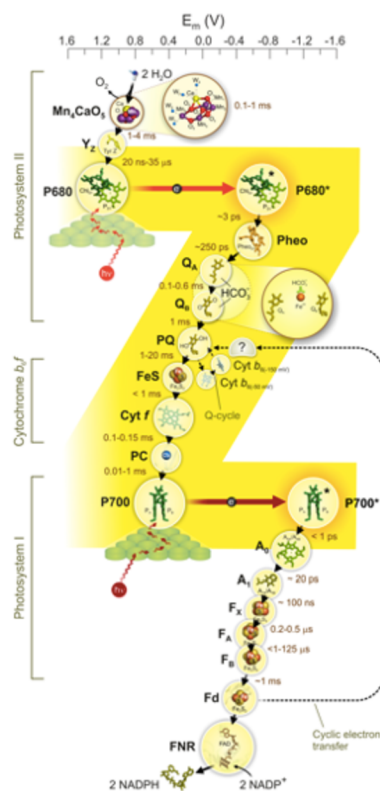
2.1.1. PMF

ATP molekuly v primárnej fáze sa produkujú pomocou transmembránového elektrochemického gradientu protónov ($\Delta\mu_{H^+}$), ktorý sa práve využíva pri práci protónových púmp akou je aj ATP-syntáza (Junge a Witt 1968). Celý proces vysvetlil vo svojej práci o chemiosmotickej hypotéze Peter Mitchell v roku 1961, za ktorú neskôr získal Nobelovu cenu. Na spomínaný elektrochemický gradient protónov sa používa skôr označenie „*proton motive force*“ (pmf). V chemiosmotickej teórii Mitchell popisuje pmf skladajúcu sa z dvoch hlavných zložiek. Prvá zložka je elektrická ($\Delta\psi$) a druhá je chemická (ΔpH). $\Delta\psi$ odzrkadľuje membránový potenciál a ΔpH vzniká pri rozdielnej koncentrácii iónov medzi strómou a luménom. Obe zložky sú rovnako potrebné pre sformovanie celkovej pmf. Vzťah medzi elektrochemickým gradientom, pmf a jednotlivými zložkami pmf vyjadruje nasledujúci vzorec:

$$pmf(mV) = \frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\psi + \frac{2,3RT}{F}\Delta pH \quad (1)$$

kde F je Faradayova konštanta, T je teplota a R je Boltzmanova konštanta (Mitchell P. 1961). V chloroplastoch v ustálenom stave sa za prevládajúcu zložku považuje ΔpH (Martin a Ort 1982), okrem toho má benefity pri fotoprotekcii a účinnosti zberu svetla v svetelnej fáze (Tikhonov 2013).

Všetky oxidačno–redukčné zmeny počas svetelnej reakcie fotosyntézy znázorňujú Z-schéma (obrázok 1). Na začiatku Z-schémy (horná časť obrázku 1) je znázornené, ako sa absorpciou fotónov excitujú molekuly chlorofylov, nachádzajúce sa v anténach fotosystému II (PSII). Spolu s oxidačno–redukčnými zmenami naznačuje zmeny ich redoxných potenciálov (E_m) v smere ku záporným hodnotám. Táto zmena E_m umožní počas nábojovej separácie prenos elektrónov na nasledujúci prenášač, s viac kladným E_m . Na začiatku sa elektróny pochádzajúce zo štiepenia vody prenášajú na PSII. Celý nasledujúci prenos od PSII cez PSI, až napokon na molekuly NADP^+ je síce na obrázku 1 zobrazený, ale nie je súčasťou pôvodnej Z-schémy.



Obrázok 1: Z-schéma a znázornené zmeny redoxných potenciálov. Prevzaté z Govindjee a kol (2017).

2.1.2.Svetlozberné anténne komplexy

Svetlozberné anténne komplexy-light harvesting complexes (LHC) predstavujú proteíny naviazané na molekuly pigmentov nachádzajúce sa v membráne chloroplastov. Pri lepšom pohľade na tento komplex, LHC tvoria hydrofóbne alfa-helixy, ktoré poskytujú niečo ako kostru pre naviazanie chlorofylov. Štruktúru LHCI a LHCII z eukaryotických fotosyntetických organizmov nám umožnili výsledky RTG kryštografie (Hoffman a kol. 1987).

Molekuly chlorofylu sú v tomto zoskupení naviazané na LHC tak, aby boli optimálne nasmerované voči dopadajúcemu svetlu. Celý tento komplex je v membráne ďalej naviazaný na fotosystém I (PSI) a PSII, kde spolu vytvárajú väčšie proteínové komplexy (LHCI a LHCII).

Spojenie PSII s LHC vytvorí proteínový superkomplex PSII-LHCII. Vnútroštruktúra superkomplexu pozostáva z D_1 a D_2 proteínov, na ktorých sa nachádzajú podjednotky vytvárajúce dimér PsbA-PsbD. Tento dimér je ďalej spárovaný s anténymi chlorofylovými proteínmi CP43 a CP47. Ďalšie proteínové jednotky, ktoré sú súčasťou vonkajšej časti superkomplexu sa označujú ako CP29 (Lhcb4), CP26 (Lhcb5) a CP24 (Lhcb6) (Green a Durnford 1996). Spolu s týmito proteínmi patria k vonkajšej časti aj Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3, ktoré môžu medzi sebou vytvárať heterotriméry ale aj homotrimér. Tieto triméry majú na seba naviazané približne polovicu všetkých molekúl chlorofylov v rastline, a sú zároveň najhojnejšie sa vyskytujúcim proteínom na Zemi.

Celý superkomplex PSII-LHCII je uložený v grana, zatiaľ čo proteínový superkomplex zahŕňajúci PSI je lokalizovaný v stromálnych lamelách chloroplastov. Samotné zloženie LHCI a LHCII je dosť odlišné v rozdielnom zastúpení pigmentov, ktoré umožňujú absorpciu svetla s inou vlnovou dĺžkou.

V prípade nadmerného osvetlenia sa v rastlinách zapína proces disipácie energie vo forme tepla, nazývaný sa nefotochemické zhášanie-nonphotochemical quenching (NPQ). NPQ predstavuje mechanizmus, ktorým sa rastliny chránia pred nadmernou excitačnou energiou. Tento proces pomáha regulovať a chrániť fotosyntézu v prostrediach, kde absorpcia svetelnej energie prevyšuje kapacitu využitia svetla. Príliš nadmerné osvetlenie vedie ku produkcii škodlivých reaktívnych foriem kyslíka ako vedľajších produktov fotosyntézy (Müller a kol. 2001). Proces je stimulovaný vysokým $\Delta\mu_{H^+}$, zatiaľ čo v luméne klesá pH nasleduje protonizácia LHC a ďalšej proteínovej podjednotky PsbS vo PSII (Li a kol. 2000). Tento mechanizmus má veľký význam pre prežitie samotnej rastliny pri stresových podmienkach, a okrem rastlín sa vyskytuje takmer vo všetkých fotosyntetických eukaryotoch (Müller a kol. 2001).

Pomocou LHC sa teda svetelná energia v rastlinách zachytáva a absorbuje. Absorbovaná energia sa následne prenáša rezonančným prenosom a sústredí sa na fotoreakčné centrá PSI (RCI) a PSII (RCII). Energia sa spotrebuje na excitáciu a uvoľnenie elektrónov z primárnych donorov v PSI a PSII. Využitie excitačnej energie na rezonančný prenos a ďalej na prenos elektrónov v TM nazývame aj fotochemické zhášanie (qP) (Müller a kol. 2001).

2.2. Komplex vyvíjajúci kyslík

Na začiatku Z-schémy je ako prvý krok naznačená biologická oxidácia molekuly vody (obrázok 1). Vďaka tejto rozkladnej reakcii sa začína opakujúci sa prenos elektrónov na TM, a môžeme tiež komplex v ktorom oxidácia prebieha nazvať ako Water Oxidising Complex (WOC). Pri oxidácii molekuly vody dochádza súčasne aj k uvoľneniu molekuly kyslíka, a preto sa tento komplex tiež označuje ako komplex vyvíjajúci kyslík Oxygen Evolving Complex (OEC) (Wilson a Jain 2018). OEC je umiestnený v TM na lumenálnej strane a naviazaný cez bočné aminokyselinové reťazce na polypeptidy D₁ a D₂ proteínového komplexu PSII. Bočné reťazce tvoria aminokyseliny ako histidín, aspartát glutamát, alanín a tyrozín. V tomto komplexe je potrebné rozložiť dve molekuly vody, pre tvorbu jednej molekuly kyslíka, pričom oxidáciou sa uvoľnia do luménu aj štyri protóny vodíka (H⁺).

Dnes už vieme, že súčasťou OEC komplexu je mangánový klaster (Mn₄CaO₅), v ktorom cyklus rozkladu prebieha. Ďalší pokrok sa dosiahol pomocou metódy RTG kryštalografie, kedy sa podarilo určiť štruktúru tetra-mangán vápnikového komplexu (Tsui a kol. 2013). Klaster je kubického tvaru, kde v rohoch sú umiestnené ióny Mn a Ca, zároveň stabilizované cez ióny kyslíka. Ca sa tam nachádza v oxidačnom stupni ako Ca²⁺ a Mn mení svoje oxidačné stupne od Mn²⁺ po Mn⁵⁺ (De Causmaecker a kol. 2019).

Spomínaný veľký rozsah oxidačných stavov Mn napomáha rozkladu vody, ktorý prebieha v sériách po sebe nasledujúcich krokoch, tieto kroky sa nazývajú spoločným názvom S-stavy. Z S₀ stavu do S₁ stavu je Mn²⁺ oxidovaný na Mn³⁺ a elektrón prechádza na molekulu chlorofylu v RCII (P680⁺). Zo stavu S₁ do stavu S₂ dochádza ku ďalšej redoxnej reakcii Mn³⁺ prechádza do stavu Mn⁴⁺ a elektrón sa presunie opäť na P680⁺. Zo stavu S₂ do stavu S₃ sa elektróny prenášajú na P680⁺ a Mn prechádza do oxidačného stavu Mn⁵⁺. Elektróny z každého kroku prechádzajú na P680⁺ cez tyrozínový zvyšok (Y_Z), ktorý je súčasťou PSII. Y_Z je konkrétnejšie súčasťou D₁ proteínu označujúci sa aj ako D₁-Tyr161, ktorý ako akceptor elektrónov musí vytvoriť krátku vodíkovú väzbu s D₁-His190 (Kawashima a kol. 2018). Elektróny po presune z Y_Z na P680⁺ vytvoria P680 a Y_Z⁺. Až pri poslednom kroku z S₃ do stavu S₄ sa naviaže molekula vody, a nakoniec pri prechode zo stavu S₄ stavu do S₀ stavu sa sformuje molekula kyslíka pri rozklade vody, kde elektróny z rozkladu vody zredukujú Mn na pôvodný stav a všetko samôže opakovať znova. Množstvo redoxných stavov, a zároveň distribúcia valenčných a spinových

elektrónov v mangánovej štruktúre za pomoci komplexných interakcií medzi štyrmi mangánmi určujú elektrické vlastnosti OEC.

Veľmi dôležitú rolu pri rozklade vody v OEC hrá vysoký E_m P680 oproti nižšiemu E_m Y_Z , ktorý zároveň funguje ako hnacia sila pri priebehu S-stavov. Rastúce hodnoty E_m od S-stavov ku RCII, spôsobujú ľahký prenos elektrónov v smere na P680 (obrázok 1).

2.3. Fotosystém II

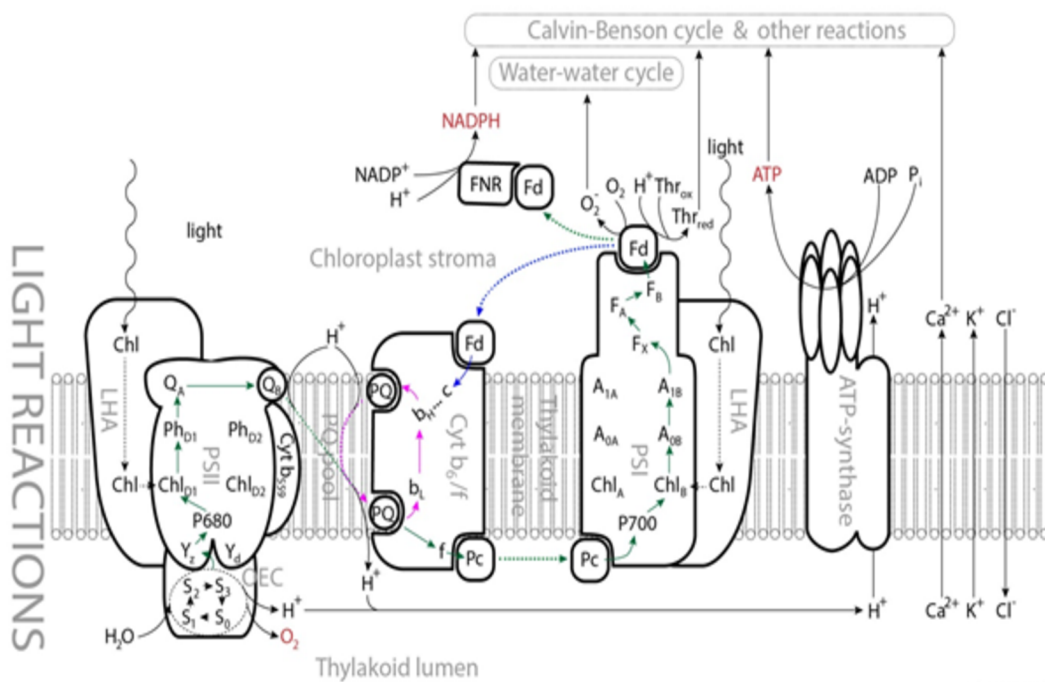
V PSII sa za primárny donor elektrónov považuje dimér molekúl P680. Nasledujúcim akceptorom v reťazci je feofytín (Pheo) a za ním chinón A (Q_A). Pheo a Q_A sú pevne naviazané na polypeptid D_1 , respektíve D_2 . Pheo a Q_A sú známe ako jedoelektrónové akceptory. Primárne elektrogénne reakcie v PSII sú nábojové separácie, pri ktorých sa redukuje Pheo na $Pheo^-$ a vytvorí sa oxidovaný primárny donor $P680^+$. Nasledujúci prenos elektrónov tzv. nábojová stabilizácia, vedie ku vytvoreniu ďalšieho radikálového páru $P680^+Q_A^-$. Následne sa $P680^+$ spätne redukuje darovaním elektrónov z Y_Z (Jeans kol. 2002).

Konečným akceptorom v PSII je chinón B (Q_B), ktorý sa redukuje postupne najskôr na formu plastosemichinónu (Q_B^-). Počas následného fotochemického obratu Q_B^- prijíma druhý elektrón z novovzniknutého Q_A^- . Q_B je na rozdiel od Q_A dvojelektrónový akceptor, takže úplne redukovaný je až prijatím dvoch elektrónov na formu Q_B^{2-} . Celý proces dvojelektrónového akceptora sa nazýva aj model dvojelektrónovej brány. Forma Q_B^{2-} prijíma dva protóny vodíka zo strómy a vzniká neutrálna forma plastochinónu Q_BH_2 , ktorá je voľne naviazaná v Q_B -kapse na polypeptide D_1 vo PSII (Saito a kol. 2013). Q_BH_2 sa uvoľní z Q_B -kapsy, ktorá sa znova naplní oxidovanou formou molekuly plastochinónu (PQ) z PQ-pool, čím sa z molekuly stane Q_B . Prenosu medzi Q_A a Q_B napomáha kation železa, ktorý je súčasťou proteínovej štruktúry PSII (Vass a kol. 1995). Molekula Q_BH_2 uvoľnená z PSII do objemu TM sa potom označuje ako plastochinol, PQH_2 , a stáva sa súčasťou PQ-poolu.

Okrem spomenutej vetvy Y_Z a Pheo umiestnených na D_1 , existuje ešte aj vetva Y_D a Pheo umiestnené na D_2 , ktoré sa však nezúčastnia aktívneho prenosu elektrónov. PSII je v celom prenose považovaný za centrálnu dôležitú a používa sa preňho aj názov svetelne riadená voda-plastochinónová oxidoreduktáza (De Causmacker a kol. 2019).

2.4. Plastochinón a cytochrom b₆/f

Prenos elektrónov z PSII na PSI je prepojený pomocou oligoméneho integrálneho proteínu cytochrómu b₆/f (cyt b₆/f), ktorý je zobrazený na obrázku 2. Cyt b₆/f je popisovaný ako prostredník v prenose, preto sa preňho používa aj názov ako plastochinol-plastocyanínová oxidoreduktáza (Hurt a kol. 1983). Pri účasti na elektrónovom transporte sa cyt b₆/f účastní aj prenosu H⁺ zo strómy do luménu. Katalytickú funkciu v cyt b₆/f zabezpečujú štyri redoxné centrá: Rieskeho železnato-sírne



Obrázok 2: Prenos elektrónov v TM počas svetelnej fázy fotosyntézy vedúci k vzniku NADPH. Zelené šípky zobrazujú lineárny transport elektrónov a modré šípky cyklický transport elektrónov. Ružové šípky zobrazujú Q-cyklus cytochrómu b₆/f. Je zobrazená aj redukcia kyslíka a thioeredoxínov (Thr) a tvorba ATP pomocou ATPsyntázy. Využitie NADPH, ATP a redukovaných thioeredoxínov v CB cykle, odstránením zredukovaného kyslíka v cykle voda-voda a transport katiónov Ca²⁺, K⁺ do strómy a aniónov Cl⁻ do luménu. Zdroj: Lazár D., použité s povolením.

centrum (Fe₂S₂), dve hemové jednotky cyt b₆ (nízkopotenciálny hem b₆^L a vysokopotenciálny hem b₆^H), a nakoniec hem typu f (cyt f). Okrem týchto hemových štruktúr je tu ešte tretí hem typu c, ktorý je kovalentne naviazaný na cyt b₆. Samotný cyt b₆/f obsahuje dve väzobné miesta Q₀ a Q_i. Q₀ je situované blízko Rieskeho proteínu, Q_i sa nachádza na stromálnej strane komplexu blízko hemu c (Tikhonov 2018).

Elektrónový transport z PSII na cyt b₆/f sa uskutočňuje prostredníctvom mobilného prenášača PQ. Na cyt b₆/f sa naviaže PQH₂. PQH₂, ktorá sa spätne oxiduje predaním elektrónov na cyt b₆/f po naviazaní na mieste Q₀. V tomto mieste dochádza ku

oxidácii PQH₂, a súčasne dochádza ku prenosu dvoch H⁺. Dvojelektrónová oxidácia PQH₂ v Q_O mieste, jeden elektrón je nasmerovaný z PQH₂ cez vysokopotenciálovú vetvu, ktorá obsahuje Rieskeho proteín a hem f na cyt f. Rieskeho proteín obsahuje kation železa Fe³⁺, ktorý sa prijatím elektrónu zredukuje a zmení svoj oxidačný stupeň na Fe²⁺ (Gurbiel a kol. 1996).

Druhý elektrón sa prenáša cez nízkopotenciálovú vetvu, nasmerovaný zredukovať PQ v druhom väzobnom mieste Q_i na stromálnej strane. Akonáhle sa v mieste Q_i zredukuje PQ dvoma elektrónmi, sú dva protóny prevzaté zo strómy. Vzniknutá protónovaná PQH₂ molekula disociuje z Q_i miesta a môže sa naviazať na Q_O miesto. Celý tento cyklus, ktorý opísal aj Peter Mitchell (1976), sa nazýva aj tzv. Q-cyklus (obrázok 2). Práve oxidácia PQH₂ komplexom cyt b₆/f na mieste Q_O sa považuje za krok obmedzujúci rýchlosť v intersystémovom reťazci transportu elektrónov. V mieste cyt b₆/f sa nachádza aj regulácia tohto intersystémového prenosu elektrónov, vznikajúca pri svetelne indukovanej acidifikácii luménu. Pri acidifikácii luménu sa znižuje pH, čo spomaľuje a znižuje oxidáciu PQH₂ na cyt b₆/f. Tento efekt sa nazýva „backpressure“ efekt (Kooten a kol. 1986, Foyer a kol. 1990).

Množstvo molekúl PQ, ktoré spájajú PSII a cyt b₆/f je oveľa väčšie, ako množstvo PSI a PSII nerovnomerne rozmiestnených po TM (Stiehl a Witt 1969). Rýchlosť obratu PQ je určená redukciou PQ na PQH₂, následnou disociáciou z PSII a oxidáciou v mieste Q_O. Redukcia PQ, disociácia a difúzia na cyt b₆/f prebieha rýchlejšie ako oxidácia PQH₂ po jeho naviazaní na cyt b₆/f (Tikhonov a kol. 1984).

2.4.1. Plastocyanín

V elektrónovom transportnom reťazci (ETC) je cyt b₆/f prepojený s PSI pomocou plastocyanínu (Pc). Pc predstavuje donor elektrónov pre PSI, a zároveň predstavuje proteín difundujúci v luméne. Mobilný proteínový prenášač Pc prijme elektrón cez cyt f, pomocou ktorého sa zredukuje ión medi v Pc štruktúre (Pc⁻). Ión medi zmení svoj oxidačný stupeň z Cu²⁺ na oxidačný stupeň Cu⁺. Po prvom kontakte medzi Pc a cyt b₆/f funguje mechanizmus reakcie tak, že po počiatočnom elektrostatickom vedení a kontakte nasleduje nepolárna interakcia. Interakcia umožní pohyb Pc na povrchu cyt b₆/f, a to zároveň zabezpečí priblíženie medi do hému (Pearson a kol. 1996). Laterálna difúzia redukovaného Pc⁻ v luméne a prenos elektrónu na oxidované RCI, nelimitujú samotný elektrónový transport medzi PSII a PSI. Toto zistenie je prezentované

rýchlejším prenosom elektrónov z Pc^- na RCI ako elektrónový prenos z PSII na Pc cez PQ-pool a cyt b_6/f (Witt a kol. 1979).

2.5. Fotosystém I

PSI predstavuje pigment-proteínový komplex skladajúci sa z viacerých podjednotiek. Označuje sa aj ako svetlom riadená oxidoreduktáza, prítomná vo fotosyntetických siniciach, riasach a vyšších rastlinách (Albertson 2001). Jadro PSI obsahuje špeciálny pár molekúl chlorofylov (Chl_{1A} , Chl_{1B}) umiestnené na rozhraní podjednotiek $PsaA$ a $PsaB$, vytvárajúce RCI pomenované ako P700. P700 predstavuje primárny elektrónový donor, a zároveň jeho svetlom riadená excitácia (vznik P700*) vyvoláva nábojovú separáciu v tomto proteínovom komplexe. P700* daruje elektróny primárnemu akceptorovi v reťazci (Chl_{2A} , Chl_{2B}). Na akceptorovej strane PSI sa prenos elektrónov rozdeľuje do dvoch symetrických vetiev, pričom každá vetva obsahuje molekuly chlorofylov a jeden fylochinón (A_{1A} alebo A_{1B}). Tieto dve symetrické vetvy sa neskôr zbiehajú ku spoločnému akceptorovi F_X , ktorý predstavuje jeden z troch železato-sírných redoxných centier $[FeS]_4$ vo PSI. Je experimentálne dokázané, že pri prenose elektrónov sa preferuje skôr vetva A. Prenos elektrónov vystupujúcich z F_X pokračuje až do dvoch posledných redoxných centier F_A a F_B , ktoré sú naviazané na podjednotku $PsaC$ (Ritherford a Setif 1990). Podjednotka $PsaC$ spolu s ďalšími dvoma podjednotkami $PsaD$ a $PsaE$ predstavujú tzv. stromálny hrebeň, ktorý prispieva ku stabilizácii a viazaniu ferredoxínu (Fd) ku PSI (Setif a kol. 2002). Centrá klastrov F_A a F_B predstavujú terminálne akceptory, pred prenosom na Fd.

V PSI sa vyskytujú dva elektrogénne kroky spojené s transportom elektrónov z chlorofylu P700 ku akceptorom A_0 a A_1 . Pomocou fotovoltatickej techniky bol nameraný ich výskyt v čase desiatok pikosekúnd po excitácii (Giera a kol. 2010). Pričom druhý elektrogénny krok sa vyskytuje medzi komponentmi F_A a F_B .

Meraniami redoxného stavu zložiek elektrónového reťazca ukázalo, že regulácia dochádza zrejme na úrovni cyt b_6/f , a najpravdepodobnejšie je to v kroku oxidácie PQH_2 , pomocou už spomenutého „backpressure“ efektu (Vankooten a kol. 1986). Tento krok je citlivý na pH tylakoidného luménu, a preto tvorba ΔpH môže viesť ku spomaleniu toku elektrónov cez cyt b_6/f .

2.5.1. Ferredoxín

Konečným akceptorom v PSI je Fd, rozpustný elektrónový transportný proteín obsahujúci železato-sírne aktívne centrum. Centrum je napojené na postranné reťazce cysteínových zvyškov v PSI (Fukuyama a kol. 1980). Fe-S klaster je ďalej obalený hydrofóbnou náplast'ou a nabitými zvyškami kyseliny glutámovej a asparágovej (Hurley a kol. 1999).

Väzba medzi Fd a PSI je prechodná a nevyhnutná pre rýchlu redukciu pomocou PSI, čo umožňuje vysoký obrat reakcie. Táto väzba je založená hlavne na elektrostatických interakciách, ktoré zahŕňajú pozitívne nabité aminokyseliny (AMK) umiestnené v podjednotkách PSI a negatívne nabité AMK na povrchu Fd. Pozitívne nabité AMK, ktoré sú prítomné v podjednotkách PsaA, PsaC, PsaD a PsaF. Experimenty ukázali iba jednu zásaditú AMK na Fd a to arginín, ktorá sídli na povrchu rozhrania Fd a podjednotky PsaE, ktorá nie je vždy zapojená do interakcii. Z tohto zistenia vyplýva, že arginín môže byť zapojený do disociácie Fd od PSI po jeho redukcii, čo uľahčuje následne tvorbu komplexu Fd-FNR (Caspy a kol. 2020).

2.5.2. Transportné dráhy elektrónov

Počas prenosu elektrónov v ETC, zahŕňajúci aj tok cez PSI, sa elektróny primárne presúvajú z OEC na NADP⁺. Hlavným cieľom je zredukovať tieto molekuly a vytvoriť molekuly NADPH, ktoré ďalej vstupujú do CB cyklu. Tento proces elektrónov sa nazýva lineárny elektrónový transport (LET), uskutočňujúci sa prostredníctvom troch hlavných transmembránových proteínových komplexov ako PSII, cyt b₆/f a PSI. LET nie je však jediná dráha vznikajúca v rastlinách pri ETC. Pomocou LET sa pravdepodobne negeneruje dostatočné množstvo ATP molekúl, ktoré sú ďalším hlavným produktom svetelnej fáze, a preto vyrovnaníu napomáha cyklický elektrónový transport (CET). Tento osobitný prípad cyklu elektrónov zahŕňa zo spomenutých komplexov len PSI a cyt b₆/f, pričom oba transporty sú spojené s generovaním $\Delta\mu_{H^+}$ (Joliot a Joliot 2006).

CET má síce relatívne malý príspevok ku vzniku ΔpH , aj napriek tomu to stačí ku vzniku ATP molekúl a udržaniu rovnováhy medzi ATP/NADPH. CET sa zároveň zvyšuje pri silnom osvetlení, kde vytvorený rozdiel koncentrácie protónov na stranách TM ovplyvňuje spustenie NPQ v anténach PSII. Tento tok elektrónov sa považuje za určitú efektívnu odozvu na výkyvy svetelnej intenzity, čo zároveň zabraňuje fotosyntetickému poškodeniu v chloroplastoch (Suorsa a kol. 2012).

Hypotéza podľa ktorej funguje prenos v CET navrhuje prepojenie pomocou väzbového miesta pre Fd na cyt b_6/f (Johnson 2011). Experimenty poukázali presnejší postup fungovania prepojenia, v ktorom priebehu je zapojený kľúčový enzým nazývaný ferredoxín-plastochinón-reduktáza (FQR). FQR predstavuje proteínový komplex, ktorý sprostredkuje prepojenie v CET, konkrétne cestu elektrónov z Fd⁻ na Q_i miesto v štruktúre cyt b_6/f . FQR obsahuje vo svojej štruktúre PGRL1 a PGR5 proteíny, ktoré napomáhajú pri akceptácii elektrónov z Fd⁻, neskôr redukujúce PQ (Hertle a kol. 2013). Obidva spomenuté proteíny sú zapojené v CET, a tým pádom sa zapájajú tiež do procesu fotoprotekcie v chloroplastoch. Opísaný CET je hlavný cyklus, pričom existujú aj ďalšie typy hrajúce minoritnú rolu.

V LET cykle sa napojenie enzýmu na cyt b_6/f nepopisuje, ale elektróny sú prednostne prenášané z Fd⁻ na NADP⁺ (Johnson 2011). Na záver môžeme povedať, že LET by nedokázal určite fungovať bez CET, pomocou ktorého sa udržiava správny pomer medzi ATP a NADPH. Ak by táto spolupráca nefungovala tak by dochádzalo k nadmernej akumulácii NADPH v stróme. CET je preto nevyhnutný proces pre zvýšenie kyslosti luménu a zároveň chráni strómu pred nadmernou redukciou prispievaním k syntéze ATP.

2.6. Ferredoxin-NADP⁺ reduktáza

V poslednom kroku LET elektrónov sa objavuje ferredoxín-NADP⁺ reduktáza (FNR). Enzým FNR obsahuje flavín adenín dinukleotid (FAD) a dokáže sa redukovať až pomocou dvoch elektrónov, ktoré následne prenesie na terminálny akceptor molekulu NADP⁺. Fd pri každom obrate dopraví len jeden elektrón, a preto pre úplnú redukciu sa musia naviazať dve Fd (Aliverti a kol. 1994). Napojenie Fd na FNR a vytvorenie komplexu závisí od interakcií medzi prevažne negatívne nabitými bočnými reťazcami v Fd a prevažne pozitívne nabitými bočnými reťazcami arginínu a lyzínu v štruktúre FNR. Okrem štruktúry hrá dôležitý faktor aj afinita, ktorá je pre FNR ku redukovanému Fd asi 30-krát vyššia ako ku oxidovanému (Batie a Kamin 1984).

Fotosyntetický transport elektrónov produkuje redukčnú silu, ktorú využívajú rôzne enzýmy zapojené do chloroplastov aj do bunkového metabolizmu. Fotosyntetické elektróny sú primárne distribuované do dráhy LET, ktorej hlavným produktom sú molekuly NADPH. V TM sa nachádza proteín nazývaný TROL, ktorý funguje pri tejto LET ceste v prenose ako membránová kotva pre FNR. N-koniec proteínu je založený na sekvencii, ktorá smeruje import tohto proteínu preloženého cytosolom do chloroplastov.

TROL sa inkorporuje do chloroplastovej membrány pomocou svojich dvoch transmembránových helixov, ktoré obklopujú centrálnu umiestnenú neaktívnu doménu. C-koniec ostáva v stróme a pozostáva z domény viažucej FNR. N-koniec FNR je zodpovedný za asociáciu FNR s rôznymi komplexmi (Juric a kol. 2009).

Podobný komplex, aký vytvára FNR s TROL vytvára aj s proteínom Tic62. Komplexy sa nepodieľajú na fotosyntetickom prenose elektrónov, ale sú regulované svetelnými signálmi a stromálnym pH (Benz a kol. 2009). Tic62 je súčasťou interakcii vo vnútornom obale chloroplastu sprostredkovaná C-koncovou doménou, ktorá obsahuje opakovania bohaté na prolín a serín. Benz a kol. navrhli model v ktorom sa väčšina chloroplastových FNR viaže na TM, práve prostredníctvom Tic62 a TROL. V obdobiach tmy stabilizujú enzým FNR počas fotosyntetickej nečinnosti, zatiaľ čo pod vplyvom svetla sa FNR uvoľňuje do strómy, kde katalyzuje NADP^+ fotoredukciu (Benz a kol. 2009). Táto fotoredukcia zas umožňuje efektívny LET. NADP^+ fotoredukcia je veľmi neúčinná ak sa enzým neviaže na membrány. Membránové napojenie FNR je ovplyvnené stromálnym redoxným stavom a to pomerom $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, ktorý odzrkadľuje zmeny v podmienkach prostredia (Twachtman a kol. 2012).

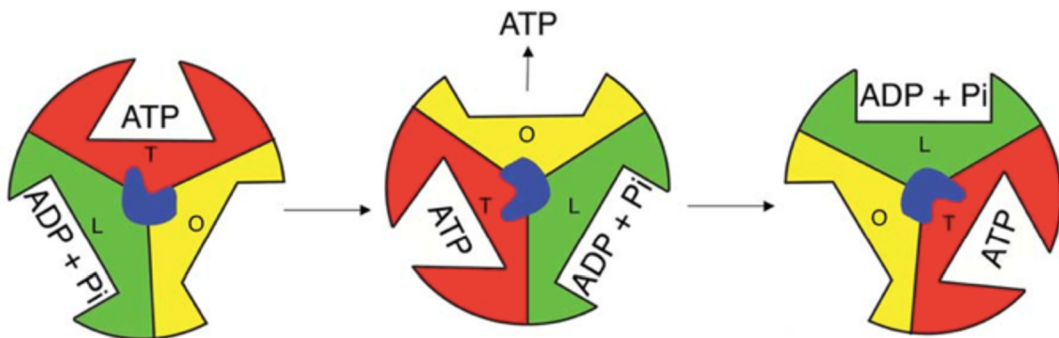
Za hnaciu silu prenosu cez TM sa považuje rozdiel redoxných potenciálov, čo predstavuje rozdiel medzi oxidovanou a redukovanou formou dvojice. V PSII je za túto hnaciu silu považovaný rozdiel medzi oxidovanými a redukovanými formami Q_A a Q_B . Pre dvojicu Q_B/Q_BH_2 je hodnota rozdielu E_m nižšia ako pre dvojicu PQ/PQH_2 . Hodnoty stredných redoxných potenciálov udávajú do akej miery môže dôjsť ku spätnej reakcii, spätnému prenosu elektrónu. Q_A je pevne viazaný na rozdiel od Q_B , ktorý má 2 z 3 redoxných stavov relatívne slabo viazané a zameniteľné s PQ/PQH_2 .

2.7. ATP-syntáza

Okyslenie luménu nastáva v dôsledku hromadenia protónov po oxidácii vody v OEC a PQH_2 v cyt b_6/f . Ku spätnému prenosu protónov z luménu do strómy dochádza cez ATP syntázu (Tikhonov 2013).

Paul Boyer popísal mechanizmus väzby pre syntézu ATP riadenú protónmi. Návrh uvádza, že zmeny väzby vo vlastnostiach troch β podjednotiek umožňujú postupné viazanie ADP a P_i , syntézu ATP a následné uvoľňovanie ATP. Opisuje ATP syntázu ako valec so striedajúcimi sa podjednotkami α a β . Asymetrická podjednotka γ uprostred valca spôsobuje pri otáčaní zmeny v štruktúre podjednotiek β . Jedna môže byť v tesnej konformácii (T), ktorá naviaže ATP s veľkou afinitou. V tejto konformácii táto

podjednotka je obmedzená na uvoľnenie ATP. Druhá podjednotka sa v tom prípade nachádza vo voľnej konformácii (L) a môže naviazať ADP a Pi. Posledná podjednotka bude v otvorenej forme (O) a dokáže uvoľniť viazaný nukleotid (obrázok 3). Premeny konformácii je možné riadiť rotáciou spomínanej γ podjednotky, ktorá sa otáča o 120° proti smeru hodinových ručičiek. Rotácia zmení T konformáciu na O konformáciu, čo umožní podjednotke uvoľniť ATP. Podjednotka v L konformácii sa prevedie na T konformáciu, čo zas umožní prechod viazaného ADP+Pi na ATP. Nakoniec sa v konformácii O prevedie na konformáciu L a zachytí viazané ADP a Pi tak, aby nemohli uniknúť. Táto väzba dokončí celý cyklus, ktorý je znázornený na obrázku 2. Tento mechanizmus naznačuje ako je možné syntetizovať ATP riadením rotácie podjednotky γ (Boyer 1989).



Obrázok 3: Farebne znázornený cyklus tvorby ATP podľa Paula Boyera, tri podjednotky β a uprostred rotujúca podjednotka γ . Prevzaté z (Bowler 2005).

Zmeny konformácii väzobnej afinity domény F_1 poháňa energia generovaná z rozdielu koncentrácií protónov, čo vedie k uvoľneniu molekuly ATP. V tme sa γ podjednotka oxiduje na disulfidovej väzbe vo svojej štruktúre.

Pomer ATP je iný pri LET ako pri CET, v ktorom elektróny v redukovanom Fd sa prenesú na cyt b_6/f a prúdia späť cez tento komplex aby redukovali Pc. Výsledný rozdiel koncentrácie protónov takto ovplyvní syntézu ATP molekúl. Tento proces sa nazýva cyklická fotofosforylácia, pri ktorej sa generuje ATP bez tvorby NADPH a nezúčastňuje sa jej PSII. Cyklická fotofosforylácia prebieha, keď $NADP^+$ nie je schopný prijať elektróny z redukovaného Fd, kvôli vysokému pomeru $NADPH/NADP^+$.

2.7.1. Účasť iónov a iónových kanálov pri fotosyntéze

TM je negatívne nabitá a vplýva tak na štruktúru aj funkciu primárnych fotosyntetických reakcií. Negatívny náboj na povrchu TM vytvárajú aminokyselinové

zvyšky, konkrétne karboxy skupiny (COO^-) v ich štruktúre. Heterogénna štruktúra definovaná nábojmi a elektrickými poľami vytvorenými v blízkosti záporne nabitých povrchov membrán vytvára tzv. „*electrostatic dilipid layer*“ (EDL) (Cevc 1990). EDL je založená na zmenách elektrického poľa a koncentrácie iónov s rastúcou vzdialenosťou od membrány. Zmeny elektrického poľa na EDL odzrkadľuje $\Delta\psi$ parameter, ktorý je merateľný pomocou ECS.

Protóny a ióny sú distribuované heterogénne v tesnej blízkosti negatívne nabitého povrchu TM. Úloha protónov a všetkých ostatných iónov v regulácii fotosyntézy je vzájomne prepojená, pretože prenos aniónov aj katiónov cez TM je nutný pre vyrovnanie počiatocnej osvetlením-indukovanej akumulácie kladného náboja protónov v luméne, po čom následne vzniká $\Delta\psi$. Pasívne iónové kanály sprostredkujú prenos, ktorý je riadený vlastnosťami TM, dominantných iónov ako K^+ , Mg^{2+} , Cl^- a Ca^{2+} (Barber a kol. 1977). EDL je ovplyvnená nábojmi iónov, zasahuje do interakcii a prenosu excitačnej energie z PSII na PSI. Ak stúpa hladina excitácie stúpa aj rýchlosť transportu elektrónov. Tieto účinky sa premietajú do intenzity fluorescencie, excitácie chlorofylu *a* a miery NPQ. NPQ sa spúšťa okyslením luménu, čo je spojené s exportom katiónov (Mg^{2+} a K^+) do strómy a negatívnych iónov ako Cl^- do luménu. Izoelektrickými meraniami sa ukázalo, že celkové fixné negatívne náboje na TM sú vyššie na ich lumenálnej strane než na ich stromálnom povrchu.

Svetlom indukovaná akumulácia protónov v luméne je vyvážená väčšinou odtokom Mg^{2+} iónov alebo K^+ iónov do strómy, a naopak Cl^- späť do luménu. Všeobecne sa Mg^{2+} považujú za protipumpu H^+ iónov. ΔpH zložka prispieva k produkcii ATP, importu proteínov a príjmu esenciálnych iónov ako je Ca^{2+} . Transport H^+ stanovuje fyziologické pH v luméne a stróme, čím zaisťuje aktivitu fotosyntetických reakcií závislých od svetla. V tme sa stromálne pH blíži k hodnote 7 ale po osvetlení sa stróma stáva alkalickou v dôsledku prečerpávania H^+ cez TM. Alkalické pH strómy je aj podmienkou pre aktivovanie enzýmov pre CB cyklus (Höhner a kol. 2016).

V niektorých štúdiách bol potvrdený draslíkový kanál TPK3 cez TM. Kanál je *in vitro* aktivovaný iónmi Ca^{2+} , okyslením a uvoľňuje K^+ z TM na reguláciu pmf (Carraretto a kol. 2013). V ďalšej štúdií je spomínaný draslíkový antiporter (K^+/H^+) nazývaný KEA3 identifikovaný v TM. Otvorením kanálu TPK3 a zvýšenie vodivosti sa podporí vývoj ΔpH zložky ale skratuje membránový potenciál, zatiaľ čo pri KEA3 by sa narušila ΔpH a ponechala $\Delta\psi$ zložku neporušenú (Armbruster a kol. 2014).

Pri prahových hodnotách koncentrácie protónov sa v rastlinách zavádzajú ochranné procesy. Merania ukázali, že ak klesne pH luménu pod hodnotu 6,5 oxidácia PQH₂ na cyt b₆/f sa spomalí a môžeme pozorovať spomenutý „backpressure“ efekt, kde sa prenos protónov stáva termodynamicky menej priaznivým (Tikhonov 2014). Okrem toho pri nízkom pH sú aminokyselinové zvyšky na lumenálnej strane cyt b₆/f čiastočne protonované a hovoríme o tzv. pufrovacej kapacite luménu na protóny. Môžeme teda povedať, že ióny majú veľkú schopnosť regulovať pmf (Dolan a Hind 1974).

2.8. Signály

Pri prechode excitovanej molekuly vo fotosystémoch do základného stavu dochádza k emisii žiarenia, všeobecne nazývaného ako luminiscencia. O fluorescenciu sa jedná ak dochádza ku prechodu do základného stavu zo singletného excitovaného stavu. Molekulou emitujúcou fluorescenciu vo fotosyntetizujúcich organizmoch je chlorofyl *a*.

Vo vyšších rastlinách môžu, popri fluorescencii chlorofylu, viditeľné IČ a UV absorpčné spektrá odrážať svetlom indukované zmeny v redoxných stavoch cyt b₆/f, P700, ako aj ECS spôsobené vznikom a rozpadom $\Delta\psi$.

2.8.1.P515

TM je ovplyvnená zmenami v $\Delta\psi$ zložke pmf, a tým aj zmenami koncentrácie iónov na oboch stranách membrány. Zmeny zložky $\Delta\psi$ sú merateľné tzv. elektrochromickým posunom-electrochromic pigment absorbance shift (ECS). ECS absorpčných pásiem je vlastne odpoveď fotosyntetických pigmentov, hlavne karotenoidov na elektrické pole. Každý posun je charakterizovaný svojou vlnovou dĺžkou minima, maxima a nulovou zmenou absorbancie. V zelených rastlinách posuny pásiem takýchto typov sa objavujú v rozmedzí 470-550 nm po osvetlení s maximom pri 515 nm.

Pokrok vo výskume fotosyntézy bol do značnej miery poháňaný vývojom nových meracích techník a metód. Junge a Witt (1969) opísali využívanú metódou monitorovania zložky $\Delta\psi$ a menej invazívnu ako staršia metóda patch-clamp, ktorej základom je pozorovanie práve zmeny absorpcie vrcholiacej pri 515 nm. Tento typ signálu sa nazval P515 podľa výskytu absorpčného maxima v meraniach, zároveň signál odzrkadľuje ECS. P515 môžeme považovať za vlastný voltmeter, ktorý rýchlo reaguje na zmeny elektrického potenciálu cez TM. Použitím techniky PAM, ktorá využíva sledy mikrosekundových impulzov generovaných svetelnými diódami, sme schopný P515 zmerať pri nastavenej frekvencii. Na základe meraní existujú nálezy naznačujúce čiastočný alebo úplný kolaps $\Delta\psi$ zložky pmf za ustálených podmienok.

Saturačný pulz pri meraní spôsobuje extrémny nárast signálu, čo odráža primárnu nábojovú separáciu v RCI a RCII. V tme adaptovaných listoch tento nárast je nasledovaný oveľa pomalšou fázou spôsobenou Q-cyklom vznikajúcim v cyt b₆/f (Velthuys 1978). Q-cyklus odráža sekundárny intersystémový transport vyvolaný primárnou separáciou náboja. Rozpad signálu je závislý od fyziologického stavu vzorku a urýchľuje ho prenos membránových iónov a práca ATP-syntázy. Amplitúda signálu P515, vyvolaná svetelným zábleskom je mierou počtu otvorených fotosystémov so stabilnou separáciou náboja. Práve meraním P515 môžeme odhadnúť zložky pmf. Použitím intenzívnejšieho meracieho svetla zároveň rastie aj hodnota $\Delta\psi$. Na pokles $\Delta\psi$ zložky prispieva prítok Cl⁻ iónov a výtok Mg²⁺ iónov, ktoré sú spojené so svetlom riadeným prítokom protónov do luménu zo strómy. Práve svetlom poháňaný elektrónový transport spojený s protónovým transportom zo strómy do luménu je vyvážený výtokom protónov cez ATP-syntázu.

2.8.2.I820

Oxidácia RCI zvyšuje absorbančiu v rozmedzí vlnovej dĺžky 800-850 nm, a zároveň znižuje absorbančiu pri 700 nm. Monitorovaním absorbancie pri 820 nm je veľmi dobrý spôsob ako pozorovať redoxný stav P700 pod kontinuálnym svetlom.

Pri meraniach je P700 v tme redukované a prechodom na svetlo sa oxiduje na P700⁺. Z experimentov sa zistilo, že rýchlosť akou sa oxidujú molekuly P700 pri prechode na svetlo je lineárne so zvyšujúcou sa intenzitou osvetlenia. Tento fakt je spôsobený reguláciou tepelnej disipácie a obmedzením transportu elektrónov v komplexe cyt b₆/f (Schreiber a kol. 1988).

Problém je v tom, že ku zmenám absorbancie pri 820 nm prispievajú ďalšie tri komponenty, a to Pc, P680 a Fd. Zmeny absorbancie pri 820 nm boli použité pôvodne na monitorovanie redukčného a oxidačného stavu P700, ale aj pri P680 v osvetlenom systéme. Meranie kinetiky redukcie, P680⁺ a P700⁺, ukázalo rozdiel v polčase redukcie pri oboch fotosystémoch. Na základe týchto meraní bolo možné pozorovanie redukcie P700 po osvetlení bez interferencie P680.

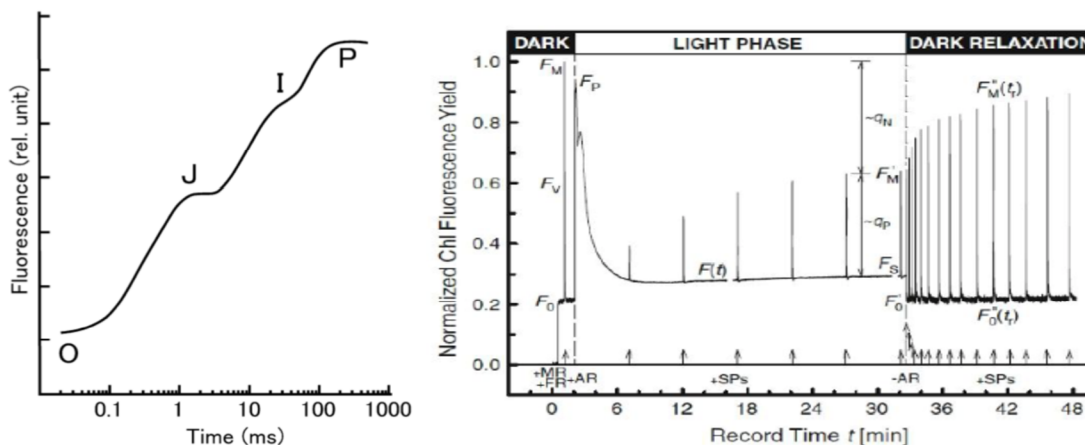
Zo simultánnych meraní I820 a fluorescencie chlorofylu sa zo zmien v priebehu signálu I820 vyvodzujú aj mechanizmy zodpovedné za zmeny vo fluorescenčnej kinetike. Priebeh krivky do kroku I sa pripisuje prechodnej oxidácii Pc a P700 v dôsledku aktivity PSI a následná I-P fáza odráža prechodný blok na akceptorovej strane PSI.

Klesanie signálu I820 korešponduje so znížením množstva P700⁺ a molekúl Pc⁺, a zároveň odzrkadľuje rýchlosť ich redukcie. Pri štúdiu, ktoré vykonal Essemine a kol. (2016) boli rastlinné vzorky vystavené krátkodobému tepelnému stresu a následnému zaznamenávaniu signálu I820. Táto štúdia potvrdila vyjadrenie, a to že vystavenie stresu viedlo ku skoršej regulácii vo PSI. Táto skutočnosť sa pripisuje vytvoreniu limitácie na akceptorovej strane PSI, generovanou nasledujúcou inhibíciou asimilácie CO₂. Táto inhibícia je spôsobená poklesom aktivity enzýmu Rubisco fixujúceho CO₂ v rastlinách.

2.8.3. Fluorescencia chlorofylu

Fluorescencia chlorofylu sa široko používa vo výskume fotosyntézy, fyziológii rastlín a ďalších oblastiach výskumu súvisiacich s fotosyntézou. Merania emisných a excitačných spektier fluorescence chlorofylu poskytli mnoho informácií o komponentoch anténnych komplexov a prenose excitačnej energie medzi nimi. Za pokojovej teploty dochádza k emitácii fluorescence najmä molekulami chlorofylu pripojenými k PSII a menšia emisia pochádza aj z molekúl chlorofylov PSI (Govindjee a kol. 1986). Prvé merania fluorescence pri vysokej intenzite excitačného svetla s použitím fluorometra PAM 101-103 od firmy Waltz použili Schreiber a kol. (1986). Nameraný signál vyjadruje závislosť intenzity fluorescence chlorofylu behom náhleho osvetlenia listu adaptovaného na tmu. Ku fluorescenčnému signálu okrem PSII prispieva aj PSI, jeho príspevok ku celkovej fluorescencii je konštantný približne 15-20% (Strasser 1997).

Po vynesení nameraného priebehu fluorescence chlorofylu ako funkcie logaritmickeho času, môžeme identifikovať kľúčové úrovne fluorescence. Kľúčové úrovne, ktorými sa budem zaoberať vo svojej práci sa označujú O-J-I-P (obrázok 3A). Krivka na obrázku 3A odráža hlavné fotosyntetické reakcie indukované svetlom a elektrónový transport z PSII až na FNR za vzniku molekúl NADPH. Prvý krok O označuje „*origin*-počiatok“, minimálnu fluorescenciu adaptovanú na tmu. J a I naznačujú dve inflácie pri 2 ms a 30 ms. Posledný krok P sa označuje „*peak*-vrchol“, zvyčajne objavujúci sa približne pri 500 ms (Lazár 1999).



Obrázok 4: 4A) Fluorescenčná krivka OJIP, merania rýchlej kinetiky fluorescencie. Prevzaté z Ogawa a Sonoike 2021. 4B) Krivka pomalej fluorescencie chlorofylu Prevzaté z (Očenášová a kol. 2014).

Minimálne fluorescencia F_0 , čo predstavuje počiatok O v O-J-I-P krivke, je dôsledok stavu rovnováhy medzi excitovanými stavmi všetkých molekúl pigmentov v LHC a P680. Definuje fluorescenciu, kde sú otvorené všetky RCII a prvý elektrónový akceptor Q_A je oxidovaný (Vredenberg 2000). Príspevok k tomuto parametru má aj PSI (Byrdin a kol. 2000). Podľa návrhu Delossmeho (1967) prechodná fáza O-J zodpovedá nahromadeniu zredukovaného primárneho reaktanta fotoreakcie Q_A . Počiatkový sklon a relatívna výška tejto fotochemickej fázy silne závisia od použitej intenzity excitačného svetla. Druhá fáza J-I súvisí s redukciou PQ pomocou Q_A . Posledná fáza I-P je vysvetlená rôznymi mechanizmami a matematickými simuláciami, ktoré ukázali dôležitosť transportu elektrónov mimo PQ-pool. Bola zároveň podporená hypotéza, že táto fáza súvisí s tokom elektrónov cez PSI. Obmedzenie toku elektrónov na akceptorovej strane PSI je dôsledok neaktívnej FNR, čo môže viesť ku redukcii prenášačov elektrónov TM.

Na obrázku 4B je zobrazená fluorescenčná indukcia, pre ktorú je charakteristický rýchly nárast intenzity počas prvej sekundy, a následne dochádza ku pomalému poklesu trvajúcemu desiatky sekúnd až minút. Prvým nameraným parametrom je F_0 , odpovedajúci kroku O na obrázku 4A. Najvyšším bodom nameraným na obrázku 4B je maximálna fluorescencia F_M . Charakterizuje stav, v ktorom sú všetky RCII zatvorené a Q_A je redukovaný (Tomek a kol. 2003).

Pri uzavretých RCII dochádza ku nábojovej separácii, teda sformovaniu $P680^+$ a $Pheo^-$, pomalšie ako je tomu pri otvorených RCII. Následok tohto javu je zvýšenie doby života excitovaných stavov, práve pri uzavretých RCII a následnému zvýšeniu fluorescenčnej emisie.

Vo vzorku adaptovanom na tmu sa z nameraných hodnôt F_0 a F_M dá vypočítať pomer

$$\frac{(F_M - F_0)}{F_M} = \frac{F_V}{F_M}, \quad (2)$$

ktorý vyjadruje maximálny kvantový výťažok fotochemických reakcií v PSII a je mierou funkčnosti PSII. Pomer medzi variabilnou fluorescenciou (F_V) a F_M je najčastejšie používaným fluorescenčným parametrom pri štúdiách zmien fotosyntézy pri strese rastlín.

V prípade použitia vyššej teploty ako stresového faktora sa objavuje aditívny krok K. Tento krok odzrkadľuje inhibíciu donorovej strany PSII. Táto nová fotochemická fáza sa objaví v prípade, keď elektrónový tok od P680 ku akceptorovej strane PSII prekročí rýchlosť elektrónového toku od donorovej strany PSII ku P680. S inhibíciou donorovej strany PSII je spojená inhibícia OEC. Okrem závislosti od rýchlosti elektrónových prúdov, odráža K krok akumuláciu redukovaných Q_A . Za určitých podmienok merania fluorescencie môžeme pozorovať zároveň J a K krok súčasne. Tento fakt naznačuje, že oba kroky odrážajú dva rozdielne javy (Strasser 1997).

Čiastočná inhibícia OEC zvýšením teploty vedie ku korelácii medzi rýchlosťou vzniku prechodného J-P kroku a rýchlosťou vývoja kyslíka (Martinazzo a kol. 2012). Lazár (2003) vo svojom modeli naznačil, že fotochemické fázy sú ovplyvnené nefotochemickým žiarením, molekulami $P680^+$ a PQ-poolom, nábojovou rekombináciou medzi $P680^+$ a Q_A^- , počiatočným stavom OEC a rýchlosťou prenosu elektrónov z Y_Z na $P680^+$.

Pozastavením OEC dochádza zároveň ku nedostatku elektrónov pre redukciu PQ-poolu, tým pádom PQ-pool zostáva oxidovaný a zohráva úlohu fluorescenčného zhášača (Haldiman a Tsimilli 2005). Určitá redukcia PQ-poolu je potrebná pre fungovanie CET, pomocou ktorého môžeme zredukovať elektrónový nosiče spájajúce PSII a PSI. Inhibovať samotný CET môžeme osvetlením far-red light (FRL). Prediluminácia pomocou FRL plne zoxiduje PQ, čo zabráni fungovaniu CET (Vredenberg a Bulychev 2010).

S priebehom fluorescenčnej krivky O-J-I-P, v polohe I kroku, súvisia aj zmeny signálu I820, ktorý odráža množstvo oxidovaného P700 a Pc. Na druhej strane, Schreiber a Neubauer (1990) zistili, že zmeny absorpcie zistené pri 515 nm majú maximum približne v pozícii J kroku O-J-I-P krivky. Svetelne indukované napätie vznikne cez TM

a podporuje formovanie a vznik P680*. Dau a kol. (1991) našli tiež súvislosť medzi napätím na TM a fluorescenciou chlorofylu. Podľa ich zistení pri zvýšení napätia cez TM sa zvyšuje emisia fluorescencie chlorofylu.

3. Cieľ práce

Touto DP sme naviazali na predchádzajúcu BP, v ktorej hlavným cieľom bolo venovať sa jednotlivým priebehom najmä signálov I820 a P515. Priebeh signálov sme doplnili o merania rýchlej kinetiky signálu fluorescence chlorofylu, keďže nami využívaný merací systém umožňuje simultánne meranie fluorescence popri signály I820. Naším hlavným cieľom bolo preskúmanie možných súvislostí medzi signálmi navzájom. Práce publikujúce meranie závislostí fluorescence chlorofylu na I820 sa už objavili, a preto sme sa zamerali na signál P515 a fluorescence chlorofylu. Vo výsledkoch sme spracovali závislosti a pridali sme abiotické stresy ako teplotu a intenzitu osvetlenia.

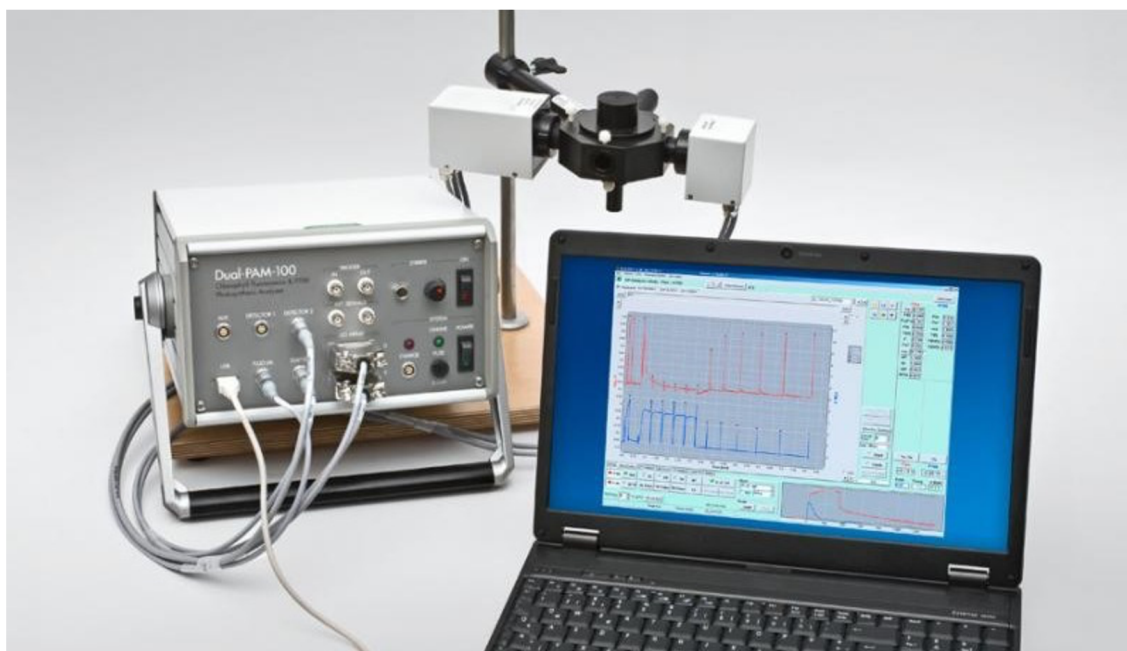
4. Materiály a metódy

4.1 Sadenie a pestovanie

Pre merania v tejto práci sme využili rastliny druhu *Arabidopsis* WT (Wild type). Rastliny boli zasiate do dprpripravenej pôdy, ktorú sme upravovali sušením pri 70°C. Semienka sme mali predpripravené, v mikroskúmvavke typu eppendorf spolu s roztokom, ktoré sa neskôr zasievali do plastových nádob o veľkostiach 2,5 x 2,5 cm. Vyklíčenie aj pestovanie rastlín prebiehalo vo fyto komorách od firmy Photon Systems Instruments. V týchto komorách boli vystavené intenzite svetla, ktorá sa považuje za intenzitu umelého slnečného žiarenia 100 μmol fotónov $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Pestované boli pri teplote 23°C a 60% relatívnej vlhkosti pri 8 hodinovej fotoperióde konštantného svetla. Po vyklíčení sa rastliny zasadili do väčších nádob a pokračovalo sa v pestovaní a zalievaní až do 6 až 7 týždňa, kedy listy boli dostatočne veľké a silné pre meranie.

4.2 Postup merania

Pomocou prístroja Dual-PAM-100 od výrobcu (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Nemecko) na obrázku 1, sme merali a sledovali priebehy troch signálov (I820, chl α fluorescencie a P515). Jednokanálové meranie sme využívali pre signál P515, a naopak dvojkanálové meranie sme použili pre kinetiku I820 a chl α fluorescenciu. Prístroj DUAL-PAM umožňuje takéto simultánne meranie prechodu fluorescencie (krivky OJIP) a zmeny transmisie pri 820 nm. I820 poskytuje analogickú informáciu o PSI ako chlorofylová fluorescencia o PSII. Technikou pulznej modulácie sa merajú zmeny absorbancie pri 820 nm. Pre ESC a P515 sa vo výbave prístroja nachádzajú alternatívne emitory a detektory. Použité hlavice pre jednokanálové meranie sa označujú ako DUAL-EP515 a DUAL-DP515, zatiaľ čo pre dvojkanálové meranie sú to hlavice DUAL-E a DUAL-DB. Ako zdroj svetla pri meraniach slúžia LED žiarovky, využívajúce vlnové dĺžky pre červené, modré a ďaleké červené svetlá.



Obrázok 5: Prístroj DUAL-PAM-100. Prevzaté z [1].

Hlavica DUAL-DB obsahuje modré LED žiarovky, ktoré využívajú modrú vlnovú dĺžku (460 nm) a LED žiarovku na vybudovanie chlorofylovej fluorescence. Navyše je táto hlavica vybavená troma LED diódami pre aktinické svetlo. Pre červené aktinické svetlo aj saturačné impulzy je k dispozícii špeciálne pole LED diód, ktoré sa spájajú do plexiskla s rozmermi 10 a 10 mm a na výstupe sa miešajú kvality svetla. Fotodióda s pulzným zosilovačom slúži na detekciu prenášaného meracieho svetla pre I820 a pulznej modulovanej fluorescence. Prístroj má okrem toho veľký rozsah meracích frekvencií svetla (1 Hz – 400 kHz), čo umožňuje záznam rýchlej kinetiky pri vysokom časovom rozlíšení.

Pri každej sérii meraní boli listy adaptované na tmu minimálne hodinu a na jednu sériu meraní sme použili 5 vzoriek listov. Znamená to, že pre merania s lineárne sa dvíhajúcej teplotou sme použili pre každú teplotu 5 vzoriek, čo sme opakovali pri intenzite aj pri časovej závislosti pri zatemnení rastlín. Svetelné pulzy mali dĺžku 300 ms a po každom svetelnom pulze bol list 30 sekúnd v tme a nasledoval ďalší svetelný pulz. Zatemnenie po každom svetelnom pulze sme zväčšovali od 30 s až po 120 s, pričom po každom zatemnení sme opakovali 300 ms merací svetelný pulz. Rozmedzie intervalu 70 s až 120 s sme do výsledkov nespracovali, dôvodom boli nevýrazné zmeny v signáloch. Touto metódou merania sme zmerali signály pre všetky tri signály.

4.3 Spracovanie výsledkov

Následne po meraniach ďalšie spracovanie prebehlo v programe Excel. Každú sériu meraní sme následne priemerovali pred použitím do výsledných grafov. Priemerovanie prebehlo v programe Microsoft Excel a následné vyhladzovanie kriviek v programe Origin v.7 (OriginLab, Northampton, USA) metódou priľahlého priemerovania 8 bodov. Jedným z hlavných cieľov mojej DP bolo nájsť korelácie medzi jednotlivými signálmi. Predpokladom pre meranie a následné spracovanie bolo, že stav P700 v tme bol redukovaný a napätie na TM bolo nulové. Pre určenie korelácie sme preto použili Pearsonov korelačný koeficient. Výpočet pre Pearsonov korelačný koeficient je uvedený nižšie

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}} \quad (3)$$

Pearsonov korelačný koeficient nám udáva mieru lineárnej závislosti dvoch premenných. Nadobúda hodnoty od -1 až po +1, pričom hodnoty blízke 0 vyjadrovali nezávislosť medzi premennými. Druhý koeficient, ktorý sme využili je koeficient determinácie. Tento koeficient nám udáva ako veľmi sa zmeny parametrov zobrazených na y-ovej (napr. ChlF) osi odrážajú v zmenách parametrov na x-ovej (P515) osi.

5. Výsledky

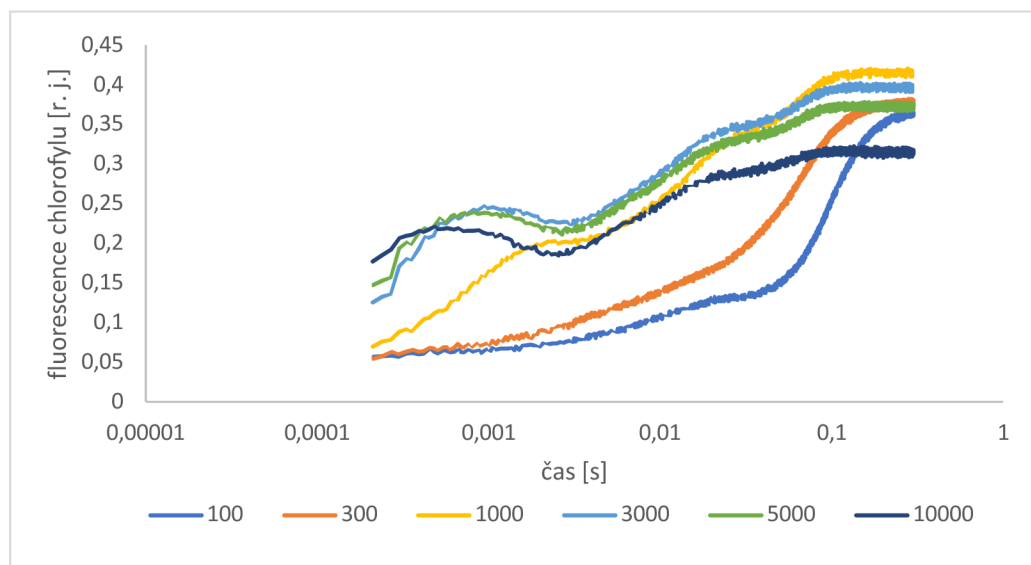
V nasledujúcej časti DP sú spracované experimentálne namerané a spriemerované série meraní signálov P515, I820 a fluorescencie chlorofylu na listoch *Arabidopsis* divokého typu. Prvá séria meraní sa uskutočnila pri podmienkach konštantnej teploty a dvíhajúcej sa intenzity osvetlenia. V druhej časti sme použili konštantnú intenzitu osvetlenia a zvyšovali sme teplotu ako typ abiotického stresu. Pri oboch typoch meraní sme pri spracovaní výsledkov hľadali možné korelácie medzi signálmi v lineárnej závislosti.

5.1 Intenzita

V prvej sérii meraní sú spracované výsledky pri izbovej teplote. Intenzitu sme dvíhali postupne od hodnoty $100 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ až po hodnotu $10\,000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Pri každej zvolenej intenzite sme signál premerali päťkrát a použili priemer.

5.1.1 Fluorescencia chlorofylu

Na obrázku 6 je nameraný priebeh fluorescencie v závislosti od času pri zvyšujúcej sa intenzite a izbovej teplote počas prvej sekundy po osvetlení v tme adaptovaných listových vzoriek. Priebeh krivky O-J-I-P odzrkadľuje fluorescenciu chlorofylu pochádzajúcu z PSII.



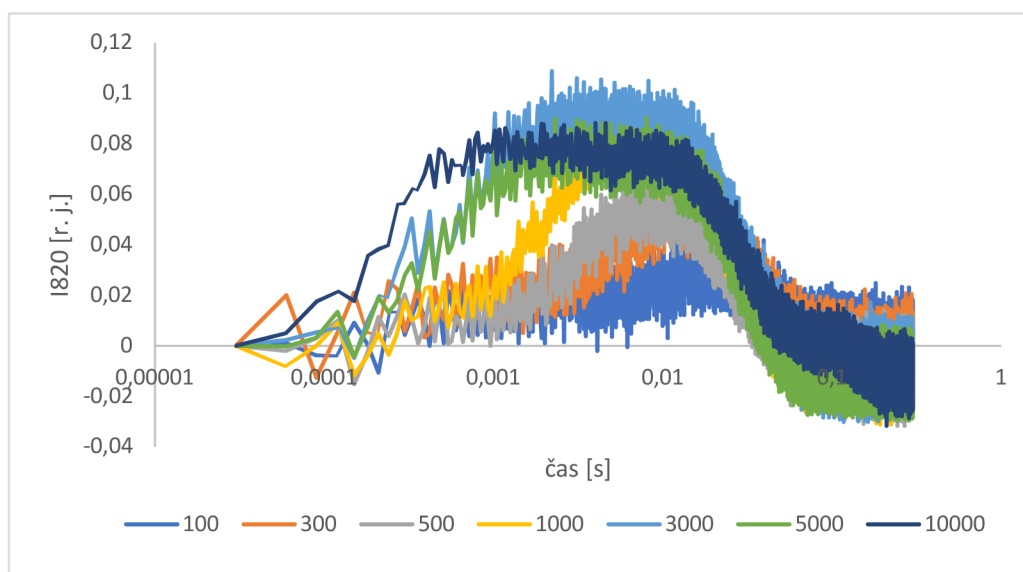
Obrázok 6: Priebeh krivky fluorescencie chlorofylu pri izbovej teplote pre rôzne intenzity osvetlenia (časová os má logaritmické delenie).

Pri nízkych intenzitách 100 , 300 a $500 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ má krivka slabo rozoznateľné všetky kroky O-J-I-P. Pri nízkych intenzitách sa objavuje J krok približne

v rovnakých časoch, okolo 50 ms. Postupne zvyšovaním intenzity na hodnotu 1 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dosiahol signál typický priebeh O-J-I-P krivky nameraný vo vyšších rastlinách. Pri vyšších intenzitách ako 3 000, 5 000 a 10 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ majú signály podobný priebeh. Viditeľne sa zvyšuje lokálne maximum v oblasti kroku O-J, ktorý odzrkadľuje redukciu primárneho akceptora Q_A v PSII. Pri najvyššej intenzite 10 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sa zároveň vzniknuté maximum posunulo výrazne vľavo ku kratším časom. Pri vyšších intenzitách sa krok J posunul ku kratším časom a začal sa objavovať už pod 1 ms.

5.1.2 I820

Na obrázku 7 je nameraný signál I820, ktorý sme namerali súčasne so signálom fluorescencie chlorofylu. Kinetika I820 odzrkadľuje redoxný stav P700 a Pc. Merania prebiehali pri izbovej teplote a zvyšujúcej sa intenzite osvetlenia vzorku počas prvej sekundy po osvetlení červeným svetlom.



Obrázok 7: Priebeh signálu I820 pri konštantnej izbovej teplote pre rôzne intenzity osvetlenia (časová os má logaritmické delenie).

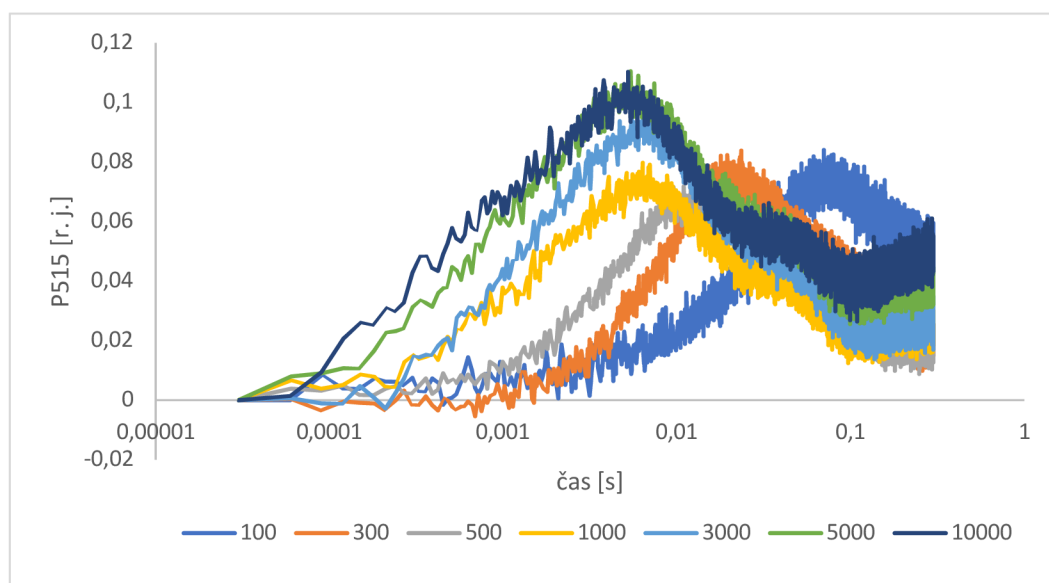
Nárast krivky odzrkadľuje vznik oxidovaného Pc^+ a oxidovaných centier $P700^+$ v PSI, a zároveň ich následnú redukciu. Na priebehoch kriviek postupne od najnižšej intenzity 500 až po hodnotu 10 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ môžeme vidieť ako sa dvíhajú postupne rýchlosti nárastov kriviek a vznik maxima sa posúva vľavo ku kratším časom (približne v časoch od 0,5-5 ms). Najvyšší zistený pík sa ukazuje pri hodnote 3 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ približne pri hodnote 5 ms. Priebeh tejto krivky je zároveň veľmi podobný

priebehu krivky pri hodnote $5\,000\ \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Pri hodnote $10\,000\ \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ pozorujeme výrazné zmeny v tvare a v priebehu signálu I820. Nárast krivky je rýchlejší, a zároveň maximum píku sa výrazne rozšíri.

Pc je rýchly donor elektrónov pre P700 v oxidovanom stave (P700⁺) a predpokladá sa, že P700 a Pc sú v kinetickej rovnováhe. Redukcia Pc⁺ a P700⁺ prebehne vďaka elektrónom prenášaným od PSII, čo sa na obrázku 2 odzrkadlilo v klesaní signálu po dosiahnutí maxima. V našich meraniach sa táto redukcia podľa výsledkov začala v čase približne 15 ms a bola ukončená v časoch okolo 50-60 ms. Z celkového priebehu môžeme usúdiť, že vznik oxidovaných molekúl P700⁺ a Pc⁺ sa zvyšuje, so zvyšujúcou sa intenzitou osvetlenia. Následná redukcia nastáva približne v rovnakých časoch pri všetkých intenzitách osvetlenia.

5.1.3 P515

Na obrázku 8 je zobrazený priebeh signálu P515, nameraný počas prvej sekundy po osvetlení pri izbovej teplote a dvíhajúcej sa intenzite. P515 odráža vzniknuté napätie na TM.



Obrázok 8: Závislosť signálu P515 pre rôzne intenzity osvetlenia pri izbovej teplote (časová os má logaritmické delenie).

Nárast signálu odzrkadľuje nahromadenie H⁺ iónov na lumenálnej strane TM, čo spôsobuje zvýšenie $\Delta\psi$ zložky pmf. Z priebehov signálov na obrázku 3 je viditeľné ako sa pri zvyšujúcej intenzite dvíha pík signálu a saturáciu vidíme pri hodnotách $5\,000$ a $10\,000\ \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ v (čase okolo 6 ms), ktoré majú veľmi podobný priebeh. Pri

nižších hodnotách intenzity sa postupne pík maxima presúval od dlhších časov okolo 70 ms (pri hodnotách 100 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ku kratším časom okolo 6 ms (pri 10 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pri meraní signálu je vidieť priamu závislosť medzi použitou intenzitou osvetlenia a nárastom signálu P515. Poklesy signálov po dosiahnutí maxima odzrkadľujú vo všeobecnosti prácu ATP-syntázy, a teda vznik ATP molekúl, zároveň prenos iónov (K^+ , Cl^-) cez TM.

5.1.4 Korelácia medzi fluorescenciou chlorofylu a P515:

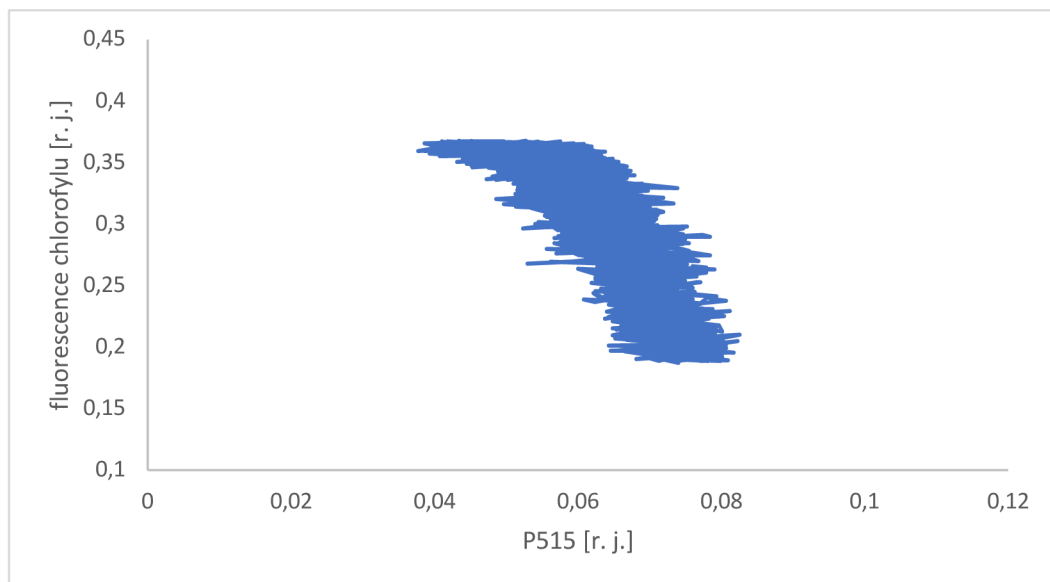
Pre porovnanie tvaru kriviek jednotlivých signálov (obrázok 6-8) pri daných intenzitách osvetlenia sme usúdili, že by mohla existovať lineárna závislosť medzi priebehom signálu P515 a príslušným priebehom fluorescencie chlorofylu, po dosadení maxima P515. Na nasledujúcej sérii obrázkov sú spracované spomínané vzájomné závislosti signálov P515 a fluorescencie chlorofylu. Lineárne závislosti medzi signálmi sú viditeľné pre intenzity od hodnoty 1 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a vyššie. Pri všetkých týchto intenzitách sme boli schopní namerať typický priebeh O-J-I-P krivky. Zároveň pri spracovaní bol ukazovateľom závislosti aj vypočítaný korelačný koeficient, ktorý je spracovaný v nasledujúcej tabuľke 1.

Tabuľka 1: Vypočítaný koeficient determinácie a korelačný koeficient medzi fluorescenciou chlorofylu a P515.

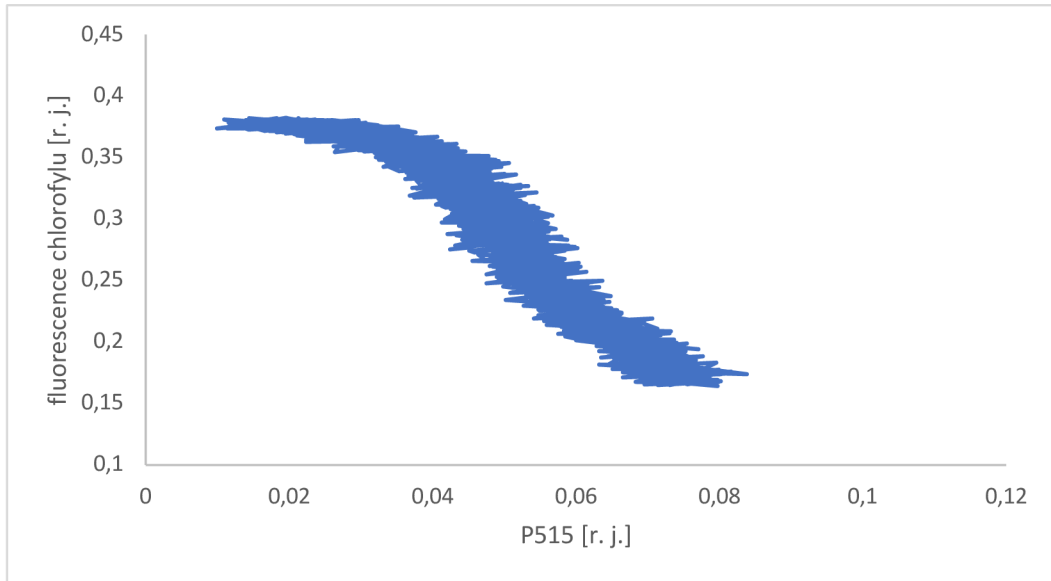
Intenzita osvetlenia ($\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1000	3000	5000	10000
Korelačný koeficient medzi fluorescenciou chlorofylu a P515	-0,945	-0,970	-0,956	-0,871
Koeficient determinácie	0,893	0,942	0,913	0,758

Postupne s narastajúcou intenzitou môžeme vidieť výraznejšiu závislosť (obrázok 9-15). Na obrázkoch 4, 5 a 6 sú ukázané korelácie pri nízkych intenzitách. Už z tvaru vykreslených kriviek môžeme pozorovať slabšie závislosti oproti vyšším intenzitám od hodnoty 1 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Práve kvôli slabším závislostiam sme koeficienty pre najnižšie intenzity 100, 300 a 500 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nezpracovali korelačný koeficient do tabuľky 1. Pri týchto intenzitách mal vzdialenejšiu hodnotu od mínus 1, ako to bolo pri vyšších intenzitách. Približovanie sa ku hodnote mínus 1 nám hovorí o tom, že ak signál P515 v určitom čase klesá (narastá) tak signál fluorescencie naopak bude narastať (klesať). Pokles signálu P515 odzrkadľuje takisto pokles $\Delta\psi$, a teda

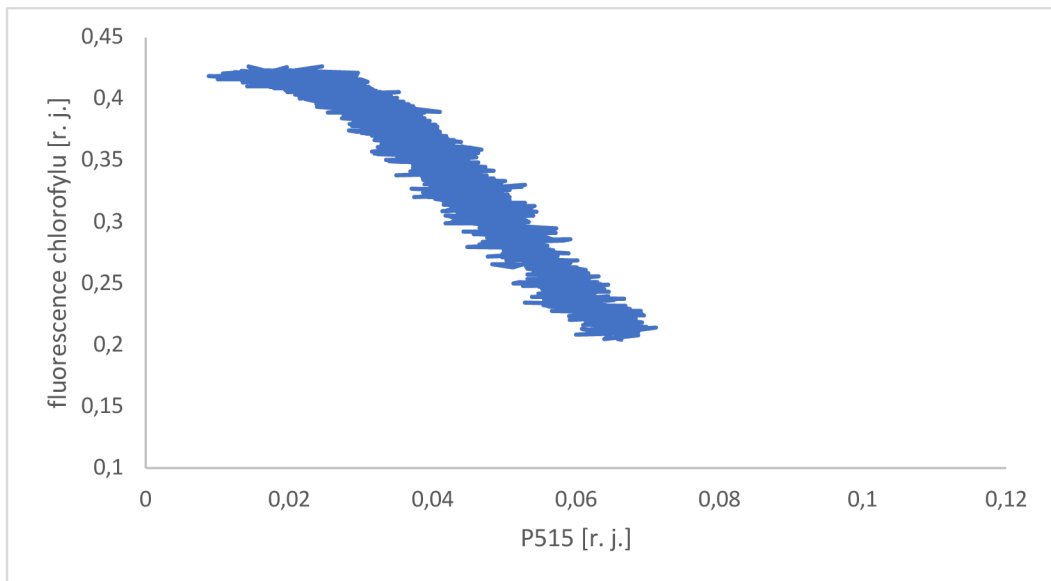
vyrovnávanie náboja na oboch stranách TM, zatiaľ čo fluorescencia odráža dej v PSII. Ku vyrovnaniu náboja na oboch stranách TM prispieva viac faktorov. Pri ETC sa najskôr H^+ ióny hromadia v luméne vďaka rozkladu molekúl vody, ktorý prebieha v OEC komplexe napojenom na PSII. Okrem iónov sa z OEC a rozkladu vody využívajú elektróny pri presune cez ETC vo PSII. Ďalší nárast množstva H^+ iónov v luméne súvisí aj s prácou PQ v PQ-poole, ktorý ovplyvňuje zároveň prenos elektrónov na cyt b_6/f . Maximálna akumulácia H^+ v luméne približne odpovedá maximu v krivke P515. Následný pokles P515 je spôsobený odtokom H^+ cez ATP-syntázu, umožňujúcu tvorbu molekúl ATP. Ďalšie faktory, ktoré prispievajú ku rozptylu napätia na TM sú príslušné toky K^+ a Cl^- cez TM.



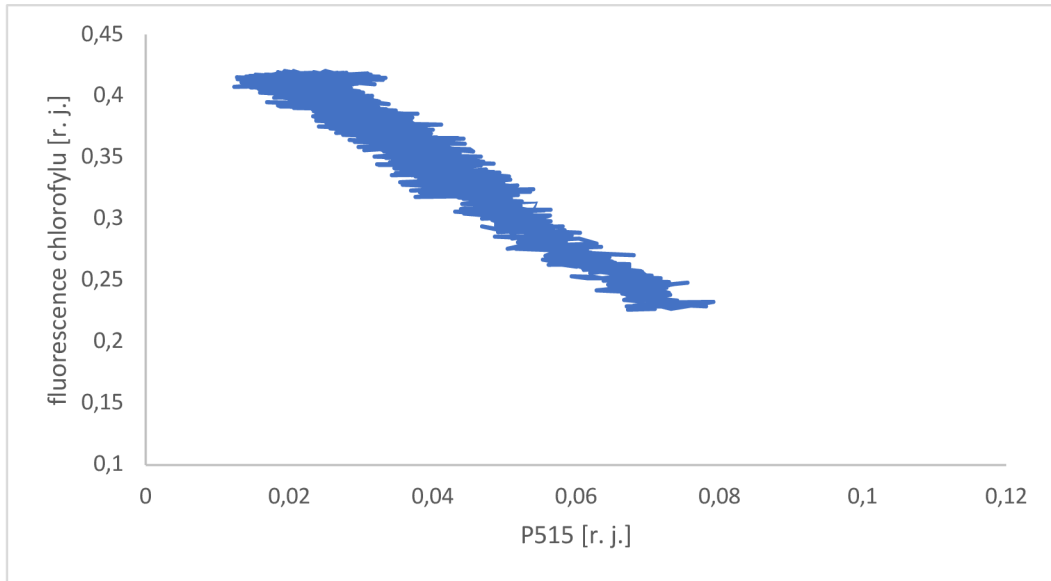
Obrázok 9: Závislosť fluorescencie chlorofylu na signáli P515 pri intenzite $100 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



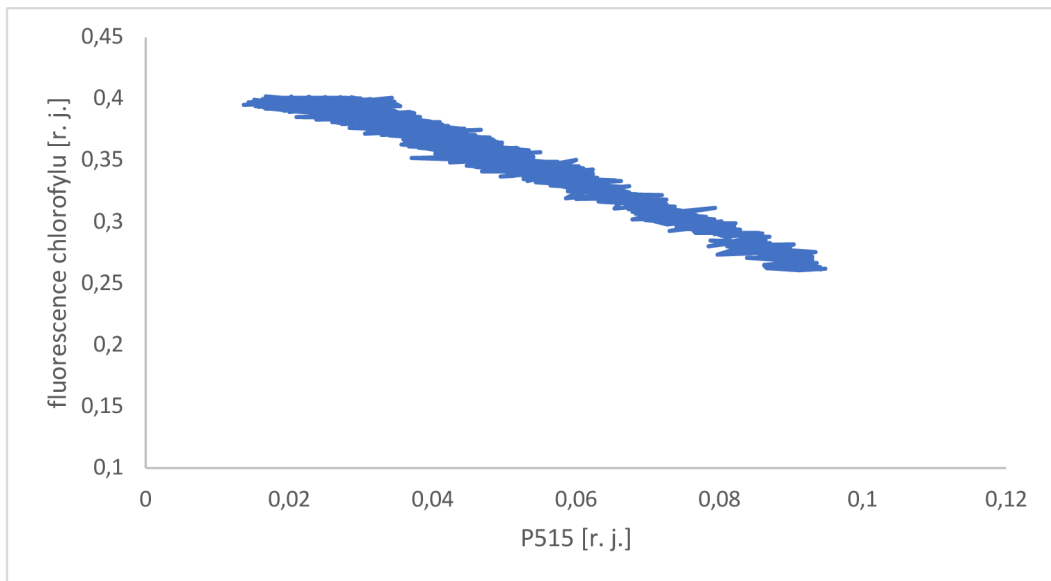
Obrázok 10: Závislosť fluorescencie chlorofylu na signáli P515 pri intenzite $300 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



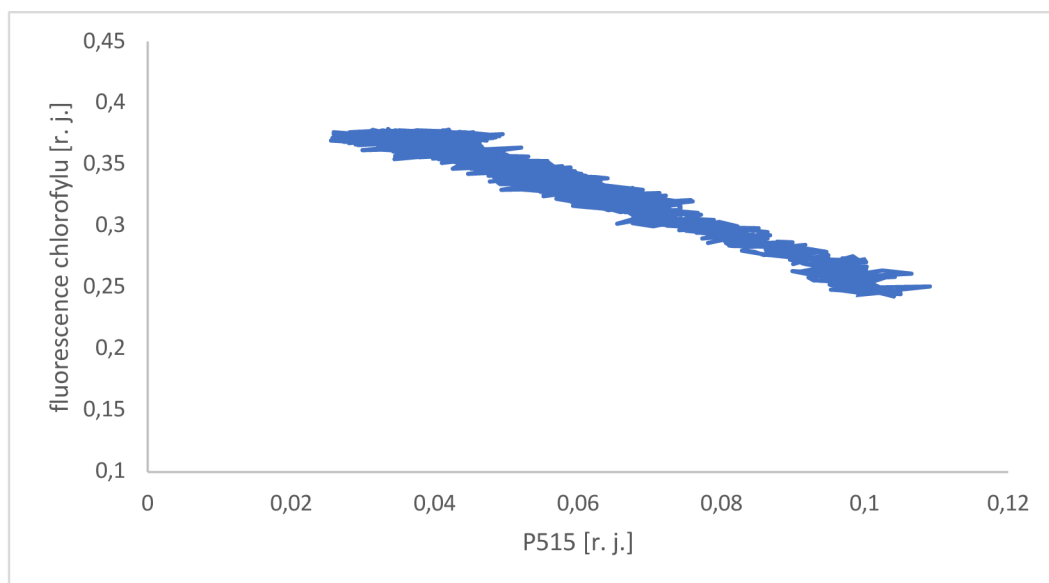
Obrázok 11: Závislosť fluorescencie chlorofylu na signáli P515 pri intenzite $500 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



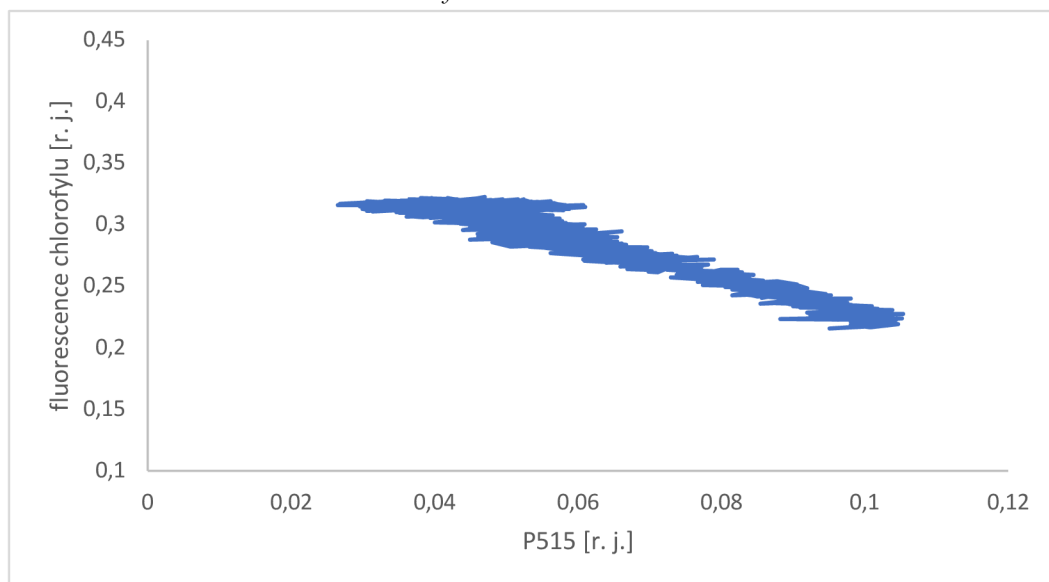
Obrázok 12: Závislosť fluorescence chlorofylu na signáli P515 pri intenzite $1000 \mu\text{mol}$ fotonov $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Obrázok 13: Závislosť fluorescence chlorofylu na signáli P515 pri intenzite $3000 \mu\text{mol}$ fotonov $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Obrázok 14: Závislosť fluorescencie chlorofylu na signáli P515 pri intenzite $5000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Obrázok 15: Závislosť fluorescencie chlorofylu na signáli P515 pri intenzite $10\,000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

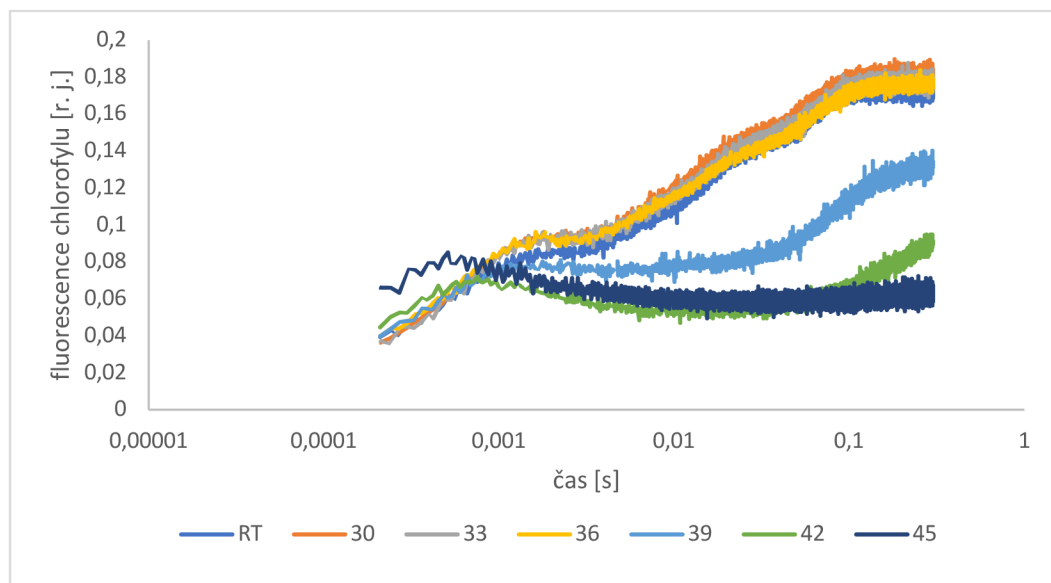
5.2 Teplotná závislosť

V nasledujúcich sériách meraní sú zaznamenané signály P515, fluorescencia chlorofylu a I820 v tme adaptovaných listoch *Arabidopsis* divokého typu. Merania prebiehali pri konštantnej intenzite osvetlenia a postupne sa dvíhajúcej teplote (inkubácia v tme pri danej teplote prebiehala po dobu 15 minút pred meraním).

5.2.1 Fluorescencia chlorofylu

Na obrázku 16 je zobrazená nameraná fluorescencia chlorofylu pri intenzite $1\,000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a dvíhajúcej sa teplote ako pri predchádzajúcich dvoch meraniach.

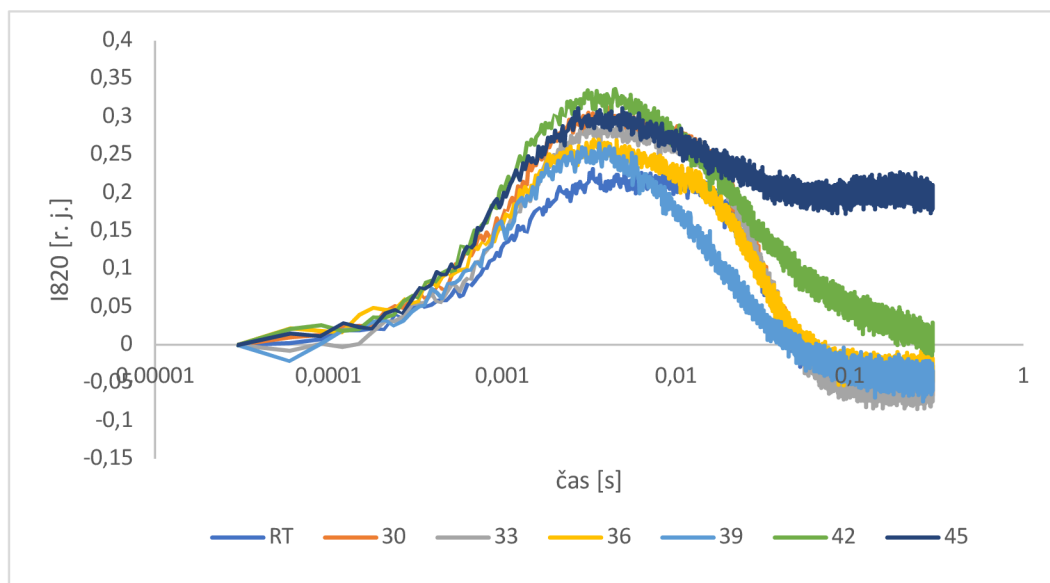
Pri izbovej teplote fluorescencia vzniká a pochádza z PSII, jej nárast odráža časovo závislú akumuláciu redukovaného elektrónového akceptora Q_A . Postupným zvyšovaním teploty do 36°C sa priebeh krivky výrazne nezmenil a sú rozoznateľné všetky kroky O-J-I-P. Pri 39°C sa krivka výrazne znížila a z klasického priebehu O-J-I-P je vidieť dosiahnutie J kroku, a následne až P krok. Pri najvyšších teplotách 42°C a 45°C krivka už nemá vôbec klasický priebeh O-J-I-P fluorescencnej krivky, vzniklo maximum medzi krokmi O a J. Tento jav poukazuje na vytvorenie medzikroku K, jeho objavenie môžeme brať ako indikátor nefunkčnosti OEC.



Obrázok 16: Priebeh krivky fluorescencie chlorofylu pre rôzne teploty a pri stálej intenzite osvetlenia (časová os má logaritmické delenie).

5.2.2 I820

Na nasledujúcom obrázku 17 je zaznamenaný signál I820 pri konštantnej intenzite $1\,000\ \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ a postupnom teplotnom zvyšovaní ako to bolo pri signáli P515. Z teoretických poznatkov vieme, že tento signál odzrkadľuje oxidáciu RCI a oxidáciu Pc. Naše merania prebiehali počas prvej sekundy po osvetlení. Prvá krivka bola nameraná pri izbovej teplote, čo znamená aj bez akéhokoľvek abiotického stresu na rastlinných vzorkách. Pri 30°C a 33°C sa píky vytvárajú približne v rovnakom čase (približne 4 ms), ako to bolo pri izbovej teplote, a zároveň krivky sú vyššie a majú pozorovateľne rýchlejší nárast. Pri 36°C je pík viditeľne nižší, a zároveň sa rozšíril oproti nižším teplotám. Pri najvyšších teplotách 42°C a 45°C sa opäť zvýšila krivka, ale pri 45°C je signál už nasýtený.

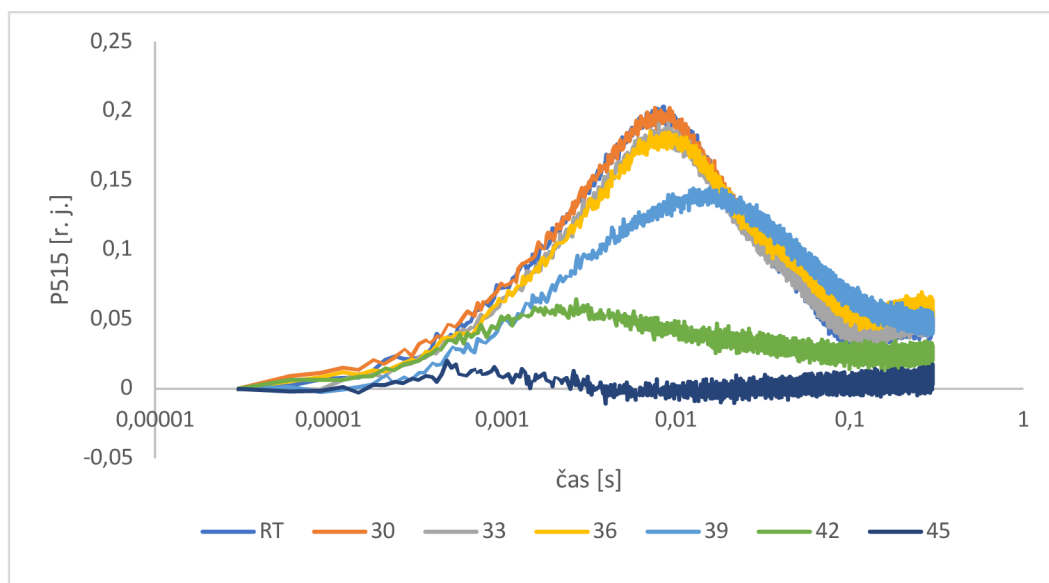


Obrázok 17: Priebeh signálu I820 pre rôzne teploty a pri stálej intenzite osvetlenia (časová os má logaritmické delenie).

Sklon nárastu krivky sa zvýšením teploty zväčšuje, čo odzrkadľuje rýchlejšiu reoxidáciu P700 a Pc a rýchlejšiu akumuláciu P700⁺ a Pc⁺. Klesanie po dosiahnutí maxima odzrkadľuje následnú redukciu P700⁺ a Pc⁺ pomocou elektrónov z PSII. Pri izbovej teplote je maximum rozšírené a pro teploty 30–36°C sa začína „zadná“ časť pôvodného širokého maxima znižovať. Pre teplotu 39°C, a nasledujúce vyššie teploty sa dosiahnuté maximum posunulo ku kratším časom. Pre teplotu 45°C je pokles za maximom malý, čo naznačuje nedostatok elektrónov prichádzajúcich z PSII. Tento efekt následne môže naznačovať jeho nefunkčnosť, pravdepodobne spôsobenú inhibíciou OEC pri danej teplote.

5.2.3 P515

Na obrázku 15 môžeme pozorovať zmenu signálu P515 pri intenzite 1 000 μmol fotónov $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a postupným zvyšovaním teploty cez RT, 30°C, 33°C, 36°C, 39°C, 42°C až po 45°C. Intenzita 1 000 μmol fotónov $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bola vybraná zámerné, pretože sa pri nej a pokojovej teplote meria typický priebeh O-J-I-P krivky (obrázok 6).



Obrázok 18: Závislosť signálu P515 pro rôzne teploty a pri stálej intenzite osvetlenia (časová os má logaritmické delenie).

P515 odzrkadľuje tvorbu $\Delta\psi$ na TM, ktorú zapríčiňujú nahromadené H^+ v luméne, v priebehu fotosyntézy. Klesanie a sklon krivky odzrkadľuje prácu ATP-syntázy a jej zapojenie sa do priebehu fotosyntézy, ktorá spotrebuje nahromadené H^+ pre následnú tvorbu molekúl ATP. V poklese signálu sa prejavuje aj tok K^+ a Cl^- iónov cez TM.

Pri teplotách do $36^\circ C$ sa maximum objavuje v rovnakom čase (približne 8 ms) a priebeh signálov je podobný. Prelomovou teplotou v našom meraní bolo $39^\circ C$, pri ktorej sa viditeľne pík posunul vpravo ku dlhším časom (približne 17 ms) a signál mal pomalší nábeh aj menší sklon. Pomalšie dosiahnutie signálu a nižšie maximum odzrkadľuje spomalenie nahromadenia H^+ iónov, a teda zmenšenie $\Delta\psi$ zložky pmf. Ďalším zvyšovaním až na $42^\circ C$ a $45^\circ C$ môžeme tieto teploty považovať naproti signálu zameraného pri izbovej teplote, za kritické pre tvorbu $\Delta\psi$ na TM. Píky sa výrazne posunuli ku kratším časom a sú nižšie. Krivky nemajú už tak výrazne nárasty a klesania, a zároveň pri najvyššej teplote $45^\circ C$ je signál už takmer úplne nulový. Predpokladáme, že pri tejto teplote sa signál vytratí, čo hovorí o minimálnom až takmer nulovom $\Delta\psi$ na TM, a súčasne koncentrácia iónov na stranách TM je vyrovnaná.

5.2.4 Korelácia medzi fluorescenciou chlorofylu a P515

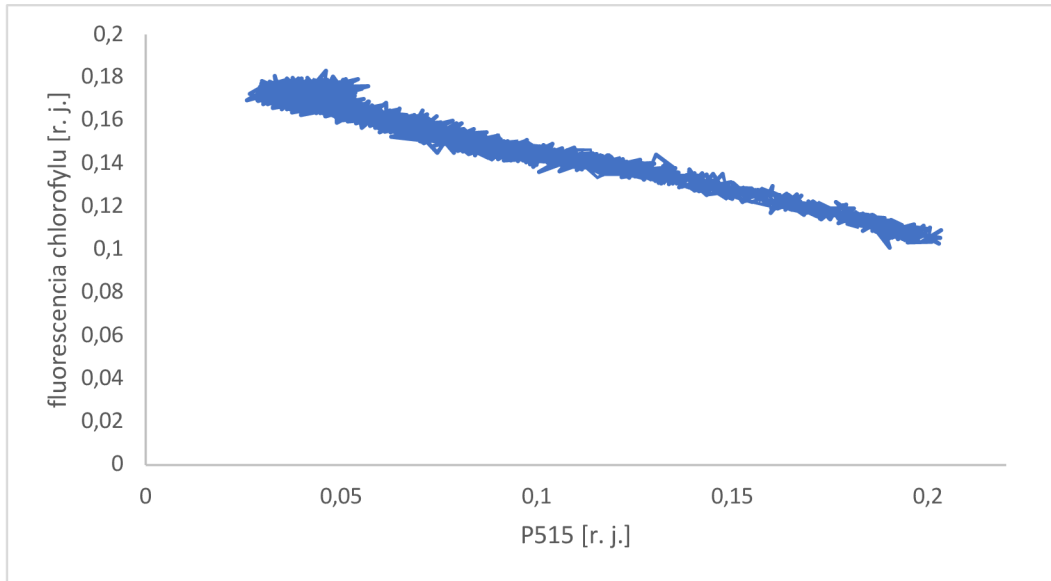
Na základe výsledkov merania fluorescencie chlorofylu, I820 a P515 v závislosti na intenzite osvetlenia prezentovaných v predchádzajúcej kapitole, sme sa v tejto časti už cielene sústredili len na korelácie. Spracovali sme korelácie medzi zmenami vo

fluorescencii chlorofylu a P515, a to opäť v časoch po dosiahnutí maxima v P515. Na nasledujúcich obrázkoch (19-22) sú spracované príslušné závislosti medzi signálmi P515 a fluorescenciou chlorofylu, v závislosti na predchádzajúcej teplotnej inkubácii. Prezentované výsledky sú už len pri vybraných teplotách (izbová teplota až 36°C), pri vybraných teplotách je viditeľná lineárna závislosť medzi danými signálmi. Ako je vidieť z výsledkov závislosti fluorescenčnej krivky sú istým spôsobom odzrkadlené v absorpčných zmenách pri 515 nm. Pre potvrdenie závislosti sme využili výpočet korelačného koeficienta, ktorý je spracovaný v tabuľke 2.

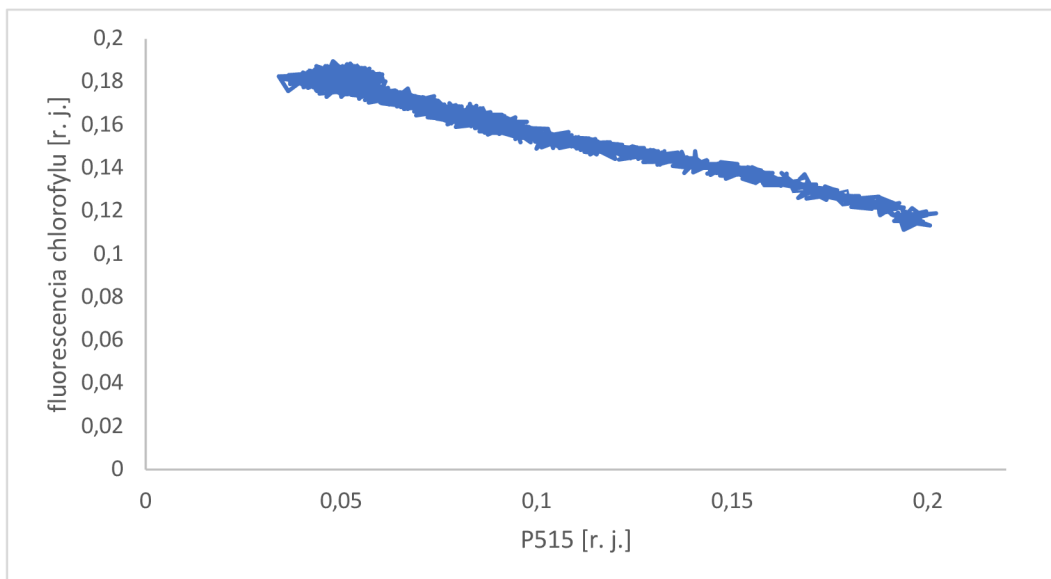
Tabuľka 2: Vypočítaný koeficient determinácie a korelačný koeficient medzi fluorescenciou chlorofylu a P515

Teplota pri priemerovaní	RT	30°C	33°C	36°C
Korelačný koeficient medzi fluorescenciou chlorofylu a P515	-0,965	-0,978	-0,955	-0,966
Koeficient determinácie	0,931	0,957	0,913	0,933

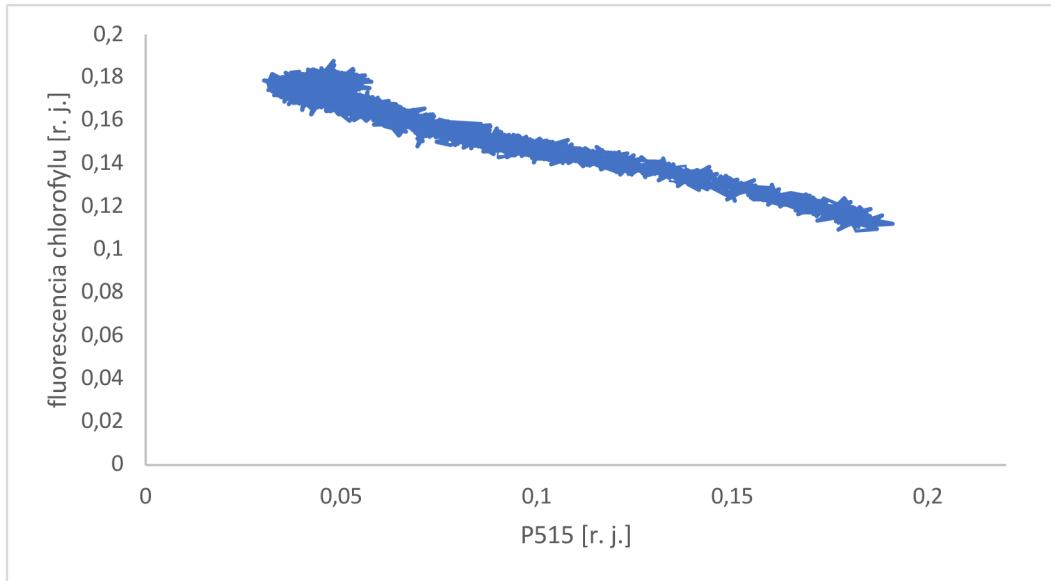
Celkovo hodnoty veľmi blízke mínus 1 zistené pri všetkých teplotách, okrem najvyšších teplôt 39°C, 42°C a 45°C (nie sú zobrazené), nám hovoria o výrazne nepriamej závislosti. Môžeme teda povedať, že keď jeden signál v čase bude stúpať druhý bude v tom istom čase klesať. Podľa korelačného koeficientu, ktorý sa najviac blížil ku hodnote mínus 1, najväčšia vzájomná závislosť bola zistená pri teplote 30°C na obrázku 17. Pri vyšších teplotách ako 33°C a 36°C sa korelačný koeficient síce zmenil, ale len v hodnotách o stotiny.



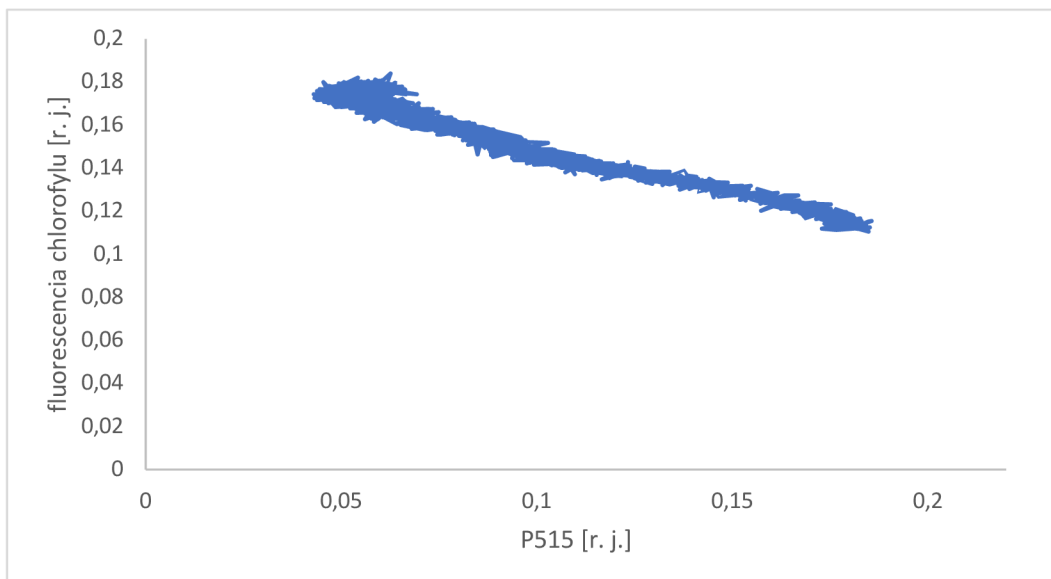
Obrázok 19: Závislosť fluorescencie chlorofylu na P515 pri izbovej teplote.



Obrázok 20: Závislosť fluorescencie chlorofylu na P515 pri 30°C.



Obrázok 21: Závislosť fluorescencie chlorofylu na P515 pri 33°C.



Obrázok 22: Závislosť fluorescencie chlorofylu na P515 pri 36°C.

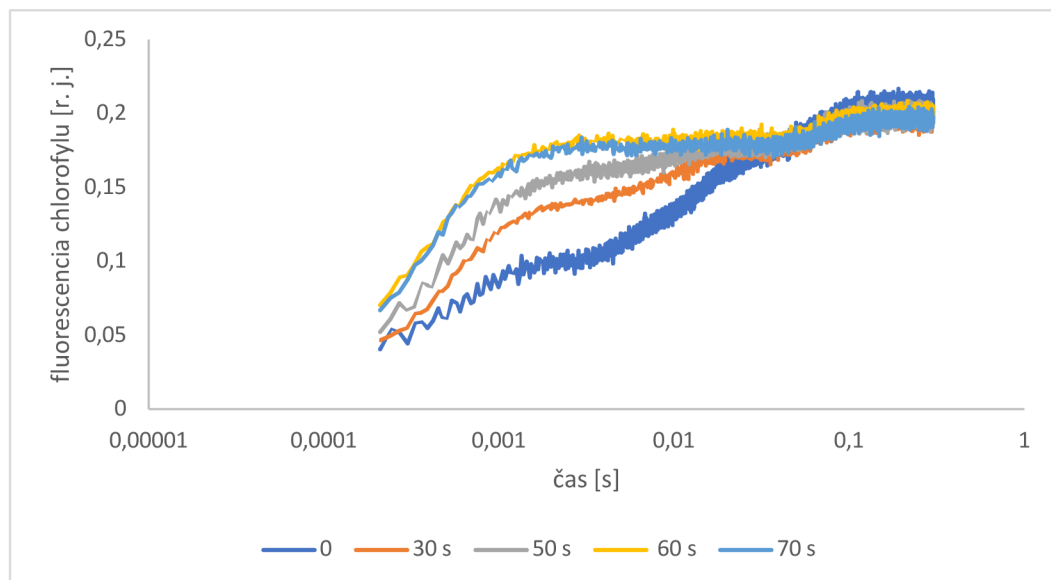
5.2.5 Viacnásobné meranie so zatemňovacou fázou

V poslednej časti výsledkov sme využili ďalší spôsob ako ovplyvniť stav prenosu, a tým aj tvar kriviek troch meraných signálov, elektrónov a protónov cez TM a aplikovali ho na naše merania. Museli sme uskutočniť viacnásobné merania, ktoré boli oddelené zatemňovacou fázou. Séria meraní bolo uskutočnená pri izbovej teplote a konštantnej intenzite osvetlenia $1\,000\ \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

Pri vzorke adaptovanej na tmu v čase 0 s prebehlo prvé meranie daného signálu. Potom bola vzorka ponechaná 30 s v tme a prebehlo ďalšie meranie. Pred nasledujúcim

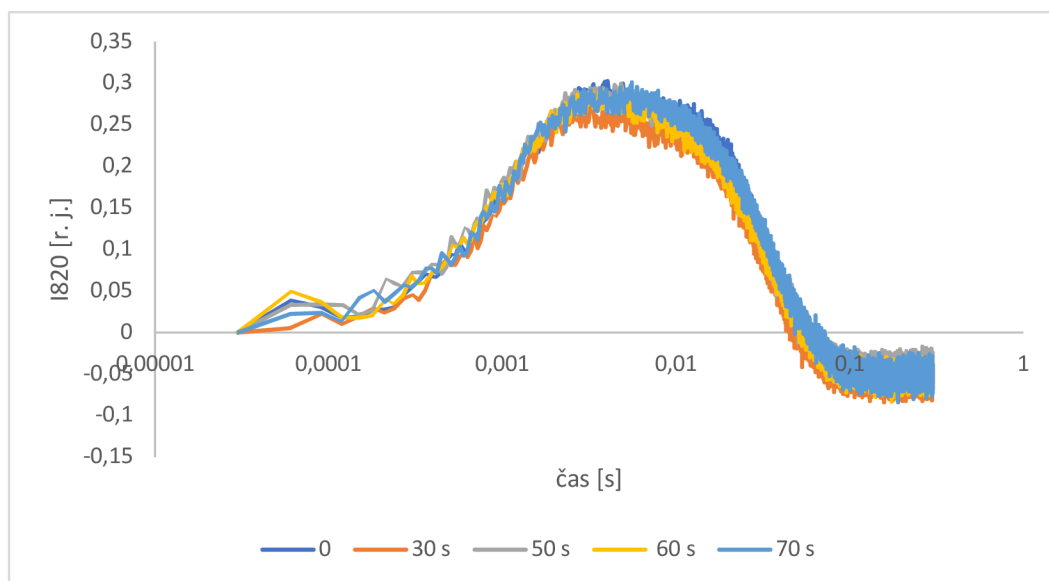
meraním sa vzorka ponechala v tme počas 20 s. Potom nasledovala doba 10 s v tme a opäť nasledovalo ďalšie meranie, atď. Vzorka bola teda postupne osvetlená v časoch 0, 30 s, 50 s, 60 s, 70 s, a postupne až po 120 s. V takto navrhnutom meraní došlo po prvom osvetlení ku zredukovaniu reťazca prenosu elektrónov, ktorý sa následne v tme zas oxidoval. Z priebehu nameraných kriviek sme usúdili, že táto oxidácia však nebola úplná. Neúplná oxidácia spôsobila to, že pri následnom osvetlení vzorku bola časť reťazca prenosu elektrónov už na začiatku zredukovaná a prejavilo sa to aj v príslušných zmenách meraných signálov.

Na nasledujúcich obrázkoch sú výsledky zmeraných signálov a to do meracieho času 70 s. Následné merania už nevykazovali žiadne ďalšie zmeny vo fluorescencii chlorofylu a P515. Na nasledujúcom obrázku 20 sú výsledky z merania fluorescencie chlorofylu. V čase 0 s pozorujeme správne vykreslenú krivku O-J-I-P. Pri následných meraniach sa začal objavovať spoločný úkaz, a to nárast kroku J a pokles kroku P. Pri posledných meraniach počas 60 a 70 s, nastal ďalší úkaz ako vymiznutie kroku I.



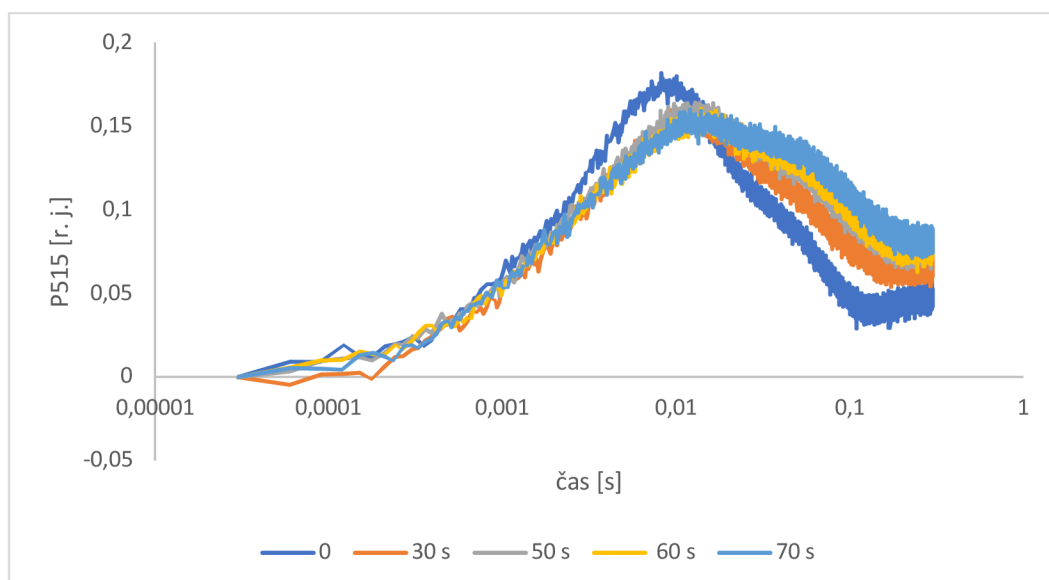
Obrázok 23: Priebeh signálu fluorescencie chlorofylu pri viacnásobnom meraní v daných časoch (časová os má logaritmické delenie).

Na obrázku 24 je spracovaný signál I820 pri viacnásobnom meraní do 70 s. Signál I820 ako jediný signál z nameraných vykazoval jednotný priebeh v rôznych časoch. Z tohto zistenia môžeme povedať, že oxidácia a následná redukcia P700 a Pc prebieha rovnako rýchlo bez ohľadu na množstvo predchádzajúcich osvetlení.



Obrázok 24: Priebeh signálu I820 pri viacnásobnom meraní v daných časoch (časová os má logaritmické delenie).

Na obrázku 25 je nameraný vývoj signálu P515 pri viacnásobnom meraní do 70 s. V čase 0 s dosiahol signál najvyšší pík, a zároveň nábeh signálu bol najvýraznejší. Tento efekt odzrkadľuje najrýchlejšie nahromadenie H^+ iónov. Pri následných meraniach sa nárasty kriviek medzi sebou výrazne nezmenili, ale vidieť zmeny pri klesaní. Tieto zmeny odrážajú pomalšiu funkciu ATP-syntázy a plus prenosu K^+ a Cl^- iónov cez TM.



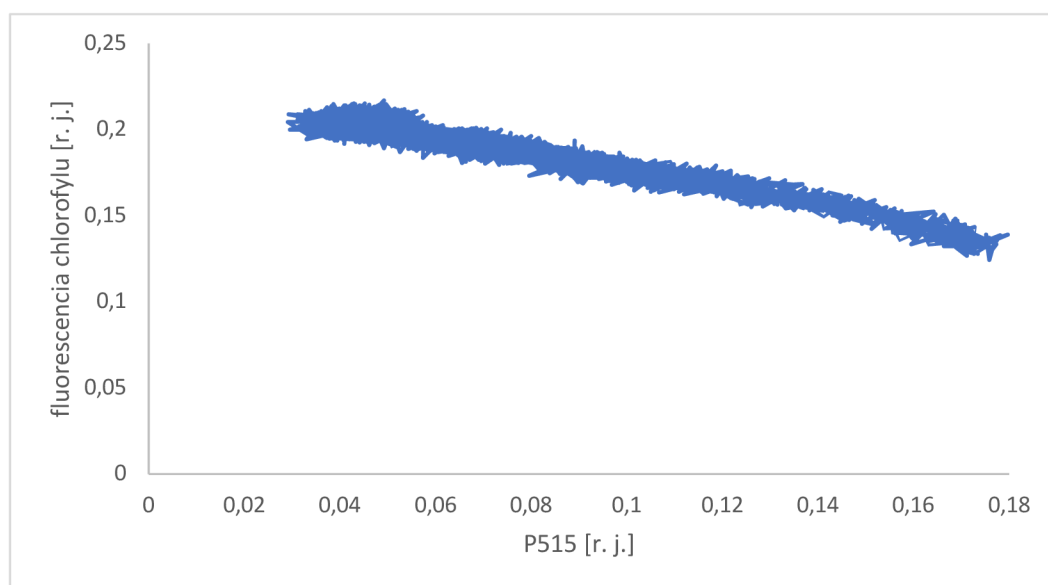
Obrázok 25: Priebeh signálu P515 pri viacnásobnom meraní v daných časoch (časová os má logaritmické delenie).

Na obrázkoch 26-30 sú zobrazené závislosti medzi fluorescenciou chlorofylu a P515 pre vyššie uvedené viacnásobné merania so zatemňovacou fázou do 70 s. Závislosti medzi signálmi sú opäť zobrazené pre časy po dosadení vzniknutého maxima v P515. Podobne ako aj pri predchádzajúcich prípadoch sme vypočítali korelačný koeficient a koeficient determinácie spracované v tabuľke 3.

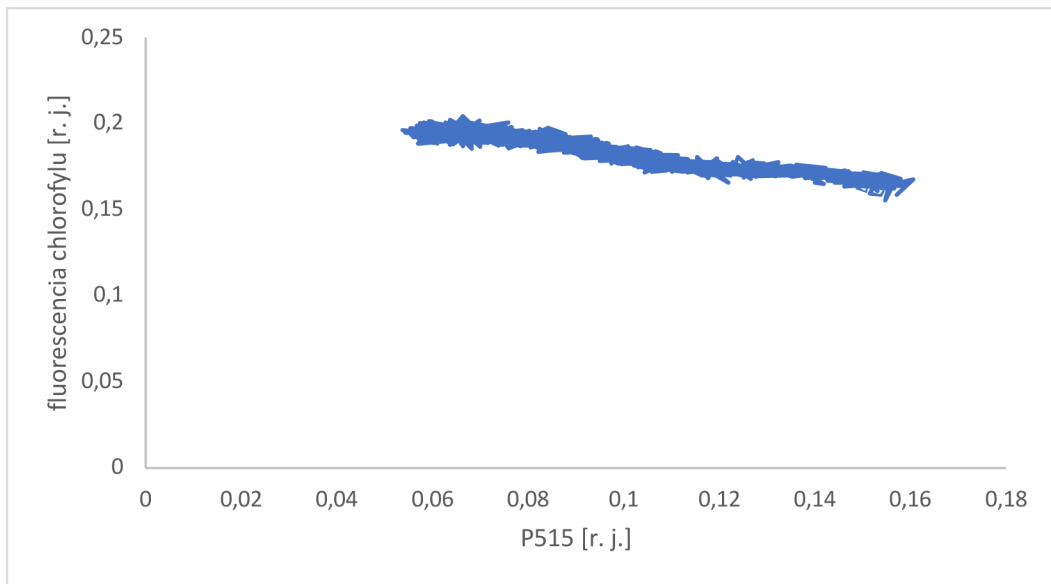
Tabuľka 3: Vypočítaný koeficient determinácie a korelačný koeficient medzi fluorescenciou chlorofylu a P515

Čas	0 s	30 s	50 s	60 s	70 s
Korelačný koeficient medzi fluorescenciou chlorofylu a P515	-0,942	-0,962	-0,899	-0,926	-0,920
Koeficient determinácie	0,887	0,925	0,807	0,857	0,847

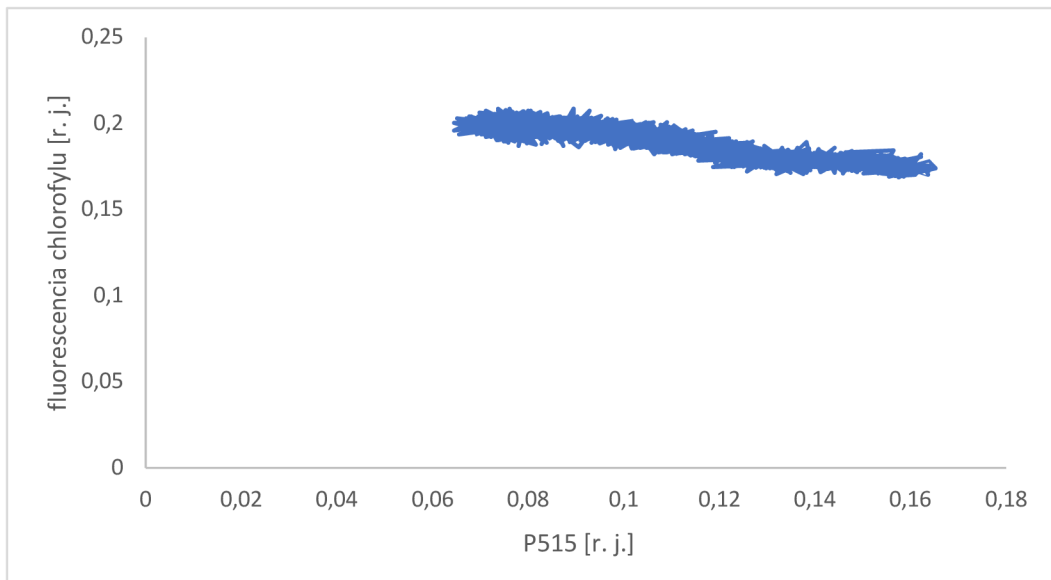
Grafy na obrázkoch a koeficienty v tabuľke 3 ukazuje, že síce pri postupnom meraní sa vzájomná lineárna závislosť fluorescencie chlorofylu na P515 mierne zhoršuje, avšak stále je prítomná. Tieto výsledky potvrdzujú aj predošlé merania, a to že existuje vzájomný vzťah medzi poklesom P515 po dosiahnutí jeho maxima a nárastom fluorescencie chlorofylu.



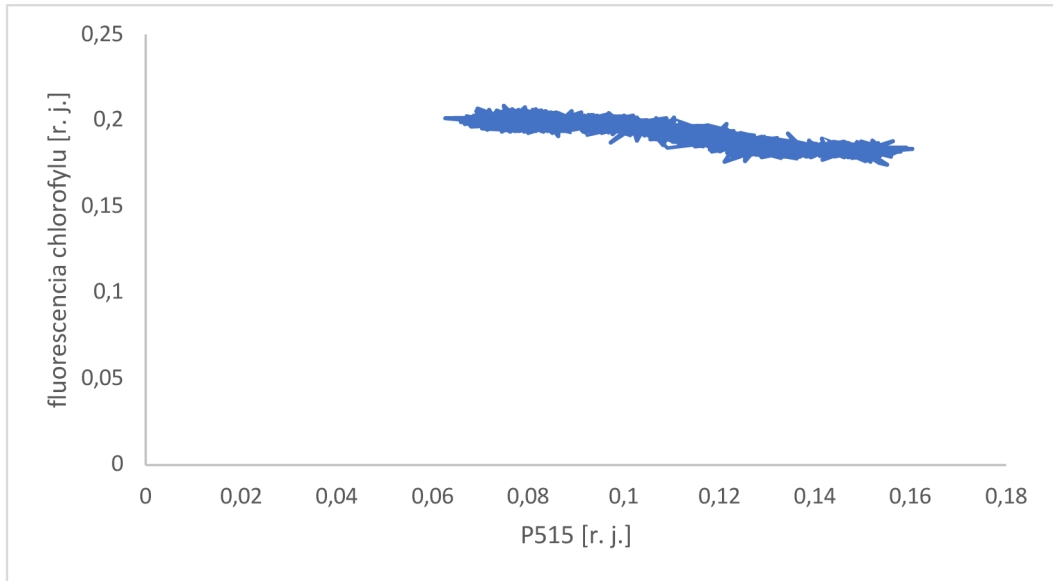
Obrázok 26: Závislosť medzi fluorescenciou chlorofylu a P515 v čase 0 s.



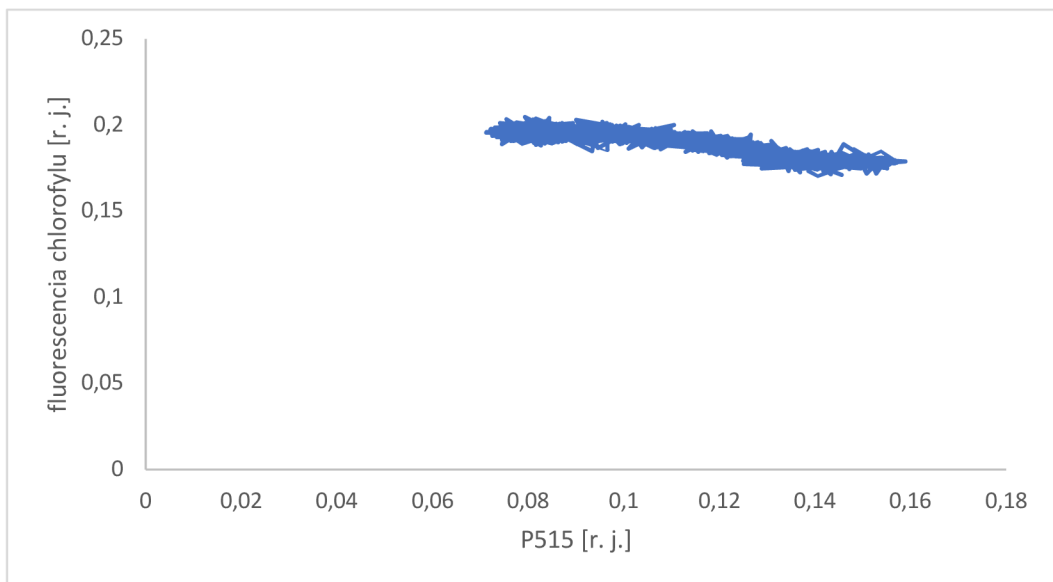
Obrázok 27: Závislosť medzi fluorescenciou chlorofylu a P515 v čase 30 s.



Obrázok 28: Závislosť medzi fluorescenciou chlorofylu a P515 v čase 50 s.



Obrázok 29: Závislosť medzi fluorescenciou chlorofylu a P515 v čase 60 s.



Obrázok 30: Závislosť medzi fluorescenciou chlorofylu a P515 v čase 70 s.

6. Diskusia

Harbinson a Hedley (1993) už vo svojej práci poukázali na vzájomné súvislosti medzi fluorescenciou chlorofylu a absorpčnými zmenami pri 820 nm. Menšia pozornosť v tomto smere bola venovaná vzájomnému ovplyvneniu signálu fluorescencie chlorofylu s absorpčnými zmenami pri 515 nm. Zdal sa nám preto vhodný krok sústrediť naše merania a pokúsiť sa odpovedať na otázky v tomto smere.

Pri našich experimentoch sme prihliadali, už na práce ktoré sa zaoberali ovplyvnením fluorescencie chlorofylu pomocou napätia ako napr. Pospíšil a Dau (2002), Bulychev (2011), Bulychev a kol. (2013). V žiadnej z uvedených prác sa však nereprezentovala vzájomná závislosť fluorescencie chlorofylu konkrétne na signáli P515.

6.1 Korelácia medzi P515 a fluorescenciou chlorofylu pri dvíhajúcej sa intenzite osvetlenia

Samostatné meranie rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu za zmeny intenzity osvetlenia poukázalo v našom prípade na rovnaké výsledky, ako to bolo napríklad pri podobných meraniach, ktoré prezentoval aj Schansker a kol. (2003). Pri nižších intenzitách ako vidíme na obrázku 1 sa zdá, že krok J a I sú nejasné a niekde aj chýbajú. Postupne zvyšovaním intenzity sú už viditeľnejšie vykreslené všetky O-J-I-P kroky. Prvá intenzita odzrkadľujúca každý krok krivky sa nám podarila namerať pri hodnote 1 000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na obrázku 1 a pri výpočte korelačného koeficienta v tejto intenzite sme namerali najväčšiu koreláciu so signálom P515 a predpokladali sme súvislosti.

Behom osvetlení vzorky sa zatvárajú RCII, čo znamená že P680 sa zoxiduje a Pheo je prechodne zredukované a rýchlo dochádza k prenosu elektrónu na Q_A , a tým pádom dôjde ku oxidácii Pheo. Redukcia Q_A umožní následný prenos v PSII, aby mohla nastať dvojelektrónová redukcia Q_B . Vytvorenie prvého medzikroku J v O-J-I-P krivke, teda popisuje redukciu Q_A , a čiastočne aj prenos elektrónov medzi Q_A a Q_B , ktoré pochádzajú z OEC a prechádzajúce cez YZ a Pheo. Po redukcii Q_B nastáva dvojelektrónová redukcia PQ, čo sa následne odzrkadlí v kroku I. Môžeme povedať, že tento krok teda odzrkadľuje naplnenie PQ-poolu elektrónmi v dôsledku viacnásobných obrátov PSII centier. Vytvorenie malej platô fáze takisto v tomto bode zodpovedá stavu, kedy proces redukcie PQ pomocou PSII a oxidácie PQH_2 komplexom cyt b_6/f dosiahne prechodnú rovnováhu (Kaminskaya a kol. 1994).

Podľa časového rozpätia v ktorom sme korelácie spracovali, by sa mali nachádzať práve v čase dosiahnutia spomínaného I kroku pri fluorescencii, a zároveň počas klesania

signálu P515 po dosadení jeho maxima. Pri O-J-I-P krivke je toto obdobie nárastu signálu fluorescencie chlorofylu, kde sa dosiahnutím P kroku dosiahne aj maximálnej úrovne zatvorenia RCII. Pri pohľade na signál P515 v tom istom čase sa nachádzame v krivke pri klesaní signálu. Klesanie pri krivke P515 primárne opisuje prácu ATP-syntázy, ktorá nahromadené H^+ ióny v luméne využíva v prospech svojej funkčnosti. Túto súvislosť môže odzrkadľovať aj nameranie lokálneho maxima v klesaní P515 pri vyšších intenzitách, ktoré sa objavuje približne v rovnakom čase ako I krok pri fluorescencii chlorofylu. Pre vznik ATP molekúl je potrebný najmä nepretržitý zdroj H^+ iónov v luméne. Ku acidifikácii luménu pomocou H^+ iónov prispievajú procesy ako rozklad vody v OEC a prenos H^+ iónov zo strómy do luménu pomocou PQH₂.

ATP-syntáza všeobecne využíva ku svojej činnosti celú pmf, pozostávajúcu z vytvoreného ΔpH a $\Delta\psi$. Elektrickú zložku $\Delta\psi$ odzrkadľuje signál P515. Vytvoreniu pmf závisí aj od LET a CET. Pri LET sa redukuje NADP⁺, kde končia H^+ ióny v stróme a pri CET sa generuje pmf recykláciou elektrónov z Fd do PQ-poolu (I-P krok). V náraste kroku I-P je poukázaný spomalený prenos elektrónov medzi PSII a PSI, v dôsledku vytvárania ΔpH . Čo nás privádza späť ku možnému prepojeniu týchto dvoch signálov. Vieme, že koordináciou CET a LET sa vyvažuje produkcia ATP a NADPH a optimalizácia tohto pomeru je vyžadované pre CB-cyklus.

Musíme brať do úvahy, že do zložky $\Delta\psi$ prispieva viac faktorov. Celkové $\Delta\psi$ pozostáva z napätia spôsobeného transportom elektrónov vo vnútri multiproteínových komplexov (PSII, cyt *b₆/f*, PSI). Ďalšia zložka celkového $\Delta\psi$ je spôsobená redistribúciou všetkých mobilných iónov H^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- a zápornými nábojmi na povrchu TM. Práve negatívne fixné náboje na povrchu membrány a kationy v objeme strómy a luménu vytvárajú ešte ďalší elektrický potenciál na povrchu membrány (Barber a kol. 1977), ktorý musíme brať do úvahy pri popise P515. Celý predpoklad pre tento signál je, že eflux kationov K^+ a Mg^{2+} a opačný vtok aniónov Cl^- cez TM prispieva ku vyváženiu svetlom indukovaného pumpovania H^+ , čím sa optimalizuje fotosyntéza.

Iónové kanály sú kľúčové pre elektrickú signalizáciu a ovplyvňovanie veľkosti $\Delta\psi$. Elektrofyziologické údaje získané z listov suchozemských rastlín alebo rias potvrdili, že TM obsahuje rôzne typy iónových kanálov. Čím je negatívnejší elektrický potenciál v luméne oproti stróme, tým viac kationov sa pohybuje zo strománlej strany na lumenálnu stranu. Tieto fakty súhlasia s výrokom, že kationové efluxy slúžia najmä na disipáciu $\Delta\psi$ (Barber a kol. 1977), a teda zmenšenie P515. Pričom sa pravdepodobne najprv H^+ ióny

z luménu transportovali do strómy, a naspäť do luménu prešli kotransportom K^+ zo strómy. Neskôr sa nahromadené K^+ presunú iným iónovým kanálom späť z luménu do strómy.

V zhrnutí zistení by sme hľadali prepojenie fluorescencie chlorofylu a P515 pravdepodobne cez PQ-pool pretože je to časť ETC, kedy sa H^+ ióny dostávajú do luménu a následne vzrastá podľa predchádzajúcich tvrdení elektrický potenciál na vnútornej strane TM. Pravdepodobne práca ETC, ktorá zabezpečuje vznik krokov pri O-J-I-P krivke má dopad na tvar P515. Toto bol jeden z predpokladov, prečo sme sa zamerali na vzájomné prepojenie týchto dvoch signálov práve v tomto bode. Influx H^+ prebieha v čase kedy sa tvaruje I krok, čo sme už spomínali. Tento prechod, a zároveň acidifikácia luménu môže mať dopad na vznik druhého maxima v našich meraniach. Vznik maxima aj opisuje menšie spomalenie práce ATP-syntázy, ktorá využíva práve H^+ ióny nachádzajúce sa v luméne, tým pádom vyrovnáva aj napätia ale aj prispieva aj ku vyrovnaniu ΔpH .

6.2 Korelácia medzi P515 a fluorescencie chlorofylu pri dvíhajúcej sa teplote

Vypracovaním tabuľky 2 sú podľa korelačných koeficientov určite súvislosti medzi signálmi P515 a fluorescencie chlorofylu pri takmer všetkých teplotách. Najvyššie merané a použité teploty už vykazovali úplnú stratu signálu, preto sme ich nebrali do úvahy. Od izbovej teploty až po $36^\circ C$ nám výsledky dostatočne ukázali, že sú vzájomne ovplyvňované aj pri zvyšujúcej sa teplote, tak ako to bolo pri intenzite (obrázok 19-22). V časovej mierke sa súvislosti nachádzali opäť v čase reoxidácie PQ-poolu (pri O-J-I-P) a práce ATP-syntázy (P515), ako to bolo pri dvíhajúcej sa intenzite.

Wang a kol. (2006) ukázali, že ΔpH sa pri použití vysokom abiotickom strese významne potláča, ako bolo aj v našich meraniach pri vysokej teplote. Produkcia ΔpH je ako sme už spomínali spojená s tvorbou ATP molekúl a generovanie prebieha cez ATP-syntázu, čo sa odzrkadľuje na menšom napätí, menšom signáli P515 na TM a zníženie v rámci celej pmf. Saturácia signálu P515 pri dvíhajúcej sa teplote nastala pri $30^\circ C$ (obrázok 6), od tejto hodnoty sa výška maxima znižovala. Z poklesu signálu P515 boli založené aj merania zisťujúce aktivitu ATP-syntázy a integritu membrány po záblesku svetla. Hlavnou myšlienkou bolo, že rozpad signálu udáva mieru efluxu H^+ cez kanál ATP-syntázy. Záblesk svetla teda vyvolá elektrické pole separáciou náboja vo fotosystémoch a cyklickým prenosom elektrónov cez cyt b_6/f .

Pri O-J-I-P krivke nastala saturácia signálu pri rovnakej teplote ako pri P515, a to pri 30°C. Z merania fluorescencie chlorofylu je vidieť zníženie maximálnej fluorescencie, a tým aj klesajúci fotochemický výťažok reakcie pod zvyšujúcou sa teplotou. Pri meraniach s použitím tepelného stresu sa pri O-J-I-P krivke vytvorilo lokálne maximum bod v čase približne 0,9 ms. Vytvorenie ďalšieho medzikroku v O-J-I-P krivke pri vyšších teplotách môžeme pripísať vzniku K kroku. Z predchádzajúcich štúdií sa zistilo, že tento K krok odráža postupnú inhibíciu OEC, ako aj pokles rýchlosti fotochemických procesov (Gururani a kol. 2015). V ďalších experimentoch bolo hlásené, že K krok naznačuje závažnú dezorganizáciu PSII spôsobenú vysokou teplotou (Brestič a Živčák 2013.) Stres z vysokej teploty spôsobuje inhibíciu transportu elektrónov z Q_A do Q_B , nahromadené Q_A^- a $P680^+$ sa môžu rekombinovať, čo spôsobuje pokles fluorescencie chlorofylu po K kroku (Lazár 1999). K krok môžeme pripísať teplotne vyvolanej nerovnováhe medzi tokom elektrónov opúšťajúcim RCII smerom ku akceptorom a tokom elektrónov prichádzajúcim do RCII zo strany donoru (Strasser 1997).

6.3 Viacnásobné meranie so zatemňovacou fázou

Pri viacnásobnom meraní signálov od 0 s do 70 s sa pri fluorescencii chlorofylu vytvorila plató fáza dosiahnutím J kroku, tým pádom sa prechod medzi J a I krokom vytratil a spojil do jedného maxima. Dosiahnutie predĺženej plató fáze sa v tomto meraní asi predlžuje úmerne s veľkosťou redukovateľného PQ-poolu. Spomínaný PQ-poolu je ovplyvnený s CET, ktorý recykluje elektróny z Fd. Jedným z primárnych produktov CET je ΔpH , ako zložka pmf. Záverom pri tomto meraní môžeme povedať, že predlžujúca sa zatemňovacia fáza ukázala postupne sa predlžujúci spomínaný J-I krok. H^+ ióny v závislosti od svetla oddeľujú rýchlosť oxidácie PQ riadenú strómou a TM pri cyt *b_{6/f}*.

Prvé osvetlenie spôsobilo redukciu Q_A , PQ-poolu, a následné nasýtenie celého ETC elektrónmi. V následnej zatemňovacej fáze došlo ku oxidácii celého ETC, čo sa dá vysvetliť tokom elektrónov z Fd preč. Táto doba tmy však nebola dostatočne dlhá, čo spôsobilo neúplnú oxidáciu ETC. Najskôr po použitých 20 a 10 sekundách sa aplikoval ďalší svetelný pulz, čo spôsobilo rýchlejšie nasýtenie ETC elektrónmi, a to sa odrazilo v tvare krivky fluorescencie chlorofylu. Čiastočne zredukovaný ETC na začiatku následného osvetlenia potom príslušne ovplyvnilo aj ďalšie merané signály.

Zo spracovaných výsledkov viacnásobného merania do 70 s, sa objavené maximum premietlo aj do absorpcie pri 515 nm. Pri P515 sa objavilo aj menšie lokálne maximum v čase približne 22 ms, ako je vidieť na obrázku 19. Toto maximum sa objavilo

pri klesaní signálu a odzrkadľuje čiastočné spomalenie práce ATP-syntázy. Tento čas odpovedá pri O-J-I-P krivke kroku J, pri ktorom sa pri vyšších intenzitách vytvorilo spomínaná plató fáza alebo čiastočné nasýtenie signálu pri dlhších časoch. Závislosti sa na obrázkoch podľa časovej mierky vyskytujú najmä pri práci ATP-syntázy, takže v období klesania P515 a pri O-J-I-P krivke približne v čase výskytu maxima a následného ďalšieho rastu. Ku pozorovaným súvislostiam je pravdepodobné, že priebehy v TM sa vzájomne ovplyvňujú. V oboch signáloch dochádza ku väčšiemu nasýteniu postupne predlžovaním času zatemňovacej fázy.

6.4 Fyzikálny mechanizmus zmien fluorescence chlorofylu v závislosti na P515

V predchádzajúcom texte boli diskutované fyziologické súvislosti týkajúce sa súčasných zmien fluorescence chlorofylu a P515. Aká je ale fyzikálna podstata závislosti fluorescence chlorofylu na signáli P515?

Podľa niektorých predchádzajúcich teórii pri náraste $\Delta\psi$, spôsobeného nárastom protónov v luméne, súčasne narastá aj fluorescence chlorofylu. Na opačnej strane sú názory, podľa ktorých by efekt mal byť opačný. Podľa Dau a Sauer (1992) je nárast fluorescence chlorofylu, pri kladnom elektrickom potenciály luménu, vysvetlený poklesom rýchlostnej konštanty nábojovej separácie, v bode tvorby $P680^+Pheo^-$ z $P680Pheo$. S poklesom rýchlostnej konštanty nábojovej separácie dochádza ku akumulácii $P680^*$, a tým sa aj zväčšuje deaktivácia $P680^*$ pomocou emisie fluorescence. Iný názor prezentoval Davis a kol. (2016), podľa ktorého pri kladnom elektrickom potenciály luménu dochádza k nárastu rýchlostnej konštanty nežiarivej rekombinácie. Na základe tejto informácie by malo dôjsť k poklesu emisie fluorescence chlorofylu, pretože nežiarivá rekombinácia konkuruje žiarivej deaktivácii (emisii fluorescence). Davis a kol. (2016) sa však meraniam fluorescenciu chlorofylu vo svojej práci nevenovali. Podľa našich dát nameraných v tejto práci sa jasne ukazuje, že fluorescence chlorofylu rastie s poklesom P515, preto sa prikláňame k druhému názoru (Davis a kol. 2016). Fyzikálny mechanizmus zmien veľkosti spomenutých rýchlostných konštánt je potom zmena Gibbsovej voľnej energie (ΔG) daných reakcii spôsobená elektrickým potenciálom.

7. Záver

V tejto diplomovej práci boli zmerané časové závislosti signálov P515, I820 a fluorescencie chlorofylu. Všetky signály popisujú určité elektrické vlastnosti v rastlinách. Okrem fluorescencie chlorofylu produkovanou najmä PSII, zaznamenaný signál P515 odráža napätie na thylakoidnej membráne a signál I820 odráža redoxný stav P700. Všetky zaznamenané signály v práci sme zmerali pomocou prístroja DUAL-PAM, popísaného v časti materiály a metódy. Pri meraniach časových priebehov sme uskutočnili merania aj pre rôzne teploty a intenzity osvetlenia. Posledné zaznamenané bolo viacnásobné meranie oddelené zatemňovacou fázou.

Hlavným cieľom bolo preskúmať spojitosti medzi signálmi. Pri spracovaní meraní signálov I820 a P515 sme však nezistili žiadne lineárne závislosti. Priaznivejšie výsledky sme dostali pri spracovaní lineárnych vlastností medzi fluorescenciou chlorofylu a P515. Merania ukázali, že existuje závislosť medzi týmito dvoma signálmi. Závislosti sme mohli pozorovať po dosadení nameraného maxima P515. Po tomto spracovaní môžeme potvrdiť, že existuje lineárna závislosť medzi nárastom fluorescencie chlorofylu a poklesom signálu P515. Dosadené maximum P515 sa objavovalo vždy približne v časoch pozície kroku I v O-J-I-P krivky.

Táto diplomová práca môže poslúžiť ako ďalší dôkaz a potvrdenie, že napätie vytvorené na membráne počas ETC a fluorescenciu chlorofylu, sú síce dva rozdielne procesy prebiehajúce v rastlinách, ale vzájomne ovplyvňované. Vo všeobecnosti je však ešte mnoho informácií, ktoré je potrebné doplniť k úplnému pochopeniu takto súhrnného procesu.

8. Zoznam literatúry

Albertson P. A. (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *TRENDS in Plant Science* **6**, 349-354.

Armbruster U., Carrillo L. R., Venema K., Pavlovič A., Schmidtman E., Kornfeld A., Jahns P., Berry J. A., Kramer D. M. Jonikas M. C. (2014) Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments. *Nature Communications* **5**, 5439.

Barber J., Mills J., Love A. (1977) Electrical diffuse layers and their influence on photosynthetic processes. *FEBS* **74**, 174-181.

Batie C. J., Kamin H. (1984) Electron transfer by ferredoxin-NADP⁺ reductase rapid reaction evidence for participation of a ternary complex. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 1976-1985.

Benz J. P., Stengel A., Lintala M., Lee Y. H., Weber A., Philippar K., Gugel I. L., Kaieda S., Ikegami T., Mulo P., Soll J., Bölder B. (2009) Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. *Plant Cell* **21**, 3965-3983.

Bowler M. W. (2005) Structural and biochemical studies of the regulation and catalytic mechanism of ATP synthase. (Doctoral thesis), doi.org/10.17863/CAM.16535.

Boyer P. D. (1989) A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *Faseb Journal* **3**, 2164-2178.

Bulychev A. A. (2011) Induction changes in Photosystems I and II in plant leaves upon modulation of membrane ion transport. *Biochemistry Moscow supplement series A-membrane and Cell Biology* **5**, 335-342.

Bulychev A. A., Osipov V. A., Matorin D. N., Vredenberg W. J. (2013) Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished ΔpH a $\Delta\psi$ components of the proton motive force. *Journal of Bioenergetics and biomembranes* **45**, 37-45.

Byrdin M., Rimke I., Schlodder E., Stehlik D., Roelofs T. A. (2000) Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: Are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited. *Biophysical Journal* **79**, 992-1007.

Carrareto L., Formentin E., Teardo E., Checchetto V., Tomizioli M., Morosinotto T., Giacometti G. M., Finazzi G., Szabo I. (2013) A thylakoid located two-pore K⁺ channel controls photosynthetic light utilization in plants. *Science* **342**, 114-118.

Caspy I., Borovikova-Sheinker A., Klaiman D. Shkolnisky Y., Nelson N. (2020) The structure of a triple complex of plant photosystem I with ferredoxin and plastocyanin. *Nature* **6**, 1300-1305.

Dau H., Sauer K. (1992) Electric field effect on the picosecond fluorescence of Photosystem II and relation to the energetics and kinetics of primary charge separation. *Biochimica et Biophysica* **1102**, 91-106.

Davis G. A., Kanazawa A., Schöttler M. A., Kohzuma K., Froehlich J. E., Rutherford A. W., Satoh-Cruz M., Minhas D., Tietz S., Dhingra A., Kramer D. M. (2016) Limitations to photosynthesis by proton motive force-induced photosystem II photodamage. *ELIFE* **5**, 10.7554/eLife.16921.

De Causmaecker S., Douglass J. S., Fantuzzi A., Nitschke W., Rutherford A. W. (2019) Energetics of the exchangeable quinone, Q_B, in Photosystem II. *National Academy of Sciences of USA* **116**, 19458-19463.

- Delosme R. (1967) Etude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au debut d'une illumination intense. *Biochimica et Biophysica Acta* **143**, 108-128.
- Dolan E., Hind G. (1974) Kinetics of reduction and oxidation of cytochromes-b6 and cytochromes-f in isolated chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **357**, 380-385.
- Essemine J., Qu M. N., Mi H. L., Zhui X. G. (2016) Response of Chloroplast NAD(P)H dehydrogenase. Mediated cyclic electron flow to a shortage or lack in Ferredoxin-Quinone oxidoreductase-dependent pathway in rice following short-term heat stress. *Frontiers in Plant Science* **7**, 10.3389/fpls.2016.00383.
- Fukuyama K., Hase T., Matsumoto S., Tsukihara T., Katsube Y., Tanaka N., Kakudo M., Wada K., Matsubara H. (1980) Structure of S-platensis [2Fe-2S] Ferredoxin and evolution of chloroplast type ferredoxins. *Nature* **286**, 522-524.
- Giera W., Ramesh V. M., Webber A. N., van Stokkum I., van Grondelle R., Gibasiewicz K. (2010) Effect of the P700 pre-oxidation and point mutations A₀ on the reversibility of the primary charge separation in Photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1797**, 106-112.
- Govindjee, Eatonrye J. J. (1986) Electron-transfer through Photosystem-II acceptors interaction with anions. *Photosynthesis Research* **10**, 365-379.
- Govindjee, Shevela D., Björn L. O. (2017) Evolution of the Z-scheme of photosynthesis: a perspective. *Photosynthesis Research* **133**, 5-15.
- Green B. R., Durnford D. G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu Rev. Plant Molecular Biology* **47**, 685-714.
- Gubriel R. J., Dvan P. E., Gassner G. T., Macke T. J., Case D. A., Ohniski T., Fee J. A., Ballore D. P., Hoffman B. M. (1996) Active Site Structure. *Biochemistry* **35**, 7834-7845.
- Gururani M. A., Venkatesh J., Tran L. S. P. (2015) Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. *Molecular Plant* **8**, 1304-1320.
- Haldiman P., Tsimilli M. M. (2005) Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence by oxidised plastoquinone: New evidences based on modulation of the redox state of the endogenous plastoquinone pool in broken spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1706**, 239-249.
- Harbinson J., Hedley C. L. (1993) Changes in P-700 Oxidation During The Early Stages of The Induction of Photosynthesis. *Plant Physiology* **103**, 649-660.
- Hoffman N. E., Pichersky E., Malih V. S., Castesana C., Ko K., Darr S. C., Cashmore A. R. (1987) A cDNA clone encoding a photosystem I protein with homology to photosystem II chlorophyll a/b – binding polypeptides. *National Academy of Sciences of USA* **84**, 8844-8848.
- Höhner R., Tabatabaei S., Kunz H. H., Fittschen U. (2016) A rapid total reflection X-ray fluorescence protocol for micro analyses of ion profiles in *Arabidopsis thaliana*. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **125**, 159-167.
- Hurley J. K., Hazzard J. T., Martinez-Julvez M., Medina M., Gomez-Moreno C., Tollin G. (1999) Electrostatic forces involved in orienting Anabaena ferredoxin during binding to Anabaena ferredoxin: NADP⁺ reductase: Site-specific mutagenesis, transient kinetic measurement, and electrostatic surface potentials. *Protein Science* **8**, 1614-1622.
- Hurt E. C., Gabellini N., Shahak Y., Lockau W., Hauska G. (1983) Extra proton translocation and membrane-potential generation universal properties of cytochrome

BC1/B6F complexes reconstituted into liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **225**, 879-885.

Jeans C., Schilstra M. J., Klug D. R. (2002) The temperature dependence of P680⁺ reduction in oxygen-evolving photosystem. *Biochemistry* **41**, 5015-5023.

Joliot P., Joliot A. (2006) Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757**, 362-368.

Johnson G. N. (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 906-911.

Junge W., Witt H. (1969) Analysis of electrical phenomena in membranes and interfaces by absorption changes. *Nature* **222**, 1069.

Juric S., Hazler-Pilepic K., Tomasic A., Lepedus H., Jelicić, Puthiyaveetil S., Bionda T., Vojta L., Allen J. F., Schleiff E., Fulgosi H. (2009) Tethering of Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *Plant Journal* **60**, 783-794.

Kawashima K., Saito K., Ishikita H. (2018) Mechanism of radical formation in the H-Bond network of D1-Asn298 in Photosystem II. *Biochemistry* **57**, 4997-5004.

Lazár D. (1999) Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1412**, 1-28.

Lazár D. (2005) Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology* **220**, 469-503.

Lazár D. (2009) Modelling of light-induced chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P transient) and changes in 820 nm-transmittance signal of photosynthesis. *Photosynthetica* **47**, 483-498.

Li X. P., Björkman O., Shih C., Grossman A. R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-395.

Martin B., Ort D. R. (1982) Insensitivity of water-oxidation and Photosystem-II activity tomato to chilling temperatures. *Plant Physiology* **70**, 689-694.

Martinazzo E. G., Silva D. M., Bianchi V. J., Bacarin M. A. (2012) Chlorophyll a fluorescence in peach cultivar Maciel Grafted on different rootstocks. *Revista Brasileira de Fruticultura* **34**, 678-685.

Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.

Müller P., Li X. P., Niyogi K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* **125**, 1558-1566.

Očenášová P., Barták M., Hájek J. (2014) Photoinhibition of photosynthesis in Antarctic lichen *Usnea antarctica*. II. Analysis of non-photochemical quenching mechanism activated by low to medium light doses. *Czech Polar Reports* **4**, 90-99.

Ogawa T., Sonoike K. (2021) Screening of mutants using chlorophyll fluorescence. *Journal of Plant research* **134**, 653-664.

Pearson D. C., Gross E. L., David E. S. (1996) Electrostatic properties of cytochrome f: Implications for docking with plastocyanin. *Biophysical Journal* **71**, 64-76.

Pospíšil P., Dau H. (2002) Valinomycin Sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transient. *Biochimica et biophysica acta-bioenergetics* **1554**, 94-100.

Rutherford A. W., Setif P. (1990) Orientation of P700, the primary electron donor of P700. *Biochimica et Biophysica Acta* **1019**, 128-132.

- Saito K., Ritherford A. W., Ishikita H. (2013) Mechanism of proton-coupled quinone reduction in Photosystem II. *National Academy of Sciences of USA* **110**, 954-959.
- Setif P., Fischer N., Lagoutte B., Bottin H., Rochaix J. D. (2002) The ferredoxin site of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1555**, 204-209.
- Schansker G., Srivastava A., Govindjee, Starsser R. J. (2003) Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Functional Plant Biology* **30**, 785-796.
- Schreiber U., Klughammer C., Neubauer C. (1988) Measuring P700 Absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Zeitschrift für Naturforschung B* **43**, 686-698.
- Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis research* **10**, 51-62.
- Schreiber U., Neubauer C. (1990) O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis research* **25**, 279-293.
- Stiehl H. H., Witt H. T. (1969) Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung B* **24**, 1588-1589.
- Strasser B. J. (1997) Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transient. *Photosynthesis Research* **52**, 147-155.
- Suorsa M., Jarvi S., Grieco M., Nurmi M., Pietrzykowska M., Rantala M., Kangasjarvi S., Paakkarinen V., Tikkanen M., Jansson S., Aro E. M. (2012) Proton gradient regulations is essential for proper acclimation of arabidopsis photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *Plant Cell* **24**, 2934-2948.
- Tikhonov A. N., Khomutov G. B., Ruuge E. K. (1984) Electron transport control in chloroplasts. Effect of magnesium ions on the electron flow between two photosystems. *Photobiochemistry and photobiophysics* **8**, 261-269.
- Tikhonov A. N. (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth Res* **116**, 511-534.
- Tikhonov (2018) The cytochrome b₆f complex: Biophysical aspects of its functioning in chloroplasts. *Subcellular Biochemistry* **87**, 287-328.
- Tomek P., Ilík P., Lazár D., Štroch M., Nauš J. (2003) On the determination of Q_B-non-reducing photosystem II centers from chlorophyll a fluorescence induction. *Plant Science* **164**, 665-670.
- Tsui E. Y., Kanady J. S., Agapie T. (2013) Synthetic cluster models of biological and heterogeneous manganese catalysts for O₂ evolution. *Inorganic Chemistry* **52**, 13833-13848.
- Twachtmann M., Altmann B., Muraki N., Voss I., Okutani S., Kurisu G., Hase T., Hanke G. T. (2012) N-Terminal structure of maize Ferredoxin-NADP⁺ reductase determines recruitment different thylakoid membrane complexes. *Plant Cell* **24**, 2979-2991.
- Vass I., Sanakis Y., Spetea C., Petrouleas V. (1995) Effects of photoinhibition on the Q_A⁻Fe²⁺ complex of Photosystem II studied by EPR and Mössbauer spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 4434-4440.
- Velthuys B. R. (1978) 3RD Site of proton translocation in green plant photosynthetic electron-transport. *National Academy of Sciences of USA* **75**, 6031-6034.

Vredenberg W. J. (2000) A three_state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination. *Biophysical Journal* **79**, 26-38.

Vredenberg W. J., Bulychev A. A. (2010) Photoelectrochemical control of the balance between cyclic and linear electron transport in photosystem I. Algorithm for P700⁺ induction kinetics. *Biochimica et Biophysica-Bioenergetics* **1797**, 1521-1532.

Wilson A. J., Jain P. K. (2018) Structural dynamics of the oxygen-evolving complex of Photosystem II in water-splitting action. *JACS* **140**, 5853-5859.

9. Internetové zdroje

- 1) Katedra biofyziky | Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.
303 See Other [online]. [27.7.2021] Dostupné z:
<http://biofyzika.upol.cz/cs/katedra-biofyziky-vybaveni-a-sluzby>