



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

IZOLACE ČÁSTIC FOTOSYSTÉMU II A JEJICH CHARAKTERISTIKA

ISOLATION OF PHOTOSYSTEM II PARTICLES AND THEIR CHARACTERIZATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Denisa Svitačová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1978/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Denisa Svitačová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **Ing. Tereza Venerová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Izolace částic fotosystému II a jejich charakteristika

Zadání diplomové práce:

1. Provést rešerši na téma postup izolace částic fotosystému II a sledování jeho vlastností.
2. Na základě rešerše provést izolace chloroplastů a následně tylakoidových membrán s důrazem na zachování jejich nativních vlastností. Vybrat a provést jejich vhodné charakteristiky se zaměřením na jejich spektroskopické vlastnosti.
3. Zhodnotit postup a výsledky práce s ohledem na budoucí použití takto získaných membrán v dalších navazujících experimentech.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Denisa Svitačová
studentka

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá izoláciou a charakterizáciou špenátových tylakoidných membrán a častíc fotosystému II. Na základe rešerše boli zvolené dva postupy izolácie špenátových tylakoidných membrán a postup izolácie častíc fotosystému II s dôrazom na zachovanie ich natívnych vlastností. Následne boli prevedené charakterizácie so zameraním na spektroskopické vlastnosti vyizolovaných vzoriek. UV-VIS spektrometria bola použitá na stanovenie pomeru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* vo vzorkách tylakoidných membrán a častíc fotosystému II. Fluorescenčnými metódami bola potvrdená úspešnosť izolácií. Metódou ustálenej fluorescenčnej spektroskopie boli premerané excitačné a emisné spektrá vzoriek a časovo rozlíšenou fluorescenciou boli stanovené doby života fluorescencie vzoriek tylakoidných membrán a častíc fotosystému II. Izolované vzorky boli následne vizualizované fluorescenčným mikroskopom s CCD kamerou a technikou FCS.

ABSTRACT

This master's thesis deals with the isolation and characterization of spinach thylakoid membranes and photosystem II particles. Based on the research, two procedures were chosen for the isolation of spinach thylakoid membranes and photosystem II particles with an emphasis on preserving their native properties. Subsequently, the characterizations were carried out, focusing on the spectroscopic properties of the isolated samples. UV-VIS spectrometry was used to determine the ratio of chlorophyll *a* to chlorophyll *b* in samples of thylakoid membranes and photosystem II particles. The success of the isolations was confirmed by fluorescence methods. The excitation and emission spectra of the samples were measured by the steady-state fluorescence spectroscopy, and the fluorescence lifetimes of the samples of thylakoid membranes and photosystem II particles were determined by time-resolved fluorescence. The isolated samples were afterwards visualized with a fluorescence microscope with a CCD camera and the FCS technique.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

izolácia častíc fotosystému II, špenát, chlorofyl, tylakoidné membrány, fluorescencia, charakteristika spektroskopických vlastností, FCS, doba života fluorescencie, emisné spektrá

KEYWORDS

isolation of photosystem II particles, spinach, chlorophyll, thylakoid membranes, fluorescence, characteristics spectroscopic properties, FCS, fluorescence lifetime, emission spectra

SVITAČOVÁ, Denisa. *Izolace částic fotosystému II a jejich charakteristika*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156707>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Tereza Venerová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Podakovanie:

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce Ing. Tereze Venerovej, Ph.D. za jej odborné vedenie, priateľský prístup a cenné rady. Najväčšia vďaka jej však patrí za čas, ktorý mi venovala, pomoc a podporu pri riešení problémov, s ktorými som sa v rámci experimentálnej časti tejto diplomovej práce stretla. Rovnako by som sa chcela poďakovať mojej rodine za obrovskú podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	FOTOSYNTÉZA	9
2.2	ORGANELY FOTOSYNTÉZY	9
2.2.1	Chloroplasty.....	10
2.2.1.1	<i>Tylakoidné membrány.....</i>	<i>10</i>
2.3	FOTORECEPTORY	11
2.4	SVETLÁ FÁZA FOTOSYNTÉZY	12
2.4.1	Svetlo zberné antény	13
2.4.2	Fotosystém II	14
2.4.3	Komplex <i>b₆f</i>	14
2.4.4	Fotosystém PSI	15
2.5	TEMNÁ FÁZA FOTOSYNTÉZY	15
2.6	ABSORPCIA SVETELNEJ ENERGIE.....	16
2.7	FLUORESCENČNÉ METÓDY.....	18
2.7.1	Fluorescenčná mikroskopia	18
2.7.1.1	<i>Základné princípy fluorescenčnej mikroskopie.....</i>	<i>19</i>
2.7.2	Fluorescenčná korelačná spektroskopia	19
2.7.2.1	<i>Autokorelačná funkcia</i>	<i>20</i>
2.7.2.2	<i>Inštrumentácia.....</i>	<i>20</i>
2.7.3	Fluorescenčná spektroskopia	21
2.7.3.1	<i>Ustálená fluorescencia.....</i>	<i>21</i>
2.7.3.2	<i>Časovo rozlíšená fluorescencia.....</i>	<i>22</i>
2.8	UV-VIS SPEKTROMETRIA.....	22
2.8.1	Labmert-Beerov zákon.....	23
2.8.2	Inštrumentácia.....	23
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	24
3.1	FOTOSYNTETIZUJÚCE MEMBRÁNY	24
3.1.1	Fragmentácia a organizácia tylakoidnej membrány.....	24
3.2	IZOLÁCIA A CHARAKTERIZÁCIA FOTOSYSTÉMU II	27
3.2.1	Chloroplastové lipidy	29
3.2.2	Subchloroplastové častice obohatené o P700 a železo-sírový proteín.....	30
3.3	KVANTIFIKÁCIA FOTOSYSTÉMU I A II V RÔZNYCH ČASTIACH TYLAKOIDNEJ MEMBRÁNY ZO ŠPENÁTOVÝCH LISTOV	30
3.3.1	Katalázová a polyfenoloxidázová aktivita fotosystému II	31
3.3.2	Pôsobenie stresových faktorov na proteín reakčného centra D1 v špenátovom tylakoide.....	32
3.3.3	Cyklus opravy fotosystému II.....	34

3.3.4	Fluorescenčná analýza životnosti fotosystému II a fotosystému I.....	35
3.4	FOTOINDUKOVANÝ PRENOS ELEKTRÓNŮV ZO ŠPENÁTOVÝCH CHLOROPLASTOV.....	36
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	39
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	39
4.2	POUŽITÉ PRÍSTROJE	39
4.3	IZOLÁCIA TYLAKOIDNÝCH MEMBRÁN.....	39
4.3.1	Postup izolácie tylakoidných membrán podľa postupu Brown a Cooper	40
4.3.2	Postup izolácie tylakoidných membrán podľa postupu Yoneda.....	40
4.4	IZOLÁCIA ČASTÍC FOTOSYSTÉMU II.....	41
4.4.1	Postup izolácie častíc fotosystému II	41
4.5	FOTOMETRICKÉ STANOVENIE CHLOROFYLU.....	41
4.5.1	Príprava vzoriek	41
4.5.2	Meranie absorpčných spektier	41
4.5.3	Spracovanie dát	42
4.6	CHARAKTERIZÁCIA PRIPRAVENÝCH VZORIEK FLUORESCENČNÝMI METÓDAMI	42
4.6.1	Príprava vzoriek na charakterizáciu fluorescenčnými metódami	42
4.6.1.1	<i>Vzorky v 80% vodnom acetóne.....</i>	<i>42</i>
4.6.1.2	<i>Vzorky v pufri</i>	<i>43</i>
4.6.2	Ustálená fluorescenčná spektroskopia.....	43
4.6.2.1	<i>Spracovanie dát.....</i>	<i>44</i>
4.6.3	Meranie doby života fluorescencie	44
4.6.3.1	<i>Spracovanie dát.....</i>	<i>45</i>
4.6.4	Fluorescenčná korelačná spektroskopia	45
4.6.4.1	<i>Spracovanie dát.....</i>	<i>46</i>
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	47
5.1	IZOLÁCIA A CHARAKTERIZÁCIA TYLAKOIDNÝCH MEMBRÁN A ČASTÍC FOTOSYSTÉMU II.....	47
5.1.1	Optimalizácia a výsledky použitých izolácií tylakoidných membrán.....	47
5.1.2	Výsledky izolácie častíc fotosystému II.....	49
5.1.3	Vyhodnotenie fotometrického stanovenia pomeru chlorofylov	49
5.1.4	Vyhodnotenie meraní ustálenej fluorescenčnej spektroskopie	51
5.1.5	Vyhodnotenie merania doby života fluorescencie	53
5.1.5.1	<i>Vyhodnotenie dôb života vzoriek v 80% vodnom acetóne</i>	<i>53</i>
5.1.5.2	<i>Vyhodnotenie dôb života vzoriek meraných v pufri.....</i>	<i>55</i>
5.2	ZOBRAZOVANIE VYIZOLOVANÝCH VZORIEK	56
5.2.1	Zobrazovanie vzoriek tylakoidných membrán	57
5.2.2	Zobrazovanie vzoriek častíc fotosystému II.....	60

6	ZÁVER	62
7	LITERATÚRA	66
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	73
	8.1 POUŽITÉ SKRATKY	73
	8.2 POUŽITÉ SYMBOLY	74
9	PRÍLOHY	75

1 ÚVOD

Fotosyntéza prebieha v zelených rastlinách, riasach, cyanobaktériách a fotosyntetických baktériách, v ktorých sa slnečné svetlo premieňa na chemickú energiu. V zelených rastlinách si fotosyntéza vyžaduje okrem svetla ako zdroja energie len dve suroviny, a to vodu a oxid uhličitý z atmosféry. Organické zlúčeniny, ktoré sú v konečnom dôsledku fotosyntézou produkované, priamo alebo nepriamo, zahŕňajú sacharidy, lipidy a bielkoviny, z ktorých všetky slúžia ako potrava pre živé organizmy. Všeobecne sa verí, že Zem vznikla pred asi 4,6 miliardami rokov a že život na Zemi začal asi pred 3,5 miliardami rokov, pričom prvými fotosyntetickými organizmami, ktoré boli objavené, boli fotosyntetizujúce baktérie a primitívne riasy. Dôkazy naznačujú, že cyanobaktérie sa vyvinuli asi pred 2 miliardami rokov, čo viedlo k akumulácii kyslíka v atmosfére. Prítomnosť kyslíka a produkcia potravín vyššími rastlinami umožnila existenciu heterotrofov, akými sú aj ľudia. V súčasnosti dosahuje celková biomasa vyprodukovaná ročne fotosyntézou rastlín asi dvesto miliárd ton. Živé organizmy konzumujú fotosyntetizované produkty a získavajú z nich energiu dýchaním, procesom, pri ktorom sú organické zlúčeniny oxidované späť na oxid uhličitý a vodu. Fotosyntéza slúži ako dôležité spojenie medzi svetelnou energiou a všetkými živými tvormi. Rovnako sa fotosyntéza a organely, ktoré sa na nej podieľajú skúmajú z hľadiska využitia v rôznych experimentoch. Dokonca sa začínajú vyvíjať systémy umelej fotosyntézy, ktoré môžu viesť k rozvoju výroby energie bez znečistenia, fotovoltickej energie, vodíkovej energie, alternatívnych uhlíkových produktov a biologických analytických systémov na ukládanie oxidu uhličitého. Ide o biofotovoltiku, teda živý solárny panel, ktorý zachytáva slnečnú energiu na výrobu elektriny. Biofotovoltická energia vyrába elektrinu a obnoviteľnú energiu pomocou fotosyntézy rias alebo machu, ako aj slnečného žiarenia a vody. Preto je potrebné izolovať a charakterizovať organely fotosyntézy so zachovanými natívnymi vlastnosťami.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jeden z najdôležitejších dejov v živej prírode, pretože vyrába organické látky pre výživu heterotrofných organizmov a súčasne je jediným producentom kyslíka na našej planéte. Fotosyntetická produkcia kyslíka a asimilácia oxidu uhličitého vytvorili zloženie biosféry a poskytujú potravu a palivo všetkým formám života.

Z fyzikálneho hľadiska je fotosyntéza premenou energie slnečného žiarenia na chemickú energiu. Ide o silne endergonický redukčný dej, kedy je uhlík z najviac oxidovanej formy s nízkou energiou (CO_2) prevedený na silne redukovaný stav s vysokou energiou (sacharid). Energia sa na tento dej získava z absorpcie elektromagnetického žiarenia, ktoré poskytuje slnečné žiarenie. Redukčné činidlo, teda elektróny potrebné pre redukciu sú odoberané u vyšších rastlín z vody a hlavným produktom fotosyntézy je sacharid.

2.2 Organely fotosyntézy

Plastidy sú membránové organely vyskytujúce sa len v rastlinných a len v eukaryotických bunkách. V prokaryotických bunkách, konkrétne u fotosyntetizujúcich baktérií a siníc, predstavujú ekvivalenty plastidov tylakoidy a vezikuly voľne uložené v cytoplazme. Základná hmota, ktorá vyplňa vnútro niektorých plastidov, sa nazýva stróma. Plastidy sa všeobecne rozdeľujú na dve hlavné skupiny podľa prítomnosti pigmentov. Na bezfarebné plastidy nazývané leukoplasty a chromoplasty, ktoré obsahujú pigmenty. Chromoplasty sú plastidy obsahujúce farebné pigmenty, ktoré podľa povahy pigmentu delíme na chromoplasty obsahujúce fotosynteticky neaktívne pigmenty a chloroplasty obsahujúce fotosynteticky aktívne pigmenty.

Chloroplasty sú fotosynteticky aktívne, preto ich mnohí pokladajú za najvýznamnejšiu bunkovú organelu vôbec. Vyskytujú sa hlavne v nadzemných orgánoch zelených rastlín, najmä v mezofyle listov. Sú rozložené voľne v cytoplazme. Typické zafarbenie chloroplastov je podmienené obsahom pigmentov, predovšetkým chlorofylu. Z chemického hľadiska je základom molekuly chlorofylu porfyrín s naviazaným horečnatým kationom. Majú lipofilný charakter, takže sú rozpustné v nepolárnych rozpúšťadlách.

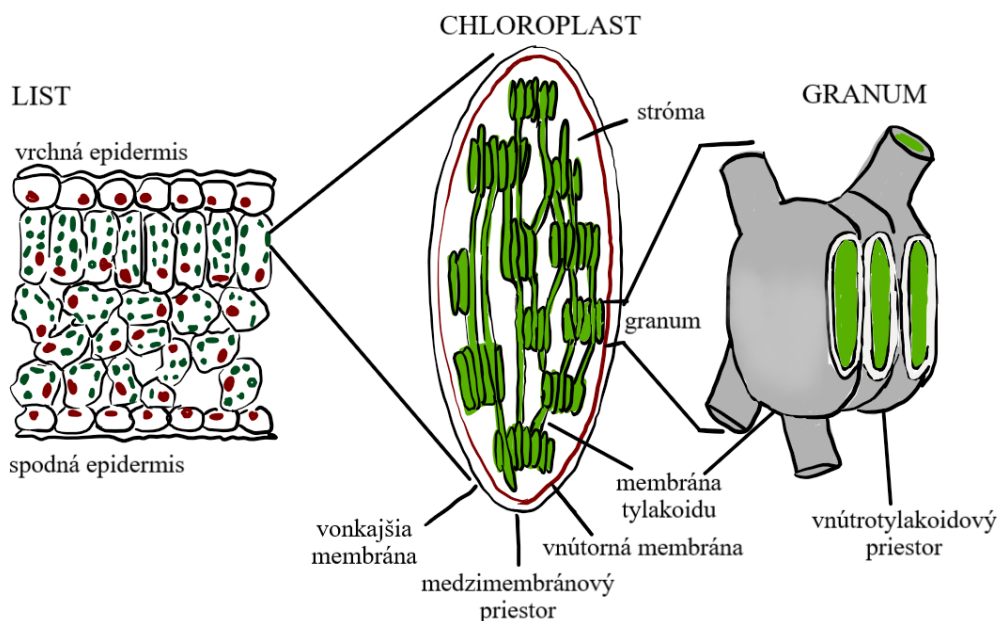
Existuje niekoľko druhov chlorofylov. Chlorofyl *a* je najdôležitejší pigment modrozelenéj farby, ktorý obsahujú všetky fotosyntetizujúce rastliny, vrátane siníc a prvozelenej rias. Chlorofyl *b* je pigment žltozelenej farby, ktorý obsahujú prvozelene riasy, zelená vývojová vetva eukaryotických rias a všetky vyššie rastliny. Ďalej je známy chlorofyl *c*, ktorý obsahuje hnedá vývojová vetva rias, chlorofyl *d* obsahuje červená vývojová vetva rias a bakteriochlorofyl a bakterioviridín, ktoré boli izolované z fotosyntetizujúcich purpurových a zelených baktérií.

Chloroplasty sú semiautonómne organely s vlastnou genetickou informáciou. Chloroplastový genóm tvorí molekula dvojvláknovej DNA, ktorá má veľkosť 80–600 kbp a je vždy cirkulárna, na rozdiel od lineárnej jadrovej DNA. DNA sa nachádza v stróme a je pripojená na membrány tylakoidov. Nesie informáciu pre správny rast a delenie chloroplastov. Kóduje proteíny fotosystému I a II a niektoré cytochrómy. Jadrová DNA kóduje enzýmy Calvinovho cyklu, zložky chloroplastovej membrány, niektoré zložky tylakoidov a fotolytické enzýmy.

2.2.1 Chloroplasty

Chloroplasty sú organely s dvojitou povrchovou membránou, vnútornou a vonkajšou. Ich vonkajšia membrána je dobre priepustná a k nej prilieha vnútorná membrána so špecifickou priepustnosťou. Medzi membránami sa nachádza periplastidový priestor. Vnútorná membrána obklopuje základnú hmotu vyplňajúcu chloroplasty, strómu. Stróma je vyplnená roztokom enzýmov, obsahujúca DNA, RNA a ribozómy. V stróme dochádza k temnej fáze fotosyntézy.

V stróme sú uložené zložité membránové stĺpovité systémy – graná, tvorené paralelne usporiadanými mechúrikmi – tylakoidmi (Obr. 1). Tylakoidy sú ploché membránové vaky a v ich membránach sú vstavané molekuly zodpovedné za zachytenie a využitie svetelnej energie. Lumen je priestor vo vnútri tylakoidov vyplnený vodou a rozpustenými soľami. Jednotlivé graná sú vzájomne prepojené dvojmembránovými lamelami, takzvanými tylakoidmi strómy. Inak povedané, tylakoidy usporiadané nad sebou vytvárajú graná a sú vzájomne pospájané lamelami strómy. V stróme sa vyskytujú aj globulárne útvary, označované ako plastoglobuly. Ich počet sa rapídne zvyšuje v chloroplastoch starnúcich buniek. Vznikajú rozpadom a postupným odbúravaním membrán tylakoidov graná a strómy.



Obr. 1: Schéma chloroplastu

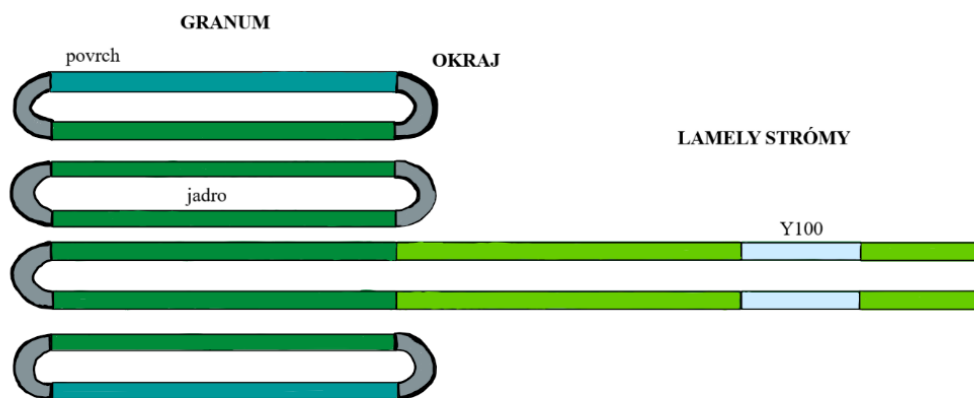
2.2.1.1 Tylakoidné membrány

Všetky primárne procesy fotosyntézy sa odohrávajú v tylakoidoch, a to predovšetkým v ich membránach [1]. Tieto membrány majú značne tekutú základnú lipidovú matrix s veľkým obsahom nenasýtených mastných kyselín. Obzvlášť pozoruhodný je vysoký obsah bielkovín v rozsahu 60 až 65 % hmotnosti membrán. Na väčšinu z nich sa viaže veľké množstvo molekúl asimilačných farbív (chlorofylov a karotenoidov) za vzniku proteín-pigmentových komplexov.

Proteíny v tylakoidných membránach, s naviazanými pigmentami alebo bez nich, nie sú rozmiestnené náhodne, ale zdržiavajú sa vo veľmi dokonale organizovaných funkčných celkoch, ktoré môžu síce pracovať do značnej miery samostatne, ale zvyčajne spolu navzájom spolupracujú (Obr. 2). Rozdeľujeme ich do štyroch základných skupín, a to fotosystém I, fotosystém II, cytochrómový komplex a ATP-syntáza.

Fotosystém I sa nachádza výlučne v tých častiach tylakoidných membrán, ktoré komunikujú priamo so strómou. Nevyskytuje sa teda v tých častiach tylakoidov, ktoré k sebe tesne priliehajú. Fotosystém II je lokalizovaný v granálnych tesných membránach tylakoidov. Cytochrómový komplex *b6/f* býva približne rovnomerne zastúpený vo všetkých častiach tylakoidných membrán.

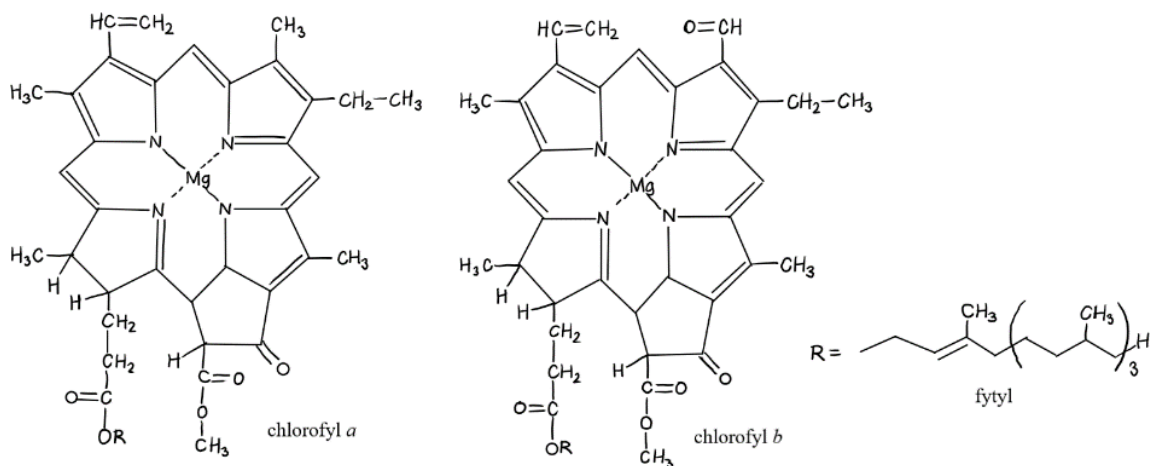
Oba typy fotosystémov sa skladajú z centrálnej časti, teda reakčného centra, ktorá je obklopená svetlo zberným proteín-pigmentovým komplexom. Funkciou tohoto komplexu je iba zachytávať a induktívnou rezonanciou predávať excitačnú energiu do reakčného centra, kde začína vlastný prenos elektrónov. Na transmembránových proteínoch jadra bývajú pripojené nie len asimilačné farbivá, ale aj molekuly látok s redoxnými vlastnosťami, ktoré slúžia ako prenášače elektrónov.



Obr. 2: Schematický model domén tylakoidnej membrány [2]

2.3 Fotoreceptory

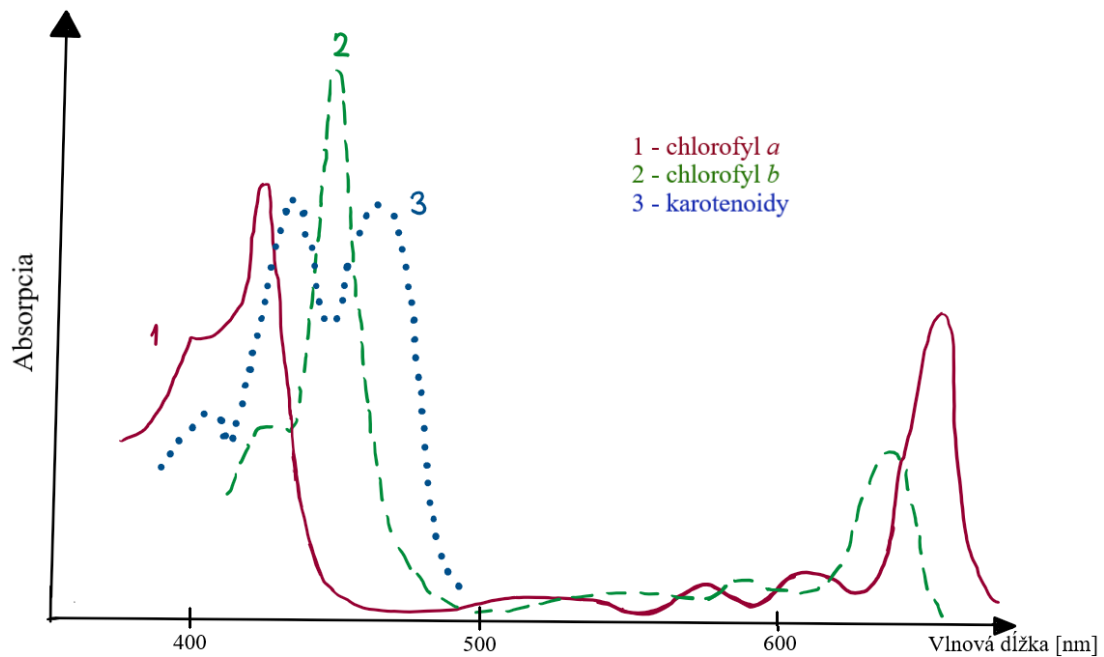
Fotoreceptory sú zlúčeniny viazané na proteíny, ktoré absorbujú pre fotosyntézu potrebné svetelné žiarenie [3]. U eukaryotických organizmov a siníc sú to tetrapyrrolové zlúčeniny chlorofyl *a* a chlorofyl *b* (Obr. 3), ktoré obsahujú horečnatý kation vo svojom centre. Dlhý reťazec *R* je fytyl, ktorý je súčasťou esterovej skupiny chlorofylov. Fytyl je odvodený od alkoholu fytolu.



Obr. 3: Štruktúry molekúl chlorofylu *a* a chlorofylu *b* [3]

Molekuly chlorofylu absorbujú fotóny elektromagnetického žiarenia, čím sú prevedené do vyšších energetických stavov (Obr. 4). Fotóny viditeľného žiarenia sú absorbované chlorofylmi veľmi silno. Pre fotosyntézu má význam elektrónový prechod medzi orbitálmi $\pi \rightarrow \pi^*$. V konjugovaných systémoch rastúci počet konjugovaných dvojitých väzieb posúva absorpčný pás tohoto prechodu k vyšším vlnovým dĺžkam, čo sa označuje konjugačný efekt. Absorpčné spektrum chlorofylu má dve maximá. Prechod $\pi \rightarrow \pi^*$ má pás v červenej oblasti spektra. Absorpcia červeného žiarenia z viditeľnej oblasti spektra ponecháva doplnkovú farbu, ktorou je farba zelená. Tým je vysvetlená prevládajúca farba v rastlinnej ríši.

Nie každý chlorofyl má však rovnakú úlohu. Stovky molekúl chlorofylu a iných farbív sú organizované pomocou proteínových zberačov fotónov, teda svetlo zbernými anténami. Absorbovaná energia zachytených fotónov je predávaná medzi molekulami chlorofylu vo svetlo zbernej anténe, pokiaľ nedorazí do reakčného centra. Tento proces sa nazýva prenos excitónu alebo rezonančný prenos energie. Molekuly chlorofylu v LHC doprevádzajú karotenoidy, konkrétne napríklad karotény alebo xantofyly, ktoré pomáhajú zachytávať fotóny z tých častí spektra, kde chlorofyly absorbujú žiarenie slabo.

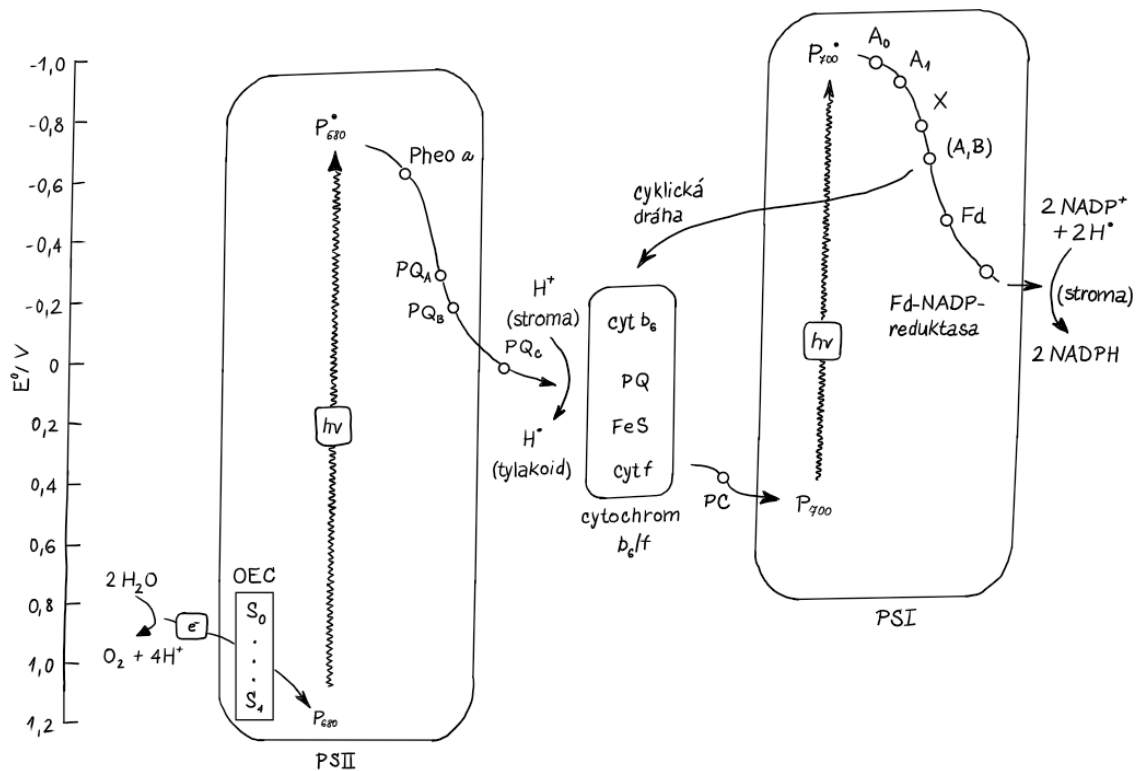


Obr. 4: Absorpčné spektrá chlorofylov a karotenoidov [3]

2.4 Svetlá fáza fotosyntézy

Pri fotosyntéze v rastlinách a siniciach sa uplatňujú dve sériovo spojené reakčné centrá nazývané fotosystém I a fotosystém II [3]. Fotosystém II vytvára silné oxidačné činidlo, ktoré umožňuje oxidáciu vody na kyslík a slabé redukčné činidlo. Úlohou fotosystému I je produkcia silného redukčného činidla schopného redukovať NADP^+ na NADPH a slabého oxidačného činidla. V prepojení PSI a PSII slabé redukčné činidlo redukuje prostredníctvom komplexu cytochrómu *b₆/f* slabé oxidačné činidlo. Toto prepojenie dvoch redoxných systémov vytvára „elektrónovú pumpu“, umožňujúcu necyklický prenos elektrónov z H_2O na NADPH , ktorá je známa ako schéma Z (Obr. 5). Dochádza taktiež k zvyšovaniu koncentrácie H^+ v tylakoidoch, čo sprostredkováva pohon enzýmového komplexu ATP-syntázy pri produkcii ATP z ADP.

Reakcie svetelnej fázy fotosyntézy sa odohrávajú v membráne tylakoidov. Pri toku elektrónov a katiónov H^+ sa v oxidačne redukčných dejoch mení redoxný potenciál postupne sa uplatňujúcich redoxných systémov. Po excitáciách vo fotosystéme II a fotosystéme I nastáva silný pokles redoxného potenciálu a tým získaná energia je použitá v rade nasledujúcich redukčných dejov s postupným rastom redoxného potenciálu. Fotosystémy zbavené elektrónu sú naopak oxidačnými činidlami.



Obr. 5: Podrobná fotosynetická schéma Z [3]

2.4.1 Svetlo zberné antény

Pri dopade kvánt žiarenia, teda fotónov, s vhodnou vlnovou dĺžkou (380–710 nm) na asimilačné farbivá v anténach, dochádza v ich molekulách k excitácii elektrónov [3]. Jeden fotón pritom excituje iba jeden elektrón v jednej molekule. Excitačná energia môže byť jednak premenená na teplo alebo vyžiarená vo forme fluorescenčného žiarenia alebo sa môže induktívnou rezonanciou postupne predávať iným molekulám farbív, a tak nakoniec preniknúť až do reakčného centra k ionizovateľnej molekule chlorofylu *a*. Jedine táto tretia možnosť energetickej premeny žiarenia je z hľadiska ďalšieho využitia významná a taktiež zvyčajne prevažuje. Jednosmernosť prenosu excitačnej energie z antén smerom k reakčnému centru fotosystémov je zaistená kvôli rozdielom vo vlastnostiach farbív, ktoré sú závislé na spôsobe ich väzby k molekulám bielkovín. Čím bližšie k reakčnému centru sa farbivá nachádzajú, tým menšiu energiu potrebujú k excitácii, a tým stúpa pravdepodobnosť, že práve na ne bude excitačná energia prenesená. Karotenoidy a chlorofyl *b* potrebujú všeobecne vyššiu excitačnú energiu ako molekuly chlorofylu *a*.

2.4.2 Fotosystém II

V riasach, cyanobaktériách a chloroplastoch zelených rastlín štiepi PSII vodu na molekulárny kyslík, elektróny a protóny. Vyvinutý kyslík sa uvoľňuje do atmosféry, zatiaľ čo elektróny a protóny sa používajú na redukciiu plastochinónov. Táto funkcia dala fotosystému II názov „vodná plastochinón oxidoreduktáza“. Uvoľňovanie protónov tiež vytvára elektrochemický transmembránový gradient, ktorý sa používa na riadenie syntézy ATP [3]. Hlavná časť fotosystému II, je zvyčajne tvorená šiestimi integrálnymi a tromi periférnymi proteínmi [1]. Jadro, teda reakčné centrum fotosystému II tvoria dva integrálne proteíny označované ako D1 a D2, na ktorých býva naviazaných asi 50 molekúl chlorofylu *a*, vrátane jednej zvláštnej ionizovanej molekuly označovanej ako P680, pretože jeho absorpčné maximum je 680 nm. Ďalej je v jadre fotosystému II trvalo prítomných niekoľko molekúl prenášačov elektrónov.

Transport elektrónov vo fotosystéme II vedúci k oxidácii vody je iniciovaný svetlom indukovanou separáciou náboja medzi primárnym donorom elektrónov, špeciálnym chlorofylovým párom nazývaným P680, a primárnym akceptorom elektrónov, molekulou feofytínu reprezentovanou separáciou náboja. Keď je primárny donor P680 excitovaný buď priamou absorpciou fotónu alebo oveľa pravdepodobnejšie prenosom elektrónovej energie z fotoexcitovanej anténnej molekuly chlorofylu [3]. Absorpciou fotónu je z LHC vymrštený elektrón. Excitovaný P680* predáva elektrón feofytínu a sám sa oxiduje na P680⁺. Feofytín *a* je chlorofyl *a*, kde je horečnatý kation nahradený dvoma hydrónami H⁺. Potom je elektrón predaný komplexu plastochinónu s Fe²⁺ PQ_A. Dva elektróny sú z PQ_A pri dvoch redukciách prenesené na PQ_B za vzniku PQ_B²⁻. PQ_B²⁻ prijme dva hydróny zo stromálneho povrchu tylakoidnej membrány. Vzniká plastochinol PQ_BH₂. Plastochinol sa vymení za molekulou plastochinónu zo zásoby v membráne PQ_C. P680⁺, odkiaľ bol elektrón vymrštený, je silným oxidačným činidlom, ktorý odoberá elektrón vode. Odoberanie elektrónu nastáva účinkom komplexu obsahujúceho mangán. Nazýva sa kyslík vyvíjajúci komplex a označuje sa OEC. Je tvorený periférnymi proteínmi, pripojenými z vnútornej strany, teda z lumenu, tylakoidnej membrány. Na nich sú naviazané štyri ióny mangánu, ďalej ióny Cl⁻ a Ca²⁺. OEC viaže vo východiskovom stave S₀ dve molekuly vody, z ktorých postupne odoberá štyri elektróny, a prechádza tak cez stavy S₁, S₂, S₃ až do stavu S₄. Každý z týchto prechodov spojených z odberom elektrónu je poháňaný svetlom a je doprevádzaný uvoľnením jedného hydrónu. Nakoniec komplex S₄ uvoľní molekulou O₂ a naviazaním dvoch molekúl vody prejde opäť do stavu S₀. Tým došlo k fotooxidácii vody.

2.4.3 Komplex *b₆/f*

Cytochrómový komplex je zložený zo štyroch integrálnych proteínov [3]. Jeho hlavnou úlohou je sprostredkovanie transportu elektrónov z fotosystému II na fotosystém I. Prenos elektrónov je najpomalší proces v celej transportnej ceste. Priemerná doba prenosu je asi 5 ms, ostatné výmeny sú zvyčajne oveľa rýchlejšie. Z plastochinolu z membrány odoberá elektróny komplex cytochrómov *b₆/f*. Proteínový komplex cytochrómov *b₆/f* obsahuje molekulou cytochrómu *f*, molekulou cytochrómu *b₆* s dvoma hémami a proteín so sírou a železom naviazaný plastochinón. Komplex prestupuje membránu tylakoidu a prenáša hydróny a elektróny z vonkajšej strany tylakoidnej membrány na vnútornú stranu. Tento mechanizmus sa nazýva *Q*-cyklus. Na jeden plastochinol vytvorený fotosystémom II sa týmto cyklom dostávajú dva hydróny. Tento prenos vytvára veľkú časť hydrónového gradientu potrebného pre pohon syntézy ATP.

2.4.4 Fotosystém PSI

Medzi komplexom cytochrómov *b₆/f* a fotosystémom I prenáša elektróny plastocyanín, čo je molekula proteínu pohybujúca sa v povrchovej membráne dutiny tylakoidu [3]. Tento proteín obsahuje koordinačne viazanú meď, ktorá pri zmenách oxidačného stavu plastocyanínu prechádza medzi oxidačnými číslami I a II. Jadro fotosystému I, teda reakčné centrum obsahuje predovšetkým dva veľké polypeptidy (*I_a*, *I_b*), ktoré na seba viažu ionizovateľnú molekulu chlorofylu *a* označovanú ako P700. Pravdepodobne však ide o dimér, teda o dve spojené molekuly. P700 je v procese fotosyntézy excitovaný fotónom z LHC na P700*. Predaním elektrónu na prenášač vzniká slabé oxidačné činidlo P700⁺, ktoré sa ľahko redukuje elektrónmi z plastocyanínu na P700 [1]. Prenášači elektrónov na redukčnej strane sú chlorofyl *a*, fylochinón, teda vitamín K₁ a proteíny ferredoxíny, ktoré obsahujú železo a síru.

Sú dve možnosti ďalšej cesty elektrónu, a to cyklická a necyklická. Necyklickou cestou pokračuje väčšina elektrónov. Elektrón prechádza na ďalší ferredoxín (Fd), ktorý vo finále redukuje NADP⁺ na NADPH za účasti enzýmu ferredoxín-NADP⁺-reduktázy. Táto cesta tvorby ATP sa nazýva necyklická fotofosforylácia. Cyklickou cestou sa niektoré elektróny vracajú na plastochinón v membráne. Spôsobujú ďalší prenos hydrónu a nastáva podpora syntézy ATP. Cyklickou cestou dochádza k prenosom hydrónov bez potreby fotosystému II. Podobne pracuje bakteriálny fotosystém, ktorý je iba jeden. Cesta k tvorbe ATP touto cestou fotosyntézy sa nazýva cyklická fotofosforylácia.

2.5 Temná fáza fotosyntézy

NADP a ATP vytvorené vo svetlej fáze sú v temnostnej fáze, nazývanej Calvinov cyklus, využité na tvorbu uhlíkatých štruktúr [1]. Pri každej obrátke Calvinovho cyklu je asimilovaná jedna molekula atmosférického CO₂ a zabudovaná do organickej zlúčeniny. K vytvoreniu molekuly glukózy je preto potrebné šesť obrátok Calvinovho cyklu. Calvinov cyklus má tri fázy. Fázu fixácie oxidu uhličitého, redukčnú a regeneračnú fázu.

Fixácia CO₂ je prevedenie CO₂ ako málo reaktívnej zlúčeniny na aktívnu redukovanú formu karboxylu. Dôjde k jeho napojeniu na päť uhlíkový sacharid ribulóza-1,5-bisfosfát. Vzniká nestabilný šesťuhlíkatý medziprodukt. Ten sa hneď rozpadá na dve molekuly 3-fosfoglycerátu. Katalyzátorom reakcie je ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza. Enzým, známy ako Rubisco, ktorý tvorí v chloroplaste až 16 % z prítomných proteínov. Enzým Rubisco je aktivovaný fruktóza-6-fosfátom a inhibovaný fruktóza-1,6-bisfosfátom. Ich pomer ovplyvňuje množstvo redukovaného ferredoxínu, posledného akceptora elektrónov fotosystému I. V konečnom dôsledku dostatok svetla aktivuje Rubisco.

V redukčnej fáze sa redukuje 3-fosfoglycerát NADPH za spotreby ATP. Ten je postupne prevedený na 1,3-bisfosfoglycerát a glyceraldehyd-3-fosfát. Izomeráciou glyceraldehyd-3-fosfátu vzniká dihydroxyacetónfosfát. Časť trióz prechádza cez membránu chloroplastu do cytozolu, kde aldolovou kondenzáciou vzniká fruktóza-1,6-bisfosfát. Ten odštiepuje fosforylovú skupinu a izomeráciou vzniká glukóza-6-fosfát. Táto fáza je analógia úseku biosyntézy glukózy. V Calvinovom cykle ale glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza využíva NADPH miesto NADH. Z glukózy vznikajú zásobné sacharidy sacharóza a škrob. Z časti triózafosfátu sa syntetizujú lipidy a aminokyseliny.

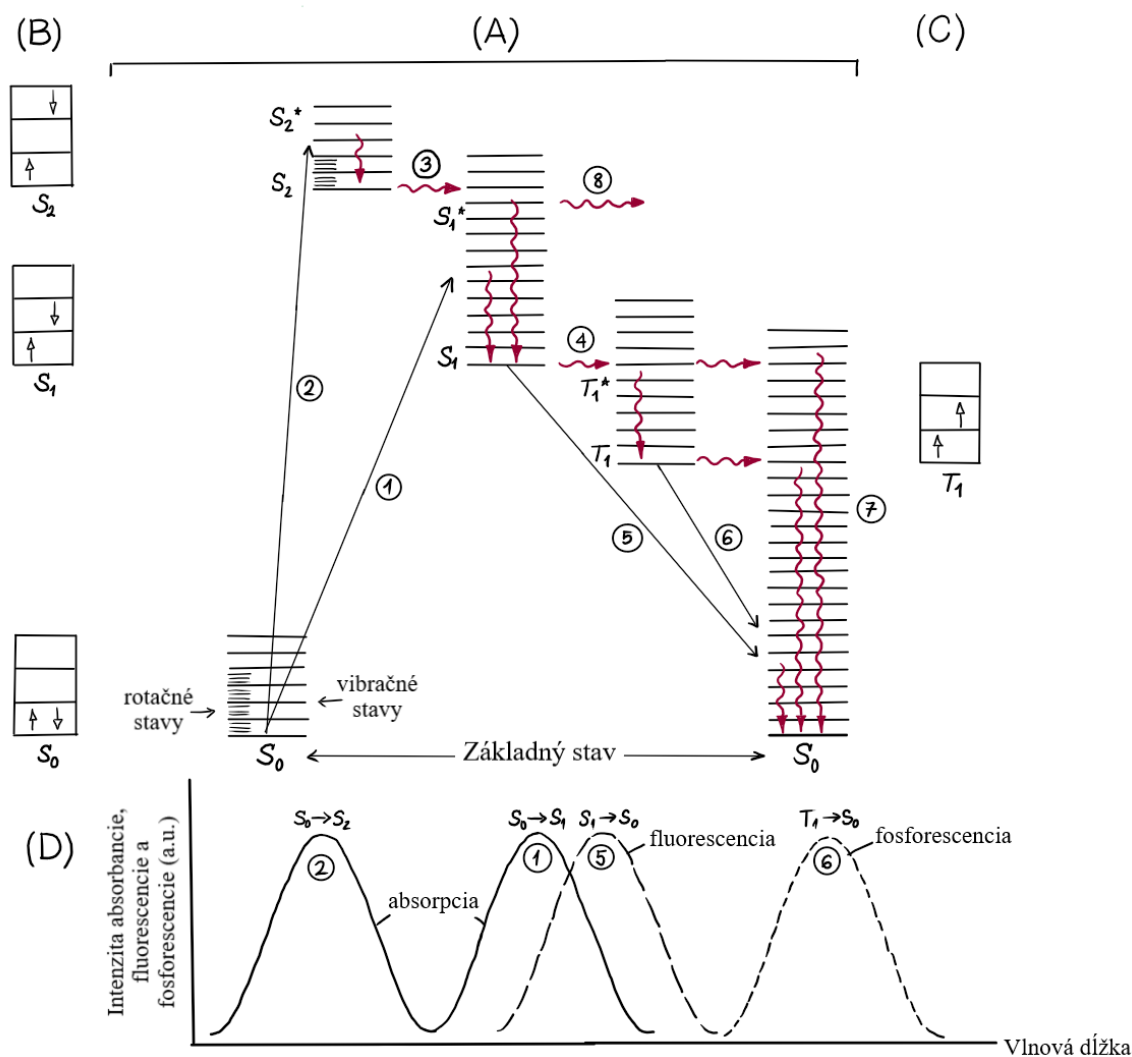
Regeneračná fáza obnovuje v zložitom procese ribulózu-5-fosfát. Pri premenách sacharidov, teda transglykozidačných reakciách dochádza za účasti transketolázy k prenosu glykolaldehydu a glycerinaldehydu z ketózy na aldózy. Koenzýmom enzýmu je tiamíndifosfát. Transaldoláza katalyzuje reakcie dihydroxyacetónfosfátu s fosforečnými esterami aldóz.

2.6 Absorpcia svetelnej energie

Fotón je absorbovaný molekulou veľmi rýchlo, do 10^{-15} sekúnd, za predpokladu, že frekvencia dopadajúceho svetla spĺňa kritérium (1)

$$h\nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = \Delta E \quad (1)$$

kde ΔE je rozdiel medzi energetickými hladinami počiatočného a konečného excitovaného stavu, ν a λ je frekvencia a vlnová dĺžka svetla, c je rýchlosť svetla a h je Planckova konštanta [4]. Vo väčšine prípadov absorbovaný fotón posúva elektrón zo základného singletového stavu S_0 do nejakého excitovaného singletového stavu S_1 alebo S_2 (Obr. 6, krok 1 alebo krok 2). Zjednodušené absorpčné spektrum zodpovedajúce týmto rôznym zmenám energetických hladín je znázornené na Obr. 6 označené písmenom D, kde štruktúra často pozorovaná pri prechodoch na rôzne vibračné úrovne bola pre jednoduchosť ignorovaná.



Obr. 6: Absorpcia fotónu a rôzne možné osudy excitovaného stavu [4]

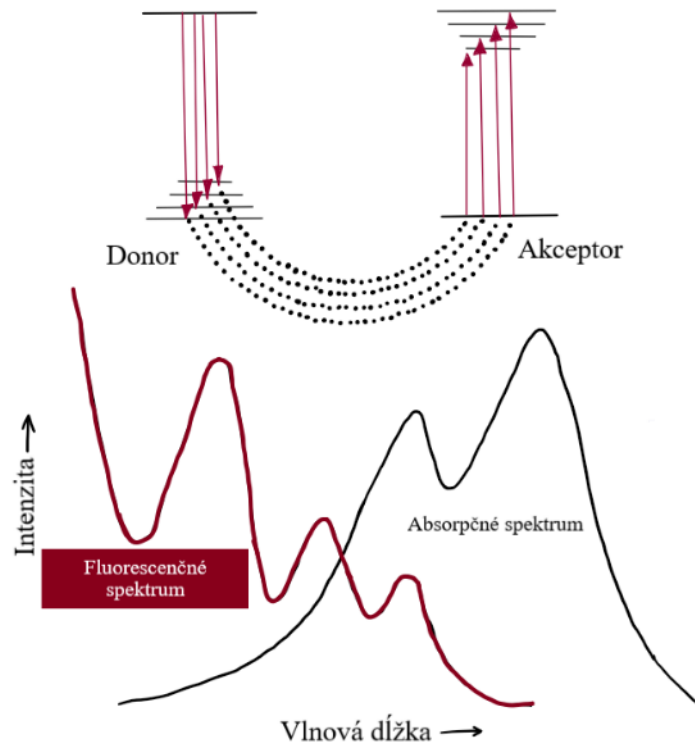
Rotačná štruktúra sa zvyčajne v kondenzovanom stave nepozoruje. Molekula prevedená do vyššieho excitovaného stavu sa zvyčajne vráti vnútornou konverziou do prvého excitovaného stavu za 10^{-14} – 10^{-13} sekundy, ktorú ukazuje krok tri na Obr. 6. Touto cestou sa časť energie vyššieho excitovaného stavu vyžiari ako teplo do okolia sledom malých prechodov cez vibračné pod úrovne elektronicky excitovaného stavu. Zo všetkých spôsobov excitácie je najselektívnejší spôsob excitácie fotónmi. Použitím svetla vhodnej frekvencie alebo vlnovej dĺžky môžu byť molekuly transformované z dobre definovaného počiatočného stavu do dobre definovaného excitovaného stavu.

Excitovaná molekula v singletovom stave má zvyčajne maximálnu životnosť asi 10^{-8} sekundy v dôsledku prirodzenej tendencie fluoreskovať, ale môže podstúpiť rôzne spôsoby nežiarivého, ako aj radiačného rozpadu, ktorý sa všeobecne nazýva luminiscencia. Osud excitovanej molekuly závisí od dráhy excitačnej energie. V závislosti od spôsobu radiačného rozpadu sa luminiscencia môže nazývať aj fluorescencia, fosforescencia, dosvit alebo oneskorená emisia svetla atď. Akonáhle sa excitovaná molekula vráti do jednej z nižších vibračných hladín prvého excitovaného singletového stavu, môže sa vrátiť do jednej z nižších vibračných pod úrovní základného stavu emitovaním fotónu ako fluorescencie, čo je ukázané ako krok 5 na Obr. 6. Vzťah medzi fluorescenčným spektrom a spektrom absorpcie je znázornený na Obr. 6 (D). Fluorescencia sa zvyčajne považuje za zbytočné minutie absorbovanej energie, ale tento jav poskytuje veľmi cenný nástroj na skúmanie fotosyntézy, aj keď výťažok fluorescencie, to je počet emitovaných fotónov v pomere k absorbovaným fotónom, je zvyčajne menší ako niekoľko percent alebo ešte nižší vo fotosyntetických systémoch.

Ďalšia dôležitá energetická dráha sa nazýva „medzi systémové kríženie“ a je zobrazená ako krok 4. Týka sa premeny excitovaného singletového stavu na excitovaný tripletový stav, po ktorom nasleduje radiačný alebo nežiarivý rozpad excitovaného tripletového stavu na základný singletový stav. Svetlo emitované radiačným prechodom tripletu do základného stavu sa nazýva „fosforescencia“ (krok 6). Elektrón rotuje v základnom stave a excitované singletové a tripletové stavy sú znázornené na Obr. 6 (B) a (C). Okrem návratu do základného stavu S_0 zo stavu S_1 emisiou, môže stav S_1 alternatívne prejsť do S_0 medzi systémovým prechodom, čo je znázornené krokom 4 a následne prebehne krok 7. Ako už názov napovedá, nevyžaruje sa žiadne žiarenie a elektrónová excitačná energia sa premieňa na vibračnú excitáciu. Pre určité excitované molekuly je najužitočnejšou cestou rozpadu „prenos energie“ (krok 8), ktorý nakoniec vedie k takzvanému stavu oddelenému nábojom a je životne dôležitý pre fotosyntézu.

Mechanizmus, ktorým dochádza k prenosu energie v rastlinných pigmentových systémoch, sa nazýva rezonančný prenos, ktorý sformuloval Theodor Förster asi pred päťdesiatimi rokmi. Tento typ prenosu energie sa môže javiť ako jednoduchý prenos žiarenia, ale nie je to len proces, kedy jedna molekula vyžaruje fluorescenciu a druhá ju absorbuje. Namiesto toho existuje priama väzba prostredníctvom vzájomných radiačných polí dvoch oscilátorov, čo zodpovedá fluorescencii v donorovej molekule D a absorpcii v akceptorovej molekule A. Rezonančný prenos znamená „intímnejšie“ spojenie medzi donorom energie a akceptorom, skôr pripomínajúci interakciu slabo spriahnutých kyvadiel. Oscilácia spojená s deexcitáciou jednej molekuly je v tesnej blízkosti spojená so „sympatickou“ osciláciou v susednej molekule, čo spôsobuje prenos excitačnej energie na susednú molekulu. Prvá molekula teda odovzdáva

svoju energiu priamo druhej molekule bez zásahu fluorescencie alebo absorpcie v obvyklom zmysle. V dôsledku toho je prenos ešte rýchlejší ako pri žiarení. Je možné, že sa energia prenáša mechanizmom rezonančného prenosu na nevybudenú molekulu na vzdialenosť 50 až 100 Å. Okrem toho tieto dve molekuly nemusia byť totožné. Napríklad k prenosu rezonančnej energie môže dôjsť z chlorofylu *b* na chlorofyl *a*. Jednou dôležitou podmienkou účinného rezonančného prenosu je, aby sa fluorescenčné spektrum darcu prekrývalo s absorpčným spektrom akceptora, ako je znázornené na Obr. 7.



Obr. 7: Ilustrácia Försterovho rezonančného prenosu energie [4]

2.7 Fluorescenčné metódy

Fluorescencia je fotoluminiscenčný proces, pri ktorom sú atómy alebo molekuly excitované absorpciou elektromagnetického žiarenia a následne relaxujú do základného stavu a zbavujú sa prebytočnej energie v podobe fotónov [5]. Významnou vlastnosťou fluorescencie je jej citlivosť, ktorá býva o jeden až tri rady vyššia ako v prípade absorpčnej spektroskopie.

Počas posledných 20 rokov došlo k pozoruhodnému nárastu používania fluorescencie v biologických vedách [6]. Fluorescenčná spektroskopia a časovo rozlíšená fluorescencia sa považujú za výskumné nástroje využívané v biochémií a biofyzike. Práve preto je používanie fluorescenčných metód veľmi atraktívne pri skúmaní fotosyntetických dejov.

2.7.1 Fluorescenčná mikroskopia

Fluorescenčná mikroskopia je technika na štúdium mikro- a nanoštruktúrovaných systémov, či už ide o živé bunky a biologické tkanivá alebo koloidy, tekuté kryštály, polyméry alebo vlákna [7]. V klasickej fluorescenčnej mikroskopii sa súčasne vizualizuje celé pole ale je možné sledovať aj submikrometrovú úroveň detailov postupným skenovaním oblasti záujmu. To sa dosahuje pomocou konfokálnych a dvojfotónových mikroskopov, ktoré umožňujú 3D zobrazovanie. Vyššie laterálne rozlíšenie možno dosiahnuť špeciálnymi technikami ako je

skenovacia optická mikroskopia v blízkom poli (SNOM), stimulovaná emisná deplécia (STED) a stochastická optická rekonštrukčná mikroskopia (STORM). Zahrnutie časovej dimenzie do fluorescenčnej mikroskopie je dosiahnuté technikami fluorescenčného zobrazovania doby života (FLIM), ako v časovej, tak aj vo frekvenčnej doméne.

2.7.1.1 Základné princípy fluorescenčnej mikroskopie

V bežnom optickom mikroskope je vzorka osvetlená zdrojom svetla a to isté svetlo sa analyzuje po interakcii (adsorpcia, odraz, rozptyl, difrakcia alebo lom) so vzorkou [8]. Vo fluorescenčnom mikroskope sa preparát osvetlí svetlom s krátkou vlnovou dĺžkou, napríklad ultrafialovým alebo modrým svetlom [7]. Časť tohto svetla je absorbovaná vzorkou a opätovne vyžarovaná vo forme fluorescencie. Vlnová dĺžka reemitovaného svetla je dlhšia ako vlnová dĺžka dopadajúceho sveta. Aby bolo možné vidieť pomerne slabú fluorescenciu napriek silnému osvetleniu, svetlo použité na excitáciu je odfiltrované sekundárnym filtrom umiestneným medzi vzorkou a okom. Pozorovanie fluorescencie sa uskutočňuje okom alebo CCD kamerou [8].

Do základného usporiadania patrí lampa, ktorá by mala byť výkonným zdrojom svetla bohatým na krátke vlnové dĺžky, medzi lampou a vzorkou by mal byť umiestnený primárny alebo excitačný filter [7]. Filter v kombinácii s lampou by mal poskytovať svetlo v pomerne úzkom pásme vlnových dĺžok zodpovedajúcich absorpčnému maximu fluorofóru. Sekundárny alebo bariérový filter bráni tomu, aby sa excitačné svetlo dostalo do oka pozorovateľa, a je umiestnený kdekoľvek medzi preparátom a okom. Excitačný filter by mal mať v ideálnom prípade úplnú priepustnosť v oblasti absorpčného vrcholu fluorofóru, pričom pri vlnových dĺžkach fluorescencie by mal mať nulovú priepustnosť, teda by mal byť úplne nepriehľadný. Naopak sekundárny filter by mal mať 100 % priepustnosť pri vlnových dĺžkach fluorescencie a nulovú priepustnosť v oblasti použitej na excitáciu. Tieto dva filtre sú komplementárne.

2.7.2 Fluorescenčná korelačná spektroskopia

Fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS) je metóda založená na pozorovaní jednej alebo niekoľkých molekúl, ktorá nevyžaduje ich povrchovú imobilizáciu a môže sa vykonávať na molekulách v roztoku. Pozorované molekuly sú priebežne difúziou dopĺňané do malého pozorovaného objemu. FCS tak umožňuje nepretržité pozorovanie počas dlhších časových období a nevyžaduje výber špecifických molekúl [6].

Je založená na analýze časovo závislých fluktuácií intenzity, ktoré sú výsledkom nejakého dynamického procesu, typicky translačnej difúzie do a z malého objemu definovaného zaostreným lúčom a konfokálnou štrbinou. Keď fluorofór difunduje do zaostreného svetelného lúča, dochádza k výbuchu emitovaných fotónov v dôsledku viacerých cyklov excitácie a emisie z rovnakého fluorofóru. Ak fluorofór difunduje z objemu rýchlo, tak fotónový výbuch trvá krátko. Za typických podmienok nepodlieha fluorofór fotobieleniu počas doby, v ktorej zotrúva v osvetlenom objeme, ale často dochádza aj k prechodom do tripletového stavu. Časovo závislou korelačnou analýzou je možné určiť difúzny koeficient fluorofóru. V tomto prípade sa „časovo závislý“ týka skutočného času a nie časového oneskorenia alebo časovo závislého rozpadu po impulznom budení. FCS má mnoho aplikácií, pretože široká škála procesov môže mať za následok kolísanie intenzity. Okrem translačnej difúzie môžu nastať fluktuácie intenzity v dôsledku väzby ligandu s makromolekulou, rotačnej difúzie, vnútornej dynamiky makromolekúl, medzi systémového prechodu a reakcií excitovaného stavu.

2.7.2.1 Autokorelačná funkcia

Fluktuácia fluorescenčného signálu $F(t)$, z ktorej môžu byť získané informácie o pohybe jednotlivých molekúl, ktoré sú vo vzorke vo veľmi nízkej koncentrácii je analyzovaná pomocou autokorelačnej funkcie [6]. Autokorelačná funkcia ukazuje súvislosť intenzity fluorescencie v čase t , $F(t)$ s intenzitou po čase oneskorenia τ , $F(t+\tau)$. Čas t sa vzťahuje na skutočný čas, kedy sú pozorované intenzity. Časy zberu dát sa pohybujú od sekúnd po minúty. Čas oneskorenia τ je rozdiel v reálnom čase medzi meraniami $F(t)$ a $F(t+\tau)$, typicky v rozsahu 10^{-2} do 10^2 ms.

Táto funkcia má svoje maximum pre malé časové intervaly τ , pre dlhšie τ klesá k nule. To je spôsobené tým, že v dostatočne malých časových intervaloch τ je vysoko pravdepodobné, že ak na začiatku intervalu bola v detekčnom objeme prítomná molekula, na jeho konci bude ešte stále prítomná. Teda ak sú fluktuácie intenzity v porovnaní s τ pomalé, tak potom budú mať $F(t)$ a $F(t+\tau)$ rovnakú veľkosť. To znamená, že ak je $F(t)$ väčšia ako priemerná intenzita $\langle F \rangle$, potom $F(t+\tau)$ bude pravdepodobne väčšie ako $\langle F \rangle$.

Pokiaľ sa zvolí dlhší časový interval, tak sa v detekčnom objeme môže vystriedať niekoľko rôznych molekúl. Teda ak sú fluktuácie intenzity vzhľadom na τ rýchle, potom hodnota $F(t)$ a $F(t+\tau)$ nebude súvisieť. Fluktuácia $\delta F(t)$ intenzity fluorescencie $F(t)$ je definovaná autokorelačnou funkciou (2),

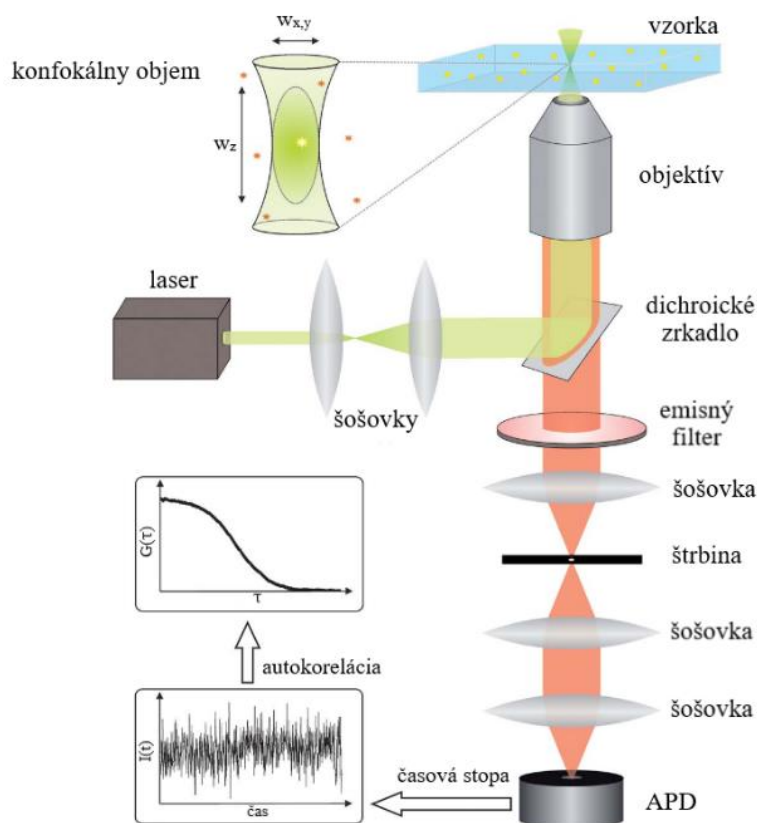
$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2)$$

kde $\langle F(t) \rangle$ značí priemernú hodnotu intenzity fluorescencie v čase a $\delta F(t+\tau)$ odchýlku signálu od jeho priemernej hodnoty v časovom intervale $(t+\tau)$, definovanú rovnicou (3).

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F - (t) \rangle \quad (3)$$

2.7.2.2 Inštrumentácia

Typický prístroj pre FCS (Obr. 8) je invertovaný konfokálny fluorescenčný mikroskop [9]. Kolimovaný laserový lúč je zaostrý na šošovku objektívu do difrakčne obmedzeného konfokálneho objemu vo vzorke umiestnenej na sklenenom krycom sklíčku. Časť svetla vyžarovaného z tohto konfokálneho objemu je zhromaždená rovnakým objektívom a oddelená od excitačného svetla pomocou dichroického zrkadla a emisného filtra. Emisné svetlo je sústredené na štrbinu blokujúcu väčšinu svetla, ktoré nepochádza z konfokálneho objemu. Tým sa zlepšuje axiálne z-rozlíšenie. Konfokálny objem je typicky asi 0,1 femtolitra. Fotóny prechádzajúce štrbinou sú detegované pomocou „avalanche photo diode“, takzvanej lavínovej fotodiódy (APD). APD má dobrú kvantovú účinnosť a s vhodnou elektronikou umožňuje určiť časy príchodu jednotlivých fotónov s presnosťou v rozsahu pikosekúnd.



Obr. 8: Inštrumentácia pre FSC [9]

2.7.3 Fluorescenčná spektroskopia

Fluorescenčné merania možno vo všeobecnosti rozdeliť do dvoch typov [6]. Prvým viac používaným typom je ustálená fluorescencia, ktorá je realizovaná pri konštantnom osvetľovaní a pozorovaní. Vzorka je ožiarená súvislým lúčom svetla a následne je zaznamenané emisné spektrum. Kvôli nanosekundovej časovej škále fluorescencie je väčšina meraní prevádzaná v ustálenom stave. Keď je vzorka prvýkrát vystavená svetlu, rovnovážny stav sa dosiahne takmer okamžite.

Druhým typom je časovo rozlíšená fluorescencia. Je založená na štúdiu poklesu intenzity fluorescencie po časovo obmedzenej excitácii. Pri týchto meraniach je vzorka vystavená pulzu svetla, pričom šírka pulzu je zvyčajne kratšia ako doba rozpadu vzorky. Pokles intenzity sa zaznamenáva vysokorýchlostným detekčným systémom, ktorý umožňuje meranie intenzity alebo anizotropie na časovej škále nanosekúnd.

2.7.3.1 Ustálená fluorescencia

Pri ustálenej fluorescencii sa ako svetelný zdroj vo všeobecnosti využíva vysokotlaková xenónová oblúčková lampa, ktorá ponúka výhodu nepretržitého vyžarovania od asi 250 nm do blízkej infračervenej oblasti [8]. Na výber excitačnej vlnovej dĺžky sa používa monochromátor. Fluorescencia sa zhromažďuje v pravom uhle vzhľadom na dopadajúci lúč a deteguje sa cez monochromátor fotonásobičom. Automatické snímanie vlnových dĺžok je dosiahnuté motorizovanými monochromátormi, ktoré sú riadené elektronickými zariadeniami a počítačom. Optický modul obsahuje rôzne časti ako držiak vzorky, uzávery, v prípade potreby aj polarizátory a rozdeľovač lúčov, ktorý odráža niekoľko percent excitačného svetla smerom

k fotodióde. Referenčný kanál, teda fotodióda, má dve výhody. Kompenzuje časové kolísanie intenzity lampy pomerovým meraním a umožňuje korekciu excitačných spektier. Pozorovanie vzorky v ustálenom stave je jednoducho priemer časovo rozlíšených javov počas poklesu intenzity vzorky.

2.7.3.2 Časovo rozlíšená fluorescencia

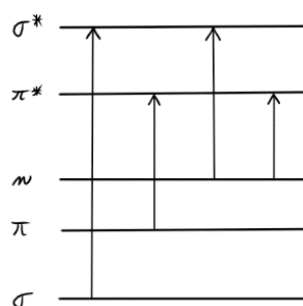
Poznanie dynamiky excitovaných stavov má veľký význam pre pochopenie fotofyzikálnych, fotochemických a fotobiologických procesov. Pulzná fluorimetria a fluorimetria s fázovou moduláciou sú bežne používané na zachytávanie dôb života alebo všeobecnejšie parametrov charakterizujúcich δ -pulznú odozvu fluorescenčnej vzorky [8].

Pulzná fluorimetria využíva krátky budiaci impulz svetla a poskytuje δ -pulznú odozvu vzorky, ktorá je spojená s odozvou prístroja. Táto technika pracuje v časovej doméne. Fázová modulačná fluorimetria využíva modulované svetlo s premenlivou frekvenciou a poskytuje harmonickú odozvu vzorky, čo je Fouriérova transformácia δ -pulznej odozvy. Pracuje vo frekvenčnej doméne. Obe techniky sú teoreticky ekvivalentné ale princípy jednotlivých prístrojov sú odlišné.

V časovej doméne je najpoužívanejšou technikou technika časovo korelovaného sčítania fotónov (TCSPC), prednostne nazývaná technika jednofotónového časovania (SPT). Zábleskové kamery ponúkajú veľmi dobré časové rozlíšenie ale dynamický rozsah je menší ako pri technike jednofotónového časovania. Prístroje, ktoré poskytujú najlepšie časové rozlíšenie sú založené na vzostupnej fluorescenčnej konverzii. Optické klapky tiež poskytujú vynikajúce časové rozlíšenie. Vo frekvenčnej doméne môžu byť merania fázy a modulácie vykonané buď pomocou kontinuálneho vlnového lasera (alebo xenónovej lampy) a optického modulátora, alebo harmonického pulzného lasera.

2.8 UV-VIS spektrometria

Absorpčná spektrometria v ultrafialovej (UV) a viditeľnej (VIS) oblasti spektra predstavuje jednu z najbežnejších techník molekulovej spektrometrie, používaných hlavne v kvantitatívnej analýze [10]. Býva zvyčajne vymedzená vlnovými dĺžkami 180 až 380 nm, respektíve 380 až 780 nm. Je spojená s absorpciou UV-VIS žiarenia a prechodom valenčných elektrónov z molekulových orbitálov σ , π a n na excitovanú elektrónovú hladinu. Povolené sú však iba vybrané prechody znázornené na Obr. 9. Analyt je schopný absorbovať žiarenie o určitých vlnových dĺžkach, ktoré sú preň charakteristické [5]. Prijatie energie atómom alebo molekulou zoslabí tok žiarenia zo zdroja. Tento pokles žiarivého toku závisí na koncentrácii analytu a kvantitatívne je popísaný Lambert-Beerovým zákonom (4).



Obr. 9: Povolené prechody elektrónov molekulových orbitálov [10]

2.8.1 Labmert-Beerov zákon

Tento zákon kvantitatívne popisuje závislosť zoslabenia žiarenia na koncentrácii absorbujúcej látky a hrúbke absorbujúceho prostredia. Platí, že pri danej koncentrácii analytu dochádza k poklesu žiarivého toku s rastúcou hrúbkou absorbujúceho prostredia. Zároveň pri konštantnej hrúbke absorbujúceho prostredia dochádza k poklesu žiarivého toku vstupujúceho žiarenia s rastúcou koncentraciou absorbujúcej látky. Účinnosť absorpcie svetla absorbujúcou látkou pri vlnovej dĺžke λ je charakterizovaná absorbanciou (A) [8],

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$

kde ε je molárny absorpčný koeficient [$\text{dm}^{-3} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], c je koncentrácia [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] absorbujúcich látok a l je hrúbka absorbujúceho prostredia.

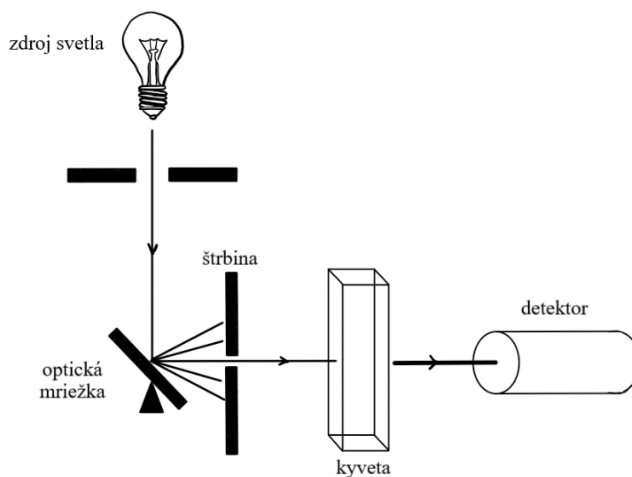
2.8.2 Inštrumentácia

Voľba prístroja (Obr. 10) pre UV-VIS spektrometriu sa riadi nie len typom analytického problému ale aj spôsobom jeho realizácie. Prístroje musia byť vybrané aj podľa ich funkčných a výkonových charakteristík [10].

Jednopaprskové prístroje sú jednoduchšie a lacnejšie, väčšinou ale spĺňajú nároky na rýchlosť merania aj na citlivosť, ak ide o meranie pri jednej vlnovej dĺžke. Pri meraní celého spektra sa interval medzi meraním vzorky a referencie predlžuje, a nepriaznivo sa môže prejavovať na kolísaní intenzity zdroja. Túto nevýhodu nemajú prístroje s diódovým polom a dvojpaprskové prístroje. Využitelný obor elektromagnetického žiarenia je daný spektrálnou charakteristikou všetkých optických prvkov prístroja.

Zdrojom žiarenia zvyčajne býva deuteriová výbojka pre UV oblasť a volfrámová alebo volfrámová-halogénová lampa pre oblasť VIS. Obe oblasti pokrýva xenónová výbojka. Spodné obmedzenie je dané absorpciou atmosféry, absorpciou obalu zdroja určuje dlhovlnný limit, zvyčajne 900 nm.

Disperzným prvkom je zvyčajne difrakčná mriežka. Kvalitné prístroje používajú dvojitý monochromátor s nastaviteľnou šírkou štrbiny, jednoduchšie prístroje majú fixnú štrbinu. Rýchlosť skenovania môže byť až 8000 nm/min. V spektrometroch s diódovým polom sa dá celé spektrum namerať aj v časovej škále jednotiek milisekúnd. Detektorom žiarenia je zvyčajne fotonásobič, kremíková fotodióda alebo diódové pole.



Obr. 10: Inštrumentácia UV-VIS spektrofotometra

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Fotosyntetizujúce membrány

Tylakoidné membrány v chloroplastoch rastlín, rias a siníc sú hnacou silou fotosyntézy, zachytávajú slnečnú energiu a premieňajú ju na chemickú energiu. Hoci ich štruktúry a funkcie boli rozsiahle študované, vnútorná heterogénna a dynamická povaha membránových štruktúr stále nie je úplne pochopená. Skúmanie natívnych tylakoidných membrán *in vivo* je ťažké kvôli ich malej veľkosti a obmedzenému vonkajšiemu prístupu do vnútra chloroplastov.

3.1.1 Fragmentácia a organizácia tylakoidnej membrány

Fragmentácia fotosyntetickej membrány s následnou separáciou a biochemickou charakterizáciou fragmentov predstavuje úspešný prístup k štúdiu štruktúry a funkcie fotosyntetického aparátu. Doposiaľ mnohé štúdie potvrdili, že vezikuly bohaté na fotosystém I pochádzajú zo strómových membrán, zatiaľ čo ťažšia frakcia obsahujúca fotosystém II aj fotosystém I pochádza z oblasti grana, ktorá sa často nazýva aj frakcia grana. Okrem toho sa potvrdilo, že frakcia grana môže byť separovaná na vysoko obohatené vezikuly fotosystému II. Podľa ďalších štúdií je asi 25 % reakčných centier fotosystému II lokalizovaných v oblasti strómy.

Týmito tvrdeniami sa zaoberali aj autori článku [11], ktorí charakterizovali supramolekulárnu organizáciu fotosystému II v odlišných doménach tylakoidnej membrány, jadra grana, okrajov grana, lamiel strómy a takzvanej frakcie Y100. PSII superkomplexy a PSII jadrové diméry, PSII jadrové monoméry, PSII jadrové monoméry bez podjednotiek CP43 a PSII reakčné centrá boli rozlíšené a kvantifikované modrou natívnou PAGE, SDS-PAGE pre druhú dimenziu a imunoanalýzou D1 proteínu. Dimérny PSII (superkomplexy PSII a jadrové diméry PSII) dominoval v jadrovej časti tylakoidného grana, zatiaľ čo monomérny PSII prevládal v lamelách strómy. V lamelách strómy boli nájdené značné množstvá monomérov PSII, ktorým chýbal CP43 proteín a PSII reakčné centrá (komplex D1-D2-cytochrómu *b₅₅₉*). Kvantitatívny obraz supramolekulárneho zloženia PSII, ktorý bol úplne odlišný medzi rôznymi doménami tylakoidnej membrány, bol v článku [11] diskutovaný s ohľadom na funkciu PSII v každej frakcii. Prenos elektrónov v ustálenom stave, zábleskový rozpad fluorescencie (flash-induced fluorescence decay) a EPR analýza odhalili, že takmer všetky dimérne formy predstavovali centrá PSII vyvíjajúce kyslík. Monoméry jadra PSII boli heterogénne a veľká časť kyslík nevyvíjala. Monoméry PSII bez proteínu CP43 a reakčných centier PSII nevykazovali žiadnu aktivitu vyvíjajúcu kyslík.

Štrukturálna organizácia tylakoidných membrán bola ďalej rozsiahle študovaná biochemickými, spektroskopickými a mikroskopickými technikami. Kryo elektrónová tomografia umožnila vizualizáciu tylakoidnej membrány v natívnych chloroplastoch. Použitím sériových rezov zafarbených chloroplastov, ktoré boli kryo-immobilizované a dehydratované, by bolo možné odhaliť trojrozmernú (3D) štruktúru tylakoidnej membrány, vrstvenú oblasť (grana) a nevrstvenú oblasť (stróma lamela) [12]. Hoci elektrónová mikroskopia poskytuje dôležité znalosti o vnútornej štruktúre chloroplastu, pozorovanie molekulárnej dynamiky v tylakoidnej membráne nebolo možné, pretože vzorky bolo potrebné immobilizovať a narezať. Nedávne pozorovania tylakoidných membrán adsorbovaných na pevných nosičoch pomocou mikroskopie atómových síl odhalili podrobnosti o molekulárnej organizácii v membráne.

Okrem toho boli purifikované zložky fotosyntetického aparátu (komplexy LH2 a LH1-reakčné centrá izolované z purpurových baktérií alebo samotné LHCI izolované z suchozemských rastlín atď.) rekonštituované v modelovej membráne podporovanej substrátom, aby bola študovaná ich laterálna organizácia, zhlukovanie, vrstvenie membrán a ich potenciál použitia ako nanomateriálov. Vytvorenie hybridného systému z natívnej tylakoidnej membrány a purifikovaných lipidových alebo proteínových zložiek ako kontinuálnej a laterálne mobilnej lipidovej membrány by mohlo výrazne rozšíriť flexibilitu experimentálnych návrhov na skúmanie fotosyntetického aparátu. Tieto hybridy by mohli poskytnúť výhody prístupnosti citlivým analýzám a pôsobiť ako model, ktorý lepšie reprezentuje zložitosť prirodzeného systému ako jednoduchšie lipidové dvojvrstvy.

V tejto štúdii [13] bola stratégia výroby lipidových membrán, založená na litografickej fotopolymerizácii lipidovej dvojvrstvy, rozšírená o aplikáciu na fotosyntézu zavedením tylakoidných membrán do miest, medzi vopred vytvorenými polymérnymi membránovými dvojvrstvami. Tieto dvojvrstvy vyrobené z polymerizovaných lipidových molekúl boli potom použité, ako templát na zostavenie tylakoidných membrán extrahovaných z chloroplastov špenátu. Ak bola aplikovaná suspenzia izolovanej tylakoidnej membrány samostatne, boli nájdené fragmenty membrány náhodne adsorbované na polymérnych dvojvrstvách. Membrány neboli navzájom spontánne zlúčené a zostali od seba izolované. Aby bola podporená tvorba kontinuálnej rovinatej dvojvrstvy z tylakoidnej membrány, bola zmiešaná tylakoidná membrána so sonikovanými 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholínovými (DOPC) vezikulami. Obsah lipidov v tylakoidnej membráne bol odhadnutý z koncentrácie chlorofylu (0,121 mg/ml) a koncentrácia DOPC bola 0,0005 mol·dm⁻³. Veľkosti tylakoidnej membrány a DOPC vezikúl boli redukované vysokotlakovým homogenizátorom a sonifikáciou, v danom poradí, pretože bolo dobre zdokumentované, že menšie vezikuly sú efektívnejšie pri vytváraní planárnej membrány [14]. Keď bol lipofilný fluorofór trietylamóniová soľ (NBD-PE) začlenený do vezikúl DOPC, fluorescencia z NBD-PE bola tiež pozorovaná v rovnakých miestach ako chlorofyl, čo naznačuje, že tylakoidná membrána aj dvojvrstva DOPC boli homogénne zmiešané.

Predchádzajúce štúdie ukázali, že tylakoidné membrány sa môžu zlúčiť s lipidovými vezikulami a rozprestrieť sa na povrchu lipidovej membrány ako planárna vrstva na membráne [15]. Kontinuita a tekutosť inkorporovanej tylakoidnej membrány bola hodnotená fluorescenčným zotavením po fotobielení (FRAP). Po lokálnom fotobielení buď molekúl chlorofylu alebo NBD-PE lipidov, boli hranice medzi bielenými a nebielenými oblasťami časom rozmazané. Zjavne boli vytvorené spojité a tekuté lipidové dvojvrstvy s pohyblivosťou lipidov a proteínov obsahujúcich chlorofyl. K tvorbe planárnej membrány bolo ďalej pristupované pomocou meraní QCM-D. Keď bol aplikovaný DOPC na samotné vezikuly, bolo pozorované, že frekvenčné aj disipačné posuny prechádzali cez inflexný bod, čo je charakteristické pre transformáciu sférických vezikúl na rovinné dvojvrstvy. Zmena inflexného bodu bola stabilizovaná na asi -30 Hz, čo je typické pre vysokokvalitnú lipidovú dvojvrstvu. Zavedenie zmesi tylakoidnej membrány a DOPC významne zmenilo profily QCM-D. Posun frekvencie ukázal inflexný bod, čo naznačuje, že zo zmesi tylakoidných a DOPC membrán bola vytvorená planárna membrána. Posun disipácie zostal monotónny, ale väčší v porovnaní iba s tylakoidom, čo naznačuje akumuláciu mäkkých membránových vrstiev. Aby bola

preštudovaná úloha vezikúl DOPC pri podpore fúzie tylakoidov, bol zmenený pomer tylakoidnej membrány a DOPC/NBD-PE a pozorovaná tvorba membrány v koraloch. Predpokladalo sa, že tylakoidná membrána nahrádza DOPC a NBD-PE a tým znižuje relatívnu fluorescenciu z NBD-PE. Plošná frakcia sa zvyšovala lineárne s koncentráciou tylakoidnej membrány vo východiskovej zmesi v suspenzii. Tieto výsledky demonštrujú schopnosť vyladiť hustotu membrány odvodenú od tylakoidov v hybridnom dvojvrstvovom systéme.

Aktivita prenosu elektrónov fotosystémom II v hybridnej tylakoidnej membráne bola hodnotená pozorovaním fluorescenčnej emisie chlorofylu z reakčného centra hlavného komplexu zbierajúceho svetlo (LHCII) a fotosystému II. V článku [13] vytvorené hybridné membrány bez ďalšieho zásahu vykazujú relatívne vysokú fluorescenciu chlorofylu. Fluorescencia chlorofylu bola znížená, po prídavku akceptora elektrónov, ktorým bol v tomto prípade 2,6-dimetylbenzochinón (DMBQ), v dôsledku prenosu elektrónov z LHCII-PSII. Predpoklad, že fluorescencia chlorofylu bola výsledkom bráneného prenosu elektrónov, bol ďalej podporený pridaním hydroxylamínu, o ktorom je známe, že disociuje klastre mangánu vo fotosystéme II a blokuje reakciu fotosyntetického prenosu elektrónov na regeneráciu chlorofylu v reakčnom centre (P680) v rámci fotosystému II. Keď bol hydroxylamín ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) pridaný k tylakoidným membránam v prítomnosti DMBQ, fluorescencia chlorofylu bola obnovená. Hoci hydroxylamín môže potenciálne pôsobiť ako donor elektrónov pre P680 a zvýšiť intenzitu fluorescencie, elektrón z hydroxylamínu by bol prenesený do DMBQ a poháňal by tok fotosyntetických elektrónov, takže by sa skôr znížila intenzita fluorescencie. Okrem toho bola intenzita fluorescencie NBD-PE v rovnakých hybridných membránach nezmenená po pridaní DMBQ a hydroxylamínu, čo naznačuje, že zmeny fluorescencie chlorofylu neboli spôsobené priamym zhasaním fluorescencie v dôsledku prenosu energie. Hoci test priamo nemonitoroval prenos elektrónov, výsledky podporovali predpoklad, že rekonštituovaný fotosystém II bol schopný prenášať elektróny. Pretože klastre mangánu sú zodpovedné za funkciu štiepenia vody vo fotosystéme II, účinok hydroxylamínu ďalej naznačoval, že funkcia okysličovania PSII bola zachovaná. Prenos elektrónov z fotosystému II do plastochinónu (PQ) bol ďalej hodnotený pomocou durochinónu, ktorý prijíma elektróny z PQ. V prítomnosti durochinónu bola fluorescencia chlorofylu z hybridných tylakoidných membrán znížená. Použitie týchto dvoch rôznych chinónov ako akceptorov elektrónov a pozorovanie rovnakého účinku ďalej potvrdilo, že aktivita prenosu elektrónov z PSII do PQ na substráte bola zachovaná. Aktivita rekonštituovaného PSI v hybridných membránach bola hodnotená monitorovaním tvorby NADPH. Aby PSI poskytol nadbytok elektrónových donorov bol, do vodného roztoku, pridaný redukovaný 2,6-dichloroindofenol (DCIP). Súčasne bola aktivita PSII inhibovaná pridaním 3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimethylureinu (DCMU) počas tohto testu, aby bola izolovaná aktivita fotosystému I od aktivity fotosystému II. Proteíny feredoxín (Fd) a feredoxín-NADP⁺ reduktáza (FNR) a reaktant NADP⁺ boli pridané vo vhodných koncentráciách do vodného roztoku a membrána bola osvetlená bielym svetlom. Generovanie NADPH prenosom elektrónov z excitovaného fotosystému I na NADP⁺ cez Fd a FNR bolo vyhodnotených odstránením vodného roztoku nad hybridnou membránou a meraním fluorescencie NADPH fluorescenčným spektrometrom. Aj keď nebolo možné odhadnúť množstvo inkorporovaného fotosystému I na povrchu, koncentrácia NADPH sa časom zvyšovala, čo naznačuje, že prenos elektrónov bol katalytickou reakciou. Celkovo výsledky

silne naznačujú, že rekonštituovaný fotosystém I v hybridnej membráne na substráte si zachoval aktivitu prenosu elektrónov. Rovnako bol hodnotený celý prenos elektrónov od fotosystému II cez fotosystém I v hybridnej tylakoidnej membráne vykonaním rovnakého testu bez DCMU a zníženého DCIP. V tomto prípade však bola tvorba NADPH pri osvetlení minimálna, čo naznačuje, že prenos elektrónov medzi PSII a PSI bol väčšinou brzdený.

Kompletná rekonštrukcia celého reťazca fotosyntetického prenosu elektrónov na substrát by umožnila kvantitatívne analýzy zložitých a sofistikovaných molekulárnych systémov fotosyntézy, čo by mohlo pripraviť novú cestu na využitie slnečnej energie so zvýšenou účinnosťou. Vzorovaná tylakoidná membrána na čípe by tiež mohla poskytnúť platformu na skonštruovanie umelého fotosyntetického systému na generovanie chemickej energie, čoho príkladom je systém syntézy ATP využívaním zabudovanej ATP syntázy.

3.2 Izolácia a charakterizácia fotosystému II

Prvým krokom pri príprave tylakoidných membrán v knihe [16] bola izolácia chloroplastov. Tylakoidy boli potom uvoľnené osmotickou lýzou chloroplastového obalu. Všetky kroky boli vykonávané pri teplotách 0–4 °C. Aby boli dosiahnuté maximálne rýchlosti uvoľňovania kyslíka, boli kroky po čistení chloroplastov vykonávané v tme. Tylakoidné membrány boli pripravené zo špenátových listov, ich homogenizáciou, dekantáciou supernatantu a následnou resuspendáciou častíc fotosystému II v resuspendačnom médiu obsahujúcom kryoprotektant. Komplexy fotosystémov I a II boli solubilizované z pripravených tylakoidných membrán použitím detergentu Triton-X 100 a komplexy boli následne oddelené centrifugáciou. Testy na vývoj kyslíka boli uskutočnené v prítomnosti akceptora elektrónov 2,6-dimetylbenzochinónu (DMBQ) s kyslíkovou elektródou. Vývoj kyslíka bol v rozsahu 300–600 $\mu\text{molO}_2/\text{mg chl/h}$. Následne boli častice fotosystému II čistené detergentami, výsledkom čoho boli jadrové častice. Ošetrovaním častíc fotosystému II oktylglucopyranozidom (OGP) bol z častíc odstránený komplex na zber svetla (LHCII), pričom bola ponechaná jadrová častica, ktorá si zachovala D1, D2, CP47, CP43, CP29, polypeptidy cytochrómu b_{559} , 22 a 10 kDa podjednotky a 33 kDa vonkajší polypeptid. Jadrové častice taktiež uchovávajú mangánové ióny spojené s oxidáciou vody. Použitie *n*-heptyltioglukozidu (HTG) spôsobilo podobnú stratu polypeptidov zbierajúcich svetlo, ale všetky tri vonkajšie polypeptidy (17, 23 a 33 kDa) boli zachované. HTG jadrové častice môžu byť pripravené v neprítomnosti hydrogenuhličitanových iónov pri pH 6. Výsledkom je príprava jadra HTG so zvýšenou rýchlosťou vývoja kyslíka pri použití DMBQ ako akceptora elektrónov. Naviazaný bikarbonát sa však stráca z akceptorovej strany fotosystému II, čo dokazuje prítomnosť modifikovaného signálu Q_AFe^{2+} 1,8 EPR signál. Prvým krokom pri príprave komplexu D1/D2/cyt b_{599} je odstránenie 17, 23 a 33 kDa vonkajších peptidov premytím Tris pufrom a následnou iónomeničovou chromatografiou. Tento postup bol vykonaný pri dennom svetle, pretože pomalý obrat „S“ stavov komplexu vyvíjajúceho kyslík zvyšuje šance na uvoľnenie vonkajších polypeptidov. Zahrnutie *orto*-fenantrolínu počas čistenia malo za následok zvýšený výťažok častíc jadra reakčného centra. To mohlo byť spôsobené tým, že *orto*-fenantrolín uľahčuje uvoľňovanie chinónov *a*/alebo nehemového železa. Počas elúcie častíc jadra reakčného centra bol použitý dodecylmaltozid, aby sa zvýšila stabilita komplexov. Elúcia častíc jadra reakčného centra z kolóny môže byť nasledovaná meraním absorpčného spektra eluovaných frakcií.

V inom článku [17] autori použili a porovnali štyri postupy na izoláciu prípravkov fotosystému II s uvoľňovaním kyslíka zo špenátových tylakoidných membrán využívajúce rôzne detergentné a solné podmienky. Tieto prípravky PSII boli charakterizované elektrónovou mikroskopiou so zmrazením, SDS polyakrylamidovou gélovou elektroforézou, ustáleným a pulzným vývojom kyslíka, fluorescenciou 77 K a elektrónovou para magnetickou rezonanciou pri izbovej teplote. Danou charakterizáciou bolo zistené, že všetky vzorky PSII uvoľňujúce O₂ boli vysoko purifikované grana membránové frakcie zložené z párových, pritlačených membránových fragmentov. Lumenálne povrchy membrán, a tým komplex enzýmov uvoľňujúcich O₂ boli priamo vystavené vonkajšiemu prostrediu. Biochemické a biofyzikálne analýzy ukázali, že všetky štyri prípravky boli obohatené o komplex na zber svetla chlorofyl *a/b* a fotosystém II a ochudobnené o zložky spojené so strómou, fotosystémom I a CFI-ATPázou. Štyri vzorky PSII sa tiež líšili v obsahu cytochrómu *f*. Všetky prípravky vykazovali zvýšenú stabilitu produkcie kyslíka a aktivitu elektródy rýchlosti kyslíka v porovnaní s kontrolnými tylakoidmi, zjavne podporovanú nízkymi koncentraciami zvyškového detergentu v prípravkoch PSII. Ako v každej porovnávej štúdií, treba vyhodnotiť relatívne výhody porovnávaných materiálov. Skutočný úsudok o hodnote, ktorý prípravok je „najlepší“, nemožno v súčasnosti odôvodniť, pretože rôzne prípravky majú vlastnosti, ktoré by sa dali s výhodou použiť v rôznych experimentálnych situáciách. Je zrejmé, že vývoj týchto nových metód na výrobu funkčne aktívnych prípravkov PSII otvoril nové možnosti na štúdium funkcie fotosyntetického štiepenia vody a oxidačnej stránky PSII. Dúfajme, že tieto príležitosti povedú k lepšiemu pochopeniu tejto kritickej oblasti fotosyntézy.

Autori v knihe [18] taktiež popisujú izoláciu chloroplastov z listov špenátu veľmi podobnú tej popísanej v knihe [15]. Podstata tohto postupu spočíva v rýchlej a studenej príprave, kedy sa po rozrušení rastlinných buniek uvoľní veľké množstvo protolytických a iných degradujúcich enzýmov a je teda nevyhnuté čo najrýchlejšie odstránenie chloroplastov z tohto prostredia. Nízka teplota znižuje aktivitu enzýmov a pomáha predchádzať úpadku aktivity chloroplastov. Následne boli prevedené pokusy izolácie chloroplastov z iných druhov ale vo všeobecnosti neboli také úspešné ako izolácie zo špenátových listov alebo hrachu. Zdá sa, že existujú dva problémy, a to macerácia listov a prítomnosť polyfenolov a polyfenoxidáz. U druhov tráv môže byť macerácia tkanív veľmi náročná. Dlhé cievné vlákna, ktoré sú uložené paralelne v listoch, spôsobujú problémy pri narúšaní listov. Rozrezanie listov na malé 1 cm štvorčeky môže tento problém čiastočne zmierniť ako aj použitie elektrického noža adaptovaného na použitie žiletiek. Na oddelenie buniek cievnych zväzkov a mezofilných buniek v *C4* rastlinách musí byť použitá iná technika macerácie, konkrétne technika rozdielneho mletia. Krátkou maceráciou boli získané mezofilné chloroplasty a druhým mletím boli získané bunky cievneho zväzku pripojené k cievnym vláknam.

V knihe [19] boli popísané dva postupy izolácie chloroplastov, prvým je mechanické narušenie tkaniva. Jeho výhodou je rýchlosť, hospodárnosť a vysoká výťažnosť stabilných chloroplastov. Jeho hlavnou nevýhodou je, že jeho použitie je obmedzené na niekoľko druhov, najmä špenát a hrach, takmer všetky ostatné druhy poskytujú buď rozbité chloroplasty alebo také, ktoré viažu CO₂ len v nízkej miere. Výhodou druhého spôsobu prípravy chloroplastov, využívajúceho protoplasty, je použiteľnosť pre viacero druhov ale nevýhodami sú časová náročnosť, cena enzýmov degradujúcich bunkovú stenu a hlavne relatívne nízka výťažnosť

chloroplastov a chloroplasty izolované z protoplastov sú menej stabilné, ako chloroplasty izolované prvou metódou. Po izolácii chloroplastov boli prevedené testy na zistenie neporušenosti. Najskôr bola porovnaná rýchlosť redukcie ferrikyanidu, ktorý nepreniká obalom chloroplastu, v dvoch vzorkách chloroplastového preparátu, z ktorých iba jedna bola vystavená osmotickému šoku. Rýchlosť redukcie ferrikyanidu bola sledovaná na O₂ elektróde. Percento neporušenia je dané pomerom rýchlosti transportu neviazaných elektrónov v dvoch preparátoch.

Inaktívne chloroplasty boli izolované mechanicky a tento postup poskytuje izoláciu bez kontaminácie inými bunkovými organelami ako sú mitochondrie. Tylakoidné membrány bez stromálnej kontaminácie boli aj v tomto prípade izolované osmotickým rozrušením vonkajšej chloroplastovej membrány a opätovnou izoláciou tylakoidných membrán odstredením. Na elimináciu stromálnych proteínov, ako napríklad ribulózabisfosfátkarboxyláza, boli inaktívne chloroplasty suspendované v médiu s vysokou iónovou silou pufrovanom približne na pH 8,0 pri 4 °C. Tylakoidné membrány pripravené týmto spôsobom by mali byť použité okamžite, pretože fotochemická aktivita klesá ako funkcia času. Tieto membrány sú schopné vysokej rýchlosti vývoja kyslíka spojenej s redukciou akceptorov elektrónov, ako je NADP alebo ferrikyanid. Tieto membrány vykazujú vynikajúce vlastnosti v tom, že transport elektrónov je spojený so syntézou ATP. Takto pripravené membrány sa rutinne používajú na prípravu fotosyntetických membránových komplexov

Komplex fotosystému I bol pripravovaný zo špenátových tylakoidných membrán suspendovaných v médiu s nízkym obsahom katiónov solubilizáciou s nízkymi koncentraciami detergentu Triton X-100. Komplex bol izolovaný centrifugáciou na sacharózových gradientoch. Komplex fotosystému II bol pripravený zo špenátových tylakoidných membrán solubilizáciou s vysokou koncentraciou Triton X-100 v prítomnosti katiónov a komplex bol izolovaný diferenciálnou centrifugáciou. Komplex cytochrómu *b₆/f* bol pripravovaný z tylakoidných membrán, ktoré boli dôkladne premyté, aby boli odstránené periférne proteíny a väzbové faktory. Komplex bol solubilizovaný detergentami oktylglukozid a cholát sodný a následne bol purifikovaný frakcionizáciou síranom amónnym a centrifugáciou na sacharózovom gradiente.

3.2.1 Chloroplastové lipidy

V knihe [19] sú popísané preparatívne postupy, obsah lipidov a enzymatické aktivity obalu špenátového chloroplastu. Dve membrány alebo obaly, ktoré obklopujú chloroplastovú strómu, sa vyznačujú výrazne odlišným zložením lipidov, než aké sa nachádza v tylakoidných lamelách. Nedávno bolo zistené, že obal je miestom syntézy kyseliny fosfatidovej, diacylglycerolu a galaktolipidov, konkrétne monogalaktosyldiacylglycerolu (MGDG), digalaktosyldiacylglycerolu (DGDG), v špenátových chloroplastoch. Pri stanovení obalových lipidov bolo zistené, že kvantitatívne boli polárne lipidy oboch typov chloroplastových membrán, tylakoidu a obalu identické ale ich pomer sa líšil. Výsledky mastných kyselín určili, že mastné kyseliny boli viac nasýtené v obalových membránach ako v tylakoidoch. Následne bola prevedená biosyntéza lipidov. Výsledky ukázali, že syntéza MGDG začala veľmi rýchlo a zastavila sa po 20 minútach inkubácie v dôsledku spotreby obalového diacylglycerolu. V značnom kontraste DGDG začala hladko po fáze oneskorenia ale pokračovala počas dlhšieho časového obdobia. Galaktozylačný enzýmový systém bol špecificky lokalizovaný v obalových membránach a nebol získaný v rozpustnej forme. Ďalšie výsledky ukázali, že hlavným

vytvoreným produktom bola kyselina fosfatidová, ktorá bola potom pomaly defosforylovaná, čím bol získaný odpovedajúci diacylglycerol. Za týchto testovacích podmienok bolo akumulovanej málo kyseliny lyzofosfatidovej. To naznačuje, že druhá acyláza veľmi málo využívala prvý acylačný produkt, teda kyselinu lyzofosfatidovú.

3.2.2 Subchloroplastové častice obohatené o P700 a železo-sírový proteín

Literatúra [19] popisuje chloroplastové membránové železno-sírové proteíny, ktoré sú súčasťou v primárnej fotochémií PSI. Opísaný postup využíval neiónový detergent Triton X-100 na uvoľnenie častice s obsahom železa a síry a reakčného centra obsahujúceho P700 z chloroplastových lamiel. Rovnako na uvoľnenie významného množstva svetlo zbierajúceho chlorofylu z fragmentu obsahujúceho P700. Použitie gélovej filtrácie a iónovo-výmennej chromatografie viedlo k izolácii fotoaktívnej častice, ktorá mala pomer chlorofyl/P700 25 a obsahovala 10–12 mólov nehemového železa a sulfidu labilného v kyslom prostredí na mol P700. Častica takmer neobsahovala chlorofyl *b*, cytochrómy *b₆/f* a *b₅₅₆* a mal výrazne znížený obsah β -karoténu.

3.3 Kvantifikácia fotosystému I a II v rôznych častiach tylakoidnej membrány zo špenátových listov

Cieľom tejto štúdie [20] bolo presne určiť pomer fotosystému I k fotosystému II, nielen v celom tylakoide, ale aj v každej z rôznych subtylakoidných frakcií. Na tento účel bola fragmentovaná tylakoidná membrána a izolované vezikuly pochádzajúce z rôznych častí membrány. Ako prvá bola prevedená charakterizácia subtylakoidných frakcií. Konkrétne koncentrácia chlorofylu bola stanovená podľa Arnona [21], aby ju bolo možné porovnať s predchádzajúcimi prácami, ktoré taktiež využili Arnonovu metódu. Pre hodnoty celkového chlorofylu (*a+b*) boli hodnoty získané Arnonovou metódou vynásobené faktorom 0,895, aby bolo možné získať hodnoty porovnateľné s hodnotami zodpovedajúcimi metóde podľa Porra a kolektív [22]. Vývoj kyslíka v ustálenom stave bol meraný Clarkovou elektródou s použitím saturujúceho bieleho svetla. Najvyšší vývin kyslíka (na báze chlorofylov) bol zistený v jadrových vezikulách grana, menej bolo v samotnom grane a ešte menej v okrajových a stromových lamelárnych vezikulách. V subfrakcii Y-100 nebol (na báze chlorofylov) takmer žiadny detekovateľný vývoj kyslíka. Cieľom autorov bolo použiť vysoko rozlišovacie spektroskopické techniky a kvantifikáciu veľkých fotosyntetických redoxných enzýmov v rôznych kompartmentoch vysoko dynamickej tylakoidnej membrány. Fotosystémy I a II boli potom kvantifikované pomocou elektrónovej paramagnetickej rezonančnej spektroskopie (EPR), ktorá je pre tento účel robustnejšou a presnejšou metódou, pretože oba fotosystémy môžu byť veľmi presne kvantifikované dobre charakterizovanými radikálmi v príslušných reakčných centrách. PSII bol kvantifikovaný pomocou signálu radikálu YD•. Tento radikál pochádzal z neutrálnej radikálovej formy Y-161 a proteínu D2 v špenáte. Pretože pochádzal z definovanej aminokyseliny výtťažok radikálu nemôže nikdy presiahnuť jeden radikál na reakčnom centre PSII. YD• je tiež extrémne stabilný a životnosť radikálu je desiatky minút až hodín v závislosti od S-stavu a materiálu. Radikál je účinne indukovaný osvetlením a vďaka svojej dlhej životnosti sa dá pomerne jednoducho a veľmi presne zmerať. Z meraní a z nich získaných dát bolo zrejmé, že väčšina PSII sa nachádza v granálnej časti membrány. Najväčšia koncentrácia PSII na báze Chl sa nachádza v jadre grana a potom v ostatných frakciách klesá. V porovnaní s Y-100 sú v jadre grana

a v grane 7,4-krát a 6,5-krát silnejšie signály z PSII (na báze chlorofylov). Signály sú 4,5-krát a 4,1-krát silnejšie v tylakoide a okrajoch a 2,7-krát silnejšie v strómovej lamele ako v Y-100. Fotosystém I bol analyzovaný analogickým spôsobom ako PSII. V tomto prípade sa však na odhad PSI použil EPR signál z radikálu $P700^+$ zaznamenaný vo vzorkách oxidovaných ferokyanidom. Údaje získané integráciou EPR spektier $Y_D\bullet$ a $P700^+$ priamo umožnili určiť pomer PSI/PSII v rôznych frakciách s vysokou presnosťou, jednoducho porovnaním dvojito integrovanej plochy spektra. V intaktných tylakoidných membránach bol pomer PSI/PSII $1,13 \pm 0,05$. V špenátových listoch bolo teda o niečo viac centier PSI ako PSII. V membráne však boli veľmi nerovnomerne rozložené. PSI dominuje v stromálnych lamelách (PSI/PSII je $3,10 \pm 0,20$) a rovnako dominuje aj vo frakcii Y-100 (PSI/PSII je $12,75 \pm 1,65$). Na rozdiel od toho bol PSII hojnejší ako PSI v grane. Pomer PSI/PSII bol $0,25 \pm 0,06$ vo frakcii jadra grana, čo bola najčistejšia frakcia PSII, ktorá bola v štúdiu získaná použitým postupom frakcionácie. V okrajoch bolo o niečo viac PSI ako PSII (PSI/PSII je $1,28 \pm 0,13$).

3.3.1 Katalázová a polyfenoloxidázová aktivita fotosystému II

Vďaka svojim jedinečným vlastnostiam, medzi ktoré patrí zber svetla, separácia náboja a oxidácia vody, sa PSII stal najviac študovaným proteínovým komplexom tylakoidnej membrány. Pretože 80 % komplexov PSII sa nachádza v chloroplastovom grane, je možné izolovať fotosystém II v čistej a aktívnej forme izoláciou grana časti tylakoidných membrán. Autori článku [23] sa zaoberali skutočnosťou, že membrány PSII vykazujú katalázové a polyfenoloxidázové aktivity (PPO). Mierne tepelné ošetrenie membrán fotosystému II počas 90 minút pri $30\text{ }^\circ\text{C}$ uvoľnilo väčšinu týchto enzýmových aktivít do supernatantu, sprevádzané sedemnásobnou aktiváciou PPO. Na rozdiel od toho mierne tepelné ošetrenie tylakoidných membrán neuvolnilo žiadne aktivity, čo naznačuje, že oba enzýmy boli viazané na luminálny povrch tylakoidnej membrány. Teplom uvoľnená kataláza fotosystému II spojená s membránou a PPO bola purifikovaná a charakterizovaná. Aktivita katalázy bola korelovaná s 63 kDa polypeptidom, ktorý bol purifikovaný vsádzkovou adsorpciou na aniónomeničové guľôčky, po ktorej nasledovala gélová filtrácia. Kataláza spojená s membránou PSII bola nestabilná v roztoku, pravdepodobne v dôsledku ireverzibilnej agregácie. Enzým bol charakterizovaný z hľadiska veľkosti molekuly, zloženia aminokyselín, UV-viditeľnej absorpcie, obsahu hému, optima pH, citlivosti na inhibítor a hodnoty K_m pre H_2O_2 . Jeho vlastnosti naznačili, že kataláza asociovaná s membránou PSII bola luminálny tylakoidný membránový hemový enzým, ktorý nebol predtým identifikovaný. Zvyšková katalázová aktivita membrán PSII po miernom tepelnom spracovaní bola ireverzibilne inhibovaná špecifickým inhibítorom hemových kataláz, konkrétne 3-amino-1,2,4-triazolom, bez inhibície aktivity evolúcie O_2 . Tento výsledok naznačuje, že veľmi malá, ak vôbec nejaká, katalázová aktivita z membrán PSII v tme je katalyzovaná jeho centrom vyvíjajúcim O_2 . PPO aktivita bola korelovaná s 48 kDa polypeptidom. Počas tepelného spracovania membrán PSII bolo zistené, že 72 kDa polypeptid sa z veľkej časti premenil na 48 kDa polypeptid. Zdá sa teda, že 72 kDa polypeptid je latentným prekursorom aktívneho 48 kDa PPO. PPO spojený s membránou PSII bol purifikovaný aniónomeničovou chromatografiou a charakterizovaný z hľadiska substrátovej špecifickosti, optima pH, citlivosti na inhibítor a molekulovej hmotnosti. Teplom uvoľnený PPO bol identický s enzýmom predtým izolovaným zo špenátových tylakoidných membrán.

3.3.2 Pôsobenie stresových faktorov na proteín reakčného centra D1 v špenátovom tylakoide

Fotopoškodenie proteínu D1 je fotooxidačný proces. Spôsobujú ho reaktívne formy kyslíka, najpravdepodobnejšie singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) alebo hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$) produkovaný nadmernou redukciou akceptorovej strany PSII pri nadmernom osvetlení alebo endogénnymi kationovými radikálmi, ako sú oxidované formy primárneho elektrónového donoru P680 a sekundárneho elektrónového donoru Tyrz (Tyr¹⁶¹ z D1) na PSII [24]. Silné osvetlenie grana môže ľahko spôsobiť poškodenie komplexov PSII reaktívnymi formami kyslíka a endogénnymi kationovými radikálmi, pretože grana sú bohaté na komplexy PSII. Segregácia PSI a PSII v tylakoidoch by mala z transportu elektrónov medzi PSI a PSII urobiť krok obmedzujúci rýchlosť v toku elektrónov. Nadmerná excitácia PSII za týchto podmienok môže stimulovať produkciu reaktívnych foriem kyslíka na akceptorovej strane PSII. Úzka asociácia LHCII s komplexmi jadra PSII by tiež mala stimulovať tvorbu reaktívnych foriem kyslíka v grane. Rozloženie tylakoidov, od ktorého sa tiež očakáva, že povedie k náhodnej distribúcii PSI a PSII na tylakoidoch a disociácii LHCII z jadra PSII, môže byť dôležité, k predídeniu fotopoškodeniu PSII. Pri proteolyze poškodeného D1 proteínu v chloroplastoch vyšších rastlín dochádza k defosforylácii N-koncového Thr proteínu D1 a následnou degradáciou vznikajú 23 a 9 kDa fragmenty ako primárne produkty štiepenia [25]. Proteázy a fosfatázy zahrnuté v týchto krokoch sú pravdepodobne lokalizované v tylakoidoch strómy, koncových membránach grana a okraji grana. Laterálna migrácia poškodených komplexov PSII z grana do oblastí membrány, kde sa poškodené komplexy PSII opravujú, je preto dôležitá pre degradáciu proteínu D1. Odbaľovanie tylakoidov, ak k nemu dôjde pri miernom zaťažení, by malo stimulovať difúziu proteínových komplexov na tylakoidoch, čím sa stimuluje obrat D1.

Autori článku [26] najskôr skúmali, či nadmerné viditeľné svetlo môže vyvolať uvoľnenie tylakoidov. Ďalej, študovali účinky silného osvetlenia na navrstvené a nenavrstvené tylakoidy, aby zistili, či vykazujú rôzne reakcie na nadmerné svetlo. Použitím izolovaných tylakoidov špenátu bol skúmaný vzťah medzi svetlom vyvolaným vyskladáním tylakoidov a poškodením proteínu D1. Autori pri miernom strese očakávali, že sa tylakoidy rozložia, aby sa fotopoškodené komplexy PSII v grane a proteázy mohli pohybovať po tylakoidoch na opravu. Nadmerné svetlo spôsobilo ireverzibilné rozloženie tylakoidov. Porovnaním účinkov svetelného stresu na navrstvené a nenavrstvené tylakoidy bolo zistené, že fotoinhibícia PSII je výraznejšia v naskladaných tylakoidoch ako v nenaskladaných tylakoidoch. V súlade s týmto zistením merania EPR spin trapping preukázali vyššiu produkciu hydroxylových radikálov vo vrstvených tylakoidoch ako v nevrstvených. Záverom autori uviedli, že rozloženie tylakoidov spôsobené svetelným stresom je nevyhnutné, aby sa zabránilo ďalšiemu fotopoškodeniu proteínu D1 a aby sa uľahčila degradácia a odstránenie fotopoškodeného proteínu D1 z komplexov PSII.

Ďalším environmentálnym stresovým faktorom pre PSII je teplo. Pretože tepelný stres významne ovplyvňuje PSII, bolo zdokumentovaných mnoho aspektov PSII, od fyziologických reakcií až po molekulárne mechanizmy. Veľkú pozornosť pritiahla najmä odozva tepelného šoku, vrátane snímania zvýšených teplôt, transdukcie signálu a následnej génovej expresie proteínov tepelného šoku. Všetky tieto mechanizmy by mali fungovať na ochranu PSII pred tepelným stresom alebo na opravu poškodených proteínov v PSII. Štúdie štrukturálnych zmien

v PSII a degradácie podjednotiek PSII pri tepelnom strese sú však obmedzené. Väčšina z nich sa týka analýzy zmien v organizácii komplexov PSII, ako je disociácia chlorofyl-proteínového komplexu (LHCII) zachytávajúceho svetlo z jadra PSII, uvoľňovanie vonkajších podjednotiek komplexu vyvíjajúceho kyslík a mangánu, konformačné zmeny PSII, a teplom indikovanú defosforyláciu PSII podjednotiek.

V tejto práci [17] boli podrobne skúmané účinky mierneho tepelného stresu na proteín D1 špenátových tylakoidov a špecifická degradácia proteínu D1 pri miernom tepelnom strese medzi polypeptidmi PSII. Taktiež bola študovaná možnosť, že FtsH proteáza je zodpovedná za degradáciu D1 proteínu poškodeného pri miernom tepelnom strese. Pri vystavení špenátových tylakoidov miernemu tepelnému stresu (40 °C počas 30 minút), bol vývoj kyslíka inhibovaný a došlo k štiepeniu proteínu D1 viažuceho sa na reakčné centrum PSII, čím bol vytvorený 23 kDa N-koncový fragment proteínu D1 detegovaný analýzou Western blot. Degradácia proteínu D1 bola stimulovaná pridaním ATP a zinku a inhibovaná EDTA, čo naznačuje účasť ATP-dependentnej metaloproteázy na štiepení D1. Proteáza bola solubilizovaná pôsobením 2 mol·dm⁻³ KSCN na tylakoidy. Následne bola detegovaná proteázová aktivita v supernatante gélovou elektroforézou v oblasti 70–80 kDa. V tylakoidoch bol pomocou hmotnostnej spektrometrie detegovaný homológ *Arabidopsis* FtsH8 ako jediná proteáza, ktorá bola prítomná v oblasti 70–80 kDa. Nakoniec bola proteázová aktivita rekonštituovaná použitím tylakoidov a supernatantu tylakoidov ošetrovaných KSCN. Všetky tieto údaje podporili hypotézu o zapojení FtsH do degradácie tepelne poškodeného proteínu D1. FtsH proteázy v tylakoidoch majú dva transmembránové helixy na N-koncovnej strane a katalytickú doménu na C-koncovom segmente vystavenom stróme. Preto autori predpokladali, že FtsH proteázy rozpoznávajú čiastočne denaturovanú štruktúru proteínu D1, ktorý bol vystavený tepelnému stresu. DE-slučka proteínu D1, ktorá obsahuje väzbové miesto pre Q_b plastochinón, ako aj herbicídy, môže byť jedným z miest, kde k takejto konformačnej zmene dochádza. Herbicídy, ako napríklad bromoxynil alebo ioxynil, ktoré sa viažu na miesto Q_b, inhibovali štiepenie D1, čo naznačovalo, že DE-slučka proteínu D1 je citlivá na teplo. Počas mierneho tepelného stresu bol v tylakoidoch štiepený iba proteín D1 a pri iných podjednotkových proteínoch PSII, ako sú D2, CP43 a CP47, nebola zistená žiadna degradácia. V súčasnej dobe nie je známy dôvod, prečo je práve proteín D1 obzvlášť náchylný na mierny tepelný stres. Ako bolo naznačené pri fotoinhibícii PSII, defosforylácia D1 proteínu by mala byť nevyhnutnou podmienkou pre rozpoznanie tepelne poškodeného D1 proteínu špecifickou proteázou. Následne bola proteáza tylakoidov naviazaná na membránu rozpustená s detergentmi Triton X-100, Nonidet P-40, SDS a chaotropným činidlom KSCN. Všetky tieto činidlá účinne odstránili proteolytickú aktivitu z tylakoidov, pretože následné tepelné spracovanie neprodukovalo 23 kDa fragment D1 proteínu. Z analýzy Western blot sa ukázalo, že Triton X-100, SDS a Nonidet P-40 solubilizujú väčšie množstvo FtsH proteáz v porovnaní s ošetrovaním s 2 mol·dm⁻³ KSCN, ale proteázová aktivita v supernatantoch predchádzajúcich ošetrovaní bola nulová. Je to pravdepodobne spôsobené inaktíváciou proteázy ošetrovaním detergentom alebo neefektívnym odstránením detergentov dialýzou pred aplikáciou vzoriek na test aktivity proteázy. Úspešná rekonštitúcia proteázovej aktivity so supernatantmi KSCN neošetrovaných tylakoidov podporila názor, že FtsH sa podieľa na primárnom štiepení D1 proteínu pri tepelnom strese. Táto štúdia silne naznačuje, že FtsH hrá kľúčovú úlohu pri primárnom štiepení proteínu D1 poškodeného tepelným stresom.

3.3.3 Cyklus opravy fotosystému II

Autori sa v článku [27] zaoberali distribúciou rôznych proteínov PSII v rôznych doménach tylakoidnej membrány, aby získali nové informácie o cykle opravy PSII a tiež študovali, ako pevne sú rôzne podjednotky PSII spojené s PSII. Na získanie frakcií tylakoidnej membrány z chloroplastov špenátu bola použitá mechanická fragmentácia bez detergentov, konkrétne sonikácia alebo úprava lisom Yeda, v kombinácii s vodným dvojfázovým delením. Výhodou mechanickej fragmentácie bolo zníženie denaturácie proteínov a rozkladu alebo zníženie umelej agregácie proteínových komplexov v dôsledku prítomnosti detergentov [28]. PSII podjednotky boli nájdené hlavne v oblasti grana a v zníženom množstve v tylakoide strómy. Pomocné proteíny však vykazovali oveľa rozmanitejšiu distribúciu medzi oblasťami tylakoidov. Zistilo sa, že proteín PGR5 bol celkom rovnomerne distribuovaný medzi tylakoidy grana a strómy, zatiaľ čo PGRL1 bol obohatený o tylakoidy strómy. Na získanie prehľadu o proteínovom zložení a čistote rôznych frakcií boli frakcie analyzované pomocou jednorozmernej SDS-PAGE, po ktorej nasledovalo farbenie pomocou Coomassie. Diagnostické podjednotky, o ktorých je známe, že sa nachádzajú v tylakoidoch vystavených stróme, PsaA/B a proteíny ATP-syntázy AtpA a AtpB, boli vysoko obohatené v tylakoidoch strómy a vo frakciách Y-100, zatiaľ čo obsah proteínov LHCI bol najnižšie vo frakciách strómy a postupne sa zvyšovali pri pohybe smerom k frakcii jadra grana. Distribúcia 12 podjednotiek PSII v rôznych častiach tylakoidnej membrány bola semikvalitatívne stanovená pomocou Western blottingu, po ktorom nasledovali denzitometrické analýzy. K fotopoškodeniu PSII dochádza v tylakoidoch grana [29], zatiaľ čo k degradácii proteínu D1 a kotranslačnej inzercii novo syntetizovanej kópie D1 dochádza v tylakoidoch vystavených stróme.

Autori štúdie [27] zistili, že frakcia tylakoidov strómy a frakcia Y-100 obsahovali spolu približne 30 % študovaných proteínov fotosystému II. Ďalej bolo zistené, že OEC proteíny PsbO, PsbP a PsbQ vykazujú veľmi podobnú distribúciu medzi tylakoidnou membránou ako jadrové proteíny PSII, pričom približne 30 % proteínov bolo detegovaných zo strómových tylakoidov a Y-100. Pokiaľ ide o cyklus opravy PSII, ukázalo sa, že prítomnosť CP43 je nevyhnutným predpokladom pre zostavenie komplexu PsbO na PSII a že PsbO sa zostavuje v tylakoidoch strómy, zatiaľ čo PsbP a PsbQ sa zostavujú neskôr, možno v tylakoidoch grana. Na druhej strane sa zistilo, že proteín PsbS je výrazne menej zastúpený vo frakcii Y-100 v porovnaní s inými jadrovými proteínmi PSII, pretože len približne 2 % z nich sa nachádzali vo frakcii Y-100 a viac ako 80 % vo frakcii grana. Distribúcia PsbH a PsbR z väčšej časti sledovala distribúciu proteínov reakčného centra PSII, pričom množstvá týchto proteínov boli len o niečo nižšie v tylakoidoch strómy a vo frakcii Y-100 v porovnaní s jadrovými proteínmi RC (približne 25 % oproti 30 %, v uvedenom poradí). V porovnaní s inými proteínmi PSII, jadrom kódované proteíny LMM PsbW a PsbX boli viac obohatené v grana tylakoidoch a len okrajové množstvá boli detegované vo frakcii Y-100. Pozorovanie výskytu PGRL1 v tylakoidoch strómy bolo v súlade s nedávnou publikáciou [30], ale bolo v rozpore s kolo-kalizáciou PGR5 na rovnakú tylakoidnú frakciu s PGRL1 v Arabidopsis, ktorú taktiež autori článku skúmali. Uvedené výsledky s tylakoidnými frakciami špenátu aj Arabidopsis skutočne odhalili rozdielnu distribúciu proteínov PGRL1 a PGR5. V súčasnosti si tento rozpor nevedia autori článku vysvetliť. Nedávne výsledky z experimentov vykonaných s umelým a prirodzeným kolísavým svetlom však naznačujú, že úloha proteínu PGR5 je oveľa dôležitejšia

ako to, že by mal byť „iba“ zložkou cyklického prenosu elektrónov. Podľa názoru autorov je PGR5 rozhodujúci pre reguláciu lineárneho toku elektrónov najmä pri náhlych vysokých svetelných píkoch a prostredníctvom tejto funkcie pri fotosyntetickej kontrole chráni PSI pred fotopoškodením [31]. Táto dvojitá úloha PGR5, je v súlade s jeho lokalizáciou aj v membránach grana. Nedávno bola navrhnutá ďalšia úloha aj pre PGRL1, pretože sa ukázalo, že tvorí komplex s Plsp1, čo je izoforma peptidázy na spracovanie tylakoidov, ktorá po translokácii odstraňuje signálny peptid prenášajúci tylakoid proteínov zacielených na lumen. Navrhlo sa, že PGRL1 by mohol pôsobiť ako regulátor peptidázy spracovávajúcej tylakoidy. Translokácia proteínu pravdepodobne prebieha v tylakoidoch strómy a táto domnelá dodatočná úloha by mohla vysvetliť lokalizáciu PGRL1 viac výlučne v tylakoidoch strómy v porovnaní s jeho interakčným partnerom PGR5.

3.3.4 Fluorescenčná analýza životnosti fotosystému II a fotosystému I

Autori článku [32] merali zánik fluorescencie chlorofylu a pri 4 °C v anaeróbných podmienkach v stabilizovanom komplexe reakčného centra fotosystému II izolovanom zo špenátu pomocou multifrekvenčnej (2–400 MHz) fázovej fluorimetrie s krížovou koreláciou. Porovnanie výsledkov získaných z analýzy pomocou Gaussovej a Lorentzovej distribúcie životnosti ukázalo, že v otvorených reakčných centrách bol vysoký podiel rýchlych komponentov zoskupených v rozsahu 0–300 ps. Potom nasledoval rozpad na pomalé komponenty v oblasti 2–20 ns. Po uzavretí reakčného centra nastala dynamická zmena. Došlo k posunu od veľmi širokej, takmer bezvýznamnej, k užšej distribúcii so zvýšeným čiastkovým príspevkom z kratších životností. Najvýraznejším účinkom bolo vymiznutie dlhotrvajúcich pomalých fluorescenčných zložiek (5–20 ns) po uzavretí reakčných centier. Keďže jav uzatvorenia autori interpretovali ako redukciu Pheo na Pheo⁻ [33], vymiznutie pomalých komplexov bolo kvôli absencii rekombinačných reakcií. Pomalé zložky (5–20 ns) boli spojené s rekombinačnými reakciami, ako navrhujú Klimov a spolupracovníci [34] pre premennú fluorescenciu chlorofylu *a* v PSII. Na druhej strane, rýchle zložky (0–300 ps) boli spojené s rýchlou fluorescenciou, ktorá môže alebo nemusí zahŕňať príspevky k prenosu excitačnej energie medzi 6 chromoformi (4 chlorofyl *a* a 2 Pheo molekuly) a konkurenciu s oddelením náboja. Vzhľadom na skutočnosť, že po uzavretí reakčného centra nenastala žiadna dramatická zmena v životnosti rýchlych komponentov, aj keď bolo možné pozorovať výraznejšie zostrenie, ktoré bolo zrejme spôsobené väčším príspevkom kratšieho komponentu k celkovému rozdeleniu, považuje sa za pravdepodobné, že separácia náboja tieto zložky veľmi neovplyvňuje.

V článku [35] boli merané fluorescenčné emisné spektrá PSI a PSII. Pri vlnových dĺžkach pod 680 nm väčšina fluorescenčnej emisie pochádzala z PSII, zatiaľ čo pri vlnových dĺžkach nad 710 nm to bolo obrátené. Neexistuje však jediná vlnová dĺžka, pri ktorej by k fluorescencii prispieval iba jeden fotosystém. Okrem toho, fluorescenčné kvantové výťažky PSI boli asi iba 0,3–0,4 % (životnosť 50–80 ps), zatiaľ čo fluorescenčné kvantové výťažky PSII sa pohybovali asi od 1–10 % (životnosť fluorescencie 0,2–2 ns) v závislosti od otvoreného alebo uzavretého stavu reakčného centra fotosystému II. Meranie PSI/PSII absorpčného pomeru chloroplastov na základe ich fluorescenčných emisných spektier je preto zložité. Na rozdiel od fluorescenčných emisných spektier boli rozdiely v kinetike rozpadu fluorescencie PSI a PSII s uzavretými reakčnými centrami veľmi veľké. Vo všetkých experimentoch bola excitačná vlnová dĺžka nastavená na 633 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke bol extinkčný koeficient chlorofylu *a*

rovnaký ako pri chlorofyle *b* [36]. Absorpcia svetla PSI a PSII je nezávislá od ich pomeru a závisí iba od počtu chlorofylov spojených s fotosystémom. To bolo dokázané pomocou absorpčného spektra PSI z *A. thaliana*, ktoré má pomer chlorofylu *a* ku *b* 9,7 a bolo normalizované na rovnaký počet chlorofylov ako spektrum hlavného svetlo zberného komplexu LHCII, ktoré má pomer chlorofylu *a* ku *b* 1,3. Zatiaľ čo spektrá sú veľmi rozdielne, absorpcia pri 633 nm je rovnaká.

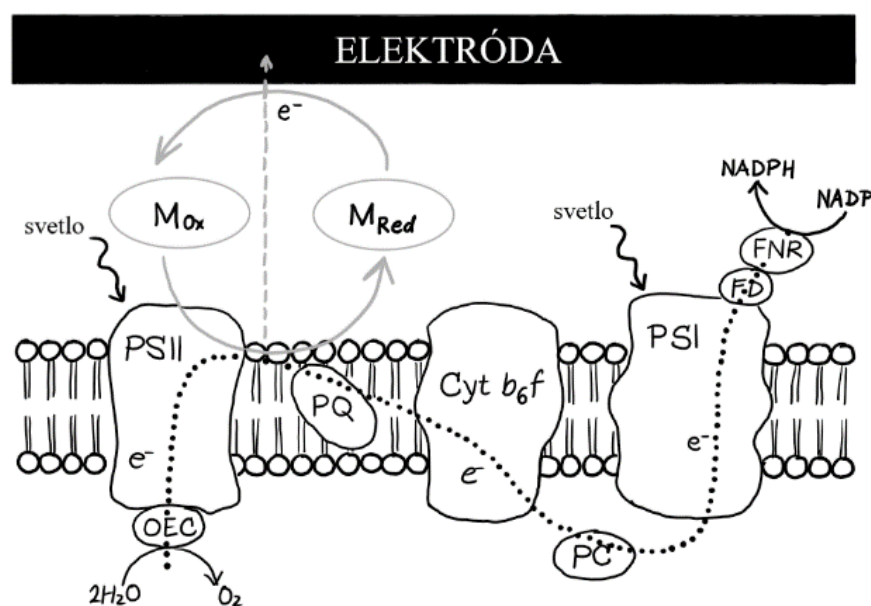
Najprv bolo testované, či krátka životnosť fluorescencie PSI môže byť skutočne použitá na odhad relatívnej chlorofylovej frakcie fotosystému I. Aby sa to dosiahlo na homogénnej vzorke, boli detergentom čistené PSI a LHCII zmiešané v rôznych pomeroch a následne boli merané zániky fluorescencie pre dva spektrálne intervaly, konkrétne pre 665–680 nm a 710–750 nm. Pre interval 665–680 nm bol dominantný zánik fluorescencie LHCII a pre rozsah 710–750 nm bol dominantný zánik fluorescencie PSI. Pre PSI bol pozorovaný iba jeden čas rozpadu 80 ps, zatiaľ čo sa zvyčajne pozorujú dve zložky okolo 20 ps a 80 ps. Preložený príspevok životnosti fluorescencie 80 ps bol vnesený do grafu pre rôzne zmesi a porovnaný s vypočítanou hodnotou. Bola získaná veľmi dobrá zhoda medzi experimentálnymi údajmi a vypočítanými hodnotami, čo potvrdilo, že krátka životnosť fluorescencie PSI môže byť použitá na odhad relatívnej frakcie absorpcie PSI v zmesi. Výhodou je, že reabsorpcia fotónov závislá od vlnovej dĺžky má rovnaký vplyv na detegovanú emisiu PSI a PSII. Toto nie je prípad, keď sa emisia zaznamenáva od 650 nm do 750 nm. V tomto prípade reabsorpcia, ktorá je maximálna okolo 680 nm, väčšinou zníži detegovanú emisiu PSII.

Priemerná životnosť fluorescencie bola dlhšia pre detekčný rozsah 665–680 nm, kde PSII prispieva hlavne v porovnaní s detekčným rozsahom 710–750 nm, kde je príspevok PSI silnejší. Prepojenie údajov ukázalo, že to bolo spôsobené väčším príspevkom zložky rozpadu 80 ps k rozpadu fluorescencie v rozsahu detekcie 710–750 nm. Čas rozpadu 80 ps bol pripísaný rozpadu PSI, zatiaľ čo zložka rozpadu 2 ns zodpovedá PSII s uzavretými reakčnými centrami.

3.4 Fotoindukovaný prenos elektrónov zo špenátových chloroplastov

Všetky vysoké rastliny, riasy a niektoré baktérie (napr. sinice alebo fialové baktérie) vykonávajú fotosyntézu na premenu slnečnej energie na chemickú energiu. Pretože kvantová účinnosť kroku separácie náboja pri fotosyntéze je takmer 100 %, rozsiahly výskum bol zameraný na fotoelektrochemické a umelé solárne články, ktoré napodobňujú fotosyntézu na výrobu energie [37]. Okrem toho vzrástol záujem o premenu fotosyntetickej energie nielen z pohľadu bio solárnej energie (fotovoltaická konverzia) [38], ale aj z pohľadu herbicídnych senzorov [39], čo je príčinou schopnosti herbicídov inhibovať prenos elektrónov v elektrónových transportných reťazcoch. Rasmussen a kolektív použili chloroplasty extrahované zo siedmich rastlín na štúdium fotoreakčných prúdov z hľadiska potenciálnych aplikácií v solárnych článkoch a herbicídnych senzoch [40]. Boli skúmané podmienky pre účinnú extrakciu elektrónov z elektrónových transportných reťazcov vo fotosyntetických organizmoch na elektródy a niekoľko výskumov naznačilo, že je potrebný mediátor. Vo všeobecnosti sa chinónové deriváty a ferrikyanid často používajú ako mediátory pre fotoindukované prúdy. Chloroplasty sú fotosyntetické organely, ktoré existujú v kyslíkových fotosyntetických organizmoch a obsahujú tylakoidné membrány s dvoma dôležitými miestami: proteíny fotosystému I a fotosystému II zodpovedné za fotoindukované reakcie prenosu elektrónov. Chloroplasty, na rozdiel od fotosystému II, majú samo liečiaci mechanizmus

fotopoškodenia a možno ich ľahko izolovať z rôznych organizmov. Chloroplasty však boli menej intenzívne skúmané ako tylakoidné membrány vo fotobioelektrochemických aplikáciách [41]. Rasmussen a kolektív uviedli, že špenátová tylakoidná membrána vykazovala najvyššiu aktivitu spomedzi siedmich skúmaných rastlinných tylakoidných membrán [40]. Preto autori štúdie [41] tiež vybrali špenátové chloroplasty ako fotosyntetické podjednotky pre skúmanie fotoindukovaného prúdu. V tejto štúdii bola skúmaná reakcia prenosu elektrónov z chloroplastov špenátu na elektródy prostredníctvom mediátora s použitím skôr vyvinutého systému uhlíkovej pastovej elektródy (CPE). Na výber mediátorov, ktoré dokážu efektívne prijímať elektróny zo špenátových chloroplastov, bolo skúmaných päť typov mediátorov. Okrem toho bol taktiež skúmaný vplyv prenosu elektrónov v inhibítoroch na fotoindukovaný prúd, aby bol objasnený mechanizmus, ktorým sa fotoindukovaný prúd generuje, a aby bola preskúmaná aplikácia navrhovaného systému CPE na snímanie škodlivých substancií. Typické fotoprúdové odozvy boli merané s použitím spojenia špenátu s 2,5-DCBQ a metódy CPE. Množstvo chlorofylu *a* (2,5-DCBQ) bolo 2,5 nmol a 0,5 % hmotnostných. Intenzita svetla bola $550 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Kontrolné experimenty bez špenátových chloroplastov alebo 2,5-DCBQ nevedli k žiadnej fotoprúdovej odozve. Ihneď po osvetlení bol pozorovaný prudký nárast kladného prúdu, po ktorom nasledoval postupný pokles. Po zhasnutí svetla bol kladný prúd znížený na úroveň pozadia. Fotoprúd bol anodický, čo znamená, že elektróny boli prenášané prevažne zo špenátových chloroplastov do CPE prostredníctvom interakcie s mediátorom pod svetelným ožiarením, ako bolo znázornené na Obr. 11.



Obr. 11: Globálna schéma elektrónového reťazca v špenátovom chloroplaste a mechanizmus tvorby fotoprúdu na CPE [42]

2,5-DCBQH₂ bol fotoredukovaný fotosyntetickým elektrónovým transportným systémom v chloroplastoch špenátu, 2,5-DCBQH₂ reoxidovaný na CPE. Spomedzi rôznych substituovaných chinónov bolo už predtým preukázané, že 2,6-DCBQ je jedným z najlepších akceptorov na extrakciu fotosyntetických elektrónov z fotosyntetických organizmov. Hasan a kol. merali fotoprúdy pomocou deviatich chinónových derivátov a špenátových tylakoidných

membrán a zistili, že 1,4-benzochinón (BQ) bol najlepším mediátorom spomedzi deviatich derivátov [42]. Systém CPE umožňuje jednoduchú fixáciu mediátorov a fotosyntetických prvkov. Autori predpokladajú, že množstvo svetla bolo nedostatočné, pretože svetlo v oblasti vlnovej dĺžky pod 660 nm bolo prerezané, aby bolo zabránené excitácii mediátora. Pretože tu opísaný systém CPE predstavuje atraktívny systém na snímanie škodlivých zlúčenín, má potenciál na široké použitie ako napríklad v systéme testovania celkovej toxicity odpadových vôd.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

- Sorbitol (Penta, číslo šarže: 2106020616, CAS-No: 50-70-4)
- Chlorid horečnatý hexahydrát (Penta, číslo šarže: 2103210319, CAS-No: 7791-18-6)
- MES hydrát (Sigma-Aldrich, číslo šarže: BCCF2829, CAS-No: 1266615-59-1)
- Hydroxid sodný (Penta, číslo šarže: 1905160514, CAS-No: 011-002-00-6)
- Chlorid sodný (Penta, číslo šarže: 2106210616, CAS-No: 7647-14-5)
- Sacharóza (Penta, číslo šarže: 1703270212F, CAS-No: 57-50-7)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, CAS-No: 9002-93-1)
- Hydroxid draselný (Lach-Ner, číslo šarže: PP/2010/00313, CAS-No: 1310-58-3)
- EDTA (Sigma-Aldrich, číslo šarže: BCCB1428, CAS-No: 60-00-4)
- HEPES (Sigma-Aldrich, číslo šarže: SLCP2886, CAS-No: 7365-45-9)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, číslo šarže: 1805180516, CAS-No: 7778-77-0)
- Chlorid mangánatý tetrahydrát (Lachema, ČSN: 684781)
- BSA (Sigma-Aldrich, číslo šarže: SLBJ2586V, CAS-No: 9048-46-8)
- Kyselina askorbová (Penta, číslo šarže: 161003, CAS-No: 50-81-7)
- Percoll® (Sigma-Aldrich, číslo šarže: SLCQ1603, CAS-No: 65455-52-9)

4.2 Použité prístroje

- vysoko-tlakový homogenizátor
- jednokomorová výveva
- centrifúga
- Varian Cary® 50 UV-VIS Spektrofotometer
- Horiba FluoroLog® spektrofluorometer
- spektrofluorometer Fluorocube, Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc.
- fluorescenčný mikroskop Olympus IX 71
- systém prístrojov MicroTime 200
- CCD kamera Newton

4.3 Izolácia tylakoidných membrán

Tylakoidné membrány boli izolované z čerstvých listov špenátu získaných z obchodného reťazca Lidl. Izolácia prebiehala podľa dvoch postupov vybraných na základe rešerše. Prvý postup vychádza z knihy Browna a Coopera s názvom *Bioenergetics: A practical approach*, vydanéj v roku 1995 [16] a bude ďalej v práci označovaný ako postup Brown a Cooper. Z článku s názvom *Photosynthetic Model Membranes of Natural Plant Thylakoid Embedded in a Patterned Polymeric Lipid Bilayer*, vydaného v roku 2020 Yonedom a kolektívom [13], bol vybraný druhý postup. Tento postup bude ďalej v práci označovaný ako postup Yoneda. Oba z týchto postupov boli optimalizované pre dostupné vybavenie a podmienky laboratória. Rovnako boli tieto dva postupy porovnané.

4.3.1 Postup izolácie tylakoidných membrán podľa postupu Brown a Cooper

Najskôr bola pri príprave tylakoidných membrán prevedená izolácia chloroplastov a následne boli z chloroplastového obalu uvoľnené tylakoidy. Všetky kroky boli vykonávané pri tlmenom osvetlení, aby boli častice fotosystému II chránené pred poškodením svetlom.

80 g čerstvých špenátových listov bolo umytých a očistených od veľkých stoniek. Listy boli homogenizované v 250 ml vopred vychladeného mlecieho média, ktoré obsahovalo $0,33 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sorbitol, $0,0002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MgCl_2 , $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MES-NaOH s pH 6,5. Tesne pred použitím bola do mlecieho média pridaná $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyselina askorbová. Homogenizácia prebiehala 15 minút pomocou vysokotlakového homogenizátora, čím boli tylakoidy uvoľnené osmotickou lýzou z chloroplastového obalu.

Vzniknutá kaša bola prefiltrovaná filtráciou za zníženého tlaku. Vzniknutý filtrát bol následne prefiltrovaný druhýkrát. Filtrát bol odstredený pri 4000 ot/min počas 10 minút. Supernatant bol zliaty a získané pelety boli resuspendované v 2 ml hypotonického $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku MgCl_2 na 60 sekúnd aby boli chloroplasty osmoticky šokované. Následne boli pridané 3 ml mlecieho média s dvojitou silou. Zmes bola centrifugovaná pri 4000 ot/min po dobu 20 minút.

Získané pelety s tylakoidnými membránami boli resuspendované v resuspendačnom médiu zloženom z $0,025 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl, $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MgCl_2 a $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MES-NaOH. Následne boli vzorky zamrazené. Jedna čerstvá vzorka bola použitá na stanovenie koncentrácie chlorofylov.

4.3.2 Postup izolácie tylakoidných membrán podľa postupu Yoneda

V druhom postupe izolácie tylakoidných membrány boli tylakoidy purifikované z listov špenátu centrifugáciou v hustotnom gradiente Percoll®. Aj pri tomto postupe boli všetky kroky vykonávané na ľade a pri tlmenom osvetlení.

100 g špenátových listov bolo umytých a očistených od veľkých stoniek. Listy boli homogenizované pomocou homogenizátora s vopred vychladenými 150 ml homogenizačného pufru. Ten obsahoval $0,33 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sorbitol, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MES-KOH (pH 7,5), $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA, $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MgCl_2 , 0,1 % BSA, $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl, $0,0005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 , $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MnCl_2 , a $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny askorbovej. Homogenizácia prebiehala 15 minút.

Vzniknutý homogenizát bol prefiltrovaný filtráciou za zníženého tlaku a vzniknutý filtrát bol prefiltrovaný druhýkrát. Finálny filtrát bol centrifugovaný pri 3500 ot/min počas 10 minút. Po centrifugácii bol supernatant zliaty a sediment bol resuspendovaný v 2 ml homogenizačného pufru. Suspenzia bola nanosená na roztok percoll, ktorý obsahoval $0,33 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sorbitol, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MES-KOH (pH 7,5), $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA, $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MgCl_2 , $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl, $0,0005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 a 40 % Percoll®. Potom nasledovala centrifugácia pri 4000 ot/min po dobu 7 minút. Supernatant bol odsatý, a tým boli zhromaždené chloroplasty.

Izolované chloroplasty boli osmoticky šokované desaťnásobným zriedením tlmivým roztokom. Použitý tlmivý roztok obsahoval $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HEPES, $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 , $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl, $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MgCl_2 a $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA. Zmes bola následne centrifugovaná pri 3500 ot/min po dobu 10 minút. Sedimentované tylakoidné membrány boli suspendované v rovnakom médiu a opäť centrifugované za rovnakých podmienok.

Pelety boli resuspendované v zásobnom pufri obsahujúcom $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$, $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $50 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ a $0,33 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sorbitol. Vzorky tylakoidných membrán boli zamrazené a jedna čerstvá vzorka bola použitá na stanovenie pomeru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*.

4.4 Izolácia častíc fotosystému II

Zo získaných tylakoidných membrán izolovaných dvomi postupmi, boli následne izolované častice fotosystému II už iba jedným postupom. Tento postup bol získaný a optimalizovaný podľa postupu uvedeného v knihe vydanej Brownom a Cooperom [16].

4.4.1 Postup izolácie častíc fotosystému II

Prípravky čerstvých neresuspendovaných tylakoidných membrán boli inkubované na ľade v tme počas 2 hodín. Inkubáciou bola umožnená laterálna migrácia a segregácia komplexov fotosystému I a fotosystému II. Tylakoidné membrány boli následne rozpustené pridaním reruspendačného média a 20% detergentu Tritonu X-100. Zmes bola premiešaná prevracaním a ponechaná na ľade pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 minút s občasným premiešaním.

Nakoniec bola zmes centrifugovaná pri 4000 ot/min po dobu 30 minút. Častice fotosystému II boli po centrifugácii v peletách a komplex fotosystému I v supernatante. Supernatant bol zliaty a pelety boli resuspendované v reruspendačnom médiu obsahujúcom kryoprotektant, teda $0,33 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharózu. Vzorky s časticami fotosystému II boli ihneď po izolácii zamrazené a jedna vzorka bola použitá na stanovenie pomeru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*.

4.5 Fotometrické stanovenie chlorofylu

Vyizolované tylakoidné membrány a častice fotosystému II boli ihneď po izolácii podrobené fotometrickému stanoveniu pomeru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*. K meraniu bol použitý spektrofotometer Varian Cary[®] 50. Každé meranie bolo prevedené trikrát za rovnakých podmienok.

4.5.1 Príprava vzoriek

Koncentrácia chlorofylov bola stanovená metódou podľa Arnona [21]. K vyizolovaným tylakoidným membránam a časticam fotosystému II bol pridaný 80% vodný acetón, v ktorom boli vzorky resuspendované. Následne bola suspenzia centrifugovaná pri 4000 ot/min po dobu 10 minút. Supernatant bol vhodne zriedený a premeraný. Pre fotometrické stanovenie pomeru chlorofylov vo vyizolovaných tylakoidných membránach bol získaný supernatant tridsaťkrát zriedený. Pre stanovenie pomeru chlorofylov častíc fotosystému II bol supernatant zriedený dvakrát.

4.5.2 Meranie absorpčných spektier

Supernatanty získané zo vzoriek tylakoidných membrán pripravených dvoma postupmi a rovnako aj supernatant získaný zo vzoriek častíc fotosystému II boli aplikované do kremennej kyvety a ich absorpčné spektrá boli merané pomocou UV-VIS spektrofotometra Varian Cary[®] 50. Meranie absorpčných spektier prebiehalo v rozsahu vlnových dĺžok od 330 nm do 800 nm.

Samotné merania prebiehali oproti 80% vodnému acetónu. Absorpčné spektrum pre každú vzorku bolo zmerané päťkrát a výsledné spektrum vzniklo spriemerovaním týchto piatich meraní. Všetky vzorky boli premerané v troch opakovaníach. Celkovo boli získané absorpčné spektrá, v troch opakovaníach, pre vzorky tylakoidných membrán izolovaných podľa postupu Brown a Cooper aj podľa postupu Yoneda. Rovnako aj pre častice fotosystému II izolované z týchto tylakoidných membrán.

4.5.3 Spracovanie dát

Dáta boli získané programom Cary Win UV a ďalej spracovávané v programe MS Excel. Pre fotometrické stanovenie koncentrácie chlorofylov a následné stanovenie pomeru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* boli potrebné hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 663 nm a 645 nm. Následne bola koncentrácia v $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorofylov *a* vypočítaná podľa vzťahu (5) a koncentrácia chlorofylov *b* podľa vzťahu (6), kde A_{663} je hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 663 nm, A_{645} je hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 645 nm a F_{Zr} je faktor zriedenia.

$$c_a = (12,70 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}) \cdot F_{Zr} \quad (5)$$

$$c_b = (22,90 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}) \cdot F_{Zr} \quad (6)$$

Celková koncentrácia oboch farbív v $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ bola vypočítaná podľa vzťahu (7) a pomer chlorofylov *a* ku chlorofylom *b* bol vypočítaný podľa rovnice (8).

$$c_a + c_b = (8,02 \cdot A_{663} + 20,20 \cdot A_{645}) \cdot F_{Zr} \quad (7)$$

$$c = \frac{c_a}{c_b} \quad (8)$$

4.6 Charakterizácia pripravených vzoriek fluorescenčnými metódami

Ďalej boli pripravené vzorky charakterizované so zameraním na ich spektroskopické vlastnosti pomocou dvoch fluorescenčných metód. Konkrétne bola použitá ustálená fluorescenčná spektroskopia a metóda merania doby života fluorescencie. Vzorky boli charakterizované v dvoch rôznych prostrediach a jednotlivé prípravy vzoriek na meranie sú popísané nižšie. Každé meranie bolo prevedené v troch opakovaníach. Nakoniec boli vzorky zobrazované pomocou metódy FLIM a fluorescenčným mikroskopom s CCD kamerou.

4.6.1 Príprava vzoriek na charakterizáciu fluorescenčnými metódami

Vyizolované vzorky boli charakterizované v dvoch rôznych prostrediach. V závislosti na fotometrickom stanovení pomeru chlorofylov, kedy boli vzorky merané v 80% vodnom acetóne, bolo toto prostredie použité aj pri fluorescenčnej charakterizácii. Ako druhé prostredie bol zvolený pufor. Charakterizácia vzoriek v pufri je dôležitá pre ďalšie možné experimentálne využitie vyizolovaných špenátových tylakoidných membrán a častíc fotosystému II.

4.6.1.1 Vzorky v 80% vodnom acetóne

Vyizolované a zamrazené vzorky tylakoidných membrán aj vzorky častíc fotosystému II boli rozmrazené a kvantitatívne prenesené do centrifugačných skúmaviek. Následne boli centrifugované 10 minút pri 4000 ot/min. Po centrifugácii bol supernatant zliaty, čím bolo odstránené médium, v ktorom boli vzorky po izolácii zamrazené. Pelety v centrifugačných skúmavkách boli resuspendované v 5 ml 80% vodného acetónu. Potom boli znovu

centrifugované 10 minút pri 4000 ot/min. Po centrifugácii bol supernatant vhodne zriedený a použitý na meranie. Pre charakterizáciu vzoriek vyizolovaných tylakoidných membrán bol získaný supernatant zriedený tridsaťkrát. Pre charakterizáciu častíc fotosystému II bol použitý supernatant bez riedenia.

4.6.1.2 Vzorky v pufri

Vzorky vyizolovaných špenátových tylakoidných membrán boli rozmrazené. Zo vzoriek bol po sedimentácii pevných častíc odsatý supernatant. Ten bol zriedený v pomere 1:3 s pufrom, obsahujúcim $0,025 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl, $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MgCl₂ a $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MES-NaOH.

Vzorky s vyizolovanými časticami fotosystému II boli taktiež rozmrazená a kvantitatívne prenesené do centrifugačných skúmaviek. Následne boli centrifugované 10 minút pri 4000 ot/min. Vzniknutý supernatant bol riedený s rovnakým pufrom, ako vzorky tylakoidných membrán, v pomere 1:5 a použitý na meranie.

4.6.2 Ustálená fluorescenčná spektroskopia

Ako prvé boli vykonané charakterizácie vzoriek pomocou ustálenej fluorescenčnej spektroskopie. Excitačné a emisné spektrá pripravených vzoriek tylakoidných membrán a častíc fotosystému II v dvoch rôznych prostrediach boli merané pomocou spektrofluorometra Horiba FluoroLog[®] v tvare *T* s dvomi detektorovými vetvami. Jednotlivé merania prebiehali v kremennej fluorescenčnej kyvete. Podrobné nastavenie prístroja pre meranie excitačných a emisných spektier vzoriek v prostredí 80% vodného acetónu popisuje Tabuľka 1.

Tabuľka 1: Nastavenie prístroja pre vzorky v 80% vodnom acetóne

Excitačné maximum [nm]	470
Emisné maximum [nm]	652
Inkrement [nm]	1
Vstupná štrbina [nm]	2
Výstupná štrbina [nm]	2
Rozsah excitačného spektra [nm]	400–500
Rozsah emisného spektra [nm]	600–700
Detektory	T1 _c /R1 _c

Pre vzorky v prostredí pufru bolo nastavenie prístroja pozmenené, kvôli ich odlišným vlastnostiam od vzoriek, ktoré boli charakterizované v 80% vodnom acetóne. Vzorky v pufri mali posunuté emisné maximum k vyšším vlnovým dĺžkam, a práve kvôli tomu bolo potrebné upravenie nastavenia merania excitačných a emisných spektier. Toto nastavenie popisuje Tabuľka 2.

Tabuľka 2: Nastavenie prístroja pre vzorky v pufri

Excitačné maximum [nm]	470
Emisné maximum [nm]	680
Inkrement [nm]	1
Vstupná štrbina [nm]	2
Výstupná štrbina [nm]	2
Rozsah excitačného spektra [nm]	400–550
Rozsah emisného spektra [nm]	620–720
Detektory	T1 _c /R1 _c

4.6.2.1 Spracovanie dát

Emisné maximum vzoriek bolo stanovené pri meraní prvej vzorky, a použité pri všetkých opakovaníach. Dáta získané softwarom FluorEssence boli následne prenesené a ďalej spracované v programe MS Excel. Keďže merania boli prevedené v troch opakovaníach, výsledné emisné a excitačné spektrá boli vytvorené spriemerovaním hodnôt zo všetkých troch meraní. Následne boli dáta normované na hodnotu 1. Teda bola nájdená najvyššia hodnota intenzity fluorescence, ktorou boli vydelené všetky príslušné hodnoty intenzity fluorescence. Z takto spracovaných dát boli vytvorené závislosti intenzity fluorescence na vlnovej dĺžke, teda excitačné a emisné spektrá jednotlivých vzoriek meraných v dvoch prostrediach.

4.6.3 Meranie doby života fluorescence

Vzorky boli následne podrobené analýze časovo rozlíšenej fluorescence pomocou prístroja Fluorocube, ktorý pracuje na princípe TCSPC. Aj pri použití tejto metódy boli vzorky charakterizované v dvoch prostrediach a merania prebiehali v kremennej fluorescenčnej kyvete. Nastavenie prístroja pre vzorky tylakoidných membrán aj častíc fotosystému II v prostredí 80% vodného etanolu popisuje Tabuľka 3.

Tabuľka 3: Nastavenie prístroja pre vzorky v 80 % vodnom acetóne

Excitačná vlnová dĺžka diódy NanoLED-470 L [nm]	467
Doba pulzu diódy [nm]	< 250 ps
Emisný monochromátor [nm]	650
Prednastavené maximum píku [counts]	10 000
Štrbina	8

V závislosti na predchádzajúcom meraní vzoriek tylakoidných membrán a fotosystému II v prostredí pufru, metódou ustálenej fluorescenčnej spektroskopie, aj pri charakterizácii doby života fluorescence muselo byť pre tieto vzorky nastavenie prístroja pozmenené. Nastavenie popisuje Tabuľka 4.

Tabuľka 4: Nastavenie prístroja pre vzorky v pufri

Excitačná vlnová dĺžka diódy NanoLED-470 L [nm]	467
Doba pulzu diódy [nm]	< 250 ps
Emisný monochromátor [nm]	680
Prednastavené maximum píku [counts]	10 000
Štrbina	8

Pomocou koloidného kremíka (ludox) bol pri meraniach nastavený signál diódy tak, že emisný monochromátor bol nastavený na excitačnú vlnovú dĺžku použitej NanoLED diódy, konkrétne na hodnotu 467 nm. Merania poklesu intenzít fluorescence prebiehali v programe DataStation.

4.6.3.1 Spracovanie dát

Získané dáta boli po meraní vyhodnotené pomocou softwaru DAS6 Fluorescence Decay Analysis, ktorý pracuje metódou nelineárnych najmenších štvorcov. Typ preloženia bol v softwari nastavený na exponenciálny a dáta boli podľa potreby preložené monoexponenciálnou alebo viac exponenciálnou matematickou funkciou. Vhodnosť použitého preloženia dát bola sledovaná softwarom vypočítanou hodnotou spoľahlivosti preloženia (CHISQ) a druhým ukazovateľom bola krivka reziduálnej analýzy. Výsledné dáta boli exportované a ďalej spracované v programe MS Excel. Namerané dáta z troch opakovaní boli spriemerované a boli vypočítané jednotlivé odchýlky. Rovnako boli z dát vytvorené vyhasínacie krivky a krivky reziduálnej analýzy.

4.6.4 Fluorescenčná korelačná spektroskopia

Po získaní dôb života fluorescence meraných vzoriek boli vzorky podrobené zobrazovaniu metódou FLIM. Vzorky boli premerané na FCS systéme MicroTime 200. Tento systém sa skladá z inverzného mikroskopu Olympus IX 71, excitačných zdrojov, pulzných laserových hlavíc, štyroch nezávislých detekčných kanálov, elektroniky od firmy PicoQuant a skeneru so subnanometrovým rozlíšením. Použitý fluorescenčný mikroskop obsahoval aj CCD kameru Newton, ktorá prenáša obraz z mikroskopu do digitálnej podoby. Zdrojom bola v tomto prípade xenónová lampa a filter mikroskopu bol nastavený na 470 nm.

Pre FCS bol na meranie vzoriek vyizolovaných tylakoidných membrán a častíc fotosystému II použitý fluorescenčný mikroskop, excitačný laser o vlnovej dĺžke 470 nm, dichroické zrkadlo 470/635 nm k rozdeleniu excitačného paprsku od signálu a pásový filter (band pass filter) 520/35 nm.

Takto boli premerané priamo zmrazené vzorky, ktoré boli mrazom vhodne fixované na potrebné meranie. Imerzný objektív mikroskopu bol očistený a bola naň kvapnutá kvapka deionizovanej vody. Kúsok zamrzenej vzorky bol nanosený na stred čistého krycieho kľička uchyteného v držiaku. Držiak s pripravenou vzorkou bol uložený na objektív. Na ovládači Manual Control bola zapnutá excitácia a detektory, čím bol rozsvietený laser. Vzorka bola prekrytá čiernym krytom. Pomocou zaostrovacej skrutky bolo nájdené medzifázové rozhranie najskôr medzi vodou a sklíčkom a potom medzi sklíčkom a vzorkou. Intenzita signálu prichádzajúca do vzorky bola nastavená pomocou filtrov, výber dichroických zrkadiel a filtrov

bol zvolený na základe predchádzajúcich fluorescenčných charakteristík vzoriek. Dáta boli pri meraní zaznamenávané pomocou softwaru SynPhoTime64. Najskôr boli vzorky premerané rýchlymi skenmi. A následne priblížené časti boli preskenované pomalšie. Na vizualizáciu vzoriek bola použitá aj CCD kamera.

4.6.4.1 Spracovanie dát

Získané dáta boli následne vyhodnotené pomocou algoritmu FLIM analýzy, ktorá pre každý pixel stanoví v rámci celkového modelu relatívne zastúpenie a korekciu daných dôb života. Tie sú potom zobrazené ako histogramy dôb života taktiež sú tieto dáta zobrazené graficky pomocou farebnej škály jednotlivých dôb života. Všetky dáta vyhodnotené v programe boli exportované do programu MS Excel, kde boli následne ďalej spracované.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Izolácia a charakterizácia tylakoidných membrán a častíc fotosystému II

Hlavným cieľom práce bola izolácia špenátových tylakoidných membrán a následná izolácia častíc fotosystému II s dôrazom na zachovanie ich natívnych vlastností. Na základe rešerše boli na izoláciu tylakoidných membrán zo špenátových listov zvolené dva postupy. Nasledujúce kapitoly zahŕňajú vyhodnotenie a porovnanie izolácií podľa dvoch postupov a charakterizáciu vyizolovaných špenátových tylakoidných membrán a častíc fotosystému II so zameraním na ich spektroskopické vlastnosti.

5.1.1 Optimalizácia a výsledky použitých izolácií tylakoidných membrán

Na základe rešerše boli tylakoidné membrány zo špenátových listov izolované podľa dvoch postupov (Obr. 12). Prvý postup bol prevzatý z knihy [16], v ktorej autori Brown a Cooper popísali jednoducho reprodukovateľnú viackrokovú izoláciu špenátových tylakoidných membrán. Tento postup Brown a Cooper pozostával z dvoch hlavných krokov. Prvým bola izolácia chloroplastov a druhým osmotická lýza chloroplastového obalu, ktorou boli získané tylakoidy.



Obr. 12: Vyizolované tylakoidné membrány zo špenátových listov postupom Brown a Cooper

Aj napriek dostatočnému popisu postupu izolácie, bola potrebná jeho optimalizácia na podmienky laboratória. Dôležitou súčasťou optimalizácie bola práca pri tlmenom osvetlení, čím boli izolované tylakoidy chránené pred poškodením svetlom. Ďalším krokom na ochranu natívnych vlastností izolovaných tylakoidov bola práca pri nízkej teplote, čo bolo zabezpečené vykonávaním všetkých krokov izolácie na ľade (Obr. 13).



Obr. 13: Homogenizácia špenátových listov na ľade

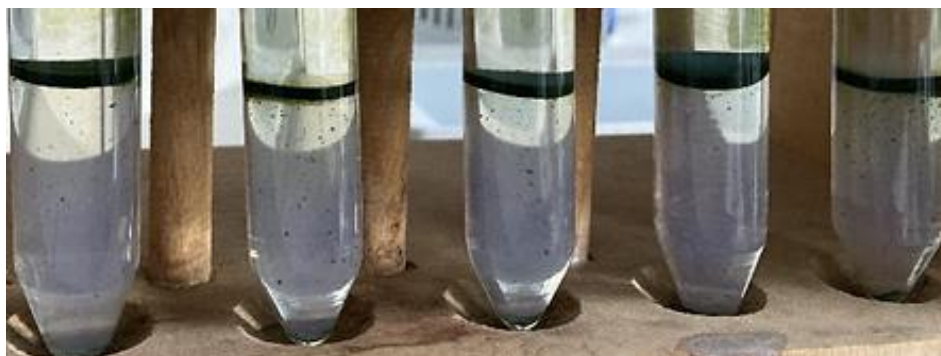
Presný popis izolácie špenátových tylakoidných membrán podľa postupu Brown a Cooper bol uvedený v kapitole 4.3.1. Hlavným problémom tejto izolácie bola rýchla strata natívnych vlastností vyizolovaných tylakoidných membrán po uskladnení v chladničke. V chladničke dochádzalo k rýchlej degradácii vzoriek. Riešením tohto problému bolo mrazenie vyizolovaných vzoriek v médiu s kryoprotektantom. Mrazením si vyizolované vzorky zachovali natívne vlastnosti, čo bolo potvrdené následnou charakterizáciou.

Druhým postupom na izoláciu tylakoidných membrán bol postup Yoneda [13]. V závislosti na aktuálnosti daného článku v ňom autori popisujú zložitejšiu a časovo náročnejšiu izoláciu špenátových tylakoidných membrán. Na rozdiel od postupu Brown a Cooper [16], autori v postupe Yoneda [13] využili purifikáciu tylakoidu zo špenátových listov pomocou centrifugácie v hustotnom gradiente Percoll®. V rámci toho postupu boli špenátové listy homogenizované. Homogenizát bol prefiltrovaný a vzniknutý filtrát bol centrifugovaný. Následne bol resuspendovaný sediment nanosený na roztok Percoll® (Obr. 14) a bola prevedená centrifugácia v hustotnom gradiente.



Obr. 14: Suspenzia nanosená na roztoku Percoll®

Po tejto centrifugácii vznikli v roztoku Percoll® prstence vysoko purifikovaných tylakoidných membrán (Obr. 15), na základe čoho bol tento krok zásadný pre separáciu subchloroplastových fragmentov.



Obr. 15: Prstence tylakoidných membrán v roztoku Percoll® po centrifugácii

Rovnako aj pri tomto postupe boli použité kroky optimalizácie. Konkrétne boli všetky kroky izolácie prevádzané v tme a na ľade. Keďže išlo o dlhší postup izolácie tylakoidných membrán dôležitým faktorom bolo rýchle vykonávanie jednotlivých krokov. Presný popis izolácie špenátových tylakoidných membrán podľa postupu Yoneda bol uvedený v kapitole 4.3.2. Vyizolované vzorky boli taktiež ihneď po izolácii mrazené, čím boli dlhodobo zachované ich natívne vlastnosti.

Pri porovnaní oboch postupov izolácie tylakoidných membrán zo špenátových listov bol okrem rozdielnej náročnosti izolácie pozorovaný aj rozdiel v ich výťažkoch. Z izolácie postupom Brown a Cooper, na ktorú bolo použité menšie množstvo špenátových listov, bol výťažok oveľa väčší ako výťažok izolácie postupom Yoneda, na ktorú bolo použité väčšie množstvo špenátových listov. Na druhú stranu, aj napriek nižším výťažkom získaných izoláciou postupom Yoneda, bol touto izoláciou získaný kvalitnejší produkt, čo ju robí významnejšou z hľadiska ďalšieho možného použitia vyizolovaných tylakoidných membrán.

5.1.2 Výsledky izolácie častíc fotosystému II

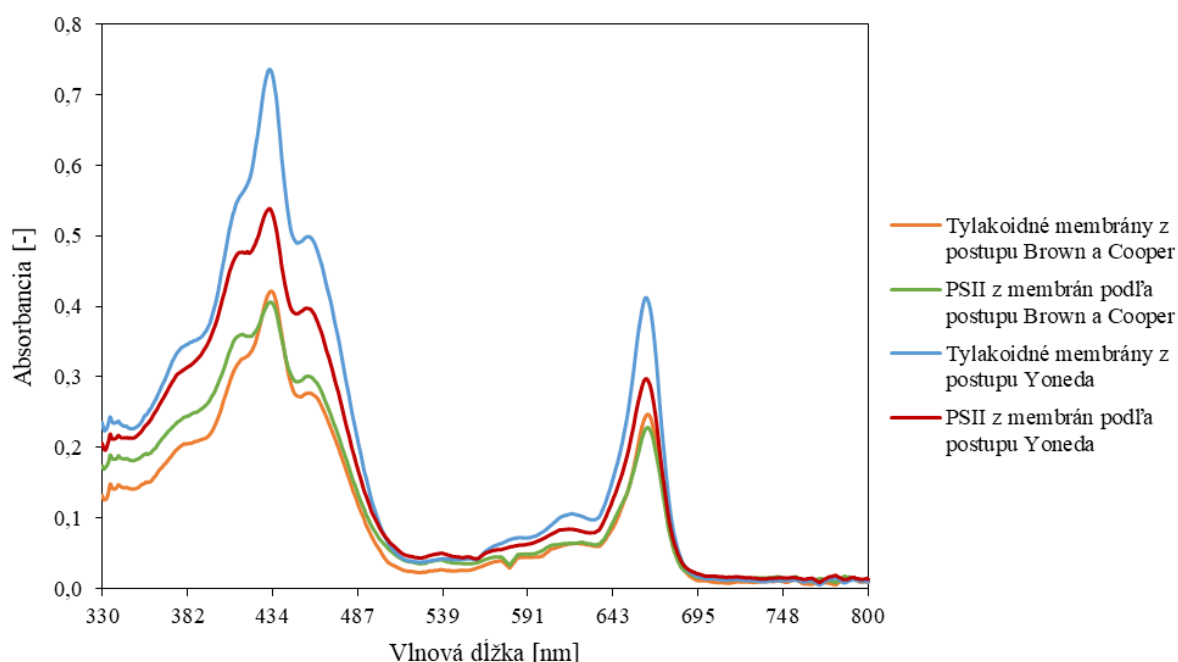
Z vyizolovaných tylakoidných membrán podľa dvoch postupov boli následne izolované častice fotosystému II už len jedným postupom, popísaným v knihe [16]. Tento postup bol zvolený z hľadiska jeho dobrej reprodukovateľnosti. Vzorky tylakoidných membrán izolovaných podľa oboch postupov boli inkubované na ľade, čím bola umožnená laterálna migrácia a segregácia komplexov fotosystému I a fotosystému II. Na rozpustenie tylakoidných membrán bol použitý detergent Triton X-100 a následnou centrifugáciou boli rozdelené častice fotosystému II od častíc fotosystému I. Aj pri tejto izolácii boli použité kroky optimalizácie, teda všetky kroky izolácie boli vykonávané pri tlmenom osvetlení a na ľade, kvôli ochrane častíc fotosystému II pred poškodením svetlom. Výťažky izolácie častíc fotosystému II boli pre tylakoidné membrány izolované dvoma rozdielnymi postupmi rovnaké.

5.1.3 Vyhodnotenie fotometrického stanovenia pomeru chlorofylov

Cieľom tohto merania bolo stanovenie pomeru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* vo vzorkách. Na Obr. 16 môžeme pozorovať absorpčné spektrá vzoriek tylakoidných membrán. Ako aj absorpčné spektrá vzoriek častíc fotosystému II získaných z vopred pripravených tylakoidných membrán vyizolovaných podľa dvoch postupov. Natívny chlorofyl *a* má komplexné spektrum pozostávajúce z množstva prekrývajúcich sa absorpčných pík, ktoré prislúchajú rôznym formám chlorofylu *a*. Absorpčné spektrum je rovnako ovplyvnené aj rôznymi formami chlorofylu *b*. Je známe, že absorpčné maximum chlorofylu *a* sa v acetóne vyskytujú pri vlnovej dĺžke 665 nm a 430 nm [43]. Chlorofyl *b* absorbuje v acetóne pri vlnovej dĺžke 456 nm a 645 nm [44].

Zo závislosti (Obr. 16) pozorujeme absorpčné maximum všetkých vzoriek pri vlnovej dĺžke 433 nm, ktoré odpovedá chlorofylu *a*. Pri vzorkách tylakoidných membrán izolovaných postupom Brown a Cooper a z nich získaných častíc fotosystému II vidíme ďalší pík pri vlnovej dĺžke 665 nm, ktorý taktiež odpovedá absorpčnému maximum chlorofylu *a*. Pre vzorky tylakoidných membrán izolovaných postupom Yoneda a z nich získaných častíc fotosystému II má tento pík maximum pri vlnovej dĺžke 670 nm. Teda môžeme predpokladať, že prevládajúcim chlorofylom vo vzorkách bol chlorofyl *a*. Prítomné absorpčné spektrum

chlorofylu *b* a iných pigmentov bolo prekryté absorpčným spektrom chlorofylu *a*, ktorý vo vyzolovaných vzorkách prevládal. To dokazuje aj vlnová dĺžka 457 nm, pri ktorej absorbuje práve chlorofyl *b* dopĺňajúci funkciu chlorofylu *a*.



Obr. 16: Absorpčné spektrá vzoriek špenátových tylakoidných membrán a častíc fotosystému II

Následne bola vypočítaná koncentrácia chlorofylu *a* (5), chlorofylu *b* (6) a celkového chlorofylu (7) vo všetkých vzorkách. Na výpočet boli použité hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 663 a 645 nm. Následne bol stanovený pomer chlorofylu *a* ku *b* podľa vzťahu (8). Všetky vypočítané hodnoty zobrazuje Tabuľka 5.

Tabuľka 5: Vypočítané hodnoty koncentrácií chlorofylov a ich pomeru

Vzorka	Vlnová dĺžka [nm]	Absorbancia [-]	Cchl <i>a</i> [g·dm ⁻³]	Cchl <i>b</i> [g·dm ⁻³]	Cchlorofyl [g·dm ⁻³]	Pomer
Tylakoidné membrány izolované postupom Brown a Cooper	663	0,23	81,89	25,32	107,19	3,23
	645	0,08				
Častice PSII z membrán podľa postupu Brown a Cooper	663	0,22	4,98	2,23	7,21	2,23
	645	0,09				
Tylakoidné membrány izolované postupom Yoneda	663	0,40	140,12	53,12	193,19	2,64
	645	0,16				
Častice PSII izolované z membrán podľa postupu Yoneda	663	0,29	6,61	3,11	9,71	2,13
	645	0,13				

Ako bolo popísané v literatúre [16] pomer chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* by mal byť vo vzorkách špenátových tylakoidných membrán zhruba okolo hodnoty 3. Po izolácii častíc fotosystému II by mal tento pomer klesnúť na hodnotu 1,8. Uvedené výsledky pomerov chlorofylov (Tabuľka 5) pre jednotlivé vzorky odpovedajú hodnotám uvedeným v literatúre. Môžeme pozorovať, že hodnoty pomerov pre obe vzorky častíc fotosystému II sú trochu vyššie

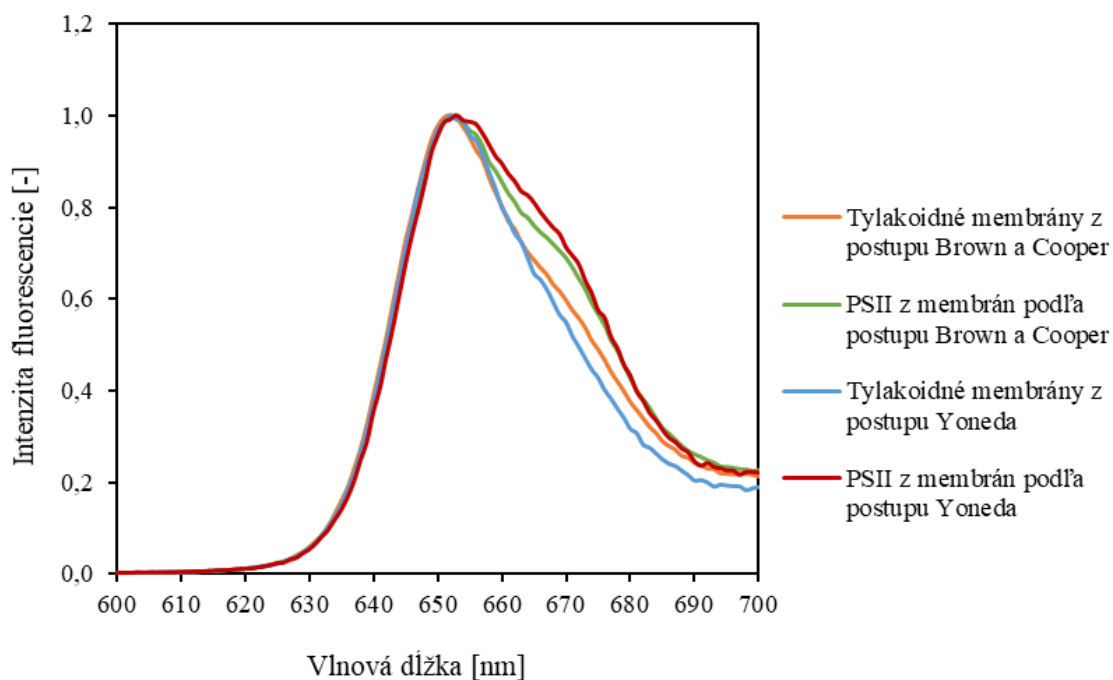
ako v literatúre uvedená hodnota. To mohlo byť spôsobené neúplnou resuspendáciou a rozpustením tylakoidných membrán v detergente Triton X-100 pred samotnou izoláciou častíc fotosystému II. Avšak na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že izolácie špenátových tylakoidných membrán a aj častíc fotosystému II boli úspešné. Vyšší výtťažok chlorofylov bol celkovo získaný optimalizovanou izoláciou postupom Yoneda [13]. To potvrdzuje predpoklad, že touto izoláciou získame kvôli viackrokovému postupu s použitím centrifugácie v hustotnom gradiente čistejší produkt.

5.1.4 Vyhodnotenie meraní ustálenej fluorescenčnej spektroskopie

Ďalším dôkazom úspešnej izolácie špenátových tylakoidných membrán a častíc fotosystému II bolo meranie ich emisných a excitačných spektier ustálenou fluorescenčnou spektroskopickou v dvoch prostrediach. Príprava meraných vzoriek bola popísaná v kapitole 4.6.1.

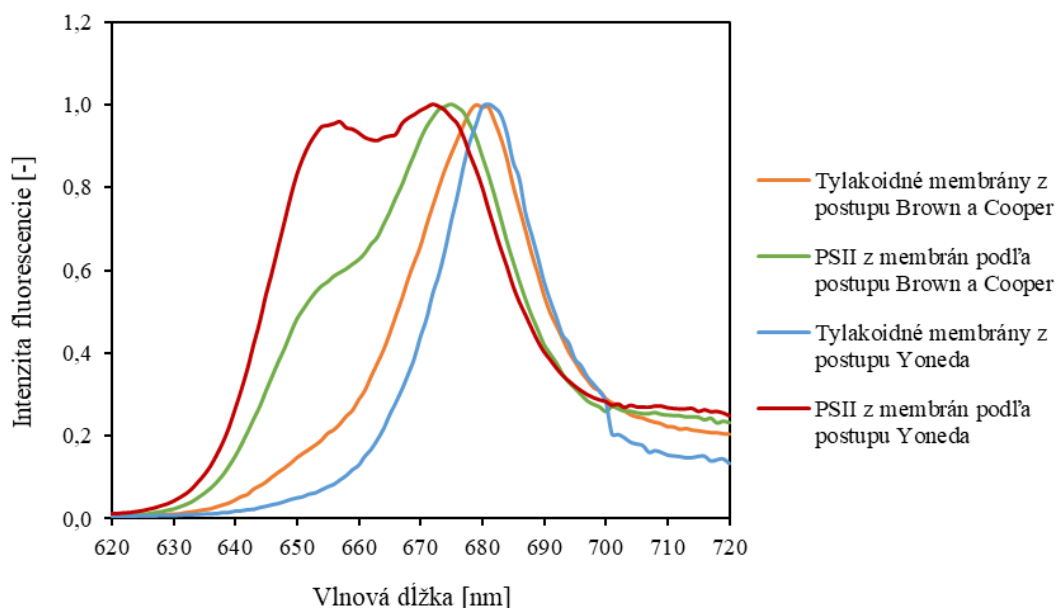
Prvým prostredím bol 80% vodný acetón. Acetón, ako polárne rozpúšťadlo, účinne rozpúšťa lipidy a fotosyntetické pigmenty tylakoidnej membrány ale jeho schopnosť rozpúšťať proteíny nie je tak efektívna. Chlorofyly, ako hlavné fotosyntetické pigmenty, majú fytylový reťazec naviazaný na porfirínový kruh. Práve existencia fytylového bočného reťazca esterifikovaného na karboxylovú skupinu kruhu, dáva chlorofylom ich lipidový charakter, kvôli ktorému sa dajú extrahovať pomocou vodného acetónu. Extrakcia 80% vodným acetónom však úplne neextrahuje menej polárny pigment, ktorým je chlorofyl *a* [45]. Nami zistené výsledky môžeme preto vysvetliť hypotézou, kedy predpokladáme, že použitím daného rozpúšťadla boli selektívne extrahované chlorofyly zo vzoriek. To sa prejavilo aj v emisných spektrách vzoriek meraných práve v 80% vodnom acetóne. Zo závislosti intenzity fluorescencie na vlnovej dĺžke (Obr. 17) vidíme, že vzorky tylakoidných membrán izolovaných oboma postupmi merané v 80% vodnom acetóne majú emisné maximum pri vlnovej dĺžke 652 nm čo odpovedá emisnému píku chlorofylu *b* [43]. Vzorky vyizolovaných častíc fotosystému II majú emisné maximum pri 653 nm. Toto emisné maximum taktiež odpovedá chlorofylu *b*, ktorého hlavný podiel je prítomný práve vo fotosystéme II. V spektrách si však môžeme všimnúť aj nárast intenzity fluorescencie pri vlnovej dĺžke okolo 670 nm, ktorá odpovedá spomínanému chlorofylu *a*, ktorý je taktiež prítomný vo fotosystéme II [43].

Namerané excitačné spektrá pre vzorky v 80% vodnom acetóne sú uvedené ako Príloha 1. V spektrách všetkých vzoriek sú viditeľné dva excitačné píky. Pre vzorky tylakoidných membrán izolovaných podľa oboch postupov sa prvé excitačné maximum vyskytuje pri vlnovej dĺžke 431 nm a druhé pri 460 nm. Pre vzorky častíc fotosystému II je prvý excitačný pik pri vlnovej dĺžke 434 nm a druhý pri vlnovej dĺžke 460 nm. Tieto hodnoty prislúchajú z väčšej časti excitácii chlorofylu *a* ale môže k nim prispievať aj chlorofyl *b*. Keďže excitačné maximum chlorofylu *a* sa v acetóne vyskytujú v rozmedzí vlnových dĺžok 435 nm až 460 nm [46] a excitačné maximum chlorofylu *b* pri vlnovej dĺžke 453 nm [47].



Obr. 17: Normované emisné spektrá vyizolovaných vzoriek v 80% vodnom acetóne

Druhým prostredím, v ktorom boli vzorky fluorescenčne charakterizované bol pufor. Presné zloženie pufru bolo popísané v kapitole 4.6.1.2. Prostredie pufru bolo na meranie zvolené práve kvôli ďalšiemu možnému využitiu vyizolovaných špenátových tylakoidných membrán a častíc fotosystému II. V tomto prostredí je vyhodnotenie fluorescenčných emisných spektier zložitejšie, keďže v pufri nedochádza k žiadnej selektívnej extrakcii. Fluorescencia špenátovej tylakoidnej membrány je pri izbovej teplote heterogénna z dôvodu prítomnosti dvoch fotosystémov. Avšak bolo zistené, že pri laboratórnej teplote emituje fotosystém II 90 % fluorescencie, zatiaľ čo fotosystém I prispieva zvyšnými 10 % [46]. V emisnom spektre vzoriek meraných v prostredí pufru (Obr. 18) môžeme vidieť emisné maximum vzorky tylakoidnej membrány izolovanej postupom Brown a Cooper, ktoré má hodnotu 679 nm a emisné maximum pre vzorku tylakoidnej membrány izolovanej postupom Yoneda, ktoré má hodnotu 681 nm. Tieto hodnoty odpovedajú krátkovlnnej emisii 680 nm spojenej s fotosystémom II [48], konkrétne s jeho reakčným centrom [49]. Keďže fotosystém II vytvára superkomplexy s proteínom zachytávajúcím svetlo LHCII, môže táto vlnová dĺžka súvisieť aj s prítomnosťou asociovaného komplexu chlorofylu *a/b* a LHCII [49]. Emisnému maximu (Obr. 18) vzorky častíc fotosystému II vyizolovaných z tylakoidných membrán získaných postupom Brown a Cooper prislúcha hodnota vlnovej dĺžky 675 nm. Emisné maximum častíc fotosystému II vyizolovaných z tylakoidných membrán získaných postupom Yoneda sa vyskytuje pri vlnovej dĺžke 672 nm. Hodnota emisie pri vlnovej dĺžke 670 nm patrí chlorofylu *a*, ktorý je funkčne viazaný na LHCII. Taktiež môžeme v oboch spektrách vzoriek častíc fotosystému II pozorovať nárast intenzity fluorescencie aj pri vlnovej dĺžke približne 657 nm, čo prislúcha krátkovlnnej fluorescencii pigmentu fotosystému II, ktorý emituje pri vlnovej dĺžke 650 nm [50]. Rovnako môže byť tento emisný pík spojený s chlorofylom *b*, ktorý emituje pri vlnovej dĺžke 653 nm a taktiež sa vo fotosystéme II vyskytuje [51].



Obr. 18: Normované emisné spektrá vyizolovaných vzoriek v pufrí

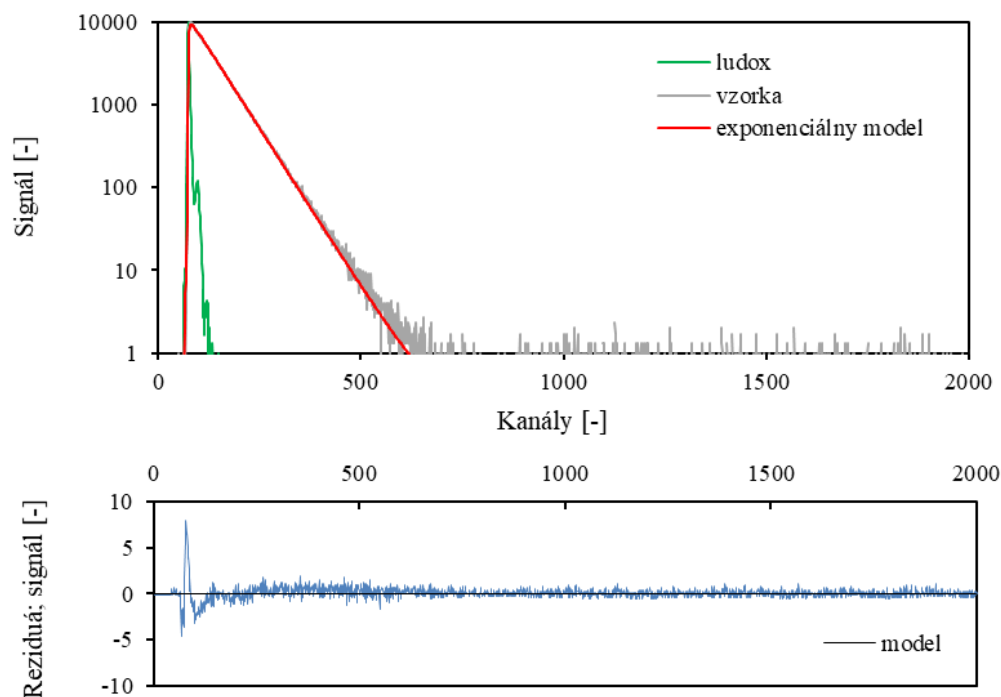
Stanovené excitačné spektrá vzoriek meraných v pufrí sú uvedené ako Príloha 2. Vzorky tylakoidných membrán izolovaných podľa oboch postupov majú excitačné maximum pri vlnovej dĺžke 433 nm, ktoré odpovedá excitácii molekúl chlorofylu *a*, najmä tých spojených s fotosystémom II [52]. Nárast intenzity fluorescencie vzoriek tylakoidných membrán pozorujeme aj okolo vlnovej dĺžky 416 nm, ktorá odpovedá excitácii reakčných centier fotosystému II. Rovnako aj okolo vlnovej dĺžky 470 nm prislúchajúcej komplexu chlorofylu *a/b* a LHCII [53]. Excitačné maximum oboch vzoriek častíc fotosystému II sa vyskytovalo pri vlnovej dĺžke 413 nm, čo odpovedá excitácii reakčných centier fotosystému II [52]. Ďalší nárast intenzity fluorescencie môžeme sledovať pri vlnových dĺžkach okolo hodnôt 433 nm a 462 nm, ktoré prislúchajú excitácii chlorofylu *a* naviazanému na proteín vo fotosystéme II [53].

5.1.5 Vyhodnotenie merania doby života fluorescencie

Merania doby života fluorescencie taktiež dokázali úspešnú izoláciu špenátových tylakoidných membrán a častíc fotosystému II. Rovnako aj v tomto prípade boli vyizolované vzorky merané v prostredí 80% vodného acetónu a pufru, pričom príprava vzoriek už bola popísaná vyššie.

5.1.5.1 Vyhodnotenie dôb života vzoriek v 80% vodnom acetóne

Ako prvé boli merané vzorky v 80% vodnom acetóne. Získané dáta boli preložené monoexponenciálnou funkciou. Ako ukazuje Tabuľka 6, hodnota spoľahlivosti preloženia CHISQ potvrdzuje správnosť monoexponenciálneho preloženia dát. Rovnako ho potvrdila aj reziduálna analýza, ktorej odchýlky sú rovnomerne rozložené okolo osi *x*. Pre zobrazenie reziduálnej analýzy a vyhasínacej krivky bol vybraný Obr. 19, na ktorom je zobrazená závislosť signálu na daných detekčných kanáloch pre vzorku tylakoidnej membrány, izolovanej postupom Brown a Cooper, meranej v prostredí 80% vodného acetónu. Monoexponenciálny model má v použitej logaritmickú mierku tvar priamky, takže priamo dostávame dobu života fluorescencie. Závislosti pre ostatné vzorky tohto merania boli totožné s vybraným Obr. 19, preto neboli prikladané.



Obr. 19: Vyhasínacia krivka a reziduálna analýza tylakoidnej membrány v 80% vodnom acetóne

Tabuľka 6: Doby života fluorescencie vzoriek meraných v 80% vodnom acetóne

Vzorka	Monoexponenciálna funkcia		
	τ [ns]	%	CHISQ
Tylakoidné membrány izolované podľa postupu Brown a Cooper	$3,1 \pm 0,1$	100	$0,8 \pm 0,1$
Častice PSII izolované z membrán podľa postupu Brown a Cooper	$3,1 \pm 0,1$		$1,1 \pm 0,2$
Tylakoidné membrány izolované podľa postupu Yoneda	$3,1 \pm 0,1$		$0,9 \pm 0,1$
Častice PSII izolované z membrán podľa postupu Yoneda	$3,1 \pm 0,1$		$1,1 \pm 0,1$

U vzoriek tylakoidných membrán izolovaných podľa oboch postupov meraných v 80% vodnom acetóne môžeme pozorovať (Tabuľka 6) rovnaké doby života fluorescencie ako pre vzorky častíc fotosystému II. Stanovená doba života fluorescencie sa pohybuje okolo 3 ns. Tieto výsledky podporujú rovnakú hypotézu ako výsledky merania ustálenej fluorescencie. A to takú, že použitím 80% vodného acetónu dochádza k selektívnej extrakcii chlorofylov z vyzolovaných vzoriek tylakoidných membrán aj častíc fotosystému II.

Porovnaním nami stanovených výsledkov s literatúrou bolo zistené, že doba života fluorescencie chlorofylu *b* sa v acetóne pohybuje okolo 3 ns [44]. Rovnako bolo potvrdené, že aj fotosystém II obsahuje proteín s naviazanými molekulami chlorofylu *a* a *b*, ktorého doba života fluorescencie je okolo 3 ns [54]. Tieto hodnoty potvrdzujú nami stanovenú hodnotu doby života fluorescencie jednotlivých vzoriek.

5.1.5.2 *Vyhodnotenie dôb života vzoriek meraných v pufri*

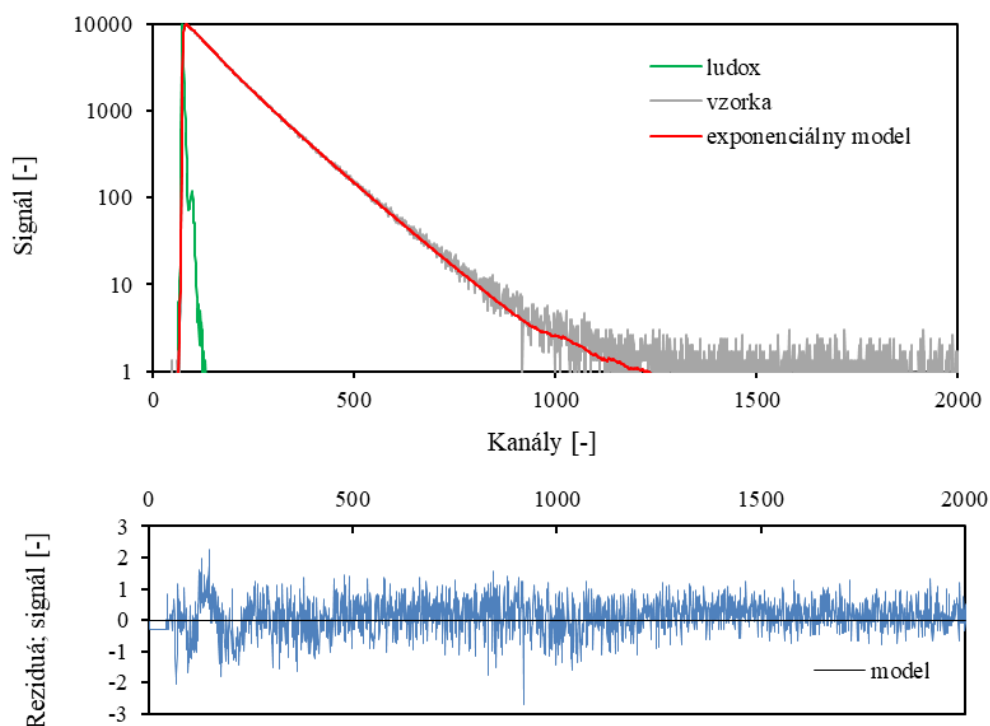
Ako druhé boli merané vzorky v prostredí pufri. Keďže v pufri nedochádza k žiadnej selekcii, namerané dáta vzoriek tylakoidných membrán a častíc fotosystému II boli náročnejšie na vyhodnotenie. To naznačujú aj poznatky získané z rešerše, kedy rôzni autori uvádzajú rôzny počet dôb života fluorescencie. Napríklad zatiaľ čo Szczepaniak a kolektív v článku [55] uviedli 5 dôb života fluorescencie pre častice fotosystému II a celkovo 7 výsledných časov, Wientjes a kolektív v článku [56] uviedli 4 doby života fluorescencie. Taktiež bolo v rámci rešerše zistené, že rozdielne dáta boli vyhodnocované pomocou rozdielnych exponenciálnych preložení dát. Napríklad autori článku [57] použili na vyhodnocovanie dát multiexponenciálne preloženie a na časť dáta bi-exponenciálne preloženie. To potvrdzuje, že je veľmi náročné stanoviť presný počet dôb života fluorescencie vo vzorkách tylakoidných membrán a častíc fotosystému II. Meraním získané dáta boli preložené dvojexponenciálnou funkciou. Správnosť tohto preloženia podporili programom vypočítané hodnoty CHISQ (Tabuľka 7) a rovnako aj krivka reziduálnej analýzy (Obr. 20). Krivka reziduálnej analýzy nie úplne sedela pre krátke doby života fluorescencie ale distribúciu časov potvrdili ďalšie merania technikou FLIM, vyhodnotenú nižšie. Závislosti pre ostatné vzorky tohto merania boli totožné s vybraným Obr. 20, preto neboli prikladané. Pri tomto vyhodnotení boli zistené dva časy fluorescencie. Časy mali rôzne zastúpenie v jednotlivých vzorkách.

Tabuľka 7: Doby života fluorescencie vzoriek meraných v pufri

Vzorka	Dvojexponenciálna funkcia				
	τ_1 [ns]	%	τ_2 [ns]	%	CHISQ
Tylakoidné membrány izolované podľa postupu Brown a Cooper	$0,5 \pm 0,1$	$64,9 \pm 23,9$	$3,7 \pm 0,8$	$35,1 \pm 23,9$	$1,1 \pm 0,2$
Častice PSII izolované z membrán podľa postupu Brown a Cooper	$2,3 \pm 0,8$	$16,8 \pm 4,0$	$5,5 \pm 0,3$	$83,3 \pm 4,0$	$0,9 \pm 0,1$
Tylakoidné membrány izolované podľa postupu Yoneda	$0,2 \pm 0,1$	$92,6 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$
Častice PSII izolované z membrán podľa postupu Yoneda	$3,5 \pm 0,3$	$32,7 \pm 7,1$	$6,1 \pm 0,3$	$67,3 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$

Pri vzorkách tylakoidných membrán mali väčšie percentuálne zastúpenie kratšie doby života fluorescencie (Tabuľka 7). Pre tylakoidnú membránu izolovanú postupom Brown a Cooper to bol čas 0,5 ns a pre vzorku tylakoidnej membrány izolovanej postupom Yoneda čas 0,2 ns. Doba života prvej vzorky tylakoidnej membrány pravdepodobne súvisí s dobou fluorescencie chlorofylov tylakoidnej membrány, ktorá sa pohybuje v rozmedzí od 0,35 ns do 1,47 ns [58]. Rovnako môže táto doba súvisieť s fotosystémom II, ktorý má dobu fluorescencie v rozmedzí 0,2–0,8 ns a 1,5–1,8 ns [59]. Doba života druhej vzorky tylakoidnej membrány súvisí s komponentom tylakoidnej membrány, do ktorého fluorescencie prispieva fotosystém II [56]. Je všeobecne známe, že fluorescencia pri laboratórnej teplote emitovaná chlorofylmi pochádza prevažne z fotosystému II. Dlhšie doby sa vo vzorkách tylakoidných membrán nachádzajú s menším percentuálnym zastúpením. Dlhší čas, 3,5 ns, tylakoidnej membrány izolovanej postupom Brown a Cooper súvisí s trimérom svetlozberného komplexu LHCII, ktorého fluorescenčná doba života je v rozmedzí 3,3 ns až 3,6 ns [59]. U vzorky tylakoidnej membrány izolovanej postupom Yoneda má tento dlhší čas hodnotu 1,8 ns, takže predpokladáme, že je to doba života fotosystému II.

Vzorky s vyizolovanými časticami fotosystému II mali na rozdiel od vzoriek tylakoidných membrán prevládajúce percentuálne zastúpenie dlhších časov (Tabuľka 7). Prevládajúca doba fluorescencie fotosystému II izolovaného z tylakoidných membrán získaných postupom Brown a Cooper mala hodnotu 5,5 ns. Táto doba fluorescencie prislúcha neviazaným chlorofylom s obmedzenou pohyblivosťou vyskytujúcich sa vo fotosystéme II s typickou dobou života okolo 5 ns, ktorá však môže vzrásť až na 7 ns [60]. Druhá vzorka fotosystému II vyizolovaná z tylakoidnej membrány získanej postupom Yoneda mala prevládajúcu dobu života 6,1 ns, ktorá taktiež prislúcha chlorofylom vyskytujúcim sa v danom fotosystéme. Kratšie doby života fluorescencie mali menšie percentuálne zastúpenie. Pre prvú vzorku častíc fotosystému II to bola doba 2,3 ns, ktorá pochádza z malej frakcie uzavretých reakčných centier fotosystému II a neviazaných chlorofylov [56]. Menej zastúpená doba života druhej vzorky fotosystému II mala hodnotu 3,5 ns a je v rozmedzí dôb života platných pre LHCII.



Obr. 20: Vyhasínacia krivka a reziduálna analýza častíc fotosystému II v pufrí

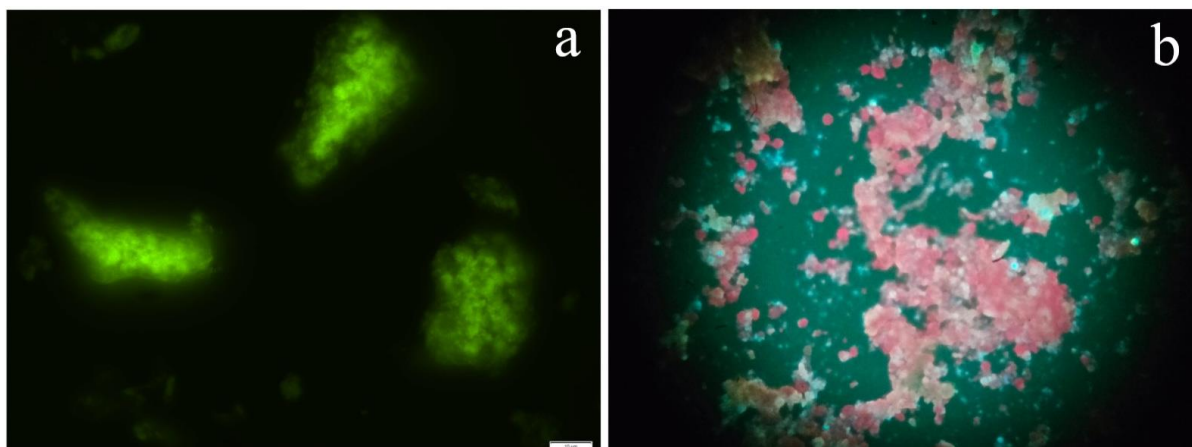
Dáta boli následne preložené aj trojexponenciálnou funkciou, ktorej reziduálna analýza sa príliš nelíšila od reziduálnej analýzy získanej dvojexponenciálnym preložením dát. Túto reziduálnu analýzu zobrazuje Príloha 3. Avšak pri trojexponenciálnom preložení dát došlo k tomu, že niektoré časy sa vo vzorkách nachádzali so záporným percentuálnym zastúpením (Príloha 4), preto neboli tieto dáta ďalej vyhodnocované.

5.2 Zobrazovanie vyizolovaných vzoriek

Na zobrazovanie vyizolovaných vzoriek bol použitý fluorescenčný mikroskop s CCD kamerou a zobrazovanie na základe dôb života pomocou metódy FLIM. Pri zobrazovaní neboli vzorky upravované ale boli použité priamo zamrazené vzorky tylakoidných membrán a častíc fotosystému II. Mrazenie poslúžilo ako vhodný spôsob fixácie vzoriek pri zobrazovaní.

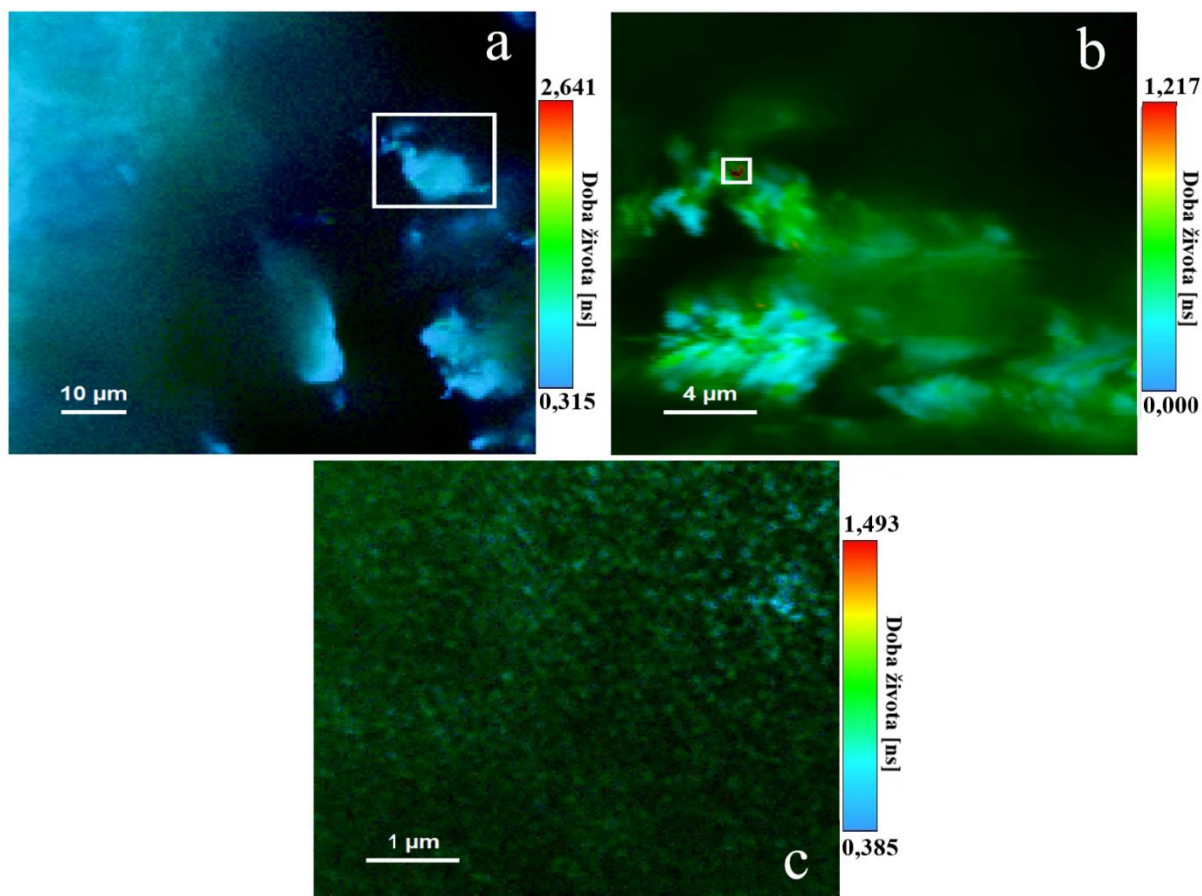
5.2.1 Zobrazovanie vzoriek tylakoidných membrán

Zmrazené tylakoidné membrány izolované oboma postupmi boli zobrazované fluorescenčným mikroskopom. Obraz z mikroskopu bol digitalizovaný pomocou CCD kamery, ktorá zachytáva intenzitu fluorescencie vzorky. Zobrazenie CCD kamerou s priblížením 10 μm vidíme na Obr. 21a, kde sú zachytené tri častice so zrnitou štruktúrou. Podľa nej môžeme predpokladať prítomnosť zachovanej prirodzenej štruktúry tylakoidnej membrány [48]. Svetlé oblasti zachytávajú vysoké fluorescencie chlorofylu. Tmavšie oblasti odpovedajú fluorescencii špecifickej pre prítomnosť fotosystému II. Na porovnanie bol vytvorený Obr. 21b získaný z okuláru fluorescenčného mikroskopu so šesťdesiat násobným zväčšením. Pri tomto zobrazení slúžila ako excitačný zdroj xenónová lampa a bol použitý 375 nm filter mikroskopu. Aj v objektíve bola pozorovaná zrnitá štruktúra vzorky tylakoidnej membrány, ktorá obsahovala veľké množstvo fotosyntetizujúcich častíc. Avšak takéto zobrazovanie nám o vzorke neposkytlo podrobnejšie informácie.



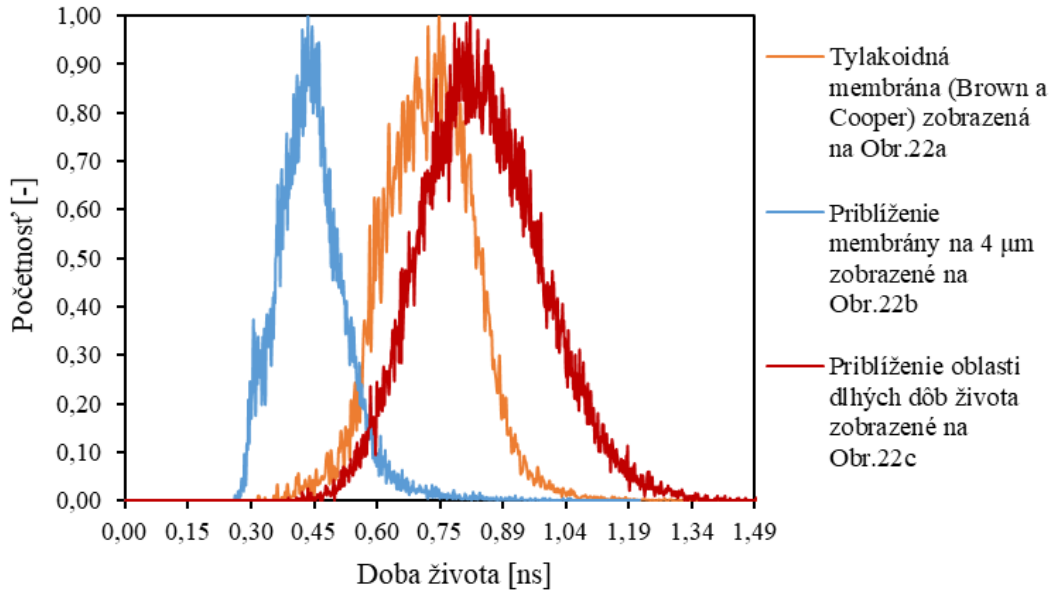
Obr. 21: a) vzorka tylakoidnej membrány zobrazená CCD kamerou, b) vzorka tylakoidnej membrány zobrazená okulárom fluorescenčného mikroskopu

Následne boli vzorky zmrazených tylakoidných membrán zobrazované technikou FLIM, teda na základe doby života fluorescencie. Táto metóda poskytuje podrobnejšie informácie o vzorkách ako zobrazovanie pomocou CCD kamery, ktoré vyhodnocuje iba intenzitu svetla. Ako prvá bola zobrazovaná vzorka tylakoidnej membrány izolovanej postupom Brown a Cooper. Z Obr. 22a je zrejmé, že pri priblížení na 10 μm vo vzorke prevládajú krátke doby života fluorescencie. Časť vzorky s výrazne prevládajúcimi krátkymi dobami života fluorescencie bola priblížená, pričom oblasť priblíženia je znázornená na Obr. 22a bielym rámikom. V 4 μm priblížení sa vo vzorke objavilo miesto s výrazným zastúpením dlhších dôb života fluorescencie (Obr. 22b). Tieto doby života mali hodnotu okolo 1,22 ns a sú spojené s dobami života fotosystému II. Z toho dôvodu sme predpokladali, že bolo presne lokalizované umiestnenie fotosystému II v tylakoidnej membráne. Avšak po opätovnom priblížení vzorky na 1 μm (Obr. 22c) v oblasti výskytu dlhých dôb života fluorescencie bolo zistené, že išlo iba o zhuk častíc s rôznym zastúpením dôb života fluorescencie.



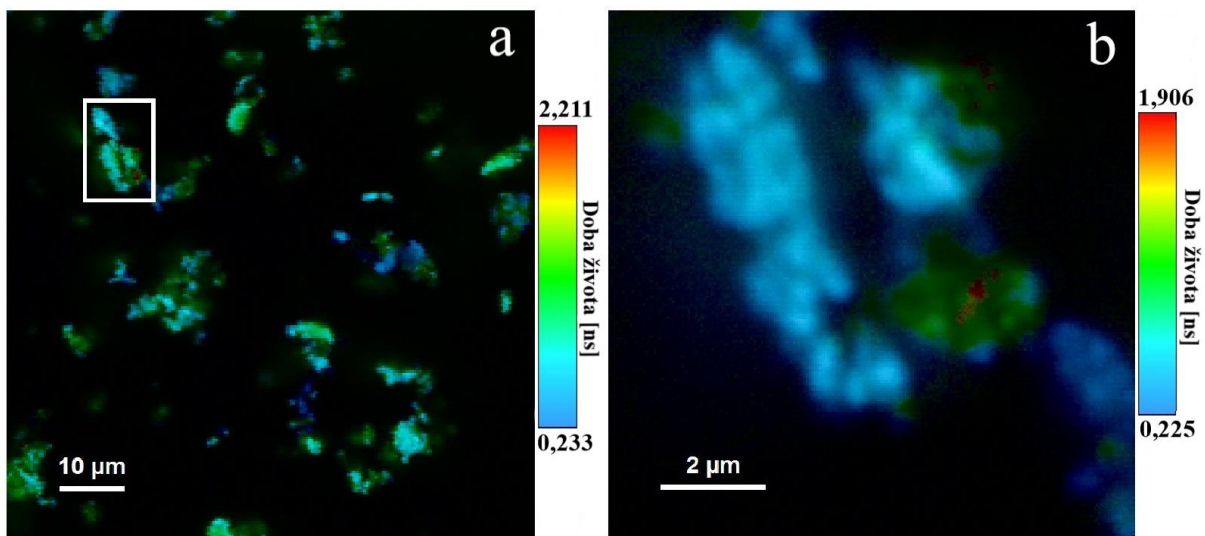
Obr. 22: a) FLIM zobrazenie vzorky tylakoidnej membrány izolovanej postupom Brown a Cooper, b) priblíženie na 4 μm , c) priblížená oblasť s výskytom dlhých dôb života fluorescencie

Na Obr. 23 vidíme porovnanie histogramov dôb života danej vzorky tylakoidnej membrány pre všetky priblíženia. Z histogramu pre 10 μm priblíženie vidíme, že v tomto prípade prevládali dlhšie doby života, pričom najviac zastúpený čas mal hodnotu 0,74 ns. Táto doba života je spojená s fotosystémom II, čo potvrdilo prítomnosť fotosystému II vo vyizolovanej tylakoidnej membráne. Pomalé doby života boli v týchto častiach tylakoidnej membrány prítomné iba veľmi málo. Aj napriek tomu, že priblížením na 4 μm bola vo vzorke objavená oblasť s výskytom dlhších dôb života fluorescencie (Obr. 22b), na základe histogramu pre toto priblíženie vidíme, že väčšie zastúpenie mali kratšie doby života. Najviac zastúpená doba života mala hodnotu okolo 0,44 ns, ktorá prislúcha fluorescencii chlorofylov. Avšak pri priblížení práve na oblasť s väčším zastúpením dlhých dôb života fluorescencie (Obr. 22c) výrazne vzrástla početnosť prípadov s vyššou dobou života fluorescencie, čo znázorňuje bordová krivka na Obr. 23. V tejto oblasti boli viac zastúpené dlhšie časy a prevládala doba života s hodnotou okolo 0,82 ns prislúchajúca fluorescencii chlorofylov tylakoidnej membrány a taktiež k nej prispievajú častice fotosystému II.



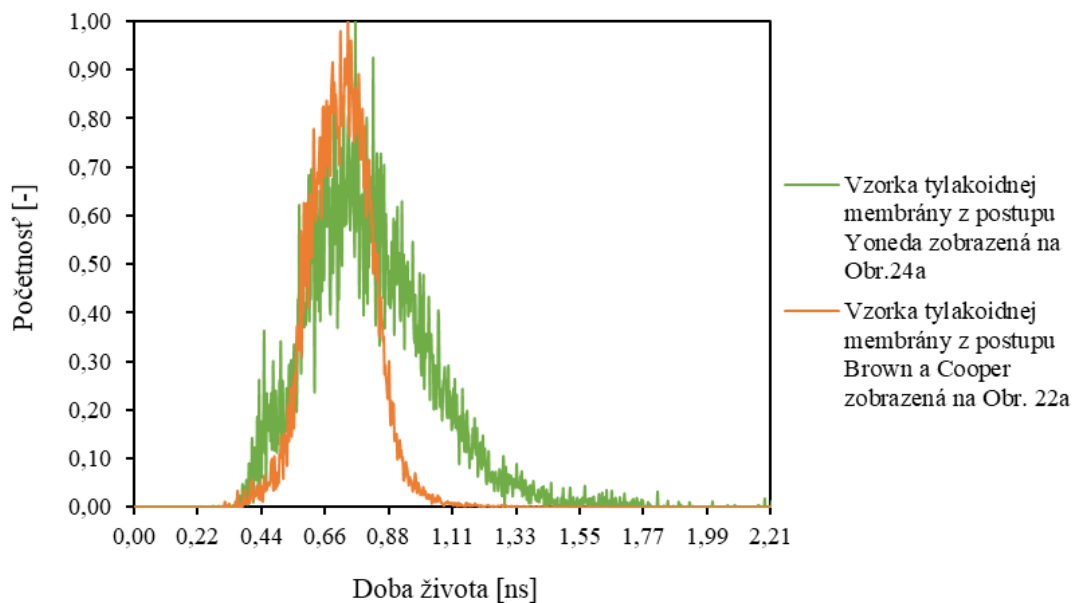
Obr. 23: Normované histogramy dĺžok života vzorky tylakoidnej membrány izolovanej postupom Brown a Cooper pri 10 μm , 4 μm priblížení a priblíženej oblasti výskytu dlhých dĺžok života fluorescence

Ako druhá bola zobrazená vzorka tylakoidnej membrány izolovanej postupom Yoneda. V porovnaní s izoláciou postupom Brown a Cooper vidíme, že postupom Yoneda boli vyizolované podstatne menšie častice tylakoidnej membrány. Tie sú zobrazené na Obr. 24a. Práve vďaka menším časticiam boli už pri 10 μm priblížení viditeľné oblasti s vysokým výskytom dlhých dĺžok života fluorescence. Tieto miesta boli následne priblížené a oblasť priblíženia je znázornená na Obr. 24a bielym rámcikom. Priblížením na 2 μm (Obr. 24b) bola zobrazená presná oblasť výskytu častíc s dlhými dobami života fluorescence, ktoré mali hodnotu okolo 1,91 ns. Tá je spojená s uzatvorenými reakčnými centrami fotosystému II a rovnako so svetlo zberným komplexom LHCII, ktorý sa v tylakoidnej membráne nachádza.



Obr. 24: a) FLIM zobrazenie vzorky tylakoidnej membrány izolovanej postupom Yoneda, b) priblíženie danej vzorky tylakoidnej membrány na 2 μm

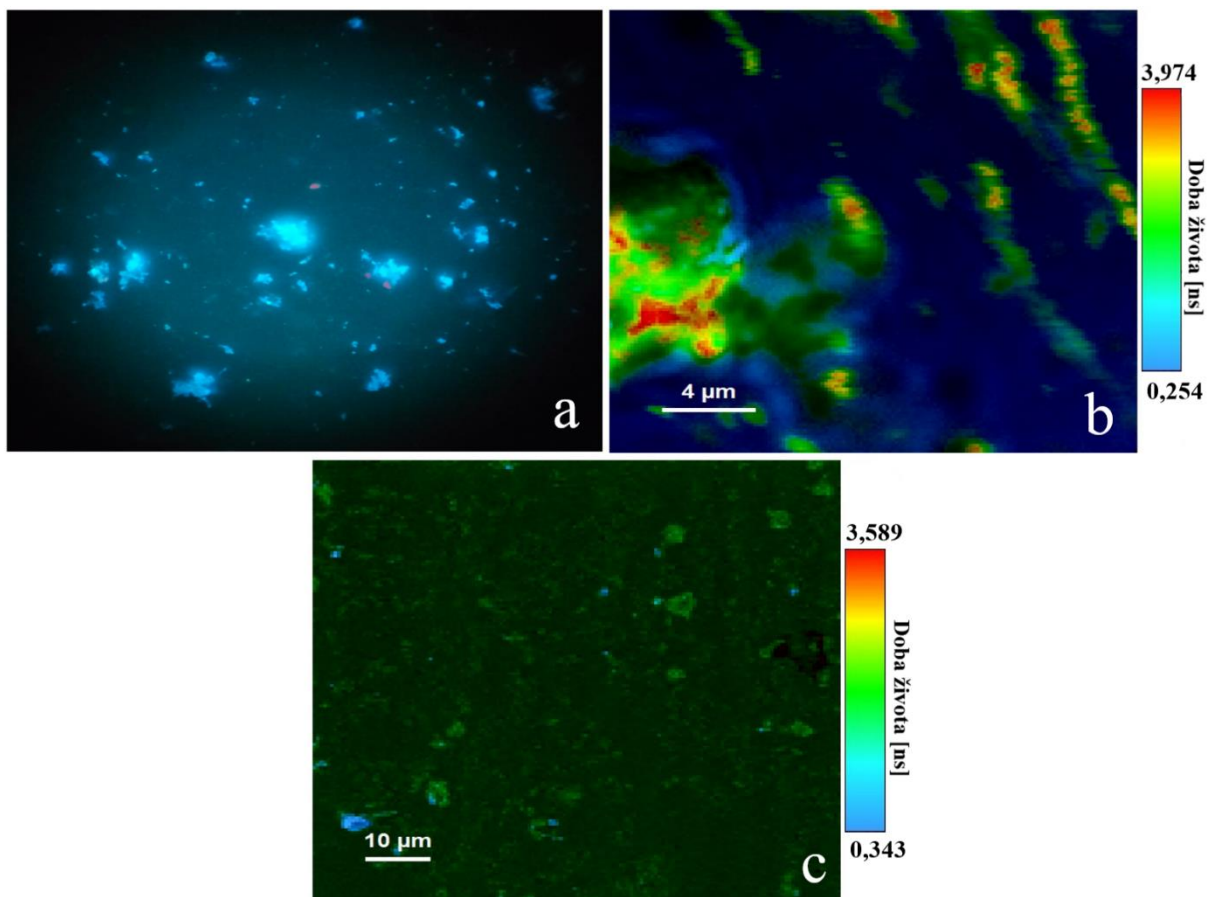
Pri porovnaní histogramov oboch vzoriek tylakoidných membrán pri 10 μm zväčšení (Obr. 25) vidíme, že vzorka izolovaná postupom Yoneda obsahovala širšie zastúpenie rôznych dĺžok životov fluorescencie. Najviac zastúpená doba života mala hodnotu okolo 0,80 ns. Táto hodnota patrí fotosystému II. Na druhú stranu, vzorka izolovaná postupom Brown a Cooper mala oveľa viac zastúpené kratšie doby života fluorescencie. To potvrdzuje, že postup Yoneda dáva kvalitnejší produkt, so zastúpením viacerých zložiek s rozdielnymi dobami života fluorescencie.



Obr. 25: Porovnanie normovaných histogramov oboch vzoriek tylakoidných membrán

5.2.2 Zobrazovanie vzoriek častíc fotosystému II

Zobrazenie vzorky častíc fotosystému II pomocou okuláru fluorescenčného mikroskopu zachytáva Obr. 26a. Vo vzorke bola viditeľná častica približne o veľkosti 2 nm s menším obsahom chlorofylu. Vzorku častíc fotosystému II (Obr. 26b), ktoré boli vyizolované z tylakoidných membrán získaných postupom Brown a Cooper, zobrazenú metódou FLIM, môžeme pozorovať na Obr. 26b. Kvôli menším časticiam, ktoré boli vo vzorke prítomné nebolo možné použiť väčšie priblíženie ako 4 μm . U tejto vzorky častíc fotosystému II (Obr. 26b) môžeme pozorovať okrem veľkého zastúpenia krátkych dôb života aj početnejšie zastúpenie dlhších dôb života fluorescencie. Predpokladáme, že tieto oblasti s dlhými dobami života neboli v tylakoidnej membráne viditeľné kvôli veľkému množstvu kompartmentov, z ktorých je zložená. Zatiaľ čo krátke doby života s hodnotou 0,25 ns prislúchajú fotosystému II, dlhé doby života fluorescencie okolo hodnoty 3,97 patria LHCI, ktoré spolu s fotosystémom II vytvárajú superkomplexy. Taktiež bola zobrazená vzorka častíc fotosystému II izolovaných z tylakoidnej membrány získanej postupom Yoneda. Pri vizualizácii tejto vzorky (Obr. 26c) bol fotosystém II rozbitý na veľmi malé častice. Vo vzorke boli viac zastúpené dlhšie doby života fluorescencie, pričom najviac zastúpený čas mal hodnotu okolo 2 ns. Táto doba života prislúcha zložke pochádzajúcej z malej frakcie uzatvorených reakčných centier fotosystému II a neviazaných molekúl chlorofylov.



Obr. 26: a) vzorka častíc fotosystému II zobrazená okulárom fluorescenčného mikroskopu, b) FLIM zobrazenie vzorky častíc fotosystému II vyizolovaných z tylakoidných membrán získaných postupom Brown a Cooper, c) FLIM zobrazenie vzorky častíc fotosystému II vyizolovaných z tylakoidných membrán získaných postupom Yoneda

6 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vytvoriť literárnu rešerš na tému izolácie častíc fotosystému II a sledovanie jeho vlastností. Na základe rešerše spraviť izoláciu chloroplastov a následne tylakoidných membrán s dôrazom na zachovanie ich natívnych vlastností. Vybrať a previesť vhodné charakteristiky so zameraním na ich spektroskopické vlastnosti. Nakoniec zhodnotiť postup a výsledky práce s ohľadom na budúce použitie takto získaných tylakoidných membrán v ďalších nadväzujúcich experimentoch.

Na základe rešerše boli vybrané dva postupy izolácie tylakoidných membrán zo špenátových listov. Špenátové listy (*Spinacea oleracea*) boli zvolené za najvhodnejší materiál pre izoláciu, pretože je ľahko dostupný a neobsahuje indiferentné chloroplasty, takže je bez obmedzení použiteľný pre dané izolácie. Ako prvý bol zvolený postup izolácie podľa knihy s názvom *Bioenergetics: A practical approach*, vydanéj v roku 1995 [16], v ktorej autori Brown a Cooper najskôr izolovali chloroplasty a následne previedli osmotickú lýzu chloroplastového obalu, ktorou získali tylakoidy. Tento postup bol v práci označovaný ako postup Brown a Cooper. Druhý zvolený postup na izoláciu tylakoidných membrán bol postup podľa článku s názvom *Photosynthetic Model Membranes of Natural Plant Thylakoid Embedded in a Patterned Polymeric Lipid Bilayer*, vydaný v roku 2020 [13]. V ňom autori Yoneda a kolektív uviedli zložitejšiu viackrokovú izoláciu, ktorej hlavným krokom bola purifikácia tylakoidu zo špenátových listov pomocou centrifugácie v hustotnom gradiente Percoll®. Touto centrifugáciou boli oddelené natívne chloroplasty. Druhý postup bol v práci označovaný ako postup Yoneda. Oba popísané postupy boli jednoducho reprodukovateľné, avšak museli byť optimalizované na podmienky laboratória. Aj napriek tomu, že všetky kroky izolácií podľa oboch postupov boli prevádzané čo najrýchlejšie, bolo zistené, že vzorky pri izolácii strácajú svoje natívne vlastnosti. Strata natívnych vlastností bola výrazne spomalená tým, že počas izolácie boli všetky kroky robené za tlmeného osvetlenia a na ľade. Rovnako bolo optimalizované aj uskladňovanie vzoriek. Aby si vyizolované vzorky tylakoidných membrán a častíc fotosystému II zachovali svoje natívne vlastnosti po dlhú dobu, museli byť ihneď po izolácii zamrazené. Z vyizolovaných membrán získaných postupom Brown a Cooper a postupom Yoneda boli následne izolované častice fotosystému II. Na ich izoláciu bol zvolený už iba jeden postup podľa knihy [16], keďže autori článku tento krok neprevádzali. K izolácii častíc fotosystému II z vopred vyizolovaných špenátových tylakoidných membrán bol použitý detergent Triton X-100, v ktorom boli tylakoidné membrány rozpúšťané. Aj pri tejto izolácii boli používané kroky optimalizácie, teda izolácia prebiehala na ľade a pri tlmenom osvetlení. Po získaní častíc fotosystému II boli vzorky ihneď zamrazené. Izoláciami boli získané vzorky tylakoidných membrán izolovaných podľa postupu Brown a Cooper, vzorky tylakoidných membrán izolovaných podľa postupu Yoneda a vzorky častíc fotosystému II. Pričom vzorky častíc fotosystému II boli izolované z membrán získaných postupom Brown a Cooper a aj z membrán získaných postupom Yoneda.

Následne boli vzorky charakterizované s ohľadom na ich spektrofotometrické vlastnosti. Ako prvé bolo prevedené fotometrické stanovenie pomeru chlorofylov pomocou UV-VIS spektroskopie. Zmerané absorpčné spektrá vzoriek (Obr. 16) ukázali, že vo všetkých vzorkách prevláda chlorofyl *a*, čo bolo následne potvrdené aj výpočtom. Tabuľka 5 uvádza vypočítané koncentrácie chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a ich pomeru. Na základe literatúry [16] bolo zistené,

že pomer chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* by mal mať pre tylakoidné membrány hodnotu okolo 3. Po izolácii častíc fotosystému II by mal tento pomer klesnúť na hodnotu 1,8. Pri porovnaní nami vypočítaných hodnôt a hodnôt z literatúry bolo zistené, že hodnoty pomeru chlorofylov pre vzorky tylakoidných membrán sa zhodovali s hodnotou z literatúry. Avšak hodnoty pomeru chlorofylov pre častice fotosystému II boli o niečo vyššie ako hodnota uvedená v literatúre. To mohlo byť spôsobené neúplnou resuspendáciou a rozpustením tylakoidných membrán v detergente, pred samotnou izoláciou častíc fotosystému II.

Ďalším dôkazom úspešnej izolácie bola charakterizácia ustálenou fluorescenčnou spektroskopiou. Vyizolované vzorky boli pri tomto meraní charakterizované v dvoch prostrediach. Prvým zvoleným prostredím bol 80% vodný acetón, v ktorom prebiehalo aj fotometrické stanovenie pomeru chlorofylov. Emisné spektrá pre vzorky merané v 80% vodnom acetóne (Obr. 17) ukázali, emisné maximá okolo vlnovej dĺžky 653 nm. Tieto emisné píky prislúchajú chlorofylu *b*, ktorý je vo väčšom zastúpení prítomný vo fotosystéme II. Taktiež bol nárast intenzity fluorescencie pozorovaný pri vlnovej dĺžke 670 nm, ktorá odpovedá maximu emisie chlorofylu *a*. Na základe týchto výsledkov bola vytvorená hypotéza, že použitím rozpúšťadla, konkrétne 80% vodného acetónu, dochádza k selektívnej extrakcii chlorofylov vzoriek do rozpúšťadla. Je známe, že chlorofyly majú lipidový charakter kvôli ich esterifikovanému bočnému fytylovému reťazcu. Tým pádom sú rozpustné v tukoch a dajú sa extrahovať pomocou organických rozpúšťadiel. Rovnako je známe, že 80% vodný acetón úplne neextrahuje menej polárny pigment chlorofyl *a*. Preto je možné, že v emisných spektrách prevládala práve emisia chlorofylu *b*. Druhým zvoleným prostredím bol pufor, ktorého presné zloženie bolo popísané v kapitole 4.6.1.2. Charakterizácia v pufri je dôležitá, keďže pufor je ako prostredie využívaný v mnohých experimentoch, v ktorých by mohli byť využité vyizolované tylakoidné membrány a častice fotosystému II. To, že v prostredí pufru k žiadnej selekcii nedošlo potvrdili namerané emisné spektrá jednotlivých vzoriek (Obr. 18). Emisné spektrá vzoriek membrán izolovaných podľa postupu Brown a Cooper mali emisné maximum pri vlnovej dĺžke 679 nm a emisné maximum vzoriek tylakoidných membrán izolovaných podľa postupu Yoneda bolo pri 681 nm. Obe tieto emisné maximá súvisia s emisiou fotosystému II. Konkrétne s jeho reakčným centrom a s prítomnosťou asociovaného komplexu chlorofylu *a/b* a LHCII. Emisné maximum vzorky častíc fotosystému II izolovanej z tylakoidných membrán získaných postupom Brown a Cooper malo hodnotu vlnovej dĺžky 675 nm. Vzorka častíc fotosystému II izolovaná z tylakoidných membrán získaných postupom Yoneda mala emisné maximum pri 672 nm. Obe tieto emisné maximá sú spojené s funkčne viazaným LHCII ku fotosystému II, keďže tieto dve zložky spolu tvoria superkomplexy. Rovnako bol zistený nárast emisie v oboch spektrách vzoriek fotosystému II pri vlnovej dĺžke 657 nm, čo odpovedá krátkovlnnej fluorescencii pigmentov fotosystému II. Výsledky tohto merania rovnako potvrdili úspešnú izoláciu jednotlivých vzoriek.

Aj doba života fluorescencie vzoriek bola stanovovaná v dvoch prostrediach. V prostredí 80% vodného acetónu prevládala u všetkých vyizolovaných vzoriek so 100 % zastúpením doba života fluorescencie okolo 3 ns (Tabuľka 6). Táto doba života odpovedá dobe života fluorescencie chlorofylu *b* v acetóne, ktorá má hodnotu 3 ns. Rovnako je spojená aj s dobou života fluorescencie fotosystému II, ktorý obsahuje proteíny s naviazanými molekulami chlorofylu *a* a chlorofylu *b*. Výsledky dôb života fluorescencie vzoriek v prostredí 80%

vodného acetónu taktiež podporili vyššie popísanú hypotézu, že v rozpúšťadle dochádza k selekcii chlorofylov z vyzolovaných vzoriek. V prostredí pufru boli vo vzorkách zistené dve prevládajúce doby života fluorescencie. Natívne tylakoidné membrány mali viac zastúpené kratšie doby života fluorescencie (Tabuľka 7). Tie súviseli s chlorofylmi tylakoidnej membrány a taktiež s jej komponentami, do ktorých prispieva fluorescencia fotosystému II. Dlhšie doby života fluorescencie spojené s triméromi LHCII a fotosystémom II mali v tylakoidnej membráne nižšie zastúpenie. Na rozdiel od tylakoidných membrán, vo vzorkách častíc fotosystému II boli viac zastúpené dlhšie doby života fluorescencie. Tie prislúchali neviazaným aj viazaným chlorofylom vo fotosystéme II. Kratšie doby života fluorescencie boli vo vzorkách častíc fotosystému II zastúpené len málo. Hodnota doby života fluorescencie prvej vzorky častíc fotosystému II izolovaných z tylakoidných membrán postupom Brown a Cooper patrila malej frakcii uzavretých reakčných centier fotosystému II a neviazaným chlorofylom. Doba života fluorescencie druhej vzorky častíc fotosystému II izolovanej z tylakoidnej membrány získanej postupom Yoneda prislúcha LHCII, ktorý tvorí s fotosystémom II superkomplexy.

Nakoniec boli vyzolované vzorky zobrazované dvomi metódami. Fluorescenčným mikroskopom s CCD kamerou a technikou FLIM. Rovnako boli vzorky zobrazené aj pomocou okuláru fluorescenčného mikroskopu. Na snímkach z okuláru pre vzorky tylakoidných membrán boli viditeľné zrnité častice s veľkou prítomnosťou fotosyntetizujúcich zložiek. To potvrdilo aj zobrazenie pomocou CCD kamery, ktoré presnejšie ukázalo tri častice so zrnitou štruktúrou. Práve zrnitá štruktúra potvrdila prítomnosť natívnej tylakoidnej membrány. Pri zobrazovaní vzoriek technikou FLIM bolo zistené, že vzorky tylakoidných membrán izolované postupom Brown a Cooper obsahovali väčšie častice ako vzorky tylakoidných membrán izolované postupom Yoneda. Priblížením vzorky tylakoidnej membrány izolovanej postupom Brown a Cooper bola vizualizovaná oblasť s väčším výskytom dlhších časov. Po opätovnom priblížení tejto oblasti bolo zistené, že išlo zhuk častíc s rôznymi dobami života fluorescencie, pričom najdlhšie doby života boli spojené s fluorescenciou fotosystému II. Priblížením vzorky tylakoidných membrán izolovaných postupom Yoneda bola zobrazená presná oblasť výskytu častíc s dlhými dobami života, ktoré boli spojené s fluorescenciou uzatvorených reakčných centier fotosystému II a LHCII. Pri vizualizácii častíc fotosystému II izolovaných z tylakoidných membrán získaných postupom Brown a Cooper bolo použité zväčšenie 4 μm , kvôli malej veľkosti vyzolovaných častíc. Pri tejto vzorke boli viditeľné viaceré oblasti s dlhými dobami života fluorescencie, ktoré nebolo vo vzorkách tylakoidnej membrány vidieť pravdepodobne kvôli množstvu kompartmentov, z ktorých je membrána zložená. Častice fotosystému II izolované z tylakoidných membrán získaných postupom Yoneda boli veľmi malé a prevládali v nich dlhé časy fluorescencie prislúchajúce práve fotosystému II.

Záverom možno konštatovať, že autori uviedli dobre reprodukovateľné postupy, ktorých optimalizáciou na podmienky laboratória boli vyzolované vzorky tylakoidných membrán a častíc fotosystému II so zachovanými natívnymi vlastnosťami. Hoci postup Brown a Cooper [16] udáva jednoduchšiu a rýchlejšiu izoláciu s vyšším výťažkom. Zložitejší postup izolácie Yoneda [13] dáva, aj napriek menšiemu výťažku, kvalitnejší produkt. Preto je pre ďalšie experimenty s využitím izolovaných tylakoidných membrán vhodnejší práve tento postup. Úspešnosť izolácií a zachovanie ich natívnych vlastností potvrdili aj fluorescenčné charakterizácie vyzolovaných vzoriek. Rovnako výsledky podporili aj nami stanovenú

hypotézu, že v prostredí 80% vodného acetónu dochádza k selektívnej extrakcii chlorofylov zo vzoriek do rozpúšťadla. Vzorky izolované v rámci tejto diplomovej práce sú vhodné na použitie v ďalších experimentoch, avšak je dôležité dbať práve na zachovanie ich natívnych vlastností v rámci ďalších experimentov.

7 LITERATÚRA

- [1] GLOSER, Jan. *Fyziologie rostlin*. Brno: Masarykova univerzita, 1995. ISBN 80-210-1062-2.
- [2] NELSON, Nathan a YOCUM, Charles F. STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEMS I AND II. Online. *Annual Review of Plant Biology*. 2006, roč. 57, č. 1, s. 521-565. ISSN 1543-5008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350>. [cit. 2024-02-06].
- [3] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2., přeprac. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005. ISBN 80-86369-11-0.
- [4] KĚ, Bacon. *Photosynthesis: photobiochemistry and photobiophysics*. Boston: Kluwer Academic Publishers, c2001. ISBN 978-0-7923-6334-7.
- [5] SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James a CROUCH, Stanley R. *Analytická chemie*. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KRÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [6] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Third edition. New York: Springer, 2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [7] ROST, F.W.D. *Fluorescence microscopy*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. ISBN 0-521-23641-x.
- [8] VALEUR, Bernard a SANTOS, Mário Berberan e. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, c2013. ISBN 978-3-527-32846-8.
- [9] WÖLL, Dominik. Fluorescence correlation spectroscopy in polymer science. Online. *RSC Advances*. 2013, roč. 4, č. 5, s. 2447-2465. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C3RA44909B>. [cit. 2024-02-12].
- [10] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [11] DANIELSSON, Ravi; SUORSA, Marjaana; PAAKKARINEN, Virpi; ALBERTSSON, Per-Åke; STYRING, Stenbjörn et al. Dimeric and Monomeric Organization of Photosystem II. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, roč. 281, č. 20, s. 14241-14249. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M600634200>. [cit. 2023-11-26].
- [12] AUSTIN, Jotham R. a STAEHELIN, L. Andrew. Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography . Online. *Plant Physiology*. 2011, roč. 155, č. 4, s. 1601-1611. ISSN 1532-2548. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.110.170647>. [cit. 2023-11-26].
- [13] YONEDA, Takuro; TANIMOTO, Yasushi; TAKAGI, Daisuke a MORIGAKI, Kenichi. Photosynthetic Model Membranes of Natural Plant Thylakoid Embedded in a Patterned Polymeric Lipid Bilayer. Online. *Langmuir*. 2020, roč. 36, č. 21, s.

- 5863-5871. ISSN 0743-7463. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00613>. [cit. 2023-11-26].
- [14] REIMHULT, Erik; HÖÖK, Fredrik a KASEMO, Bengt. Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size. Online. *The Journal of Chemical Physics*. 2002, roč. 117, č. 16, s. 7401-7404. ISSN 0021-9606. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1063/1.1515320>. [cit. 2023-11-26].
- [15] KIRCHHOFF, Helmut; HAFERKAMP, Silvia; ALLEN, John F.; EPSTEIN, David B.A. a MULLINEAUX, Conrad W. Protein Diffusion and Macromolecular Crowding in Thylakoid Membranes . Online. *Plant Physiology*. 2008, roč. 146, č. 4, s. 1571-1578. ISSN 1532-2548. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1104/pp.107.115170>. [cit. 2023-11-26].
- [16] BROWN, G. C. a COOPER, C. E. *Bioenergetics: A practical approach*. 154. New York: Oxford University Press, 1995. ISBN 0-19-963488-2.
- [17] DUNAHAY, Terri Goodman; STAEHELIN, L. Andrew; SEIBERT, Michael; OGILVIE, Paula D. a BERG, Steven P. Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving Photosystem II preparations from spinach. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1984, roč. 764, č. 2, s. 179-193. ISSN 00052728. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90027-6). [cit. 2023-11-26].
- [18] COLOWICK, Sidney P. a KAPLAN, Nathan O. *Methods in ENZYMOLOGY: Photosynthesis and Nitrogen Fixation*. 69. New York: Academic press, 1980. ISBN 0-12-181969-8.
- [19] HIPKINS, M. F. a BAKER, N. R. *Photosynthesis, energy transduction: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986. ISBN 0-947946-51-9.
- [20] DANIELSSON, Ravi; ALBERTSSON, Per-Åke; MAMEDOV, Fikret a STYRING, Stenbjörn. Quantification of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2004, roč. 1608, č. 1, s. 53-61. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.10.005>. [cit. 2023-11-26].
- [21] ARNON, Daniel I. COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS. Online. *Plant Physiology*. 1949, roč. 24, č. 1, s. 1-15. ISSN 0032-0889. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>. [cit. 2023-11-26].
- [22] PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A. a KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1989, roč. 975, č. 3, s. 384-394. ISSN 00052728. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0). [cit. 2023-11-26].

- [23] SHEPTOVITSKY, Yelena G. a BRUDVIG, Gary W. Isolation and Characterization of Spinach Photosystem II Membrane-Associated Catalase and Polyphenol Oxidase. Online. *Biochemistry*. 1996, roč. 35, č. 50, s. 16255-16263. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bi9613842>. [cit. 2023-11-26].
- [24] ARO, Eva-Mari; VIRGIN, Ivar a ANDERSSON, Bertil. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1993, roč. 1143, č. 2, s. 113-134. ISSN 00052728. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90134-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90134-2). [cit. 2023-11-26].
- [25] KHATOON, Mahbuba; INAGAWA, Kayo; POSPÍŠIL, Pavel; YAMASHITA, Amu; YOSHIOKA, Miho et al. Quality Control of Photosystem II. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, roč. 284, č. 37, s. 25343-25352. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007740>. [cit. 2023-11-26].
- [26] YOSHIOKA, Miho; UCHIDA, Suguru; MORI, Hiroki; KOMAYAMA, Keisuke; OHIRA, Satoshi et al. Quality Control of Photosystem II. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, roč. 281, č. 31, s. 21660-21669. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M602896200>. [cit. 2023-11-26].
- [27] SUORSA, Marjaana; RANTALA, Marjaana; DANIELSSON, Ravi; JÄRVI, Sari; PAAKKARINEN, Virpi et al. Dark-adapted spinach thylakoid protein heterogeneity offers insights into the photosystem II repair cycle. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014, roč. 1837, č. 9, s. 1463-1471. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.014>. [cit. 2023-11-26].
- [28] HAFERKAMP, Silvia; HAASE, Winfried; PASCAL, Andrew A.; VAN AMERONGEN, Herbert a KIRCHHOFF, Helmut. Efficient Light Harvesting by Photosystem II Requires an Optimized Protein Packing Density in Grana Thylakoids. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, roč. 285, č. 22, s. 17020-17028. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077750>. [cit. 2023-11-26].
- [29] ARO, E-M. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. Online. *Journal of Experimental Botany*. 2004, roč. 56, č. 411, s. 347-356. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/eri041>. [cit. 2023-11-26].
- [30] HERTLE, Alexander P.; BLUNDER, Thomas; WUNDER, Tobias; PESARESI, Paolo; PRIBIL, Mathias et al. PGRL1 Is the Elusive Ferredoxin-Plastoquinone Reductase in Photosynthetic Cyclic Electron Flow. Online. *Molecular Cell*. 2013, roč. 49, č. 3, s. 511-523. ISSN 10972765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.030>. [cit. 2023-11-26].
- [31] SUORSA, Marjaana; JÄRVI, Sari; GRIECO, Michele; NURMI, Markus; PIETRZYKOWSKA, Malgorzata et al. PROTON GRADIENT REGULATIONS

- Is Essential for Proper Acclimation of Arabidopsis Photosystem I to Naturally and Artificially Fluctuating Light Conditions. Online. *The Plant Cell*. 2012, roč. 24, č. 7, s. 2934-2948. ISSN 1040-4651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097162>. [cit. 2023-11-26].
- [32] GOVINDJEE; VAN DE VEN, M.; PRESTON, C.; SEIBERT, M. a GRATTON, E. Chlorophyll a fluorescence lifetime distributions in open and closed Photosystem II reaction center preparations. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1990, roč. 1015, č. 2, s. 173-179. ISSN 00052728. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90017-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90017-X). [cit. 2024-02-07].
- [33] WASIELEWSKI, Michael R.; JOHNSON, Douglas G.; SEIBERT, Michael a GOVINDJEE. Determination of the primary charge separation rate in isolated photosystem II reaction centers with 500-fs time resolution. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, roč. 86, č. 2, s. 524-528. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.2.524>. [cit. 2024-02-07].
- [34] KLIMOV, Vyacheslav V. Discovery of pheophytin function in the photosynthetic energy conversion as the primary electron acceptor of Photosystem II. Online. *Photosynthesis Research*. Roč. 76, č. 1/3, s. 247-253. ISSN 01668595. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1024990408747>. [cit. 2024-02-07].
- [35] WIENTJES, Emilie; PHILIPPI, John; BORST, Jan Willem a VAN AMERONGEN, Herbert. Imaging the Photosystem I/Photosystem II chlorophyll ratio inside the leaf. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2017, roč. 1858, č. 3, s. 259-265. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.008>. [cit. 2024-02-07].
- [36] CINQUE, Gianfelice; CROCE, Roberta a BASSI, Roberto. Absorption spectra of chlorophyll a and b in Lhcb protein environment. Online. *Photosynthesis Research*. Roč. 64, č. 2/3, s. 233-242. ISSN 01668595. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1006467617697>. [cit. 2024-02-07].
- [37] PANKRATOV, Dmitry; PANKRATOVA, Galina a GORTON, Lo. Thylakoid membrane-based photobioelectrochemical systems: Achievements, limitations, and perspectives. Online. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2020, roč. 19, s. 49-54. ISSN 24519103. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.09.005>. [cit. 2023-11-26].
- [38] LEI, Zheng; MINGYU, Su; CHAO, Liu; LIANG, Chen; HAO, Huang et al. Effects of Nanoanatase TiO2 on Photosynthesis of Spinach Chloroplasts Under Different Light Illumination. Online. *Biological Trace Element Research*. 2007, roč. 119, č. 1, s. 68-76. ISSN 0163-4984. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12011-007-0047-3>. [cit. 2023-11-26].
- [39] KASUNO, Megumi; KIMURA, Hiroki; YASUTOMO, Hisataka; TORIMURA, Masaki; MURAKAMI, Daisuke et al. An Evaluation of Sensor Performance for Harmful Compounds by Using Photo-Induced Electron Transfer from Photosynthetic Membranes to Electrodes. Online. *Sensors*. 2016, roč. 16, č. 4.

- ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s16040438>. [cit. 2023-11-26].
- [40] RASMUSSEN, Michelle; WINGERSKY, Ashlee a MINTEER, Shelley D. Comparative study of thylakoids from higher plants for solar energy conversion and herbicide detection. Online. *Electrochimica Acta*. 2014, roč. 140, s. 304-308. ISSN 00134686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.02.121>. [cit. 2023-11-26].
- [41] KASUNO, Megumi; YAMAGATA, Yuta; KAWADA, Tomoki; KAYANO, Shota a FURUMOTO, Tsuyoshi. Photoinduced electron transfer from spinach chloroplasts to carbon paste electrodes through an exogenous electron acceptor. Online. *International Journal of Electrochemical Science*. 2023, roč. 18, č. 9. ISSN 14523981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100265>. [cit. 2023-11-26].
- [42] HASAN, Kamrul; DILGIN, Yusuf; EMEK, Sinan Cem; TAVAHODI, Mojtaba; ÅKERLUND, Hans-Erik et al. Photoelectrochemical Communication between Thylakoid Membranes and Gold Electrodes through Different Quinone Derivatives. Online. *ChemElectroChem*. 2014, roč. 1, č. 1, s. 131-139. ISSN 2196-0216. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/celec.201300148>. [cit. 2023-11-26].
- [43] ISRASENA NA AYUDHYA, Theppawut; POSEY, Frederick T.; TYUS, Jessica C. a DINGRA, Nin N. Using a Microscale Approach To Rapidly Separate and Characterize Three Photosynthetic Pigment Species from Fern. Online. *Journal of Chemical Education*. 2015, roč. 92, č. 5, s. 920-923. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ed500344c>. [cit. 2024-04-17].
- [44] PFARRHERR, Andrea; TEUCHNER, Klaus; LEUPOLD, Dieter a HOFFMANN, Paul. Chlorophyll b in solution: fluorescence lifetimes, absorption and emission spectra as criteria of purity. Online. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1991, roč. 9, č. 1, s. 35-41. ISSN 10111344. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(91\)80002-Y](https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80002-Y). [cit. 2024-04-11].
- [45] LICHTENTHALER, Hartmut K. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Online. In: *Plant Cell Membranes. Methods in Enzymology*. Elsevier, 1987, s. 350-382. ISBN 9780121820480. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1). [cit. 2024-04-17].
- [46] LAMB, J. J.; RØKKE, G. a HOHMANN-MARRIOTT, M. F. Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K. Online. *Photosynthetica*. 2018, roč. 56, č. SPECIAL ISSUE, s. 105-124. ISSN 03003604. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y>. [cit. 2024-04-10].
- [47] *Chlorophyll b*. Online. In: © WEGENER-INSTITUT. EPIC.awi.de. 2014, 2024. Dostupné z: <https://epic.awi.de/id/eprint/28829/1/Jef1997k.pdf>. [cit. 2024-04-18].
- [48] VÁCHA, F.; SARAFIS, V.; BENEDIKTYOVÁ, Z.; BUMBA, L.; VALENTA, J. et al. Identification of Photosystem I and Photosystem II enriched regions of thylakoid membrane by optical microimaging of cryo-fluorescence emission

- spectra and of variable fluorescence. Online. *Micron*. 2007, roč. 38, č. 2, s. 170-175. ISSN 09684328. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.07.013>. [cit. 2024-04-10].
- [49] EVANS, John R. a ANDERSON, Jan M. Absolute absorption and relative fluorescence excitation spectra of the five major chlorophyll-protein complexes from spinach thylakoid membranes. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1987, roč. 892, č. 1, s. 75-82. ISSN 00052728. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90249-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90249-0). [cit. 2024-04-10].
- [50] PAPAGEORGIOU, George Christos a GOVINDJEE (ed.). *Chlorophyll a Fluorescence*. Online. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. ISBN 978-1-4020-3217-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9>. [cit. 2024-04-10].
- [51] ZUCHELLI, Giuseppe; JENNINGS, Robert C. a GARLASCHI, Flavio M. Independent fluorescence emission of the chlorophyll spectral forms in higher plant Photosystem II. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1992, roč. 1099, č. 2, s. 163-169. ISSN 00052728. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(92\)90214-M](https://doi.org/10.1016/0005-2728(92)90214-M). [cit. 2024-04-10].
- [52] NEVEROV, K. V. a KRASNOVSKY JR., Alexander A. *Phosphorescence analysis of the chlorophyll triplet state in preparations of photosystem II*. Online. In: ResearchGate. 2008. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/8385381_Phosphorescence_analysis_of_the_chlorophyll_triplet_state_in_preparations_of_photosystem_II. [cit. 2024-04-17].
- [53] ANDERSON, Jan M.; WALDRON, J.C. a THORNE, S.W. Chlorophyll—protein complexes of spinach and barley thylakoids. Online. *FEBS Letters*. 1978, roč. 92, č. 2, s. 227-233. ISSN 0014-5793. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80760-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80760-1). [cit. 2024-04-17].
- [54] NORDLUND, T.M. a KNOX, W.H. Lifetime of fluorescence from light-harvesting chlorophyll a/b proteins. Excitation intensity dependence. Online. *Biophysical Journal*. 1981, roč. 36, č. 1, s. 193-201. ISSN 00063495. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84723-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84723-6). [cit. 2024-04-11].
- [55] SZCZEPANIAK, M.; SANDER, J.; NOWACZYK, M.; MÜLLER, M.G.; RÖGNER, M. et al. Charge Separation, Stabilization, and Protein Relaxation in Photosystem II Core Particles with Closed Reaction Center. Online. *Biophysical Journal*. 2009, roč. 96, č. 2, s. 621-631. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.036>. [cit. 2024-04-17].
- [56] WIENTJES, Emilie; VAN AMERONGEN, Herbert a CROCE, Roberta. LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2013, roč. 1827, č. 3, s. 420-426. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.009>. [cit. 2024-04-12].

- [57] FAROOQ, Shazia; CHMELIOV, Jevgenij; WIENTJES, Emilie; KOEHORST, Rob; BADER, Arjen et al. Dynamic feedback of the photosystem II reaction centre on photoprotection in plants. Online. *Nature Plants*. 2018, roč. 4, č. 4, s. 225-231. ISSN 2055-0278. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0127-8>. [cit. 2024-04-17].
- [58] PARK, Soomin; FISCHER, Alexandra L.; STEEN, Collin J.; IWAI, Masakazu; MORRIS, Jonathan M. et al. Chlorophyll-Carotenoid Excitation Energy Transfer in High-Light-Exposed Thylakoid Membranes Investigated by Snapshot Transient Absorption Spectroscopy. Online. *Journal of the American Chemical Society*. 2018, roč. 140, č. 38, s. 11965-11973. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04844>. [cit. 2024-04-12].
- [59] LAMBREV, Petar H.; SCHMITT, Franz-Josef; KUSSIN, Sabine; SCHOENGEN, Max; VÁRKONYI, Zsuzsanna et al. Functional domain size in aggregates of light-harvesting complex II and thylakoid membranes. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2011, roč. 1807, č. 9, s. 1022-1031. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.003>. [cit. 2024-04-12].
- [60] VAN DER WEIJ-DE WIT, C. D.; IHALAINEN, J. A.; VAN GRONDELLE, R. a DEKKER, J. P. Excitation energy transfer in native and unstacked thylakoid membranes studied by low temperature and ultrafast fluorescence spectroscopy. Online. *Photosynthesis Research*. 2007, roč. 93, č. 1-3, s. 173-182. ISSN 0166-8595. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9157-1>. [cit. 2024-04-12].

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

8.1 Použité skratky

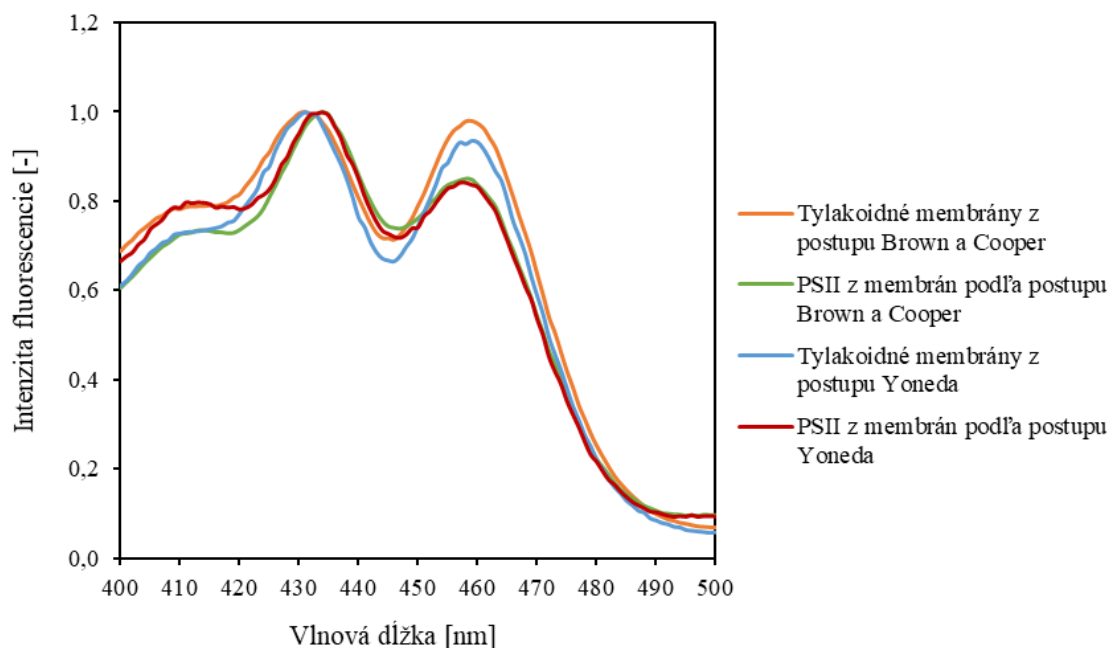
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
Chl	chlorofyl
LHC	svetlo zberný proteín-pigmentový komplex
RC	reakčné centrum
NADP ⁺	nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát
ATP	adenozíntrifosfát
ADP	adenozíndifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
PQ	plastochinón
Pheo	feofytín
MES	kyselina 2-(N-morfolino)etánsulfónová
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazín-1-etánsulfónová
BSA	hovädzí sérový albumín
BQ	benzochinón
PAGE	polyakrylamidová gélová elektroforéza
SDS	sodium dodecyl sulfát
HTG	<i>n</i> -heptyltioglukozidu
CPE	uhlíková pastová elektróda
DMBQ	2,6-dimetylbenzochinón
2,5-DCBQ	2,5-dichloro-1,4-benzochinón
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholín
DGDG	digalaktosyldiacylglycerol
MGDG	monogalaktosyldiacylglycerol
DCMU	3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimethylurein
QCM-D	mikrováhy s monitorovaním rozptylu svetla
FRAP	fluorescenčné zotavenie po fotobielení
OEC	kyslík vyvíjajúci komplex
PPO	katalázové a polyfenoloxidázové aktivity
CPE	uhlíková pastová elektróda
CCD	zariadenie s viazanými nábojmi
APD	lavínová fotodióda
FCS	fluorescenčná korelačná spektroskopia
SNOM	skenovacia optická mikroskopia v blízkom poli
STED	stimulovaná emisná deplécia
STORM	stochastická optická rekonštrukčná mikroskopia

FLIM	fluorescenčné zobrazovanie doby života
TCSPC	technika časovo korelovaného sčítania fotónov
SPT	technika jednofotónového časovania
DCIP	2,6-dichloroindofenol

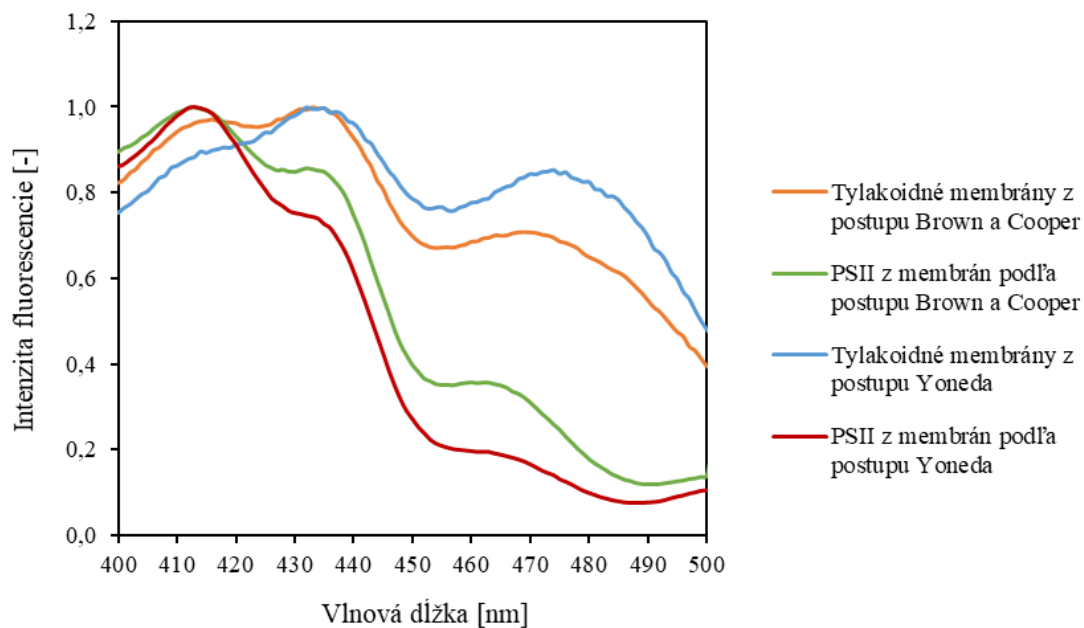
8.2 Použité symboly

ΔE	energetický rozdiel hladín excitovaného stavu
ν	frekvencia
λ	vlnová dĺžka
h	Planckova konštanta
$F(t)$	intenzita fluorescence v čase
$F(t+\tau)$	intenzita fluorescence po čase oneskorenia
τ	čas oneskorenia
$\delta F(t)$	fluktuácia intenzity fluorescence
t	čas
$\langle F(t) \rangle$	priemerná hodnota intenzity fluorescence
$G(\tau)$	autokorelačná funkcia
c	koncentrácia
A	absorbancia
I	intenzita svetla, ktoré prešlo vzorkou
I_0	intenzita svetla, ktoré do vzorky stúpilo
ε	molárny absorpčný koeficient

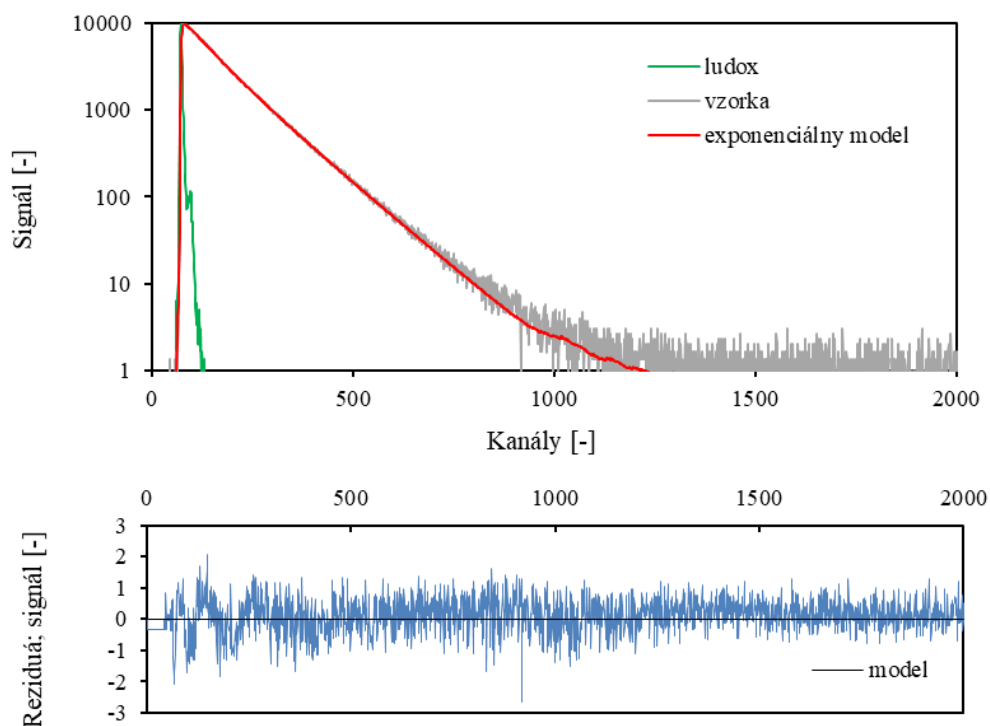
9 PRÍLOHY



Príloha 1: Normované excitačné spektrá vyizolovaných vzoriek v 80% vodnom acetóne



Príloha 2: Normované excitačné spektrá vyizolovaných vzoriek v pufrí



Príloha 3: Vyhasínacia krivka a reziduálna analýza fotosystému II v pufri pre trojexponenciálne preloženie dát

Príloha 4: Doby života fluorescencie vzoriek meraných v pufri pre trojexponenciálne preloženie dát

Vzorka	Trojexponenciálna funkcia						CHISQ
	τ_1 [ns]	%	τ_2 [ns]	%	τ_3 [ns]	%	
Tylakoidné membrány izolované postupom Brown a Cooper	$1,1 \pm 0,4$	$31,8 \pm 10,6$	$4,9 \pm 0,6$	$27,0 \pm 23,7$	$0,3 \pm 0,1$	$41,2 \pm 13,3$	$0,6 \pm 0,1$
Častice PSII izolované z membrán podľa postupu Brown a Cooper	$2,6 \pm 0,3$	$-2303,5 \pm 3287,3$	$4,4 \pm 1,5$	$2374,3 \pm 3249,5$	$2,2 \pm 2,6$	$29,2 \pm 37,8$	$0,8 \pm 0,1$
Tylakoidné membrány izolované postupom Yoneda	$0,5 \pm 0,1$	$31,6 \pm 5,9$	$3,2 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,1$	$64,8 \pm 6,1$	$0,4 \pm 0,1$
Častice PSII izolované z membrán podľa postupu Yoneda	$2,8 \pm 0,4$	$-689,4 \pm 989,7$	$2,3 \pm 0,6$	$724,8 \pm 986,4$	$6,0 \pm 0,2$	$73,6 \pm 4,8$	$0,9 \pm 0,1$