

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁRSKA PRÁCA

**Súvislosť medzi redoxným stavom donorovej strany fotosystému
I a elektrickým napätím naprieč thylakoidnou membránou**



Vypracoval:

Štúdijný obor:

Vedúci bakalárskej práce:

Tímea Dunová

Biofyzika

doc. RNDr. Dušan Lazár, Ph.D.

Olomouc 2018

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora: Tímea Dunová

Názov práce: Súvislosť medzi redoxným stavom donorovej strany fotosystému I a elektrickým napätím naprieč thylakoidnou membránou

Typ práce: Experimentálna

Pracovisko: Katedra biofyziky

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

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt:

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bolo doplniť informácie a nájsť súvislosti medzi elektrickými procesmi v chloroplastoch, ktoré doteraz ešte neboli skúmané. Reakcie na zmenu redoxného stavu fotosystému I signál I820, vzniku napätia na membráne signál P515 vo vnútri chloroplastov a ich vzájomné prepojenie. Experimentálny cieľ práce spočíval v pozorovaní a zaznamenávaní kinetiky procesov v rastlinách, ktoré boli pri stálom osvetlení stresované zvyšovaním teploty rastlinných vzorkov a následne pri stálej teplote ale zvyšovanej intenzite osvetlenia. Bola skúmaná kinetika v chloroplastoch pri použití zväzku modrého svetla pre vyvolanie napätia a červeného svetla pre vytvorenie redoxného stavu v krátkej časovej dobe. Zmeny boli pozorované v oboch prípadoch pri vzniku ich maxím, ktoré boli porovnané medzi sebou. Po vypracovaní experimentálnej časti a porovnaní výsledkov boli zistené súvislosti a náväznosti medzi jednotlivými signálmi.

Kľúčové slová: thylakoidná membrána, chloroplasty, I820, P515, P700⁺, napätie na membráne

Počet strán: 35

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Tímea Dunová

Title of thesis: Relationship between redox state of the donor side of photosystem I and electric voltage across thylakoid membrane

Type of thesis: Experimental

Department: Department of biophysics

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

The year of defence: 2018

Abstract:

Main object this bachelor thesis was completed information and find continuity between electrical processes in chloroplasts, which ones were not researched yet. Reactions for change redox condition photosystem I signal I820, formation pressure on the membrane signal P515 inside chloroplasts and their connection each other. The experimental object thesis consist in observation and recording kinetics processes in plants, which ones were, under constant lighting, stressed a raised up temperature plants samples and then, under constant temperature, but a raised up intensity lighting. Was researched kinetic in chloroplasts by use of bunch blue lighting for induction pressure and red light for creating redox condition in short time. Changes were observation in both cases at formation their max, which ones were compared between each other. After elaboration experimental part and compared results were found connection and traceability between signals each other.

Key words: thylakoid membrane, I820, P515, P700⁺, electric voltage

Number of pages: 35

Number of attachments: 0

Language: Slovak

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

V Olomouci dňa.....

Rada by som touto cestou poďakovala vedúcemu bakalárskej práce doc. RNDr. Dušanovi Lazárovi, Ph.D. za cenné rady a pripomienky, odborné vedenie a veľkú trpezlivosť behom písania mojej práce. A na záver by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľom za podporu a trpezlivosť pri písaní práce.

Zoznam skratiek

A₀ – molekula chlorofylu *a*

A₁ – fylochinón

ADP – adenosíndifosfát

ATP – adenosíntrifosfát

CET – cyklický transport elektrónov

Chl_{D1} – prídavný chlorofyl

Chl_{D2} – prídavný chlorofyl

D₁ – proteín reakčného centra fotosystému II

D₂ – proteín reakčného centra fotosystému II

Fd – Ferredoxín

FAD – flavínadenínindinukleotid

FNR – ferredoxín-NADP⁺ oxidoreduktáza

FRET – prenos energie fluorescenčnou rezonanciou

GAP – glyceraldehyd-3-fosfát

LET – lineárny transport elektrónov

LHCI – svetlozberný komplex I

LHCII – svetlozberný komplex II

NADP⁺ – katión nikotínamidadenínindinukleotidfosfát

NADPH – redukovaná forma NADP⁺

OEC – komplex vyvíjajúci komplex

P680 – reakčné centrum fotosystému II

P700 – reakčné centrum fotosystému I

PAR – fotosyntetické aktívne svetlo

Pc – Plastocyanín

Pheo_{D1} – Feofytín D₁

Pheo_{D2} – Feofytín D₂

Pmf – Protón motorická sila

PQ – Plastochinón

PQH₂ – Plastosemichinón

PSI – fotosystém I

PSII – fotosystém II

PsaA – Proteínová jednotka A fotosystému I

PsaB – Proteínová jednotka B fotosystému I

PsaC – Proteínová jednotka C fotosystému I

Q_A – chinónový jedno-elektrónový prenášač

Q_B – chinónový dvoj-elektrónový prenášač

Q_A⁻ – plastosemichinón

Q_B⁻ – semichinón

RuBP – ribulóza-1,5-bisfosfát

TM – tylakodínová membrána

TyrD – Tyrozínový zvyšok D

TyrZ – Tyrozínový zvyšok Z

Obsah

| | |
|---|----|
| 1 Úvod..... | 1 |
| 2 Prehľad problematiky | 2 |
| 2.1 Fotosyntéza..... | 2 |
| 2.1.1 Chlorofyl a svetlozberné antény..... | 3 |
| 2.1.2 Svetelná fáza fotosyntézy..... | 4 |
| 2.2 Vznik ΔpH a $\Delta\Psi$ | 6 |
| 2.3 Calvin-Bensonov cyklus | 7 |
| 2.4 Fotosystém II | 8 |
| 2.4.1 Komplex vyvíjajúci kyslík | 9 |
| 2.4.2 Cytochróm b_6/f a plastocyanín..... | 9 |
| 2.5 Fotosystém I a ferredoxín..... | 10 |
| 2.5.1 Ferredoxín-NADP ⁺ oxidoreduktáza..... | 10 |
| 2.6 ATP-syntáza | 11 |
| 3.1 Elektrogénne procesy vo svetelnej fázi fotosyntézy..... | 12 |
| 3.1.1 Lineárny a cyklický transport elektrónov | 12 |
| 3.1.2 Iónové kanály..... | 13 |
| 3.1.3 P515..... | 13 |
| 3.1.4 I820..... | 14 |
| 3 Cieľ práce | 15 |
| 4 Materiály a metódy..... | 16 |
| 4.1 Sadenie a pestovanie rastlín..... | 16 |
| 4.2 Meranie..... | 17 |
| 5 Výsledky | 19 |
| 5.1 Vplyv intenzity osvetlenia vzorku..... | 19 |
| 5.1.1 I820..... | 19 |
| 5.1.2 P515..... | 20 |
| 5.2 Vplyv teploty vzorku | 22 |
| 5.2.1 I820..... | 22 |
| 5.2.2 P515..... | 23 |
| 6 Diskusia | 25 |
| 6.1 Porovnanie zmien I820 a P515 spôsobené rôznou intenzitou osvetlenia vzorku..... | 25 |
| 6.2 Porovnanie zmien I820 a P515 spôsobené zvyšovaním teploty vzorku..... | 27 |
| 6.3 Zhrnutie porovnaní I820 a P515 | 30 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 7 Záver | 32 |
| 8 Zoznam literatúry | 33 |
| 9 Prehľad internetových zdrojov | 35 |

1 Úvod

Fotosyntéza je jedinečný proces na Zemi, pomocou ktorého sú fotosyntetizujúce organizmy schopné sériou procesov získať životne dôležité organické látky spracovaním slnečnej energie. Okrem organických látok dôležitých pre metabolizmus fotosyntetizujúcich organizmov je to dej pri ktorom sa vytvára a udržuje stály pomer kyslíka v atmosfére, preto sa považuje aj za nezastupiteľný proces pre ostatné organizmy na planéte. Prebieha najmä v rastlinných orgánoch listoch a vďaka chloroplastom obsahujúcich farbivá, ktoré absorbujú svetlo pri rôznych vlnových dĺžkach.

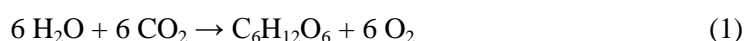
Absorbciou svetelnej energie sa cez membránu v chloroplastoch prenosom elektrónov a iónov vytvárajú elektrogénne procesy. Podľa použitého osvetlenia a dĺžky merania sa v tejto bakalárskej práci študujú dva signály charakteristické absorbciou svetla v modrej a ďalej infračervenej oblasti spektra. Konkrétne signály zaoberajúce sa redoxným stavom fotosystému I a tvorbou napätia na membráne v chloroplastoch.

Doteraz nebola uverejnená publikácia, ktorá by sa zaoberala skúmaním týchto signálov na rastlinách stresovanými zmenou intenzity a teploty. Zameriame sa preto hlavne na doplnenie týchto údajov a bližšie vzťahy medzi signálmi.

2 Prehľad problematiky

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je biochemický proces zahrňujúci premenu svetelnej energie na energiu chemických väzieb vo forme adenosíntrifosfátu (ATP) a redukovaného nikotínamidnukleotidfosfátu (NADPH) a následnou syntézou komplexných uhlíkových zlúčenín, kde zdrojom uhlíka je vzdušný CO₂. Okrem toho, pri fotosyntéze dochádza k uvoľneniu kyslíka z molekúl vody, čo je kľúčovým procesom prebiehu života na Zemi (Taiz a Zeiger 2006). Všeobecná rovnice fotosyntézy je uvedená nižšie.



Rovnica fotosyntézy zahrňuje aj vznik medziproduktu glukóza-6-fosfát pri syntéze škrobu v chloroplastoch, sacharózy v cytoplazme a konečnú premenu glukózy-6-fosfát na glukózu (C₆H₁₂O₆) v endoplazmatickom retikule.

Fotosyntetické procesy prebiehajú u vyšších rastlín a rias v semiautonómnych organelách chloroplastoch. U fotosyntetických prokaryot (baktérie a sinice) tieto procesy prebiehajú vnútri ich buniek. Vnútri chloroplastov a fotosyntetických prokaryot je rozsiahly vnútorný membránový systém, tzv. thylakoidná membrána (TM), ktorá je tvorená z lipidovej dvojvrstvy. Tieto TM sa môžu mnohonásobne vrstviť a vytvárajú tak útvary, ktoré sa nazývajú graná alebo tvoria len dve vrstvy a v tom prípade hovoríme o stromálnej TM. Vnútorný priestor chloroplastov sa nazýva stróma a priestor medzi dvoma TM sa označuje ako lumén. TM má jednu oblasť smerujúcu k stróme (stromálna časť TM) a druhú časť orientovanú smerom k luménu (lumenárna časť TM).

Procesy fotosyntézy sú rozdelené do dvoch fáz, ktoré nazývame primárna fáza a sekundárna fáza. Pre primárnu fázu je nevyhnutný zdroj fotosynteticky aktívneho žiarenia, čo je akékoľvek elektromagnetické žiarenie v rozmedzí od 400 nm do 700 nm (PAR) (Kumar a kol 2018). Po zohľadnení potreby elektromagnetického žiarenia pre svoje fungovanie, nazývame túto fázu ako svetelnú fázu. Svetelná fáza prebieha na TM aj v jej okolí pri spolupráci fotosystému I (PSI), fotosystému II (PSII), ďalších proteínov a prenášačov elektrónov a tiež zahŕňa nadväzujúce redukčno-oxidačné procesy. Pri tomto deji dochádza k lineárnemu, ale i k cyklickému toku elektrónov, ktoré oba vytvárajú rozdiel pH na oboch stranách TM, ΔpH. Podstatou tejto fáze je

tvorba konečných produktov ATP a NADPH, ktoré sú ďalej používané na riadenie biosyntetických reakcií a iných životných procesov.

Sekundárna fáza označovaná ako uhlíková fáza (Calvin-Bensonov cyklus) prebieha v stróme chloroplastov, či v cytoplazme prokaryotných fototrófov, kde prebieha bez zdroja svetelnej energie. Podstatou uhlíkovej fázy je asimilácia a premena anorganického uhlíka vo forme CO₂ na bohaté organické zlúčeniny. Sekundárna fáza nadväzuje na primárnu tým spôsobom, že využíva produkty z primárnej fázy ATP a NADPH ako energiu a reductanta pre svoje redukčno-oxidačné procesy.

2.1.1 Chlorofyl a svetlozberné antény

Proces fotosyntézy začína absorpciou svetla molekulami pigmentov. Rastliny regulujú zber fotosyntetického svetla PAR s cieľom udržať vyvážený tok energie do fotosystémov. PSI a PSII majú svoje vnútorné antény a v závislosti na organizme existujú rôzne typy vonkajších svetlozberných antén.

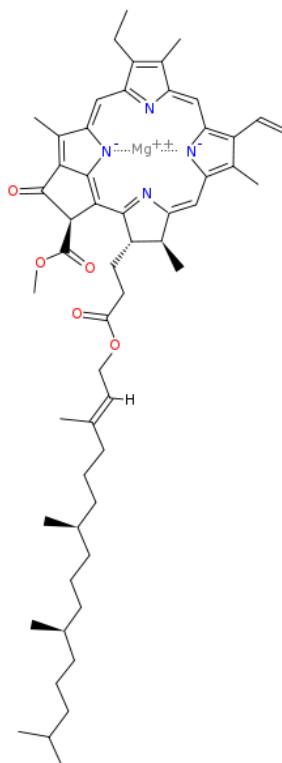
Počas fotosyntézy získava reakčné centrum fotosystému excitačnú energiu z periférneho zberu svetla pomocou svetlozberných komplexov (light harvesting complexes LHC), kde u vyšších rastlín a rias sú svetlozberný komplex I (LHCI) a svetlozberný komplex II (LHCII). LHC predstavujú proteíny, ktoré viažu chlorofyl a karotenoidy a tvoria tak pigment-proteínové periférne anténne komplexy (Pullertis a Sundstrom 1996). LHC slúžia na sústredenie zväzku svetelného žiarenia na reakčné centrá v PSI a PSII. Prechodom na reakčné centrá fotosystémov energia prechádza postupne cez molekuly pigmentov až na aktívny chlorofyl *a*. Prenos tejto energie pracuje na základe fyzikálneho mechanizmu nazývaného ako fluorescenčná rezonancia (FRET-fluorescence resonance energy transfer) (Taiz a Zeiger 2006). Okrem najznámejšieho chlorofylu a rastliny obsahujú aj chlorofyl *b* a karotenoidy, ktoré nie sú ale schopné absorbovať PAR žiarenie.

Štruktúra jedného z proteínov LHCII obsahuje tri α -helixové oblasti a viaže 14 molekúl chlorofylov a aj *b*, rovnako aj štyri karotenoidy. Štruktúra proteínov v LHCI je všeobecne podobná tým v LHCII (Taiz a Zeiger 2006). Pigmenty sú na bielkoviny naviazané nekovalentnými väzbami ako sú napríklad vodíkové väzby alebo aj koordinačné väzby vytvorené medzi jednotlivými elektrónmi. Energia získaná z periférneho zberu svetla pomocou LHC je prenášaná do spomínaných reakčných

centier, kde dochádza k chemickej oxidácií a redukcii vedúcej k dlhodobému ukladaniu energie. Svetlozberné komplexy sú u siníc nahradené fykobilizómy.

Rozmanitosť pigmentov prítomných v každom type fotosyntetického organizmu odráža prostredie v ktorom žije. Fotosyntetizujúce rastliny sú zelené vďaka schopnosti ich hlavného fotosyntetického pigmentu, chlorofylu, absorbovať svetlo s vlnovou dĺžkou pre modrú a červenú farbu a odrážajú energiu s vlnovou dĺžkou pre zelenú farbu.

Chlorofyly majú komplexnú kruhovú štruktúru, ktorá je chemicky príbuzná skupinám podobným porfyrínu s centrálne naviazaným kationom dvojmocného Mg^{2+} , ako je na obr. 1. Dlhý uhl'ovodíkový reťazec je takmer vždy spojený s kruhovou štruktúrou. Uhl'ovodíkový chvost zakotvuje chlorofyl do hydrofóbnej časti jeho prostredia, to je do proteínu svetleozbernej antény (Buchanan a kol. 2015). Všetky pigmenty majú vo svojich chemických štruktúrach spoločné striedavé série uhlíkových jednoduchých a dvojitých väzieb, ktoré tvoria konjugovaný systém π -elektrónov.

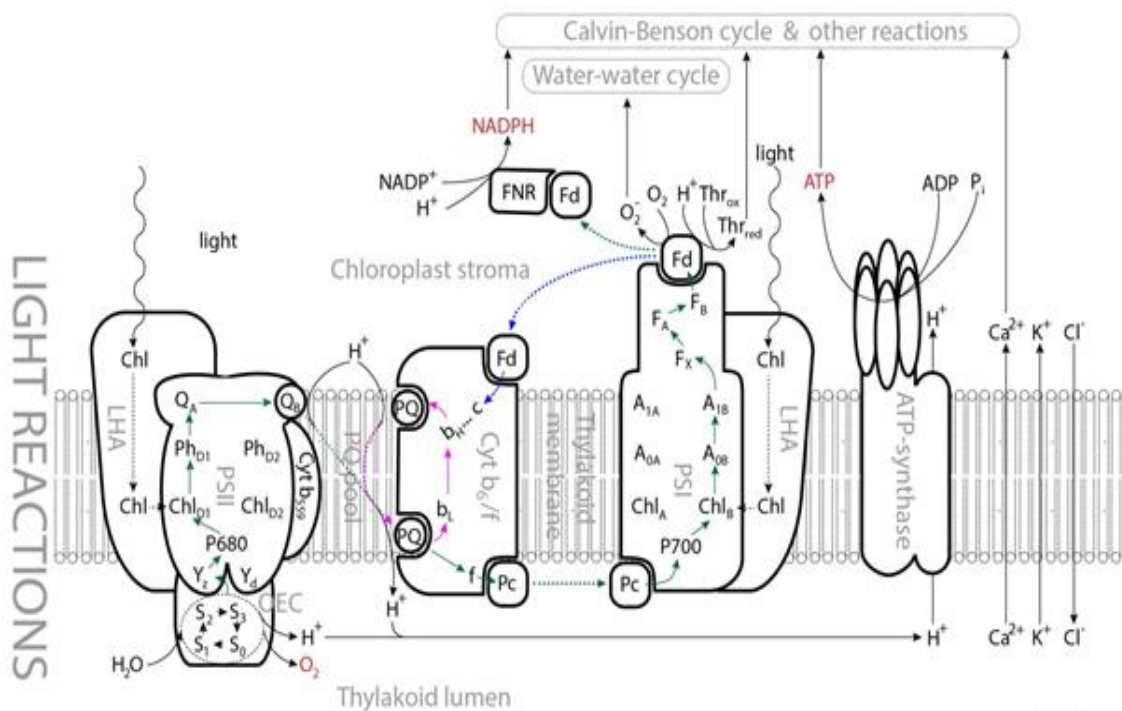


Obr. 1: Vzorec chlorofylu. (Prevzaté z [1])

2.1.2 Svetelná fáza fotosyntézy

Svetelné reakcie zahŕňajú prenos elektrónov z vody na kation nikotínamidnukleotidfosfát ($NADP^+$) za vzniku NADPH a tieto reakcie sú spojené

s prenosom protónov, ktoré vedú k fosforylácii adenosindifosfátu (ADP) na ATP. Pri premene NADP^+ , ADP a anorganického fosfátu (P_i) vzniká tiež molekulárny kyslík (O_2) z rozkladu molekúl vody a to všetko za pomoci svetelnej energie. Svetelná energia sa používa na excitáciu, teda vybudenie elektrónov do vyšších energetických hladín v molekulách pigmentov, čo sú u vyšších rastlín prevažne spomínané molekuly chlorofylu. Excitované molekuly chlorofylu prenášajú veľmi efektívne excitáciu na chlorofyly v reakčných centrách PSII a PSI. Tieto excitované molekuly chlorofylu potom uvoľnia elektrón, dôjde k nábojovej separácii, čo spôsobí redukcii nasledujúceho akceptora elektrónov v reťazci. Oxidovaný chlorofyl sa späť redukuje vodou v prípade PSII a plastocyanínom v prípade PSI. Energia vytvorená pri toku záporne nabitých elektrónov z vody do NADP^+ vytvára protón motorickú silu (pmf), ktorá sa následne použije na kontrolu ATPsyntázy chemiosmotickým mechanizmom. Svetelné reakcie sú znázornené na obr. 2.



Obr. 2: Prenos elektrónov v TM počas svetelnej fázy fotosyntézy vedúci k vzniku NADPH. Zelené šípky zobrazujú lineárny transport elektrónov a modré šípky cyklický transport elektrónov. Ružové šípky zobrazujú Q-cyklus cytochrómu b₆/f. Je zobrazená aj redukcia kyslíka a thioredoxínov (Thr) a tvorba ATP pomocou ATPsyntázy, využitie NADPH, ATP a redukovaných thioredoxínov v Clavin-Bensove cyklu, odstránenie zredukovaného kyslíka v cykle voda-voda a transport katiónov Ca^{2+} , K^+ do strómy a aniónov Cl^- do luménu. Zdroj: Lazár D., použité so zvoľením.

2.2 Vznik $\Delta p\text{H}$ a $\Delta\Psi$

Prenos záporne nabitých elektrónov pri fotosyntéze je priamo spojený aj s transportom protónov. Vďaka svetlom indukovaného fotosyntetického transportu elektrónov v TM sa akumulujú protóny v luméne a ubúdajú v stróme chloroplastov. Vzniká počiatočný rozdiel v koncentrácií protónov na oboch stranách membrány označovaný ako $\Delta p\text{H}(t)$, ktorý je časovo premenný. Vďaka tomu, že protóny sú kladne nabité častice s nábojom plus 1 sa vytvorí popri rozdielnej koncentrácii náboja aj $\Delta\Psi(t)$, čo je rozdiel v elektrických potenciáloch na oboch stranách TM. $\Delta p\text{H}(t)$ a $\Delta\Psi(t)$ spolu vytvárajú časovo premenný rozdiel elektrochemického potenciálu protónov $\Delta\mu_{\text{H}^+}(t)$, ktorý je definovaný podľa vzťahu:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+}(t) = z_i F \Delta\Psi_{l-s}(t) + RT \ln\left(\frac{c_{\text{H}^+}(t)}{c_{\text{H}^+}(t)}\right) \approx F \Delta\Psi_{l-s}(t) + 2,3RT \Delta p\text{H}_{s-l}(t), \quad (2)$$

kde R je univerzálna plynová konštanta v jednotkách $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, T je termodynamická teplota v K a z_i je mocenstvo, ktoré pre protóny je rovné plus 1. Dolné indexy l-s a s-l značia rozdiel lumén mínus stróma a opačne stróma mínus lumén.

Elektrochemický potenciál protónov $\Delta\mu_{\text{H}^+}(t)$ sa častejšie uvádza pomocou protón motorickej sily ($\text{pmf}(t)$), ktorú vyjadrujeme podľa vzťahu:

$$\text{pmf}(t) = \frac{\Delta\mu_{\text{H}^+}(t)}{F} = \Delta\Psi_{l-s}(t) + \left(\frac{2,3RT}{F}\right) \Delta p\text{H}_{s-l}(t). \quad (3)$$

Najväčší nárast $\text{pmf}(t)$ prebieha na počiatku osvetlenia vzorku v dôsledku lineárneho toku elektrónov z vody na NADPH, keď sa protóny akumulujú v luméne. S rastúcim časom dochádza ku spätnej distribúcií protónov v dôsledku fungovania ATPsyntázy a taktiež k poklesu $\Delta\Psi$ v dôsledku redistribúcie množstva iónov (Mg^{2+} , K^+ , Cl^-) v objemoch na oboch stranách TM prostredníctvom iónových kanálov až kým nenastane rovnováha.

Pohyb protónov cez iónové kanály rozhoduje hlavne o rozdelení pmf na dve zložky $\Delta\Psi$ a $\Delta p\text{H}$, ich prerozdelením sa vytvára náboj vo vnútri a vonku TM. Svetlo je hnacou silou ku generovaniu procesov pmf . Vo svetle indukovanom liste sa akumulujú protóny na lumenálnej strane aj na stromálnej strane ako je ukázané na obr. 2. V stave prispôsobenou tmou musí byť rovnováha medzi týmito protónmi a celkové prerozdelenie musí dokopy dávať 0. Cl^- je považovaný za ión závislý na napätí pre TM, zmena rozdelenia pmf na úkor $\Delta p\text{H}$. Zablockovaním kanálu pre ióny K^+ sa umelo

zvyšuje $\Delta\Psi$ a znižuje sa rýchlosť vývoja O_2 pravdepodobne rekombináciou náboja a spomaľovaním fotosyntetickej efektívnosti. Malá časť $\Delta\Psi$ je prisúdená rýchlemu prenosu protónov cez ATPsyntázu (Lyu a Lazár 2017).

2.3 Calvin-Bensonov cyklus

Calvin-Bensonov cyklus je najrozšírenejším mechanizmom fixácie atómov uhlíka na Zemi. Tento cyklus pomocou enzýmu ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy/oxygenázy (Rubisco) fixuje atmosférický CO_2 za vzniku prvého stabilného metabolitu 3-fosfoglycerátu, pozostávajúceho z troch atómov uhlíka, preto sa cyklus tiež nazýva C3-cyklom a rastliny s týmto cyklom majú názov C3 rastliny. 3-fosfoglycerát slúži ako prekursor pre všetky bunkové zložky a väčšinu redukovaného uhlíka na Zemi (Long a kol. 2006). Schéma reakcií Calvin-Bensonova cyklu je zahrnutá na obr. 2.

Fixácia CO_2 prebieha za využitia ATP a NADPH produkovaných počas svetelných reakcií fotosyntézy a tak následne vznikajú ADP, P_i a $NADP^+$. Cyklus pozostáva z troch fáz: karboxylácie, redukcie a regenerácie. V prvom kroku karboxylačnej časti cyklu sa naviaže CO_2 na primárny substrát, ktorý je cukor s piatimi atómami uhlíka, ribulóza-1,5-bisfosfát (RuBP), v reakcii katalyzovanej enzýmom Rubisco. Táto reakcia vytvorí nestabilný produkt so šiestimi atómami uhlíka (5 atómov uhlíka je z RuBP a 1 atóm uhlíka je z CO_2), ktorý sa rozpadne na dve molekuly 3-fosfoglycerátu, kde v jednej z molekúl je zabudovaný atóm uhlíka z pôvodného CO_2 . Pri redukčnej časti cyklu, 3-fosfoglycerát sa fosforyluje za spotreby ATP a za vzniku 1,3-bisfosfoglycerátu, ten sa následne redukuje za použitia NADPH a vzniká glyceraldehyd-3-fosfát (GAP). Pre každé tri molekuly CO_2 spočiatku kombinované s RuBP sa vytvorí šesť molekúl GAP. Iba jedna molekula GAP je finálny produkt Calvin-Bensonova cyklu a ostatných päť sa využije na regeneráciu primárneho substrátu cyklu RuBP v sérii reakcií, ktoré tiež vyžadujú spotrebu ATP. Molekula GAP sa ďalším radom metabolických dráh môže premeniť na aminokyseliny, lipidy alebo cukry, ktoré môžu byť zas uložené v podobe polymérneho škrobu (Buchanan a kol. 2015). Všetky reakcie v Calvin-Bensonovom cykle sú enzymatické a mnohé z enzýmov sú v tme neaktívne a na svetle sa musia najprv zaktívniť, väčšinou pomocou thioredoxínov.

2.4 Fotosystém II

Prvá reakcia fotosyntézy prebieha v špecifických štruktúrach PSII nachádzajúcich sa v TM, kde sa spúšťa séria reakcií spojených s prenosom elektrónov, ktoré vedú k štiepeniu molekuly vody. Pri reakciách spojených so štiepením vody vzniká O_2 . Fotosyntetické štiepenie vody považujeme za jednu z najdôležitejších biochemických reakcií na Zemi (Barber 2006).

PSII komplex obsahuje okrem už spomínaných integrálnych LHCII aj hydrofóbne proteíny reakčného centra s označením D_1 a D_2 . Proteíny sú uložené približne symetricky s ohľadom na medzimembránovú oblasť. PSII obsahuje aj dve molekuly chlorofylu označované skratkou P680, vďaka tomu že sú schopné absorbovať pri vlnovej dĺžke 680 nm. Ďalšie dve molekuly sa považujú za prídavné chlorofyly Chl_{D1} a Chl_{D2} , dva feofytíny (Phe_{OD1} a Phe_{OD2}) a dva plastochinóny Q_A a Q_B (Shealev a kol. 2011). Pod pojmom P680 chápeme klaster štyroch chlorofylov (heterodimér P680, Chl_{D1} , Chl_{D2}). Po absorpcii svetelnej energie pomocou LHCII v PSII sa jeden z chlorofylov P680 dostáva do vyšších energetických hladín a prenáša jeden elektrón akceptoru feofytínu, ktorý prenáša elektróny na primárne a sekundárne akceptory plastochinónu čo sú Q_A a Q_B .

Symetricky existujú dva redox-aktívne tyrozínové zvyšky v PSII, pre proteínovú podjednotku D_1 je to tyrozínový zvyšok TyrZ a pre proteínovú podjednotku D_2 je to TyrD. TyrZ sprostredkováva prenos elektrónov spojený s prenosom protónov medzi mangánovým klastrom a reakčným centrom P680 (Saito a kol. 2013). Prenosom elektrónu na Q_A prebehne redukcia a vznikne plastosemichinón Q_A^- a tento elektrón sa potom preniesie na nasledujúci akceptor Q_B , čím sa získa semichinón Q_B^- a súčasne stratou elektrónu sa Q_A^- vráti na stav Q_A . Na rozdiel od všetkých ostatných prenášačov elektrónov v PSII je Q_B dvojelektrónový prenášač, čo znamená postupnú redukciu na Q_B^- a následne na Q_B^{2-} . Tento proces dvojelektrónového prenášača sa nazýva model dvojelektrónovej brány. Po prenesení dvoch elektrónov na Q_B a jeho protonácií dvoma protónmi sa táto molekula uvoľní z Q_B -kapsy PSII do TM a stane sa z nej molekula plastochinolu (PQH_2).

PQH_2 a jeho oxidovaná forma plastochinón (PQ) je lipofilný prenášač elektrónov, ktorý vie preniesť dva elektróny a dva protóny z PSII do cytochrómového komplexu b_6/f (Erden a kol. 2017). Na začiatku prenosu sa molekula PQ naviaže do Q_B -

kapsy PSII a stane sa z nej Q_B . Na konci prenosu elektrónov cez zásobáreň PQ (PQ pool) sa PQH_2 oxiduje na PQ na lumenárnej strane cyt b_6/f , kam sa PQH_2 dostane pomocou difúzie v TM (Guskov a kol. 2009).

Prostredníctvom PQH_2 je napájaný tok elektrónov cez PSI a ďalej na $NADP^+$ za vzniku NADPH, ktorý sa ďalej využíva už v spomenutom Calvin-Bensonovom cykle. Molekula PQ má veľmi podobnú štruktúru ako molekula ubichinónu, čo je koenzým Q10.

2.4.1 Komplex vyvíjajúci kyslík

Na donorovej strane PSII proteínové podjednotky vyčnievajú do lumenálnej strany TM a tvoria uzáver pre miesto vývoja kyslíka, ktoré sa nazýva komplex vyvíjajúci kyslík (oxygen evolving complex, OEC) alebo komplex oxidujúci vodu (water oxydizing complex, WOC). Zvyšok $TyrZ^+$, vlastne $P680^+$ oxiduje zhluk Mn_4CaO_5 , čo reprezentuje jadro OEC (WOC).

Pri osvetlení sa predpokladá mechanizmus hromadenia náboja, kde OEC prechádza cez päť oxidačných stavov nazvaných S-stavy. Zhluk Mn_4CaO_5 obsahuje štyri mangány, ktoré postupne dodávajú elektróny na $TyrZ^+$ a tým mangánový klaster prechádza oxidačnými stavmi od 0 do plus 3, ktoré sú značené ako S_0 , S_1 , S_2 a S_3 . Najvyšší stav S_3 predstavuje silný oxidant schopný oxidovať molekuly vody (Petrie a kol. 2017). Každou redukciou $TyrZ^+$ sa jadro OEC oxiduje a pri odobratí štyroch elektrónov a uvoľnením štyroch protónov vodíka (H^+) do luménu sa rozložia dve molekuly vody a vznikne jedna molekula O_2 . K uvoľneniu O_2 dochádza behom S_3-S_0 prechodu OEC, čím vzniká cyklus S-stavou.

2.4.2 Cytochróm b_6/f a plastocyanín

Oxidácia PQH_2 prebieha komplexným membránovým proteínovým komplexom cytochrómu b_6/f . V komplexe sú monoméry obsahujúce jadro štyroch prenášačov elektrónov, vysokopotenciálny hém f na cytochróm f, časť označovanú ako cytochróm b_6 a vysoko potenciálny Rieskeho proteín Fe-S umiestený medzi cytochrómami f a b_6 .

Cytochróm b_6 sa skladá z dvoch typov hémov typu b – vysokopotenciálny (b_H) a nízkopotenciálny (b_L). Po prenose elektrónov na b_H , elektróny redukujú PQ, čím na cyt b_6/f vzniká tzv. Q-cyklus ako je na obrázku 1. Komplex cytochrómu b_6/f funguje

ako plastochinol-plastocyanínová oxidoreduktáza pri prenášaní elektrónov z plastochinónu na plastocyanín (Pc), ktorý sa nachádza v luméne (Fernandéz-Velasco a kol. 2001).

Tento prenos je sprevádzaný translokáciou protónov pre každý elektrón prenesený na Pc, čo prispieva k tvorbe ΔpH pri riadení ATP syntázy. Pc je hydrofilný proteín s dvomi atómami medi, ktoré umožňujú prenos elektrónu a ten sa prenáša z cyt b_6/f na PSI.

2.5 Fotosystém I a ferredoxín

Komplex PSI z rastlín obsahuje približne 15 proteínových jednotiek. Reakčné centrum PSI je tvorené heterodimérom z proteínových podjednotiek PsaA a PsaB a podieľajú sa na väzbe hlavných nosičov prenášajúcich elektróny v tomto fotosystéme, ako sú P700 (chlorofylový dimér), A_0 (chlorofyl), A_1 (fylochinón) a F_X (Fe-S centrum) (Boudreaux a kol. 2001). Zatiaľ čo v PSII sú stabilné akceptory chinóny Q_A a Q_B , v PSI sú stabilnými akceptormi Fe-S centra. Následné Fe-S centrá, viazané na podjednotke PsaC, sú F_A a F_B . PSI obsahuje ako aj PSII mnoho ďalších proteínových jednotiek, ktoré neviažu protetickú skupinu (Kubota-Kawai a kol. 2018). Elektróny sa môžu v PSI prenášať pomocou dvoch symetrických vetví značených A a B (podľa PsaA a PsaB). Obe vetvy začínajú dimérom P700 a končia železo-sírovým klastrom F_X , avšak len vetva A je aktívna (Ishikita a Knapp 2003). Podobne ako v prípade PSII, neexistuje presná zhoda o primárnom donore elektrónov v PSI, preto sa za primárny donor všeobecne označuje klastor štyroch chlorofylov (P700, Chl_A a Chl_B).

Prenos elektrónov pokračuje cez F_A , F_B až na konečný akceptor elektrónov, čo je rozpustný Fe-proteín umiestnený v stróme. Zredukovaný ferredoxín (Fd^{\cdot}) je schopný prenášať elektróny na $NADP^+$ pomocou ferredoxín- $NADP^+$ oxidoreduktázy (FNR). (Vollmer a kol. 2001).

2.5.1 Ferredoxín- $NADP^+$ oxidoreduktáza

Prenos elektrónov z Fd^{\cdot} na $NADP^+$ sprostredkováva intermediárny enzým FNR. Samotný ferredoxín a FNR tvoria komplex vďaka elektrostatickej interakcie.

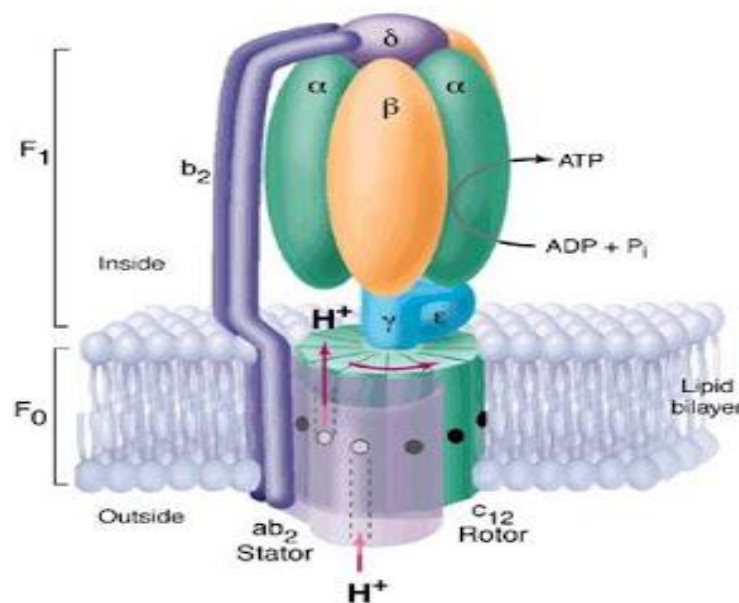
Enzým FNR obsahuje flavínadenín dinukleotid (FAD), ktorý sa redukuje v dvoch krokoch (Anusevičius a kol. 1997). V prvom kroku sa redukciami dostane na

flavín semichinónový stav a následne na druhý znížený stav FADH₂ (redukovaná forma FAD). FNR zabezpečí prenos dvoch elektrónov na NADP⁺, čili pre vznik jednej molekuly NADPH je treba naviazanie jedného protónu z luménu (Iyanagi a kol. 1974). Samotný FNR je voľne spojený s TM čo znamená, že je ľahko oddeliteľný.

2.6 ATP-syntáza

Energia uložená pri prenose elektrónov riadeného svetlom, ktoré vedú k oxidácií vody a k redukcii ferredoxínu a NADPH. Reakcie prenosu elektrónov sú spojené s premiestňovaním a ukladaním protónov, pri toku protónov sa tvorí elektrochemický gradient a následne pmf. Pmf riadi vratnú syntézu ATP, poháňanú pohybom protónov opačne z luménu do strómy (Seelert a kol. 2003).

CF₀-CF₁ ATPáza má regulačnú a funkčnú úlohu v elektrónových a prepravných obvodoch reagujúcich na zmeny svetla. Enzým CF₀-CF₁ využívajúci energiu uloženú v protónovom elektrochemickom potenciáli pre tvorbu molekúl ATP pomocou schopnosti hydrolyzovať ATP. Vo svetle prebieha jednosmerná syntéza ATP. Prechodom cez tylakoidnú membránu pri svetle sa vytvára už spomínaná pmf a aktivuje ATP syntázu a aktivuje nadbytočne enzým štiepiaci ATP. ATPsyntáza v TM sa skladá z dvoch hlavných častí: časť prechádzajúca TM (CF₀) a hydrofilná časť na povrchu stromálnej časti TM (CF₁) ako je znázornené na obr. 3.



Obr. 3: Stavba ATPsyntázy. (Prevzaté z [2])

Hydrofilná časť CF_1 pozostáva z dvoch väčších podjednotiek označovaných α a β a z ďalších troch menších podjednotiek γ , δ a ϵ . Takisto CF_1 obsahuje kópie z jednotlivých podjednotiek za účelom správnej stechiometrie. Pri premiestňovaní protónov naprieč membránou pracuje najmä CF_0 následne protóny prechádzajú na katalytickú časť enzýmu CF_1 , ktorá sa priamo zúčastňuje reakcie medzi ADP a Pi z ktorej vznikne ATP a využije sa energia z protónového gradientu. Konkrétne podjednotky α a β zabezpečujú spustenie fosforylácie molekuly ADP, čo je naviazanie fosfátu Pi na ADP za vzniku ATP. Podjednotka δ dohliada na spotrebovanie protónov pri prechode cez enzým CF_0 - CF_1 . Podjednotka γ sa účastní regulačného mechanizmu sprostredkovaného ferredoxín/thoredoxínovým systémom, ktorý aktivuje ATP syntázu vo svetle a pri nižej hodnote pmf. Posledná podjednotka ϵ zabraňuje spúšťaniu enzýmu v tme, zamedzuje rozkladu ATP a vďaka prepojeniu s podjednotkou γ sa zapája do toku protónov. Hydrofóbná časť CF_0 je zložená zo štyroch podjednotiek I, II, III a IV. Podjednotka III môže vytvárať cestu pre presun protónov z luminálneho priestoru do strómy (Buchanan a kol. 2015).

3.1 Elektrogénne procesy vo svetelnej fázi fotosyntézy

Za elektrogénne procesy považujeme procesy vďaka ktorým vzniká stabilné rozdelenie náboja. Pri fotosyntéze sú elektrogénne procesy nábojové separácie v PSI, PSII, prenos elektrónov cez komplex cyt b_6/f , takisto ako aj celú svetelnú fázu fotosyntézy.

Niektoré procesy pri prenose elektrónov sú sprevádzané aj prenosom protónov. Vychytávanie protónov zo strómy nastáva dvojnásobnou redukciou PQ na PQH_2 v miestach výskytu PSII aj cyt b_6/f a protóny sa sprostredkujú pri tvorbe $NADP^+$. PQH_2 vzniká pri druhom prenose protónov z Q_A na Q_B , je schopný sa uvoľniť do PQ pool. Presnejšie oxidácia z PQH_2 na PQ, prebehne pri difúzií PQH_2 v TM, dosiahne lumenálnu stranu cytochrómového komplexu b_6/f , konkrétne jej väzbové centrum Q_0 . PQ pool napája lineárny tok elektrónov z PSI na $NADP^+$ za vzniku NADPH.

3.1.1 Lineárny a cyklický transport elektrónov

Tok elektrónov z OEC až po $NADP^+$ sa označuje ako lineárny transport elektrónov (LET). Okrem vyššie uvedeného lineárneho transportu elektrónov (LET) model obsahuje aj transport cyklických elektrónov (CET), kde elektrón prechádza z Fd na vysoký potenciál heme (b_H) cyt b_6/f . Jeden z možných typov CET je znázornený na

obr. 2. Má sa za to, že CET reguluje a prispieva k správne mu pomeru NADPH a ATP vytvorených počas svetelnej fázy fotosyntézy.

3.1.2 Iónové kanály

Pre spomínaný prenos iónov cez TM sa využívajú iónové kanály. Pomocou týchto kanálov sa prenášajú v smere koncentračného gradientu bez spotreby ATP. Sú prítomné vo všetkých organizmoch od baktérií až po eukaryotá. Vplývajú na bunkový metabolizmus, ktorý pozostáva z reťazových reakcií substrátov na produkty pomocou enzýmov, energie a difúzie zlúčenín. Vďaka oddelenosti membrány sa vytvorí H^+ gradient pri prenose iónov. Ióny sa podieľajú na biosyntetických cestách a fyziologických procesoch v rastlinách. Sú rozhodujúce pri udržiavaní pH, objemu, pri procesoch osmózy a difúzie a tým pádom aj pre medzibunkovú komunikáciu. Z dôvodu rôznych nábojov pri iónoch sú prenášané cez membránu pomocou iónových kanálov. ATP syntetizuje pmf pohybom protónov cez CF_0 a vznik ATP z ADP a P_i cez CF_1 . Prechodom protónov do strómy je spojený aj vznik NADPH a glyceraldehydu-3-fosfát z 2,3-bisfosfoglycerovej kyseliny v CB cykle.

Ďalšie ióny, ktoré sa tu objavujú sú fosfáty (P_i), ktoré majú svoju dôležitú úlohu už pri opisovanej tvorbe ATP alebo naopak sa uvoľňujú pri procese defosforylácia čo je opačný proces rozklad ATP. Ióny sulfátu (SO_4^{2-}) sa spotrebujú pri tvorbe aminokyselín cysteínu a metionínu, ióny dusitanu (NO_2^-) sa využijú pri tvorbe dusíkatých zlúčenín a hydrogénuhličitanu (HCO_3^-) pri tvorbe uhľikátých zlúčenín. Za najpočetnejší katión v chloroplastoch sa považuje katión draslíka (K^+) a okrem neho sú v procesoch fotosyntézy využívané aj katióny vápnika (Ca^{2+}) ako je znázornené na obrázku 2.

3.1.3 P515

TM obsahuje pigmenty (najmä karotenoidy a chlorofyly), ktoré reagujú na elektrické pole s posunom absorpčných pásiem, ktorý sa nazýva elektrochrómny posun (ESC). Každý takýto posun je charakterizovaný s vlnovou dĺžkou maximálnej, minimálnej a nulovej absorbancie. V zelených rastlinách k ESC dochádza v oblasti vlnovej dĺžky 470-550 nm po osvetlení svetelnou energiou s maximom v oblasti 515 nm. Zmena absorbancie pri 515 nm (P515) je úmerná rozdielu elektrických potenciálov cez TM (Sukhov a kol. 2016).

Amplitúda zmeny signálu P515 je mierou počtu otvorených fotosystémov, ktoré vyvolali stabilné oddelenie náboja a obsahuje aj príspevky z prúdu elektrónov z Q-cyklu od rozptýlenia iónovým pohybom cez TM a príspevky zo zmien v sile miestnych elektrických polí. Na signál P515 má vplyv rozptyl a neelektrochromická absorbanca, najmä pri nepretržitom osvetlení, čo znamená že sa meria pri dlhších časoch. Správne použitie metódy P515 je bezpečné, keď je optický signál pri vlnovej dĺžke 515 nm „upravený“ o príspevky vzniknuté z iných zdrojov, najmä tzv. „scattering“ s prejavujúcou sa absorpčnými zmenami okolo 550 nm.

3.1.4 I820

Použitím signálu I820 je možné merať zmeny v redoxnom stave donorovej strany PSI. Oxidácia reakčných centier PSI (P700) spôsobuje zvýšenie absorbanca v rozmedzí vlnových dĺžok 800-850 nm. Pre monitorovanie zmeny absorbanca pri hodnote 820 nm je vhodný spôsob, ako sledovať redoxný stav P700 pri kontinuálnom svetle. Signál I820 môže obsahovať aj redoxné zmeny Pc a ferredoxínu, tieto zmeny sú však malé.

3 Cieľ práce

Cieľom práce bolo preskúmať fotochemické reakcie prenosov elektrónov v tylakoidnej membráne rastlín, súvislosť a správanie signálov I820 a P515 na rastlinách *Arabidopsis* stresovaných zmenou teploty a intenzít osvetlenia. Ďalším cieľom bolo zistiť a bližšie preskúmať vplyv a vzájomné vzťahy medzi týmito signálmi pomocou prístroja Dual-PAM-100, ktoré ešte doteraz neboli skúmané.

4 Materiály a metódy

4.1 Sadenie a pestovanie rastlín

Pre meranie boli použité jednorôčné rastliny druhu *Arabidopsis*, divokého typu ako je na obr. 4. Rastliny boli zasadené do pripravenej pôdy, ktorá bola upravená sušením po dobu 30 minút deň pred sadením pri teplote 70°C. Pred zasadením sa pôda nechala vychladiť aby sa predišlo spáleniu semien a navlhnuť vodou až po vrch pôdy. Predpripravené na sadenie boli nádoby o veľkosti 2,5 x 2,5 cm, vhodné pre naklíčenie semien. Deň po sušení sa do pôdy umiestnili semená pomocou pipety, ktoré boli pripravené v mikroskúmavke typu eppendorf spolu s roztokom. Rastliny boli umiestnené a pestované vo fytokomore firmy Photon Systems Instruments, kde boli vystavené intenzite umelého slnečného žiarenia 100 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ po za konštantných podmienok 16 hodín tma a 8 hodín svetlo. Po každodennom pravidelnom zalievaní počas ktorého bola zemina stále udržiavaná vo vlhkom stave rastliny vyklíčili.

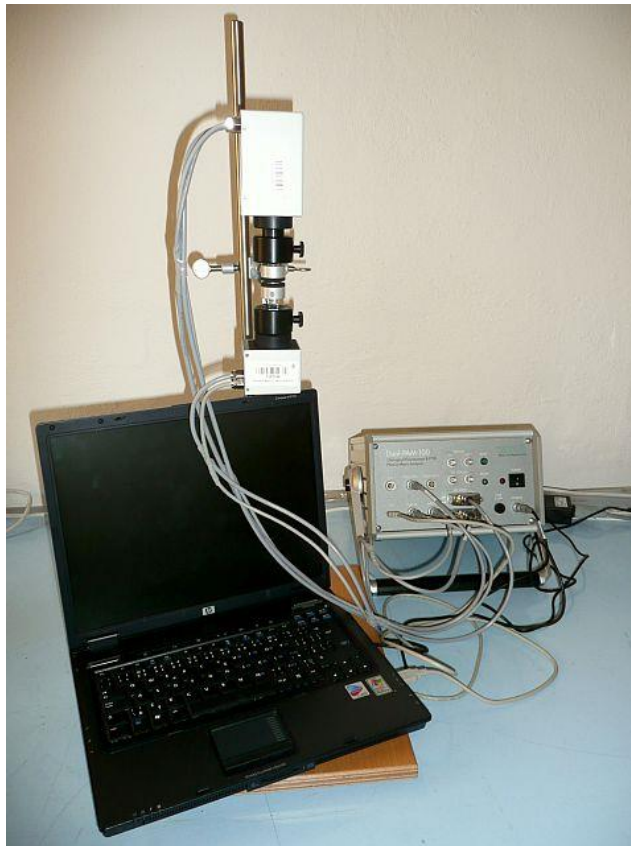


Obr.4: Sadenica *Arabidopsis*. (Prevzaté z [3])

Po vyklíčení v období druhého týždňa rastliny bolo nutné sadenice presadiť do väčších nádob s rozmermi 5,5 x 6 cm. Pred presadením sa proces sušenia pôdy opakovane a následne sa pôda nechala navlhnuť vodou až po vrch nádob. Rastliny rástli po dobu 5 týždňov pred meraním aby listy mali správnu veľkosť.

4.2 Meranie

Pre meranie sa používal fluorescenčný a absorpčný systém Walz Dual-PAM-100 od výrobcu (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Nemecko) pre súčasné stanovenie signálu I820 a Chl fluorescencie (ktorá bola súčasne zmeraná so signálom I820, ale nebola vyhodnotená) a osobitným meraním pre signál P515. Prístroj obsahuje štandardné meracie hlavice DUAL-E a DUAL-DB pre meranie signálu I820 a hlavice DUAL-EP515 a DUAL-DP515 pre meranie signálu P515. Znázornenie celej aparatúry je na obr. 5.



Obr.5: Walz Dual-PAM-100.(Pravzaté z [4])

Pre intenzitu meracích svetiel bola nastavená hodnota 10 a pred každým meraním sa vykonala ekvilibrácia meracích svetiel. Ekvilibráciou sa odčítali signály pri vlnových dĺžkach pozadia a skutočná meracia vlnová dĺžka. Pre signál P515 predstavuje pozadie pri 550 nm a skutočný signál pri 515 nm a pre signál I820 je pozadie pri 875 nm a signál pri 830 nm. Ekvilibráciou sa zabezpečil aby pri počiatočnom stave bol rozdiel intenzít meracieho a pozadového svetla pred meraním rovný 0. Doba merania bola nastavená na hodnotu 300 ms a časové rozlíšenie bolo 10 μ s.

Obidva signály (I820, P515) boli zmerané najskôr pri pokojovej teplote pri zmenách intenzít aktinického osvetlenia. Intenzity mali hodnotu 3000, 5000, 10000, 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a bolo použité červené svetlo s vlnovou dĺžkou 635 nm. Ďalšie meranie bolo uskutočnené pri intenzite 3000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a pri zmenách teplôt, kedy vzorky listov sa teplotne inkubovali po dobu 5 minút v zohriatej vode postupne s teplotami 35°C, 38°C, 41°C a 44°C. Listy boli jemne osušené s papierovým obrúskom a následne prebiehalo meranie. Rastliny boli pred meraním adaptované na tmu po dobu 1 hodiny a manipulácia so vzorkami a celé meranie prebiehalo pri veľmi slabom zelenom svetle.

Krivky pre každý teplotu a intenzitu žiarenia boli zmerané trikrát na troch rôznych listoch a do výsledkov sa použili priemery. Pri ďalšom spracovaní sa krivky vyhladzovali pomocou programu Origin v.7 (OriginLab, Northampton, USA) metódou príslušného priemerovania 8 bodov. Pri vyhladzovaní sa za počiatok bral čas 50 μs , ak v čase 50 μs nebola krivka priamo na 0 tak sa odchýlka musela pričítať alebo odčítať a čo bol aj hlavný predpoklad pre každé meranie, a to že stav P700 bol v tme redukovaný (I820 = 0) a napätie na TM bolo v tme nulové (P515 = 0).

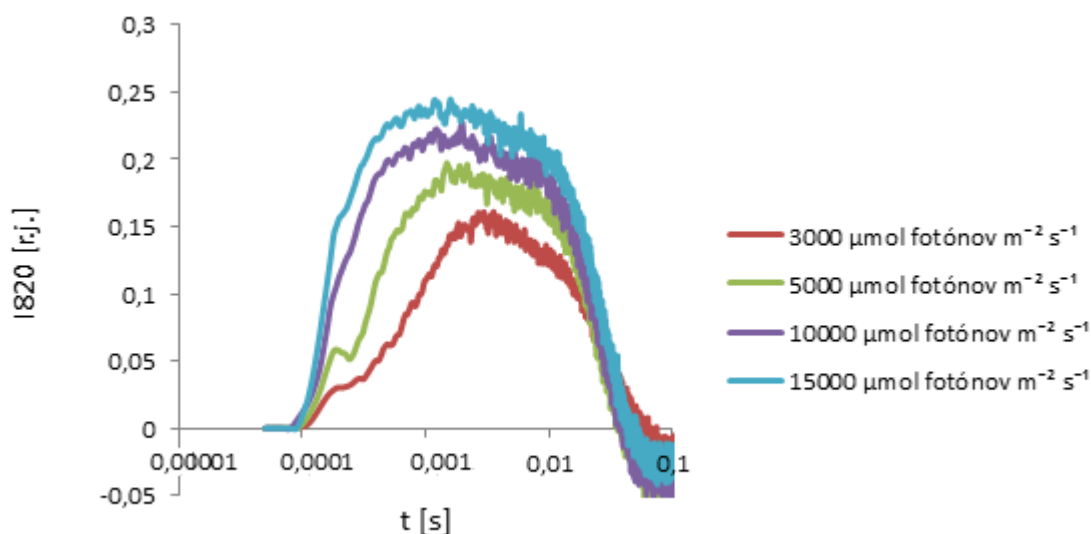
5 Výsledky

Podľa informácií a parametrov uvedených v časti materiály a metódy boli zmerané časové priebehy $P700^+$, meraného pomocou signálu I820, a priebehy $\Delta\Psi$, merané pomocou signálu P515, jednotlivých rastlinných vzoriek v závislosti na intenzite aktinického osvetlenia vzorku a na zvýšenú teplotu pri zvolenej intenzite excitačného svetla. Najskôr boli študované zmeny kinetiky v závislosti na intenzite osvetlenia rastlinného vzorku aktinickým svetlom.

5.1 Vplyv intenzity osvetlenia vzorku

5.1.1 I820

Časové priebehy signálu I820, ktoré odrážajú najmä množstvo $P700^+$, meraného pri pokojovej teplote v závislosti na intenzite použitého osvetlenia vzorku v rozmedzí 1000 až 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sú uvedené na obr. 6. Nárast krivky na obrázku pri signáli I820 odpovedá oxidácii $P700^+$ a pokles zas redukcii $P700^+$.



Obr.6: Časový priebeh I820 v závislosti na intenzite osvetlenia od 1000 do 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Merané pri pokojovej teplote a každá krivka predstavuje priemer z 3 meraní.

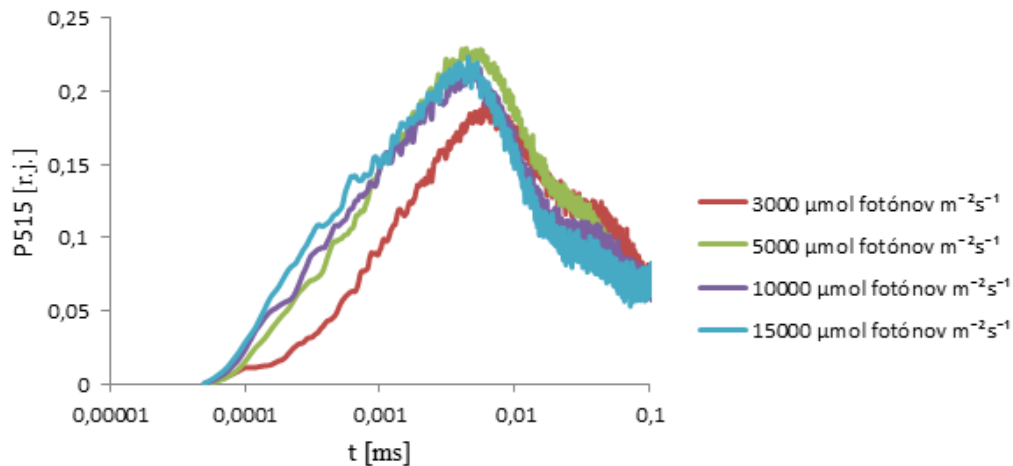
Veľkosť maxima signálu I820 a čas jeho dosadenia poukazuje na dôležitú závislosť na intenzite osvetlenia vzorku. Vznik maxima a pozícia na časovej osi v ktorom sa maximum vyskytlo odrážajú veľkosť použitej intenzity osvetlenia, v zmysle ako s rastúcou intenzitou rastie rýchlosť vzniku $P700^+$ čo sa odzrkadľuje aj na rýchlosti vzniku maxima pre I820. Na druhej strane veľkosť maxima pre tento signál je

daný množstvom P700⁺, ako dôsledok rovnováhy medzi už spomínanou rýchlosťou tvorby P700⁺ a rýchlosťou redukcie tohto P700⁺ pomocou Pc. Konkrétnejšie rýchlosť tejto redukcie P700⁺ pomocou Pc je limitovaná konečnou rýchlosťou „turnoveru“ Pc na cyt b₆/f. Limitácia má teda za následok fakt, že s rastúcou intenzitou osvetlenia prevláda rýchlosť tvorby P700⁺ nad rýchlosťou redukcie pomocou Pc, čoho následkom narastá veľkosť maxima pre signál I820 v závislosti na intenzite osvetlenia vzorku. Opisované správanie signálu I820 v závislosti na intenzite dokazuje jeho fotochemickú povahu.

Okrem spomenutých faktov stojí za povšimnutie, že redukcia P700⁺ čo znázorňuje pokles signálu I820, vykazuje pri najnižšej intenzite pomalú jednofázovú kinetiku ale pri vyšších intenzitách je táto pomalá kinetika nasledovaná rýchlou kinetikou redukcie P700⁺. Príčinou objavenia tejto rýchlej kinetiky redukcie P700⁺ by mohla napríklad byť zvýšená miera CET okolo PSI, ktorú môžeme očakávať pri zvýšenej „nasýtenosti“ akceptorovej strany PSI v dôsledku veľkej intenzity osvetlenia. Nemôžeme však ani vylúčiť vplyv $\Delta\Psi$ na vznik dvojfázovej kinetiky redukcie P700⁺.

5.1.2 P515

Závislosť časového priebehu signálu P515, ktoré odráža napätie na TM, zameraného pri pokojovej teplote, na použitej intenzite excitačného aktinického osvetlenia vzorku, v rozmedzí od 3000 do 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, je ukázané na obr. 7. Dôvodom nárastu krivky je nahromadenie protónov (H⁺) v luméne. Pokles krivky odráža dva pochody, ktoré eliminujú počiatočný nárast $\Delta\Psi$. Ako prvé je to tok iónov K⁺, Ca²⁺ z luménu do strómatu a Cl⁻ späť zo strómatu do luménu, ktoré sa snažia vyrovnať počiatočný nárast kladného náboja v luméne a za druhú prácu ATPsyntázy vedúcu k tvorbe ATP, ktorá pri svojej funkcii transportuje protóny z luménu do strómatu a tým tiež vyrovnáva počiatočný nárast kladného náboja v luméne.



Obr.7: Časový priebeh P515 v závislosti na intenzite osvetlenia od 1000 do 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Merané pri pokojovej teplote a každá krivka predstavuje priemer z 3 meraní.

Pre intenzity osvetlenia rastúceho z hodnoty 3000 na 5000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ako je na obr. 7, môžeme vidieť zväčšujúcu sa rýchlosť vzniku maxima P515 dokumentujúceho závislosť rýchlosti počiatočnej tvorby $\Delta\Psi$ na intenzite osvetlenia. Ďalej závislosť na množstve nábojových separácií za jednotku času a tým aj množstvo protónov uvoľnených a transportovaných do luménu. Intenzita osvetlenia väčšia ako 5000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ už nespôsobí rýchlejšiu tvorbu píku P515, čo pravdepodobne odráža časovú limitáciu „turnoveru“ OEC (uvoľňovanie protónov do luménu behom prechodu medzi S-stavmi OEC) a PQ poolu na cyt b6/f (uvoľnenie protónov do luménu pri oxidácii PQH_2). Zatiaľ čo veľkosť maxima P515 je pre intenzity 1000 a 3000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ približne rovnaká, pre intenzity osvetlenia 5000, 10000 a 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ je táto veľkosť väčšia, ale opäť približne rovnaká v rámci týchto 3 intenzít.

Rýchlosť prvej časti poklesu krivky P515 sa javí pre všetky použitia intenzity približne rovnaká. To naznačuje, že proces ktorý je zodpovedný za počiatočný pokles P515 za jeho vrcholom je nezávislý na intenzite excitačného svetla a tento proces by mohol byť už spomínaný tok iónov K^+ a Ca^{2+} zo strómatu do luménu a opačne iónov Cl^- . Naopak s rastúcou intenzitou svetla klesá výška vlny v časti poklesu krivky P515. Tento pokles veľkosti, odrážajúci zvýšenú elimináciu počiatočného $\Delta\Psi$, môže byť spôsobený zvýšenou funkciou ATPsyntázy v dôsledku tvorby väčšieho pmf pri väčšej intenzite osvetlenia. Menšie $\Delta\Psi$ na TM (menej kladných nábojov v luméne) môže mať za

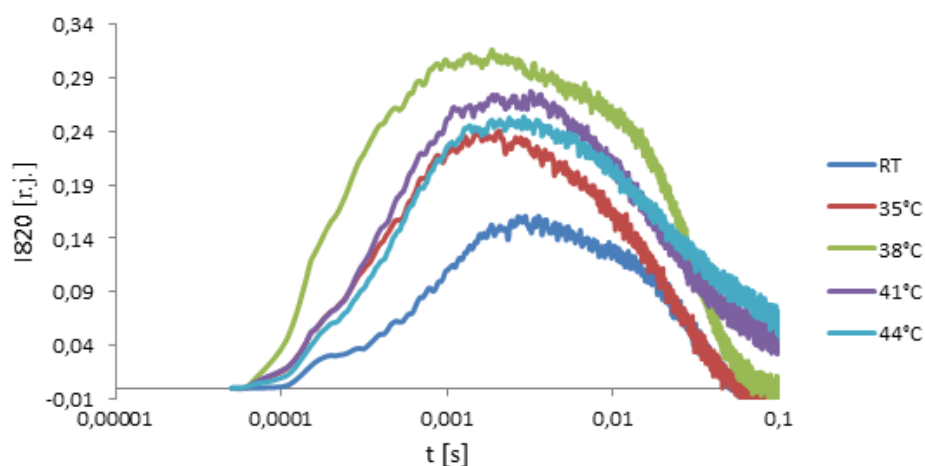
následok ľahší vznik nábojových separácií v PSII, pretože platí čím menší kladný náboj v luméne tým pôsobí elektrostaticky menej proti formovaniu P680⁺ a tým aj rýchlejší tok elektrónov na PSI. Toto môže mať za následok vznik novej rýchlej kinetiky pri redukcii P700⁺.

5.2 Vplyv teploty vzorku

Pretože fluorescenčný indukčný jav, ktorý tiež súvisí so signálmi študovanými v tejto práci, sa meria pri inzenzitách osvetlenia v rádoch niekoľko tisícov jednotiek $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, pre štúdium vplyvu teploty vzorku na zmeny tvaru kriviek signálov I820 a P515 bola vybraná intenzita excitačného osvetlenia 3000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

5.2.1 I820

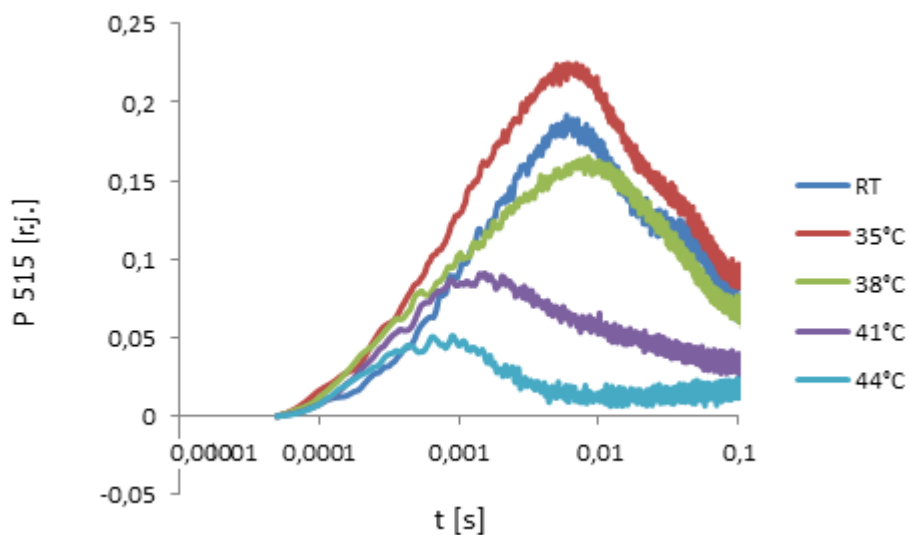
Obrázok 8 opisuje časový priebeh signálu I820, pri zvolenej intenzite excitačného osvetlenia, v závislosti na teplote vzorku a po inkubácii po dobu 5 minút vo vode pri danej teplote. Rýchlosť vzniku maxima I820 a tým aj pozícia maxima v čase rastie z pokojovej teploty do 38°C a pri vyšších teplotách dochádza k poklesu rýchlosti vzniku maxima. Tieto závislosti pravdepodobne odrážajú závislosť rýchlostnej konštanty nábojovej separácie v PSI na teplote, kde konštanta najskôr s rastúcou teplotou rastie a potom začne klesať. Tento pokles odráža inhibíciu PSI so zvyšujúcou sa teplotou. Teplota 38°C je tiež hraničná, čo sa týka veľkosti maxima signálu I820, kde do teploty 38°C vrátane veľkosti maxima rastie a po väčšom teplotnom strese veľkosť maxima klesá. Spomínané zmeny v rýchlostnej konštante nábojovej separácie v PSI, pri teplote nezávislej redukcii P700⁺, môžu plne vysvetliť tieto zmeny I820. Navyše, môžeme uvažovať, že s rastúcou teplotou rastie aktivácia CET okolo PSI, a tým sa aj zvyšuje miera redukcie P700⁺, čo by ešte viac znižovalo maximum signálu I820. Pri teplotách nad 38°C a to pri 41°C a 44°C by však táto redukcia P700⁺ pomocou CET musela byť pomalá, ako je vidieť z výrazne pomalším poklesom časti signálu I820 v porovnaní s teplotou 38°C a ešte nižšími teplotami.



Obr.8: Časový priebeh I820v závislosti na teplote (inkubácia po dobu 5 minút v zohriatej vode) od pokojovej teploty do 44 °C. Merané pri intenzite aktinického osvetlenia $3000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a každá krivka predstavuje priemer z 3 meraní.

5.2.2 P515

Časové priebehy signálov P515, pri zvolenej intenzite excitačného osvetlenia, v závislosti na teplote vzorku po inkubácii vzorku po dobu 5 minút vo vodnej pri danej teplote sú zobrazené na obrázku 9.



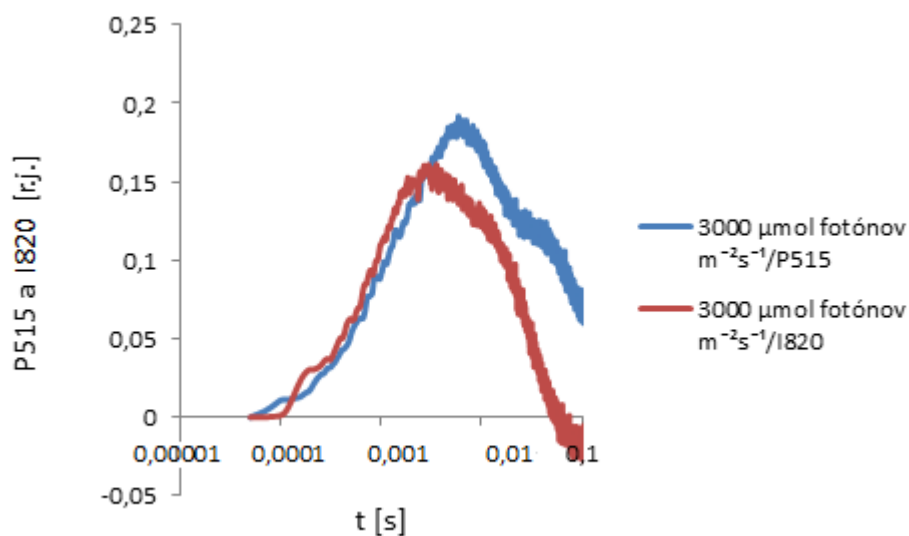
Obr.9: Časový priebeh P515v závislosti na teplote (inkubácia po dobu 5 minút v zohriatej vode) od pokojovej teploty do 44 °C. Merané pri intenzite aktinického osvetlenia $3000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a každá krivka predstavuje priemer z 3 meraní.

Oproti meraniu pri izbovej teplote, rýchlosť vzniku maxima signálu P515 a aj jeho pozícia v čase meraná pri 35°C vzrástla, ako aj veľkosť tohto maxima. Tieto zmeny odrážajú teplotou indukované zväčšenie rýchlosti akumulácie protónov v luméne. Pri teplote 38°C dochádza naopak ku spomaleniu nárastu signálu P515, čo znamená mierny posun k dlhším časom, a tiež k poklesu tohto maxima. Pretože rýchlosť poklesu signálu P515 za jeho maximom je do teploty 38°C približne stále rovnaká, čiže rozptylenie počiatočného $\Delta\Psi$ pomocou toku príslušných iónov je stále rovnaké. Potom pokles maxima signálu P515 a zároveň jeho mierny posun k dlhším časom pre teplotu 38°C odráža čiastočnú inhibíciu procesov, ktoré vedú k akumulácii protónov v luméne spôsobené zvýšenou teplotou. Tieto inhibície a zmeny vo veľkosti maxima P515 a jeho pozícia sú do teploty 38°C vrátane tejto teploty stále malé. Na druhej strane, pri teplotách 41°C a 44°C dochádza k výraznému posunu maxima ku kratším časom (okolo 1 milisekundy) a tento posun je sprevádzaný i výrazným poklesom hodnoty daného maxima. Skorší vznik vrcholu P515 s rastúcou teplotou pravdepodobne neodráža už rýchlejší vznik $\Delta\Psi$, pretože pri týchto teplotách je už výrazne inhibovaná funkcia cyklu OEC v ktorom dochádza k uvoľňovaniu protónov do luménu a je výrazne inhibovaný aj prenos elektrónov z Q_A na Q_B . Inhibícia prenosu elektrónov následne ovplyvňuje aj prenos cez PQ pool na cyt b_6/f komplex, čiže uvoľňovanie protónov do luménu behom Q-cyklu. Spomenuté inhibície vedú k malej tvorbe $\Delta\Psi$, ktoré je potom rýchlejšie vyrovnávané procesmi vedúcimi k eliminácii kladného náboja protónov v luméne. K týmto procesom patrí pri teplotách 41°C a 44°C prevažne tok K^+ , Ca^{2+} a Cl^- iónov cez TM, ktoré sú pri týchto teplotách už pravdepodobne výrazne spomalené. Toto plyní z pomalšieho poklesu signálu po maxime v porovnaní s teplotou 38°C, vrátane tejto teploty, kde signál P515 po jeho maxime klesal spočiatku oveľa rýchlejšie. Vymiznutie vlny v signáli P515 po jeho počiatočnom poklese za jeho vrcholom, ktorá je viditeľná do teploty 38°C, pravdepodobne odráža teplotou indukovanú inhibíciu funkcie ATPsyntázy.

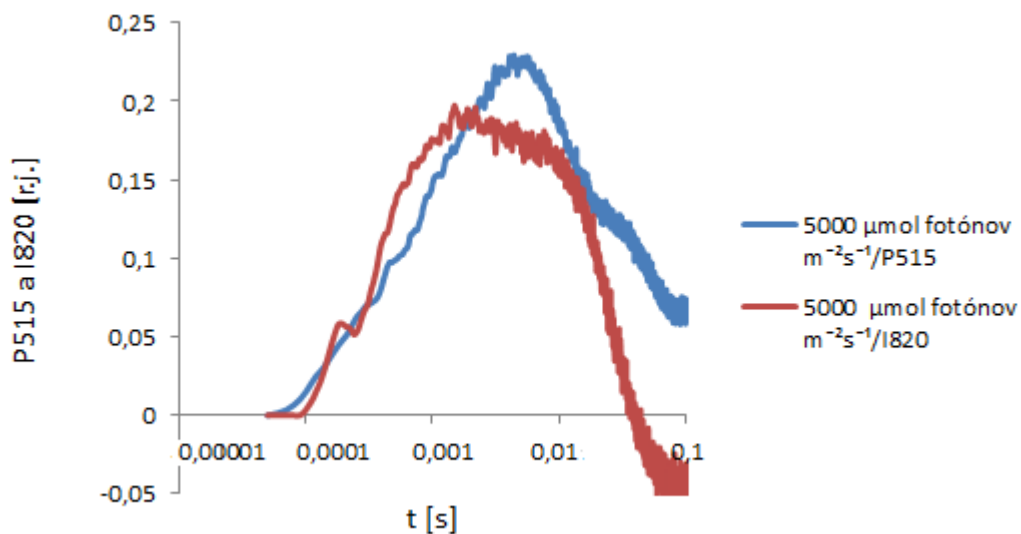
6 Diskusia

6.1 Porovnanie zmien I820 a P515 spôsobené rôznou intenzitou osvetlenia vzorku

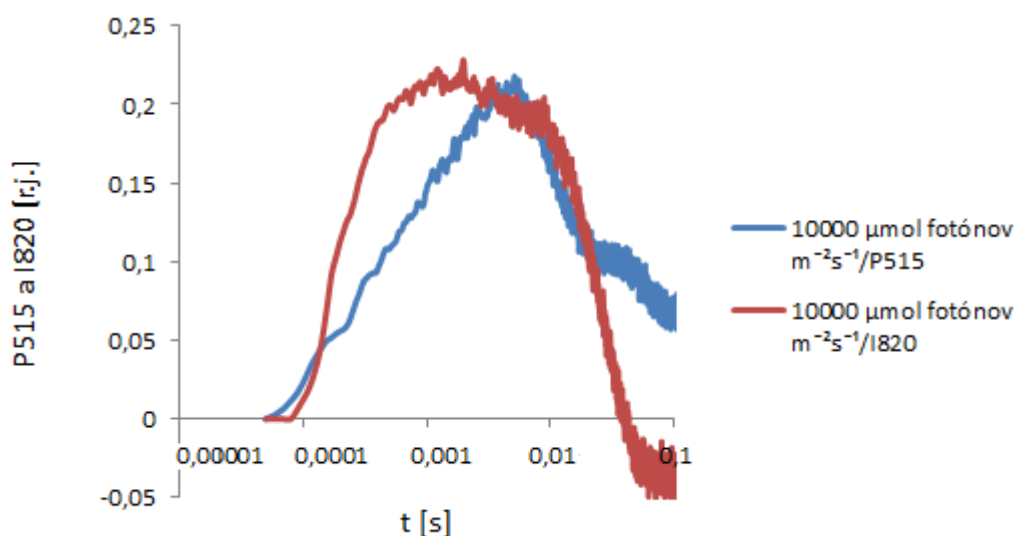
Signály P515 odrážajúci napätie na TM a I820 popisujúci redoxný stav P700 vykazujú zreteľné zmeny pri osvetlení vzoriek rastlín rôznymi intenzitami. Na obr. 9 až 12 sú porovnané zmeny výskytu maxim I820 a P515.



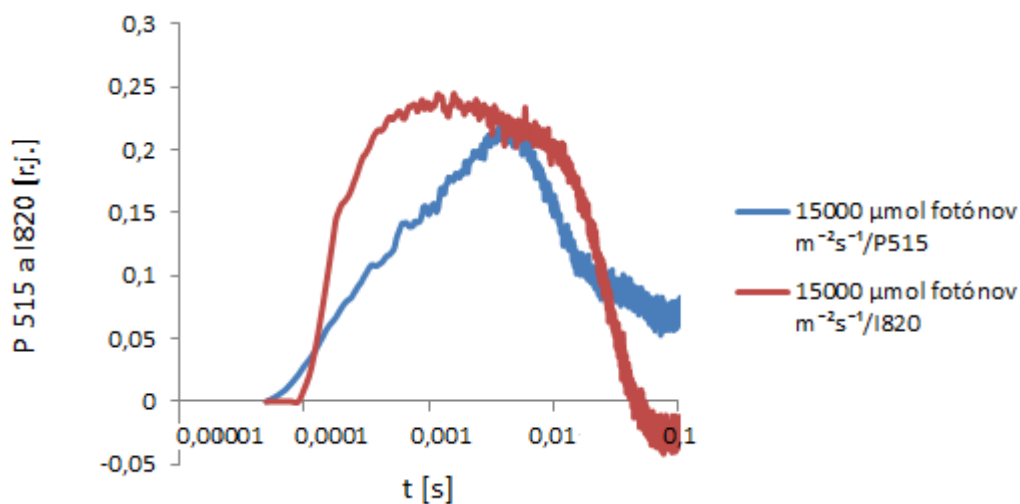
Obr.9: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri zmene intenzity osvetlenia vzorku $3000\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Dáta z obrázkov 6 a 7.



Obr.10: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri zmene intenzity osvetlenia vzorku $5000\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Dáta z obrázkov 6 a 7.



Obr.11: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri zmene intenzity osvetlenia vzorku $10000\mu\text{mol}$ fotónov $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Dáta z obrázkov 6 a 7.



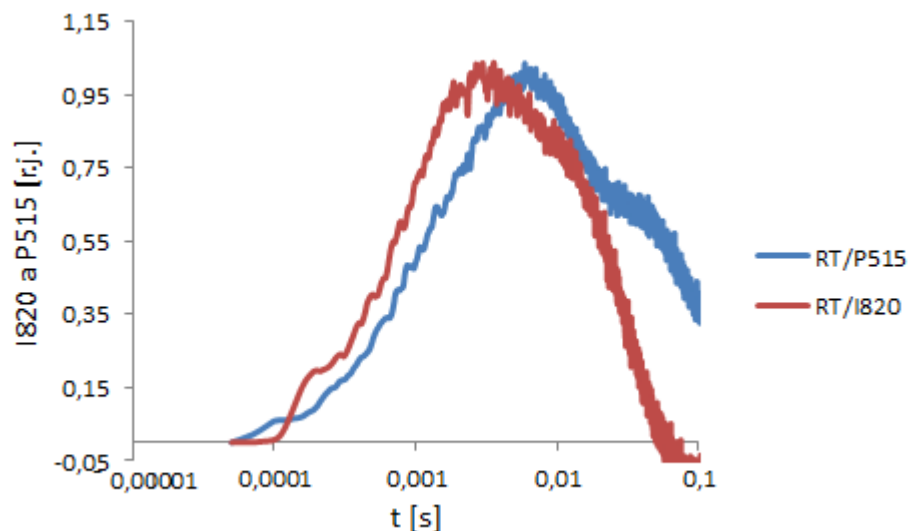
Obr.12: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri zmene intenzity osvetlenia vzorku $15000\mu\text{mol}$ fotónov $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Dáta z obrázkov 6 a 7.

Pri nižších intenzitách 3000 a $5000 \mu\text{mol}$ fotónov $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sa maximum signálu I820 objavuje pri kratších časoch medzi 1 ms a 10 ms. Oproti tomu signál P515 sa pri rovnakých intenzitách objavuje pri dlhších časoch, čo je typické pre meranie modrým aktinickým svetlom, výraznejšie bližšie k 10 ms. Pri týchto intenzitách sa sklon kriviek pri náraste pre obidva signály javí veľmi podobne, čo opisuje súčasný nárast

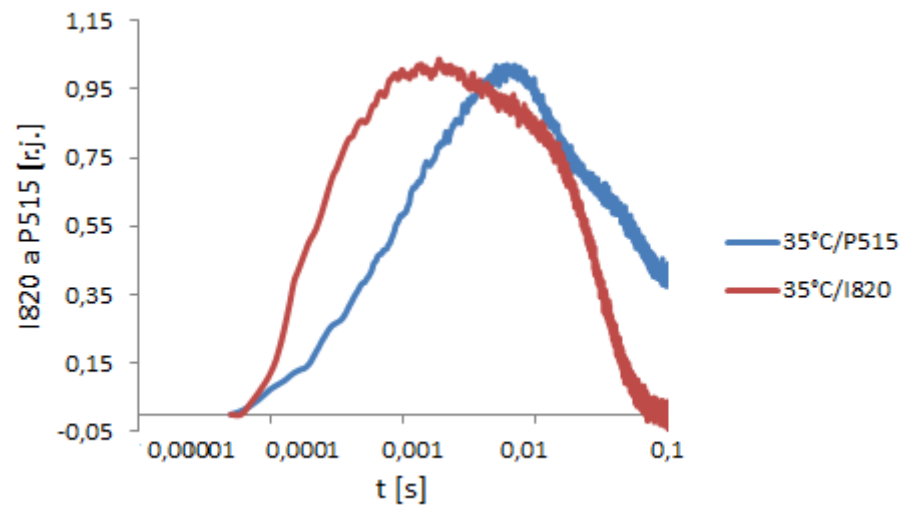
nahromadenia $P700^+$ v PSI a tvorba $\Delta\Psi$ na TM. Postupným zvyšovaním sa pri intenzite $10000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a $15000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ maximá signálov posúvajú ku kratším časom. Posúvaním maxima ku kratším časom a výraznejší sklon pri I820 ukazuje, že zvyšovanie intenzity osvetlenia svetlom z ďalej IČ oblasti vplýva pozitívne na rýchlejšie nahromadenie $P700^+$. Zatiaľ čo pri P515 sa zvýšením intenzity pri 10000 a $15000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nárast krivky skôr spomaľuje a maxima sa posúvajú ku kratším časom pomalšie oproti I820. Najrýchlejší pokles krivky I820 teda redukcia nahromadeného $P700^+$ je pri intenzitách 5000 a $10000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na obr.10 a 11, čo odpovedá aj rýchlejšiemu poklesu pri signáli P515.

6.2 Porovnanie zmien I820 a P515 spôsobené zvyšovaním teploty vzorku

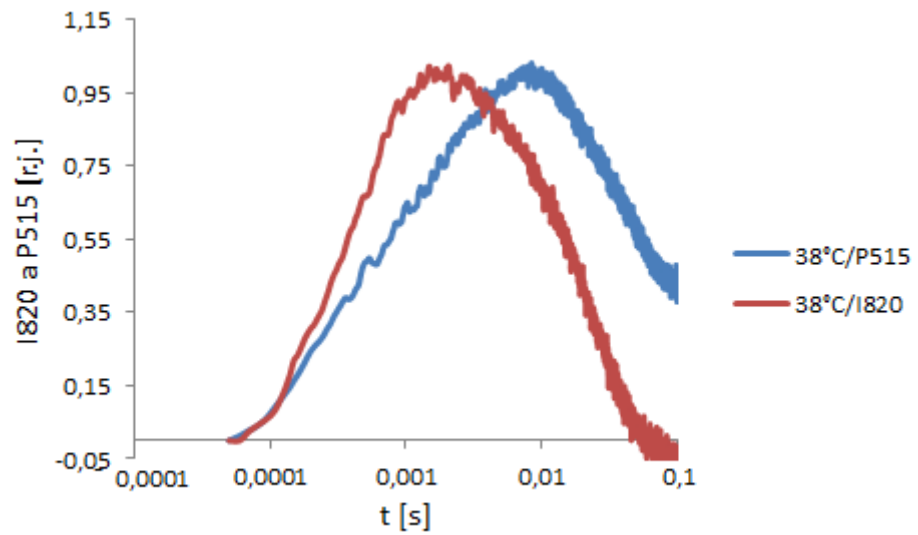
Zmeny I820 a P515 pri stresovaní teplotou na obr.13 až 17 ukazujú súčasne porovnanie vplyvu na obidva signály zvyšovaním teploty pri konštantnom osvetlení intenzitou $3000 \mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$.



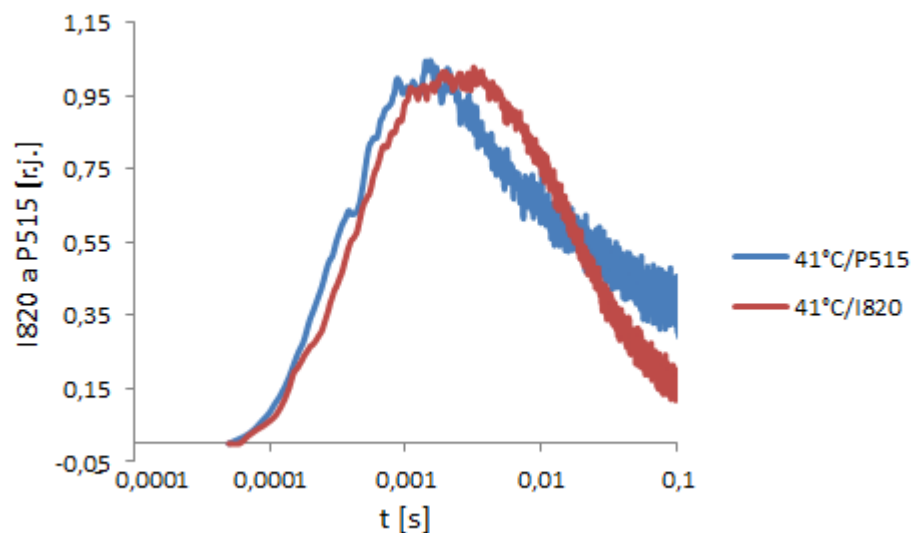
Obr.13: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri izbovej teplote. Dáta z obrázkov 8 a 9.



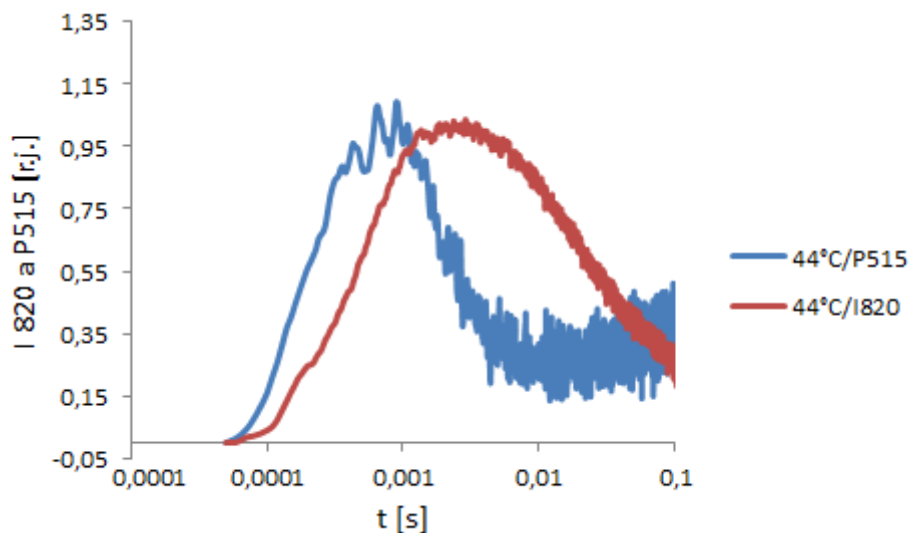
Obr.14: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri teplote 35°C. Dáta z obrázkov 8 a 9.



Obr.15: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri teplote 38°C. Dáta z obrázkov 8 a 9.



Obr.16: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri teplote 41°C. Dáta z obrázkov 8 a 9.



Obr.17: Porovnanie zmien závislosti P515 a I820 pri teplote 44°C. Dáta z obrázkov 8 a 9.

Pri izbovej teplote sa objavuje najskôr medzi 1 ms a 10 ms maximum pre I820 pri osvetlení červeným svetlom a neskôr maximum pre P515 bližšie ku 10 ms po osvetlení modrým aktinickým svetlom ako v predchádzajúcej podkapitole. Zvýšením teploty na 35°C sa posúva maximum pre P515 k dlhším časom na hodnotu 10 ms a I820 ku kratším časom okolo 1 ms. Táto teplota je teda hraničná pri posúvaní maxima I820 ku kratším časom a závisí od rýchlosti nábojovej separácie, ktorá je najrýchlejšia práve pri tejto teplote. Zatiaľ čo u P515 je hraničná vyššia teplota 38°C, pri ktorej je najpomalší nárast krivky a maximum sa posúva k najdlhším časom 10 ms. Porovnaním celého merania je vidieť, že pri teplote 41°C sa priebehy oboch signálov najviac prekrývajú čo

je súčasne sklon a nárast maxima, zároveň je to teplota s výrazným posunom P515 k nižším časom 1 ms. Od teploty 38°C až po 44°C ako je vidieť na obrázkoch je odozva oboch signálov na vyššie teploty úplne opačná zatiaľ čo pre P515 je posun maxima k nižším časom a nárast maxima je oveľa rýchlejší ako pri nižších teplotách, pri I820 sa maximum posúva k vyšším časom stále bližšie k 10 ms a nárast maxima sa už výrazne nemení. S nárastom sa mení aj čas vymiznutia maxima, kde pre P515 po teplotu 38°C opisuje inhibíciu ATPsyntázy.

Práce pre zistené závislosti signálu P515 pri zmene intenzít a teploty nie sú publikované a ani pre teplotnú závislosť P515. Kvalitatívne podobné výsledky pre teplotnú závislosť I820 boli porovnané s prácou podľa Oukarrouma a kol. 2013, kde publikujú záver že z nárastu a poklesu kriviek I820 pri teplotnom strese pracuje rýchlejšie prenos elektrónov z PSII na PQ, cyt b_6/f cez Pc až na akceptor PSI ako prenos elektrónov z $P700^+$ až na akceptor Fd. V tejto práci však použili iný druh rastlín Arabidopsis a inú dobu teplotného stresu a to len 40 s zatiaľ čo my sme vystavili rastliny stresu po dobu 5 minút pre každú teplotu vo vyhriatej vode.

6.3 Zhrnutie porovnaní I820 a P515

Súvislosť medzi I820 a P515 je pri zmenách intenzít vidieť pri nižších intenzitách 3000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$, na základe veľmi podobnej rýchlosti výskytu maxima. Pri nižších intenzitách pozorujeme aj výskyt maxim v podobnom čase medzi 1 ms a 10 ms. Ďalej za rovnaký znak považujeme, že pri zvyšovaní intenzít sa posúvajú maximá ku kratším časom čím je intenzita osvetlenia vyššia. Súvislosť medzi sebou je určite daná aj tým, ako všetky elektrogénne procesy v TM na seba nadväzujú. Limitácia pre P515 predstavuje intenzita 5000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ s najrýchlejším výskytom maxima. Limitovaný je OEC, pomocou ktorého sa rozkladajú molekuly vody a z rozkladu sú protóny H^+ použité na tvorbu $\Delta\Psi$ a elektróny sa cez S-stavy v mangánovom klastri dostávajú k akceptorom v PSII. Ďalším pokračovaním popisuje signál I820 presun elektrónov cez PQ, PQ-pool, cyt b_6/f komplex a Pc až na PSI a limitácia I820 je pomocou Pc na ktorý poskytuje elektróny OEC cez PSII. I820 pri hodnote 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ má najrýchlejší vznik maxima, čo hovorí o priamej závislosti I820 na intenzite osvetlenia čo pri P515 neplatí. Na priebeh kriviek však vplývajú aj iné faktory ako napríklad pri P515 je to vyrovnávanie náboja protónov K^+ a Ca^{2+} zo strómatu do luménu a pre ión Cl^- je to opačne z luménu do strómatu.

Pri porovnávaní I820 a P515 v závislosti od teploty pri konštantnom osvetlení 3000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ majú krivky podobnejšie priebehy ako pri zmene osvetlenia. Pri izbovej teplote je nárast a výskyt maxima veľmi podobný. I820 pri teplote 35°C má nárast krivky najrýchlejší oproti ostatným teplotám, zatiaľ čo pre P515 je hraničná teplota 38°C, pri ktorej sa maximum vyskytuje najpomalšie. Pri stresovaní teplotou sa krivky I820 a P515 správajú odlišne pri posúvaní a výskyte maxím. Pri teplote 41°C majú skoro totožný výskyt maxima za 1 ms. Ako bolo opisované pre P515 k závislosti tvorby $\Delta\Psi$ sa pri vyšších teplotách 41°C a 42°C odráža aj spomalenie výmeny protónov K^+ , Ca^{2+} a Cl^- a tiež limitácia OEC a rýchlejšia tvorba ATP. Pre I820 opisujúci CET sa úmerne so zvyšujúcou teplotou posúvajú krivky k dlhším časom oproti P515. Cyklus CET teda opisuje prenos elektrónov pomocou mobilného prenášača Fd späť na komplex cyt b_6/f . Toto odlišné správanie poukazuje na to, že teploty 41°C a 44°C sú už príliš vysoké pre P515 a skôr dochádza ku spomaleniu procesov ako k pozitívnym vplyvom teploty, proti I820 ktorý sa pri posledných troch teplotách už výrazne nemení.

7 Záver

Cieľom bakalárskej práce bolo preskúmanie elektrogénnych procesov vo fotosystéme I a porovnávanie súvislosti s tvorbou napätia na membráne v chloroplastoch rastlinných vzoriek *Arabidopsis*. Základom bolo premerať zmenu redoxného stavu fotosystému I a napätie na membráne v prvom prípade pri konštantnej izbovej teplote a postupným zvyšovaním intenzity od 3000, 5000, 10000 až do 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ďalším krokom bola zmena stresu, kde pri stálom osvetlení sa vzorky rastlín vkladali do vyhriatej vody postupne od 35, 38, 41 a 44°C. Pozorované boli zmeny v rýchlosti výskytu a náraste maxima po ožiarení stresovaných vzoriek modrým a červeným aktinickým svetlom. Zmerané maximá sa v diskusii pre jednotlivé podmienky pri oboch signáloch porovnali navzájom.

Keďže merané závislosti neboli doteraz ešte publikované bol tiež jeden z cieľov doplniť, priblížiť a zostaviť predpoklady pre tieto procesy vo vyšších rastlinách pri stresovaní teplotou a osvetlením. Pre ďalšie a väčšie priblíženie procesov by bolo vhodnejšie napríklad zvoliť menšie kroky pri teplotnom strese.

8 Zoznam literatúry

- Anusevičius Ž., Martínez-Júlvez M., Genzor C.G., Nivinskas H., Gómez-Moreno C., Čenas N. (1997) Electron transfer reactions of Anabaena PCC 7119 ferredoxin: NADP⁺ reductase with nonphysiological oxidants. *Biochimica et biophysica acta-bioenergetics* **1320**: 247-255.
- Barber J. (2006) Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochemical society transactions*, **34**: 619-631.
- Boudreaux B., MacMillan F., Teutloff Ch., Agalarov R., Gu F., Grimaldi S., Bittl S., Brettel K., Redding K. (2001) Mutations in both sides of the photosystem I reaction center identify the phylloquinone observed by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *The journal of biological chemistry* **276**, 37299-37306.
- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones L.R. (2015) *Biochemistry and molecular biology of plants* 2. vydanie, Wiley Blackwell, USA, 1264 strán.
- Erden F.J.V., Melo M.N., Frederix P.W.J.M., Periole X., Marrink S.J. (2017) Exchange pathways of plastoquinone and plastoquinol in the photosystem II complex. *Nature communications*, **8**: 15214.
- Fernández-Velasco J.G., Jamshidi A., Gong X.S., Zhou J., Veng R.Y. (2001) Photosynthetic electron transfer through the cytochrome b₆f complex can bypass cytochrome f. *Journal of biological chemistry* **276**, 30598-30607.
- Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature structural and molecular biology* **16**, 334-342.
- Ishikita H., Knapp E.W. (2003) Redox potential of quinones in both electron transfer branches of photosystem I. *Journal of biological chemistry* **278**, 52002-52011.
- Iyanagi T., Makino N., Mason H.S. (1974) Redox Properties of the Reduced Nicotinamide Adenine-Dinucleotide Phosphate-Cytochrome P-450 and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Cytochrome b₅Reductases. *Biochemistry* **13**, 1701-1710.
- Kubota-Kawai H., Mutoh R., Shinmura K., Sétif P., Nowaczky M.M., Rogner M., Ikegami T., Tanaka H., Kurisu G. (2018) X-ray structure of an asymmetrical trimeric ferredoxin–photosystem I complex. *Nature plants* **4**, 218-224.
- Kumar J., Singh V.P., Prasad S.M. (2018) An investigation on involvement of the ascorbate-glutathione cycle in modulating NaCl toxicity in two cyanobacteria photoacclimatized to different photosynthetic active radiation. *Algal research-biomass biofuels and bioproducts* **32**, 70-78.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Leakey, A.D., Nosberger, J. and Ort, D.R. (2006) Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science*, **312**, 1918–1921.
- Lyu H., Lazár D. (2017) Modeling the light-induced electric potential difference ($\Delta\Psi$), the pH difference (ΔpH) and the proton motive force across the thylakoid membrane in C₃ leaves. *Journal of theoretical biology*, **413**, 11-23.
- Oukarroum A., Goltsev V., Strasser R.J., (2013) Temperature Effects on Pea Plants Probed by Simultaneous Measurements of the Kinetics of Prompt Fluorescence, Delayed Fluorescence and Modulated 820 nm Reflection. *Plos one*, **8**, 2013.

- Petrie S., Stranger R., Pace R.J. (2017) What Mn K β spectroscopy reveals concerning the oxidation states of the Mn cluster in photosystem II. *Physical chemistry chemical physics*, **19**, 27682-27693.
- Saito K., Rutherford A.W., Ishikita H. (2013) Mechanism of tyrosine D oxidation in photosystem II. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, **110**: 7690-7695.
- Seelert H., Dencher A.N., Müller D.J. (2003) Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *Journal of molecular biology* **333**, 337-344.
- Shealev I.V., Gostev F.E., Vishnev M.I., Shkuropatov A.Y., Ptushenko V.V., Mamedov M.D., Sarkisov O.M., Nadtochenko V.A., Semenov A.Y., Shuvalov V.A. (2011) P₆₈₀ (P_{D1} P_{D2}) and Chl_{D1} as alternative electron donors in photosystem II core complex and isolated reaction centers. *Journal of photochemistry and photobiology B-Biology* **104**, 44-50.
- Shukov V., Surova L., Morozova E., Sherstneva O., Vodeneev V. (2016) Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential. *Frontiers in plant science*, **7**: 1092.
- Taiz L., Zeiger E. (2006) *Plant physiology*. 4. vydanie, Sinauer Associates, USA, 700 strán.
- Vollmer M., Thomsen N., Wiek S., Seeber F. (2001) Apicomplexan parasites possess distinct nuclear-encoded, but apicoplast-localized, plant-type ferredoxin-NADP(+) reductase and ferredoxin. *Journal of biological chemistry* **276**, 5483-5490.

9 Prehľad internetových zdrojov

- [1] O škole – Učivá – Ekológia – Fotosyntéza I. o škole - [online]. [27.7.2018] Dostupné z: http://www.oskole.sk/?id_cat=16&clanok=16503
- [2] Aktywny transport protonów napędzany reakcjami redoksoowymi łańcucha oddechowego, czyli formowanie gradientu H⁺ Przestrzeń międzybłonowa Fumaran Bursztynian *SlidePlayer - Załaduj i podziel się Twoimi PowerPoint prezentacjami* [online] [27.7.2018] Dostupné z: <https://slideplayer.pl/slide/59976/>
- [3] Arabidopsis, the darling of plant science | Blooming Plants. Blooming plants | *Think plants are boring? Think again!* [online]. [27.7.2018] Dostupné z: <https://bloomingplants.wordpress.com/2014/07/04/arabidopsis/>
- [4] Katedra biofyziky | Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. 303 *See Other* [online]. [27.7.2018] Dostupné z: <http://biofyzika.upol.cz/cs/katedra-biofyziky-vybaveni-a-sluzby>

Errata:

Na str.1:

Nesprávne znenie: „Podľa použitého osvetlenia a dĺžky merania sa v tejto bakalárskej práci študujú dva signály charakteristické absorpciou svetla v modrej a ďalekej infračervenej oblasti spektra.“

Správne znenie: „Podľa použitého osvetlenia a vlnovej dĺžky merania sa v tejto bakalárskej práci študujú dva signály charakteristické absorpciou svetla v zelenej a ďalekej infračervenej oblasti spektra.“

Na str.3:

Nesprávne znenie: „Prenos tejto energie pracuje na základe fyzikálneho mechanizmu nazývaného ako fluorescenčná rezonancia (FRET-Fluorescence resonance energy transfer).“

Správne znenie: „Prenos tejto energie pracuje na základe fyzikálneho mechanizmu nazývaného ako Försterův rezonančný prenos (FRET - Förster resonance energy transfer).“

Na str.3:

Neprávné znenie: „Okrem najznámejšieho chlorofylu a rastliny obsahujú aj chlorofyl b a karotenoidy, ktoré nie sú schopné absorbovať PAR žiarenie.“

Správne znenie: „Okrem najznámejšieho chlorofylu a rastliny obsahujú aj chlorofyl b a karotenoidy.“

Na str.5:

Nesprávne znenie: Oxidovaný chlorofyl sa spätne redukuje vodou v prípade PSII a plastocyanínom v prípade PSI.

Správne znenie: Oxidovaný chlorofyl sa spätne redukuje elektrónmi z vody v prípade PSII a plastocyanínom v prípade PSI.

Na str.8:

Nesprávne znenie: „Pod pojmom P680 chápeme klaster štyroch chlorofylov (heterodimér P680, Chl_{D1}, Chl_{D2}).“

Správne znenie: „Pod pojmom primárny donor elektrónov v PSII chápeme klaster štyroch chlorofylov (heterodimér P680, Chl_{D1}, Chl_{D2}).“

Na str.8:

Nesprávne znenie: „Prenosom elektrónu na Q_A prebehne redukcia a vznikne plastosemichinón Q_A^- a tento elektrón sa potom preniesie na nasledujúci akceptor Q_B , čím sa získa semichinón Q_B^- . a súčasne stratou elektrónu sa Q_A^- vráti na stav Q_A .“

Správne znenie: „Prenosom elektrónu na Q_A prebehne redukcia a vznikne plastosemichinón Q_A^- a tento elektrón sa potom preniesie na nasledujúci akceptor Q_B , čím sa získa plastosemichinón Q_B^- . a súčasne stratou elektrónu sa Q_A^- vráti na stav Q_A .“

Na str.9:

Nesprávne znenie: „V komplexe sú monoméry obsahujúce jadro štyroch prenášačov elektrónov, vysokopotenciálny hém *f* na cytochróm *f*, časť označovanú ako cytochróm *b₆* a vysoko potenciálny Rieskeho proteín Fe-S umiestený medzi cytochrómami *f* a *b₆*.

Správne znenie: „V komplexe sú monoméry obsahujúce jadro štyroch prenášačov elektrónov, vysokopotenciálny hém *f* na cytochróm *f*, časť označovanú ako cytochróm *b₆* a vysoko potenciálny Rieskeho Fe-S centrum umiestené medzi cytochrómami *f* a *b₆*.

Na str.10:

Nesprávne znenie: „Podobne ako v prípade PSII, neexistuje presná zhoda o primárnom donore elektrónov v PSI, preto sa za primárny donor všeobecne označuje klaster štyroch chlorofylov (P700, Chl_A a Chl_B).

Správne znenie: „Podobne ako v prípade PSII, neexistuje presná zhoda o primárnom donore elektrónov v PSI, preto sa za primárny donor elektrónov v PSI všeobecne označuje klaster štyroch chlorofylov (P700, Chl_A a Chl_B).

Na str. 11:

Nesprávne znenie: „Energia uložená pri prenose elektrónov riadeného svetlom, ktoré vedú k oxidácii vody a k redukcii ferredoxínu a NADPH.

Správne znenie: „Energia uložená pri prenose elektrónov riadeného svetlom vedú k oxidácii vody a k redukcii ferredoxínu a NADPH.

Na str.11:

Nesprávne znenie: „Enzým CF₀-CF₁ využívajúci energiu uloženú v protónovom elektrochemickom potenciáli pre tvorbu molekúl ATP pomocou schopnosti hydrolizovať ATP.

Správne znenie: „Enzým CF₀-CF₁ využívajúci energiu uloženú v protónovom elektrochemickom potenciáli pre tvorbu molekúl ATP.

Na str.11:

Nesprávne znenie: „Prechodom cez Thylakoidnú membránu pri svetle sa vytvára už spomínaná pmf a aktivuje ATP syntázu a aktivuje nadbytočnú enzým štiepiacu ATP.

Správne znenie: „Prechodom cez TM pri svetle sa vytvára už spomínaná pmf a aktivuje ATP syntázu.

Na str.12:

Nesprávne znenie: „Podjednotka γ sa účastní regulačného mechanizmu sprostredkovaného ferredoxín/thoredoxínovým systémom, ktorý aktivuje ATP syntázu vo svetle a pri nízkej hodnote pmf.

Správne znenie: „Podjednotka γ sa účastní regulačného mechanizmu sprostredkovaného ferredoxín/thoredoxínovým systémom, ktorý aktivuje ATP syntázu vo svetle.

Na str: 12

Nesprávne znenie:

Správne znenie: „Podjednotka γ sa účastní regulačného mechanizmu sprostredkovaného ferredoxín/thoredoxínovým systémom, ktorý aktivuje ATP syntázu vo svetle.“

Na str.13:

Nesprávne znenie: „Okrem vyššie uvedeného lineárneho transportu elektrónov (LET) model obsahuje aj transport cyklických elektrónov (CET), kde elektrón prechádza z Fd na vysokopotenciálny heme (b_H) cytb₆/f. Jeden z možných typov CET je znázornený na obr. 2“

Správne znenie: „Okrem vyššie uvedeného lineárneho transportu elektrónov (LET) model obsahuje aj cyklický transport elektrónov (CET), kde elektrón prechádza z Fd na vysokopotenciálny heme (b_H) cytb₆/f. Jeden z možných typov CET je znázornený na obr. 2.“

Na str.13:

Nesprávne znenie: „ATP–syntetizuje pmf pohybom protónov cez CF_0 a vznik ATP z ADP a Pi cez CF_1 . Prechodom protónov do strómy je spojený aj vznik NADPH a glyceraldehydu-3-fosfát z 2,3-bisfosfoglycerovej kyseliny v C-B cykle.“

Správne znenie: „ATP–syntetázy znižuje pmf pohybom protónov cez CF_0 za vzniku ATP z ADP a Pi na CF_1 . Prechodom protónov do strómy je spojený aj vznik NADPH a glyceraldehydu-3-fosfát z 2,3-bisfosfoglycerovej kyseliny v C-B cykle.“

Na str.13:

Nesprávne znenie: „Ďalšie ióny, ktoré sa tu objavujú sú fosfáty (Pi), ktoré majú svoju dôležitú úlohu už pri opisovanej tvorbe ATP alebo naopak sa uvoľňujú pri procese defosforylácie čo je opačný proces rozklad ATP.“

Správne znenie: „Ďalšie ióny, ktoré sa tu objavujú sú fosfáty (Pi), ktoré majú svoju dôležitú úlohu už pri opisovanej tvorbe ATP alebo naopak sa uvoľňujú pri procese defosforylácie čo je proces rozkladu ATP.“

Na str. 13:

Nesprávne znenie: „Okrem vyššie uvedeného lineárneho transportu elektrónov (LET) model obsahuje aj transport cyklických elektrónov (CET), kde elektrón prechádza z Fd na vysoký potenciálny heme (b_H) cytb₆/f.“

Správne znenie: „Okrem vyššie uvedeného lineárneho transportu elektrónov (LET) model obsahuje aj cyklický transport elektrónov (CET), kde elektrón prechádza z Fd na vysokopotenciálny heme (b_H) cytb₆/f.“

Na str.13:

Nesprávne znenie: „ATP–syntetizuje pmf pohybom protónov cez CF_0 a vznik ATP z ADP a Pi cez CF_1 .“

Správne znenie: „ATP–syntetázy snižuje pmf pohybom protónov cez CF_0 za vzniku ATP z ADP a Pi na CF_1 .“

Na str. 14:

Nesprávne znenie: „Na signál P515 má vplyv rozptyl neelektrochromická absorbanca, najmä pri nepretržitom osvetlení, čo znamená že sa meria pri dlhších časoch.“

Správne znenie: „Na signál P515 má vplyv neelektrochromická absorbanca, najmä pri nepretržitom osvetlení, čo znamená že sa meria pri dlhších časoch.“

Na str.19:

Nepravne znenie: „Časové priebehy signálu I820, ktoré odrážajú najmä množstvo $P700^+$, meraného pri pokojovej teplote v závislosti na intenzite použitého osvetlenia vzorku v rozmedzí 3000 až 15000 $\mu\text{mol fotónu m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sú uvedené na obr. 6.“

Správne znenie: „Časové priebehy signálu I820, ktoré odrážajú najmä množstvo $P700^+$, meraného pri pokojovej teplote v závislosti na intenzite použitého osvetlenia vzorku v rozmedzí 3000 až 15000 $\mu\text{mol fotónu m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sú uvedené na obr. 6.“

Na str.19:

Nesprávne znenie: „Obr.6: Časový priebeh I820v závislosti na intenzite osvetlenia od 1000 do 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Merané pri pokojovej teplote a každá krivka predstavuje priemer z 3 meraní.“

Správne znenie: „Obr.6: Časový priebeh I820v závislosti na intenzite osvetlenia od 3000 do 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Merané pri pokojovej teplote a každá krivka predstavuje priemer z 3 meraní.“

Na str. 20:

Nesprávne znenie: „Pre meranie boli použité jednoročné rastliny druhu Arabidopsis, divokého typu ako je na obr. 4.“

Správne znenie: „Pre meranie boli použité rastliny druhu Arabidopsis, divokého typu ako je na obr. 4.“

Na str. 20:

Nesprávne znenie: „Rastliny boli umiestnené a pestované vo fytokomore firmy Photon Systems Instruments, kde boli vystavené intenzite umelého slnečného žiarenia 100 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po za konštantných podmienok 16 hodín tma a 8 hodín svetlo.“

Správne znenie: „Rastliny boli umiestnené a pestované vo fytokomore firmy Photon Systems Instruments, kde boli vystavené intenzite umelého slnečného žiarenia 100 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ za konštantných podmienok 16 hodín tma a 8 hodín svetlo.“

Na str.22:

Nesprávne znenie: „Zatiaľ čo veľkosť maxima P515 pre intenzituy 3000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ je menšia ako pre vyššie intenzity, pre intenzity osvetlenia 5000, 10000 a 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ je táto veľkosť väčšia, ale približne rovnaká v rámci týchto 3 intenzít.“

Správne znenie: „Zatiaľ čo veľkosť maxima P515 pre intenzituy 3000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ je menšia ako pre vyššie intenzity, pre intenzity osvetlenia 5000, 10000 a 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ je táto veľkosť väčšia, ale približne rovnaká v rámci týchto 3 intenzít.“

Na str.22:

Nesprávne znenie: „Toto môže mať za následok vznik novej rýchlej kinetiky pri redukcii P700⁺.“

Správne znenie: „Toto môže mať za následok vznik novej rýchlej kinetiky pri redukcii P700⁺ ako bolo spomínané v predchádzajúcej kapitole.“

Na str.23:

Nesprávne znenie: „Časové priebehy signálov P515, pri zvolenej intenzite excitačného osvetlenia, v závislosti na teplote vzorku po inkubácii vzorku po dobe 5 minút vo vodnej pri danej teplote sú zobrazené na obrázku 9.“

Správne znenie: „Časové priebehy signálov P515, pri zvolenej intenzite excitačného osvetlenia, v závislosti na teplote vzorku po inkubácii vzorku po dobe 5 minút vo vodnej lázni pri danej teplote sú zobrazené na obrázku 9.“

Na str. 24:

Nesprávne znenie: „Pretože rýchlosť poklesu signálu P515 za jeho maximom je do teploty 38°C približne stále rovnaká, čiže rozptylenie počiatočného 38°C pomocou toku príslušných iónov je stále rovnaké.“

Správne znenie: „Pretože počiatočná rýchlosť poklesu signálu P515 za jeho maximom je do teploty 38°C približne stále rovnaká, rozptylenie počiatočného 38°C pomocou toku príslušných iónov je stále rovnaké.“

Na str. 27:

Nesprávne znenie: „Posúvaním maxima ku kratším časom a výraznejší sklon pri I820 ukazuje, že zvyšovanie intenzity osvetlenia svetlom z ďalekej IČ oblastivplyva pozitívne na rýchlejšie nahromadenie P700⁺.“

Správne znenie: „Posúvaním maxima ku kratším časom a väčší sklon pri I820 ukazuje, že zvyšovanie intenzity osvetlenia vplyva pozitívne na rýchlejšie nahromadenie P700⁺.“

Na str. 27:

Nesprávne znenie: Zatiaľ čo pri P515 sa zvýšením intenzity pri 10000 a 15000 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sa nárast krivky skôr spomaľuje a nárast maxima sa posúvajú ku kratším časom, pomalšie oproti I820.

Správne znenie: „Podobne pri P515 sa zvýšením intenzity pri 10000 a 15000 μmol fotónov $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sa maxima posúvajú ku kratším časom, ale pomalšie oproti I820.“

Na str. 29:

Nesprávne znenie: „Pri izbovej teplote sa objavuje najskôr medzi 1 ms a 10 ms maximum pre I820 pri osvetlení červeným svetlom a neskôr maximum pre P515 bližšie ku 10 ms po osvetlení modrým aktinickým svetlom ako v predchádzajúcej podkapitole.“

Správne znenie: „Pri izbovej teplote sa objavuje najskôr medzi 1 ms a 10 ms maximum pre I820 a neskôr maximum pre P515 bližšie ku 10 ms ako v predchádzajúcej podkapitole.“

Na str. 31:

Nesprávne znenie: „Ako bolo opisované pre P515 k závislosti tvorby $\Delta\Psi$ sa pri vyšších teplotách 41°C a 42°C odráža aj spomalenie výmeny protónov K^+ , Ca^{2+} a Cl^- a tiež limitácia OEC a rýchlejšia tvorba ATP.“

Správne znenie: „Ako bolo opisované pre P515 k závislosti tvorby $\Delta\Psi$ sa pri vyšších teplotách 41°C a 44°C odráža aj spomalenie výmeny protónov K^+ , Ca^{2+} a Cl^- a tiež limitácia OEC a rýchlejšia tvorba ATP.“

Na str.32:

Nesprávne znenie: „Pozorované boli zmeny v rýchlosti výskytu a náraste maxima po ožiarení stresovaných vzoriek modrým a červeným aktinickým svetlom.“

Správne znenie: „Pozorované boli zmeny v rýchlosti výskytu a náraste maxima po ožiarení vzoriek aktinickým svetlom.“

Plastocyanín - „plastocyanín“

Feofytín D₁ – „feofytín D₁“

Feofytín D₂ – „feofytín D₂“

Protón motorická sila – „protón motorická sila“

Plastochinón – „plastochinón“

Plastosemichinón – „plastosemichinón“

Proteínová jednotka A fotosystému I – „proteínová jednotka A fotosystému I“

Proteínová jednotka B fotosystému I – „proteínová jednotka B fotosystému I“

Proteínová jednotka C fotosystému I – „proteínová jednotka C fotosystému I“

semichinón - „plastosemichinón“

Ferredoxín – „ferredoxín“

Prenos energie fluorescenčnou rezonanciou – „*Försterův rezonančný prenos energie*“
thylakoidnou- „*tylakoidnou*“
vzorkov – „*vzoriek*“
adenosín - „*adenozín*“
vyvíjajúci - „*vyvíjajúci*“
tylakodíná – „*tylakoidná*“
fotosyntézaje – „*fotosyntéze je*“
chrakteristické - „*charakteristické*“
lumén, - „*lumen*“
prokaryotných fototrófov - „*prokaryotných fototrófov*“
nahradené fykobilizómy – „*nahradené fykobilizómami*“
svetleozbernej, - „*svetlozbernej*“
požije – „*použije*“
Clavin-Bensonov cyklus – „*Calvin-Bensonov cyklus*“
aniónv – „*aniónov*“
primárneho – „*primárneho*“
na svetle sa musia najprv zaktívniť - „*na svetle sa musia najprv aktivovať*“.
symtericky – „*symetricky*“
Oxydizing – „*oxidizing*“
cyklus S-stavou - „*cyklus S-stavov*“
protetická skupina - „*prostetická skupina*“
elektrostatickej interakcie – „*elektrostatickej interakcii*“

CF₀-CF₁-CF_o (čiže nie 0 ale O, index O naznačuje inhibíciu ATPsyntázy oligomycínom)

potenciáli – „*potenciály*“

vo svetle – „*na svetle*“

nížej – „*nízkej*“

heme – „*hém*“

2,3-bisfosfoglycerovej – „*1,3-bisfosfoglycerovej*“

defosforylácia, - „*defosforylácie*“

Arabidopsis (latinský názov v kurzíve) – „*Arabidopsis*“

pokojuva teplota – „*izbová teplota*“

s vlnovú dlzku - „*s vlnovou dlzkou*“

asove - „*asove*“

pribehy - „*pribehy*“

zavislosti – „*závislosti*“

signáli – „*signály*“

odpovedá – „*zodpovedá*“

inenzite - „*intenzite*“

eliminuji – „*eliminujú*“

redukcií - „*redukcií*“

lumnenu – „*lumenu*“

ktoreje – „*ktoré je*“

teplotych,- „*teplotách*“

pravdepodobne – „*pravdepodobne*“