

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

VLIV AKLIMAČNÍ OZÁŘENOSTI NA ORGANIZACI PIGMENT-PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ THYLAKOIDNÍ MEMBRÁNY SMRKU ZTEPILÉHO

Kateřina Pečinková

Moravskoslezský kraj

Metylovice 2017

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Vliv aklimační ozáření na organizaci pigment-proteinových komplexů thylakoidní membrány smrku ztepilého

Effects of acclimation light intensity on organization of pigment-protein complexes in thylakoid membrane of Norway spruce

Autor: Kateřina Pečínková
Škola: Gymnázium Frýdlant nad Ostravicí
náměstí T. G. Masaryka 1260
739 11 Frýdlant nad Ostravicí

Lektor: Mgr. Václav Karlický
Katedra fyziky
Přírodovědecká fakulta
Ostravská univerzita
30. dubna 22
701 03 Ostrava 1

Metýlovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Metylovicích dne 20. 3. 2017

Podpis

Poděkování

Největší poděkování patří Mgr. Václavu Karlickému za pomoc při korektuře práce a čas, který mi věnoval při objasňování dané problematiky, díky čemuž mě vypracování této práce velice bavilo. Také děkuji vůbec za možnost pracovat v laboratoři a poskytnutý materiál.

Dále děkuji i Mgr. Lukáši Bjolkovi, který mě k této práci přivedl.

ABSTRAKT

Smrk ztepilý (*Picea abies*) je nahosemenná rostlina z čeledi borovicovitých (*Pinaceae*). Nedávno bylo zjištěno, že tato čeleď postrádá některé světlosběrné komplexy fotosystému II (PSII)(LHCII) a to proteiny Lhcb6 a Lhcb3, které byly považovány za typické pro všechny suchozemské rostliny. Z tohoto důvodu se liší struktura PSII-LHCII superkomplexů v thylakoidní membráně smrku. Rostliny jsou vystaveny neustále se měnícím environmentálním podmínkám. Jedním z těchto faktorů, které ovlivňují účinnost fotosyntézy a způsobují poškození zejména PSII, je nedostatek nebo naopak přebytek dopadající sluneční radiace. Fotosyntetické reakce jsou doprovázeny vznikem potenciálně škodlivých reaktivních forem kyslíku, což je umocňováno stresovými podmínkami. Za účelem odstranění nebo zmírnění škod způsobených oxidativním stresem si rostliny vyvinuly různé ochranné mechanismy na rozdílných úrovních organizace rostlin – na úrovni listu, na buněčné úrovni pomocí regulace počtu a pohybů chloroplastů a regulací složení proteinů na úrovni molekulární – a časových škálách – krátkodobé odezvy v řádů sekund až minut a dlouhodobé odezvy (aklimace) v řádů dní až týdnů. Cílem práce je popsání změn v organizaci pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně izolované ze semenáčků smrku aklimovaných na vysokou a nízkou ozářenost. Spektroskopická analýza byla provedena na nerozvolněných a rozvolněných thylakoidních membránách izolovaných ze semenáčků smrku ztepilého aklimovaných na různou ozářenost (nízká, kontrolní a vysoká intenzita o 20, 100 a 800 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, v tomto pořadí). Absorpční, fluorescenční (emisní a excitační) spektra a spektra cirkulárního dichroismu prokázala rozdílnou organizaci pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně rostlin aklimovaných na odlišnou aklimační ozářenost a odlišné množství LHCII, což podporuje i rozdílný poměr obsahu chlorofylu *a* a *b*. U rostlin aklimovaných na vysokou ozářenost dochází k výrazné redukci makro-organizace pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně. U semenáčků aklimovaných na vysokou ozářenost byla pozorována snížená teplotní stabilita makro-organizace pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně, přestože stabilita LHCII v trimerní formě byla naopak větší.

Klíčová slova:

pigment-proteinové komplexy; smrk ztepilý; thylakoidní membrána; aklimační ozářenost; spektroskopie cirkulárního dichroismu; fluorescenční spektroskopie

ABSTRACT

Norway spruce (*Picea abies*) is a gymnosperm of the pine family (*Pinaceae*). Recently, it was found that this family is lacking some of the light-harvesting complexes of photosystem II (PSII)(LHCII) – Lhcb6 and Lhcb3 proteins. These proteins were considered as essential for all land plants. For this reason, the structure of PSII-LHCII supercomplexes in spruce thylakoid membranes is different. Plants are exposed to fluctuating environmental conditions. The deficiency or an excess of incident solar radiance are factors that affect the efficiency of photosynthesis and cause the damage especially of PSII. Photosynthetic reactions are accompanied by formation of reactive oxygen species, which is even enhanced by stress conditions. Plants have evolved protective mechanisms in order to remove or mitigate damages caused by reactive oxygen species. Protective processes take place on different level of plant organization – on a leaf level, on a cellular level by regulation of chloroplast number or chloroplast movements or on a molecular level by regulation of protein composition – and different time scales – short-term responses in order of seconds to minutes and long-term responses (acclimations) in order of days to weeks. The goal of this work is characterization of changes in pigment-protein complex organization in thylakoid membranes isolated from spruce seedlings acclimated to low and high light intensity. Spectroscopic analysis on stacked and unstacked thylakoid membranes isolated from Norway spruce seedlings acclimated to different light intensity (low, normal and high light intensity of values 20, 100 and 800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively) was performed. Absorption, fluorescence (emission and excitation), and circular dichroism spectra revealed different organization of pigment-protein complexes in thylakoid membranes from plants acclimated to different acclimation light intensity and distinct amount of LHCII as also indicated by different chlorophyll *a* and *b* ratio. Plants acclimated to high light intensity are characterized by significant reduction of macro-organization of pigment-protein complexes in thylakoid membranes. In addition, spruce seedlings acclimated to high light intensity revealed reduced thermal stability of macro-organization of pigment-protein complexes in thylakoid membranes although stability of LHCII in trimeric form was, on the contrary, higher.

Key words:

pigment-protein complexes; Norway spruce; thylakoid membrane; acclimation light intensity, circular dichroism spectroscopy; fluorescence spectroscopy

OBSAH

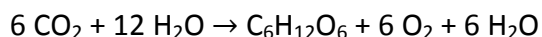
Teoretická část	8
1 Fotosyntéza.....	8
2 Organizace fotosyntetického aparátu	9
2.1 Thylakoidní membrána	9
2.2 Lipidy	10
2.3 Fotosystém I.....	10
2.4 Fotosystém II.....	11
3 Zdroje světelné energie	13
3.1 Fotosyntetické pigmenty	13
3.2 Struktura a organizace světlosběrných komplexů	14
4 Fotoprotektivní mechanismy fotosyntetického aparátu.....	14
4.1 Oxidativní stres	14
4.2 Nefotochemické zhášení.....	15
4.3 VAZ cyklus	17
5 Aklimace fotosyntetického aparátu na nízkou a vysokou ozářenost	18
6 Využití spektroskopických metod ke studiu makroorganizace LHC	20
6.1 Cirkulární dichroismus	20
6.2 Fluorescence.....	21
Experimentální část.....	24
7 Materiály a metody	24
7.1 Rostlinný materiál a aklimace	24
7.2 Metody.....	24
8 Výsledky	26
9 Diskuze	37
10 Závěr	38
Seznam použité literatury	39
Seznam použitých zkratk.....	43
Seznam obrázků	45
Seznam tabulek	46

Teoretická část

1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je důležitým dějem v přírodě. K tomu, aby byly organizmy schopny vykonávat tento děj, potřebují chloroplasty. Tyto plastidy jsou kromě vyšších rostlin obsaženy i v zelených a hnědých řasách, jednobuněčných sinicích, zelených a purpurových bakteriích. Obecně známým produktem fotosyntézy je molekulární kyslík O_2 , ale primární funkcí tohoto děje je přeměna světelné (sluneční) energie na energii chemickou a syntézu organických látek.

Sumární reakce fotosyntézy:

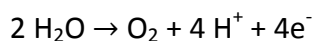


Fotosyntéza má 2 fáze – světelnou a temnostní (Calvinův cyklus).

Průběh světelné fáze, tzv. primárních dějů, je závislý na přítomnosti světla. Světelná energie ve formě fotonů je pohlcena rostlinnými pigmenty a začíná její přeměna na energii chemickou. V eukaryotických buňkách je fotosyntéza lokalizována v chloroplastech, což jsou organely, které mají svou vlastní DNA a 3 typy membrán – vnější, vnitřní a thylakoidní (TM). Tyto membrány vymezují různé prostory - mezi vnitřní a vnější membránou se nachází mezimembránový prostor, vnitřní s thylakoidní oddělují stromu a uvnitř TM je lumen. Vnitřní struktura chloroplastu vypadá tak, že TM vymezují thylakoidy, váčkovité útvary, které jsou uspořádány do sloupcovitých útvarů, gran.

Světlo zachycují fotosyntetické pigmenty, což jsou chlorofyly (Chls) a karotenoidy (Car). Existují různé formy Chls, na fotosyntéze vyšších rostlin se ale podílejí jen dva typy – *a* a *b*. Pouze chlorofyl *a* (Chl *a*) je schopen se oxidovat, tedy měnit světelnou energii na chemickou. Jeho speciální pár je umístěn v reakčním centru fotosystémů, ostatní rostlinné pigmenty jako chlorofyl *b* (Chl *b*) a Car tuto schopnost nemají a jsou nazývány světlosběrné pigmenty. Jejich funkcí je pohlcení energie, kterou postupně vedou k reakčnímu centru (RC) a umožňují oxidaci Chl *a*. Dohromady s proteiny tvoří světlosběrné komplexy, které se nachází v TM.

Poté, co je foton zachycen pomocí světlosběrných antén a jeho energie vedena až do reakčního centra fotosystému II (RC PSII), je z oxidovaného páru chlorofylu P680 (takto označován podle maxima své absorpce) uvolněn elektron, který přebírá primární akceptor. Kladně nabitý chlorofyl získává elektron od primárního donoru a vrací se do neutrálního stavu. Donor přijímá elektron, který byl vyprodukován fotolýzou vody, tedy jejím světelným rozkladem a molekulární kyslík se uvolňuje do ovzduší.



Elektrony se při oxygenní fotosyntéze přemísťují po třech komplexech – fotosystém II (PSII), cytochrom b_6 -f, fotosystém I (PSI). Přenášejí je pohyblivé přenašeče plastochinony (pQ) a plastocyanin (pC). Na PSII se v Q_A místě váže molekula pQ, která je jednoelektronovým akceptorem. Ta přenáší elektron z feofytinu. Z Q_A místa se elektron dostane do místa Q_B , kde se pQ váže již jako dvouelektronový akceptor. Po redukci pQ na pQH_2 se z PSII uvolní a dostává se na cytochrom b_6 -f komplex. Celý tento proces se opakuje. Při oxidaci pQH_2 cytochromem b_6 -f se uvolní dva elektrony. Jeden z elektronů se dostává na Rieskeho centrum a přes další přenašeče na plastocyanin a fotosystém I. Druhý elektron se naváže na PSII. Tento mechanismus se nazývá Q-cyklus. Z PS I se elektrony dostávají na ferredoxin a redukují $NADP^+$ na NADPH. Tento tok elektronů je nazýván lineární. Pokud se elektrony z PSI vrací zpět přes ferredoxin na cytochrom b_6 -f komplex a vážou se v Q_R místě plastochinonu, jedná se o cyklický tok elektronů. Při cyklickém toku elektronů se zvyšuje protonový gradient, který může vést ke zvýšení produkce adenosintrifosfátu (ATP). Naopak NADPH nevzniká, protože elektrony, které jsou potřebné k redukci $NADP^+$ se vrací zpět na cytochrom b_6 -f.

Energii získávají buňky při procesu fotofosforylace. Je zde několik faktorů, které přispívají k protonovému gradientu, kdy se liší koncentrace protonů ve stromatu a lumen. Prvním z nich je fotolýza vody, dále přenos elektronů pomocí plastochinonu a redukce $NADP^+$. To má za následek rozdílné pH na opačných stranách membrány. V rozdílu koncentrací je uložená energie, která se využívá při ATP-syntáze. ATP je vysoce energická látka, která vzniká syntézou (spojením dvou látek) adenosindifosfátu (ADP) a fosfátu (P). Proces je poháněn energií vzniklou přechodem elektronů z lumen do stromatu. Při přechodu do Calvinova cyklu se rozkládá zpět a uvolňuje se energie. (Teplá)

2 Organizace fotosyntetického aparátu

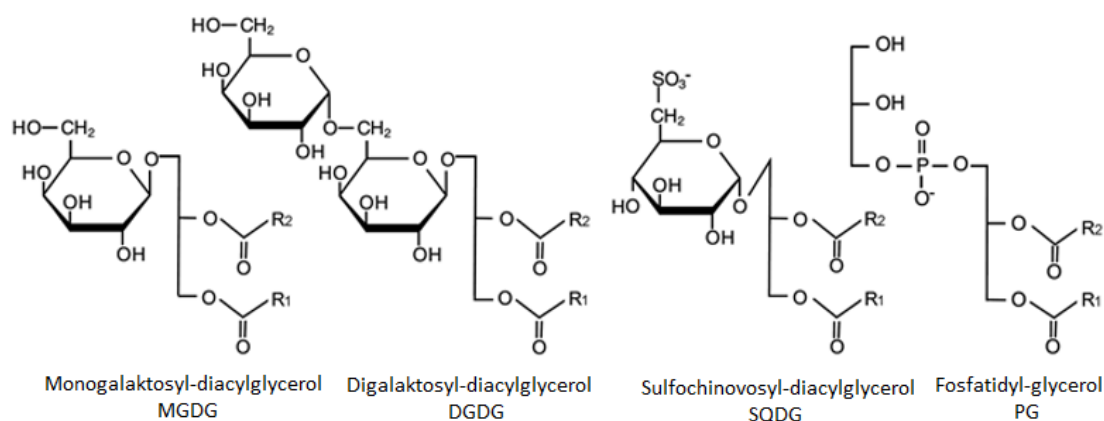
Fotosyntetický aparát je složen z proteinů a proteinových komplexů – PSI se světlosběrnými komplexy LHCI, PS II se světlosběrnými komplexy LHCII, cytochrom b_6 f komplex a ATP-syntáza. (Soukupová, a další, 2003)

2.1 Thylakoidní membrána

TM je lipidová dvojvrstva. Nejvíce zastoupenou lipidovou složkou TM je monogalaktosyl-diacylglycerol (MGDG). Nachází se zde nerovnoměrně rozmístěné proteiny a komplexy proteinů tvořící fotosyntetický aparát. TM vymezuje thylakoidy, které mohou být granální (váčkovité útvary spojeny do sloupců) nebo stromální (volné lamely spojující sloupce gran). Právě v granech je obsažen více PSII s LHCII, zatímco ve stromálních thylakoidech PSI s LHCI a ATP-syntáza. Cytochrom b_6 -f komplex je rovnoměrně rozmístěn mezi obě složky TM. (Dekker, a další, 2005) (Ptáčková, 2016)

2.2 Lipidy

Kromě již zmíněné třídy lipidů monogalaktosyl-diacylglycerolu (MGDG) se v TM nachází i další galaktolipid digalaktosyl-diacylglycerol (DGDG), sulfolipid sulfochinovosyl-diacylglycerol (SQDG) a fosfolipid fosfatidyl-glycerol (PG). Tyto lipidy mají strukturní funkci - vytváří rozhraní s proteinovými komplexy a lipidovou fází. (Garab, a další, 2016) Pro fungování proteinů a komplexů musí lipidy zajistit správné interakce při skládání pigment-proteinových komplexů (PPC), udržet strukturální flexibilitu membrán, která pravděpodobně ovlivňuje odolnost vůči stresu a zajistit nepropustnost zejména pro protony. (Boudiere, 2014) (Mizusawa, a další, 2012) Nejvíce zastoupen je MGDG, který tvoří až 50% lipidové složky. Při spojení s LHCII může tvořit dvouvrstvou strukturu i přesto, že patří do skupiny lipidů, které dvojvrstvu nevytváří. Tato vlastnost je důležitá pro xantofylový cyklus. (Krumova, a další, 2008) Naopak DGDG, tvořící až 30% lipidové složky, SQDG a PG, oba obsaženy 5-12% v lipidové složce, vytváří dvojvrstvu přirozeně. Přítomnost PG hraje důležitou roli v produkci dimeru PSII a PSI komplexů. (Pagliano, a další, 2012) (Kozárová, 2013)



Obr. 1: Struktura glykolipidů v thylakoidní membráně. R1 a R2 znázorňují řetězce mastných kyselin. (převzato z Garab, a další, 2016)

2.3 Fotosystém I

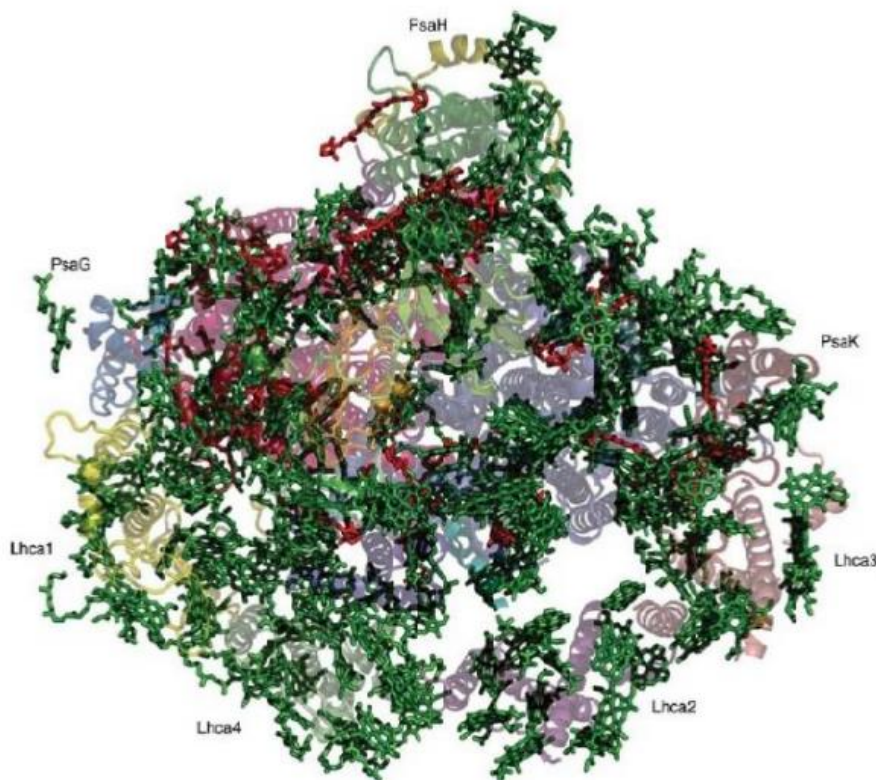
PSI je PPC, který se skládá z monomerního jádra komplexu PSI a světlosběrného komplexu. (Dekker, a další, 2005).

V RC se nachází speciální pár Chl *a*, který absorbuje světlo o maximální vlnové délce 700 nm. Proto se označuje P700. (Nelson, a další, 2006) V RC obecně dochází k separaci náboje.

Jádro PSI je tvořeno dvěma velkými podjednotkami PsaA a PsaB, čtyřmi vnějšími podjednotkami PsaC, PsaD a PsaE vystavenými stromatu a PsaN vystavené lumenu, třemi

vnitřními PsaG, PsaH a PsaO a dalšími menšími podjednotkami. Střed tvoří heterodimer tvořený PsaA a PsaB, jehož anténní část tvoří Chl *a* a Car. (Dekker, a další, 2005)

Světlosběrný komplex obsahuje periferní anténu LHCI (light-harvesting complex of photosystem I), která se skládá z Lhca1, Lhca2, Lhca3 a Lhca4. Tyto proteinové podjednotky mezi sebou vytváří dimery Lhca1-Lhca4 a Lhca2-Lhca3. Vážou na sebe Chl *a* a *b*, β -karoten, lutein a violaxantin. Okolo jádra se vážou ve tvaru půlměsíce.



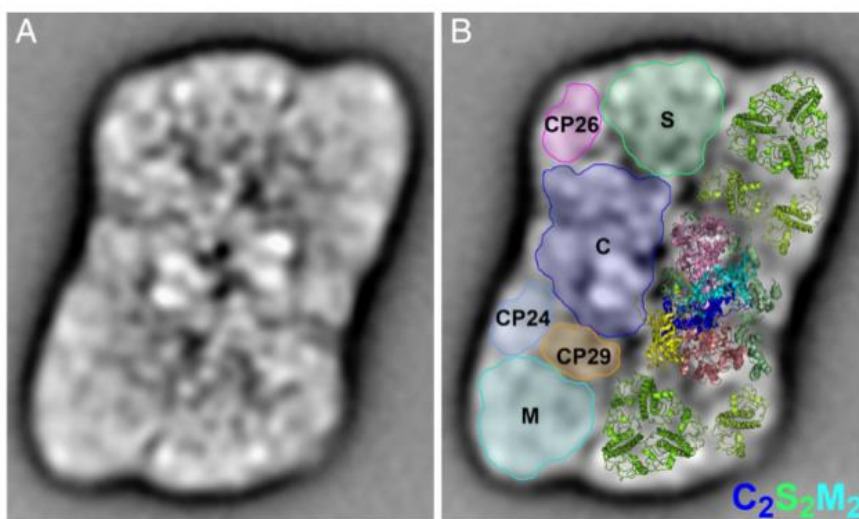
Obr. 2: Pohled ze stromální strany na strukturu PSI. Chlorofyly jsou zobrazeny zeleně, karotenoidy červeně. PsaG, PsaH a PsaK jsou menší podjednotky jádra. Okolo jádra je periferní anténa LHCI, která se skládá z Lhca1-4. Dimery jsou uspořádány v tvaru půlkruhu. (Převzato z Nelson, a další, 2006).

2.4 Fotosystém II

PSII je PPC, který se skládá z dimerního jádra komplexu PSII a světlosběrného komplexu. (Dekker, a další, 2005)

Chlorofyl v RC PSII absorbuje světlo o maximální vlnové délce 680 nm, proto je označován P680. RC PSII a PSI se nacházejí společně u vyšších rostlin. Existují i další, které se podílejí na fotosyntéze v jiných organismech – RC II označené jako P870 a P960 u různých purpurových bakterií, RC I označené jako P800 u zelených sirných bakterií nebo P840 u heliobakterií. (Pavlovič, a další, 2015)

Jádro PSII, přesněji jeho jednu polovinu, tvoří čtyři velké vnitřní podjednotky PsbA, PsbB, PsbC a PsbD, tři vnější podjednotky PsbO, PsbP a PsbQ a další malé podjednotky. (Dekker, a další, 2005) PsbA, označován D1, a PsbD, označován D2, tvoří fotochemické RC obsahující P680. Vážou Chl *a* a feofytin. (Andrizhiyevskaya, a další, 2005) PsbB, označován CP47, a PsbC, označován CP43, jsou jádrové antény, které obklopují D1 a D2. Ty vážou také Chl *a* a β -karoten. Navíc je propojují s anténami LHCI. (Pavlovič, a další, 2015) Dokážou absorbovat světlo, ale také přijmout energii od ostatních antén a vést ji do RC. (Dekker, a další, 2005) Podjednotky PsbE a PsbF společně tvoří cytochrom b_{559} , který by mohl mít fotoprotektivní funkci. (Barber, a další, 1999)



Obr. 3: Strukturní model PSII $C_2S_2M_2$ superkomplexu. (a) Obráz superkomplexu z Arabidopsis thaliana získaný transmisí elektronovou mikroskopií individuálních makromolekul. (b) Strukturní model superkomplexu, kde je znázorněna struktura jádra PSII – podjednotka D1 je zvýrazněna tmavě modrou, D2 tyrkysovou, CP43 lososovou, CP47 růžovou a vnější PsbO žlutou a struktura Lhcb – trimerní LHCI tmavě zelenou, monomerní Lhcb3 světle zelenou. Schematicky je tedy monomer jádra PSII „C“ vyobrazen tmavě modrou barvou, trimery LHCI typu „S“ a „M“ světle zelenou a tyrkysovou, v tomto pořadí, a minoritní antény CP24, CP26 a CP29 světle modrou, růžovou a oranžovou, v tomto pořadí. (Převzato z Kouřil, a další, 2012).

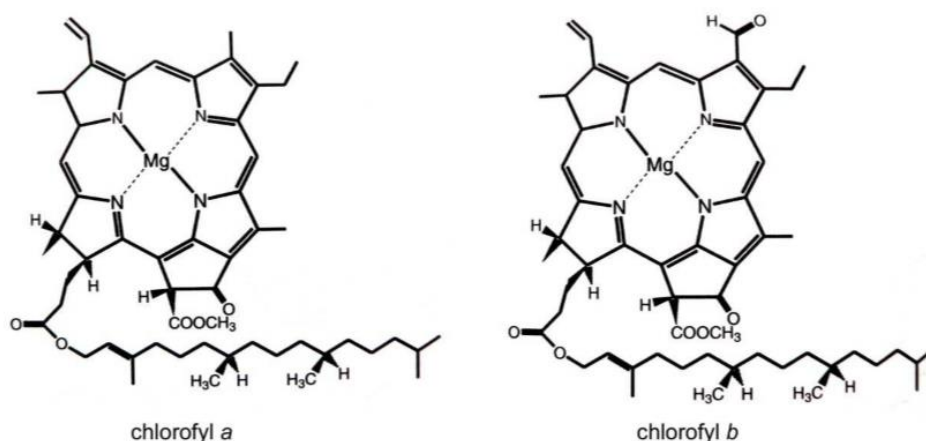
Anténní část LHCI (light-harvesting complex of photosystem II) se skládá ze dvou typů anténních proteinů – hlavní (majoritní) a vedlejší (minoritní). Mezi hlavní proteiny patří Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3. Jsou označeny podle genů, které je kódují. (Dekker, a další, 2005) Vytváří trimery a vážou Chl *a* a *b*, neoxantin, violaxantin a lutein. (Croce, a další, 2011) Vedlejší proteiny se vyskytují jako monomery a jsou to Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb6, označovány také jako CP29, CP26 a CP24, v tomto pořadí. Všechny tři vážou Chl *a* a *b*, violaxantin a lutein v různých poměrech, CP29 a CP26 navíc i neoxantin. PSII s LHCI vytváří PSII-LHCI superkomplex, kdy se dimerické jádro C_2 spojuje s různým počtem LHCI. C_2S_2 komplex vzniká připojením S-trimerů. Po připojení M-trimerů vzniká $C_2S_2M_2$. U špenátu se vyskytuje i třetí typ trimerů a to L-trimery, kdy vzácně vzniká $C_2S_2M_2L_{1-2}$. Trimery se liší složením a silou

vazebných sil, od které jsou odvozeny jejich názvy – „s“ jako „strongly“, tedy silná vazba, „m“ jako „moderately“, tedy středně silná a „l“ jako „loosely“, tedy slabá vazba. U C_2S_2 chybí z periferních antén Lhcb3 a z proteinů CP24. Hojně vyskytující se $C_2S_2M_2$ se skládá tedy z jádra C_2 , čtyř LHCI trimerů (2 S-trimery, 2 M-trimery) a dvakrát monomerní Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) a Lhcb6 (CP24). (Kouřil, a další, 2012) M-trimery jsou vázány na Lhcb4, S-trimery jsou s jádrem spojeny přes Lhcb5. (Croce, a další, 2011) Některé z proteinů mají důležitou roli ve stavbě a struktuře superkomplexů. Lhcb6 je důležitý pro vazbu M-trimerů. Superkomplexy jsou v granech TM uspořádány většinou náhodně, ale za určitých, ještě ne zcela objasněných podmínek, se mohou seskupovat do semi-krystalických domén nebo megakomplexů. Krystaly mohou tvořit alespoň 3 typy superkomplexů (C_2S_2 , C_2S_2M , $C_2S_2M_2$) pod podmínkou, že jsou odděleny od ostatních membránových proteinů. (Kouřil, a další, 2016) PSII obsahuje kyslík uvolňující komplex (OEC – oxygen-evolving complex). (Umena, a další, 2011) (Ptáčková, 2016)

3 Zdroje světelné energie

3.1 Fotosyntetické pigmenty

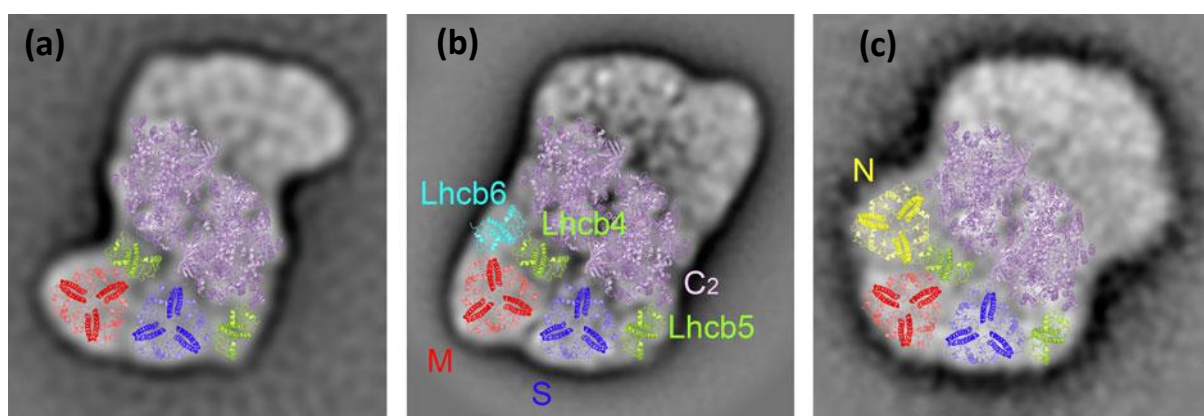
Chlorofyl je zelený pigment, který je obsažen v zelených rostlinách, sinicích a některých řasách. Vyskytuje se v TM chloroplastů. Chemický vzorec chlorofylu je $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$. Známe pět typů Chls – *a*, *b*, *c*, *d*, *f*. Liší se mírně strukturou a maximální vlnovou délkou absorbovaného světla. Chl *a* má absorpční maximum v modré oblasti spektra při vlnové délce 430 nm a v červené oblasti spektra při 662 nm. Maxima absorpce Chl *b* jsou posunuta blíže k sobě. V modré oblasti spektra je to při 455 nm a v červené oblasti při 644 nm. Car se dělí na karoteny (α a β - karoten a další) a xantofyly (lutein, zeaxantin, anteraxantin, violaxantin, neoxantin, fukoxantin a další). Jsou obsaženy i v nefotosyntetizujících organizmech. Excitační energie z karotenoidů může být přenesena na Chls, rovněž z Chl *b* se excitační energie dostane na Chl *a* a pokračuje přes další molekuly Chl *a* k RC fotosystémů. (Pavlovič, a další, 2015)



Obr. 4: Chemická struktura chlorofylu a a b. (Převzato z Pavlovič, a další, 2015).

3.2 Struktura a organizace světlosběrných komplexů

U vyšších rostlin se vyskytuje PSII-LHCII superkomplex ve formě $C_2S_2M_2$. LHCII huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), zástupce krytosemenných rostlin, obsahuje proteiny Lhcb1-6. U nahosemenných rostlin je tomu ale jinak. Smrk ztepilý (*Picea abies*) postrádá v superkomplexu $C_2S_2M_2$ proteiny Lhcb3 a Lhcb6, stejně tak i tyto proteiny chybí dalším borovicovitým (*Pinaceae*) a liánovcotvarým (*Gnetales*). Ostatní skupiny nahosemenných rostlin Lhcb3 a Lhcb6 proteiny obsahují stejně jako evolučně starší suchozemské skupiny rostlin - mechy a kapraďorosty. To vyvolává další otázky, protože Lhcb3 a Lhcb6 byly považovány za proteiny vyskytující se u všech suchozemských rostlin. V superkomplexu u smrku ztepilého zůstává místo po Lhcb6 neobsazeno. Absence Lhcb3 hraje roli v síle vázanosti M-trimeru k jádru PSII. M-trimer je oproti tomu v *A. thaliana* pootočen přibližně o 52° , což způsobuje těsnější asociaci s S-trimerem. *Chlamydomonas reinhardtii*, zástupce zelených řas, postrádá také Lhcb6. Místo něho je vázán N-trimer. M-trimery *C. reinhardtii* jsou stejně pootočené jako ty smrku. (Kouřil, a další, 2016)



Obr. 5: Zobrazení struktury proteinů v PSII superkomplexech. (a) PSII superkomplex ze smrku ztepilého (*Picea abies*), (b) huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a (c) *Chlamydomonas reinhardtii*. Na obrázcích (a) a (b) jsou zobrazeny superkomplexy $C_2S_2M_2$ a na obrázku (c) $C_2S_2M_2N_2$. Jádro fotosystému (C_2) je znázorněno světle fialovou, trimery S, M a N modře, červeně a žlutě (v tomto pořadí). Proteiny Lhcb4 a Lhcb5 jsou označené zelenou barvou, Lhcb6 azurovou. (Převzato z Kouřil, a další, 2016).

4 Fotoprotektivní mechanismy fotosyntetického aparátu

4.1 Oxidativní stres

Fotosyntetický aparát je neustále vystavován různým environmentálním změnám. Tyto faktory mají negativní vliv na průběh fotosyntézy, poškozován je zejména PSII a jeho funkčnost omezena. Při světelné reakci fotosyntézy vznikají i potenciálně škodlivé reaktivní formy kyslíku (ROS). Právě ty nejvíce poškozují PSII. Faktory můžeme tedy rozdělit na ty,

kteřé působí přímo (nadměrné množství fotosynteticky aktivní radiace (FAR), UV záření, vysoké teploty) a nepřímó (nižší než optimální teploty, sucho, zasolení). Rostliny si vůči těmto změnám dokázaly vyvinout různé ochranné mechanismy. Mechanismy fungují na rozdílných úrovních struktury rostlin – listu, buňky nebo molekul a mají i různou dobu trvání od sekund a minut po týdny. Všechny tyto mechanismy se snaží o snížení tvorby ROS nebo minimalizaci poškození způsobeného již vzniklými ROS.

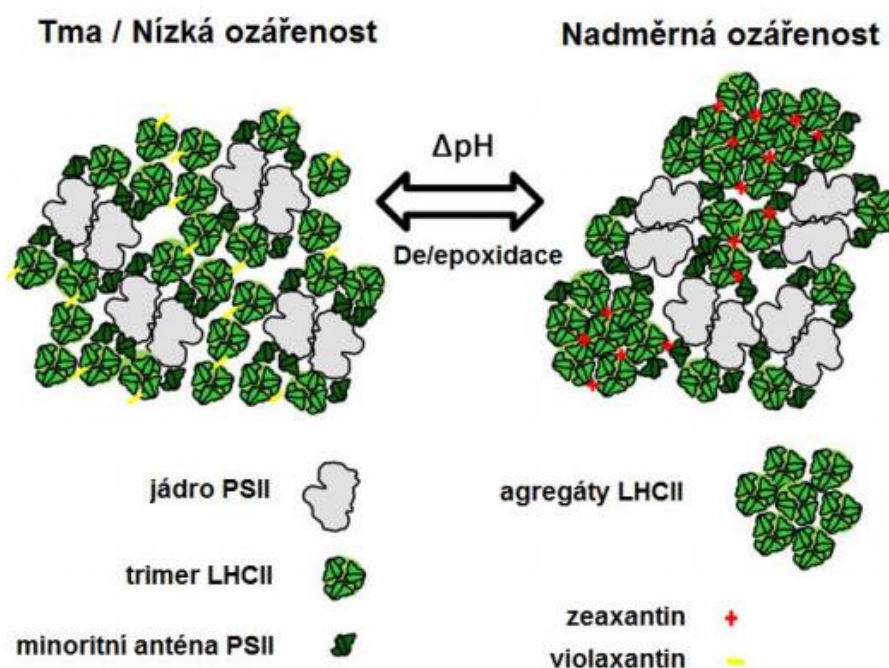
4.2 Nefotochemické zhášení

Při nadměrném ozáření pohlcují antény příliš světelné energie. Přebytečná excitační energie, která není využita při fotosyntéze, je disipována na teplo, což je možné detekovat pomocí poklesu fluorescence Chl *a*. Tento proces se nazývá nefotochemické zhášení (NPQ). Při NPQ dochází k reorganizaci LHClI a změně jejich funkce ze světlosběrné na fotoprotektivní. Důležitou roli při reorganizaci LHClI má i violaxantinový cyklus (VAZ cyklus) a PsbS protein. (Horton, a další, 2005)

NPQ se skládá z rozdílných komponent – hlavní je rychlá komponenta qE, dále qI, qT a qZ. qE relaxuje, tedy vrací se do základního stavu, během několika minut. U qI se předpokládalo, že místem zhášení, kde působí, je RC PSII. Bylo spojováno s fotoinhibicí, tedy poškozením PSII. Poté bylo zjištěno, že působí v anténách. Doba relaxace u qI je delší než u qE, jedná se i o několik hodin. qI je poměrně nejasně vymezená, proto se zavedla jiná pomalu relaxující složka qZ, která souvisí s zeaxantinem. Poměr působení komponent je závislý na světelné ozářenosti. Při rychlých změnách dopadu světla je aktivní spíše qE, při stálější hladině ozářenosti pomalu relaxující komponenty. Světlosběrné antény jsou považovány za místo vzniku NPQ. Předpokládalo se, že NPQ vzniká hlavně v minoritních anténách, dnes je ale známo, že na vzniku NPQ se podílí všechny. Důležitější je tedy struktura superkomplexu v thylakoidní membráně než samostatné podjednotky. Důležitou roli hraje i forma přítomnosti gran – u částečně rozvolněných gran je míra NPQ výrazně nižší, u zcela rozvolněných membrán nebylo NPQ zjištěno. Změny v TM se projevují přiblížením RC PSII. (Goss, a další, 2015) (Jahns, a další, 2012)

Průběh NPQ byl popsán již několika způsoby. Podle jednoho z nich NPQ probíhá ve čtyřech zhášecích stavech. (Horton, a další, 1992) V prvním je LHClI zobrazeno jako u rostlin adaptovaných na tmou nebo nízkou ozářenost. LHClI není shluknuto, tedy nijak agregováno. Neprobíhá zde zhášení a excitační energie je využívána k elektronovému transportu. Stav 4 popisuje naopak LHClI v rostlinách adaptovaných vysoké ozářenosti, kde je přebytek energie, který se nevyužívá k fotosyntéze. Zde je LHClI vysoce agregováno. Agregaci spouští zbytky speciálních aminokyselin a transformace violaxantinu na zeaxantin. V tomto stavu je NPQ nejvyšší. PsbS funguje jako senzor změny protonové koncentrace v lumen TM při průběhu vysoké ozářenosti. PsbS se protonuje a katalyzuje konformační změny LHClI, které vedou k agregaci a NPQ. Formuje zhášecí místa, kde jsou deaktivovány excitované stavy molekul Chl *a*. PsbS je protein ze skupiny světlosběrných proteinů. Ve stavu 3 jsou LHClI komplexy

protonovány, ale stále je vázán violaxantin. LHCII je méně agregováno, tedy i hodnoty NPQ jsou nižší než ve stavu 4. Stav 3 probíhá v membránách ihned po ozáření. LHCII ve stavu 2 je neprotonováno a zhášení je také nižší než ve stavu 4, ale má delší dobu trvání z důvodu pomalé epoxidace Z na V. Druhý model je založen na vztahu fluorescence a času, který představuje dvě zhášecí místa NPQ v TM vyšších rostlin. (Holzwarth, 2009) (Jahns, a další, 2012) První zhášecí místo Q1 se skládá z hlavního LHCII, které se v průběhu ozáření odpojí od jaderného komplexu PSII. Tyto odpojené agregáty mají schopnost disipace excitační energie ve formě tepla. Formace místa Q1 vyžaduje interakci s protonovaným PsbS. Toto místo představuje komponentu qE, která relaxuje v rozmezí 1 až 5 minut. Druhé zhášecí místo Q2 se skládá z minoritních proteinů LHCII (CP29, CP26 a CP24), které zůstávají připojeny k jádru PSII. Q2 je silně závislé na VAZ cyklu. Kinetika tohoto procesu je pomalejší, trvá asi 10 až 15 minut. (Goss, a další, 2015)



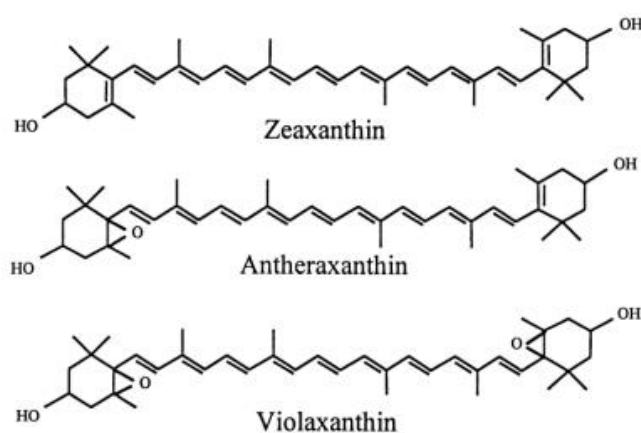
Obr. 6: Model NPQ znázorňující strukturní změny LHCII superkomplexu. Funkce antén se mění ze světlosběrných na fotoprotektivní. (Převzato z Johnson, a další, 2011).

Obecně se u zelených řas nevyskytují velké rozdíly v průběhu VAZ cyklu ani agregaci LHCII oproti vyšším rostlinám. Rozdíly ale nalezneme při aktivaci NPQ. U řasy *Chlamydomonas reinhardtii* se výrazné NPQ projevuje až po aklimaci řasy na vysokou ozáření. V TM zelených řas není rozlišena stromální a granální část, a proto postrádají dvě minoritní antény LHCII – Lhcb3 a Lhcb6. V některých chybí i PsbS, který je nahrazen Lhcsr proteiny (tzv. „stresové proteiny“ LHC, „stress-related“). Lhcsr3 *C. reinhardtii* vykazuje podobné funkce jako PsbS a je silným zháščem fluorescence Chl a , ale liší se strukturně – Lhcsr se skládá ze tří helixů a váže Chls a xantofyly, PsbS má čtyři helixy a pigmenty nejspíše neváže.

Mechy jsou skupinou rostlin, která se vývojově nachází mezi suchozemskými rostlinami a vodními řasami. Bylo zjištěno, že mech *Physcomitrella patens* obsahuje jak PsbS typický pro rostliny na souši, tak i Lhscr, který se nachází u zelených řas a nahrazuje právě PsbS a jeho funkci. Oba proteiny jsou důležité pro průběh NPQ. Důležitá je přítomnost zeaxantinu, který se váže na Lhscr proteiny. (Goss, a další, 2015)

4.3 VAZ cyklus

Xantofylový cyklus, přesněji violaxantinový cyklus, je lokalizovaný v chloroplastech. Skládá se ze dvou protichůdných reakcí, kterých se účastní xantofyly – violaxantin, anteraxantin a zeaxantin (odtud název VAZ cyklus). Hraje důležitou roli u vyvolání NPQ u vyšších rostlin.



Obr. 7: Chemická struktura pigmentů, které se účastní VAZ cyklu. U violaxantinu a anteraxantinu jsou znázorněny epoxidové skupiny. (Převzato z Hieber, a další, 2000).

V první části VAZ cyklu je xantofyl V (violaxantin) deepoxidován na xantofyl Z (zeaxantin). Xantofyl V má dvě epoxidové skupiny. Epoxid je cyklický ether. Meziproduktem deepoxidace je xantofyl A (anteraxantin) s jednou epoxidovou skupinou. Konečný xantofyl Z už neobsahuje epoxidové skupiny. Tato reakce je závislá na vysoké ozáření a katalyzována enzymem VDE (violaxantin deepoxidáza), který je aktivován nízkým pH v lumenu. U izolovaného enzymu byla ideální hodnota pH=5,2, *in vivo* pH=4,8. V druhé části dochází ke zpětné formaci epoxidových skupin. Z xantofylu Z bez epoxidů se přes meziprodukt xantofyl A s jedním epoxidem stává xantofyl V s dvěma epoxidy. Probíhá za sníženého osvětlení nebo tmy, kdy pH lumenu není sníženo. Důležitá je přítomnost enzymu ZE (zeaxantin epoxidázy). Pro optimální fungování ZE při slabém osvětlení je pH=7,8, ve tmě pH=7,4. Předpokládá se, že je lokalizován na stromální straně TM.

VAZ cyklus, hlavně tedy vytvořený xantofyl Z, může mít hned několik funkcí, jiné jsou diskutovány. Například se podílí na zhášení přebytečné energie v anténách PSII. Účastní se strukturní i funkční změny, kdy se funkce LHCIII mění z anténní na fotoprotektivní. Souvisí

s tepelnou disipací excitační energií. Xantofyl Z je důležitý při rychlé formaci a relaxaci qE v NPQ. (Goss, a další, 2015) (Holubová, 2015)

5 Aklimace fotosyntetického aparátu na nízkou a vysokou ozářenost

Dlouhodobá aklimace rostlin na rozdílnou intenzitu ozářenosti způsobuje změny v uspořádání jejich PSII-LHCII superkomplexů a množství obsahu proteinů TM. (Kouřil, a další, 2013) Biochemickou analýzou byla u aklimovaných rostlin odhalena změna ve složení a velikosti světlosběrných antén. Toto bylo dokázáno u rostlin *A. thaliana* pěstovaných v růstových komorách při různých ozářenostech – u první skupiny rostlin byla zachována kontrolní ozářenost $100 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (NL jako normal light, tedy kontrolní ozářenost), u druhé proběhla aklimace na nízkou ozářenost $20 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (LL jako low light, tedy nízká ozářenost) a třetí byla aklimována na $800\text{--}1100 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (HL jako high light, tedy vysoká ozářenost). Dlouhodobou aklimaci na světlo o vysoké intenzitě doprovází snížení počtu LHC proteinů. To vypovídá o tom, že rostlina nepotřebuje pojmout tolik světelné energie, která by mohla způsobit poškození fotosyntetického aparátu. U HL aklimovaných rostlin obsah PSII oproti PSI roste. Poměr Chls/CP43 je vyšší než u vzorků NL a LL. Příčinou může být redukce LHCII proteinů a pravděpodobně i vyšší poměr PSII/PSI. U vzorků aklimovaných na LL byl pozorován opačný efekt. Rostliny obsahovaly méně PSII, tedy i poměr PSII/PSI byl nižší a poukazuje na větší obsah LHCII proteinů. (Kouřil, a další, 2013)

V NL rostlinách bylo zjištěno průměrně 4,8 trimerů LHCII na 1 dimer jádra PSII, zatímco u HL rostlin jen 3,8 trimerů na dimer jádra a u LL rostlin dokonce 7,4 trimerů na dimer jádra. Analýza poměru *Chl a/Chl b* zjistila nižší obsah LHC antén s vyšším výskytem *Chl b* u HL rostli. U HL rostlin byl tento poměr 3,4, u NL rostlin 3,0 a u LL rostlin již 2,7, čímž byla potvrzena větší velikost LHCII antény. U HL rostlin dochází k 50% redukci CP24 a Lhcb3, který se vyskytuje převážně v M trimerech, a tím tedy dochází i k 50% redukci M trimerů. U aklimace rostlin na HL došlo k redukci anténní části PSII a tím i PSII-superkomplexů $\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2$. U rostlin aklimovaných na LL došlo ke zvětšení anténní části PSII i superkomplexů $\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2$, které se v *A. thaliana* vyskytují nejběžněji. Aklimace rostlin na HL způsobila značnou redukci obsahu proteinu PsbS znatelnou i po normalizaci k Chls, zatímco aklimace na LL znatelný růst. (Kouřil, a další, 2013)

Aklimace rostlin na LL, NL a HL má vliv na uspořádání PSII komplexů – většinou zůstávají neuspořádané, ale část z nich tvoří semi-krystalické domény. U rostlin aklimovaných na LL a NL to jsou semi-krystalické domény tvořené $\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2$ superkomplexy, ale u rostlin aklimovaných na HL tvoří semi-krystalické pole i C_2S_2 superkomplexy. Jádra PSII byla uspořádána v doménách ve vertikální pozici (LL, NL) nebo mírně natočena doleva (HL, LL), kde dochází k rozdílným vazbám mezi CP26 a CP24. Neuspořádané PSII komplexy se různě seskupují a reagují nezávisle na světelných podmínkách při aklimaci. (Kouřil, a další, 2013)

Analýza HL a NL vzorků ukázala rovnoměrné rozložení PSII komplexů v granech TM (1400-1900 komplexů na μm^2). Hustota PSII komplexů v granech TM z LL vzorků je výrazně nižší (600-1300 komplexů na μm^2). PSII komplexy LL vzorků mají navíc tendenci se seskupovat do jakýchsi řad. (Kouřil, a další, 2013)

Byla prokázána závislost exprese proteinů Lhcb na intenzitě ozáření. Změny byly pozorovány na kukuřici (*Zea mays*) pěstované při dvou různých teplotách a intenzitách ozáření – 13°C/ 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 13°C/270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24°C/70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24°C/1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rostliny pěstované při nižších teplotách měly nižší obsah Chls celkově než rostliny pěstované při vyšších teplotách, stejně tak poměr Chl *a*/Chl *b* byl nižší. Rozdíly byly patrnější u rostlin pěstovaných při vyšších ozářeních. U rostlin pěstovaných při vyšší teplotě se obsah karotenoidů zvedl o 30%, u rostlin pěstovaných při nižší teplotě o 64%. TM rostlin pěstovaných při 13 °C obsahují méně CP26 a CP29 vzhledem k LHCII. Tyto rostliny obsahují více LHCII a naopak méně PSII a PSI-LHCI komplexů než rostliny pěstované při 24°C. U rostlin aklimovaných na různou ozáření se liší exprese proteinů kódovaných geny Lhc i složení LHCII. To vyplývá z toho, že každý protein se liší obsaženými pigmenty, tedy má i jiné spektroskopické vlastnosti. Různé proteiny mají tedy různý poměr Chl *a*/Chl *b* a určité Lhcb jsou typické pro jednotlivé teplotní podmínky a stupně ozáření. (Caffari, 2005)

Toto také můžeme prezentovat na aklimaci rostlin WT ječmene jarního (wild type, tedy zástupce druhu v takové podobě, v jaké se vyskytuje nejčastěji v přírodě) a jeho mutantu *clorina-f2* (*clo*) na vysokou ozáření. (Štroch, 2004) U mutantu pěstovaného při vysoké ozáření (*clo*-HL) (1000 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) došlo k úbytku Chl *a* a nárůstu obsahu karotenoidů. Zvýšená hodnota β -karotenu znamená vyšší množství jaderných komplexů fotosystémů. Pigmenty, které se účastní VAZ cyklu, se nachází volně v lipidové dvojvrstvě nebo se vážou na proteiny tvořené při vyšší ozáření. Naopak vysoká ozáření u *clo*-HL způsobila snížení obsahu anténních komplexů oproti těm u WT ječmenu jarního pěstovaného pod stejnou ozáření (WT-HL). Při porovnání emisních spekter měřených při 77K listu mutantu *clorina-f2* (*clo*-LL) a listy WT (WT-LL) rostoucích při nízké ozáření a adaptovaných na tmu bylo zjištěno, že emisní band spektra *clo*-LL se zmenšil a posunul do oblasti nižší vlnové délky 731 nm oproti emisi spektra WT-LL při 743 nm. Emisní band při 687 nm připisovaný CP43 byl u *clorina-f2* viditelně redukován, zatímco band při 695 nm připisovaný CP47 nezaznamenal výrazné změny. Z toho můžeme usoudit změnu toku excitační energie přímo ze zbývajících LHC na CP47. Na excitačních spektrech *clo*-LL a WT-LL viditelný pokles excitace v oblasti okolo 468 nm a 490 nm značí redukci přenosu excitační energie z karotenoidů na Chl *a*. To poukazuje na redukci antén PSII a PSI. Příčinou je absence Chl *b* u *clorina-f2*, který u komplexů WT zprostředkovává přenos excitační energie mezi Chl *a* a Car. (Štroch, 2004) (Babicová)

6 Využití spektroskopických metod ke studiu makroorganizace LHC

6.1 Cirkulární dichroismus

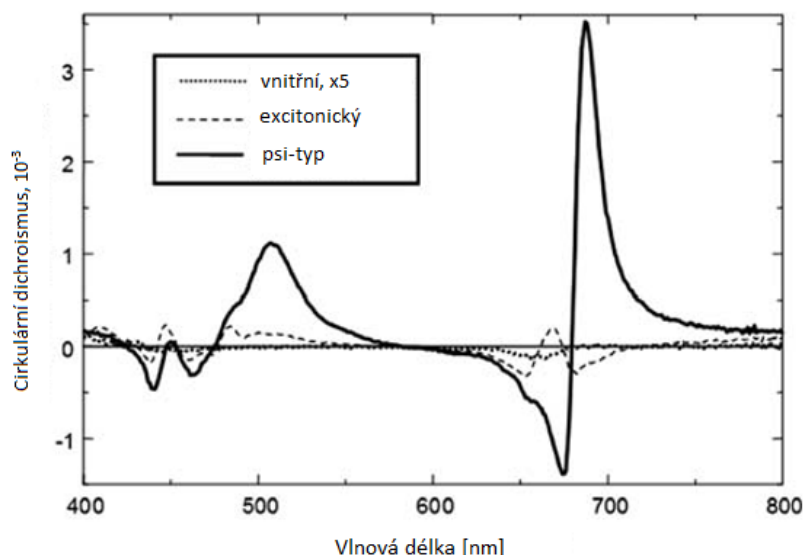
Cirkulární dichroismus (CD) je jev, který pozorujeme a zaznamenáváme u opticky aktivních látek po průchodu polarizovaného světla. Opticky aktivní látky mají chirální strukturu, což znamená, že objekt nelze překrýt jeho zrcadlovým obrazem. CD spektrum tedy můžeme vyjádřit jako rozdíl absorpce levo- a pravotočivého polarizovaného světla, které prochází látkou v závislosti na vlnové délce.

$$CD = A_L - A_P$$

Hodnoty mohou být kladné i záporné v závislosti na průchodu rozdílného množství levo- a pravotočivého světla. Světlo pohlcují chromofory, které mohou být celými molekulami nebo jen částmi molekul.

CD je využíván ke studiu struktury proteinů, což je umožněno faktem, že drtivá většina aminokyselin je chirálních a uspořádání molekul je nesymetrické. Dále můžeme pozorovat změny strukturálního uspořádání proteinů a stability proteinových fragmentů.

CD signály vychází z různých molekulárních systémů o různé složitosti. V základním případě pochází CD signál z vnitřní asymetrie nebo asymetrické deformace molekuly. U jednoho elektronového přechodu má pás stejný tvar jako absorpce. Znaménko je určeno rotační silou přechodu. V molekulárních komplexech nebo malých agregátech je CD indukován krátkodosahovými excitonickými interakcemi mezi chromofory. Tyto interakce vedou k tvorbě strukturních konzervativních pásů. To znamená, že po zobrazení v energetické škále se kladné a záporné pásy budou nacházet na stejných místech. Třetím typem CD signálu pochází z chirálně organizovaných systémů, tzv. psi-typu agregátů. Ty vytvářejí pásy, které nejsou konzervativní a mají anomální tvar. Rozsah těchto pásů CD signálu bývá větší než rozsah pásů spekter absorpčních a sahá tedy i do kratších a delších vlnových délek. U hierarchicky organizovaných systémů jako jsou granální TM nebo lamelární agregáty LHCI se vyskytují všechny tři typy CD signálů a výsledné CD spektrum je tedy dáno součtem těchto CD signálů. (Garab, a další, 2009)



Obr. 8: Spektra cirkulárního dichroismu thylakoidních pigmentů hrachu na různých úrovních organizace. Koncentrace chlorofylů je ve všech vzorcích totožná (20 μg Chl *a* + Chl *b*/ml). Vnitřní CD signál pochází z chlorofylů v 80 % acetonovém extraktu. Signál vnitřního CD násoben koeficientem 5 pro snadnější srovnání. Z thylakoidních membrán hrachu v hypotonickém médiu s nízkým obsahem soli pochází CD signál excitonický. Poslední vzorek obsahuje stejné membrány v izotonickém prostředí v přítomnosti Mg iontů. (Převzato z Garab, a další, 2009).

6.2 Fluorescence

Ke studiu excitační energie využíváme excitační a emisní spektra nízkoteplotní fluorescence (77K) Chl *a*. Vyobrazují velikost LHC a efektivnost přenosu excitační energie.

6.2.1 Emisní spektra

Emisní spektra jsou definována jako závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při fixní vlnové délce excitace. Představují přenos excitační energie ze světlosběrných komplexů do RC. Můžeme je měřit na různých úrovních – listy, chloroplasty, TM i jednotlivé PPC při 77 K a 4 K.

6.2.1.1 Emisní spektra intaktního materiálu

Nízkoteplotní (měřena při 77 K) fluorescenční emisní spektra intaktního materiálu tvoří 6 pásů – F680, F685, F695 pochází z PSII, F705, F720 a F735 z PSI. Pásky F685, F695 a F735 jsou u spektra intaktního listu zřetelné již při teplotě 77K, ostatní až při 4K nebo u mutantů a rostlin vystavených přerušovanému světlu. Intaktní materiál obsahuje nerozrušené komplexy fotosystémů. Spektrum suspenze TM chloroplastů se vyznačuje dvěma pásy – F685 při 685 nm s ramenem při 695 nm a F735 při 735 nm. U emise PSII intaktního materiálu je možné, že je obohacena emisí z PSI a LHCI. Právě u maxima emise PSI je viditelný posun oproti té

u suspenze TM až k 745 nm díky snížení koncentrace Chls a tím pádem i odstranění reabsorpce fluorescence.

6.2.1.2 Emisní spektrum PSI

Anténa jádra, která se skládá z komplexu jádra a absorpčních forem Chl *a* vykazuje emisi okolo 720-722 nm (F720). Tuto emisi způsobuje absorpce excitační energie Chls posunutými k delším vlnovým délkám (červená oblast spektra) okolo 705 nm. Světlosběrná anténa PSI vyzařuje emisi v oblasti 735 nm, ta je zřetelná u intaktního materiálu při nízkých teplotách. LHCI tvoří proteiny, které emitují fluorescenci při různých vlnových délkách – Lhca3 a Lhca2 při 680 nm, Lhca1 a Lhca4 při 730 nm. Monomer Lhca1 při excitaci 440 nm má emisní maximum při 685-687 nm, monomer Lhca4 při 730-732 nm s krátkovlnným ramenem okolo 687 nm. Lhca4 pravděpodobně ovlivňuje dlouhovlnné maximum nízkoteplotní fluorescence díky přítomnosti dlouhovlnných forem Chl *a*. Chls v Lhca2 a Lhca3 absorbují při 693 nm a způsobují emisní band okolo 702 nm. Emisní spektrum intaktního PSI má emisní band F735. Pokud ale odstraníme LHCI, band se posune ke kratším vlnovým délkám a vznikne F720, který způsobuje anténa jádra PSI. Izolované LHCI emitují fluorescenci při 730 nm. Důsledkem interakce mezi pigmenty a proteiny Lhca4 vzniká emise F742. Samostatný Lhca1 má také jinou emisi než tentýž protein vázaný k RC, kdy se emise posunuje na 732 nm. Pokud měříme fluorescenci u PSI, tedy komplexu jádra i LHCI, spojí se nám jejich charakteristické pásy, kde emisní maximum bude při 730-735 nm díky dominanci fluorescence z Lhca1 a Lhca4.

6.2.1.3 Emisní spektrum PSII

Emisní spektrum měřené při 77 K má dva charakteristické pásy způsobené emisí antény jádra PSII. Pásy emise antény jádra PSII se projevují okolo 685 nm (F685) a 695 nm (F695). Viditelné jsou ve spektrech měřených jak na izolovaných částicích, tak i samostatných PSII. Právě pás LHCI s maximem při 681 nm lze pozorovat pouze u izolovaných LHCI, u intaktních listů a izolovaných chloroplastů se pás LHCI v emisním spektru neprojevuje, příčinou je efektivní přenos excitační energie z LHCI do RC PSII nebo PSI. Při pokojové teplotě 293 K komplexy PSII vykazují emisní pík při 685 nm, pokud ale měření proběhne při teplotách nižších než 100 K, pík se posune do oblasti kratších vlnových délek a rozdělí se na dva píky F685 a F695. U CP43, které emituje F685 a CP47, emitující F695, se zvýšením teploty ze 4 K na 77 K se zvýší intenzita fluorescence až dvakrát, ale k posunu píků nedochází. Totiž RC PSII, izolovaný při 4 K, emituje fluorescenci při 684 nm, izolované antény CP43 a CP47 se projevují píky při 683 nm a 691 nm. Excitační energie by měla být přenášena z Chls v anténě na nízkoeenergetické Chls v CP43 a CP47 a poté přenesena do RC PSII.

6.2.2 Excitační spektra

Excitační spektra jsou definována jako závislost intenzity fluorescence detekované při fixní vlnové délce na vlnové délce budícího záření, jehož intenzita je konstantní. Získáváme informace o molekulách, které fluoreskují a zároveň se podílejí na přenosu excitační energie.

Excitační spektra jsou často podobná absorpčním spektrům, k absorpci ale přispívají i látky, které excitační energii na fluorofor nepřenáší.

6.2.2.1 Excitační spektrum PSI

Excitační spektra PSI při 77 K se měří při vlnové délce emisního maxima PSI, tedy 735-745 nm, což je maximum emise LHCI. V modré oblasti spektra je maximum excitačního spektra při 440 nm (E440) pro Chl *a*, pro Chl *b* okolo 472-476 nm. Oproti spektru PSII se excitační pás v modré oblasti 460-490 nm zužuje a dochází k jeho poklesu. V této oblasti dominují excitační pásy Chl *b* a karotenoidů. Jedním z faktorů poklesu je i snížení hodnoty poměru E476/E436 vzhledem k emisi PSII. Tato hodnota závisí na obsahu doplňkových světlosběrných pigmentů Chl *b* a karotenoidů. Nižší obsah indikuje redukovanou kapacitu světlosběrných komplexů PSI. Dále nalezneme ve spektrech dlouhovlnná excitační maxima Chl *a*.

6.2.2.2 Excitační spektrum PSII

Excitační spektra PSII při 77 K se měří při vlnové délce emisního maxima PSII, tedy 685-695 nm, což je maximum emise antény jádra PSII, tedy proteinů CP43 a CP47. Spektra změřená při nižší vlnové délce 680 nm mají vyšší podíl excitace Chl *b*, jelikož se jedná o emisi z LHCI. V modré oblasti excitačního spektra PSII měřeného při 77 K se nalézají pásy Chl *a* s maximem 432-438 nm (E436) a pásy Chl *b* s maximem 472-746 nm (E476). U excitačních spekter se pás karotenoidů překrývá s pásem Chl *b* – nemůže zcela jasně určit přesná maxima jednotlivých pigmentů. Ve vnitřní anténě jádra ale Chl *b* obsažen není, proto nehrozí překrytí pásů a excitační maximum přítomného β -karotenu bylo zjištěno při 468 nm (E468) a 503 nm. Jednotlivé pásy xantofylů se překrývají jak navzájem, tak i s pásem Chl *b*. Proto se využívají pro odhad maxima absorpčních spekter – violaxantin má absorpční maxima *in vivo* při 431 a 484 nm, lutein při 454 a 459 nm a zeaxantin při 505 nm. Díky poměru excitačních pásů E476/E436 můžeme určit kvantitativní efektivitu přenosu excitační energie z anténních komplexů do jader fotosystémů. Předpokládá se, že přenos z Chl *b* na Chl *a* funguje se 100% účinností. (Babicová)

Experimentální část

7 Materiály a metody

7.1 Rostlinný materiál a aklimace

Semenáčky smrku ztepilého (*Picea abies*) byly vypěstovány ze semen v růstové komoře HB 1014 (Bioline-Heraeus, Německo) při ozáření 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, relativní vlhkosti 65 % a světelném režimu 16/8 světlo/tma (17 dnů). Poté byla část rostlin aklimována na nízkou ozáření (LL, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a část na vysokou ozáření (HL, 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) po dobu 10 dnů. U třetí části rostlin zůstala ozáření nezměněna (NL, kontrolní).

7.2 Metody

7.2.1 Izolace thylakoidních membrán

Rostlinné pletivo bylo homogenizováno pomocí homogenizátoru mixérového typu Ultra-Turrax T25-18G (IKA, Staufen, Německo; 45 s při 18 000 rpm) v homogenizačním médiu (400 mM sacharóza, 400 mM NaCl, 4 mM MgCl_2 , BSA – 2 mg/ml, 5 mM kyselina askorbová, 35 mM Hepes, pH = 7,2). Homogenát byl filtrován přes osm vrstev polyamidového síta Uhelon 130T (Silk and Progress, Moravská Chrástová, Česká republika) s velikostí pórů 42 μm a poté centrifugován (3K30; Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Německo) 6 minut při 5 000 g. Pelet byl resuspenzován v médiu kvůli rozrušení chloroplastových membrán (150 mM NaCl, 8 mM MgCl_2 , 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 25 mM Hepes, pH = 7,5) a centrifugován 10 minut při 5 000 g. Potenciálně přítomný škrob byl odstraněn resuspendací peletu v médiu II (400 mM sacharózy, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Hepes, pH = 7,2) a následnou centrifugací 5 minut při 5 000 g. Konečný pelet thylakoidů byl suspendován v malém alikvotním množství média II a naředěn na koncentraci 1 000 $\mu\text{g Chls na ml}$. Obsah Chls thylakoidů byl stanoven po extrakci v 80% acetonu UV/VIS 550 spektrofotometrem (Unicam, Leeds, Velká Británie) podle Lichtenthalera (1987). Všechny kroky izolace a centrifugace byly provedeny při 0° C podle Noska (2012). Izolaci provedla Dr. Irena Kurasová. Nerozvolněné TM byly připraveny resuspenzací izolovaných membrán s obsahem Chls 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ v médiu obsahujícím 50 mM Tricinu (pH=7,5), 0,4 M sorbitolu, 5 mM MgCl_2 .

7.2.2 CD spektroskopie

Spektra cirkulárního dichroismu byla měřena v rozsahu 400-750 nm spektropolarimetrem J-815 (Jasco, Tokio, Japonsko). Spektra byla měřena po 0,5 nm s integračním časem 1 s a rychlostí skenu 100 nm min^{-1} . Nerozvolněné TM byly připraveny resuspenzací izolovaných membrán s obsahem Chls stanoveným na 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ v médiu obsahujícím 50 mM Tricinu (pH = 7,5), 0,4 M sorbitolu, 5 mM KCl a 5 mM MgCl_2 . Za účelem získání rozvolněných thylakoidů, které nevykazují typu psi CD pásů, byly TM o stejné koncentraci Chls promyty

v pufru s 50 mM Tricinu doplněného o 5 mM MEDTA (pH = 7,5) a byly sonifikovány (GM 3100, Bandelin Electronic, Berlín, Německo) 300 s za použití střídavé a výstupové hodnoty 25%. CD spektra TM byla měřena v buňce s délkou optické cesty 1 cm.

Měření změn teplotních závislostí CD signálu bylo provedeno následujícím způsobem. Vzorky byly postupně ohřívány v Peltierovém držáku – 5 minut pro každou teplotu (20 °C – 70 °C nebo 80 °C). Změřené teplotní závislosti CD pásů nebo rozdílů párů pásů byly prokládány sigmoidální křivkou, díky které je možné určit teploty přechodu T_m . T_m značí teplotu rozpadu chirálních makromolekul a je definována jako teplota, při které se intenzita CD pásu sníží na 50% hodnoty při 20 °C.

7.2.3 Spektra fluorescence chlorofylu a při 77 K

Spektra TM byla měřena při 77 K za použití luminescenčního spektrofotometru LS50B (Perkin-Elmer, Velká Británie) a na zakázku vyrobeného optického kryostatu Dewarova typu. Emisní spektra byla měřena při preferenční hodnotě excitace Chl *a* (436 nm) a Chl *b* (476 nm). Excitační spektra byla měřena na emisi pocházející z PSII (685 nm) a PSI (735 nm). Emisní spektra byla měřena se spektrálními šířkami štěrbin 5 a 2,5 mm excitačního a emisního monochromátoru. U excitačních spekter suspenzí byly užity štěrbin excitačního a emisního monochromátoru o spektrálních šířkách 2,5 a 5 mm. Emisní spektra byly korigovány na spektrální citlivost detekčního systému, u excitačních spekter proběhla korekce automaticky při výstupu z excitačního zdroje podle efektivnosti vyzařování zdroje a spektrální citlivosti referenčního fotonásobiče.

7.2.4 Absorpční spektroskopie

Absorpční spektra TM byla měřena při pokojové teplotě za použití UV-VIS spektrofotometru Specord 250 (Analytik Jena, Jena, Německo) v rozsahu 350-750 nm.

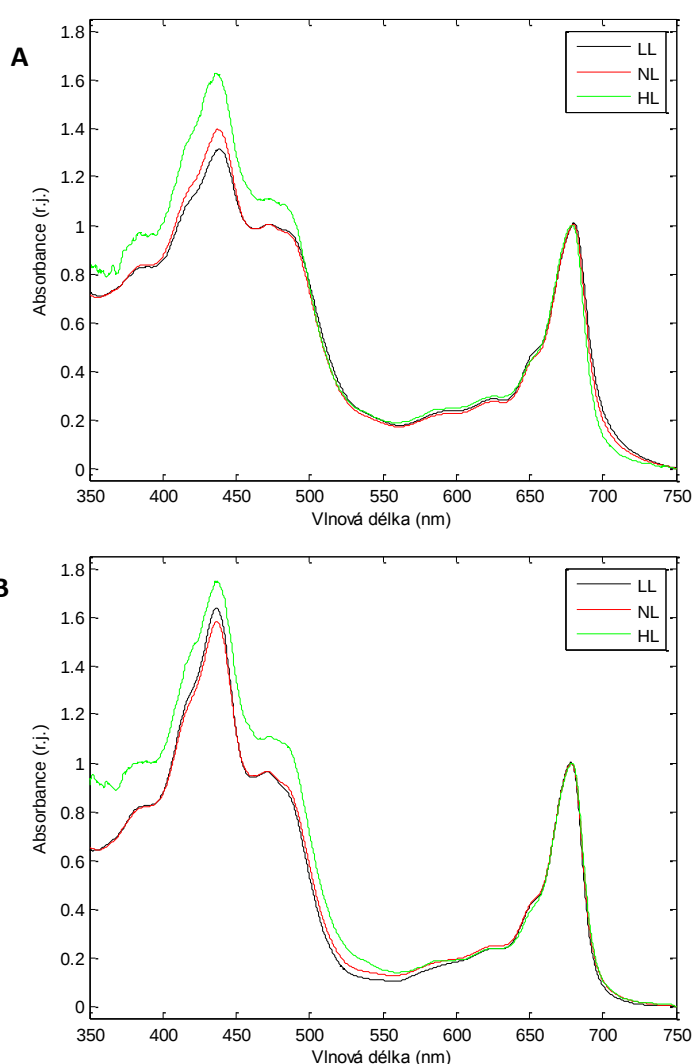
Absorpční spektra jsou korigovaná na rozptýlené záření. Spektra rozptýleného záření byla vypočtena podle článku Merzlyak et al. (2009). S menším úhlem (λ) se zmenšuje absorpce a zvyšuje rozptyl. (Merzlyak et al., 2009)

7.2.5 Analýza obsahu pigmentů

Poměry Chl *a* k Chl *b* (Chl *a/b*) a karotenoidů Car (karotenoidů a xantofylů) k Chls (Car/Chls) byly určeny spektrofotometricky (UV/VIS 550, Unicam, Leeds, Anglie) z extraktů pigmentů podle Lichtenthalera (1987). Protože jednoduchá extrakce pigmentů (hlavně β -karotenu) z listů ve vodném roztoku acetonu je nekompletní (Dunn et al. 2004; Thayer and Björkman 1992), použita byla trojnásobná extrakce pigmentu z listů v acetonu (100:100:80%).

8 Výsledky

Na změřených absorpčních spektrech je viditelné, v kterých oblastech spektra absorbují světlo různé pigmenty (**Obr. 9**). Chls absorbují hlavně v modré a červené oblasti spektra s absorpčními maximy okolo 438 nm a 680 nm pro Chl *a* a 475 nm a 650 nm pro Chl *b*, Car pouze v modré oblasti spektra. S úrovní aklimační ozáření se mění i poměr obsahu pigmentů. U HL rostlin je poměr Car/Chls znatelně vyšší oproti NL a LL rostlinám (**Tab. 1**), což je patrné ze změny poměru absorpčních pásů v modré a červené oblasti spektra. Absorpční spektra nerozvolněných a rozvolněných TM se příliš neliší, což potvrzuje fakt, že absorpční spektrum není závislé na makro-organizaci PPC v TM. Tabulka 1 dále ukazuje, že s rostoucí intenzitou ozáření dochází ke zvýšení poměru Chl *a*/Chl *b*, které není ze spektra tak jasně viditelné.

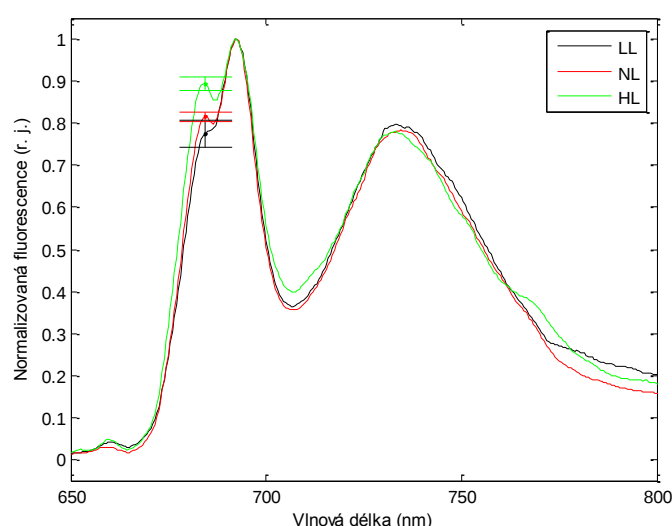


Obr. 9: Absorpční spektra nerozvolněných (**A**) a rozvolněných (**B**) thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Spektra byla korigována na rozptyl záření. Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů normovaná na maximum absorpce chlorofylu a v červené oblasti spektra.

Tab. 1: Analýza obsahu pigmentu rostlin aklimovaných na různé ozáření. Hodnoty byly zjištěny spektroskopicky z extraktu z jehlic v 80% roztoku acetonu. Data značená stejným písmenem v řádku se signifikantně neliší. ($P > 0,05$)

	LL	NL	HL
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	$2,59 \pm 0,04^a$	$2,76 \pm 0,05^b$	$3,03 \pm 0,10^c$
Car/1000 Chl <i>a</i>	$261,6 \pm 4,7^a$	$265,3 \pm 3,2^a$	$365,4 \pm 15,4^c$

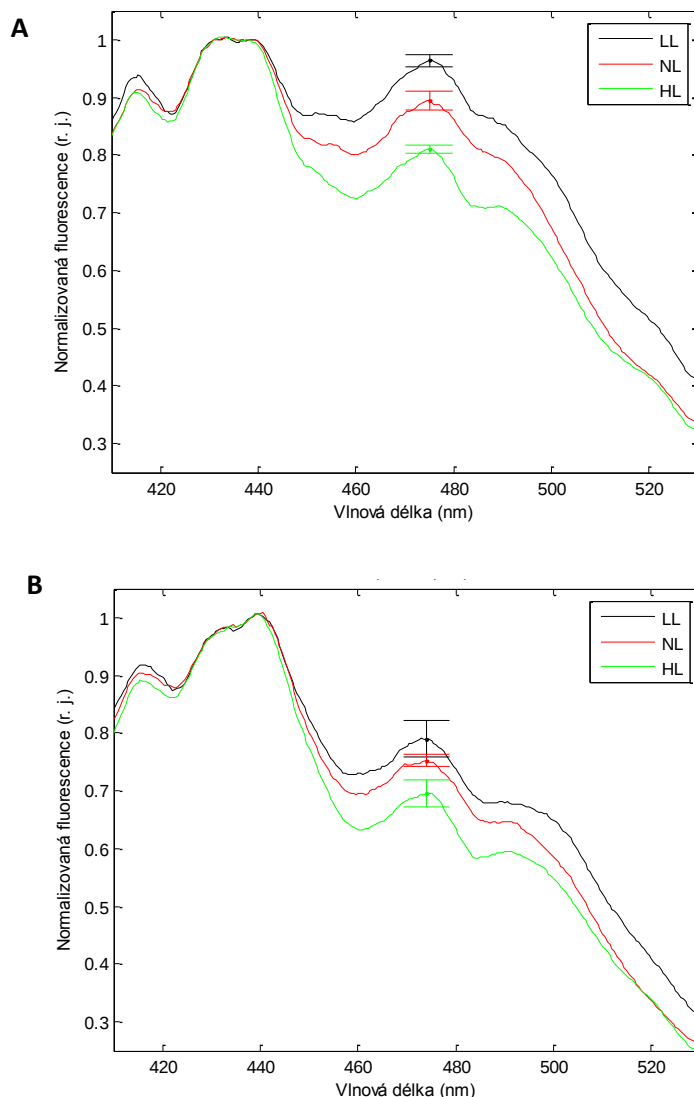
Ve fluorescenčních emisních spektrech při preferenční excitaci Chl *b* (476 nm) se emise PSII vyznačuje dvěma hlavními pásy – při 685 a 692 nm. Emise světlosběrné antény PSI (LHCI) se projevuje při 735 nm. U TM smrku je výraznější emise F695 než F685, což bylo pozorováno i na izolovaných superkomplexech PSII-LHCII z TM smrku. S rostoucí aklimační ozářeností roste podíl emise F685, což by mohlo být způsobeno větším množstvím LHCII nezapojených do přenosu excitační energie do RC PSII s emisí okolo 680 nm (F680) (**Obr. 10, Tab. 2**).



Obr. 10: Normovaná fluorescenční emisní spektra nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a měřených při 77 K. Excitace proběhla při vlnové délce 476 nm (preferenční excitace chlorofylu *b*). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů a standardní odchylky při vlnové délce 685 nm.

Excitační spektra mají v modré oblasti spektra dva hlavní pásy. U spekter PSII (detekce při 685 nm) to je pás Chl *a* s maximem v oblasti 432-438 nm (E436) a pás Chl *b* a Car s maximem v oblasti 472-476 nm (E476). Poměr E476/E436 klesá s rostoucí ozářeností. (**Obr. 11A, Tab. 2**) Tento jev naznačuje větší světlosběrné antény LHCII u rostlin aklimovaných na LL než u HL rostlin, protože Chl *b* a xantofyly jsou v PSII obsaženy právě v těchto komplexech. V excitačních spektrech PSII se ztelněji projevují Car, protože se podílejí více na excitaci PSII než PSI. Excitační spektra fluorescence PSI (detekce při 735 nm) vykazují pás Chl *a* při vlnové délce 430-440 nm (E440) a pás Chl *b* s maximem při 472-476 nm (E476). Tady dochází k zúžení a poklesu pásu v oblasti 460-490 nm, což způsobuje nižší obsah Chl *b* a

Car v PSI. Poměr E476/E436 (**Obr. 11B, Tab. 2**) klesá s rostoucí ozářeností a to naznačuje rovněž větší světlosběrné antény PSI u rostlin aklimovaných na LL než u NL a HL rostlin.

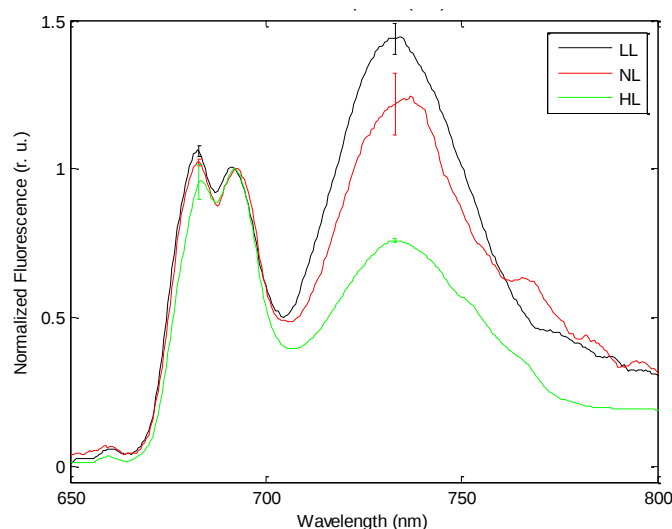


*Obr. 11: Normovaná fluorescenční excitační spektra nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea Abies*) a měřených při 77 K. Emise byla detekována při vlnové délce 685 nm (emise PSII) (**A**) a 735 nm (emise PSI) (**B**). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozářenost – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů a standardní odchylky při vlnové délce 475 nm.*

Tab. 2: Kvantitativní analýza emisních a excitačních spekter nerozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého. Data jsou získána z thylakoidní membrány smrku aklimovaného na různé intenzity ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Data značená stejným písmenem v řádku se výrazně neliší. ($P > 0,05$)

Poměr pásů	LL	NL	HL
F685/F695	$0,750 \pm 0,022^a$	$0,795 \pm 0,015^b$	$0,884 \pm 0,011^c$
F735/F695	$0,799 \pm 0,049^a$	$0,781 \pm 0,005^a$	$0,780 \pm 0,093^a$
PSII E476/E436	$0,964 \pm 0,010^a$	$0,895 \pm 0,017^b$	$0,811 \pm 0,007^c$
PSI E476/E436	$0,790 \pm 0,031^a$	$0,752 \pm 0,011^b$	$0,695 \pm 0,024^c$

Emisní spektra rozvolněných TM vykazují pásy o stejných maximech jako spektra nerozvolněných TM – F685, F692 a F735. Spektra rozvolněných a nerozvolněných TM ale se liší. U rozvolněných TM došlo k zvýšení poměrů F685/F695 a F735/F695 oproti nerozvolněným TM. Zvýšení obou poměrů, F685/F695 a F735/F695 (**Obr. 12, Tab. 3**), je znatelnější s klesající aklimační ozářeností, u HL vzorků jsou tyto změny nepatrné. Protože zvýšení poměru F685/F695 je doprovázeno posuvem maxima pásu F685 ke kratším vlnovým délkám na 684,5 nm, 684 nm a 683 nm pro HL, NL respektive LL vzorky, lze předpokládat, že zvýšení poměru F685/F695 nm je způsobeno zvýšenou emisí LHCI (F680) funkčně odpojených od PSII během rozvolnění TM. Maximum F735 zůstává stejné, ale výrazně se mění intenzita této emise vzhledem k emisi PSII. Tento efekt je rovněž výraznější u LL vzorků než u vzorků HL (**Obr. 12, Tab. 3**).

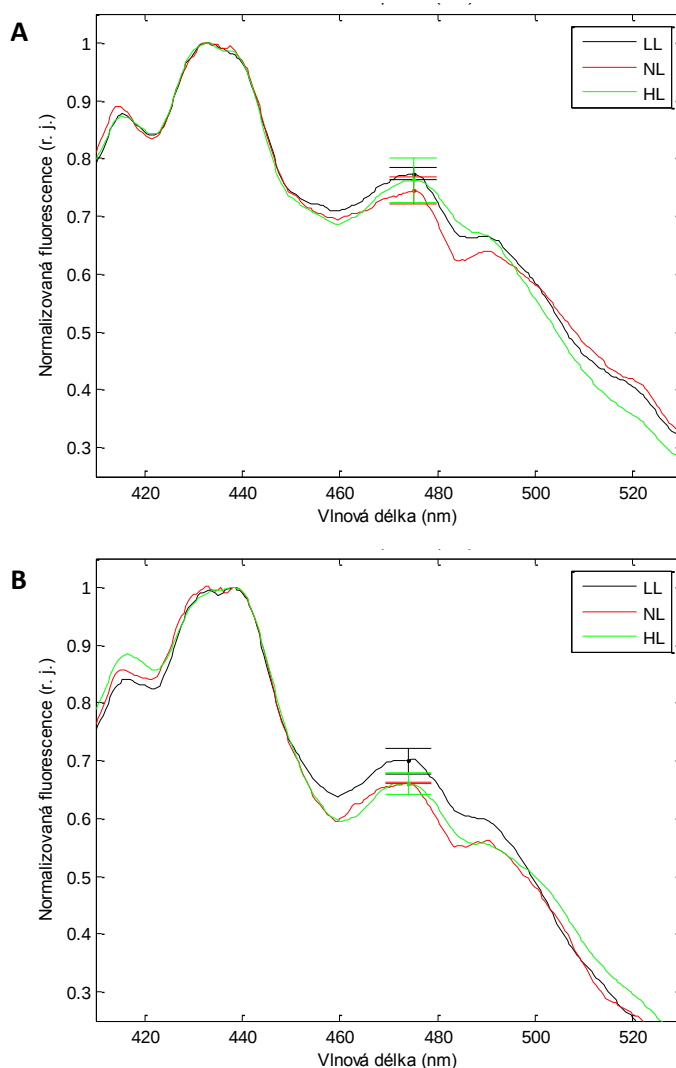


Obr. 12: Normovaná fluorescenční emisní spektra rozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) měřena při 77 K. Excitace proběhla při vlnové délce 476 nm (preferenční excitace Chl b). Semenačky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů a standardní odchylky při vlnové délce 685 nm.

Tab. 3: Kvantitativní analýza emisních a excitačních spekter rozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého. Data jsou získána z thylakoidní membrány smrku aklimovaného na různé intenzity ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Data značená stejným písmenem v řádku se výrazně neliší. ($P > 0,05$)

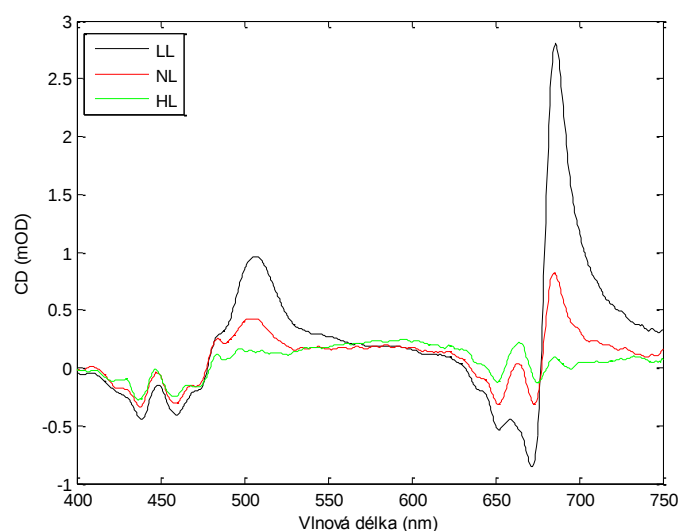
Poměr pásů	LL	NL	HL
F685/F695	$1,061 \pm 0,018^d$	$1,023 \pm 0,013^e$	$0,955 \pm 0,059^c$
F735/F695	$1,437 \pm 0,052^b$	$1,219 \pm 0,105^c$	$0,759 \pm 0,007^a$
PSII E476/E436	$0,789 \pm 0,004^d$	$0,753 \pm 0,027^d$	$0,774 \pm 0,034^{cd}$
PSI E476/E436	$0,700 \pm 0,022^c$	$0,661 \pm 0,001^d$	$0,660 \pm 0,018^{cd}$

Excitační spektra PSII i PSI rozvolněných TM se od spekter nerozvolněných TM tvarem příliš neliší. U excitačních spekter PSII rozvolněných TM došlo ke snížení pásu s maximem při 476 nm a hodnoty poměrů E476/E436 (**Obr. 13A, Tab. 3**) jsou podobné při všech intenzitách aklimační ozáření. Zúžení a pokles pásů 460-490 nm spekter na **Obr. 13B** není tak viditelné jako u nerozvolněných TM a množství světlosběrných antén PSI se příliš nemění u vzorků aklimovaných na různou intenzitu aklimační ozáření.



Obr. 13: Normovaná excitační spektra fluorescence rozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) měřena při 77 K. Emise byla detekována při vlnové délce 685 nm (emise PSII) (A) a 735 nm (emise PSI) (B). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozářenost – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů a standardní odchylky při vlnové délce 475 nm.

CD spektra se vyznačují charakteristickými pásy. Z CD signálu typu psi vychází pásy vyskytující se při vlnové délce (+) 685 nm, (-) 673 nm a (+) 505 nm. Méně intenzivní pásy (-) 650 nm, (-) 458 nm, (+) 448 nm a (-) 438 nm jsou excitonického původu.

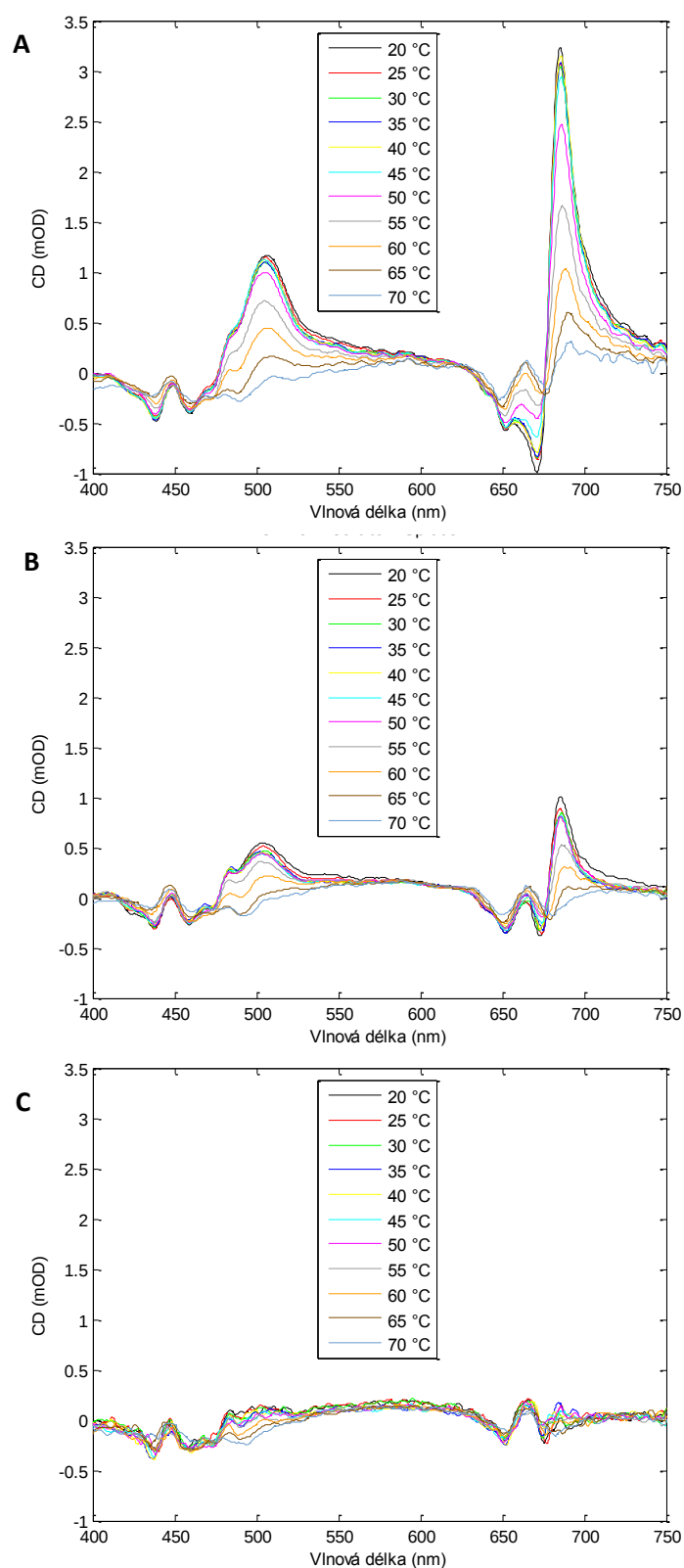


Obr. 14: Spektra cirkulárního dichroismu nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) ohřátých na 20° C. Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozářenost – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů normovaná na maximum absorpce chlorofylu a v červené oblasti spektra.

Tab. 4: Kvantitativní analýza spektrálních dat cirkulárního dichroismu nerozvolněných thylakoidních membrán. Data jsou získána z thylakoidních membrán jehlic smrku ztepilého aklimovaného na různé intenzity ozáření - LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká).

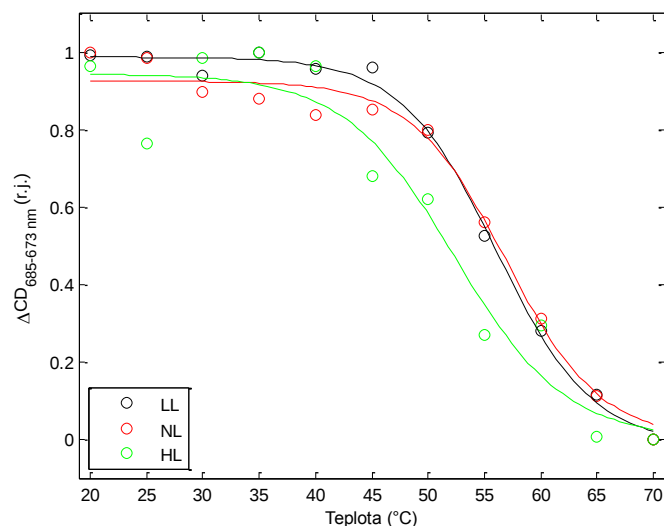
ozářenost	(+)685	(+)506	(+)690/(+)506	(+)690/(-)674
LL	2,82 ± 0,42	0,97 ± 0,21	2,95 ± 0,22	3,24 ± 0,05
NL	0,82 ± 0,16	0,43 ± 0,10	1,92 ± 0,07	2,62 ± 0,20
HL	0,11 ± 0,08	0,17 ± 0,03	0,65 ± 0,44	0,87 ± 0,70

CD pásy typu psi při 20° C jsou u CD spekter LL vzorků až několikanásobně větší než u CD spekter NL vzorků a mnohonásobně větší než u CD spekter HL vzorků (Obr. 14, Tab. 4). To značí rozdílnou organizaci superkomplexů v PSII a LHCII TM. HL vzorky mají velmi malou makro-organizaci PPC v TM, LL vzorky naopak největší.



Obr. 15: Spektra cirkulárního dichroismu nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) při postupném ohřevu. Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozářenost – LL (nízká) (A), NL (kontrolní) (B) a HL (vysoká) (C). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů normovaná na maximum absorpce chlorofylu a v červené oblasti spektra.

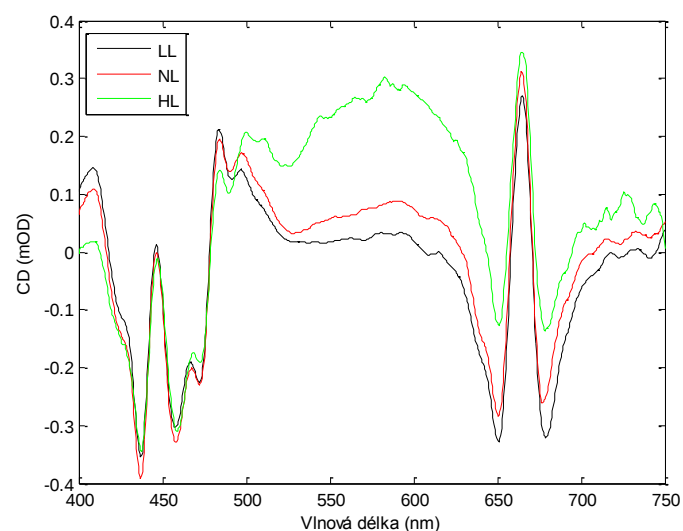
Při postupném ohřívání vzorku a zvyšování jeho teploty se snižují amplitudy CD pásů typu psi (**Obr. 15**), což je způsobeno tepelným rozpadem makro-organizace PPC v TM. Hodnota CD signálu typu psi značně klesá po 45° C. Pokles CD pásů typu psi je lépe viditelný na teplotních závislostech rozdílů amplitud pásů typu psi při 685 a 673 nm (**Obr. 16**). TM izolované z HL semenáčků smrku mají menší tepelnou stabilitu než LL a NL vzorky (**Obr. 16, Tab. 5**).



*Obr. 16: Teplotní závislosti CD pásů při (+) 685 nm a (-) 673 nm získané z nerozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého (*Picea abies*). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Jednotlivé body byly proloženy sigmoidální křivkou a hodnoty jsou průměrem tří na sobě nezávislých experimentů.*

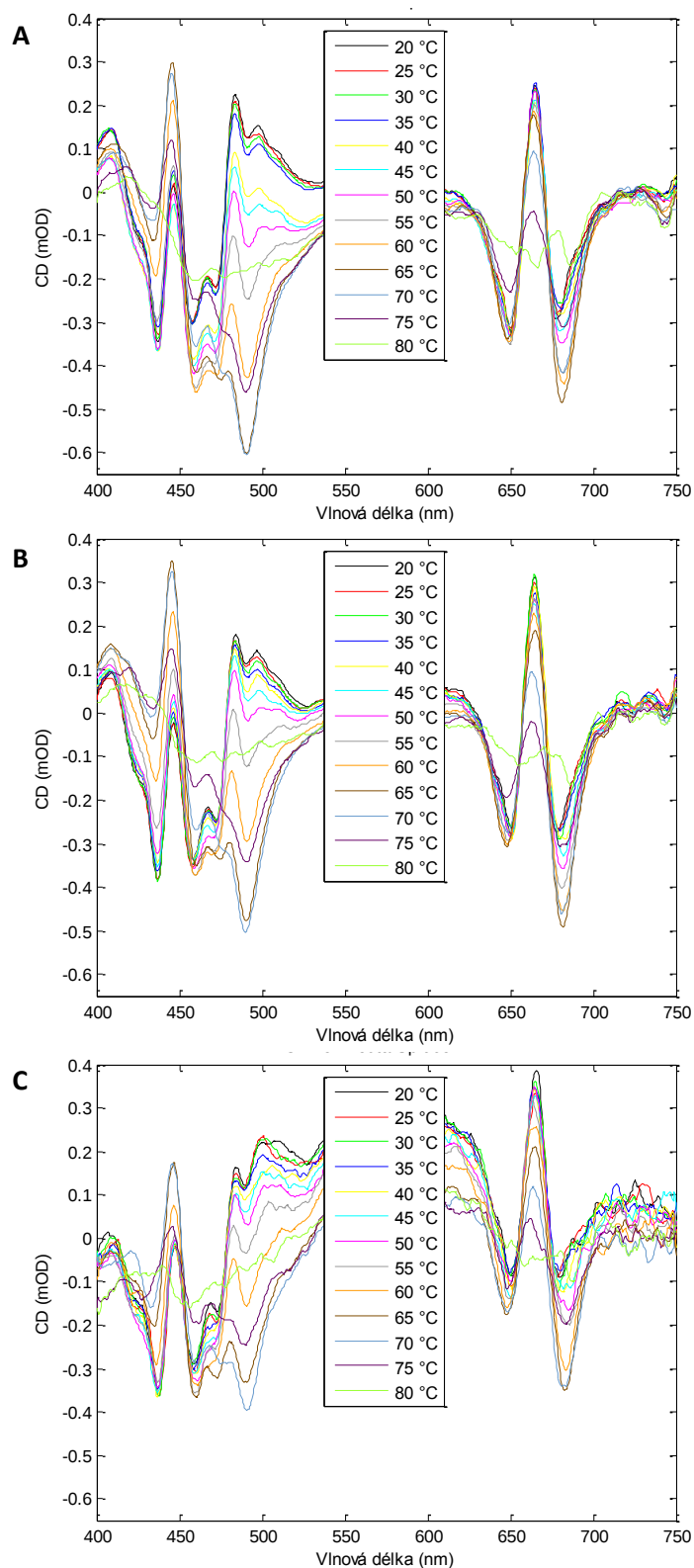
Na rozdíl od absorpčních spekter, CD spektra nerozvolněných a rozvolněných TM jsou odlišná, protože CD signál typu psi je výrazně závislý na dalekodosahovém uspořádání chromoforů (pigmentů), tedy na makro-organizaci PPC v TM (**Obr. 14, Obr. 17**).

CD spektra rozvolněných membrán měřených při 20° C u všech tří variant mají velice podobný tvar a amplitudy jednotlivých CD pásů u rozdílných spekter nabývají podobných hodnot (**Obr. 17**). Nejviditelnější rozdíl vykazuje oblast okolo 550-600 nm u CD spekter HL vzorků oproti spektrům NL a LL vzorků. Ten ale způsobuje pravděpodobně rozptyl, protože v této oblasti spektra se žádné výrazné excitonické pásy nevyskytují. CD signál typu psi, pocházející z organizovaných systémů chromoforů jako jsou PPC, skoro vymizel kvůli rozrušení makro-organizace PPC a nejzřetelnější jsou pásy excitonické, které vycházejí ze samostatných PPC - (-) 650 nm, (-) 458 nm, (+) 448 nm a (-) 438 nm. K těm navíc u CD spekter rozvolněných TM přibývají i pásy (-) 473 nm a (+) 493 nm, které jsou ve spektrech nerozvolněných TM nerozeznatelné z důvodu překryvu s intenzivnějšími CD pásy typu psi.



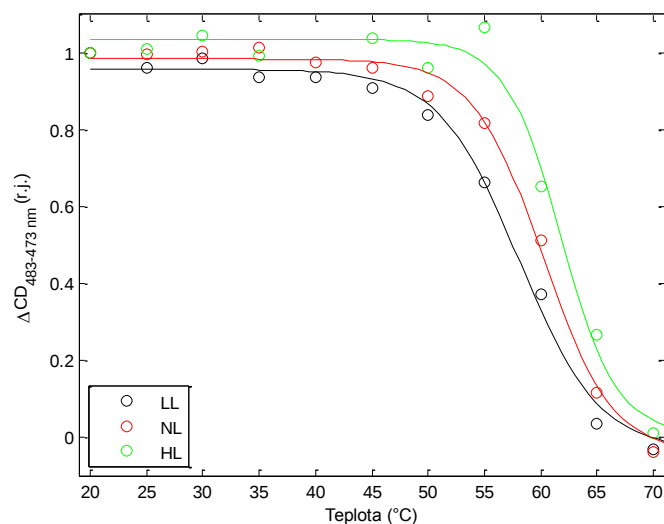
*Obr. 17: Spektra cirkulárního dichroismu rozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) ohřátých na 20° C. Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů normovaná na maximum absorpce chlorofylu *a* v červené oblasti spektra.*

Pás při 473 nm je charakteristický pro trimery LHCII. S postupným ohřevem se rozpadají na monomery. Monomerizace trimerů LHCII je viditelná z teplotních závislostí rozdílů amplitud příslušných excitonických pásů na **Obr. 19**. Pro monomery LHCII je charakteristický pás při vlnové délce 493 nm (**Obr. 18**). Největší amplitudu CD pásu, a tedy nejvíce monomerů rozložených z trimerů LHCII, má vzorek při 70° C. Po překročení této teploty se i monomery začínají rozpadat. Při 80° C ve vzorku už nezůstávají systémy, které by vyzařovaly CD signály, protože podléhají degradaci. K rozkladu trimerů LHCII dochází u HL vzorků při vyšších teplotách než u ML a LL vzorků (**Obr. 19, Tab. 5**). Pás při 650 nm pochází z interakce mezi Chl *a* a Chl *b* v LHCII.



Obr. 18: Spektra cirkulárního dichroismu rozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) při postupném ohřevu. Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká) (A), NL (kontrolní) (B) a HL (vysoká) (C). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů normovaná na maximum absorpce chlorofylu a v červené oblasti spektra.

Rozdíl amplitud excitonických pásů (-) 473 nm a (+) 483 nm je specifický pro trimery LHCII. Vymizení tohoto signálu značí monomerizaci LHCII. Data v tabulce 5 ukazují přechodovou teplotu a tím teplotní stabilitu trimerů LHCII. Při T_m se CD pás snížil na 50% své hodnoty při 20 °C. Nejnižší teplotní stabilitu trimerů LHCII mají LL vzorky (58,6 °C). Monomerizaci LHCII nejméně podléhají HL vzorky rozvolněných TM (61,1 °C).



Obr. 19: Teplotní závislosti CD pásů při (+) 685 nm a (-) 673 nm získané z nerozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého (*Picea abies*). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Jednotlivé body byly proloženy sigmoidální křivkou a hodnoty jsou průměrem tří na sobě nezávislých experimentů.

Tab. 5: Přechodová teplota (T_m) vybraných párů pásů typu psi a excitonických pásů rozvolněných a nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) aklimovaného na různé aklimační ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Data značená stejným písmenem v řádku se výrazně neliší. ($P > 0,05$)

CD signál (nm)	Původ	T_m (LL, °C)	T_m (NL, °C)	T_m (HL, °C)
685-730	psi-typ	55,1 ± 0,9 ^a	54,2 ± 1,0 ^a	51,3 ± 1,2 ^b
685-673	psi-typ	55,1 ± 0,9 ^a	54,5 ± 2,1 ^a	51,6 ± 0,6 ^b
505-550	psi-typ	57,7 ± 0,7 ^a	58,2 ± 0,2 ^a	56,8 ± 1,6 ^a
483-473	excitonický	58,6 ± 0,7 ^a	60,0 ± 0,6 ^b	61,1 ± 1,5 ^b

9 Diskuze

Schopnost měnit množství LHCI po aklimaci na LL a HL, která se projevuje změnou poměru Chl *a*/Chl *b*, nepřísluší všem suchozemským rostlinám. Tuto schopnost postrádají primitivní skupiny vyšších rostlin, např. mechorosty (Gerotto et al. 2011) nebo vývojově mladší plavuně (Ferroni et al. 2016). V předchozích studiích na zralých jehlicích smrku bylo prokázáno, že změny množství a velikosti LHCI ve fotosyntetickém aparátu nemusí být schopen ani smrk. (Kurasová et al. 2003; Štroch et al. 2008) Tato schopnost je naopak typická pro různé druhy krytosemenných rostlin (Bielczynski et al. 2016; Kouřil et al. 2013). Tato práce naznačuje, že změny v množství LHCI po aklimaci na různé intenzity světla probíhají i u mladých semenáčků smrku ztepilého. Toto můžeme prokázat změněným poměrem Chl *a*/Chl *b* (Tab. 1), což je viditelné i v absorpčních spektrech nerozvolněných a rozvolněných TM smrku (Obr. 9). Rovněž dochází k poklesu excitačních pásů Chl *b* a Car v nízkoteplotních excitačních spektrech fluorescence Chl *a* (Obr. 11). Pokles těchto pásů v oblasti 460 až 490 nm poukazuje na zmenšení světlosběrných antén s rostoucí intenzitou aklimační ozáření u PSII i PSI. Redukci LHCI také naznačuje klesající poměr CD pásů typu psi při (+) 505 nm a (+) 685 nm s rostoucí aklimační ozářeností (Obr. 15).

Aklimace na různé ozáření má vliv na makro-organizaci PPC v TM smrku. Sníženou makro-organizaci PPC demonstruje redukce CD signálu typu psi v CD spektrech nerozvolněných TM semenáčků smrku aklimovaných na vyšší hodnoty aklimační ozáření (Obr. 15C). Semenáčky smrku aklimované na HL nevykazují téměř žádný CD signál typu psi. To znamená, že dochází k téměř úplnému vymizení dalekodosahové organizace PSII-LHCI superkomplexů a LHCI v TM semenáčků smrku aklimovaných na HL. Podobný jev, při kterém se intenzita CD signálu typu psi snižovala se zvyšující se intenzitou aklimační ozáření, byl pozorován i u ječmene. Amplitudy CD signálu typu psi dosahovaly ale výrazně vyšších hodnot při všech intenzitách aklimační ozáření oproti smrku.

O změnách v organizaci PPC v TM vypovídá i teplotní stabilita. Největší teplotní stabilitou se vyznačují LL vzorky nerozvolněných TM (Obr. 16). Jejich přechodová teplota T_m je přibližně o 4 °C vyšší v červené oblasti spektra a přibližně o 1 °C v zelené oblasti spektra než ta HL vzorků (Tab. 5). Teplotní závislost CD spekter vzorků rozvolněných TM ukazuje, že teplotní stabilita trimerů LHCI je nejvyšší u HL vzorků, přibližně o 3° C vyšší než u LL vzorků (Tab. 5).

V přítomnosti kationtů NaCl a MgCl₂ jsou LHCI těsně propojeny s PSII v granálních TM (Kirchhoff et al. 2007). Následkem je intenzivní emise fluorescence z PSII (Obr. 10). Pokud ale kationty v roztoku chybí, nastane rozvolnění granálních TM a následné rozrušení laterální organizace PSII a LHCI v granálních thylakoidech. PPC TM, zejména PSII, LHCI a PSI, jsou poté uspořádány náhodně (Kirchhoff et al. 2007). Tato změna uspořádání způsobuje přelévání energie z LHCI na PSI, které dokazuje zvýšená emise z PSI (Obr. 12). Téměř totožná nízkoteplotní emisní spektra nerozvolněných a rozvolněných TM izolovaných z HL semenáčků smrku ukazují velmi malou segregaci PPC jak v granální, tak stromální TM *in vivo*.

10 Závěr

Hlavním cílem práce bylo popsat vliv aklimační ozáření na organizaci pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně smrku ztepilého. Proto byly provedeny experimenty na thylakoidních membránách izolovaných ze semenáčků smrku s využitím spektroskopických metod. Semenáčky byly aklimovány na různou aklimační ozáření (nízká - LL, kontrolní - NL, vysoká - HL). Výsledkem jsou absorpční, fluorescenční (emisní a excitační) spektra a spektra cirkulárního dichroismu. Tyto spektra naznačují závislost velikosti světlosběrné antény fotosystému II, ale i fotosystému I, na intenzitě aklimační ozáření. Ta se projevuje 1) zvýšeným poměrem chlorofylu *a*/chlorofylu *b*, 2) poklesem excitačních pásů chlorofylu *b* a karotenoidů v nízkoteplotních excitačních spektrech fluorescence chlorofylu *a* a 3) klesajícím poměrem CD pásů typu psi při (+) 505 nm a (+) 685 nm s rostoucí aklimační ozáření. Vysoká aklimační ozáření způsobuje téměř úplné vymizení makro-organizace pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně smrku, která se v CD spektrech projevuje výraznou redukcí CD pásů typu psi. U vzorků této aklimační ozáření byla v emisních spektrech odhalena i velmi malá funkční segregace pigment-proteinových komplexů v granální a stromální thylakoidní membráně oproti semenáčkům smrku aklimovaných na LL a NL. U semenáčků aklimovaných na vysokou ozáření byla pozorována snížená teplotní stabilita makro-organizace pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně, přestože stabilita světlosběrných komplexů fotosystému II v trimerní formě byla naopak větší. Toto může být způsobeno několika faktory. Výzkum se proto zabývá otázkou souvislosti mezi poměrem lipidů a proteinů, zastoupením jednotlivých lipidových tříd či mastných kyselin v thylakoidní membráně a stabilitou makro-organizace pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně nebo odolností vůči oxidativnímu stresu při vysoké ozáření a teplotě. Navíc vědecké studie týkající se využití obnovitelných zdrojů nabývají v současné době na důležitosti kvůli rychle se zvyšující spotřebě energie. Fosilní paliva jsou jako hlavní zdroj energie neudržitelná a problémem je i rostoucí koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře. Specifickou roli jako obnovitelný zdroj má solární energie, protože dopadající světelná energie na zemský povrch převyšuje současné požadavky na energii několikanásobně. Na základě přírodního procesu, při kterém právě fotosyntetické organismy mají schopnost efektivně pohlcovat, využít a uchovat solární energii prostřednictvím přeměny na energii chemickou, může podstatný příspěvek k výrobě energie v průmyslu pocházet z modifikovaných fotosyntetických organismů nebo umělých zařízení pro konverzi sluneční energie. Rostliny mají oproti umělým systémům vyvinuty vysoce sofistikované adaptační mechanismy, které jim umožnily přežít v průběhu evoluce za stresových podmínek. Pochopení těchto mechanismů může přispět k vývoji stabilnějších umělých systémů pracujících na bázi fotosyntézy.

Výsledky této práce jsou součástí vědeckého článku připravovaného pro publikaci v mezinárodním impaktovaném časopise *Photosynthesis Research*.

Seznam použité literatury

ANDRIZHIYEVSKAYA, E. G., A. CHOJNICKA, J. A. BAUTISTA, B. A. DINER, R. VAN GRONDELLE a J. P. DEKKER. Origin of the F685 and F695 fluorescence in Photosystem II. *Photosynthesis research*. 2005, 84, s. 173-180.

BABICOVÁ, M. Vliv organizace pigment-proteinových komplexů na účinnost přenosu a využití excitační energie. Diplomová práce. Ostravská univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Martin Čajánek, Ph. D.

BARBER, J. a W. KÜHLBRANDT. Photosystem II. *Current Opinion in Structural Biology*. 1999, 9, s. 143-157.

BIELCZYNSKI, L. W., SCHANSKER, G. a CROCE, R. Effect of Light Acclimation on the Organization of Photosystem II Super- and Sub-Complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2016.00105. ISSN 1664-462x.

BOUDIERE, L., et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*. 2014, 1837, s. 470-480.

CAFFARI, S. a další. Differential accumulation of Lhcb gene products in thylakoid membranes of *Zea mays* plants grown under contrasting light and temperature conditions. *Proteomics*. 2005, 5, s. 758-768.

CROCE, R. a H. VAN AMERONGEN. Light-harvesting and structural organization of photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane. 2011, 104, s. 142-153.

DEKKER, J. P. a E. J. BOEKEMA. Supramolecular organization of the thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*. 2005, 1706, s. 12-39.

DEKKER, J. P. a E. J. BOEKEMA. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*. 2005, 1706, s. 12-39.

FERRONI, L., SUORSA, M., ARO, E.-M., BALDISSEROTTO, C. a PANCALDI, S. Light acclimation in the lycophyte *Selaginella martensii* depends on changes in the amount of photosystems and on the flexibility of the light-harvesting complex II antenna association with both photosystems. *New Phytologist*. 2016, 211(2), 554-568. DOI: 10.1111/nph.13939. ISSN 0028646x.

GARAB, G. a VAN AMERONGEN, H. Linear dichroism and circular dichroism in photosynthesis research. *Photosynthesis Research*. 2009, 101(2-3), 140-144.

GARAB, G., B. UGHLY a R. GOSS, NAKAMURA, Y. a Y. LI-BEISSON (eds.). Lipids in Plant and Algae Development. *Springer International Publishing*. 2016.

GEROTTO, C., ALBORESI, A., GIACOMETTI, G. M., BASSI R. a MOROSINOTTO, T. Role of PSBS and LHCSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature. *Plant, Cell & Environment*. 2011, 34(6), 922-932. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02294.x. ISSN 01407791.

GOSS, R. a LEPETIT, B. Biodiversity of NPQ. *Journal of Plant Physiology*. 2015, 172, s. 13-28.

HIEBER, A. D., BUGOS, R. C. a YAMAMOTO, H. Y. Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000, 1482(1-2), 84-91. DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00141-2. ISSN 01674838.

HOLUBOVÁ, I. Vliv teploty a světla na aktivitu xantofylového cyklu. (Analýza variability odezvy u vybraných druhů rostlin). Diplomová práce. Ostravská univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Vladimír Špunda, CSc.

HOLZWARTH, AR, Y. MILOSLAVINA, M. NILKENS a P. JAHNS. Identification of two quenching sites active in the regulation of photosynthetic light-harvesting studied by time resolved fluorescence. *Chem Phys Lett*. 2009, 483, s. 262-267.

HORTON, P. a AV RUBAN. Regulation of photosystem II. *Photosynth Res*. 1992, 34.

HORTON, P., WENTWORTH M. a RUBAN, A.. Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Letters*. 2005, 579(20), 4201-4206. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.07.003. ISSN 00145793.

JAHNS, Peter a Alfred R. HOLZWARTH. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012, 1817(1), 182-193. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.04.012. ISSN 00052728.

JOHNSON, M. a A. V. RUBAN. Restoration of Rapidly Reversible Photoprotective Energy Dissipation in the Absence of PsbS Protein by Enhanced ΔpH . *Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286(22), 19973-19981. DOI: 10.1074/jbc.M111.237255. ISSN 0021-9258.

KIRCHHOFF, H., HAASE, W., HAFERKAMP, S., SCHOTT, T., BORINSKI, M., KUBITSCHKE, U. a RÖGNER, M. Structural and functional self-organization of Photosystem II in grana thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2007, 1767(9), 1180-1188. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.05.009. ISSN 00052728.

KOUŘIL, R., E. WIENTJES, J. B. BULTEMA, R. GROCE a E. J. BOEKEMA. High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, 1827, s. 412-417.

KOUŘIL, R., L. NOSEK, J. BARTOŠ, E. J. BOEKEMA a P. ILÍK. *Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant group - break up of current dogma*. 2016, 210, s. 808-814.

KOZÁROVÁ, I. Strukturní analýza proteinových komplexů fotosyntetického aparátu rostlin pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Roman Kouřil, Ph. D.

KRUMOVA, S. B., C. DIJKEEMA, P. WAARD, H. GARAB, H. VAN AMERONGEN a H. VAN AS. Phase behavior of phosphatidylglycerol in spinach thylakoid membranes as revealed by ³¹P-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Biomembranes*. 2013, 1778 (4), s. 997-1003.

KURASOVÁ, I., KALINA, J., ŠTROCH, M., URBAN, O., ŠPUNDA, V. Acclimation of two distinct plant species, spring barley and Norway spruce, to combined effect of various irradiance and CO₂ content concentration during cultivation in controlled environment. *Photosynthetica*. 2003, 41:513-523

LICHTENTHALER, H. K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids - Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Method Enzymol* 148:350-382

MERZLYAK, M. N., CHIVKUNOVA, O. B., ZHIGULOVA, T. V., NAQVI, K. R. (2009). Light absorption by isolated chloroplasts and leaves: effects of scattering and 'packing'. *Photosynth Res* (2009) 102:31-41

MIZUSAWA, N. a H. WADA. *Biochimica Et Biophysica Acta: Bioenergetics*. 2012, 1817, s. 194-208.

NELSON, N. a C. F. YOCUM. Structure and Function of Photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*. 2006, 57, s. 521-565.

NOSEK, L. (2012) Usage of 2D-CN/SDS-PAGE for determination of changes in pigment-protein complexes from thylakoid membranes of stressed plants. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci.

PAGLIANO, C., S. BARERA, F. CHIMIRRI, G. SARACCO a J. BARBER. Comparison of the α and β isomeric forms of the detergent n-dodecyl-D-maltoside for solubilizing photosynthetic complexes from pea thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*. 2012, 1817, s. 1506-1515.

PAVLOVIČ, A. a Ľ. SLOVÁKOVÁ. *Fotosyntéza*. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyziológie rastlín. Bratislava, 2015, s. 13-15, 42-47.

PTÁČKOVÁ, B. Studium vlivu teplotního stresu na strukturní organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně vyšších rostlin pomocí cirkulárního dichroismu. Diplomová práce. Ostravská univerzita. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Mgr. Václav Karlický.

SESTŘENKOVÁ, J. Indukce tepelné disipace excitační energie ve fotosystému II při krátkodobém působení zvýšené teploty a nadměrné ozáření u vybraných druhů vyšších rostlin. Bakalářská práce. Ostravská univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Vladimír Špunda, CSc.

SOUKUPOVÁ, J. a K. ROHÁČEK. *Fluorescence, fotosyntéza a stres: Jak to spolu souvisí?* Ústav fyzikální biologie JU, AVČR, 2003, s. 14.

ŠTROCH, M. a další. Regulation of the excitation energy utilization in the photosynthetic apparatus of chlorina f2 barley mutant grown under different irradiances. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2004, 75, s. 41-50.

ŠTROCH, M., KULDOVÁ, K., KALINA, J. a ŠPUNDA, V. Dynamics of the xanthophyll cycle and non-radiative dissipation of absorbed light energy during exposure of Norway spruce to high irradiance. *Journal of Plant Physiology*. 2008, 165(6), 612-622 DOI: 10.1016/j.jplph.2007.03.013. ISSN 01761617

TEPLÁ, Milada. *Biochemie - vzdělávací portál: Fotosyntéza* [online]. Dostupné také z: <http://studiumbiochemie.cz/fotosynteza.html>

UMENA, Y., K. KAWASAKI, J. R. SHEN a N. KAMIYA. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9. *Nature*. 2011, 473, s. 55-60.

Seznam použitých zkratk

A	anteraxantin
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenostintrifosfát
A _L	levo točivé polarizované světlo
A _P	pravo točivé polarizované světlo
Car	karotenoidy
CD	cirkulární dichroismus
<i>clo</i>	clorina f2
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DGDG	digalaktosyl-diacylglycerol
FAR	fotosynteticky aktivní radiace
HL	vysoká ozáření
<i>Chl a</i>	chlorofyl a
<i>Chl b</i>	chlorofyl b
<i>Chls</i>	chlorofyly
LHC	světlosběrný komplex
LHC I	světlosběrný komplex fotosystému I
Lhca1-4	světlosběrné proteiny obsažené v LHCI
Lhcb1-6	světlosběrné proteiny obsažené v LHCI
LHC II	světlosběrný komplex fotosystému II
LL	nízká ozáření
MGDG	monogalaktosyl-diacylglycerol
NADPH ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NADPH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NL	kontrolní ozáření
NPQ	nefotochemické zhášení
OEC	kyslík uvolňující komplex

P	fosfát
P680	reakční centrum fotosystému II
P700	reakční centrum fotosystému I
pC	plastocyanin
PG	fosfatidyl-glycerol
pH	vodíkový exponent
PPC	pigment-proteinový komplex, pigment-proteinové komplexy
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
psi	polymer-salt induced
pQ	plastoquinon
pQH ₂	plastochinol
Q _A	primární chinonový akceptor PSII
Q _B	sekundární chinonový akceptor PSII
Q _R	redukční místo
RC	reakční centrum
ROS	potenciálně škodlivé reaktivní formy kyslíku
SQDG	sulfochinovosyl-diacylglycerol
TM	thylakoidní membrána
UV	ultrafialové
V	violaxantin
VDE	violaxantin deepoxidáza
WT	wild type
Z	zeaxantin
ZE	zeaxantin epoxidáza

Seznam obrázků

Obr. 1: Struktura glykolipidů v thylakoidní membráně.

Obr. 2: Pohled ze stromální strany na strukturu PSI.

Obr. 3: Strukturní model PSII C₂S₂M₂ superkomplexu.

Obr. 4: Chemická struktura chlorofylu a a b.

Obr. 5: Zobrazení struktury proteinů v PSII superkomplexech.

Obr. 6: Model NPQ znázorňující strukturní změny LHCII superkomplexu.

Obr. 7: Chemická struktura pigmentů, které se účastní VAZ cyklu.

Obr. 8: Spektra cirkulárního dichroismu thylakoidních pigmentů hrachu na různých úrovních organizace.

Obr. 9: Absorpční spektra nerozvolněných (A) a rozvolněných (B) thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) měřených v rozsahu 350-750 nm.

Obr. 10: Normovaná fluorescenční emisní spektra nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) a měřených při 77 K.

Obr. 11: Normovaná fluorescenční excitační spektra nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea Abies) a měřených při 77 K. Emise byla detekována při vlnové délce 685 nm (emise PSII) (A) a 735 nm (emise PSI) (B).

Obr. 12: Normovaná fluorescenční emisní spektra rozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) měřena při 77 K.

Obr. 13: Normovaná excitační spektra fluorescence rozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) měřena při 77 K. Emise byla detekována při vlnové délce 685 nm (emise PSII) (A) a 735 nm (emise PSI) (B).

Obr. 14: Spektra cirkulárního dichroismu nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) ohřátých na 20° C.

Obr. 15: Spektra cirkulárního dichroismu nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) při postupném ohřevu. Semenáčky smrku ztepilého byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká) (A), NL (kontrolní) (B) a HL (vysoká) (C).

Obr. 16: Teplotní závislosti CD pásů při (+) 685 nm a (-) 673 nm získané z nerozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého (Picea abies).

Obr. 17: Spektra cirkulárního dichroismu nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) ohřátých na 20° C.

Obr. 19: Teplotní závislosti CD pásů při (+) 685 nm a (-) 673 nm získané z nerozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého (Picea abies).

Seznam tabulek

Tab. 1: Analýza obsahu pigmentu rostlin aklimovaných na různé ozáření.

Tab. 2: Kvantitativní analýza dat emisních a excitačních spekter nerozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého.

Tab. 3: Kvantitativní analýza dat emisních a excitačních spekter rozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého.

Tab. 4: Kvantitativní analýza spektrálních dat cirkulárního dichroismu nerozvolněných thylakoidních membrán.

Tab. 5: Přechodová teplota (T_m) vybraných párů pásů typu psi a excitonických pásů rozvolněných a nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (Picea abies) aklimovaného na různé aklimační ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká).