

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Matěj Semerák

**Samoregulační mechanismy fotosyntetických systémů**  
**Self-regulating mechanisms of photosynthetic systems**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Mančal, PhD.

Praha 2013

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli, dr. Tomáši Mančalovi, za zadání zajímavého tématu práce, dále za poskytnutí literatury, rady a konzultace.

Také děkuji dr. Lukáši Fischerovi za důležité opravy textu a připomínky a doc. Heleně Lipavské za ochotnou administrativní pomoc.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 16. května 2013

## Použité zkratky

BChl	bakteriochlorofyl
Car	karotenoid
Chl	chlorofyl
hECN	hydroxyechinenon
LHC	light-harvesting complex, světlosběrný komplex
Lut	lutein
Neo	neoxantin
NPQ	non-photochemical quenching, nefotochemické zhášení
OCP	orange carotenoid protein, oranžový karotenoidy vázající protein
OEC	oxygen-evolving complex, kyslík vyvíjející komplex
P680	označení pro reakční centrum fotosystému II
PS	fotosystém
PQ	photochemical quenching, fotochemické zhášení
qE	energy-dependent quenching, zhášení závislé na energii
qI	photoinhibitory quenching, fotoinhibice
RC	reakční centrum
Vio	violaxantin
Zea	zeaxantin

## Abstrakt

Fotosyntéza, pochod využívající energie dopadajících fotonů k pohonu elektrontransportního řetězce tvořícího membránový gradient pH, je v přírodě rozšířeným způsobem obživy. Intenzita slunečního záření však může překročit míru, již jsou organismy schopny svými aparáty zvládnout. Za této situace přicházejí na řadu nezbytné ochranné mechanismy, bezpečně odvádějící přebytečnou energii.

Teorií o podstatě a regulaci těchto funkcí již bylo vypracováno mnoho a nové se stále objevují. Zdá se, že pozornost se soustřeďuje především na anténní komplex LHClI. Lze konstatovat, že ochranu s velkou pravděpodobností zajišťuje více mechanismů, přičemž panuje poměrně ustálený názor, že klíčovou roli v jejich spouštění hraje klesající pH. To je logické, neboť čím více fotonů přichází, tím intenzivněji probíhá transport protonů přes membránu, čili velikost  $\Delta\text{pH}$  odráží rovnováhu mezi mírou spotřeby ATP a osvětlením membránového aparátu.

Obecně se fenomén nazývá NPQ (nefotochemické zhášení), protože zeslabuje fluorescenci chlorofylu. Významnou úlohu zastávají patrně karotenoidy, hlavně zeaxantin, vznikající v kyselém prostředí činností violaxantin deepoxidasy; poskytuje chlorofylům energetickou past při excitačních interakcích. Dochází i ke konformačním změnám (zejm. proteinu PsbS), fosforylaci fotosystémů a dalším procesům.

## Klíčová slova

fotosyntéza, disipace energie, ochrana před nadměrným ozářením, nefotochemické zhášení, fluorescence chlorofylu

## **Abstract**

Photosynthesis, a process utilising energy of arriving photons for driving electron transport chain creating transmembrane pH gradient, is a widespread way of subsistence in the nature. However, the intensity of sunlight can exceed the rate which the organisms are able to manage by their gadgetry. In this situation, essential protective mechanisms, safely draining the excess energy away, take a turn.

Many theories about the principle and regulation of these functions have been developed and new still arise. It appears that the attention focuses mainly on the antenna complex LHCII. It is possible to state that with high probability, the protective processes are assured by several mechanisms, and quite a stable opinion prevails that crucial role in their activation is played by decreasing pH. That is logical since the more photons come, the more intensively the transport of protons across the membrane happens, thus  $\Delta\text{pH}$  reflects the balance between ATP usage and the membrane apparatus illumination.

Generally, the phenomenon is called NPQ (non-photochemical quenching), because it weakens the chlorophyll fluorescence. An important task is probably handled by carotenoids, mainly zeaxanthin, created by violaxanthin deepoxidase at low pH; it provides chlorophylls with energetical trap during excitation interactions. Conformational changes (particularly of PsbS protein), photosystem phosphorylation and some other processes occur, too.

## **Key words**

photosynthesis, energy dissipation, photoprotection, non-photochemical quenching, chlorophyll fluorescence

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Fotosyntetický aparát.....	2
2.1. Archebakterie.....	2
2.2. Eubakterie.....	2
2.2.1. Anoxygenní skupiny.....	2
2.2.2. Oxygenní skupiny.....	3
2.3. Eukaryota.....	3
3. Reakční centra a anténní komplexy.....	6
4. Stres nadměrným ozářením.....	7
4.1. Fotoinhibice.....	7
4.2. Fluorescence chlorofylu.....	8
4.3. Co je to NPQ?.....	9
4.3.1. Metody studia.....	9
5. Ochranné mechanismy.....	11
5.1. Tvorba zeaxantinového kationtového radikálu.....	11
5.2. Car ↔ Chl přenos excitonu.....	12
5.3. Úloha PsbS proteinu.....	12
5.4. Změny konformací a uspořádání v membráně.....	13
5.5. Chl-Chl interakce.....	14
5.6. Fosforylace proteinů PSII.....	15
5.7. Role cytochromu b559.....	15
5.8. A co sinice?.....	16
5.9. Diskuse a závěr.....	17
6. Nastínění fyzikálního modelu.....	19
7. Seznam použité literatury.....	20

# 1. Úvod

Fotoautotrofní organismy (zelené řasy, sinice, většina vyšších rostlin, některé bakterie) získávají energii a látky pro svůj vývoj fotosyntézou, při níž je energie fotonů slunečního záření přeměňována na energii chemických vazeb. Nezbytným substrátem pro průběh tohoto děje je voda (případně podobná molekula), dodávající protony ( $H^+$ ). Díky speciálním vlastnostem chlorofylů, feofytinů, karotenoidů a dalších molekul se při absorpci záření vhodných vlnových délek vytváří protonový gradient mezi membránou oddělenými prostory fotosyntetizujících struktur. Toto nerovnoměrné rozmístění protonů (čili  $\Delta pH$ ) umožňuje pohon rotačního enzymu ATP-syntázy (známé jako  $F_0F_1$ ). Tvorbou ATP končí tzv. primární (nepřesně světelná) fáze fotosyntézy, další děje – fixace  $CO_2$  do molekul cukrů – se označují jako sekundární (nepřesně temnostní). V dalším textu se zaměříme na primární procesy.

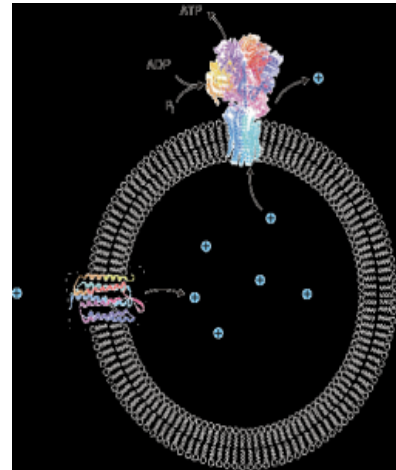
Funkce fotosyntetického aparátu netkví jen v samotném sběru a přeměně sluneční energie; vzhledem k ohromným změnám intenzity osvětlení v průběhu roku a – zejména – během dne musely fotosyntetické organismy vyvinout spolehlivé samoregulační mechanismy, které by jejich membránové aparáty ochránily před poškozením nadměrným ozářením, ale zároveň za nepřítomnosti slunečních podmínek zbytečně nebránily využití omezeného přísunu fotonů. Tento požadavek logicky klade přísné nároky na schopnost zmíněného ústrojí pružně a co nejrychleji reagovat na změnu světelných podmínek. Mechanismy nalézané v přírodě takovou schopnost mají, což mimo jiné umožnilo fotosyntetickým organismům osídlit rozličná prostředí od tropů až po polární oblasti. Dodnes není zcela jasné, jak tato samoregulace funguje a kolik mechanismů se na ní podílí; cílem rešerše bylo shrnout a utřídit dosavadní poznatky o této problematice.

## 2. Fotosyntetický aparát

Jak už bylo nastíněno v úvodu, fotoautotrofně se na Zemi vyživují různé typy organismů; jak prokaryota, tak eukaryota. V této části velmi stručně charakterizujeme jejich fotosyntetická ústrojí, zejména zdůrazníme hlavní rozdíly mezi nimi.

### 2.1. Archebakterie

Někteří zástupci archebakterií, prastaré prokaryotické říše, provozují zvláštní anoxygenní pochod, využívající bakteriorodopsinu coby protonové pumpy (Obr. 1). Tato membránová molekula má schopnost při osvětlení přenášet protony přes membránu; koncentrační spád potom pohání ATP-syntázu, jak to známe i u dalších skupin organismů. Příznačná pro archaea je neexistence membránového elektrontransportního řetězce [Marriott a Blankenship 2012].



Obr. 1 – schema funkce bakteriorodopsinu některých archebakterií; převzato z: <http://www.biotech.tu-dresden.de/cms/index.php?id=194>

### 2.2. Eubakterie

Mezi fotosyntetické zástupce eubakterií patří různorodé organismy; probíhá u nich řetězový přenos elektronů, jejich dárcovské molekuly se však liší. S tím souvisí fakt, že jen některé bakterie vyvíjejí kyslík.

#### 2.2.1. Anoxygenní skupiny

Heliobakterie, zelené (bez)sirné a purpurové (bez)sirné bakterie kyslík neuvolňují. Mnozí zástupci navíc obývají výhradně bezkyslíkatá prostředí (ale jiní naopak kyslík snášejí/potřebují) [Meyer a Cusanovich 2003; Azai a kol. 2010]. V membráně mají zabudován jeden typ reakčního centra; buď železosirné, nebo chinonové.

Asi nejprostudovanější skupinou jsou purpurové bakterie. Společným znakem jejich RC je využití párů bakteriochlorofylů – molekul schopných excitace světlem a tzv. fotooxidace. To znamená, že molekula BChl ztratí elektron. Přijat je bakteriofeofytinem a následně chinonem (Q). Ten, takto redukován, naváže z okolní cytoplasmy proton.



Mezitím je do RC dodán cytochromem nový elektron, takže může znovu proběhnout fotooxidace. Chinon přijme tento další elektron a z okolí druhý proton a cestuje na periplasmatickou stranu membrány, kde protony uvolní a elektrony dodá cytochromu [Mančal 2011]. Vzniká tedy membránový gradient pH, využívaný ATP-syntázou.

U některých skupin vystupují jako zdroj elektronů (pro redukci koenzymů NAD<sup>+</sup>) sulfidy, případně jiné sirmé sloučeniny či síra sama, u některých zástupců organické molekuly [Marriott a Blankenship 2012]. Tyto látky poskytují elektrony cytochromům [Kaprálek 1986].

### **2.2.2. Oxygenní skupiny**

Sinice vyvíjejí kyslík díky unikátní schopnosti čerpat elektrony z vody. Na rozdíl od předchozích kmenů mají dvě membránová reakční centra (jedno chinonové, druhé železosirmé) [Marriott a Blankenship 2012]. Mezi nimi probíhá pomocí různých přenašečů elektronový transport, završený redukcí NADP<sup>+</sup> pomocí dalšího komplexu; opět je generován rozdíl koncentrace H<sup>+</sup> mezi oběma stranami membrány. Oxygenní fotosyntéza bude blíže popsána v následující podkapitole.

## **2.3. Eukaryota**

Nejmohutnějšími a bezpochyby nejznámějšími fotosyntetickými organismy jsou rostliny; život na Zemi by bez nich nebyl možný. Fotoautotrofně se však vyživují i někteří zástupci dalších skupin říše eukaryot – např. řasy nebo krásnoočka. Ústředím fotosyntézy jsou u těchto organismů chloroplasty, podle endosymbiotické teorie původně samostatně žijící prokaryotní buňky sinicového typu (v případě sekundární endosymbiosy došlo k pohlcení již fotosyntetizujícího eukaryota).

Chloroplasty vykazují specifickou stavbu. Tyto oválné organely o typické délce cca 5 μm mají kromě dvou vnějších membrán, vymezujících úzký mezimembránový prostor, ještě složitý systém vnitřních struktur – thylakoidů – obklopených stromatem. Thylakoidy jsou ploché disky s vnitřním prostorem, zvaným lumen, často na sebe nasedající a tvořící tzv. grana; nepřisedlé části se označují jako stromatální. V membráně thylakoidů je konečně umístěn vlastní fotosyntetický aparát, sestávající z několika komplexů.

Zaměříme se nyní na tzv. necyklický přenos elektronů: Začneme na komplexu

s trochu překvapivým názvem fotosystém II (PSII). Jeho kostru tvoří heterodimer bílkovin  $D_1$  a  $D_2$ , poblíž jehož středu se nacházejí dva chlorofyly  $a$ . Tato tetrapyrolová porfyrinová barviva s konjugovanými dvojnými vazbami jsou energií dopadajícího záření (v tomto případě je nejdelší účinnou vlnovou délkou cca 680 nm) excitována a fotooxidována: Jeden elektron přeskočí přes molekulu chlorofylu  $a_2$  a feofytin na plastochinon  $Q_A$ , nacházející se ve velkém množství v membráně. Z tohoto primárního akceptoru poté putuje na chinon  $Q_B$ . Když se proces odehraje podruhé, vznikne  $Q_B^{2-}$ . Tento anion se následně neutralizuje přijetím dvou protonů z vodného prostředí stromatu, čímž vytváří plně redukovaný plastochinol  $Q_BH_2$  (též plastohydrochinon). Ten cestuje ke druhému membránovému komplexu (cytochromu  $b_6f$ ), kde se reoxiduje na chinon; při tom se na luminální stranu uvolní protony a další mobilní přenašeč, plastocyanin, může přijmout jeden z přivezených elektronů [Blankenship 2002 (1)].

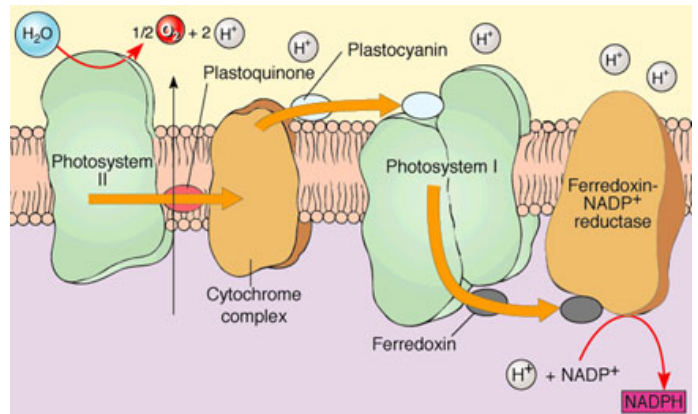
Chlorofyly v RC každou fotooxidací přijdou o elektron; doplňuje jim ho tzv. kyslík vyvíjející komplex (OEC – oxygen-evolving complex). Tato struktura provádí úkon, který nemá v přírodě obdoby – oxiduje vodu. Tento jedinečný pochod jí umožňují čtyři vázané ionty manganu, schopné změn mocenství. Když tyto poskytnou ve svém redukovaném stavu chlorofylům postupně čtyři chybějící elektrony (přeskokem přes tyrosin bílkoviny  $D_2$ ), jsou schopny několikasupňovým mechanismem katalyzovat roztržení dvou molekul vody za vzniku molekulárního  $O_2$  a čtyř vodíkových protonů (uvolněnými elektrony se Mn opět redukuje, takže proces se může opakovat). Pro funkci OEC jsou nezbytné také ionty  $Ca^{2+}$  a asi i  $Cl^-$  [Blankenship 2002 (2)].

Počet přenesených protonů je dále zvýšen tzv. chinonovým cyklem. Při něm jeden z elektronů uvolněných z  $Q_BH_2$  redukuje (přímo v rámci komplexu  $b_6f$ ) další chinon; pokud k tomu dojde dvakrát, opět vznikne (po přijetí dvou protonů ze stromatu) chinol, schopný redukovat molekulu plastocyaninu. Ten přenáší elektron – prostřednictvím redukce měďnatého iontu – k fotosystému I (PSI) [Šetlík 2011].

PSI je druhou strukturou absorbující světlo; v jeho reakčním centru opět nalezneme chlorofyly. Ty se energií fotonů o vlnových délkách věsměs kratších než cca 700 nm fotooxidují a elektron přeskočí (přes několik dalších molekul, např. fylochinon či železosírné ferredoxiny X, A a B) na ferredoxin Fd. Ten jej přeneše na membránový enzym NADP<sup>+</sup>-reduktasu. Přijetím dvou takovýchto elektronů a navíc protonu z okolí vzniká

molekula NADPH. Dodávku chybějících elektronů má PSI zajištěnu plastocyaninem.

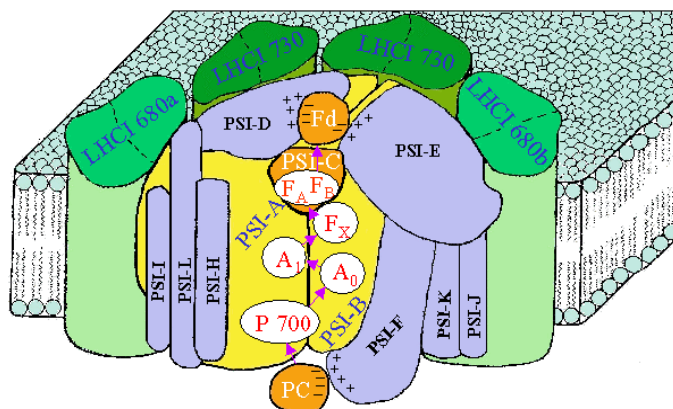
Popsaný proces, necyklický řetězec (Obr. 2), není jediný možný. Existuje i přenos cyklický, kdy buď ferredoxin nepřenesse elektron na reduktasu, nýbrž tento putuje zpět na cytochrom b<sub>6</sub>f a účastní se chinonového cyklu [Voet 1995], nebo se elektron dokonce (činností enzymu NAD(P)H-dehydrogenasy) vrátí na plastochinon z NADPH [Joët a kol. 2002]. Na jednu molekulu vody, stojící na začátku, se necyklickým přenosem elektronů teoreticky vytvoří rozdíl 6 protonů mezi stranami membrány; vzniklý spád jejich koncentrace pohání ATP-syntázu. Enzym využívá cca 4 protonů k výrobě 1 ATP; poměr se mezidruhově liší podle počtu podjednotek F<sub>0</sub> části syntázy [Berry a Rumberg 1996].



Obr. 2 - schema necyklického přenosu elektronů na thylakoidních membránách; převzato z: <http://163.16.28.248/bio/activelearner/08/ch8c2.html>

### 3. Reakční centra a anténní komplexy

Ve fotosystémech I a II hraje bezpochyby hlavní roli pár chlorofylů (viz výše); pokud by však byl jedinou strukturou absorbující světlo, docházelo by k zachycení fotonu jen velmi zřídka a rostlina by trpěla nedostatkem energie. Proto kromě reakčních center (jádra fotosystémů) zastávají klíčovou úlohu i tzv. světlosběrné antény (LHC - light-harvesting complexes), což jsou obklopující ústrojí, která přijímají energii fotonů a předávají ji chlorofylovému páru. Jeden fotosystém mívá několik (i různých) antén (Obr. 3).



Obr. 3 – struktura fotosystému I; převzato z: <http://www.staff.uni-mainz.de/vschmid/labeng.htm>

Složení světlosběrných komplexů se u různých organismů liší; LHC proteiny vážou různá barviva, většinou karotenoidy a – opět – chlorofyly, tvořící důmyslnou strukturu [Pascal a kol. 2005]. Po zachycení fotonu těmito molekulami řádově převyšuje doba života jejich excitovaného stavu (jednotky ns) čas potřebný k přeskočení energie do reakčního centra [Mančal 2011], proto je takový proces vůbec možný a využívaný. Účinnost přenosu karotenoid → chlorofyl navíc dosahuje přes 70 % [Holt a kol. 2003], přičemž coby jeho mechanismus je tradičně zmiňována Försterova rezonance.

Asi nejznámější anténa – LHCI, vyskytující se nejčastěji kolem jádra PSII – je trimerem obsahujícím (u zelených rostlin) chlorofyly *a* i *b*, luteiny, neoxantin a violaxantin. Kromě ní obklopují střed fotosystému ještě tři menší komplexy (CP24, 26 a 29); mimo violaxantin vážou i zeaxantin a strukturou jsou pravděpodobně blízké LHCI [Marin a kol. 2010]. Složení dimerických LHCI – antén PSI – je též do značné míry obdobné, liší se však absencí neoxantinu a naopak přítomností  $\beta$ -karotenu. V rámci fotosystému I se někdy vyskytují i komplexy LHCI [Schmid 2008].

Bakteriální antény využívají karotenoidů spolu s bakteriochlorofyly [Wormit a kol. 2009]; antény sinic označujeme jako fykobilisomy a tvoří je tzv. biliproteiny, většinou fykoerythrin, fykocyanin a allofykocyanin, s navázanými barvivy (biliny) s absorpcí v různých vlnových délkách [Grossman a kol. 1993].

## 4. Stres nadměrným ozářením

Potíže nastávají, když elektrontransportní řetězec nestíhá odvádět energii z PSII – pak může dojít k fotoinhibici (qI). Ta je již dlouho známa; zahrnuje rozličná poškození membránových aparátů [Jones a Kok 1966] jako např. ničení OEC [Henmi a kol. 2004] či oxidativní změny bílkoviny D<sub>1</sub>, součásti kostry PSII [Aro a kol. 1993], následované její proteolýzou. Každopádně výkon fotosyntézy klesá.

### 4.1. Fotoinhibice

Lumen thylakoidů je přirozeně kyselější než stroma, nicméně rozdíl patrně nenabývá závratných hodnot – pH uvnitř se ve dne běžně pohybuje kolem 6 oproti cca 8 vně [Kramer a kol. 1999]. OEC je nadměrnou kyselostí lumina (pH < 5,5) vyřazován z funkce: Možná od něj oddisociují vápenaté kationty, nezbytné pro jeho funkci [Krieger a Weis 1993], každopádně však OEC (zatím ne zcela vyjasněným mechanismem) přestávají být drženy u PSII. Jako volné je potom zřejmě poškozují kyslíkové radikály [Henmi a kol. 2004]. Ty mohou vznikat zejména v PSII (viz dále), ale zřejmě i jinde [Hideg a kol. 2008]; jejich působením trpí i další struktury, např. i membránové lipidy.

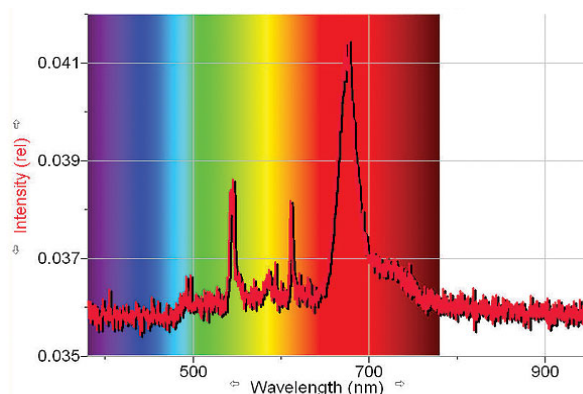
Lze rozlišovat dva svou podstatou se lišící typy qI: na straně dárce elektronů a na straně příjemce (tzv. donor side versus acceptor side photoinhibition). První případ nastane při již zmíněném poškození OEC (už nerozkládá vodu, nedodává elektrony do reakčního centra), druhý je navozen poruchou přenosu elektronu mezi centrem a feofytinem [Demeter a kol. 1987]. Problém patrně spočívá ve vytváření stabilních protonovaných Q<sub>A</sub><sup>-</sup>H<sup>+</sup> při zahlcení řetězce (když neprobíhá přeskok Q<sub>A</sub> → Q<sub>B</sub>): Za této situace totiž neutrální molekula chinonu repulsně nezabrání dlouhotrvajícímu ustavení dvojice Chl<sup>+</sup> a Pheo<sup>-</sup> a následný návrat elektronu na Chl; ten v takovém případě snadno zaujímá tripletový stav. Tento v přítomnosti vzdušného kyslíku může dát vzniknout singletovému <sup>1</sup>O<sub>2</sub> s jeho neblahými důsledky zejména pro protein D<sub>1</sub> [Vass a kol. 1992].

Rostliny (zejm. C<sub>3</sub>) se do jisté míry fotoinhibici brání též nežádoucí fotorespirací [Wingler a kol. 2000]; procesem, během něž se kvůli oxygenasové aktivitě enzymu RUBISCO ztrácí uhlík, fixovaný v cukrech, ve formě CO<sub>2</sub>. Fotorespiraci kromě přílišného ozáření napomáhá i snížená koncentrace kyslíčnicku ve vzduchu (enzym místo něj použije

dostatkového  $O_2$  coby substrátu). Zdánlivě jednoznačně nežádoucí proces (kromě spotřeby uhlíku se ještě navíc plýtvá ATP) však zajišťuje odbyt energie, což je v situacích zahlcení elektrontransportního řetězce redukovánými přenašeči potřeba. V dalším textu se ovšem fotorespirací zabývat nebudeme; pomineme také stáčení listů nebo přeskupování chloroplastů ve stínu versus na plném světle [Han a kol. 2013] a soustředíme se na chemické a fyzikální děje probíhající uvnitř vlastního fotosyntetického aparátu (s důrazem na rostlinný).

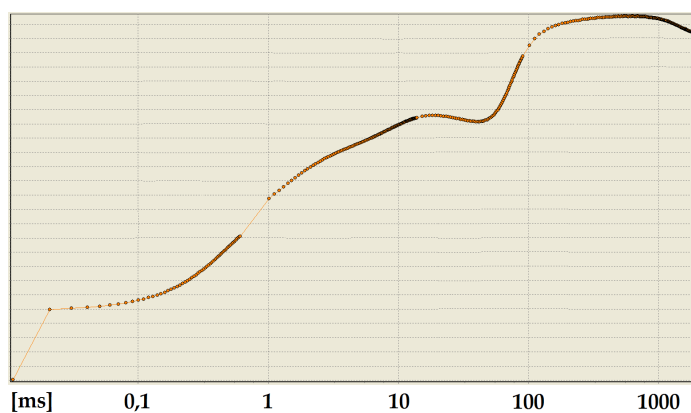
## 4.2. Fluorescence chlorofylu

Ve výzkumu fotosyntézy mají klíčový význam měření chlorofylové fluorescence. Jak vidno (Obr. 4), její maximum se nachází v červené oblasti (cca 680 nm). Již dlouho se ví, že zajímavý je zejména její časový průběh např. při výzkumu listů: V přitnutí má minimální hodnotu  $F_0$  (veškerý nízký příkon pohání fotochemické děje); při zapnutí světla běžné intenzity nejdříve cca 1 s vzrůstá a dosahuje maxima (Obr. 5)  $F_m$ , pak ovšem opět slábne [Kautsky a Hirsch 1931].



Obr. 4 – spektrum fluorescence chlorofylu; převzato z: [http://www.vernier.com/images/innovate/fluorescence\\_large.jpg](http://www.vernier.com/images/innovate/fluorescence_large.jpg)

Tyto fluorescenční změny z různých důvodů nepozorujeme u PSI; jsou za ně zodpovědné procesy probíhající v rámci PSII. Pravděpodobně zejména proto, že redukováný plastochinon  $Q_A$  repulsními silami brání přenosu elektronu z chlorofylu na feofytin, případně působí jeho návrat na Chl, který jeho excitaci vyzáří. Naproti tomu značné rozdíly redoxních potenciálů PSI a jeho elektronových příjemců (vedle jejich větší vzdálenosti od reakčního centra) zpětný tok neumožňují [Blankenship 2002 (3)].



Obr. 5 – vývoj fluorescence chlorofylu během první sekundy (tzv. OJIP křivka); vlastní měření (praktikum z fyziologie rostlin)

Prvotní nárůst lze tedy vysvětlit redukcí molekul  $Q_A$ : P680 již nemají příjemce, chlorofyly se zase deexcitují (do doby, než elektron přeskočí na  $Q_B$ , nabývá reakční centrum tzv. uzavřeného stavu); následný pokles jednak souvisí s fotoaktivací enzymů sekundární fáze a zrychlením elektrontransportního řetězce (tzv. fotochemické zhášení, PQ), jednak je způsoben tzv. NPQ.

### 4.3. Co je to NPQ?

Nefotochemickým zhášením (NPQ – zkratka non-photochemical quenching) chlorofylové fluorescence se obecně nazývá fenomén disipace části dopadající sluneční energie při jejím přebytku. Zahrnuje zejména tzv. qE (energy-dependent quenching). Jak název napovídá, při qE se výtěžek fluorescence chlorofylu snižuje [Müller a kol. 2001]. Kromě toho se mění její spektrum [Krüger a kol. 2012]; měření a kvantifikaci umožňují i posuny ve spektru absorpčním [Lavaud a Lepetit 2013].

PQ i NPQ mají tedy na fluorescenci negativní vliv; při výzkumech je potřeba oba příspěvky odlišit. To je možné díky specifickému průběhu spektroskopických měření.

#### 4.3.1. Metody studia

NPQ se nejčastěji měří právě zmíněnou fluorescenční spektroskopií. Metoda je založena na základní myšlence, že excitační energie může být buď využita k vlastní fotosyntéze, nebo je disipována jako teplo (viz dále), nebo chlorofylem zpětně vyzářena. Jestliže se tedy zvýší podíl tepelné složky při zachování zhruba stejné rychlosti fotochemie, musí fluorescence klesnout.

Nejdříve je potřeba zjistit základní parametry: Při stanovování  $F_m$  se užívá krátkých vysokoenergetických pulsů, které uzavřou všechny PSII, ale nestihnou vyvolat žádné zhášení [Maxwell a Johnson 2000]. Doba trvání fluorescence je pak velmi malá (několik ns). Klíčovým rysem je, že při náhlém osvětlení temnotně adaptovaného stavu vykazují systémy vyšší hodnoty  $F_m$  než při aplikaci záření na stav přizpůsobený normálnímu světlu (tehdy funguje NPQ; hodnotu označujeme s čarou). Platí vztah

$$\text{NPQ} = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$$

Hodnota  $F_0$  (která se do vzorce pro výpočet NPQ většinou nezahrnuje) se experimentálně

stanovuje užitím velmi slabého záření,  $F_m$  je zjištěna následným silným zábleskem.  $F'_m$  se měří stejně intenzivním pulsem, ale na pozadí běžného osvětlení PAR (photosynthetic active radiation) [Betterle a kol. 2009]. Přirozeně vidíme, že čím menší bude hodnota  $F'_{mv}$ , tím víc vzroste NPQ.

Fluorescence však nestačí, chceme-li zjistit, jaké látky se na zhášení podílejí. S úspěchem se zde využívá Ramanovy spektroskopie. Ta je založena na nepružném rozptylu fotonů při kontaktu s látkou. Po srážce může mít foton buď vyšší (častější, tzv. Stokesův rozptyl), nebo nižší (tzv. anti-Stokesův rozptyl) energii než před ní; to závisí na tom, jak interaguje s molekulárními vibračními stavy, přičemž vibrační spektrum každé molekuly je jedinečné. V jednoduchých systémech je tedy možné se dopátrat chemického složení zkoumané látky; technika má však i svá úskalí, např. se musí odstínit řádově převažující pružný (tzv. Rayleighův) rozptyl [Mojzeš a kol. 2011]. Při výzkumu NPQ (a fotosyntézy vůbec) Ramanova spektroskopie umožňuje např. detekci různých xantofylů ve fotosystémech.



## 5. Ochranné mechanismy

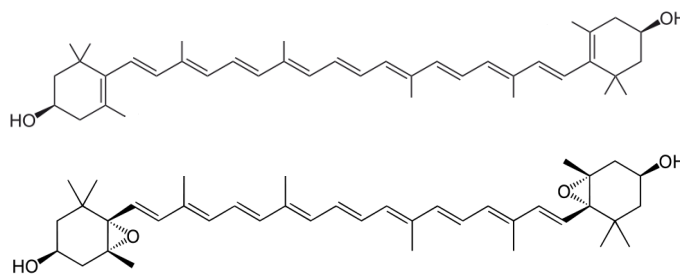
Jednotlivé procesy, k nimž v rámci qE dochází, ještě nejsou zcela objasněny. Existující teorie, na něž se nyní podíváme, se někdy nevylučují, jindy naopak překvapivě ostře navzájem popírají.

### 5.1. Tvorba zeaxantinového kationtového radikálu

Za podmínek intenzivního osvětlení, při klesajícím pH v lumen thylakoidů, se v rámci tzv. xantofylového cyklu aktivuje enzym deepoxidující violaxantin (přes antheraxantin) na zeaxantin [Li a kol. 2004]; ten se snadněji ionizuje. V malých CP anténách se snad energie disipuje tak, že dopadajícím zářením excitovaný heterodimer Chl-Zea dá za méně než 1 ps vzniknout iontovým radikálům  $\text{Chl}^{\bullet-}$  a  $\text{Zea}^{\bullet+}$  s dobou života cca 150 ps; po této době dojde k vyrovnání náboje (charge recombination) [Holt a kol. 2005].

Zdá se, že zmíněný dimer Chl-Zea je ve skutečnosti trimerem (Zea s dvěma vzájemně pevně vázanými Chl), přičemž radikál vzniká z celého Chl-Chl přijetím elektronu od Zea. Možná že laděním vzdálenosti mezi chlorofyly v tomto dimery (nebo změnami jiných faktorů) rostliny umějí ovlivňovat jeho redukční potenciál a tím účinnost vzniku iontů, čili nastavovat míru CP zhášení [Ahn a kol. 2008].

Tvorba Zea (Obr. 6) z jiných xantofylů je pro tyto pochody nutná, jak prokázaly pokusy s rostlinami s poškozeným genem pro violaxantin deepoxidasu [Havaux a Niyogi 1999]:



Obr. 6 – zeaxantin (nahore) a violaxantin (dole);  
upraveno podle: [http://en.wikipedia.org/wiki/Zeaxanthin\(Violaxanthin\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Zeaxanthin(Violaxanthin))

Tyto se nedokážou účinně bránit nadměrnému přísunu energie a trpí např. lipoperoxidací thylakoidních membrán. V normálních thylakoidech se cca 40 % CP antén podílí na výše uvedených dějích; ustavuje se rovnováha mezi disipativním a nedisipativním stavem. Čím více Zea je přítomno, tím víc se poměr posune ve směru zhášení [Avenson a kol. 2008].

Popsané procesy samozřejmě nejsou izolované od okolí; patrně je vyvolává protein PsbS, součást PSII (viz dále). Tento možná změnou své konformace za nízkého pH ovlivňuje vazbu ve výše zmíněném chlorofylovém dimery [Ahn a kol. 2008].

## 5.2. Car ↔ Chl přenos excitonu

V komplexech LHCII spolu interagují karotenoidy (xantofyly), nacházející se v tzv.  $S_1$  konfiguraci, a chlorofyly ve stavu označovaném jako  $Q_y$ . Jejich spřažení do heterodimeru je provázeno vznikem dvou nových, společných elektronových stavů, z nichž jeden leží níže a druhý výše než oba původní. Nižší hladina může účinně sloužit jako energetická past, produkující teplo na úkor fotochemie. Vznik párů Car-Chl skutečně probíhá především za podmínek vysokého ozáření; pro posílení jejich tvorby je však opět nezbytný protein PsbS (viz dále) a napomáhá jí též zvýšená hladina Zea [Bode a kol. 2009].

Energie se přenáší účinně a oběma směry (Car → Chl i Chl → Car) za situací, kdy hladiny  $S_1$  a  $Q_y$  leží podobně vysoko – excitace Car pak vždy způsobí excitaci Chl a naopak; větší energetický rozdíl logicky vede k převaze přeskoků ve směru vyšší → nižší. Dochází k tzv. excitonovému štěpení, přičemž jeho trvání je limitováno životností stavu zúčastněného karotenoidu [Liao a kol. 2010] a závisí také na tom, o který interagující xantofyl (a jaký jeho izomer) se jedná [van Amerongen a van Grondelle 2001].

Ač se často zdůrazňuje především role Zea, není vyloučeno, že Vio by k těmto procesům mohl přispívat ještě účelněji; jeho  $S_1$  hladina totiž neleží o tolik níže vůči  $Q_y$  [Polívka a kol. 1999], což by mělo svědčit pro usnadnění excitační interakce.

## 5.3. Úloha PsbS proteinu

Již v předchozích statích jsme na tuto čtyřikrát membránou procházející bílkovinu narazili. V rámci PSII zřejmě zastává funkci senzoru pH thylakoidního lumen (ukazatele míry fotochemie), a to prostřednictvím svých dvou symetricky umístěných glutamátů; ty se v kyselých podmínkách protonují [Li a kol. 2004].

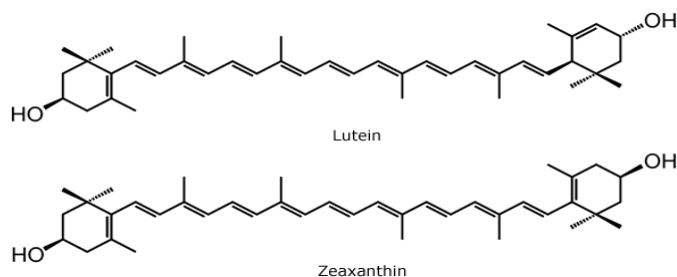
PsbS je schopen vázat dvě molekuly Zea (nikoli však Vio). Předpokládá se, že právě zmíněné přijetí protonů změní konformaci proteinu a umožní tuto vazbu *in vivo*; to vyvolá disipační děje související se Zea. Oba xantofyly navíc vykazují vzájemné excitační interakce [Aspinall-O'Dea M. a kol. 2002]. Některé studie ovšem naopak vazbu PsbS-Zea popírají a sázejí na vliv protonovaného PsbS na konformaci okolí [Bonente a kol. 2008]. Umístění tohoto proteinu však není jednoznačné. Navíc bylo zjištěno, že se často vyskytuje dimericky, přičemž s klesajícím pH se vratně rozpadá v monomery; ty se vážou na LHCII, což naznačuje, že se zde zřejmě podílejí na qE [Bergantino a kol. 2003].

Jeden ze způsobů, jakým by to mohly dělat, nabízí disociační teorie: Protonované monomery vyvolají odvázaní antén LHCII od center PSII [Kereiche S. a kol. 2010]. To zní poněkud přímočařeji, než že by PsbS ovlivňoval vzdálenost mezi chlorofyly v CP komplexech, nicméně na izolovaných CP bylo pozorováno, že oproti studiím *in vivo* mají tyto cca 80krát utlumenu qE aktivitu [Avenson a kol. 2008]. Těžko však říct, zda příčina skutečně tkví právě v nepřítomnosti PsbS, nebo v něčem jiném. Každopádně mutantní rostliny bez PsbS se do jisté míry fotoinhibici bránit umějí, ovšem na intenzivní světlo reagují mnohem pomaleji než *wild type*. Zřejmě mají problémy s příliš rigidní strukturou PSII [Johnson a Ruban 2010].

## 5.4. Změny konformací a uspořádání v membráně

Je možné, že snížení pH lumina thylakoidů má za následek ovlivnění konformace alespoň některých LHC; trimery LHCII (a pravděpodobně i CP24) v takové situaci přestanou být drženy u reakčního centra a uspořádají se do vlastních shluků, v nichž by účinněji docházelo k rozdělování a disipaci nadměrné energie. Vzniku těchto struktur by mohl (kromě PsbS proteinu, zmíněného výše) napomáhat Zea [Johnson a kol. 2011]. Brání mu naopak antimycin A, čímž lze vysvětlit podstatu jeho známého inhibičního účinku na qE. Výtěžek fluorescence klesá agregací o 60 až 90 % a její maximum se posouvá od cca 680 nm do cca 700 nm [Horton a kol. 1991].

Díky Ramanově spektroskopii se zjistilo, že během qE dochází v LHCII (snad také kvůli okyselení prostředí) k deformaci molekuly Neo; ta by mohla v důsledku vést k přiblížení Chl a luteinu (Obr. 7), přičemž právě přenos excitační energie Chl → Lut(S<sub>1</sub>) by byl odpovědný za zhášení. Standardní doba života excitovaného Chl (zhruba 1 ns) je při tom cca 7,5násobně zkrácena [Ruban a kol. 2007]. Tato hypotéza sice přímo nevyvrací např. roli Zea, zpochybňuje však jeho nezbytnost při qE. Na roli luteinů poukazují i některá fluorescenčně spektroskopická měření; i podle nich by mělo docházet k tvorbě párů Lut-Chl, provázené vzájemnými excitačními interakcemi [Krüger a kol. 2012].



Obr. 7 – struktury Lut a Zea jsou si nesmírně blízké; převzato z: <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Lutein>

Přepínání (ne)disipativních stavů LHCII, ať už je zapříčiněno čímkoli, bylo podloženo i teoretickými modely; bylo spočítáno, že potenciálová jáma odpovídající nefotochemické konformaci je obecně mělčí a plošší než minimum představující stav světlosběrný, ale při okyselování prostředí se jejich hloubky vyrovnávají a i strmost disipační jámy se zvětšuje, v důsledku čehož 2,3krát vzroste četnost přechodů do této ochranné konformace [Valkūnas a kol. 2012]. To je zcela ve shodě s experimenty i s prostou úvahou o zvýšené potřebě qE při nízkém pH. Existují patrně čtyři stavy, jichž LHCII může nabývat – dva světlosběrné a dva disipační, přičemž nízké pH a přítomnost Zea a PsbS upřednostňují později zmíněné [Krüger a kol. 2012]. Z konformace I při slabém ozáření se systém rychle dostává do tzv. stavu III, deepoxidace Vio → Zea má po několika minutách za následek ustavení plně disipativního stavu IV; uspořádání II značí situaci, kdy pH lumina již stoupl, ale stále je přítomen Zea [Horton a kol. 2005].

Ke zhášení dochází také při měření za hydrostatického stlačení. Objem LHCII se sice sníží i za tlaku normálního při zaujetí disipativní konformace, ale řádově méně; mechanismus změny je tedy v obou případech evidentně jiný [van Oort a kol. 2007], nicméně myšlenka role zmenšování antény při qE zní pochopitelně velmi přijatelně.

## 5.5. Chl-Chl interakce

Fluorescence Chl má při měření krátkými intenzivními pulsy běžně trvání cca 3 ns. Jak již bylo zmíněno výše, trimery LHCII se během qE shlukují; toto uspořádání uvedenou dobu několikanásobně zkracuje a přebytek Zea ji dále snižuje až na cca 280 ps. Navíc oligomerizace pronikavě zesiluje výtěžek v daleké červené oblasti, což bylo přisouzeno vzniku mezitrimerických kontaktů Chl-Chl, schopných přenosu excitonu. Zřejmě částečně dochází i k ionizaci těchto dvojic, tzn. vztahům dárce-příjemce; podle [Miloslavina a kol. 2008] se však zdá, že nevznikají žádné Chl radikály, jelikož tyto by nebyly fluorescenčně pozorovatelné (žádnou fluorescenci nevykazují).

Nedostí na tom; spektrofotometricky bylo navíc zjištěno, že během zhášení se neobjevují excitované karotenoidy (jejich charakteristické absorpční spektrum totiž nebylo pozorováno), tudíž jediným možným probíhajícím procesem je výše zmíněná Chl-Chl interakce [Müller a kol. 2010]. Zde se objevuje příkrý rozpor s rozšířeným a již tradičním pojetím karotenoidů coby původců qE.

## 5.6. Fosforylace proteinů PSII

Změny ozáření (de)aktivují v chloroplastech (dosud ne zcela vyjasněnými způsoby, souvisejícími s redoxními ději během elektronového transportu) kinasu proteinů PSII. Výrazný vliv na spuštění enzymu má zřejmě interakce s komplexem  $b_6f$ , a to za situace, kdy redukované plastochinoly přicházejí rychleji, než je zmíněný cytochromový komplex schopen je reoxidovat [Vener a kol. 1997]; udržení aktivního stavu by také nějakým způsobem mohly napomáhat kyslíkové radikály [Breitholtz a kol. 2005].

Fosforylovány jsou proteiny LHCII i samotného RC, a to kinasami STN7 a STN8, přičemž STN7 funguje účinněji na anténě a STN8 v reakčním centru. Pozoruhodným zjištěním nepochybně je, že zatímco v RC silnější záření fosforylaci zintenzivňuje, v LHCII má opačné důsledky. Navíc záleží i na spektru: Modré světlo působí ve směru fosforylace (a to na centrum i na anténu), červené naopak. Vzhledem k tomu, že kratší vlnové délky excitují spíše PSII a delší PSI, nejpřímočařejším dopadem působení kinas by se zdála migrace fosforylovaných antén LHCII k PSI, čímž by se PSII - a tím i četnost zachytu fotonů tímto fotosystémem - zmenšily. Tuto dříve raženou vsutku logickou teorii podporovalo pozorování zvýšené fluorescence u PSI, spektrálně typické pro LHCII, po vystavení modrému světlu. Nedávná měření nicméně takové chování nepotvrdila. Zůstává ovšem přijímaným názorem, že kinasy svou činností nějak LHCII ovlivňují, jelikož mutanty huseníčku bez STN7 trpěly nadměrnou excitací RCII oproti fotosystému I [Tikkanen a kol. 2010].

Co se týče fosforylace jádra PSII, její funkcí bude zřejmě nikoli prevence  $q_I$ , nýbrž oprava jejích důsledků, především detekce oxidované bílkoviny  $D_1$ . Poškozená RC po fosforylaci migrují membránou thylakoidů z gran do stromatálních úseků, lépe přístupných protease; ta je degraduje [Tikkanen a kol. 2008].

## 5.7. Role cytochromu b559

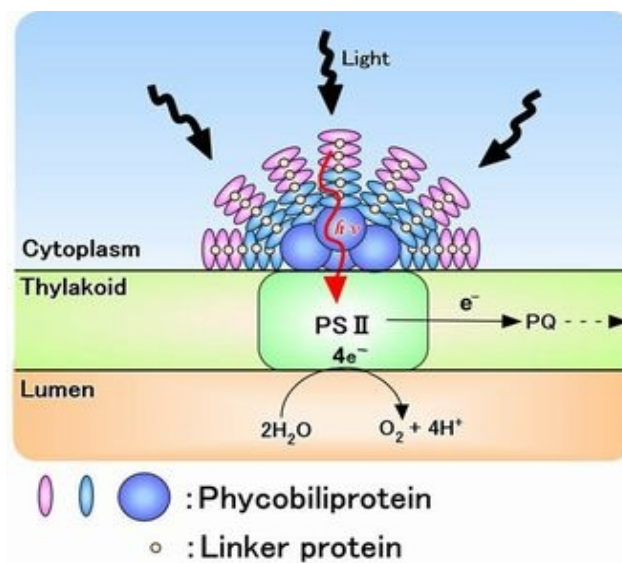
Cytochrom b559, obsahující hem, je součástí PSII [Nanba a Satoh 1987]. Jeho funkce pravděpodobně též spočívá v ochraně před fotoinhibicí, a to díky jedinečné schopnosti měnit redoxní potenciál, a tudíž zastávat úlohu elektronového dárce i příjemce. To znamená, že by dokázal bránit fotoinhibici na obou stranách. Mechanismus přepínání by mohl záviset na pH [Barber a De Las Rivas 1993]. Zjednodušeně se dá říci, že b559

poskytuje alternativní, cyklický elektronový přenos kolem PSII.

Novější výzkum poukázal na možnost vzájemné interakce b559 a plastochinolu; tento udržuje cytochrom redukováným za podmínek bezproblémové funkce PSII, zatímco při poškození OEC poskytuje b559 (ve vysokopotenciálovém redoxním stavu) elektron reakčnímu centru. Přechod do stavu nižšího potenciálu může být následován oxidací molekulárním kyslíkem [Kruk a Strzalka 2001]. Stále však není objasněno, jak je potenciál nastavován, ani nebyly pozorovány žádné konformační změny cytochromu. Zjistilo se však, že kromě dvou krajních stavů (- 150 mV a + 390 mV) může b559 nabýt i třetí, „prostřední“ (+ 230 mV) [Shinopoulos a Brudvig 2012].

## 5.8. A co sinice?

Věnujme alespoň krátce pozornost výzkumům sinic. Bylo pozorováno, že až 40 % energie absorbované fykobilisomy (Obr. 8) může být odvedeno nefotochemicky, a to díky působení karotenoidů. Jako klíčový hráč zde vystupuje protein OCP (orange carotenoid protein), nicméně bohužel stále není s jistotou známo, jak a kam se váže a jakým mechanismem k NPQ přispívá [Rakhimberdieva a kol. 2010]. Podle nejnovějších výzkumů se pravděpodobnou zdá hypotéza přenosu náboje (něco podobného, jako známe z rostlinných qE teorií) mezi chromofory allofykocyaninu a hECN (hydroxyechinenon) karotenoidem OCP proteinu [Tian a kol. 2011].



Obr. 8 – struktura fykobilisomu;  
převzato z: <http://www.cc.kurume-nct.ac.jp/BCAC/teacher/lab/hagiwara/research.html>

C-konec OCP proteinu interaguje s trimerem allofykocyaninů. Vysvětlení, proč by k vyvolání qE za intenzivního světla mohlo docházet, nabízí teorie o konformační změně způsobené absorpcí záření hECN. Ta by mohla způsobit těsnější kontakt mezi karotenoidem a trimerem, což by usnadnilo excitační přenos [Wilson a kol. 2008]. Nelze nevšimnout si analogie s domněnkami o působení PsbS proteinu a Zea u rostlin.

## 5.9. Diskuse a závěr

Je pravděpodobné, že podstata  $qE$  všechny výše popsané procesy nezbytně nezahrnuje, ale o komplexní proces se patrně jedná. Nepochybně se však skutečnost bude lišit u různých druhů rostlin (při experimentech bývají využívány klasické modely jako huseníček, tabák či špenát, a to zajisté může výsledky ovlivnit či zúžit jejich platnost) i řas nebo prokaryot (těmi jsme se zde ovšem příliš nezabývali). Lze vypožorovat několik základních názorových proudů:

Vcelku významná pozornost je stále věnována karotenoidům, zejména existuje řada podkladů pro tvrzení, že zeaxantin  $qE$  podněcuje. S tvorbou radikálů již mají některé studie problémy, ba přímo odmítají i samotnou jeho excitaci, leč v tom případě vyvstává otázka, jakou fyziologickou funkci by plnila xantofylová deepoxidasa, kdyby Zea za snižujícího se pH neměl žádnou úlohu. Zavrhování tohoto tradičního modelu působí tedy přinejmenším překvapivě a určitě by bylo vhodné daná měření zopakovat.

Jako na „náhradu“ za Zea bylo poukázáno na samotné chlorofyly; i za situace, pokud by xantofyly přece hrály roli, není ovšem vyloučeno, že excitační interakce mohou probíhat jak mezi Chl a Zea (případně jiným karotenoidem, např. luteinem), tak mezi dvěma Chl. Bohužel, co se výskytu radikálových stavů týče, nelze asi učinit žádný závěr.

Zmatek vládne v dosavadních znalostech o ochranné funkci proteinu PsbS; shoda nepanuje ani v názorech na jeho schopnost vazby Zea. Každopádně mutace postihující syntézu této bílkoviny pronikavě ovlivňují míru  $qE$ , tudíž lze asi bez potíží konstatovat, že nějakou úlohu zastává. Hypotéza o konformačních změnách při kyselém pH zní jistě přijatelně; vezmeme-li v úvahu, že už známe i konkrétní aminokyseliny, na nichž skutečně dochází k protonaci, otázka vlivu na konformaci se přímo nabízí. Není asi problém si představit, že by tato způsobovala disociaci LHCI<sub>II</sub> od jádra fotosystému. Pozoruhodná myšlenka o funkci PsbS coby regulátoru vzdálenosti Chl a jeho excitačních příjemců (a to i bez ohledu na jejich identitu nebo přesné uspořádání molekul) by však, ukázala-li by se oprávněnou, odhalila zcela jiný mechanismus.

Navrhované změny rozmístění LHCI<sub>II</sub> antén představují zcela jiné, mnohem „hrubší“ řešení, jak nakládat s přebytečnou energií; bezproblémovým se jeví klonit se k názoru, že k nim může klidně docházet i v případě, že zároveň fungují další procesy. V agregovaných LHCI<sub>II</sub> by se excitace, ať už jakkoli, jistě efektivně zhasela. Pokud by navíc

antény cestovaly k PSI (byť o tom nový výzkum pochybuje), nemuselo by maření energie částečně probíhat vůbec, protože by k přemíře excitace u PSII ani nedocházelo. „Tradiční“ biochemická modifikace fosforylace se zdá přirozenou možností regulace; zvláštní ovšem je, že evidentně působí opačně na RC a na LHCI. Zatímco její vliv na RC zřejmě zahrnuje hlavně uspokojivě vysvětlitelné biochemické následky, u LHCI stále panuje nejistota.

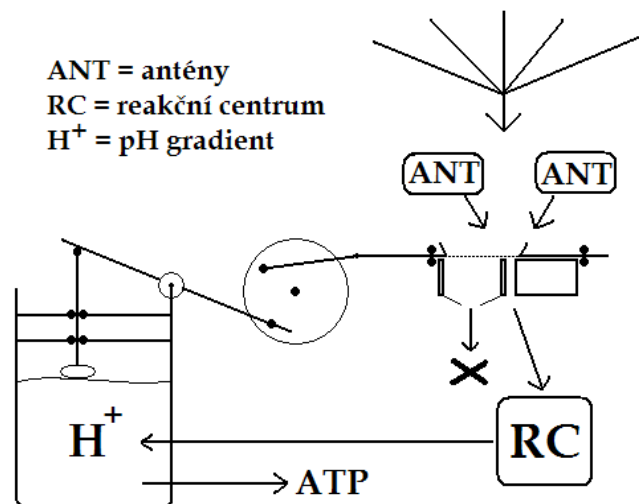
Úloha cytochromu b559 zdá se opět být úplně oddělenou od všech ostatních. Stálo by jistě za úvahu i měření, do jaké míry je b559 schopen zajistit bezpečnou funkčnost PSII a od jakého stupně ozáření již na úkol nestačí. Bylo by totiž s podivem, kdyby vše dokázal zastávat sám; přijatelně by spíše mohla působit koncepce, že funguje především jako jemný usměrňovač za mírných podmínek, kdy jiné mechanismy ještě nejsou potřeba.



## 6. Nastínění fyzikálního modelu

Toky energie ve fotosyntetickém aparátu si můžeme znázornit schematicky, třeba jako na obr. 9. Vidíme, že čím víc vzroste gradient  $H^+$ , tím větší podíl energie je odveden disipačním směrem (křížek).

Fakt, že  $\Delta pH$  závisí i na spotřebě ATP, problém výrazně komplikuje. Můžeme však napsat několik základních rovnic, které situaci popisují. Symbol  $P$  v nich bude mít význam populace (excitovaných stavů, resp. protonů),  $K$  označíme rychlostní konstanty a pro intenzitu použijeme  $I$ .



Obr. 9 - schema energetických toků (šipky) ve fotosyntetickém systému

$$\frac{\delta}{\delta t} P_{LHC} = K_{exc} I_{Sun} - K_Q P_{LHC} - K_{RC \leftarrow} P_{LHC} + K_{LHC \leftarrow} P_{RC}$$

$$\frac{\delta}{\delta t} P_{RC} = K_{RC \leftarrow} P_{LHC} - K_{CH} P_{RC} - K_{LHC \leftarrow} P_{RC}$$

$$\frac{\delta}{\delta t} P_{H^+} = K_{CH} P_{RC} - K_{ATP} P_{H^+}$$

Indexy  $RC \leftarrow$  a  $LHC \leftarrow$  značí, že energie se může přenášet oběma směry; exc = excitace, Sun = slunce a CH = fotochemie.

Každopádně  $K_Q = f(P_{H^+})$  a  $K_{ATP} = f(P_{H^+})$ .

Můžeme předpokládat, že  $K_{RC \leftarrow} \neq f(P_{H^+})$  a ani  $K_{CH} \neq f(P_{H^+})$ .

Z těchto základních úvah lze vycházet, chceme-li modelovat vývoj systému (nejdříve asi jeho rovnovážný stav). Řešení však z důvodu složitých funkčních závislostí mezi jednotlivými členy není jednoduché; nezbytným ústupkem je zjednodušený pohled, tzn. zvážení, která provázání je možno při zachování rozumné přesnosti zanedbat.

## 7. Seznam použité literatury

[Ahn a kol. 2008] Ahn T.K., Avenson T.J., Ballottari M. a kol.: Architecture of a Charge-Transfer State Regulating Light Harvesting in a Plant Antenna Protein. *Science* **320**, str. 794-797 (2008)

[Aro a kol. 1993] Aro E.M., McCaffery S., Anderson J.M.: Photoinhibition and D1 Protein-degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiology* **103**, str. 835-843 (1993)

[Aspinall-O'Dea M. a kol. 2002] Aspinall-O'Dea M., Wentworth M., Pascal A. a kol.: In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, str. 16331-16335 (2002)

[Avenson a kol. 2008] Avenson T.J., Ahn T.K., Zigmantas D. a kol.: Zeaxanthin Radical Cation Formation in Minor Light-harvesting Complexes of Higher Plant Antenna. *Journal of Biological Chemistry* **283**, str. 3550-3558 (2008)

[Azai a kol. 2010]\* Azai C., Tsukatani Y., Itoh S., Oh-oka H.: C-type cytochromes in the photosynthetic electron transfer pathways in green sulfur bacteria and heliobacteria. *Photosynthesis Research* **104**, str. 189-199 (2010)

[Barber a De Las Rivas 1993] Barber J., De Las Rivas J.: A functional model for the role of cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, str. 10942-10946 (1993)

[Bergantino a kol. 2003] Bergantino E., Segalla A., Brunetta A. a kol.: Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, str. 15265-15270 (2003)

[Berry a Rumberg 1996] Berry S., Rumberg B.: H<sup>+</sup>/ATP coupling ratio at the unmodulated CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-ATP synthase determined by proton flux measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* **1276**, str. 51-56 (1996)

[Betterle a kol. 2009] Betterle N., Ballottari M., Zorzan S. a kol.: Light-induced Dissociation of an Antenna Hetero-oligomer Is Needed for Non-photochemical Quenching Induction. *Journal of Biological Chemistry* **284**, str. 15255-15266 (2009)

[Blankenship 2002 (1)] Blankenship R.E.: Electron Transfer Pathways and Components. IN Blankenship R.E.: *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science Ltd, Malden - USA, str. 125-156 (2002)

[Blankenship 2002 (2)] Blankenship R.E.: Reaction Center Complexes. IN Blankenship R.E.: *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science Ltd, Malden - USA, str. 95-123 (2002)

[Blankenship 2002 (3)] Blankenship R.E.: The use of chlorophyll fluorescence to probe photosystem 2. IN Blankenship R.E.: *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science Ltd, Malden - USA, str. 148-153 (2002)

[Bode a kol. 2009] Bode S., Quentmeier C.C., Liao P.-N. a kol.: On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, str. 12311-12316 (2009)

- [Bonente a kol. 2008] Bonente G., Howes B.D., Caffarri S., Smulevich G., Bassi R.: Interactions between the Photosystem II Subunit PsbS and Xanthophylls Studied in Vivo and in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **283**, str. 8434–8445 (2008)
- [Breitholtz a kol. 2005] Breitholtz H.-L., Srivastava R., Tyystjärvi E., Rintamäki E.: LHC II protein phosphorylation in leaves of *Arabidopsis thaliana* mutants deficient in non-photochemical quenching. *Photosynthesis Research* **84**, str. 217-223 (2005)
- [Demeter a kol. 1987] Demeter S., Neale P.J., Melis A.: Photoinhibition: Impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplasts. *FEBS Letters* **214**, str. 370-374 (1987)
- [Grossman a kol. 1993]\* Grossman A.R., Schaefer M.R., Collier J.L.: The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews* **57**, str. 725-749 (1993)
- [Han a kol. 2013] Han I.-S., Cho H.-Y., Moni A., Lee A.-Y., Briggs W.-R.: Investigations on the Photoregulation of Chloroplast Movement and Leaf Positioning in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* **54**, str. 48-56 (2013)
- [Havaux a Niyogi 1999] Havaux M., Niyogi K.K.: The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, str. 8762-8767 (1999)
- [Henmi a kol. 2004] Henmi T., Miyao M., Yamamoto Y.: Release and Reactive-Oxygen-Mediated Damage of the Oxygen-Evolving Complex Subunits of PSII during Photoinhibition. *Plant Cell Physiology* **45**, str. 243-250 (2004)
- [Hideg a kol. 2008] Hideg É., Kós P.B., Schreiber U.: Imaging of NPQ and ROS Formation in Tobacco Leaves: Heat Inactivation of the Water–Water Cycle Prevents Down-Regulation of PSII. *Plant Cell Physiology* **49**, str. 1879-1886 (2008)
- [Holt a kol. 2003] Holt N.E., Kennis J.T.M., Dall'Osto L., Bassi R., Fleming G.R.: Carotenoid to chlorophyll energy transfer in light harvesting complex II from *Arabidopsis thaliana* probed by femtosecond fluorescence upconversion. *Chemical Physics Letters* **379**, str. 305-313 (2003)
- [Holt a kol. 2005] Holt N.E., Zigmantas D., Valkunas L. a kol.: Carotenoid Cation Formation and the Regulation of Photosynthetic Light Harvesting. *Science* **307**, str. 433-436 (2005)
- [Horton a kol. 1991] Horton P., Ruban A.V., Rees D. a kol.: Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Letters* **292**, str. 1-4 (1991)
- [Horton a kol. 2005] Horton P., Wentworth M., Ruban A.: Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Letters* **579**, str. 4201–4206 (2005)
- [Joët a kol. 2002] Joët T., Cournac L., Peltier G., Havaux M.: Cyclic Electron Flow around Photosystem I in C3 Plants. In Vivo Control by the Redox State of Chloroplasts and Involvement of the NADH-Dehydrogenase Complex. *Plant Physiology* **128**, str. 760-769 (2002)

- [Johnson a kol. 2011] Johnson M.P., Goral T.K., Duffy C.D.P. a kol.: Photoprotective Energy Dissipation Involves the Reorganization of Photosystem II Light-Harvesting Complexes in the Grana Membranes of Spinach Chloroplasts. *The Plant Cell* **23**, str. 1468–1479 (2011)
- [Johnson a Ruban 2010] Johnson M.P., Ruban A.V.: Arabidopsis plants lacking PsbS protein possess photoprotective energy dissipation. *The Plant Journal* **61**, str. 283-289 (2010)
- [Jones a Kok 1966] Jones L.W., Kok B.: Photoinhibition of Chloroplast Reactions. *Plant Physiology* **41**, str. 1037-1049 (1966)
- [Kaprálek 1986] Kaprálek F.: Fotosyntéza u bakterií. IN Kaprálek F.: *Fyziologie bakterií*. SPN, Praha - Česká republika, str. 485-493 (1986)
- [Kautsky a Hirsch 1931] Kautsky H., Hirsch A.: Neue Versuche zur Kohlendioxidassimilation. *Naturwissenschaften* **19**, str. 964 (1931)
- [Kereiche S. a kol. 2010] Kereiche S., Kiss A.Z., Kouřil R., Boekema E.J., Hoton P.: The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Letters* **584**, str. 759-764 (2010)
- [Kramer a kol. 1999] Kramer D.M., Sacksteder C.A., Cruz J.A.: How acidic is the lumen?. *Photosynthesis Research* **60**, str. 151-163 (1999)
- [Krieger a Weis 1993] Krieger A., Weis E.: The role of calcium in the pH dependent control of photosystem II. *Photosynthesis Research* **37**, str. 117-130 (1993)
- [Krüger a kol. 2012] Krüger T.P.J., Iliaia C., Johnson M.P. a kol.: Controlled Disorder in Plant Light-Harvesting Complex II Explains Its Photoprotective Role. *Biophysical Journal* **102**, str. 2669–2676 (2012)
- [Kruk a Strzalka 2001] Kruk J., Strzalka K.: Redox Changes of Cytochrome b(559) in the Presence of Plastoquinones. *Journal of Biological Chemistry* **276**, str. 86-91 (2001)
- [Lavaud a Lepetit 2013] Lavaud J., Lepetit B.: An explanation for the inter-species variability of the photoprotective non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1927**, str. 294–302 (2013)
- [Li a kol. 2004] Li X.-P., Gilmore A.M., Caffarri S. a kol.: Regulation of Photosynthetic Light Harvesting Involves Intrathylakoid Lumen pH Sensing by the PsbS Protein. *Journal of Biological Chemistry* **279**, str. 22866-22874 (2004)
- [Liao a kol. 2010] Liao P.-N., Holleboom C.-P., Wilk L., Kühlbrandt W., Walla P.J.: Correlation of Car S1 → Chl with Chl → Car S1 Energy Transfer Supports the Excitonic Model in Quenched Light Harvesting Complex II. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, str. 15650–15655 (2010)
- [Mančal 2011] Mančal T.: Primární procesy ve fotosyntéze. *Československý časopis pro fyziku* **61**, str. 151-156 (2011)
- [Marin a kol. 2010] Marin A., Passarini F., Croce R., van Grondelle R.: Energy Transfer Pathways in the CP24 and CP26 Antenna Complexes of Higher Plant Photosystem II: A Comparative Study. *Biophysical Journal* **99**, str. 4056-4065 (2010)

- [Marriott a Blankenship 2012] Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E.: The Photosynthetic World. IN Eaton-Rye J.J., Tripathy B.C., Sharkey T.D.: *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht - Nizozemsko, str. 3-32 (2012)
- [Maxwell a Johnson 2000]\* Maxwell K., Johnson G.N.: Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, str. 659-668 (2000)
- [Meyer a Cusanovich 2003]\* Meyer T.E., Cusanovich M.A.: Discovery and characterization of electron transfer proteins in the photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research* **76**, str. 111-126 (2003)
- [Miloslavina a kol. 2008] Miloslavina Y., Wehner A., Lambrev P.H. a kol.: Far-red fluorescence: A direct spectroscopic marker for LHCII oligomer formation in non-photochemical quenching. *FEBS Letters* **582**, str. 3625-3631 (2008)
- [Mojzeš a kol. 2011] Mojzeš P., Palacký J., Bauerová V., Bednářová L.: Ramanova mikrospektroskopie a mapování buněk a tkání. *Československý časopis pro fyziku* **61**, str. 178-184 (2011)
- [Müller a kol. 2001] Müller P., Li X.-P., Niyogi K.K.: Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* **125**, str. 1558-1566 (2001)
- [Müller a kol. 2010] Müller M.G., Lambrev P., Reus M. a kol.: Singlet Energy Dissipation in the Photosystem II Light-Harvesting Complex Does Not Involve Energy Transfer to Carotenoids. *ChemPhysChem* **11**, str. 1289-1296 (2010)
- [Nanba a Satoh 1987] Nanba O., Satoh K.: Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, str. 109-112 (1987)
- [Pascal a kol. 2005] Pascal A.A., Liu Z.F., Broess K. a kol.: Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* **436**, str. 134-137 (2005)
- [Polívka a kol. 1999] Polívka T., Herek J.L., Zigmantas D., Åkerlund H-E., Sundström V.: Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, str. 4914-4917 (1999)
- [Rakhimberdieva a kol. 2010] Rakhimberdieva M.G., Elenskaya I.V., Vermaas W.F.J., Karapetyan N.V.: Carotenoid-triggered energy dissipation in phycobilisomes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 diverts excitation away from reaction centers of both photosystems. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**, str. 241-249 (2010)
- [Ruban a kol. 2007] Ruban A.V., Berera R., Iliaia C. a kol.: Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* **450**, str. 575-579 (2007)
- [Shinopoulos a Brudvig 2012] Shinopoulos K.E., Brudvig G.W.: Cytochrome b<sub>559</sub> and cyclic electron transfer within photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* **1817**, str. 66-75 (2012)
- [Schmid 2008]\* Schmid V.H.R.: Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, str. 3619-3639 (2008)
- [Šetlík 2011] Šetlík I.: Voda ve fotosyntéze. IN Kleczek J. a kol.: *Voda ve vesmíru, na zemi, v životě a v kultuře*. Radioservis, Praha - Česká republika, str. 416-428 (2011)

- [Tian a kol. 2011] Tian L., van Stokkum I.H.M., Koehorst R.B.M.: Site, Rate, and Mechanism of Photoprotective Quenching in Cyanobacteria. *Journal of the American Chemical Society* **133**, str. 18304–18311 (2011)
- [Tikkanen a kol. 2008] Tikkanen M., Nurmi M., Kangasjärvi S., Aro E.-M.: Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. *Biochimica et Biophysica Acta* **1777**, str. 1432-1437 (2008)
- [Tikkanen a kol. 2010] Tikkanen M., Grieco M., Kangasjärvi S., Aro E.-M.: Thylakoid Protein Phosphorylation in Higher Plant Chloroplasts Optimizes Electron Transfer under Fluctuating Light. *Plant Physiology* **152**, str. 723-735 (2010)
- [Valkūnas a kol. 2012] Valkūnas L., Chmeliov J., Krüger T.P.J., Iliaia C., van Grondelle R.: How photosynthetic proteins switch. *Journal of Physical Chemistry B*, str. 2779-2784 (2012)
- [van Amerongen a van Grondelle 2001] van Amerongen H., van Grondelle R.: Understanding the Energy Transfer Function of LHCII, the Major Light-Harvesting Complex of Green Plants. *Journal of Physical Chemistry B* **105**, str. 604-617 (2001)
- [van Oort a kol. 2007] van Oort B., van Hoek A., Ruban A.V., van Amerongen H.: Equilibrium between Quenched and Nonquenched Conformations of the Major Plant Light-Harvesting Complex Studied with High-Pressure Time-Resolved Fluorescence. *Journal of Physical Chemistry B* **111**, str. 7631-7637 (2007)
- [Vass a kol. 1992] Vass I., Styring S., Hundal T. a kol.: Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, str. 1408-1412 (1992)
- [Vener a kol. 1997] Vener A.V., van Kan P.J.M., Rich P.R., Ohad I., Andersson B.: Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, str. 1585-1590 (1997)
- [Voet 1995] Voet D., Voet J.G.: Fotosyntéza. IN Voet D., Voet J.G.: *Biochemie*. Victoria, Praha - Česká republika, str. 657-679 (1995)
- [Wilson a kol. 2008] Wilson A., Punginelli C., Gall A. a kol.: A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, str. 12075–12080 (2008)
- [Wingler a kol. 2000] Wingler A., Lea P.J., Quick W.P., Leegood R.C.: Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **335**, str. 1517-1529 (2000)
- [Wormit a kol. 2009] Wormit M., Harbach P.H.P., Mewes J.M. a kol.: Excitation energy transfer and carotenoid radical cation formation in light harvesting complexes – A theoretical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* **1787**, str. 738-746 (2009)

\* review