

UNIVERZITA PALACKÉHO OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Studium vlivu teplotního stresu na strukturní organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně rostlin pomocí transmisní elektronové mikroskopie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Gryčová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Roman Kouřil, PhD.
Termín odevzdání práce:	19.6.2017

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Romana Kouřila, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne 19.6.2017

.....

Mé poděkování patří vedoucímu práce RNDr. Romanu Kouřilovi, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a vstřícné jednání. Poděkování si zaslouží i Mgr. Lukáš Nosek, Ph.D. za pomoc při řešení části experimentální části práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Gryčová
Název práce	Studium vlivu teplotního stresu na strukturní organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně rostlin pomocí transmisní elektronové mikroskopie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá problematikou vlivu teplotního stresu na organizaci fotosystému II (PSII) v tylakoidní membráně rostlin pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Teoretická část především pojednává o struktuře, funkci, organizaci PSII v tylakoidních membránách rostlin a o vlivu teplotního stresu na strukturu PSII a tylakoidní membrány. Teoretická část dále obsahuje stručné seznámení s elektronovou mikroskopií a metodami přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopií.</p> <p>V experimentální části práce je studován vliv teplotního stresu na organizaci PSII v izolovaných granálních membránách ječmene setého (<i>Hordeum vulgare</i>) a mutanta ječmene setého <i>viridis zb63</i> pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Z provedených experimentů vyplývá, že v granálních membránách ječmene setého vykazuje PSII náhodné uspořádání a s rostoucí teplotou (42 °C a 46 °C) dochází ke zkracování vzdáleností mezi jednotlivými PSII komplexy. V granálních membránách mutanta ječmene setého <i>viridis zb63</i>, který vykazuje krystalické uspořádání PSII v membráně, nedocházelo s rostoucí teplotou ke zkracování vzdáleností mezi PSII. Byla však pozorována reorganizace PSII v granálních membránách, která vedla k rozpadu jeho krystalického uspořádání. Z experimentu prováděného na granálních membránách mutanta ječmene s chemicky destabilizovaným kyslík vyvíjejícím komplexem bylo zjištěno, že změny v organizaci a struktuře PSII jsou spojené s teplotně indukovanými změnami komplexu vyvíjejícího kyslík.</p>
Klíčová slova	fotosystém II, teplotní stress, transmisní elektronová mikroskopie
Počet stran	45
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Veronika Gryčová
Title of thesis	Structural characterization of an effect of heat stress on a higher organization of Photosystem II in the thylakoid membrane of higher plants using a transmission electron microscopy.
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>This work deals with an effect of heat stress on a higher organization of Photosystem II (PSII) in the thylakoid membrane of higher plants using transmission electron microscopy. The theoretical part primarily deals with a composition, function and structure of PSII in the thylakoid membrane of higher plants and deals with an effect of heat stress on a structure of PSII and thylakoid membranes. In the theoretical part there is also comprised a short overview of electron microscopy and methods of specimen preparation for the electron microscopy are introduced.</p> <p>In the experimental part of the work the effect of heat stress on a higher organization of PSII in the isolated thylakoid membrane from barley (<i>Hordeum vulgare</i>) and from barley mutant <i>viridis zb63</i> is studied using transmission electron microscopy. The performed experiments show that the PSII organization in grana membrane from barley is random and the distance between PSII complexes with increasing temperature (42 °C and 46 °C) has shorted. In grana membranes of the barley mutant, which forms 2D crystalline array of PSII in grana membrane, the shortening of the distance between PSII complexes was not observed. But the reorganization of PSII in the grana membranes was observed, which led to a disruption of the crystalline organization of PSII complexes. An additional experiment performed on grana membranes from barley mutant with chemically removed oxygen evolving complex revealed that changes in the organization and the structure of PSII in the grana membrane are linked to the temperature induced changes of oxygen evolving complex.</p>
Keywords	photosystem II, heat stress, transmission electron microscopy
Number of pages	45
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	9
2 Struktura fotosyntetického aparátu a tylakoidní membrány	10
3 Funkce a struktura fotosystému II	11
3.1 Superkomplexy PSII	12
3.2 Organizace PSII v tylakoidní membráně	14
4. Teplotní stres	16
4.1 Vliv teplotního stresu na funkci a strukturu fotosystému II	16
4.2 Vliv teplotního stresu na strukturu tylakoidních membrán	17
5 Elektronová mikroskopie	18
5.1 Transmisní elektronový mikroskop	18
5.1.1 Metody přípravy vzorků pro TEM	19
6 Materiál a metody	21
6.1 Použité chemikálie	21
6.2 Rostlinný materiál	21
6.2.1 Knopův roztok	21
6.3 Pěstování ječmene	21
6.4 Vystavení teplotnímu stresu	22
6.5 Izolace tylakoidních membrán	22
6.6 Izolace fragmentů granálních membrán	24
6.7 Odstranění komplexu vyvíjející kyslík (OEC)	24
6.8 Elektronová mikroskopie	24
6.8.1 Příprava vzorků	24
6.8.2 Elektronová mikroskopie granálních membrán	25
6.8.3 Popis vyhodnocování snímků	25
7 Výsledky	26
7.1 Vliv teplotního stresu na organizaci PSII v granálních membránách ječmene setého	26
7.2 Vliv teplotního stresu na organizaci PSII v granálních membránách mutantu ječmene setého <i>viridis zb63</i>	29
7.3 Vliv OEC na organizaci PSII v granálních membránách mutantu ječmene setého <i>viridis zb63</i>	35

8 Diskuze	37
9 Závěr	41
Použitá literatura	42

Seznam použitých zkratk

ATP	Adenosintrifosfát
EM	Elektronová mikroskopie
LHCII	Světloběrný komplex fotosystému II
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OEC	Komplex vyvíjející kyslík
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
TEM	Transmisní elektronový mikroskop

1 Úvod a cíle práce

Rostliny jsou objektem bádání již od pradávna, ať už pro své léčivé účinky nebo proto, že slouží jako potrava mnoha druhům živočichů, včetně člověka. Jedním z mnoha motivů

k výzkumu rostlin je poznat jejich specifický děj - fotosyntézu. Děj, který je založen na tom, že rostliny dokáží využít energii ze Slunce v souboru reakcí, ve kterých dochází k přeměně látek energeticky chudých (voda) na látky energeticky bohaté (ATP, NADPH). Tyto látky využívají pro tzv. fixaci uhlíku, jejímž produktem je sacharid, který rostlině slouží jako zdroj obživy. Odpadním produktem v tomto procesu je kyslík, který je na naší planetě nezbytný pro všechny aerobní organismy včetně člověka.

Jako každý organismus jsou i rostliny (a probíhající procesy uvnitř buněk rostlin) ovlivňovány řadou faktorů. Těmito faktory jsou např. světlo, teplota, množství vody a její dostupnost, obsah živin nebo pH prostředí, ve kterém rostlina roste. Pokud poznáme vliv těchto faktorů na rostliny a fotosyntézu, můžeme získané znalosti využít pro lepší regulaci výnosů hospodářsky významných rostlin v zemědělství.

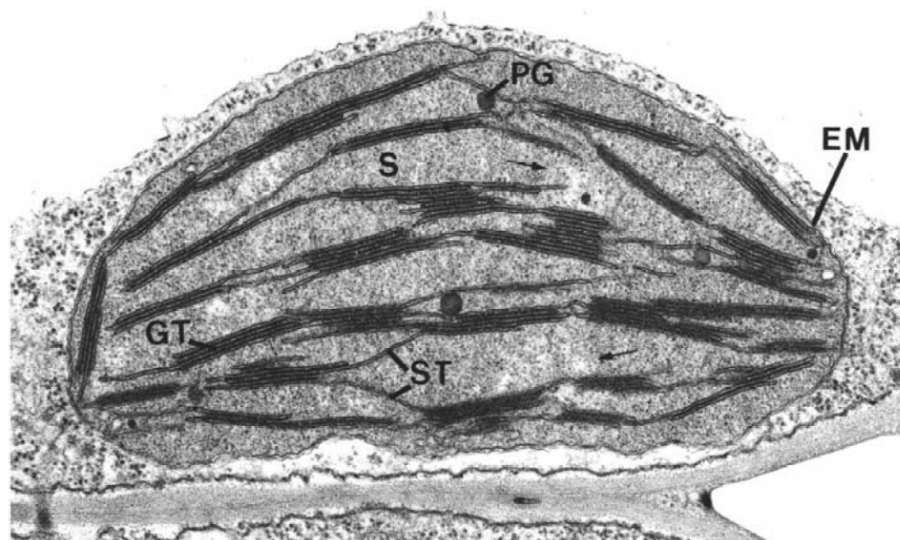
Ve své práci se zabývám vlivem zvýšené teploty na fotosyntézu rostlin. Konkrétně sleduji vliv krátkodobého zvýšení teploty na organizaci superkomplexů fotosystému II (PSII) v tylakoidní membráně chloroplastů. Většina PSII superkomplexů je v granech tylakoidní membrány uspořádána náhodně, ale objevují se i oblasti granální membrány, kde jsou PSII superkomplexy uspořádány do semikrystalických domén (Kouřil et al., 2012). Protože zvýšená teplota vede ke změně strukturní organizace samotného superkomplexu PSII, lze očekávat i teplotně indukované změny v jeho organizaci na úrovni granální membrány.

Cílem práce bylo zpracovat přehled problematiky o vlivu teplotního stresu na funkci, strukturu a organizaci PSII superkomplexu v tylakoidní membráně. Experimentální část práce byla zaměřena na studium uspořádání PSII superkomplexů v izolovaných granálních membránách z listů ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a mutanta ječmene setého *viridis zb63* vystavených vyšším teplotám. Mým úkolem bylo pořídit sérii mikroskopických snímků granálních membrán z jednotlivých teplotních

variant transmisním elektronovým mikroskopem a ze získaných obrázků vyhodnotit vliv teplotního stresu na organizaci PSII superkomplexů v membráně.

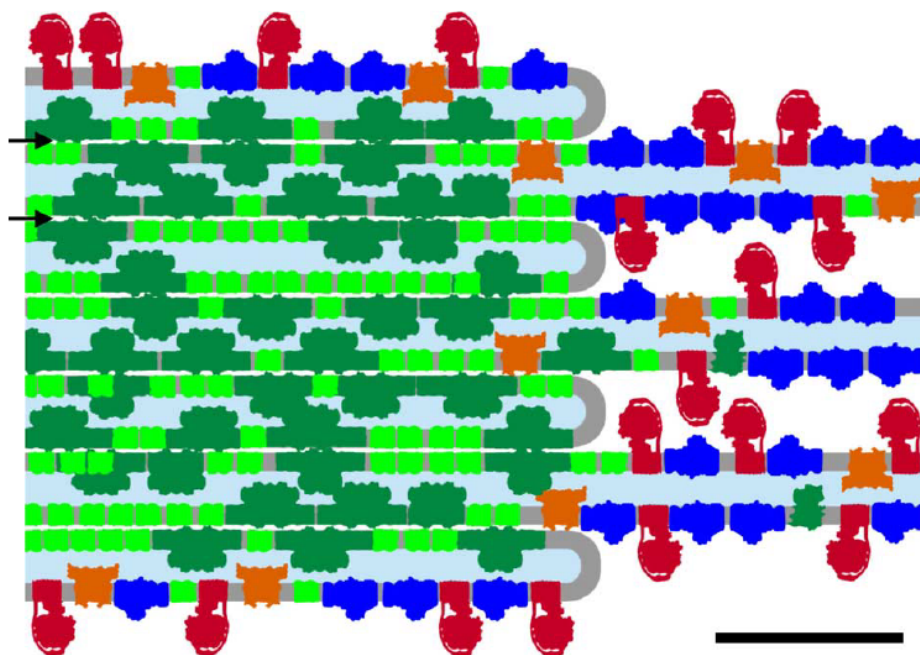
2 Struktura fotosyntetického aparátu a tylakoidní membrány

K pochopení složitých dějů fotosyntézy u eukaryotických organismů jako jsou rostliny a řasy, je nutné znát strukturu organel, ve kterých se převážná část tohoto děje odehrává. Místa, kde probíhá fotosyntéza, jsou chloroplasty, což jsou semiautonomní buněčné organely nacházející se v buňkách rostlin a zelených řas. Chloroplasty jsou zodpovědné za primární procesy fotosyntézy jako je absorpce světla, oxidace molekul vody, syntéza ATP a NADPH a dále za sekundární procesy fotosyntézy - fixace CO_2 . Uvnitř chloroplastů se nachází komplex membrán zvaný tylakoidní systém (Lawlor, 2001; Nelson et Ben-Shem, 2004). Díky elektronové mikroskopii ultratenkých řezů chemicky fixovaných chloroplastů byly získány prvotní informace o organizaci tylakoidní membrány, které vedly k vytvoření celé řady modelů jejího uspořádání (obr. 1). Tylakoidní membrána je složena z lipidové dvojvrstvy gran a ze stromálních tylakoidů (lamel), které spojují jednotlivá grana. Mezi tylakoidy je prostor, který je vyplněn vodným prostředím, označovaný jako tylakoidní lumen. Shluky granálních tylakoidů, které jsou na sebe přitisknuty jako mince ve sloupci, vytváří granum. Za interakce mezi jednotlivými tylakoidy a tvorbu gran jsou pravděpodobně zodpovědné světlosběrné komplexy PSII (LHCII) (Albertsson, 2001).



Obr. 1. Snímek tenkého řezu zachycující chloroplast tabáku. Na snímku jsou zachyceny membrány chloroplastů (EM) obklopující stroma (S), ve kterých lze rozpoznat granální tylakoidy (GT) a stromální tylakoidy (ST). Dále se zde nachází plastoglobule (PG) a oblasti obsahující DNA (označené šipkami). Převzato z Staehelin, 2003.

Strukturní informace o proteinovém složení tylakoidní membrány byly získány na základě separace a biochemické charakterizace jednotlivých fragmentů membrány. Bylo zjištěno, že většina PSII a LHCII komplexů se nalézá v granech, zatímco komplexy fotosystému I (PSI) a ATP syntázy se vyskytují ve stromálních tylakoidech a vnějších membránách gran. Cytochrom b_6/f komplex je zastoupen mezi oběma membránami přibližně stejně. Tento předpoklad pak vedl k sestavení trojrozměrného modelu, který zobrazuje prostorový vztah mezi grany a stromálními tylakoidy (obr. 2) (Dekker et Boekema, 2005).



Obr. 2. Model rozložení proteinů v tylakoidní membráně rostlin. V modelu jsou PSII-LHCII superkomplexy monomery označeny tmavě zeleně, LHCII jsou světle zelené, komplexy cyt b_6/f jsou oranžové, PSI modré a ATPasy červené. Délka černé čáry (měřítko) odpovídá 50 nm.

3 Funkce a struktura fotosystému II

Fotosystém II je velký pigment-proteinový komplex, který se nachází v tylakoidních membránách vyšších rostlin, řas i sinic. V membráně se PSII vyskytuje většinou jako dimer, který tvoří jádro PSII. Každý monomer jádra PSII obsahuje 27-28 podjednotek., na které se specificky vážou podjednotky světlosběrného komplexu (Caffari et al., 2009).

Hlavními interními membránovými proteiny jaderného komplexu PSII jsou proteiny PsbA, B, C a D. Jaderný komplex PSII zelených rostlin dále tvoří externí proteiny PsbO, P, Q (Nelson et Yocum, 2006). Tyto proteiny dohromady tvoří komplex vyvíjející kyslík (OEC). Funkcí proteinů PsbO, P, Q je udržování optimálního prostředí

pro oxidaci vody ve fotosyntéze. Protein PsbO stabilizuje tzv. manganový klastr, který je složen ze 4 atomů manganu vázících se k PsbA a PsbD proteinům. V manganovém klastru dochází k oxidaci vody (Barber et al., 1997). Dále se v jaderném komplexu PSII nachází 13 transmembránových proteinů: PsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbT, PsbX, PsbY, PsbZ a Psb30. Proteiny formující reakční centrum, ve kterém dochází k separaci náboje a primárním reakcím elektronového přenosu, se jmenují PsbA (nazývané též D1) a PsbD (nazývané též D2). Absorpční maximum molekul chlorofylu *a* v reakčním centru PSII je 680 nm a proto bývá reakční centrum PSII označováno jako P680. Proteiny D1 a D2 jsou obklopeny podjednotkami CP43 a CP47 (neboli PsbB a PsbC), které mají světlosběrnou funkci (absorbují a následně přenášejí excitační energii do reakčního centra PSII) (Shen, 2015; Dekker et Boekema, 2005).

Reakční centrum je obklopeno světlosběrným komplexem, který je tvořen LHCI komplexem. Ten je tvořen podjednotkami Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3, které se mezi sebou různě kombinují a tvoří trimery LHCI. Dalšími proteiny periferního anténního systému jsou Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb6, které se jinak také nazývají CP29, CP26 a CP24. Tyto proteiny se vyskytují pouze jako monomery. LHCI trimery jsou v kontaktu s proteiny Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb6. Protein Lhcb4 je v blízkosti podjednotky CP43, protein Lhcb5 je nedaleko podjednotky reakčního centra CP47 a v neposlední řadě Lhcb6 je v kontaktu s Lhcb4. Díky blízkosti proteinů světlosběrného komplexu a podjednotek reakčního centra je umožněn přímý přenos energie z periferních antén do reakčního centra PSII (Dekker et Boekema, 2005; Nelson et Yocum, 2006).

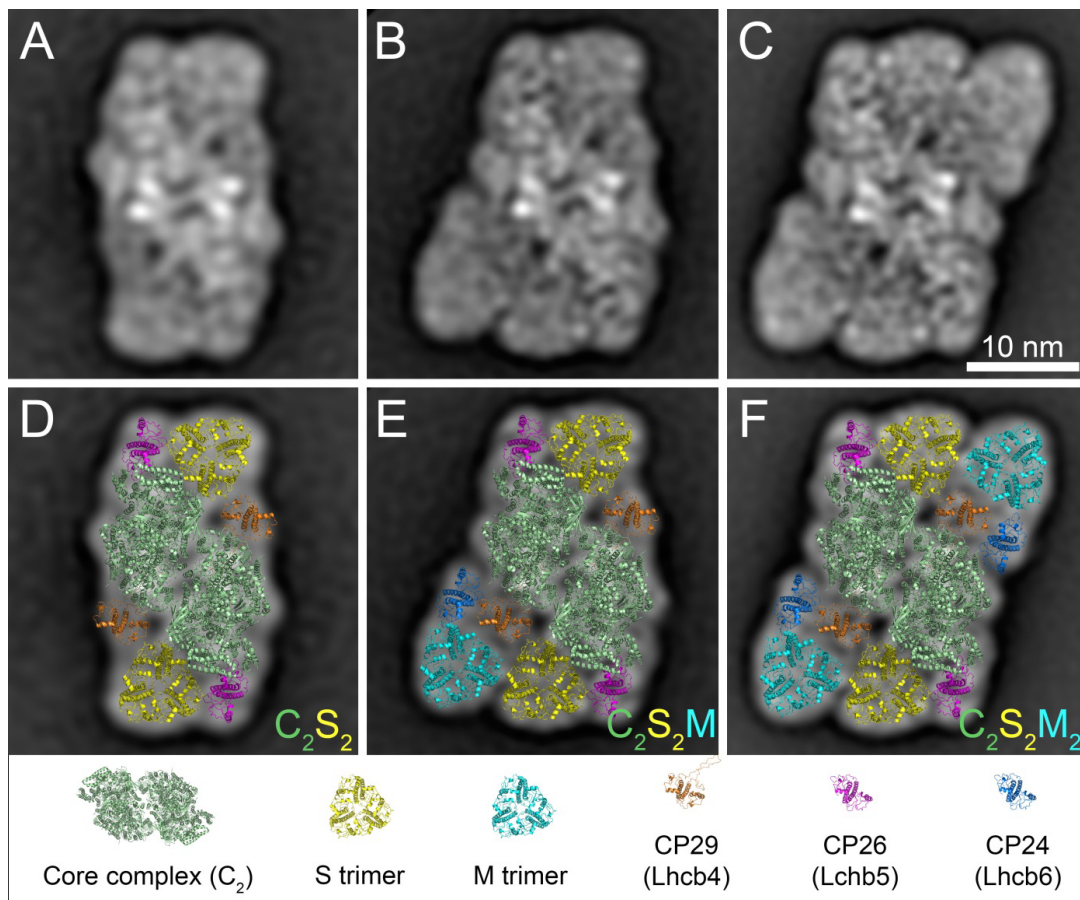
3.1 Superkomplexy PSII

Jaderný komplex PSII spolu s různým množstvím periferních anténních proteinů může tvořit tzv. PSII-LHCI superkomplexy. Superkomplexy byly poprvé pozorovány elektronovým mikroskopem ve vzorcích připravených ze solubilizovaných granálních membrán jemným detergentem (Boekema et al., 1995).

K dimernímu jadernému komplexu (označovaný jako C₂-, „core complex“) se mohou stabilně vázat až čtyři periferní LHCI trimery (obr. 3). Podle četnosti výskytu vazebného místa LHCI byly pojmenovány vazebná místa „S“ („strongly“ vázaný LHCI trimer), „M“ („moderate“ vázaný LHCI trimer). Výjimečně se na jádro PSII mohou vázat další LHCI trimery označovány jako „L“ („loosely“ vázaný LHCI trimer). Dva S-trimery se vážou k jadernému komplexu prostřednictvím anténních

proteinů CP26 a CP29, potom mluvíme o vzniku superkomplexu C_2S_2 . Ke komplexu C_2S_2 se mohou, díky dalším monomerním anténám CP24 a CP29, navázat další dva M-trimery za vzniku superkomplexu $C_2S_2M_2$ (Caffarri et al., 2009; Kouřil et al., 2012). Superkomplexy $C_2S_2M_2$ byly pozorovány v nejstarších suchozemských rostlinách - játrovkách i v angiospermech, což vedlo k předpokladu, že PSII superkomplexy $C_2S_2M_2$ byly v průběhu evoluce zachovány. Nedávné studie ukázaly, že architektura a složení podjednotek PSII-LHCII $C_2S_2M_2$ superkomplexů není ve všech suchozemských rostlinách stejná. Analýza transkriptomu a genomu smrku ztepilého prokázala nedostatek funkčních genů *Lhcb6* a *Lhcb3*. Tento nedostatek proteinů vedl ke změnám ve strukturální organizaci $C_2S_2M_2$ superkomplexů podobných jako u evolučně staršího organismu *Chlamydomonas reinhardtii* také postrádající *Lhcb6* (Tokutsu et al., 2012; Drop et al., 2014; Kouřil et al., 2016).

V literatuře byl popsán i vznik superkomplexů $C_2S_2M_2L_{1-2}$ u špenátu, tyto superkomplexy se však vyskytují méně často (Boekema et al., 1999). S-trimer je složen z *Lhcb1* a *Lhcb2* genových produktů. M-trimer obsahuje *Lhcb1* a *Lhcb3* genové produkty (Dekker et Boekema, 2005).



Obr. 3. Projekční mapa různých forem PSII superkomplexů *Arabidopsis thaliana* získané z elektronového mikroskopu a obrazové analýzy. A) Projekční mapa PSII C_2S_2 superkomplexů,

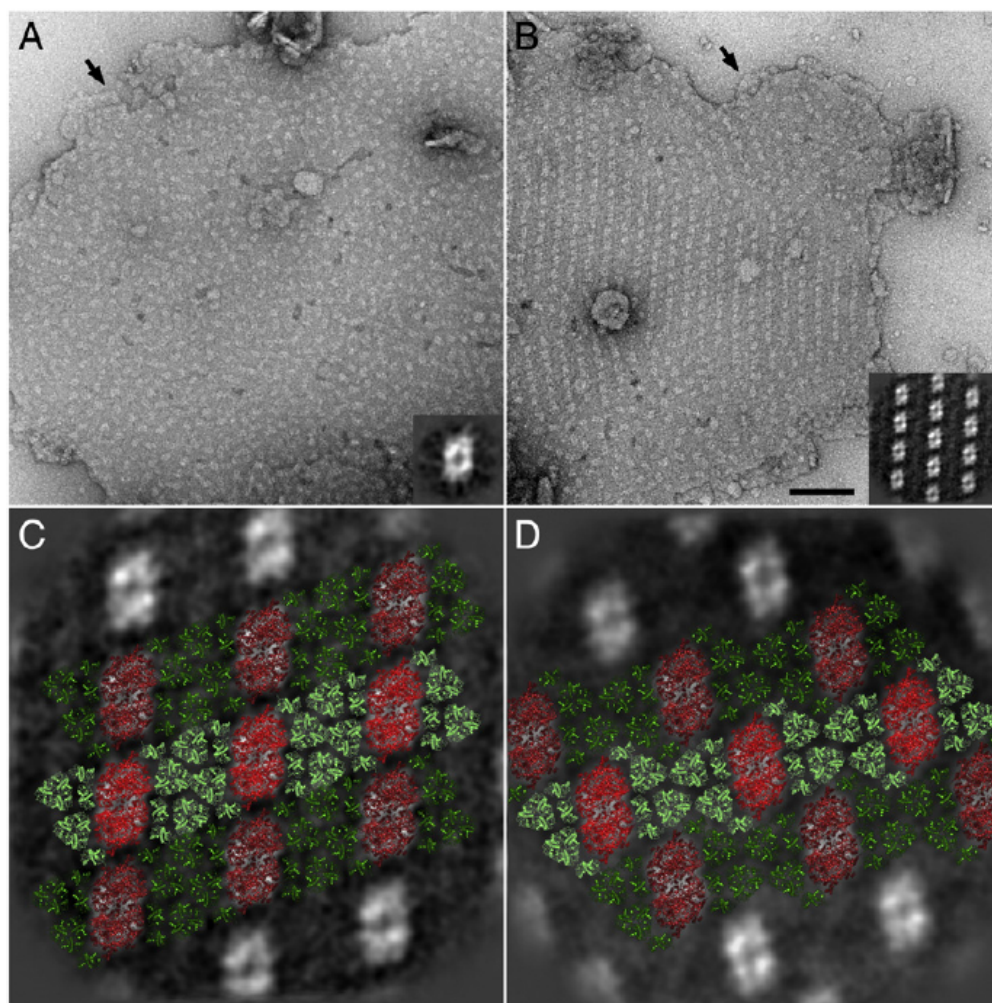
B) C_2S_2M superkomplex a C) $C_2S_2M_2$ superkomplex. (D-F) Strukturální model PSII superkomplexů získaný z vhodně doplněných struktur s vysokým rozlišením rostlinných PSII superkomplexů. Převzato Caffarri et al. 2009; Wei et al. 2016.

3.2 Organizace PSII v tylakoidní membráně

Studium organizace PSII v izolovaných tylakoidních membránách je primárně založeno na mikroskopických snímcích z elektronového mikroskopu na vzorcích připravených metodou mrazového leptání a mrazového štěpení tylakoidních membrán. Elektronová mikroskopie poskytla cenné informace o rozměrech, tvarech a místě PSII a jeho anténních systémech (Kouřil et al., 2012).

Bylo zjištěno, že 85 % PSII se nachází v granech a 15 % ve stromálních tylakoidech (Staelin 2003). Většina PSII superkomplexů je v granech uspořádána náhodně,

ale objevují se i oblasti granální membrány, ve kterých je PSII uspořádán do semikrystalických domén (obr. 4). Aby se v membráně PSII uspořádaly do semikrystalických domén, je nutné, aby došlo k separaci PSII superkomplexů od ostatních membránových proteinů, např. LHCII nebo proteinů PsbS. Faktory, které mohou zvýšit výskyt uspořádání PSII do semikrystalických domén jsou prostředí s nízkou teplotou, nízkou intenzitou osvětlení, vysokou koncentrací cukru či dokonce specifickým pH pufru (Kirchhoff et al., 2013). Které síly konkrétně způsobují separaci proteinů, nejsou prozatím známy. Je však možné, že uspořádání PSII do semikrystalických domén je energeticky výhodné, zatímco náhodné uspořádání PSII v membránách je entropicky výhodné. Nabízí se možnost, že síly v membránách jsou v rovnováze tak, aby mohly odpovídat na strukturální změny (z náhodného uspořádání PSII do uspořádání do semikrystalických domén) za minimálního použití energie a tím umožnit funkční modifikace (Kirchhoff et al., 2013; Kouřil et al., 2012).



Obr. 4. Snímky pořízené elektronovým mikroskopem zobrazující organizaci PSII superkomplexů v tylakoidní membráně *Arabidopsis thaliana* s náhodnou A) a krystalickou B) organizací PSII komplexů. Detail v A) zobrazuje výsledek analýzy z 224 PSII vybraných ze snímků. Detail v B) zobrazuje výsledky z analýzy 96 dílčích oblastí nebo krystalických polí vybraných ze snímků. C) Přiřazení 2D polí PSII z B) vhodně doplněných strukturálním modelem PSII $C_2S_2M_2$ superkomplexu podle Caffari et al., 2009. D) Nový typ sbalení PSII $C_2S_2M_2$ superkomplexů. Měřítka pro snímky z elektronového mikroskopu (A, B) je 100 nm. Převzato z Kouřil et al., 2012.

Superkomplexy PSII, které mohou tvořit krystaly, jsou C_2S_2 , C_2S_2M a $C_2S_2M_2$. Význam těchto krystalů objasnil Kirchhoff et al., 2013, který navrhl, že supramolekulární reorganizace do semikrystalických domén při slabém osvětlení slouží k překonání případných problémů s přeplněním membrány proteiny. Při aklimaci rostliny na nízké osvětlení totiž dochází k výraznému zvýšení počtu světlosběrných antén, naopak ke snížení počtu PSII a cytochromu b_6f komplexu (Kirchhoff et al., 2007). Naopak při vyšší intenzitě osvětlení se počet LHCIII snižuje, zatímco množství PSII se zvyšuje ve srovnání s PSI. Uspořádání PSII do semikrystalických domén v izolovaných membránách dlouhodobě vystavených vyšším intenzitám světla je

pozorováno méně často oproti izolovaným membránám dlouhodobě vystavených nízkým hladinám světla (Kouřil et al., 2013).

Při překročení dodávky světelné energie oproti poptávce energie, je aktivováno nefotochemické zhášení, při němž dochází k převádění přebytečné energie na teplo. Bylo zjištěno, že uspořádání do semikrystalických domén urychluje přeměnu violaxantinu na zeaxantin, který se podstatnou měrou uplatňuje ve zhášecích procesech (Kirchhoff, 2013).

Zdá se, že změna organizace proteinů do uspořádaného stavu zjednodušuje molekulární difúzi malých molekulových přenašečů elektronů jako např. plastochinonu nebo ochranných pigmentů xantofylů přes přeplněné tylakoidní membrány, což výrazně ovlivňuje elektronový transport a fotoprotektivní energeticky závislé zhášení (Tietz et al., 2015).

4. Teplotní stres

4.1 Vliv teplotního stresu na funkci a strukturu fotosystému II

Rostliny, stejně jako ostatní organismy, jsou náchylné na změny podmínek, ve kterých žijí. Působení rozličných faktorů má na rostlinu různý dopad. Pokud je rostlina a další oxygenní fotosyntetické organismy vystavena teplotnímu stresu, dochází k narušení procesu fotosyntézy. Bylo zjištěno, že teplotní stres má, vedle inhibice fixace oxidu uhličitého v Calvinově cyklu, největší dopad na strukturu a funkci PSII (Berry et Björkman, 1980).

Vlivem vysokých teplot (okolo 40°C) dochází k uvolňování proteinů PsbO, P, Q a manganu z jejich vazebných míst. Narušuje se struktura manganového komplexu (ztrácí se dva ze čtyř manganatých iontů z manganatého komplexu).

Okolo teploty 42°C a výše dochází k postupné inaktivaci akceptorové strany PSII. Dochází k rozpadu OEC, což vede ke změnám supramolekulární organizace jádra PSII. K úplné inaktivaci fotochemické funkce PSII dochází při teplotách 49-50°C. Neprobíhají nábojově separační reakce, PSII dimerní jaderný komplex se začíná oddělovat na monomery a celkově dochází k strukturně-funkčnímu poškození PSII (Busheva et al., 2012).

Působením vysokých teplot je poškozen reparační mechanismus proteas, což může mít za následek inhibici PSII, která je nevratná (Yamamoto et al., 2008). Při teplotách okolo 40°C dochází k rozštěpení D1 proteinu. Proteiny D2, CP43 a CP47

zůstávají neporušeny. Za rozštěpení D1 proteinu je pravděpodobně zodpovědná proteasa FtsH, která se vlivem tepla přesouvá ze stromatu do grana a zde štěpí protein D1. Další proteasou štěpící D1 protein je proteasa Deg, která se nachází v lumenu tylakoidů. Dříve se myslelo, že jako první je D1 protein degradován proteasou Deg. Nyní se však za primární štěpení D1 proteinu považuje FtsH proteasa. Nicméně pokusy, které by vedly k detekci FtsH proteasy hmotnostním spektrometrem ve fragmentech obsahující proteolytickou aktivitu, byly neúspěšné. Stále tedy není dostupný přímý důkaz, že FtsH proteasa je zapojena do degradačního kroku D1 proteinu (Yoshioka-Nishimura et al., 2014).

Působením vysokých teplot byly v PSII pozorovány reaktivní formy kyslíku (ROS) jako je peroxid vodíku, superoxidový radikál a hydroxylový radikál. Reaktivní formy kyslíku jsou produkovány reakčními centry fotosystémů a způsobují oxidativní poškození fotosyntetického aparátu (Allakhverdiev et al., 2008).

Při teplotním stresu (od teploty 35°C) dochází k uvolňování LHCI od jádra PSII. Přičemž bylo pozorováno, že jádro PSII putuje do stromálních tylakoidů, zatímco LHCI zůstává v granech (Sundby et Andersson, 1985).

Veškeré poznatky týkající se migrace složek v granálních membránách byly získány nepřímo z biochemických experimentů. Přímá studie pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) zkoumající vliv teplotního stresu na PSII dosud nebyla provedena. Právě studium vlivu teplotního stresu na PSII pomocí TEM je jeden z cílů této práce.

4.2 Vliv teplotního stresu na strukturu tylakoidních membrán

Teplotně indukované změny ve struktuře a funkci PSII komplexů jsou doprovázeny také strukturálními změnami tylakoidní membrány. Teplotní stres způsobí rozvolnění tylakoidních membrán, převážně jednotlivých gran. Tato změna být může vratná či nevratná. Studie z 80. let minulého století ukázaly, že přitisknutí tylakoidů k sobě do gran je způsobeno elektrostatickými interakcemi mezi proteiny na povrchu membrány. Za nevratnou změnu rozvolnění tylakoidních membrán od sebe pravděpodobně mohou změny v distribuci LHCI, stejně tak strukturální změny PSII.

Vlivem vysokých teplot (teploty 35-45°C) dochází ke zvýšení fluidity membránových lipidů, což vede k narušení lipidové dvojvrstvy a snížení počtu fosfolipidů. Následky změn fluidity membránových lipidů se projeví destabilizací

protein-lipidových interakcí, které ovlivní organizaci a funkci PSII. Při teplotách vyšších než 45°C byly pozorované rozsáhlé fázové separace narušené lipidové dvojvrstvy, které zahrnují tvorbu trojrozměrných struktur obrácených válcových micel (Gounaris et al., 1983).

Při vysokoteplotním stresu se objevují ROS, které oxidují nasycené mastné kyseliny v tylakoidních membránách. Nenasycené mastné kyseliny způsobují narušení tekutosti membrány. Naštěstí se rostliny dokáží působení ROS bránit. Při vyšších teplotách jsou produkovány antioxidanty (např. kyselina askorbová, karotenoidy, α -tocopherol) a enzymy (askorbát peroxidasa, superoxid dismutasa) (Asada, 2006). Tyto antioxidantní systémy hrají významnou roli v ochraně proti poškození buněk rostlin. Rostliny se mohou postupně adaptovat na teplotní stres. Teplotní aklimace zahrnuje reorganizaci tylakoidní membrány a změnu složení lipidů. Zároveň stoupá hranice teploty, při které je tekutost membrány a funkce zachována (Xu et al., 2006).

5 Elektronová mikroskopie

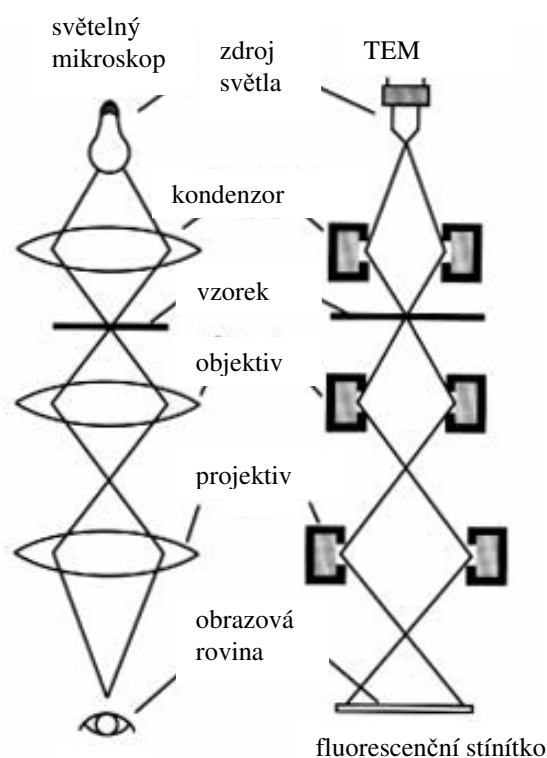
Při pozorování objektů světelným či jiným mikroskopem je rozlišovací mez omezena difrakčním limitem, který je roven přibližně polovině vlnové délky zdrojového světla. Důležitým krokem k použití elektronu v elektronové mikroskopii (EM), byl položen objevem Luis de Broglieho, který navrhl, že rychle letící částice (elektron) má částicový i vlnový charakter.

Existují dva typy elektronového mikroskopu- transmisní a skenovací. Skenovací elektronový mikroskop (SEM) je založen na detekci rozptýlených elektronů, zatímco TEM na detekci elektronů, které vzorkem prochází. V bakalářské práci byla použita metoda TEM, která je ve stručnosti popsána v následující kapitole.

5.1 Transmisní elektronový mikroskop

Transmisní elektronový mikroskop se stal od svého vzniku významným nástrojem pro studium struktury biomakromolekul a proteinových komplexů. V konstrukci TEM nacházíme jakousi analogii se světelným mikroskopem. Zdrojem elektronů je elektronové dělo, které je složeno z tzv. Wehneltového válce, anody a katody. Katodou může být wolframové vlákno nebo elektronová tryska na bázi hexaboridu lanthanu (LaB_6), která emituje elektrony. Katoda je vystředěna do středu otvoru Wehneltova válce, odkud jsou elektrony urychleny anodou pro průlet tubusem a letí směrem

na kondenzor. Jako kondenzor slouží dvě kondenzorové čočky, jejichž úlohou je promítnout obraz křížště na preparát a homogenně jej ozářit. Nejdůležitějším prvkem TEM je objektivová čočka, protože tvoří základní obraz. Pro další zvětšení obrazu se dále používá projektiv (nazývané také projektor), který je tvořen až čtyřmi čočkami. Úpravou procházejícího proudu čočkami můžeme měnit výsledné zvětšení mikroskopu. Obraz je promítnut na fluorescenční stínítko, pokryté fluorescenčním sulfidem zinečnatým, který emituje zelené světlo, v závislosti na množství dopadajících elektronů. Obraz z TEM můžeme zaznamenat na fotografický film, který je v dnešní době nahrazen digitální CCD kamerou. Na obrázku 5 je zobrazeno schéma transmisního elektronového mikroskopu v porovnání se světelným mikroskopem (Vůjtek et al., 2012; Laboratoř mikroskopie atomárních sil).



Obr. 5. Zjednodušené schéma světelného a transmisního elektronového mikroskopu. Namísto zdroje světla je v TEM elektronické dělo. Obrázek převzat a upraven z: <https://cmrf.research.uiowa.edu/transmission-electron-microscopy>

5.1.1 Metody přípravy vzorků pro TEM

Vzorek, který chceme pozorovat v TEM, se aplikuje na mikroskopickou síťku (nejčastěji měděnou), která je potažená tenkým uhlíkovým filmem. Způsob přípravy vzorků ovlivňuje výsledný kontrast proteinových komplexů v obrazu. Pro strukturní

analýzu proteinových komplexů se velmi často používá metoda negativního barvení. Biomolekuly se vkládají do roztoků solí těžkých kovů. Při sušení vyplní soli těžkých kovů prázdné prostory kolem molekul, přičemž nepronikají do hydrofilních částí proteinu. Před aplikací solí těžkých kovů je nutné uhlíkový film potažený mikroskopickou měděnou mřížku upravit doutnavým výbojem, aby se film stal více hydrofilní a proteiny lépe přilnuly na film.

Jinou metodou využívanou při přípravě biologických vzorků je metoda kryogenní EM, která spočívá v rychlém zmrazení biologického vzorku. Vytvoří se tenká amorfní vrstvička ledu, ve které jsou objekty vizualizovány bez kontrastující látky. Zatímco metodou kryogenní EM dosahujeme lepšího rozlišení oproti metodě negativního barvení, kontrast je nižší (Boekema et al., 2009). Kryogenní EM také klade vyšší nároky na přístrojové vybavení.

6 Materiál a metody

6.1 Použité chemikálie

Askorbát sodný	Sigma
BSA	Sigma
Digitonin	Sigma
Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl	Sigma
Hepes	Sigma
Chlorid sodný	Lachema
Chlorid hořečnatý, hexyhydrát	Lachner
Sacharosa	Lachema
Tris pufr	Sigma
Uranyl acetát	

6.2 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byl použit ječmen setý (*Hordeum vulgare*) a mutant ječmene *viridis zb63*, který se vyznačuje téměř úplnou absencí fotosystému I.

6.2.1 Knopův roztok

Rostliny byly zalévány Knopovým roztokem, který byl připraven následujícím způsobem: k 950 ml deionizované vody bylo přidáno po 10 ml ze zásobních roztoků (tab. 1). Jako poslední byly přidány 3 kapky 50% roztoku FeCl_3 .

Tab. 1. Složení zásobních roztoků pro přípravu Knopova roztoku.

Chemikálie	Koncentrace (g/l)
KCl	7.1
KH_2PO_4	14.3
KNO_3	14.3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	57.2
MgSO_4	14.3

6.3 Pěstování ječmene

Semínka ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a mutanta ječmene byla nasazeny do inertního materiálu (perlitu). Rostliny ječmene setého byly pěstovány ve fytokomoře Microclima 1750 (Snijders Scientific, Holandsko) za podmínek osvětlení 16 hodin den

a 8 hodin tma. Ozáření byla $140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Rostliny byly pěstovány po dobu 9 dnů při teplotě $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ a relativní vlhkosti 60/70%.

Rostliny mutanta ječmene byly pěstovány ve fyto-komóře Microclima 1750 (Snijders Scientific, Holandsko) za podmínek osvětlení 16 hodin den a 8 hodiny tma. Ozáření byla $140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Rostliny byly pěstovány po dobu 7 dnů při teplotě $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a relativní vlhkosti 50%.

Rozdílné podmínky pěstování byly způsobeny vytižeností fyto-komory na pracovišti.

6.4 Vystavení teplotnímu stresu

Listy ječmene setého byly adaptované na tmu po dobu 15 minut. Po té byly listy vystaveny po dobu 30 minut teplotnímu stresu ve vodní lázni termostatu JulaboED F12 (Julabo Labortechnik, Německo) při teplotách $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$. V případě mutantu ječmene *viridis zb63* byl teplotní stres, z důvodu nedostatku rostlinného materiálu, prováděn až na izolovaných tylakoidních membránách před samotnou izolací granálních membrán v mikrozkuřkách. Teplotní stres mutanta ječmene byl dodatečně doplněn ještě o další dvě teploty a to $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.5 Izolace tylakoidních membrán

Izolace tylakoidních membrán byla provedena kombinací protokolů z prací Dau et al., (1995) a Hideg, (2004). Horní polovina listů ječmene byla ustřížena a listy byly vloženy do homogenizační nádoby a bylo přidáno 150 ml pufru A (viz tab. 2) vychlazeném na teplotu $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Listy byly homogenizovány pomocí tyčového homogenizátoru T25basic (IKA Labortechnik, Německo) při 13 000 otáčkách za minutu. Homogenizace probíhala 4x v 5 sekundových intervalech. Po dobu homogenizace byla homogenizační nádoba chlazená v ledové lázni. Homogenát byl přefiltrován přes 2 vrstvy nylonové síťky (velikost oka $40\text{ }\mu\text{m}$). Filtrát byl rozdělen do čtyř 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován v centrifuze 3-30K (Sigma, Německo). Centrifuga byla nastavena na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a centrifugace probíhala při 5000 g, 6 minut. Suspenze byla odlita a pelet resuspendován v pufru B (viz tab. 2) vychlazeném na 0°C . Resuspendovaný pelet byl rozdělen do dvou 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován ve vychlazené centrifuze na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 5000 g, 10 minut. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v pufru C (viz tab. 2) vychlazeném na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Resuspendovaný pelet byl přelit do jedné centrifugační kyvety a centrifugován v centrifuze nastavené na teplotu 4 °C při 5000 g, 5 minut. Supernatant byl odlit a vzniklý pelet byl resuspendován v minimálním množství (asi 1 ml) pufru C. U suspenze tylakoidních membrán byla změřena pomocí spektrometru UV550 (Thermo Spectronic, USA) absorbance chlorofylu při vlnových délkách 646,8; 663,2 a 750 nm. Hodnoty absorbance byly použity pro výpočet koncentrace chlorofylu a, b podle Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987):

$$c_a = 12.25(A_{663.2} - A_{750}) - 2.79(A_{646.8} - A_{750})$$

$$c_b = 21.50(A_{646.8} - A_{750}) - 5.10(A_{663.2} - A_{750})$$

c_a ... koncentrace chlorofylu *a* v $\mu\text{g/ml}$

c_b ... koncentrace chlorofylu *b* v $\mu\text{g/ml}$.

Vhodným naředěním byly získány roztoky izolovaných tylakoidních membrán ječmene setého o koncentraci chlorofylu 2000 $\mu\text{g/ml}$ a mutanta ječmene o koncentraci 230 $\mu\text{g/ml}$. Jednotlivé vzorky byly rozděleny do mikrozkušavek po 100 μl a uloženy do -80 °C pro následné použití. Veškerá práce s listy a následná izolace probíhala za nízké intenzity zeleného osvětlení. Rostlinný materiál byl chlazen v ledové lázni.

Tab. 2. Složení pufrů pro izolaci tylakoidních membrán

	Chemikálie	Koncentrace
Pufř A (pH 7.2)	Sacharosa	400 mM
	HEPES	35 mM
	NaCl	400 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	4 mM
	Askorbát sodný*	5 mM
	BSA*	2 mg/ml
Pufř B (pH 7.5)	HEPES	25 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	8 mM
	Na-EDTA	1 mM
Pufř C (pH 7.2)	Sacharosa	400 mM
	HEPES	50 mM
	NaCl	15 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mM

* Přidáno před použitím.

6.6 Izolace fragmentů granálních membrán

Následující postup byl společný pro oba rostlinné materiály: V chladové komoře bylo do mikrozkuhavky přidáno 100 μ l vzorku izolovaných tylakoidních membrán. Pro izolaci granálních membrán z tylakoidních membrán ječmene setého byl použit následující postup: Do mikrozkuhavky byl přidán pufr C neobsahující sacharosu, a digitonin (koncentrace digitoninu byla 0,7 %). Celkový objem pufru, digitoninu a vzorku činil 400 μ l. Koncentrace chlorofylu byla 2 mg/ml. Pro vzorky tylakoidních membrán mutanta ječmene byl použit následující postup: Do mikrozkuhavky byl přidán pufr C neobsahující sacharosu, vychlazený na 0 °C a digitonin (koncentrace digitoninu byla 0,2 %). Celkový objem pufru, digitoninu a vzorku činil 115 μ l. Koncentrace chlorofylu byla 0,23 mg/ml. Následující postup byl společný pro oba rostlinné materiály: Mikrozkuhavka byla v chladové komoře na 30 minut míchána. Po té byla mikrozkuhavka centrifugována ve vychlazené centrifuzě na 4 °C při 7 000g, 10 minut. Supernatant byl odlit a pelet byl resuspendován v 1 ml pufru C, který neobsahoval sacharosu. Resuspendovaný pelet byl centrifugován ve vychlazené centrifuzě na 4 °C při 7 000g, 10 minut. Celý proces promývání a centrifugace byl opakován 2-3 \times v případě ječmene setého (dle potřeby) a 1 \times v případě mutanta ječmene. Poslední pelet vzorku ječmene setého byl resuspendován v 100 μ l pufru C neobsahující sacharosu. Pelet vzorku mutanta ječmene byl resuspendován v 50 μ l pufru C neobsahující sacharosu.

6.7 Odstranění komplexu vyvíjející kyslík (OEC)

Odstranění OEC na izolovaných tylakoidních membránách mutanta ječmene *viridis zb63* bylo provedeno alkalickým 0,8M TRIS puforem, pH 9,6 (Busheva et al., 2012). Ke 100 μ l vzorku tylakoidních membrán nestresovaného mutanta ječmene *viridis zb63* byl přidán 0,8M TRIS pufr. Koncentrace chlorofylů byla 0,2 mg/ml. Mikrozkuhavka se vzorkem a TRIS puforem byla míchána v chladové komoře 15 minut.

6.8 Elektronová mikroskopie

6.8.1 Příprava vzorků

Elektron-mikroskopická síťka potažená podpurným uhlíkovým filmem byla upravena doutnavým výbojem (PELCO easiGlow Discharge System, Ted Pella, Californie, USA). Elektron-mikroskopická síťka se vystavuje doutnavému výboji proto,

že uhlíkový film na elektron-mikroskopické mřížce se stane hydrofilní, což slouží pro lepší přilnutí vzorku. Vzorku bylo nanášeno 5 μ l. Po 1 minutě byl vzorek odsán a na síťku bylo nanášeno 5 μ l 2% uranylu acetátu, který byl po 2 minutách odsán. Uranyl acetát slouží pro zlepšení kontrastu biologického materiálu v elektronovém mikroskopu.

6.8.2 Elektronová mikroskopie granálních membrán

Připravené vzorky granálních membrán byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem Jeol-2010F (Jeol, Japan) při zvětšení 25 000 \times . Snímky byly pořízeny CCD kamerou G2-KeenView ovládanou softwarem iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions).

6.8.3 Popis vyhodnocování snímků

U pořízených snímků granálních membrán ječmene setého a mutanta ječmene setého *viridis zb63* byla zhodnocena organizace PSII komplexů v granálních membránách. Organizace byla určena jako náhodná nebo krystalická. Analýza vzdáleností PSII komplexů v granální membráně byla provedena pomocí programu GRIP (Univerzita v Gronigenu, Nizozemí) a programu Microsoft Excel.

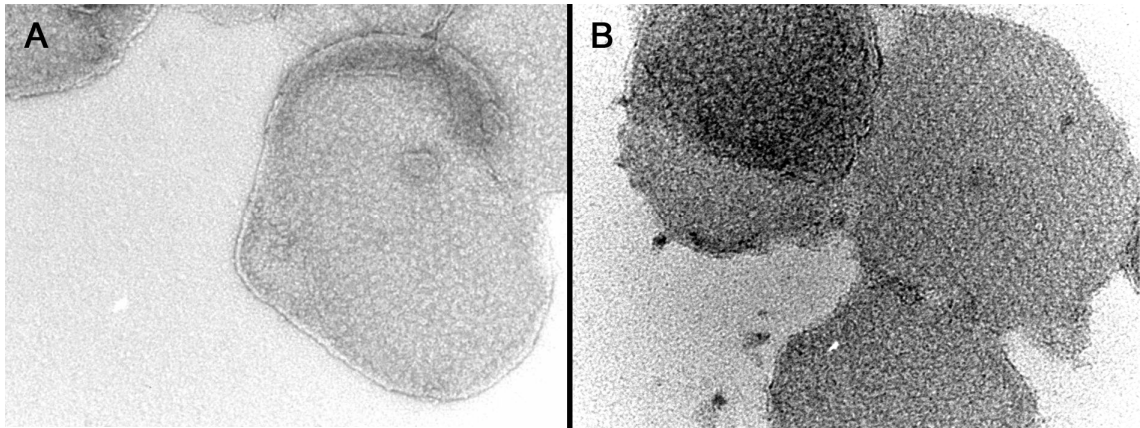
7 Výsledky

Cílem této práce bylo zjistit vliv zvýšené teploty na organizaci superkomplexů PSII v granálních membránách ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

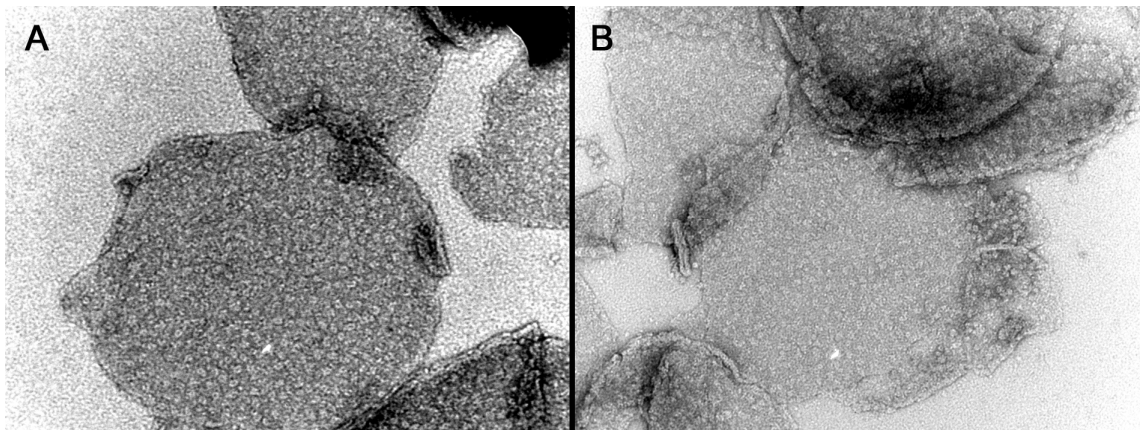
7.1 Vliv teplotního stresu na organizaci PSII v granálních membránách ječmene setého

Vliv zvýšené teploty na organizaci PSII byl sledován v granálních membránách izolovaných z listů ječmene setého. Granální membrány byly izolovány z kontrolních (teplotně nestresovaných) listů ječmene setého a dále z listů, které byly vystaveny teplotnímu stresu 42 °C a 46 °C.

Z každé teplotní varianty ječmene setého byly izolovány fragmenty granálních membrán, které byly následně snímkovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu. U každé teplotní varianty bylo pořízeno 25 snímků. Analýza jednotlivých snímků byla zaměřena na distribuci PSII komplexů v izolovaných tylakoidních membránách. PSII komplex je v granální membráně pozorovatelný díky svému charakteristickému dimeru jaderného komplexu, na jehož lumenální stranu je navázán OEC, který tak přispívá k zvětšení kontrastu PSII v elektronovém mikroskopu. U kontrolního vzorku ječmene setého bylo zjištěno, že většina PSII komplexů vykazuje náhodné uspořádání (viz obr. 5). Jen velmi ojediněle PSII komplexy vykazovaly krystalické uspořádání (viz obr. 5). U granálních membrán připravených z teplotně stresovaných listů ječmene setého již nebyly pozorovány žádné PSII komplexy vykazující toto krystalické uspořádání, všechny PSII komplexy vykazovaly náhodné uspořádání (viz obr. 6). Zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII superkomplexů v granálních membránách ječmene setého vystaveného teplotnímu stresu ukazuje tabulka 3.



Obr. 5. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány kontrolního vzorku ječmene setého vykazující A) náhodné uspořádání PSII komplexů, B) krystalické uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

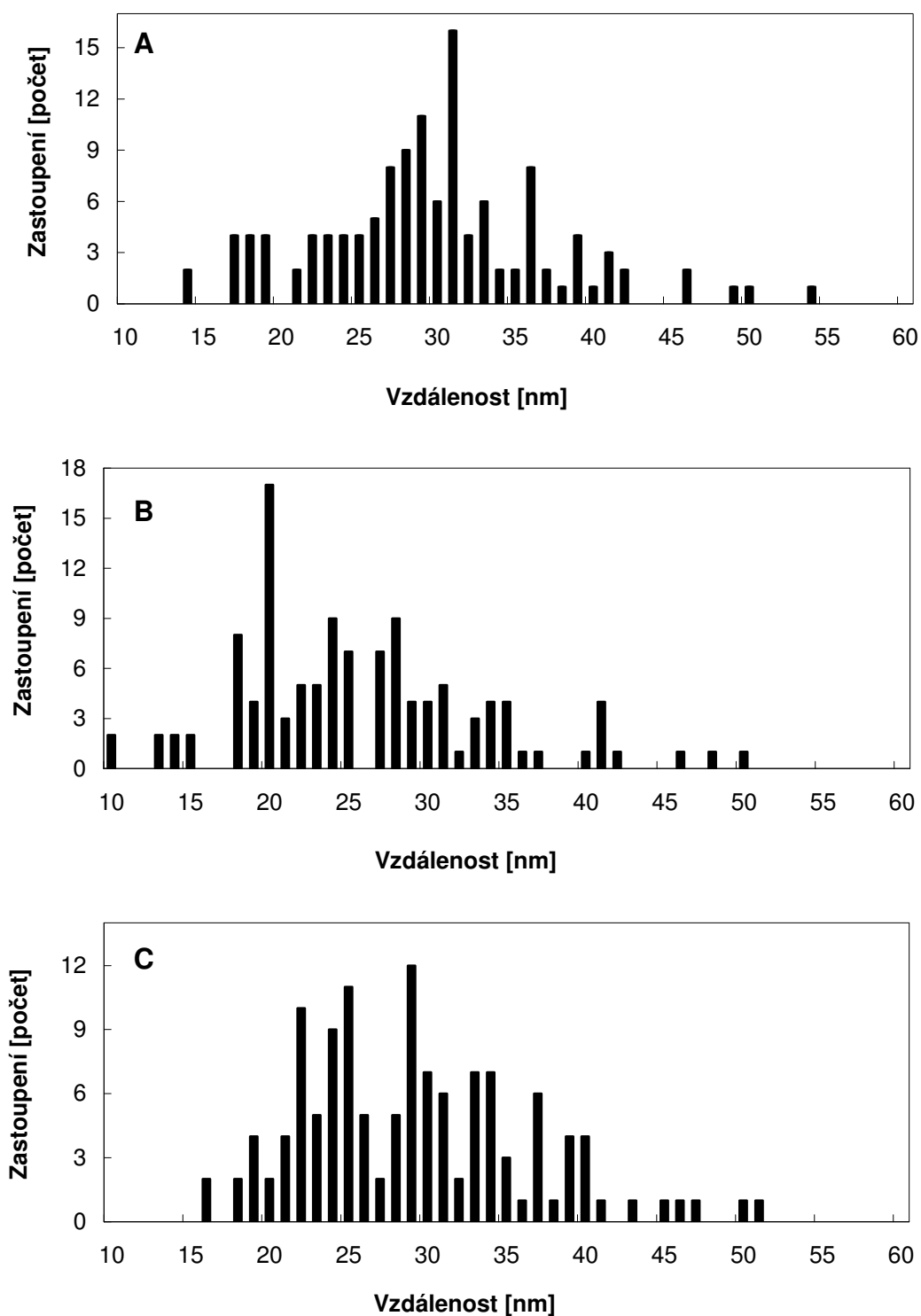


Obr. 6. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány vykazující náhodné uspořádání PSII komplexů teplotně stresovaného vzorku ječmene setého A) 42 °C, B) 46 °C. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

Tab. 3. Zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII ve snímcích granálních membránách ječmene setého po vystavení teplotnímu stresu. U každé teplotní varianty bylo analyzováno celkem 25 mikroskopických snímků.

Teplota (°C)	Krystalické (počet snímků)	Náhodné (počet snímků)	Krystalické (%)	Náhodné (%)
25	1	24	4	96
42	0	25	0	100
46	0	25	0	100

Pro detailnější rozbor vlivu zvýšené teploty na náhodné uspořádání PSII komplexů v granální membráně byla z pořízených snímků provedena analýza vzájemných vzdáleností jednotlivých PSII komplexů. Z každé teplotní varianty byly analyzovány vzdálenosti mezi PSII komplexy z jednoho snímku. Vypočtené hodnoty vzdáleností v programu Excel byly zaneseny do grafu pro každou teplotní variantu zvlášť (viz obr. 7)



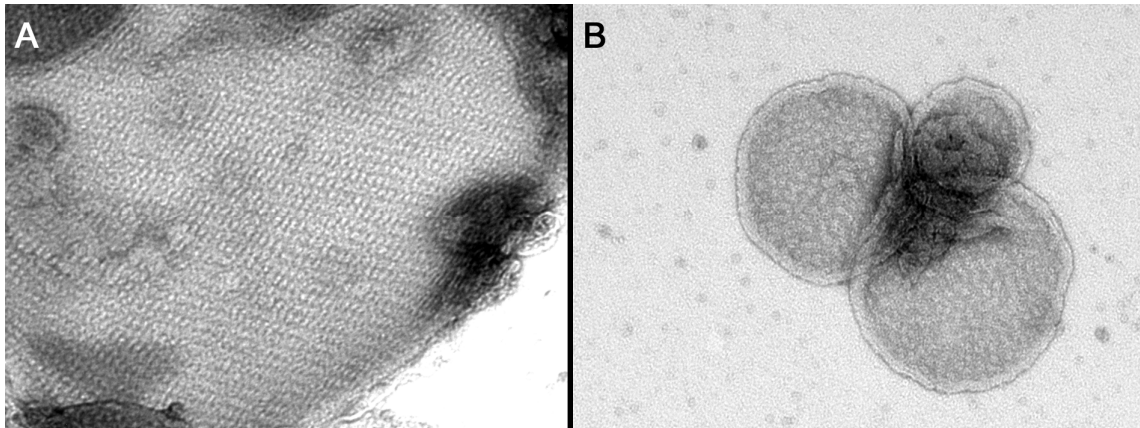
Obr. 7. Vliv teploty na velikosti vzdáleností mezi PSII komplexy v granálních membránách ječmene setého vystavené teplotě A) 25 °C, B) 42 °C, C) 46 °C. U každé teplotní varianty byl analyzován 1 snímek vykazující náhodné uspořádání PSII, zvětšení: 25 000×.

Přes snahu analyzovat vzdálenosti mezi PSII komplexy v granálních membránách se vliv teplotního stresu na organizaci PSII nepodařilo prokazatelně zhodnotit kvůli špatnému kontrastu PSII na snímcích. Proto bylo přistoupeno k experimentu s mutantem ječmene setého *viridis zb63*, který se vyznačuje krystalickým uspořádáním PSII komplexů, a kde by teplotně indukované změny v organizaci PSII měly být lépe viditelné.

7.2 Vliv teplotního stresu na organizaci PSII v granálních membránách mutantu ječmene setého *viridis zb63*

Mutant ječmene setého *viridis zb63* se vyznačuje téměř úplnou absencí PSI komplexů, ale s normální aktivitou PSII. PSII mutantu je složen z dimeru PSII reakčního centra, které je obklopeno monomerními anténami Lhcb4, Lhcb5 a dvěma trimery LHCI. Bylo zjištěno, že mutant ječmene setého *viridis zb63* obsahuje méně PSII antén. Organizace PSII v granálních membránách mutantu je krystalická, proto by jakékoliv teplotně indukované změny v organizaci PSII komplexů měly být dobře pozorovatelné (Morosinotto et al., 2006).

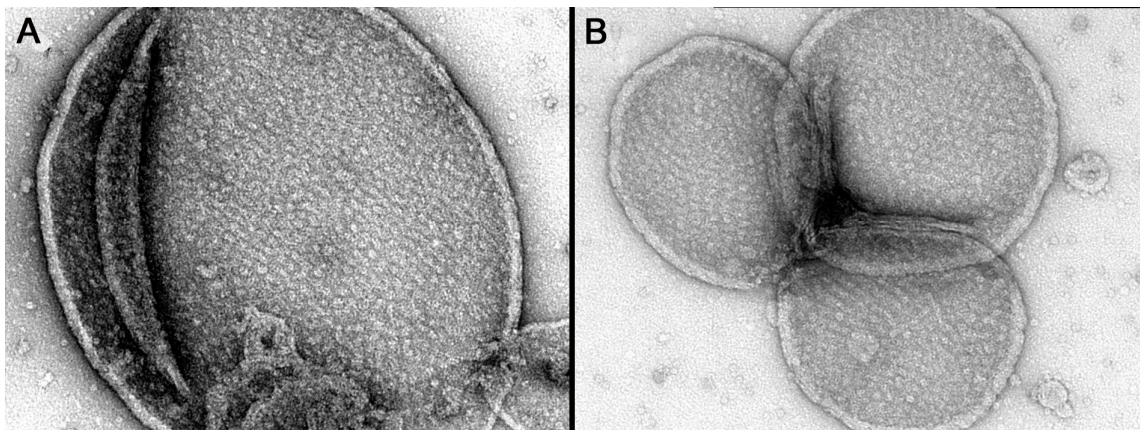
V další části experimentu byla provedena izolace granálních membrán z mutantu ječmene *viridis zb63*, jehož tylakoidní membrány byly teplotně stresovány. Z každé teplotní varianty izolovaných tylakoidních membrán mutantu ječmene setého bylo analyzováno 50 snímků granálních membrán. V granálních membránách kontrolních vzorků mutantu ječmene setého *viridis zb63*, který nebyl teplotně stresován, byla organizace PSII v 82 % analyzovaných snímků krystalická (viz obr. 8). Náhodné uspořádání PSII v granálních membránách kontrolních vzorků mutantu ječmene setého *viridis zb63* bylo oproti kontrolním vzorkům granálních membrán ječmene setého méně časté. Pouze v 18 % snímků granálních membrán mutantu ječmene bylo pozorováno náhodné uspořádání PSII (viz obr. 8).



Obr. 8. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány kontrolního vzorku mutanta ječmene setého *viridis zb63* vykazující A) krystalické uspořádání PSII komplexů B) náhodné uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

Následně bylo provedeno zhodnocení zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII v granálních membránách teplotně stresovaných mutantů ječmene setého *viridis zb63*.

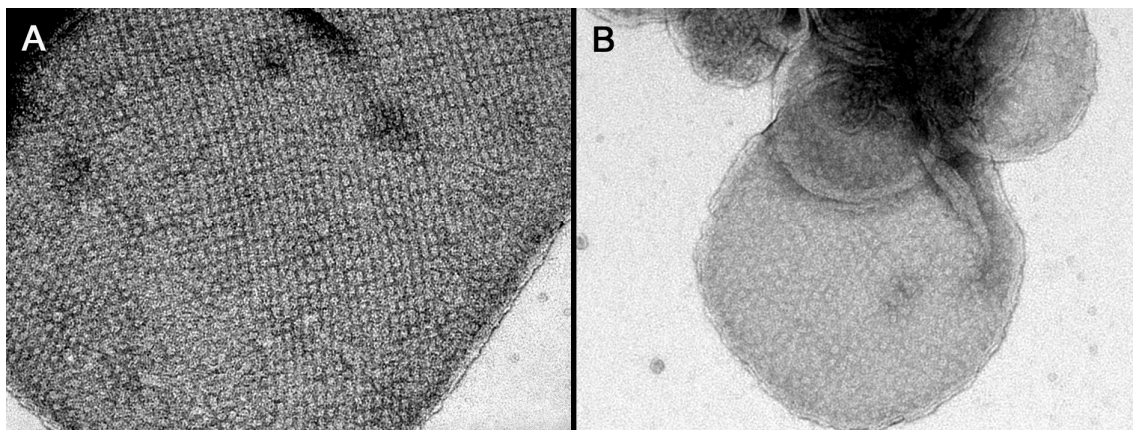
Při teplotě 35 °C byl pozorován úbytek krystalického uspořádání PSII membránách mutanta. Krystalické uspořádání PSII bylo pozorováno na 72 % snímcích granálních membránách (viz obr. 9). Zastoupení náhodného uspořádání PSII v membránách mutanta ječmene setého bylo pozorováno na 28 % snímcích (viz obr. 9).



Obr. 9. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány teplotně stresovaného vzorku (35 °C) mutanta ječmene setého *viridis zb63* vykazující A) krystalické uspořádání PSII komplexů B) náhodné uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

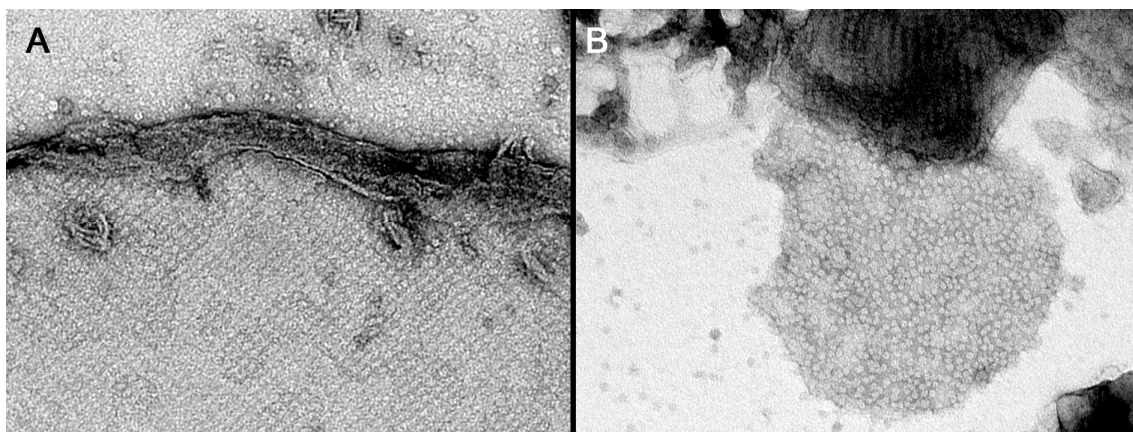
V granálních membránách mutanta ječmene *viridis zb63*, u něhož byly tylakoidní membrány vystaveny teplotnímu stresu 38 °C, dochází k razantnímu úbytku krystalického uspořádání PSII. Převažuje náhodné uspořádání PSII. Krystalické uspořádání PSII v granálních membránách bylo pozorováno na 48 % mikroskopických

snímků (viz obr. 10). Náhodné uspořádání PSII bylo zastoupeno na 52 % snímcích (viz obr. 10).



Obr. 10. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány teplotně stresovaného vzorku (38 °C) mutanta ječmene setého *viridis zb63* vykazující A) krystalické uspořádání PSII komplexů B) náhodné uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

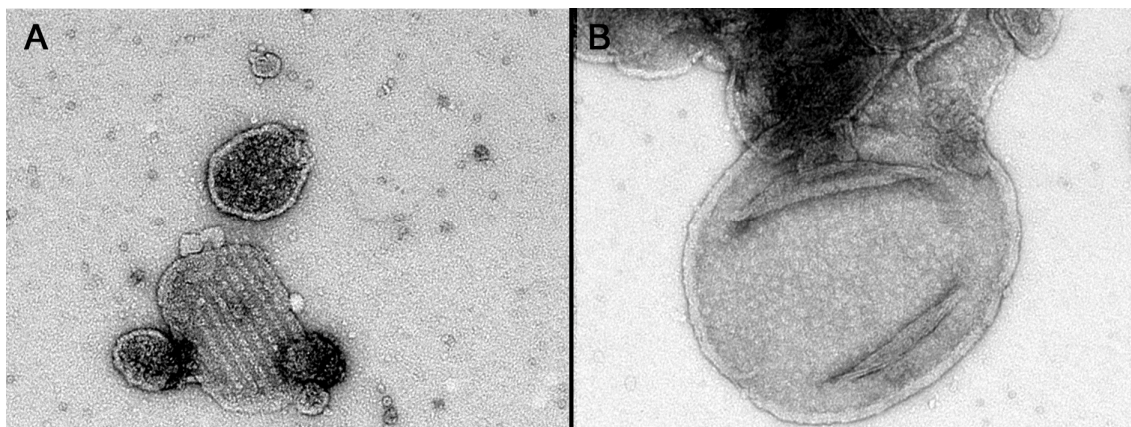
V granálních membránách mutanta ječmene *viridis zb63*, jehož tylakoidní membrány byly vystaveny teplotnímu stresu 42 °C, již výrazně převažovalo náhodné uspořádání PSII komplexů. Zatímco zastoupení krystalického uspořádání PSII bylo pozorováno na 18 % snímcích, v 82 % snímcích membrán byla organizace PSII náhodná (viz obr. 11).



Obr. 11. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány teplotně stresovaného vzorku (42 °C) mutanta ječmene setého *viridis zb63* vykazující A) krystalické uspořádání PSII komplexů B) náhodné uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

Granální membrány mutanta ječmene setého *viridis zb63*, u kterého byly tylakoidní membrány vystaveny teplotě 46 °C, neobsahovaly téměř žádné PSII vykazující krystalické uspořádání. Pouze na 4 snímcích granálních membrán (8 %)

bylo pozorované krystalické uspořádání PSII komplexů. Ve zbylých 92 % snímcích byla organizace PSII náhodná (viz obr. 12).



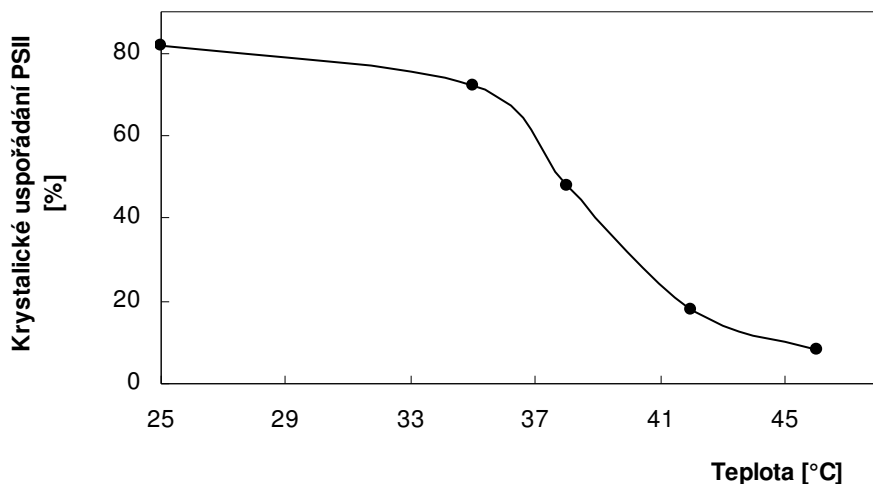
Obr. 12. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány teplotně stresovaného vzorku (46 °C) mutanta ječmene setého *viridis zb63* vykazující A) krystalické uspořádání PSII komplexů B) náhodné uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

Přehled zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII v granálních membránách mutanta ječmene setého *viridis zb63* v jednotlivých teplotních variantách přehledně shrnuje tabulka 4.

Tab. 4. Zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII ve snímcích granálních membránách mutanta ječmene setého *viridis zb63* po vystavení teplotnímu stresu. U každé teplotní varianty bylo analyzováno celkem 50 mikroskopických snímků.

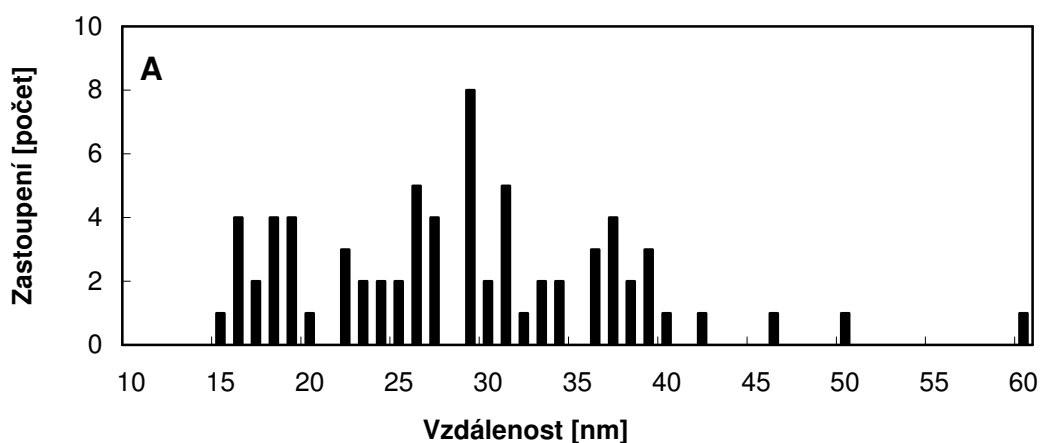
Teplota (°C)	Krystalické (počet snímků)	Náhodné (počet snímků)	Krystalické (%)	Náhodné (%)
25	41	9	82	18
35	36	14	72	28
38	24	26	48	52
42	9	41	18	82
46	4	46	8	92

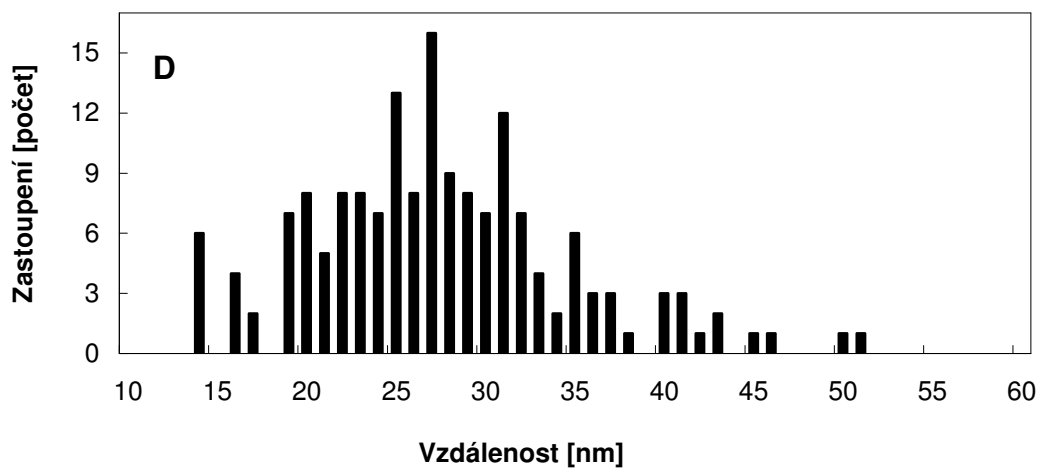
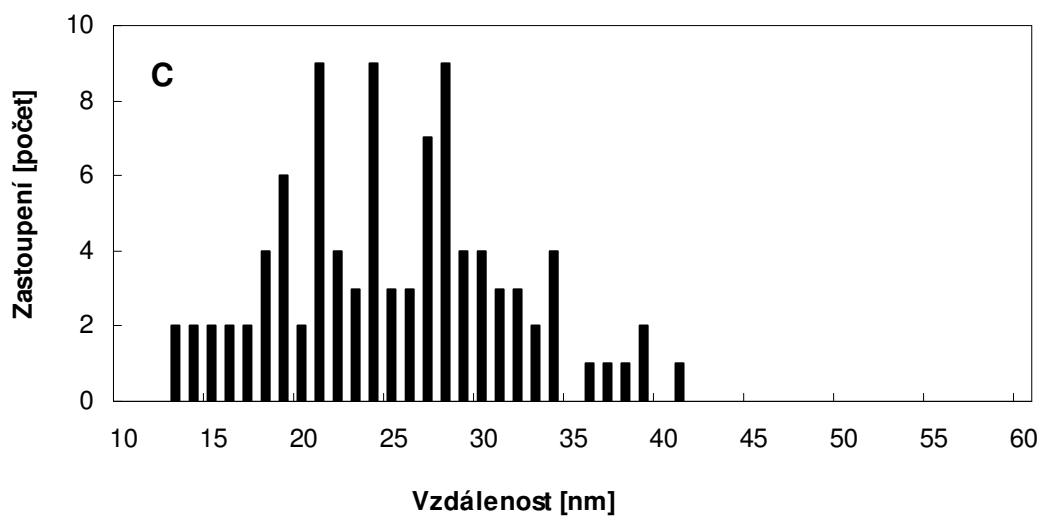
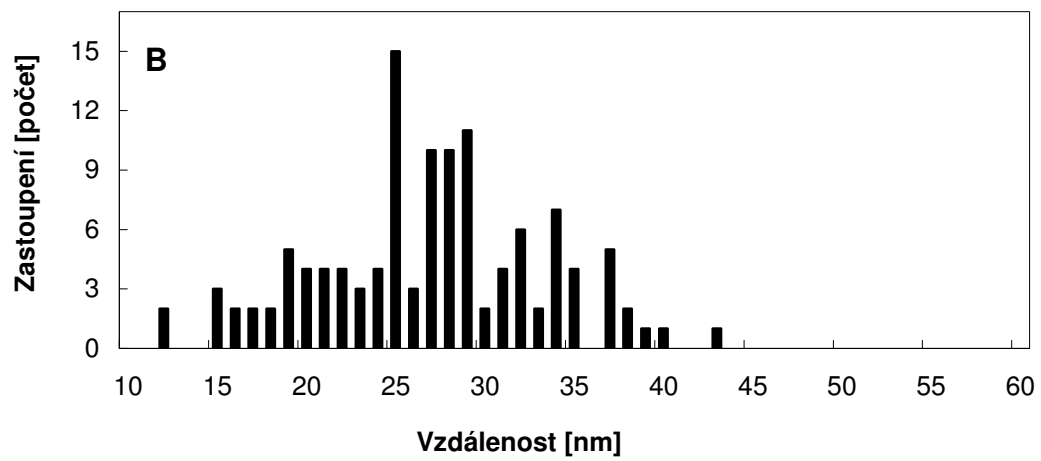
Z obdržných výsledků lze konstatovat, že s rostoucí teplotou byl pozorován úbytek krystalického uspořádání PSII komplexů v granálních membránách mutanta ječmene setého *viridis zb63*. Vliv teploty na zastoupení krystalického uspořádání PSII komplexů v granálních membránách mutanta ječmene znázorňuje obrázek 13.

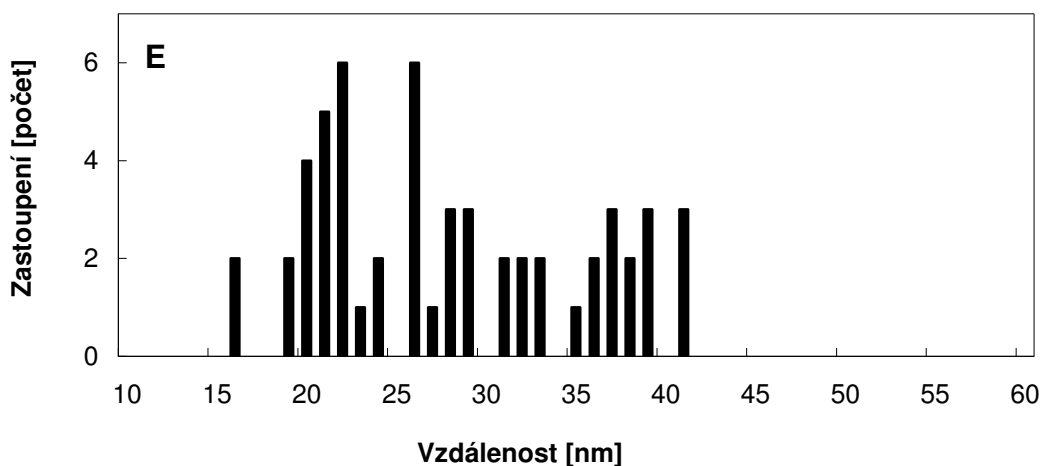


Obr. 13 Vliv teploty na zastoupení krystalického uspořádání PSII komplexů v granálních membránách mutanta ječmene setého *viridis zb63*. Z každé teplotní varianty bylo analyzováno celkem 50 mikroskopických snímků.

Ze získaných snímků granálních membrán byla provedena analýza vzdáleností mezi PSII, aby mohl být detailněji zhodnocen vliv teplotního stresu na organizaci PSII v granálních membránách. Byly analyzovány vzdálenosti PSII v granální membráně mutanta ječmene setého *viridis zb63* z jednoho snímku pro každou teplotní variantu. Vzdálenosti mezi PSII byly spočítány v programu Excel. Vypočtené vzdálenosti PSII byly zaneseny do grafu pro každou teplotní variantu zvlášť (viz obr. 14)





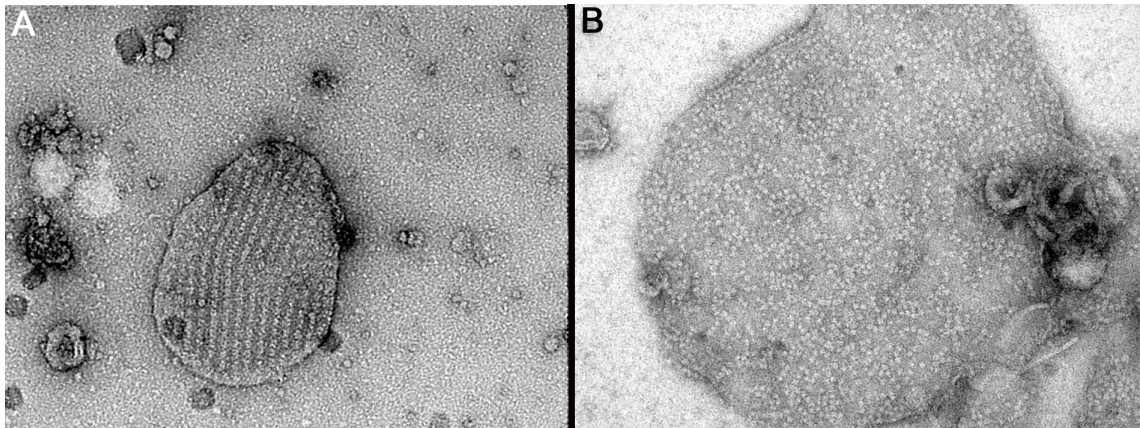


Obr. 14. Vliv teploty na velikosti vzdáleností PSII v granálních membránách mutanta ječmene setého *viridis zb63* vystavené teplotě A) 25 °C, B) 35 °C, C) 38 °C D) 42 °C, E) 46 °C. U každé teplotní varianty byl analyzován 1 mikroskopický snímek s náhodným uspořádáním PSII v membránách, zvětšení: 25 000×.

Protože teplotní závislost krystalického uspořádání PSII komplexů v granální membráně (obr. 13) nápadně připomíná průběh teplotní inaktivace funkce OEC, byl proveden ještě jeden neplánovaný experiment, ve kterém byl posouzen vliv strukturální celistvosti OEC na organizaci PSII komplexů.

7.3 Vliv OEC na organizaci PSII v granálních membránách mutanta ječmene setého *viridis zb63*

V posledním experimentu byl chemicky odstraněn OEC v nestresovaném vzorku tylakoidních membránách pomocí 0,8M Tris pufru, pH 9,6. Následně byly membrány pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem při zvětšení 25 000×. Celkem bylo analyzováno 50 snímků, ze kterých byly vybrány 2 reprezentativní snímky ukazující krystalické a náhodné uspořádání PSII v granální membráně (viz obr. 15). Bylo zjištěno, že po chemickém odstranění OEC z PSII komplexů byl pozorován rozpad krystalického uspořádání PSII komplexů v granální membráně. Analýza snímků ukazuje, že ve více snímcích (66 %) granálních membrán vykazuje PSII náhodné uspořádání. Zastoupení náhodného a krystalického uspořádání PSII po chemickém odstranění OEC ukazuje tabulka 5.



Obr. 15. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány teplotně nestresovaného vzorku mutanta ječmene setého *viridis zb63* po chemickém odstranění OEC vykazující A) krystalické uspořádání PSII komplexů B) náhodné uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Velikost snímků: 1100×825 nm.

Tab. 5. Zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII ve snímcích granálních membrán v kontrolním vzorku (25 °C) nestresovaného mutanta ječmene *viridis zb63* a zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII ve snímcích granálních membrán v kontrolním vzorku (25 °C) nestresovaného mutanta ječmene *viridis zb63* po chemickém odstranění kyslík vyvíjejícího komplexu. Bylo analyzováno 50 snímků z každé varianty.

Teplota (°C)	Kontrola		Po odstranění OEC	
	Krystalické (%)	Náhodné (%)	Krystalické (%)	Náhodné (%)
25	82	18	34	66

8 Diskuze

Teplotní stres vede ke změně struktury tylakoidů a PSII komplexů. Z dřívějších prací bylo zjištěno, že teplotní stres je zodpovědný za rozvolnění tylakoidní membrány. Vlivem tepla dochází ke změnám distribuce proteinových komplexů LHCII a strukturálním změnám PSII. Z biochemických analýz bylo zjištěno, že jaderné komplexy PSII migrují z gran do oblastí stromálních tylakoidů, zatímco LHCII zůstává v granech (Sundby et Andersson, 1985). V bakalářské práci byl zhodnocen vliv teplotního stresu na organizaci PSII v granálních membránách izolovaných tylakoidních membrán pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Pro studium byl vybrán organismus ječmen setý, jehož listy byly teplotně stresovány při teplotě 42 °C a 46 °C a jako kontrolní teplota byla zvoleno 25 °C. Tyto teploty byly vybrány z toho důvodu, že při nich nastávají výrazné změny ve fotochemické funkci PSII a bylo očekáváno, že tyto funkční změny povedou i ke změnám organizace PSII v membráně. Při teplotě 42 °C dochází k rozpadu OEC, kdy jsou uvolňovány jeho podjednotky PsbO, PsbP, PsbQ a mangany z vazebných míst. Úplná inaktivace fotochemických dějů PSII nastává při teplotě 49-50 °C (Busheva et al., 2012).

Ze snímků z elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že většina snímků granálních membrán ječmene setého, u kterého nebyl proveden teplotní stres, vykazuje náhodné uspořádání PSII a jen nepatrné množství z celkových 25 analyzovaných snímků granálních membrán ječmene setého, vykazuje krystalické uspořádání PSII komplexů. I v průběhu snímkování granálních membrán bylo krystalické uspořádání PSII komplexů pozorováno jen velmi vzácně. Oproti huseníčku rolnímu (*Arabidopsis thaliana*) je zastoupení krystalických struktur v kontrolních vzorcích ječmene setého výrazně nižší. Podíl krystalických domén u huseníčku rolního se pohybuje kolem 10 % (Kouřil et al., 2013). V ostatních snímcích granálních membrán teplotně stresovaných vzorků ječmene setého bylo pozorováno pouze náhodné uspořádání PSII. Pro objektivnější zhodnocení vlivu teplotního stresu na organizaci PSII by bylo třeba analyzovat větší množství snímků granálních membrán ječmene.

Rozborem vzdáleností PSII bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou se vzdálenosti mezi jednotlivými PSII zmenšují. Zatímco v kontrolních vzorců granálních membrán byly vzdálenosti mezi jednotlivými PSII určeny nejčastěji v rozmezí 27-31 nm, při teplotě 46 °C bylo největší zastoupení vzdáleností 18-25 nm. Toto zjištění je zajímavé vzhledem ke dřívějším pracím, ve kterých se dovídáme, že PSII vlivem

vyšších teplot migrují do stromálních tylakoidů. Proto by se dalo očekávat naopak snížení hustoty PSII a zároveň zvětšení vzdáleností mezi jednotlivými PSII. Vliv teploty na uspořádání PSII komplexů v membránách však nebylo možné přesně a objektivně zhodnotit z důvodu nižšího rozlišení, které bránilo k jednoznačnému určení pozic PSII ve snímcích granálních membrán. V průběhu experimentální práce bylo přistoupeno na experiment s mutantem ječmene setého *viridis zb63*, který téměř postrádá PSI komplexy. Organizace PSII komplexů je v granálních membránách krystalická, jeví se tedy jako vhodný materiál pro posouzení vlivu teploty na uspořádání PSII v tylakoidní membráně, protože jakékoliv teplotně indukované změny by měly dobře pozorovatelné (Morosinotto et al., 2006).

Pro studium vlivu teploty na uspořádání PSII v tylakoidní membráně mutanta ječmene setého *viridis zb63* byly zvoleny tyto teploty: kontrolní 25 °C, 35 °C, 38 °C, 42 °C a 46 °C. Oproti ječmenu setému byly přidány dvě teploty, aby bylo možné lépe zhodnotit, která teplota je pro organizaci PSII klíčová, tj. při které nastávají největší změny v uspořádání PSII v granálních membránách. Ze studií, které se zabývají vlivem teploty na strukturu a funkci PSII komplexu, je známo, že při zvýšených teplotách dochází k postupným strukturním změnám na úrovni PSII, což by mohlo mít vliv i na jeho organizaci v granální membráně. Těmito teplotami jsou 35 °C, při které dochází k uvolňování LHCII od jádra PSII. Další teplotou, při které dochází k významné změně ve PSII je 38 °C, při které se začínají uvolňovat proteiny PsbO, P, Q a mangany z jejich vazebných míst (Busheva et al., 2012, Yamamoto et al., 2008). Na snímcích granálních membrán mutanta ječmene setého, které nebyly teplotně stresovány, bylo pozorováno krystalické uspořádání na 82 % snímcích granálních membrán. Ve zbylých snímcích teplotně nestresovaných granálních membrán mutanta ječmene setého bylo uspořádání PSII komplexů náhodné. Dále byly analyzovány vzdálenosti PSII v jednom snímku granálních membrán z každé teplotní varianty. Z analýzy vzdáleností PSII u kontrolního vzorku vyplývá, že jednotlivé PSII byly od sebe vzdáleny od 14 do 50 nm, přičemž největší zastoupení vzdáleností bylo v rozmezí 26-30 nm.

Vzorky izolovaných tylakoidních membrán mutanta ječmene setého *viridis zb63*, které byly vystaveny teplotě 35 °C, vykazovaly na 72 % snímcích granálních membrán krystalické uspořádání PSII komplexů. Docházelo k nárůstu náhodné organizace PSII v granálních membrán. Je možné, že je to způsobené destabilizací PSII, při které

dochází při 35 °C k uvolňování LHCII komplexů od jádra PSII. Výrazné zmenšení nebo zvětšení vzdálenosti PSII nebylo zjištěno.

Při teplotě 38 °C byl pozorován výraznější pokles krystalického uspořádání PSII komplexů v granálních membránách mutanta ječmene setého *viridis zb63*. Na snímcích granálních membrán převažoval náhodný systém PSII (vyskytoval se na 52 % snímcích teplotní varianty). Při teplotě 38 °C došlo pouze k mírnému zmenšení vzdáleností PSII. Nejvyšší zastoupení vzdáleností PSII v membránách bylo zjištěno v rozmezí 19-28 nm.

U teplotní varianty 42 °C mutanta ječmene setého *viridis zb63* již došlo k razantnímu zvýšení zastoupení náhodného uspořádání PSII v granálních membránách. Náhodné uspořádání bylo možné pozorovat na 82 % snímcích membrán, což bylo oproti granálním membránám vystavených 25 °C více než 4× vyšší zastoupení. Vzdálenosti PSII se od předchozí teplotní varianty jen mírně lišily. Vzdálenosti PSII byly nejčastěji spočítány v rozmezí 20-27 nm.

Při teplotě 46 °C pouze na 8 % snímcích granálních membrán mutanta ječmene vykazovaly PSII komplexy krystalické uspořádání. Většina PSII byla v granálních membránách uspořádána náhodně. Rozborem vzdáleností bylo zjištěno, že nejčastější vzdálenost mezi PSII byla v rozmezí 21-26 nm. Obdržené výsledky ukazují, že zvýšená teplota prokazatelně mění interakce mezi PSII komplexy v granální membráně. Změna těchto interakcí vede k rozpadu krystalického uspořádání PSII v membráně.

U mutanta ječmene setého nebyly se vzrůstající teplotou pozorovány výraznější změny ve vzdálenostech PSII v granálních membránách, které byly vystaveny teplotnímu stresu. Pro průkaznější výsledky by však muselo být analyzováno více snímků. Jednou z možných příčin proč u mutanta *viridis zb63* nedocházelo ke změnám vzdáleností PSII v granálních membránách je ten, že v granálních membránách mutanta *viridis zb63* nejsou volné LHCII. Superkomplex PSII mutanta ječmene setého je tvořen dimerem jaderného komplexu a „strongly“ vazáným LHCII trimerem. Dohromady tvoří C₂S₂ superkomplex, zatímco PSII ječmene setého je tvořen C₂S₂M₂ superkomplexem. Volné LHCII v membráně ječmene setého vlivem teploty mohou agregovat. V granální membráně mutanta se volné LHCII nenacházejí, nedochází ke shlukování proteinů a tím pádem ani ke zkracování vzdáleností mezi PSII komplexy (osobní sdělení vedoucího práce R. Kouřila).

S rostoucí teplotou byl pozorován úbytek krystalického uspořádání PSII v granálních membránách mutant ječmene. Velmi výrazný pokles nastal při teplotě 38 °C, což je teplota, při které také dochází k destabilizaci OEC. Křivka, ukazující

pokles krystalického uspořádání nápadně připomínala křivku inaktivace OEC s rostoucí teplotou. Tato analogie vedla k hypotéze, že teplotní destabilizace OEC, má vliv na krystalickou organizaci PSII v membráně. V dřívějších pracích bylo navrženo, že teplotní inaktivace souvisí s agregací a následnou disociací LHCI. Prozatím se však neví, jak teplo indukuje agregaci LHCI. Busheva et al., 2012 se ve své práci také zabývají, jak souvisí OEC s ochranou jaderných komplexů PSII před vysokoteplotním stresem. Ze 77 K fluorescenčních spekter bylo zjištěno, že dochází k podobným změnám jak u membrán, které byly vystaveny teplotnímu stresu, tak u membrán, které byly ošetřeny Tris pufrem, kterým byl odstraněn OEC. Z tohoto pozorování je vyvozováno, že rozpad OEC vede ke strukturním změnám supramolekulárního uspořádání PSII (Busheva et al., 2012). Aby bylo potvrzeno, zda k reorganizaci a rozpadu krystalického uspořádání PSII dochází vlivem uvolňování OEC, byl proveden krátký experiment na mutantu ječmene.

Pro zhodnocení vlivu destabilizace OEC na organizaci PSII byl v posledním experimentu chemicky odmyt OEC u teplotně nestresovaného vzorku mutantu ječmene. Granální membrány mutantu ječmene byly analyzovány transmisním elektronovým mikroskopem. Analýzou snímků bylo zjištěno, že 66 % snímků granálních membrán skutečně vykazovalo náhodné uspořádání PSII. Oproti kontrolnímu vzorku mutantu ječmene, u kterého nebylo provedeno chemické odstranění OEC, došlo k výraznému nárůstu náhodného uspořádání PSII v granálních membránách. Zatímco u kontrolního vzorku mutantu ječmene vykazovalo více než 80 % granálních membrán krystalické uspořádání PSII, v granálních membránách mutantu ječmene, u kterého byl odstraněn OEC, krystalické uspořádání PSII bylo pozorováno již pouze u 1/3 snímků granálních membrán. Byl tedy potvrzen předpoklad, že uvolňování OEC z lumenální strany PSII, které je indukované vysokou teplotou, má zásadní vliv na destabilizaci krystalického uspořádání PSII komplexů v granální membráně.

9 Závěr

Je známo, že teplotní stres vede ke strukturálním změnám tylakoidních membrán a PSII komplexů. Cílem této práce bylo zpracovat přehled problematiky o vlivu teplotního stresu na funkci, strukturu a organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně a zhodnotit vliv vyšší teploty na organizaci PSII v granálních membránách ječmene setého pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Pouze minimální množství z analyzovaných snímků granálních membrán vykazovalo krystalické uspořádání. V ostatních snímcích granálních membrán kontrolních i teplotně stresovaných (42 °C a 46 °C) vzorcích bylo pozorováno náhodné uspořádání PSII komplexů. Ukázalo se, že s vyšší teplotou dochází ke zkracování vzdáleností PSII v granální membráně. Nicméně pro objektivnější zhodnocení vlivu teplotního stresu na vzdálenosti mezi PSII komplexy by bylo potřeba analyzovat větší počet mikroskopických snímků s vyšším rozlišením a kontrastem PSII komplexů v membráně.

V další části práce byl z důvodů již výše popsanych studován vliv vyšší teploty (35 °C, 38 °C, 42 °C, 46 °C a kontrolní teplota 25 °C) na organizaci PSII v granálních membránách mutantu ječmene *viridis zb63*. Kontrolní vzorek vykazoval na 82 % snímcích krystalické uspořádání PSII v granálních membránách. Bylo zjištěno, že se vzrůstající teplotou docházelo k úbytku krystalických forem PSII v membránách.

U mutantu ječmene setého bylo také studováno, zda strukturální změny PSII při vyšších teplotách souvisí s inaktivací OEC, jak naznačují práce např. Busheva et al., 2012. Po chemickém odstranění OEC z PSII byl pozorován výrazný pokles krystalického uspořádání PSII v membránách, z čehož je možné vyvodit, že změny v organizaci a struktuře PSII jsou spojené s teplotně indukovanými změnami OEC.

Cíle práce zpracovat přehled problematiky a zhodnotit vliv teplotního stresu na organizaci PSII byly splněny. Pro průkaznější výsledky práce by však bylo třeba analyzovat více snímků granálních membrán ječmene i mutantu ječmene.

Protože zvýšená teplota je často spojena i se zvýšeným osvětlením, bylo by zajímavé zhodnotit také vliv zvýšené teploty a světla dohromady na organizaci PSII v granálních membránách.

Použitá literatura

Albertsson P. A. (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci.* **6**, 349-354.

Allakhverdiev S. I., Kreslavski V. D., Klimov V. V., Los D. A., Carpentier R., Mohanty P. (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis research.* **98**, 541-550.

Asada K. (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology.* **141**, 391-396.

Barber J., Nield J., Morris E. P., Zheleva D., Hankamer B. (1997) The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiologia Plantarum* **100**, 817-827.

Berry J., Björkman O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 491–543.

Boekema E. J., Hankamer B., Bald D., Kruip J., Nield J., Boonstra A. F., Barber J., Rögner M. (1995). Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 175–179.

Boekema E. J., Roon H., Breemen J. F. L., Dekker J. P. (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem.* **266**, 444-452.

Boekema E. J., Folea M., Kouřil R. (2009) Single particle electron microscopy. *Photosynthesis research.* **102**, 189-196.

Busheva M., Tzonova I., Stoitchkova K., Andreeva A. (2012) Heat-induced reorganization of the structure of photosystem II membranes: Role of oxygen evolving complex. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **117**, 214–221.

Caffarri S., Kouřil R., Kereiche S., Boekema E. J., Croce R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J.* **28**, 3052-3063.

Dau H., Andrews J. C., Roelofs T. A., Latimer M. J., Liang W. C., Yachandra V. K., Sauer K., Klein M. P. (1995) Structural consequences of ammonia binding to the manganese center of the photosynthetic oxygen-evolving complex - an X-rayabsorption spectroscopy study of isotropic and oriented photosystem-II particles. *Biochemistry* **34**, 5274-5287.

Dekker J. P., Boekema E. J. (2005) Supramolecular organization of the thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1706**, 12–39.

Drop B., Webber-Birungi M., Yadav SK, Filipowicz-Szymanska A., Fusetti F., Boekema EJ, Croce R. (2014) Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1837**, 63–72

Gounaris K., Brain A. P. R., Quinn P. J., Williams P. W. (1983) Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. *FEBS Letters* **153**, 47-52.

Hideg E. (2004) Detection of free radicals and reactive oxygen species. In *Methods in Molecular Biology, vol. 274: Photosynthesis Research Protocol* pp. 249-260, Humana Press Inc, Totowa, USA.

Kirchhoff H., Haase W., Wegner S., Danielsson R., Ackermann R., Albertsson P. A. (2007) Low-light-induced formation of semicrystalline photosystem II arrays in higher plant chloroplasts. *Biochemistry* **46**, 11169–11176.

Kirchhoff H. (2013) Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynth Research* **116**, 481–487.

Kouřil R., Dekker Jan P., Boekema E. J. (2012) Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**, 2-12.

Kouřil R., Wientjes E., Bultema J. B., Croce R., Boekema E. J. (2013) High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1827**, 411–419.

Kouřil, R., Nosek, L., Bartoš, J., Boekema, E. J., Ilík, P. (2016), Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups – break-up of current dogma. *New Phytol*, **210**, 808–814.

Laboratoř mikroskopie atomárních sil. Transmisní elektronová mikroskopie [online]. Olomouc [7.4.2017]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>

Lawlor D. W. (2001) Photosynthesis. 3rd ed. pp. 60-61 Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 386 p. ISBN 0-387-91607-5.

Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**, 350-382.

Morosinotto T., Bassi R., Frigerio S., Finazzi G., Morris E., Barber J. (2006) Biochemical and structural analyses of a higher plant photosystem II supercomplex of a photosystem I-less mutant of barley. *FEBS Journal* **273**, 4616–4630.

Nelson N., Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 971-982.

Nelson N., Yocum ChF (2006) Structure and Function of Photosystems I and II. *Annu. Rev. of Plant Biol.* **57**, 521–65.

Shen J. R. (2015) The Structure of Photosystem II and the Mechanism of Water Oxidation in Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 23–48.

Staelin L. A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* **76**, 185–196.

Sundby C., Andersson B. (1985) Temperature-induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem II regulates its association with LHC-II. *FEBS Letters* **191**, 24-28.

Tokutsu R., Kato N., Bui K. H., Ishikawa T., Minagawa J. (2012) Revisiting the supramolecular organization of Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31574–31581.

Vůjtek M., Kubínek R., Mašláň M. Nanoskopie. *Portál moderní fyziky* [online]. Olomouc, 2012. [7.4.2017]. Dostupné z:
<https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/nanoskopie.pdf>

Xu S., Li J., Zhang X., Wei H., Cui L. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and experimental botany*. **56**, 274-285.

Yamamoto Y., Aminaka R., Yoshioka M., Khatoon M., Komayama K., Takenaka D., Yamashita A., Nijo N., Inagawa K., Morita N., Sasaki T., Yamamoto Y. (2008) Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth Research* **98**, 589–608.

Yoshioka-Nishimura M., Yamamoto Y. (2014) Quality control of Photosystem II: The molecular basis for the action of FtsH protease and the dynamics of the thylakoid membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **137**, 100-106.