

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv strukturní integrity komplexu vyvíjejícího kyslík
na organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně mutanta
ječmene *viridis* *zb63***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Veronika Gryčová
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	30. 4. 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Veronika Gryčová
Název práce	Vliv strukturní integrity komplexu vyvíjejícího kyslík na organizaci fotosystému II v tylakoidní membráně mutanta ječmene <i>viridis zb63</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá vlivem komplexu vyvíjející kyslík (OEC) na strukturní integritu fotosystému II (PSII) a jeho organizaci v tylakoidní membráně rostlin. Teoretická část pojednává o struktuře, funkci a organizaci PSII v tylakoidních membránách rostlin a o vlivu OEC na strukturu PSII. Teoretická část se dále zabývá charakteristikou mutanta ječmene setého <i>viridis zb63</i> a metodami obrazové analýzy snímků z elektronového mikroskopu.</p> <p>V experimentální části práce je studován vliv strukturní integrity OEC na stabilitu PSII a jeho formování do semikrystalických domén v izolovaných tylakoidních membránách ječmene setého (<i>Hordeum vulgare</i>) a mutanta ječmene <i>viridis zb63</i> pomocí transmisní elektronové mikroskopie a jednočásticové obrazové analýzy a dále bezbarvé nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy (CN-PAGE). Z provedených experimentů vyplývá, že PSII vykazuje náhodné uspořádání téměř ve všech snímcích granálních membrán ječmene setého. Vlivem chemického odstranění OEC dochází k rozpadu superkomplexů PSII. V granálních membránách mutanta ječmene <i>viridis zb63</i>, který se vyznačuje krystalickým uspořádáním PSII v membránách, byl po chemickém odstranění pozorován rozpad superkomplexů PSII a zároveň výrazný pokles krystalického uspořádání v membránách. Z obrazové analýzy bylo zjištěno, že chemické odstranění OEC v granálních membránách mutanta ječmene <i>viridis zb63</i> vedlo k jinému typu krystalického uspořádání superkomplexů PSII. Výsledky práce ukazují, že strukturní celistvost OEC je důležitá pro stabilitu PSII a uspořádání PSII do semikrystalických domén v membránách.</p>
Klíčová slova	fotosystém II, komplex vyvíjející kyslík, mutant ječmene <i>viridis zb63</i> , transmisní elektronová mikroskopie, bezbarvá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza, jednočásticová obrazová analýza
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Veronika Gryčová
Title of thesis	The effect of structural integrity of oxygen evolving complex on the organization of photosystem II in thylakoid membrane of barley <i>viridis zb63</i> mutant
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Roman Kouřil, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>This work deals with an effect of structural integrity of oxygen evolving complex (OEC) on a higher organization of Photosystem II (PSII) in the thylakoid membrane of green plants. 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 structural integrity on a structure of PSII and thylakoid membranes. The theoretical part also includes a characteristics of barley <i>viridis zb63</i> mutant and methods of image processing in electron microscopy are introduced.</p> <p>In the experimental part of the work the effect of structural integrity of OEC on the stability of PSII and its ability to form 2D semi-crystalline domains 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 and single particle analysis and clear-native polyacrylamide gel electrophoresis. The performed experiments show that the PSII organization in grana membranes from barley is predominantly random. The PSII supercomplex is disintegrated by effect of chemically removed OEC. In the grana membranes of barley <i>viridis zb63</i> mutant, which forms the 2D crystalline array of PSII in membrane, disintegration of PSII supercomplex and also the decrease of crystalline organization of PSII was observed after chemical removing OEC. Single particle analysis revealed that chemical removing OEC in grana membranes of barley <i>viridis zb63</i> mutant led to another type of packing of the PSII supercomplexes. Results of this work show that structural integrity of PSII supercomplexes is important for stability and formation of semi-crystalline domain of PSII in the membranes.</p>
Keywords	photosystem II, oxygen evolving complex, barley <i>viridis zb63</i> mutant, transmission electron microscopy, clear-native polyacrylamide gel electrophoresis, single particle analysis
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

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

V Olomouci dne 30. 4.2019

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Romanu Kouřilovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a cenné připomínky při řešení této práce. Mé poděkování patří i Doc. Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D. a Mgr. Lukášovi Noskovi, Ph.D. za pomoc při řešení části experimentální práce a celému kolektivu katedry biofyziky za vytvoření vhodných pracovních podmínek.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	9
2 Struktura fotosyntetického aparátu a tylakoidní membrány rostlin	10
3 Funkce a struktura fotosystému II	12
3.1 Komplex vyvíjející kyslík	14
4 Organizace PSII v tylakoidní membráně	18
4.1 Megakomplexy PSII	21
5 Mutant ječmene <i>viridis zb63</i>	22
6 Vliv strukturní integrity OEC na funkci a strukturu PSII	23
7 Analýza obrazu	25
8 Materiál a metody	26
8.1 Použité chemikálie	26
8.1.1 Knopův roztok	27
8.2 Množení a výsev semínek mutanta ječmene <i>viridis zb63</i>	27
8.3 Pěstování ječmene	28
8.4 Izolace tylakoidních membrán	28
8.5 Určení koncentrace chlorofylů	29
8.6 Izolace fragmentů granálních membrán	29
8.7 Odstranění OEC	30
8.8 Měření vývoje kyslíku	31
8.9 Elektronová mikroskopie	32
8.9.1 Příprava vzorků	32
8.9.2 Elektronová mikroskopie granálních membrán	32
8.9.3 Popis vyhodnocování snímků	32
8.9.4 Obrazová analýza	33
8.9.5 Vytvoření modelu superkomplexu PSII	33
8.10 CN-PAGE	34
8.10.1 Solublizace tylakoidních membrán a příprava vzorků pro CN-PAGE	34
8.10.2 CN-PAGE	34
8.10.3 Skenování gelu	36
9 Výsledky	37
9.1 Kontrola chemického odstranění OEC	37

9.2 Vliv odstranění OEC na strukturu PSII-LHCII v tylakoidní membráně ječmene setého a mutanta ječmene <i>viridis zb63</i>	39
9.3 Vliv strukturní integrity OEC na organizaci PSII v granálních membránách ječmene setého a mutanta ječmene <i>viridis zb63</i>	42
9.4 Obrazová analýza.....	47
10 Diskuze	52
11 Závěr	55
Použitá literatura	57

Seznam zkratek

α -DDM	Dodecyl- α -D-maltosid
AFM	Mikroskopie atomárních sil
APS	Persíran amonný
ATP	Adenosin trifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin
CN-PAGE	Bezbarvá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza
CURT1	Curvature tylakoid 1
Cy5	Cyanin 5
Cyt <i>b_{6f}</i>	Cytochrom <i>b_{6f}</i> komplex
Cyt <i>b₅₅₉</i>	Cytochrom <i>b₅₅₉</i>
EM	Elektronová mikroskopie
EXAFS	Extended X – ray Absorption Fine Structure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
LHCII	Světlosběrný komplex fotosystému II
NADH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NDH	NAD(P)H dehydrogenasa
NPQ	Nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
OEC	Komplex vyvíjející kyslík
PGRL1/PGR5	Proton gradient like 1/ regulation 5
PPBQ	2-Phenyl-p-benzochinon
PQ	Plastochinon
PSI	Fotosytém I
PSII	Fotosytém II
ROS	Reaktivní formy kyslíku
qE	Energetické zhášení
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylendiamin

1 Úvod a cíle práce

Rostliny jsou mnohobuněčné organismy, které nás obklopují téměř všude. Umělcům se staly inspirací, vědcům objekty bádání, zamilovaným vyjádřením lásky. Člověk je také dokázal využít jako zdroj suroviny (např. dřevo, obilí, rostlinná vlákna). Rostliny ale především poskytují všem aerobním organismům nezbytný kyslík. Děje se tak pomocí specifického procesu zvaný fotosyntéza, při kterém je využita sluneční energie k přeměně vody na molekuly ATP a NADPH. Ty jsou rostlinou využity k fixaci uhlíku, která vede k produkci sacharidu. Jako odpadní produkt v tomto ději vzniká kyslík. Bez něj by nevznikl život, tak jak ho známe.

K pochopení dějů fotosyntézy je nutné poznat jednotlivé součásti fotosyntetického aparátu rostlin. Reakce fotosyntézy začínají ve fotosystému II (PSII), který se nachází v granálních membránách. Organizace PSII v granálních membránách je náhodná, ale existují i oblasti granálních membrán, ve kterých PSII vytváří 2D krystalická pole (Kouřil et al., 2013). Ve své práci se zabývám vlivem komplexu vyvíjející kyslík (OEC) na funkci a formování superkomplexů PSII v tylakoidní membráně rostlin. Některé studie ukazují, že komplex vyvíjející kyslík vedle své hlavní funkce vytváření kyslíku, rovněž přispívá k udržování stability PSII (Boekema et al., 2000).

Cílem mé práce bylo zpracovat přehled o problematice struktury PSII a jeho organizaci v tylakoidní membráně, vlivu OEC na formování a funkci superkomplexů PSII v tylakoidní membráně. Cílem experimentální práce bylo zhodnotit vliv strukturní integrity OEC na stabilitu PSII a jeho formování do semikrystalických domén v izolovaných tylakoidních membránách rostlin. Aby bylo možné zhodnotit vliv OEC na stabilitu a formování PSII do semikrystalických domén v membránách, bylo nutné ověřit účinnost protokolu inhibice funkce OEC pomocí biochemické metody. Mým úkolem bylo izolovat granální membrány z listů ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a mutanta ječmene *viridis zb63*, separovat pigment-proteinové komplexy pomocí nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy (CN-PAGE) a pořídit sérii mikroskopických snímků granálních membrán ječmene, ze kterých byl vyhodnocen vliv strukturní integrity OEC na organizaci PSII v granálních membránách.

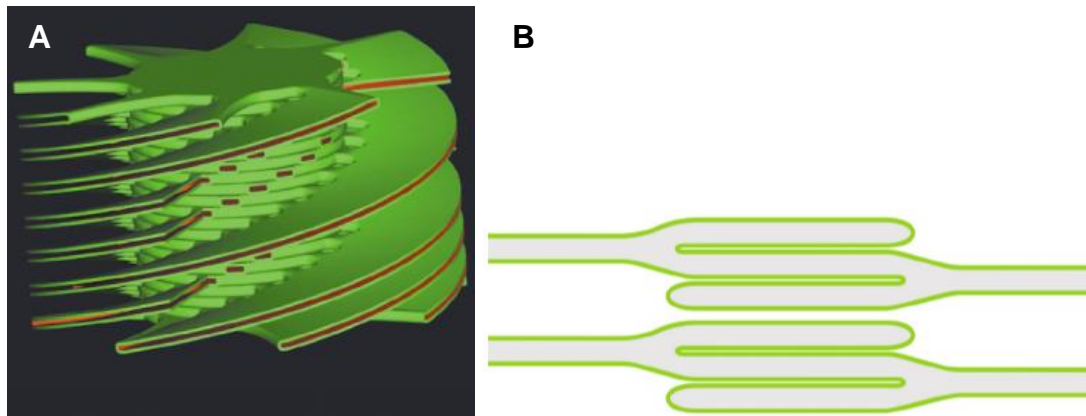
2 Struktura fotosyntetického aparátu a tylakoidní membrány rostlin

Chloroplasty jsou organely, ve kterých probíhá důležitý děj zvaný fotosyntéza. Uvnitř chloroplastů se nachází tylakoidní membrána, která vytváří síť pravidelných shluků tylakoidů nazývaných granum. Jednotlivá grana jsou spojena stromálními tylakoidy (lamelami). Tylakoidy obklopují prostor, vyplněný vodným prostředím, který označujeme jako tylakoidní lumen. Okolo tylakoidů se nachází stroma (Kouřil et al., 2011; Dekker et Boekema, 2005).

Fragmentace a strukturní analýza tylakoidních membrán přinesla prvotní informace o složení membrány a jejího uspořádání, což nám umožnilo vytvořit model tylakoidní membrány. Pomocí dat z elektronové mikroskopie (EM) tenkých řezů fixovaných tylakoidních membrán byly navrženy dva odlišné modely organizace tylakoidní membrány: helikální (viz obr. 1A) a vidličkový model (obr. 1B). První helikální model odvozený z mikrofotografií řezů tylakoidní membrány představil Paolillo (1970). V tomto modelu jsou stromální tylakoidy šroubovitě uspořádány kolem každého grana jako pravotočivé spirály. Každé granum je obklopeno několika lamelami, které jsou připojeny k jednotlivým granám přes membránové výčnělky. Platnost helikálního modelu byla následně potvrzena dalšími metodami EM. Boční pohled na izolovaná grana ve skenovacím EM ukázal šroubovitě uspořádání stromálních tylakoidů (Mustárdy et Janossy, 1979), zatímco horní pohled na vzorky připravené pomocí metody mrazového lomu prozradil, že spoje stromálních tylakoidů jsou uspořádány do kruhu (Mustárdy et al., 2008; Staehelin et van der Staay, 1996).

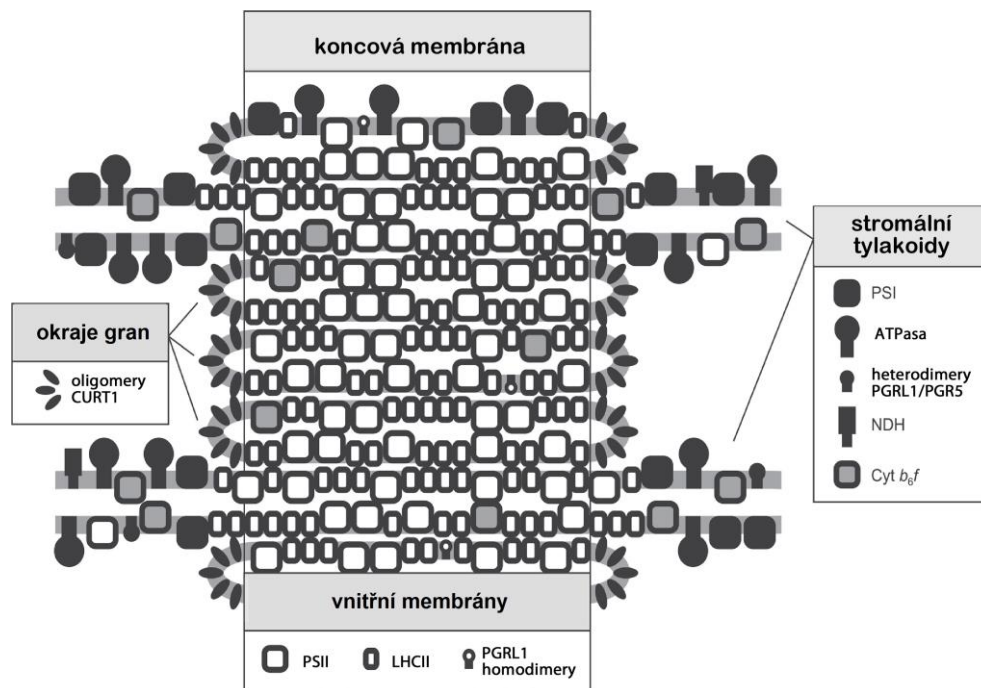
Ve vidličkovém modelu tylakoidní membrány autoři Arvidsson et Sundby (1999) navrhují, že granum se skládá z mnoha opakujících se jednotek, přičemž každá z nich obsahuje tři granální disky, které jsou vytvořeny vchlípením tylakoidového páru. O několik let později byl na základě dat z elektronové tomografie vytvořen upravený vidličkový model, ve kterém je granum tvořeno opakujícími se lipidovými dvojvrstvami vytvořených rozdvojením stromálních tylakoidů. Část horní vrstvy rozdvojených stromálních tylakoidů se ohýbá na okraji nahoru a spojuje se s vrstvou nad ní, zatímco druhá vrstva rozdvojených stromálních tylakoidů se ohýbá dolů na opačné straně a spojuje se s vrstvou pod ní (Shimoni et al., 2005). Rozdílnosti v navržených modelech jsou stále předmětem diskuzí a studií. S rozvojem technik EM, to především kryogenní elektronové tomografie, vznikají studie dokazující, že helikální model tylakoidní

membrány lépe popisuje strukturu tylakoidní membrány v chloroplastu (Daum et Kühlbrandt, 2011).



Obr. 1 A) Počítačový 3D helikální model tylakoidní membrány zobrazující stromální membrány okolo gran. Model byl vytvořen z mikroskopických snímků série řezů tylakoidní membrány. Převzato z: Mustárdy et Garab (2003). B) Vidličkový model tylakoidní membrány nakreslený podle Arvidsson et Sundby, 1999. Granum se skládá z opakujících se jednotek, přičemž každá se skládá ze tří granálních disků. Převzato z Pribil et al. (2014).

Tylakoidní membrána se vyznačuje laterální heterogenitou, to znamená, že jednotlivé proteinové komplexy jsou v každé části membrány lokalizovány odlišně. Studie ukázaly, že většina PSII a světlosběrných komplexů PSII (LHCII) se nachází v granálních membránách, zatímco většina komplexů fotosystému I (PSI) a ATP syntáz byla nalezena ve stromálních tylakoidech a vnějších membránách gran (Staehelein et van der Staay, 1996) (viz obr. 2). Zastoupení komplexu cytochromu *b₆f* (cyt *b₆f*) v granálních a stromálních tylakoidech je přibližně stejné (Dekker et Boekema, 2005). Kromě čtyř dříve zmíněných hlavních komplexů se v tylakoidní membráně nachází mnoho dalších proteinů nebo proteinových komplexů, např. komplexy NAD(P)H dehydrogenasa (NDH) a heterodimer proton gradient like 1/regulation 5 (PGRL1/PGRL5), který je nalézán v stromálních tylakoidech; PGRL1 byly detekovány i v granech (Pribil et al., 2014). Dříve se předpokládalo, že okraje gran neobsahují žádné větší proteinové komplexy. Nicméně v nedávné době byly lokalizovány na hranicích vnějších granálních membrán malé polypeptidy nazvané Curvature tylakoid (CURT1). Zdá se, že tyto polypeptidy mohou hrát úlohu v ohybu membrány na okraji gran. Při nadměrné expresi CURT1 oligomerů byla pozorována tenčí grana s více vrstvami, zatímco při nižší expresi oligomerů CURT1 chloroplasty obsahovaly ploché tylakoidy (Armbruster et al., 2013).



Obr. 2 Laterální heterogenita. Proteinové komplexy jako PSI, ATP syntáza, NDH a heterodimery PGRL1/PGR5 se přednostně nacházejí v stromálních tylakoidech a jsou v obrázku značeny černě. PSII a LHCII (bíle značky) byly nalezeny převážně v granálních membránách. Dimer cyt b_6/f , který je v modelu označen šedou značkou, je zastoupen ve stromálních tylakoidech i granálních membránách přibližně stejně. V zakřivených oblastech tylakoidů a především na okrajích gran se nachází oligomer CURT1 (v modelu zobrazen jako černé elipsy). Monomer PSII se může nacházet i ve stromálních tylakoidech. NDH a heterodimery PGRL1-PGR5 mohou vytvářet ve stromálních tylakoidech komplexy s PSI. Převzato a upraveno z Pribil et al. (2014).

3 Funkce a struktura fotosystému II

Fotosystém II je velký proteinový komplex nacházející se v tylakoidních membránách vyšších rostlin, sinic a řas. Obsahuje mnoho podjednotek a kofaktorů, zahrnující chlorofyly, karoteinody, hem, plastochinony, manganový klastr a lipidy (Shen et al., 2015). Fotosystém II se skládá z dimerního jaderného komplexu a periferních anténních proteinů. Monomer jaderného komplexu PSII je tvořen 20-23 podjednotkami dle organismu a v jeho středu se nachází reakční centrum, ve kterém dochází k důležitým reakcím fotosyntézy. V těsné blízkosti jaderného komplexu rostlin a řas se nachází periferní anténní proteiny, jejichž hlavním úkolem je sbírat energii ve formě fotonů a přinášet ji do reakčního centra.

Jaderný komplex PSII je tvořen interními a externími proteiny. Hlavními interními membránovými proteiny PSII jsou PsbA (nazývané též D1), PsbB (též CP47), PsbC (také označován jako CP43) a PsbD (neboli D2). PsbA a PsbD tvoří fotochemické reakční centrum, kde dochází k separaci nábojů a přenosu elektronů přes membránu.

Podjednotky D1 a D2 váží dohromady šest chlorofylů *a* a podjednotka D1 navíc poutá dva feofytiny. Podjednotky CP43, resp. CP47 obklopující D1, resp. D2 také váží několik chlorofylů; CP47 váže 16 chlorofylů *a*, CP43 14 chlorofylů *a*. Tyto podjednotky mají světlosběrnou funkci; jejich úkolem je absorbovat a přenášet excitační energii z periferních anténních komplexů do fotochemického reakčního centra (van Bezouwen et al., 2017, Dekker et Boekema, 2005). Další důležitou úlohu hrají CP43 a CP47 ve stabilizaci jaderného komplexu PSII. Bylo zjištěno, že ztráta CP43 nebo CP47 vede k rozpadu PSII a k ztrátě aktivity komplexu vyvíjející kyslík, nicméně při ztrátě CP47 nedojde ani k sestavení PSII (Shen et al., 2008)

Externí proteiny PSII leží na lumenálním povrchu PSII, těsně sousedí s CP47, CP43 a reakčním centrem. Mezi organismy došlo pravděpodobně v průběhu evoluce ke změnám externích proteinů PSII. Vyšší rostliny a zelené řasy byly obdařeny sadou proteinů PsbO, PsbP a PsbQ, zatímco sinice, červené řasy a rozsivky mají místo PsbP a PsbQ proteiny PsbU a PsbV (Ifuku, 2015). Tyto tři externí proteiny společně s podjednotkami D1, D2, CP43 a CP47 obklopují tzv. manganový klastr OEC, nacházející se na lumenální straně PSII. Podrobněji o struktuře a funkci OEC bude pojednáno v podkapitole 3.1.

Dalšími externími proteiny nacházející se v PSII jsou např. PsbR a Psb31. Funkce PsbR, proteinu nacházející se ve PSII vyšších rostlin a zelených řas, není prozatím plně známa. V experimentech, ve kterých byl chemicky odstraněn PsbR, byl zaznamenán snížený vývoj kyslíku. Stejný trend ukázaly i studie s mutanty neobsahující protein PsbR (Roose et al., 2007). Zdá se, že tento 10 kDa velký protein je potřebný k vazbě PsbP do komplexu PSII. Ke stabilizaci PsbR přispívá pravděpodobně nízkomolekulární podjednotka PsbJ (Pagliano et al., 2013). Podjednotka Psb31 byla objevena ve PSII některých rozsivek, červených a hnědých řas. Bylo zjištěno, že v nepřítomnosti PsbO se může Psb31 navázat přímo na jádro PSII a dochází k obnově vývoje kyslíku (Nagao et al., 2010). Kromě velkých interních a externích proteinů je PSII tvořen celou řadou transmembránových proteinů, které se také označují jako nízkomolekulární podjednotky, protože jejich molekulová hmotnost je menší než 10 kDa. Patří sem tyto podjednotky: PsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbT_c, PsbX, PsbY, PsbZ a Ycf12. První nízkomolekulární podjednotky PSII byly popsány na konci 80. let minulého století. S rozvojem metod detekce a identifikace proteinů dochází k lepšímu poznání těchto podjednotek, i přesto funkce některých podjednotek není stále plně

objasněna. V následujícím odstavci bude krátce shrnuta úloha některých nízkomolekulárních podjednotek v PSII.

Proteiny PsbE a PsbF jsou α a β podjednotkami cytochromu b_{559} (cyt b_{599}), který je součástí reakčního centra PSII všech fotosyntetických organismů produkujících kyslík. Podobně i podjednotka PsbI se nachází v blízkosti proteinů D1 a D2 reakčního centra a její funkce mimo jiné spočívá ve správném sestavování PSII. PsbL je protein vyskytující se téměř ve všech fotosyntetizujících organismech, ve kterých plní svou hlavní roli a tou je formování dimerů PSII (Shen et al., 2008; Shen et al., 2015; Shi et al., 2004).

Periferní anténní komplex obklopující reakční centrum PSII, nazývaný také světlosběrný komplex, je tvořen několika Lhcb podjednotkami. „Hlavní“ LHCI komplex je tvořen různými kombinacemi Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 podjednotek tvořících trimery. Existuje i tzv. vedlejší světlosběrný komplex složený z podjednotek Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb6, které se označují jako CP29, CP26 a CP24. Proteiny „vedlejšího“ světlosběrného komplexu se vyskytují v monomerním stavu. Protein Lhcb4 se váže k PsbB, protein Lhcb5 je nedaleko PsbC a proteiny Lhcb4 a Lhcb6 jsou v kontaktu mezi sebou. Všechny proteinové podjednotky váží různé množství chlorofylů *a* a *b*, xantofyly lutein, violaxanthin a neoxantin (Dekker et al., 2005).

Poměrně nedávno byly objeveny další formy LHCI komplexů, které byly pojmenovány jako Lhcb7 a Lhcb8. Lhcb8 vznikla po přejmenování Lhcb4.3 podjednotky, jedné z isoform Lhcb4 (CP29), kvůli zjištění odlišné funkce od ostatních isoform Lhcb4 (Klimmek et al., 2006).

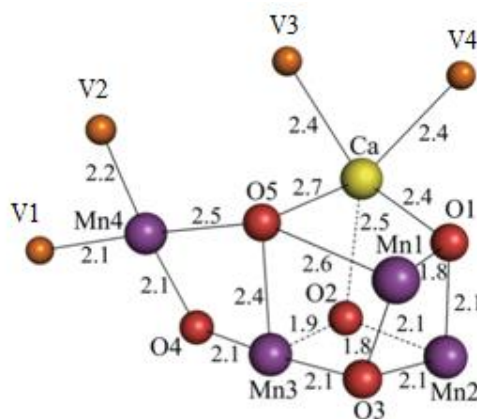
3.1 Komplex vyvíjející kyslík

V předchozí části této kapitoly byla popsána struktura a funkce PSII, což je klíčový proteinový komplex ve fotosyntéze. Na luminálním povrchu reakčního centra PSII se nachází tři externí proteiny, které tvoří jakýsi kryt nad katalytickým centrem OEC, kde dochází k oxidaci vody na kyslík. K pochopení tak důležitého děje, jakým je vývoj kyslíku, je třeba poznat strukturu OEC, ve kterém děj probíhá (Barber, 2016).

Srdcem OEC je manganový klastr. K určení struktury manganového klastru se využívají metody rentgenové absorpce EXAFS (z angl. Extended X – ray Absorption Fine Structure) a rentgenová difrakční analýza. Data rentgenové difrakce však trpí

radiačním poškozením, které způsobují změny v přirozeném uspořádání ligandů a iontů OEC. (Najafpour, 2011).

Manganový klastr (viz obr. 3) je složen ze čtyř molekul manganu, jedné molekuly vápenatého (Ca^{2+}) iontu a pěti molekul kyslíku, tedy dohromady představují Mn_4CaO_5 klastr. Tři molekuly manganu, molekula vápníku a čtyři molekuly kyslíku vytváří strukturu podobnou kubanu, kdy v rozích jsou tři molekuly manganu, molekula vápníku a v dalších rozích jsou umístěny čtyři molekuly kyslíku. Poslední molekula manganu je připojena k manganům uvnitř struktury podobné kubanu pomocí dvou kyslíků kyslíkovým můstkem (nazývané i O-O můstek). Také každé dva přiléhající mangany jsou propojeny kyslíkovým můstkem. Navíc jsou ke klastru vázány čtyři molekuly vody, přičemž dvě molekuly vody se váží k molekulám manganu a dvě k Ca^{2+} iontu. Molekuly vody vytváří vodíkové vazby mezi sebou i s kyslíkem obsažený v manganovém klastru (Shen, 2015; Umena et al., 2011).



Obr. 3 Struktura manganového klastru. Červené kuličky představují atomy kyslíku. Atomy manganu jsou označeny fialovými kuličkami. Molekuly vody představují oranžové kuličky a žlutá kulička značí atom vápníku. Čísla mezi atomy představují vzdálenosti (v angströmech) mezi atomy kovy a kyslíkovými můstky nebo molekulami vody. Poloha atomů manganového klastru byla zjištěna z mapy elektronových hustot. Převzato a upraveno z Umena et al., 2011.

Manganový klastr je koordinován sedmi aminokyselinami, přičemž šest z nich jsou karboxylátové zbytky a jedna je histidinový zbytek. Následující aminokyseliny představují karboxylátové zbytky: D1-Asp 170, D1-Glu 333, D1-Asp 342, D1-Ala 344, CP43-Glu 354 a D1-Glu 189. Aminokyselina D1-His-332 je histidinový zbytek. Kromě sedmi aminokyselin, které jsou k manganovému klastru vázány přímo, existují aminokyselinové zbytky D1-Asp 61, D1-His 337 a CP43-Arg 357, které se nacházejí ve vnější sféře komplexu (tzn. že se neváží přímo k manganovému klastru). Jejich role pravděpodobně spočívá v udržování aktivity vývoje kyslíku (Umena et al., 2011). V okolí manganového klastru se dále nacházejí chloridové (Cl^-) ionty. Oba Cl^- ionty

jsou obklopeny čtyřmi molekulami. Jeden Cl⁻ iont je kromě dvou molekul vody obklopen aminokyselinovými zbytky D2-Lys 317 a D1-Glu 333. Další Cl⁻ iont je také obklopen dvěma molekulami vody a navíc molekulami D1-Asn 338 a CP43-Glu, které se jsou vázány k manganovému klastru přímo. Je proto možné, že Cl⁻ ionty hrají roli v zachování prostředí manganového klastru tak, aby reakce vývoje kyslíku probíhaly správně (Umena et al., 2011).

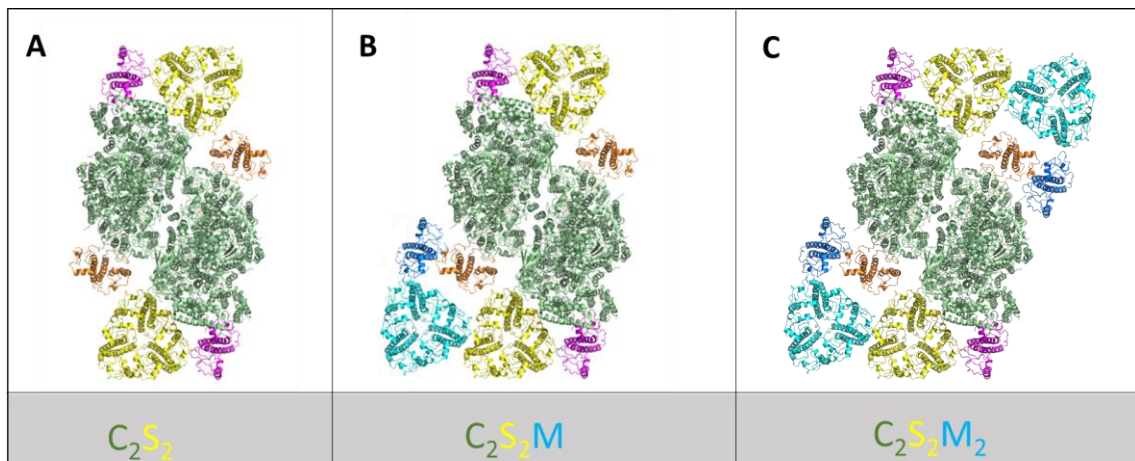
Protein PsbO (neboli 33 kDa protein), který bývá často nazýván mangan-stabilizující protein, hraje důležitou roli v udržování stabilního manganového klastru. Předpokládá se, že PsbO určitým způsobem reguluje množství chloridových a vápenatých iontů v manganovém klastru. Studie, ve kterých byl PsbO z OEC odstraněn, ukazují, že vlivem chybějícího mangan-stabilizujícího proteinu dochází ke snížení vývoje kyslíku (Bricker et al., 1992; Bricker et al., 2012). Analýzy sekvence PsbO ukázaly, že všechny nahosemenné rostliny mají pouze jednu isoformu PsbO, zatímco většina krytosemenných rostlin má dvě isoformy PsbO (PsbO-1 a PsbO-2) (Duchoslav et Fisher, 2015).

Proteiny PsbP (označovaný jako 23 kDa protein) a PsbQ (17 kDa protein) optimalizují fyziologické koncentrace chloridů a vápenatých iontů pro správný vývoj kyslíku. Protein PsbP je známý také tím, že pomáhá stabilizovat vytvořený manganový klastr. Další funkcí proteinu PsbP je přinášet mangan k PSII při sestavování nebo opravě PSII. Mangan získává z poškozeného PSII při obnově D1, která je vyvolaná světlem (Bondarava et al., 2005). Protein PsbQ společně s proteiny PsbP a PsbO hraje strukturální úlohu, která chrání manganový klastr před inaktivací redukčními činidly v tylakoidním lumenu a tím pomáhají udržovat stabilitu OEC (Ghanotakis et al., 1984). Funkce podjednotky PsbU (označovaná také jako 12 kDa protein) spočívá ve stabilizaci iontového prostředí důležitého pro vývoj kyslíku. Zvláštní funkci PsbU představuje v ochraně PSII sinic, červených řas a rozsivek před tepelným stresem. Mutanti PsbU termofilních i mezofilních sinic se nedokázali přizpůsobit vysokým teplotám (Roose et al., 2007). Bylo také zjištěno, že absence PsbU způsobuje inaktivaci PSII a vyšší citlivost jádra PSII k poškození světlem. Ukazuje se, že inaktivace PsbU, může zvýšit produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), v důsledku čehož mohou být mutantní organismy více rezistentní vůči oxidativnímu stresu (Balint et al., 2006). Protein PsbV označován jako cytochrom *c*₅₅₀ pomáhá udržovat optimální iontové prostředí v OEC, a tím udržuje stabilitu PSII. V některých druzích sinic a červených řas byl objeven protein velmi podobný PsbV, označen jako PsbV2, který

dokáže případnou ztrátu PsbV částečně nahradit. Navíc je protein PsbV zvláštní svým nízkým potenciálem, který žádný jiný cytochrom nemá, což vyvolává otázky týkající se skutečné funkce tohoto proteinu (Bricker et al., 2012; Roose et al., 2007).

3.2 Superkomplexy PSII

Dimer jaderného komplexu PSII vytváří s různým počtem světlosběrných komplexů takzvané PSII-LHCII superkomplexy. První PSII superkomplexy byly pozorovány na snímcích z elektronového mikroskopu ve vzorcích připravených ze solubilizovaných granálních membrán pomocí jemného detergentu (Boekema et al., 1995). Podle způsobu vazby trimerů na jaderný komplex rozlišujeme S („strongly“ vázaný LHCII trimer) a M („moderate“ vázaný LHCII trimer) trimery. V literatuře je také popsána vazba dalších trimerů k jadernému komplexu označovaných jako L („loosely“ vázaný trimer) (Boekema et al., 1999). S-trimery obsahují převážně Lhcb2 genové produkty, zatímco M-trimer obsahuje protein Lhcb3. Proteiny Lhcb1 jsou přítomny v obou trimerech (Dekker et Boekema, 2005). Největší stabilní rostlinný PSII superkomplex je tvořen dimerním jaderným komplexem (označovaným jako C_2), ke kterému jsou vázány čtyři LHCII trimery. Dva z nich se váží k jádru PSII silně (S trimery) prostřednictvím PsbC a Lhcb5 podjednotek a další dva M trimery se váží díky monomerním anténním proteinům Lhcb4 a Lhcb6 za vzniku $C_2S_2M_2$ komplexu (viz obr. 4C) (Caffari et al., 2009). Menší formy superkomplexu postrádají jeden nebo dva M trimery (C_2S_2M , C_2S_2) (viz obr. 4B a 4A). Superkomplex C_2S_2 se zdá být nejmenší možnou fyziologickou formou superkomplexu (Morosinotto et al., 2006). Naproti tomu byl popsán u špenátu vznik superkomplexů s jedním až dvěma volně vázanými L trimery, vyskytuje se však s velmi malou četností (Boekema et al., 1999).



Obr. 4 Strukturální model různých forem PSII superkomplexů: A) C_2S_2 superkomplex, B) C_2S_2M superkomplex, C) $C_2S_2M_2$ superkomplex. Přehled umístění jaderného komplexu (zelená), S-LHCII trimerů (žlutá), M-LHCII trimerů (světle modrá), CP29 (oranžová), CP26 (růžová) a CP24 (tmavě modrá). Strukturální model $C_2S_2M_2$ superkomplexu (pdb soubor s číslem 5B66) byl získán z Protein Data Bank. Proteinové podjednotky byly barevně odlišeny v programu Pymol.

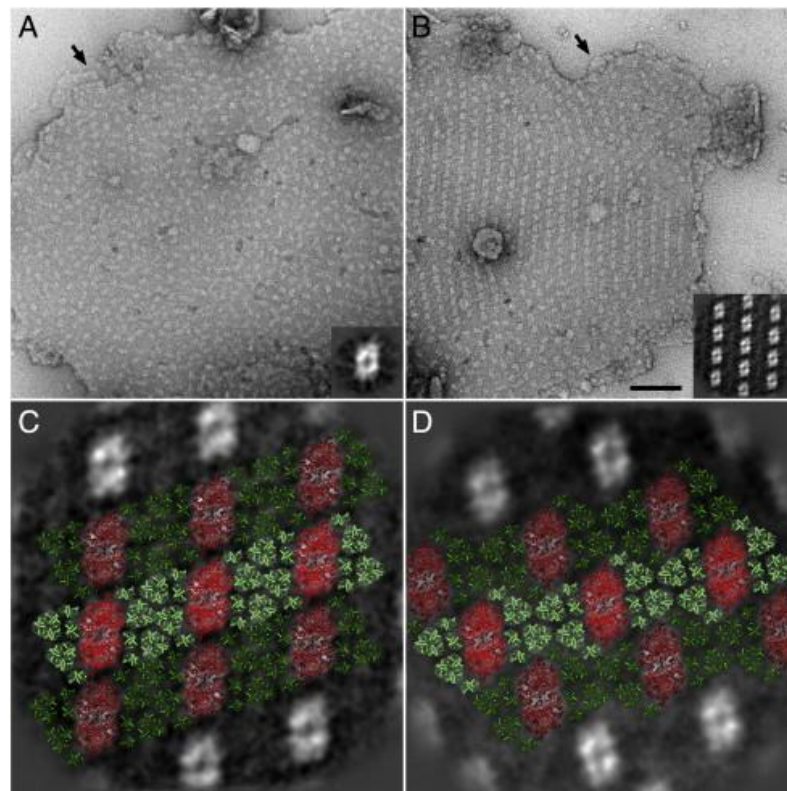
Autoři Kouřil et al. (2016) zjistili, že složení a architektura podjednotek v superkomplexu PSII $C_2S_2M_2$ není ve všech suchozemských rostlinách, jak se původně předpokládalo, zachována. Analýza transkriptomu a genomu nahosemenných rodů *Pinus*, *Picea* a *Gnetum* prokázala nepřítomnost funkčních *lhcb3* a *lhb6* genů. Absence proteinů vedla ke změnám v architektuře superkomplexu PSII, podobně jako bylo pozorováno u evolučně staršího organismu *Chlamydomonas reinhardtii* (Tokutsu et al., 2012). Zůstává otázkou, jaké výhody přináší rostlinám ztráta Lhcb3 a Lhb6 proteinů.

4 Organizace PSII v tylakoidní membráně

Prvotní poznání o organizaci PSII pochází ze studií tylakoidních membrán pomocí elektronové mikroskopie na vzorcích připravovanými metodami mrazového leptání nebo mrazového štěpení, které ukázaly, že většina PSII je v tylakoidních membránách uspořádáno náhodně, ale v určitých částech membrán dochází k uspořádávání PSII do semikrystalických domén (Simpson, 1978; Staehelin, 1986). S pomocí matematických analýz a dat z mikroskopie atomárních sil (AFM) bylo odhaleno, že distribuce PSII v membránách není tak úplně náhodná. Lidské oko totiž nedokáže spolehlivě rozlišit náhodnou distribuci (Kirchoff et al., 2004). Jiné studie, založené na metodě AFM ukázaly, že na tvorbě 2D semikrystalických oblastí se podílejí stejné síly jako v membránách s neuspořádanou organizací PSII. Zdá se, že neuspořádaná organizace PSII je jakýsi předstupeň ke tvorbě semikrystalických oblastí (Kirchhoff et al., 2008). Kryogenní elektronová tomografie umožnila rozvoj poznání organizace

PSII v membránách ve třetí dimenzi. Tomografická data ukazují, že každá membrána v semikrystalických oblastech obsahuje na obou stranách stromální mezery 2D krystaly superkomplexu (Daum et al., 2010).

Byly popsány tři typy superkomplexů, které mohou tvořit krystaly. Jsou jimi C_2S_2 , C_2S_2M a $C_2S_2M_2$, přičemž různé typy superkomplexů se mezi sebou mohou uspořádat různě vlivem odlišných interakcí mezi sousedními superkomplexy (viz obr. 5) (Dekker et Boekema, 2005). Vznik semikrystalických domén je podmíněn fyzickou separací superkomplexů PSII od ostatních proteinů jako jsou LHClI proteiny nebo PsbS. Prozatím však nejsou známy konkrétní síly, které by byly zodpovědné za separaci proteinů. Je možné, že krystalické uspořádání PSII je energeticky výhodné, zatímco náhodná organizace PSII je entropicky výhodná. Možná jsou síly v membráně v rovnováze tak, aby dokázaly lépe reagovat na větší strukturální změny (z náhodného do krystalického uspořádání PSII) za minimální použité energie a tím dovolit funkční modifikace (Kouřil et al., 2012).



Obr. 5 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 uspořádání PSII $C_2S_2M_2$ superkomplexů. Měřítka pro snímky z elektronového mikroskopu (A, B) je 100 nm. Převzato z Kouřil et al. (2012).

Z dosavadních studií bylo zjištěno, že existují podmínky prostředí, které zvyšují pravděpodobnost tvorby semikrystalických domén. Za tyto faktory jsou považovány nízká intenzita osvětlení, nízká teplota, vysoká koncentrace cukrů ve skladovacích mediích, nedostatek PsbS, nepřítomnost některých Lhcb proteinů a dokonce specifické pH pufru (Kirchhoff, 2013; Kouřil et al., 2013). U rostlin rostoucích při nízké intenzitě osvětlení dochází k supramolekulární reorganizaci do semikrystalických domén. U rostlin aklimovaných na slabé osvětlení byl pozorován nárůst světlosběrných komplexů a naopak úbytek PSII a cyt *b6f*. Důvod, proč v membránách rostlin pěstovaných při slabém osvětlení dochází k vytváření pravidelného uspořádání PSII, není znám. Kirchhoff (2013) navrhl, že se jedná o strategii rostlin, jak předejít potenciálnímu přeplnění membrány a difúzním problémům v důsledku změny v množství LHCI, PSII a cyt *b6f*. Tyto změny ovlivňují migraci plastochinonu (PQ) z PSII do cyt *b6f* a naopak. Předpokládá se, zvýšení hustoty LHCI komplexů vede k prodloužení difúzní dráhy PQ mezi PSII a cyt *b6f*, což způsobuje problémy v nalezení vazebného místa při náhodném pohybu, čemuž lze předejít již zmíněnou strategií supramolekulární reorganizace (Kirchhoff et al., 2007; Kirchhoff, 2013). Opačně, rostliny pěstované při vysoké intenzitě osvětlení vykazovaly úbytek krystalického uspořádání PSII. U takto aklimovaných rostlin dochází k snížení Lhcb3 a proteinu CP24, k menším ztrátám Lhcb1 a Lhcb2 tvořící M-trimery a k redukci superkomplexu PSII-LHCI superkomplexu na menší formy (Kouřil et al., 2013).

Za vysokých intenzit osvětlení, které převyšují poptávku energie rostlin, dochází k přeměně až 80% absorbované energie na teplo. Tento proces je označován jako nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ). Hlavní část NPQ, která je indukována rychle a reversibilně v závislosti na pH gradientu tylakoidních membrán, se nazývá energetické zhášení (qE). Bylo zjištěno, že přestavba superkomplexů PSII do semikrystalických domén zvyšuje rychlost tvorby zeaxanthinu, který stimuluje qE. Zdá se, že krystalické uspořádání superkomplexů umožňuje rychlejší transport malých hydrofobních molekul jako jsou plastochinony nebo xantofyly přes lipidovou dvojvrstvu (Kereiche et al., 2010; Kirchhoff, 2013).

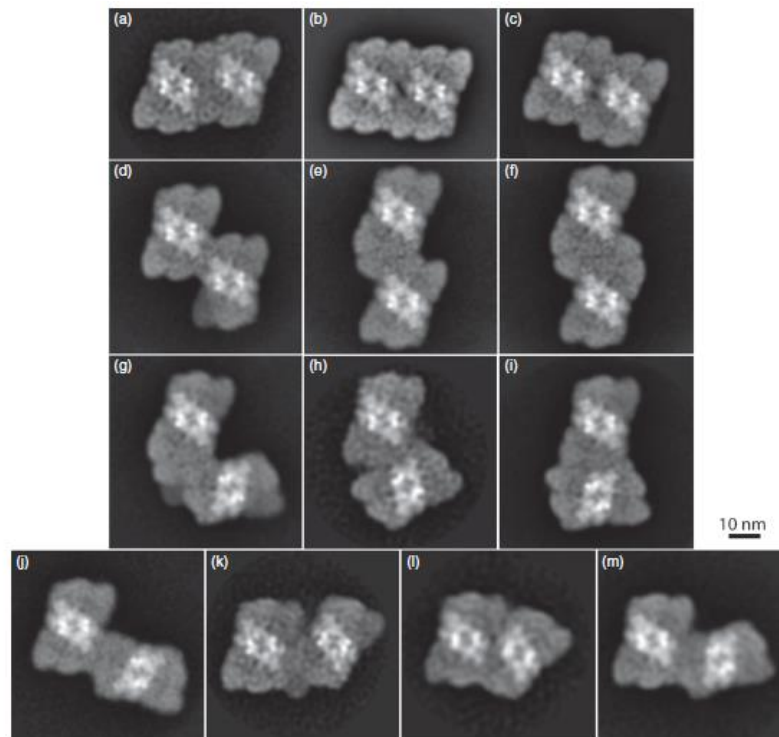
Studium vlivu PsbS na tvorbu semikrystalických domén ukázalo, že při nedostatku proteinu PsbS se zvyšuje frekvence vzniku semikrystalických domén, naopak membrány obsahující zvýšené množství PsbS vykazovaly náhodnou organizaci superkomplexu PSII. Bylo zjištěno, že nadbytek PsbS zvyšuje kapacitu pro qE až dvakrát, což poskytuje vysvětlení role tohoto proteinu v NPQ (Kereiche et al., 2010).

Jiná studie však ukázala pravý opak. Rostliny aklimované na vysokou intenzitu osvětlení, při kterých je spuštěn zhasací mechanismus, vykazovaly snížené množství proteinu PsbS (Kouřil et al., 2013).

Nepřítomnost Lhcb5 (CP26) proteinů vede k téměř dvojnásobné, u mutanta neobsahující Lhcb6 (CP24) proteiny dokonce trojnásobně vyšší tvorbě krystalického uspořádání PSII. Naopak rostliny postrádající Lhcb4 (CP29) proteiny nevykazují pravidelné uspořádání PSII vůbec a navíc je tvar PSII superkomplexů C₂S₂ celkově jiný oproti kontrolním vzorkům. Ve vzorcích granálních membrán mutantů s nedostatkem proteinů hlavního světloběrného komplexu Lhcb2 a Lhcb3 bylo zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII superkomplexů podobné jako u kontrolního vzorku (Goral et al., 2012).

4.1 Megakomplexy PSII

Superkomplexy PSII mohou spolu specificky interagovat za vzniku různých typů megakomplexů, což jsou nejčastěji páry PSII-LHCII superkomplexů. Poprvé byly pozorovány v chromatograficky přečištěných proteinových komplexech jemně solublizovaných tylakoidních membrán pomocí α -dodecylmaltosidu (α -DDM) (Boekema et al., 1999). Do dnešních dnů byla objevena řada specifických megakomplexů (viz obr. 6). Vzhledem k tomu, že rozpad a tvorba megakomplexů mění kontakt mezi jaderným komplexem a přilehlými anténní proteiny, význam megakomplexů spočívá pravděpodobně v účinném řízení využití absorbované energie PSII superkomplexy (Nosek et al., 2017).



Obr. 6 Strukturální charakterizace PSII megakomplexů: (a-f) představují megakomplexy s paralelní orientací, (g-m) představují megakomplexy vytvářené dvěma neparalelně interagujícími superkomplexy. Celkový počet částic podílející se na finálních obrázcích: (a) 1637, 4%; (b) 8411, 22%; (c) 16 928, 45%; (d) 2105, 6%; (e) 378, 1%; (f) 779, 2%; (g) 1640, 4%; (h) 418, 1%; (i) 2789, 7%; (j) 506, 1%; (k) 582, 2%; (l) 488, 1%; (m) 1082 (3%). Procenta ukazují relativní zastoupení konkrétní formy PSII megakomplexu v analyzovaném vzorku. Převzato z Nosek et al., 2017.

5 Mutant ječmene *viridis zb63*

Mutant ječmene *viridis zb63* se vyznačuje zejména tím, že neobsahuje téměř žádný PSI komplex (Nielsen et al., 1996), ale aktivita PSII je normální. V tylakoidních membránách mutantu ječmene *viridis zb63* tvoří PSII 2D krystalová pole (Simpson, 1983), přičemž bylo zjištěno, že 2D krystaly jsou tvořeny pouze C_2S_2 superkomplexy, což je nejmenší známá fyziologická forma superkomplexu PSII (Morosinotto et al., 2006).

Kvůli nedostatku PSI, vede osvětlení rostlin mutantu ječmene *viridis zb63* ke snížení přenosu elektronů v elektrotransportním řetězci. Dochází k nadměrné redukci PQ poolu, což je stav, který se může objevit i u rostlin divokého typu, které jsou vystaveny stresovým podmínkám (jako je např. vysoká intenzita osvětlení nebo nízká teplota). Mutant ječmene *viridis zb63* má zredukovanou velikost antén na typ superkomplexu C_2S_2 a i přes značně zredukovaný PQ pool z důvodu absence PSI, už dále antény nezmenšuje. Malé antény PSII vykazuje i při nízkých hladinách osvětlení. Z biochemických analýz bylo zjištěno, že mutant *viridis zb63* neobsahuje

jaderné polypeptidy PSI, zatímco polypeptidy anténního systému PSI Lhca jsou zachovány. Naproti tomu téměř všechny podjednotky PSII jsou u mutantu *viridis zb63* přítomné, pouze proteiny periferního anténního systému Lhcb6 (označované též CP24) chybí (Morosinotto et al., 2006).

6 Vliv strukturní integrity OEC na funkci a strukturu PSII

Zatímco o struktuře jaderného komplexu a umístění externích proteinů podílejících se na vývoji kyslíku je známo čím dál více poznatků, o vlivu externích proteinů na celkovou strukturu a organizaci PSII toho víme stále málo. Komplex vyvíjející kyslík však vedle své základní funkce, kterou je oxidace vody za vzniku molekulárního kyslíku, zvyšuje stabilitu superkomplexu PSII. Mechanismus, kterým OEC udržuje integritu PSII, není dosud přesně znám (Boekema et al., 2000).

Rostliny jsou často vystaveny nejrůznějším podmínkám prostředí. Bylo zjištěno, že teplotní stres má negativní dopad na vývoj kyslíku. Inaktivace vývoje kyslíku, ke které dochází při teplotách okolo 40 °C, je způsobena postupným uvolňováním proteinových podjednotek PsbO, PsbP, PsbQ a manganu z vazebných míst (Busheva et al., 2012). Primárně je za rozpad OEC zodpovědné uvolnění proteinu PsbO, ne ztráta manganu (Enami et al., 1994). Rozpad OEC vede ke strukturním změnám ve PSII, tudíž OEC přispívá k zvyšování teplotní stability PSII (Busheva et al., 2012).

Bylo pozorováno, že nedostatkem proteinu PsbO se superkomplex PSII stává i více citlivý na světelný stres a dochází k výrazné agregaci D1 a CP43. Protein PsbO tedy zřejmě brání shlukování D1 proteinu a tím podporuje degradaci D1 poškozeného světlem (Yamamoto et al., 1998). Nedávno bylo zjištěno, že protein PsbO s vysokou afinitou váže GTP a funguje jako GTPáza. Předpokládá se, že PsbO hraje roli v procesu kontroly fosforylačního stavu proteinu D1, čímž přispívá k degradaci poškozeného D1. Kvůli vyšší GTPázové aktivitě PsbO-2 byla vytvořena hypotéza, že funkce PsbO-2 spočívá v regulaci fosforylačního stavu a obnově proteinu D1 a PsbO-1 se podílí na správném vývoji kyslíku (Bricker et al., 2012).

Podjednotka PsbO hraje roli v ochraně OEC před inhibicí, která je způsobená hydroxidovým iontem. Podjednotka PsbO udržuje chloridové ionty ve vazebném místě OEC a fungují tak jako zábrana před inhibicí manganového klastru hydroxidovým iontem (Commet et al., 2012). Ukázalo se, že protein PsbO prochází konformačními změnami způsobené rozdílným pH. Při neutrálním pH, představující pH lumenu ve tmě,

aminokyselinové zbytky PsbO neváží manganaté ani vápenaté ionty, zatímco středně kyselé pH (podobném jako v lumenu při světle) umožní vazbu manganatých a vápenatých iontů k mangan-stabilizujícímu proteinu PsbO. Vazba manganatých nebo vápenatých iontů způsobí další konformační změnu, která usnadní pohyb vody a iontů z OEC. Konformační změny PsbO jsou tak významné pro regulaci vazby manganatých a vápenatých iontů a pro regulaci funkce OEC (Shutova et al., 2005).

Rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*) postrádající podjednotku PsbP, pěstované za normálních podmínek, vykazují zpomalený růst, listy jsou světle zelené a především dochází k úbytku až ztrátě PsbQ. Z těchto výsledků je zřejmé, že PsbP je nezbytný pro normální funkci PSII vyšších rostlin (Ifuku et al., 2005). Další studie poukazuje na důležitost PsbP v udržování vazby chloridových iontů v OEC. Je pravděpodobné, že PsbP stabilizuje vazbu chloridových iontů regulací disociační konstanty a/nebo energetické bariéry rozpadu chloridového iontu prostřednictvím konformačních změn proteinu kolem vazebného místa chloridových iontů (Kondo et Noguchi, 2018).

Rostliny huseníčku rolního s nedostatkem PsbQ pěstované při nízkých intenzitách osvětlení velmi rychle zežloutly a ztratily schopnost vytvářet funkční reakční centrum PSII a byl pozorován úbytek D2, CP47. Výsledky této studie naznačují, že ztráta PsbQ vede k výrazným změnám ve funkčnosti PSII a že PsbQ je zodpovědný za fotoautotrofický růst při slabém osvětlení (Yi et al., 2006).

Odstraněním proteinu PsbO se vytváří unikátní struktury superkomplexů, ve kterých dochází ke značným posunům centrálního jaderného dimeru PSII, což má dokonce za následek vznik superkomplexů PSII bez podjednotek světlosběrného komplexu Lhcb4 (Boekema et al., 2000). Tyto změny ve struktuře superkomplexu PSII ukazují na roli PsbO: udržování stability dimerního jaderného komplexu. Autoři studie předpokládají, že podjednotky PsbO působí ve PSII na udržování S-LHCII trimerů a Lhcb4 v pevné vzdálenosti od jaderného komplexu proto, aby zajistily řízený přenos excitační energie přes monomerní periferní anténní proteiny Lhcb4 a Lhcb5. Tyto proteiny také dokáží vázat zeaxantin vzniklý z violaxantinu při vysokých intenzitách světla v xantofylovém cyklu nefotochemického zhášení, čímž snižují fluorescenční kvantový výtěžek. Je také možné, že zachování určité vzdálenosti mezi S-LHCII trimery a proteiny Lhcb4, je důležité pro udržení chloridových a vápenatých iontů potřebných pro vývoj kyslíku v uzavřených doménách nedaleko manganového klastru. Odstranění podjednotek PsbP a PsbQ indukuje změnu v polohách periferních

anténních proteinů; protein Lhcb4 se pohybuje směrem k jádru PSII. Dále dochází k nepatrné změně polohy S-LHCII trimerů. Nutno podotknout, že studie vlivu strukturní integrity OEC na strukturu PSII byla prováděna na tylakoidních membránách špenátu (Boekema et al., 2000).

7 Analýza obrazu

Obrazová analýza je nesmírně důležitá technika v elektronové mikroskopii, pomocí níž lze studovat struktury proteinů s nízkým až vysokým rozlišením. Rozlišujeme metody krystalografické a nekrystalografické (Boekema et al., 2009).

Jednou z krystalografických metod používaných pro určení struktur s vysokým rozlišením je elektronová krystalografie. Jistou nevýhodou této metody je nutnost získat dostatečně velký 2D krystal. V dnešní době se proto v obrazové analýze stává populární metoda jednočásticová analýzy (z angl. single-particle analysis), která představuje metodu nekrystalografickou. Lze jí zpracovat jak snímky z elektronového mikroskopu negativně barvených makromolekul, tak snímky pořízené kryogenní elektronovou mikroskopií. Technika spočívá v automatickém nebo ručním výběru projekcí částic, následně je programem provedena translace a rotace jednotlivých projekcí částic tak, aby měly stejnou orientaci. Obrázky jsou analyzovány a rozříděny do podskupin, které mají podobnou projekci. Poté jsou projekce z každé podskupiny „zprůměrovány“, čímž vzroste poměr signál/šum a dojde k zvýraznění struktury makromolekuly. S větším počtem projekcí, klesá úroveň šumu (Boekema et al., 2009; Orlova, 2000).

8 Materiál a metody

8.1 Použité chemikálie

2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (TRIS)	Sigma
2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Bis-Tris)	Sigma
2-Phenyl-p-benzochinon (PPBQ)	Sigma
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma
Aceton	Lach-ner
Akrylamid	Biorad
Aminokapronová kyselina	Sigma
Askorbát sodný	Sigma
Bisakrylamid	Biorad
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma
Deoxycholát sodný	Sigma
Dithioničitan sodný	Sigma
Digitonin	Sigma
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema
Dodecyl- α -D-maltosid	Affymetrix
Dusičnan draselný	Lachema
Dusičnan vápenatý, tetrahydrát	Hichem
Ethanol	Lach-ner
Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl	Sigma
Glycerol	Lach-ner
Chlorid draselný	Lachema
Chlorid sodný	Lachema
Chlorid hořečnatý bezvodý	Sigma
Chlorid hořečnatý, hexahydrát	Lach-ner
Chlorid železitý	Aldrich
Kyselina chlorovodíková	Lach-ner
MES hydrát	Sigma
N, N, N', N'-tetramethyldiamin (TEMED)	Biorad
Persíran amonný (APS)	Biorad
Sacharosa	Lachema

Síran hořečnatý	Lachema
Tricin	Biorad
Uranyl acetát	Spi Supplies

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

8.1.1 Knopův roztok

Rostliny byly zalévány Knopovým roztokem, který byl připraven následujícím způsobem: k 9500 ml deionizované vody bylo přidáno po 100 ml ze zásobních roztoků (tab. 1). Jako poslední byly přidány 3 kapky 50% roztoku FeCl₃.

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

Chemikálie	Koncentrace (g/l)
KCl	7.1
KH ₂ PO ₄	14.3
KNO ₃	14.3
Ca(NO ₃).4H ₂ O	57.2
MgSO ₄	14.3

8.2 Množení a výsev semínek mutanta ječmene *viridis zb63*

Kvůli nedostatku semínek mutanta ječmene *viridis zb63* bylo nutné je namnožit. Semínka mutanta ječmene byla nasazena do 44 květináčů s půdou a pěstována ve skleníku po dobu 8 měsíců. Ze zralých rostlin byly sesbírány klasy, které byly skladovány 14 dní v suchu a temnu. Každá varianta semínek rostlin byla skladována odděleně v papírových sáčkách. Z vysušených klasů byla získána ručně nebo pomocí klasové mlátičky (Precision Machine, Lincoln) semínka. Dále bylo nutné ověřit, které varianty rostlin obsahují mutantní semínka, protože mutace ječmene *viridis zb63* je letální a mutantní rostliny se rozmnožují v heterozygotním stavu (Morosinotto et al., 2006). Z každé varianty rostlin bylo vyseto 15 semínek do inertního materiálu (perlitu). Rostliny byly pěstovány ve fytokomoře PGC-40L2 (Percival Scientific, USA) za podmínek osvětlení 16 hodin den a 8 hodin tma, po dobu 14 dní při teplotě 21 °C a relativní vlhkosti 50%. Mladé listy mutantů byly rozlišeny od listů neobsahující mutaci díky světleji zeleným listům.

8.3 Pěstování ječmene

Semínka ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a semínka ověřených mutantů ječmene *viridis zb63* byla nasazena do inertního materiálu (perlitu). Rostliny byly pěstovány ve fytofotochomě za podmínek osvětlení 16 hodin den a 8 hodin tma, po dobu 14 dní při teplotě 21 °C a relativní vlhkosti 50%.

8.4 Izolace tylakoidních membrán

Izolace probíhala kombinací protokolů z prací Dau et al. (1995) a Hideg (2004). Horní polovina mladých listů byla ustřižena a listy byly vloženy do homogenizační nádoby, která byla po celou dobu homogenizace chlazená v ledové lázni. K ustřiženým listům bylo přidáno 150 ml pufru A (viz tab. 2) vychlazeném na 0 °C. Směs rozstříhaných listů a pufru byla homogenizována pomocí tyčového homogenizátoru T25basic (IKA Labortechnik, Německo) ve čtyřech 5 sekundových intervalech při 13 000 otáčkách za minutu, přičemž jednotlivé intervaly byly prokládány asi 15 sekundovými přestávkami. Homogenát byl přefiltrován přes 2 vrstvy nylonové sítky s velikostí ok 40 µm. Filtrát byl rovnoměrně rozdělen do čtyř 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugován ve vychlazené centrifuze 5430 R (Eppendorf, Německo) při 0 °C a 5000 g, po dobu 6 minut. Supernatant byl opatrně odlit a pelet byl resuspendován v pufru B (viz tab. 2) vychlazeném na 0 °C. Resuspendovaný pelet byl rozdělen do dvou centrifugačních kyvet a centrifugován v centrifuze nastavené na 0 °C při 5000g, 10 min. Supernatant byl opět odlit a pelet resuspendován v pufru C (viz tab. 2) vychlazeném na 0 °C. Resuspendovaný pelet byl přelit do jedné centrifugační kyvety a centrifugován. Centrifuga byla nastavena na 4 °C a centrifugace probíhala při 5000g, 5 minut. Supernatant byl odlit a resuspendován v cca 1 ml pufru C. Po změření koncentrace chlorofylů (popis určení koncentrace chlorofylů je popsán v kapitole 8.6) byly vzorky rozděleny do mikrozkušavek po 50 µl a uloženy do -80 °C pro pozdější použití. Veškerá práce a izolace tylakoidních membrán probíhala za nízké intenzity zeleného osvětlení. Po celou dobu byl rostlinný materiál chlazen v ledové lázni.

Tab. 2. Složení pufrů pro izolaci tylakoidních membrán

	Chemikálie	Koncentrace
Pufr 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
Pufr B (pH 7,5)	HEPES	25 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	8 mM
	Na-EDTA	1 mM
Pufr C (pH 7,2)	Sacharosa	400 mM
	HEPES	50 mM
	NaCl	15 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mM

* Přidáno před použitím.

8.5 Určení koncentrace chlorofylů

Do dvou mikrozkušavek bylo napipetováno 2 ml 80% acetonu. Do jedné mikrozkušavky bylo napipetováno 10 µl a do druhé 20 µl suspenze tylakoidních membrán. Mikrozkušavky byly promíchány a centrifugovány při 25 000g, 10 min. U supernatantu byla proměřena absorbance chlorofylů při vlnových délkách: 646,8; 663,2 a 750 nm. Koncentrace chlorofylů *a* a *b* byla získána dosazením hodnot absorbance do Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987).

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

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

Z výpočtů koncentrace chlorofylů vyplývá, že byly získány roztoky izolovaných tylakoidních membrán ječmene setého o koncentraci chlorofylu 4 370 µg/ml a mutanta ječmene o koncentraci 838 µg/ml.

8.6 Izolace fragmentů granálních membrán

Pro izolaci granálních membrán ječmene setého byl použit následující postup: do mikrozkušavky byl přidán Bis-Tris pufr (viz tab. 3), digitonin (koncentrace digitoninu byla 0,4 %) a suspenze izolovaných tylakoidních membrán. Celkový objem vzorku, pufru a digitoninu byl 200 µl. Koncentrace chlorofylu činila 0,5 mg/ml. Pro vzorky tylakoidních membrán mutanta ječmene byl použit následující postup:

do mikrozkuřavky byl přidán Bis-Tris puřr (viz tab. 3), digitonin (koncentrace digitoninu byla 0,15 %) a suspenze izolovaných tylakoidních membrán. Celkový objem vzorku, puřru a digitoninu byl 200 μ l. Koncentrace chlorofylu činila 0,2 mg/ml.

Tab. 3 Složení Bis-Tris puřru, pH 6,5

Chemikálie	Koncentrace (mM)
Bis-Tris	20
NaCl	5

Následující postup byl společný pro oba rostlinné materiály: mikrozkuřavka byla míchána v ledové lázni 30 min. Poté byla provedena centrifugace při 10 000g, 5 minut ve vychlazené centrifuze na 4 °C. Supernatant byl odlit a pelet resuspendován v 1,5 ml puřru. Resuspendovaný pelet byl centrifugován ve vychlazené centrifuze na 4 °C při 10 000g, 10 minut. Tento krok (odlití supernatantu, resuspendace peletu v 1,5 ml Bis-Tris puřru a centrifugace) byl zopakován, aby bylo promytí membrán dostatečné a byly odstraněny volné proteiny z roztoku. Supernatant byl následně odstraněn a pelet resuspendován v 50 nebo 100 μ l puřru dle velikosti peletu (malý pelet byl resuspendován v 50 μ l, velký pelet ve 100 μ l puřru).

8.7 Odstranění OEC

Odstranění OEC v tylakoidních membránách probíhalo kombinací protokolů z prací Yamamoto et al. (1981) a Busheva et al. (2012). Podmínky odstranění OEC byly následovné: k tylakoidním membránám (koncentrace chlorofylů 0,1 mg/ml) byl přidán 0,8 M Tris puřr (pH 8,4) a mikrozkuřavka se vzorkem byla 30 minut míchána, po celou dobu byla chlazená ve vodní lázni. Protože pro další využití metody (CN-PAGE, izolace granálních membrán), ve kterých byly použity tylakoidní membrány s odstraněným OEC, bylo nutné zvolit různé množství chlorofylů, byl celkový objem puřru a vzorku pro odstranění OEC pro každou metodu jiný. Pro přehlednost jsou celkové objemy puřru a vzorku pro každou metodu uvedeny v tabulce 4 a 5. Po odstranění OEC byla suspenze tylakoidních membrán centrifugována ve vychlazené centrifuze na 4 °C při 30 000g, 15 minut.

Tab. 4 Celkový objem vzorku tylakoidních membrán a 0,8 M Tris pufru (pH 8,4), který byl použit pro odstranění OEC v izolovaných tylakoidních membránách ječmene setého podle následně použité metody.

Metoda	Celkový objem pufru a vzorku (μl)
Měření vývoje kyslíku	200
Izolace granálních membrán	2185
CN-PAGE	2927

Tab. 5 Celkový objem vzorku tylakoidních membrán a 0,8 M Tris pufru (pH 8,4), který byl použit pro odstranění OEC v izolovaných tylakoidních membránách mutanta ječmene *viridis* zb63 podle následně použité metody.

Metoda	Celkový objem pufru a vzorku (μl)
Měření vývoje kyslíku	400
Izolace granálních membrán	838
CN-PAGE	1215

8.8 Měření vývoje kyslíku

Byla sestavena aparatura Oxygraph+ System (Hansatech Instruments, Velká Británie) pro měření vývoje kyslíku. Na platinovou elektrodu Hansatech® byla nanášena kapka nasyceného roztoku chloridu draselného a položen malý čtverec velikosti asi 1,5×1,5 cm jemného cigaretového papírku, který byl přeložen čtvercem o velikosti asi 2×2 cm z teflonové membrány. Elektroda byla vložena pod reakční nádobku a přišroubována. Do reakční nádoby bylo vloženo magnetické míchadlo.

Pro kalibraci kyslíkové elektrody byla připravena deionizovaná voda nasycená kyslíkem. Kádinka s vodou byla míchána okolo 1 h. v místnosti, ve které probíhalo měření vývoje kyslíku, aby teplota deionizované vody nasycené kyslíkem měla stejnou teplotu jako teplota místnosti a voda byla dostatečně nasycená kyslíkem. Pro získání tzv. O₂-line (maximální množství kyslíku) byla použita připravená deionizovaná voda nasycená kyslíkem. Druhým kalibračním roztokem byla deionizovaná voda zbavená kyslíku pomocí dithioničitanu sodného, kterým byla změřena tzv. N₂-line. Do reakčního prostoru elektrody byla přidána reakční směs, která byla připravena smícháním 970 μl resuspendačního pufru (viz tab. 6), 20 μl umělého akceptoru elektronů-70 mM 2-fenyl-p-benzochinonu (PPBQ) v ethanolu a 10 μl suspenze tylakoidních membrán ječmene setého nebo mutanta ječmene *viridis* zb63, resp. tylakoidních membrán ječmene setého a mutanta ječmene *viridis* zb63 s odstraněnými podjednotkami OEC. Aktivita vývoje kyslíku byla sledována nejdříve ve tmě a později během osvětlení červeným LED

zdrojem světla. Měření aktivity vývoje kyslíku každého vzorku tylakoidních membrán bylo opakováno čtyřikrát bezprostředně za sebou.

Tab. 6 Složení resuspendačního pufru, pH 6,5

Chemikálie	Koncentrace (mM)
Sacharosa	400
MES	40
NaCl	15
MgCl ₂ bezvodý	5

8.9 Elektronová mikroskopie

8.9.1 Příprava vzorků

Měděná nosná síťka se 400 oky potažená podpurným uhlíkovým filmem byla vystavena doutnavému výboji (PELCO easiGlow Discharge System, Ted Pella, USA). Na mikroskopickou síťku bylo poté nanášeno 5 μ l vzorku granálních membrán ječmene nebo mutanta ječmene *viridis zb63*, resp. granálních membrán ječmene nebo mutanta ječmene s odstraněným OEC. Po 1 minutě byl vzorek odsán filtračním papírem a následně bylo na síťku nanášeno 5 μ l 2 % uranylu acetátu, který slouží pro zlepšení kontrastu. Vzorek byl barven 4 minuty. Poté byl uranyl acetát odsán a síťka byla umístěna do držáku vzorku elektronového mikroskopu.

8.9.2 Elektronová mikroskopie granálních membrán

Vzorky byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem Jeol-2010F (Jeol, Japonsko) při zvětšení 25 000 \times nebo 40 000 \times . Veškeré snímky byly pořízeny CCD kamerou Quemesa (Olympus, Japan), která byla ovládána programem iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions).

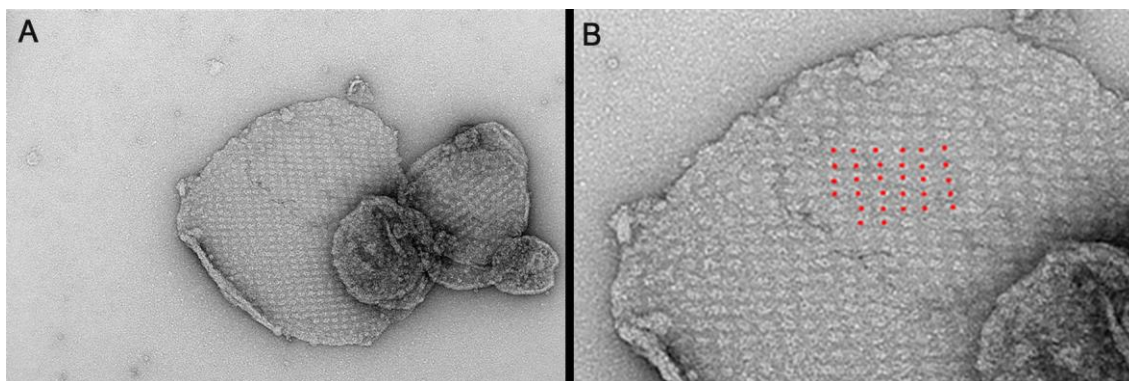
8.9.3 Popis vyhodnocování snímků

Ze snímků granálních membrán ječmene setého a mutantu ječmene *viridis zb63* pořízených transmisním elektronovým mikroskopem byla zhodnocena organizace PSII komplexů v granálních membránách, která byla vizuálně vyhodnocena jako jako náhodná nebo krystalická. U každé varianty studovaného vzorku byla zjištěna četnost snímků s náhodnou nebo krystalickou organizací PSII v membráně. Jestliže se ve snímku granálních membrán vyskytovaly oblasti s krystalickou i náhodnou

organizací PSII zároveň, byl tento snímek označen jako snímek s krystalickou organizací PSII.

8.9.4 Obrazová analýza

Pro obrazovou analýzu byly použity mikroskopické snímky kontrolních vzorků granálních membrán ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* a mikroskopické snímky granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* s odstraněným OEC (zvětšení: 40 000 ×) s krystalickým uspořádáním PSII. Z každého snímku byly vybrány projekce PSII v programu EMAN2 pomocí e2boxer (interactive Boxing) (Tang et al., 2007). Na obrázku 7 je znázorněno, jakým způsobem byly vybírány pozice PSII, z nichž byla prováděna základní jednočásticová obrazová analýza v programu Xmipp (Sorzano et al., 2004).



Obr. 7 Ukázka snímku z elektronového mikroskopu zobrazující A) granální membrány mutanta ječmene *viridis zb63* vykazující krystalické uspořádání PSII komplexů, z něhož byly vybrány projekce PSII použité pro obrazovou analýzu. Zvětšení: 40 000 ×. B) výřez snímku A) zobrazující několik pozic (červené body) PSII, z nichž byla prováděna obrazová analýza.

8.9.5 Vytvoření modelu superkomplexu PSII

Strukturní model PSII C₂S₂M₂ (pdb soubor s číslem 5B66) byl získán z Protein Data Bank. V programu Pymol (Schrödinger, LLC, USA) byly barevně odlišeny jednotlivé podjednotky PSII. Pomocí velikosti pixelu v mikroskopické snímku, která je daná použitým zvětšením a velikostí pixelu CCD kamery, byla vypočítána velikost strukturního modelu PSII a byl vytvořen strukturní model organizace PSII v granálních membránách.

8.10 CN-PAGE

8.10.1 Solublizace tylakoidních membrán a příprava vzorků pro CN-PAGE

Tylakoidní membrány izolované z ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* byly pro následnou elektroforetickou separaci solublizovány se zvyšujícím se hmotnostním poměrem α -DDM/chl ($a+b$)=10, 20, 30 a 40. Do mikrozkuhavky byl napipetován C-pufr (složení pufru viz tab. 7), poté α -DDM se vzrůstající koncentrací (zásobní roztok byl 5%) a následně suspenze tylakoidních membrán, resp. tylakoidních membrán s odmytým OEC. Celkový objem v mikrozkuhavce byl 60 μ l. Množství chlorofylu v jedné mikrozkuhavce bylo 20 μ g.

Tab. 7 Složení solublizačního pufru C, pH 7,2

Chemikálie	Koncentrace
Sacharosa	400 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	5mM
HEPES/NaOH	50 mM
NaCl	15 mM
Glycerol	10%

Směs pufru, detergentu a tylakoidních membrán byla promíchána na vortexu a následně centrifugována při 20 000 g, 10 min v centrifuze vychlazené na 4 °C. Po centrifugaci byla v supernatantu změřena koncentrace chlorofylů. Následně byla suspenze nanášena do jamek gelu tak, aby bylo zachováno množství chlorofylů na jamku 10 μ g pro suspenzi solublizovaných tylakoidních membrán.

8.10.2 CN-PAGE

Pro elektroforetickou separaci pigment-proteinových komplexů byla využita metoda bezbarvé nativní polyakrylamidové elektroforézy. Byla sestavena aparatura pro nalévání gelu. Očištěná a nepoškozená skla vhodná pro gel o tloušťce 1 mm byla uchycena do připravené aparatury.

Byly nachystány zásobní roztoky potřebné k přípravě gradientového gelu:

- Gelový pufr (6 \times koncentrovaný, pH 7): 3M aminokapronová kyselina (ACA), 0,3M Bis-Tris/HCl,
- 50% roztok akrylamidu: 50% T; 2,6% C (T- celková koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu, C- poměr bisakrylamidu a akrylamidu).

Elektroforetická separace probíhala v 4-8% polyakrylamidovém dělicím gradientovém gelu, jenž byl vytvořen následovně pomocí peristaltické pumpy PCD21 (Kouřil, Česká republika). Celá aparatura byla promyta destilovanou vodou. Do komory

dále od výpusti bylo přidáno 3 ml zásobního roztoku pro přípravu 4% gelu dělicího gelu a do komory blíže k výpusti 3 ml zásobního roztoku pro přípravu 8% gelu (složení zásobních roztoků pro přípravu dělicího gelu je uvedeno v tabulce 8). Obě komory byly stále míchány. Následně bylo do obou komor přidáno 5 μ l TEMED a 20 μ l 10% roztoku persíranu amonného (APS). Po asi 1 minutě míchání byl otevřen kohout mezi komorami a byla spuštěna pumpa.

Tab. 8 Složení 50 ml zásobního roztoku pro přípravu 4% a 8% dělicího gelu

Chemikálie	4% gel	8% gel
	Množství (ml)	
Glycerol	-	10
Gelový pufr	8,33	8,33
Voda	37,67	23,67
50% roztok akrylamidu	4	8

Po nalití gradientového gelu byl mezi skla vložen plastový hřebínek. Gel byl ponechán v klidu při laboratorní teplotě, aby proběhla spontánní polymerace. Po proběhlé polymeraci (asi 60 minut) byl gel zabalen do hliníkové folie a uložen do lednice pro pozdější použití.

Pro samotný průběh elektroforézy bylo třeba si nachystat další pufrы:

- Katodový (horní) pufr (10 \times koncentrovaný, pH 7,0): 0,5 M Tricin, 150 M Bis-Tris/HCl. Ředěním zásobního roztoku katodového pufru bylo pro potřeby elektroforetické separace připraveno 150 ml pufru, ke kterému bylo přidáno 43 mg α -DDM, 86 mg deoxycholátu sodného a 48 μ l 35% HCl.
- Anodový (dolní) pufr (1 \times koncentrovaný, pH 7,0): 50 M Bis-Tris/HCl.

Ze zpolymerizovaného gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a vzniklé jamky byly promyty destilovanou vodou, čímž byl odstraněn případný nezpolymerizovaný gel. Poté byla sestavena elektroforetická aparatura Protean II xi Cell (Biorad, USA). Těsnost aparatury byla ověřena nalitím destilované vody mezi skla, následně byla voda odlita a byl nalit katodový a anodový pufr. Do jamek gelu byly naneseny vzorky solublizovaných tylakoidních membrán připravených podle postupu popsaném v kapitole 8.11.1. a elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji elektrického proudu Powerpac 1000 (Biorad, USA). Následně byla spuštěna elektroforéza.

Podmínky separace byly následující: na elektroforetické aparatuře byl udržován 15 min. proud 7 mA, který byl poté zvýšen na 15 mA a ponechán nezměněný až do ukončení separace. Po asi 1,5 h dosáhlo čelo migrujících částic konce dělicího gelu,

elektroforéza byla ukončena, elektroforetická aparatura rozložena, gel vyjmut a skenován.

Veškerá práce se vzorky a elektroforéza probíhala při nízké intenzitě zeleného osvětlení a v chladu.

8.10.3 Skenování gelu

Polyakrylamidový gel byl skenován na gel skeneru Amersham Imager 600RGB (GE Healthcare Bio-Sciences, USA) v transmisním kolorimetrickém módu a fluorometrickém módu. Zářením o vlnové délce 460 nm byla vyvolána excitace chlorofylů. Detekce fluorescence probíhala za pomoci filtru cyaninu 5 (Cy5), který propouští vlnové délky červeného světla.

9 Výsledky

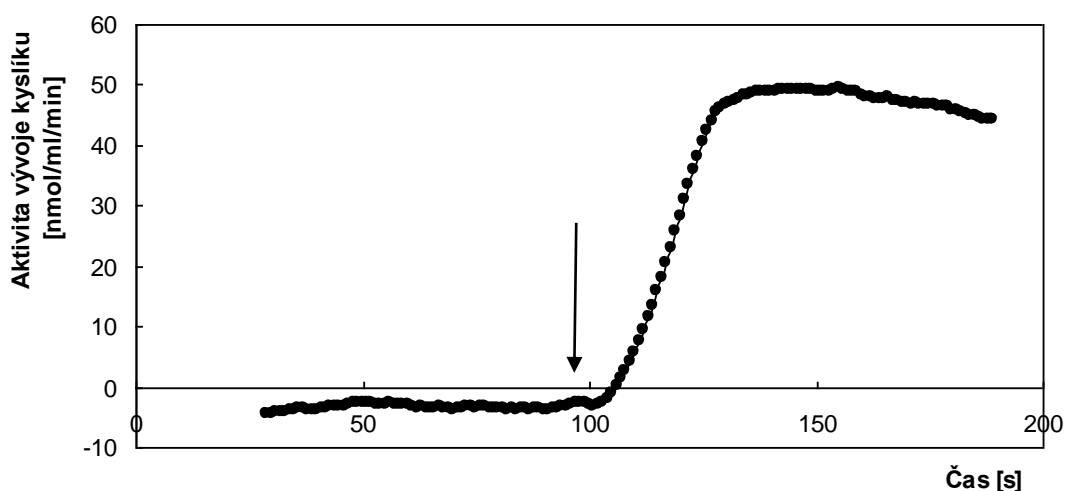
Cílem této práce bylo zjistit vliv strukturní integrity OEC na formování a stabilitu PSII superkomplexů a 2D krystalických domén PSII v granálních membrán ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63*.

9.1 Kontrola chemického odstranění OEC

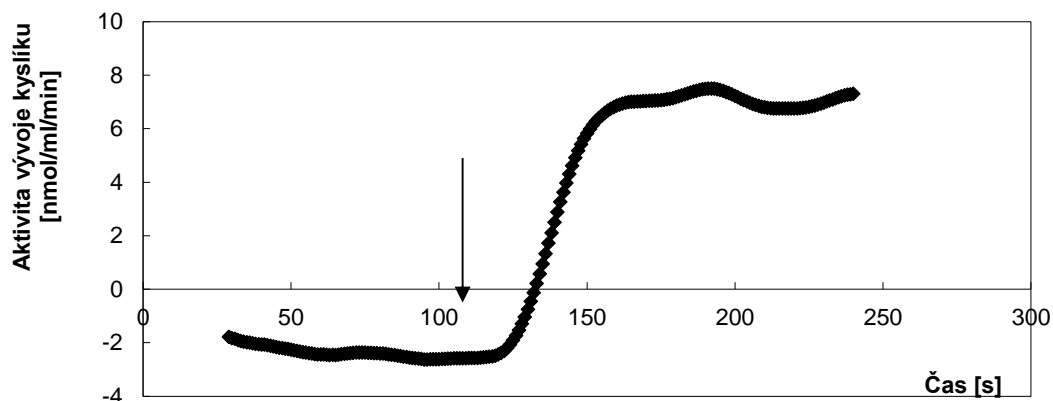
Pro zhodnocení vlivu destabilizace OEC na formování a stabilitu PSII superkomplexů a krystalických domén PSII bylo třeba experimentálně stanovit vhodné podmínky pro odstranění OEC. Nejdříve byla proměřena aktivita vývoje kyslíku v tylakoidních membránách ječmene setého i mutanta ječmene *viridis zb63*, u kterých nebyl odstraněn OEC. Z křivky aktivity vývoje kyslíku (viz obr. 8 a 9) byla odečtena maximální dosažená hodnota, ze které byla vypočtena aktivita vývoje kyslíku vztažená na mg chlorofylů za hodinu podle následujícího vzorce:

$$((x \text{ nmol/ml/min} * 60 \text{ min/h}) / 1000 \text{ O}_2 \text{ } \mu\text{mol/nmol}) / y \text{ mg/ml chl } a$$

Výsledky měření aktivity vývoje kyslíku v kontrolních vzorcích izolovaných tylakoidních membrán ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* jsou uvedeny v tabulce 9 a 10. Z výsledků měření je zřejmé, že průměrná aktivita vývoje kyslíku v tylakoidních membránách ječmene setého vztažená na mg chlorofylu za hodinu se od aktivity vývoje kyslíku tylakoidních membrán mutanta *viridis zb63* liší jen nepatrně.



Obr. 8 Aktivita vývoje kyslíku zaznamenaná měřením vývoje kyslíku v kontrolních vzorcích tylakoidních membrán ječmene setého Clarkovou elektrodou. Šipkou je označen čas, ve kterém bylo zapnuto červené LED osvětlení (po 99 s). Kalibrační teplota: 24°C. Koncentrace chlorofylů: 4,37 mg/ml.



Obr. 9 Aktivita vývoje kyslíku zaznamenaná měřením vývoje kyslíku v kontrolních vzorcích tylakoidních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* Clarkovou elektrodou. Šipkou je označen čas, ve kterém bylo zapnuto červené LED osvětlení (po 112 s). Kalibrační teplota: 24 °C. Koncentrace chlorofylů: 0,838 mg/ml.

Tab. 9 Výsledky měření aktivity vývoje kyslíku s jejich směrodatnou odchylkou v kontrolních vzorcích izolovaných tylakoidních membrán ječmene setého. Kalibrační teplota: 24 °C. Koncentrace chlorofylů: 4,37 mg/ml.

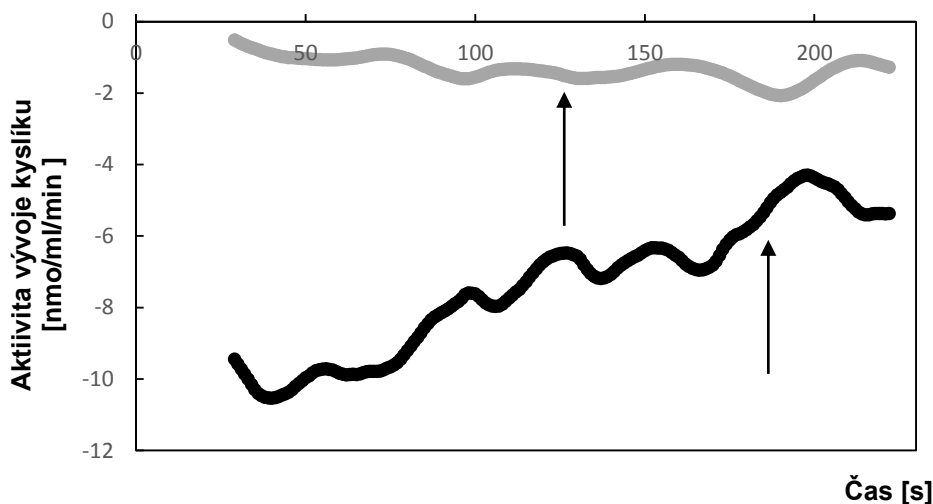
Pokus měření	aktivita vývoje kyslíku	
	[nmol/ml/min]	[$\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
1	55,01	76,76
2	49,13	68,55
3	59,79	83,43
4	45,94	64,10
Průměr		73.21±7.44

Tab. 10 Výsledky měření aktivity vývoje kyslíku s jejich směrodatnou odchylkou ve kontrolních vzorcích izolovaných tylakoidních membrán mutanta ječmene *viridis zb63*. Kalibrační teplota: 24 °C. Koncentrace chlorofylů: 0,838 mg/ml.

Pokus měření	aktivita vývoje kyslíku	
	[nmol/ml/min]	[$\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]
1	7,5	53,70
2	9	64,44
3	10,3	73,75
4	9	64,44
Průměr		64.08±8.19

V tylakoidních membránách mutanta ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63*, ve kterých byl odmyt OEC, byla také proměřena aktivita vývoje kyslíku. Hodnoty aktivity vývoje kyslíku oscilovaly okolo nuly (viz obr. 10), což potvrdilo úspěšné odstranění podjednotek OEC. Pro úplnost jsou maximální naměřené hodnoty aktivity vývoje kyslíku tylakoidních membrán ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* uvedeny v tab. 11 a 12. Záporné hodnoty aktivity vývoje kyslíku vypovídají o tom, že v měřicí komůrce byl spotřebováván kyslík, a to buď samotnou měřicí

elektrodou nebo zbytky mitochondrií, které mohly zůstat ve vzorku po izolaci tylakoidních membrán.



Obr. 10 Aktivita vývoje kyslíku zaznamenaná měřením vývoje kyslíku v tylakoidních membránách ječmene setého (černá křivka) a mutanta ječmene *viridis zb63* (šedá křivka) Clarkovou elektrodou, ve kterých byl chemicky odstraněn OEC. Šipkami je označen čas, ve kterém bylo zapnuto červené LED osvětlení: v membránách ječmene setého po 181 s, v membránách mutanta po 130 s. Kalibrační teplota: 23,3 °C. Koncentrace chlorofylů: 0,1 mg/ml.

Tab. 11 Výsledky měření aktivity vývoje kyslíku ve vzorcích izolovaných tylakoidních membrán ječmene setého vystavené působení 0,8 M Tris pufru (pH 8,4), 30 minut. Kalibrační teplota: 23,3 °C. Koncentrace chlorofylů: 0,1 mg/ml.

Pokus měření	aktivita vývoje kyslíku		
	[nmol/ml/min]	[$\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	
1	-4,28		-
2	-2,63		-
3	-2,17		-

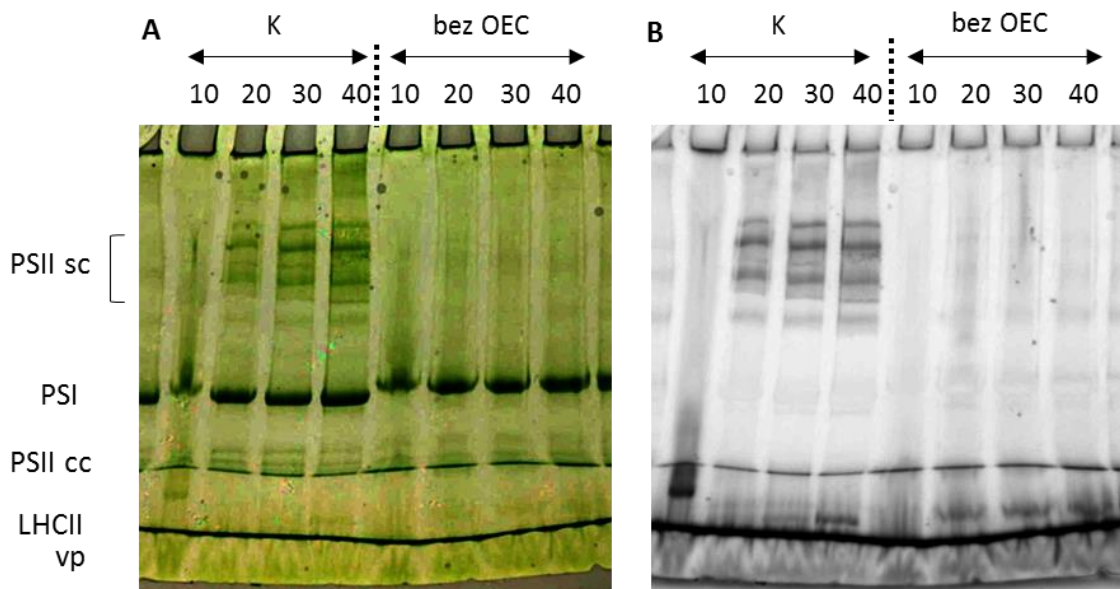
Tab. 12 Výsledky měření aktivity vývoje kyslíku ve vzorcích izolovaných tylakoidních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* vystavené působení 0,8 M Tris pufru (pH 8,4), 30 minut. Kalibrační teplota: 23,3 °C. Koncentrace chlorofylů: 0,1 mg/ml.

Pokus měření	aktivita vývoje kyslíku		
	[nmol/ml/min]	[$\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{mg chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	
1	-0,53		-
2	-1,2		-
3	-0,32		-

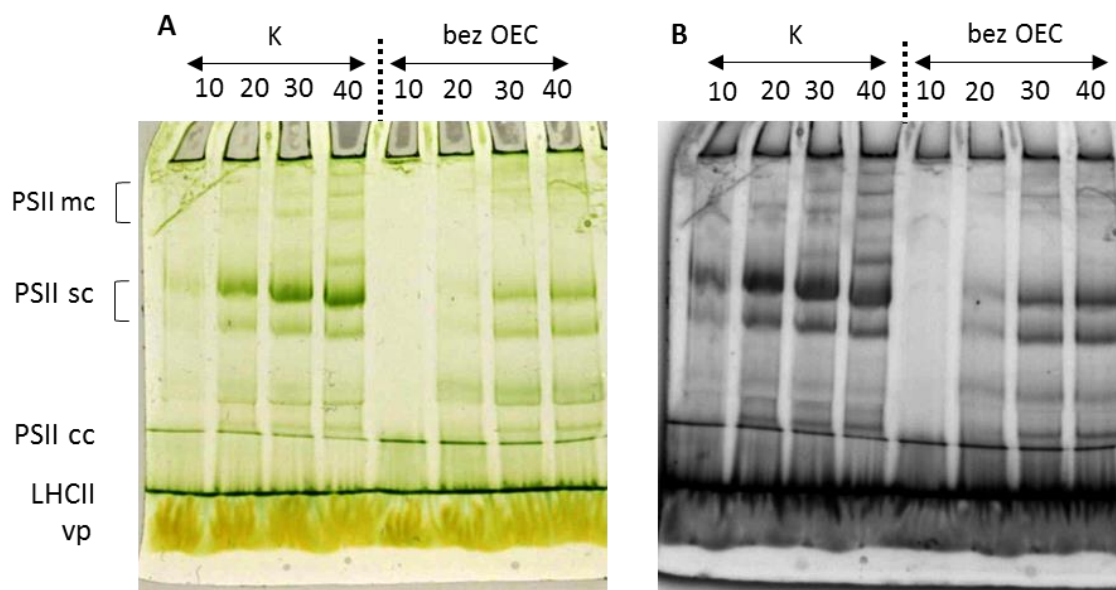
9.2 Vliv odstranění OEC na strukturu PSII-LHCII v tylakoidní membráně ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63*

Dopad odstranění podjednotek OEC na strukturu superkomplexu PSII-LHCII v tylakoidních membránách ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* byl hodnocen pomocí elektroforetické separace. Tylakoidní membrány ječmene setého

a mutanta ječmene a tylakoidní membrány s odstraněným OEC byly solublizovány se zvyšujícím se hmotnostním poměrem α -DDM/chl. ($a+b$) = 10, 20, 30 a 40. Proteinové komplexy tylakoidní membrány ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* byly následně separovány pomocí CN-PAGE. Výsledky separace proteinových komplexů tylakoidních membrán po solublizaci při hmotnostním poměru DDM/chl= 10-40 jsou na obrázku 11 a 12.



Obrázek 11: Elektroforeogram tylakoidních membrán ječmene setého solublizovaných se zvyšujícím se hmotnostním poměrem α -dodecyl maltosidu/chl. A) Snímek gelu. B) Fluorescenční snímek. Čísla nad jamkami značí hmotnostní poměr DDM/chl. Tečkovanou čarou jsou oddělené jamky 1-4 (nalevo od čáry) obsahují solublizované kontrolní membrány ječmene setého od jamek 5-8 (napravo od čáry) obsahující solublizované membrány ječmene setého s odstraněnými podjednotkami OEC pomocí 0,8 M Tris pufru. PSII sc: superkomplexy PSII, PSI: fotosystém I, PSII cc: jádro PSII, LHCII: trimery světlosběrného komplexu PSII, vp: volné pigmenty.



Obrázek 12: Elektroforeogram tylakoidních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* solublizovaných se zvyšujícím hmotnostním poměrem α -dodecyl maltosidu/chl. A) Snímek gelu. B) Fluorescenční snímek. Čísla nad jamkami značí hmotnostní poměr DDM/chl. Tečkovanou čarou jsou oddělené jamky 1-4 (nalevo od čáry) obsahují solublizované kontrolní membrány mutanta ječmene *viridis zb63* od jamek 5-8 (napravo od čáry) obsahující solublizované membrány mutanta ječmene *viridis zb63* s odstraněnými podjednotkami OEC pomocí 0,8 M Tris pufru. PSII mc: megakomplexy PSII, PSII sc: superkomplexy PSII, PSII cc: jádro PSII, LHCII: trimery světlosběrného komplexu LHCII, vp: volné pigmenty.

Ve snímcích gelu obsahující separované pigment-proteinové komplexy tylakoidní membrány bylo nutné identifikovat jednotlivé proteinové pásy. Identifikace jednotlivých proteinových pásů byla provedena na základě srovnání s prací Kouřil et al. (2018) a zkušeností vedoucího práce. Určování, o jaký proteinový pás se jedná, usnadňuje detekce fluorescence PSII superkomplexu. Při pokojové teplotě je totiž fluorescence PSII vysoká a pásy jsou na fluorescenčním snímku dobře viditelné, zatímco intenzita fluorescence PSI je při pokojové teplotě nízká a na fluorescenčním snímku jsou pásy téměř nezřetelné. Na základě fluorescence superkomplexů a srovnáním denzity pásu v barevném snímku byla skupina pásů v horní části gelu identifikována jako superkomplexy PSII a pás uprostřed snímku jako PSI. Skupina pásů pod pásem PSI byla identifikována na základě porovnání fluorescence ve fluorescenčním snímku a denzity pásů v transmisním snímku jako dimer jaderného komplexu PSII. Pás označený jako LHCII byl identifikován kvůli výrazné fluorescenci jako trimerní světlosběrný komplex. Poslední pás označený jako vp pravděpodobně patří volným pigmentům, které se uvolnily ze svých míst v pigment-proteinových komplexech.

Na obr. 11 je snímek gelu, který obsahoval separované pigment-proteinové komplexy tylakoidních membrán ječmene setého. V levé horní části gelu, ječmene setého se nacházely proteinové pásy superkomplexu PSII. Na snímku byly zřetelné čtyři pásy superkomplexu PSII představující tyto formy superkomplexů: C₂S, C₂S₂, C₂S₂M a C₂S₂M₂. Vlivem chemického odstranění OEC došlo k rozpadu superkomplexů PSII (viz pravá polovina gelu). Je možné si všimnout, že s destabilizací superkomplexů PSII docházelo k mírnému nárůstu denzity pásů jádra PSII.

Na obr. 12 je snímek gelu obsahující separované pigment-proteinové komplexy tylakoidních membrán mutanta ječmene *viridis zb63*. V levé horní části gelu těsně pod jamkami bylo pozorováno několik pásů megakomplexů. Pod pásy megakomplexů se nacházely dva pásy superkomplexů PSII, které představovaly C₂S a C₂S₂ formy superkomplexu PSII. Ve čtvrté jamce, do které byly pipetovány solublizované tylakoidní membrány s hmotnostním poměrem DDM/chl=40, byly dokonce pozorovány tři pásy superkomplexu PSII. Tyto pásy představovaly C₂S, C₂S₂ a C₂S₂M formu superkomplexu. Je patrné, že chemické odmytí OEC v tylakoidních membránách mutanta ječmene *viridis zb63* způsobilo destabilizaci superkomplexů a megakomplexů PSII. Elektroforeogram tylakoidních membrán mutanta ječmene *viridis zb63*, jak bylo předpokládáno, neobsahoval proteinové pásy PSI.

Samotná separace proteinových komplexů probíhala na 4-8% polyakrylamidovém gelu, protože použití takového koncentračního rozmezí umožňuje šetrnou separaci proteinů o velkých molekulových hmotnostech. Množství použité suspenze tylakoidních membrán nanášených do jedné jamky bylo zvolené na základě znalostí vedoucí práce tak, aby odpovídalo 10 µg chlorofylů *a + b*. Z obr. 11 i 12 je patrné, že při použití hmotnostního poměru DDM/chl=10 byly patrné nejvíce proteinové pásy PSI, jádra PSII a světlosběrných komplexů. U vyšších hmotnostních poměrů DDM/chl byly již viditelné i pásy superkomplexů. Ve všech jamkách zůstával nesolublizovaný materiál z důvodu šetrnosti použitého detergentu.

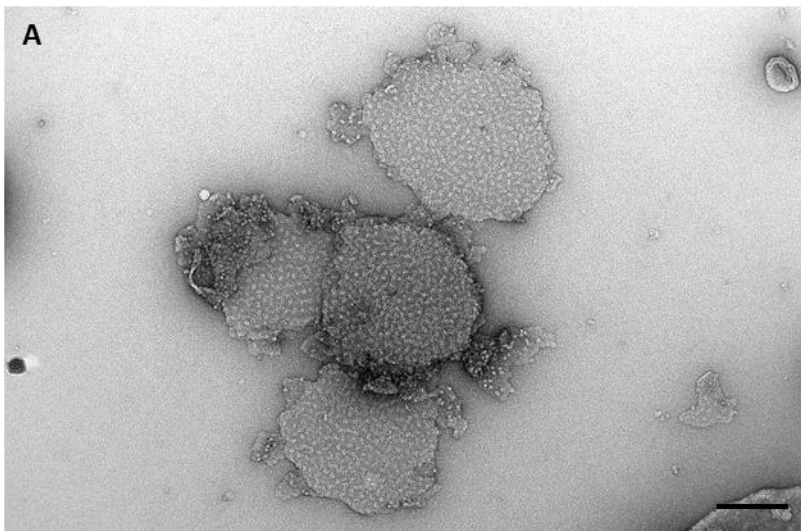
9.3 Vliv strukturní integrity OEC na organizaci PSII v granálních membránách ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63*

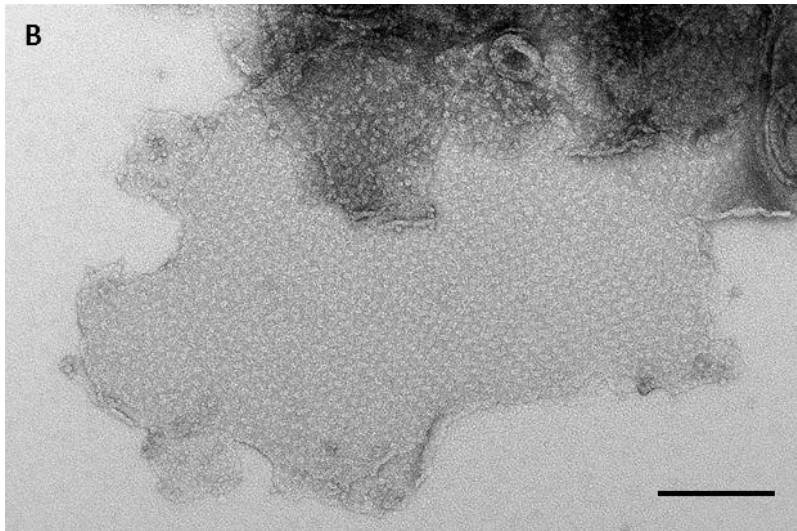
Mutant ječmene *viridis zb63* se vyznačuje téměř úplnou absencí PSI, ale vykazuje normální aktivitu PSII. Organizace PSII v tylakoidních membránách je krystalická (Morosinotto et al. 2006), proto by jakékoliv strukturní změny v organizaci PSII

související s inhibicí OEC měly být dobře detekovatelné. Mutant ječmene *viridis zb63* se proto jeví jako vhodný materiál ke studiu vlivu OEC na organizaci PSII v granálních membránách.

Granální membrány byly izolovány z kontrolních vzorků tylakoidních membrán ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63* a z tylakoidních membrán ječmene setého a mutanta ječmene *viridis zb63*, ve kterých byl chemicky odstraněn OEC pomocí 0,8 M Tris pufru, pH 8,4. Fragменты granálních membrán byly pozorovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Celkem bylo analyzováno 60 snímků kontrolních vzorků granálních membrán ječmene setého a granálních membrán s odstraněným OEC a 70 snímků kontrolních vzorků granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* a granálních membrán s odstraněným OEC.

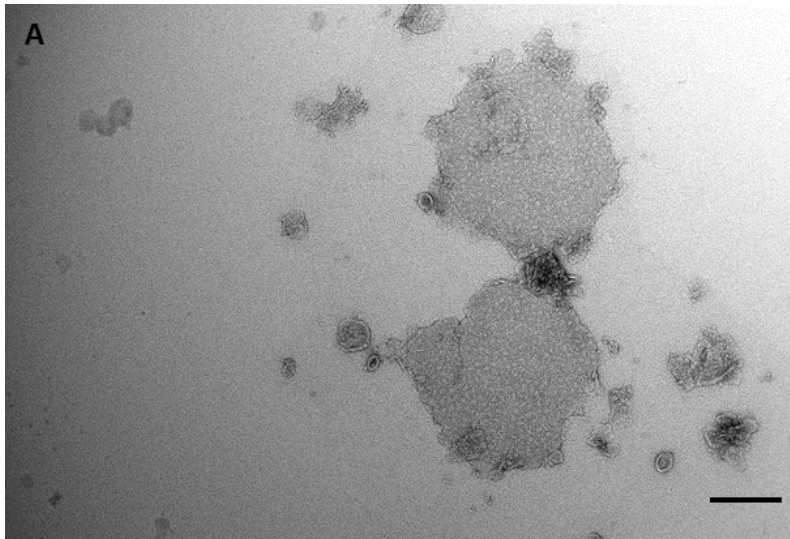
Ve snímcích granálních membrán kontrolního vzorku ječmene setého byly pozorovány převážně PSII vykazující náhodné uspořádání (viz obr. 13A). Jen v 8 % analyzovaných snímků vykazovaly PSII komplexy krystalické uspořádání (viz obr. 13B).

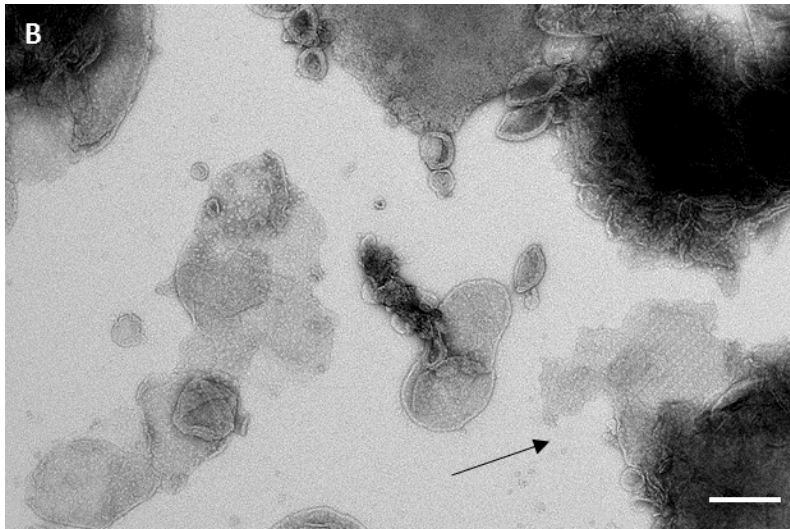




Obr. 13 Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány kontrolního vzorku ječmene setého vykazující A) náhodné uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000 \times , B) krystalické uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 40 000 \times . Měřítka pro snímky z elektronového mikroskopu je 200 nm.

V granálních membránách ječmene setého, ve kterých byl chemicky odstraněn OEC, vykazovaly téměř všechny PSII komplexy náhodné uspořádání (viz obr. 14A). Pouze v jednom snímku granálních membrán ječmene setého s chemicky odstraněným OEC byla pozorována malá oblast s krystalickým uspořádáním PSII (viz obr. 14B).





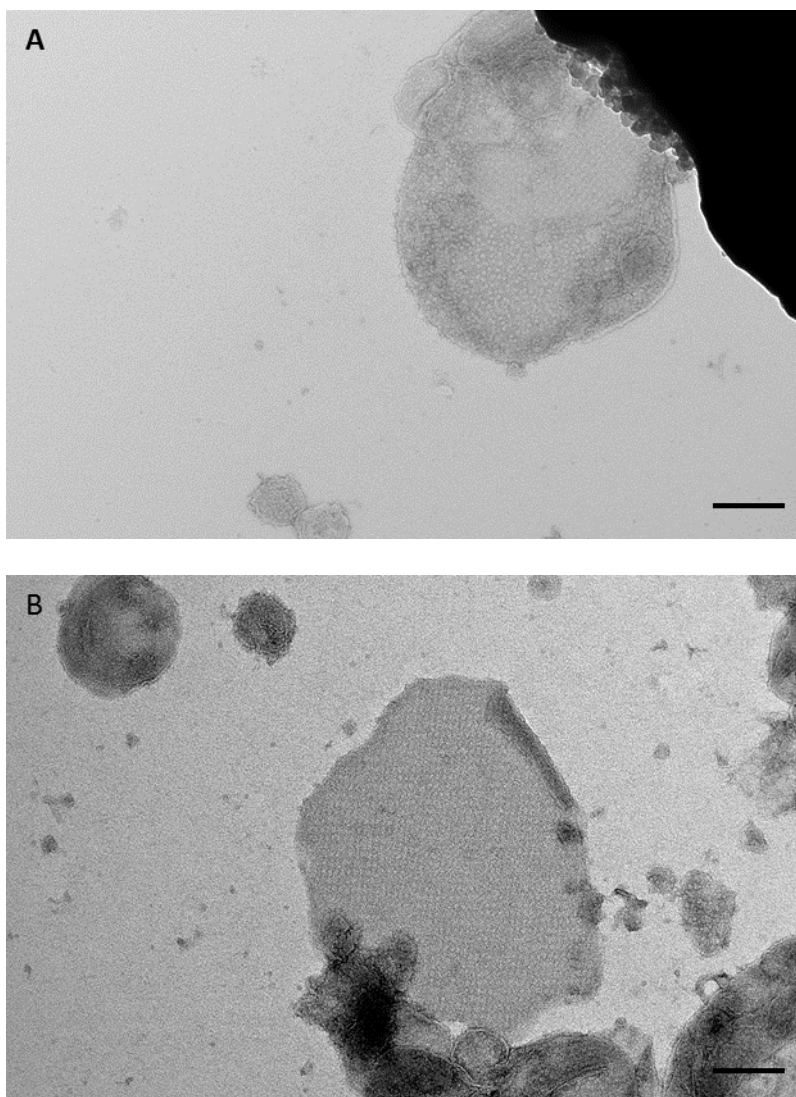
Obr. 14 Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány kontrolního vzorku ječmene setého po chemickém odstranění OEC vykazující A) náhodné uspořádání PSII komplexů. B) krystalické uspořádání PSII komplexů, označeno šipkou. Zvětšení: 25 000×. Měřítka pro snímky z elektronového mikroskopu je 200 nm.

Zastoupení náhodného a krystalického uspořádání PSII superkomplexů v granálních membránách kontrolního vzorku ječmene setého a vzorku po chemickém odstranění OEC shrnuje tabulka 13.

Tab. 13 Zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII ve snímcích granálních membrán v kontrolním vzorku ječmene setého a ve snímcích granálních membrán ječmene setého po chemickém odstranění OEC. Bylo analyzováno 60 snímků z každé varianty.

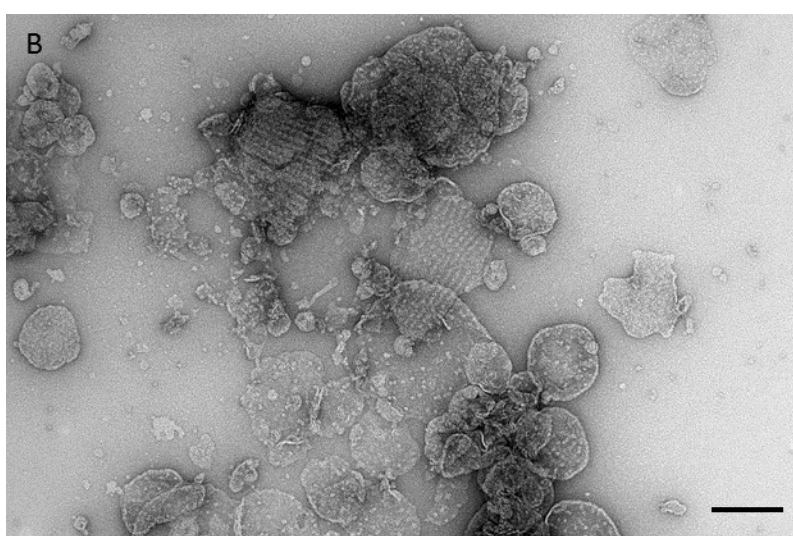
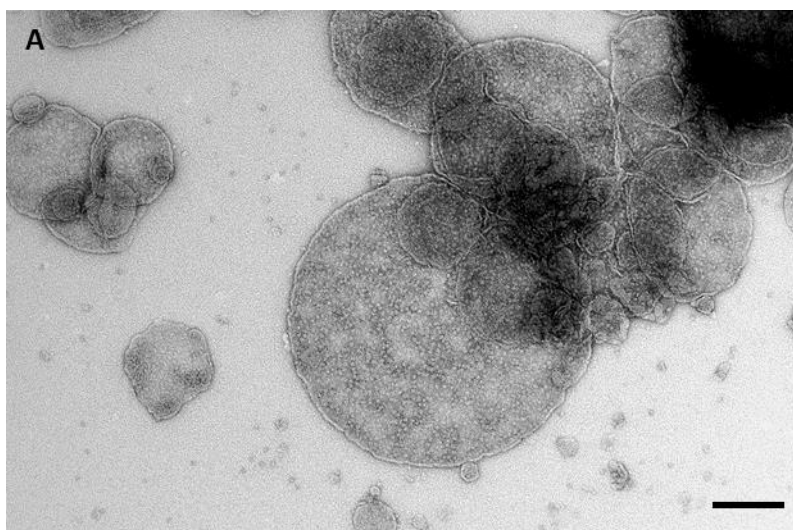
	Krystalické (počet snímků)	Náhodné (počet snímků)	Krystalické (%)	Náhodné (%)
Kontrola	5	55	8	92
Po odstranění OEC	1	59	2	98

Na většině snímcích (91 %) kontrolních granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* vykazovaly PSII komplexy krystalické uspořádání PSII (viz obr. 15B). Náhodné uspořádání PSII v granálních membránách kontrolních vzorků mutanta ječmene *viridis zb63* bylo pozorováno pouze v 9 % snímcích (viz obr. 15A). Oproti kontrolním vzorkům granálních membrán ječmene setého byla náhodná organizace v kontrolních vzorcích granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* méně častá.



Obr. 15 Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány kontrolního vzorku mutanta ječmene *viridis zb63* A) náhodné uspořádání PSII komplexů, B) krystalické uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Měřítka pro snímky z elektronového mikroskopu je 200 nm.

Vlivem chemického odstranění OEC docházelo k rozpadu krystalického uspořádání PSII komplexů v granální membráně. Pouze na 32 % snímcích granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* vykazovaly PSII komplexy krystalické uspořádání (viz obr. 16B). Ve zbylých analyzovaných snímcích (68 %) granálních membrán bylo pozorováno náhodné uspořádání PSII komplexů (viz obr. 16A). Zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII v granálních membránách mutanta ječmene *viridis zb63* po chemickém odstranění OEC ukazuje tabulka 14.



Obr. 16. Snímky z elektronového mikroskopu zobrazující granální membrány mutantu ječmene *viridis zb63* po chemické odstranění OEC vykazující A) náhodné uspořádání PSII komplexů. B) krystalické uspořádání PSII komplexů. Zvětšení: 25 000×. Měřítka pro snímky elektronového mikroskopu je 200 nm.

Tab. 14. Zastoupení krystalického a náhodného uspořádání PSII ve snímčích granálních membrán v kontrolním vzorku mutantu ječmene *viridis zb63* a ve snímčích granálních membrán mutantu po chemickém odstranění OEC. Bylo analyzováno 70 snímků z každé varianty.

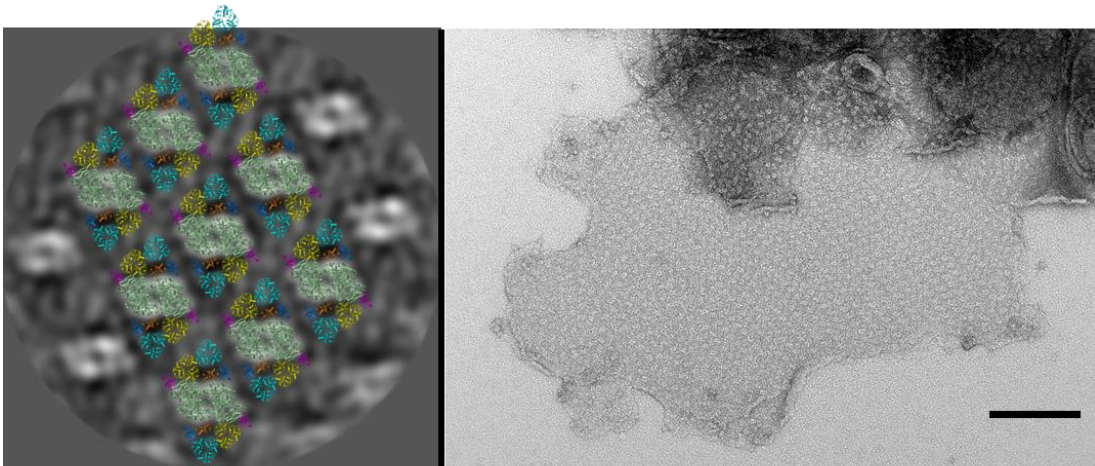
	Krystalické (počet snímků)	Náhodné (počet snímků)	Krystalické (%)	Náhodné (%)
Kontrola	64	6	91	9
Po odstranění OEC	22	48	32	68

9.4 Obrazová analýza

U vybraných snímků z elektronového mikroskopu granálních membrán ječmene setého a mutantu ječmene *viridis zb63*, které vykazovaly krystalické uspořádání PSII, byla provedena obrazová analýza (popis metody je uveden v kapitole 8.9.4). Obrazová

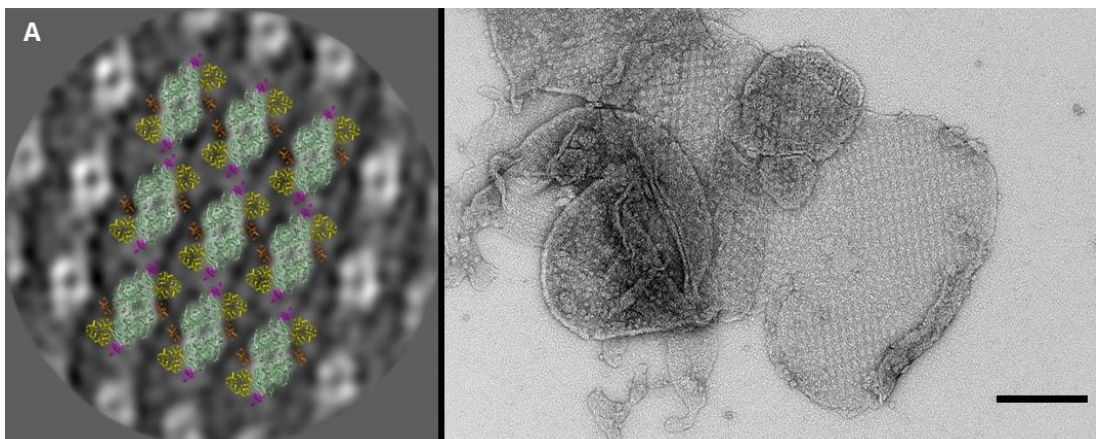
analýza zlepšila kontrast snímku, zvýšila poměr signál/šum a tím zvýraznila jednotlivé PSII komplexy.

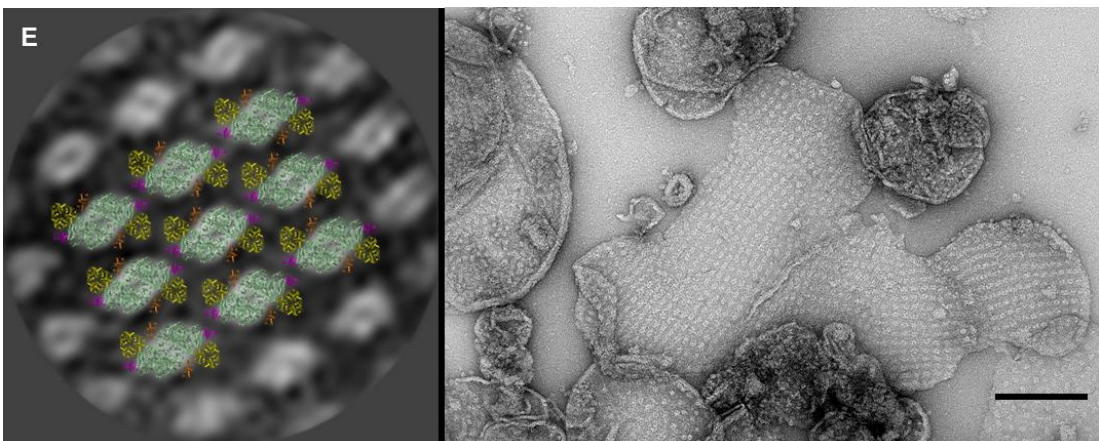
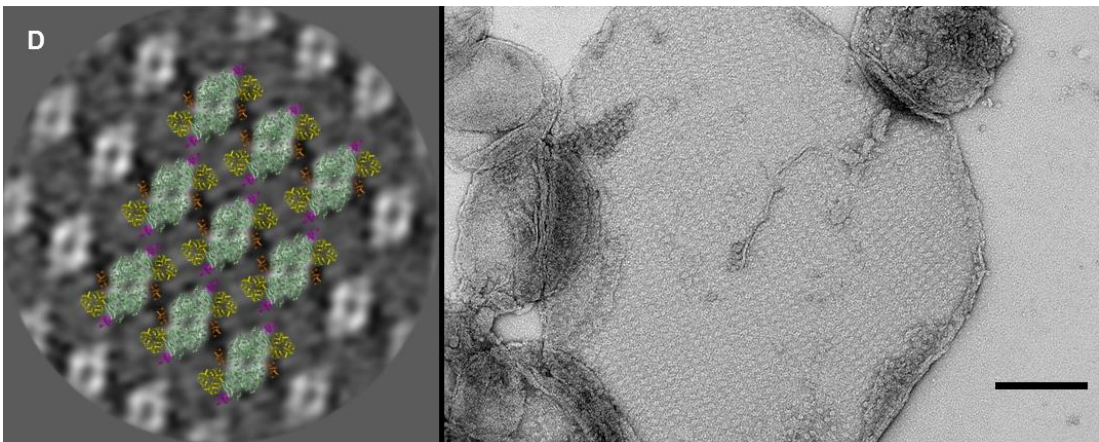
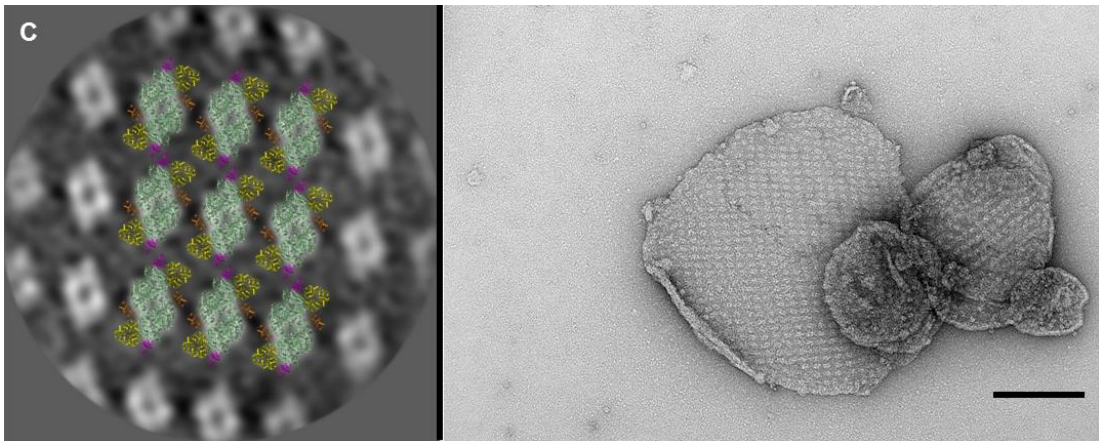
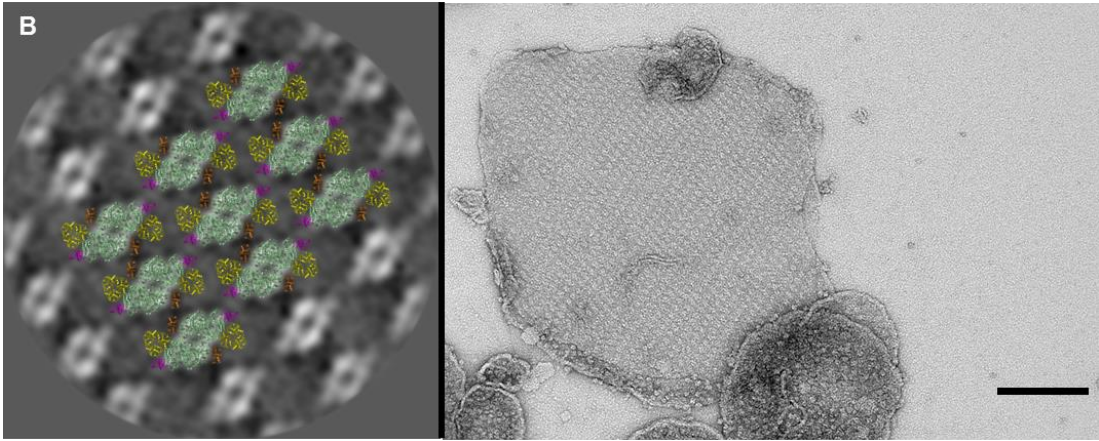
Ze snímků kontrolních vzorků granálních membrán ječmene setého byl analyzován jeden snímek. Vytvořením strukturního modelu PSII bylo zjištěno, že v granálních membránách s krystalickým uspořádáním PSII, byla $C_2S_2M_2$ forma superkomplexů (viz obr. 17).

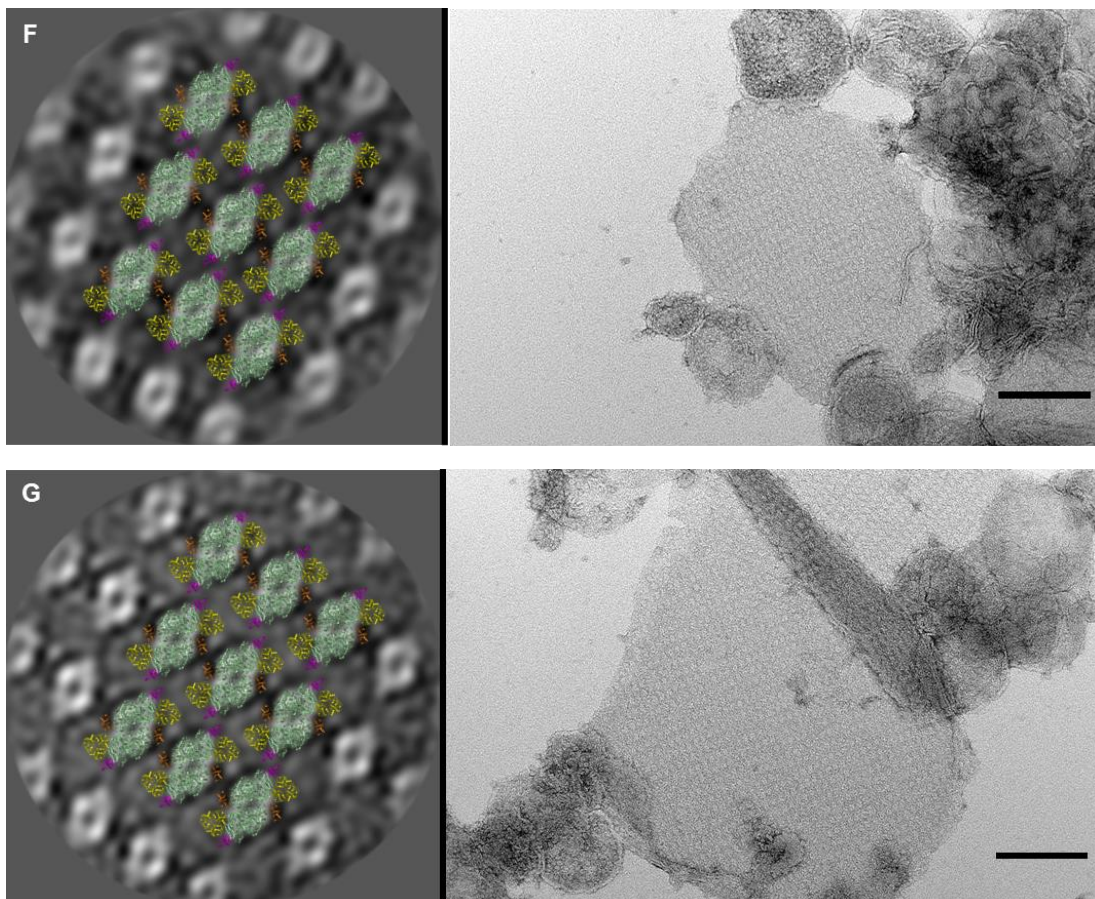


Obr. 17. Výsledek obrazové analýzy snímku granální membrány kontrolního vzorku ječmene setého. Výsledek obrazové analýzy doplněný o strukturní model PSII (vlevo) získaný ze snímku granálních membrán (vpravo). Vysvětlivky ke strukturnímu modelu PSII: jaderný komplex je znázorněn zeleně, S- trimer LHCII žlutě, M trimer modře, CP26 růžově a CP24 oranžově. Celkový počet projekcí PSII podílející se na výsledném obrázku: 246. Měřítka pro snímky z elektronového mikroskopu je 200 nm.

Ze snímků kontrolních vzorků granálních membrán mutantu ječmene *viridis zb63* byla také provedena obrazová analýza. Vytvoření strukturního modelu PSII, potvrdilo výskyt superkomplexů PSII ve formě C_2S_2 (viz obr. 18). Porovnáním výsledků obrazové analýzy snímků kontrolních vzorků granálních membrán mutantu ječmene *viridis zb63* doplněné o strukturní model PSII bylo zjištěno, že ve všech granálních membránách je typ krystalického uspořádání superkomplexů C_2S_2 stejný (viz obr. 20A).

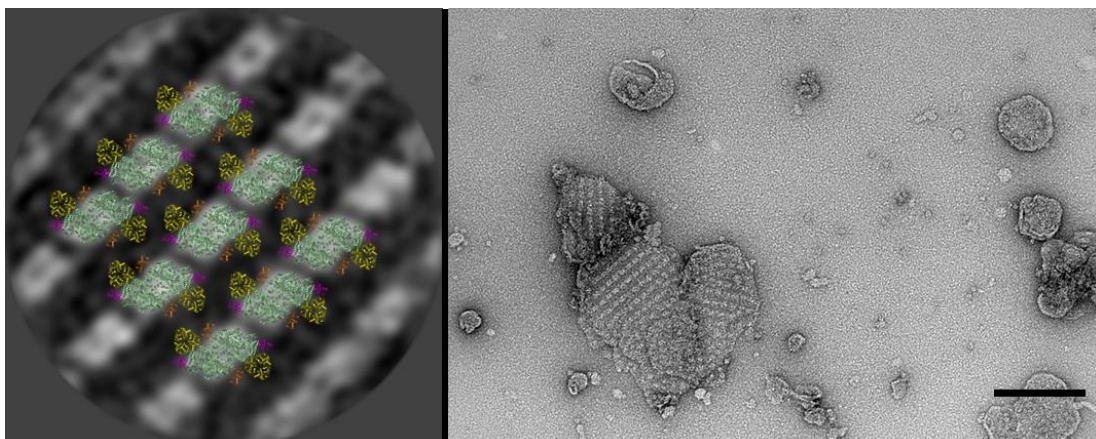




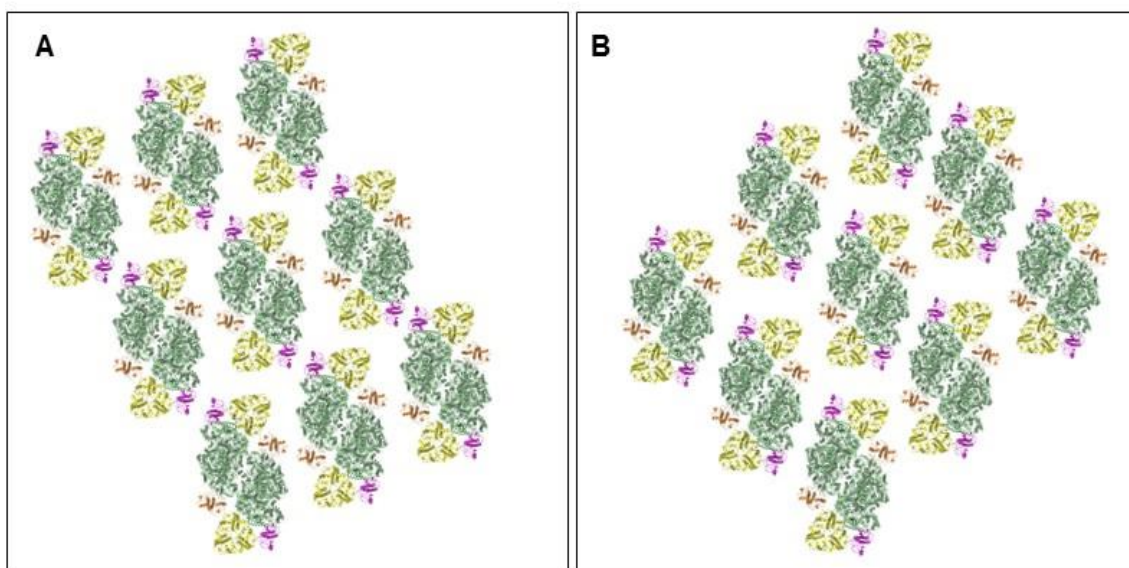


Obr. 18 Výsledek obrazové analýzy snímků granálních membrán kontrolního vzorku mutanta ječmene *viridis zb63*. Výsledek obrazové analýzy doplněný o strukturní model PSII (vlevo) získaný ze snímku granálních membrán (vpravo). Vysvětlivky ke strukturnímu modelu PSII: jaderný komplex spolu s CP29 je znázorněn zeleně, S- trimer LHCII žlutě, CP26 růžově a CP24 oranžově. Celkový počet projekcí PSII podílejících se na výsledném obrázku: A) 113, B) 312, C) 153, D) 413, E) 167, F) 161, G) 259. Měřítka pro snímky z elektronového mikroskopu je 200 nm.

Dopad chemického odstranění OEC na krystalické uspořádání PSII v granálních membránách byl zkoumán pomocí obrazové analýzy jednoho snímku granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63*. Vytvořený strukturní model PSII vzniklý ze snímku membrány ukázal, že vlivem odstranění OEC z membrán je krystalická oblast i nadále tvořena C_2S_2 superkomplexy, ale krystalické uspořádání superkomplexů je odlišné oproti krystalickému uspořádání PSII superkomplexů ve snímcích kontrolních granálních membrán (viz obr. 19 a 20).



Obr. 19 Výsledek obrazové analýzy ze snímků vpravo zobrazující krystalické uspořádání PSII ve vzorcích granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* s chemicky odstraněným OEC. Výsledek obrazové analýzy doplněný o strukturní model PSII (vlevo) získaný ze snímku granálních membrán (vpravo). Vysvětlivky ke strukturnímu modelu PSII: jaderný komplex spolu s CP29 je znázorněn zeleně, S- trimer LHCII žlutě, CP26 růžově a CP24 oranžově. Celkový počet projekcí PSII podílejících se na výsledném obrázku: 71. Měřítko pro snímky z elektronového mikroskopu je 200 nm.



Obr. 20 Vytvořený strukturní model PSII v granálních membránách vykazující krystalické uspořádání PSII A) kontrolního vzorku mutanta ječmene *viridis zb63*, B) mutanta ječmene *viridis zb63* s chemicky odstraněným OEC. Jaderný komplex PSII spolu s CP29 je znázorněn zeleně, S- trimer LHCII žlutě, CP26 růžově a CP24 oranžově.

10 Diskuze

Komplex vyvíjející kyslík kromě své základní funkce, kterou je oxidace vody za vzniku molekulárního kyslíku, přispívá ke zvyšování stability superkomplexu PSII. Odstranění podjednotek PsbP a PsbQ z OEC vede ke změnám polohy periférních anténních komplexů v superkomplexu PSII. Odstranění proteinů PsbO vede k dalším změnám v polohách periférních anténních komplexů a navíc dochází k destabilizaci dimerní struktury PSII (Boekema et al., 2000). V diplomové práci byl hodnocen vliv strukturní integrity OEC na stabilitu, formování a organizaci superkomplexů PSII v izolovaných tylakoidních membránách. Pro studium byl vybrán ječmen setý, který sloužil jako kontrola a mutant ječmene *viridis zb63*, který téměř úplně postrádá PSI, ale aktivita PSII je zachována. Organizace PSII v membránách mutanta je krystalická, proto se jeví jako vhodný materiál pro posouzení vlivu OEC na organizaci PSII, jelikož jakékoliv změny v organizaci PSII by měly být dobře pozorovatelné.

Dopad odstranění OEC na strukturu superkomplexu PSII byl hodnocen pomocí metody elektroforetické seprace CN-PAGE. Na snímcích gelu z elektroforetické separace pigment-proteinových komplexů ječmene setého, ve kterých byl chemicky odstraněn OEC, byl pozorován rozpad superkomplexů PSII a nárůst denzity pásů jader PSII. Výsledky separace pigment-proteinových komplexů mutanta ječmene *viridis zb63* prokázaly destabilizaci superkomplexů PSII a nárůst denzity pásů jader PSII po chemickém odstranění podjednotek OEC. V tylakoidních membránách mutanta ječmene *viridis zb63* se oproti tylakoidním membránám ječmene setého vyskytovalo méně forem superkomplexů, což potvrdilo dřívější výsledky studie, která ukázala, že hlavní forma superkomplexu PSII v tylakoidních membránách mutanta ječmene je C_2S_2 (Morosinotto et al., 2006).

Ze snímků z elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že ve většině snímků kontrolních vzorků granálních membrán ječmene setého, u kterých nebylo provedeno chemické odstranění OEC, vykazovaly superkomplexy PSII náhodné uspořádání. Krystalické uspořádání PSII v granálních membránách bylo pozorováno na pěti snímcích z 60 analyzovaných snímků granálních membrán ječmene setého.

Na snímcích granálních membrán ječmene setého, ve kterých byl chemicky odstraněn OEC, bylo pozorováno převážně náhodné uspořádání PSII. Pouze na jednom z analyzovaných snímků granálních membrán bylo uspořádání PSII krystalické.

U kontrolního vzorku granálních membrán matanta ječmene *viridis zb63* bylo na 91 % snímcích z elektronového mikroskopu pozorováno krystalické uspořádání PSII. Naproti tomu ve snímcích granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63*, u kterého bylo provedeno chemické odstranění OEC, bylo krystalické uspořádání PSII v membránách pozorováno méně často (32 % snímků) a převažovala náhodná organizace PSII.

Aby byl shodnocen dopad odstranění OEC na strukturu PSII superkomplexů a jejich interakce mezi sebou, byla ze snímků granálních membrán, které vykazovaly krystalické uspořádání PSII, provedena jednočásticová obrazová analýza. Vytvořením strukturního modelu PSII superkomplexu ve snímcích kontrolního vzorku granálních membrán ječmene setého bylo zjištěno, že v membránách se vyskytuje $C_2S_2M_2$ forma superkomplexu. Kvůli nedostatku snímků s krystalickým uspořádáním PSII superkomplexu v granálních membránách, u nichž bylo provedeno chemické odstranění OEC, nebylo možné provést obrazovou jednočásticovou analýzu a shodnotit případné strukturní změny PSII superkomplexů v granálních membránách ječmene setého

Jednočásticová obrazová analýza snímků granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* ukázala, že v membránách mutanta ječmene *viridis zb63* se vyskytuje pouze C_2S_2 forma superkomplexu, jakožto nejmenší fyziologická forma superkomplexu (Morosinotto et al., 2006). Po vytvoření strukturního modelu PSII byly vizuálně shodnoceny interakce mezi jednotlivými PSII a zdá se, že kolem S-trimerů se náchází volné prostory, které jsou však příliš malé na to, aby se zde vázaly např. monomerní anténní proteiny. Prostory by pravděpodobně mohly být zaplněny lipidy. Pro potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy byl vypočítán poměr chl *a/b* tylakoidních membrán mutanta ječmene *viridis zb63*. Vzhledem k tomu, že chlorofyl *b* se váží pouze k světlosběrným komplexům a chlorofyl *a* k oběma reakčním centrům a světlosběrným komplexům, vyšší hodnoty poměru chlorofylu *a/b* mohou indikovat redukované počty světlosběrných antén (Stecanella et al., 2015). V tylakoidních membránách mutantu ječmene *viridis zb63* byl poměr chl *a/b* 7,76. Porovnáním s kontrolním vzorkem tylakoidních membrán ječmene setého, jejichž poměr chl *a/b* byl 1,65, lze usoudit, že mutant ječmene *viridis zb63* má redukovaný počet světlosběrných antén a tudíž jsou volná místa pravděpodobně zaplněna lipidy.

Jednočásticovou obrazovou analýzou snímku granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* s chemicky odstraněným OEC, na kterém PSII superkomplexy vykazovaly krystalické uspořádání, byla vytvořena 2D projekční mapa. Vytvořením

strukturního modelu PSII bylo zjištěno, že krystalické uspořádání PSII v membránách je oproti kontrolnímu vzorku granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* jiné. Pozoruhodné je, že ačkoliv byl v tylakoidních membránách mutanta ječmene chemicky odstraněn OEC, i přes to byla na asi 1/3 snímků pozorována krystalická organizace PSII. Je možné, že pozorované jiné uspořádání PSII do semikrystrystalických domén v granálních membránách mutanta ječmene *viridis zb63*, ve kterých byl chemicky odstraněn OEC, je jakýmsi předstupněm před rozpadem krystalické struktury superkomplexu PSII nebo že jiné upořádání PSII superkomplexu je výhodné kvůli jiným prostorovým interakcím PSII superkomplexů mezi sebou. Pro průkaznější výsledky obrazové analýzy by bylo vhodné analyzovat více snímků, které se však nepodařilo získat.

Výsledky jednočásticové strukturní analýzy snímků kontrolních granálních membrán mutanta ječmene *viridis zb63* ukázaly, že struktura a uspořádání PSII v granálních membránách je stejná jako v práci autorů Morosinotto et al. (2006). Ve studii autorů van Bezouwen et al. (2017) bylo pozorováno, že po izolaci digitoninem v rostlinách huseníčku rolního došlo k odpojení podjednotek PsbP, PsbQ a PsbR. Bylo zjištěno, že tyto externí podjednotky jsou slaběji vázány oproti jiným druhům rostlin. I přes odpojení podjednotek OEC nedošlo k destabilizaci $C_2S_2M_2$ superkomplexu (van Bezouwen et al., 2017) a byla pozorována stejná struktura superkomplexu $C_2S_2M_2$ jako struktura $C_2S_2M_2$ superkomplexu hrachu setého (*Pisum sativum*), ve kterém byly podjednotky OEC neporušené (Su et al., 2017). V kontrastu s předchozími informacemi je výsledek této práce. Bylo pozorováno, že vlivem chemického odstranění podjednotek OEC dochází k rozpadu superkomplexu PSII a ke změně krystalického uspořádání C_2S_2 superkomplexů v granální membráně mutanta ječmene *viridis zb63*. Je možné, že Tris pufr kromě odpojení jednotek z OEC ovlivňuje strukturu proteinů i dalším způsobem.

V době vypracování experimentální práce byl na pracovišti vedoucího práce vytvořen mutant huseníčku, který ve své struktuře PSII neobsahuje světloběrné proteiny Lhcb3 a Lhcb6 a organizace superkomplexů PSII v granálních membránách je převážně krystalická (nepublikováno), podobně jako je tomu v granálních membránách mutantu ječmene *viridis zb63*. Oproti mutantu ječmene *viridis zb63* má však nově vytvořený mutant huseníčku aktivní PSI. Jeví se tedy jako vhodnější materiál pro další studie vlivu indukovaných změn na organizaci PSII v granálních membránách.

11 Závěr

Studie ukazují, že OEC kromě své hlavní funkce vytvářet kyslík, přispívá ke zvyšování stability PSII. Cílem této práce bylo zpracovat přehled problematiky o struktuře PSII a jeho organizaci v tylakoidní membráně, vlivu OEC na funkci a strukturu PSII v tylakoidní membráně a zhodnotit vliv strukturní integrity OEC na formování a stabilitu 2D krystalických domén PSII v tylakoidních membránách mutanta ječmene *viridis zb63*.

V kontrolních vzorcích granálních membrán ječmene setého bylo na většině snímků z elektronového mikroskopu pozorováno náhodné uspořádání PSII superkomplexů. Obrazová analýza snímků s krystalickým uspořádáním PSII v granálních membránách potvrdila $C_2S_2M_2$ formu superkomplexu. Ve snímcích granálních membrán s chemicky odstraněným OEC pak vykazovaly téměř všechny PSII náhodné uspořádání. Vzhledem k nedostatku snímků granálních membrán s chemicky odstraněným OEC, ve kterých by bylo pozorováno krystalické uspořádání PSII, nebylo možné provést obrazovou analýzu a zhodnotit tak, zda vlivem odstranění OEC dochází ke strukturním změnám PSII v granálních membránách ječmene setého. Pomocí elektroforetické separace metodou CN-PAGE se ukázalo, že vlivem chemického odstranění OEC došlo k rozpadu superkomplexů PSII v membránách.

Hlavní částí práce bylo zhodnotit vliv strukturní celistvosti OEC na formování a stabilitu 2D krystalických domén v granální membráně mutanta ječmene *viridis zb63*. Na 91 % snímcích kontrolních vzorků granálních membrán vykazoval PSII krystalické uspořádání. Obrazovou analýzou byl prokázán výskyt C_2S_2 formy superkomplexu PSII. Po chemickém odstranění OEC byl pozorován výrazný úbytek krystalických forem PSII membránách a z elektroforetické separace bylo zjištěno, že docházelo rovněž k rozpadu superkomplexů PSII. Obrazovou analýzou snímků granálních membrán s krystalickým uspořádáním PSII byl objeven jiný typ krystalického uspořádání PSII superkomplexů. Pro průkaznější výsledky obrazové analýzy by však bylo třeba zhodnotit větší počet snímků.

I přes to, že nebylo možné analyzovat více snímků granálních membrán s odstraněným OEC, je zřejmé, že strukturní celistvost OEC je důležitá pro zachování stability a formování PSII do semikrystalických domén v granálních membránách. Cíle práce zpracovat přehled problematiky a experimentálně zhodnotit vliv strukturní integrity OEC na stabilitu a formování PSII do 2D krystalických forem byly splněny.

Jak již bylo zmíněno v diskuzi, bylo by zajímavé zhodnotit vliv strukturní celistvosti OEC na stabilitu a formování PSII do semikrystalických domén v granálních membránách mutanta huseníčku, který oproti mutantu ječmene *viridis zb63* obsahuje aktivní PSI. Je pravděpodobné, že procesy mutanta huseníčku budou fyziologičtější.

Použitá literatura

Arvidsson P. O., Sundby C. (1999). A model for the topology of the chloroplast thylakoid membrane. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**, 687-694.

Armbruster U., Labs M., Pribil M., Viola S., Xu W., Scharfenberg M., Hertle A. P., Rojahn U., Jensen P. E., Rappaport F., Joliot P., Dörmann P., Wanner G., Leister D. (2013) *Arabidopsis* CURVATURE THYLAKOID1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature. *The Plant Cell* **25**, 2661-2678.

Balint I., Bhattacharya J., Perelman A., Schatz D., Moskovitz Y., Keren N., Schwarz R. (2006) Inactivation of the extrinsic subunit of photosystem II, PsbU, in *Synechococcus* PCC 7942 results in elevated resistance to oxidative stress. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **580**, 2117-2122.

Barber J. (2016). Photosystem II: The water splitting enzyme of photosynthesis and the origin of oxygen in our atmosphere. *Quarterly Reviews of Biophysics* **49**, E14.

van Bezouwen L., Caffarri S., Kale R. S., Kouřil R., Thunnissen A. M. W. H., Oostergetel G. T., Boekema E. J. (2017) Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex. *Nature Plants* **3**, 17080.

Boekema E. J., Hankamer B., Bald D., Kruij J., Nield J., Boonstra A. F., Barber J., Rogner M. (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 175-179.

Boekema E. J., van Roon H., Calkoen F., Bassi R., Dekker J. P. (1999) Multiple Types of Association of Photosystem II and Its Light-Harvesting Antenna in Partially Solubilized Photosystem II Membranes. *Biochemistry* **38**, 2233-2239.

Boekema E. J., van Breemen J. F. L., van Roon H., Dekker J. P. (2000) Conformational Changes in Photosystem II Supercomplexes upon Removal of Extrinsic Subunits. *Biochemistry* **39**, 12907-12915.

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

Bondarava N., Beyer P., Krieger-Liszkay A. (2005) Function of the 23 kDa extrinsic protein of Photosystem II as a manganese binding protein and its role in photoactivation. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1708**, 63-70.

Bricker T. M. (1992) Oxygen Evolution in the Absence of the 33-Kilodalton Manganese-Stabilizing Protein. *Biochemistry* **31**, 4623-4628.

Bricker T. M., Roose J.L., Fagerlund R.D., Frankel L.K., Eaton-Rye J.J. (2012) The extrinsic proteins of Photosystem II *Biochimica et Biophysica Acta* **1817**, 121-142.

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. *European Molecular Biology Organization Journal* **28**, 3052-3063.

Commet A., Boswell N., Yocum Ch. F., Popelka H. (2012) pH Optimum of the Photosystem II H₂O Oxidation Reaction: Effects of PsbO, the Manganese-Stabilizing Protein, Cl⁻ Retention, and Deprotonation of a Component Required for O₂ Evolution Activity. *Biochemistry* **51**, 3808-3818.

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-ray absorption spectroscopy study of isotropic and oriented photosystem-II particles. *Biochemistry* **34**, 5274-5287.

Daum B., Nicastro D., Austin J., McIntosh J. R., Kühlbrandt W. (2010) Arrangement of Photosystem II and ATP Synthase in Chloroplast Membranes of Spinach and Pea. *The Plant Cell* **22**, 1299-1312.

Daum B., Kühlbrandt W. (2011) Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2393–2402.

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

Duchoslav M., Fisher L. (2015) Parallel subfunctionalisation of PsbO protein isoforms in angiosperms revealed by phylogenetic analysis and mapping of sequence variability onto protein structure. *BioMed Central plant biology* **15**, 1-14.

Enami I., Kitamura M., Tomo T., Isokawa Y., Ohta H., Katoh S. (1994) Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PS II membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn?. *Biochimica et Biophysica Acta- Bionergetics* **1186**, 52-58.

Ghanotakis D. F., Topper J. N., Yocum C. F. (1984) Structural organization of the oxidizing side of photosystem II. Exogenous reductants reduce and destroy the Mn-complex in photosystems II membranes depleted of the 17 and 23 kDa polypeptides. *Biochimica Biophysica Acta* **767**, 524–531.

Goral T. K., Johnson M. P., Duffy C. D. P., Brain A. P. R., Ruban A. V. (2012) Light-harvesting antenna composition controls the macrostructure and dynamics of thylakoid membranes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **69**, 289–301.

Hideg E. (2004) Detection of free radicals and reactive oxygen species. In *Methods in Molecular Biology*, Biochemical and structural analyses of a higher plant photosystem II supercomplex of a photosystem I-less mutant of barley Vol. 274: Photosynthesis Research Protocol pp. 249-260, Humana Press Inc, Totowa, USA.

Ifuku K., Yamamoto Y., Ono T., Ishihara, Sato F. (2005) PsbP Protein, But Not PsbQ Protein, Is Essential for the Regulation and Stabilization of Photosystem II in Higher Plants. *Plant Physiology* **139**, 1175-1184.

Ifuku K. (2015) Localization and functional characterization of the extrinsic subunits of photosystem II: an update. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **79**, 1223-1231.

Kereïche S., Kiss A. Z., Kouřil R., Boekema E. J., Horton P. (2010) The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **584**, 759-764.

Kirchhoff H., Tremmel I., Haase W., Kubitscheck U. (2004) Supramolecular Photosystem II Organization in Grana Thylakoid Membranes: Evidence for a Structured Arrangement. *Biochemistry* **43**, 9204–9213.

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., Lenhert S., Büchel C., Chi L., Nield J. (2008) Probing the Organization of Photosystem II in Photosynthetic Membranes by Atomic Force Microscopy. *Biochemistry* **47**, 431-440.

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

Klimmek F., Sjödin A., Noutsos C., Leister D., Jansson S. (2006) Abundantly and Rarely Expressed *Lhc* Protein Genes Exhibit Distinct Regulation Patterns in Plants. *Plant Physiology* **140**, 793-804.

Kondo J., Noguchi T. (2018) PsbP-induced protein conformational changes around Cl⁻ ions in the water oxidizing center of photosystem II. *Photosynthetica* **56**, 178-184.

Kouřil R., Oostergetel G. T., Boekema E. J. (2011) Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta- Bioenergetics* **1807**, 368–374.

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

Kouřil R., Wientjes E., Bultema J. B., Croce R., Boekema E. J. (2013) High-light vs. lowlight: 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 Phytologist*, **210**, 808-814.

Kouřil R., Nosek L., Semchonok D., Boekema E. J., Ilík P. (2018) Organization of plant photosystem II and photosystem I supercomplexes. In: *Subcellular Biochemistry, Vol. 87 Membrane Protein Complexes: Structure and Function*. pp. 259-286, Springer, Singapore.

Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **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. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **273**, 4616-4630.

Mustárdy L. A., Jánossy A. G. S. (1979). Evidence of helical thylakoid arrangement by scanning-electron microscopy. *Plant Science Letters* **16**, 281-284.

- Mustárdy L. A., Garab G. (2003). Granum revisited. A three-dimensional model where things fall into place. *Trends in Plant Science* **8**, 117-122.
- Mustárdy L. A., Buttle K., Steinbach G., Garab G. (2008) The Three-Dimensional Network of the Thylakoid Membranes in Plants: Quasihelical Model of the Granum-Stroma Assembly. *The Plant Cell* **20**, 2552-2557.
- Nagao R., Moriguchi A., Tomo T., Niikura A., Nakajima S., Suzuki T., Okumura A., Iwai M., Shen J. R., Ikeuchi M., Enami I. (2010) Binding and functional properties of five extrinsic proteins in oxygen-evolving photosystem II from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 29191-29199.
- Najafpour M. M. (2011) Calcium-manganese oxides as structural and functional models for active site in oxygen evolving complex in photosystem II: Lessons from simple models. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**, 111-117.
- Nielsen V. S., Scheller H. S., Møler B. L. (1996) The photosystem I mutant *viridis-zb63* of barley (*Hordeum vulgare*) contains low amounts of active but unstable photosystem I. *Physiologia Plantarum* **98**, 637-644.
- Nosek L., Semchonok D., Boekema E. J., Ilík P., Kouřil R. (2017) Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *The Plant Journal* **89**, 104-111.
- Orlova E. V. (2000) Structural analysis of non-crystalline macromolecules: the ribosome. *Acta Crystallographica* **56**, 1253-1258.
- Pagliano C., Saracco G., Barber J. (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynthesis Research* **116**, 167-188.
- Paolillo D. J. (1970) The three-dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts. *Journal of Cell Science* **6**, 243-255.

- Pribil M., Labs M., Leister D. (2014) Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1955-1972.
- Roose J. L., Wegener K. M., Pakrasi H. M. (2007) The extrinsic proteins of Photosystem II. *Photosynthesis Research* **92**, 362–387.
- Simpson D. J. (1978) Freeze-fracture studies on barely plastid membranes II. Wild type chloroplast. *Carlsberg Research Communications*. **43**, 365-389
- Simpson D. J. (1983) Freeze-fracture studies on barley plastid membranes. VI. Location of the P700-chlorophyll a-protein 1. *European Journal of Cell Biology* **31**, 305-314.
- Shen J. R., Henmi T., Kamiya N. (2008). Structure and function of photosystem II. *Photosynthetic Protein Complexes: A Structural Approach*, 83-106.
- Shen J. R. (2015) The Structure of Photosystem II and the Mechanism of Water Oxidation in Photosynthesis. *Annual Review of Plant Bioogy* **66**, 23-48.
- Shi L.-X., Shröder W. P. (2004) The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica et Biophysica* **1608**, 75-96.
- Shimoni E., Rav-Hon O., Ohad I., Brumfeld V., Reich Z. (2005) Three-Dimensional Organization of Higher-Plant Chloroplast Thylakoid Membranes Revealed by Electron Tomography. *The Plant Cel* **17**, 2580-2586.
- Shutova T., Nikitina J., Deikus G., Andersson B., Klimov V., Samuelsson G. (2005) Structural Dynamics of the Manganese-Stabilizing Proteins Effect of pH, Calcium, and Manganese. *Biochemistry* **44**, 15182-15192.
- Sorzano C. O., Marabini R., Velázquez-Muriel J., Bilbao-Castro J. R., Scheres S. H., Carazo J. M., Pascual-Montano A. (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **148**, 194-204.

Staehelein L. A. (1986) Chloroplast Structure and Supramolecular Organization of Photosynthetic Membranes. In: *Photosynthesis III, vol. 19 Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)* (Staehelein L. A., Arntzen C. J., ed.), pp. 1-84, Springer, Berlin, Heidelberg.

Staehelein L. A., van der Staay G. W. M. (1996). Structure, composition, functional organisation and dynamic properties of thylakoid membranes In: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, vol. 4 Advances in Photosynthesis and Respiration* (Ort D. R., Yocum C. F., Heichel I. F., ed.) pp. 11-30, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Su X., Ma J., Wei X., Cao P., Zhu D., Chang W., Liu Z., Zhang X., Li M. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* **357**, 815-820.

Tang G., Peng L., Baldwin P. R., Mann D. S., Jiang W., Rees I., Ludtke S. J. (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **157**, 38-46.

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.

Umena Y., Kawakami K., Shen J. R., Kamiya N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9Å. *Nature* **473**, 55-60.

Yi X., Hargett S. R., Frankel L. K., Bricker T. M. (2006) The PsbQ protein is required in Arabidopsis for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy under low light conditions. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 26260-7.

Yamamoto Y., Doi M., Tamura N., Nishimura M. (1981) Release of polypeptides from highly active O₂ - evolving photosystem - 2 preparation by this treatment. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **133**, 265-268.

Yamamoto Y., Ishikawa Y., Nakatani E., Yamada M., Zhang H., Wydrzynski T. (1998) Role of an extrinsic 33 kilodalton protein of photosystem II in the turnover of the reaction center-binding protein D1 during photoinhibition. *Biochemistry* **37**, 1565-1574.