

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

**Srovnávací studie elektronové mikroskopie a
mikroskopie skenovací sondou a jejich využití ve
fotosyntetickém výzkumu**

Martina Matěnová

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.

České Budějovice 2009

Matěnová M., 2009, Srovnávací studie elektronové mikroskopie a mikroskopie skenovací sondou a jejich využití ve fotosyntetickém výzkumu [Comparative study of electron microscopy and scanning probe microscopy in phototosynthetic research. Bc Thesis, in Czech] - p.27, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotace:

The aim of this study is to compare the ability of transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and atomic force microscopy to visualize individual protein complexes. The principle of electron microscopy and atomic force microscopy is explained. For comparison of these methods well characterized photosynthetic complexes LH1, LH2, PSI and PSII were selected.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum:.....

Podpis:.....

Děkuji doc. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, pomoc a rady, Ing. Zdeno Gardianovi za čas strávený se mnou v laboratoři a za poskytnuté materiály, Ing. Janě Nebesářové, CSc. za rady a připomínky k práci, rodičům za to, že mi umožnili studium na vysoké škole a kamarádům za podporu.

Obsah

1. Úvod	5
1.1 Historie.....	5
1.2 Transmisní elektronový mikroskop	6
1.3 Skenovací elektronový mikroskop	7
1.4 Mikroskop atomárních sil	8
1.4.1 Konstrukce AFM	8
2. Metody	11
2.1 Metody využívající TEM.....	11
2.1.1 Jednočásticová analýza (Single particle analysis).....	11
2.1.2 Elektronová krystalografie	12
2.2 Mikroskopie atomárních sil (Atomic force microscopy, AFM)	13
3. Pozorování proteinů účastnících se fotosyntetických reakcí	14
3.1 Světlosběrný komplex LH1 purpurových bakterií	14
3.1.1 Elektronová krystalografie	14
3.1.2 Mikroskopie atomárních sil.....	15
3.2 Světlosběrný komplex LH2 purpurových bakterií	16
3.2.1 Elektronová krystalografie	16
3.2.2 Elektronová mikroskopie a jednočásticová analýza.....	17
3.2.3 Mikroskopie atomárních sil.....	17
3.3 Fotosystém II sinic a vyšších rostlin a jeho světlosběrný systém	18
3.3.1 Elektronová krystalografie	18
3.3.2 Elektronová mikroskopie a jednočásticová analýza.....	19
3.3.3 Mikroskopie atomárních sil.....	20
3.4 Fotosystém I sinic a vyšších rostlin a jeho světlosběrný systém	20
3.4.1 Elektronová krystalografie	20
3.4.2 Elektronová mikroskopie a jednočásticová analýza.....	21
3.4.3 Mikroskopie atomárních sil.....	22
4. Závěr	23
5. Experimentální část	24
6. Literatura.....	26

1. Úvod

1.1 Historie

Příběh mikroskopie začíná v 16. století, kdy v Holandsku Zacharias Jansen sestavil první mikroskop. Jeden z jednoduchých mikroskopů sestavil v roce 1676 i Antony van Leeuwenhoek, jehož práce patřily k vrcholům mikroskopického pozorování 17. století. Světelný mikroskop byl dále zdokonalován, takže Leeuwenhoekovi pokračovatelé mohli pozorovat a zkoumat složení a činnost živých organismů na úrovni jednotlivých buněk. Světelný mikroskop má zvětšení 50x – 1000x, teoretické možné zvětšení je však téměř 2000x. Při tomto zvětšení se už ale projevují ohybové jevy světelných vln. Rozlišení světelného mikroskopu je omezeno vlnovou délkou světla, vliv mají také vady optické soustavy.

Kvůli překonání limitů daných vlnovou délkou fotonů byly sestrojeny další typy mikroskopů. Elektronový mikroskop využívá místo fotonů urychlených elektronů, jejichž vlnová délka je dána de Broglieho vztahem:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

kde λ je vlnová délka, h Planckova konstanta, m hmotnost částice a v její rychlost. Při vyšších urychlovacích napětích musíme za m dosadit relativistickou hmotnost elektronu. Pro urychlovací napětí 1 000V je vlnová délka 0.040nm, pro 100 000V je to 0,00370nm.

Rozlišení je ale i u elektronového mikroskopu ovlivněno vadami elektromagnetických čoček.

První transmisní elektronový mikroskop (TEM) byl vyroben roku 1932 a dosahoval rozlišení 10 nm. Jeho konstrukce je spojena se jmény Ernsta Rusky a Maxe Knolla. Prvnímu z nich byla roku 1986 za konstrukci TEM udělena Nobelova cena.

První komerční mikroskop byl vyroben pouze o čtyři roky později. Vývoj však byl zpomalen druhou světovou válkou. Další vývoj se týkal spíše zpracování vzorků a porozumění interakcím mezi elektrony a vzorkem. Dnes dosahuje TEM zvětšení až několika milionů [49].

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) vznikl až mnohem později. Ačkoli už roku 1938 Manfred von Ardenne popsal teoreticky princip skenování a interakce mezi svazkem paprsků a vzorkem, nebyl znám způsob, jakým detekovat sekundární elektrony. Zlomem byl vynález fotonásobiče, o který se zasloužil americký vědec Zworykin. Ten v roce 1942 poprvé použil fotonásobič k detekci sekundárních elektronů při rastrování. Po druhé světové válce se konstrukcí skenovacího elektronového mikroskopu zabývala anglická skupina vědců vedená C. Oatleyem. SEM byl v odborné literatuře popsán v padesátých letech. Evehart a Thornley zlepšili detektor sekundárních elektronů a zvýšili tak poměr získaného signálu k šumu (signal-to-noise ratio). Tento detektor je dnes nejpoužívanější. Dalším podstatným vylepšením přístroje bylo zavedení nepřímě žhavené katody (Broers) a stabilní autoemisní trysky (Crewe). Komerčně byl první přístroj vyroben roku 1965.

Skenovací mikroskopy mají horší rozlišovací schopnost než TEM, ale mají větší hloubku ostrosti a dobře zobrazují členitost povrchu. Snímky povrchů získané pomocí SEM jsou naprosto odlišné od snímků z TEM.

Na základě prací na poli elektronové mikroskopie sestrojili roku 1986 Gerd Binning a Heinrich Rohrer ve švýcarském výzkumném pracovišti IBM první skenovací

tunelovací mikroskop (STM). Oba dostali Nobelovu cenu společně s E. Ruskou. Zobrazování zde probíhá pomocí sondy přebíhající postupně po celém povrchu vzorku. Detekuje se tunelovací proud, který je větší, když je sonda blíže k povrchu (více u mikroskopu atomárních sil). Tento přístroj dosahuje atomového rozlišení (1nm). Od roku 1986 vzniklo několik dalších metod založených na STM, jednou z nich je AFM (Atomic Force Microscopy, mikroskopie atomárních sil), další například SPM (scanning probe microscopy) nebo CFM (chemical force microscopy) na měření síly vazebných interakcí mezi molekulami.

1.2 Transmisní elektronový mikroskop

V transmisním elektronovém mikroskopu tvoří obraz elektrony, které projdou vzorkem, jde tedy o přímé zobrazování.

Základními prvky TEM je zdroj emitovaných elektronů (tj. elektronová tryska), elektromagnetické čočky, vychylovací cívky a fluorescenční stínítko, na kterém dopadající elektrony tvoří obraz. Dalšími neméně důležitými prvky jsou zdroje vysokého napětí a vakuový systém.

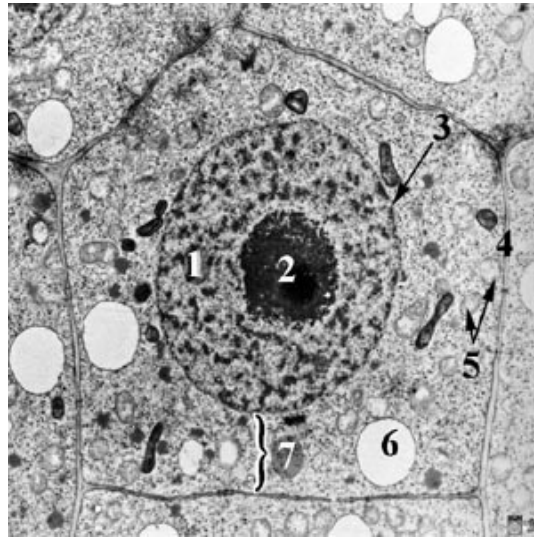
Elektronových trysek je několik typů. Nejčastěji používané způsoby emise jsou termoemise a autoemise. Termoemisní tryska (katoda) je obvykle wolframové vlákno ohnuté do tvaru písmene V. Při vysoké teplotě hrotu mají některé elektrony dostatečnou energii na to, aby opustily kov (doporučuje se ale žhavit vlákno jen na minimální potřebnou teplotu, protože jeho životnost s vyššími teplotami prudce klesá). U autoemisní trysky jsou elektrony vytrhovány z povrchu studeného (wolframového) hrotu elektrickým polem s vysokou intenzitou. Tato emise je daleko silnější a osvětlení preparátu je asi 1000x větší. Nevýhodou je potřeba vysokého vakua. Součástí trysky je také anoda s otvorem, do kterého jsou elektrony přitahovány.

Emitované elektrony procházejí osvětlovací a zobrazovací soustavou. Osvětlovací soustava se skládá ze dvou elektromagnetických kondenzorových čoček, z nichž jedna vytváří obraz křížiče (místo, kde se protínají dráhy elektronů, je považováno za virtuální zdroj elektronů) a druhá ho zaostřuje do roviny preparátu. Zobrazovací soustava je tvořena držákem preparátu, objektivovou čočkou (která zajišťuje zvětšení a hloubku ostrosti mikroskopu), objektivovou clonou (zvětšující kontrast výsledného obrazu), projektivovými čočkami a stínítkem.

Kontrast vzniká díky pružným srážkám elektronů s částicemi vzorku. Elektrony se odchýlí od původního směru (někdy i o 180°), ale neztrácí energii. Dopadnutím či nedopadnutím elektronu na stínítko vzniká amplitudový kontrast, rozdílem mezi dráhami odchýlených elektronů vzniká kontrast fázový, díky kterému pozorujeme různé stupně šedi.

Elektrony, které se rozptylují nepružně, tzn. ztrácí část své energie a tím pádem se mění i jejich vlnová délka, mají na ostrost obrazu nepříznivý vliv. Čím je vzorek tlustší a urychlovací napětí nižší, tím je tento vliv ztelnější.

Elektrony dopadají na stínítko pokryté vrstvou ZnS, který po dopadu emituje světlo o vlnové délce 450-550 nm (rozpětí je způsobené nečistotami). Obraz se zaznamenává na negativy, které jsou uloženy v komoře pod stínítkem. Další možnost záznamu obrazu je CCD kamera.



Obr. 1.1: Snímek rostlinné buňky pořízený V TEM, [65]

1.3 Skenovací elektronový mikroskop

SEM zobrazuje povrch vzorku pomocí vysokoenergetického svazku elektronů skenujícího vzorek. Elektrony interagují s atomy vzorku. Tak se vytváří signál



Obr. 1.2: Snímek epidermálních rostlinných buněk získaný v kryo-SEM [63]

obsahující informace o topografii, prvkovém složení a dalších vlastnostech vzorku. Protože se ke tvorbě obrazu využívají sekundární elektrony, označuje se zobrazování pomocí SEM za nepřímé.

Sekundární elektrony vznikají vyražením elektronů z atomů vzorku elektrony primárními. Mají energii do 50 eV, primární a zpětně odražené mají energii několikanásobně vyšší.

Kromě sekundárních a odražených elektronů vznikají při interakci svazku se vzorkem ještě další typy signálu, například RTG záření, Augerovy elektrony a katodové záření.

Zvětšení je dáno poměrem skenované plochy a velikosti obrazovky, kam je obraz promítán. Zvětšení není realizováno žádnými elektromagnetickými čočkami (jsou zde pouze vychylovací cívkami, které vychylují paprsek při rastrování ve dvou navzájem kolmých směrech), ale je ovlivněno velikostí paprsku.

Ten musí být co nejužší, aby se dala skenovat co nejmenší plocha. (Pomocí autoemisní trysky se tak díky hodně fokusovanému paprsku dá docílit rozlišení srovnatelného s rozlišením TEM.) Dále zvětšení závisí na urychlovacím napětí (při pozorování biologických vzorků se používá urychlovací napětí do 25kV), typu detekovaného signálu, citlivosti detektoru a rychlosti přeběhu.

Před detektor sekundárních elektronů se umísťuje mřížka s předpětím. Protože mají tyto elektrony nízkou energii, z vyvýšených míst jich na detektor doletí víc a tato místa se pak na obrazovce jeví jako světlejší a prohloubeniny jako tmavší.

Zpětně odražené elektrony nesou informaci o prvkovém složení, protože jejich množství závisí na atomovém čísle. Jako světlejší místa se pak jeví místa, kde jsou těžší prvky, naopak oblasti se zastoupením lehkých prvků se jeví tmavší.

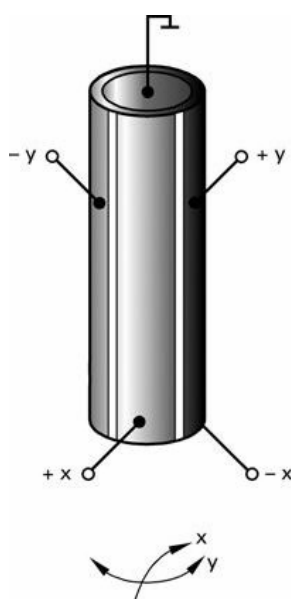
1.4 Mikroskop atomárních sil

AFM je jedna z metod SPM (scanning probe microscopy). Dnes se používá celá řada variant založených na různých fyzikálních principech, kterým se pak přizpůsobuje sonda.

Mezi tyto metody patří kromě AFM také STM (skenovací tunelovací mikroskopie). Tato metoda je založena na tunelování elektronů mezi dvěma vodivými tělesy (sondou a vzorkem). Tunelový jev je schopnost elektronů překonat energetickou bariéru. Protože však elektrony nemají na překonání takovéto bariéry dostatek energie, je pravděpodobnost „protunelování se“ velmi malá. Kromě toho je pravděpodobnost tunelování v obou směrech stejná, takže výsledný tunelovací proud je nulový. Pokud mezi sondu a vzorek vložíme elektrické napětí, budou elektrony tunelovat jen jedním směrem a tak můžeme měřit tunelovací proud. Protože je při menších vzdálenostech mezi sondou a vzorkem pravděpodobnost tunelování větší, můžeme pomocí tunelovacího proudu měřit tuto vzdálenost.

AFM je obdobou STM. Měřenou veličinou zde není proud, ale přitažlivé a odpudivé atomární síly. Díky tomu nemusí být vzorek vodivý.

1.4.1 Konstrukce AFM



Obr. 1.3: Skener [64]

Skener

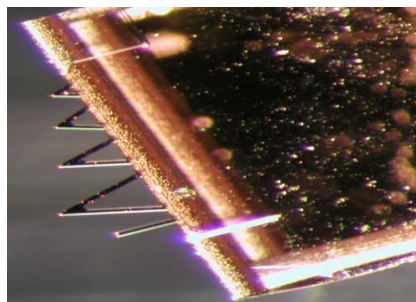
Skener zajišťuje velmi přesnou polohu hrotu nad vzorkem a také jeho pohyb po povrchu vzorku. Z tohoto důvodu se používají piezoelektrické válcové skenery, které jsou schopné realizovat pohyb hrotu s přesností na desetiny nanometru a jsou nenáročné na konstrukci.

Válcový skener je z jednoho kusu piezoelektrického materiálu a je na něm přiloženo pět elektrod, čtyři z nich tvoří vnější část válce, pátá je uvnitř. Připojením napětí na některou ze čtyř vnějších elektrod se realizuje pohyb ve směru XY, při připojení napětí na vnitřní elektrodu se piezoelektrický krystal zkracuje nebo prodlužuje, tak je zajištěn pohyb v ose Z (obr. 1.3).

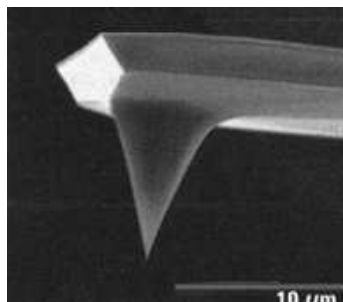
Raménko s hrotem

Na skeneru je připevněn čip, na kterém je několik ramének s hrotem (viz obr. 1.4). Ta jsou vyrobena nejčastěji z křemíku nebo nitridu křemíku mikrolitografickými technikami. Na ostrosti hrotu

(obr.1.5) závisí rozlišení AFM. Těchto hrotů se používá několik typů, které se liší tvarem a ostroť. Jednotlivá raménka lišící se délkou mají různou tuhost a tím pádem i rezonanční frekvenci, což je důležitý parametr při pozorování v nekontaktním módu. Tuhost ramének se pohybuje okolo 0,1 N/m, nejkratší raménko má samozřejmě nejvyšší tuhost.



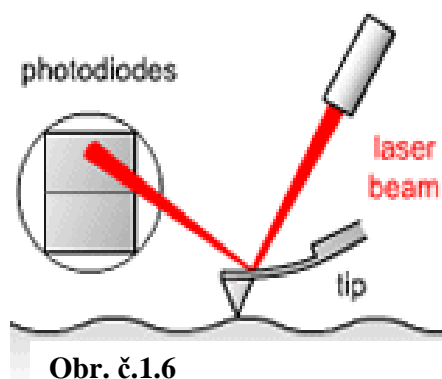
Obr. 1.4



Obr. 1.5 [62]

Dioda detekující laser

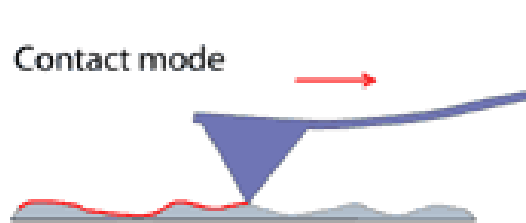
Na raménko dopadá laserový paprsek, který se odráží a dopadá na diodu skládající se ze čtyř částí. V závislosti na ohnutí raménka dopadá paprsek pod různým úhlem a podle různého osvětlení v každé ze čtyř částí diody je spočítána poloha hrotu (obr. 1.6)



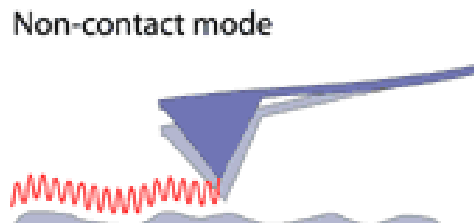
Obr. č.1.6

K regulaci síly působící na vzorek se používá zpětnovazebná smyčka. Ta je realizována válcovým skenerem, který kontroluje výšku celého vzorku. Optické vahadlo měří lokální výšku vzorku. Zpětná vazba se opakuje a tak udržuje konstantní ohnutí nosníku přizpůsobováním napětím uplatňovaným na skener. Čím rychleji může zpětnovazebná smyčka upravovat ohnutí nosníku, tím rychleji může AFM získat obraz, proto je dobře sestrojená smyčka základní pro výkon mikroskopu.

AFM pracuje ve dvou standardních módech – kontaktním (obr. 1.7) a nekontaktním (obr. 1.8). Kontaktní mód (CM AFM-contact mode) je jednodušší a také původní. Hrot je přímo v mechanickém kontaktu se vzorkem. Protože působí odpudivé síly, je do vzorku v podstatě vtačován. V případě tvrdých vzorků je možné tímto režimem dosáhnout atomárního rozlišení. Při prohlížení měkkých (biologických) vzorků ale



Obr. 1.7



Obr. 1.8

dochází k jejich deformaci vlivem třecích sil. Deformace může být sice vratná, ale přesto dochází ke zkreslení výsledku.

Tak, jako kontaktní mód využívá odpudivé síly, bezkontaktní mód (NC AFM-non-contact mode) využívá síly přitažlivé. Hrot se nachází v určité vzdálenosti od vzorku a je ohýbán k jeho povrchu. Aby se snížil šum, používá se oscilační metoda. Raménko se rozkmitá (magneticky nebo akusticky) s frekvencí, která je o něco nižší než rezonační frekvence raménka. Měříme velikost amplitudy. Tento režim je sice náročnější na realizaci, ale umožňuje pozorovat i citlivé vzorky. Jeho nevýhodou je menší rozlišení (za určitých podmínek ale může dosáhnout stejného rozlišení jako CM AFM) a citlivost na interakce mezi hrotem a vzorkem.

Tento problém se dá obejít použitím pokleповého režimu (TM AFM- tapping mode), při kterém se hrot při průchodu dolní amplitudou dotkne vzorku. I v tomto režimu se měří amplituda kmitu raménka.

AFM umožňuje mimo zobrazování vzorků také měření jejich elastických vlastností a interakcí mezi hrotem a vzorkem, čehož se využívá v silové spektroskopii (force spectroscopy).

2. Metody

2.1 Metody využívající TEM

Interakce mezi elektrony a organickou hmotou vede k poškození vzorku rozbitím chemických vazeb a tvorbou volných radikálů, které způsobují další poškození. I tak je možné zobrazit proteiny, pokud použijeme nižší dávku elektronů. V tom případě mají ale snímky velmi nízký poměr signálu k šumu (signal to noise ratio). Podstatně lepší kvality můžeme dosáhnout, když použijeme metodu, která „průměruje“ jednotlivá zobrazení [16].

Průměrovací metody se dají rozdělit na krystalografické (založené na pozorování 2D krystalů malých proteinů, dosahují atomového rozlišení) a nekrystalografické, tzv. jednočásticová analýza (single particle analysis). Ta je založena na průměrování jednotlivých zobrazení, dosahuje rozlišení 10-25Å [59].

2.1.1 Jednočásticová analýza (Single particle analysis)

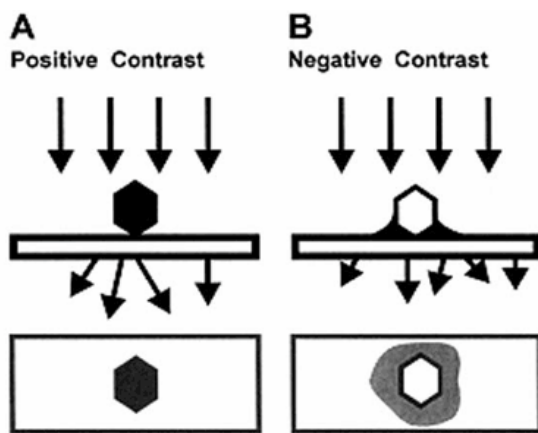
Jednočásticová analýza je způsob jak zobrazit strukturu (a dynamiku) velkých proteinů a jejich komplexů, které špatně vytvářejí krystaly a jsou velké pro RTG krystalografii. Vzorek je zobrazován po jednotlivých částicích, které se na vzorku nacházejí v mnoha „kopiích“. Z digitálních snímků se manuálně vyberou částice, které nás zajímají, počítačově se srovnají tak, aby měly stejnou orientaci a následně se „zprůměrují“. Výhodou této metody je, že zobrazované objekty nemusí být přesně uspořádány. Na druhou stranu tato metoda dosahuje rozlišení jen 10 Å. Příkladem programu na jednočásticovou analýzu je SPIDER a IMAGIC.

Tato metoda byla původně vyvinuta pro negativně kontrastované vzorky molekul, ale její úspěšnost je limitována artefakty způsobenými během přípravy vzorku, proto se používá také na snímky pořízené kryo-elektronovou mikroskopií [4].

Negativní kontrast

Tato metoda je určena pro malé částice jako jsou viry a bílkoviny. Protože jsou proteiny z lehkých prvků, odrážejí elektrony jen slabě. Aby se zvýšil kontrast, zalije se vzorek roztokem soli těžkého kovu (například 1-2% uranyl acetát), který obklopí

pozorované částice, ale nepronikne do jejich struktury. Protože od kovu se odráží elektrony daleko více, jeví se vzorek světlý na tmavém pozadí (obr. 2.1). S lepším kontrastem se zobrazují jen povrchy proteinů.



Obr. 2.1: Porovnání pozitivního a negativního kontrastu, [61].

Většinou se vzorek smíchaný s kontrastujícím roztokem nanese na mřížku pokrytou uhlíkovou blánou (která může být aktivovaná - glow discharged, vzorek pak k bláně lépe přilne) a po krátké inkubaci (řádově 1 minuta) se na vzduchu vysuší [3].

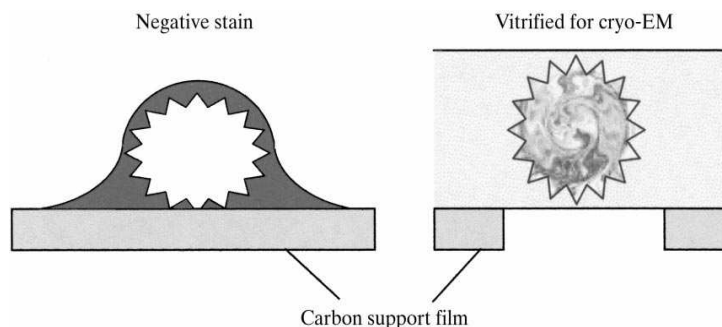
Druhou možností je nanést na mřížku nejdříve vzorek, vysušit přebytečnou kapalinu a teprve potom nakápnout kontrastující roztok.

Kryo- elektronová mikroskopie

Kryo EM je technika dosahující vysokého rozlišení. Velká výhoda kryo-EM je ve zobrazování makromolekul blízko nativnímu stavu a také v tom, že kontrast je způsobený přímo hustotou proteinu spíše než okolním kontrastujícím roztokem. To umožňuje určit strukturu s rozlišením až 3,5Å.

Oproti pozorování negativně kontrastovaných proteinů má kryo-EM několik nevýhod. Zaprvé kontrast nekontrastovaných molekul je nízký. Druhou nevýhodou je citlivost plně hydratovaných zmražených vzorků k elektronovému paprsku způsobená nestabilitou hydratovaného biologického materiálu. Led začne při dopadu elektronů tát. Pokud by se na takové vzorky použilo stejné množství elektronů, jaké je typické při pozorování suchých (air dried) negativně kontrastovaných vzorků, nezůstalo by z hydratovaného vzorku nic. (Nicméně odolnost vůči poškození elektronovým paprskem není u suchého biologického materiálu výrazně vyšší než u hydratovaného. V případě negativního kontrastování je ale částice obalena kontrastující látkou, která jí poskytuje ochranu.) Třetím důvodem, proč někteří mikroskopici pozorují spíše suché vzorky, jsou vyšší náklady při pozorování zmražených vzorků.

Kombinací kryo-EM a negativního kontrastu můžeme využít výhod obou metod. Na snímku jsou pak znaky charakteristické pro kryo EM bez negativního kontrastování, ale s vyšším kontrastem. (Na síťku se vzorkem se před zmražením nanese kontrastující roztok. Používají se vyšší koncentrace než u suchých vzorků, přibližně 16%) [2].



Obr. 2.2: Schematické znázornění negativně kontrastované částice a částice obalené vitrifikovaným ledem [60].

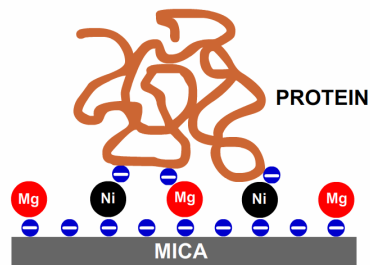
2.1.2 Elektronová krystalografie

Oproti RTG krystalografii, která vyžaduje velké 3D krystaly, je elektronová mikroskopie ideální k pozorování 2D krystalů, což se hodí při zkoumání struktury membránových proteinů. Ty špatně vytvářejí 3D krystaly kvůli interakcím mezi hydrofilními a hydrofóbními doménami. Navíc jsou ještě hydrofóbní domény obaleny detergentem. Jako realizovatelná alternativa se ukázala reorganizace membránových proteinů do lipidových vrstev. Obrázky 2D krystalů (a difrakční obrazce) jsou počítačově zpracovány do 3D mapy proteinu. Tak byl například vytvořen model LHCI vyšších rostlin [27].

2.2 Mikroskopie atomárních sil (Atomic force microscopy, AFM)

AFM je jediný přístroj který dosahuje subnanometrového rozlišení a zároveň může pracovat v kapalném prostředí, což umožňuje zobrazování biologických vzorků v nativním stavu.

V porovnání s ostatními mikroskopickými technikami umožňuje AFM pozorování strukturních detailů jednotlivých molekul (díky vysokému poměru signálu k šumu) bez předchozího značení [5]. Nativní proteiny mohou být zobrazeny s rozlišením přibližně 0,5 nm v horizontálním a 0,1 nm ve vertikálním směru. Při zobrazování makromolekul v kontaktním módu dochází častěji k deformaci vzorku (části molekuly jsou odtrženy špičkou AFM), proto bylo mnoho makromolekul pozorovaných v tapping módu. Ten je sice šetrnější ke vzorkům, ale dosahuje nižšího rozlišení [6].



Obr. 2.3

Jako podklad pro vzorek se používá slída. Po odštípnutí je hladká na atomární úrovni. Vzorek na ní drží díky elektrostatickým interakcím. Protože je záporně nabitá, omyje se před pozorováním adsorpčním pufrům, který obsahuje $MgCl_2$. Hořčnaté ionty po přidání vzorku vytvoří můstky mezi slídou a proteinem (obr. 2.3).

Při pozorování proteinů se střetává snaha získat co nejvyšší rozlišení a snaha co nejmíň porušit vzorek (a zároveň hrot). Při použití kontaktního módu se proto používají raménka

s tuhostí do 0,1 N/m a zobrazuje se při nejmenších možných silách kolem 100 pN, v tapping módu se používají raménka s vyšší tuhostí, která mají také vyšší rezonanční frekvenci a proto umožňují rychlejší reakci při skenování.

3. Pozorování proteinů účastnících se fotosyntetických reakcí

Všechny fotosyntetizující organismy obsahující chlorofyl využívají ke své funkci světlosběrné antény. Jejich úlohou je absorbovat světlo a převést jeho energii do reakčního centra, kde se tato energie využije k fotochemické reakci, získání elektronu oxidací molekuly chlorofylu. Antény se dají povšechně rozdělit na integrální a periferní. Energie absorbovaná pigmenty periferních komplexů je přenesená do integrálních antén a dál do reakčního centra (RC).

Nejvzdálenější části tohoto systému absorbují převážně fotony s krátkou vlnovou délkou. Podle Planckovy rovnice $E = hc/\lambda$ (E je energie, h Planckova konstanta, c rychlost světla a λ vlnová délka absorbovaného fotonu) mají excitované stavy vyvolané fotony o kratší vlnové délce vyšší energii. Při následném přenosu energie z těchto vzdálených pigmentů do reakčního centra se část energie uvolní jako teplo (díky tomuto množství „ztracené“ energie může být přenos takřka nevratný proces) [1].

Světlosběrný systém purpurových bakterií je tvořen kruhovými komplexy Light-harvesting 1 a Light-harvesting 2 (LH1 a LH2). Tyto komplexy absorbují při delších vlnových délkách než je viditelné světlo. Tím pádem absorbují menší dávky energie a nejsou schopny oxidovat vodu. Jako redukční činidlo využívají tyto bakterie vodík nebo sulfid siřičitý.

U sinic slouží jako světlosběrné antény fykobilisomy s výjimkou sinic Prochlorofyta, které mají chlorofylové světlosběrné antény Pcb.

U eukaryot jsou fotosyntetické proteiny uspořádány v tylakoidní membráně tak, že k fotosystému II (PS II) přiléhají heterotrimery proteinů Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 a vytvářejí světlosběrný systém LHCI. Fotosystém I je obklopen proteiny Lhca1, Lhca2, Lhca3 a Lhca4 tvořícími LHCI. K fotosystému I se za určitých podmínek můžou připojit i trimery LHCI [58].

3.1 Světlosběrný komplex LH1 purpurových bakterií

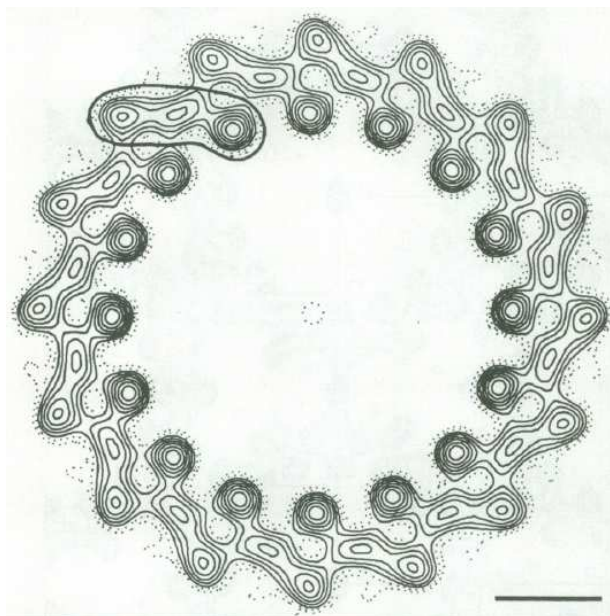
(Light-harvesting complex 1)

LH1 je integrální pigment-proteinový komplex, který absorbuje při 870–890 nm. Obklopuje reakční centrum (RC). U fotosyntetických purpurových bakterií přenáší excitační energii přímo do RC. Skládá se z jednotlivých párů polypeptidických podjednotek α a β , z nichž každá váže molekulu bakteriochlorofylu (BChl) a nebo b [58].

Studie elektronovou difrakcí na dvourozměrných (2D) krystalech LH1 ukázala, že jsou jednotky $\alpha\beta$ uspořádány do kruhu a na to, aby to byl kruh uzavřený, je těchto jednotek potřeba šestnáct. Z dalších pozorování vyplývá, že LH1 může mít více tvarů a že jeho uspořádání závisí na přítomnosti proteinu PufX (více v odstavci LH1).

3.1.1 Elektronová krystalografie

Struktura LH1 s rozlišením 8,5 Å byla určena analýzou 2D krystalů tohoto komplexu izolovaného z bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Na projekční mapě je zřetelných 16 podjednotek uspořádaných do kruhu, jehož rozměry jsou dostatečné na to, aby v něm bylo reakční centrum (obr. 3.1) [20].

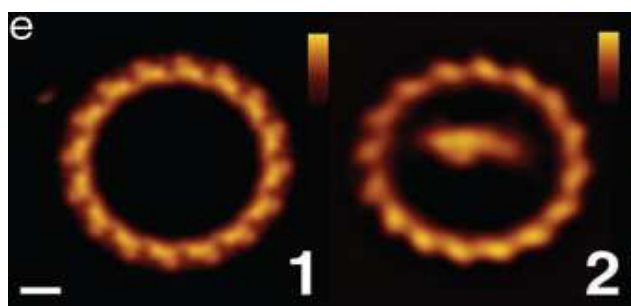


Obr. 3.1: Struktura LH1 s rozlišením 8,5 Å, měřítko 20 Å, [20]

Walz a kol. [43] použili jako modelový organismus *Rhodobacter sphaeroides*. Studiem 2D krystalů komplexu LH1 a RC-LH1 získaly projekční mapy těchto proteinů s rozlišením 25 Å.

3.1.2 Mikroskopie atomárních sil

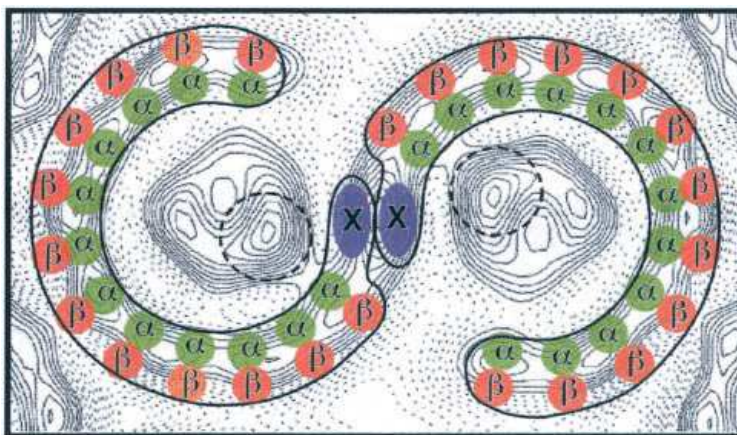
Scheuring [9] pozoroval v kontaktním módu komplex LH1 v nativní membráně bakterie *Rhodospseudomonas viridis*. LH1 byl pozorován jako součást většího komplexu RC-LH1 i jako samostatný komplex LH1. Pokud LH1 obklopoval RC, měl eliptické uspořádání, bez RC byl komplex uspořádaný do kruhu. Rozlišení 10Å horizontálně a 1Å vertikálně bylo dosaženo pomocí jednočásticové analýzy (obr. 3.2).



Obr. 3.2: 1: LH1, 2: RC-LH1, s použitím jednočásticové analýzy, měřítko 2 nm [9].

V AFM byly pozorovány také 2D krystaly LH1 izolované z bakterie *Rhodospirillum rubrum*. V kontaktním módu byly u komplexů postrádajících RC zobrazeny oba kruhy polypeptidů (α a β) [8]. V tapping módu bylo pozorováno několik různých tvarů (kruhové, eliptické a otevřené prstence), do kterých se uspořádává komplex LH1 bez RC [13].

Siebert [33] porovnal strukturu membrán dvou typů (PufX^+ a PufX^-) *Rb. Sphaeroides*. Pomocí AFM a EM ukázal, že LH1 a PufX tvoří spojitý kruh kolem RC a že PufX řídí dimerizaci komplexu RC-LH1 *in vivo*.



Obr. 3.3: Model dimeru komplexu LH1. Komplex se skládá ze dvou uskupení LH1, dvou PufX proteinů a dvou reakčních center [34]

3.2 Světlosběrný komplex LH2 purpurových bakterií

(Light-harvesting complex 2)

LH2 je kruhový nonamer skládající se rovněž z párů $\alpha\beta$ apoproteinů. Vnitřní kruh je z α peptidů, vnější z β peptidů. Každý pár váže dvě molekuly BchlA, které jsou umístěny mezi kruhy α a β a jednu molekulu BChl na rozhraní membrány a cytosolu (celkem je tedy v komplexu 27 molekul BChl). Na každý $\alpha\beta$ pár připadá také jedna molekula karotenoidu [58].

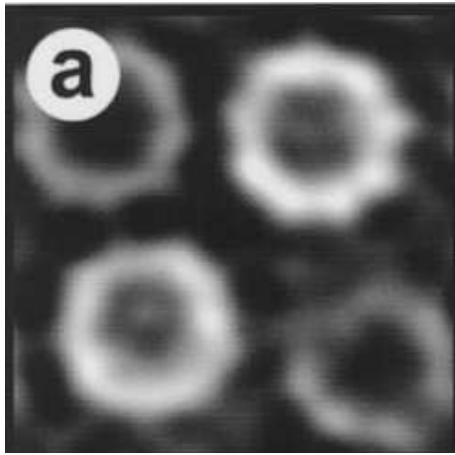
Komplex LH2 může mít také pouze 8 podjednotek, například u bakterie *Rhodospirillum molischianum* [51].

Typické vlnové délky, při kterých LH2 absorbuje jsou 800 a 850 nm, ale u některých druhů bakterií se může tato vlnová délka lišit [58].

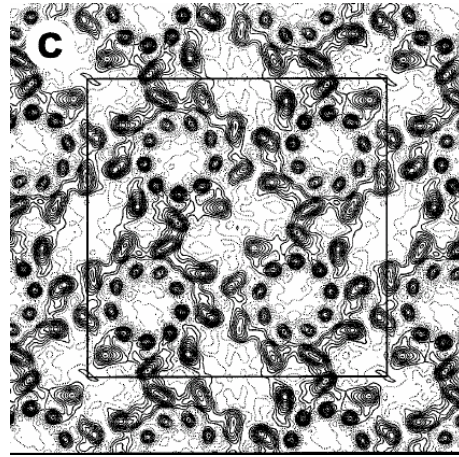
3.2.1 Elektronová krystalografie

Výsledkem první elektronové krystalografie bakteriálního LH2 (izolovaného z *Rhodovulum sulfidophilum*) byla projekční mapa s rozlišením 18 Å. Ringy měly vnější průměr 76 Å, vnitřní 30 Å [55]. O rok později bylo s LH2 též bakterie dosaženo rozlišení 7 Å [56].

Ještě lepší rozlišení, 6 Å, má projekční mapa LH2 bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Krystaly zalité do glukózy byly analyzovány při nízkých teplotách [43].



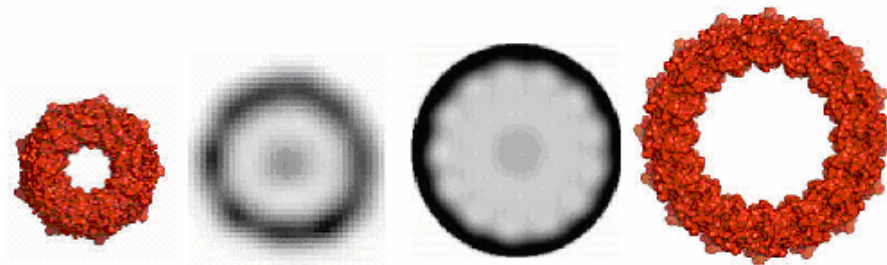
Obr. 3.4a: Projekční mapa negativně kontrastovaných krystalů LH2 [43].



Obr. 4b: Projekční mapa krystalů zalitých v glukóze, rozlišení 6 Å [43].

3.2.2 Elektronová mikroskopie a jednočásticová analýza

Velikost komplexu LH2 je na hranici rozlišení jednočásticové analýzy. Počítačovým zpracováním snímků negativně kontrastovaného LH2 bakterie *Allochromatium vinosum* zobrazovaného se zvětšením 97 500x byly určeny různé průměry ringů tohoto komplexu od 68 do 115 Å, z toho jeden má třináct podjednotek (obr. 3.5) [57].



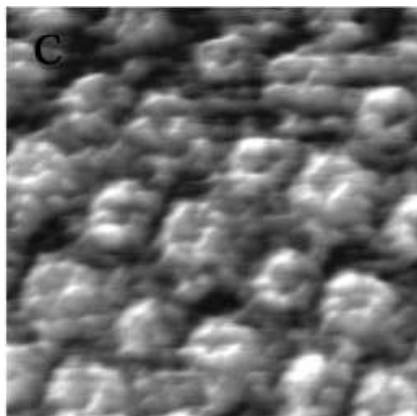
Obr. 3.5: Různé velikosti LH komplexů. Vlevo je LH2 nonamer, vpravo LH1 z 16 podjednotek, prostřední dva jsou „nové“ LH komplexy, větší se skládá z 13 $\alpha\beta$ podjednotek [57].

3.2.3 Mikroskopie atomárních sil

V AFM se pozorují 2D krystaly a snímky se počítačově „průměrují“. Tímto postupem byly získány výsledky odpovídající dříve získané struktuře pomocí elektronového mikroskopu: LH2 je kruhový nonamer [10]. Stejným způsobem byl s rozlišením 10Å horizontálně a 1Å vertikálně pozorován komplex LH2 izolovaný z *Rhodobakter sphaeroides* a bylo určeno, že jeho výška nad membránou je 13,1Å nebo 3,8 Å, rozdíl je způsoben rozdílnou orientací periplazmatické a cytoplazmatické části komplexu v membráně [11]. Tyto výsledky byly potvrzeny použitím tapping módu

v kapalném prostředí. U některých ringů bylo rozlišení natolik dobré, že se dal určit počet podjednotek bez použití jednočásticové analýzy [13].

Dalším pozorováním krystalů LH2 *Rhodobacter sphaeroides* bylo zjištěno, že je komplex v membráně uložen s jistým sklonem, který ale nebyl pozorován u *Rubrivivax gelatinosus*.



Obr. 3.6: 2D krystaly LH2 zobrazené v tapping módu, rozměry obrázku 50 x 50 nm. [13].

Aby se zjistilo, jestli je naklonění přirozené nebo důsledek krystalizace, byl v AFM pozorován LH2 *Rhodospseudomonas acidophila* rekonstituovaný několikrát s různým poměrem proteinu k lipidům. Ukázalo se, že naklonění není v nativních membránách přirozené, ale je způsobeno interakcí mezi proteiny v krystalech [52].

Stamouli [12] zobrazila 2D krystaly LH2 bakterie *Rhodospseudomonas acidophila* v kontaktním módu v nefyziologických podmínkách a v tapping módu ve fyziologických podmínkách. Na snímcích získaných v TM AFM byly zřetelné „výčnělky“ o velikosti LH2, v CM AFM byl viditelný kruh LH2. Ze snímků v TM AFM může být získána informace o orientaci a organizaci LH2 v lipidové dvojvrstvě.

3.3 Fotosystém II sinic a vyšších rostlin a jeho světlosběrný systém

PS II je mezi ostatními fotosystémy jedinečný, protože má schopnost oxidovat vodu na kyslík (tzn. je zdrojem atmosférického kyslíku). Z tohoto důvodu je PS II intenzivně zkoumán.

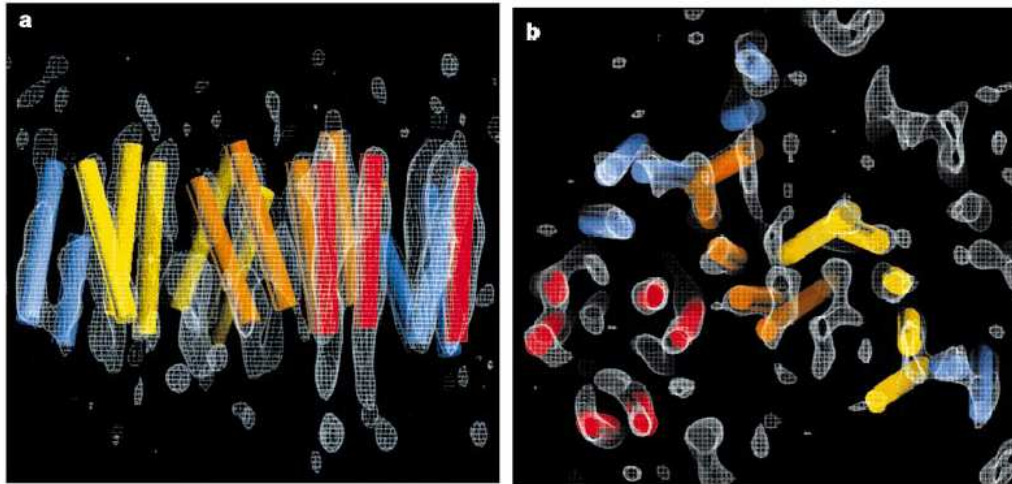
PS II se skládá z více jak 25 odlišných proteinů. Mezi hlavní proteiny tohoto komplexu patří proteiny reakčního centra D1 a D2. Tyto podjednotky vážou kofaktory zajišťující reakce vedoucí k štěpení vody. Ke každému z těchto proteinů (D1 a D2) přiléhají proteiny integrálních antén CP43 a CP47. Tyto čtyři podjednotky jsou obklopeny dalšími proteiny o malé molekulové hmotnosti, mezi které patří i kyslík vyvíjející komplex (OEC – oxygen evolving complex) [71]. PS II je *in vivo* dimer, ve kterém jsou dvě jednotky těsně spojeny. Strukturně je si PS II sinic, řas a vyšších rostlin hodně podobný.

3.3.1 Elektronová krystalografie

Jako první byl vytvořen model podjednotek D1, D2 a CP47 PS II vyšších rostlin s rozlišením 8 Å (obr. 3.7) [66].

O něco poději byl vytvořen model 3D struktury celého komplexu PS II, rozlišení bylo menší (10Å), ale stále dostatečné na určení pozice jednotlivých helixů [14].

Atomový model světlosběrného komplexu LHCI_{II} vyšších rostlin (z hrachu) byl vytvořen čistě na základě elektronové krystalografie s rozlišením 3,4 Å. Kryo-EM 2D krystalů tohoto komplexu ukázala trimerickou strukturu, ve které se komplex nachází také *in vivo* [26, 27].

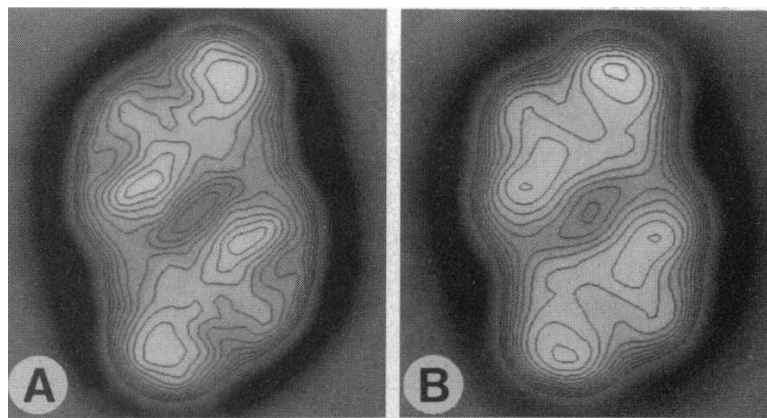


Obr. 3.7: 3D struktura podjednotek D1, D2 a CP47 monomeru fotosystému II, rozlišení 8 Å, a: z boku, b: lumenální strana [66].

3.3.2 Elektronová mikroskopie a jednočásticová analýza

První studie zabývající se PS II byla publikovaná na konci osmdesátých let. Ze snímků negativně kontrastovaného PS II sinice *Synechococcus* sp. byly odhadnuty rozměry monomerické formy na 12,3 x 7,5 nm a dimerické formy na 12 x 15,5 a byl prezentován model PS II *in vivo* [17].

Později byly publikovány výsledky zobrazení PS II sinic a špenátu. Podobnost ve velikosti a tvaru komplexu sinic a vyšších rostlin odpovídá shodnému proteinovému složení a funkci. Z toho, že nebyl pozorován monomer PS II společně s světlosběrným komplexem LHII bylo usouzeno, že PS II se *in vivo* vyskytuje jako dimer [18].



Obr. 3.8: Obrázky PS II po jednočásticové analýze, A: *Synechococcus*, B: špenát, [18].

Ze špenátu byl také izolován větší komplex PSII-LHCII. Z výsledků získaných zobrazením negativně kontrastovaných vzorků se dalo usoudit, že se v dimeru komplexu PSII-LHCII vyskytují dva trimery LHCII, z nichž se každý váže k reakčnímu centru [18]. 3D struktura tohoto komplexu s rozlišením 24Å byla získána pomocí kryo

EM a následnou jednočásticovou analýzou. Byla zdůrazněná dimerická struktura a daly se snadno pozorovat proteiny komplexu vyvíjejícího kyslík (OEC) [15].

Kombinace jednočásticové analýzy se značením zlatem se zdá být vhodnou metodou na lokalizování jednotlivých částic ve složitých komplexech. Bylo tak zjištěno umístění podjednotky PsbH v komplexu PS II izolovaného z řasy *Chlamydomonas reinhardtii* [42].

3.3.3 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopem atomárních sil nebyla získána žádná topografická zobrazení s vysokým rozlišením. Snímky pokovených tubulárních krystalů získané v kontaktním módu jsou prosté jakýkoli detailů [41].

Membrány obsahující PS II byly izolovány ze špenátu a pozorovány v TM AFM. Komplex byl na snímcích viditelný jako kapce podobný útvar, jehož rozměry byly větší než rozměry zjištěné elektronovou mikroskopií. Tento rozdíl byl zřejmě způsobený velikostí skenovacího hrotu. Mimo zobrazení PS II byly taky zkoumány jeho elastické vlastnosti [19].

Organizace PS II v membráně může být zobrazena AFM pracujícím v tapping módu ve vzduchu s minimálními interakcemi mezi hrotem a vzorkem. Byl zobrazen izolovaný komplex a komplex uspořádaný v membráně. Snímky dosahují rozlišení srovnatelného se snímky vzorků mrazového lámání [39].

3.4 Fotosystém I sinic a vyšších rostlin a jeho světloběrný systém

Komplex PSI se skládá z fotosyntetických peptidů, reakčního centra P700 a dalších center účastnících se přenosu elektronů. Celkem obsahuje více jak 12 podjednotek, které jsou vázány na bílkoviny PsaA a PsaB. Dále obsahuje tři vnější podjednotky PsaC, PsaD a PsaE umístěné na lumenální straně [28].

V sinicích je PSI převážně trimer, ve vyšších rostlinách monomer obklopený světloběrným systémem LHCI.

3.4.1 Elektronová krystalografie

První 3D struktura fotosystému I vyšších rostlin (ze špenátu) byla získána elektronovou krystalografií. 2D krystaly byly negativně kontrastovány. PS I vyšších rostlin má několik podobností s PS I sinic. Je ale o něco větší, jeho rozměry byly určeny na 15–16 x 11–12.5 nm s předpokladem, že jsou na komplex navázány další polypeptidy [29]. Další studie 2D krystalů PS I odhalila vazebné místa pro ferredoxin – na stromální straně, interaguje hlavně s vnějšími podjednotkami (PsaC a PsaE), což je naprosto rozdílné od vazebného místa pro tentýž přenašeč u sinic [30].

Více studií bylo uděláno na PS I komplexu sinic. První 2D krystaly PS I byly studovány v roce 1990. Od té doby další práce odhalily společný tvar trimerního PS I sinic.

Struktura PS I sinice *Synechococcus* sp. byla zkoumána na negativně kontrastovaných 2D krystalech. Model dosažený 3D rekonstrukcí ukazuje nesymetrický komplex. Rozlišení bylo 1,8 nm. Na jedné straně (nejspíš stromální) je asi 3 nm vysoký hrbol, pravděpodobně složený z podjednotek psaC, psaD a psaE [24].

3D mapa PSI *Synechococcus* sp. byla získána dvěma způsoby. Rozlišení 19 Å bylo dosaženo při pozorování negativně kontrastovaných 2D krystalů (0,75% uranyl formátem), mnohem lepšího výsledku, rozlišení 8 Å, se dosáhlo studiem hydratovaných zmražených krystalů [22].

3.4.2 Elektronová mikroskopie a jednočásticová analýza

Zkoumání struktury PS I pomocí elektronové mikroskopie začalo v 70. letech minulého století. Newman [31] studoval PS I i PS II z řasy *Synechococcus cedrorum*. Ukázalo se, že složení a velikost PS I a PS II jsou naprosto rozdílné.

Další studie odhalily, že PS I sinic se vyskytuje ve dvou formách: monomer a trimer [40, 21, 25].

Výsledky pozorování negativně kontrastovaného fotosystému I izolovaného ze sinice *Synechococcus* sp. při zvětšení 70 000x dokázaly, že se komplex PS I vyskytuje jako trimer (velmi pravděpodobně také *in vivo*) [21].

Monomer, dimer i trimer PSI z téže sinice byl pozorován o něco později elektronovým mikroskopem a velikost monomeru byla určena $15.3 \times 10.6 \times 6.4$ nm [25].

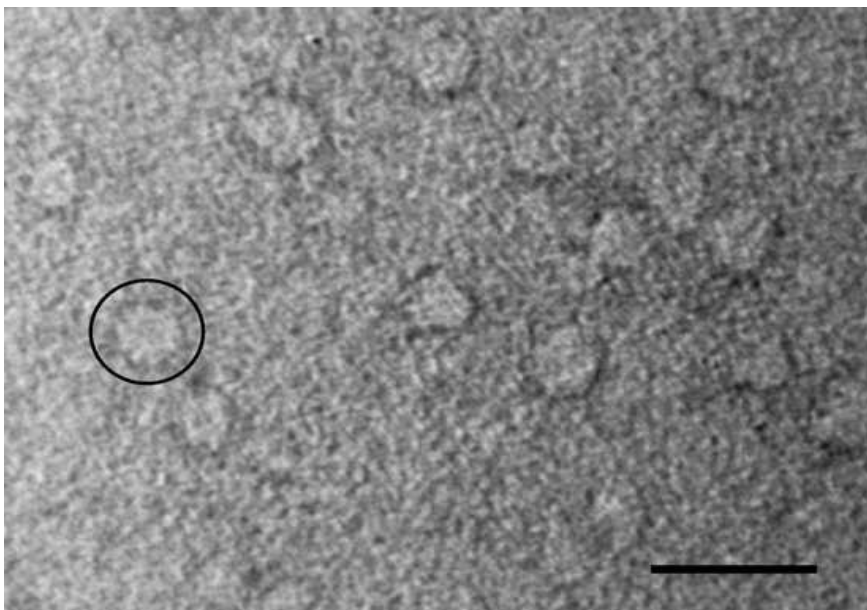
Po jednočásticové analýze byly určeny rozměry monomeru komplexu PSI-LHCI zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* 21.3 nm x 18.2 nm. To je znatelně víc, než jsou rozměry téhož komplexu špenátu [23].

PS I vyšších rostlin a řas je spojen s proteiny světlosběrného systému LHCI. PS I má tvar disku, rozměry 16 x 12 nm v rovině membrány a výšku 6,8 nm [32].

Jednočásticová analýza snímků PS I z tylakoidních membrán špenátu ukázala, že se LHCI objevuje pouze na jedné straně komplexu PS I. [68].

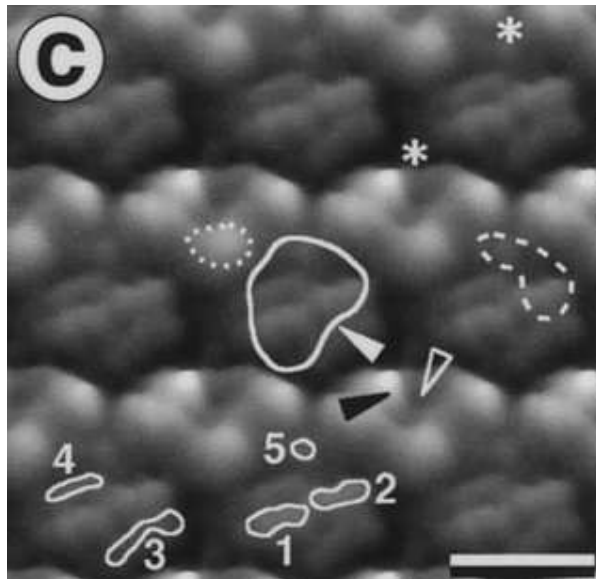
O několik let později bylo zjištěno, že zastoupení dimerů a trimerů PS I je ale u vyšších rostlin jen několik málo procent a navíc jsou některé podjednotky v trimernu obráceny „hlavou dolů“. Mnoho z výsledků jednočásticové analýzy těchto oligomerů bylo neostrých, vykazovaly nespecifickou orientaci podjednotek. Z toho bylo usouzeno, že PSI vyšších rostlin je monomer [38].

Veith [37] poprvé pozoroval komplex PSI-FCP (fucoxantin chlorophyll protein) rozsivek *Phaeodactylum tricorutum*. FCP v tomto komplexu plní funkci LHCI. Bez jednočásticové analýzy bylo zjištěno, že komplex je monomer, který má rozměry srovnatelné s komplexem PSI-LHCI (průměr 21nm).



Obr. 3.9: Snímek negativně kontrastovaného komplexu PSI-FCP, měřítko 50 nm, [37].

3.4.3 Mikroskopie atomárních sil



Obr. 3.10: Počítačově zprůměrované tři snímky PS II bez vnějších podjednotek [53].

Struktura PS I sinice *Synechococcus* sp. byla pozorována v kontaktním módu AFM s vysokým rozlišením. Byly pozorovány 2D krystaly, nejdříve celé, následně byly odstraněny vnější podjednotky. Na snímku kompletních krystalů je zaznamenáno různé rozložení podjednotek. Po zprůměrování několika snímků PSI bez vnějších jednotek je na obrázku jasně patrná trimerická struktura a umístění PsaD podjednotky.

Výsledek byl porovnán s pozorováním téhož vzorku (stínovaného těžkými kovy) pomocí elektronového mikroskopu. Obě dvě metody poskytly informaci o lumenálním a stromatálním povrchu [53].

Pomocí AFM byl pozorován i celý fotosyntetický aparát v nativních membránách [35, 67]. Scheuring [36] pozoroval fotosyntetickou membránu z *Rhodospirillum photometricum*. Byly získány snímky celé fotosyntetické jednotky s rozlišením 12 Å. Snímky ukázaly strukturní různorodost komplexu LH2 v membráně a poskytly detailnější pohled na interakce mezi komponentami fotosyntetické jednotky.

V poslední době se pozorování elektronovým mikroskopem a mikroskopem atomárních sil zaměřují na studium umístění jednotlivých podjednotek v komplexech, na vzájemné umístění komplexů a jejich dynamiku [55, 69, 70].

4. Závěr

Ze srovnávaných metod dosahuje nejlepšího rozlišení elektronová krystalografie. Umožňuje dokonce rozpoznat umístění jednotlivých helixů. Během let se vyvinuly nejen metody elektronové mikroskopie, ale také zpracování obrazu a tak je limitujícím faktorem této metody právě krystalizace.

Jednočásticová analýza snímků negativně kontrastovaných vzorků a vzorků zpracovaných kryometodami z transmisní elektronové mikroskopie dosahuje rozlišení dostatečného na určení počtu a umístění jednotlivých podjednotek pozorovaných komplexů. Světlosběrné komplexy purpurových bakterií LH1 a LH2 se takto nepozorují, protože jejich velikost je na hranici rozlišení této metody.

Mikroskopie atomárních sil v některých případech dosahuje rozlišení srovnatelného s jednočásticovou analýzou snímků z TEM. I na snímky z AFM se používají průměrovací metody založené na principu jednočásticové analýzy. Pokud se zobrazují uspořádané částice jako jsou 2D krystaly světlosběrných komplexů, dají se na počítačově zpracovaných snímcích rozeznat jednotlivé podjednotky. Na snímcích LH2 pořízených v tapping módu [13] lze spočítat podjednotky i bez použití jednočásticové analýzy.

Nedávno byl v AFM zobrazen PSII s rozlišením srovnatelným se snímky „freeze fracture“ vzorků z elektronového mikroskopu.

Struktura všech uvedených proteinů byla zjištěna s vyšším rozlišením metodami RTG krystalografie. Ta ale nevypovídá nic o vzájemném uspořádání podjednotek v membránách.

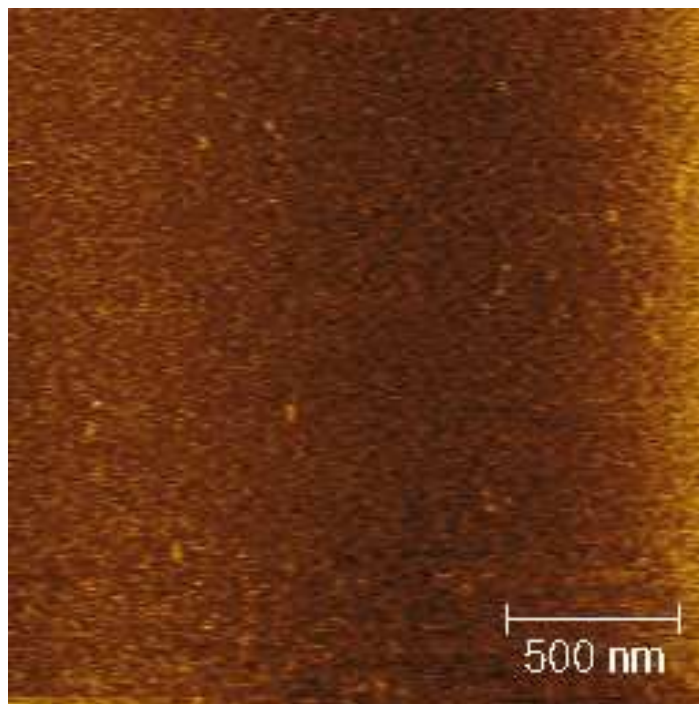
Skenovací elektronový mikroskop se na pozorování těchto proteinů nepoužívá. Většina vzorků je na hranici rozlišovací schopnosti SEM.

5. Experimentální část

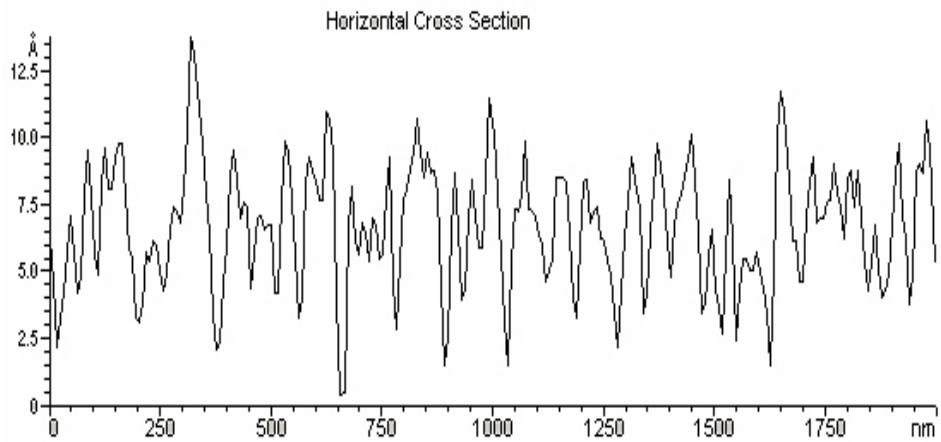
Pokusila jsem se zobrazit fotosystém I sinice *Prochlorothryx hollandica* ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou (FESEM). Mikroskop je vybaven kryo-komorou a dosahuje dostatečného rozlišení vzhledem k velikosti fotosystému I. Problémem je, jak vzorek připravit, aby byly snímky dostatečně kontrastní a najít vhodný podklad, který je dostatečně hladký na to, aby částice „nezapadla“ do jeho struktury. Další problémem je pokovení vzorku. Kromě toho, že po napaření kovu je protein překryt vrstvou o tloušťce srovnatelné s výškou proteinu, napařený kov také vytváří na podkladu vlastní strukturu (obr. 5.2).

Jako podklad jsem vyzkoušela uhlíkovou blánu, slídu, sklo a molekulární filtr. Nejdříve jsem se zaměřila na studium povrchu jednotlivých podkladů. Jako nejvhodnější se jeví slída (obr. 5.1).

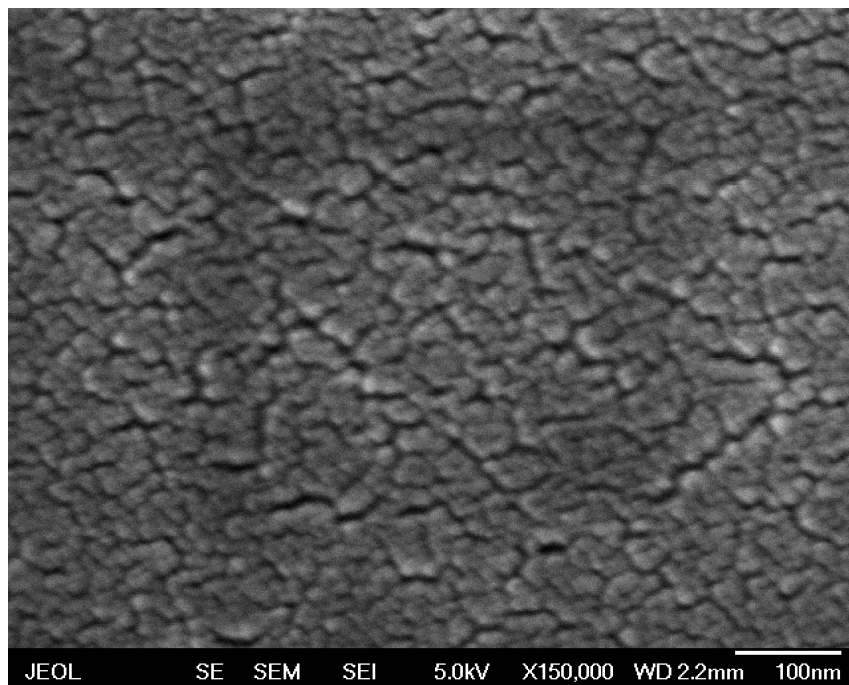
Vzorky PS I jsem zkoušela zobrazit i bez pokovení, ale v tomto případě není protein vidět díky příliš nízkému kontrastu.



Obr. 5.1a: Snímek slídy z AFM



Obr. 5.1b: Cross section k obrázku slídy, je ukázáno, že nerovnosti povrchu jsou do 1 nm



Obr. 5.2: Snímek pokovené slídy ze SEM

6. Literatura

- [1] Blankenship R.E., 2002, Molecular Mechanism of Photosynthesis, Blackwell Science
- [2] Adrian M., Dubochet J., Fuller S.D., Harris J.R., 1998, Cryo-Negative Staining, *Micron* 29, 145-160
- [3] Boekema E.J., 1991, Negative Staining of Integral Membrane Proteins, *Micron and Microscopica Acta*, Vol. 22, No.4, 361—369
- [4] Frank J., 2002, Single-Particle Imaging of Macromolecules by Cryo-Electron Microscopy, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:303–19
- [5] Müller D.J., Janovjak H., Lehto T., Kuerschner, Anderson K., 2002, Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 79, 1-43
- [6] Möller C., Allen M., Elings V., Engel A., Müller D.J., 1999, Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-resolution Images of Protein Surfaces, *Biophysical Journal* 77, 1150-1158
- [7] V.Hulínský, K.Jurek: Zkoumání látek elektronovým paprskem, SNTL Praha, 1982
- [8] Fotiadis D., Quian P., Pilippsen A., Bullough P.A., Engel A., Hunter C.N., 2004, Structural Analysis of the Reaction Centre Light-harvesting Complex I Photosynthetic Core Complex of *Rhodospirillum rubrum* Using Atomic Force Microscopy, *Journal of Biological Chemistry* 279, 2063 – 2068
- [9] Scheuring S., Seguin J., Marco S., Lévy D., Robert B., Rigaud J.L., 2003, Nanodissection and high-resolution imaging of the *Rhodopseudomonas viridis* Photosynthetic core complex in native membranes by AFM, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1690-1693
- [10] Scheuring S., Reiss-Husson F., Engel A., 2001, High-resolution AFM Topographs of *Rubrivivax gelatinosus* Light Harvesting Complex LH2, *EMBO Journal* 12, 3029-3035
- [11] Scheuring S., Seguin J., Marco S., Levy D., Breyton C., Robert B., Rigaud J.-L., 2003, AFM Characterization of Tilt and Intrinsic Flexibility of *Rhodobacter sphaeroides* Light Harvesting Complex 2 (LH2), *Journal of Molecular Biology* 325, 569-580
- [12] Stamouli A., Kafi S., Klein D.C.G., Oosterkamp T.H., Frenken J.W.M., Cogdell R.J., Aartsma T.J., 2003 The Ring Structure and Organization of Light Harvesting 2 Complexes in a Reconstituted Lipid Bilayer, Resolved by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal* 84, 2483–2491

- [13] Bahatyrova S., Frese R.N., Van der Werf K., Otto C., Hunter C.N., Olsen J.D., 2004 , Flexibility and Size Heterogeneity of the LH1 Light Harvesting Complex Revealed by Atomic Force Microscopy, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 279, No. 20, 21327–21333
- [14] Hankamer B., Morris E., Nield J., Gerle Ch., Barber J., 2001 Three-Dimensional Structure of the Photosystem II Core Dimer of Higher Plants Determined by Electron Microscopy, Journal of Structural Biology 135, 262–269
- [15] Nield J., Orlova E.V., Morris E.P., Gowen B., van Heel M., Barber J., 2000, 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis, Nature Structural Biology 7, 44-47
- [16] Subramaniam S., Milne J.L.S., 2004, Three-dimensional electron microscopy at atomic resolution, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 33, 141- 155
- [17] Dekker J.P., Boekema E.J., Witt H.T., Rögner M., 1988, Refined purification and further characterization of oxygen-evolving and Tris-treated Photosystem II particles from the thermophilic *Cyanobacterium synechococcus* sp., Biochimica et Biophysica Acta 936, 307-318.
- [18] Boekema E.J., Hankamer B., Bald D., Kruip J., Nield J., Boonstra A.F., Barber J., Rögner M., 1995, Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 175-179
- [19] Shao L., Tao N.J., Leblanc R.M., 1997, Probing the microelastic properties of nanobiological particles with tapping mode atomic force microscopy, Chemical Physics Letters 273, 37-41
- [20] Karrasch S., Bullough P.A., Ghosh R., 1995, The 8,5 Å projection map of the light harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits, The EMBO Journal vol.14, no.4, 631-638
- [21] Boekema E.J., Dekker J.P., van Heel M.G., Rögner M., Saenger W., Witt I., Witt H.T., 1987, Evidence for a trimeric organization of the photosystem I complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp., FEBS letters 217, 283-286
- [22] Karrasch S., Typke D., Walz T., Miller M., Tsiotis G., Engel A., 1996, Highly ordered two-dimensional crystals of photosystem I reaction centre from *Synechococcus* sp. Functional and structural analysis, Journal of Molecular Biology 262, 336-348
- [23] Germano M., Yakushevskaya A.E., Keegstra W., van Gorkom H.J., Jan P., Dekker J.P., Boekema E.J., 2002, Supramolecular organization of photosystem I and light-harvesting complex I in *Chlamydomonas reinhardtii*, FEBS Letters 525, 121-125

- [24] Böttcher B., Gräber P., Boekema E.J., 1992, The structure of photosystem I from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. determined by electron microscopy of two-dimensional crystals, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1100, Issue 2, 125-136
- [25] Rögner M., Muhlenhoff U., Boekema E.J., Witt H.T., 1990, Monomeric, dimeric and trimeric PSI reaction center complex isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp.,- size, shape and activity, *Biochimica et Biophysica Acta* 1015, 415-424
- [26] Kühlbrandt W, 1994a, Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II, *Current Opinion in Structural Biology* 4, 519-528
- [27] Kühlbrandt W, Wang DG, Fujiyoshi Y, 1994b, Atomic Model of Plant Light-Harvesting Complex by Electron Crystallography. *Nature* 367, 614-621
- [28] Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., 1998, *Fyziologie rostlin*, Academia, str.137
- [29] Kitmitto A., Mustafa A.O., Holzenburg A., Ford R.C., 1998, Three-dimensional Structure of Higher Plant Photosystem I Determined by Electron Crystallography, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 273, 29592–29599
- [30] Ruffle S.V., Mustafa A.O., Kitmitto A., Holzenburg A., Ford R.C., 2000, The Location of the Mobile Electron Carrier Ferredoxin in Vascular Plant Photosystem I, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 275, 36250–36255
- [31] Newman P.J., Sherman L.A., 1978, Isolation and characterisation of photosystem I and II membrane particles from the blue-green alga *Synechococcus cedorum*, *Biochimica et Biophysica acta* 503, 343-361
- [32] Boekema E.J., Wynn R.M., Malkin R., 1990, The structure of spinach Photosystem I studied by electron microscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* 1017, 49-56
- [33] Siebert C.A., Qian P., Fotiadis D., Engel A., Hunter C.N., Bullough P.A., 2004, Molecular architecture of photosynthetic membranes in *Rhodobacter sphaeroides*: the role of PufX, *The EMBO Journal* (2004) 23, 690–700
- [34] Scheuring S., Francia F., Busselez J., Melandris B.A., Rigaud J-L., Lévy D., 2004, Structural Role of PufX in the Dimerization of the Photosynthetic Core Complex of *Rhodobacter sphaeroides*, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 279, 3620–3626
- [35] Goncalves R.P., Bernadac A., Strurgis J.N., Scheuring S., 2005, Architecture of native photosynthetic apparatus of *Phaeospirillum molischianum*, *Journal of Structural Biology* 152, 221-228

- [36] Scheuring S., Rigaud J-L., Sturgis J.N., 2004, Variable LH2 stoichiometry and core clustering in native membranes of *Rhodospirillum rubrum*, *The EMBO Journal* 23, 4127-4133
- [37] Veith T., Büchel C., 2007, The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs) as light-harvesting complexes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 1428-1435
- [38] Kouril R., van Oosterwijk N., Yakushevska A.E., Boekema E.J., 2005, Photosystem I: a search for green plant trimers, *PHOTOCHEMICAL & PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES* 12, 1091-1094
- [39] Kirchhoff H., Lenhart 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
- [40] Ford R.C., Holzenburg A., 1988, Investigation of the structure of trimeric and monomeric photosystem I reaction centre complexes, *The EMBO Journal* 7, 2287-2293
- [41] Lyon M.K., Marr K.M., Furcinitti P.S., 1993, Formation and characterization of two-dimensional crystals of Photosystem II, *Journal of Structural Biology* 110, 133-140
- [42] Büchel C., Morris E., Orlova E., Barber J., 2001, Localisation of the PsbH subunit in photosystem II: a new approach using labelling of his-tags with a Ni²⁺-NTA gold cluster and single particle analysis, *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY* 312, 371-379
- [43] Walz T, Jamieson SJ, Bowers CM, Bullough PA, Hunter CN, 1998, Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 angstrom LH1 and RC-LH1 at 25 angstrom., *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY* 282, 833-845
- [44] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.1.html>
- [45] <http://www.scienceworld.cz/sw.nsf/0/B51AB8E153B44E00C1256E970048FBB5?OpenDocument&cast=1>
- [46] http://cs.wikipedia.org/wiki/Mikroskopie_atomárních_sil
- [47] <http://stm2.nrl.navy.mil/how-afm/how-afm.html>
- [48] V.Hulínský, K.Jurek: Zkoumání látek elektronovým paprskem, SNTL Praha, 1982
- [49] Miroslav Karlík, Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů, Katedra materiálů FJFI ČVUT, Trojanova 13, Praha 2 http://rumcajs.fjfi.cvut.cz/fyzport/FT/2004/Difrakce/05_Karlik_CsCAsFyz_manu.pdf

- [50] <http://atmilab.upol.cz/texty/fyzchem.pdf>
- [51] Cogdell R.J., Gardiner A.T., Rozsak A.W., Law Ch.J., Southall J., Isaacs N.W., 2004, Rings, ellipses and horseshoes: how purple bacteria harvest solar energy, *Photosynthesis Research* 81, 207–214
- [52] Goncalves R.P., Busselez J., Lévy D., Seguin J., Scheuring S., 2005, Membrane insertion of *Rhodospseudomonas acidophila* light harvesting complex 2 investigated by high resolution AFM
- [53] Fotiadis D., Müller, D.J., Tsiotis G., Hasler L., Tittman P., Mini T., Gross P.J.H., Engel A., 1998, Surface Analysis of the Photosystem I Complex by Electron and Atomic Force Microscopy, *J. Mol. Biol.* 283, 83-94
- [54] Scheuring S., Sturgis J.N., 2006, Dynamic and Diffusion in Photosynthetic membranes from *Rhodospirillum Photometricum*, *Biophysical Journal* 91, 3707 - 3717
- [55] Montoya G., Cyrklaff M., Sinning I., 1995, Two-dimensional Crystalization and Preliminary Structure Analysis of Light Harvesting II (B800-850) Complex From the Purple Bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*, *Journal of Molecular Biology* 250, 1-10
- [56] Savage H., Cyrklaff M., Montoya G., Kühlbrandt W., Sinning I., 1996, Two-dimensional structure of light harvesting complex II (LHII) from the purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* and comparison with LHII from *Rhodospseudomonas acidophila*, *Structure* 4, 243-252
- [57] Kereiche S., Bourinet L., Keegstra W., Arteni A.A., Verbavatz J.M., Boekema E.J., Robert B., Gall A., 2008, The peripheral light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria have different ‘ring’ size, *FEBS Letters* 582, 3650-3656
- [58] Green B.R., Parsons W.W., 2003, *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, kap.1 a kap. 5
- [59] Vácha F., Bumba L., Kaftan D., Vácha M., 2005, Microscopy and single molecule detection in photosynthesis, *Micron* 36, 483-502
- [60] Saibil H.R., 2000, Macromolecular structure determination by cryo-electron microscopy. *Acta Crystallographica D* 56, 1215-1222
- [61] <http://www.lymenet.info/literatur/imelectronmicroscopy/electronmic.htm>
- [62] www3.physik.uni-greisdorf.de
- [63] https://www.biomedica.cellbiology.ubc.ca/cellbiol/user/scripts/qry_media_id.php?media_id=212

- [64] <http://www.physikinstrumente.com/en/products/primages.php?sortnr=400800.00&picview=5>
- [65] <http://www.vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/cellcycle/karyotes/>
- [66] Rhee K-H., Morris E.P., Barber J., Kuhlbrandt W., 1998, Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8Å resolution, *Nature* 396, 283-286
- [67] Scheuring S., Goncalves R.P., Prima V., Sturgis J.N., 2006, The Photosynthetic Apparatus of *Rhodospseudomonas palustris*: Structures and Organization, *Journal of Molecular Biology* 358, 83-96
- [68] Boekema E.J., Jensen P.E., Schlodder E., van Breeman J.F.L., van Roon H., Scheller H.V., Dekker J.P., 2001, Green Plant Photosystem I Binds Light-Harvesting Complex I on One Side of the Complex, *Biochemistry* 40, 1029-1936
- [69] Folea I.M., Zhang P., Aro E-M., Boekema E.J., 2008, Domain organization of photosystem II in membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 investigated by electron microscopy, *FEBS Letters* 582, 1749-1754.
- [70] Kargul J., Turkina M.V., Nield J., Benson S., Vener A.V., Barber J., 2005, Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under State 2 condition, *FEBS Journal* 272, 4797-4806
- [71] Nield J., Barber J., 2006, Refinement of the structural model for the Photosystem II superkomplex of higher plants, *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 353-361