



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Charakterizace oligomerních forem fotosystémů
izolovaných z *Arabidopsis thaliana***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Aleš Řiháček**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Nosek, Ph.D.
Termín odevzdání práce: 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Aleš Řiháček
Název práce	Charakterizace oligomerních forem fotosystémů izolovaných z <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Lukáš Nosek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Fotosystémy jsou velké pigment-proteinové superkomplexy nacházející se v tylakoidních membránách zelených rostlin, řas a sinic. Jsou známy dva typy fotosystémů: fotosystém I a fotosystém II. Fotosystémy mají schopnost tvořit vyšší funkční celky s dalšími fotosyntetickými komplexy. Cílem této práce byla stabilizace nových oligomerních forem fotosystémů použitím činidel vytvářejících příčné vazby. Byla použita tři činidla: 3,3'-dithiobis(sulfo-sukcinimidyl propionát), dithiobis(sukcinimidyl propionát) a glutaraldehyd. Bezbarvá nativní elektroforéza ukázala, že po ošetření tylakoidních membrán činidlem 3,3'-dithiobis(sulfo-sukcinimidyl propionát) dochází ke stabilizaci nativní struktury superkomplexů fotosystému II. Nicméně se nepodařilo nalézt žádné nové oligomerní formy fotosystémů.
Klíčová slova	Fotosystém I, fotosystém II, oligomerní formy fotosystémů, činidlo pro tvorbu příčných vazeb
Počet stran	92
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Aleš Řiháček
Title of thesis	Characterization of oligomeric forms of photosystems isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Lukáš Nosek, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>Photosystems are a large supramolecular pigment-protein complexes found in the thylakoid membranes of green plants, algae and cyanobacteria. There are two types of photosystems: Photosystem I and Photosystem II. Photosystems have the ability to form larger units with other photosynthetic complexes. The aim of this thesis was stabilisation of new oligomeric forms of photosystems by chemically cross-linking. There were used three reagents: 3,3-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), dithiobis(succinimidyl propionate) and glutaraldehyde. Clear native-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the samples after cross-linking showed that the native structure of supercomplexes of photosystem II are stabilised by 3,3-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate). However, new oligomeric forms of photosystems were not detected.</p>
Keywords	Photosystem I, photosystem II, oligomeric forms of photosystems, crosslinker
Number of pages	92
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli Mgr. Lukáši Noskovi, Ph.D. za jeho ochotu, čas a pomoc s prováděnými experimenty a také za cenné připomínky při sepisování této diplomové práce.

Obsah

1	Úvod a cíle práce	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
2.1	Struktura a funkce fotosyntetického aparátu rostlin	9
2.2	Fotosystém I	10
2.2.1	Struktura fotosystému I	11
2.2.1.1	Jádro fotosystému I.....	12
2.2.1.2	Světloběrný komplex fotosystému I	14
2.2.2	Stavové přechody fotosystému I.....	14
2.2.3	Interakce fotosystému I s cytochrom b_6f komplexem	16
2.2.4	Interakce fotosystému I s NAD(P)H dehydrogenasovým komplexem	17
2.2.5	Oligomerní komplexy fotosystému I.....	19
2.3	Fotosystém II	20
2.3.1	Struktura fotosystému II	20
2.3.1.1	Jádro fotosystému II	21
2.3.1.2	Světloběrný komplex fotosystému II	23
2.3.2	Superkomplexy fotosystému II.....	24
2.3.3	Megakomplexy fotosystému II.....	25
2.3.4	Dvoudimenzionální krystaly fotosystému II	27
2.4	Tvorba příčných vazeb	27
2.4.1	Činidla pro tvorbu příčných vazeb	28
2.4.2	Využití tvorby příčných vazeb ve strukturálních studiích proteinů	29
3	Materiál a metody	32
3.1	Přístroje a vybavení	32
3.2	Použité chemikálie.....	32
3.3	Rostlinný materiál.....	34
3.4	Izolace tylakoidních membrán.....	34
3.5	Optimalizace podmínek pro tvorbu příčných vazeb.....	35
3.5.1	Ultracentrifugace na hustotním gradientu sacharosy.....	35
3.5.2	Koncentrace a přečištění vzorku.....	36

3.5.3	Tvorba příčných vazeb	37
3.5.4	SDS-PAGE	37
3.6	Tvorba příčných vazeb na úrovni intaktní tylakoidní membrány.....	39
3.6.1	Příprava tylakoidních membrán.....	39
3.6.2	Tvorba příčných vazeb	39
3.6.3	Solubilizace tylakoidních membrán	40
3.6.4	CN-PAGE	40
3.7	Tvorba příčných vazeb na úrovni solubilizované tylakoidní membrány	41
3.7.1	Solubilizace tylakoidních membrán	41
3.7.2	Tvorba příčných vazeb	41
3.7.3	CN-PAGE.....	42
3.8	Transmisní elektronová mikroskopie a obrazová analýza.....	42
4	Výsledky	43
4.1	Optimalizace podmínek pro tvorbu příčných vazeb.....	43
4.2	Stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni intaktní tylakoidní membrány .	48
4.3	Stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni solubilizované tylakoidní membrány	57
4.4	Charakterizace izolovaných vyšších forem fotosystémů.....	58
4.4.1	Přístup na úrovni intaktní tylakoidní membrány	58
4.4.1.1	Obrazová analýza	60
4.4.1.2	Strukturní charakterizace	61
4.4.2	Přístup na úrovni solubilizované tylakoidní membrány	63
5	Diskuze	66
6	Závěr	73
7	Seznam použitých zkratk	74
8	Seznam použité literatury	76

1 Úvod a cíle práce

Fotosystémy jsou velké multiproteinové superkomplexy s enzymovou aktivitou, které se účastní procesu zvaného fotosyntéza. Existují dva typy fotosystémů: fotosystém I a fotosystém II. Představy o organizaci těchto superkomplexů se velmi rychle vyvíjejí. U vyšších rostlin byla prokázána schopnost fotosystémů sdružovat se do vyšších funkčních celků spolu s dalšími fotosyntetickými komplexy. U fotosystému I byla objevena schopnost interagovat s cytochrom b_6f komplexem, se světlosběrnými anténami fotosystému II či s NAD(P)H dehydrogenasovým komplexem. U fotosystému II pak byla objevena schopnost interagovat mezi sebou navzájem, a tvořit tak větší oligomerní celky. S ohledem na nízkou stabilitu a možnost narušení interakcí mezi komplexy vyšších celků těchto fotosystémů se nabízí myšlenka, zda se v intaktní formě nevyskytují i další formy vyšších funkčních celků, které se ztrácejí během separace. K odhalení případných nových vyšších forem fotosystémů by mohlo pomoci využití činidel vytvářejících příčné vazby. Tato činidla umožňují spojení dvou a více molekul prostřednictvím kovalentních vazeb, které se vytvářejí prostřednictvím chemických reakcí mezi koncovými reaktivními skupinami zesilovacích činidel a funkčními skupinami proteinů. Použití zmíněných činidel by udrželo takovéto struktury v intaktní formě a během separace by nedocházelo k jejich ztrátám. Cílem teoretické části práce bylo vypracovat rešerši týkající se problematiky fotosystémů I a II se zřetelem na jejich schopnost tvorby vyšších funkčních celků. Cílem experimentální části práce pak bylo stabilizovat vyšší formy fotosystémů pomocí činidel vytvářejících příčnou vazbu a následně provést strukturní charakterizaci případných nových forem vyšších celků fotosystémů.

2 Současný stav řešené problematiky

Fotosyntéza je proces, při kterém je využívána světelná energie k syntéze energeticky bohatých organických sloučenin. V zelených rostlinách vyžaduje tento proces, mimo světla jako zdroje energie, pouze dvě složky: vodu a oxid uhličitý z atmosféry. Soubor reakcí, k nimž v rámci fotosyntézy dochází, lze rozdělit na děje primární a sekundární. Primární děje jsou závislé na světle a zahrnují pohlcení světla fotosyntetickými pigmenty, transport elektronů, syntézu ATP a NAD(P)H a tvorbu kyslíku. Sekundární děje jsou na světle nezávislé. Podstatou těchto dějů je fixace oxidu uhličitého a tvorba organických sloučenin za účasti ATP a NAD(P)H vzniklých v primárních dějích fotosyntézy. Fotosyntézou přímo či nepřímo vzniklé organické sloučeniny zahrnují sacharidy, lipidy a bílkoviny. Ty jsou zdrojem potravy pro všechny živé organismy. Stejně tak vznikající kyslík je nepostradatelný pro existenci aerobních organismů (Dey *et* Harborne, 1997).

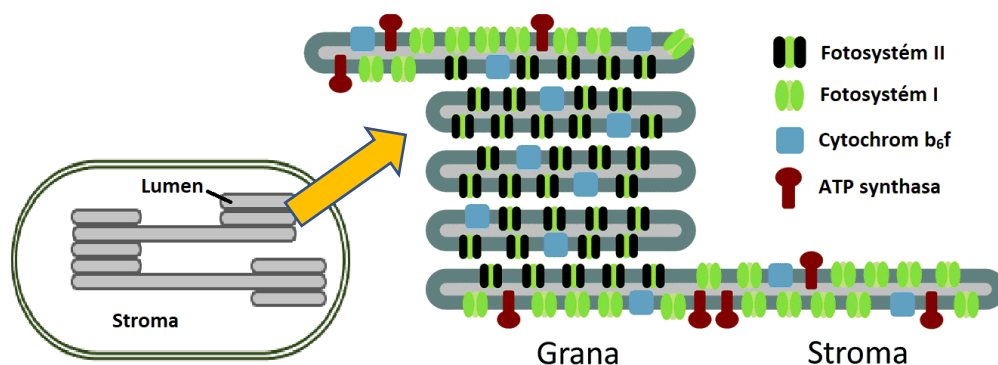
2.1 Struktura a funkce fotosyntetického aparátu rostlin

Aby bylo možné charakterizovat fotosyntetický aparát, je nutné nejprve lokalizovat místo, ve kterém se nachází. Ve vyšších rostlinách je fotosyntetický aparát primární fáze fotosyntézy zakotven v tylakoidních membránách chloroplastů. Tylakoidní membrány vytváří soustavu uzavřených plochých váčků, tylakoidů. Jejich vnitřní prostor se nazývá lumen. Tylakoidy, které na sebe přiléhají vytváří grana. Vzájemně na sebe naléhající membrány granálních tylakoidů jsou označovány jako stěsnané (granální) membrány, zatímco membrány, které přímo komunikují se stromatem chloroplastu, jsou označovány jako nestěsnané (stromální). Stěsnané a nestěsnané membrány tylakoidů vykazují rozdílné zastoupení jednotlivých fotosyntetických komponent (Procházka *et al.*, 1998).

V tylakoidní membráně chloroplastů se nachází čtyři hlavní komponenty fotosyntetického aparátu primární fáze fotosyntézy: fotosystém I (PSI), fotosystém II (PSII) spolu s kyslík vyvíjejícím komplexem (OEC), cytochrom b_6f komplex (Cyt b_6f) a ATP syntasa. Oba typy fotosystémů (I a II) jsou navíc obklopeny světlosběrnými protein-pigmentovými komplexy, označovanými jako LHCI, respektive LHCII. PSII se spolu s LHCII a OEC nacházejí převážně uvnitř gran, zatímco PSI spolu s LHCI a ATP syntasa se vyskytují na okraji gran a ve stromálních tylakoidech. Cytochrom b_6f je rozmístěn napříč celou tylakoidní membránou (Obr. 1). Mezi těmito komponentami, které jsou upevněné v membráně, zajišťují přenos elektronů mobilní přenašeče: plastocyanin (PC), ferredoxin (Fd) a plastochinon (PQ) (Procházka *et al.*, 1998; Dekker *et* Boekema, 2005). Komponenty fotosyntetického aparátu jsou sériově zapojeny v lineárním elektronovém transportu.

Ten začíná fotoindukovanou oxidací vody katalyzovanou PSII. Elektrony jsou z PSII přenášeny přes PQ *pool* k Cyt b_6f komplexu, který působí jako protonová pumpa přes tzv. Q-cyklus (Joliot *et al.*, 2006). Elektrony jsou dále přenášeny z Cyt b_6f na elektronový přenašeč PC a poté na PSI (Malkin, 1996). Elektrony z PSI jsou přeneseny na Fd, který redukuje NAD(P)^+ na NAD(P)H prostřednictvím ferredoxin: NAD(P)^+ oxidoreduktasy (FNR) (Knaff, 1996).

Vyjma zmíněných komponent se v tylakoidní membráně vyskytují také další bílkovinné komponenty, které zprostředkovávají cyklický elektronový transport, a to PROTON GRADIENT REGULATION (PGR5) komplex, PGR5-LIKE1 (PGRL1) komplex a NAD(P)H dehydrogenasový komplex. Tyto komplexy jsou lokalizovány ve stromálních tylakoidech, kde funkčně interagují s PSI jako donorem elektronů (Kramer *et al.*, 2004; Munekage *et al.*, 2004; Rumeau *et al.*, 2007; Hertle *et al.*, 2013; Shikanai, 2016). Během cyklického elektronového transportu jsou prostřednictvím uvedených komplexů elektrony z NAD(P)H nebo Fd recyklovány zpět na PQ. Lineární i cyklická elektronová dráha jsou spojeny s přenosem protonů přes tylakoidní membránu. Vzniká tak gradient pH, čehož využívá ATP synthasa k tvorbě ATP (Nelson *et Yocum*, 2006).



Obrázek 1: Schéma chloroplastu a tylakoidní membrány, ve které jsou zobrazeny základní komponenty fotosyntetického aparátu. Fotosystém I se spolu s ATP synthasou nachází na okraji gran a ve stromálních tylakoidech, fotosystém II se nachází pouze uvnitř gran. Cytochrom b_6f je umístěn ve všech částech membrány. Převzato a upraveno z Rasmussen *et Minteer* (2014).

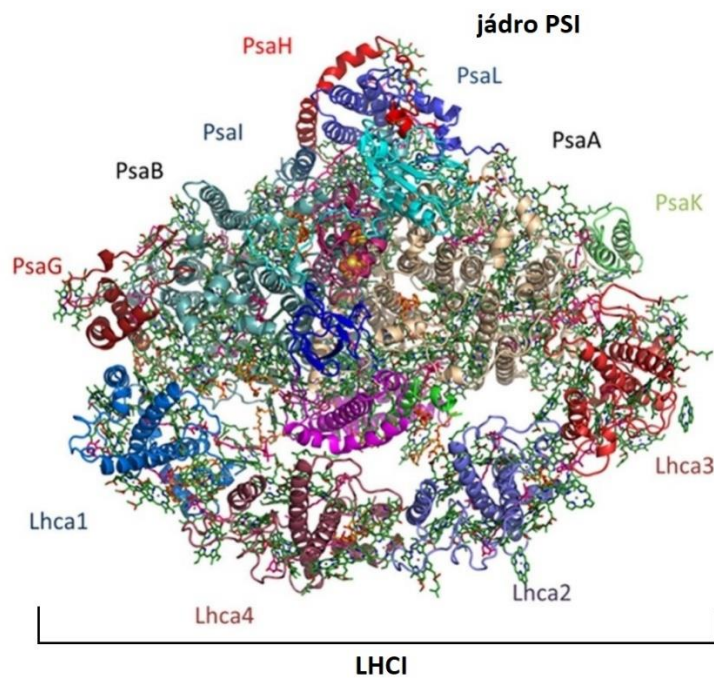
2.2 Fotosystém I

Fotosystém I je jedním ze dvou membránově-vázaných fotosystémů sinic, řas a rostlin, kde plní funkci světlem indukované ferredoxin-reduktasy (Jensen *et al.*, 2007). Fotosystém I se vyvinul před více než 3,5 miliardami let z jednoduché homodimerické struktury do složitějšího aparátu obsahujícího heterodimerické jádro (Busch *et Hippler*, 2011). Podle informací z molekulárně-biologických a fylogenetických analýz PSI předcházela vzniku sinic

a mohl se vyvinout z organismů podobných dnešním zeleným a tzv. klouzavým bakteriím (Büttner *et al.*, 1992a; Burke *et al.*, 1993; Liebl *et al.*, 1993; Blank, 2004).

2.2.1 Struktura fotosystému I

Fotosystém I vyšších rostlin se skládá z jaderného komplexu (reakčního centra) a světlosběrného komplexu I (LHCI). Jádro rostlinného PSI je podobné jádru PSI vyskytujícímu se u sinic, zatímco LHCI je pro rostliny a zelené řasy unikátní (Amunts *et al.*, 2010). Světlosběrný komplex je tvořen soustavou fotosyntetických pigmentů vázaných na proteiny, které absorbují světelnou energii a přenášejí ji do jaderného komplexu. V jaderném komplexu pak probíhá největší část fotochemických reakcí, využívajících energii světelných kvant k přenosu elektronů z PC na Fd (Jensen *et al.*, 2007; Amunts *et Nelson*, 2008). Izolace a následná charakterizace rostlinného PSI byla poprvé provedena Andersonem *et Boardmanem* v roce 1966. O několik let později byla zveřejněna i studie o podjednotkovém složení purifikovaného komplexu PSI (Bengis *et Nelson*, 1975). Od této doby bylo publikováno mnoho dalších studií zabývajících se funkcí a analýzou struktury PSI. Analýza struktury PSI byla provedena řadou technik, nicméně nejdetailnější informace o struktuře tohoto superkomplexu poskytla rentgenová strukturní analýza (Ben-Shem *et al.*, 2003; Nelson *et Ben-Shem*, 2004; Nelson *et Yocum*, 2006; Mazor *et al.*, 2015). První rentgenová strukturní analýza rostlinného PSI byla zveřejněna v roce 2003 v rozlišení 4,4 Å. Analýza tohoto superkomplexu odhalila 12 jaderných podjednotek (PsaA–PsaL), 4 podjednotky LHCI (Lhc1–4) sestavené do struktury poloměsíčitého tvaru lokalizované na jedné straně jádra PSI, 45 transmembránových helixů, 3 Fe-S klastry a 2 fylochinony (Ben-Shem *et al.*, 2003). Další rentgenové strukturní analýzy provedené o několik let později, s rozlišením 3,4 Å (Amunts *et al.*, 2007) a následně 3,3 Å (Amunts *et al.*, 2010), umožnily odhalit celkově 17 podjednotek PSI. Detailnější informace o struktuře PSI přinesla rentgenová strukturní analýza provedená v rozlišení 2,8 Å (Mazor *et al.*, 2015), viz Obr. 2, a později v rozlišení 2,6 Å (Mazor *et al.*, 2017). Tato nejnovější struktura PSI v rozlišení 2,6 Å je složena z 16 podjednotek, 45 transmembránových helixů a 232 prostetických skupin včetně 143 chlorofylů *a*, 13 chlorofylů *b*, 27 β-karotenů, 7 luteinů, 2 xanthofilů, 1 zeaxanthinu, 20 monogalaktosyl diglyceridů, 7 fosfatidyl diglyceridů, 5 digalaktosyl diglyceridů, 2 vápenatých iontů, 2 fylochinonů a 3 Fe-S klastrů (Mazor *et al.*, 2017).



Obrázek 2: Struktura rostlinného PSI-LHCI superkomplexu. Podjednotky PSI-LHCI jsou znázorněny následovně: PsaF – purpurovou, PsaJ – zelenou, PsaC – tyrkysovou, PsaD – růžovou a PsaE – modrou barvou, dva klastry (Fe-S) podjednotky PsaC jsou znázorněny žlutou a oranžovou barvou. Pohled je ze stromální strany membrány. Převzato a upraveno z Mazor *et al.* (2015).

2.2.1.1 Jádro fotosystému I

Jádro PSI vyšších rostlin je tvořeno 12 stabilními podjednotkami označenými jako PsaA až PsaL. Za součást jádra PSI jsou považovány i podjednotky PsaN až PsaP a podjednotka PsaR, které jsou však k jádru vázány slabě (Bem-Shem *et al.*, 2003; Amunts *et al.*, 2007, 2010; Mazor *et al.*, 2015). Podjednotky jádra PSI jsou kódovány chloroplastovými geny (PsaA-C, -I a -J) a jadernými geny (Psa-D-H, -K, -L, -N, -O a -P) (Goldbeck *et al.*, 1991; Knoetzel *et al.*, 1992; Knoetzel *et al.*, 2002; Hansson *et al.*, 2003).

Podjednotky PsaA (84 kDa) a PsaB (83 kDa) tvoří heterodimer, který je středem jádra PSI. Zajímavostí je, že se tento heterodimer vyvinul z homodimerního předka, a to genovou duplikací ancestrálního genu (Blankenship, 1992; Büttner *et al.*, 1992b; Ben-Shem *et al.*, 2004a). Lze ho izolovat jako komplex, jenž je označován jako chlorofyl *a*-komplex 1 (CP1). Každá z podjednotek je tvořena 11 transmembránovými helixy. Obě tyto podjednotky zprostředkovávají vazbu chlorofylového dimeru P₇₀₀, primárních elektronových akceptorů A₀ a A₁ a dále redoxního centra F_x. Dohromady váží okolo 80 chlorofylů, které fungují jako vnitřní světlosběrné antény (Scheller *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2007; Amunts *et al.*, 2009). Malé stromální podjednotky PsaC (9 kDa), PsaD (18 kDa) a PsaE (10 kDa), které jsou mezi sebou v těsném kontaktu, tvoří vazebné místo pro Fd. Zatímco PsaD a PsaE neváží žádný kofaktor, PsaC podjednotka váže terminální elektronový akceptor F_A a F_B

(Hayashida *et al.*, 1987; Hoj *et al.*, 1987). PsaD je pravděpodobně nezbytná pro elektrostatické vedení Fd k vazebné kapse PSI, PsaE hraje roli při stabilizaci konečného komplexu transportujícího elektrony a PsaC vytváří těsný proteinový kontakt potřebný pro rychlý transport elektronů mezi Fe-S klastrem Fd a terminálním elektronovým akceptorem (F_A a F_B) PSI (Busch *et al.*, 2011). Podjednotka PsaF (17 kDa) váže PC (Farah *et al.*, 1995; Scheller *et al.*, 2001) a umožňuje přechod excitační energie z LHCI do jádra PSI (Haldrup *et al.*, 2000). PsaG (11 kDa) a PsaK (9kDa) jsou malé membránové podjednotky, které jsou sekvenčně a strukturně velmi podobné. Jsou umístěny ve dvou „rozích“ jádra PSI a vytváří dva body, kterými se připojují k LHCI (Mazor *et al.*, 2017). Jejich další důležitou funkcí je stabilizace PSI (Varotto *et al.*, 2002). Podjednotky PsaH (10 kDa), PsaK, PsaL (18 kDa), PsaO (10 kDa) a pravděpodobně i podjednotky PsaP (14 kDa) a PsaI (4 kDa) zprostředkovávají interakci PSI s fosforylovaným LHCI při stavových přechodech (Lunde *et al.*, 2000; Scheller *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). PsaH podjednotka je tvořena jedním hydrofobním transmembránovým helixem (Buchanan *et al.*, 2015). Podjednotka PsaL představuje hydrofobní integrální membránový protein (Scheller *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2007; Buchanan *et al.*, 2015). U sinic tato podjednotka hraje důležitou roli v trimerizaci PSI (Chitnis *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 2001). U vyšších rostlin je tato funkce eliminována PsaH podjednotkou (Ben-Shem *et al.*, 2003). PsaO podjednotka je tvořena dvěma transmembránovými helixy (Knoetzel *et al.*, 2002). Její vazba k PSI je závislá na přítomnosti podjednotek PsaH a PsaL (Jensen *et al.*, 2007; Buchanan *et al.*, 2015). Hydrofobní podjednotka PsaP je tvořena malým integrálním proteinem a nachází se v blízkosti podjednotek PsaL, PsaH a PsaO (Jensen *et al.*, 2007). PsaJ je hydrofobní podjednotka s nízkou molekulovou hmotností a je tvořena jedním transmembránovým helixem (Jordan *et al.*, 2001; Ben-Shem *et al.*, 2003). Váže dvě molekuly chlorofylu a leží v blízkosti PsaF podjednotky (Jordan *et al.*, 2001; Ben-Shem *et al.*, 2003). Tato podjednotka se zdá být nezbytnou pro stabilizaci a sestavení PSI komplexu a vazbu PC k PSI komplexu (Hansson *et al.*, 2007). Podjednotka PsaI (4 kDa) představuje hydrofobní protein s nízkou molekulovou hmotností, který je tvořený jedním transmembránovým helixem (Scheller *et al.*, 2001) a plní roli ve stabilizaci vazebného místa pro vazbu LHCI (Plöckinger *et al.*, 2016). PsaN podjednotka je jedinečná pro eukaryotické organismy (Vanselow *et al.*, 2009), a je také jedinou podjednotkou vnější membrány PSI, která je lokalizovaná pouze na lumenální straně (Nielsen *et al.*, 1994). Tato podjednotka se nachází blízko oblasti podjednotek PsaA, PsaF a PsaJ, kde vyplňuje prostor mezi Lhca2 a PsaA podjednotkou a pravděpodobně zprostředkovává spojení těchto subkomplexů (Jansson *et al.*, 1996; Haldrup *et al.*, 2000;

Hansson *et al.*, 2007; Xiaowei *et al.*, 2018). PsaN podjednotka je složena ze tří helixů a váže dva chlorofyly (Xiaowei *et al.*, 2018). Spolu s PsaJ podjednotkou se účastní vazby k PC (Fischer *et al.*, 1999; Haldrup *et al.*, 1999). PsaR je malá periferní podjednotka tvořená transmembránovým helixem. PsaR je umístěna mezi podjednotkami PsaK a Lhca3, což naznačuje, že by se mohla podílet na stabilizaci vazby LHCI k PSI (Amunts *et al.*, 2007, 2010).

2.2.1.2 Světlosběrný komplex fotosystému I

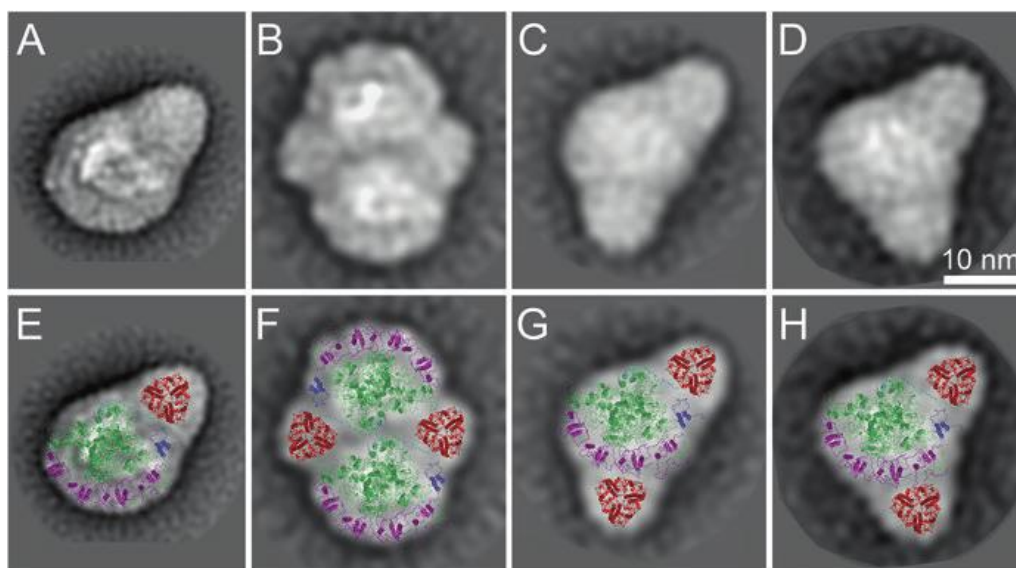
Na rozdíl od jádra vykazuje LHCI komplex vysokou variabilitu ve velikosti, podjednotkovém složení a množství vázaných pigmentů, což je způsobeno velkým množstvím různých biotopů, v nichž se fotosyntetické organismy vyskytují (Ben-Shem *et al.*, 2003).

U vyšších rostlin je LHCI tvořen 6 proteinovými podjednotkami Lhca1-6, které jsou kódovány stejnojmennými jadernými geny (Jensen *et al.*, 2007). Lhca1-4 podjednotky tvoří komplex srpkovitého tvaru na PsaF/PsaJ straně jádra PSI a zprostředkovávají absorpci a následný transport světelných kvant do jádra PSI (Boekema *et al.*, 2001; Ben-Shem *et al.*, 2003; Amunts *et al.*, 2007, 2010). Podjednotky Lhca1 a Lhca4 tvoří dimer LHCI-730, zatímco podjednotky Lhca2 a Lhca3 tvoří dimer LHCI-680 (Knoetzel *et al.*, 1992; Jansson *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 1997; Ihalainen *et al.*, 2000; Croce *et al.*, 2002). Lhca2 a Lhca3 mohou tvořit rovněž homodimery (Castelletti *et al.*, 2003). Lhca1 anténní podjednotka (22 kDa) se váže k jádru PSI přes PsaB a PsaG podjednotku (Jensen *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2006). Interakce mezi podjednotkou Lhca4 (22 kDa) a jádrem PSI je zprostředkována pomocí vazby k PsaF. Interakce mezi podjednotkou Lhca2 (23 kDa) a jádrem PSI je umožněna pomocí vazby k PsaJ a PsaA. Vazba mezi Lhca4 a Lhca2 je navíc zprostředkována pomocí chlorofylů umístěných v mezeře mezi oběma proteiny (Haldrup *et al.*, 2000; Hansson *et al.*, 2007; Schöttler *et al.*, 2007; Amunts *et al.*, 2010). Podjednotka Lhca3 (25 kDa) interaguje s podjednotkou PsaA a PsaK jádra PSI (Jensen *et al.*, 2002; Amunts *et al.*, 2010; Mazor *et al.*, 2015). Podjednotky Lhca5 (24 kDa) a Lhca6 (25 kDa), které jsou oproti ostatním Lhca podjednotkám exprimovány na nízké úrovni, zprostředkovávají vazbu k NAD(P)H komplexu (Klimmek *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2009).

2.2.2 Stavové přechody fotosystému I

Jak již bylo zmíněno, rostlinné PSI a PSII obsahují mimo jádra také periferní antény složené z LHC. LHCI (obsahující apoproteiny Lhca) jsou asociovány s jádrem PSI a tvoří komplex PSI-LHCI, zatímco LHCI (obsahující apoproteiny Lhcb) jsou většinou připojeny

k jádru PSII a tvoří komplex PSII-LHCII. Anténní systémy PSI a PSII mají různé složení pigmentů, a tedy rozdílné světelné absorpční vlastnosti. Vyvážený sběr světla je zásadní pro účinnost fotosyntézy. Rostliny si proto vyvinuly mechanismy pro krátkodobé i dlouhodobé přizpůsobení neustále se měnícím světelným podmínkám v prostředí. Mezi krátkodobé mechanismy, trvající v časovém měřítku několika minut, patří právě stavové přechody (Kargul *et Barber*, 2008; Rochaix *et al.*, 2012; Xiaowei *et al.*, 2018). Studie provedená v roce 2013 Wientjes *et al.* nicméně prokázala, že sdružení LHCII s PSI se vyskytuje také při dlouhodobé aklimatizaci, a to konkrétně u *Arabidopsis thaliana*. Stavové přechody umožňují vyvážené rozložení energie mezi oběma fotosystémy při změně kvality či množství světla. Během stavových přechodů v rostlinách je trimerní LHCII, složený z různých kombinací Lhcb1-3, reverzibilně fosforylován a defosforylován procesem řízeným redoxním stavem PQ a je regulován chloroplastovou kinázou (STN7) a fosfatázou (PPH1) (Rochaix *et al.*, 2012; Goldschmidt-Clermont *et Bassi*, 2015). Ve stavu 1 jsou LHCII spojeny převážně s PSII a přenášejí excitační energii k jádru PSII. Při světelných podmínkách, které podporují excitaci PSII, vede nadměrná exprese PSII k redukci PQ *poolu*, aktivaci kinázy STN7 a následně k fosforylaci N-koncové oblasti LHCII. (Bellafiore *et al.*, 2005; Frenkel *et al.*, 2007; Tikkanen *et al.*, 2010). Část fosforylovaných LHCII ve formě trimerů se přesunuje k PSI, kde se váže na oblast obsahující podjednotky PsaK a PsaL za vzniku superkomplexu PSI-LHCI-LHCII (Kouřil *et al.*, 2005b; Galka *et al.*, 2012). Studie provedená v roce 2015 Bellem *et al.* spolu se studií provedenou Bensonem *et al.* v téže roce však prokázaly schopnost PSI vázat více než jeden LHCII trimer. Tento poznatek koreluje se studií provedenou Yadavem *et al.* z roku 2017, ve které bylo zjištěno, že PSI-LHCII superkomplex váže další trimer LHCII ve dvou pozicích na LHCI straně superkomplexu, a to prostřednictvím Lhca2/Lhca3 nebo Lhca4/Lhca2, viz Obr. 3.



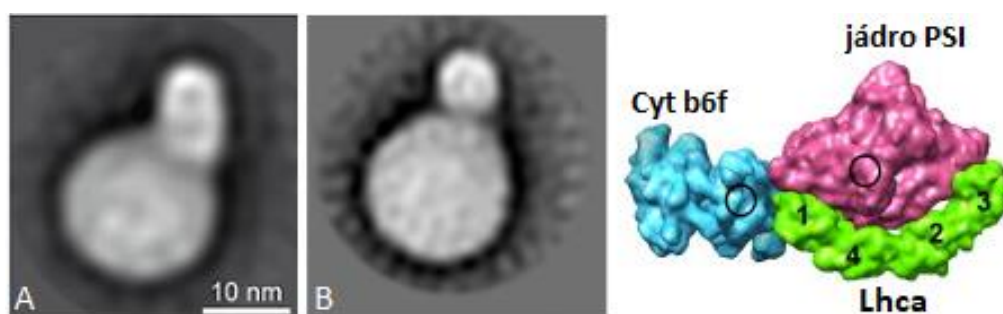
Obrázek 3: Projekční mapy PSI-LHCII superkomplexů izolovaných z *Arabidopsis thaliana* získaných elektronovou mikroskopií a obrazovou analýzou. Na snímku A je zachycen PSI-LHCII superkomplex, na snímku B dimerní forma PSI-LHCII superkomplexu a na snímcích C a D PSI-LHCII superkomplexy s dalším navázaným LHCII trimerem. Snímky E-F představují PSI-LHCII doplněné strukturou rostlinného PSI komplexu ze studie Mazora *et al.* (2015), kde je jádro PSI znázorněno zelenou barvou, PsuH podjednotka tyrkysovou, PsuK podjednotka modrou, LHCI purpurovou a strukturou LHCII trimeru (červená barva) ze studie Standfusse *et al.* (2005). LHCII trimer se váže na jaderný komplex PSI na místě podjednotek PsuH/PsuK (E, F), další trimer LHCII se připojuje k PSI komplexu v oblasti LHCI. Převzato z Kouřil *et al.* (2018).

Mimo schopnost PSI interagovat s LHCII za tvorby PSI-LHCII byla zjištěna i schopnost PSI interagovat s dalšími fotosyntetickými komplexy, jako je Cyt b_6f komplex či NAD(P) dehydrogenasový komplex (Iwai *et al.*, 2010; Kouřil *et al.*, 2014).

2.2.3 Interakce fotosystému I s cytochrom b_6f komplexem

Interakce komplexu Cyt b_6f s PSI dává vzniknout PSI-Cyt b_6f superkomplexu, jenž hraje roli v cyklické elektronové transportní dráze. Interakce těchto dvou komplexů byla poprvé zaznamenána u *Chlamydomonas reinhardtii* (Iwai *et al.*, 2010). Superkomplex PSI-Cyt b_6f u vyšších rostlin, konkrétně u *Arabidopsis thaliana*, vyizoloval a popsal Yadav *et al.* v roce 2017. Cytochrom b_6f se podle autorů studie váže ve formě monomeru a dimeru, ale pouze dimerní forma Cyt b_6f komplexu je považována za aktivní (Croce *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2017). Monomer či dimer Cyt b_6f komplexu se váže na LHCI straně PSI, kde se nachází podjednotka Lhca1 (Obr. 4). Tento způsob vazby nebrání navázání trimeru LHCII na Lhca2-4. Cytochrom b_6f komplex se navazuje na PSI svou kratší stranou. To podle autorů také vysvětluje, proč je PSI-Cyt b_6f superkomplex náchylný k disociaci. Takovéto propojení komplexů má ale pravděpodobně svůj význam. Malá

vzdálenost, která vznikne mezi komplexy, umožňuje PC, který funguje jako transportér elektronů, snadnější přenos elektronů mezi PSI a Cyt b₆f (Yadav *et al.*, 2017).



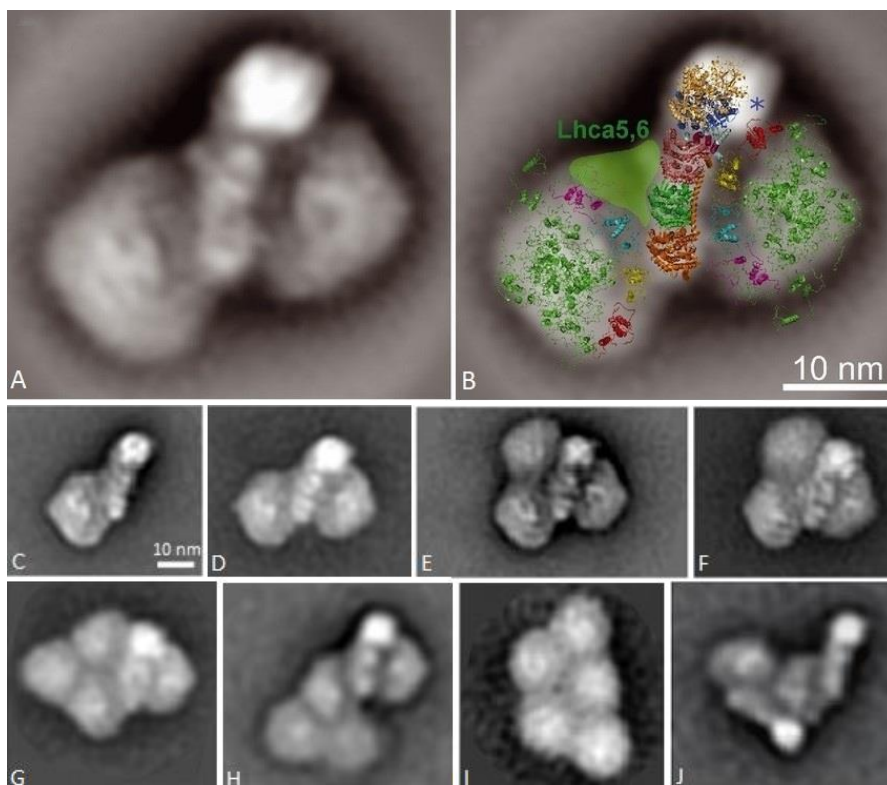
Obrázek 4: Snímky A a B získané z elektronové mikroskopie představující PSI-Cyt b₆f superkomplexy. Na snímku A je vyobrazen superkomplex PSI s navázaným dimerem Cyt b₆f komplexu. Na snímku B je vyobrazen superkomplex PSI s navázaným monomerním Cyt b₆f komplexu. V pravé části je vyobrazen model PSI s navázaným monomerním Cyt b₆f superkomplexu. Jádru PSI je znázorněno fialovou barvou, LHCI zelenou barvou a Cyt b₆f komplex. Černé kroužky představují oblasti vázajících plastocyanin. Převzato a upraveno z Yadav *et al.* (2017).

2.2.4 Interakce fotosystému I s NAD(P)H dehydrogenasovým komplexem

Dalším fotosyntetickým komplexem, se kterým PSI interaguje, je NDH (NAD(P)H dehydrogenasa) komplex, jenž hraje roli v jedné z drah cyklického elektronového transportu. NDH-dependentní dráha cyklického elektronového transportu je důležitá v ochraně rostlin před oxidativním stresem způsobeným nadměrnou redukcí stromatu a také pro udržení elektronového transportu u rostlin vystavených nízké intenzitě světla (Peng *et al.*, 2009; Yamori *et al.*, 2015). NDH je velký proteinový komplex, který je složený z 29 podjednotek. Tyto podjednotky mohou být rozděleny do 5 subkomplexů: membránového subkomplexu (NdhA-G) a subkomplexu A (NdhH-O), které dohromady tvoří kostru tohoto komplexu, subkomplexu B (PnsB1-5) a lumenálního subkomplexu (PnsL1-5), které zajišťují stabilitu komplexu a subkomplexu E (NdhS-V) tvořícího vazebné místo pro Fd (Peng *et al.*, 2009; Battchikova *et al.*, 2011; Ifuku *et al.*, 2011; Shikanai *et al.*, 2016). Vazba PSI k NDH je nutná k udržení stability NDH komplexu, a to zejména při působení stresových faktorů, jakými jsou například vysoká či nízká intenzita světla (Peng *et al.*, 2011).

Existence PSI-NDH superkomplexu byla popsána v roce 2008 Pengem *et al.*, kdy se podařilo získat PSI-NDH superkomplex použitím modré nativní elektroforézy (BN-PAGE). Následovaly studie provedené na mutantech *Arabidopsis thaliana*, které odhalily, že se PSI k NDH komplexu váže přes Lhca5 a Lhca6 podjednotky (Peng *et al.*, 2009), a že se k jednomu NDH komplexu mohou vázat až dvě kopie PSI (Peng *et al.*, 2011). První strukturu PSI-NDH superkomplexu, získaného z ječmene pomocí bezbarvé nativní

elektroforézy (CN-PAGE), zveřejnil ve své studii Kouřil *et al.* (2014). Tento superkomplex byl složen z NDH komplexu, na kterém byly navázány dvě kopie PSI (Obr. 5). Studium PSI-NDH superkomplexu se ve své práci zabýval i Yadav *et al.* (2017). V této studii bylo zjištěno, že je NDH komplex schopen vázat až šest komplexů PSI. Zajímavou informací o PSI-NDH superkomplexu přinesla studie Kouřila *et al.* (2018). Autoři zde popsali unikátní spojení dvou PSI s dvěma komplexy NDH, a uvádí, že by tyto komplexy mohly v tylakoidní membráně vytvářet rozsáhle PSI-NDH klastry (Kouřil *et al.*, 2018).



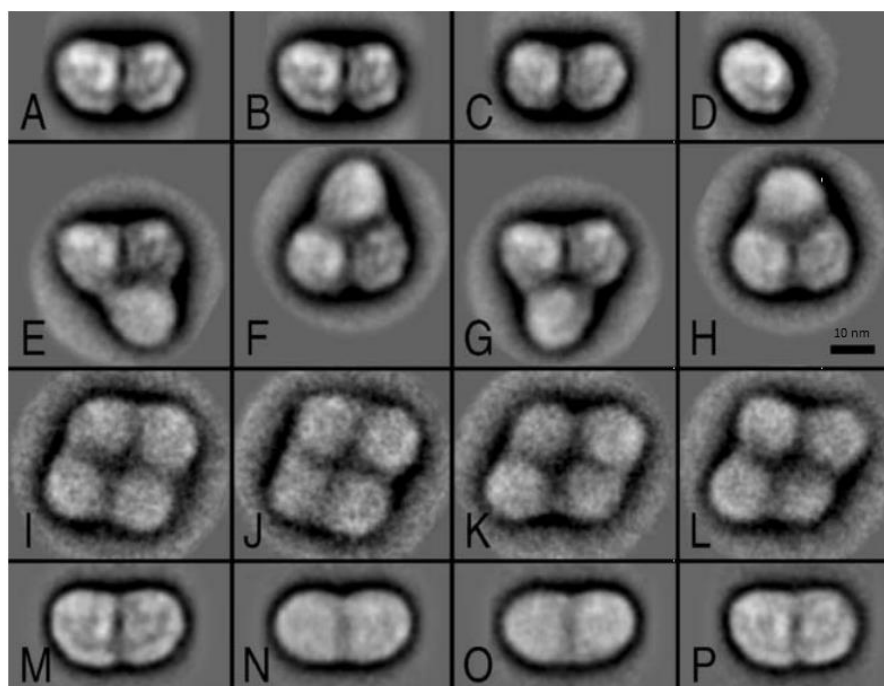
Obrázek 5: Snímky se strukturou PSI-NDH superkomplexu získané pomocí elektronové mikroskopie a obrazové analýzy. Snímek A znázorňuje strukturu NDH komplexu, na kterém jsou navázány dvě kopie PSI. Snímek B znázorňuje krystalovou strukturu PSI-NDH superkomplexu. PSI je znázorněn zelenou barvou, Lhca1 červenou barvou, Lhca2 azurovou barvou, Lhca3 fialovou a Lhca4 žlutou barvou. Podjednotky NDH jsou znázorněny následovně: NdhF oranžovou barvou, NdhD zelenou barvou, NdhB lososovou barvou, NdhE růžovou barvou, NdhG azurovou barvou, NdhA a NdhC modrou barvou. Hvězdička modré barvy znázorňuje oblast hydrofilního ramene. Převzato a upraveno z Kouřil *et al.* (2014). Snímky C-J představují různé formy PSI-NDH superkomplexu. Snímek C znázorňuje PSI₁-NDH superkomplex, snímek D PSI₂-NDH superkomplex, snímek E PSI₃-NDH superkomplex, snímek F PSI₃-NDH superkomplex v mírně nakloněné pozici, v níž je horní levý PSI komplex větší než pravý PSI komplex, snímky G a H PSI₄-NDH superkomplexy, snímek I největší možný schématický model PSI₆-NDH superkomplexu a snímek J dimeru PSI-NDH superkomplexu. Převzato a upraveno z Yadav *et al.* (2017) a Kouřil *et al.* (2018).

Fotosystém I se k dalšímu PSI může navázat i přímo, aniž by došlo k jejich spojení přes NDH komplex, a to za vzniku oligomerních komplexů PSI (Hladík *et al.*, 1982; Takahashi *et al.*, 1982; Boekema *et al.*, 2001; Kouřil *et al.*, 2005a).

2.2.5 Oligomerní komplexy fotosystému I

První oligomerní komplexy PSI byly získány ze sinic v roce 1982 ve studiích Takahashiho *et al.* a Hladíka *et al.*, ve kterých se podařilo získat řadu oligomerních forem tohoto komplexu, a o několik let později i ve studii Boekema *et al.* (1987), ve které byly získány trimerní formy PSI. Zůstávalo ovšem nejasné, zda se jedná o přirozeně se vyskytující formy PSI či o agregáty vzniklé z monomerních PSI při izolaci (Shubin *et al.*, 1993). Až krystalová struktura PSI trimeru, izolovaného ze *Synechococcus elongatus*, odhalila detaily o tvorbě PSI trimeru a potvrdila tak přirozený výskyt tohoto oligomeru PSI u sinic (Jordan *et al.*, 2001). Tato struktura navíc odhalila, že k trimerizaci PSI u sinic je nutná podjednotka PsaL.

Fotosystém I vyšších rostlin se vyskytuje přirozeně ve své monomerní formě (Boekema *et al.*, 2001; Kouřil *et al.*, 2005a). Byly však nalezeny oligomerní komplexy PSI ve formě dimerů, trimerů a tetramerů, podobné oligomerním komplexům PSI sinic (Boekema *et al.*, 1987; Semchonok *et al.*, 2016). Nicméně detailní analýza ukázala, že se všechny oligomerní komplexy PSI vyskytují v takových konfiguracích, které nejsou kompatibilní s funkcí PSI *in vivo*, a tedy že se jedná pravděpodobně o artefakty vzniklé *in vitro* z purifikovaného monomerního PSI (Boekema *et al.*, 2001; Kouřil *et al.*, 2005a) (Obr. 6). Dosavadní publikovaná data tedy naznačují, že se rostlinný PSI vyskytuje jako monomer *in vivo*, na rozdíl od PSI sinic, kde se vyskytuje jako trimer (Chitnis, 2001). V krystalové struktuře rostlinného PSI se totiž podjednotka PsaH, která se u sinic nevyskytuje a u rostlin je nezbytná k vazbě LHCI k PSI během stavových přechodů (Lunde *et al.*, 2000), váže na podjednotku PsaL, což může být důvodem blokace trimerizace PSI v rostlinách (Ben-Shem *et al.*, 2004b; Nelson *et al.*, 2005; Amunts *et al.*, 2008; Amunts *et al.*, 2009).



Obrázek 6: Snímky se zachycenými monomerními a multimerními formami komplexů PSI. Snímky A-L jsou získány pomocí elektronové mikroskopie a obrazové analýzy z PSI izolovaných ze špenátu. Snímky A–C znázorňují uměle vytvořené dimery obsahující nahoře a dole navázaný monomer, snímek D monomerní formu PSI, snímky E-H uměle vytvořené trimery PSI a snímky I-L uměle vytvořené tetramery PSI různého tvaru. Snímky M-P získané elektronovou mikroskopií s následnou obrazovou analýzou představují uměle vytvořené dimery PSI izolované z *Arabidopsis thaliana*. Převzato a upraveno z Kouřil *et al.* (2005a).

2.3 Fotosystém II

Fotosystém II (PSII) je velký multipodjednotkový komplex, vyskytující se stejně jako PSI v tylakoidní membráně vyšších rostlin, řas a sinic, kde zprostředkovává světlem řízenou redukci PQ a oxidaci vody (Hankamer *et al.*, 1997). Důkazy z fosilních nálezů naznačují, že organismy, které obsahovaly PSII, se na Zemi objevily před více než 3 miliardami let, což následně vedlo ke vzniku atmosféry bohaté na kyslík (Govindjee *et al.*, 2010). Stejně jako PSI se i PSII pravděpodobně vyvinul ze struktury obsahující homodimerické jádro do nynější struktury s heterodimerickým jádrem (Rutherford *et Faller*, 2002).

2.3.1 Struktura fotosystému II

Fotosystém II se skládá z řady proteinových podjednotek, kofaktorů, chlorofylů, karotenoidů, manganového klastru, plastochinonů a lipidů (Shen, 2015). Rostlinný PSII se v tylakoidní membráně vyskytuje ve formě PSII-LHCII superkomplexů, které jsou tvořeny jaderným komplexem PSII a komplexem anténních světlosběrných proteinů – světlosběrným komplexem PSII (LHCII). Jaderný komplex PSII se vyskytuje

v tylakoidní membráně ve formě dimeru, zatímco LHCII ve formě monomeru a trimeru (Dekker *et Boekema*, 2005; Loll *et al.*, 2005).

2.3.1.1 Jádru fotosystému II

Strukturu jaderného komplexu PSII pomohla odhalit rentgenová difrakční analýza, konkrétně u termofilních sinic (Zouni *et al.*, 2001; Kamiya *et Shen*, 2003; Biesiadka *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004; Loll *et al.*, 2005). První krystalovou strukturu PSII s intaktním kyslík vyvíjejícím komplexem (OEC) v rozlišení 3,8 Å zveřejnil ve své studii Zouni *et al.* (2001). Tato studie poskytla informace o uspořádání proteinových podjednotek, kofaktorů a přinesla také informace o poloze a rozměrech manganového klastru (Zouni *et al.*, 2001). O několik let později byly publikovány další krystalové struktury jaderného komplexu PSII, získané z *Thermosynechococcus elongatus* a *T. vulcanus*, v rozlišení 3,7 Å, 3,2 Å a 3,0 Å (Kamiya *et Shen*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Biesiadka *et al.*, 2004; Loll *et al.*, 2005). V roce 2009 byla zveřejněna studie Guskova *et al.* s krystalovou strukturou PSII v rozlišení 2,9 Å, která odhalila celkem 20 proteinových podjednotek, 35 molekul chlorofylu *a*, 12 molekul karotenoidů, 25 molekul integrálních lipidů a 1 chloridový iont na monomer PSII. Novější struktura s rozlišením 1,9 Å získaná z *T. vulcanus* umožnila lokalizovat všechny atomy manganového klastru společně s jejich ligandy (Umena *et al.*, 2011). Struktura jádra rostlinného PSII byla získána pomocí kryoelektronové krystalografie v rozlišení 8-10 Å (Rhee *et al.*, 1998; Hankamer *et al.*, 1999; Hankamer *et al.*, 2001). Detailnější informace o jaderném komplexu rostlinného PSII přinesla o několik let později kryoelektronová krystalografie v rozlišení 3,2 Å (Wei *et al.*, 2016). Jaderný komplex rostlinného PSII, který se nachází v jeho centrální části, je složen ze čtyř transmembránových podjednotek: D1 (PsbA), D2 (PsbD), CP43 (PsbC) a CP47 (PsbB), ze čtyř vnějších hydrofilních proteinů: PsbO-Q a PsbTn a dvanácti nízkomolekulárních vnitřních podjednotek (PsbE, PsbF, PsbH, PsbI-M, PsbTc, PsbW, PsbX a PsbZ) (Wei *et al.*, 2016). Podjednotky D1, D2, CP43, CP47, PsbE, PsbF, PsbH, PsbI-M, PsbTc a PsbZ jsou kódovány chloroplastovými geny, zatímco podjednotky PsbO-Q, PsbTn, PsbW a PsbX jsou kódovány jadernými geny (Pagliano *et al.*, 2013).

Podjednotky D1 (38 kDa) a D2 (39 kDa) bývají též označovány jako PsbA, respektive PsbD. Každá z těchto podjednotek, které jsou si strukturně podobné, je složená z 5 helixů (Xiong *et al.*, 1996; Buchanan *et al.*, 2015). Spolu tvoří centrální heterodimer reakčního centra PSII, označovaný jako P680 (dle absorpčního maxima chlorofylu *a* v reakčním centru), který obsahuje celkem 6 molekul chlorofylu, 2 molekuly β-karotenu a 2 molekuly feofytinu (Zouni *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2016). Tento heterodimer je z obou stran obklopen

podjednotkami CP47 (56 kDa) a CP43 (50 kDa), též označovanými jako PsbB a PsbC (Hankamer *et al.*, 1999). Podjednotka CP47 váže 16 molekul chlorofylu *a* a 3 molekuly β -karotenu, zatímco podjednotka CP43 váže 13 molekul chlorofylu *a* a 3 molekuly β -karotenu. Jejich hlavní rolí je absorpce světla a přenos energie ze světlosběrného komplexu k reakčnímu centru PSII (Wei *et al.*, 2016). Podjednotky PsbE (9 kDa) a PsbF (4 kDa) jsou tvořeny 1 transmembránovým helixem. Tyto podjednotky jsou nutné k sestavení celého komplexu PSII a pravděpodobně jsou také součástí elektronového transportního mechanismu, chránícího PSII před poškozením způsobeným světlem (Swiatek *et al.*, 2003; Shi *et Schröder*, 2004). PsbH (7 kDa) je vnitřní membránová podjednotka tvořená 1 helixem (Michel *et Bennett*, 1987), která hraje roli při sestavování PSII, jeho stabilizaci a pravděpodobně má také ochrannou roli při působení vysoké intenzity světla (Bergantino *et al.*, 2003). Podjednotka PsbI (4 kDa) je tvořená 1 transmembránovým helixem. Tato podjednotka se podle Schwenkerta *et al.* (2006) účastní dimerizace a stabilizace PSII a také stabilizace PSII superkomplexů. Podjednotka PsbJ (4 kDa) je tvořena 1 helixem a uvádí se, že se jedná o jeden z nejméně hydrofobních proteinů napříč tylakoidní membránou. PsbJ podjednotka je potřebná pro připojení PsbP podjednotky k jádru PSII, a navíc je zapojena do přenosu elektronů v PSII (Shi *et Schröder*, 2004). PsbK (4 kDa) je chloroplastem kódovaná podjednotka tvořena 1 helixem. PsbK umožňuje vazbu PQ, a navíc udržuje PSII v dimerní formě (Zheleva *et al.*, 1998). V procesu dimerizace PSII hraje roli i podjednotka PsbL (4 kDa) a PsbM (4 kDa). PsbL se navíc účastní sestavování jádra PSII a přenosu elektronů (Zheleva *et al.*, 1998; Shi *et Schröder*, 2004). PsbO (33 kDa), PsbP (20 kDa) a PsbQ (17 kDa) jsou hlavními vnějšími podjednotkami jádra PSII. Dohromady tvoří strukturu tvaru trojúhelníku, která obklopuje lumenální doménu CP43 a D1 podjednotky. Jsou součástí OEC, přičemž jejich přítomnost je nutná pro stabilitu a optimální funkci tohoto komplexu generujícího kyslík (Balsera *et al.*, 2005; Umena *et al.*, 2011). PsbO podjednotka, též nazývaná jako mangan stabilizující protein, zajišťuje správnou funkci manganového klastru. Je složena z centrálního β -soudku s obsahem β -vláken a z tzv. hlavové domény (Rivas *et Barber*, 2004). Mezi fotosyntetizujícími organismy je podjednotka PsbO vysoce konzervovaná, zatímco PsbP a PsbQ jsou typicky rostlinné podjednotky (Tohri *et al.*, 2002). PsbP a PsbO umožňují vazbu chloridových a vápenatých iontů, díky čemuž vytváří optimální iontové prostředí, které je nutné pro správnou funkci OEC (Seidler, 1996). PsbTc (4 kDa) je vnitřní podjednotka tvořená transmembránovým helixem. Mezi sinicemi, řasami a vyššími rostlinami je vysoce konzervovaná (Monod *et al.*, 1994; Zheleva *et al.*, 1998). Podle Zheleva *et al.* (1998) je PsbTc podjednotka asociována s D1 a D2 podjednotkou a pravděpodobně umožňuje dimerizaci a stabilizaci PSII (Shi *et Schröder*, 2004). PsbTn

(3 kDa) je nejmenší podjednotkou jaderného komplexu PSII (Shi *et Schröder*, 2004). Je také fylogeneticky nejmladší, jelikož nebyla nalezena u sinic ani řas, a zdá se tedy, že se vyvinula během endosymbiózy u vyšších rostlin (Chen *et al.*, 2018). Podle autorů studie Chena *et al.* (2018) je primární funkcí PsbTn udržovat PSII v aktivní formě a ochrana před poškozením světlem. Nízkomolekulární podjednotka PsbW (6 kDa) se účastní stabilizace dimeru PSII (Shi *et al.*, 2000) a organizace superkomplexu PSII-LHCII (Garcia-Cerdán *et al.*, 2011). Podjednotka PsbX (4 kDa) hraje pravděpodobně roli při změně redoxního stavu na akceptorové straně PSII (Garcia-Cerdán *et al.*, 2009). Podjednotka PsbZ (7 kDa) stabilizuje superkomplexy PSII-LHCII a pravděpodobně má také fotoprotektivní funkci (Swiatek *et al.*, 2001).

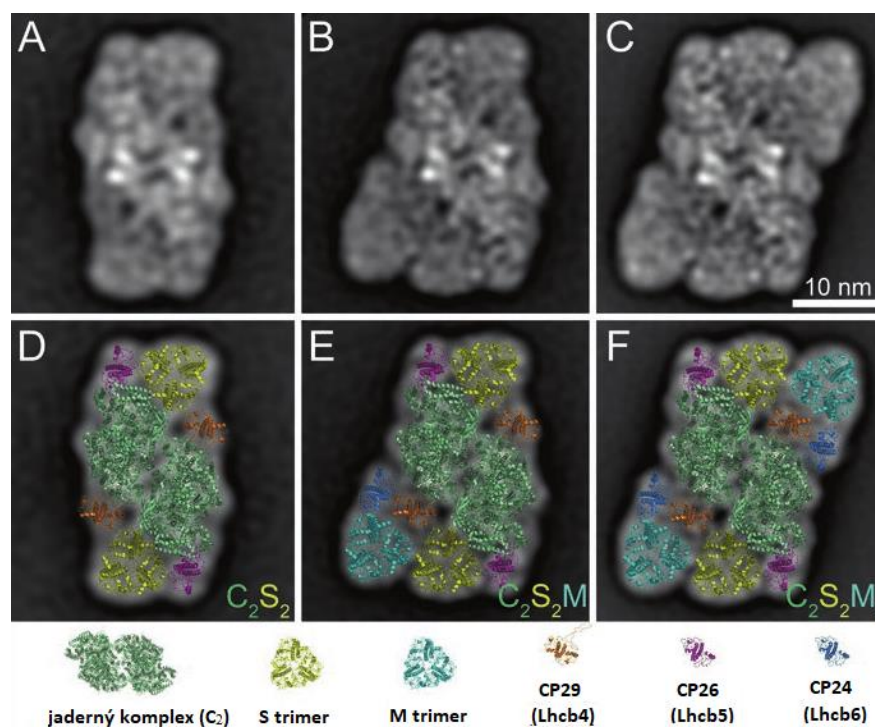
2.3.1.2 Světloběrný komplex fotosystému II

Anténní systémy, které asociují s dimerní formou jaderného komplexu PSII, vykazují napříč druhy vysokou variabilitu. U vyšších rostlin a zelených řas se vyskytují jako integrální membránové proteiny zakotvené v tylakoidní membráně, které dohromady vytvářejí světloběrný komplex PSII (LHCII) (Ballottari *et al.*, 2012; Pagliano *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013). Zajímavým faktem je, že rostlinné LHCII zaujímají asi 30 % celkového množství bílkovin v membránách chloroplastů, což je činí nejhojněji se vyskytujícími membránovými proteiny na Zemi (Peter *et Thornber*, 1991; Standfuss *et al.*, 2005). Světloběrný komplex PSII umožňuje absorpci světelné energie a přenos excitační energie do reakčního centra PSII, a navíc má ochrannou funkci, a to za podmínek vysoké intenzity osvětlení prostřednictvím mechanismu zvaného nefotochemické zhášení (Müller *et al.*, 2001). Rostlinné anténní systémy jsou představovány 6 proteinovými podjednotkami označenými jako Lhcb1-6, které jsou kódovány jaderným genomem (Jansson *et al.*, 1992). Tyto podjednotky váží různé množství molekul chlorofylů *a* a *b*, β -karotenu, xanthofylu, violoxhantinu a neoxhantinu (Sandona *et al.*, 1998; Amerongen *et Dekker.*, 2003). Lhcb1 (28 kDa), Lhcb2 (29 kDa) a Lhcb3 (29) spolu tvoří trimerní strukturu, která představuje hlavní část LHCII (Jansson, 1994; Jackowski *et al.*, 2001). Tato trimerní struktura LHCII byla získána pomocí rentgenové strukturní analýzy v roce 2004 Liuem *et al.* z rostliny špenátu, a to v rozlišení 2.72 Å a v roce 2005 z hrachu Standfussem *et al.* v rozlišení 2.5 Å. Bylo zjištěno, že podjednotky Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 tvoří heterotrimer (Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3), a že samotné podjednotky Lhcb1 a Lhcb2 mohou tvořit i homotrimery (Lhcb1)₃ nebo (Lhcb2)₃ (Jackowski *et al.*, 2001; Standfuss *et Kühlbrandt*, 2004). Lhcb4 (CP29) (31 kDa), Lhcb5 (CP26) (30 kDa) a Lhcb6 (CP24) (28 kDa) patří mezi vedlejší anténní systémy, které se vyskytují v monomerní formě (Camm *et Green*, 2004).

Podjednotka Lhcb4 interaguje s podjednotkou Lhcb6 a nachází se v blízkosti jaderné podjednotky CP47 (PsbB), zatímco podjednotka Lhcb5 je lokalizována na opačné straně komplexu blízko podjednotky CP43 (PsbC) (Dekker *et* Boekema, 2005).

2.3.2 Superkomplexy fotosystému II

Jak již bylo zmíněno výše, rostlinný PSII se v tylakoidní membráně vyskytuje ve formě superkomplexů PSII-LHCII (Dekker *et* Boekema, 2005). Tyto superkomplexy byly poprvé získány solubilizací granálních membrán za použití jemného detergentu a následně pozorovány pomocí elektronové mikroskopie (Boekema *et al.*, 1995). První strukturu rostlinného superkomplexu PSII-LHCII v rozlišení 17 Å zveřejnil ve své studii Nield *et al.* v roce 2000. S dimerní formou jádra PSII interaguje různé množství periferních anténních proteinů za vzniku těchto superkomplexů (Dekker *et* Boekema, 2005). Podle schopnosti LHCII trimerů asociovat s jaderným komplexem PSII mohou být rozděleny LHCII do tří hlavních typů: silně asociovaný (S-LHCII), mírně asociovaný (M-LHCII) a volně asociovaný (L-LHCII) trimer (Boekema *et al.*, 1999a; Boekema *et al.*, 1999b). Trimer S-LHCII, který se nachází v blízkosti podjednotky CP26, je složen z produktů genů *lhcb1* a *lhcb2* a je silně vázán k jadernému komplexu PSII (Hankamer *et al.*, 1997). Trimer M-LHCII se nachází v blízkosti podjednotek CP29 a CP24, a je tvořen produkty genů *lhcb1*, *lhcb2* a *lhcb3* (Boekema *et al.*, 1999a). Dvě kopie od každé z podjednotek CP29, CP26 spolu s dvěma kopiemi trimery S-LHCII (S_2) interagují s dimerní formou jádra (C_2) za vzniku superkomplexu C_2S_2 (Boekema *et al.*, 1995; Morosinotto, *et al.*, 2006). Superkomplex C_2S_2 může vázat další dvě podjednotky CP24 a dva trimery M-LHCII (M_2) za vzniku superkomplexu $C_2S_2M_2$, který se vyskytuje především u vyšších rostlin aklimatizovaných na nízké světelné podmínky (Boekema *et al.*, 1998; Caffarri *et al.*, 2009; Kouřil *et al.*, 2012; Amerongen *et* Croce, 2013) (Obr. 7).



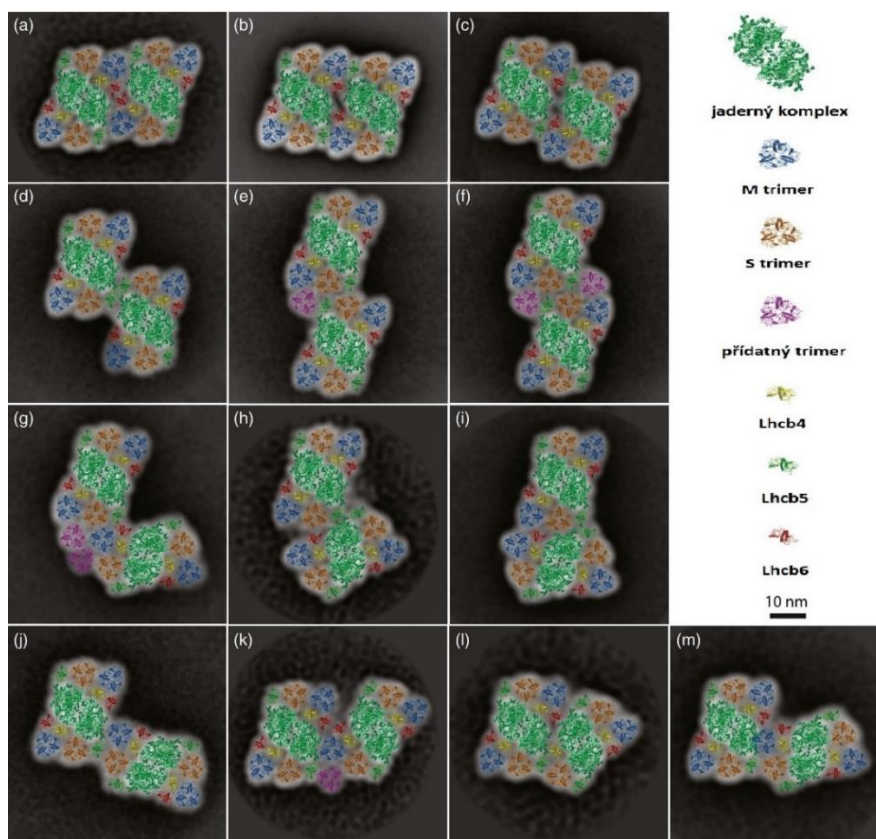
Obrázek 7: Projekční mapy superkomplexů PSII získaných z *Arabidopsis thaliana* pomocí elektronové mikroskopie a obrazové analýzy. Snímek A znázorňuje projekční mapu superkomplexu C_2S_2 , snímek B strukturu superkomplexu C_2S_2M a snímek C strukturu superkomplexu $C_2S_2M_2$. Snímky D-F znázorňují superkomplexy PSII doplněné strukturami získanými z PSII superkomplexu ze studie Caffarriho *et al.* (2009) a Wei *et al.* (2016). Podjednotky jsou znázorněny následovně: jaderný komplex – světle zelená barva, M trimer – světle modrá barva, S trimer – žlutá barva, Lhcb4 – oranžová barva, Lhcb5 – fialová barva a Lhcb6 – tmavě modrá barva. Převzato a upraveno z Kouřil *et al.* (2018).

V tylakoidní membráně mohou být přítomny také superkomplexy $C_2S_2M_2L_x$ s různým množstvím navázaných trimerů L-LHCII, a to v závislosti na podmínkách prostředí, ve kterém se rostliny nacházejí (Boekema *et al.*, 1999a; Boekema *et al.*, 1999b). Superkomplexy PSII-LHCII mohou také interagovat mezi sebou, a to za vzniku vysokomolekulárních struktur, které se označují jako megakomplexy PSII-LHCII (Boekema *et al.*, 1999a).

2.3.3 Megakomplexy fotosystému II

První struktury megakomplexů PSII-LHCII byly zveřejněny ve studii Boekemy *et al.*, (1999a; 1999b). V této studii byly čisté PSII-LHCII megakomplexy izolovány z tylakoidní membrány rostliny špenátu použitím solubilizačního činidla n-dodecyl- α -d-maltosidu s následnou ultracentrifugací na sacharosovém gradientu. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie spojené s obrazovou analýzou bylo zjištěno, že superkomplexy PSII-LHCII spolu interagují uvnitř membrány ve třech různých vazebných místech za tvorby následujících megakomplexů: megakomplex typu I ($C_4S_4M_{2-4}$) čtvercového tvaru,

megakomplexu typu II ($C_4S_4M_{2-4}$) obdélníkového tvaru, které jsou složeny ze dvou C_2S_2M superkomplexů (Boekema *et al.*, 1999a) a megakomplexu typu III (C_4S_4) tvaru větrného mlýnu, který je složený ze dvou C_2S_2 superkomplexů (Boekema *et al.*, 1999b). Další typy megakomplexů byly objeveny o několik let později u *Arabidopsis thaliana* (Yakushevskaya *et al.*, 2001) a v roce 2016 pak byla zveřejněna struktura dvou dalších megakomplexů, označených jako $(C_2S_2)_4$ a $(C_2S_2 + C_2S_2M_2)_2$ (Albanese *et al.*, 2016). Nejnovější struktury megakomplexů PSII, získaných pomocí CN-PAGE z *Arabidopsis thaliana*, zveřejnil ve své studii Nosek *et al.* (2017), viz Obr. 8. V této studii se podařilo odhalit megakomplexy vzniklé paralelním spojením dvou superkomplexů PSII prostřednictvím interakce jaderných komplexů, trimerů M-LHCII a podjednotek Lhcb5 a Lhcb6 a dalších trimerů LHCII. Mimo těchto paralelně spojených superkomplexů PSII autoři poprvé detekovali i megakomplexy s neparalelní orientací superkomplexů PSII. Vazby superkomplexů v těchto megakomplexech byly zprostředkovány podobně jako u paralelně orientovaných megakomplexů, ovšem bez zapojení některých struktur (Nosek *et al.*, 2017).



Obrázek 8: Modely megakomplexů PSII doplněné krystalovou strukturou PSII získanou ve studii Caffariho *et al.* (2009). Podjednotky jsou znázorněny následovně: jaderný komplex – světle zelená barva, M trimer – modrá barva, S trimer – oranžová barva, přídavné LHCII trimery – purpurová barva, Lhcb4 – žlutá barva, Lhcb5 – zelená barva a Lhcb6 – červená barva. Převzato a upraveno z Nosek *et al.* (2017).

Sestavení a demontáž vyšších struktur PSII, tedy superkomplexů a megakomplexů, mění velikost antény PSII, která má podstatný vliv na celkový fotochemický výtěžek (Amarnath *et al.*, 2016). Díky tomu mohou rostliny odolávat měnícím se podmínkám vnějšího prostředí (Ballottari *et al.*, 2007; Kouřil *et al.*, 2013).

2.3.4 Dvoudimenzionální krystaly fotosystému II

Superkomplexy PSII mohou tvořit, mimo megakomplexy, také struktury zvané dvoudimenzionální krystaly. Oblasti tylakoidní membrány, ve které se vyskytovaly dvoudimenzionální krystaly PSII, byly pozorovány pomocí metody mrazového lámání tylakoidních membrán ve studii Garbera *et Steponkuse* v roce 1976. Tyto krystaly mohou být tvořeny superkomplexy C_2S_2 , C_2S_2M nebo $C_2S_2M_2$ (Dekker *et Boekema*, 2005). Vznik těchto semikrystalických domén složených ze superkomplexů PSII závisí na podjednotce PsbS (Kereiche *et al.*, 2009). Jejich výskyt napříč tylakoidní membránou je dán pravděpodobně změnami vnějších podmínek, jako je například snížená teplota či nízká intenzita osvětlení (Garber *et Steponkus*, 1976; Kirchhoff *et al.*, 2007), nicméně jejich funkce není stále objasněná. Podle studie Kirchhoffa *et al.* (2007) tvorba semikrystalové struktury je strategií, jak překonat problém přeplněné membrány při nízké intenzitě světla, kdy dochází ke zvýšení množství LHCI_{II}, a snížení množství Cyt b_6f komplexu PSII. Podle studie Tietze *et al.* (2015) tvorba semikrystalové struktury umožňuje difúzi PQ či xanthofylů přes přeplněnou tylakoidní membránu, a díky tomu dochází k usnadnění elektronového transportu závislého na difúzi a fotoprotektivním, na energii závislém, zhášení.

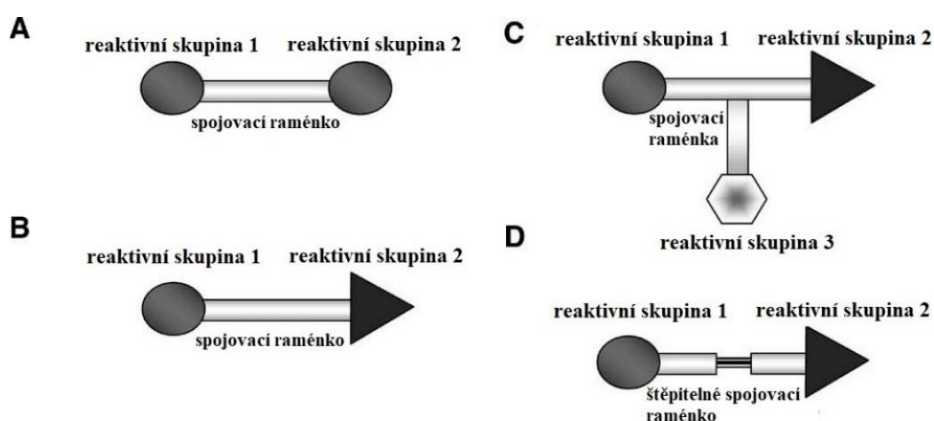
2.4 Tvorba příčných vazeb

Tvorba příčných vazeb je proces, který umožňuje spojení dvou a více molekul prostřednictvím kovalentních vazeb, které se vytvářejí prostřednictvím chemických reakcí mezi koncovými reaktivními skupinami zesíťovacích činidel a funkčními skupinami proteinů či jiných molekul (Tang *et Bruce*, 2009).

Experimenty, během nichž dochází k tvorbě příčných vazeb, je nutné důkladně naplánovat, aby se zabránilo nežádoucím vedlejším reakcím, hydrolýze činidla pro tvorbu příčných vazeb nebo změnám nativní struktury studovaných proteinů a také aby se dosáhlo co nejlepšího a maximálního výtěžku očekávaných produktů reakce. Nezbytným krokem je tedy optimalizace reakčních podmínek, jakými jsou koncentrace činidla a proteinů, volba pufru, pH, délka inkubace, teplota a především volba vhodného činidla (Kukačka, 2015).

2.4.1 Činidla pro tvorbu příčných vazeb

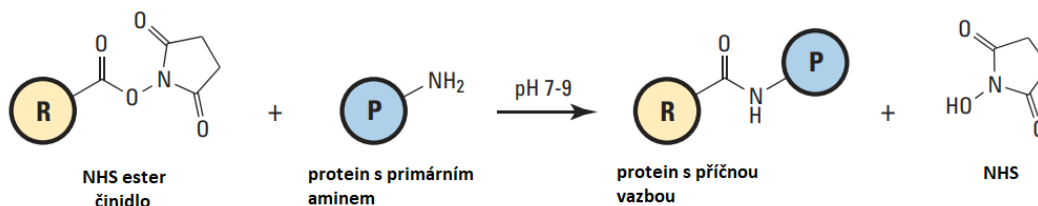
K tvorbě příčných vazeb se využívají činidla, která lze rozdělit do čtyř kategorií: homobifunkční, heterobifunkční, trifunkční a zesíťovací činidla s nulovou délkou vazby. Homobifunkční zesíťovací činidla obsahují identické funkční skupiny na obou reaktivních koncích, zatímco heterobifunkční zesíťovací činidla obsahují rozdílné koncové reaktivní skupiny. Trifunkční zesíťovací činidla jsou podobné bifunkčním, s tím rozdílem, že mají navíc třetí funkční koncovou skupinu. Funkční skupiny činidel jsou spojeny řetězcem, tzv. raménkem, které může být štěpitelné, a podle toho se tato činidla rozdělují na štěpitelná a neštěpitelná (Obr. 9). Činidla s nulovou délkou vazby umožňují spojení řetězců takovým způsobem, aniž by mezi nimi vznikla spojovací linie (Sinz, 2006).



Obrázek 9: Základní typy činidel pro tvorbu příčných vazeb. A – homobifunkční činidlo, B – heterobifunkční činidlo, C – trifunkční činidlo a D – heterobifunkční činidlo se štěpitelným spojovacím raménkem. Převzato a upraveno ze Sinz (2006).

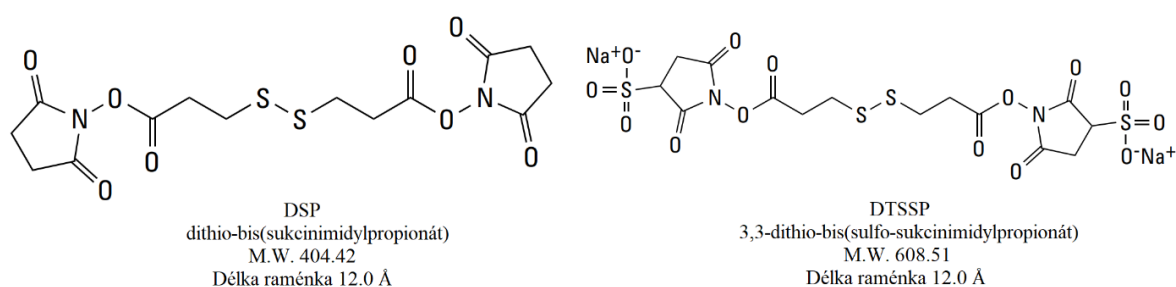
Dalším rozdělením těchto činidel může být rozdělení podle funkčních skupin, se kterými interagují: karboxy-, sulfanyl-, formyl-, hydroxy-, azido- a aminoreaktivní činidla (Thermo Scientific, 2012).

Mezi nepoužívanější aminoreaktivní činidla pro tvorbu příčných vazeb patří N-hydroxysukcinimidestery (NHS estery). Tato činidla mohou reagovat s volným N-koncem peptidového řetězce (α -amin) nebo s aminoskupinou bočního řetězce lysinu (ϵ -amin), viz Obr. 10 (Sinz, 2006; Thermo Scientific, 2012).



Obrázek 10: Reakční schéma vazby NHS esteru s primárním aminem. (R) představuje jeden z konců činidla pro tvorbu příčných vazeb s reaktivní esterovou skupinou NHS, (P) představuje protein s cílovou funkční skupinou (tj. primární amin). Převzato a upraveno z Thermo Scientific (2012).

Reakce, při které dochází k tvorbě příčných vazeb za použití NHS esterů, se provádí nejčastěji v uhličitano-hydrogenuhličitanovém, HEPES nebo fosfátovém pufru při pH 7,2 až 8,5 po dobu 30 min až 4 h, a to při laboratorní teplotě či 4 °C. K zastavení reakce se volí Tris nebo glycinový pufr. Se zvyšujícím se pH dochází k hydrolyze NHS esterů, což přispívá k méně účinnému zesílení v méně koncentrovaných roztocích proteinů (Thermo Scientific, 2012). Existují dvě skupiny těchto činidel, a to ve vodě nerozpustná a ve vodě rozpustná, která navíc obsahují sulfo skupinu. K ve vodě nerozpustným NHS-esterům patří například dithiobis(sukcinimidylpropionát) (DSP), k ve vodě rozpustným pak jeho derivát 3,3-dithiobis(sulfo-sukcinimidylpropionát) (DTSSP) (Obr. 11) (Sinz, 2006; Thermo Scientific, 2012).



Obrázek 11: Struktura NHS-esterů DSP a DTSSP. Převzato a upraveno z Thermo Scientific (2012).

Činidla pro tvorbu příčných vazeb nalézají široké uplatnění ve studiích proteinů. Využívají se při tvorbě proteinových konjugátů (například při tvorbě konjugátu protilátka-enzym), dále při immobilizaci proteinů na pevnou složku, při tvorbě příčných vazeb *in vivo*, při metabolickém značení, při zesíťování buněčných membrán, a v neposlední řadě při studiích struktury proteinů a proteinových komplexů (Thermo Scientific, 2012).

2.4.2 Využití tvorby příčných vazeb ve strukturálních studiích proteinů

Některé proteiny je obtížné studovat, a to z důvodu existence různých konformačních změn v rámci různých podmínek pH nebo solí. Jedním ze způsobů, jak se vyhnout konformačním změnám, je tvorba příčných vazeb mezi jednotlivými proteinovými podjednotkami. Pro účely lokalizace proteinových podjednotek, jejich počtu či velikosti, se nejčastěji používají aminová, karboxylová a sulfohydrylová činidla pro tvorbu příčných vazeb (Thermo Scientific, 2012).

Činidla pro tvorbu příčných vazeb byla využita v řadě studií zabývajících se organizací podjednotek fotosystémů (Armbrusta *et al.*, 1996). Jednou z prvních byla studie Enami *et al.* (1987), při které bylo využito třech činidel: glutaraldehydu, dimethyladipimidátu a

hexamethylenediisokyanátu, díky kterým se podařilo získat informace o interakcích několika podjednotek reakčního centra PSI u *Synechococcus elongatus* (Enami *et al.*, 1987). Následovalo mnoho dalších studií, které si kladly za cíl určit organizaci podjednotek PSI pomocí hydrofilních i hydrofobních činidel pro tvorbu příčných vazeb, jako je dimethyladipimidát, 3,3-dithiobis(sulfo-sukcinimidylpropionát), glutaraldehyd či hexamethylenediisokyanát (Oh-Oka *et al.*, 1989; Armbrust *et al.*, 1994; Armbrust *et al.*, 1996). I v případě studia struktury PSII bylo využito činidel pro tvorbu příčných vazeb, a to například ve studii Hana *et al.* (1994) či Odoma *et al.* (1992), kdy bylo použito činidlo 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodimid pro studium interakcí jednotlivých podjednotek PSII.

Ukázalo se, že činidla pro tvorbu příčných vazeb nalézají uplatnění nejen na úrovni proteinových podjednotek, ale i na úrovni celých fotosyntetických komplexů a interakcích mezi nimi. Tato činidla byla použita například při studiu interakcí komplexu PSI s PC (Wynn *et al.*, 1988), s Cyt b₆f (Wynn *et al.*, 1989) či Fd (Zilber *et al.*, 1988). Pomocí činidel pro tvorbu příčných vazeb byly izolovány i oligomerní formy komplexu PSI ze sinic, a to ve studii Hladíka *et al.* (1990). V této studii vedlo použití činidla DSP ke stabilizaci izolovaných PSI trimerů ze *Synechococcus elongatus*. Činidlo DTSSP bylo použito i ve studii Hea *et al.* (2014). V této studii byla činidla využita k zachování nativní struktury reakčního centra zelené sírné bakterie *Chlorobaculum tepidum*, složeného z jádra reakčního centra (RCC) a Fenna-Matthews-Olsonova anténního proteinu (FMO). Pomocí činidel pro tvorbu příčných vazeb se v této studii podařilo zachytit dva typy FMO/RCC komplexů, které zahrnovaly komplexy s jednou kopií FMO na jedno RCC a dvě kopie FMO na jedno RCC (He *et al.*, 2014).

Mimo studií zabývajících se strukturou fotosystémů byla činidla pro tvorbu příčných vazeb využita i v dalších strukturálních studiích proteinů, především pak při charakterizaci oligomerních stavů proteinů. Jedním z nejpoužívanějších činidel byl při těchto studiích glutaraldehyd (Fadouloglou *et al.*, 2007). Glutaraldehyd byl použit například při studiu histonového uspořádání jádra ve studii Hopwooda *et al.* (1972) či Sewella *et al.* (1984), dále při studiu mitochondriálních komplexů, konkrétně při studiu oligomerní formy komplexu Tim9/Tim10 (Vasiljev *et al.*, 2004) a při detekci oligomerních forem proteinů teplotního šoku (Hsp22) ve studii Morrowa *et al.* (2000).

Činidel pro tvorbu příčných vazeb bylo využito i v experimentální části této práce. Ta si kladla za cíl nalézt nové interakce mezi fotosyntetickými komplexy, které se, z důvodu nízké stability, prozatím nepodařilo nalézt. Jedná se například o možnou interakci PSI s PSII, na kterou poukazuje studie Yokona *et al.* (2015). V této studii autoři detekovali hypotetický

megakomplex PSI-PSII *Arabidopsis thaliana* za pomoci fluorescenčního měření. Použití činidel pro tvorbu příčných vazeb by mohlo strukturu tohoto megakomplexu zachovat, a umožnit tak jeho izolaci. V rámci experimentu byla použita již zmíněná činidla DTSSP a DSP. Jedná se o činidla, která jsou tvořena štěpitelným raménkem. Této vlastnosti je možné využít pro zvrácení zesíťení a následné charakterizaci proteinů či celých komplexů, které se k sobě navázaly, což je jejich nespornou výhodou.

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje a vybavení

- Analytické váhy ABT 220-5DM (Kern)
- Centrifuga 3K30 (SIGMA)
- Centrifugační filtry Amicon Ultracel 10K (Merck Millipore)
- Elektroforetická vana Mini PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD)
- Fytokomora SGC 170 (Weiss Gallenkamp)
- Gel skener Amersham Imager 600RGB (GE Healthcare Life Sciences)
- Gradientová aparatura s peristaltickou pumpou PCD21 (Kouřil, Kyjov, Česká republika)
- Homogenizátor T25 basic (IKA)
- Míchačka magnetická s ohřevem C-MAG HS 7 (IKA)
- Preparativní ultracentrifuga CP90WX (Hitachi)
- Spektrofotometr SPECORD 250 PLUS (Analytik Jena)
- Systém pro doutnavý výboj PELCO Discharge System easiGlow (Ted Pella)
- Termoblok Dry Bath Incubator MD-010 (Major Science)
- Transmisní elektronový mikroskop 2010F (JEOL)
- Třepačka výkyvná (WAVETEC)
- Vortex V-32 (Biosan)
- Zdroj stejnosměrného napětí Power Pac 1000 (BIO-RAD)

3.2 Použité chemikálie

- 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris) $\geq 99,9\%$ (Sigma)
- 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Bis-Tris) $\geq 98\%$ (Sigma)
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) (Sigma)
- Aceton $\geq 99,5\%$ (Lach:ner)
- Akrylamid $\geq 99,9\%$ (BIO-RAD)
- Aminokapronová kyselina (ACA) (Sigma)
- Askorbát sodný (Na-Asc) (Sigma)
- Coomassie blue G-250 (Serva)
- Deionizovaná voda

- Deoxycholát sodný (Sigma)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema)
- Dithiobis(sukcinimidyl propionát) (DSP) (Thermo scientific™)
- 3,3'-dithiobis(sulfo-sukcinimidyl propionát) (DTSSP) (Thermo scientific™)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) 99% (Lach:ner)
- Dodecylsíran sodný (SDS) (Fluka)
- Dodecyl- α -D-maltosidem (α DM) (AppliChem)
- Dusičnan draselný (Lachema)
- Dusičnan vápenatý, tetrahydrát (Hichem)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl (Na-EDTA) (Sigma)
- Glutaraldehyd 25% (Sigma)
- Glycerol (Lach:ner)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid hořečnatý, hexahdrát (Lach:ner)
- Chlorid sodný (Lach:ner)
- Chlorid železitý (Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (Lach:ner)
- Kyselina octová 99,8% (Lach:ner)
- Methanol 99,5% (Lach:ner)
- N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED) (BIO-RAD)
- N, N'-metylenbisakrylamid (BIO-RAD)
- N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin (Tricin) (BIO-RAD)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo scientific™)
- Peroxodisíran amonný (APS) (BIO-RAD)
- Sacharosa (Lach:ner)
- Síran hořečnatý (Lachema)
- Uranyl acetát (Spi Supplies)

3.3 Rostlinný materiál

Pro účely experimentů byly použity 8 týdnů staré rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pěstované v substrátu ve fytokomoře při následujících podmínkách:

- Teplota: 21 °C
- Vlhkost: 60 %
- Režim: 8 h světlo, 16 h tma
- Intenzita světla: 100 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR (400-700 nm)

3.4 Izolace tylakoidních membrán

Izolace tylakoidních membrán byla provedena podle kombinovaného protokolu (Dau *et al.*, 1995; Hideg, 1994). Před izolací tylakoidních membrán byly rostliny ponechány ve tmě 30 min. Z rostlin byly odebrány listy, které byly vloženy do kádinky se 150 ml vychlazeného pufru A (složení viz Tab. 1), nastříhány a homogenizovány pomocí tyčového homogenizátoru.

Tabulka 1: Složení pufru A (pH 7,2)

Chemikálie	Koncentrace
NaCl	400 mmol/l
Sacharóza	400 mmol/l
HEPES	35 mmol/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4 mmol/l
Na-Asc*	5 mmol/l
BSA*	2 mg/ml

*Přidáno před použitím.

Homogenizát byl přefiltrován přes dvě vrstvy nylonové síťky s velikostí ok 40 μm . Filtrát byl rozdělen do kyvet a centrifugován 6 min při 5 000 g (4 °C). Po centrifugaci byl supernatant vylit a pelet byl rozmíchán v pufru B (složení viz Tab. 2).

Tabulka 2: Složení pufru B (pH 7,5)

Chemikálie	Koncentrace
NaCl	150 mmol/l
HEPES	25 mmol/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	8 mmol/l
Na-EDTA	1 mmol/l

Pelet rozmíchaný v pufru B byl rozdělen do kyvet a centrifugován 10 min při 5 000 g (4 °C). Následovalo odlití supernatantu a rozmíchání peletu v pufru C (složení viz Tab. 3). Vzniklý roztok byl opět centrifugován 5 min při 5 000 g (4 °C).

Tabulka 3: Složení pufru C (pH 7,2)

Chemikálie	Koncentrace
Sacharóza	400 mmol/l
HEPES	50 mmol/l
NaCl	15 mmol/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mmol/l

Supernatant byl odlit a pelet byl rozmíchan v 1 ml pufru C. Následovalo stanovení koncentrace chlorofylů *a* a *b* v získané suspenzi tylakoidních membrán. Ke 2 ml 80% acetonu v mikrozkuhavce bylo přidáno 5 a 10 µl připravené suspenze. Následovala centrifugace 5 min při 30 000 g (4 °C) a přelití supernatantu do čisté mikrozkuhavky. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 646,8; 663,2 a 750 nm. Hodnoty absorbance byly použity pro výpočet koncentrace chlorofylů pomocí Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987):

$$c_a = 12,25(A_{663,2} - A_{750}) - 2,79(A_{646,8} - A_{750})$$

$$c_b = 21,50(A_{646,8} - A_{750}) - 5,10(A_{663,2} - A_{750})$$

c_a ...koncentrace chlorofylu *a* (µg/ml)

c_b ...koncentrace chlorofylu *b* (µg/ml)

Suspenze tylakoidních membrán byla rozdělena do mikrozkuhovek tak, aby bylo v každé obsaženo 110 µg chlorofylu. Mikrozkuhavky s alikvoty suspenze tylakoidních membrán byly zmrazeny v tekutém dusíku a do dalšího použití uchovány při -80 °C.

3.5 Optimalizace podmínek pro tvorbu příčných vazeb

Optimalizace podmínek pro tvorbu příčných vazeb byla provedena na izolovaných pigment-proteinových superkomplexech pomocí různých činidel. Pro posouzení vlivu prostředí byly použity dva různé pufrovací systémy a dvě rozdílné teploty, při kterých tvorba příčných vazeb probíhala.

3.5.1 Ultracentrifugace na hustotním gradientu sacharosy

Pro účely optimalizace podmínek pro tvorbu příčných vazeb bylo nutné získat čistou frakci fotosystémů, které byly získány pomocí ultracentrifugace solubilizovaných

tylakoidních membrán na sacharosovém hustotním gradientu. Pro přípravu gradientu byl namíchán roztok sacharosy o koncentraci 0,65 mol/l, který dále obsahoval 0,008 % α DM a 10 mmol/l HEPES (pH 7,5). Takto připravený roztok byl rozdělen do ultracentrifugačních kyvet, které byly zamrazeny v -80 °C. Před provedením ultracentrifugace se nechaly kyvety s roztokem sacharosy zvolna rozmrazit v chladničce, čímž došlo k samovolnému vytvoření gradientu. Vzorky pro ultracentrifugaci byly připraveny následujícím způsobem: Vzorky se suspenzí tylakoidních membrán, získané izolací v předchozím kroku (viz kapitola 3.4), byly centrifugovány 5 min při 5 000 g (4 °C). Pelet byl u každého vzorku promyt promývacím roztokem obsahujícím 5 mmol/l EDTA a 10 mmol/l HEPES (pH 7,5) a následně centrifugován 5 min při 5 000 g (4 °C). Supernatant byl odlit a pelet promyt roztokem obsahujícím 10 mmol/l HEPES (pH 7,5). Opět proběhla centrifugace 5 min při 5 000 g (4 °C). Supernatant byl odlit a pelet rozpuštěn (solubilizován) v roztoku obsahujícím 0,6 % α DM a 10 mmol/l HEPES (pH 7,5) tak, aby výsledná koncentrace chlorofylů byla 0,5 mg/ml. Následovala centrifugace 10 min při 20 000 g pro odstranění nesolubilizovaných zbytků membrán. Takto připravené vzorky byly naneseny na gradient sacharosy v kyvetě. Ultracentrifugace probíhala 16 h při 40 000 rpm (4 °C) (Caffarri *et al.*, 2009). Poté byla z jednotlivých ultracentrifugačních kyvet pomocí automatické pipety odebrána frakce pigment-proteinových superkomplexů představujících PSII a v odebrané frakci byla spektrofotometricky změřena koncentrace chlorofylů (dle postupu uvedeného v kapitole 3.4).

3.5.2 Koncentrace a přečištění vzorku

Získanou frakci superkomplexů bylo následně nutné zbavit sacharosy a zkoncentrovat, což bylo provedeno pomocí koncentračních a přečišťovacích kyvet (Merck Amicon Ultracel 10K). Do kyvet bylo naneseno předem zvolené množství frakce a kyvety byly centrifugovány 30 min při 16 000 g (4 °C). Následovalo promytí koncentráту roztokem 0,1 mol/l HEPES (pH 7,2), respektive fosfátovým pufrem (0,1 mol/l hydrogenfosforečnan draselný, 0,15 mol/l chlorid sodný) (pH 7,2). Kyvety byly opět centrifugovány 30 min při 16 000 g (4 °C). Po odfiltrování tekutiny byl přidán HEPES, respektive fosfátový puf, aby byl vzniklý koncentrát naředěn na vhodnou koncentraci chlorofylů. Vzniklý roztok byl odebrán a připraven pro další použití.

3.5.3 Tvorba příčných vazeb

Pro tvorbu příčných vazeb byly připraveny zásobní roztoky tří různých činidel: dithiobis(sukcinimidyl propionát) (DSP), 3,3'-dithiobis(sulfo-sukcinimidyl propionát) (DTSSP) a glutaraldehyd. Zásobní roztoky byly připraveny takto: DTSSP o koncentraci 20 mmol/l rozpuštěný v 0,1 mol/l HEPES (pH 7,2) (DTSSP-H), DTSSP o koncentraci 20 mmol/l rozpuštěný ve fosfátovém pufru (0,1 mol/l hydrogenfosforečnan draselný, 0,15 mol/l chlorid sodný, pH 7,2) (DTSSP-P) a DSP o koncentraci 20 mmol/l rozpuštěný v DMSO. Dále bylo připraveno 12 mikrozkušavek, do kterých byl rozdělen zakoncentrovaný vzorek z předchozího kroku tak, aby v každé mikrozkušavce bylo přesně 2 µg chlorofylu. Ke vzorkům bylo přidáno příslušné množství připraveného zásobního roztoku DTSSP-P, respektive DTSSP-H a doplněno do objemu 25 µl příslušným pufrům tak, aby byly výsledné koncentrace DTSSP 0,5; 5 a 10 mmol/l. Obdobný postup byl proveden i pro DSP: ke vzorkům bylo přidáno příslušné množství DSP rozpuštěného v DMSO, a doplněno 0,1 mol/l HEPES (pH 7,2) (DSP-H), respektive fosfátovým pufrům (0,1 mol/l hydrogenfosforečnan draselný, 0,15 mol/l chlorid sodný, pH 7,2) (DSP-F), aby výsledné koncentrace DSP byly 0,5; 5 a 10 mmol/l. Dále byl připraven zásobní roztok 0,5% glutaraldehydu v 0,1 mol/l HEPES (pH 7,2) (glutaraldehyd-H) a ve fosfátovém pufru (0,1 mol/l hydrogenfosforečnan draselný, 0,15 mol/l chlorid sodný, pH 7,2) (glutaraldehyd-P). Do 14 připravených mikrozkušavek byl rozdělen zakoncentrovaný vzorek z předchozího kroku tak, aby v každé mikrozkušavce bylo opět množství chlorofylu 2 µg. Ke vzorkům bylo přidáno příslušné množství připraveného zásobního roztoku 0,5% glutaraldehydu-H a 0,5% glutaraldehydu-P, a doplněno do objemu 25 µl příslušným pufrům, aby výsledné koncentrace glutaraldehydu byly následující: 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,0025 a 0,001 %. Takto připravené vzorky byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 min, respektive ve tmě a v chladu (7 °C) po dobu 2 h, v obou případech za stálého třepání. Po ukončení inkubace byl do každého vzorku přidán 1 µl 1 mol/l Tris (pH 7,2), čímž byla reakce pro tvorbu příčných vazeb zastavena. Kontrolní vzorky byly připraveny stejným způsobem s tím rozdílem, že do nich nebyla přidávána látka způsobující příčnou vazbu.

3.5.4 SDS-PAGE

Vzorky získané v předchozím kroku byly následně podrobeny elektroforetické separaci za denaturujících podmínek (SDS-PAGE).

Pro účely SDS PAGE byly připraveny následující roztoky:

- Katodový pufr (10x koncentrovaný, pH 8,25, 1 mol/l Tris, 1 mol/l Tricin, 1 % SDS). Před použitím byl pufr náležitě naředěn.
- Anodový pufr (10x koncentrovaný, pH 8,9, 1 mol/l Tris a 0,225 mol/l HCl). Před použitím byl pufr náležitě naředěn.
- Gelový pufr (3x koncentrovaný, pH 8,45, 3 mol/l Tris, 1 mol/l HCl a 0,3 % SDS).
- Zásobní roztok akrylamidu AB-3 (49,5 % T, 3 % C).
- Vzorkovací pufr (pH 7, 12 % SDS, 30 % glycerol, 0,05 % Coomassie blue G-250 a 150 mmol/l Tris/HCl).
- Barvicí roztok (45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,1 % Coomassie blue G-250)
- Odbarvovací roztok (10 % kyselina octová).

Roztoky pro přípravu jednoho gelu byly vytvořeny podle následující tabulky:

Tabulka 4: Složení 4% a 10% gelu k provedení SDS-PAGE

Chemická látka	4% gel [ml]	10% gel [ml]
50% AB-3	0,4	2
Voda	3,36	3,7
gelový pufr	1,24	3,3
Glycerol	-	1
10% APS*	0,04	0,05
TEMED*	0,004	0,01

*Přidáno před použitím.

Nejprve byl mezi elektroforetická skla nalit 10% roztok pro přípravu gelu a ihned převrstven 4% roztokem. Do 4% roztoku byl následně vložen hřebínek a gel ponechán v klidu, dokud neproběhla polymerace akrylamidu. Provedení elektroforézy pak bylo následující. K připraveným vzorkům z předchozího kroku (kapitola 3.5.3) bylo přidáno 5 μ l vzorkovacího pufru a vzorky byly inkubovány 20 min při 75 °C. Vzorky byly poté krátce centrifugovány na stolní minicentrifuze (5 min, 10000 g). Gely byly umístěny do elektroforetické aparatury, do které byly nality elektrodové pufrы. Do krajních jamek gelu pak bylo nanášeno 2,5 μ l hmotnostního standardu (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Thermo scientificTM) a do dalších jamek po 30 μ l vzorků. Elektroforetická separace probíhala při konstantním proudu 60 mA pro jeden gel. Po skončení separace byly gely vyjmuty z aparatury a ponořeny na 30 min do barvicího roztoku. Následně byly gely dvakrát odbarveny odbarvovacím roztokem po dobu 30 min. Odbarvovací roztok byl poté vylit a proběhlo další odbarvování, a to přes noc. Po vymytí barviva byly gely skenovány (gelscanner Amersham Imager 600RGB).

3.6 Tvorba příčných vazeb na úrovni intaktní tylakoidní membrány

Po ověření funkčnosti látek způsobujících příčnou vazbu na úrovni izolovaných pigment-proteinových komplexů byla provedena studie funkčnosti těchto látek na úrovni intaktních tylakoidních membrán.

3.6.1 Příprava tylakoidních membrán

Tylakoidní membrány byly před použitím promyty (Caffarri *et al.*, 2009), aby byly zbaveny zbytků skladovacího pufru a případná grana rozvolněna. Vzorky se suspenzí tylakoidních membrán (aliquoty se 110 µg chlorofylu) byly centrifugovány 5 min při 5 000 g (4 °C). Pelet byl poté promyt promývacím roztokem obsahujícím 5 mmol/l EDTA a 10 mmol/l HEPES (pH 7,5) a následně centrifugován 5 min při 5 000 g (4 °C). Supernatant byl odlit a pelet promyt roztokem obsahujícím 10 mmol/l HEPES (pH 7,5). Opět proběhla centrifugace 5 min při 5 000 g (4 °C). Supernatant byl odlit a pelet rozmíchan v takovém množství 10mmol/l HEPES (pH 7,5), aby bylo dosaženo koncentrace chlorofylů 1 mg/ml. Promyté membrány byly nadále uchovány v chladicím boxu.

3.6.2 Tvorba příčných vazeb

Byly připraveny tyto zásobní roztoky: DTSSP o koncentraci 20 mmol/l rozpuštěný v 0,1mol/l HEPES (pH 7,2) (DTSSP-H) a DSP o koncentraci 20 mmol/l rozpuštěný v DMSO. Ke vzorkům promytých tylakoidních membrán z předchozího kroku bylo přidáno příslušné množství zásobního roztoku DTSSP-H a DSP rozpuštěného v DMSO, aby výsledná koncentrace těchto činidel byla následující: 0,5; 5 a 10 mmol/l. Stejně tak byl připraven zásobní roztok glutaraldehydu v 0,1mol/l HEPES (pH 7,2) (glutaraldehyd-H), a to v 0,5% koncentraci. Ke vzorkům promytých tylakoidních membrán bylo přidáno příslušné množství zásobního roztoku glutaraldehydu-H, aby výsledná koncentrace tohoto činidla byla následující: 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,0025 a 0,001 %. Takto připravené vzorky byly inkubovány 2 h v chladu (7 °C) a ve tmě na třepačce. Po ukončení inkubace bylo k těmto vzorkům přidáno takové množství 1mol/l roztoku Tris (pH 7,2), aby jeho výsledná koncentrace byla 50 mmol/l, čímž došlo k zastavení reakce. Následně byly vzorky centrifugovány 5 min při 5 000 g (4 °C). Pelet byl promyt pomocí 0,1mol/l HEPES (pH 7,2) a opět proběhla centrifugace 5 min při 5 000 g (4 °C). Dále byl pelet promyt C pufrem (složení viz Tab. 3 v kapitole 3.4) a opět centrifugován 5 min při 5 000 g (4 °C). Supernatant

byl odlit a pelet rozmíchán ve 100 μ l pufru C. Nakonec byla spektrofotometricky stanovena koncentrace chlorofylů *a* a *b* (dle postupu uvedeného v kapitole 3.4). Kontrolní vzorek byl připraven identickým způsobem s tím rozdílem, že k němu nebyla přidána činidla vytvářející příčnou vazbu.

3.6.3 Solubilizace tylakoidních membrán

Před provedením CN-PAGE byly vzorky připravené v předchozím kroku (kapitola 3.6.2) solubilizovány za použití α DM při hmotnostních poměrech α DM k chlorofylům *a* a *b* (DM/chl): 10, 20, 30 a 40 (Nosek, 2017). Do připravených mikrozkuvek bylo napipetováno takové množství suspenze tylakoidních membrán, které odpovídalo 10 μ g chlorofylů. K membránám byl následně přidán roztok 5% α DM v množství, které odpovídalo stanoveným hmotnostním poměrům detergent:chlorofyl a vzniklý roztok byl poté doplněn vzorkovým pufrům (400 mmol/l sacharosa, 5 mmol/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mmol/l HEPES, 15 mmol/l NaCl, 10 % glycerol, pH7,2) na celkový objem 30 μ l. Následovalo důkladné promíchání a centrifugace 5 min při 20 000 g (4 °C).

3.6.4 CN-PAGE

Pro účely CN-PAGE byly připraveny následující roztoky:

- Katodový pufr (10x koncentrovaný, pH 7, 0,5 mol/l Tricin, 150 mmol/l Bis-Tris/HCl). Před použitím byl pufr náležitě naředěn na objem 300 ml, do něhož bylo přidáno 86 mg α DM a 172 mg deoxycholátu sodného.
- Anodový pufr (1x koncentrovaný, pH 7, obsahoval 50 mmol/l Bis-Tris/HCl).
- Gelový pufr (6x koncentrovaný, pH 7, 3 mol/l aminokapronové kyseliny, 0,3 mol/l Bis-Tris/HCl).
 - Zásobní roztok 50% AB-3 (49,5 % T, 3 % C).
 - Zásobní roztok 50% AB-1,5 (49,5 % T, 1,5 %C).

CN-PAGE byla provedena s použitím gradientových gelů. K přípravě gelů byla využita aparatura s peristaltickou pumpou. Gel byl připraven z 2% a 8% gelového zásobního roztoku AB-1,5, respektive AB-3 (složení zásobních roztoků je uvedeno v Tab. 5). Těsně před naléváním bylo ke 3 ml od každého z roztoků přidáno 20 μ l 10% APS a 5 μ l TEMED.

Tabulka 5: Složení 50 ml zásobních 2% a 8% gelových roztoků CN-PAGE

Chemická látka	2% gelový roztok [ml]	8% gelový roztok [ml]
50% AB-1,5/AB-3	2	8
voda	39,67	23,67
glycerol	-	10
gelový pufr	8,33	8,33

Průběh elektroforézy byl následující. Gely byly umístěny do elektroforetické aparatury, která byla umístěna v chladu a tmě. Do elektroforetické aparatury byly nality elektrodové pufrы. Vzorkeы připravené v předchozím kroku byly naneseы do jamek gelu. Separace započala při konstantním proudu 3,5 mA pro jeden gel po dobu 15 min a poté probíhala separace při konstantním proudu 7,5 mA pro jeden gel do ukončení separace (přibližně 2 h). Po skončení separace byly gely vyjmuty z aparatury a skenovány ve fluorometrickém a transmisním kolorimetrickém módu s použitím gelskeneru (Amersham Imager 600RGB).

3.7 Tvorba příčných vazeb na úrovni solubilizované tylakoidní membrány

3.7.1 Solubilizace tylakoidních membrán

Suspenze tylakoidních membrán byla solubilizována α DM v hmotnostním poměru α DM/chl 10. Do připravených mikrozkušavek bylo napipetováno takové množství suspenze tylakoidních membrán, které odpovídalo 10 μ g chlorofylů. K membránám byl následně přidán roztok 5% α DM v množství, které odpovídalo stanoveným hmotnostním poměrům detergent:chlorofyl a vzniklý roztok byl poté doplněn vzorkovým pufrem (400 mmol/l sacharóza, 5 mmol/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mmol/l HEPES, 15 mmol/l NaCl, 10 % glycerol, pH7,2) na celkový objem 30 μ l. Následovalo důkladné promíchání a centrifugace 5 min při 20 000 g (4 °C).

3.7.2 Tvorba příčných vazeb

Byly připraveny tyto zásobní roztoky: DTSSP o koncentraci 50 mmol/l rozpuštěný v 0,1mol/l HEPES (pH 7,2) (DTSSP-H) a DSP o koncentraci 100 mmol/l rozpuštěný v DMSO. Ke vzorkům solubilizovaných tylakoidních membrán z předchozího kroku bylo

přidáno příslušné množství zásobního roztoku DTSSP-H a DSP rozpuštěného v DMSO, aby výsledná koncentrace těchto činidel byla 0,5 a 5 mmol/l. Stejně tak byl připraven zásobní roztok glutaraldehydu v 0,1 mol/l HEPES (pH 7,2) (glutaraldehyd-H), a to v 1% koncentraci. Ke vzorkům solubilizovaných tylakoidních membrán z předchozího kroku bylo přidáno příslušné množství zásobního roztoku glutaraldehydu-H, aby výsledné koncentrace tohoto činidla byly následující: 0,025 a 0,005 %. Takto připravené vzorky byly inkubovány 15 min v chladu (7 °C) a ve tmě na třepačce. Kontrolní vzorek byl připraven identickým způsobem s tím rozdílem, že k němu nebyla přidána činidla vytvářející příčnou vazbu.

3.7.3 CN-PAGE

Po solubilizaci a reakci s činidly tvořícími příčné vazby byly vzorky centrifugovány 10 min při 20 000 g (4 °C) a naneseny do jamek gelu připraveného dle postupu v kapitole 3.6.4. Elektroforetická separace pomocí CN-PAGE probíhala za stejných podmínek, jako je uvedeno v kapitole 3.6.4.

3.8 Transmisní elektronová mikroskopie a obrazová analýza

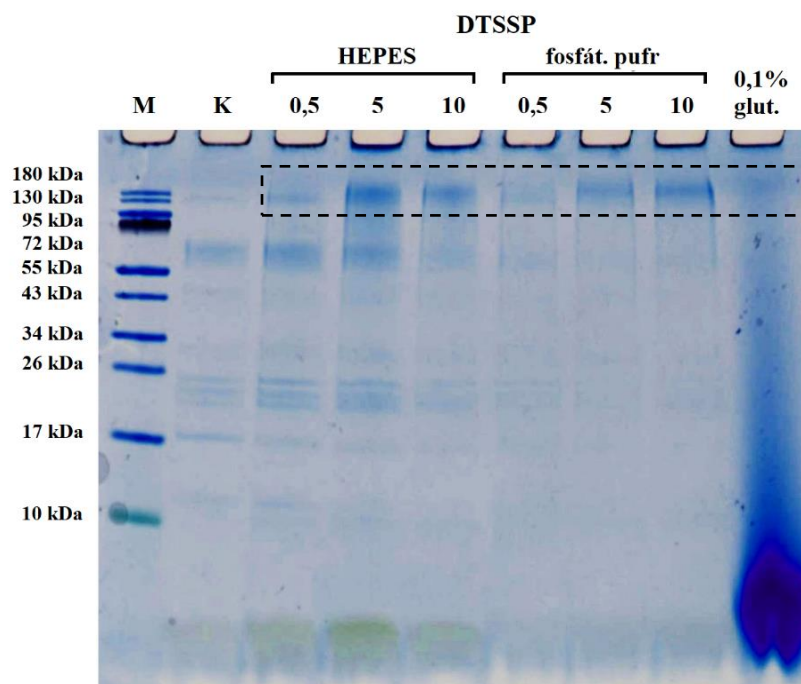
Z výsledného elektroforetogramu po provedené CN-PAGE byly vyřezány vybrané pásy s pigment-proteinovými komplexy. Ty byly následně nasekány na malé části a přidány do mikrokumavky s elučním pufrem (15 mmol/l chlorid sodný, 50mmol/l HEPES, 5 mmol/l chlorid hořečnatý, 0,008 % α -DM) (pH 7,2). Eluce probíhala 2 h v chladu (4 °C) a ve tmě. Poté bylo odebráno 5 μ l takto připraveného vzorku a naneseno na měděnou síťku pokrytou uhlíkovým filmem upravenou doutnavým výbojem. Po 1 min byl vzorek odsán filtračním papírem a na síťku bylo naneseno 5 μ l 2% roztoku uranyl acetátu. Po 1 min byl odsán pomocí filtračního papíru. Připravené sítky byly umístěny do držáku mikroskopu. Obraz byl snímán CCD kamerou. Obrazová analýza zaznamenaných snímků byla provedena pomocí programu Xmipp (Scheres, 2012).

4 Výsledky

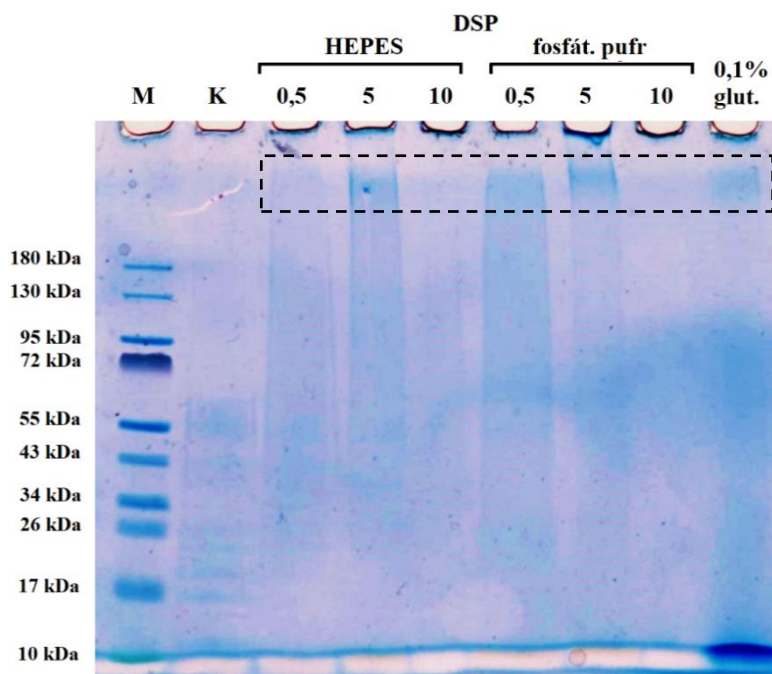
Cílem experimentální části této práce bylo provést stabilizaci případných vyšších forem fotosystémů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pomocí činidel vytvářejících příčné vazby a následně tyto vyšší formy fotosystému strukturně charakterizovat. Nezbytným krokem experimentu bylo ověření funkčnosti zvolených činidel a podmínek reakce, při kterých by docházelo k nejúčinnější stabilizaci. Funkčnost činidel při zvolených podmínkách pak byla posuzována pomocí SDS-PAGE. Zvolené optimální podmínky byly použity pro účely stabilizace a separace vyšších forem fotosystémů. Byly zvoleny dva přístupy. V prvním přístupu byla provedena stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni intaktní tylakoidní membrány a v druhém přístupu byla stabilizace vyšších forem fotosystémů provedena na úrovni solubilizované tylakoidní membrány. V obou případech byla separace fotosystémů provedena pomocí CN-PAGE. Pro strukturní charakterizaci nalezených vyšších forem fotosystémů byla použita transmisní elektornová mikroskopie s následnou obrazovou analýzou.

4.1 Optimalizace podmínek pro tvorbu příčných vazeb

V první části experimentu bylo nutné ověřit funkčnost zvolených činidel, které by stabilizovaly vyšší formy fotosystémů, a nalézt optimální podmínky této reakce. Ověřovací studie probíhala na komplexech PSII získaných ultracentrifugací na hustotním gradientu sacharosy. Byla použita tři činidla: DTSSP, DSP a glutaraldehyd. Činidlo DTSSP, které je ve vodě rozpustné, bylo zvoleno na základě studie Hea *et al.* (2014). Činidlo DSP bylo vybráno jakožto činidlo ve vodě nerozpustné. Obě činidla byla použita v koncentracích 0,5; 5 a 10 mmol/l. Glutaraldehyd byl zvolen v 0,1% koncentraci na základě studie Currana *et al.* (2002) a Vasiljeva *et al.* (2004). Reakce probíhala ve dvou pufrovacích systémech, kterými byly HEPES a fosfátový pufr (Thermo Scientific, 2012). Délka inkubace byla 30 min, a to ve tmě za standardní teploty. Separace takto upravených vzorků PSII poté probíhala pomocí SDS-PAGE. Elektroforetogramy z provedené SDS-PAGE jsou uvedeny na Obr. 12 a 13.



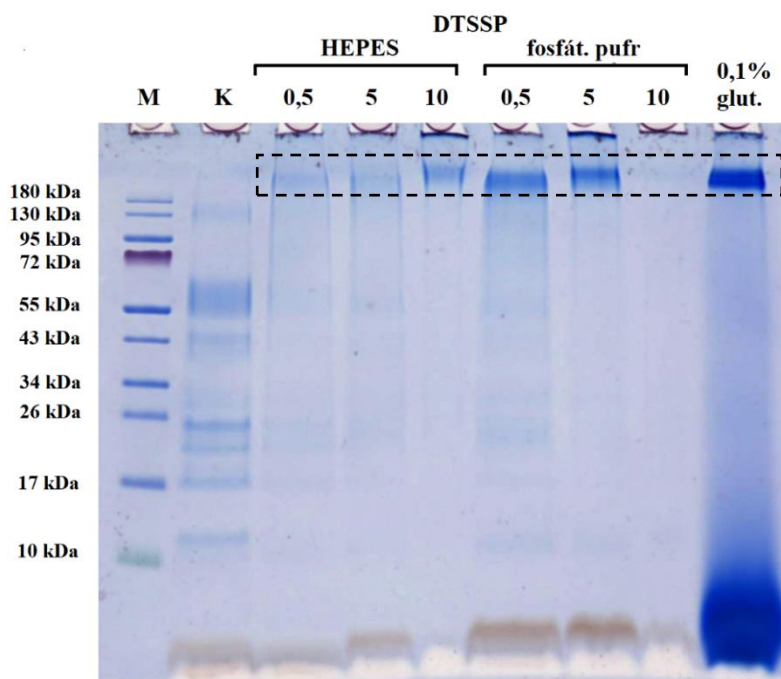
Obrázek 12: Elektroforetogram s chemicky stabilizovanými komplexy fotosystému II inkubovanými s DTSSP 30 min při laboratorní teplotě ve tmě. Čísla nahoře představují použitou koncentraci činidla DTSSP (uvedenou v mmol/l) rozpuštěného v HEPES či fosfátovém pufru. Označení 0,1% glut. představuje použití činidla glutaraldehydu v 0,1% koncentraci v HEPES, K představuje kontrolu a M hmotnostní marker. Rámečkem s přerušovanou čarou je označena oblast výskytu zesíťovaných komplexů.



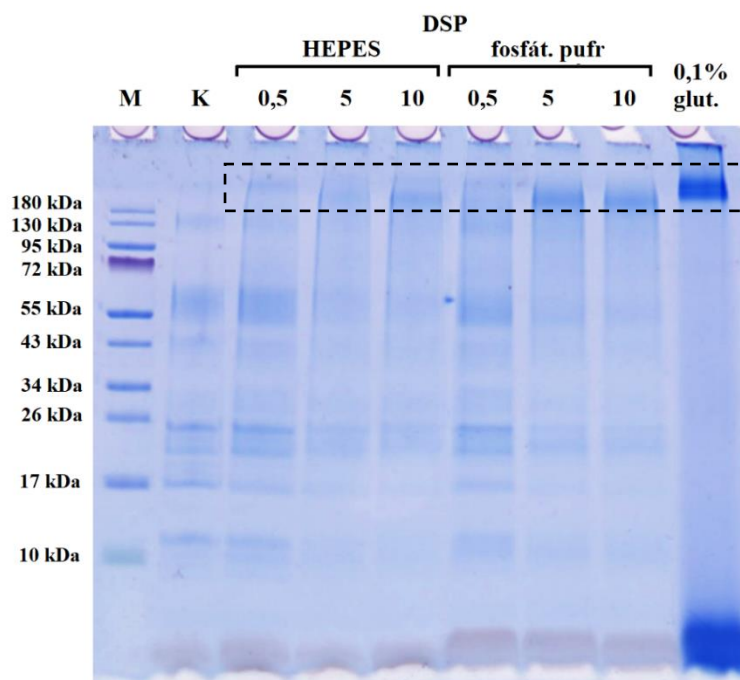
Obrázek 13: Elektroforetogram s chemicky stabilizovanými komplexy fotosystému II inkubovanými s DSP 30 min při laboratorní teplotě ve tmě. Čísla nahoře představují použitou koncentraci činidla DSP (uvedenou v mmol/l) rozpuštěného v HEPES či fosfátovém pufru. Označení 0,1% glut. představuje použití činidla glutaraldehydu v 0,1% koncentraci ve fosfátovém pufru, K představuje kontrolu a M hmotnostní marker. Rámečkem s přerušovanou čarou je označena oblast výskytu zesíťovaných komplexů.

Bylo zjištěno, že činidlo DTSSP funguje v obou pufovacích systémech. Se zvyšující se koncentrací ve fosfátovém pufovacím systému jeho účinek narůstal, což dokazují vzniklé pásy na elektroforetogramu při použití tohoto činidla (Obr. 12). Při použití pufovacího systému HEPES byl nejintenzivnější pás při použití koncentrace DTSSP 5 mmol/l. Stejně tak činidlo DSP fungovalo v obou pufovacích systémech. Se zvyšující se koncentrací byl jeho účinek patrnější, ovšem při použití koncentrace 10 mmol/l došlo ve vzorku ke vzniku proteinových agregátů, což zabránilo jeho nanesení do jamky gelu (Obr. 13). Použití glutaraldehydu v 0,1% koncentraci se ukázalo jako funkční v obou systémech. Intenzivní skvrna ve spodní části gelu pravděpodobně představuje artefakt interakce glutaraldehydu s barvivem Coomassie a nejspíše nesouvisí se schopností činidla vytvářet příčné vazby (Obr. 12 a 13).

V další části experimentu bylo zjišťováno, zda použitá činidla nebudou vykazovat lepší funkčnost za odlišných podmínek inkubace, než byly v předchozím experimentu. Délka inkubace byla tedy zvolena 2 h ve tmě a teplota inkubace 7 °C. Výsledné elektroforetogramy jsou znázorněny na Obr. 14 a 15.

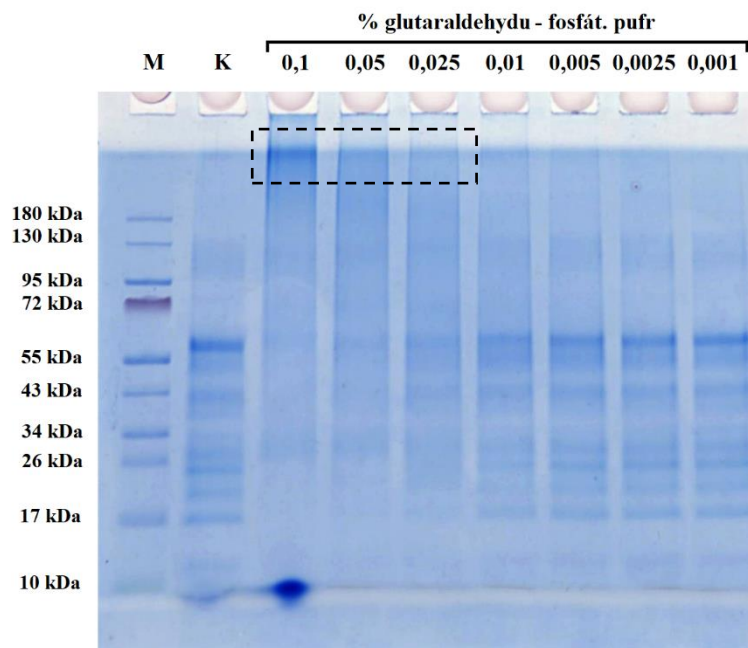


Obrázek 14: Elektroforetogram s chemicky stabilizovanými komplexy fotosystému II inkubovanými s DTSSP 2 h při 7 °C ve tmě a za třepání. Čísla nahoře představují použitou koncentraci činidla DTSSP (uvedenou v mmol/l) rozpuštěného v HEPES či fosfátovém pufru. Označení 0,1% glut. představuje použití činidla glutaraldehydu v 0,1% koncentraci v HEPES, K představuje kontrolu a M hmotnostní marker. Rámečkem s přerušovanou čarou je označena oblast výskytu zesíťovaných komplexů.

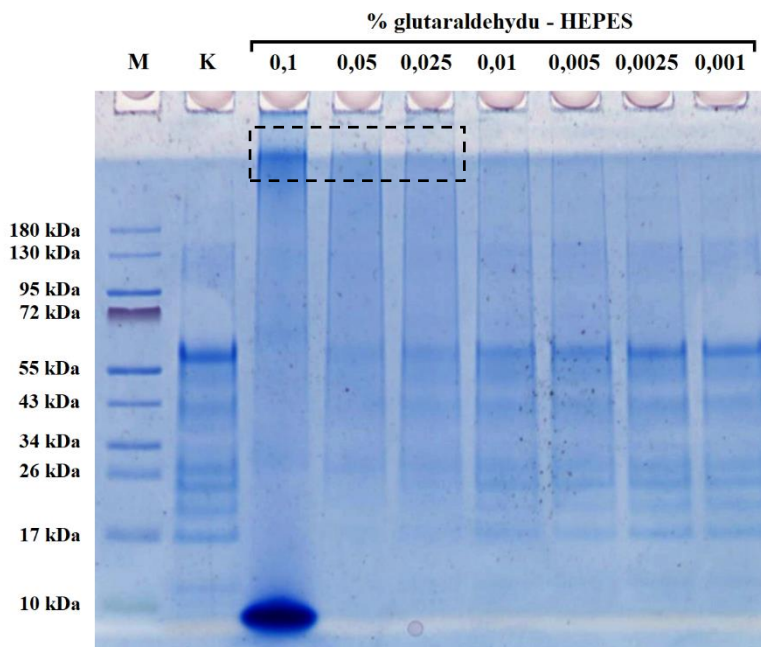


Obrázek 15: Elektroforetogram s chemicky stabilizovanými komplexy fotosystému II inkubovanými s DSP 2 h při 7 °C ve tmě a za třepání. Čísla nahoře představují použitou koncentraci činidla DSP (uvedenou v mmol/l) rozpuštěného v HEPES či fosfátovém pufru. Označení 0,1% glut. představuje použití činidla glutaraldehydu v 0,1% koncentraci v HEPES, K představuje kontrolu a M hmotnostní marker. Rámečkem s přerušovanou čarou je označena oblast výskytu zesíťovaných komplexů.

Za podmínek nižší teploty inkubace a delšího času byla zjištěna lepší funkčnost činidel DTSSP, DSP i glutaraldehydu (Obr. 14 a 15). Činidla DTSSP i DSP fungovala v obou pufrůvacích systémech. Se zvyšující se koncentrací byl jejich účinek patrnější v obou systémech, ovšem za použití 10mmol/l koncentrace DTSSP ve fosfátovém pufru vznikly, stejně jako v předchozí části experimentu, proteinové agregáty, které nebylo možné nanést do jamek gelu (Obr. 14). Použití glutaraldehydu v 0,1% koncentraci za těchto podmínek inkubace vykazovalo silný efekt na tvorbu příčných vazeb v obou systémech. Přistoupilo se tedy i k použití nižších koncentrací glutaraldehydu: 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,0025 a 0,001 %. Reakce probíhala v obou pufrůvacích systémech, za stejných podmínek jako předchozí experiment, tedy délky inkubace 2 h ve tmě při teplotě 7 °C. Výsledné elektroforetogramy jsou znázorněny na Obr. 16 a 17.



Obrázek 16: Elektroforetogram s chemicky stabilizovanými komplexy fotosystému II inkubovanými s glutaraldehydem 2 h při 7 °C ve tmě a za třepání. Čísla nahoře představují použitou procentuální koncentraci činidla glutaraldehydu ve fosfátovém pufru, K představuje kontrolu a M hmotnostní marker. Rámečkem s přerušovanou čarou je označena oblast výskytu zesíťovaných komplexů.

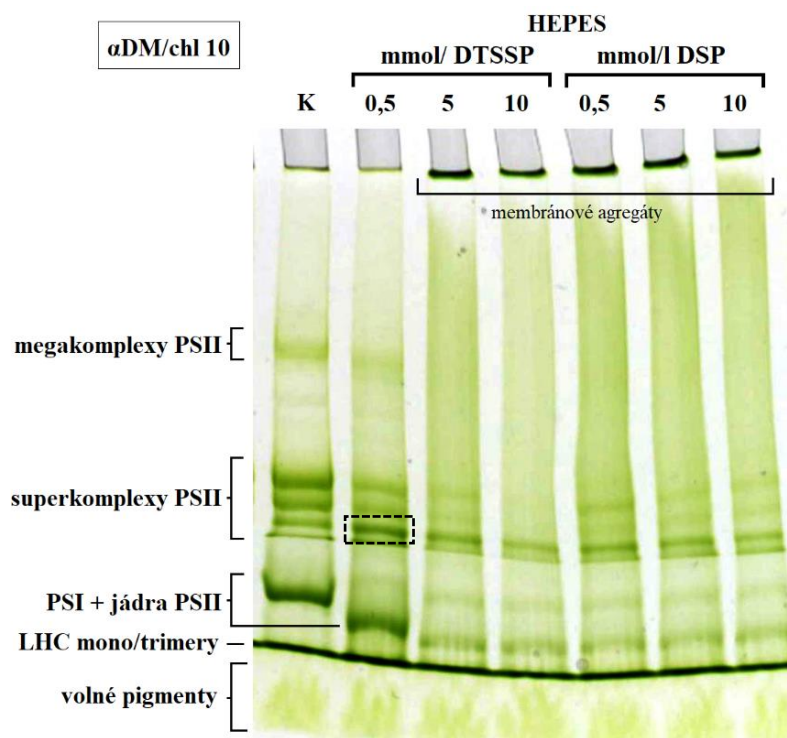


Obrázek 17: Elektroforetogram s chemicky stabilizovanými komplexy fotosystému II inkubovanými s glutaraldehydem 2 h při 7 °C ve tmě a za třepání. Čísla nahoře představují použitou procentuální koncentraci činidla glutaraldehydu v HEPES, K představuje kontrolu a M hmotnostní marker. Rámečkem s přerušovanou čarou je označena oblast výskytu zesíťovaných komplexů.

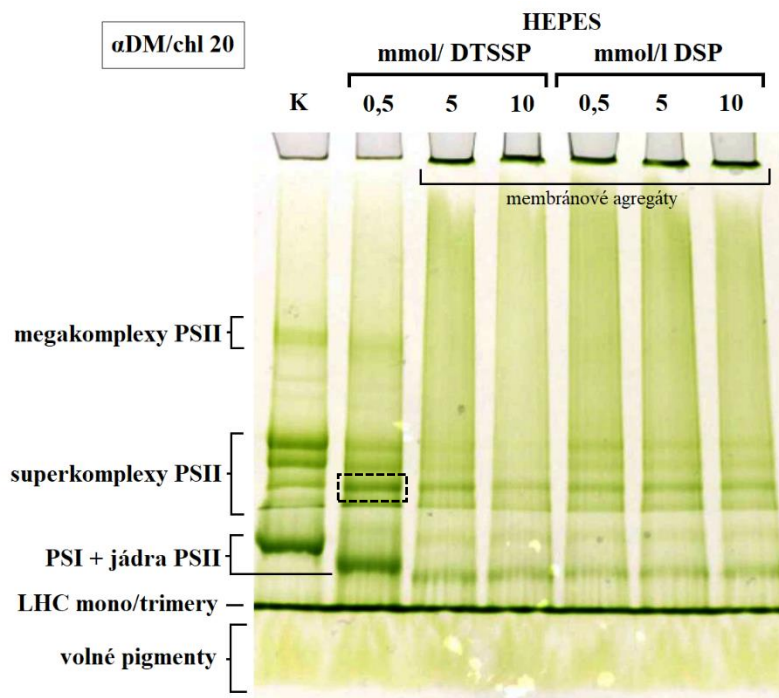
Při použití uvedených koncentrací glutaraldehydu se ukázalo, že nejlépe toto činidlo reaguje, mimo 0,1% koncentraci, při koncentraci 0,05% v pufovacím systému HEPES (Obr. 17).

4.2 Stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni intaktní tylakoidní membrány

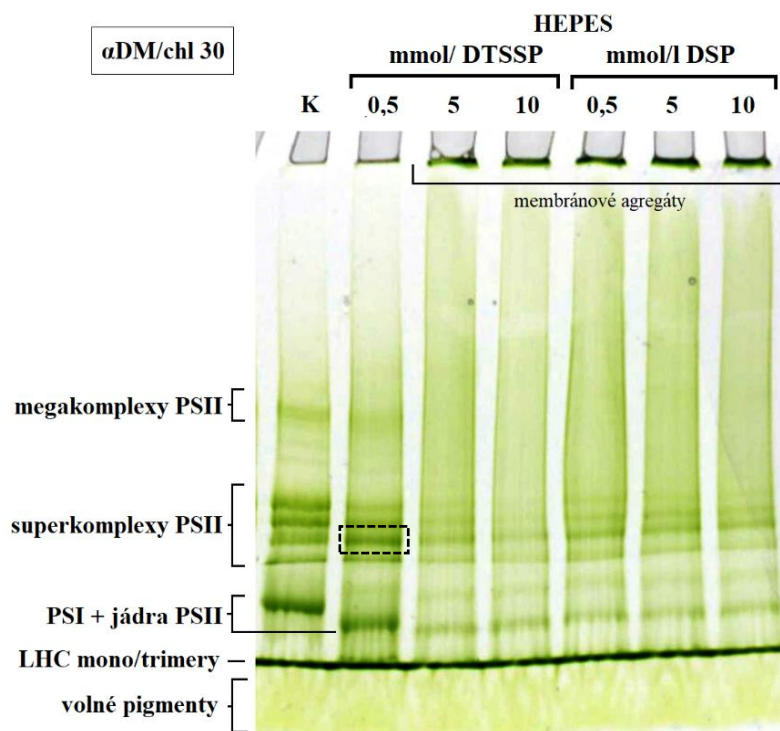
Provedené experimenty uvedené v kapitole 4.1 potvrdily funkčnost všech tří zvolených činidel (DTSSP, DSP a glutaraldehydu). Optimální podmínky inkubace byly zvoleny následovně: délka inkubace 2 h ve tmě při teplotě 7 °C. Pufovací systém HEPES i fosfátový se jevil jako vhodný. Pro účely dalších experimentů byl zvolen pouze pufovací systém HEPES, a to ze dvou důvodů. Prvním z nich byl jeho lepší vliv na vytváření příčných vazeb při použití glutaraldehydu (Obr. 17). Dalším důvodem bylo to, že při přípravě vzorků pro CN-PAGE bylo nezbytným krokem rozvolnění tylakoidních membrán, jehož součástí bylo promývání membrán za použití pufru obsahujícím HEPES. Za uvedených podmínek byla provedena stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni tylakoidní membrány. Solubilizace probíhala při poměrech α DM/chl 10, 20, 30 a 40. Široké rozmezí koncentrace detergentu bylo použito kvůli ověření účinnosti solubilizace tylakoidní membrány vystavené působením činidla vytvářejícího příčnou vazbu. Separace probíhala na polyakrylamidovém gradientovém gelu s rozsahem koncentrací 2-8 %. Koncentrace bisakrylamidu zásobního roztoku akrylamidu pro tvorbu gelu byla zvolena jako 3% (AB-3). Výsledné elektroforetogramy jsou znázorněny na Obr. 18 až 21.



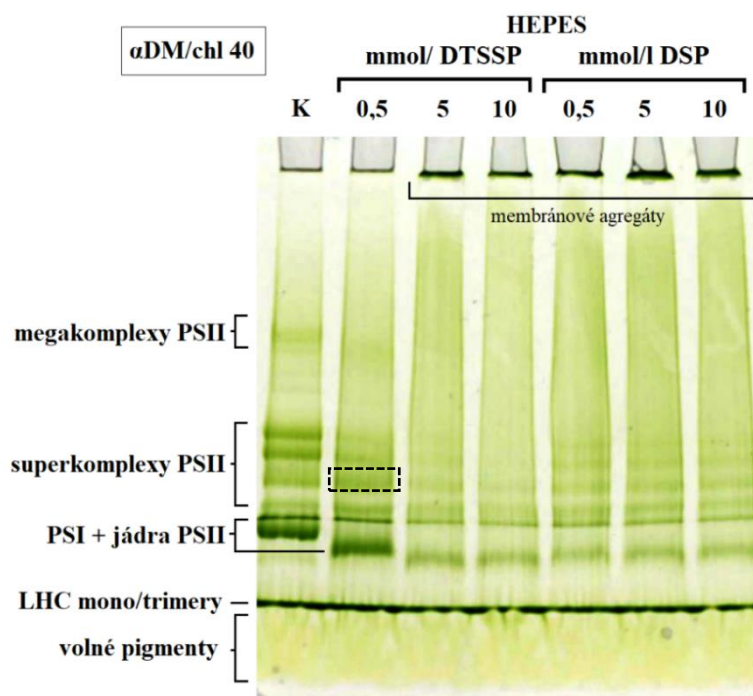
Obrázek 18: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 3 % bisakrylamidu.



Obrázek 19: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 20. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 3 % bisakrylamidu.

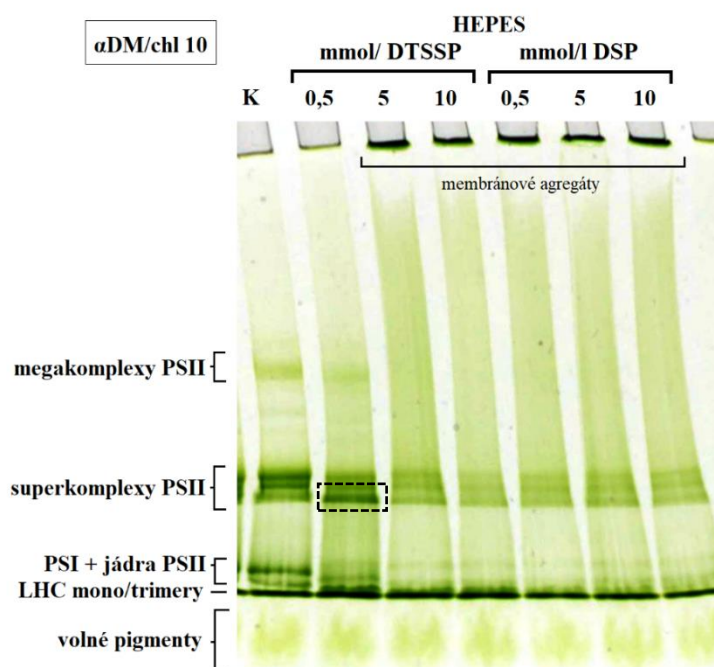


Obrázek 20: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 30. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 3 % bisakrylamidu.

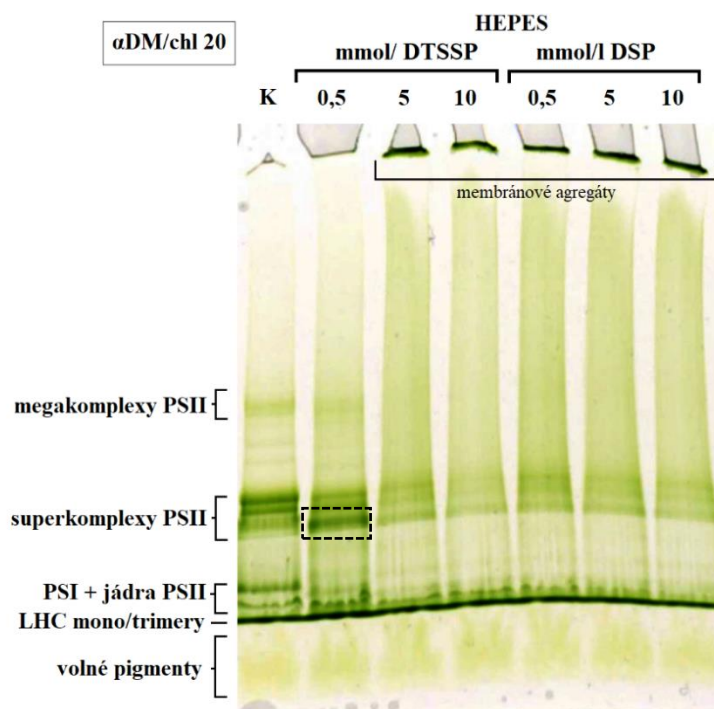


Obrázek 21: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 40. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 3 % bisakrylamidu.

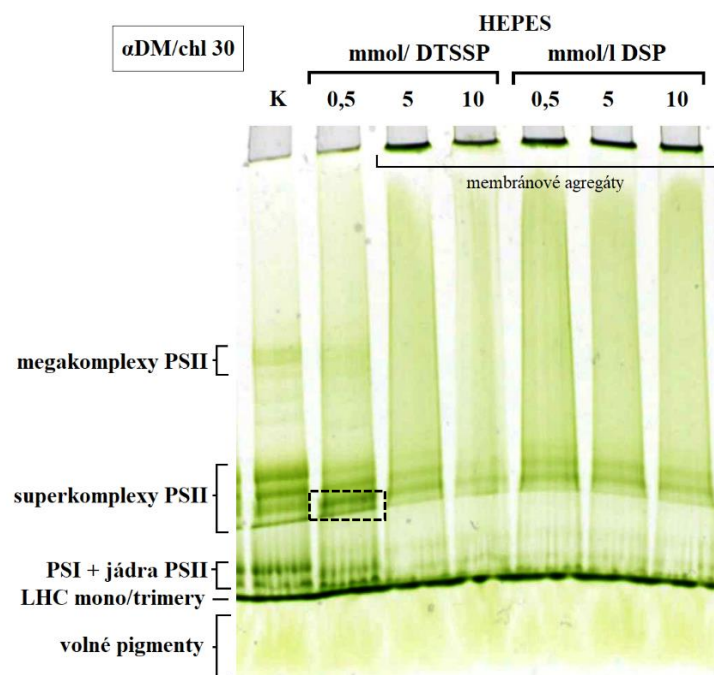
Na výsledných elektroforetogramech bylo možné pozorovat výraznější pás nacházející se v oblasti výskytu superkomplexů PSII při použití činidla DTSSP v koncentraci 0,5 mmol/l, oproti kontrolnímu vzorku, přičemž nejvýraznější efekt byl patrný při použití hmotnostního poměru α DM/chl 10 (Obr. 18). Z elektroforetogramů bylo dále patrné, že při použití koncentrací 0,5; 5 a 10 mmol/l DSP a koncentrace 5 a 10 mmol/l DTSSP došlo k tvorbě agregátů tylakoidních membrán, které při elektroforetické separaci zůstaly na dně jamek gelu (Obr. 18 až 21). Přistoupilo se tedy k volbě gelu s nižší koncentrací bisakrylamidu. Solubilizace probíhala stejně jako v předchozím experimentu při poměrech α DM/chl 10, 20, 30 a 40. Separace probíhala na polyakrylamidovém gradientovém gelu s rozsahem koncentrací 2-8 %. Koncentrace bisakrylamidu zásobního roztoku akrylamidu byla zvolena jako 1,5% (AB-1,5). Výsledné elektroforetogramy jsou znázorněny na Obr. 22 až 25.



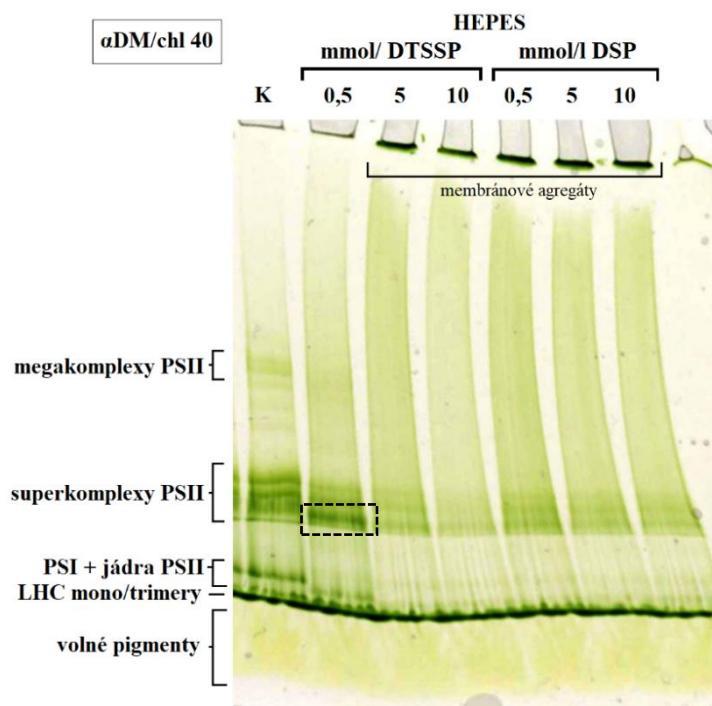
Obrázek 22: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu.



Obrázek 23: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 20. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu.

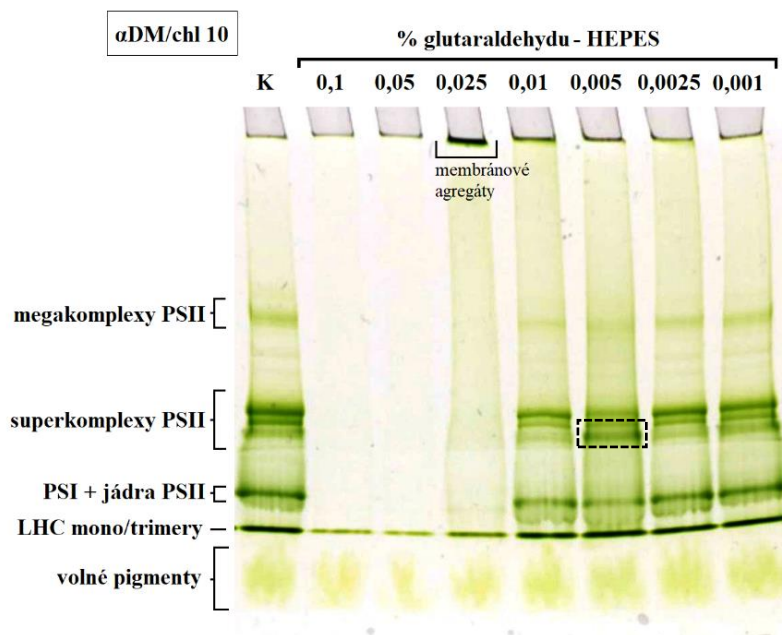


Obrázek 24: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 30. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu.

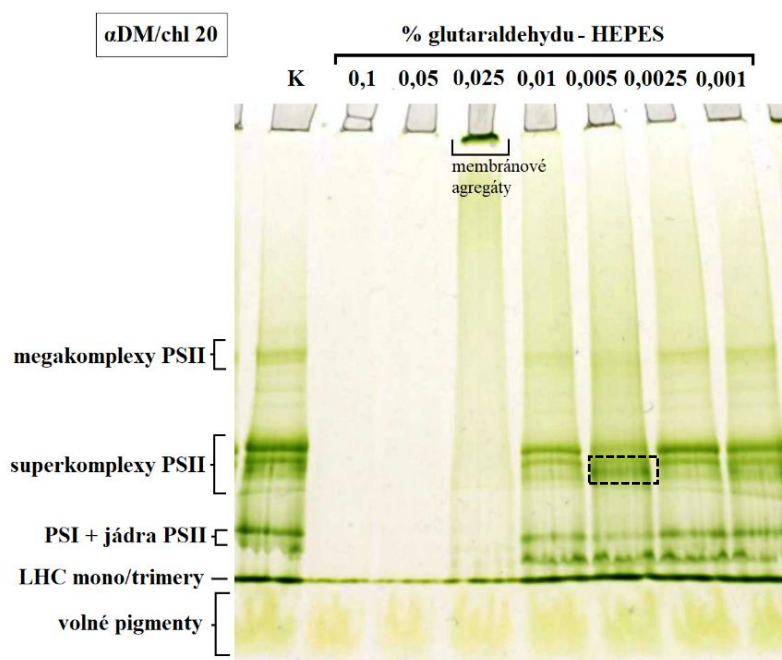


Obrázek 25: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 40. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu.

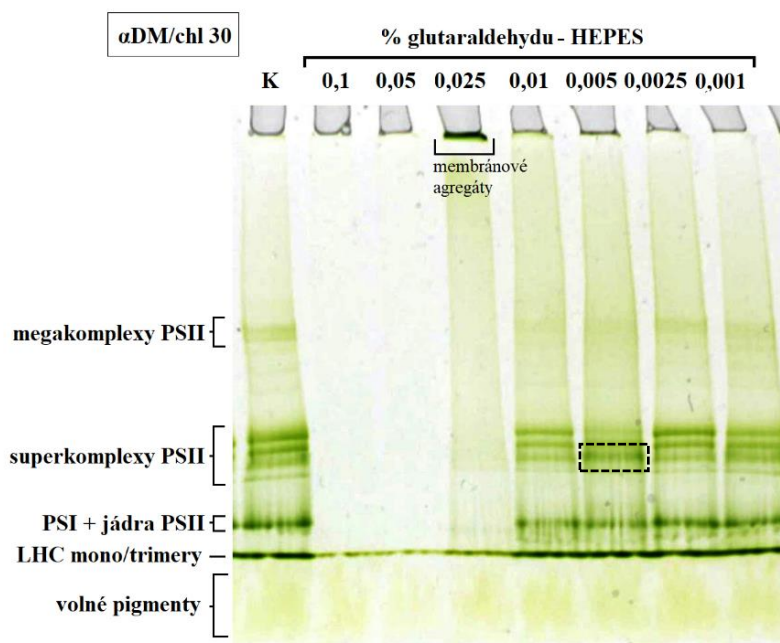
Jak je z výsledných elektroforetogramů patrné (Obr. 22 až 25), volba gelu s nižší koncentrací bisakrylamidu neměla oproti předchozímu experimentu znatelný vliv na separaci případných vyšších forem superkomplexů, které ulpávaly na dnech jamek (jako v případě gelů s vyšší koncentrací bisakrylamidu). Při použití koncentrací 0,5; 5 a 10 mmol/l DSP a koncentrace 5 a 10 mmol/l DTSSP na dnech jamek opět zůstaly agregáty tylakoidní membrány, které dále neprostoupily do gelu. Stejně jako v předchozím experimentu byly objeveny výraznější pásy nacházející se v oblasti výskytu superkomplexů PSI II při použití činidla DTSSP v koncentraci 0,5 mmol/l, oproti kontrolnímu vzorku, přičemž nejvýraznější efekt byl opět patrný při použití hmotnostního poměru α DM/chl 10 (Obr. 22). Opětovné nalezení tohoto pásu v elektroforetogramu eliminuje možnost, že tento pás byl tvořen náhodně vzniklými artefakty. V další části experimentu se přistoupilo k použití glutaraldehydu v koncentracích 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,0025 a 0,001 %. Podmínky experimentu byly stejné jako při použití činidel DTSSP a DSP, tedy: solubilizace probíhala při poměrech α DM/chl 10, 20, 30 a 40, separace probíhala na polyakrylamidovém gradientovém gelu s rozsahem koncentrací 2-8 % a koncentrace bisakrylamidu byla s ohledem na předchozí experimenty zvolena pouze 1,5% (AB-1,5). Výsledné elektroforetogramy jsou znázorněny na Obr. 26 až 29.



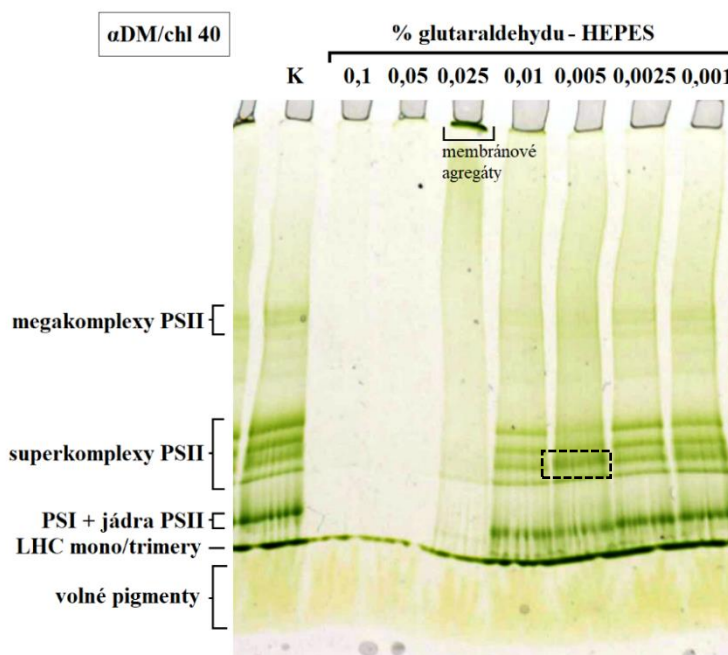
Obrázek 26: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí glutaraldehydu před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakarylamidu.



Obrázek 27: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí glutaraldehydu před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 20. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakarylamidu.

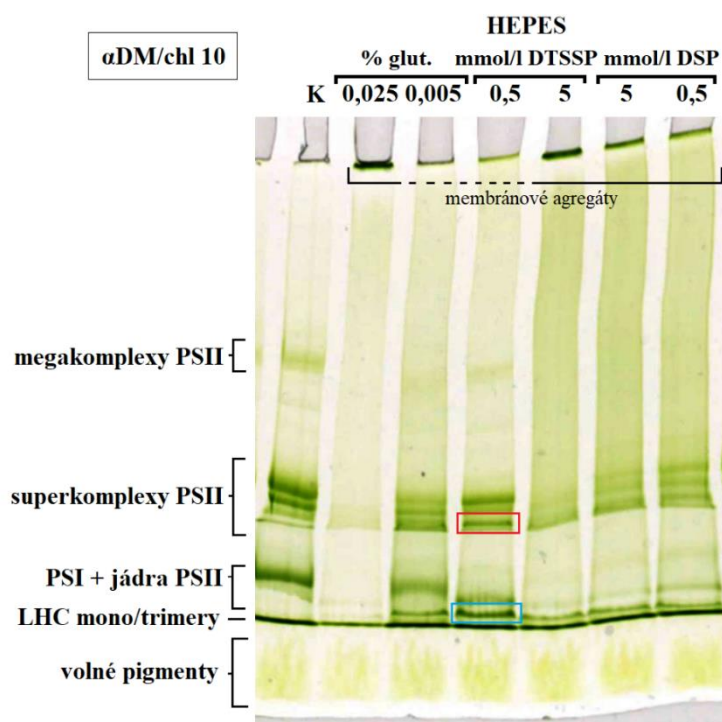


Obrázek 28: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí glutaraldehydu před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 30. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu.



Obrázek 29: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí glutaraldehydu před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 40. V rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu.

Při použití činidla glutaraldehydu v koncentracích 0,1 a 0,05 % došlo k tvorbě agregátů tylakoidních membrán, který po centrifugaci zůstal usazený na dně mikrokumavky, což znemožnilo jeho nanesení do jamek gelu. Při použití 0,025% glutaraldehydu došlo opět k vytvoření menšího množství agregátů tylakoidní membrány, které v tomto případě byly naneseny do jamky gelu, ale neprostoupily dále do gelu (Obr. 26 až 29). Při použití 0,005% koncentrace glutaraldehydu se v elektroforetogramu objevil výrazný pás v oblasti výskytu superkomplexů PSII, podobně jako v případě použití 0,5 mmol DTSSP. Tento pás byl nejvíce denzní při použití hmotnostního poměru α DM/chl 10 (Obr. 26). Na základě provedených experimentů se přistoupilo k finální separaci proteinových superkomplexů tylakoidních membrán stabilizovaných optimálními koncentracemi činidel DTSSP, DSP i glutaraldehydu, a to v následujících koncentracích: DTSSP a DSP v 0,5% koncentraci a v 5% koncentraci (tato koncentrace sloužila jako porovnávací), glutaraldehyd v koncentraci 0,005% a v 0,025% (tato koncentrace sloužila jako porovnávací). Solubilizace byla zvolena při použití hmotnostního poměru α DM/chl 10. Separace probíhala na polyakrylamidovém gradientovém gelu s rozsahem koncentrací 2-8 % a koncentrace bisakrylamidu byla zvolena jako AB-1,5. Výsledný elektroforetogram je znázorněn na Obr. 30.

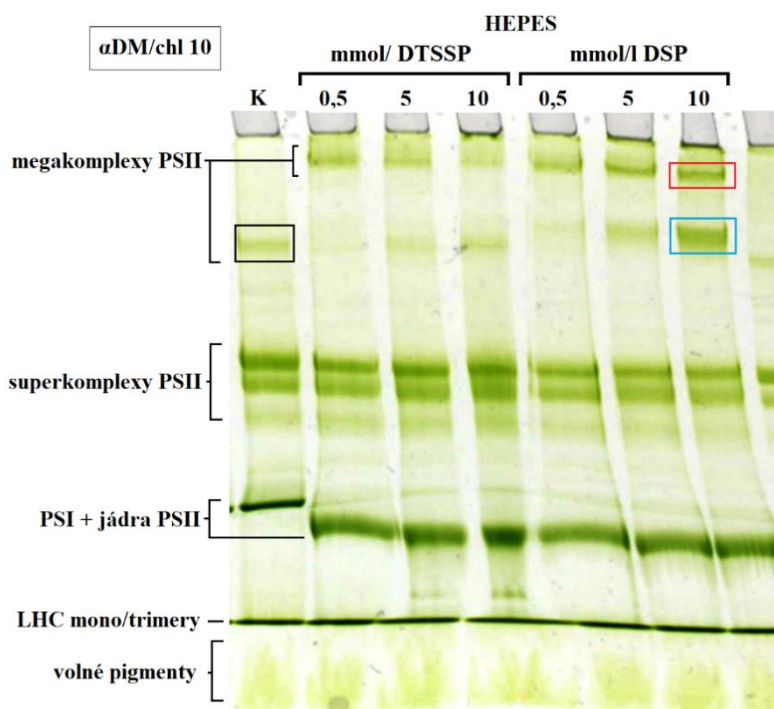


Obrázek 30: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP, DSP a glutaraldehydu před solubilizací. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu. V červeném rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II, v modrém rámečku je zvýrazněn denzní pás představující jádra fotosystémů II a fotosystémy I. Tyto pásy byly vyříznuty a podrobeny dalšímu zkoumání pomocí elektronové mikroskopie.

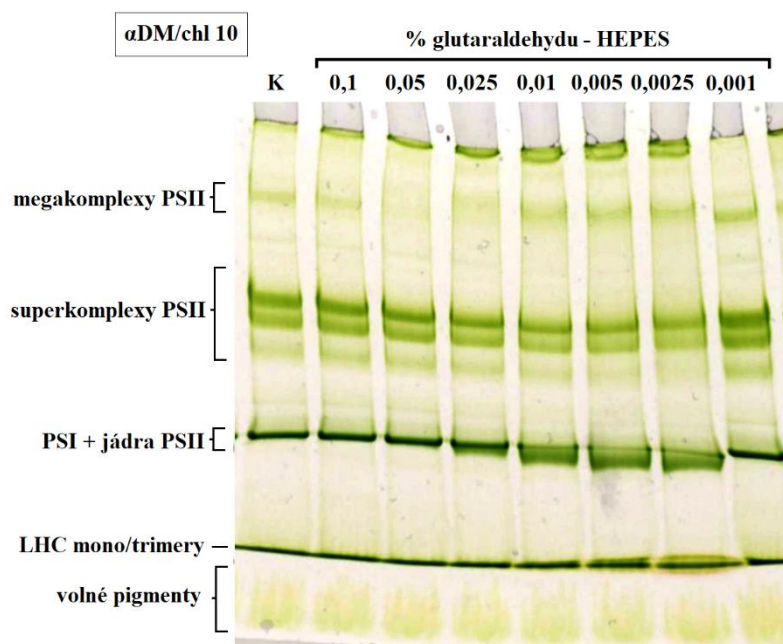
Z finálního elektroforetogramu byly vyříznuty pásy zájmu (Obr. 30), které byly podrobeny elektronové mikroskopii a následné obrazové analýze, viz kapitola 4.4.

4.3 Stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni solubilizované tylakoidní membrány

V druhé části experimentu byla provedena stabilizace vyšších forem fotosystémů s použitím činidel pro tvorbu příčných vazeb až po solubilizaci tylakoidních membrán. Zvoleny byly stejné podmínky jako v první části experimentu. Koncentrace DTSSP a DSP byla 0,5; 5 a 10 mmol/l a koncentrace glutaraldehydu byla 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,0025 a 0,001 %. Solubilizace probíhala při poměrech α DM/chl 10. Separace probíhala na polyakrylamidovém gradientovém gelu s rozsahem koncentrací 2-8 % a koncentrace bisakrylamidu byla zvolena jako AB-1,5. Výsledné elektroforetogramy jsou znázorněny na Obr. 31 a 32.



Obrázek 31: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí DTSSP a DSP po solubilizaci. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakrylamidu. V červeném rámečku je zvýrazněn denzní pás představující megakomplexy fotosystému II, v modrém rámečku denzní pás superkomplexů fotosystému II. Tyto pásy byly vyříznuty a podrobeny dalšímu zkoumání pomocí elektronové mikroskopie. Pás v černém rámečku byl odebrán jako referenční.



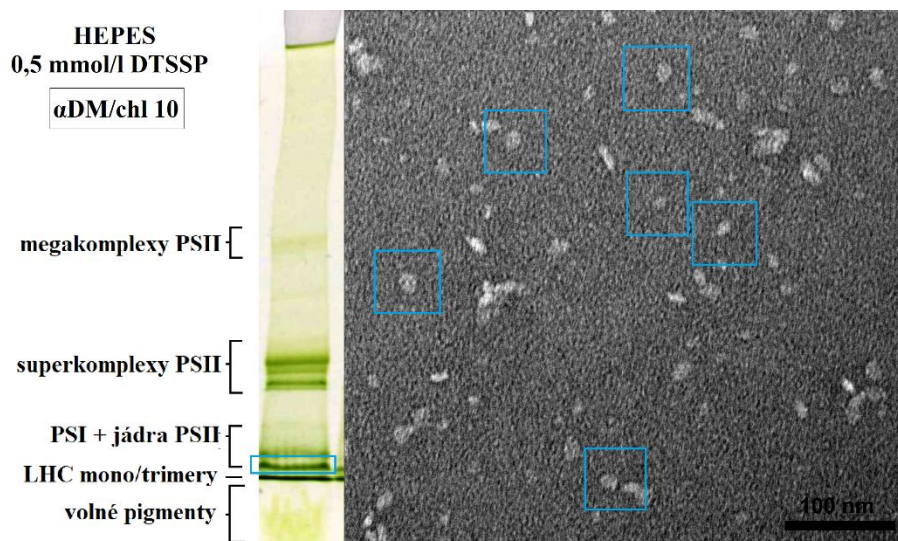
Obrázek 32: Elektroforetogram separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných pomocí glutaraldehydem po solubilizaci. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. Gel byl vytvořen ze zásobního roztoku akrylamidu obsahujícího 1,5 % bisakarylamidu.

Ve výsledných elektroforetogramech bylo možné pozorovat unikátní pásy při použití všech tří koncentrací (0,5; 5 a 10 mmol/l) činidel DTSSP i DSP (Obr. 31). Jednalo se o pásy představující megakomplexy PSII. Největší denzita těchto pásů byla patrná při použití DSP v koncentraci 10 mmol/l. Tyto pásy byly z gelu vyříznuty a byly podrobeny elektronové mikroskopii s následnou obrazovou analýzou, viz další kapitola. Při použití glutaraldehydu byly též patrné pozitivní změny v denzitě pásů se superkomplexy PSII, oproti použití činidel DTSSP a DSP ovšem nebyly tak výrazné (Obr. 32).

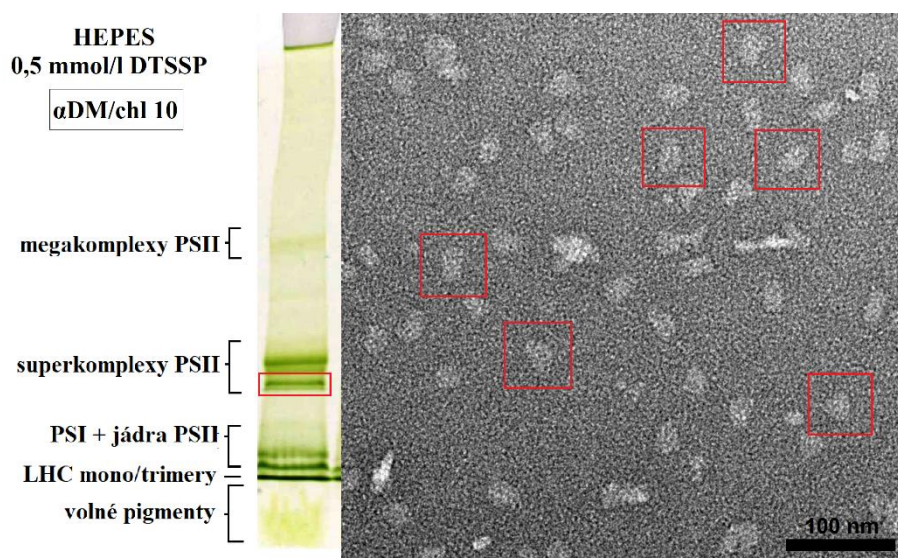
4.4 Charakterizace izolovaných vyšších forem fotosystémů

4.4.1 Přístup na úrovni intaktní tylakoidní membrány

Z gelu (Obr. 30) byly vyříznuty pásy zájmu, které byly podrobeny transmisní elektronové mikroskopii. Jednalo se o pásy představující jádra PSII a PSI (Obr. 33) a o pás představující superkomplexy PSII (Obr. 34). Z každého vzorku bylo pořízeno 300 snímků, které byly dále zpracovány pomocí obrazové analýzy.



Obrázek 33: V levé části je zobrazena část elektroforetogramu separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných před solubilizací pomocí 0,5mmol/l DTSSP v pufovacím systému HEPES. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V modrém rámečku je zvýrazněn denzní pás představující fotosystém I a jádra fotosystému II. V pravé části obrázku je reprezentativní snímek z transmisní elektronové mikroskopie fotosystémů I a jader fotosystému II z vybraného pásu. V modrých čtvercích jsou zvýrazněny vybrané částice představující zmíněné komplexy. Zvětšení 40 000x.

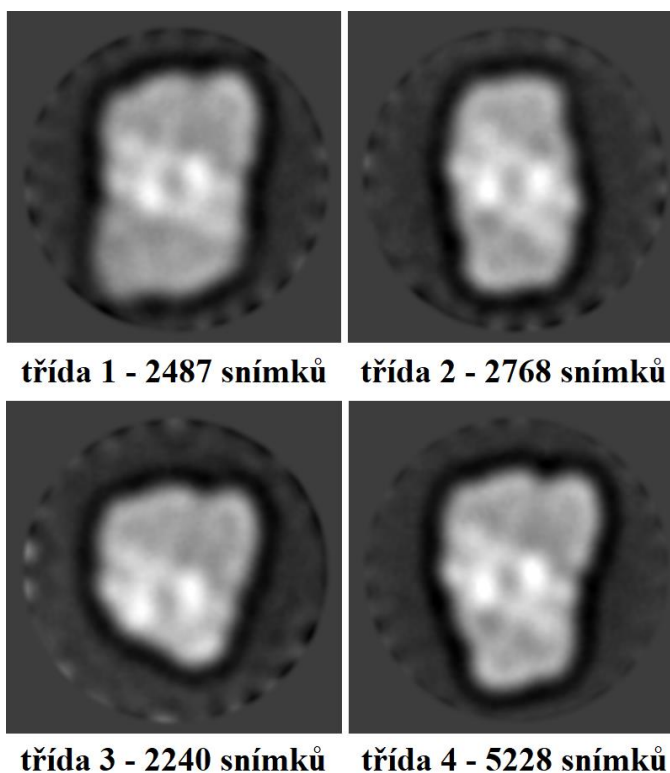


Obrázek 34: V levé části je zobrazena část elektroforetogramu separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných před solubilizací pomocí 0,5mmol/l DTSSP v pufovacím systému HEPES. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V červeném rámečku je zvýrazněn denzní pás představující superkomplexy fotosystému II. V pravé části obrázku je reprezentativní snímek z transmisní elektronové mikroskopie superkomplexů fotosystému II z vybraného pásu. V červených čtvercích jsou zvýrazněny vybrané částice představující variabilní formy fotosystému II. Zvětšení 40 000x.

4.4.1.1 Obrazová analýza

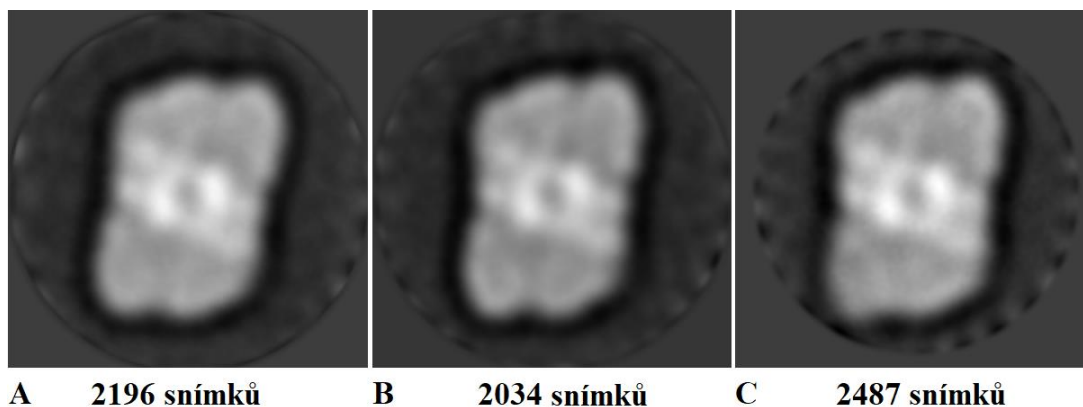
Z důvodu nízké kvality výsledků obrazové analýzy komplexů získaných z pásů představujících jádra PSII a PSI (Obr. 33) je v této kapitole uvedena obrazová analýza pouze komplexů získaných z druhého pásu, který představoval superkomplexy PSII (Obr. 34).

Z původního počtu 300 snímků bylo vybráno 40500 částic. Částice byly rozděleny do 4 tříd, které představovaly různé formy superkomplexů PSII. 2487 částic náleželo třídě 1, 2768 třídě 2, 2240 třídě 3 a 5228 třídě 4 (Obr. 35).



Obrázek 35: Výsledné struktury nalezených superkomplexů fotosystému II, získané obrazovou analýzou snímků z transmisní elektronové mikroskopie, rozdělené do 4 tříd.

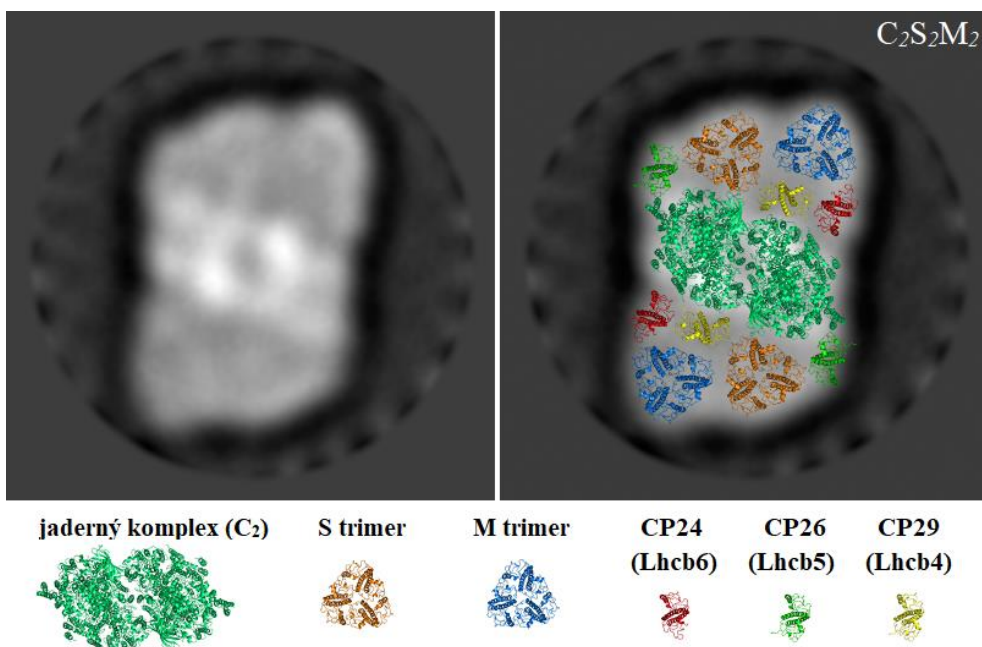
Takto vzniklé třídy jednotlivých částic vznikly klasifikací a postupným přečišťováním původního souboru 40500 snímků. Díky tomu docházelo k postupnému zlepšování kvality výsledné struktury, což je možné pozorovat na příkladu obrazové analýzy největšího nalezeného superkomplexu PSII z třídy 1 (Obr. 36).



Obrázek 36: Postupné zlepšování kvality obrazové analýzy snímků z transmisní elektronové mikroskopie. Obrázek A představuje výsledek prvotní klasifikace obrazové analýzy, obrázek B představuje výsledek opětovné analýzy provedené reanalýzou původního výsledku a obrázek C finální obrazovou analýzu. Ze snímků je patrné, že postupným přečišťováním docházelo ke zlepšení kvality obrazu. Částice představují superkomplexy fotosystému II třídy 1.

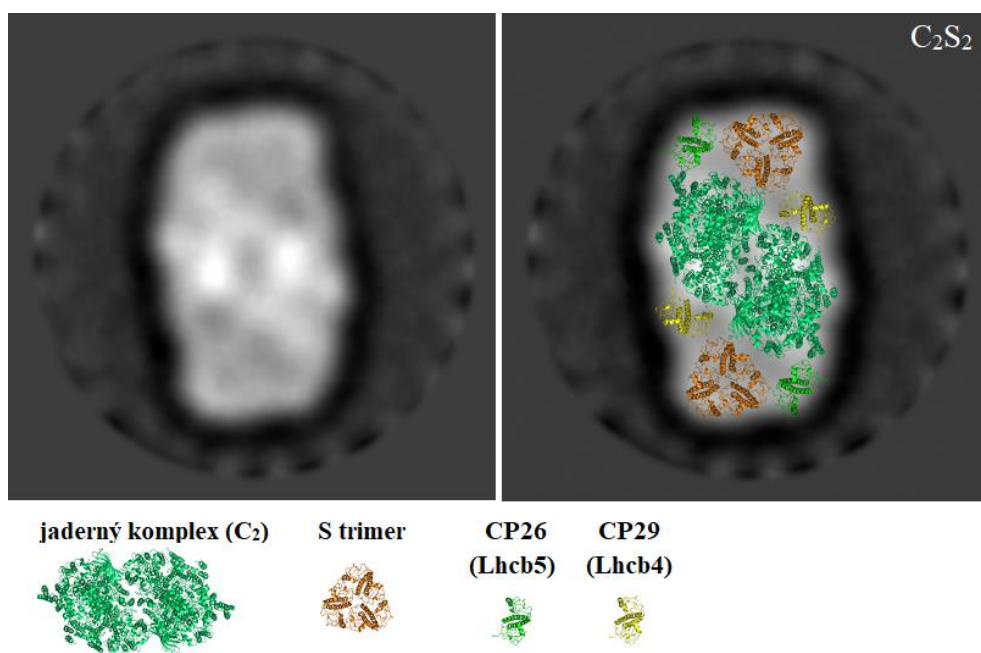
4.4.1.2 Strukturní charakterizace

Aby bylo možné strukturně charakterizovat nalezené superkomplexy PSII a lépe posoudit případné strukturní změny, bylo nutné částice doplnit krystalovou strukturou (Caffarri *et al.*, 2009). Doplněním struktury jednotlivými podjednotkami bylo zjištěno následující: Třidu 1, představovanou 2487 snímky, tvořily superkomplexy PSII označené jako $C_2S_2M_2$ (Obr. 37).



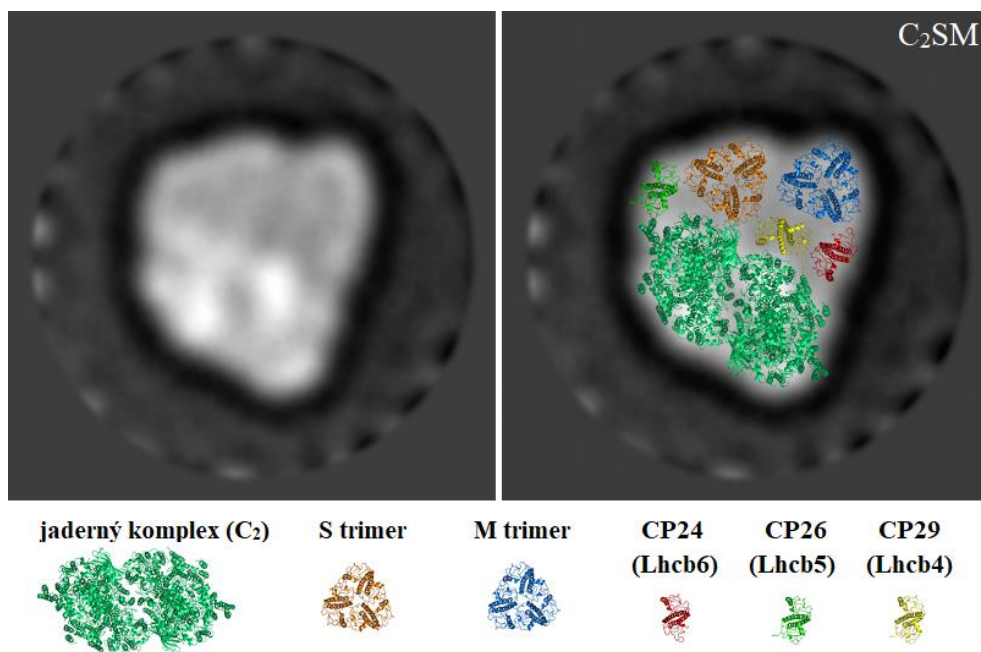
Obrázek 37: Superkomplex fotosystému II $C_2S_2M_2$ získaný obrazovou analýzou snímků z transmisní elektronové mikroskopie. V pravé části obrázku je struktura doplněna krystalovou strukturou jednotlivých podjednotek (Caffarri *et al.*, 2009).

Třídu 2, představovanou 2768 snímky, tvořily superkomplexy PSII označené jako C_2S_2 (Obr. 38).



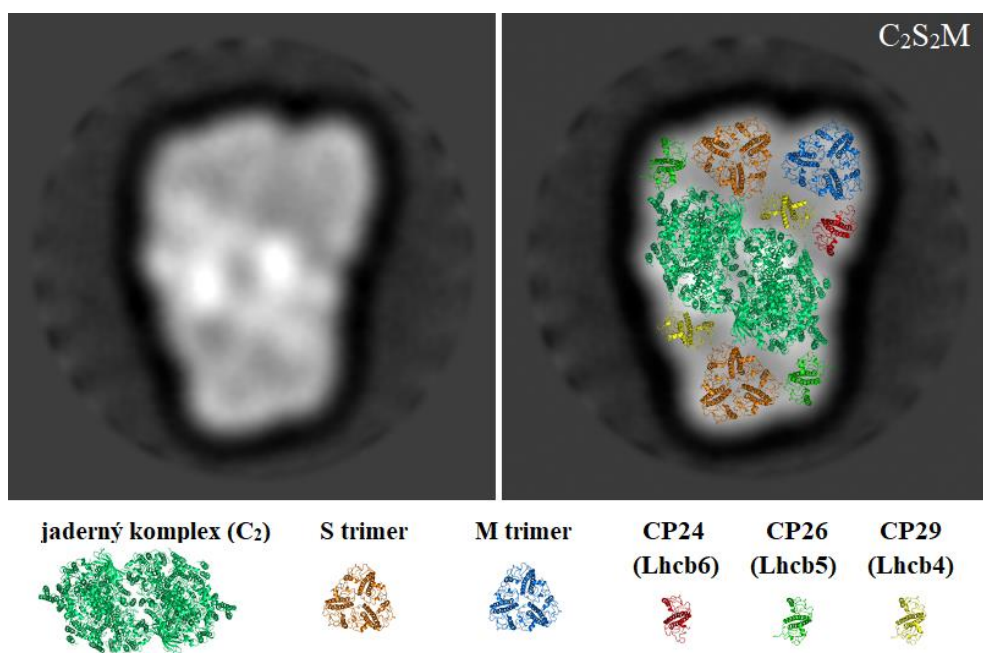
Obrázek 38: Superkomplex fotosystému II C_2S_2 získaný obrazovou analýzou snímků z transmisní elektronové mikroskopie. V pravé části obrázku je struktura doplněna krystalovou strukturou jednotlivých podjednotek (Caffarri *et al.*, 2009).

Třídu 3, představovanou 2240 snímky, tvořily superkomplexy PSII označené jako C_2SM (Obr. 39).



Obrázek 39: Superkomplex fotosystému II C_2SM získaný obrazovou analýzou snímků z transmisní elektronové mikroskopie. V pravé části obrázku je struktura doplněna krystalovou strukturou jednotlivých podjednotek (Caffarri *et al.*, 2009).

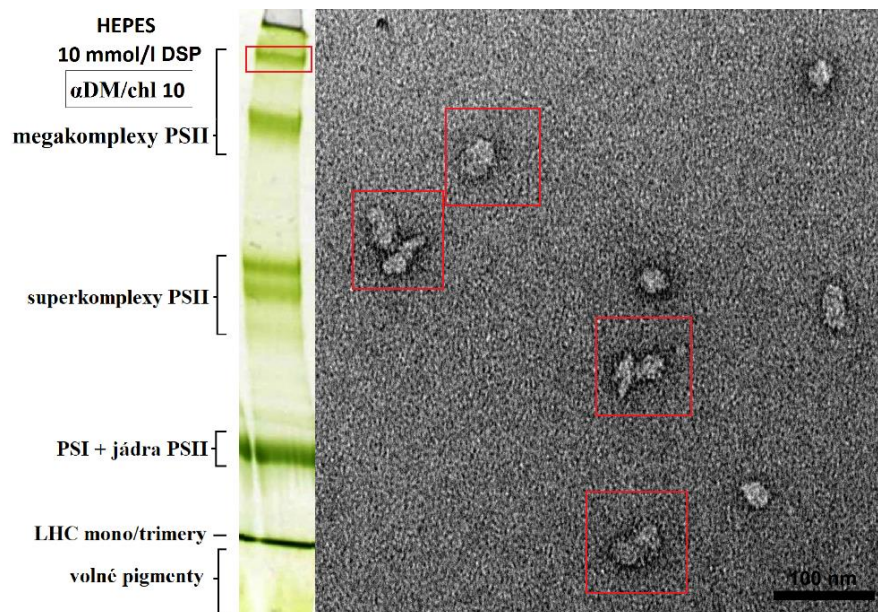
Třídu 4, představovanou 5228 snímky, tvořily superkomplexy PSII označené jako C₂S₂M (Obr. 40).



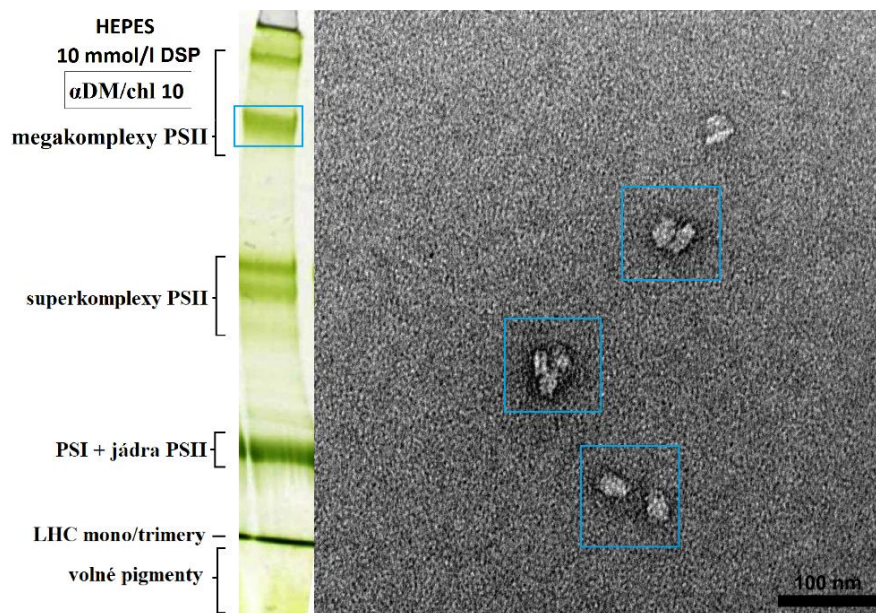
Obrázek 40: Superkomplex fotosystému II C₂S₂M získaný obrazovou analýzou snímků z transmisní elektronové mikroskopie. V pravé části obrázku je struktura doplněna krystalovou strukturou jednotlivých podjednotek (Caffarri *et al.*, 2009).

4.4.2 Přístup na úrovni solubilizované tylakoidní membrány

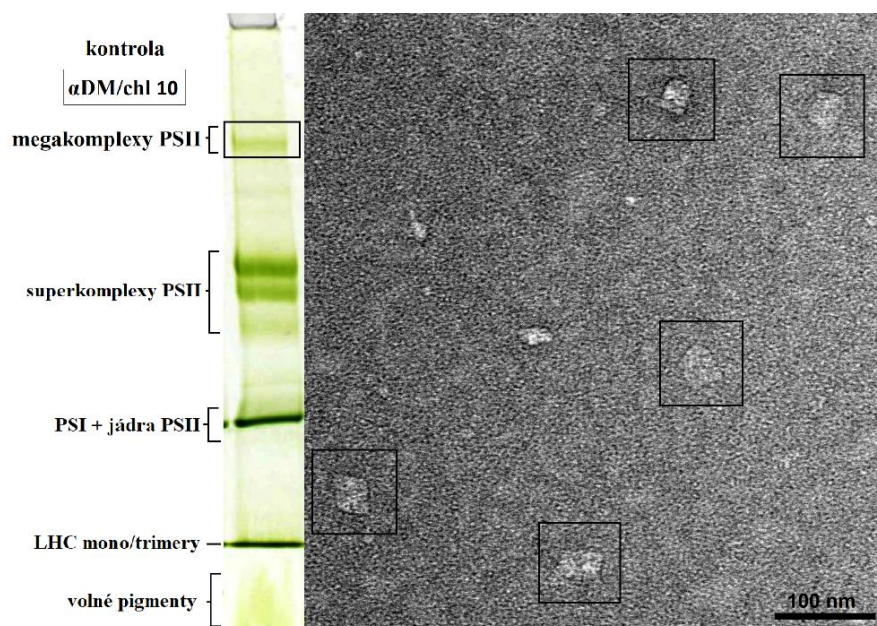
Z gelu (Obr. 31) byly vyříznuty pásy zájmu, které byly podrobeny transmisní elektronové mikroskopii. Jednalo se o pásy představující megakomplexy PSII (Obr. 41 a 42) spolu s kontrolním pásem představujícím taktéž megakomplexy PSII, který vznikl po rozdělení frakce tylakoidní membrány neošetřené činidlem pro tvorbu příčných vazeb (Obr. 43).



Obrázek 41: V levé části je zobrazena část elektroforetogramu separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných po solubilizaci pomocí 10mmol/l DSP v pufovacím systému HEPES. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V červeném rámečku je zvýrazněn denzní pás představující megakomplexy fotosystému II. V pravé části obrázku je snímek z transmisní elektronové mikroskopie megakomplexů fotosystému II z vybraného pásu. V červených čtvercích jsou zvýrazněny vybrané částice představující pravděpodobně nespecificky spojené megakomplexy fotosystému II. Zvětšení 40 000x.



Obrázek 42: V levé části je zobrazena část elektroforetogramu separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán stabilizovaných po solubilizaci pomocí 10mmol/l DSP v pufovacím systému HEPES. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V modrém rámečku je zvýrazněn denzní pás představující megakomplexy fotosystému II. V pravé části obrázku je snímek z transmisní elektronové mikroskopie megakomplexů fotosystému II z vybraného pásu. V modrých čtvercích jsou zvýrazněny vybrané částice představující pravděpodobně nespecificky spojené megakomplexy fotosystému II. Zvětšení 40 000x



Obrázek 43: V levé části je zobrazena část elektroforetogramu separovaných proteinových komplexů tylakoidních membrán, představujících kontrolu bez použití činidla pro tvorbu příčných vazeb. Membrány byly solubilizovány při hmotnostním poměru dodecyl- α -D-maltosidu k chlorofylu a a b 10. V černém rámečku je zvýrazněn denzní pás představující megakomplexy fotosystému II. V pravé části obrázku je snímek z transmisní elektronové mikroskopie megakomplexů fotosystému II z vybraného pásu. V černých čtvercích jsou zvýrazněny vybrané částice představující megakomplexy fotosystému II. Zvětšení 40 000x.

Jak je ze snímků patrné, megakomplexy PSII se sdružovaly do nepravidelných shluků na rozdíl od megakomplexů PSII z kontrolního pásu (Obr. 43). Počet těchto částic byl navíc velmi malý, což znemožňovalo provedení obrazové analýzy.

5 Diskuze

Bylo nutné ověřit funkčnost zvolených činidel, které by stabilizovaly vyšší formy fotosystémů a také nalézt optimální podmínky těchto reakcí. Činidlo DTSSP, které je ve vodě rozpustné, bylo zvoleno na základě studie Hea *et al.* (2014). V této studii se pomocí zmíněného činidla podařilo zachovat nativní strukturu reakčního centra zelené sírné bakterie *Chlorobaculum tepidum*, složeného z jádra reakčního centra a Fenna-Matthews-Olsonova anténního proteinu. Dále bylo použito i činidlo DSP, jakožto ve vodě nerozpustná forma těžé látky. Podmínky experimentu byly zvoleny podle zmíněné studie, tedy při laboratorní teplotě a délce inkubace 30 min a při koncentraci zvolených činidel 0,5; 5 a 10 mmol/l. Lišil se i vstupní materiál, který byl v tomto případě představován frakcí PSII izolovanou z *Arabidopsis thaliana*. Pufrovací systémy byly zvoleny dva, a to z důvodu posouzení, který pufrovací systém poskytne vhodnější reakční podmínky. Jednalo se fosfátový pufr a HEPES pufr, které byly vybrány na základě produktového listu vydaného k použitým činidlům (Thermo Scientific, 2012). Kritickými aspekty při výběru pufrů byla možnost použití pufru v neutrální oblasti pH a absence primárních amino skupin, které by reagovaly s činidly. Vzorky ošetřené zvolenými činidly byly následně separovány pomocí SDS-PAGE, aby mohla být lépe posouzena účinnost reakce. Stejně jako při použití činidla DTSSP ve studii Hea *et al.* (2014), i při tomto experimentu se ukázalo, že se toto činidlo jeví jako funkční. A to i při použití obou pufrovacích systémů, což dokazuje pás vzniklý v horní části elektroforetogramu u vzorků ošetřených tímto činidlem oproti kontrolnímu vzorku u všech použitých koncentrací (Obr. 12). Koncentrace DTSSP 5 mmol/l v pufrovacím systému HEPES vykazovala lepší efekt tvorby příčných vazeb než koncentrace 0,5 mmol/l, což také naznačuje denzita vzniklých pásů. Navíc při použití 5mmol/l koncentrace DTSSP docházelo k usazení proteinových agregátů na dně jamky gelu. Oproti tomu pás vzniklý při použití koncentrace 10 mmol/l DTSSP se jevil jako méně denzní oproti koncentraci 5 mmol/l, což bylo způsobeno tím, že při přípravě vzorku došlo vlivem vysoké intenzity zesíťování ke vzniku proteinového agregátu, který v tomto případě nemohl být vůbec nanesen do jamek gelu. Ve fosfátovém pufru docházelo se zvyšující se koncentrací činidla k nárůstu denzity pásů napříč zvyšující se koncentrací DTSSP, což prokázalo jeho funkčnost i v tomto pufrovacím systému. Použití ve vodě nerozpustného činidla DSP se jeví též jako funkční, což dokazují vzniklé pásy na elektroforetogramu u vzorků ošetřených tímto činidlem v koncentraci 0,5 a 5 mmol/l oproti kontrolnímu vzorku u obou pufrovacích systémů (Obr. 13). Při použití koncentrace 10 mmol/l byl pozorován stejný efekt jako při použití činidla DTSSP v systému HEPES, tedy že docházelo ke vzniku proteinového agregátu, který

nebylo možné nanést do jamky gelu, což v tomto případě způsobilo absenci nově vzniklého pásu v obou pufovacích systémech oproti ostatním vzorkům. Při použití 5mmol/l koncentrace DSP taktéž vznikly proteinové agregáty, které během separace zůstaly na dně jamky gelu. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že obě činidla pro tvorbu příčných vazeb, tedy ve vodě rozpustné činidlo DTSSP a ve vodě nerozpustné činidlo DSP, se skutečně jeví jako funkční, a to v obou pufovacích systémech, HEPES a fosfátovém pufru, za definovaných podmínek uvedených ve studii Hea *et al.* (2014). Jelikož však tato práce byla zaměřena na stabilizaci případných vyšších forem fotosyntetických komplexů, jejichž stabilita by při inkubaci s činidly při laboratorní teplotě mohla být negativně ovlivněna, bylo nutné ověřit reaktivitu zmíněných činidel i při nízké teplotě (7 °C). Mimo nižší teplotu byla prodloužena i délka inkubace (2 h), a to z toho důvodu, že se očekávalo, že reakce tvorby příčných vazeb bude díky snížené teplotě probíhat menší rychlostí. Použití činidla DTSSP se i za nových podmínek reakce jeví jako funkční v obou pufovacích systémech (Obr. 14). Při použití pufovacího systému HEPES došlo k nárůstu intenzity nově vzniklého pásu v horní části gelu se zvyšující se koncentrací činidla oproti kontrolnímu vzorku. Při použití fosfátového pufru bylo možné pozorovat více denzní pás v horní části gelu při použití koncentrace 5 mmol/l oproti koncentraci 0,5 mmol. Při použití koncentrace 10 mmol/l došlo k tvorbě proteinového agregátu, který nebylo možné nanést do jamky gelu. Při použití koncentrace 5 mmol/l ve fosfátovém pufru docházelo taktéž ke vzniku proteinového agregátu, který ale v tomto případě zůstal usazený na dně jamky gelu. Použití činidla DSP se za zmíněných podmínek inkubace se vzorkem jeví též jako funkční (Obr. 15). Oproti předchozím podmínkám (Obr. 13) ovšem denzita nově vzniklých pásů nebyla tak intenzivní, i přesto ale docházelo k jejímu nárůstu u obou pufovacích systémů. Součástí tohoto experimentu bylo použití činidla glutaraldehydu jako referenčního činidla z toho důvodu, aby bylo možné prokázat, že činidlo DTSSP i DSP jsou stejně účinná jako toto prokazatelně fungující činidlo. Jeho funkčnost dokazuje například studie Vasiljeva *et al.* (2004), který pomocí glutaraldehydu stabilizoval oligomerní formy mitochondriálního komplexu Tim9/Tim10 či Morrowa *et al.* 2000, který stabilizoval oligomerní formy proteinů teplotního šoku (Hsp22). Činidlo bylo použito podle zmíněných studií v 0,1% koncentraci, a to v obou podmínkách experimentu, tedy nejprve při laboratorní teplotě, déle inkubace 30 min a poté při nižší teplotě (7 °C), vyšší déle inkubace (2 h), a to v obou pufovacích systémech. Jak je z elektroforetogramů patrné (Obr. 12 až 15), došlo ke vzniku intenzivního pásu v horní části gelu, což prokázalo jeho funkčnost za uvedených podmínek. Ve spodní části elektroforetogramu pak bylo možné pozorovat artefakt interakce glutaraldehydu s barvivem Coomassie, který pravděpodobně nesouvisí se schopností činidla vytvářet příčné

vazby. Přistoupilo se však i k použití širší škály koncentrací glutaraldehydu (za podmínek nižší teploty a delší doby inkubace), aby se ukázalo, zda glutaraldehyd při nižších koncentracích nebude použitelný i pro účely izolace stabilizace oligomerních forem fyotosyntetických komplexů v dalším experimentu. Tedy, zda se použití nízké koncentrace silného činidla glutaraldehydu nevyrovná použití činidla DTSSP a DSP. Jak je z elektroforetogramů patrné (Obr. 16 a 17), účinnost tvorby příčných vazeb byla zaznamatelná při použití 0,1% koncentraci, a dále 0,05 a 0,025% koncentraci, kde bylo možné pozorovat nově vzniklý pás v horní části gelu oproti kontrolnímu vzorku, přičemž s klesající koncentrací glutaraldehydu vykazovala denzita tohoto pásu klesající tendenci. Účinnost tohoto činidla v podmínkách optimalizovaných pro původní činidla DTSSP a DSP se jevila jako srovnatelná, proto toto činidlo bylo použito i v následující části experimentu.

Provedené experimenty potvrdily funkčnost činidla DTSSP, DSP i glutaraldehydu při různých podmínkách inkubace, tedy laboratorní teploty a snížené teploty, při různých koncentracích a při obou délkách inkubace. Jako funkční se jevily oba pufovací systémy. Pro účely stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni tylakoidní membrány byly vybrány podmínky, při kterých by se eliminovala možnost narušení intaktní struktury případných oligomerních forem fotosystémů, tedy nižší teplota a delší doba inkubace. Pufovací systém byl pro účely dalšího experimentu zvolen HEPES z toho důvodu, že při inkubaci s nižší teplotou a delší dobou inkubace docházelo při použití DTSSP ve fosfátovém pufru ke vzniku proteinového agregátu, který nebylo možné nanést do jamky gelu při použití koncentrace 10 mmol/l a usazeného agregátu na dně jamky gelu při použití koncentrace 5 mmol/l (Obr. 14), což pravděpodobně indikovalo, že použitím fosfátového pufru dochází k nadměrnému efektu tohoto činidla při použití v daném pufovacím systému za daných podmínek. Při použití glutaraldehydu se navíc jevily nově vzniklé pásy v elektroforetogramu více denzní oproti pásům při použití fosfátového pufru (Obr. 16 s 17). Dalším důvodem použití pufovacího systému HEPES byl i fakt, že před ošetřením fyotosyntetických komplexů činidly vytvářejících příčné vazby je nutné tylakoidní membránu rozvolnit, což se děje prostřednictvím pufru, který mimo jiné obsahuje HEPES. Za těchto podmínek se přistoupilo k další části experimentu, jehož cílem bylo stabilizovat vyšší formy fotosystémů na úrovni intaktní tylakoidní membrány a následně je separovat pomocí CN-PAGE.

Pro účely stabilizace vyšších forem fotosystémů na úrovni intaktní tylakoidní membrány byly zvoleny podmínky inkubace totožné s předchozím krokem optimalizačního experimentu, tedy při snížené teplotě a zvýšené délce inkubace, aby nedošlo k narušení intaktní formy málo stabilních oligomerních forem fotosystémů, a aby byl dostatečný čas

pro tvorbu příčných vazeb. Činidla DTSSP a DSP byla zvolena ve stejné koncentraci jako v předchozích krocích, stejně tak i koncentrace glutaraldehydu. Pro účely samotné separace fotosyntetických komplexů bylo nutné optimalizovat hmotnostní poměr detergentu α DM k chlorofylu (α DM/chl) pro posouzení vlivu solubilizace membrány na případnou intaktnost komplexů, jelikož bylo zjištěno, že zvyšující se koncentrace detergentu má vliv na účinnost solubilizace tylakoidní membrány (Kouřil *et al.*, 2018). Potenciálně vzniklý vyšší funkční celek fotosystému by se totiž mohl solubilizovat až ve vyšším poměru detergentu, a proto se tedy použilo více hmotnostních poměrů α DM/chl. Jako výchozí hmotnostní poměr byl zvolen DM/chl 20, a to na základě studie Noska *et al.* (2017), kde byl tento poměr detergentu úspěšně použit při separaci megakomplexů PSII právě u *Arabidopsis thaliana*. Dále byl použit i menší hmotnostní poměr (10) a větší poměry (30 a 40). Ukázalo se, že měnící se poměr DM/chl neměl významný vliv na účinnost solubilizace tylakoidních membrán ošetřených činidly DTSSP a DSP, jak je patrné ze všech čtyřech elektroforetogramů (Obr. 18 až 21). Při použití koncentrace DTSSP 0,5 mmol/l došlo k úbytku denzit prvních dvou pásů představujících superkomplexy ve srovnání s kontrolním vzorkem, za to však došlo k výraznému nárůstu v intenzitě třetího pásu oproti kontrole, který podle literatury pravděpodobně představoval superkomplex C_2S_2 , případně C_2SM (Bressan *et al.*, 2017). Při koncentracích 5 a 10 mmol/l již tento pás nevykazoval vyšší denzitu oproti kontrole, jelikož docházelo k příliš intenzivnímu zesílení a komplexy zůstaly na dně jamek a nevstoupily dále do gelu. Při použití DSP nevznikl žádný výrazně denzní pás oproti kontrole a stejně jako ve vyšších koncentracích při použití DTSSP i v tomto případě zůstávaly zesílené komplexy na dně jamek, a to při všech třech použitých koncentracích. Z tohoto důvodu se přistoupilo k použití separačního gelu s nižším stupněm zesíťování (tj. s nižší koncentrací bisakrylamidu (1,5 %)). Při použití DTSSP v koncentraci 0,5 mmol/l došlo opět ke snížení denzity prvních dvou pásů představujících superkomplexy PSII a výraznému nárůstu intenzity třetího pásu, pravděpodobně představovaného superkomplexe C_2S_2 , případně C_2SM (Bressan *et al.*, 2017) oproti kontrole (Obr. 22 až 25). Při použití vyšších koncentrací DTSSP a při všech koncentracích použitého DSP docházelo k opět k tvorbě agregátů, které zůstaly na dně jamek. V porovnání s gelem s koncentrací bisakrylamidu 3 % (Obr. 18 až 21) došlo při použití nižší koncentrace bisakrylamidu k posunu migrační vzdálenosti jednotlivých komplexů. (Obr. 22 až 25). Jelikož při použití nižší koncentrace bisakrylamidu byly v polyakrylamidovém gelu větší póry, došlo k menšímu vzájemnému rozlišení pásů. Přesto, že se očekávalo, že komplexy původně zadržené na dně jamek by mohly vstoupit do gelu, se tomu tak nestalo, což bylo pravděpodobně důsledkem tvorby velkých nescifických agregátů, které ani za těchto podmínek nemohly vstoupit do gelu.

I v této části experimentu byl použit glutaraldehyd, a to z důvodu jeho možného využití i při stabilizaci vyšších forem fotosystémů na základě předešlých slibných výsledků optimalizace, a to opět v širokém rozsahu koncentrací. Jak je z elektroforetogramů patrné (Obr. 26 až 29), se zvyšujícím se poměrem DM/chl docházelo k úbytku denzit jednotlivých pásů, což je důkazem toho, že na úrovni membrány nefunguje tak, jako činidla DTSSP a DSP, jelikož jsou komplexy vyššími koncentracemi detergentu narušeny a nejsou tedy tímto činidlem stabilizovány, jako v případě dvou předchozích činidel. Napříč koncentracemi byl efekt patrný při koncentracích 0,1 a 0,05 %, kdy došlo k tvorbě agregátu, který nebylo možné nanést do jamek gelu a dále při koncentraci 0,025 %, kdy zůstal agregát na dně jamky. Oproti kontrole byla zvýšená denzita třetího pásu, opět představovaného superkomplexem C_2S_2 , případně C_2SM (Bressan *et al.*, 2017) při použité koncentraci glutaraldehydu 0,005 %. Denzita zbylých pásů při zvyšujících se koncentracích (0,001 až 0,01 %) však nebyla oproti kontrole nijak výrazná, což opět přispívá k tomu, že se použití tohoto činidla jeví jako nepřilíš vhodné pro stabilizaci vyšších forem fotosyntetických komplexů. Závěrem této části experimentu byla finální separace ošetřených tylakoidních membrán (Obr. 30) s takovými koncentracemi činidel, jejichž použití mělo společný efekt takový, že při následné separaci takto ošetřených tylakoidních membrán docházelo na elektroforetogramu ke zvýšení denzity třetího pásu v oblasti výskytu superkomplexů PSII, pravděpodobně představovaného superkomplexem C_2S_2 , případně C_2SM (Bressan *et al.*, 2017). Pás zájmu se jevil jako nejvíce denzní při použití DTSSP v koncentraci 0,5 mmol/l, a proto byl vyřezán a podroben elektronové mikroskopii s následnou obrazovou analýzou, aby se ukázalo, zda se nejedná o případnou novou formu superkomplexu PSII. Stejně tak byl vyřezán i nově vzniklý pás nacházející se v oblasti výskytu PSI a jader PSII, při použití DTSSP ve stejné koncentraci a podroben elektronové mikroskopii a obrazové analýze (viz dále).

Přesto, že byly očekávány změny ve smyslu nově vzniklého pásu, či zvýšení denzity pásů v horních oblastech gelu při použití činidel vytvářejících příčné vazby, k výrazným změnám nedošlo. Přistoupilo se tedy k tvorbě příčných vazeb na úrovni solubilizované tylakoidní membrány. Stabilizace vyšších fotosyntetických komplexů byla provedena za stejných podmínek jako v předchozím experimentu. Jako hmotnostní poměr byl použit pouze poměr DM/chl 10. Při použití DTSSP a DSP ve všech třech koncentracích nedošlo k výrazným změnám denzity pásů představujících superkomplexy PSII (Obr. 31). Objevily se ale pásy ve vysokomolekulárních oblastech gelu, které mohly představovat nové oligomerní formy fotosystémů, a to ve všech koncentracích DTSSP a DSP. Při použití činidla DTSSP v koncentraci 10 mmol/l a DSP v koncentraci 5 a 10 mmol/l se zvýraznila denzita pásů oproti kontrole v nižší oblasti gelu, kde se vyskytují vysokomolekulární

komplexy, oproti předchozím pásům. Tyto pásy byly vyřezány a podrobeny elektronové mikroskopii s následnou obrazovou analýzou. Stejně tak byl vyříznut kontrolní pás ze vzorku neošetřeného činidlem pro tvorbu příčných vazeb, aby se ukázalo, zda se nejednalo o novou formu oligomerní formy fotosystémů. Použití glutaraldehydu mělo podobný efekt na vznik nových pásů ve vysokomolekulárních oblastech (Obr. 32), ale vzhledem k tomu, že předchozí experimenty ukázaly, že DTSSP a DSP poskytují lepší výsledky, se proto analýza dělala pouze na těchto činidlech.

Vzorky vyřezaných pásů gelů z předchozích experimentů byly podrobeny elektronové mikroskopii, aby se ukázalo, o jaké formy fotosystémů se jedná. Byla provedena obrazová analýza komplexů z pásu představujícího PSI a jádra PSII (Obr. 33). Jednalo o malé komplexy spíše zaobleného tvaru, u kterých je obrazová analýza velmi náročná. Navíc byla velká variabilita ve velikosti a tvaru částic. Softwarová klasifikace díky tomu nedokázala vybrat ideální částice, což mělo za následek nekvalitní výsledek celé obrazové analýzy. Druhý pás, představovaný superkomplexy PSII, obsahoval tvarově podobné částice se specifickým tvarem (Obr. 34), obrazová analýza proto byla úspěšná. Byly nalezeny čtyři částice, které byly představovány menšími i většími formami superkomplexu PSII (Obr. 35). Menší částice se v pásu objevily nejspíše vlivem komigrace, kdy větší částice s sebou strhávaly částice o menší velikosti. Po doplnění krystalových struktur bylo zjištěno, že nedošlo k žádné zřetelné strukturální změně oproti již publikovaným strukturám (Kouřil *et al.*, 2012; Caffarri *et al.*, 2009). Jednalo se o superkomplex PSII označovaný jako $C_2S_2M_2$ (Obr. 37), C_2S_2 (Obr. 38), C_2S_2M (Obr. 39) a C_2S_2M (Obr. 40). Činidlo DTSSP tento superkomplex stabilizovalo ve své přirozené formě, proto došlo pouze ke zvýšení denzity tohoto pásu oproti kontrole. Zůstává však nejasné, proč došlo ke stabilizaci zrovna těchto komplexů.

Při elektronové mikroskopii pásů vzniklých po stabilizaci komplexů na úrovni tylakoidní membrány se očekávalo, že budou nalezeny specifické oligomerní komplexy. Z tohoto důvodu byl použit i kontrolní pás představující megakomplexy PSII (Obr. 43), který byl srovnán se snímky ze studie provedené Noskem *et al.* (2017), aby se potvrdilo, že se opravdu jedná o tyto struktury. Jak ale ukazují reprezentativní snímky z elektronové mikroskopie, jedná se pravděpodobně o nespecifické megakomplexy PSII, protože napříč snímky nebyly nalezeny žádné tvarově podobné částice, z čehož je zřejmé, že se pravděpodobně nejedná o specifické megakomplexy, ale náhodně propojené částice fotosyntetických komplexů (Obr. 41 a 42).

Byla použita tři různá činidla pro tvorbu příčných vazeb při různých koncentracích a podmínkách, aby se ukázalo, že tato činidla fungují a že fungují za daných reakčních

podmínek. Ověřovací studie za použití SDS-PAGE proběhla úspěšně. Ověřené funkční podmínky byly poté aplikovány na intaktní tylakoidní membrány a na solubilizované tylakoidní membrány. Ukázalo se ale, že na těchto úrovních použitá činidla nefungují podle původních představ. I přes jejich funkčnost nedocházelo k tvorbě nových pásů během separace pomocí CN-PAGE, které by mohly indikovat přítomnost vyšších funkčních celků tvořených fotosyntetickými komplexy. Byla by nutná důkladnější a časově nákladnější optimalizace, na kterou v této práci nebyl vymezen prostor. Tato práce však nepochybně ukázala, že použitá činidla pro tvorbu příčných vazeb jsou při studiu fotosyntetických komplexů aplikovatelná. Byly navrženy i základní podmínky reakce, při kterých dochází ke stabilizaci intaktních forem superkomplexů PSII. Pro případnou stabilizaci vyšších forem fotosyntetických komplexů s použitím činidel pro tvorbu příčných vazeb by však bylo potřeba dalších kroků optimalizace, případně vystavit rostliny různým vnějším podmínkám indukujícím tvorbu vyšších funkčních fotosyntetických celků.

6 Závěr

Teoretická část této diplomové práce byla zaměřena na problematiku fotosystémů, s ohledem na jejich schopnost vytvářet vyšší funkční celky s dalšími komplexy. Druhá část teoretické práce byla věnována činidlům se schopností tvorby příčných vazeb, jejich rozdělení a využití ve strukturálních studiích.

Experimentální část této práce se věnovala využití činidel vytvářejících příčné vazby ke stabilizaci vyšších funkčních celků fotosystémů izolovaných z *Arabidopsis thaliana*, se záměrem nalézt nové formy těchto vyšších celků. Provedené experimenty poukázaly na funkčnost použitých činidel, kterými byl 3,3'-dithiobis(sulfo-sukcinimidyl propionát), dithiobis(sukcinimidyl propionát) a glutaraldehyd. Byly navrženy i optimální podmínky, při kterých dochází ke stabilizaci intaktních forem superkomplexů fotosystémů II. Použitím činidel vytvářejících příčné vazby za daných podmínek se ovšem nepodařilo nalézt žádné nové formy vyšších funkčních celků fotosystémů.

7 Seznam použitých zkratek

APS	Peroxodisíran amonný
Asc	Askorbát sodný
ATP	Adenosintrifosfát
Bis-Tris	2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
BSA	Hovězí sérový albumin
CN-PAGE	Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f
DM	Dodecyl- α -D-maltosidem
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSP	Dithiobis(sukcinimidyl propionát)
DTSSP	3,3'-dithiobis(sulfo-sukcinimidyl propionát)
EDTA-Na	Ethylendiamintetraoctová kyselina, sodná sůl
Fd	Ferredoxin
FMO	Fenna-Matthews-Olson anténní protein
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ oxidoreduktasa
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
Hsp22	Protein teplotního šoku 22
LHCI	Světloběrný komplex fotosystému I
LHCII	Světloběrný komplex fotosystému II
Na-Asc	Aminokapronová kyselina
NDH	NAD(P)H dehydrogenasa
OEC	Kyslík vyvíjející komplex
PGR5	Proton gradient regulativ 5 komplex
PGRL1	Proton gradient regulativ like 1 komplex
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
RCC	Jádro reakčního centra
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s detergentem dodecylsíránem sodným
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylendiamin

Tim10	Translokasa vnitřní membrány 10
Tim9	Translokasa vnitřní membrány 9
Tricin	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris)

8 Seznam použité literatury

- Albanese P., Nield J., Tabares J. A. M., Chiodoni A., Manfredi M., Gosetti F., Marengo E., Saraco G., Barber J., Pagliano C. (2016) Isolation of novel PSII-LHCII megacomplexes from pea plants characterized by a combination of proteomics and electron microscopy. *Photosynthesis Research* **130**, 19-31.
- Amarnath K., Bennet D. I. G., Schneider A. R., Fleming G. R. (2016) Multiscale model of light harvesting by photosystem II in plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 1156-1161.
- van Amerongen H., Croce R. (2013) Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis Research* **116**, 251-263.
- van Amerongen H., Dekker J. P. (2003) Light-Harvesting in Photosystem II. In *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis, Vol. 13 Advances in Photosynthesis and Respiration* (Green B. R., Parson W. W., eds.), pp. 219-251, Springer, The Netherlands.
- Amunts A., Drory O., Nelson N. (2007) The structure of plant photosystem I supercomplex at 3.4 angstrom resolution. *Nature* **447**, 58-63.
- Amunts A., Nelson N. (2008) Functional organization of a plant Photosystem I: Evolution of a highly efficient photochemical machine. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 228-237.
- Amunts A., Nelson N. (2009) Plant Photosystem I Design in the Light of Evolution. *Structure* **17**, 637-650.
- Amunts A., Toporik H., Borovikova, A., Nelson N. (2010) Structure Determination and Improved Model of Plant Photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 3478-3486.
- Anderson J., Boardman N. (1966) Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **112**, 403-421.
- Armbrust T. S., Odom W. R., Guikema J. A. (1994) Structural analysis of photosystem I polypeptides using chemical crosslinking. *Journal of Experimental Zoology* **269**, 205-211.
- Armbrust T. S., Parag R., Chitnis P. R., Guikema J. A. (1996) Organization of Photosystem I Polypeptides Examined by Chemical Cross-Linking. *Plant Physiology* **111**, 1307-1312.

- Ballottari M., Dall'Osto L., Morosinotto T., Bassi R. (2007) Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 8947-8958.
- Ballottari M., Girardon J., Dall'Osto L., Bassi R. (2012) Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1817**, 143-157.
- Balsera M., Arellano J. B., Revuelta J. L., de las Rivas J., Hermano J. A. (2005) The 1.49 Å Resolution Crystal Structure of PsbQ from Photosystem II of *Spinacia oleracea* Reveals a PPII Structure in the N-terminal Region. *Journal of Molecular Biology* **350**, 1051-1060.
- Battchikova N., Eisenhut M., Aro E. M. (2011) Cyanobacterial NDH-1 complexes: novel insights and remaining puzzle. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 935-944.
- Bellaïfiore S., Barneche F., Peltier G., Rochaix J. D. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* **433**, 892-895.
- Bell A. J., Frankel L. K., Bricker T. M. (2015) High Yield Non-detergent Isolation of Photosystem I-Light harvesting Chlorophyll II Membranes from Spinach Thylakoids: IMPLICATIONS FOR THE ORGANIZATION OF THE PS I ANTENNAE IN HIGHER PLANTS. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 18429-18437.
- Bengis C., Nelson N. (1975) Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 2783-2788.
- Ben-Shem A., Frolow F., Nelson N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**, 630-635.
- Ben-Shem A., Frolow F., Nelson N. (2004a) Evolution of photosystem I – from symmetry through pseudo-symmetry to asymmetry. *FEBS Letters* **564**, 274-280.
- Ben-Shem A., Frolow F., Nelson N. (2004b) Light harvesting features revealed by the structure of plant photosystem I. *Photosynthesis Research* **81**, 239-250.
- Benson S. L., Maheswaran P., Ware M. A., Hunter C. N., Horton P., Jansson S., Ruban A. V., Johnson M. P. (2015) An intact light harvesting complex I antenna system is required for complete state transitions in Arabidopsis. *Nature Plants* **1**.
- Bergantino E., Brunetta A., Touloupakis E., Segalla A., Szabo I., Giacometti G. M. (2003) Role of the PSII-H Subunit in Photoprotection: novel aspects of D1 turnover in *Synechocystis* 6803. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41820-41829.

- Biesiadka J., Loll B., Kern J., Irrgang K. D., Zouni A. (2004) Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 4733–4736.
- Blank C. E. (2004) Evolutionary timing of the origins of mesophilic sulphate reduction and oxygenic photosynthesis: a phylogenomic dating approach. *Geobiology* **2**, 1-20.
- Blankenship R. E. (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research* **33**, 91-111.
- 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.
- 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. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 175-179.
- Boekema E. J., Jensen P. E., Schlodder E., van Breemen J. F., 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**, 1029-1036.
- Boekema E. J., van Roon H., Calkoen F., Bassi R., Dekker J. P. (1999a) 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 Roon H., Dekker J. P. (1998) Specific association of photosystem II and light-harvesting complex II in partially solubilized photosystem II membranes. *FEBS Letters* **424**, 95-99.
- Boekema E. J., van Roon H., van Breemen J. F., Dekker J. P. (1999b) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *European Journal of Biochemistry* **266**, 444-452.
- Bressan M., Bassi R., Dall'Osto L. (2017) Loss of LHCI system affects LHCII redistribution between thylakoid domains upon state transitions. *Photosynthesis Research* **135**, 251–261.
- Buchanan B. B., Gruissem W., Jonnes R. L. (2015) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, pp. 508-530, Wiley Blackwell, ASPB, West Sussex, UK.
- Burke D. H., Hearst J. E., Sidow A. (1993) Early evolution of photosynthesis: clues from nitrogenase and chlorophyll iron proteins. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7134-7138.

- Busch A., Hippler M. (2011) The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1807**, 864-877.
- Büttner M., Xie D. L., Nelson H., Pinther W., Hauska G., Nelson N. (1992a) The photosystem I-like P840-reaction center of green S-bacteria is a homodimer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1101**, 154-156.
- Büttner M., Xie D. L., Nelson H., Pinther W., Hauska G., Nelson N. (1992b) Photosynthetic reaction center genes in green sulfur bacteria and in photosystem 1 are related. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8135-8139.
- Caffarri S., Kouřil R., Kereiche S., Boekema E.J., Croce R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO Journal* **28**, 3052–3063..
- Camm E. L., Green B. R. (2004) How the chlorophyll-proteins got their names. *Photosynthesis Research* **80**, 189-196.
- Castelletti S., Morosinotto T., Robert B., Caffarri S., Bassi R., Croce R. (2003) Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the photosystem I antenna system. *Biochemistry* **42**, 4226-4234.
- Croce R., van Amerongen H. (2013) Light-harvesting in photosystem I. *Photosynthesis Research* **116**, 153-166.
- Croce R., Morosinotto T., Castelletti S., Breton J., Bassi R. (2002) The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* **1556**, 29-40.
- Curran S. P., Leunberger D., Schmidt E., Koehler C. M. (2002) The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *Journal of Cell Biology* **158**, 1017-1027.
- Dau H., Andrews J. C., Roelofs T. A., Latimer M. J., Liang W. C., Yachandra V. K., Sauer K., Klein M. P. (1995) Structural consequences of ammonia binding to the manganese center of the photosynthetic oxygen-evolving complex - an X-rayabsorption spectroscopy study of isotropic and oriented photosystem-II particles. *Biochemistry* **34**, 5274-5287.
- Dekker J. P., Boekema E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1706**, 12-39.
- Dey P. M., Harborne J. B. (1997) Plant Biochemistry, pp. 46-60, Academic Press, London, UK.

- Enami I., Ohta H., Miyaoka T. (1987) Cross-linking studies on the membrane topography of photosystem I reaction center complex in *Synechococcus sp.* *Plant Cell Physiology* **28**, 101-115.
- Fadoulglou V. E., Kokkinidis M., Glykos N. M. (2007) Determination of protein oligomerization state: Two approaches based on glutaraldehyde crosslinking. *Analytical Biochemistry* **373**, 404-406.
- Farah J., Rappaport F., Choquet Y., Joliot P., Rochaix J.D. (1995). ISOLATION OF A PSAF-DEFICIENT MUTANT OF CHLAMYDOMONAS-REINHARDTII - EFFICIENT INTERACTION OF PLASTOCYANIN WITH THE PHOTOSYSTEM-I REACTION-CENTER IS MEDIATED BY THE PSAF SUBUNIT. *Embo Journal* **14**, 4976-4984.
- Ferreira K. N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**, 1831–1838.
- Fischer N., Boudreau E., Hippler M., Drepper F., Haehnel W., Rochaix J. D. (1999) A large fraction of PsaF is nonfunctional in photosystem I complexes lacking the PsaJ subunit. *Biochemistry* **38**, 5546-5552.
- Frenkel M., Bellafiore S., Rochaix J. D., Jansson S. (2007) Hierarchy amongst photosynthetic acclimation responses for plant fitness. *Physiologia Plantarum* **129**, 455-459.
- Galka P., Santabarbara S., Thi T. H. K., Degand H., Morsomme P., Jennings R. C., Boekema E. J., Caffarri, S. (2012) Functional Analyses of the Plant Photosystem I-Light-Harvesting Complex II Supercomplex Reveal That Light-Harvesting Complex II Loosely Bound to Photosystem II Is a Very Efficient Antenna for Photosystem I in State II. *Plant Cell* **24**, 2963-2978.
- Garber M. P., Steponkus P.L. (1976) ALTERATIONS IN CHLOROPLAST THYLAKOIDS DURING COLD-ACCLIMATION. *Plant Physiology* **57**, 681-686.
- Garcia-Cerdan J. G., Kovacs L., Toth T., Kereiche S., Aseeva E., Boekema E. J., Mamedov F., Funk C., Schröder W. P. (2011) The PsbW protein stabilizes the supramolecular organization of photosystem II in higher plants. *Plant Journal* **65**, 368-381.
- Garcia-Cerdan J. G., Sveshnikov D., Dewez D., Jansson S., Funk C., Schröder W. P. (2009) Antisense inhibition of the PsbX protein affects PSII integrity in the higher plant. *Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiology* **50**, 191–202.
- Goldbeck J. H., Bryant D. A. (1991) Photosystem I. In *Current Topics in Bioenergetics, Vol. 16* (Lee C., ed.), pp. 83-177, Academic Press, San Diego, California, USA.

- Goldschmidt-Clermont M., Bassi R. (2015) Sharing light between two photosystems: mechanism of state transitions. *Current Opinion in Plant Biology* **25**: 71–78.
- Govindjee, Kern J. F., Messinger J., Whitmarsh J. (2010) Photosystem II. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK.
- Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 334-342.
- Haldrup A., Naver H., Scheller H. V. (1999) The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant Journal* **17**, 689-698.
- Haldrup A., Simpson D. J., Scheller H. V. (2000) Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 31211-31218.
- Han K. C., Shen J. R., Ikeuchi M., Inoue Y. (1994) Chemical crosslinking studies of extrinsic proteins in cyanobacterial Photosystem II. *FEBS Letters* **335**, 121-124.
- Hankamer B., Morris E. P., Barber J. (1999) Revealing the structure of the oxygen-evolving core dimer of photosystem II by cryoelectron crystallography. *Nature structural biology* **6**, 560-564.
- Hankamer B., Morris E., Nield J., Gerle C., 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.
- Hankamer B., Nield J., Zheleva D., Boekema E. J., Jansson S., Barber J. (1997) Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *European Journal of Biochemistry* **243**, 422-429.
- Hansson A., Amann K., Zygadlo A., Meurer J., Scheller H. V., Jensen P. E. (2007) Knock-out of the chloroplast-encoded PSI-J subunit of photosystem I in *Nicotiana tabacum*. *FEBS Journal* **274**, 1734-1746.
- Hansson M., Vener A. V. (2003) Identification of Three Previously Unknown *in Vivo* Protein Phosphorylation Sites in Thylakoid Membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* **2**, 550-559.
- Hayashida N., Matsubayashi K., Shinozaki K., Sugiura M., Inoue K., Hiyama T. (1987) The gene for the 9 kd polypeptide, a possible apoprotein for the iron-sulfur centers A and

- B of the photosystem I complex, in tobacco chloroplast DNA. *Current Genetics* **12**, 247-250.
- He G., Zhang H., King J. D., Blankenship R. E. (2014) Structural Analysis of the Homodimeric Reaction Center Complex from the Photosynthetic Green Sulfur Bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Biochemistry* **53**, 4924-4930.
- Hertle A. P., Blunder T., Wunder T., Peasaresi P., Pribil M., Armbruster U., Leister D. (2013) PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Molecular Cell* **49**, 511-523.
- Hideg E. (1994) Detection of Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In *Methods in Molecular Biology, vol. 274: Photosynthesis Research Protocol* (Carpentier R., ed.), pp. 249-260, Humana Press Inc, Totowa, USA.
- Hladík J., Pančoška P., Sofrová D. (1982) The influence of carotenoids on cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Absorption and circular dichroism study. *Biochimica et Biophysica Acta* **681**, 263-272.
- Hladík J., Pospíšilová L., Sofrová D. (1990) Topography of Photosystem I in cyanobacteria. In *Current research in Photosynthesis, Vol. 2* (Baltscheffsky M., ed.), pp. 579-582. Springer, Dodrecht, The Netherlands.
- Hoj P. B., Svendsen I., Scheller H. V., Moller B. L. (1987) Identification of a chloroplast-encoded 9-kDa polypeptide as a 2[4Fe-4S] protein carrying centers A and B of photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 12676-12684.
- Hopwood D. (1972) Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochemical Journal* **4**, 267-303.
- Chen Y. E., Yuan S., Lezhneva L., Meurer J., Schwenkert S., Mamedov F., Schröder W. P. (2018) The Low Molecular Mass Photosystem II Protein PsbTn is important for Light Acclimation. *Plant Physiology* **179**, 1739-1753.
- Chitnis P. R. (2001) Photosystem I: Function and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 593-626.
- Chitnis V. P., Chitnis P. R. (1993) PSaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC-6803. *Febs Letters* **336**, 330-334.
- Ifuku K., Endo T., Shikanai T., Aro E. M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits. *Plant Cell Physiology* **52**, 1560-1568.
- Ihalainen J. A., Gobets B., Sznee K., Brazzoli M., Croce R., Bassi R., van Grondelle R., Korppi-Tommola J. E., Dekker J. P. (2000) Evidence for two spectroscopically

- different dimers of light-harvesting complex I from green plants. *Biochemistry* **39**, 8625-8631.
- Iwai M., Takizawa K., Tokutsu R., Okamuro A., Takahashi Y., Minagawa J. (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* **464**, 1210-1213.
- Jackowski G., Kacprzak K., Jansson S. (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of Photosystem II (LHC II). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1504**, 340-345.
- Jansson S. (1994) The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1184**, 1-19.
- Jansson S., Andersen B., Scheller H. V. (1996) Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. *Plant Physiology* **112**, 409-420.
- Jansson S., Pichersky E., Bassi R., Green B. R., Ikeuchi M., Melis A., Simpson D. J., Spangfort M., Staehelin L. A., Thornber J. P. (1992) A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **10**, 242-253.
- Jensen P. E., Bassi R., Boekema E. J., Dekker J. P., Jansson S., Leister D., Robinson C., Scheller H. V. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**, 335-352.
- Jensen P. E., Haldrup A., Zhang S., Scheller H. V. (2004) The PSI-O subunit of plant photosystem I is involved in balancing the excitation pressure between the two photosystems. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 24212-24217.
- Jensen P. E., Rosgaard L., Knoetzel J., Scheller H. V. (2002) Photosystem I activity is increased in the absence of the PSI-G subunit. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2798-2803.
- Joliot P., Joliot A., Johnson G. (2006) Cyclic Electron Transfer Around Photosystem I. In *Photosystem I. The Light-Driven Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase, Vol. 24 Advances in Photosynthesis and Respiration* (Golbeck J. H., ed.), pp. 639-656, Springer, The Netherlands.
- Jordan P., Fromme P., Witt H. T., Klukas O., Saenger W., Krauss N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**, 909-917.

- Kamiya N., Shen J. R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**, 98–103.
- Kargul J., Barber J. (2008) Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna—role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins. *FEBS Journal* **275**, 1056-1068.
- Kereičič S., Kiss A. Z., Kouřil R., Boekema E. J., Horton P. (2009) The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Letters* **584**, 759–764.
- 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.
- Klimmek D., Sjodin A., Noutsos C., Leister D., Jansson S. (2007) Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiology* **140**, 739-804.
- Knaff D. B. (1996) Ferredoxin and Ferredoxin-Dependent Enzymes. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light reactions, Vol. 4 Advances in Photosynthesis* (Ort D. R., Yocum C. F., eds.), pp. 333-361, Springer, The Netherlands.
- Knoetzel J., Mant A., Haldrup A., Jensen P. E., Scheller H. V. (2002) PSI-O, a new 10-kDa subunit of eukaryotic photosystem I. *FEBS Letters* **510**, 145-148.
- Knoetzel J., Simpson D. (1992) Polypeptides involved in excitation energy transfer to Photosystem I in barley. In *Research in Photosynthesis, Vol. 1* (Murata N., ed.), pp. 645-648, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Knoetzel J., Svendsen I., Simpson D. J. (1992) Identification of the photosystem I antenna polypeptides in barley. Isolation of three pigment-binding antenna complexes. *European Journal of Biochemistry* **206**, 209-215.
- Kouřil R., Dekker J. P., Boekema E. J. (2012) Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1817**, 2-12.
- Kouřil R., Nosek L., Semchonok D., Boekema E. J., Ilík P. (2018) Organization of Plant Photosystem II and Photosystem I Supercomplexes. In *Membrane Protein Complexes: Structure and Function, Vol. 87 Subcellular Biochemistry* (Harris J. R., Boekema E. J., eds), pp. 259-286, Springer, Singapore.
- Kouřil R., Strouhal O., Nosek L., Lenobel R., Chamrád I., Boekema E.J., Šebela M., Ilík P. (2014) Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex. *Plant Journal* **77**, 568-576.

- Kouřil R., van Oosterwijk N., Yakushevska A. E., Boekema E. J. (2005a) Photosystem I a search for green plant trimers. *Photochemical & Photobiological Sciences* **4**, 1091-1094.
- Kouřil R., Wientjes E., Bultema J. B., Croce R., Boekema E. J. (2013) High-light vs. low-light: effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1827**, 411–419.
- Kouřil R., Zygadlo A., Arteni A. A., de Wit C. D., Dekker J. P., Jensen P.E., Scheller H. V., Boekema E.J. (2005b). Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* **44**,10935-10940.
- Kramer D. M., Avenson T. J., Edwards G. E. (2004) Dynamics flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends in Plant Science* **9**, 349–357.
- Kukačka Z. (2015) Charakterizace struktury proteinů pomocí chemického zesílení a hmotnostní spektrometrie. Disertační práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.
- Liebl U., Mockenstrum-Wilson M., Trost J., Brune D., Blankenship R., Vermaas W. (1993) Single core polypeptide in the reaction center of the photosynthetic bacterium *Heliobacillus mobilis*: structural implications and relations to other photosystems. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7124-7128.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Liu Z. F., Yan H. C., Wang K. B., Kuang T. Y., Zhang J. P., Gui L. L., An X. M., Chang W. R. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287-292.
- Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A., Biesiadka J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**, 1040-1044.
- Lunde C., Jensen P.E., Haldrup A., Knoetzel J., Scheller H.V. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* **408**, 613-615.
- Malkin R. (1996) Photosystem I electron transfer reactions-components and kinetics. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions, Vol. 4 Advances in Photosynthesis and Respiration* (Ort D. R., Yocum C. F., eds.), pp. 313-332, Springer, The Netherlands.

- Mazor Y., Borovikova A., Caspy I., Nelson N. (2017) Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nature Plants* **3**.
- Mazor Y., Borovikova A., Nelson N. (2015) The structure of plant photosystem I supercomplex at 2.8 Å resolution. *Elife* **4**.
- Michel H. P., Bennett J. (1987) Identification of the phosphorylation site of an 8.3 kDa protein from photosystem II of spinach. *FEBS Letters* **212**, 103-108.
- Monod C., Takahashi Y., Goldschmidt-Clermont M., Rochaix J. D. (1994) The chloroplast *ycf8* open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions. *EMBO Journal* **13**, 2747-2754.
- Morosinotto T., Bassi R., Frigerio S., Finazzi G., Morris G., Barber J. (2006) Biochemical and structural analyses of a higher plant photosystem II supercomplex of a photosystem I-less mutant of barley. Consequences of a chronic over-reduction of the plastoquinone pool. *FEBS Journal* **273**, 4616-30.
- Morrow G., Inaguma Y., Kato K., Tanguay M. (2000) The Small heat Shock Protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* Is a Mitochondrial Protein Displaying Oligomeric Organization. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 31204-31210.
- Müller P., Li X. P., Niyogi K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* **125**, 1558- 1566.
- Munekage Y., Hashimoto M., Miyake C., Tomizawa K., Endo T., Tasaka M., Shikanai T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**, 579–582.
- Nelson N., Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 971–982.
- Nelson N., Ben-Shem A. (2005) The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis. *Bioessays* **27**, 914-922.
- Nelson N., Yocum C.F. (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 521-565.
- 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 cryoelectronmicroscopy and single particle analysis. *Nature Structural Biology* **7**, 44–47.
- Nielsen V. S., Mant A., Knoetzel J., Moller B. L., Robinson C. (1994) Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate processing site. Role of the delta pH in

- translocation across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 3762-3766.
- Nosek L., Semchonok D., Boekema E. J., Illík P., Kouřil R. (2017) Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *Plant Journal: for cell and molecular biology* **89**, 104-111.
- Odom W., Bricker T. M. (1992) Interaction of Cpa-1 with the manganese-stabilizing protein of Photosystem II: identification of domains cross-linked by 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide. *Biochemistry* **31**, 5616-5620.
- Oh-Oka H., Takahashi Y., Matsubara H. (1989) Topological consideration of the 9-kDa polypeptide which contains centers A and B, associated with the 14- and 19-kDa polypeptides in the photosystem I complex of spinach. *Plant Cell Physiology* **30**, 869-875.
- Pagliano C., Saracco G., Barber J. (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynthesis Research* **116**, 167-188.
- Pan X., Liu Z., Li M., Chang W. (2013) Architecture and function of plant light-harvesting complexes II. *Current Opinion in Structural Biology* **23**, 515-525.
- Peng L. W., Fukao Y., Fujiwara M., Takami T., Shikanai T. (2009) Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 3623-3640.
- Peng L., Shikanai T. (2011) Supercomplex formation with photosystem I is required for the stabilization of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in Arabidopsis. *Plant Physiology* **155**, 1629-1639.
- Peng L., Shimizu H., Shikanai T. (2008) The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 34873-34879.
- Peter G. F., Thornber J. P. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 16745-16754.
- Plöchinger M., Torabi S., Rantala M., Tikkanen M., Suorsa M., Jensen P. E., Aro E. M., Meurer J. (2016) The Low Molecular Weight Protein PsaI Stabilizes the Light-Harvesting Complex II Docking Site of Photosystem I. *Plant Physiology* **172**, 450-463.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kolektiv (1998) Fyziologie rostlin, pp. 128-137, Academia, Praha, ČR.

- Qin X., Wang K., Chen X., Qu Y., Li L., Kuang T. (2006) Rapid purification of photosystem I chlorophyll-binding proteins by differential centrifugation and vertical rotor. *Photosynthesis Research* **90**, 195-204.
- Rasmussen M., Minteer S. D. (2014) Thylakoid direct photobioelectrocatalysis: utilizing stroma thylakoids to improve bio-solar cell performance. *Physical Chemistry Chemical Physics* **16**, 17327-17331.
- Rhee K. H., Morris E. P., Barber J., Kuhlbrandt W. (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* **396**, 283-286.
- de las Rivas J., Barber J. (2004) Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynthesis Research* **81**, 329-343.
- Rochaix J. D., Lemeille S., Shapiguzov A., Samol I., Fucile G., Willig A., Goldschmidt-Clermont M. (2012) Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **367**, 3466-3474.
- Rumeau D., Peltier G., Cournac L. (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant, Cell and Environment* **30**, 1041-1051.
- Rutherford A. W., Faller P. (2003) Photosystem II: evolutionary perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **358**, 245-253.
- Sandona D., Croce R., Pagano A., Crimi M., Bassi R. (1998) Higher plants light harvesting proteins. Structure and function as revealed by mutation analysis of either protein or chromophore moieties. *Biochimica et Biophysica Acta* **1365**, 207-214.
- Seidler A. (1996) The extrinsic polypeptides of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* **1277**, 35-60.
- Semchonok D. A., Li M., Bruce B. D., Oostergetel G. T., Boekema E. J. (2016) Cryo-EM structure of a tetrameric cyanobacterial photosystem I complex reveals novel subunit interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**, 1619-1626.
- Sewell B. T., Bouloukos C., Holt C. (1984) Formaldehyde and glutaraldehyde in the fixation of chromatin for electron microscopy. *Journal of Microscopy* **136**, 103-112.
- Shen J. R. (2015) The structure of photosystem II and the mechanism of water oxidation in photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 23-48.
- Shi L. X., Lorkovic Z. J., Oelmüller R., Schröder W. P. (2000) The low molecular mass PsbW protein is involved in the stabilization of the dimeric photosystem II complex in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 37945-37950.

- Shi L.X., Schröder W.P. (2004) The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1608**, 75-96.
- Shikanai T. (2016) Chloroplast NDH: A different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**, 1015-1022.
- Shubin V. V., Tsuprun V. L., Bezsmertnaya I. N., Karapetyan N. V. (1993) Trimeric forms of the photosystem I reaction center complex pre-exist in the membranes of cyanobacterium *Spirulina platensis*. *FEBS Letters* **334**, 79-82.
- Scheller H. V., Jensen P. E., Haldrup A., Lunde C., Knoetzel J. (2001) Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* **1507**, 41-60.
- Scheres S. H. (2012) RELION: implementation of a Bayesian approach to cry-EM structure determination. *Journal of Structural Biology* **180**, 519-530.
- Schmid V. H., Cammarata K. V., Bruns B. U., Schmidt G. W. (1997) In vitro reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7667-7672.
- Schöttler M. A., Flügel C., Thiele W., Stegemann S., Bock R. (2007) The plastome-encoded PsaJ subunit is required for efficient Photosystem I excitation, but not for plastocyanin oxidation in tobacco. *Biochemical Journal* **403**, 251-260.
- Schwenkert S., Umate P., Dal Bossco C., Volz S., Mlcochová L., Zoryan M., Eichacker L. A., Ohad I., Herrmann R. G., Meurer J. (2006) PsbI affect the stability, function, and phosphorylation patterns of photosystem II assemblies in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 34227-34238.
- Sinz A. (2006) CHEMICAL CROSS-LINKING AND MASS SPECTROMETRY TO MAP THREE-DIMENSIONAL PROTEIN STRUCTURES AND PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS. *Mass Spectrometry Reviews* **25**, 663-682.
- Standfuss J., Kühlbrandt W (2004) The three isoforms of the lightharvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36884-36891.
- Standfuss R., van Scheltinga A. C. T., Lamborghini M., Kuhlbrandt W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *Embo Journal* **24**, 919-928.
- Swiatek M., Kuras R., Sokolenko A., Higgs D., Olive J., Cinque G., Müller B., Eichacker L. A., Stern D. B., Bassi R., Herrmann R. G., Wollman F. A. (2001) The chloroplast gene

- ycf9* encodes a photosystem II (PSII) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture. *Plant Cell* **13**, 1347-1367.
- Swiatek M., Regel R. E., Meurer J., Wanner G., Pakrasi H. B., Ohad I., Herrmann R. G. (2003) Effects of selective inactivation of individual genes for low-molecular-mass subunits on the assembly of photosystem II, as revealed by chloroplast transformation: the *psbEFLJ* operon in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Genetics and Genomics* **268**, 699-710.
- Takahashi Y., Koike H., Katoh S. (1982) Multiple forms of chlorophyll-protein complexes from a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus sp.* *Archives of Biochemistry and Biophysics* **219**, 209-218.
- Tang X., Bruce J. E. (2009) Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies. *Methods in Molecular Biology* **492**, 283-293.
- Tietz S., Puthiyaveetil S., Enlow H.M., Yarbrough R., Wood M., Semchonok D.A., Lowry T., Li Z., Jahns P., Boekema E.J., Lenhart S., Niyogi K.K., Kirchhoff H. (2015) Functional Implications of Photosystem II Crystal Formation in Photosynthetic Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 14091-14106.
- Tikkanen M., Grieco M., Kangasjärvi S., Aro E. M. (2010) Thylakoid protein phosphorylation in higher plant chloroplasts optimizes electron transfer under fluctuating light. *Plant Physiology* **152**, 723-735.
- Tohri A., Suzuki T., Okuyama S., Kamino K., Motoki A., Hirano M., Ohta H., Shen J. R., Yamamoto Y., Enami I. (2002) Comparison of the structure of the extrinsic 33 kDa protein from different organisms. *Plant Cell Physiology* **43**, 429-439.
- Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., Kamiya N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* **473**, 55-60.
- Vanselow C., Weber A. P., Krause K., Fromme P. (2009) Genetic analysis of the Photosystem I subunits from the red alga, *Galdieria sulphuraria*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1787**, 46-59.
- Varotto C., Pesaresi P., Jahns P., Lessnick A., Tizzano M., Schiavon F., Salamini F., Leister D. (2002) Single and double knockouts of the genes for photosystem I subunits G, K, and H of Arabidopsis. Effects on photosystem I composition, photosynthetic electron flow, and state transitions. *Plant Physiology* **129**, 616-624.
- Vasilijev A., Ahting U., Nargang F. E., Go N. E., Habib S. J., Kozany C., Pannels V., Sinning I., Prokisch H., Neupert W., Nussberger S., Rapaport D. (2004) Reconstituted TOM Core Complex and Tim9/Tim10 Complex of Mitochondria Are Sufficient for

- translocation of the ADP/ATP Carrier across membranes. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1445-1458.
- Wei X. P., Su X. D., Cao P., Liu, X. Y., Chang, W. R., Li, M., Zhang, X. Z., Liu, Z. F. (2016) Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 angstrom resolution. *Nature* **534**, 69-+.
- Wientjes E., van Amerongen H., Croce R. (2013) LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1827**, 420–426.
- Wynn R. M., Malkin R. (1988) Interaction of plastocyanin with photosystem I: a chemical crosslinking study of the polypeptide that binds plastocyanin. *Biochemistry* **27**, 5863-5869.
- Wynn R. M., Omaha J., Malkin R. (1989) Structural and functional properties of the cyanobacterial photosystem I complex. *Biochemistry* **28**, 5554-5560.
- Xiaowei P., Ma J., Su X., Cao P., Chang W., Liu Z., Zhang X., Li M. (2018) Structure of the maize photosystem I supercomplex with light-harvesting complexes I and II. *Science* **360**, 1109-1113.
- Xiong J., Subramaniam S., Govindjee G. (1996) Modeling of the D1/D2 proteins and cofactors of the photosystem II reaction center: Implications for herbicide and bicarbonate binding. *Protein Science* **5**, 2054-2073.
- Yadav K. N., Semchonok D. A., Nosek L., Kouřil R., Fucile G., Boekema E. J., Eichacker L. A. (2017) Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome b₆f, light-harvesting complex II and NDH. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1858**, 12-20.
- Yakushevskaya A. E., Jensen P. E., Keegstra W., van Roon H., Scheller H. S., Boekema E. J., Dekker J. P. (2001) Supermolecular organization of photosystem II and its 82 associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* **268**, 6020- 6028.
- Yamori W., Shikanai T., Makino A. (2015) Photosystem I cyclic electron flow via chloroplast NADH dehydrogenase-like complex performs a physiological role for photosynthesis at low light. *Scientific Reports* **5**.
- Yokono M., Takabayashi A., Akimoto S., Tanaka A. (2015) A megacomplex composed of both photosystem reaction centres in higher plants. *Nature Communications* **6**, 6675.
- Zhang S., Scheller H. V. (2004) Light-harvesting complex II binds to several small subunits of photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 3180-3187.

- Zheleva D., Sharma J., Panico M., Morris H. R., Barber J (1998) Isolation and characterization of monomeric and dimeric CP47–reaction center photosystem II complexes. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 16122-16127.
- Zilber A. L., Malkin R. (1988) Ferredoxin cross-links to a 22 kDa subunit of photosystem I. *Plant Physiology* **88**, 810-814.
- Zouni A., Witt H. T., Kern J., Fromme P., Krauss N., Saenger W., Orth P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**, 739–743.

Komerční materiál:

- ThermoScientific (2012) Easy molecular bonding, crosslinking technology – Reactivity chemistries, applications and structure references. In: Thermo scientific crosslinking technical handbook. ThermoScientific, pp 1-52.