

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



Ondřej Nykles

Funkce proteinu PsbO v rostlinách

Functions of PsbO protein in plants

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Miloš Duchoslav

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 15.8.2019

Podpis

Abstrakt

Oxygenní fotosyntéza byla jistě jedním z nejdůležitějších dějů pro vznik velké části organismů na Zemi. Oxygenní fotosyntéza probíhá na tylakoidní membráně sinic, obdobně jako na tylakoidní membráně v chloroplastech řas a vyšších rostlin. Tylakoidní membrána obsahuje mimo jiné také fotosystém II, což je komplex mnoha proteinů. Jedním z nich je také mangano-vápenatý klastr, stěžejní komponent pro štěpení vody, při kterém vzniká kyslík. Pro správnou funkci tohoto klastru je důležitý lumenální protein PsbO (znám i jako MSP - manga-stabilizující protein), který je také součástí fotosystému II. U vyšších rostlin je PsbO nezbytnou součástí fotosyntetického aparátu, jelikož bez něj tyto rostliny nejsou schopny žít. Obecnou funkcí PsbO je ochrana a stabilizace mangano-vápenatého klastru. Avšak intenzivní výzkum toho proteinu ukázal a stále ukazuje nové a nové poznatky o jeho funkcích. Jmenuji kupříkladu uvažovanou účast PsbO na transportu substrátu a produktů k a od mangano-vápenatému klastru či jeho GTPázovou aktivitu při výměně proteinu D1. Těmito a dalšími poznatky o PsbO se zabývá tato práce. Ta byla zpracována jako literární přehled nových informací o PsbO (se zaměřením na rostliny) za posledních několik let.

Klíčová slova

fotosyntéza, mangano-vápenatý klastr, MSP, OEC, PSII, PsbO, PsbO1, PsbO2, vnější podjednotky PSII

Abstract

Oxygenic photosynthesis was one of the most important events for big part of organisms on Earth. Oxygenic photosynthesis takes place on thylakoid membrane of cyanobacteria, as well as it occurs on thylakoid membrane in chloroplasts of algae and higher plants. Among others, thylakoid membrane contains photosystem II which is multiprotein complex. One of the proteins in this complex is manganese-calcium cluster, crucial component for water splitting. During this event, the oxygen is evolved. For proper function of this cluster, there is an important luminal protein PsbO (which is also known as MSP - manganese-stabilizing protein), which is part of photosystem II as well. In higher plants, the PsbO is necessary part of photosynthetic apparatus because without it, these plants are unable to live. General functions of PsbO are protection and stabilization of manganese-calcium cluster. However, intensive research of this protein revealed and still reveals new knowledge about its functions. For example, there is a putative role of PsbO in transport of substrate and products to and from manganese-calcium cluster or its GTPase activity in D1 turnover. These and more information about PsbO were aim of this work. This work was made as literary overview of new knowledge about PsbO (with focus on plants) in last few years.

Keywords

extrinsic subunits of PSII, manganese-calcium cluster, MSP, OEC, photosynthesis, PSII, PsbO, PsbO1, PsbO2

Úvod	8
Fotosystém II (PSII)	10
Struktura PSII	10
Funkce PSII	12
Vnější podjednotky PSII	14
PsbP	14
PsbQ	15
PsbTn	16
PsbR	16
PsbO	16
Struktura PsbO	17
Vazba PsbO do PSII	19
Izoformy PsbO	20
Funkce PsbO	20
PsbO a kanály pro substrát/produkty OEC	21
PsbO jako GTPáza	21
PsbO a stresová odpověď	22
Nové poznatky ohledně PsbO	23
Novinky ze struktury PsbO	23
Novinky o izoformách PsbO	26
Novinky ohledně GTPázové funkce PsbO	29
PsbO a posttranslační modifikace	30
PsbO a skládání gran	31
Úloha PsbO v degradaci chloroplastu	31
Seznam literatury	33

Seznam použitých zkratek

AK – aminokyselina/aminokyselinový zbytek

CCVs – CV containing vesicles - vesikuly obsahující CV protein

CET – cyclic electron transport - cyklický elektronový transport

Co-IP – koimunoprecipitace

CsA – cyklosporin A

CV – chloroplast vesiculation - protein účastnící se degradace chloroplastu

Cyt b_6f – cytochrom b_6f

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

IDP – intrinsically disordered protein - vnitřně neuspořádaný protein

LET – linear electron transport - lineární elektronový transport

LHCII – light harvesting complex II - světlosběrný komplex II

Mn_4CaO_5 klastr – mangano-vápenatý klastr

NDH – NADH dehydrogenase-like komplex

NPQ – non-photochemical quenching - nefotochemické zhášení

OEC – oxygen evolving complex - kyslík vyvíjející komplex

PQ – plastochinon

PQH^{\cdot} - semichinon

PQH_2 - plastochinol

PSI – fotosystém I

PSII – fotosystém II

PsbO-DR – PsbO down regulated - mutant v proteinu PsbO se sníženou expresí tohoto proteinu

PsbO-UR – PsbO up regulated - mutant v proteinu PsbO se zvýšenou expresí tohoto proteinu

RC – reakční centrum

ROS – reactive oxygen species - reaktivní formy kyslíku

RNAi – RNA interference

SAVs – senescence-associated vacuols - vakuoly asociované se senescencí

WT – wild type - označení pro rostlinu bez jakýchkoliv člověkem způsobených mutací, jež slouží jako kontrola k pokusům

XFEL – X-ray free electron laser

Y₂ – tyrosin 161

Y2H – yeast two hybrid, kvasinkový dvouhybridní systém

2D-LC-IB – 2D - kapalná chromatografie kombinovaná s imunoblotováním

Úvod

Jedním z nejzákladnějších biochemických procesů na Zemi je fotosyntéza. Jde o způsob, jakým fotoautotrofové přeměňují energii fotonů na energii chemických vazeb, jež je možno využít pro život. Sinice, řasy a rostliny fotosyntetizují mimo jiné díky membránovým komplexům (tedy fotosystému I, fotosystému II a komplexu cytochromů b_6f), jež jsou si u těchto skupin značně podobné co do funkce (byť jsou tyto organismy navzájem evolučně velice vzdálené). Ovšem na molekulární úrovni se mohou ony komplexy lišit v aminokyselinových (dále jako AK) sekvencích, což ústí v jiné rozložení náboje na povrchu proteinu a tedy jiné možnosti vazeb částí komplexu mezi sebou (Fedorov et al. 2019). Vysoká míra podobnosti těchto komplexů je důsledkem společného původu. Díky endosymbióze (respektive primární endosymbióze; Mareš et al. 2019), tedy procesu, kdy předek dnešních rostlin a řas (obě patří do *Archaeplastid*) pohltil sinici a začlenil ji do své buňky. Tím vznikl původní chloroplast (McFadden 1999).

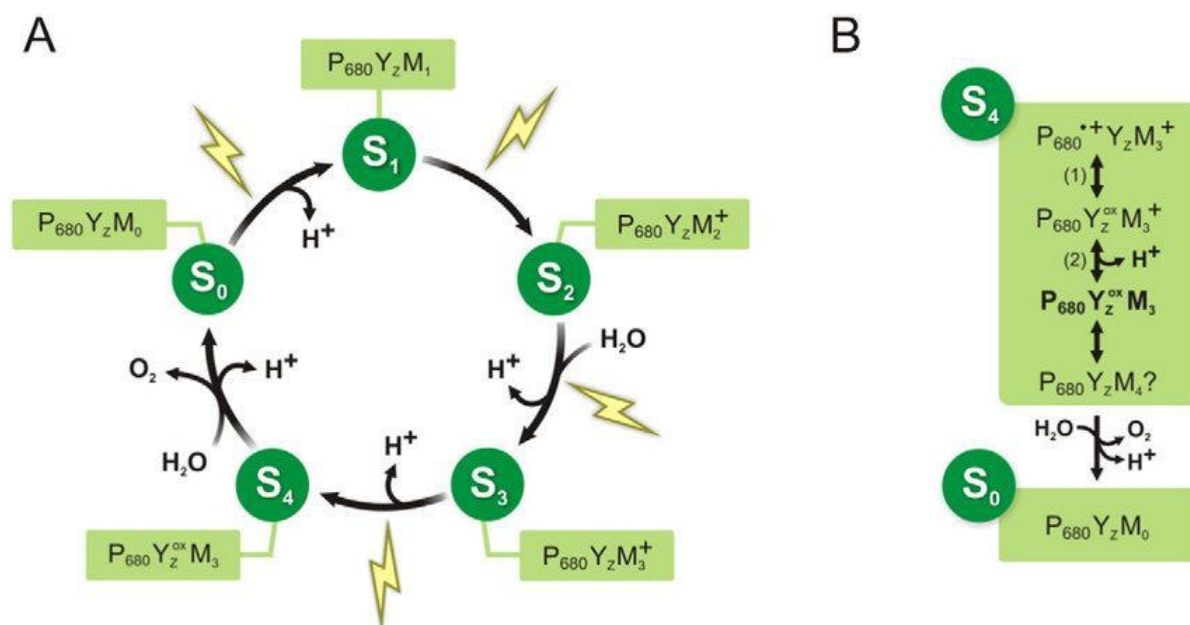
Fotosyntetické komplexy můžeme najít na tylakoidní membráně, přičemž u sinic se jedná o vchlípenou část plasmatické membrány. U řas a rostlin jsou tyto membrány v endosymbioticky vzniklých chloroplastech (fotosyntézu zajišťující plastid). Zde se oddělily od vnitřních membrán chloroplastu. Lze je v rostlinách a řasách dělit na grana (struktury podobné sloupečkům na sebe naskládaných disků) a stromatální lamely, jež grana mezi sebou propojují (Mareš et al. 2019). Jak již bylo řečeno výše, je to právě tylakoidní membrána, která obsahuje fotosystémy a cytochromové komplexy, jež dohromady zajišťují fotosyntetický transport elektronů.

Shamsipur a Pashabadi (2018) ve své práci popisují elektron-transportní řetězec jako dráhu, která umožňuje využití energie fotonu. Tato energie je použita na uvolnění elektronu z molekuly chlorofylu a tento elektron následně putuje přes elektron-transportní řetězec na finální akceptor, kterým je $NADP^+$. Při své cestě řetězcem je také onen elektron využit na tvorbu protonového gradientu na membráně chloroplastu. Aby se molekula chlorofylu regenerovala, dochází k rozštěpení (fotolýze) vody. Získá se tak elektron (pro regeneraci) a proton (podílí se na tvorbě protonmotivní síly), zatímco jako vedlejší produkt vzniká O_2 . Tento proces uvolnění a regenerace elektronu probíhá na prvním úseku elektron-transportního řetězce, tedy na fotosystému II (dále jen již jako PSII). Součástí PSII je kyslík-vyvíjející komplex (OEC – oxygen evolving complex), jehož hlavní součástí je Mn_4CaO_5 cluster (mangano-vápenatý klastr), na němž probíhá Kokův cyklus (viz Obr. 1).

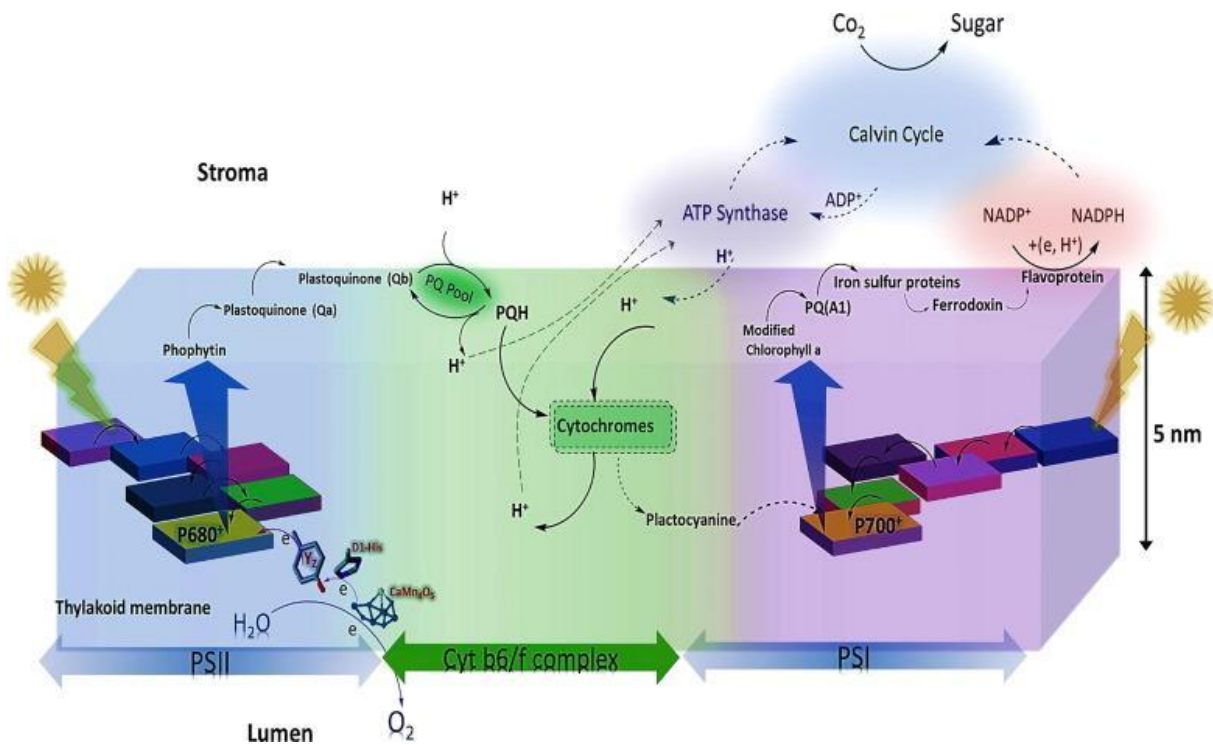
Elektrony z PSII jsou předávány pomocí plastochinonu na další složkou řetězce, komplex cytochromů b_6f (Cyt b_6f ; Gao et al. 2018). Dimer komplexů Cyt b_6f zajišťuje průběh Q-cyklu (Cramer,

Hasan a Yamashita 2011), jež slouží k tvorbě protonmotivní síly. V průběhu Q-cyklus se postupnou oxidací plastochinolu (PQH₂) ve vazebném místě poblíž luminální strany membrány tento mění na plastochinon (PQ). Při zjednodušení mechanismu přenosu elektronu přes Cyt b₆f komplex pak vypadá tento děj následovně. Jeden ze dvou elektronů, které PQH₂ nese, je předán přes Rieskeho železo-sírné centrum na plastocyanin (popř. cytochrom). Z něj je pak dále přenesen na PSI. Vzniklý semichinon (PQH•) z původního PQH₂ předá druhý elektron díky hemu *b* na PQ či PQH; vázaný v druhém vazebném místě blíže stromatální membrány. Tím se redukuje zpět na PQH₂, který může přenést další pár protonů. Tímto způsobem lze využít jeden elektron na přenos 2 protonů (Cramer et al. 2011). Tak dochází ke zvýšení koncentrace protonů na luminální straně tylakoidu a celkovému zvýšení protonového gradientu. Na zvýšení protonového gradientu se podílí také cyklický transport elektronů (CET - cyclic electron transport). Při něm dochází k redukcí plastochinonu na plastochinol zpětným přenosem elektronu z PSI přes ferredoxin zpět na komplex b₆f (Cramer et al. 2011). Zajímavostí je, že u vyšších rostlin můžeme pozorovat dva typy CET: NDH typ (NADPH dehydrogenase-like) a PGR5 typ (Johnson 2011). Oba mají vzájemně odlišitelné funkce, ale jak uvádí Johnson (2011), jsou do jisté míry vzájemně redundantní.

Elektron přenesený na PSI je opětovně vybuzen do vyššího energetického stavu a přes ferredoxin je přenesen na NADP⁺ za vzniku NADPH (zprostředkováno ferredoxin NADP⁺ reductázou). Protonmotivní síla vytvořená rozkladem vody, přenosem protonů plastochinolem mezi PSII a cytochromovým komplexem, Q-cyklem a případně CET je následně díky ATP syntáze využita na tvorbu ATP (Shamsipur a Pashabadi 2018). Celé schéma elektron-transportního řetězce v tylakoidní membráně je zobrazeno na Obr. 2.



Obrázek 1; A) Schéma Kokova cyklu; $S_0 \rightarrow S_4$ jsou fáze cyklu, kdy každá představuje jeden oxidační ekvivalent (elektronovou díru), jež se postupně akumulují a za spotřeby 2 molekul vody se následně regenerují, přičemž se v průběhu procesu získají 4 elektrony, 4 protony a molekula O_2 , $P_{680}Y_2M_0 \rightarrow P_{680}Y_2^OXM_3$ jsou obdobou klasického znázornění Kokova cyklu pomocí S-fází, kde autoři vyjadřují oxidační ekvivalent pomocí písmene M a jeho stavy pomocí horního (náboj v dané fázi) a dolního (fáze) indexu; B) detailnější popis obnovy cyklu do počátečního stavu spolu s oxidací Y_2 a tedy recyklací reakčního centra fotosystému II, $P_{680}Y_2M_4$ fáze je zatím jen teoretická; Převzato z Nilsson et al. (2016).



Obrázek 2; Schéma elektron-transportního řetězce v tylakoidní membráně. Příčný řez. Zleva doprava naznačena trasa elektronu z PSII přes Cyt b_6/f na PSI. Schématicky naznačeno i využití makroergních sloučenin ATP a NADPH v Calvinově cyklu pro tvorbu cukrů za spotřeby CO_2 . Převzato z Shamsipur a Pashabadi (2018).

Fotosystém II (PSII)

Jak uvádí Gao et al. (2018), PSII tvoří obvykle homodimer, který je lokalizován především v granálních membránách (oproti PSI, jež je především ve stromatálních lamelách). Zatím bylo zjištěno 25 proteinů (Wei et al. 2016), které se podílí na stavbě jednoho monomeru (avšak Shi et al. (2012) uvádí až 40 proteinů na monomer u sinic). Studium PSII je prováděno jak na sinicích, tak na vyšších rostlinách a lze tak pozorovat u těchto dvou skupin vzájemné odchylky.

Struktura PSII

Struktura PSII pro vyšší rostliny byla detailně studována na hrachu (*Pisum sativum*; Su et al. 2017). Složení komplexu PSII je následovné: proteiny reakčního centra (RC) D1 a D2, podjednotky vnitřních anténních komplexů CP43 a CP47, 12 membránových podjednotek (PsbE, PsbF, PsbH-M,

PsbTc, PsbW, PsbX a PsbZ) a 3 základní vnějších podjednotky (PsbO, PsbP a PsbQ; Gao et al. 2018; Su et al. 2017). Experimenty na sinici *Thermosynechococcus elongatus* (Ferreira et al. 2004) ukazují složení komplexu PSII značně podobné složení vyšších rostlin. Mírné odchylky jsou v membránových podjednotkách (PsbN, PsbY, a PsbYcf12) a vnějších podjednotkách (PsbU, PsbV místo PsbP a PsbQ; Gao et al. 2018). U sinic však také existují homology PsbP a PsbQ, označované jako CyanoP a CyanoQ (Bricker et al. 2012). Zvláštností jsou zde červené řasy. U nich můžeme pozorovat PsbO, PsbQ' (homolog PsbQ), PsbU a PsbV (Ago et al. 2016). U vyšších rostlin Wei et al. (2016) uvádí čtvrtou vnější podjednotku PsbTn. U zelených řas a rostlin je ještě možná pátá vnější podjednotka PsbR (Bricker et al. 2012).

Podjednotky reakčního centra D1 a D2 jsou si navzájem podobné, obě se skládají z pěti transmembránových helixů. CP43 a CP47 mají také obdobné struktury a skládají se z 6 helixů, jež obklopují RC. Jsou zde přítomny i lipidy vázané v komplexu, které jednak tvoří kruh okolo RC (které tak oddělují od ostatních proteinů), a za druhé se vyskytují na rozhraní mezi oběma monomery PSII dimeru (Gao et al. 2018).

Jak již bylo uvedeno výše, k PSII patří také OEC, jehož katalytické centrum je Mn_4CaO_5 klastr. Ten se popisuje jako „kubanu-podobná“ struktura (kuban je syntetický uhlovodík, jež má tvar pravidelné krychle), přičemž čtvrtý Mn atom z této „kubanu-podobné“ struktury přesahuje ven a vzniká tak struktura připomínající židli s opěrkou (Barber 2017). Klastr mění svou strukturu v závislosti na fázi Kokova cyklu ($S_0 \rightarrow S_4$), viz Obr. 1. Nejpřesnější rozlišení struktur klastru se pohybují okolo 1,95 Å (Suga et al. 2015). Byly získány pomocí XFEL (X-ray free electron laser, tedy metoda, která by neměla poškozovat nativní konformaci zkoumané struktury). Bylo zjištěno, že k funkci OEC je nezbytná přítomnost chloridového iontu (Kawakami et al. 2009). Jeho funkce může spočívat buď v napomáhání s koordinací Mn_4CaO_5 klastru, nebo v napomáhání tvorby únikové cesty pro protony uvolňované v průběhu Kokova cyklu. Tyto teorie jsou však neustále terčem dohadů, jelikož ze strukturních analýz PSII vyplývá, že daný Cl^- iont je od klastru vzdálen 7 Å (Boussac et al. 2012).

Výše uvedená struktura rostlinného PSII, kterou získal Su et al. (2017) z hrachu, je momentálně nejpřesnějším modelem pro vyšší rostliny. Jedná se o dva modely struktury superkomplexu PSII-LHCII (typ $C_2S_2M_2$, viz dále) s rozlišením 2,7 a 3,2 Å získané pomocí kryoelektronové mikroskopie. Modely se liší podmínkami, za kterých byla získána strukturní data (pH 5,7 s ionty Ca^{2+} a pH 7,5 bez Ca^{2+} iontů).

Vnější podjednotky PSII rostlin jsou ony tři základní PsbO, PsbP, PsbQ, přičemž vyšší rostliny mají ještě PsbTn (Wei et al. 2016) a možná i PsbR (Bricker et al. 2012). Základní podjednotky chrání lumenální stranu D1, CP43 a hlavně Mn_4CaO_5 klastr. PsbO je zodpovědný hlavně za stabilizaci klastru,

zatímco PsbP a PsbQ zodpovídají za regulaci tvorby kyslíku (Gao et al. 2018; Ifuku 2015). Podrobnější informace o vnějších podjednotkách PSII uvedu v další části tohoto textu samostatně.

Homodimer PSII je obklopen postranními komplexy světlosběrných antén (LHCII – light harvesting complex II). Tato struktura se označuje jako superkomplex PSII-LHCII (dále o něm však budu mluvit jako o PSII).

Hlavní komponenty LHCII (vnějších antén PSII) jsou homo- či heterotrimery složené z proteinů Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3. Minoritní komponenty LHCII, které se vyskytují jako monomery, tvoří proteiny CP29 (Lhcb4), CP26 (Lhcb5) a CP24 (Lhcb6). Su et al. (2017) uvádí, že hlavní komponenty LHCII se váží na vlastní PSII pomocí minoritních LHCII komponent a tvoří tak několik možných stavů PSII komplexu. Ty reagují na různé hladiny ozáření. C₂S₂ a C₂S stavy¹ mají zvýšený výskyt při vysoké ozáření, zatímco C₂S₂M₂ či C₂S₂M stavy pomáhají hlavně při adaptaci na nízký osvit. S-LHCII se váží na jádro PSII pomocí CP29 a CP26, zatímco M-LHCII pomocí CP24. Jak uvádí Gao et al. (2018), Lhcb1 při jeho zvýšené expresi značně posiluje shlukování tylakoidů do gran, zatímco snížení exprese toto shlukování potlačuje.

Kromě proteinových složek jsou nutné pro správnou funkci PSII i jeho kofaktory. Z nejdůležitějších sem spadají chlorofyly, karotenoidy, lipidy a Mn₄CaO₅ (Gao et al. 2018; Loll et al. 2005). To platí jak pro sinice, tak pro řasy a vyšší rostliny. Pro detailnější představu viz Obr. 3.

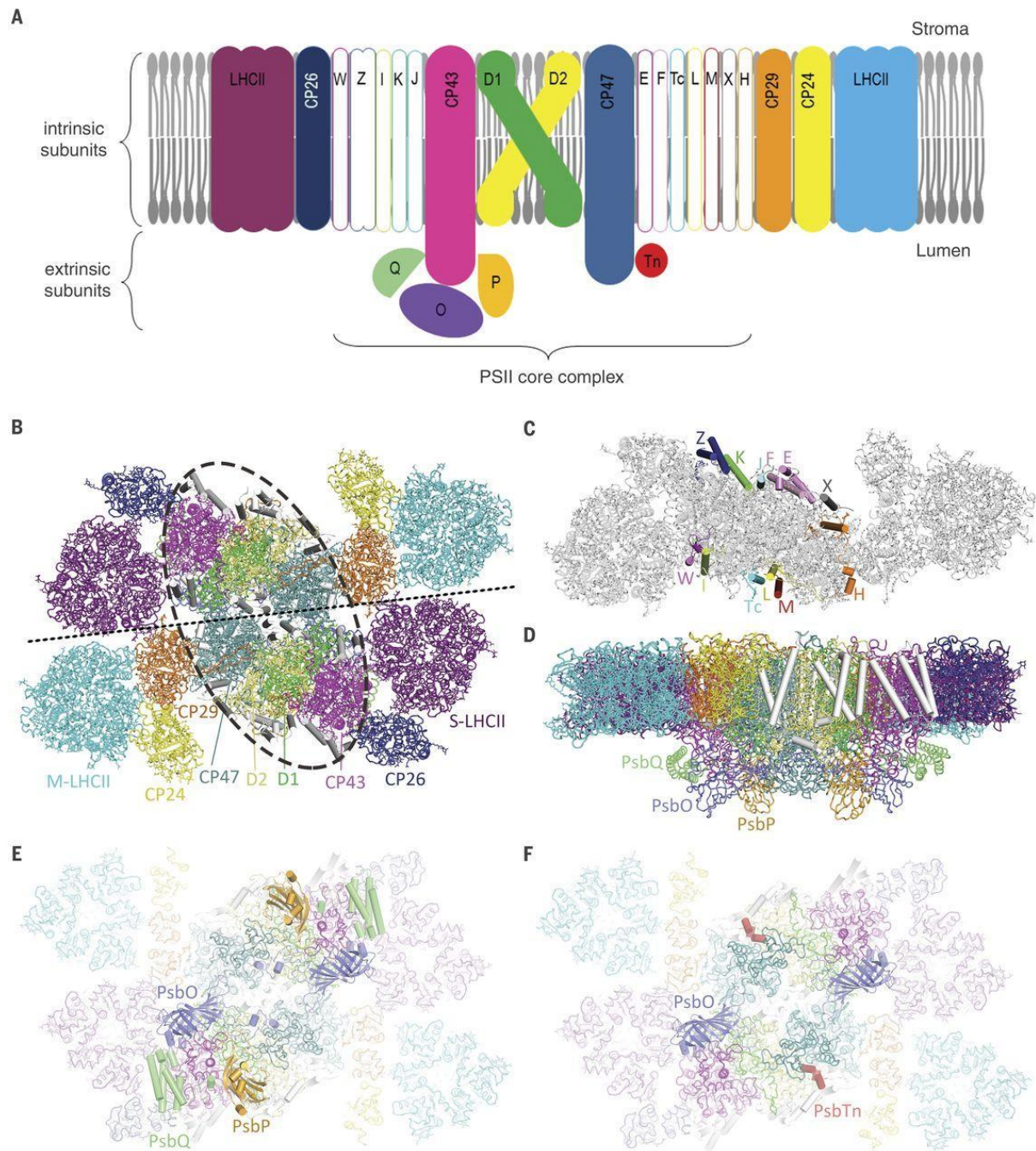
Funkce PSII

Jádro PSII můžeme rozdělit dle funkcí. D1 a D2 jsou odpovědné za separaci náboje a transport elektronu z Mn₄CaO₅ klastru až na plastochinon, CP43 a CP47 jsou světlosběrné antény, jež fungují jako přiváděče energie z vnějších antén LHCII. Díky této energii převedené do reakčního centra na P680 (jde o primární elektronový donor, jenž se skládá z dvou molekul chlorofylu *a* dojde k excitaci a následnému uvolnění elektronu z P680. Tento elektron putuje přes feofytin *a* na pevně vázaný plastochinon PQ_A, čímž vzniká komplex P680⁺PQ_A⁻. Odtud je předán (přes nehemově vázaný atom železa) na plastochinon PQ_B. Po redukci dvěma elektrony a následné protonaci (ze stromatu) se plastochinon mění na plastochinol (PQH₂), v němž elektrony opouští PSII a přesouvají se lipidovou dvouvrstvou do komplexu cytochromů b₆f (Ifuku 2015; Loll et al. 2005).

Vybuzením a uvolněním elektronu z P680 se spouští i další část elektron-transportního řetězce chloroplastů, a to fotolýza vody. Ta je výrazně pomalejší (10⁻³ – 10⁻⁶ s) oproti přenosu

¹ C značí "Core", tedy jádro komplexu PSII, S značí "Strong", tedy silně vázaný LHCII protein a M značí "Medium, tedy středně silně vázaný LHCII protein, dolní index značí 2 (není-li tam, znamená to 1) dané komplexy v celkovém superkomplexu; Su et al. (2017)

elektronu řetězcem dál (10^{-9} s; Shamsipur a Pashabadi 2018). P680⁺ je extrémně silným oxidačním činidlem (Junge 2019). Způsobuje oxidaci aminokyselinového zbytku Tyr¹⁶¹ (Y_Z) podjednotky D1. K redukci zpět do výchozího stavu je využit elektron z Mn₄CaO₅ klastru (respektive 4 elektrony), jež se po čtyřech excitacích P680 doplní ze dvou rozložených molekul vody, viz Obr. 1.



Obrázek 3; A) Zjednodušený pohled z boku na PSII-LHCII superkomplex, šedě značena lipidická dvojvrstva B) PSII při pohledu z lumen tylakoidu, přerušovaná čára od sebe odděluje monomery, jádrový komplex ohraničen přerušovanou elipsou, barvy odpovídají barvám podjednotek v A; C) zvýraznění malých podjednotek PSII, pohled ze stromatální strany; D) pohled na superkomplex z boku (rovnoběžně s rovinou membrány, směrem nahoru stroma, směrem dolů lumen), E) C₂S₂M₂ ve sbalené formě, F) C₂S₂M₂ v rozbalené formě. Převzato ze Su et al. (2017).

Vnější podjednotky PSII

Jak již bylo řečeno, hlavními vnějšími podjednotkami PSII jsou u rostlin proteiny PsbO, PsbP a PsbQ, vázané na PSII z lumenální strany. Tyto proteiny jsou často kódované více geny, díky čemuž vzniká více izoform těchto proteinů, které jsou si vzájemně do velké míry podobné. V případě *A. thaliana* jde o dvě izoformy PsbO (PsbO1-2), dvě izoformy PsbP (PsbP1-2) a dvě izoformy PsbQ (PsbQ1-2; Perez-Bueno, Baron a Garcia-Luque 2011). Proteiny PsbP a PsbQ mají v rostlinách i vzdálenější paralogy, které jsou také lokalizované v lumen tylakoidů, ale často získaly i funkce, které pravděpodobně nesouvisí s PSII. V *A. thaliana* jsou to dva PsbP-like proteiny (PPL1-2), sedm (možná osm) PsbP-domain proteinů (PPD1-7) a tři PsbQ-like proteiny (PQL1-3; Ifuku 2014, 2015; Nishimura et al. 2016). Co do funkce, různé homology zaujímají široké spektrum funkcí, jako např. účast na opravě fotopoškozeného PSII, kde se uplatňuje PPL1, kdežto PQL1-3 a PPL2 se podílejí na funkci NADPH dehydrogenázového komplexu (součásti cyklické elektronové dráhy; Ifuku 2015).

PsbP a PsbQ jsou přítomné pouze ve vyšších rostlinách a řasách. Ovšem i u sinic lze najít homologní proteiny (CyanoP a CyanoQ), z kterých se asi vyvinuly eukaryotní formy (Ifuku 2015). Co se jejich funkce týče, u CyanoQ jde pravděpodobně o napomáhání při stabilizaci dimeru PSII, k čemuž přispívá i PsbO. U CyanoP je funkce stále předmětem debat, ale předpokládá se, že se uplatňuje při skládání PSII a následně je po maturaci tohoto komplexu nahrazen PsbO (Ifuku 2015), který se nachází jak u nižších, tak u vyšších rostlin a sinic.

Mezi vnější proteiny PSII vyšších rostlin lze řadit ještě PsbR, avšak stále není jasná jeho poloha v komplexu (jde-li o vnější či vnitřní podjednotku). Jeho role souvisí pravděpodobně s vazbou PsbP do membrány PSII (Roose et al. 2016). Také sem spadá PsbTn, který není součástí proteinů chránících OEC, ale pravděpodobně se podílí na ochraně před fotoinhibicí (Chen et al. 2019).

PsbP

Ifuku (2015) uvádí, že PsbP mohl být zásadní protein pro vývoj PSII v podobě, v jaké se nachází v zelených rostlinách. Experimentálně bylo totiž zjištěno, že knockout (mutanti s vypnutou expresí genu) či knockdown (mutanti se sníženou expresí genu) rostliny v *psbP* genech vykazují poruchy mangan-vápenatého klastru, což značně ovlivňuje životaschopnost rostlin (Ido et al. 2009). Pomocí FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) bylo dokázáno, že PsbP zajišťuje správné koncentrace Cl^- a Ca^{2+} iontů okolo OEC. Zajímavé je, že PsbP je pravděpodobně nutný v semenáčcích, ovšem u starších rostlin se sestavenými PSII již ne (Roose et al. 2016). Dle Knoppová et al. (2016) má předchůdce PsbP, protein CyanoP, také svou roli při skládání PSII sinic. V

průběhu evoluce byl však nahrazen proteinem PsbP, jelikož vznikaly nové vazby (například s CP26; Knoppová et al. 2016).

PsbP má velikost 24 kDa (Bricker a Burnap 2005) a váže se k PSII svým N-koncem, a to k PsbE, PsbF (obojí součásti cytochromu b_{559}) a PsbR (Su et al. 2017; Suorsa et al. 2006). PsbP a PsbQ se také váží k anténním podjednotkám CP26 a CP43 (Ido et al. 2012, 2014). Byla zjištěna role PsbP a PsbQ i v sestavování PSII-LHCII superkomplexů, kdy při snížení koncentrace těchto proteinů bylo možno pozorovat množství nekompletních PSII-LHCII superkomplexů. Tato zjištění přispívají k teoriím o vazbě PsbP a PsbQ k CP26 a CP43 (Allahverdiyeva et al. 2013; Ido et al. 2009). Při RNAi (RNA interferenci) PsbP tabáku došlo k akumulaci volných podjednotek RC (př. PsbQ, Mn_4CaO_5 klastru), a snížení kvantového výtěžku rostlin (Yi et al. 2008). Bricker et al. (2013) tak vyvozují, že PsbP je v rámci své rodiny nezastupitelný pro správné sestavení PSII. PsbP interaguje také s PsbO a napomáhá při stabilizaci C-terminálních domén D1 a D2 proteinů (Su et al. 2017; Wei et al. 2016).

PsbQ

PsbQ má velikost 16 kDa (Bricker a Burnap 2005) a byl pro něj udělán strukturní model s rozlišením 1,49 Å. Lze ho také nalézt v modelu celkové struktury PSII (Balsera et al. 2005; Su et al. 2017). V práci Balsera et al. (2005) však nejde o kompletní strukturu tohoto proteinu (chybí informace hlavně o N-terminální oblasti, které však částečně doplnili počítačovou simulací). Důležitou roli zde hraje N-terminální oblast bohatá na prolin, kde v rámci jednotlivých skupin organismů dochází k nejvýraznějším změnám tohoto proteinu v rámci PsbQ-rodiny (Balsera et al. 2005).

PsbQ se váže na N-terminální část PsbO a také na CP43 (Wei et al. 2016). Naopak N-terminální část PsbQ se táhne 50 Å a propojuje tak PsbQ a PsbP (Wei et al. 2016). Ovlivňuje tak jeho konformaci, což mu umožňuje vazbu k PSII (Ifuku 2015).

Co se funkce PsbQ týče, Allahverdiyeva et al. (2013) uvádí, že po jeho odstranění nedošlo k výraznému ovlivnění běžné funkce rostlinného PSII. To se projevilo až při zvýšeném ozáření, kdy došlo vlivem nesprávného poskládání PSII k narušení nefotochemického zhášení (NPQ, non-photochemical quenching - způsob, jakým se fotoautotrofové zbavují přebytečné excitační energie přeměnou na teplo; Allahverdiyeva et al. 2013). Další výzkumy přichází s poznatkem, že přítomnost PsbQ pomáhá vazbě PsbP a částečně obnovuje funkci OEC (vývoj kyslíku) v tylakoidních membránách (s PsbP a PsbQ odmytými pomocí NaCl). Zde autoři na membránu vraceli nativní a mutované formy PsbP spolu či bez PsbQ (Kakiuchi et al. 2012). Vyvozují tak, že funkce PsbQ spočívá ve stabilizaci propojení PsbP a PSII, což umožní obnovení koncentrací chloridových a vápenatých iontů důležitých pro správné fungování OEC.

U červených řas a rozsivek se vyskytuje PsbQ', jež je částečně odlišný od PsbQ vyšších rostlin (Yamada et al. 2018). Jeho funkce pravděpodobně spočívá v posunu redoxního potenciálu plastochinonu PQ_A do kladnějších hodnot, což snižuje tvorbu ROS (v tomto případě O₂⁻; Yamada et al. 2018).

PsbTn

Jde o vnější podjednotku zkoumanou v souvislosti s vytvořením struktury PSII vyšších rostlin (Wei et al. 2016). Jde o jaderně kódovanou podjednotku, která má velikost 3 kDa, a je tak nejmenší vnější podjednotkou. Jako ostatní vnější proteiny PSII, i PsbTn má dvě isoformy, PsbTn1 a PsbTn2 (Chen et al. 2019). Chen et al. (2019) uvádí, že PsbTn se na membráně udržel i poté, co všechny ostatní vnější podjednotky byly chemicky odmyty. Jde tedy o silně se vážící protein. Dle Wei et al. (2016) je PsbTn vklíněn mezi C-terminální doménu PsbE a CP47.

Co se týče funkce PsbTn, panují zde stále dohady. Předmětem spekulací je účast při přizpůsobování na změny tma/světlo a také přizpůsobení se prudkému světlu. Chen et al. (2019) zakládají svá tvrzení na tom, že u dvojitých knock-out mutantů *psbTn1 psbTn2* byl zjištěn značný pokles fosforylace podjednotek D1, D2 a CP43, kteroužto obstarává kináza STN8 (Betterle et al. 2017). PsbTn tak může sloužit k regulaci této kinázy, jejíž funkce souvisí s opravou PSII při nadměrném osvitě (Chen et al. 2019). Dle těchto autorů tak může u PsbTn jít o účast na redukci fotoinhibice, avšak nelze to tvrdit zcela s jistotou.

PsbR

Jak bylo řečeno v předchozích odstavcích, jde o podjednotku PSII, u níž se stále spekuluje, zda je vnější či vnitřní. Nachází se pouze u zelených rostlin a řas (není u červených řas; Bricker et al. 2012). Prostorová struktura u ní zatím nebyla popsána. Co zatím víme je, že se váže k PsbP a nachází se mezi PsbP a PsbE (Roose et al. 2016). Suorsa et al. (2006) ve své práci uvádí, že mutanti v *PsbJ* neměli v PSII žádné PsbR, z čehož vyvozuje, že *PsbJ* je nutný k vazbě PsbR do PSII. U mutantů v genu *psbR* byl při nízké hladině osvitě zaznamenán drastický pokles obsahu PsbP a PsbQ (Suorsa et al. 2006), stejně jako zvýšení množství LHClI nespojených s PSII (což ovšem mohl způsobit pokles PsbQ, v jehož mutantech byl podíl nespojených LHClI ještě větší; Roose et al. 2016).

PsbO

PsbO se jako jediná vnější podjednotka PSII vyskytuje u všech oxygenních fotosyntetizujících organismů (De Las Rivas a Barber 2004). Ke změnám v tomto proteinu v průběhu evoluce došlo pouze v koncových smyčkách a povrchových aminokyselinových zbytcích (Bommer et al. 2017). Jak již bylo zmíněno výše, mezi jeho hlavní úlohy v systému patří stabilizace mangano-vápenatého klastru

(udržování koncentrace vápenatých a chloridových iontů), ochrana OEC proti reduktantům a odvod produktů (protonů) z fotolýzy vody (Bricker et al. 2012; De Las Rivas a Barber 2004; Gabdulkhakov et al. 2009). Avšak co se mechanismu těchto dějů týče, prozatím zůstávají velice málo objasněné (Roose et al. 2016).

Struktura PsbO

PsbO je protein, pro který se uvádí délka 246-249 aminokyselinových zbytků² (del Val a Bondar 2017) a molekulové hmotnosti 27 kDa (De Las Rivas a Barber 2004) v jeho maturované podobě. Napříč 22 zkoumanými organismy (jednalo se o rostliny, řasy a sinice) si protein PsbO dle Bricker a Burnap (2005) zachoval 43 % AK zbytků zcela stejných či alespoň s neutrálními záměnami. Tento protein tvoří β -barel (Wei et al. 2016) skládající se z osmi antiparalelních β -vláken, tvořících "cylindrickou" doménu. Mezi 5. a 6. β -vláknem se nachází delší smyčka tvořící "hlavovou" doménu PsbO (De Las Rivas a Barber 2004; Nield a Barber 2006). β -barel je uvnitř vyplněn hydrofóbními AK zbytky. Spolu se zmíněnou hlavovou doménou (β 5- β 6 smyčka) se vazby tohoto proteinu na PSII podílí ještě N-terminální smyčka a β 1- β 2 smyčka (De Las Rivas a Barber 2004). Zde bych upozornil na fakt, že De Las Rivas a Barber (2004) pracovali se strukturou PsbO ze sinice. Avšak Mummadisetti et al. (2016) či Wei et al. (2016) potvrzují většinovou podobnost PsbO u sinic a zelených rostlin. Struktura PsbO u vyšších rostlin je zobrazena na Obr. 4.

² Platí pro většinu v dané práci zkoumaných vyšších rostlin (*Spinacia oleracea*), přičemž autoři uvádí, že *Morus nigra* či *Allium cepa* mají tento protein výrazně kratší (214-217 AK zbytků v maturované formě); zkoumáno na PsbO1 izoformě.



Obrázek 4; Struktura PsbO vyšších rostlin (zde z hrachu); žlutě N-koncová doména PsbO; bíle β -barel, tedy "cylindrická" doména; červeně "hlavová" doména; zeleně β 1- β 2 smyčka; Obrázek vytvořen za pomoci programu Swiss-PdbViewer 4.1.0, data v něm použita původem z 5xn1 struktury (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/5xn1>) z práce Su et al. (2017); popsáno na základě práce J. De Las Rivas a Barber (2004).

Rozdíl ve struktuře PsbO u sinic je hlavně v tzv. "sinicové smyčce" (Bricker et al. 2012), jež má délku 14 AK. Korespondující smyčka vyšších rostlin k sinicové smyčce je výrazně menší (Popelkova a Yocum 2011). Co se polohy sinicové smyčky týče, De Las Rivas a Barber (2004) uvádějí, že se vyskytuje na lumenální konci β -barelu PsbO mezi 4. a 5. β -listem. U rostlin její funkci pravděpodobně nahradil prodloužený N-koncový. Ten mají vyšší rostliny a řasy zhruba o 10 AK delší, jde o úsek aminokyselinových zbytků $^{1}E - ^{10}E$ (číslováno dle špenátu; Mummadisetti et al. 2016).

Důležitou součástí struktury PsbO všech organismů je také jeho disulfidický můstek. Při jeho absenci dochází u tohoto proteinu k destabilizaci terciární struktury (Wyman a Yocum 2005). Hall et al. (2010) zjistili, že pokud je směs lumenálních proteinů vystavena redukčním podmínkám, PsbO je degradován. Z toho usuzují, že pro stabilitu PsbO je přítomnost disulfidického můstku nezbytná. Karamoko et al. (2011) se ve své práci zabývali proteinem LTO1 (Lumen Thiol Oxidoreduktáza 1), který mění redoxní stav Cys zbytků u lumenálních proteinů tylakoidu. Za pomoci kvasinkového dvouhybridního systému (Y2H) zjistili, že jak PsbO1, tak PsbO2 mohou interagovat s LTO1. Lze se tak domnívat, že právě LTO1 je protein, který zabezpečuje oxidaci disulfidického můstku PsbO1. Karamoko et al. (2011) tak odvodili, že právě nedostatek LTO1 v jejich mutantech může být příčinou

špatného sestavování PSII, jehož je PsbO součástí. Nedostatek LTO1 totiž způsobí, že PsbO nebude mít oxidovaný disulfidický můstek, což povede k jeho nestabilitě, která se zase odrazí v nesprávném skládání PSII. To by pak mohlo vysvětlit značnou podobnost mezi fenotypem *lto1* a *psbo1* mutantů. Kromě interakce s PsbO1 autoři také zjistili, že další možný interaktor LTO1 by mohl být protein FKBP20-2 (jde o izomerázu). Ten taktéž obsahuje disulfidický můstek a je také účasten na sestavování PSII. Není tak tedy vyloučeno, že i on by se mohl podílet na defektu PSII v *lto1* mutantovi. Další podporou domněnky, že fenotyp *lto1* mutantu je způsoben nedostatkem funkčního PsbO Karamoko et al. (2011) dokládají měření fluorescence chlorofylu. Porovnávání fluorescence *psbo1* a *lto1* mutantů ukázala, že projevy obou mutantů se velice podobají.

Disulfidický můstek, jak bylo uvedeno v odstavci výše, je důležitý pro stabilitu PsbO a bez něj může být protein degradován. Roberts et al. (2012) zkoumali vliv proteáz na degradaci PsbO v sinicích a špenátu (zde budu uvádět pouze výsledky pro špenát). V souladu s pozorováním Hall et al. (2010) na huseníčku i Roberts et al. (2012) na špenátu zjistili, že k degradaci PsbO dochází po redukcí disulfidického můstku. Autoři tvrdí, že jde o redoxně podmíněný děj. Experimentálně to ověřili tak, že k izolovaným lumenálním proteinům z huseníčku a špenátu přidali redukovaný thioredoxin. Oproti kontrole (kde však bazální degradace také probíhala) bylo možno pozorovat značný nárůst v míře degradace PsbO. Další pokusy byly provedeny s rekombinantními proteázami ze sinice *Synechocystis* 6803. Největší efekt měl rekombinantní enzym rHhoA a thioredoxin, které způsobily po 10 hodinách působení pokles PsbO na méně než 7 % původní hodnoty. Autoři podrobili pokusům o degradaci i fragmenty membrán s navázaným PsbO. Zde nedošlo k žádné proteolýze (kromě testů s rHhoA, které však dle autorů mohly být zkresleny kontaminací vzorku volným PsbO) a lze tedy tvrdit, že vázaný PsbO je před degradací chráněn (Roberts et al. 2012).

Vazba PsbO do PSII

Starší práce na sinicích (De Las Rivas a Barber 2004) uvádí jako hlavní interagující proteiny s PsbO vnitřní proteiny CP43 a D1. Tyto informace byly potvrzeny i v novějších pracích na vyšších rostlinách (Su et al. 2017). D1 se dle autorů De Las Rivas a Barber (2004) pojí s PsbO přes své transmembránové helixy a C-terminální část. CP43 zase přes svou vnější smyčku. Právě toto místo, kde dochází k interakci těchto tří proteinů, je oním místem, kde se nachází Mn₄CaO₅ klastr (De Las Rivas a Barber 2004). Vazbu k CP47 na jeho vnější smyčku zabezpečuje hlavová doména PsbO (oblast AK zbytků ¹⁵⁷L - ¹⁷⁹E, číslováno dle *Thermosynechococcus elongatus*). Pro D2 je vazba zprostředkována přes C-terminální vnější helix (De Las Rivas a Barber 2004). PsbO se také napříč organismy účastní vazby PSII monomerů do dimeru a může tak napomáhat v jeho stabilizaci. K této vazbě slouží převážně β1-β2 smyčka, jež se váže na velkou vnější smyčku CP47 druhého monomeru (Anderson, Chow a De Las Rivas 2008). Bentley a Eaton-Rye (2008) uvádějí, že v delečním mutantu PsbO sinice

Synechocystis sp. PCC 6803 se většina PSII vyskytovala v monomerní formě. Bricker et al. (2012) však navrhuje druhou možnost, a to, že při absenci PsbO je rostlina náchylná na silné světlo, což vede k nutnosti rychlé obměny D1 proteinu, k čemuž je zapotřebí rozpojit PSII dimer na monomery. I N-koncová doména je považována za místo důležité pro vazbu PsbO k PSII a stabilitu vývoje kyslíku. Zde bych připomněl, že N-konec rostlinných PsbO je delší oproti sinicovým. Lze tak odlišit dva důležité úseky v AK sekvenci PsbO napříč organismy. Pro vyšší rostliny (zde uvedeno pro špenát) a řasy jde o úsek ⁴K – ¹⁰E aminokyselinových zbytků (ztráta této sekvence vyvolá snížení schopnosti vývoje kyslíku o 50 %). Pro rostliny a sinice dohromady to jsou zbytky ¹⁵E – ¹⁸T. Ztráta této druhé sekvence ještě prohloubí snížení schopnosti tvorby kyslíku u rostlin, došlo-li předtím ke ztrátě sekvence ⁴K – ¹⁰E (Popelkova, Im, D'Auria et al. 2002; Popelkova, Im a Yocum 2002).

Miyao a Murata (1984) uvádějí, že PsbO lze z membrán odmyt pomocí 1 M CaCl₂, zatímco po přidání 2 M NaCl k odmytí nedochází k rozdílu od PsbP a PsbQ. Ovšem použijeme-li 200 mM NaCl a 2,6 M močovinu, k odmytí dojde (Miyao a Murata 1984). Důvodem je pravděpodobně rozrušení vodíkových můstků díky močovině, čímž se vazba k PSII oslabí natolik, že méně koncentrovaný chlorid sodný dokáže protein odpoutat (Bricker et al. 2012).

Izoformy PsbO

PsbO, stejně jako PsbP a PsbQ, je v rostlinách kódován jadernou DNA (De Las Rivas, Balsera a Barber 2004). Jak již bylo uvedeno výše, *A. thaliana* exprimuje dvě izoformy genu *psbO* (na rozdíl třeba od špenátu, který má jen jednu; Bricker et al. 2012), a to PsbO1 a PsbO2 (Murakami et al. 2005). Tyto se u *Arabidopsis* liší 11 AK zbytky (Murakami et al. 2002). Lundin et al. (2007) se při svém výzkumu zajímali o mutanty v *psbo1* a *psbo2*. Fenotypy obou mutantů se lišily od wild typu³ (WT), avšak oba byly životaschopné. Lze se tak domnívat, že izoformy tohoto proteinu jsou vzájemně do jisté míry zastupitelné.

Funkce PsbO

Již starší práce (Ono a Inoue 1985) uvádí, že po odstranění PsbO odmytím z membrány (viz výše) dochází ke snížení vývoje kyslíku kvůli neschopnosti Mn₄CaO₅ klastru prodělávat správně jednotlivé kroky Kokova cyklu (v tomto pokusu zjistili, že je znemožněn přechod z S₃ do S₄). Stejně tak je již dlouho dobu znám fakt, že PsbO udržuje v OEC stabilní hladinu Cl⁻ a Ca²⁺ iontů, při jejímž snížení se sníží i schopnost vývoje kyslíku (Bricker 1992; Rivalta et al. 2011). Právě ony nesprávné koncentrace iontů zapříčiňují zpomalení či úplné zastavení fází Kokova cyklu (Boussac, Zimmermann a

³ *Psbo1* mutant měl světle zelené listy a značně pomalý růst oproti kontrole, *psbo2* mutant měl listy tmavě zelené a růst měl oproti kontrole zpomalen jen trochu (Lundin et al. 2007).

Rutherford 1989; Wincencjusz, van Gorkom a Yocum 1997), který je pro tvorbu kyslíku nezbytný. PsbO však neslouží jako donor těchto iontů pro Mn_4CaO_5 klastr, jelikož ten dokáže částečně fungovat i bez PsbO při zvýšené koncentraci daných iontů (Bricker 1992). Pro Cl^- iont se uvádí vazebné místo ^{317}K proteinu D2 (Guskov et al. 2009), zatímco pro Ca^{2+} jde o ^{189}E a ^{344}A proteinu D1 (Loll et al. 2005).

Burnap a Sherman (1991) zkoumali ve svých pokusech sinice, které bylo možné v živném médiu a za správných podmínek pěstovat i bez PsbO, byť se sníženou produkcí kyslíku. U vyšších rostlin je však fotoautotrofní růst bez PsbO (či s velmi malými koncentracemi) nemožný (Yi et al. 2005, 2008).

PsbO a kanály pro substrát/produkty OEC

PsbO se podílí na zaštitění mangano-vápenatého klastru před vnějšími vlivy lumen tylakoidu. Ovšem aby mohlo docházet k vývoji kyslíku, je logické, že v tomto "štitu" musí existovat kanály pro substrát a produkty OEC. Tyto kanály se pravděpodobně skládají z více jak deseti karboxylových skupin (jde o AK zbytky E a D; del Val a Bondar 2017). Gabdulkhakov et al. (2009) ve své práci dělí kanály na tři typy: 1) kanály přivádějící vodu k OEC; 2) kanály odvádějící molekulární kyslík z OEC; 3) kanály odvádějící z OEC protony. Kanály jsou tvořeny převážně AK zbytky proteinů PSII. V práci těchto autorů je PsbO uveden jako účastník na tvorbě kanálů pro přívod vody k OEC a kanálů pro odvod protonů. U kanálů, jež přenáší protony do lumen tylakoidů, dochází k přenosu na základě protonace AK zbytků. Jde o tzv. Grotthův mechanismus, kdy protony „přeskakují“ z jedné molekuly na druhou (Brzezinski a Ådelroth 2006). Je zde také možnost, že tyto kanály obsahují molekuly vody, jež fungují jako přenašeče protonů (Gabdulkhakov et al. 2009). To ve své práci rozvádí Guerra et al. (2018). Tito autoři tvrdí, že existuje kolem PsbO síť, jež je tvořena vodíkovými můstky, které spojují zbytky aminokyselin a molekul vody, jež se mezi nimi nachází. Těmto vodním spojům autoři říkají "vodní dráty". Síť se skládá z PsbO, D1 a D2 AK zbytků. D2 zbytky tvoří její konec v blízkosti OEC, odkud prochází až do lumen tylakoidu, kde ústí díky AK zbytkům PsbO. D1 zbytky mohou mít v této síti roli v transportu protonů (Dilbeck et al. 2012; Service, Hillier a Debus 2010) společně s PsbO zbytky (Lorch et al. 2015).

PsbO jako GTPáza

GTPásovou aktivitu u PsbO pozoroval poprvé Lundin et al. (2008). Autoři na základě tohoto objevu přichází s tvrzením, že tato aktivita může souviset s D1 podjednotkou PSII. Ta patří k "nejnamáhanějším" částem fotosystému a je u ní nutná častá výměna (Bricker et al. 2012). Za účelem této výměny mohly některé vyšší rostliny vytvořit více izoforem PsbO (např. huseníček a hrách; Murakami et al. 2002). U *A. thaliana* je totiž předpokládáno funkční rozdělení obou izoforem

(Lundin et al. 2008). Dle tohoto rozdělení PsbO1 funguje jako stabilizátor OEC, zatímco PsbO2 se uplatňuje ve fosforylaci D1 proteinu, respektive v jeho výměně. K domněnce o primární funkci PsbO2 přispívá dle autorů fakt, že má trojnásobně vyšší GTPásovou aktivitu než PsbO1 (Lundin et al. 2008).

PsbO a stresová odpověď

Práce Gururani et al. (2012, 2013), které byly prováděny na bramborách, poskytly náhled na vliv abiotických stresů či výnosnost rostlin, při snížené expresi PsbO. Pro indikaci míry stresové odpovědi na médiích s přidavkem NaCl, ZnCl₂ a manitolu vybrali autoři tvorbu ROS, konkrétně H₂O₂. Oproti kontrolním rostlinám vykazovaly rostliny se sníženou expresí PsbO (dále jen PsbO-DR, PsbO down regulated) sníženou tvorbu H₂O₂. Autoři také zaznamenali zvýšenou produkci antioxidantních enzymů v PsbO-DR rostlinách. Ovšem jak sami uvádějí, není známa přesná příčina tohoto nárůstu. V jednom z pokusů pozorovali autoři v PsbO-DR rostlinách nárůst hladiny prolinu (který se běžně účastní stresových odpovědí; Parvaiz a Satyawati 2008). Další látky, u kterých autoři uvádějí zvýšení koncentrace v PsbO-DR rostlinách při zasolení, vystavení těžkým kovům či osmotickému stresu, byly askorbát a tokoferol. Ovšem u těchto sloučenin byla vyšší koncentrace pozorována i při normálních, nestresových podmínkách. Když autoři zkoumali PsbO-DR v *in vitro* podmínkách, všimli si, že hlízy se u těchto rostlin tvoří skoro dvojnásobně rychleji než u rostlin PsbO-UR (PsbO up regulated) a PsbO-WT. Společně s tím zjistili, že PsbO-DR rostliny mají v průměru větší výnos a počet hlíz na rostlinu než PsbO-UR a kontrola. Pro porovnání Gururani et al. (2012) vypěstovali transgenní rostliny i ve skleníku. Po 45 dnech pak provedli měření, kdy zjistili, že až 80 % PsbO-DR rostlin již mělo vytvořené hlízy, zatímco PsbO-UR a WT rostliny hlízy neměly vůbec. Avšak rostliny jako takové byly co do vzrůstu srovnatelné ve všech třech zkoumaných liniích. Kromě hlíz byl u PsbO-DR zaznamenán i nárůst v koncentraci sacharidů a již zmíněného askorbátu (který později autoři dali do souvislosti se stresem). Nárůst sacharidů mohl být způsoben větší fotosyntetickou aktivitou, kterou autoři na PsbO-DR rostlinách naměřili. Větší velikost hlíz by mohla být způsobena zvýšenou aktivitou cytokininů (Roitsch a Ehneß 2000), které jsou hladinou sacharidů ovlivňovány.

Podrobení PsbO-DR rostlin stresu těžkými kovy následně ukázalo, že jsou mnohem stabilnější, co do fungování fotosyntetického aparátu, než kontrolní rostliny. Obdobně vypadaly výsledky i pro osmotický stres či zasolení. Na podporu svých výsledků autoři uvádějí práci Pawłowicz, Kosmala a Rapacz (2012). V ní byly pokusy prováděny na travách (*Festuca arundinacea* a *F. pratensis*). Tito autoři zjistili, že rostliny s vysokou tolerancí na sucho mají menší expresi PsbO než rostliny s menší tolerancí na sucho. To naznačuje, že snižování hladiny PsbO by mohl být jeden z mechanismů sloužících rostlině k vyrovnání se se stresem, avšak je nutný další výzkum k potvrzení této domněnky a odhalení mechanismu takové reakce. Závěrem kapitoly je třeba ještě poznamenat, že pozorované

efekty pokusů Gururani et al. (2012, 2013) se zdají být spíše nepřímými důsledky pozměněného PSII a s tím souvisejících změn fotosyntetického aparátu.

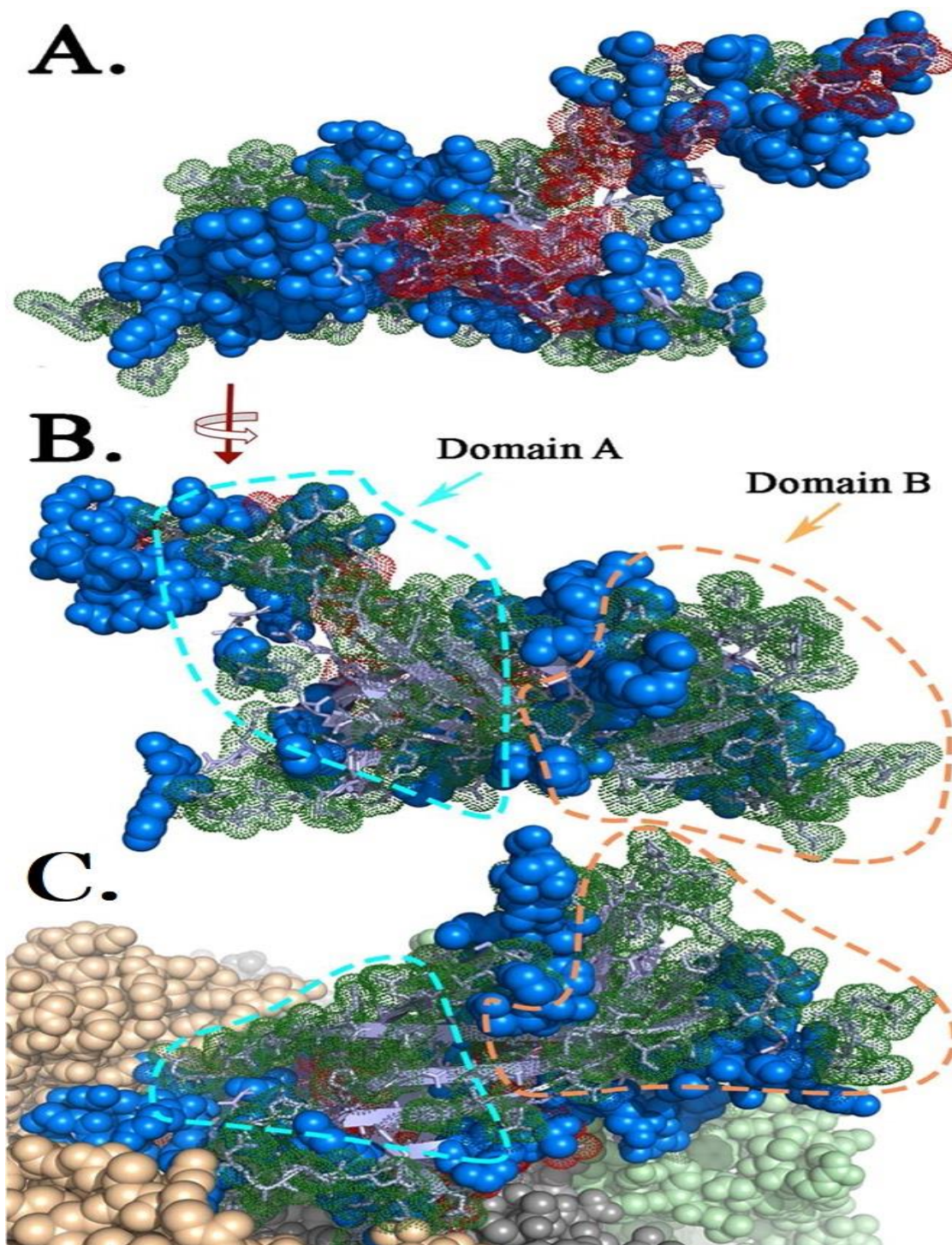
Nové poznatky ohledně PsbO

Novinky ze struktury PsbO

Mummadiseti et al. (2016) prováděli na PsbO radiolytické značení (zjišťovali, které AK zbytky byly vystavené roztoku). Zjistili, že i některá místa PsbO, která nezajišťují přímo vazbu k PSII, jsou rezistentní vůči oxidativním modifikacím způsobeným touto metodou (Mummadiseti et al. 2016; Obr. 5). Z toho autoři vyvozují, že tato místa slouží k vazbě jiných částí PSII jako je např. PsbQ. Tato teorie je však založena na předpokladu, že PsbQ je v podobné pozici jako bakteriální CyanoQ a je na rozhraní dimeru PSII (Liu et al. 2014). Podporou pro ni je práce Wei et al. (2016), kde na PSII z hrachu autoři uvádějí, že PsbO se svou N-koncovou doménou váže k PsbQ. Dalšími možnostmi, proč nedošlo k modifikacím, jsou dosud nepopsané vazby luminálních proteinů, jako jsou katalázy, polyfenol oxidázy, TL29 (protein s možnou účastí při stabilizaci luminální části PSII), TLP18.3 (protein účastnící se skládání a opravy PSII), YCF39-like protein (také protein s předpokládanou úlohou při skládání PSII) či vazba druhého PsbO (k tomu zatím neexistují dostatečné důkazy; Bricker et al. 2012; Granlund et al. 2009; Chidgey et al. 2014; Mummadiseti et al. 2016; Sheptovitsky a Brudvig 1996; Tomizioli et al. 2014).

Jako další možný protein, který interaguje s PsbO, uvádějí Jiang et al. (2017) protein HSP90C v *A. thaliana*. HSP90C je chaperon ve stromatu chloroplastu (Inoue, Li a Schnell 2013), u kterého autoři zjistili za pomoci kvasinkového dvouhybridního systému, že PsbO1 je jeden ze šesti proteinů s ním interagujících. Pro zlepšení pozorování interakce HSP90C a PsbO1 si autoři vytvořili fúzní proteiny PsbO1-GFP. U těchto fúzních proteinů však zaznamenali zpoždění v přenosu přes membránu tylakoidu oproti rychlosti přenosu WT PsbO1. Autoři uvádějí, že při pozorování transformovaných rostlin bylo patrné zpoždění v zezelenání děložních lístků semenáčků. To bylo dle nich způsobeno menším obsahem chlorofylu. Tento efekt byl tím silnější, čím byla větší exprese PsbO1GFP. Avšak čím byly rostliny starší, tím byl nedostatek chlorofylu menší, a proto je možné předpokládat, že šlo pouze o zpoždění v dozrávání chloroplastu. Pro ověření hypotéz byly použity další konstrukty, které obsahovaly stromatální cílovou sekvenci a tylakoidní cílovou sekvenci. Jiang et al. (2017) u rostlin s těmito konstrukty nepozorovali změnu fenotypu oproti WT rostlinám, a tudíž za zpoždění maturace semenáčků byl pravděpodobně zodpovědný plnohodnotný PsbO1GFP protein. Při pozorování vývoje transformovaných rostlin se Jiang et al. (2017) zaměřili na zbarvení listů. Intenzita GFP signálu se jim zvyšovala ve směru od zelených částí listů ke žlutým až bělavým částem, což podporuje tvrzení, že za

změnu barvy (a tedy množství chlorofylu) může PsbO1GFP. K průzkumu mechanismu, jakým docházelo k opožděnému zelenání listů u PsbO1GFP byl použit konstrukt HSP90C^{FLAG} (FLAG-tag je proteinová značka připojující se k C-konci proteinu; Oh et al. 2014), ke kterému byl následně transformován PsbO1GFP. Autoři poté zkoumali několik transgenických linií, avšak nikde nepozorovali, že by došlo ke zpoždění zezelenání oproti WT. Je tedy možné, že zvýšená exprese HSP90C do jisté míry kompenzovala negativní působení PsbO1GFP. Lze tak předpokládat, že HSP90C v rostlině urychluje a pomáhá s transportem PsbO1 do tylakoidů. U této práce však vyvstává otázka, a to, zda PsbO2 také není jedním z interaktorů s HSP90C. Jiang et al. (2017) ho sice pomocí Y2H screeningu s HSP90C nespojili, ale také nepodnikli žádné další kroky v hledání případné interakce. Je zde tedy nutnost dalšího výzkumu.



Obrázek

5; Struktura PsbO vyšších rostlin použita při radiolytickém mapování domén tohoto proteinu, jež byly vystaveny roztoku. Modré kuličky zobrazují 77 oxidativně značených aminokyselinových zbytků. A) pohled na PsbO z perspektivy vnitřních podjednotek PSII, červeně tečkované jsou AK zbytky, jež interagují s podjednotkami PSII a nedošlo u nich k oxidativní modifikaci; B) pohled na PsbO z luminální strany tylakoidní membrány, domény označené jako A a B neobsahují prakticky žádné oxidativní modifikace, zeleně tečkované jsou AK zbytky, jež byly vystaveny rozpouštědlu a nedošlo u nich k oxidativní modifikaci (nabízí se zde vysvětlení, že jde o AK zbytky, jež jsou chráněny zatím nespecifikovanými interagujícími proteiny); C) model PsbO vyšších rostlin zasazený do kontextu PSII sinic, CP43 zázorněno světle zelenými kuličkami, CP47 béžovými kuličkami, ostatní podjednotky zobrazeny jako šedé kuličky; převzato z Mummadisetti et al. (2016).

Charakteristikou struktury PsbO jako samostatného celku, či ve vazbě na PSII, se zabývali Offenbacher, Polander a Barry (2013). Ti uvádějí, že PsbO je tzv. vnitřně neuspořádaný protein (intrinsically disordered protein, IDP), tedy že jde o protein, který má v roztoku značně proměnlivou konformaci a stabilním se stane až po vazbě na jiný protein. Jednou z charakteristik IDP je značný počet nabitých AK zbytků na jeho povrchu, které zamezují jeho shlukování v roztoku (Lawrence, Phillips, a Liu 2007; del Val a Bondar 2017). Tyto nabité AK byly pozorovány hlavně na smyčkách, jež vykazují značnou dynamičnost, a které tak pravděpodobně hrají značnou roli při vazbě na PSII (del Val a Bondar 2017). Wyman, Popelkova a Yocum (2008) uvádí, že mutací W241F docílili zhoršení vazby PsbO do PSII a snížení produktivity OEC. I další mutace vedly k potížím s vazbou do PSII, z čehož bylo vyvozeno, že díky těmto mutacím došlo ke zvýšení stability proteinu, a tedy ke snížení jeho flexibility, jež je důležitá pro vazbu k PSII. V práci Offenbacher et al. (2013) je poukázáno na závislost konformace PsbO na teplotě, kdy dochází k viditelným změnám struktury PsbO. Autoři pozorovali změnu v dynamice PsbO skrze celý S-cyklus při teplotách 263 K a 277 K. Největší rozdíly přiřazují přechodu z S₂ do S₃ fáze Kokova cyklu (za teploty 277 K). Offenbacher, Polander a Barry (2013) dále uvádějí, že i přes vzdálenost, která dělí PsbO od Mn₄CaO₅ klastru (cca 17Å) spolu dokáží tyto komunikovat, a to přes vodní síť, jež obklopuje OEC (Polander a Barry 2012). Na tu se PsbO napojuje přes své amidové skupiny AK zbytků, jež jsou součástí vodní sítě OEC (Offenbacher et al. 2013).

Novinky o izoformách PsbO

Dvě izoformy PsbO má podle dostupných informací většina krytosemenných rostlin, zatímco nahosemenné rostliny mají pouze jednu (Duchoslav a Fischer 2015). Tito autoři uvádí, že rozdíly mezi izoformami se pohybují v rozpětí 6-26 AK zbytků. K nejčastějším změnám dochází díky substituci aminokyselinových zbytků D a E. Zajímavé je, že izoformy PsbO vznikly v evoluci opakovaně nezávislými genovými duplikacemi. Vzájemné paralogy daného druhu jsou si totiž více příbuzné, než isoformy z dvou různých druhů (pokud jsou z různých čeledí; Duchoslav a Fischer 2015). Hledáním rozdílů na různých hladinách (v rámci izoform, v rámci čeledí či mezi druhy) tak došli Duchoslav a Fischer (2015) k závěru, že co se týče AK zbytků, které vážou PsbO k PSII, izoformy krytosemenných rostlin se prakticky neliší. V této práci autoři uvádí, že největší rozdíly mezi izoformami jednoho druhu jsou obvykle na β1-β2 smyčce a na konci β-barelu, jež směřuje do lumen. Nejrozsáhlejší rozdíly mezi čeleděmi či mezi druhy lze pozorovat na β5-β6 smyčce a přiléhajícím β6 vlákně (Duchoslav a Fischer 2015). Autoři předpokládají, že strukturální rozdíly mezi izoformami tak ústí v rozdílné funkce. Ty by mohly spočívat v rozdílné GTPázové aktivitě či rozdílné vazbě potenciálních interaktorů (Duchoslav a Fischer 2015; Lundin et al. 2008). Více viz v části PsbO jako GTPáza.

Na studii mutantů v různých izoformách PsbO se ve své práci zaměřili Suorsa et al. (2016). Tito autoři si vytvořili pro svůj pokus několik mutantů. Šlo o mutanty v *psbO1*, *psbO2*, *psbO2 psbO1/psbO1* (mutant v *psbO2* a heterozygot v *psbO1*) a $\Delta 5$ (pětinásobný mutant s minimálním počtem podjednotek OEC potřebných pro jeho funkci). Mutant *psbo2 psbo1/psbo1* obsahoval stejné množství PsbO1, jako mutant *psbo1* obsahoval množství PsbO2. $\Delta 5$ mutant obsahoval mutace *psbO1*, *psbP2*, *psbQ1*, *psbQ2* a *psbR1*. Vzhledově byl *psbo2* mutant velice podobný WT rostlinám. Oproti tomu měl *psbo1* mutant světle zelené listy, malou listovou růžici a vykazoval pomalý růst (Allahverdiyeva et al. 2009). Mutant *psbo2 psbo1/psbo1* byl, co se fenotypu týče, někde na pomezí *psbo1* a *psbo2* mutantů. Poslední z uvedených mutantů, $\Delta 5$, měl překvapivě podobný fenotyp s *psbo1* mutantem, tedy světle zelené listy a zpomalený růst oproti WT. Při bližším zkoumání autoři zjistili, že u mutantů *psbo1* a $\Delta 5$ došlo k redukci množství PSII-LHCII komplexů. Tím se změnil stechiometrický poměr PSII-PSI, s nímž se zároveň snížil počet podjednotek PSI. K této změně došlo ve větší míře u *psbo1* než u $\Delta 5$. V mutantu $\Delta 5$ došlo k relativnímu zvýšení množství Cyt b_6/f na vyšší hladinu než u WT rostlin. Z toho tak Suorsa et al. (2016) vyvozují, že při změně struktury OEC a tím i elektron-transportního řetězce (LET - linear electron transport) vyšší rostliny zvýší míru užití alternativních elektronových drah jako CET (cyclic electron transport). Díky snížení celkového obsahu chlorofylu tak tyto rostliny měly světlejší barvu než WT rostliny. U mutantu *psbo2* byl zaznamenán mírný pokles v obsahu podjednotek PSII (hlavně PsbP) a LHCII, zatímco ostatní složky tylakoidní membrány byly na úrovni WT rostlin. Dále v této práci autoři uvádějí, že zaznamenali značný pokles kvantového výtěžku PSII u všech výše v odstavci uvedených mutantů kromě *psbo2*. Ovšem zajímavé je, že při kombinaci *NDH* mutantů (mutant v jedné ze dvou cyklických elektronových drah vyšších rostlin) s *psbo1* či $\Delta 5$ mutanty nedošlo k dalšímu snížení efektivity fotosyntézy (kvantového výtěžku PSII). K tomu došlo až při kombinaci mutace $\Delta 5$ s *pgr5* (druhá dráha cyklického transportu). Suorsa et al. (2016) se tak domnívají, že PGR5 CET je pro C3 rostliny významnější drahou CET oproti NDH. Suorsa et al. (2016) si na svých mutantech také všimli podivných fosforylací tylakoidních proteinů PSII. Ty jsou běžně regulovány redoxním stavem PQ. Fosforylace zde slouží k zajištění správné pohyblivosti PSII především při vysoké ozáření, kdy je nutno vyměňovat poškozené části PSII za nové. Ve WT rostlinách autoři pozorovali zvýšení fosforylace PSII-LHCII za běžného světla či za světla více excitujícího PSII. Ke snížení naopak docházelo za tmy či za světla, jež více excitovalo PSI. U *psbo2* pozorovali, že k defosforylaci proteinů D1 a D2 za tmy skoro nedocházelo, zatímco CP43 byl značně fosforylován i při světelných podmínkách prospívajících PSI. U mutantů s menším či žádným obsahem PsbO1 byla u D1, D2 a CP43 (při podmínkách prospěšných pro PSI) zaznamenána vyšší fosforylace než u WT. Ke snížení fosforylace PSII naopak došlo v *psbo1* a *psbo2 psbo1/psbo1*, a to hlavně za normálního světla a světla prospěšného pro PSII. $\Delta 5$ mutanti neprojevily skoro žádnou fosforylaci ani za tmy, ani za jiných podmínek (výjimkou byl protein CP43). Změny ve fosforylaci byly zaznamenány i

pro LHCII. Kromě $\Delta 5$ mutantu (který to měl naopak) byla fosforylace LHCII větší při světelných podmínkách vyhovujících PSII a normálním světle, zatímco při podmínkách prospěšných pro PSI byla snížena. Zajímavé také je, že byť fenotypově podobné, tak co se fosforylace týče, byly projevy u mutantů *psbo1* a $\Delta 5$ velice rozdílné. $\Delta 5$ totiž vykazoval oproti *psbo1* daleko menší míru fosforylace, a to za jakýchkoliv podmínek (kromě fosforylace LHCII, a to za tmy a PSI prospěšných světelných podmínek, kdy byla fosforylace srovnatelná).

Vlivem snížení množství PsbO pomocí RNA interference na rostliny *A. thaliana* se zabývali Dwyer et al. (2012). Analyzovali antisense linie, které měly celkové množství PsbO snížené na 25-60 % oproti WT rostlinám. Použitý antisense konstrukt měl dle autorů větší vliv na PsbO1 (prováděno na rostlinách, které měly 25 % WT obsahu PsbO). Z celkového PsbO tvořila izoforma PsbO1 u antisense linií 43 % oproti 59 % u WT. Vzhledem k narušení normálního poměru izoform je otázka, do jaké míry jsou pozorované změny způsobené sníženým množstvím PsbO a do jaké míry změnou poměru izoform. Antisense linie měly o 32 % pomalejší růst. Při porovnávání poměrů jednotlivých složek PSII autoři zjistili, že snížení obsahu PsbO bylo úměrné (1:1) ke snížení množství funkčních PSII a k obsahu proteinu D2, který je celkem stabilní podjednotkou PSII. Z toho vyvodili, že aktivita PSII byla snížena díky celkově sníženému obsahu PSII a ne kvůli akumulaci nefunkčních PSII. Antisense linie měly snížený maximální kvantový výtěžek PSII (F_v/F_m), který byl způsoben jak snížením hodnoty F_m , tak zvýšením hodnoty F_o . To potvrzuje, že bylo sníženo množství PSII přítomných v listech. Tento jev byl znám již dříve pro *psbo1* mutanty (Lundin et al. 2007), takže zde autoři připisují tento jev i snížení poměru PsbO1/PsbO2 (Dwyer et al. 2012). Další změny, které Dwyer et al. (2012) pozorovali v rostlinách s nízkým obsahem PsbO byly: snížení obsahu chlorofylu, změna poměru chlorofylu *a/b* a snížení obsahu PSI. Co se chlorofylu a PSI týče, ty dle autorů byly sníženy zhruba ve stejném poměru vůči sobě a zhruba v polovičním poměru vůči PSII. Změna v poměru chlorofylu byla způsobena poklesem PSII a PSI (jde tedy hlavně o chlorofyl *a* v RC). Další změny Dwyer et al. (2012) zaznamenali v transportu elektronů (měřeno pomocí tvorby kyslíku rostlinou) přes membránu. Zde si všimli, že při světelné saturaci autoři pozorovali nárůst tvorby kyslíku u antisense rostlin skoro až na trojnásobek hodnot WT. Z toho autoři vyvozují, že rostliny s nižším obsahem PsbO mají oproti WT více takových PSII, které se při veliké ozáření neinhibují (avšak celkový počet PSII mají antisense mutanti samozřejmě menší). Za běžných podmínek je totiž při světelné saturaci rychlost transportu elektronů nejvíce ovlivněna Cyt b_6f (Yamori et al. 2011). Až při nadměrném osvětlení je hlavním omezujícím prvkem PSII (Dwyer et al. 2012). Při svých pokusech Dwyer et al. (2012) také snížili obsah funkčních PSII na méně než 25 % běžných hodnot. Až po tomto snížení byli autoři schopni zaznamenat při světelné saturaci přechod z limitace Cyt b_6f (co se fotosyntetického obrátu týče) na limitaci PSII.

Novinky ohledně GTPázové funkce PsbO

V rámci výzkumu stresu nadměrným ozářením dospěli Wang et al. (2015) k provázání proteinu CYP38 a GTPázové aktivity PsbO2. Ve své práci autoři studovali mutantu *cyp38* postrádajícího imunofilin CYP38. He, Li, a Luan (2004) uvádějí, že v *A. thaliana* bylo zatím objeveno 52 genů z rodiny imunofilinů, přičemž 16 z nich je lokalizováno v lumen tylakoidů a jedná se tedy zřejmě o významné proteiny v tomto kompartmentu (Romano et al. 2005). A právě jedním z těchto 16 luminálních imunofilinů je CYP38 (ortologem CYP38 ve špenátu je TLP40; Fulgosi et al. 1998). Již dřívější práce (Sirpiö et al. 2008) naznačují, že bez CYP38 rostlina vykazuje sníženou fosforylaci D1 a CP43 PSII. Tito autoři tak spekulují o možnosti, že se CYP38 účastní skládání PSII (skládání a vazba D1 a CP43). Sirpiö et al. (2008) dále uvádějí, že mutant *cyp38* vykazoval značné snížení vývoje kyslíku při vysoké ozářenosti. To vedlo Wang et al. (2015) k jejich testům, kdy zjistili značný pokles maximálního kvantového výtěžku PSII (F_v/F_m) při vysoké ozářenosti (trvajících 3 dny). Z výsledků pokusů, kdy vzrostla exprese CYP38 při nadměrném osvitě, autoři vyvozují, že CYP38 může hrát roli v ochraně rostliny při fotoinhibici. U *cyp38* mutantů totiž dochází k vyšší úrovni poškození D1 proteinu, než je tomu u WT rostlin (Wang et al. 2015). Při porovnání *psbo1* a *cyp38* mutantů lze vidět podobnost jejich fenotypů (světle zelené listy a malý vzrůst oproti WT; Lundin et al. 2007; Wang et al. 2015). Avšak při porovnání jejich tolerance na vysokou ozářenost zjistíme, že *psbo1* mutant má míru této tolerance vyšší (přibližně srovnatelnou s WT; Lundin et al. 2007). Pro zjištění vztahu PsbO2 k CYP38 použili Wang et al. (2015) cyklosporin A (CsA; Steinmann et al. 1991). Ten funguje jako obecný inhibitor cyklofilinů (CYPs - jedna ze dvou podskupin imunofilinů; He et al. 2004). Z výsledků vyplynulo, že rostliny ošetřené CsA a vystavené vysoké ozářenosti měly značně zvýšenou produkci PsbO2 oproti rostlinám neošetřeným pomocí CsA, zatímco změna v úrovni transkripce PsbO1 byla při těchto podmínkách minimální. To ovšem nemusí znamenat, že inhibice CYP38 za pomoci CsA, spolu s vysokou ozářeností, způsobily tuto změnu v míře exprese PsbO proteinů, jelikož Wang et al. (2015) o tom nepodávají dostačující důkazy (problém s CsA jako obecným inhibitorem CYPs).

Byly to tedy rostliny s *psbo1* mutací oproti *psbo2* a WT, které vykazovaly vyšší GTPázovou aktivitu PsbO proteinu při vystavení zvýšenému osvitě a CsA (míra aktivity byla založena na relativním obsahu chlorofylu, který je v *psbo1* mutantu snížený). Jde tak o potvrzení výzkumu Lundin et al. (2007) o vyšší GTPázové aktivitě PsbO2. Další pokusy Wang et al. (2015) spočívaly v porovnání míry exprese PsbO2 v mutantu *cyp38*, WT a *cyp38-C* (komplementovaný mutant). Experimenty ukázaly, že exprese PsbO2 byla u *cyp38* vyšší, než u *cyp38-C* a WT. Rozdíl byl ještě markantnější, pokud se rostliny daly pod vysoce intenzivní světlo. Z těchto výsledků autoři usuzují, že CYP38 je inhibitorem GTPázové aktivity PsbO, a to především PsbO2. Výsledkem inhibice PsbO2 pomocí CYP38 tak může být dle Wang et al. (2015) snížení defosforylace D1 proteinu při vysokém osvitě, což by mohlo zvýšit

jeho stabilitu (nedocházelo by tak k jeho degradaci). K následné degradaci by pak mohlo dojít při nízkém osvitu, kdy, jak autoři uvádí, je hladina exprese CYP38 snížena a inhibiční efekt na PsbO2 částečně opadne.

O onom mechanismu výměny D1 proteinu spekulují bez experimentálních podkladů ve své práci i Duchoslav a Fischer (2015). Tito autoři přichází s možností, jak by mohl fungovat mechanismus výměny D1 proteinu za účasti PsbO2. Díky poničením D1 proteinu a Mn₄CaO₅ klastru se spustí GTPázová aktivita PsbO. Tím se změní konformace β1-β2 smyčky, kterážto interaguje s druhým monomerm PSII dimeru (De Las Rivas a Barber 2004), čímž by se mohl monomer uvolnit z vazby. Takto uvolněný monomer by mohl přejít do stromatální lamely, kde by se PsbO protein díky změně GTPázové aktivity uvolnil (Aro et al. 2005). Následně by se odboural poškozený D1 protein a nasyntetizoval by se nový. Poté by se mohl PsbO opět připojit k PSII monomeru a ten by se vrátil zpět (Duchoslav a Fischer 2015).

PsbO a posttranslační modifikace

Jednou z posttranslačních modifikací PsbO je nitrace (přidání NO₂). Tou se u *Arabidopsis* zabývali Takahashi et al. (2017). Autoři uvádějí, že nitrace byla spuštěna běžnou ozářeností v průběhu osmi hodin při vystavení rostlin 40 ppm NO₂. Tyto podmínky vyvolaly selektivní nitraci PsbO1, PsbO2, PsbP1 a ještě dalších čtyř proteinů nepatřících do PSII (avšak více jak 80 % připadlo na první tři jmenované; Takahashi et al. 2015). Nitrací se týkala výhradně tyrosinových zbytků těchto proteinů a měla za následek částečnou inhibici vývoje kyslíku. Jako místo průběhu nitrací byl určen ⁹Y (a další tyrosinové zbytky) u PsbO1 (pro PsbO2 a PsbP1 byly tyrosinové zbytky zjištěny pouze na základě počítačové simulace; Takahashi et al. 2017). Takahashi et al. (2016) přichází se zajímavou, leč značně nepravděpodobnou domněnkou. Tvrdí, že ⁹Y PsbO1 by se mohl účastnit elektron-transportního řetězce podobně, jako Y₂ proteinu D1. Své tvrzení autoři zakládají na pokusech, kdy zjistili, že při užití inhibitorů elektron-transportního řetězce (jako jsou DCMU, tedy 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, či azid sodný) nedošlo k redoxní reakci na tyrosinovém zbytku. Nevznikl tak tyrosylový radikál a nemohlo tudíž dojít k nitraci, jež vyžaduje fotooxidaci daného zbytku ke svému průběhu (Takahashi et al. 2016). Je zde však několik problémů. První z nich přináší nové poznatky o PSII rostlin (Su et al. 2017), kde byla vzdálenost PsbO ⁹Y od OEC vypočtena na 36,1 Å (Takahashi a Morikawa 2018). Dle těchto autorů je to příliš velká vzdálenost, aby mohlo dojít k přímé interakci. Ovšem práce Morita a Kimura (2003) naznačují teoretickou možnost tohoto přenosu. Druhým úskalím práce je, že autoři prováděli pokusy při koncentraci 40 ppm NO₂, přičemž běžná koncentrace je 10-50 ppb. Při běžné koncentraci funguje NO₂ jako stimulant růstu rostlin (Takahashi a Morikawa 2014). Předpokládá se u něj signalizační funkce (Takahashi a Morikawa 2014). Inhibiční funkce,

kteřou tedy NO₂ vykazoval, tak mohla být dle autorů způsobena 1000násobnou koncentrací oproti normálu.

Další posttranslační modifikace, která je spojována s PsbO je SUMOylace. SUMO, neboli “small ubiquitin-related modifier” je protein, který se dle Novatchkova et al. (2004) účastní řady odpovědí organismu na vnější podněty a dalších dějů. Jeho funkce spočívá v posttranslační modifikaci daného substrátu (López-Torrejón et al. 2013). Při svém proteomickém výzkumu cílů SUMO López-Torrejón et al. (2013) zjistili, že jedním z oněch cílů je mimo jiné PsbO. Použili k tomu 2-D-LC-IB metodu (2D-kapalná chromatografie kombinovaná s imunoblotováním), avšak díky vysoké homologii PsbO izoforem nebyli schopni určit, zda jde o interakci s PsbO1 či PsbO2. Autoři také poukazují na to, že k SUMOylaci pravděpodobně došlo již v cytoplasmě, protože SUMOylační mechanismus nebyl nalezen ani v chloroplastu, ani v mitochondrii. Bohužel, López-Torrejón et al. (2013) nepodávají žádné konkrétní informace o funkci SUMOylace u PsbO proteinů.

PsbO a skládání gran

Již v úvodu se zmiňuji o tom, že grana jsou sloupečkovité struktury tylakoidních membrán, které jsou naskládány na sebe. Tímto složením se tak k sobě dostávají dvě luminální strany tylakoidních membrán a Anderson, Chow a De Las Rivas (2008) již dříve přišli s hypotézou, že by spolu v granech mohly interagovat PSII z protějších membrán (přes luminální mezeru). Spojení by mohlo být zajištěno prostřednictvím vnějších proteinů včetně PsbO. Jako vysvětlení mechanismu se nabízí možnost, že nabitě AK na povrchu PsbO ovlivňují elektrické interakce při skládání (stackingu) gran. Spuštění skládání do gran tak může být ovlivněno poklesem negativního náboje na povrchu PsbO, když vlivem aktivity fotosyntézy dochází k tvorbě protonového kanálu (jehož je PsbO součástí) a přenosu kladného náboje (del Val a Bondar 2017).

Úloha PsbO v degradaci chloroplastu

Pro degradaci chloroplastů či jejich proteinů existuje několik možností. Nejrozsáhlejší je autofagie (Izumi et al. 2010). Avšak autofagii můžeme najít v nejrůznějších buněčných kompartmentech a při nejrůznějších příležitostech, jako senescence, napadení patogenem a stres (Liu a Bassham 2012). Další možností jsou vakuoly asociované se senescencí (SAVs - senescence-associated vacuoles), kteréžto mají vlastní lytický aparát (Martínez et al. 2008). S třetím způsobem, jak degradovat chloroplasty přichází Wang a Blumwald (2014). Ti popisují jimi objevený gen CV (chloroplast vesiculation). Z něj exprimovaný protein cílí na chloroplasty, kde následně indukuje degradaci a tvorbu vezikulů, jež přednostně obsahují tylakoidní proteiny. Vznikají tak CCVs (CV-containing vesicles), které putují do vakuoly k degradaci. Wang a Blumwald (2014) na základě

výsledků koimunoprecipitace⁴ (co-IP) a následné kapalné chromatografie a hmotnostní spektrometrie zjistili možnou vazbu obou izoform PsbO na CV protein (prováděno na *Arabidopsis thaliana*). Pro potvrzení autoři použili BiFC (bimolekulární fluorescenční komplementace), kdy odhalili, že PsbO1 a CV skutečně interagují (zjištěno *in vivo*). Další pokusy ukázaly, že CV interaguje i s PsbO2 či CP43 a D1. Přímo v rostlině huseníčku pak autoři podnikli experimenty s fluorescenčně značenými proteiny. Bez exprimovaného CV byl značený PsbO1 pozorován rovnoměrně napříč chloroplastem. Při expresi CV došlo k překryvu fluorescenčních signálů na CCVs, což znamená, že se PsbO1 kumuloval v těchto strukturách. Z těchto pozorování tak autoři usuzují, že přímá interakce CV s PsbO by mohla vést k disociaci tohoto proteinu z PSII. Tím by došlo k destabilizaci PSII, čímž by se umožnil lepší přístup do RC PSII pro proteázy, a tedy degradaci tohoto komplexu. Ve starších pracích (Henmi et al. 2003; Yamamoto et al. 1998) bylo pozorováno shlukování podjednotek PSII (hlavně D1 a CP43), ve kterém nebyl přítomen PsbO. Wang a Blumwald (2014) naznačují, že toto shlukování by mohlo být signálem, který by mohl spustit tvorbu CCVs. Své tvrzení podkládají studií Jang et al. (2013), v níž její autoři popisují způsob, kterým mozaikový virus *Alternanthera* ničí rostliny tabáku. Tento virus obsahuje protein, který interaguje obdobně jako CV s PsbO a způsobuje tak mimo jiné vezikulaci chloroplastů.

Zajímavé poznatky při svém výzkumu Wang a Blumwald (2014) pozorovali, když CV umlčené rostliny podrobili stresovým testům. Při oxidativním stresu, zasolení a suchu tyto rostliny prokázaly vyšší stabilitu chloroplastu a nedocházelo tak k předčasnému stárnutí. Zde se nabízí porovnání s pracemi Gururani et al. (2012, 2013), které jsem rozebíral v odstavci o vztahu PsbO ke stresu. Z výsledků vyplynulo, že rostliny s menším obsahem PsbO různé stresy snášejí lépe. Závěr Gururani et al. (2012, 2013) jde tedy proti závěru Wang a Blumwald (2014), jelikož CV protein by měl právě koncentraci PsbO snižovat, avšak CV umlčené rostliny vykazují lepší snášenlivost ke stresu. Tento rozpor tak jistě poskytuje námět k dalšímu výzkumu.

⁴ Jde o metodu, kdy k lyzátu buňky přidáme protilátky proti hledanému proteinu, a pak je pomocí sekundární protilátky precipitujeme na médium, z kterého pak lze centrifugací precipitát získat (Xu et al. 2019).

Seznam literatury

- Ago, Hideo, Hideyuki Adachi, Yasufumi Umena, Takayoshi Tashiro, Keisuke Kawakami, Nobuo Kamiya, Lirong Tian, Guangye Han, Tingyun Kuang, Zheyi Liu, Fangjun Wang, Hanfa Zou, Isao Enami, Masashi Miyano, a Jian-Ren Shen. 2016. „Novel Features of Eukaryotic Photosystem II Revealed by Its Crystal Structure Analysis from a Red Alga". *Journal of Biological Chemistry* 291(11):5676–87.
- Allahverdiyeva, Yagut, Fikret Mamedov, Maija Holmström, Markus Nurmi, Björn Lundin, Stenbjörn Styring, Cornelia Spetea, a Eva-Mari Aro. 2009. „Comparison of the Electron Transport Properties of the Psbo1 and Psbo2 Mutants of Arabidopsis Thaliana". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787(10):1230–37.
- Allahverdiyeva, Yagut, Marjaana Suorsa, Fabio Rossi, Andrea Pavesi, Martin M. Kater, Alessia Antonacci, Luca Tadini, Mathias Pribil, Anja Schneider, Gerhard Wanner, Dario Leister, Eva-Mari Aro, Roberto Barbato, a Paolo Pesaresi. 2013. „Arabidopsis Plants Lacking PsbQ and PsbR Subunits of the Oxygen-Evolving Complex Show Altered PSII Super-Complex Organization and Short-Term Adaptive Mechanisms". *The Plant Journal* 75(4):671–84.
- Anderson, Jan M., Wah Soon Chow, a Javier De Las Rivas. 2008. „Dynamic Flexibility in the Structure and Function of Photosystem II in Higher Plant Thylakoid Membranes: The Grana Enigma". *Photosynthesis Research* 98(1–3):575–87.
- Aro, E. M., M. Suorsa, A. Rokka, Y. Allahverdiyeva, V. Paakkarinen, A. Saleem, N. Battchikova, a E. Rintamäki. 2005. „Dynamics of Photosystem II: A Proteomic Approach to Thylakoid Protein Complexes". *Journal of Experimental Botany* 56(411):347–56.
- Balsera, Mónica, Juan B. Arellano, José L. Revuelta, Javier de las Rivas, a Juan A. Hermoso. 2005. „The 1.49Å 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(5):1051–60.
- Barber, James. 2017. „A Mechanism for Water Splitting and Oxygen Production in Photosynthesis". *Nature Plants* 3(4).
- Bentley, Fiona K. a Julian J. Eaton-Rye. 2008. „The Effect of Removing Photosystem II Extrinsic Proteins on Dimer Formation and Recovery from Photodamage in Synechocystis Sp. PCC 6803". S. 715–17 in *Photosynthesis. Energy from the Sun*, editoval J. F. Allen, E. Gantt, J. H. Golbeck, a B. Osmond. Springer Netherlands.
- Betterle, Nico, Roshan Sharma Poudyal, Anthony Rosa, Guangxi Wu, Roberto Bassi, a Choon-Hwan Lee. 2017. „The STN8 Kinase-PBCP Phosphatase System Is Responsible for High-Light-Induced Reversible Phosphorylation of the PSII Inner Antenna Subunit CP29 in Rice". *The Plant Journal* 89(4):681–91.
- Bommer, Martin, Leighton Coates, Holger Dau, Athina Zouni, a Holger Dobbek. 2017. „Protein crystallization and initial neutron diffraction studies of the photosystem II subunit PsbO". *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 73(9):525–31.
- Boussac, Alain, Naoko Ishida, Miwa Sugiura, a Fabrice Rappaport. 2012. „Probing the role of chloride in Photosystem II from Thermosynechococcus elongatus by exchanging chloride for iodide". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817(5):802–10.
- Boussac, Alain, Jean Luc Zimmermann, a A. William Rutherford. 1989. „EPR Signals from Modified Charge Accumulation States of the Oxygen-Evolving Enzyme in Calcium-Deficient Photosystem II". *Biochemistry* 28(23):8984–89.
- Bricker, Terry M. 1992. „Oxygen Evolution in the Absence of the 33-Kilodalton Manganese-Stabilizing Protein". *Biochemistry* 31(19):4623–28.
- Bricker, Terry M. a Robert L. Burnap. 2005. „The Extrinsic Proteins of Photosystem II". S. 95–120 in *Photosystem II*. Roč. 22, editoval T. J. Wydrzynski, K. Satoh, a J. A. Freeman. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bricker, Terry M., Johnna L. Roose, Robert D. Fagerlund, Laurie K. Frankel, a Julian J. Eaton-Rye. 2012. „The Extrinsic Proteins of Photosystem II". *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*

1817(1):121–42.

- Bricker, Terry M., Johnna L. Roose, Pengpeng Zhang, a Laurie K. Frankel. 2013. „The PsbP Family of Proteins". *Photosynthesis Research* 116(2–3):235–50.
- Brzezinski, Peter a Pia Ädelroth. 2006. „Design Principles of Proton-Pumping Haem-Copper Oxidases". *Current Opinion in Structural Biology* 16(4):465–72.
- Burnap, Robert L. a Louis A. Sherman. 1991. „Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 indicates that the manganese-stabilizing protein of photosystem II is not essential for oxygen evolution". *Biochemistry* 30(2):440–46.
- Cramer, William A., S. Saif Hasan, a Eiki Yamashita. 2011. „The Q cycle of cytochrome bc complexes: A structure perspective". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807(7):788–802.
- De Las Rivas, J. a J. Barber. 2004. „Analysis of the Structure of the PsbO Protein and Its Implications". *Photosynthesis Research* 81(3):329–43.
- De Las Rivas, Javier, Mónica Balsera, a James Barber. 2004. „Evolution of Oxygenic Photosynthesis: Genome-Wide Analysis of the OEC Extrinsic Proteins". *Trends in Plant Science* 9(1):18–25.
- Duchoslav, Milos a Lukas Fischer. 2015. „Parallel Subfunctionalisation of PsbO Protein Isoforms in Angiosperms Revealed by Phylogenetic Analysis and Mapping of Sequence Variability onto Protein Structure". *Bmc Plant Biology* 15:133.
- Dwyer, Simon A., Wah Soon Chow, Wataru Yamori, John R. Evans, Sarah Kaines, Murray R. Badger, a Susanne von Caemmerer. 2012. „Antisense Reductions in the PsbO Protein of Photosystem II Leads to Decreased Quantum Yield but Similar Maximal Photosynthetic Rates". *Journal of Experimental Botany* 63(13):4781–95.
- Fedorov, Vladimir A., Ilya B. Kovalenko, Sergei S. Khruschev, Dmitry M. Ustinin, Taras K. Antal, Galina Y. Riznichenko, a Andrei B. Rubin. 2019. „Comparative analysis of plastocyanin–cytochrome f complex formation in higher plants, green algae and cyanobacteria". *Physiologia Plantarum* 166(1):320–35.
- Ferreira, K. N., T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, a S. Iwata. 2004. „Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center". *Science* 303(5665):1831–38.
- Fulgosi, H., A. V. Vener, L. Altschmied, R. G. Herrmann, a B. Andersson. 1998. „A Novel Multi-Functional Chloroplast Protein: Identification of a 40 KDa Immunophilin-like Protein Located in the Thylakoid Lumen". *The EMBO Journal* 17(6):1577–87.
- Gabdulkhakov, Azat, Albert Guskov, Matthias Broser, Jan Kern, Frank Müh, Wolfram Saenger, a Athina Zouni. 2009. „Probing the Accessibility of the Mn₄Ca Cluster in Photosystem II: Channels Calculation, Noble Gas Derivatization, and Cococrystallization with DMSO". *Structure* 17(9):1223–34.
- Gao, Jinlan, Hao Wang, Qipeng Yuan, a Yue Feng. 2018. „Structure and Function of the Photosystem Supercomplexes". *Frontiers in Plant Science* 9.
- Gururani, Mayank Anand, Chandrama Prakash Upadhyaya, Reto J. Strasser, Yu Jae Woong, a Se Won Park. 2012. „Physiological and Biochemical Responses of Transgenic Potato Plants with Altered Expression of PSII Manganese Stabilizing Protein". *Plant Physiology and Biochemistry* 58:182–94.
- Gururani, Mayank Anand, Chandrama Prakash Upadhyaya, Reto J. Strasser, Jae Woong Yu, a Se Won Park. 2013. „Evaluation of Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Potato Plants with Reduced Expression of PSII Manganese Stabilizing Protein". *Plant Science* 198:7–16.
- Guskov, Albert, Jan Kern, Azat Gabdulkhakov, Matthias Broser, Athina Zouni, a Wolfram Saenger. 2009. „Cyanobacterial Photosystem II at 2.9-Å Resolution and the Role of Quinones, Lipids, Channels and Chloride". *Nature Structural & Molecular Biology* 16(3):334–42.
- Hall, Michael, Thomas Kieselbach, Uwe H. Sauer, a Wolfgang P. Schröder. 2012. „Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of PPD6, a PsbP-domain protein from *Arabidopsis thaliana*". *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* 68(3):278–80.
- Hall, Michael, Alejandro Mata-Cabana, Hans-Erik Åkerlund, Francisco J. Florencio, Wolfgang P.

- Schröder, Marika Lindahl, a Thomas Kieselbach. 2010. „Thioredoxin Targets of the Plant Chloroplast Lumen and Their Implications for Plastid Function". *PROTEOMICS NA-NA*.
- He, Zengyong, Legong Li, a Sheng Luan. 2004. „Immunophilins and Parvulins. Superfamily of Peptidyl Prolyl Isomerases in Arabidopsis". *Plant Physiology* 134(4):1248–67.
- Henmi, Takahiro, Hitoshi Yamasaki, Shinsuke Sakuma, Yuka Tomokawa, Noriaki Tamura, Jian-Ren Shen, a Yasusi Yamamoto. 2003. „Dynamic Interaction between the D1 Protein, CP43 and OEC33 at the Lumenal Side of Photosystem II in Spinach Chloroplasts: Evidence from Light-Induced Cross-Linking of the Proteins in the Donor-Side Photoinhibition". *Plant & Cell Physiology* 44(4):451–56.
- Chen, Yang-Er, Shu Yuan, Lina Lezhneva, Jörg Meurer, Serena Schwenkert, Fikret Mamedov, a Wolfgang P. Schröder. 2019. „The Low Molecular Mass Photosystem II Protein PsbTn Is Important for Light Acclimation". *Plant Physiology* 179(4):1739–53.
- Ido, Kunio, Kentaro Ifuku, Yumiko Yamamoto, Seiko Ishihara, Akio Murakami, Keiji Takabe, Chikahiro Miyake, a Fumihiko Sato. 2009. „Knockdown of the PsbP protein does not prevent assembly of the dimeric PSII core complex but impairs accumulation of photosystem II supercomplexes in tobacco". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787(7):873–81.
- Ido, Kunio, Shusuke Kakiuchi, Chihiro Uno, Taishi Nishimura, Yoichiro Fukao, Takumi Noguchi, Fumihiko Sato, a Kentaro Ifuku. 2012. „The Conserved His-144 in the PsbP Protein Is Important for the Interaction between the PsbP N-Terminus and the Cyt *b*₅₅₉ Subunit of Photosystem II". *Journal of Biological Chemistry* 287(31):26377–87.
- Ido, Kunio, Jon Nield, Yoichiro Fukao, Taishi Nishimura, Fumihiko Sato, a Kentaro Ifuku. 2014. „Cross-Linking Evidence for Multiple Interactions of the PsbP and PsbQ Proteins in a Higher Plant Photosystem II Supercomplex". *Journal of Biological Chemistry* 289(29):20150–57.
- Ifuku, Kentaro. 2014. „The PsbP and PsbQ Family Proteins in the Photosynthetic Machinery of Chloroplasts". *Plant Physiology and Biochemistry* 81:108–14.
- Ifuku, Kentaro. 2015. „Localization and Functional Characterization of the Extrinsic Subunits of Photosystem II: An Update". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79(8):1223–31.
- Ifuku, Kentaro, Seiko Ishihara, a Fumihiko Sato. 2010. „Molecular Functions of Oxygen-Evolving Complex Family Proteins in Photosynthetic Electron Flow". *Journal of Integrative Plant Biology* 52(8):723–34.
- Inoue, Hitoshi, Ming Li, a Danny J. Schnell. 2013. „An Essential Role for Chloroplast Heat Shock Protein 90 (Hsp90C) in Protein Import into Chloroplasts". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(8):3173–78.
- Izumi, Masanori, Shinya Wada, Amane Makino, a Hiroyuki Ishida. 2010. „The Autophagic Degradation of Chloroplasts via Rubisco-Containing Bodies Is Specifically Linked to Leaf Carbon Status but Not Nitrogen Status in Arabidopsis". *Plant Physiology* 154(3):1196–1209.
- Jang, Chanyong, Eun-Young Seo, Jiryun Nam, Hanhong Bae, Yeong Guk Gim, Hong Gi Kim, In Sook Cho, Zee-Won Lee, Gary R. Bauchan, John Hammond, a Hyoun-Sub Lim. 2013. „Insights into Alternanthera Mosaic Virus TGB3 Functions: Interactions with Nicotiana Benthamiana PsbO Correlate with Chloroplast Vesiculation and Veinal Necrosis Caused by TGB3 Over-Expression". *Frontiers in Plant Science* 4:5.
- Jiang, Tim, Edward Saehong Oh, Diana Bonea, a Rongmin Zhao. 2017. „HSP90C Interacts with PsbO1 and Facilitates Its Thylakoid Distribution from Chloroplast Stroma in Arabidopsis". *PLOS ONE* 12(12):e0190168.
- Johnson, Giles N. 2011. „Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807(3):384–89.
- Junge, Wolfgang. 2019. „Oxygenic Photosynthesis: History, Status and Perspective". *Quarterly Reviews of Biophysics* 52.
- Kakiuchi, Shusuke, Chihiro Uno, Kunio Ido, Taishi Nishimura, Takumi Noguchi, Kentaro Ifuku, a Fumihiko Sato. 2012. „The PsbQ Protein Stabilizes the Functional Binding of the PsbP Protein to Photosystem II in Higher Plants". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817(8):1346–51.

- Karamoko, Mohamed, Sara Cline, Kevin Redding, Natividad Ruiz, a Patrice P. Hamel. 2011. „Lumen Thiol Oxidoreductase1, a Disulfide Bond-Forming Catalyst, Is Required for the Assembly of Photosystem II in Arabidopsis". *The Plant Cell* 23(12):4462–75.
- Kawakami, K., Y. Umena, N. Kamiya, a J. R. Shen. 2009. „Location of Chloride and Its Possible Functions in Oxygen-Evolving Photosystem II Revealed by X-Ray Crystallography". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(21):8567–72.
- Knoppová, Jana, Jianfeng Yu, Peter Konik, Peter J. Nixon, a Josef Komenda. 2016. „CyanoP Is Involved in the Early Steps of Photosystem II Assembly in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803". *Plant and Cell Physiology* 57(9):1921–31.
- Kuhn, Matthias G. a Wim F. J. Vermaas. 1993. „Deletion Mutations in a Long Hydrophilic Loop in the Photosystem II Chlorophyll-Binding Protein CP43 in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803". *Plant Molecular Biology* 23(1):123–33.
- Lawrence, Michael S., Kevin J. Phillips, a David R. Liu. 2007. „Supercharging Proteins Can Impart Unusual Resilience". *Journal of the American Chemical Society* 129(33):10110–12.
- Liu, Jun, Huixia Yang, Qingtao Lu, Xiaogang Wen, Fan Chen, Lianwei Peng, Lixin Zhang, a Congming Lu. 2012. „PSBP-DOMAIN PROTEIN1, a Nuclear-Encoded Thylakoid Lumenal Protein, Is Essential for Photosystem I Assembly in Arabidopsis". *The Plant Cell* 24(12):4992–5006.
- Liu, Yimo a Diane C. Bassham. 2012. „Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells". *Annual Review of Plant Biology* 63:215–37.
- Loll, Bernhard, Jan Kern, Wolfram Saenger, Athina Zouni, a Jacek Biesiadka. 2005. „Towards Complete Cofactor Arrangement in the 3.0 Å Resolution Structure of Photosystem II". *Nature* 438(7070):1040–44.
- López-Torrejón, Gema, Davide Guerra, Rafael Catalá, Julio Salinas, a Juan C. del Pozo. 2013. „Identification of SUMO Targets by a Novel Proteomic Approach in Plants". *Journal of Integrative Plant Biology* 55(1):96–107.
- Lundin, Björn, Maria Hansson, Benoît Schoefs, Alexander V. Vener, a Cornelia Spetea. 2007. „The Arabidopsis PsbO2 Protein Regulates Dephosphorylation and Turnover of the Photosystem II Reaction Centre D1 Protein". *The Plant Journal* 49(3):528–39.
- Lundin, Björn, Markus Nurmi, Marc Rojas-Stuetz, Eva-Mari Aro, Iwona Adamska, a Cornelia Spetea. 2008. „Towards Understanding the Functional Difference between the Two PsbO Isoforms in Arabidopsis Thaliana—Insights from Phenotypic Analyses of Psbo Knockout Mutants". *Photosynthesis Research* 98(1–3):405–14.
- Mareš, Jan, Otakar Strunecký, Lenka Bučinská, a Jana Wiedermannová. 2019. „Evolutionary Patterns of Thylakoid Architecture in Cyanobacteria". *Frontiers in Microbiology* 10.
- Martínez, Dana E., María L. Costa, Facundo M. Gomez, Marisa S. Otegui, a Juan J. Guiamet. 2008. „‘Senescence-Associated Vacuoles’ Are Involved in the Degradation of Chloroplast Proteins in Tobacco Leaves: ‘Senescence-Associated Vacuoles’ and Protein Degradation". *The Plant Journal* 56(2):196–206.
- McFadden, Geoffrey Ian. 1999. „Endosymbiosis and Evolution of the Plant Cell". *Current Opinion in Plant Biology* 2(6):513–19.
- Miyao, Mitsue a Norio Murata. 1984. „Role of the 33-KDa Polypeptide in Preserving Mn in the Photosynthetic Oxygen-Evolution System and Its Replacement by Chloride Ions". *FEBS Letters* 170(2):350–54.
- Morita, Tomoyuki a Shunsaku Kimura. 2003. „Long-Range Electron Transfer over 4 Nm Governed by an Inelastic Hopping Mechanism in Self-Assembled Monolayers of Helical Peptides". *Journal of the American Chemical Society* 125(29):8732–33.
- Motoki, Akihiro, Mina Usui, Tsuneo Shimazu, Masahiko Hirano, a Sakae Katoh. 2002. „A Domain of the Manganese-Stabilizing Protein From *Synechococcus Elongatus* Involved in Functional Binding to Photosystem II". *Journal of Biological Chemistry* 277(17):14747–56.
- Mummadiseti, Manjula P., Laurie K. Frankel, Henry D. Bellamy, Larry Sallans, Jost S. Goettert, Michal Brylinski, a Terry M. Bricker. 2016. „Use of Protein Cross-Linking and Radiolytic Labeling To Elucidate the Structure of PsbO within Higher-Plant Photosystem II". *Biochemistry*

- 55(23):3204–13.
- Murakami, Reiko, Kentaro Ifuku, Atsushi Takabayashi, Toshiharu Shikanai, Tsuyoshi Endo, a Fumihiko Sato. 2002. „Characterization of an Arabidopsis thaliana mutant with impaired psbO, one of two genes encoding extrinsic 33-kDa proteins in photosystem II". *FEBS Letters* 523(1):138–42.
- Murakami, Reiko, Kentaro Ifuku, Atsushi Takabayashi, Toshiharu Shikanai, Tsuyoshi Endo, a Fumihiko Sato. 2005. „Functional Dissection of Two Arabidopsis PsbO Proteins: PsbO1 and PsbO2". *The FEBS Journal* 272(9):2165–75.
- Nield, Jon a James Barber. 2006. „Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757(5):353–61.
- Nilsson, Håkan, Laurent Cournac, Fabrice Rappaport, Johannes Messinger, a Jérôme Lavergne. 2016. „Estimation of the Driving Force for Dioxygen Formation in Photosynthesis". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857(1):23–33.
- Nishimura, Taishi, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Jon Nield, Fumihiko Sato, a Kentaro Ifuku. 2016. „The N-Terminal Sequence of the Extrinsic PsbP Protein Modulates the Redox Potential of Cyt B559 in Photosystem II". *Scientific Reports* 6(1):21490.
- Offenbacher, Adam R., Brandon C. Polander, a Bridgette A. Barry. 2013. „An Intrinsically Disordered Photosystem II Subunit, PsbO, Provides a Structural Template and a Sensor of the Hydrogen-Bonding Network in Photosynthetic Water Oxidation". *Journal of Biological Chemistry* 288(40):29056–68.
- Oh, Saehong E., Christine Yeung, Rebecca Babaei-Rad, a Rongmin Zhao. 2014. „Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in Arabidopsis". *BMC Research Notes* 7(1):643.
- Ono, Taka-aki a Yorinao Inoue. 1985. „S-state turnover in the O₂-evolving system of CaCl₂-washed Photosystem II particles depleted of three peripheral proteins as measured by thermoluminescence. Removal of 33 kDa protein inhibits S₃ to S₄ transition". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 806(3):331–40.
- Parvaiz, A. a S. Satyawati. 2008. „Salt Stress and Phyto-Biochemical Responses of Plants – a Review". *Plant, Soil and Environment* 54(No. 3):89–99.
- Pawłowicz, Izabela, Arkadiusz Kosmala, a Marcin Rapacz. 2012. „Expression Pattern of the PsbO Gene and Its Involvement in Acclimation of the Photosynthetic Apparatus during Abiotic Stresses in Festuca Arundinacea and F. Pratensis". *Acta Physiologiae Plantarum* 34(5):1915–24.
- Perez-Bueno, M. L., M. Baron, a I. Garcia-Luque. 2011. „PsbO, PsbP, and PsbQ of Photosystem II Are Encoded by Gene Families in Nicotiana Benthamiana. Structure and Functionality of Their Isoforms". *Photosynthetica* 49(4):573–80.
- Polander, Brandon C. a Bridgette A. Barry. 2012. „A hydrogen-bonding network plays a catalytic role in photosynthetic oxygen evolution". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16):6112–17.
- Popelkova, Hana, Michael M. Im, John D’Auria, Scott D. Betts, Nikos Lydakis-Simantiris, a Charles F. Yocum. 2002. „N-Terminus of the Photosystem II Manganese Stabilizing Protein: Effects of Sequence Elongation and Truncation^{††}". *Biochemistry* 41(8):2702–11.
- Popelkova, Hana, Michael M. Im, a Charles F. Yocum. 2002. „N-Terminal Truncations of Manganese Stabilizing Protein Identify Two Amino Acid Sequences Required for Binding of the Eukaryotic Protein to Photosystem II and Reveal the Absence of One Binding-Related Sequence in Cyanobacteria^{††}". *Biochemistry* 41(31):10038–45.
- Popelkova, Hana a Charles F. Yocum. 2011. „PsbO, the Manganese-Stabilizing Protein: Analysis of the Structure–Function Relations That Provide Insights into Its Role in Photosystem II". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104(1–2):179–90.
- Rivalta, Ivan, Muhamed Amin, Sandra Luber, Serguei Vassiliev, Ravi Pokhrel, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen, Nobuo Kamiya, Doug Bruce, Gary W. Brudvig, M. R. Gunner, a Victor S. Batista. 2011. „Structural/Functional Role of Chloride in Photosystem II". *Biochemistry* 50(29):6312–15.

- Roberts, Irma N., Xuan Tam Lam, Helder Miranda, Thomas Kieselbach, a Christiane Funk. 2012. „Degradation of PsbO by the Deg Protease HhoA Is Thioredoxin Dependent" editoval F. Börnke. *PLoS ONE* 7(9):e45713.
- Roitsch, T. a R. Ehneß. 2000. „Regulation of Source/Sink Relations by Cytokinins". *Plant Growth Regulation* 32(2–3):359–67.
- Romano, Patrick, Julie Gray, Peter Horton, a Sheng Luan. 2005. „Plant Immunophilins: Functional Versatility beyond Protein Maturation". *The New Phytologist* 166(3):753–69.
- Roose, Johnna L., Laurie K. Frankel, a Terry M. Bricker. 2011. „Developmental Defects in Mutants of the PsbP Domain Protein 5 in Arabidopsis Thaliana" editoval D. E. Somers. *PLoS ONE* 6(12):e28624.
- Roose, Johnna L., Laurie K. Frankel, Manjula P. Mummadisetti, a Terry M. Bricker. 2016. „The Extrinsic Proteins of Photosystem II: Update". *Planta* 243(4):889–908.
- Sasi, Shina, Jelli Venkatesh, Rawya Fatohllah Daneshi, a Mayank Anand Gururani. 2018. „Photosystem II Extrinsic Proteins and Their Putative Role in Abiotic Stress Tolerance in Higher Plants". *Plants* 7(4):100.
- Shamsipur, Mojtaba a Afshin Pashabadi. 2018. „Latest advances in PSII features and mechanism of water oxidation". *Coordination Chemistry Reviews* 374:153–72.
- Sheptovitsky, Yelena G. a Gary W. Brudvig. 1996. „Isolation and Characterization of Spinach Photosystem II Membrane-Associated Catalase and Polyphenol Oxidase ⁺". *Biochemistry* 35(50):16255–63.
- Shi, Lan-Xin, Michael Hall, Christiane Funk, a Wolfgang P. Schröder. 2012. „Photosystem II, a Growing Complex: Updates on Newly Discovered Components and Low Molecular Mass Proteins". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817(1):13–25.
- Schreiber, Stuart L. 1992. „Immunophilin-Sensitive Protein Phosphatase Action in Cell Signaling Pathways". *Cell* 70(3):365–68.
- Sirpiö, Sari, Anastassia Khrouchtchova, Yagut Allahverdiyeva, Maria Hansson, Rikard Fristedt, Alexander V. Vener, Henrik Vibe Scheller, Poul Erik Jensen, Anna Haldrup, a Eva-Mari Aro. 2008. „AtCYP38 Ensures Early Biogenesis, Correct Assembly and Sustenance of Photosystem II". *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 55(4):639–51.
- Steinmann, B., P. Bruckner, a A. Supertifurga. 1991. „Cyclosporine-a Slows Collagen Triple-Helix Formation In vivo - Indirect Evidence for a Physiological-Role of Peptidyl-Prolyl Cis-Trans-Isomerase". *Journal of Biological Chemistry* 266(2):1299–1303.
- Su, Xiaodong, Jun Ma, Xuepeng Wei, Peng Cao, Dongjie Zhu, Wenrui Chang, Zhenfeng Liu, Xinzheng Zhang, a Mei Li. 2017. „Structure and Assembly Mechanism of Plant C2S2M2-Type PSII-LHCII Supercomplex". *Science* 357(6353):815–20.
- Suga, Michihiro, Fusamichi Akita, Kunio Hirata, Go Ueno, Hironori Murakami, Yoshiki Nakajima, Tetsuya Shimizu, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Hideo Ago, a Jian-Ren Shen. 2015. „Native Structure of Photosystem II at 1.95 Å Resolution Viewed by Femtosecond X-Ray Pulses". *Nature* 517(7532):99–103.
- Suorsa, Marjaana, Fabio Rossi, Luca Tadini, Mathias Labs, Monica Colombo, Peter Jahns, Martin M. Kater, Dario Leister, Giovanni Finazzi, Eva-Mari Aro, Roberto Barbato, a Paolo Pesaresi. 2016. „PGR5-PGRL1-Dependent Cyclic Electron Transport Modulates Linear Electron Transport Rate in Arabidopsis Thaliana". *Molecular Plant* 9(2):271–88.
- Suorsa, Marjaana, Sari Sirpiö, Yagut Allahverdiyeva, Virpi Paakkarinen, Fikret Mamedov, Stenbjörn Styring, a Eva-Mari Aro. 2006. „PsbR, a Missing Link in the Assembly of the Oxygen-Evolving Complex of Plant Photosystem II". *Journal of Biological Chemistry* 281(1):145–50.
- Takahashi, Misa a Hiromichi Morikawa. 2014. „Nitrogen Dioxide Is a Positive Regulator of Plant Growth". *Plant Signaling & Behavior* 9(2):e28033.
- Takahashi, Misa a Hiromichi Morikawa. 2018. „A Novel Role for PsbO1 in Photosynthetic Electron Transport as Suggested by Its Light-Triggered Selective Nitration in Arabidopsis Thaliana". *Plant Signaling & Behavior* 13(9):e1513298.
- Takahashi, Misa, Jun Shigeto, Atsushi Sakamoto, Shunsuke Izumi, Kozi Asada, a Hiromichi Morikawa.

2015. „Dual Selective Nitration in Arabidopsis: Almost Exclusive Nitration of PsbO and PsbP, and Highly Susceptible Nitration of Four Non-PSII Proteins, Including Peroxiredoxin II E". *ELECTROPHORESIS* 36(20):2569–78.
- Takahashi, Misa, Jun Shigeto, Atsushi Sakamoto, a Hiromichi Morikawa. 2016. „Light-triggered selective nitration of PsbO1 in isolated Arabidopsis thylakoid membranes is inhibited by photosynthetic electron transport inhibitors". *Plant Signaling & Behavior* 11(12):e1263413.
- Takahashi, Misa, Jun Shigeto, Atsushi Sakamoto, a Hiromichi Morikawa. 2017. „Selective nitration of PsbO1, PsbO2, and PsbP1 decreases PSII oxygen evolution and photochemical efficiency in intact leaves of Arabidopsis". *Plant Signaling & Behavior* 12(10):e1376157.
- del Val, Coral a Ana-Nicoleta Bondar. 2017. „Charged Groups at Binding Interfaces of the PsbO Subunit of Photosystem II: A Combined Bioinformatics and Simulation Study". *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1858(6):432–41.
- Wang, Songhu a Eduardo Blumwald. 2014. „Stress-Induced Chloroplast Degradation in Arabidopsis Is Regulated via a Process Independent of Autophagy and Senescence-Associated Vacuoles". *The Plant Cell* 26(12):4875–88.
- Wang, Yongqiang, Lizhang Zeng, a Da Xing. 2015. „ROS-Mediated Enhanced Transcription of CYP38 Promotes the Plant Tolerance to High Light Stress by Suppressing GTPase Activation of PsbO2". *Frontiers in Plant Science* 6.
- Wei, Xuepeng, Xiaodong Su, Peng Cao, Xiuying Liu, Wenrui Chang, Mei Li, Xinzheng Zhang, a Zhenfeng Liu. 2016. „Structure of Spinach Photosystem II–LHCII Supercomplex at 3.2 Å Resolution". *Nature* 534(7605):69–74.
- Wincencjusz, Hanna, Hans J. van Gorkom, a Charles F. Yocum. 1997. „The Photosynthetic Oxygen Evolving Complex Requires Chloride for Its Redox State $S_2 \rightarrow S_3$ and $S_3 \rightarrow S_0$ Transitions But Not for $S_0 \rightarrow S_1$ or $S_1 \rightarrow S_2$ Transitions^{††}". *Biochemistry* 36(12):3663–70.
- Wyman, Aaron J., Hana Popelkova, a Charles F. Yocum. 2008. „Site-Directed Mutagenesis of Conserved C-Terminal Tyrosine and Tryptophan Residues of PsbO, the Photosystem II Manganese-Stabilizing Protein, Alters Its Activity and Fluorescence Properties". *Biochemistry* 47(24):6490–98.
- Wyman, Aaron J. a Charles F. Yocum. 2005. „Structure and Activity of the Photosystem II Manganese-Stabilizing Protein: Role of the Conserved Disulfide Bond". *Photosynthesis Research* 85(3):359–72.
- Yamada, M., R. Nagao, M. Iwai, Y. Arai, A. Makita, H. Ohta, a T. Tomo. 2018. „The PsbQ' protein affects the redox potential of the QA in photosystem II". *Photosynthetica* 56(1):185–91.
- Yamamoto, Yasusi, Yasuo Ishikawa, Etsuko Nakatani, Mina Yamada, Haoming Zhang, a Tom Wydrzynski. 1998. „Role of an Extrinsic 33 Kilodalton Protein of Photosystem II in the Turnover of the Reaction Center-Binding Protein D1 during Photoinhibition^{††}". *Biochemistry* 37(6):1565–74.
- Yamori, Wataru, Shunichi Takahashi, Amane Makino, G. Dean Price, Murray R. Badger, a Susanne von Caemmerer. 2011. „The Roles of ATP Synthase and the Cytochrome b6/f Complexes in Limiting Chloroplast Electron Transport and Determining Photosynthetic Capacity1[W][OA]". *Plant Physiology* 155(2):956–62.
- Yi, Xiaoping, Stefan R. Hargett, Laurie K. Frankel, a Terry M. Bricker. 2008. „The Effects of Simultaneous RNAi Suppression of PsbO and PsbP Protein Expression in Photosystem II of Arabidopsis". *Photosynthesis Research* 98(1):439.
- Yi, Xiaoping, Myriam McChargue, Susan Laborde, Laurie K. Frankel, a Terry M. Bricker. 2005. „The Manganese-Stabilizing Protein Is Required for Photosystem II Assembly/Stability and Photoautotrophy in Higher Plants". *Journal of Biological Chemistry* 280(16):16170–74.