

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra experimentální biologie rostlin



## **Úloha mangan-stabilizujícího proteinu fotosystému II**

## **The role of manganese-stabilizing protein of photosystem II**

Miloš Duchoslav

Vedoucí práce:  
RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Bakalářská práce

Praha 2010



Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Lukáše Fischera, Ph.D., kterému tímto děkuji za zodpovědné vedení. Všechny přijaté informace jsou řádně citovány.

V Praze dne 29.4.2010

Podpis:

## **Abstrakt**

Vznik oxýgenní fotosyntézy byl jedním z klíčových momentů evoluce života na Zemi. Veškerý molekulární kyslík v atmosféře pravděpodobně vznikl štěpením vody, které probíhá v centru vyvíjejícím kyslík na fotosystému II. Fotosystém II, složitý komplex mnoha proteinů a kofaktorů, jehož struktura je do velké míry fylogeneticky konzervovaná, se nachází v thylakoidních membránách chloroplastů a sinic. Ač je mechanismus fotosyntetického rozkladu vody, probíhajícího na manganovém klastru, intenzivně zkoumán, není do dnešní doby uspokojivě objasněn. Podstatný vliv na stabilizaci manganového klastru a účinnost rozkladu vody mají vnější proteiny fotosystému II nacházející se v luminu thylakoidů. Nejdůležitější z nich je mangan-stabilizující protein (MSP), který je přítomný ve všech známých oxyfototrofních organismech. V literatuře je tomuto proteinu připisováno velké množství úloh – kromě stabilizace manganového klastru například také karbonátdehydratázová aktivita, GTPázová aktivita či regulace výměny poškozeného proteinu D1. Funkce MSP jsou pravděpodobně řízeny změnami v jeho dynamické struktuře. MSP se pravděpodobně podílí na regulaci fotosyntézy za různých vnějších a vnitřních podmínek. Předložená práce shrnuje současné znalosti o struktuře a funkcích MSP a rozdílech dvou izoform MSP v některých vyšších rostlinách.

### **Klíčová slova**

fotosyntéza, fotosystém II, mangan-stabilizující protein, MSP, PsbO, rozklad vody, vývoj kyslíku

## **Abstract**

The appearance of oxygenic photosynthesis was a key event in the evolution of life on the Earth. All molecular oxygen in the atmosphere likely comes from a water-splitting reaction catalysed by the oxygen-evolving center of photosystem II. Photosystem II – a multisubunit protein-cofactor complex with a phylogenetically highly conserved structure – is embedded in the thylakoid membrane of chloroplasts and cyanobacteria. The mechanism of the photosynthetic water-splitting reaction, which occurs on the manganese cluster, has been widely investigated; however, it has not yet been fully understood. An essential role in the stabilization of the manganese cluster and in the facilitation of oxygen evolution is played by photosystem II extrinsic proteins that occur in thylakoid lumen. The most important among them is a manganese-stabilizing protein (MSP) that is present in all known oxyphototrophs. This protein is believed to have many functions: besides stabilizing the manganese cluster, it is also carbonic anhydrase activity, GTPase activity and regulation of the turnover of the D1 protein. The functions of the MSP are probably regulated through changes in its dynamic structure. The MSP is likely to take part in the regulation of photosynthesis under various external and internal conditions. This work reviews the current understanding of the structure and the functions of the MSP, and summarizes the differences between two MSP isoforms in some higher plants.

## **Keywords**

photosynthesis, photosystem II, manganese-stabilizing protein, MSP, PsbO, water-splitting reaction, oxygen evolution

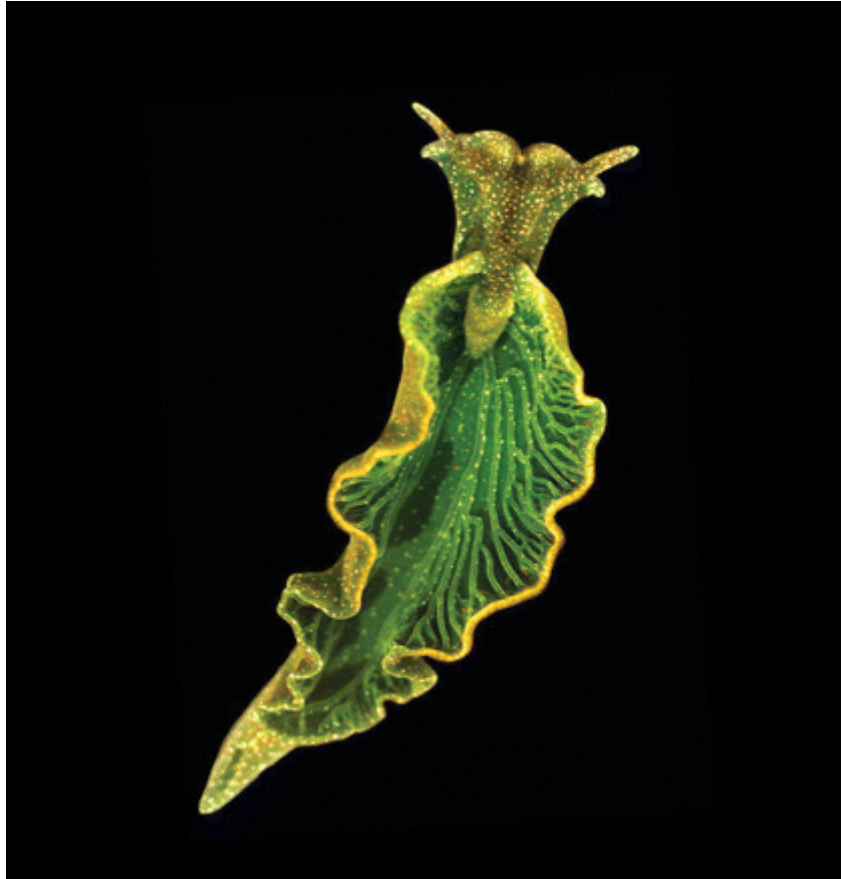


## Obsah

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Úvod .....   | 1  |
| 2       | Fotosystém II .....  | 3  |
| 2.1     | Jádrový komplex .....  | 3  |
| 2.2     | Centrum vyvíjející kyslík .....  | 4  |
| 2.2.1   | Manganový klastr .....   | 5  |
| 2.2.2   | Vnější proteiny centra vyvíjejícího kyslík .....                                   | 6  |
| 2.3     | Anténní komplexy .....   | 8  |
| 3       | Mangan-stabilizující protein .....   | 10 |
| 3.1     | Struktura MSP .....  | 10 |
| 3.1.1   | Primární struktura MSP .....   | 10 |
| 3.1.2   | Sekundární a terciární struktura MSP .....   | 11 |
| 3.1.2.1 | Struktura MSP sinice získaná rentgenovou krystalografií .....                      | 11 |
| 3.1.2.2 | Dynamika struktury MSP .....   | 13 |
| 3.1.3   | Vazba MSP na fotosystém II .....   | 15 |
| 3.1.4   | Interakce MSP s dalšími vnějšími proteiny fotosystému II .....                     | 17 |
| 3.1.4.1 | Interakce MSP v sinicích .....   | 17 |
| 3.1.4.2 | Interakce MSP vyšších rostlin a zelených řas .....                                 | 17 |
| 3.2     | Funkce MSP .....   | 18 |
| 3.2.1   | Stabilizace manganového klastru .....  | 18 |
| 3.2.2   | Interakce s $Ca^{2+}$ .....  | 20 |
| 3.2.3   | Karbonátdehydratázová aktivita .....   | 21 |
| 3.2.4   | Předpokládaný kanál pro vodu a protony .....                                       | 21 |
| 3.2.5   | Thioredoxinová aktivita .....  | 22 |
| 3.2.6   | Vliv MSP na strukturu superkomplexu fotosystému II a světlosběrných komplexů ..... | 22 |
| 3.2.7   | GTPázová aktivita MSP .....  | 23 |
| 3.2.8   | Funkce MSP v degradaci poškozeného proteinu D1 .....                               | 23 |
| 3.3     | Funkční rozdíly mezi izoformami MSP v huseníčku .....                              | 24 |
| 4       | Seznam použité literatury .....  | 26 |

## Seznam používaných zkratk

|              |  |
|--------------|--|
| EDC          | propojovací činidlo <i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -( <i>N,N</i> -dimethyl-3-aminopropyl)karbodiimid |
| FTIR         | infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared spectroscopy)  |
| GTP          | guanosintrifosfát  |
| LHCII        | světlosběrný komplex fotosystému II (light harvesting complex II)                                |
| MSP          | mangan-stabilizující protein (manganese-stabilizing protein)                                     |
| OEC          | centrum vyvíjející kyslík (oxygen evolving center)   |
| PsbO1, PsbO2 | izoformy MSP v huseníčku ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )   |



Obr. 1: Fotosyntetizující mořský zadožábřý plž *Elysia chlorotica*.  
Foto: Mary S. Tyler. Převzato z obálky Proceedings of the  
National Academy of Sciences of the United States of America  
105 (46), rok 2008.

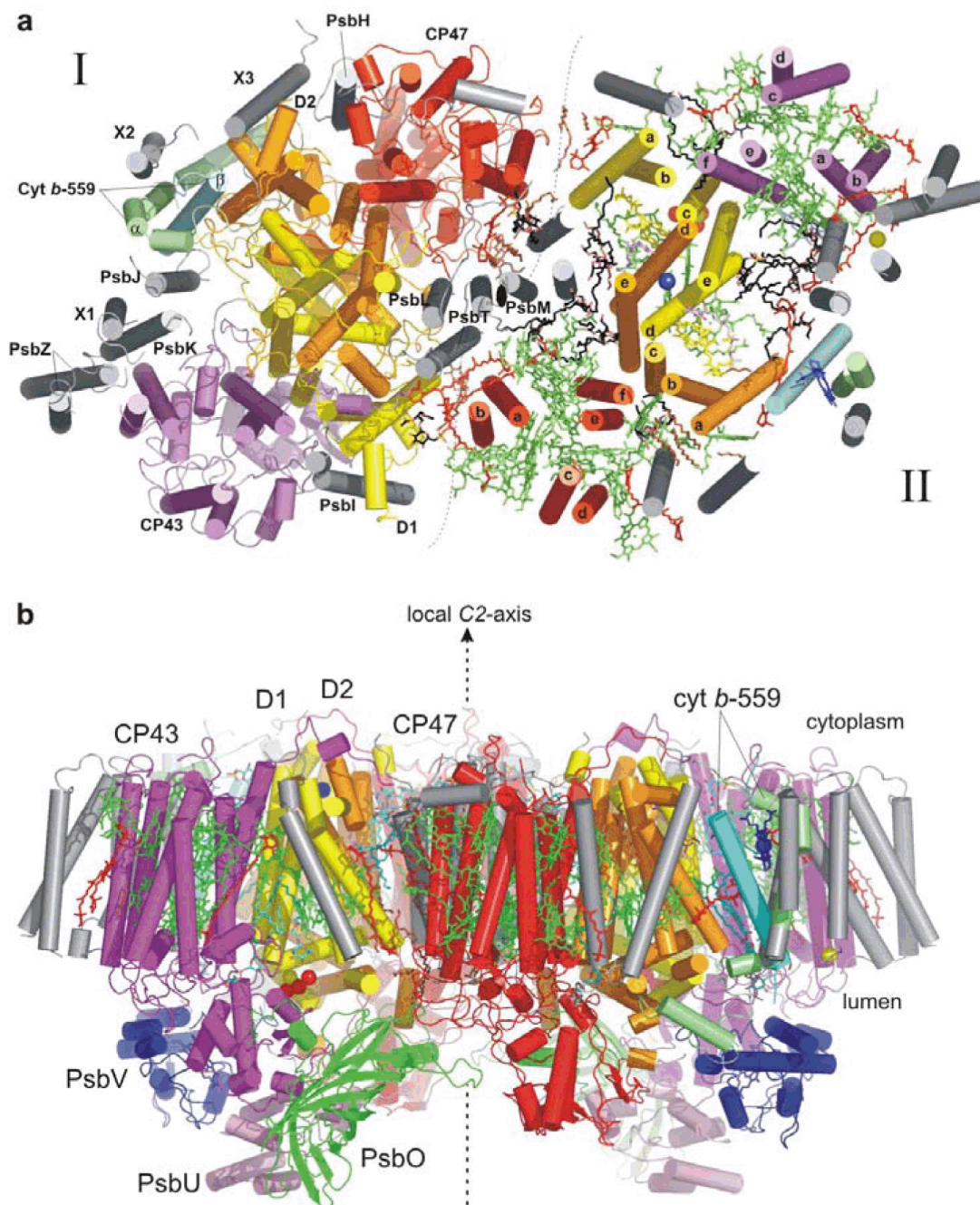


# 1 Úvod

Zhruba před 2,5 miliardami let (Olson a Blankenship 2004) se u fotosyntetizujících organismů vyvinul aparát schopný štěpit vodu za pomoci energie ze světla na molekuly kyslíku a vodík navazovaný do organických sloučenin, jinými slovy oxidovat vodu na O<sub>2</sub> a redukční ekvivalenty. Tato událost, evoluční vynález fotosystému II, byla „velkým třeskem“ ve vývoji biosféry, protože život na této planetě už nebyl limitován zdroji sloučenin, které do té doby byly používány jako donory vodíku a elektronů (organické kyseliny, Fe<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>S, NH<sub>2</sub>). Voda byla a stále je na Zemi dostupná v prakticky neomezeném množství. Zpřístupnění tohoto nevyčerpatelného zdroje redukčních ekvivalentů potřebných k fixaci uhlíku je příčinou obrovského množství biomasy na Zemi v dnešní době. Kromě toho uvolňování kyslíku jako odpadního produktu mělo za následek vytvoření atmosféry s velkým podílem kyslíku umožňující aerobní dýchání, při kterém je maximálně využita energie obsažená v organických látkách (Nield a Barber 2006). Mimo to dal kyslík v atmosféře vznik ochranné ozónové vrstvy, která dovolila rozšíření života na souš (Kern a Renger 2007).

Předkládaná práce je zaměřena na mangan-stabilizující protein (MSP) – vnější (luminální) podjednotku fotosystému II, která má zásadní vliv na funkci vlastního centra vyvíjejícího kyslík, tvořeného skupinou čtyř atomů manganu a jednoho atomu vápníku (Popelková a kol. 2003; Loll a kol. 2005). MSP se nachází ve všech známých fotosyntetizujících organismech vyvíjejících kyslík (De Las Rivas a kol. 2004). Jeho nezbytnost pro funkci fotosyntetického aparátu lze demonstrovat i na kuriózním příkladu zvláštního mořského zadožábrého plže *Elysia chlorotica* (obr. 1), který získává plastidy ze své potravy, řasy *Vaucheria litorea*. Plastidy ukládá do svého trávicího epitelu, kde několik měsíců fotosyntetizují a dodávají plži energii a fixovaný uhlík i bez přítomnosti jaderného genomu řasy, což je zarážející, neboť většina proteinů v chloroplastech (mimo jiné také MSP) je kódována právě jaderným genomem. Bylo však prokázáno, že minimálně gen pro MSP má plž přítomný ve svém jaderném genomu, pravděpodobně v důsledku horizontálního genového přenosu (Rumpha a kol. 2008).

Objasnění struktury a mechanismu fungování fotosyntetického aparátu štěpícího vodu není jen obrovskou výzvou a fascinujícím tématem základního výzkumu, ale může také poskytnout inspiraci pro vytvoření biomimetických (biologické systémy napodobujících) zařízení sloužících k technickému využívání sluneční energie (Kern a Renger 2007).



Obr. 2: Dimer fotosystému II sinice *Thermosynechococcus elongatus*. (a) Pohled na rovinu membrány. Na každém monomeru (I a II), které jsou oddělené přerušovanou černou čarou, jsou ukázány rozdílné strukturní prvky. I, Podjednotky jádra D1 (žlutě), D2 (oranžově), CP43 (fialově) a CP47 (červeně),  $\alpha$ - a  $\beta$ -řetězec cytochromu *b*-559 (zeleně a modrozeleně), malé membránové podjednotky (šedě). Nepřirazené transmembránové helixy jsou označeny X1–X3. Vnější podjednotky a kofaktory nejsou znázorněny. II, Proteiny jsou znázorněny jejich transmembránovými helixy obarvenými stejně jako v části I. Dále jsou znázorněny kofaktory: chlorofyl A (zeleně), feofytin (žlutě),  $\beta$ -karoteny (červeně), hem (modře), plastochinony (fialově), lipidy (černě), molekuly detergentu a nepřirazené alkylové řetězce (hnědě), železnatý kationt (modrá kulička) a předpokládaný vápenatý kationt (žlutá kulička). (b) Pohled z boku (z roviny membrány). Barvy pro membránové podjednotky a kofaktory jsou stejné jako v části (a). Vnější podjednotky jsou znázorněny zeleně (MSP), růžově (PsbU) a modře (PsbV), atomy manganu jsou znázorněny červenými kuličkami. Převzato z Loll a kol. (2005).

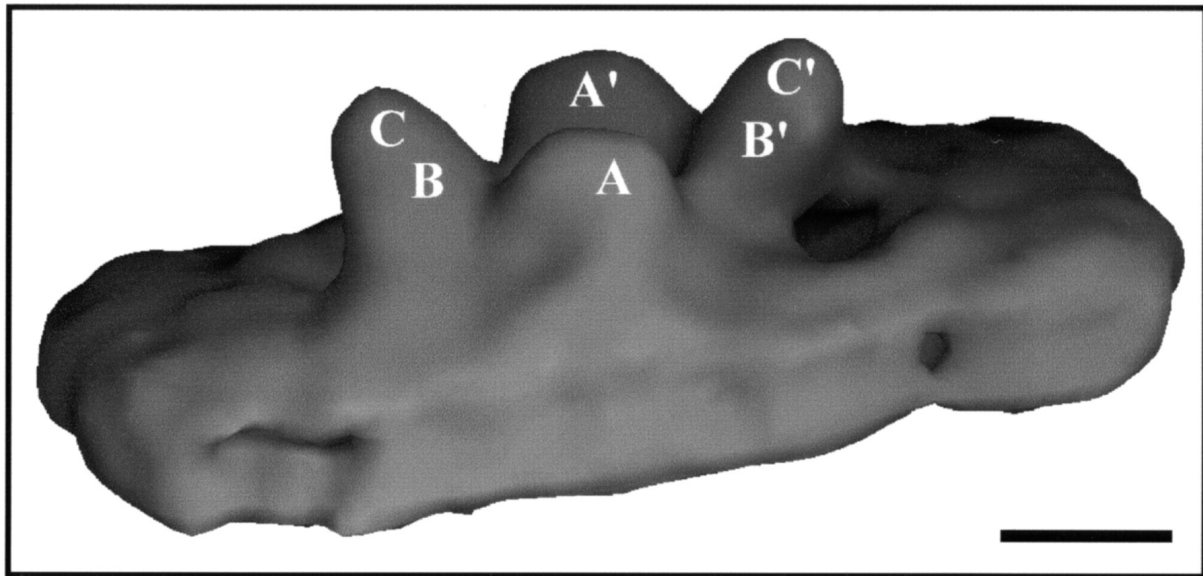
## 2 Fotosystém II

Fotosyntetický rozklad vody probíhá v proteinovém komplexu označovaném jako fotosystém II (photosystem II), který se nachází v thylakoidních membránách. Fotosystém II je složený z většího počtu podjednotek a funguje jako oxidoreduktáza oxidující vodu a redukující plastochinon, neboli přenášející elektrony z vody (za vzniku molekulárního kyslíku) na plastochinon, který se redukuje na plastochinol. Superkomplex fotosystému II se skládá ze tří částí – světlosběrného komplexu (light harvesting complex, LHCI), jádrového komplexu (core complex) a vnějších proteinů centra vyvíjejícího kyslík (oxygen evolving center, OEC). Každý z komplexů je složen z více podjednotek (Kern a Renger 2007). V thylakoidních membránách se fotosystém II vyskytuje v homodimerech (Loll a kol. 2005).

V dnešní době je poměrně dobře známá struktura fotosystému II sinice *Thermosynechococcus elongatus*, zvláště díky práci Loll a kol. (2005), kteří pomocí rentgenové difrakční analýzy získali strukturu jádrového komplexu s vnějšími proteiny OEC s rozlišením 3,0 Å (obr. 2). O fotosystému II vyšších rostlin bohužel nejsou známy takové podrobnosti, protože se zatím nepodařilo získat dostatečně kvalitní třírozměrné krystaly pro rentgenovou difrakční analýzu. Nej kvalitnější struktury jaderného komplexu rostlinného fotosystému II byly získány elektronovou krystalografií, která umožnila určit pozici hlavních podjednotek a umístění transmembránových helixů (Hankamer a kol. 2001b). Při porovnání s modelem odvozeným ze struktury sinicového fotosystému II Hankamer a kol. (2001a) zjistili, že pozice hlavních podjednotek a jejich transmembránových helixů si odpovídají. Uspořádání menších podjednotek už však odpovídá méně. Představa o uspořádání celého superkomplexu (jádra fotosystému II, vnějších proteinů OEC a světlosběrného komplexu) vyšších rostlin vychází z elektronmikroskopických snímků. Třírozměrná struktura tohoto superkomplexu ze špenátu (*Spinacea oleracea*) s rozlišením 17 Å byla získána jednočásticovou analýzou pomocí elektronové kryomikroskopie (obr. 3; Nield a kol. 2002).

### 2.1 Jádrový komplex

Jádro fotosystému II tvoří heterodimer proteinů D1 a D2. Všechny kofaktory zajišťující separaci nábojů, oxidaci vody a redukci plastochinonu jsou vázány těmito dvěma proteiny. Po stranách proteinů D1 a D2 jsou proteiny CP43 a CP47 (chlorophyll binding proteins) sloužící k absorpci světla a přenosu energie ze světlosběrného komplexu k reakčnímu centru. Tyto čtyři proteiny jsou uspořádány v celku symetricky, stejně jako kofaktory jimi vázané (obr. 4). Kolem těchto čtyř hlavních podjednotek je množství malých transmembránových proteinů (obr. 2; Loll a kol. 2005). V dostupné literatuře dosud chybí



Obr. 3: Šikmý pohled na povrch třírozměrného modelu superkomplexu světlosběrných komplexů a dimeru fotosystému II špenátu o rozlišení 17 Å získaný pomocí jednočásticové analýzy z fotografií z elektronového mikroskopu. Výběžky označené písmeny pravděpodobně odpovídají vnějším proteinům OEC. Převzato z Nield a kol. (2002).

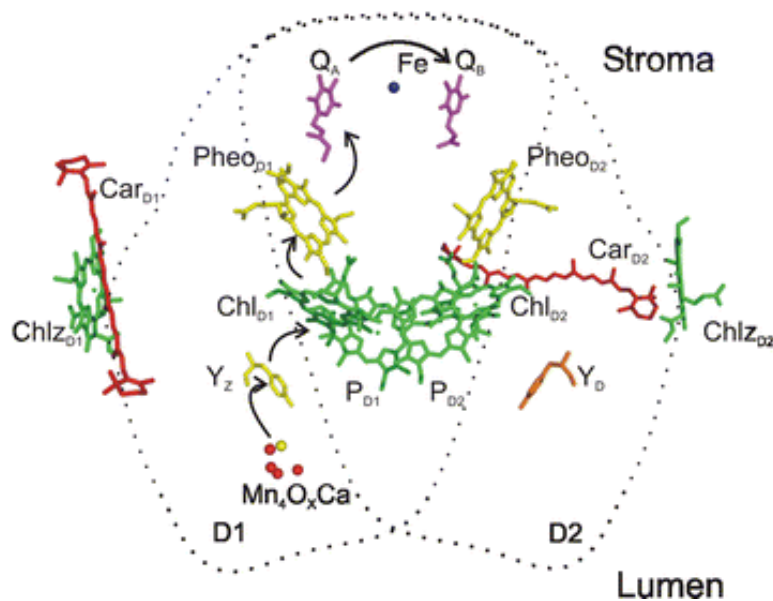
spolehlivý údaj o jejich celkovém počtu, neboť některé podjednotky jsou zřejmě vázány jen lehce a při izolaci komplexu odpadávají. Loll a kol. (2005) uvádí pro sinice minimálně 13 malých membránových podjednotek, přičemž se dá předpokládat, že vyšší rostliny budou mít těchto podjednotek ještě více. U Eukaryot je většina těchto podjednotek, stejně jako čtyři centrální podjednotky, kódována chloroplastovým genomem.

Celý jádrový komplex fotosystému II sinice váže přes sedmdesát kofaktorů. Heterodimer D1/D2 váže symetricky uspořádané následující kofaktory: 6 molekul chlorofylu A, 2 molekuly feofytinu, 2 molekuly plastochinonu, 2 molekuly  $\beta$ -karotenu, jeden železnatý kation a jeden uhličitanový anion. Z luminální strany proteinu D1 je ještě vazebné místo pro manganový klastr komplexu vyvíjejícího kyslík (Loll a kol. 2005). Uspořádání těchto kofaktorů je vidět v obrázku 4.

CP47 váže 16 molekul chlorofylu A a 5 molekul  $\beta$ -karotenu, CP43 13 molekul chlorofylu A a 3 molekuly  $\beta$ -karotenu. Kromě toho jsou například v podjednotkách označovaných cytochrom b559 vázány 2 molekuly hemu (Loll a kol. 2005).

## 2.2 Centrum vyvíjející kyslík

Jako centrum vyvíjející kyslík (oxygen evolving center, OEC) je označován obvykle klastr (seskupení) čtyř atomů manganu a jednoho atomu vápníku – kofaktorů, na kterých probíhá oxidace vody. V širším pojetí, které bude používáno i v této práci, jsou za součást



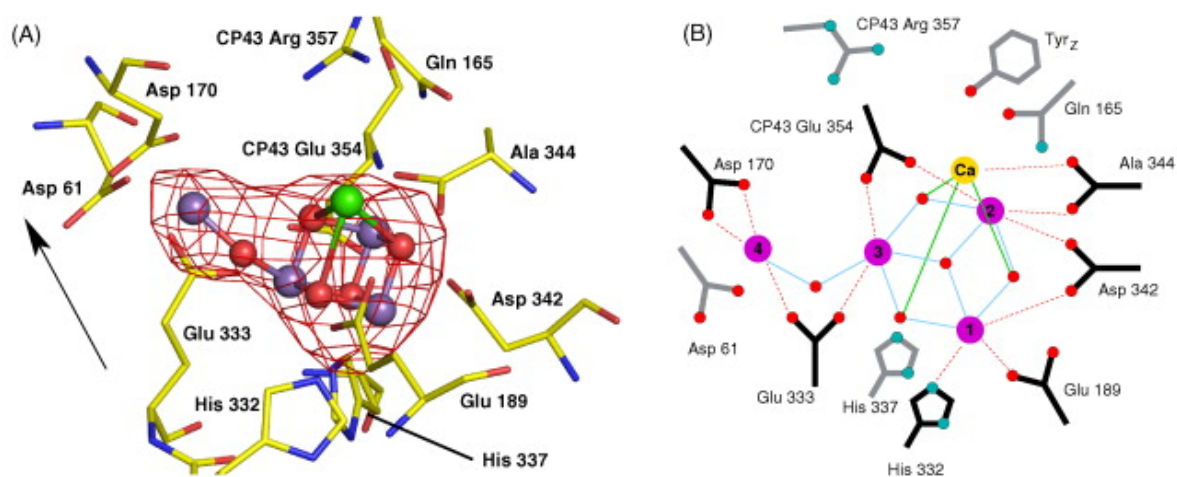
Obr. 4: Uspořádání kofaktorů v jádru fotosystému II, pohled z roviny membrány. Znázorněné kofaktory: chlorofyl A (zeleně), feofytin (žlutě),  $\beta$ -karoteny (červeně), plastochinony (fialově), železnatý kationt (modrá kulička), vápenatý kationt (žlutá kulička), atomy manganu (červeně). Přibližné polohy proteinů D1 a D2 jsou znázorněné tečkovanými čarami. Černé šipky znázorňují přenos elektronu po excitaci P680 (Loll a kol. 2005, převzato z Kern a Renger 2007).

OEC považovány i okolní proteiny, které se účastní vazby a stabilizace manganového klastru (D1 a CP43 z jádra fotosystému II a vnější proteiny fotosystému II nasedající z lumina thylakoidu). Často se v literatuře setkáme s použitím zkratky OEC nejen pro „oxygen evolving center“, ale také pro „oxygen evolving complex“. Občas jsou používány i pojmy „water-oxidizing complex“ (WOC) či „water-splitting complex“.

### 2.2.1 Manganový klastr

Manganový klastr centra vyvíjejícího kyslík je vázán převážně proteinem D1, a to v jeho části směřující do lumina thylakoidu. Skládá se z jednoho vápenatého kationtu a ze čtyř atomů manganu, které se v důsledku odebrání elektronů do reakčního centra fotosystému II postupně oxidují. Plně oxidovaný klastr je následně schopen se zpětně redukovat rozštěpením dvou molekul vody. Detailní uspořádání těchto atomů a atomů kyslíku, které jsou zřejmě mezi nimi, není zatím známo, částečně kvůli nedostatečnému rozlišení struktur získaných rentgenovou krystalografií, částečně i kvůli změnám navozovaným při vlastní analýze (Barber 2008). Yano a kol. (2005) totiž ukázali, že dávky rentgenového záření běžně používané pro rentgenovou krystalografii mohou manganový klastr značně pozměňovat.

Kromě rentgenové difrakční analýzy jsou ke studiu struktury manganového klastru a jejích změn v průběhu oxidace vody využívány také různé spektroskopické metody. Interpretace výsledků však není zcela jasná, což vede k vytváření mnoha různých modelů (Barber 2008; Yano a Yachandra 2008). Jistý není ani způsob vazby manganového klastru na okolní proteiny, modely vycházející z nejnovější krystalografické struktury fotosystému II (Loll a kol. 2005) se však shodují v tom, že jako ligandy pro mangan slouží několik



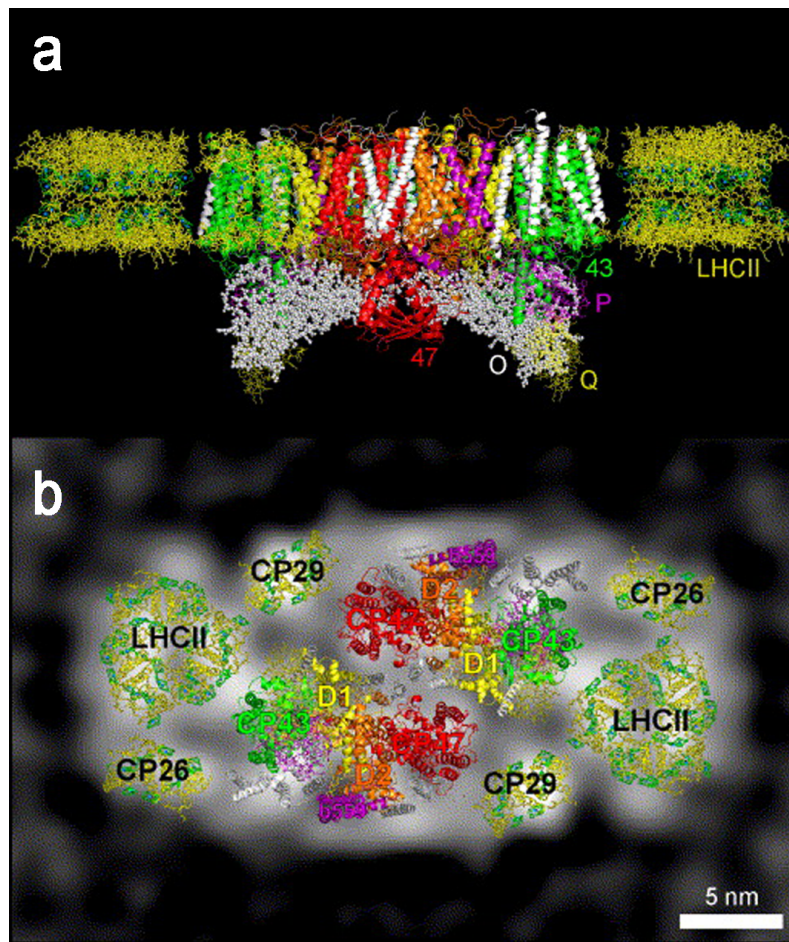
Obr. 5: (A) Jeden z modelů uspořádání manganového klastru v OEC. Atom vápníku je znázorněn zeleně, atomy manganu fialově, atomy kyslíku červeně. Šipka znázorňuje směr normály k membráně. (B) Stejný model jako v (A) znázorněný schematicky. Vzdálenosti mezi atomy menší než 2,8 Å jsou znázorněné čarami. Převzato z Barber a Murray (2008).

aminokyselin proteinu D1 a jedna aminokyselina proteinu CP43 (Barber 2008; Yano a Yachandra 2008). Jeden z modelů je na obrázku 5.

## 2.2.2 Vnější proteiny centra vyvíjejícího kyslík

Vnější proteiny (extrinsic proteins) fotosystému II zahrnované do OEC nasedají na integrální membránové proteiny jádra fotosystému z lumenální strany (Nield a Barber 2006). Tvoří tím jakýsi „výstupek“ fotosystému II do lumina thylakoidu. Jak je vidět z obrázku 6, fotosystém II sinic i vyšších rostlin je z cytosolické/stromatální strany plochý. Tento strukturní rys, kterým se podstatně liší od fotosystému I s nápadným „výstupkem“ na cytosolické/stromatální straně membrány, je podstatný pro skládání (stacking) thylakoidů – tvorbu gran, v nichž je fotosystém II přednostně lokalizován (Kern a Renger 2007).

Hlavním vnějším proteinem OEC je mangan-stabilizující protein (manganese-stabilizing protein, MSP). V literatuře jsou pro tento protein používány také názvy PsbO (podle názvu genu), oxygen-evolving enhancer protein 1 (OEE1) nebo OEC 33 kDa subunit. MSP se nachází ve všech známých fotosyntetizujících organismech vyvíjejících kyslík (oxyfototrofech), narozdíl od ostatních vnějších proteinů OEC, které už nejsou tak široce konzervované. U vyšších rostlin a zelených řas jsou součástí OEC proteiny PsbP (OEC 23 kDa subunit) a PsbQ (OEC 16 kDa subunit). U sinic jsou místo nich na fotosystém II vázány proteiny PsbU (photosystem II 12 kDa extrinsic protein) a PsbV (cytochrome *c*550), ačkoliv se v jejich genomu nacházejí i sekvence pro proteiny homologní k PsbP a PsbQ (De Las Rivas a kol. 2004). Thornton a kol. (2004) prokázali, že tyto homology se u sinice



Obr. 6: Model superkomplexu světlosběrných komplexů a dimeru fotosystému II, pohled (a) z roviny membrány a (b) z luminu thylakoidu. Struktury proteinů jádra fotosystému II ze sinice (Ferreira a kol. 2004) a struktury světlosběrných komplexů (Liu a kol. 2004) získané rentgenovou krystalografií jsou v (b) zobrazeny do struktury superkomplexu ze špenátu získané elektronovou kryomikroskopií a jednočásticovou analýzou (Nield a kol. 2002). Vnější proteiny OEC jsou v (a) označeny O (MSP), P (PsbP) a Q (PsbQ), v (b) nejsou zobrazeny. Neoznačené malé membránové podjednotky jádra fotosystému jsou znázorněny bíle, molekuly chlorofylu zeleně. Trimerický hlavní světlosběrný komplex je označen LHCII. Pro zobrazení struktury menšinových světlosběrných komplexů, CP26 a CP29, byla použita struktura monomeru hlavního světlosběrného komplexu. Převzato z Nield a Barber (2006).

*Synechocystis* alespoň částečně váží na fotosystém II a zajišťují jeho optimální aktivitu. Umístění PsbP a PsbQ na fotosystému II vyšších rostlin se podle elektronmikroskopických snímků zdá být velice odlišné od umístění PsbU a PsbV na fotosystému sinice. Z těchto údajů se dá vyvodit, že proteiny PsbP a PsbQ nejsou strukturním a funkčním nahrazením sinicových PsbU a PsbV ve fotosystému rostlin (Nield a Barber 2006) a že evolučně původních je zřejmě pět proteinů OEC, z nichž se dva, PsbU a PsbV, během evoluce zelených rostlin ztratily (Thornton a kol. 2004). Během evoluce zelených fotosyntetizujících Eukaryot také došlo k přesunu genů pro MSP, PsbP a PsbQ (spolu se stovkami dalších genů)

z chloroplastů do jádra, neboť tyto geny se u všech zkoumaných zelených fotosyntetizujících Eukaryot nacházejí právě v jaderné DNA (De Las Rivas a kol. 2004). Zvláštní skupinu vnějších proteinů OEC mají ruduchy – u řasy *Cyanidium caldarium* byl nalezen jaderně kódovaný protein o molekulové hmotnosti 20 kDa vázající se na fotosystém II a nazván PsbQ' vzhledem k částečné homologii s PsbQ (Ohta a kol. 2003). Kromě toho mají ruduchy protein PsbU, kódovaný jadernou DNA, a protein PsbV, kódovaný plastidovou DNA (De Las Rivas a kol. 2004).

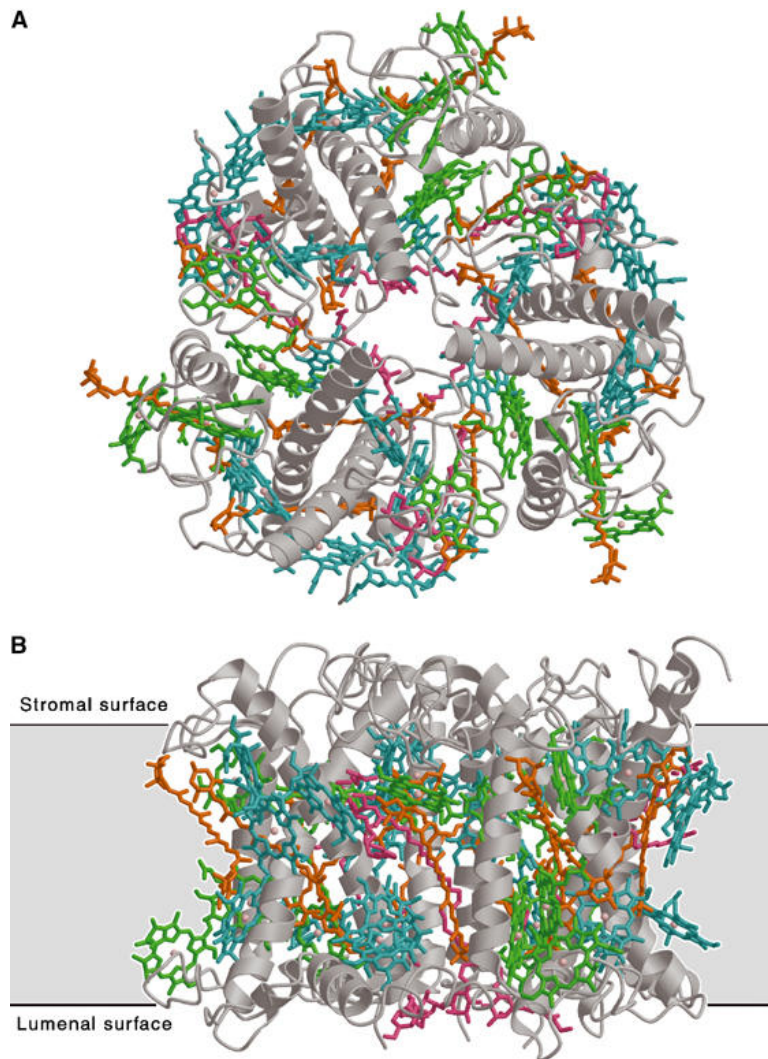
Vnější proteiny OEC se na fotosystému II nacházejí v blízkosti manganového klastru. Jejich hlavní funkce je pravděpodobně stabilizovat a chránit vlastní centrum vyvíjející kyslík a optimalizovat přístup iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Cl}^-$ , které jsou v reakčním centru potřeba jako kofaktory pro štěpení vody. Proč zde mají sinice a ruduchy přítomný i cytochrom (PsbV) je záhada, neboť tento cytochrom má velmi nízký potenciál a nemá žádnou redoxní aktivitu indukovanou světlem (Barber 2003).

### 2.3 Anténní komplexy

Takzvané anténní komplexy přiléhající k fotosystému II slouží k absorpci světelné energie a k přenosu této energie do jádra fotosystému. Tím je zvýšena efektivita absorpce světla rostlinou, a tudíž účinnost celé fotosyntézy. Předpokládá se také, že některé součásti anténních komplexů slouží k přeměně nadbytku absorbované excitační energie na teplo (disipaci) za podmínek nadměrné ozáření (Barros a Kühlbrandt 2009).

Anténní komplexy eukaryotických fotosystémů se v literatuře označují jako světlosběrné (light harvesting) komplexy. Do světlosběrného komplexu fotosystému II (light harvesting complex II, LHCI) vyšších rostlin a zelených řas je zahrnováno několik membránových proteinů patřících do genové nadrodiny (gene superfamily) Lhc. Všechny geny z této nadrodiny jsou součástí jaderného genomu (Barros a Kühlbrandt 2009). Jejich proteinové produkty váží různé počty molekul chlorofylu A, chlorofylu B a xantofylů (luteinu, violaxantinu a neoxantinu). V největším množství je v thylakoidních membránách přítomen takzvaný „hlavní“ komplex LHCI. Tento komplex je trimer o nestálém složení – tvoří ho různé kombinace tří velice podobných proteinů označovaných podle názvu genů Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3. V literatuře je často zkratka LHCI používána jen pro tento trimerický komplex. Kromě toho jsou však v thylakoidních membránách i tři takzvané „menšinové“ anténní komplexy označované Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) a Lhcb6 (CP24), které se většinou vyskytují jako monomery (Dekker a Boekema 2005).





Obr. 7: Model struktury trimerického hlavního světlosběrného komplexu fotosystému II hrachu (*Pisum sativum*). (A) pohled ze stromatální strany, (B) pohled z roviny membrány (luminální strana směřuje dolů). Chlorofyl A je zobrazen modrozeleně, chlorofyl B zeleně, karotenoidy oranžově a lipidy fialově. Převzato ze Standfuss a kol. (2005).

Struktura trimerického hlavního komplexu LHCII byla získána rentgenovou krystalografií, a to z rostlin špenátu (Liu a kol. 2004) a hrachu (Standfuss a kol. 2005; obr. 7). Předpokládá se, že menšinové proteiny LHCII mají obdobné prostorové uspořádání jako monomery hlavního komplexu (Dekker a Boekema 2005; Nield a Barber 2006). Jeden z modelů uspořádání superkomplexu jádra fotosystému II a LHCII je na obrázku 6.

Anténní komplexy sinic a ruduch, takzvané fykobilisomy, jsou velmi odlišné od světlosběrného komplexu vyšších rostlin a zelených řas – tvoří je integrální membránové proteiny, ale rozpustné (hydrofilní) proteinové komplexy přiléhající k jádru fotosystému II z cytosolické/stromatální strany thylakoidní membrány. Tyto proteiny kovalentně váží chromofory biliny (například fykocyanobilin či fykoerythrobilin), proto jsou nazývané biliproteiny (Blankenship 2002).

## 3 Mangan-stabilizující protein

### 3.1 Struktura MSP

#### 3.1.1 Primární struktura MSP

Mangan-stabilizující protein (MSP) vyšších rostlin a zelených řas je kódován jaderným genomem, jak již bylo zmíněno, a tudíž je syntetizován v cytoplazmě, na volných ribozomech. Transport do thylakoidů je zajištěn dvěma signálními peptidy řazenými za sebou na N-konci proteinu. První je signální peptid pro transport do stromatu chloroplastu, za ním je signální peptid pro přenos do lumina thylakoidu. Tyto signální peptidy jsou po transportu odštěpeny peptidázou. V sinicích, kde je MSP kódován chromozomální DNA, je exprimován jen s jedním signálním peptidem, pro přenos do thylakoidů. Tento peptid je po přenosu opět odštěpen peptidázou (Seidler 1996).

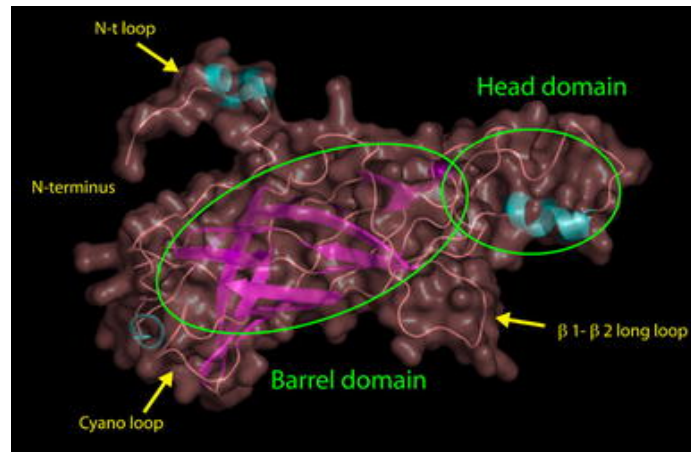
Podle databáze UniProt (The UniProt Consortium 2010) je délka prekurzoru jednoho z nejprobádanějších MSP, MSP ze špenátu (accession number P12359), 332 aminokyselin, z čehož 84 aminokyselin je součástí signálních peptidů. Délka vlastního proteinu je tedy 248 aminokyselin. Délka MSP sinice *Thermosynechococcus elongatus* (accession number P0A431) je 272 aminokyselin, z nichž 26 tvoří signální peptid. Délka vlastního proteinu (246 aminokyselin) je tedy téměř stejná jako u špenátu.

Následující část této práce se věnuje pouze vlastnímu MSP, bez signálních peptidů.

Molekulová hmotnost MSP špenátu vypočítaná z aminokyselinové sekvence (26,53 kDa), byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie, což ukazuje na nepřítomnost velkých posttranslačních modifikací (Svensson a kol. 2002). Původní označení OEC 33 kDa subunit bylo odvozeno z pohyblivosti MSP na denaturační elektroforéze – SDS-PAGE (polyakrylamidové gelové elektroforéze za přítomnosti dodecylsírany sodného). Z toho je zřejmé, že elektroforetická pohyblivost MSP je anomální, což nejspíš souvisí s jeho primární strukturou (Popelková a kol. 2003).

De Las Rivas a Barber (2004) srovnáním všech tehdy známých sekvencí MSP (z celého spektra oxyfototrofních organismů, od sinic přes zelené řasy k vyšším rostlinám) zjistili, že pouze 19 aminokyselinových zbytků je plně konzervovaných. Z toho 18 se nachází v pěti konzervovaných oblastech, které v sekvencích proteinů identifikovali. Ty zahrnují dva cysteinové zbytky účastnící se tvorby intramolekulárního disulfidického můstku a sekvence účastnící se vazby na fotosystém II. Kromě konzervovaných oblastí autoři identifikovali pět oblastí specifických pro prokaryotické a eukaryotické MSP (obr. 8).

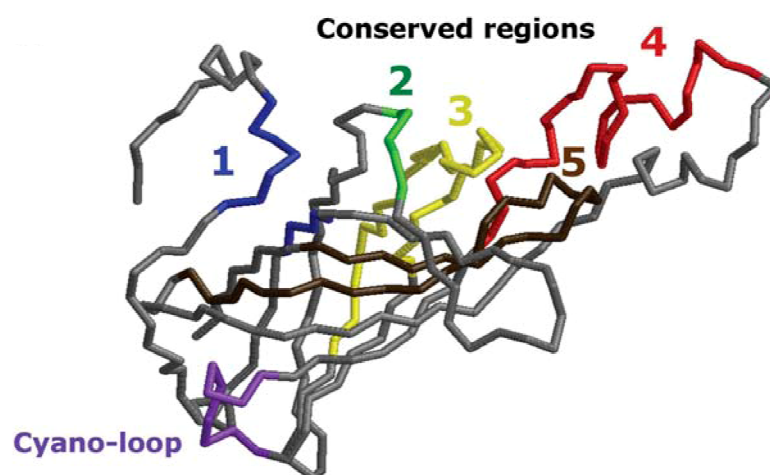




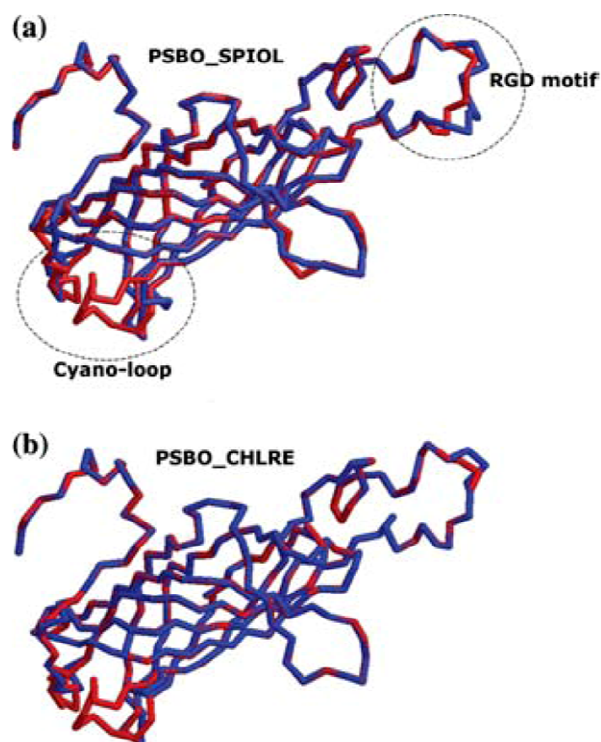
Obr. 9: Struktura MSP sinice *Thermosynechococcus elongatus* ve stavu, kdy je vázaná na fotosystém II, kterou získal Loll a kol. (2005) pomocí rentgenové difrakční analýzy. Modře znázorněné části mají  $\alpha$ -helikální strukturu, fialově jsou znázorněné  $\beta$ -listy. Převzato z Williamson (2008)

tvořících  $\beta$ -strukturu, většina však sestává z nepravidelných smyček a záhybů. Ve stavu, kdy je MSP navázán na fotosystém II, je jeho osa pod úhlem zhruba  $40^\circ$  k rovině thylakoidní membrány a C-konec i N-konec proteinu jsou v části směřující do lumina thylakoidu (De Las Rivas a Barber 2004).

Jak už bylo uvedeno, De Las Rivas a Barber (2004) identifikovali v MSP srovnáním 33 sekvencí pět konzervovaných oblastí a pět oblastí specifických pro prokaryotické a eukaryotické MSP. Zamapováním konzervovaných oblastí do struktury MSP zjistili, že se nacházejí především v hlavě proteinu, která interaguje s ostatními proteiny fotosystému II (obr. 10). De Las Rivas a Barber (2004) mimo jiné také využili známou strukturu MSP sinice



Obr. 10: Struktura MSP sinice *Thermosynechococcus elongatus* se zvýrazněnými silně konzervovanými oblastmi, očíslovanými stejně jako na obrázku 8. Fialově je znázorněna takzvaná sinicová smyčka, oblast specifická pro sinice. Převzato z De Las Rivas a Barber (2004).



Obr. 11: Proložení struktury MSP sinice *Thermosynechococcus elongatus* (červeně) modely struktur (a) špenátu (PSBO\_SPIOL) a (b) zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (PSBO\_CHLRE). Dvě oblasti s největšími odlišnostmi jsou označené – RGD motiv a sinicová smyčka. Převzato z De Las Rivas a Barber (2004).

*Thermosynechococcus elongatus* k vytváření homologních modelů pro MSP špenátu a zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (pomocí jejich sekvencí). Ačkoli se aminokyselinová sekvence MSP sinice poměrně dost liší od sekvencí MSP vyšších rostlin a zelených řas, modely struktury si celkem dobře odpovídají. Největší odlišnosti jsou v takzvané sinicové smyčce (cyano-loop) na lumenálním konci  $\beta$ -soudku a v takzvaném RGD motivu vyčnívajícím z „hlavy“ proteinu (obr. 11). Obě tyto oblasti předtím definovali jako specifické pro sinice, respektive vyšší rostliny.

Stále však zůstává otázkou, jak dobře jsou znalosti o MSP sinice převoditelné na MSP vyšších rostlin a zelených řas. Podle třírozměrného modelu získaného pomocí elektronové mikroskopie (bohužel jen s rozlišením 17 Å) je struktura MSP špenátu a jeho pozice v rámci fotosystému II v podstatě stejná jako u *Thermosynechococcus elongatus* (Nield a kol. 2002, Nield a Barber 2006). Podle leckterých výzkumů má však MSP rostlin trochu jiné funkční charakteristiky a charakter struktury v roztoku. Navíc některé vlastnosti struktury MSP sinice *Thermosynechococcus elongatus* mohou souviset s tím, že se jedná o termofilní organismus (Williamson 2008).

### 3.1.2.2 Dynamika struktury MSP

Dříve než byla struktura MSP získána pomocí rentgenové difrakční analýzy o dostatečném rozlišení alespoň ze sinice, byly částečné informace o sekundární struktuře získávány pomocí CD (circular dichroism) spektroskopie a infračervené spektroskopie

s Fourierovou transformací (FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy). Kusé informace o terciární struktuře poskytovaly také cílené mutace na různých místech proteinu, částečná štěpení proteázami a chemické modifikace, především s použitím propojovacích činidel (crosslinkers). Výsledky těchto studií shrnují Popelková a kol. (2003). Vyplývá z nich, že MSP má v roztoku charakter takzvaného vnitřně neuspořádaného (intrinsically disordered) neboli přirozeně rozvolněného (natively unfolded) proteinu (viz také Lydakis-Simantiris a kol. 1999). Podobné proteiny obvykle získávají stabilní strukturu až po navázání na jiný protein, popřípadě nukleovou kyselinu, na které mohou díky svým vlastnostem perfektně nasednout.

Většina studií také naznačovala jiné uspořádání MSP v roztoku a navázaného na fotosystém II. Například Enami a kol. (1998) analyzovali v MSP ze špenátu pozice propojení vytvořených pomocí EDC (*N*-ethyl-*N'*-(*N,N*-dimethyl-3-aminopropyl)karbodiimid), propojovacího činidla vytvářejícího kovalentní vazby mezi aminovou a karboxylovou skupinou v případě, že jsou ve vzdálenosti typické pro van der Waalsovy interakce. Autoři studie zjistili, že při působení EDC na MSP v roztoku se propojí Lys14 (lysin v pozici 14) s Glu10 (kyselinou glutamovou v pozici 10) a Lys48 s Glu246, kdežto při působení EDC na MSP vázané na fotosystém II se Glu246 propojí s Lys190.

Zajímavé výsledky přinesly též studie termostability MSP. Lydakis-Simantiris a kol. (1999) zjistili, že po zahřátí MSP ze špenátu na 90 °C a opětovném ochlazení byl protein stále schopný vazby na fotosystém II, jehož aktivita (produkce kyslíku) byla obnovena až z 80 % oproti vzorku s nezahřátým MSP.

V sekvenci MSP jsou dva plně konzervované cysteinové zbytky (Cys19 a Cys44 u *Thermosynechococcus elongatus*, Cys28 a Cys55 u špenátu). Nikitina a kol. (2008) zjistili, že pokud je mezi nimi vytvořený disulfidický můstek, silně to stabilizuje strukturu MSP v roztoku. Pokud jsou cysteinové zbytky redukovány (disulfidický můstek není vytvořený), MSP je mnohem náchylnější k denaturaci močovinou. Autoři však předpokládají, že *in vivo* nemusí být disulfidický můstek vytvořen stále, ale že redukce/oxidace MSP (v závislosti na prostředí v thylakoidu) může souviset s řízením jeho funkce, podobně jako je reverzibilní redukci/oxidaci disulfidických můstků regulována aktivita thylakoidního imunofilinu FKBP13 (Gopalan a kol. 2004). Gopalan a kol. (2004) totiž, vzhledem k jejich experimentům s imunofilem FKBP13, navrhují koncept redoxní regulace v luminu thylakoidu s tím, že by luminální enzymy byly aktivovány za světla oxidací jejich cysteinových zbytků. To je v kontrastu s procesy ve stromatu, kde jsou enzymy za světla aktivovány naopak redukcí disulfidických můstků (Schurmann a Jacquot 2000).

Koncept regulace OEC za různých světelných podmínek prostřednictvím změn v konformaci MSP, v tomto případě však indukovaných změnami pH, navrhuje také Shutova a kol. (2005). Svými experimenty zjistili, že při změnách pH obdobných fyziologickým změnám v luminu thylakoidů na světle a ve tmě (5,7–7,2) MSP mění svou konformaci. V mírně kyselém prostředí (za světla) jsou hydrofobní aminokyselinové zbytky jádra MSP více přístupné z roztoku (Shutova a kol. 2005).

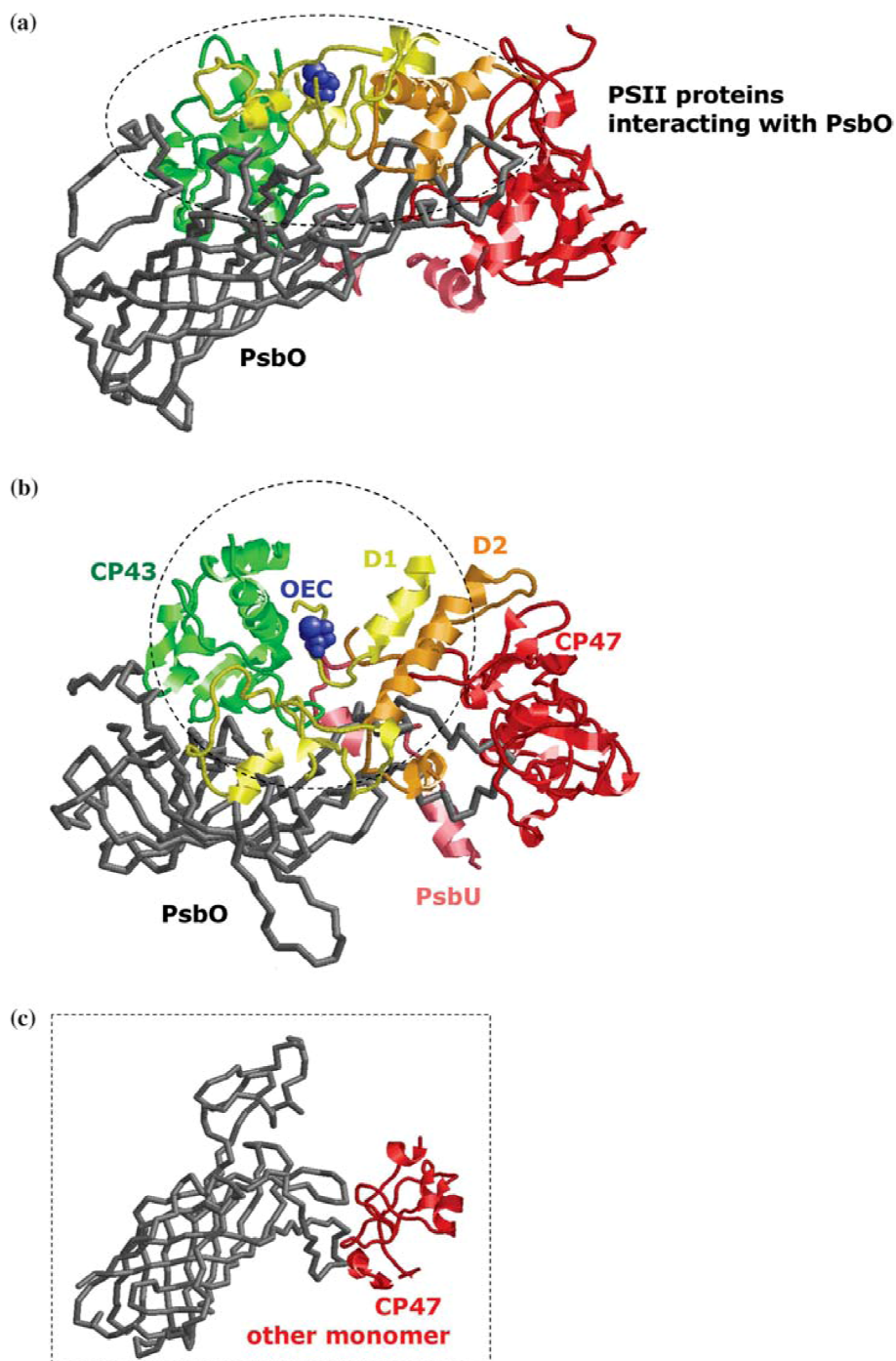
Celkově se o struktuře MSP dá říct, že je pravděpodobně do velké míry proměnlivá a že tato dynamika může hrát důležitou roli ve funkcích, které MSP v rostlině zastává (Popelková a kol. 2003; Williamson 2008).

### 3.1.3 Vazba MSP na fotosystém II

Mnohými biochemickými experimenty bylo zjišťováno, jakým způsobem se váže MSP na fotosystém II. Byla prováděna místně-specifická mutagenese genu pro MSP a chemické modifikace izolovaného proteinu. V těchto studiích, které shrnují Popelková a kol. (2003) a Williamson (2008), byly určeny polypeptidové úseky i jednotlivé aminokyselinové zbytky podstatné pro vazbu MSP na jádro fotosystému II. Většina těchto poznatků souhlasí s analýzou vazebných míst ve struktuře MSP ze sinice *Thermosynechococcus elongatus*, kterou provedli De Las Rivas a Barber (2004). U této sinice se interakcí s vnitřními podjednotkami fotosystému II účastní především hlavová doména, „krk“, který ji spojuje s  $\beta$ -soudkem, přiléhající část  $\beta$ -soudku a smyčky vyčnívající z hlavního těla proteinu (N-koncová smyčka a smyčka mezi  $\beta$ -vlákný 1 a 2). Při porovnání těchto oblastí s konzervovanými oblastmi sekvence MSP se ukázalo, že si vzájemně dobře odpovídají (De Las Rivas a Barber 2004).

Nejrozsáhlejší interakce s MSP mají proteiny CP43 a D1. Tyto interakce zahrnují vodíkové můstky a elektrostatické vazby. Manganový klastr je umístěn právě mezi oblastmi interakce CP43 a D1 s MSP. Poblíž se nachází také C-koncový helix proteinu D2, který s MSP tvoří minimálně dva vodíkové můstky. S proteinem CP47 interaguje MSP skrze část hlavové domény nejbližší od těla proteinu.

MSP interaguje také s proteinem CP47 z druhého monomeru dimerického komplexu fotosystému II. Tato vazba, které se účastní smyčka mezi  $\beta$ -vlákný 1 a 2 vyčnívající z těla MSP, má pravděpodobně vliv na stabilizaci dimerické organizace fotosystému II (De Las Rivas a Barber 2004). Umístění MSP vůči vnitřním podjednotkám fotosystému II, se kterými interaguje, ukazuje obrázek 12.



Obr. 12: Umístění MSP sinice *Thermosynechococcus elongatus* vůči podjednotkám fotosystému II, se kterými interaguje. MSP (PsbO) zobrazen šedě, D1 žlutě, D2 oranžově, CP43 zeleně, CP47 červeně a PsbU růžově. (a) Pohled podél povrchu membrány, (b) pohled přibližně kolmo na povrch membrány, (c) interakce s proteinem CP47 z druhého monomeru fotosystému II. Převzato z De Las Rivas a Barber (2004).

Opět zůstává otázkou, co vše z údajů o vazbách MSP z termofilní sinice můžeme vyvozovat pro vyšší rostliny. Přestože se podle struktury získané jednočásticovou analýzou z kryoelektronmikroskopických snímků zdá, že MSP je na fotosystému II špenátů ve stejné pozici a také v jedné kopii na jeden fotosystém II jako u sinice (Nield a kol. 2002, Nield a



Barber 2006), některé biochemické experimenty naznačují, že ve vyšších rostlinách se na jeden fotosystém II vážou dvě kopie MSP. Například Popelková a kol. (2002) uvádějí, že při opětovném navazování MSP na fotosystém II špenátu předem zbavený vnějších proteinů se maximální rychlosti vyvíjení kyslíku dosáhlo až při přidání dvou molů MSP k jednomu molu fotosystému II.

### **3.1.4 Interakce MSP s dalšími vnějšími proteiny fotosystému II**

#### **3.1.4.1 Interakce MSP v sinicích**

V sinici *Thermosynechococcus elongatus* interaguje MSP s proteinem PsbU přes svoji hlavovou doménu. Protein PsbV je ve fyzickém kontaktu s PsbU, ne však s MSP (De Las Rivas a Barber 2004). Pro vazbu PsbU na fotosystém II je nutná přítomnost navázaného PsbV narozdíl od přítomnosti MSP – PsbU se může na fotosystém II vázat i pokud je MSP nepřítomen (Eaton-Rye 2005).

Zatím není zcela jasné, jak se na fotosystém II sinice váží homology proteinů PsbP a PsbQ. Některé strukturální charakteristiky napovídají, že by mohly být vázány k membráně pomocí lipidové kotvy na N-konci (Thornton a kol. 2004). Thornton a kol. (2004) zjišťovali, v jakém stechiometrickém poměru jsou v izolovaných thylakoidních membránách sinice *Synechocystis* proteiny CP47 a homology PsbP a PsbQ. Homolog PsbQ byl přítomen přibližně ve stejném množství jako CP47, z čehož vyvodili, že je zřejmě vázán jednou na každém monomeru fotosystému II. Homolog PsbP byl přítomen v silně substechiometrickém množství – pouze 3 % množství CP47. Vzhledem k tomu, že tyto homology nejsou přítomny v modelu struktury fotosystému II sinice (Ferreira a kol. 2004; Loll a kol. 2005), jsou nejspíš oba k fotosystému II vázány jen volně. Thornton a kol. (2004) z toho mimo jiné vyvozují, že oba tyto homology budou mít nejspíš v sinicích regulační funkci, přičemž funkce homologu PsbP by mohla souviset se skládáním fotosystému II, a proto by nemusel být na fotosystém vázán trvale.

Jackson a kol. (2010) nedávno publikovali model struktury homologu PsbQ ze sinice *Synechocystis* získaný pomocí rentgenové krystalografie. Protože tomuto homologu chybí některé struktury, které jsou u PsbQ ze špenátu potřebné pro vazbu na fotosystém II, jeho způsob vazby na fotosystém II sinice bude pravděpodobně jiný (Jackson a kol. 2010).

#### **3.1.4.2 Interakce MSP vyšších rostlin a zelených řas**

Podle původního modelu vazby vnějších proteinů ve vyšších rostlinách měl MSP po navázání na fotosystém II vytvářet vazebné místo pro PsbP a ten po navázání zase pro PsbQ

(Miyao a Murata 1989; Suorsa a Aro 2007). Volně v roztoku spolu tyto proteiny neinteragují (Miyao a Murata 1989). Zásadní rysy tohoto modelu zůstávají zatím stejné. Překvapivý by se mohl zdát výsledek Yu a kol. (2006), kterým se povedlo pomocí chloridu rtuťnatého odpoutat z fotosystému II MSP, přičemž proteiny PsbP a PsbQ zůstaly navázány. Existují dohady, že chlorid rtuťnatý by mohl způsobit nepřirozenou vazbu PsbP a PsbQ na vnitřní podjednotky fotosystému (Suorsa a Aro 2007), lze to však vysvětlit i jinak. Bricker a Frankel (2003) už předtím navrhli, že by přítomnost PsbP a PsbQ po odstranění MSP nemusela nutně vylučovat nezbytnost MSP pro navázání PsbP a PsbQ. Protein PsbP by se mohl vázat zároveň na MSP a vnitřní podjednotky fotosystému II, popřípadě pouze na vnitřní podjednotky, přičemž navázaný MSP by ovlivňoval konformaci těchto vnitřních podjednotek tak, aby byly schopné PsbP primárně navázat. Při vazbě PsbP mohou proběhnout další konformační změny, díky kterým zůstane PsbP pevně navázán na vnitřní podjednotky fotosystému II i po odstranění MSP (Bricker a Frankel 2003).

Bricker a Frankel (2003) také ukázali, že pro vazbu PsbP jsou potřeba některé karboxylové skupiny na MSP. Ze strukturních dat lze vyvodit, že PsbP se váže na záporně nabitý povrch MSP svými konzervovanými kladně nabitými oblastmi (De Las Rivas a Roman 2005; De Las Rivas a kol. 2007).

Pro navázání PsbQ na fotosystém II vyšších rostlin je nezbytná předchozí vazba MSP a PsbP, zatím však není jasné, jestli se PsbQ váže na oba tyto proteiny, nebo jen na jeden. S MSP by mohl protein PsbQ interagovat pomocí elektrostatických sil mezi negativně nabitým povrchem  $\beta$ -soudkové domény MSP a kladně nabitým povrchem PsbQ, obdobně jako pravděpodobně interaguje MSP s PsbP (De Las Rivas a Roman 2005; De Las Rivas a kol. 2007).

Způsob vazby proteinů PsbP a PsbQ na fotosystém II zřejmě není v evoluci tak konzervován jako způsob vazby MSP, neboť v zelené řase *Chlamydomonas reinhardtii* se pravděpodobně všechny tři vnější proteiny OEC (MSP, PsbP a PsbQ) váží na fotosystém II nezávisle na sobě (Suzuki a kol. 2005).

## **3.2 Funkce MSP**

### **3.2.1 Stabilizace manganového klastru**

Hlavní role MSP v oxyfototrofních organismech vychází už z jeho názvu – stabilizace manganového klastru oxidujícího vodu (vyvíjejícího kyslík). Vzhledem k tomu, že MSP není s manganovým klastrem v přímém kontaktu (neposkytuje mu žádný ligand), alespoň podle struktury fotosystému II ze sinice (De Las Rivas a Barber 2004; Loll a kol. 2005), podílí se na

jeho stabilizaci nepřímo. Tato nepřímá stabilizace zřejmě zahrnuje změny prostředí v okolí manganového klastru. Můžou to být částečné změny v konformaci proteinů poskytujících ligandy pro atomy manganu a vápenatý kation – proteinů D1 a CP43 nebo lokální změny v dostupnosti některých iontů, případně i vody (Barber 2008; Yano a Yachandra 2008).

Mutantní sinice *Synechocystis* s nefunkčním genem pro MSP je schopná sestavovat fotosystém II a udržovat ho stejné množství jako nemutovaní jedinci, ale množství uvolňovaného kyslíku je podstatně sníženo, fotoautotrofní růst je pomalejší a jsou k němu potřeba zvýšené koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Cl}^-$  iontů. Kromě toho je tato sinice citlivější k vyšší ozáření (Burnap a Sherman 1991).

Oproti sinicím je pro fotoautotrofní růst vyšších rostlin a zelených řas MSP naprosto nezbytný. Mutantní buňky zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* postrádající MSP nemají sestavené fotosystémy II a nejsou schopny fotoautotrofního růstu (Mayfield a kol. 1987). V huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) je MSP kódován dvěma geny (rozebíráno níže). Po umlčení exprese obou těchto genů pomocí RNA interference nebyly rostliny schopné růst fotoautotrofně a byly u nich pozorovány poruchy v sestavování a stabilitě komplexů fotosystému II (Yi a kol. 2005).

V *in vitro* pokusech se k výzkumu fotosystému II používají fragmenty thylakoidních membrán. V takových podmínkách lze působením zvýšené koncentrace soli s jednomocnými kationty, například NaCl, odmyt z fotosystému II proteiny PsbP a PsbQ (Åkerlund a kol. 1982). Následně je možné odmyt i MSP, a to zvýšenou koncentrací soli s dvojmocnými kationty, například  $\text{CaCl}_2$  (Ono a Inoue 1983), nebo pomocí zvýšené koncentrace močoviny (Miyao a Murata 1984). Pokud v průběhu této procedury není v médiu dostatečná koncentrace  $\text{Cl}^-$ , dochází ke ztrátě dvou ze čtyř atomů manganu vázaných v OEC (Miyao a Murata 1984). V případě neporušeného manganového klastru jsou takto ošetřené fotosystémy II schopné vyvíjet kyslík pouze za zvýšených koncentrací nejen  $\text{Cl}^-$ , ale také  $\text{Ca}^{2+}$ , a i tak vykazují jen zhruba 20% aktivitu oproti intaktním fotosystémům II (Bricker 1992).

Díky těmto pozorováním se zdá, že MSP stabilizuje manganový klastr především ovlivňováním lokálních koncentrací chloridových aniontů a vápenatých kationtů.

De Las Rivas a Barber (2004) ze struktury fotosystému II sinice předpověděli, že nejdůležitější pro stabilizaci manganového klastru bude takzvaný DPKGR region MSP sinice, protože je fylogeneticky nejvíce konzervovaný a je lokalizován v těsné blízkosti manganového klastru (15–20 Å). To potvrzují i práce na špenátu. Popelková a kol. (2006) zjistili, že mutace plně konzervovaných argininů Arg151 a Arg161 (číslování ve špenátovém

MSP), které oba zahrnuje DPKGR region, snižují vývoj kyslíku na 20 %, respektive 40 %. Schopnost takto mutovaných proteinů vázat se na fotosystém II je ovlivněna jen slabě, schopnost zadržovat  $\text{Ca}^{2+}$  není ovlivněna vůbec, ale schopnost zadržovat  $\text{Cl}^-$  je podstatně snížena. Nedávná práce Popelkové a kol. (2009) navíc ukazuje, že mutace kyseliny asparagové Asp157 v DPKGR regionu MSP špenátu snižuje schopnost fotosystému II vyvíjet kyslík na 30 % oproti kontrole, i když není ovlivněna vazba MSP na fotosystém. I v tomto případě byla podstatně snížena schopnost MSP zadržovat chloridové anionty, kdežto schopnost zadržovat vápenaté anionty ovlivněna nebyla (Popelková a kol. 2009).

Mutantní MSP ze špenátu s různě dlouhými delecemi na N-konci (3–18 N-koncových aminokyselinových zbytků) vykazovaly podle stupně zkrácení postupně se snižující schopnost vazby na vnitřní podjednotky fotosystému II. Díky tomu měly také postupně sníženou schopnost zadržovat  $\text{Cl}^-$  a napomáhat vývoji kyslíku. Schopnost zadržovat  $\text{Ca}^{2+}$  se u nich nelišila (Popelková a kol. 2008).

### 3.2.2 Interakce s $\text{Ca}^{2+}$

Ädelroth a kol. (1995) pomocí radioaktivního vápenatého kationtu ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) ukázali, že odstranění MSP z fotosystému II znatelně ovlivňuje vazbu  $\text{Ca}^{2+}$ . V nepřítomnosti MSP bylo sníženo množství  $\text{Ca}^{2+}$  vázaného na fotosystém II a zvýšena rychlost jeho disociace. Odstranění MSP tedy pravděpodobně vede k narušení vazebného místa pro vápenaté kationty, nebo k odstranění bariéry, která brání rychlé výměně  $\text{Ca}^{2+}$  mezi OEC a okolním médiem (Ädelroth a kol. 1995).

Heredia a De Las Rivas (2003) a Kruk a kol. (2003) navrhli, že vápenatý kation je i součástí struktury MSP. Pomocí FTIR spektroskopie Heredia a De Las Rivas (2003) zjistili, že přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  mění konformaci MSP v roztoku na méně uspořádanou a snižuje jeho teplotní stabilitu. Kruk a kol. (2003) detekovali v MSP přítomnost jednoho nízkoafinitního vazebného místa pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Murray a Barber (2006) dokonce určili pravděpodobné místo vazby  $\text{Ca}^{2+}$  ve struktuře MSP sinice z anomálních difrakčních dat, které získali Ferreira a kol. (2004). Z těchto dat však není jasné, jestli se jedná o vápenaté kationty, nebo o kationty jiného kovu. Kromě toho ze tří aminokyselinových zbytků navrhovaných jako ligandy kationtu kovu je pouze jeden vysoce konzervovaný, jeden je konzervovaný méně a jeden je specifický pro sinici *Thermosynechococcus elongatus* (Murray a Barber 2006). Popelková a kol. (2008) se k významu vazby vápenatých kationtů na MSP staví skepticky a argumentují tím, že MSP je kyselý ( $\text{pI} = 5,2$ ), a tudíž negativní náboj na proteinu při fyziologickém pH může způsobovat nespecifickou vazbu dvojmocných kationtů.

### 3.2.3 Karbonátdehydratázová aktivita

Pro optimální oxidaci vody jsou zřejmě mimo jiné potřeba i hydrogenuhličitanové anionty. Jejich nutnost pro správnou funkci OEC, a tedy i nutnost karbonátdehydratázy (carbonic anhydrase), která je v dostatečné míře produkuje katalýzou reakce oxidu uhličitého a vody, prokázali u zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* Villarejo a kol. (2002). Lu a kol. (2005) ukázali, že u hrachu jsou s fotosystémem II asociovány dokonce dva zdroje karbonátdehydratázové aktivity, z nichž vnější, luminální, se nachází na MSP. Karbonátdehydratázová aktivita MSP je silně stimulována manganatými kationty, částečně také vápenatými kationty. MSP tedy zřejmě potřebuje  $Mn^{2+}$  jako kofaktor pro maximální karbonátdehydratázovou aktivitu (Lu a kol. 2005; Lu a Stemler 2007). Villarejo a kol. (2002) navrhuje, že by karbonátdehydratáza mohla také katalýzou zpětné reakce, při které reagují protony s  $HCO_3^-$  za vzniku vody a oxidu uhličitého, chránit OEC při nadměrném ozáření před přílišnou acidifikací odebráním protonů.

### 3.2.4 Předpokládaný kanál pro vodu a protony

Jednou z rolí, kterými MSP zajišťuje správnou funkci OEC, je zřejmě také podíl na tvorbě kanálu mezi lumenem thylakoidu a manganovým klastrem. Takový kanál by mohl zajišťovat kontrolovaný vstup substrátové vody k manganovému klastru, regulovat přístup různých dalších malých molekul a zajišťovat odvod produktů – protonů a kyslíku, aby bylo zabráněno nechtěným vedlejším reakcím (De Las Rivas a Barber 2004; Hillier a kol. 2001; Shutova a kol. 2007). Hillier a kol. (2001) ukázali, že odstraněním vnějších proteinů OEC (MSP, PsbP a PsbQ) se zpomalí výměna vody v katalytickém centru.

Ze známé struktury MSP sinice (Ferreira a kol. 2004; Loll a kol. 2005) je jasné, že hydrofilní kanál nemůže vést vnitřkem  $\beta$ -soudku, protože ten je plný hydrofobních postranních řetězců. Kanál zřejmě vede mezi MSP a vnitřními proteiny fotosystému II (De Las Rivas a Barber 2004).

Shutova a kol. (2007) identifikovali ve struktuře MSP sinice *Thermosynechococcus elongatus* skupinu karboxylových skupin, která je podle nich součástí hydrofilního kanálu či jakési hydrofilní kapsy a funguje jako „protonová anténa“ – váže protony uvolněné při oxidaci vody a rychle je delokalizuje na množství akceptorů, a tím zajišťuje možnost rychle přijímat další protony. Takovým způsobem pufruje vnitřní prostředí OEC a přenáší protony do lumina thylakoidu. Změny v konformaci MSP závislé na jeho protonaci by mohly hrát roli v regulaci transportu vody k manganovému klastru a protonů zpět (Shutova a kol. 2007).

Další modely umístění kanálů, založené na krystalografických strukturách MSP a fotosystému II sinice *Thermosynechococcus elongatus*, navrhli Murray a Barber (2007) a Ho a Styring (2008). Murray a Barber (2007) mají ve svém modelu tři kanály, Ho a Styring (2008) dokonce čtyři. Jeden z kanálů, který navrhli Ho a Styring, zahrnuje aminokyselinové zbytky z MSP, ale ty se liší od aminokyselinových zbytků, které navrhli Murray a Barber, a pouze jeden z nich je konzervovaný v evoluci MSP. Aminokyselinové zbytky účastnící se tvorby kanálů, které navrhli Murray a Barber, jsou více konzervované a částečně se shodují se zbytky s karboxylovými skupinami identifikovanými Shutovou a kol. (Williamson 2008).

Ve všech diskutovaných modelech se zúčastněné aminokyselinové zbytky na MSP nacházejí na flexibilních smyčkách. Vzhledem k tomu, že tyto modely byly vyvozeny ze statické struktury sinice, zůstává otázkou, jak se chovají *in vivo*, kde pravděpodobně může MSP měnit konformaci v průběhu reakčního cyklu oxidace vody a při změnách vnějších podmínek (Williamson 2008).

### 3.2.5 Thioredoxinová aktivita

Heide a kol. (2004) izolovali ze zelené řasy *Scenedesmus obliquus* protein o molekulové hmotnosti 28 kDa, který vykazoval thioredoxinovou aktivitu. Částečným sekvenováním zjistili, že se jedná o MSP nebo jeho homolog. Extrakcí z izolovaných thylakoidů potvrdili, že se v nich tento protein nachází. Zarážející je, že thioredoxinová aktivita tohoto proteinu se zdá být specifická pro aktivaci enzymů nacházejících se ve stromatu chloroplastů (Heide a kol. 2004).

Obdobný protein (vykazující thioredoxinovou aktivitu) se autorům podařilo vyizolovat také z řasy *Chlorella vulgaris*, ale ne z řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. MSP izolovaný ze špenátu thioredoxinovou aktivitu nevykazoval. Je otázkou, jestli je thioredoxinová aktivita MSP specifická pro některé zelené řasy, a jakou má funkci – jestli se MSP může nacházet i ve stromatu, aby reguloval aktivitu stromatálních enzymů (Heide a kol. 2004). Vzhledem k již zmíněné hypotéze redoxní regulace v luminu thylakoidů (Gopalan a kol. 2004) vyvstává také otázka, jestli by MSP nemohl regulovat aktivitu proteinů v luminu thylakoidů.

### 3.2.6 Vliv MSP na strukturu superkomplexu fotosystému II a světlosběrných komplexů

Jak už bylo zmíněno, ze struktury fotosystému II sinice (Ferreira a kol. 2004) bylo zjištěno, že MSP interaguje i s proteinem CP47 druhého monomeru dimerického komplexu fotosystému II (De Las Rivas a Barber 2004). Kromě toho také MSP „vyčnívá“ přes „okraj“ komplexu fotosystému II v místě, kde je u vyšších rostlin vázán trimerický hlavní

světloběrný komplex (Dekker a Boekema 2005). Elektronmikroskopická studie superkomplexů fotosystémů II a světloběrných komplexů vystavených různým podmínkám odhalila, že po odstranění MSP se zdatně mění struktura superkomplexu. Trimerický hlavní světloběrný komplex se posune asi o 0,9 nm a u mnoha superkomplexů se také přeskupí monomery fotosystémů (Boekema a kol. 2000). Z toho lze usuzovat, že MSP stabilizuje dimery fotosystému II a udržuje ve správné pozici trimerický hlavní světloběrný komplex (Boekema a kol. 2000; Dekker a Boekema 2005; De Las Rivas a Barber 2004).

### **3.2.7 GTPázová aktivita MSP**

Ač se dřív předpokládalo, že v luminu thylakoidů nejsou nukleotidy, Spetea a kol. (2004) u špenátu jejich přítomnost v luminu prokázali. Demonstrovali, že v thylakoidních membránách existuje transportní systém pro nukleotidy a uvnitř thylakoidů jsou proteiny, které je váží. Jedním z těchto proteinů je překvapivě MSP (Spetea a kol. 2004). GTP-vazebné místo MSP špenátu je pravděpodobně lokalizováno v  $\beta$ -soudkové doméně. Aminokyselinové zbytky zahrnuté do vazby GTP nejsou konzervovány mezi vyššími rostlinami, zelenými řasami a sinicemi, což je v souladu s pozorováními, že MSP zelených řas a sinic GTP neváže – tato aktivita je nejspíš specifická pro MSP vyšších rostlin (Lundin a kol. 2007b).

MSP špenátu má nízkou vnitřní GTPázovou aktivitu, která se ale přibližně patnáctkrát zvýší, pokud je MSP navázán na dimer fotosystému II. Hydrolyza GTP nejspíš změní konformaci smyčky mezi  $\beta$ -vlákny 1 a 2, která interaguje s proteinem CP47 druhého monomeru dimerického komplexu fotosystému II, což může vést k monomerizaci fotosystému a případně i k odpoutání MSP z fotosystému (Lundin a kol. 2007b).

### **3.2.8 Funkce MSP v degradaci poškozeného proteinu D1**

Během normální funkce fotosystému II a zejména za nadměrné ozáření dochází k poničení proteinu D1 oxidanty produkovanými v OEC, k takzvané fotoinhibici. Fotosystémy II s poškozenými proteiny D1 podstupují neustále probíhající opravný cyklus, který zahrnuje degradaci poničeného D1 a jeho nahrazení nově syntetizovaným proteinem. Tento opravný cyklus je mimo jiné regulován reverzibilní fosforylací některých podjednotek jádra fotosystému II (Aro a kol. 2005). Pokud není přítomný MSP, protein D1 není degradován a tvoří agregáty s proteiny CP43 a CP47 (Yamamoto a kol. 1998). Proto Yamamoto a kol. (1998) navrhli hypotézu, že by MSP mohl fungovat jako jakýsi chaperon zabraňující agregaci D1, a tím umožňující jeho degradaci.

Ve špenátu je k degradaci poškozeného D1 mimo jiné potřeba přítomnost GTP (Spetea a kol. 1999). Je tedy pravděpodobné, že s opravným cyklem D1 souvisí GTPázová aktivita MSP (Lundin a kol. 2007b). Ve shodě s tím je i zjištění, že při opravném cyklu se dimer fotosystému II rozpadá na monomery (což může být způsobeno změnou konformace MSP po hydrolýze GTP), které následně putují z granálních thylakoidních membrán do stromatálních oblastí, kde může dojít k výměně proteinu D1 (Dekker a Boekema 2005; Aro a kol. 2005).

Lundin a kol. (2007a) navrhuje, že by MSP mohl mít vliv i na defosforylaci proteinu D1 potřebnou k jeho degradaci.

### 3.3 Funkční rozdíly mezi izoformami MSP v huseníčku

Sekvenováním genomu huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) bylo zjištěno, že jeho genom obsahuje dva geny pro MSP, *psbO1* a *psbO2* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Oba geny jsou exprimovány a jejich produkty, izoformy MSP označované PsbO1 a PsbO2, se liší pouze 11 aminokyselinovými zbytky. PsbO1 se zdá být hlavní izoformou, protože v rostlině se jí nachází několikrát více než izoformy PsbO2 (Murakami a kol. 2005). Ač se primární struktura izoform jen málo liší, nedokáží se vzájemně plně nahradit. Oba mutanti s nefunkčním jedním nebo druhým genem vykazují jasné změny fenotypu. Mutant *psbO1* (postrádá izoformu PsbO1) vykazuje oproti nemutovaným rostlinám zpomalený růst, bledě zelené listy, zvýšenou náchylnost k fotoinhibici a častější výměnu poškozeného proteinu D1 (Murakami a kol. 2002; Lundin a kol. 2007a). Mutant *psbO2* roste rychleji než mutant *psbO1*, avšak pomaleji než nemutované rostliny a jeho listy jsou tmavě zelené. Kromě toho má poškozený cyklus degradace D1 a hůř se mu daří při dlouhodobém nadměrném ozáření (Lundin a kol. 2007a). Exprese izoform je vzájemně kontrolována, v obou mutantech došlo k navýšení množství zbylé izoformy (Murakami a kol. 2005; Lundin a kol. 2007a). V *in vitro* pokusech s navazováním jednotlivých izoform, exprimovaných v bakterii *Escherichia coli*, na fotosystém II bylo zjištěno, že obě izoformy se na fotosystém váží stejně dobře, ovšem produkce kyslíku v OEC je o něco vyšší v přítomnosti izoformy PsbO1 (Murakami a kol. 2005). Lundin a kol. (2008) zjistili, že izoforma PsbO2 má naopak přibližně třikrát vyšší GTPázovou aktivitu.

Tyto skutečnosti vyplývají v hypotézu, že izoforma PsbO1 slouží především k usnadňování funkce OEC (stabilizaci manganového klastru), kdežto izoforma PsbO2, které je v rostlinách huseníčku podstatně méně, má spíše regulační funkci potřebnou pro výměnu poškozeného proteinu D1 (Lundin a kol. 2007a; Lundin a kol. 2008; Allahverdiyeva a kol. 2009).



Možnost, že dvě rozdílné izoformy MSP jsou důležité i pro přizpůsobování různým vnějším podmínkám, je podpořena zjištěním, že při chladové aklimaci rostlin huseníčku se mění poměr zastoupení jednotlivých izoform v rostlině. Goulas a kol. (2006) zjistili, že při čtyřicetidenní kultivaci rostlin huseníčku při 5 °C stoupá v luminu thylakoidů množství izoformy PsbO2 a klesá množství izoformy PsbO1, což ale může opět souviset s relativně nadměrným ozářením a potřebou častější výměny proteinu D1.

Přestože ve špenátu, z hlediska fotosyntézy nejprozkoumanější vyšší rostlině, se nachází nejspíš pouze jedna izoforma MSP, zdá se, že ve většině alespoň částečně osekvenovaných vyšších rostlin, s výjimkou rýže, se nachází právě dvě izoformy MSP (Lundin a kol. 2007a; Duchoslav a Fischer, nepublikováno). Rozdíly v těchto izoformách mohou hrát významnou roli ve všech funkcích, které MSP vykonává, což pravděpodobně umožňuje rostlinám dobře se přizpůsobovat proměnlivým podmínkám prostředí. Vzhledem k tomu, že v luminu thylakoidů se nachází velké množství volných MSP schopných nasednutí na fotosystém II (Hashimoto a kol. 1996), je možné, že prostřednictvím výměny izoform může docházet i k velmi rychlému přizpůsobování aktivity fotosystému II.

## 4 Seznam použité literatury

- Ädelroth P, Lindberg K, Andréasson LE** (1995) Studies of Ca<sup>2+</sup> Binding in Spinach Photosystem II Using <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry* **34**: 9021-9027
- Åkerlund HE, Jansson C, Andersson B** (1982) Reconstitution of photosynthetic water splitting in inside-out thylakoid vesicles and identification of a participating polypeptide. *Biochimica et Biophysica Acta* **681**: 1-10
- Allahverdiyeva Y, Mamedov F, Holmstrom M, Nurmi M, Lundin B, Styring S, Spetea C, Aro EM** (2009) Comparison of the electron transport properties of the *psbO1* and *psbO2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1787**: 1230-1237
- Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamaki E** (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Journal of Experimental Botany* **56**: 347-356
- Barber J** (2003) Photosystem II: the engine of life. *Quarterly Reviews of Biophysics* **36**: 71-89
- Barber J** (2008) Crystal structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Inorganic Chemistry* **47**: 1700-1710
- Barber J, Murray JW** (2008) Revealing the structure of the Mn-cluster of photosystem II by X-ray crystallography. *Coordination Chemistry Reviews* **252**: 233-243
- Barros T, Kuhlbrandt W** (2009) Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1787**: 753-772
- Blankenship RE** (2002) Molecular Mechanisms of Photosynthesis. *Blackwell Science*, Oxford, UK
- Boekema EJ, van Breemen JFL, van Roon H, Dekker JP** (2000) Conformational changes in photosystem II supercomplexes upon removal of extrinsic subunits. *Biochemistry* **39**: 12907-12915
- Bricker TM** (1992) Oxygen Evolution in the Absence of the 33-Kilodalton Manganese-Stabilizing Protein. *Biochemistry* **31**: 4623-4628
- Bricker TM, Frankel LK** (2003) Carboxylate groups on the manganese-stabilizing protein are required for efficient binding of the 24 kDa extrinsic protein to photosystem II. *Biochemistry* **42**: 2056-2061
- Burnap RL, Sherman LA** (1991) Deletion Mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 Indicates That the Mn-Stabilizing Protein of Photosystem II Is Not Essential for O<sub>2</sub> Evolution. *Biochemistry* **30**: 440-446
- De Las Rivas J, Balsera M, Barber J** (2004) Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends in Plant Science* **9**: 18-25
- De Las Rivas J, Barber J** (2004) Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynthesis Research* **81**: 329-343
- De Las Rivas J, Heredia P, Roman A** (2007) Oxygen-evolving extrinsic proteins (PsbO,P,Q,R): Bioinformatic and functional analysis. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1767**: 575-582

- De Las Rivas J, Roman A** (2005) Structure and evolution of the extrinsic proteins that stabilize the oxygen-evolving engine. *Photochemical & Photobiological Sciences* **4**: 1003-1010
- Dekker JP, Boekema EJ** (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1706**: 12-39
- Eaton-Rye JJ** (2005) Requirements for different combinations of the extrinsic proteins in specific cyanobacterial Photosystem II mutants. *Photosynthesis Research* **84**: 275-281
- Enami I, Kamo M, Ohta H, Takahashi S, Miura T, Kusayanagi M, Tanabe S, Kamei A, Motoki A, Hirano M, Tomo T, Satoh K** (1998) Intramolecular cross-linking of the extrinsic 33-kDa protein leads to loss of oxygen evolution but not its ability of binding to photosystem II and stabilization of the manganese cluster. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 4629-4634
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S** (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**: 1831-1838
- Gopalan G, He Z, Balmer Y, Romano P, Gupta R, Heroux A, Buchanan BB, Swaminathan K, Luan S** (2004) Structural analysis uncovers a role for redox in regulating FKBP13, an immunophilin of the chloroplast thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13945-13950
- Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczkowski LA, Gardestrom P, Schroder W, Hurry V** (2006) The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *Plant Journal* **47**: 720-734
- Hankamer B, Morris E, Nield J, Carne A, Barber J** (2001a) Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *Febs Letters* **504**: 142-151
- Hankamer B, Morris E, Nield J, Gerle C, Barber J** (2001b) Three-dimensional structure of the photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **135**: 262-269
- Hashimoto A, Yamamoto Y, Theg SM** (1996) Unassembled subunits of the photosynthetic oxygen-evolving complex present in the thylakoid lumen are long-lived and assembly-competent. *Febs Letters* **391**: 29-34
- Heide H, Kalisz HM, Follmann H** (2004) The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *Journal of Plant Physiology* **161**: 139-149
- Heredia P, De Las Rivas J** (2003) Calcium-dependent conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR Spectroscopy. *Biochemistry* **42**: 11831-11838
- Hillier W, Hendry G, Burnap RL, Wydrzynski T** (2001) Substrate water exchange in photosystem II depends on the peripheral proteins. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 46917-46924
- Ho FM, Styring S** (2008) Access channels and methanol binding site to the CaMn<sub>4</sub> cluster in Photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1777**: 140-153

- Jackson SA, Fagerlund RD, Wilbanks SM, Eaton-Rye JJ** (2010) Crystal Structure of PsbQ from *Synechocystis* sp. PCC 6803 at 1.8 Å: Implications for Binding and Function in Cyanobacterial Photosystem II. *Biochemistry* **49**: 2765-2767
- Kern J, Renger G** (2007) Photosystem II: Structure and mechanism of the water : plastoquinone oxidoreductase. *Photosynthesis Research* **94**: 183-202
- Kruk J, Burda K, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K** (2003) The 33 kDa protein of photosystem II is a low-affinity calcium- and lanthanide-binding protein. *Biochemistry* **42**: 14862-14867
- Liu ZF, Yan HC, Wang KB, Kuang TY, Zhang JP, Gui LL, An XM, Chang WR** (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**: 287-292
- Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J** (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**: 1040-1044
- Lu YK, Stemler AJ** (2007) Differing responses of the two forms of photosystem II carbonic anhydrase to chloride, cations, and pH. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1767**: 633-638
- Lu YK, Theg SM, Stemler AJ** (2005) Carbonic Anhydrase Activity of the Photosystem II OEC33 Protein from Pea. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1944-1953
- Lundin B, Hansson M, Schoefs B, Vener AV, Spetea C** (2007a) The Arabidopsis PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein. *Plant Journal* **49**: 528-539
- Lundin B, Thuswaldner S, Shutova T, Eshaghi S, Samuelsson G, Barber J, Andersson B, Spetea C** (2007b) Subsequent events to GTP binding by the plant PsbO protein: Structural changes, GTP hydrolysis and dissociation from the photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1767**: 500-508
- Lundin B, Nurmi M, Rojas-Stuetz M, Aro EM, Adamska I, Spetea C** (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**: 405-414
- Lydakis-Simantiris N, Hutchison RS, Betts SD, Barry BA, Yocum CF** (1999) Manganese stabilizing protein of photosystem II is a thermostable, natively unfolded polypeptide. *Biochemistry* **38** : 404-414
- Mayfield SP, Bennoun P, Rochaix JD** (1987) Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo Journal* **6**: 313-318
- Miyao M, Murata N** (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**: 350-354
- Miyao M, Murata N** (1989) The Mode of Binding of 3 Extrinsic Proteins of 33-kDa, 23-kDa and 18-kDa in the Photosystem II Complex of Spinach. *Biochimica et Biophysica Acta* **977**: 315-321

- Murakami R, Ifuku K, Takabayashi A, Shikanai T, Endo T, Sato F** (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**: 138-142
- Murakami R, Ifuku K, Takabayashi A, Shikanai T, Endo T, Sato F** (2005) Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins PsbO1 and PsbO2. *Febs Journal* **272**: 2165-2175
- Murray JW, Barber J** (2006) Identification of a Calcium-Binding Site in the PsbO Protein of Photosystem II. *Biochemistry* **45**: 4128-4130
- Murray JW, Barber J** (2007) Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel. *Journal of Structural Biology* **159**: 228-237
- Nield J, Balsera M, Las Rivas J, Barber J** (2002) Three-dimensional electron cryo-microscopy study of the extrinsic domains of the oxygen-evolving complex of spinach – Assignment of the PsbO protein. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 15006-15012
- Nield J, Barber J** (2006) Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1757**: 353-361
- Nikitina J, Shutova T, Melnik B, Chernyshov S, Marchenkov V, Semisotnov G, Klimov V, Samuelsson G** (2008) Importance of a single disulfide bond for the PsbO protein of photosystem II: protein structure stability and soluble overexpression in *Escherichia coli*. *Photosynthesis Research* **98**: 391-403
- Ohta H, Suzuki T, Ueno M, Okumura A, Yoshihara S, Shen JR, Enami I** (2003) Extrinsic proteins of photosystem II - An intermediate member of the PsbQ protein family in red algal PSII. *European Journal of Biochemistry* **270**: 4156-4163
- Olson JM, Blankenship RE** (2004) Thinking about the evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research* **80**: 373-386
- Ono TA, Inoue Y** (1983) Mn-preserving extraction of 33-kDa, 24-kDa and 16-kDa proteins from O<sub>2</sub>-evolving PSII particles by divalent salt-washing. *Febs Letters* **164**: 255-260
- Popelková H, Betts SD, Lydakis-Symantiris N, Im MM, Swenson E, Yocum CF** (2006) Mutagenesis of basic residues R151 and R161 in manganese-stabilizing protein of photosystem II causes inefficient binding of chloride to the oxygen-evolving complex. *Biochemistry* **45**: 3107-3115
- Popelková H, Commet A, Kuntzleman T, Yocum CF** (2008) Inorganic Cofactor Stabilization and Retention: The Unique Functions of the Two PsbO Subunits of Eukaryotic Photosystem II. *Biochemistry* **47**: 12593-12600
- Popelková H, Commet A, Yocum CF** (2009) Asp157 Is Required for the Function of PsbO, the Photosystem II Manganese Stabilizing Protein. *Biochemistry* **48**: 11920-11928
- Popelková H, Im MM, D'Auria J, Betts SD, Lydakis-Simantiris N, Yocum CF** (2002) N-terminus of the photosystem II manganese stabilizing protein: Effects of sequence elongation and truncation. *Biochemistry* **41**: 2702-2711
- Popelková H, Wyman A, Yocum C** (2003) Amino acid sequences and solution structures of manganese stabilizing protein that affect reconstitution of Photosystem II activity. *Photosynthesis Research* **77**: 21-34

- Rumpho ME, Worful JM, Lee J, Kannan K, Tyler MS, Bhattacharya D, Moustafa A, Manhart JR** (2008) Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene *psbO* to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 17867-17871
- Schurmann P, Jacquot JP** (2000) Plant Thioredoxin Systems Revisited. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 371-400
- Seidler A** (1996) The extrinsic polypeptides of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1277**: 35-60
- Shutova T, Klimov VV, Andersson B, Samuelsson G** (2007) A cluster of carboxylic groups in PsbO protein is involved in proton transfer from the water oxidizing complex of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1767**: 434-440
- Shutova T, Nikitina J, Deikus G, Andersson B, Klimov V, Samuelsson G** (2005) Structural dynamics of the manganese-stabilizing protein - Effect of pH, calcium, and manganese. *Biochemistry* **44**: 15182-15192
- Spetea C, Hundal T, Lohmann F, Andersson B** (1999) GTP bound to chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced, multienzyme degradation of the photosystem II D1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6547-6552
- Spetea C, Hundal T, Lundin B, Heddad M, Adamska I, Andersson B** (2004) Multiple evidence for nucleotide metabolism in the chloroplast thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1409-1414
- Standfuss R, van Scheltinga ACT, Lamborghini M, Kuhlbrandt W** (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *Embo Journal* **24**: 919-928
- Suorsa M, Aro EM** (2007) Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynthesis Research* **93**: 89-100
- Suzuki T, Ohta H, Enami I** (2005) Cross-reconstitution of the extrinsic proteins and Photosystem II complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Spinacia oleracea*. *Photosynthesis Research* **84**: 239-244
- Svensson B, Tiede DM, Barry BA** (2002) Small-angle X-ray scattering studies of the manganese stabilizing subunit in photosystem II. *Journal of Physical Chemistry B* **106**: 8485-8488
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- The UniProt Consortium** (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Research* **38**: D142-D148
- Thornton LE, Ohkawa H, Roose JL, Kashino Y, Keren N, Pakrasi HB** (2004) Homologs of plant PsbP and PsbQ proteins are necessary for regulation of photosystem II activity in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Cell* **16**: 2164-2175
- Villarejo A, Shutova T, Moskvina O, Forssen M, Klimov VV, Samuelsson G** (2002) A photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution. *Embo Journal* **21**: 1930-1938

- Williamson AK** (2008) Structural and functional aspects of the MSP (PsbO) and study of its differences in thermophilic versus mesophilic organisms. *Photosynthesis Research* **98**: 365-389
- Yamamoto Y, Ishikawa Y, Nakatani E, Yamada M, Zhang HM, Wydrzynski T** (1998) Role of an extrinsic 33 kilodalton protein of photosystem II in the turnover of the reaction center-binding protein D1 during photoinhibition. *Biochemistry* **37**: 1565-1574
- Yano J, Kern J, Irrgang KD, Latimer MJ, Bergmann U, Glatzel P, Pushkar Y, Biesiadka J, Loll B, Sauer K, Messinger J, Zouni A, Yachandra VK** (2005) X-ray damage to the Mn<sub>4</sub>Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12047-12052
- Yano J, Yachandra VK** (2008) Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca cluster from X-ray spectroscopy. *Inorganic Chemistry* **47**: 1711-1726
- Yi XP, McChargue M, Laborde S, Frankel LK, Bricker TM** (2005) The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 16170-16174
- Yu H, Xu XZ, Britt RD** (2006) The 33 kDa protein can be removed without affecting the association of the 23 and 17 kDa proteins with the luminal side of PSII of spinach. *Biochemistry* **45**: 3404-3411

