

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

НИЯ ЗЛАТКОВА ПЕТРОВА

**СТРУКТУРНА СТАБИЛНОСТ И МЕЖДУМОЛЕКУЛНИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВНИТЕ СВЕТОСЪБИРАЩИ
КОМПЛЕКСИ В ТИЛАКОИДНИ МЕМБРАНИ НА ВИСШИ РАСТЕНИЯ
И ЦИАНОБАКТЕРИИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

Професионално направление: „Биологически науки“ (шифър 4.3)

Научна специалност: „Биофизика“

Научен ръководител: проф. д-р Сашка Крумова

Научен консултант: проф. дбн Стефка Г. Танева

София, 2019 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. УВОД	1
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	2
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	
<i>III. 1. Растителен материал и клетъчни култури</i>	3
III. 1.1. Отглеждане на грахови растения	3
III. 1.2. Култивиране на <i>Synechocystis</i> PCC6803 див тип и мутанти	3
<i>III.2. Изолиране и третиране на тилакоидни мембрани от грах</i>	3
<i>III.3. Изолиране на фикобилизоми от див тип и мутант СК на <i>Synechocystis</i> PCC6803</i>	4
<i>III.4. Абсорбционна спектроскопия</i>	4
<i>III.5. Методи, приложени за структурно и функционално характеризиране на фотосинтетичния апарат в изолирани тилакоиди и фикобилизоми, цели клетки от цианобактерии и интактни листа на висши растения</i>	4
III.5.1. Изследване на флуидността на липидите в интактни и разстиковани тилакоиди	4
III.5.2. Диференциална сканираща калориметрия	5
III.5.3. Кръгов дихроизъм	5
III.5.4. JIP-тест	5
III.5.5. Нискотемпературна (77K) флуоресценция	6
IV. РЕЗУЛТАТИ	
<i>IV.1. Роля на архитектурата на тилакоидните мембрани за термодинамичните свойства на CCK2 и функционалните характеристики на фотосинтетичния апарат на висши растения</i>	7
IV.1.1. Ефект на степента на стикване върху структурната стабилност на тилакоидните мембрани	7
IV.1.1.1. Хлорофилно съдържание на интактни тилакоидни мембрани и изолирани гранални фрагменти	7
IV.1.1.2. Кръгов дихроизъм на интактни и разстиковани тилакоиди	8
IV.1.1.3. Диференциална сканираща калориметрия на стиковани и разстиковани тилакоиди	11
IV.1.1.4. Флуидност на липидния матрикс при стиковани и разстиковани тилакоиди	15
IV.1.2. Ефект на степента на стикване на тилакоидните мембрани върху функционалността на фотосинтетичния апарат	16

IV.1.2.1. Нискотемпературна флуоресценция на интактни и разстиковани тилакоидни мембрани	16
IV.1.2.2. Индукционни криви на флуоресценция и JIP-тест на изолирани интактни и разстиковани тилакоиди	17
IV.1.2.3. Индукционни криви на флуоресценция и OJIP-тест на интактни грахови растения, адаптирани към нисък светлинен интензитет	19
IV.2. Термодинамични свойства на фикобилизоми при <i>Synechocystis</i> PCC6803	21
IV.2.1. 77K флуоресценция на изолирани фикобилизоми	21
IV.2.2 Температурна зависимост на абсорбционните спектри на изолирани фикобилизоми и цели клетки <i>Synechocystis</i> PCC6803 от див тип и мутант СК	22
IV.2.3. Диференциална сканираща калориметрия на изолирани фикобилизоми от автотрофно отглеждани клетки <i>Synechocystis</i> див тип и мутанта СК	23
IV.2.4. Диференциална сканираща калориметрия на интактни клетки от <i>Synechocystis</i> PCC6803 див тип и мутантни форми	24
IV.2.4.1. Термодинамично характеризирание на интактни клетки от <i>Synechocystis</i> PCC6803: фотоавтотрофно отглеждан WT и мутант СК	24
IV.2.4.2. Термодинамично характеризирание на интактни клетки <i>Synechocystis</i> PCC6803: фотомиксотрофно отглеждан див тип и мутанти, при които липсват фикобилизоми и/или ФС1 и ФС2	25
V. ДИСКУСИЯ	
V.1. Връзка между архитектурата на тилакоидните мембрани и термодинамичните и функционални характеристики на фотосинтетичния апарат на висши растения	28
V.2. Идентифициране на термодинамичния преход, отразяващ денатурацията на фикобилизомите при <i>Synechocystis</i> PCC6803. Установяване на фактори, които определят температурната стабилност на фикобилизомите.	32
VI. ИЗВОДИ	35
VII. ПРИНОСИ	36
VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	37
IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ	38
X. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА	39

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

GP	обща поляризация
LL	нисък светлинен интензитет
LS	тилакоидни мембрани, изолирани от грахови растения, адаптирани към нисък светлинен интензитет
LU	разстиковани LS тилакоидни мембрани
MC540	мероцианин 540
ML	умерен светлинен интензитет
MS	тилакоидни мембрани, изолирани от грахови растения, адаптирани към умерен светлинен интензитет
MU	разстиковани MS тилакоидни мембрани
OD	оптична плътност
PQ	пластохинон
β-DM	β-додецил малтозид
АТФ	аденозинтрифосфат
ДГДГ	дигалактозилдиацилглицерол
ДСК	диференциална сканираща калориметрия
ЕДТА	етилендиаминтетраоцетна киселина
ЕТВ	електрон-транспортна верига
КД	кръгов дихроизъм
МГДГ	моногалактозилдиацилглицерол
НАДФ⁺	никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (окислена форма)
РЦ	реакционен център
ССК1	светосъбиращ комплекс на фотосистема 1
ССК2	светосъбиращ комплекс на фотосистема 2
ФС1	фотосистема 1
ФС2	фотосистема 2
ФСА	фотосинтетичен апарат
хл.	хлорофил

I.УВОД

Натрупаните през последните години данни за функционалните взаимовръзки между пигмент-белтъчните комплекси, изграждащи фотосинтетичния апарат (ФСА) на висшите растения, за пътищата на пренос на енергия на възбуждане и нейната дисипация, убедително надграждат върху приетата като класическа идея, че светосъбиращият комплекс 2 (ССК2) има основна функция да пренася енергия на възбуждане към фотосистема 2. По-задълбочените и детайлни проучвания на адаптационните механизми на фотосинтетичния апарат при променящи се светлинни условия все повече разкриват глобалната роля на ССК2 като компонент, който интегрира и съгласува работата на пигмент-белтъчните комплекси. За да осъществява тази своя функция, ССК2 взаимодейства физически и функционално с други компоненти на фотосинтетичния апарат и променя състоянието си на олигомеризация. На свой ред, тези структурно-функционални превключвания на ССК2 са в тясна, но все още не напълно изяснена, връзка със специфични фактори от неговото микрообкръжение във фотосинтетичните мембрани.

Аналогично, съвременни изследвания върху структурните промени и функционалното поведение на основните светосъбиращи комплекси при цианобактерии, фикобилизомите, при различни светлинни условия демонстрират ролята им на регулатор на потоците на енергия на възбуждане във фотосинтетичния апарат. Благодарение на динамични промени във взаимодействието им с други пигмент-белтъчни комплекси, фикобилизомите поддържат и балансират работата на фотосинтетичния апарат в условия на стрес.

Настоящият дисертационен труд цели да допринесе за по-доброто разбиране на промените, настъпващи в структурната стабилност на ССК2 и фикобилизомите при протичане на адаптационни механизми, включващи промяна на междумолекулните взаимодействия, осъществявани с тяхно участие.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

В последните години са натрупани все повече доказателства за това, че формирането на грани и съотношението на количеството гранални и стромални мембранны области е важен регулаторен елемент от реакцията на растенията към промени в условията на околната среда. Изследвани са редица фактори, които модулират триизмерната организация на тилакоидите, но за момента се знае недостатъчно за връзката между архитектурата на тилакоидите и структурната стабилност на компонентите на фотосинтетичния апарат, която има съществена роля за осъществяването на неговата светосъбираща и регулаторна функция. Въпреки че при цианобактериите и други фотосинтетични организми сегрегиране на тилакоидната мембрана в гранални и агранални области не се наблюдава, те също проявяват специфична структурна организация по отношение на подредбата и олигомеризацията на фотосистемите.

Целта на настоящата работа е да се изследва задълбочено корелацията между специфичната архитектура на ФСА при висши растения и цианобактерии, и структурната стабилност на техните основни светосъбиращи комплекси (ССК2 и фикобилизомите).

За постигането на тази цел бяха формулирани следните конкретни задачи:

1. Изследване на степента на стиковане на мембраните, като фактор, който повлиява стабилността на ССК2 чрез модулиране на протеин-протеин и протеин-липидните взаимодействия на комплекса, и контролира функционалността на фотосинтетичния апарат.
2. Прилагане на калориметричен подход за изследване на структурната стабилност на фикобилизоми в интактни клетки на цианобактерии. Установяване на ролята на структурната организация и протеиновия състав на тилакоидните мембрани и физическото взаимодействие между фикобилизомите и фотосистемите за структурната цялост на тези антенни комплекси.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

III. 1. Растителен материал и клетъчни култури

III. 1.1. Отглеждане на грахови растения

Грахови растения (*Pisum sativum*) сорт RAN1 бяха отглеждани хидропонно при светлинен режим 16 ч. нощ/8 ч. ден, температура 23 °C и осветяване с интензитет 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (умерен светлинен интензитет, ML) или 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (нисък светлинен интензитет, LL), осигурено от LED източник с цветна температура 6500K.

III. 1.2. Култивиране на *Synechocystis* PCC6803 див тип и мутанти

Клетки от *Synechocystis* PCC6803 бяха култивирани в среда BG11, съдържаща 5 mM HEPES-Na (Allen 1968) при температура 30 °C и разклащане със скорост 100 rpm. Дивият тип и мутантите CK (не образува фикоцианинови пръчици, Thomas et al. 2006) и PAL (не формира фикобилизоми, Ajlani and Vernotte 1998) бяха отглеждани фотоавтотрофно (без добавена глюкоза към средата) на бяла светлина с интензитет 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Див тип *Synechocystis* PCC6803 беше отглеждан също и фотомиксотрофно. Мутантите BE (не притежава фикобилизоми и функционална FC2, Krutova et al. 2010b) и $\text{PSI}^-/\text{ArcE}^-$ (няма FC1, а фикобилизоми не се свързват с тилакоидната мембрана, Shen et al. 1993) бяха отглеждани фотохетеротрофно (в среда, съдържаща 10 mM глюкоза) при светлинен интензитет 7 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Мутантът PSII^- (не притежава FC2, Vermaas et al. 1988; Bittersmann and Vermaas 1991) бе култивиран във фотохетеротрофни условия, но при 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Мутантите PAL, BE, и CK бяха любезно предоставени от Ghada Ajlani (Institut de Biologie et de Technologies de Saclay, Франция), а $\text{PSI}^-/\text{ArcE}^-$ и PSII^- бяха осигурени от Wim Vermaas (Arizona State University, САЩ).

За определяне на концентрацията на протеин в интактни клетки бе приложена процедура, описана в Yeang et al. (1995).

III.2. Изолиране и третиране на тилакоидни мембрани от грах

Тилакоидни мембрани от грахови растения бяха изолирани, следвайки процедурата на Harrison and Melis (1992). Изолираните тилакоиди бяха ресуспендирани и (освен ако не е оказано друго) изследвани в буфер, съдържащ 20 mM трицин (pH 7.6), 250 mM сорбитол, 5 mM MgCl_2 .

За проследяване на ефекта на ниско pH върху биофизичните характеристики на тилакоидни мембрани, изолирани от грахови растения, отглеждани при оптимален светлинен интензитет, пробите бяха двукратно промити в буфер със съдържание: 20 mM MES (pH 5.2), 250 mM сорбитол, 5 mM MgCl_2 .

За индуциране на разстиковане, интактните тилакоидни мембрани бяха третирани по модифициран вариант на процедурата, описана в Kirchhoff et al. (2007a) и ресуспендирани в разстиковаш буфер: 15 mM HEPES-Na (pH 7.6), 5 mM KCl, 0.5 mM ЕДТА.

С цел дезагрегиране на евентуално формирани агрегати от CCK2 и/или фотосистема 1 (FC1)-CCK2 суперкомплекси, разстиковани тилакоиди бяха третирани с 0.1% от нейлонния детергент β -додецил малтозид (DM) по процедура, описана в Lambrev et al. (2007).

За определяне на относителното съдържание на грани в тилакоидните мембрани бе приложен метод, описан от Chow et al. (1980).

III.3. Изолиране на фикобилизоми от див тип и мутанта СК на *Synechocystis* PCC6803

При изолирането на фикобилизоми от фотоавтотрофно отглеждан див тип и мутант СК на *Synechocystis* бе следван протокол, описан от Garnier et al (1994). Изолираните фикобилизоми бяха съхранявани и изследвани в буферна среда, съдържаща 750 mM NaKPO₄ (pH 7.0) и 0.75 M (див тип) или 0.5 M захароза (СК).

За получаване на фикобилизоми с нарушена структура те бяха подложени на неколкостепенно последователно замразяване и размразяване.

Отглеждането на изброените щамове *Synechocystis* PCC6803 и изолирането на фикобилизоми беше проведено в Института по растителна биология, Център за биологични изследвания, Унгарска академия на науките, гр. Сегед, Унгария.

Концентрацията на протеин във фикобилизомните суспензии бе определена спектрофотометрично при 595 nm по метода на Bradford (Bio-Rad).

III.4. Абсорбционна спектроскопия

За определяне на концентрацията на хлорофил (хл.) в суспензиите от изолирани тилакоиди, бяха регистрирани абсорбционните спектри на пигментни екстракти, извлечени с 80% ацетон (при 4 °C), със спектрофотометър Specord 210 Plus (Analytik Jena, Edition 2010) в интервала 400 - 750 nm, с процеп 2 nm, стъпка 0.5 nm и скорост 10 nm.s⁻¹. Хлорофилната концентрация бе определена по метода на Arnon (1949). При същите условия бяха измерени и абсорбционните спектри на температурно третирани интактни клетки *Synechocystis* и изолирани фикобилизоми. Клетките и фикобилизомите бяха нагрявани постепенно между 20 и 80 °C със стъпка 5 °C и 3-минутна инкубация в термостатична водна баня на всяка стъпка. Фикобилизомите бяха с концентрация 0.07 mg протеин.ml⁻¹, а клетъчните култури с OD₆₈₀ = 0.4.

III.5. Методи, приложени за структурно и функционално характеризиране на фотосинтетичния апарат в изолирани тилакоиди и фикобилизоми, цели клетки от цианобактерии и интактни листа на висши растения

III.5.1. Изследване на флуидността на липидите в интактни и разстиковани тилакоиди

Степента на флуидност на тилакоидните мембрани бе изследвана с помощта на два флуоресцентни маркера – мероцианин 540 (MC540) и лаурдан. Стиковани и разстиковани тилакоиди с концентрация 15 µg хл.ml⁻¹ бяха инкубирани за 30 мин. на стайна температура с 0.2 µM MC540 или 30 µM лаурдан.

Инкорпориранте на MC540 в тилакоидните мембрани бе изследвано, както е описано в Krumova et al. (2008).

От емисионните спектри на лаурдана беше изчислена обща поляризация (GP) на флуоресценцията на багрилото в средата на тилакоидната мембрана (Szilagyi et al. 2008).

Емисионните и екситационни спектри на двете багрила бяха измерени с LS-50B Perkin Elmer luminescence спектрометър в Института по кристалография при БАН с помощта на проф. Б. Шивачев.

III.5.2. Диференциална сканираща калориметрия

Термограмите на тилакоидни мембрани, интактни клетки на див тип и мутантни линии *Synechocystis* PCC6803, както и фикобилизоми, изолирани от мутанта СК и див тип бяха измерени с помощта на калориметър DASM-4 (Пушчино, Русия).

ДСК измерванията на тилакоидни суспензии с концентрация 1.0-1.3 mg хл.ml⁻¹ бяха осъществени в температурен интервал 30 °C – 110 °C и скорост на сканиране варираща в интервала 0.5 – 1 °C.min⁻¹ при различните експерименти.

Термограми на клетъчни култури на *Synechocystis* PCC6803 в среда BG11 с концентрация 3–7 mg протеин.ml⁻¹ и фикобилизоми с концентрация 2-4 mg протеин.ml⁻¹ в 0.75 M фосфатен буфер, съдържащ още 0.75 M (див тип) или 0.50 M захароза (мутант СК), 1 mM бензамидин и 1 mM ЕДТА, бяха регистрирани в температурния интервал 20 °C - 120 °C със скорост на нагряване 0.5 - 1 °C.min⁻¹.

Софтуерната обработка на термограмите беше проведена с Origin 8.1.

III.5.3. Кръгов дихроизъм

Спектри на КД на интактни, разстиковани и третиран с β-DM тилакоиди с концентрация 15 μg хл. ml⁻¹ бяха регистрирани с помощта на дихрограф Jobin Yvon CD6 в интервала 400-750 nm със стъпка 1 nm, време за интегриране 0.5 s и 2 nm процеп.

Беше определен интензитетът на следните ивици: (+)694 nm (КД₆₉₄-КД₇₅₀), (-)679 (КД₇₅₀-КД₆₇₉), (+)483 nm/(-)473 nm (КД₄₈₃-КД₄₇₃), (+)444 nm/(-)436 nm (КД₄₄₄-КД₄₃₆), (+)506 (КД₅₀₆-КД₆₂₀), (-)657/630 nm (КД₆₃₀-КД₆₅₇).

За определяне на температурната стабилност на гореизброените ивици, тилакоидните суспензии бяха нагрявани на водна баня за 5 мин при температури от 20 до 80 °C със стъпка 5 °C; в последствие техните КД спектри бяха записвани при стайна температура. Бе изчислена температурата, при която съответната ивица достига 50% от интензитета си при 25 °C (T_m^{КД}).

III.5.4. JIP-тест

Индукцията на флуоресценцията на хл. *a* при тъмнинно адаптирани интактни листа и изолирани нетретиран и разстиковани тилакоиди беше записана с помощта на Multifunctional Plant Efficiency Analyzer (M-PEA), разработен от Hansatech Instruments Ltd. (King's Lynn, UK). Осветяването на пробите беше извършено чрез LED източник, излъчващ 4000 μmol. s⁻¹.m⁻² с дължина на вълната 620 nm. Хлорофилната флуоресценция на интактни листа бе записана в продължение на 1 s, а тази при изолирани тилакоиди – за 120 s. За изчисляване на относителното съдържание на реакционни центрове на фотосистема 2 (ФС2) от тип α, β и γ, преди регистриране на кривите на флуоресценция, тилакоидите бяха инкубирани за 30 min с 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилурея (диурон) с крайна концентрация 3.5×10⁻⁵ mM. Индукционните криви на тилакоидите третиран с диурон бяха записвани в продължение на 1 s.

Бях определени следните OJIP-параметри (по Strasser et al. 2004 и Goltsev et al. 2016):

- F₀ – минимално ниво на флуоресценцията (регистрирано обикновено при 20 μs);
- F_M – максимален интензитет на флуоресценцията (в точка P);
- съотношението F_M/ F₀;

- $F_V/F_0 = (F_M - F_0)/F_0$, съотношение между фотохимичното и нефотохимичното гасене на хлорофилната флуоресценция;
- M_0 – наклон на индукционната крива на флуоресценция в $t=0$: $M_0=4(F_{300\mu s} - F_0)/F_V$, този параметър дава представа за максималната скорост на редукция на Q_A веднага след осветяване на пробата.
- RC/CS_0 – брой активни реакционни центрове (РЦ) за единица площ;
- ABS/RC – големина на ефективната светосъбираща антена, която обслужва един активен РЦ и е индикатор за това каква част от хлорофилните молекули играят ролята на РЦ;
- DI_0/RC – количеството енергия, освобождавано от един РЦ под формата на топлина, флуоресценция или чрез насочване към ФС1;
- RE_0/RC – поток електрони, които преминават през активен РЦ на ФС2 и достигат крайните акцептори на ФС1;
- ψ_{E_0} – ефективност, с която екситон, погълнат от РЦ, пренася електрони по електрон транспортната верига (ЕТВ) след Q_A ;
- δ_{R_0} – вероятност електрон, който се намира върху преносител между ФС2 и ФС1, да достигне крайните акцептори на ФС1;
- PI_{total} – индекс на общата производителност на ФС1, ФС2 и фотосинтетичната ЕТВ;
- $\varphi_{P_0} (=F_V/F_M)$ – максимален квантов добив на първичната фотохимична реакция във ФС2 и P2G – способност за функционално групиране (пренос на енергия) между ФС2.

Измерванията на индукционни криви на бърза флуоресценция върху изолирани тилакоиди и интактни растения бяха проведени в катедра Биофизика и радиобиология към Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

III.5.5. Нискотемпературна (77K) флуоресценция

Нискотемпературната флуоресценция при интактни, разстиковани и третирани с β -DM тилакоиди, както и на изолирани фикобилизоми от див тип и мутанта СК, бяха измерени с помощта на спектрофлуориметър Fluorolog (Jobin Yvon Horiba).

Тилакоидните суспензии бяха отложени върху филтърна хартия (с крайна концентрация от $200 \mu g \text{ хл. cm}^{-2}$) и замразени в течен азот. Емисионните спектри на хлорофилната флуоресценция бяха регистрирани в интервала 615 - 800 nm при възбуждане при 472 nm, съответно 7 и 3 nm екситационен и емисионен процеп, и време за интегриране 1 s.

За регистриране на емисионните спектри на флуоресценция на интактни фикобилизоми и такива с нарушена структура беше приложено възбуждане при 590 nm и детектиране между 615 и 800 nm, с емисионен процеп 2 nm и време за интегриране 4 s.

Измерванията на нискотемпературна флуоресценция на фикобилизоми и тилакоиди бяха проведени в Института по растителна биология, Център за биологични изследвания, Унгарска академия на науките, гр. Сегед, Унгария.

IV. РЕЗУЛТАТИ

IV.1. Роля на архитектурата на тилакоидните мембрани за термодинамичните свойства на CCK2 и функционалните характеристики на ФСА на висши растения

За да се установи връзка между 3D организацията на тилакоидните мембрани, температурната стабилност на CCK2 и ефективността на фотосинтетичния апарат на висши растения бяха изследвани:

- Интактни грахови растения, адаптирани към умерен светлинен интензитет, и тилакоидни мембрани, изолирани от тях (MS тилакоиди);
- Интактни грахови растения, адаптирани към нисък светлинен интензитет и тилакоиди, изолирани от тях (LS тилакоиди);
- *in vitro* разстиковани тилакоидни мембрани от грах, отглеждан при умерен (MU) и нисък (LU) светлинен интензитет;
- MS тилакоидни мембрани, инкубирани в среда с pH 5.2 (MS pH 5.2 тилакоиди).

IV.1.1. Ефект на степента на стикование върху структурната стабилност на тилакоидните мембрани

IV.1.1.1. Хлорофилно съдържание на интактни тилакоидни мембрани и изолирани гранални фрагменти

Спектрофотометричното определяне на хлорофилното съдържание в ацетонови екстракти от суспензии на интактни стиковани тилакоиди, адаптирани към умерена и ниска светлина, очаквано показва понижение на съотношението хл. *a/b* при LS тилакоидите с 5.5% в сравнение с MS мембраните, както показват резултати в голям брой научни публикации (Lichtenthaler et al. 1982a, b ; Kirchhoff et al. 2007b; Kouřil et al. 2013). В съответствие с литературните данни този резултат е индикация за повишено съдържание на CCK2 в тилакоидите, адаптирани към нисък светлинен интензитет.

Като показател за степента на образуване на грани при тилакоидните мембрани, адаптирани към двата типа условия, беше използвано съотношението между хлорофилното съдържание на мембранните суспензии преди и след третиране с детергента дигитонин (Chow et al. 1980). В потвърждение на по-стари трудове (Lichtenthaler et al. 1982a, b), бе установено, че докато при MS тилакоидите около 32% от хлорофилните молекули са разположени в граните, при LS пробите този показател е значително (с около 37%) по-висок (Таблица 1), демонстрирайки повишено гранообразуване при тилакоидите, изолирани от растения, адаптирани към нисък светлинен интензитет.

Таблица 1 Съотношение между концентрациите на хл. *a* и хл. *b* (хл. *a/b*) в интактни стиковани тилакоиди, отглеждани при различен светлинен интензитет, и хлорофилно съдържание на изолирани от тях грани (изразено като процент от общото количество хлорофил в тилакоидите). Средни стойности $\pm$ стандартно отклонение, $n=3$ * обозначава статистически значими разлики спрямо MS тилакоиди според тест на Стюdent при $p=0.05$

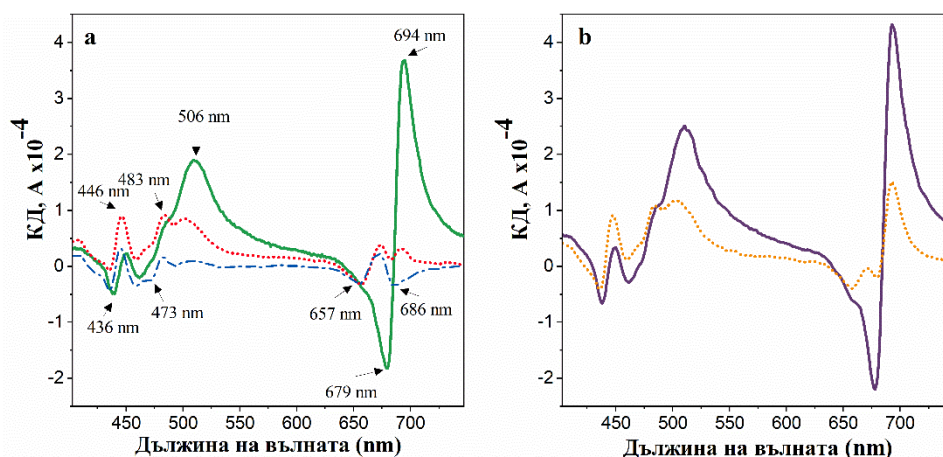
Светлинни условия	хл. <i>a/b</i>	% хл. в граните
MS	2.69 ± 0.01	32.0 ± 1.4
LS	$2.55^* \pm 0.06$	$43.8^* \pm 1.1$
MS pH 5.2	2.67 ± 0.01	$54.9^* \pm 2.7$

Ресуспендирането на MS тилакоиди в среда с pH 5.2 води до още по-значително увеличение на количеството на граните, с около 70% (Таблица 1). Този резултат съответства на публикуваното от Semenova (2002) и Goss et al. (2007).

IV.1.1.2. Кръгов дихроизъм на интактни и разстиковани тилакоиди

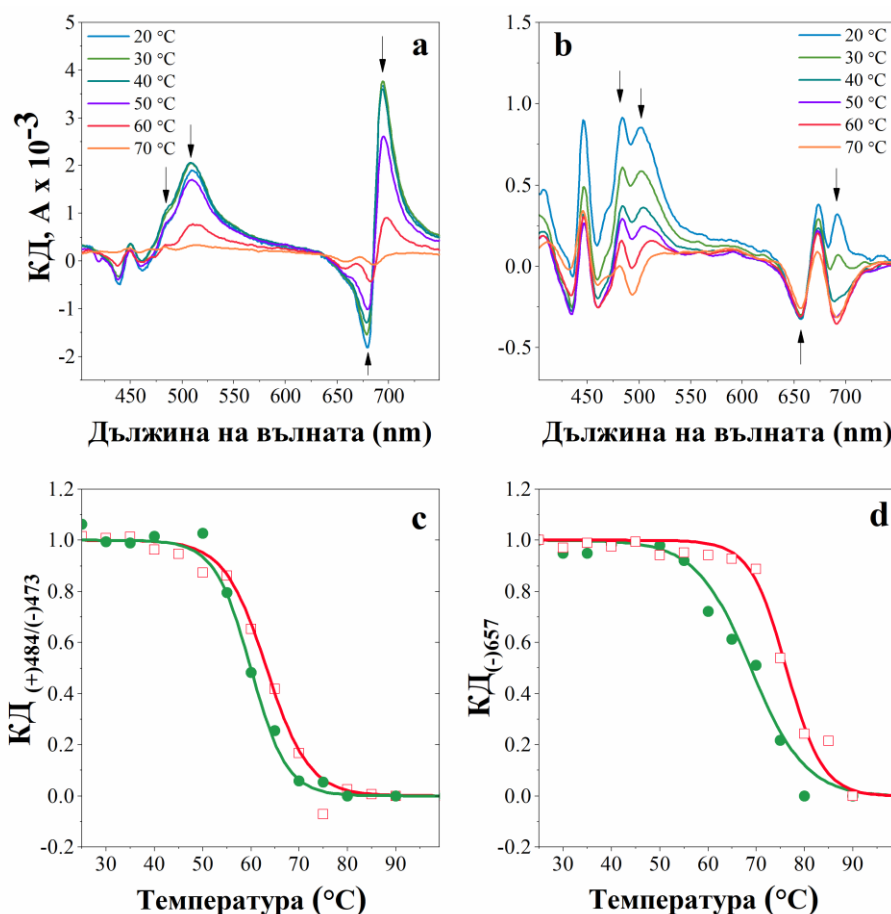
Спектрите на КД на MS тилакоидни мембрани (Фиг. 1а) са подобни на тези докладвани в научната литература (Garab and van Amerongen 2009; Tóth et al. 2016). Разстиковането на тилакоидни мембрани, адаптирани към умерена светлина (MU мембрани) доведе до изчезване на ивицата (-)679 nm и силно намаляване на интензитета на ивиците при (+)694 nm и (+)506 nm (Фиг. 1а), което потвърждава разстиковането на граните (Dobrikova et al. 2003; Lambrev et al. 2007) и е индикатор за разрушаване на подредбата на суперкомплексите ФС2-ССК2 (Tóth et al. 2016). Амплитудата на екситонната ивица (+)444/(-)436 се увеличава в следствие на разстиковането. За да бъде установено дали тези промени се дължат на агрегиране на ССК2 или образуване на комплекс ФС1-ССК2, MU мембраните бяха третирани с 0.1% β -DM, за който се знае че провокира дисоциацията на агрегати от ССК2 (Lambrev et al. 2007) и суперкомплекса ФС1-ССК2 (Wientjes et al. 2013a). Спектрите на КД на третираните с детергента разстиковани мембрани (Фиг. 1а) показаха пълна липса на Ψ -тип ивици, а интензитетът на екситонните ивици остана неповлиян. Според КД спектрите на температурно третирани интактни MS тилакоиди (Фиг. 2а, Таблица 2) Ψ -тип ивиците (-)679 nm, (+)694 nm и (+)506 nm показват най-висока нестабилност, следвани от (+)446/(-)436 nm, (+)483/(-)473 nm и (-)657nm. При MU мембраните $T_m^{КД}$ на ивицата (+)506 nm е с около 20 °C по-ниска от тези на екситонните ивици (Фиг. 2, Таблица 2).

Разстиковането доведе до увеличаване на температурната стабилност на ивиците, отразяващи екситонните взаимодействия в мономерите и тримерите на ССК2 - ивиците (+)483/(-)473 nm и (-)657 nm бяха стабилизирани с около 4-6 °C при MU спрямо MS тилакоиди (Таблица 2, Фиг. 2). Тези резултати сочат за стабилизацията на мономерите и тримерите на ССК2 в разстикованите мембрани. Същевременно Ψ -тип ивиците при MU бяха с много по-ниска стабилност или липсваха, за разлика от MS тилакоидите (Таблица 2, Фиг. 2).



Фиг. 1 КД спектри, регистрирани при стайна температура: (а) интактни (MS, плътна зелена линия), разстиковани (MU, червена точкова линия) и третирани с 0.1% *B*-DM разстиковани тилакоиди (синя пунктирна линия), (b) интактни (LS, плътна лилава линия) и *in vitro* разстиковани (LU, оранжева точкова линия) тилакоиди, изолирани от растения, адаптирани към нисък светлинен интензитет

Спектрите на КД на стиковани тилакоиди, адаптирани към нисък светлинен интензитет (LS проби, Фиг. 1b) не се различаваха значимо при стайна температура от тези на контролните MS мембрани. Температурната зависимост на интензитета на някои от характерните за тилакоидни мембрани Ψ -тип и екситонни ивици обаче показва значителни разлики. С изключение на ивиците $(-)$ 679 nm и $(+)$ 446/ $(-)$ 436 nm, чиято стабилност не бе повлияна, всички останали ивици при LS тилакоидите бяха дестабилизиращи в сравнение с MS тилакоидите (Таблица 2). Най-ясно този ефект бе изразен за ивиците $(+)$ 484/ $(-)$ 473 nm и $(-)$ 657 nm, дължащи се на екситонни взаимодействия съответно в тримерите и мономерите на CCK2. Те бяха дестабилизиращи с около 4-6 °C. Ψ -тип ивиците $(+)$ 605 nm и $(+)$ 694 nm също бяха температурно по-нестабилни, като показаха $T_m^{КД}$ по-ниски с около 3 °C за MS мембраните (Таблица 2). КД спектрите на LU мембраните (Фиг. 1b) демонстрираха изменения, аналогични с тези настъпващи при разстиковането на MS тилакоиди и $T_m^{КД}$ идентични с тези при MU мембраните с изключение на ивицата $(+)$ 446/ $(-)$ 436 nm, която показва статистически значима стабилизация в сравнение с LS тилакоидите (Таблица 2).



Фиг. 2 КД спектри на интактни, MS (a) и разстиковани, MU (b) тилакоидни мембрани, регистрирани на всеки 10 °C при нагряване на тилакоидните суспензии от 20 до 70 °C. Температурната зависимост на интензитета на ивиците (+)484/(-)473 nm (c) и (-)657 nm (d) на стиковани (запълнени кръгчета, плътна зелена линия) и разстиковани (незапълнени квадратчета, червена точкова линия) тилакоиди

Таблица 2 Температура на прехода на КД ивици ($T_m^{КД}$), регистрирани за стиковани (MS, LS) и разстиковани (MU, LU) тилакоидни мембрани. Средни стойности $\pm$ стандартно отклонение, $n=3$. * обозначава статистически значими разлики според тест на Стюdent ($p=0.05$). Различията при LS и MU са установени спрямо MS, а при LU – спрямо LS

КД ивица	$T_m^{КД}$ (°C)			
	MS	MU	LS	LU
	тилакоиди	тилакоиди	тилакоиди	тилакоиди
(+)694 nm	53.5 $\pm$ 0.07	-	51.0* $\pm$ 0.7	
(-)679 nm	54.8 $\pm$ 1.20	-	54.6 $\pm$ 2.4	
(+)506 nm	56.5 $\pm$ 0.4	40.2* $\pm$ 3.1	53.6* $\pm$ 0.8	32.7* $\pm$ 1.9
(+)483/(-)473 nm	59.5 $\pm$ 1.6	63.4* $\pm$ 0.3	55.7* $\pm$ 2.1	63.9* $\pm$ 3.1
(+)446/(-)436 nm	62.2 $\pm$ 3.1	68.9 $\pm$ 1.7	56.5 $\pm$ 4.6	69.4* $\pm$ 5.6
(-)657 nm	69.3 $\pm$ 1.5	74.8* $\pm$ 1.6	63.1* $\pm$ 2.2	73.8* $\pm$ 3.0

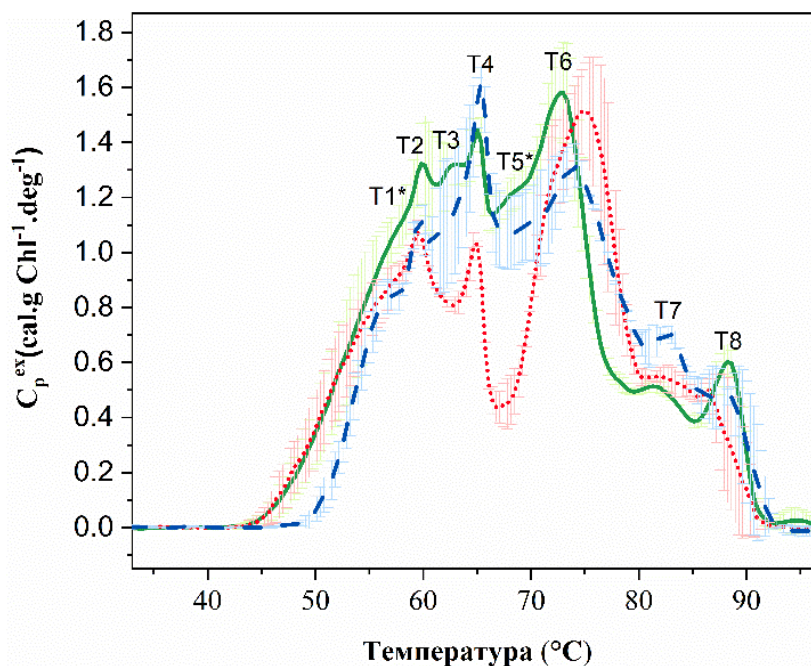
IV.1.1.3. Диференциална сканираща калориметрия на стиковани и разстиковани тилакоиди

Термограмите на MS тилакоидни мембрани показаха 8 ендотермични прехода съответно при: 57, 59, 63, 65, 69, 73, 82 and 88 °C (Фиг. 3; Таблица 3), означени като T1*-T8, съответно. Със * са обозначени термодинамичните преходи, които не са ясно различими и са видими като рамо, а именно преходите при 57 °C и 69 °C (T1* и T5* съответно, Фиг. 3).

КД ивиците, които се свързват с макроорганизацията на ФС2-ССК2 суперкомплексите и стиковането на граните, показаха сходни стойности на T_m^{KD} (между 53 °C и 56 °C) и са близки до температурите, при които протича термодинамичният преход T1* (56-57 °C). Този резултат е в съгласие с резултатите на Dobrikova et al. (2003).

Температурата на денатурация на сърцевинния комплекс на ФС2 (59 °C (според Thompson et al. 1989) също е близо до този температурен интервал. $T_m^{ДСК}$ на прехода T2 (59 °C) е идентична с T_m^{KD} на КД ивицата (+)483/(-)473 nm и следователно той може да бъде свързан с разрушаване на структурата на тримерите на ССК2. Силно кооперативният преход с $T_m^{ДСК}$ около 65 °C (T4) вероятно показва денатурацията на тилакоидната АТФ-аза (Nolan et al. 1992).

Фиг. 3 Термограми на MS (плътна зелена линия), MU (червена точкова линия) и MU тилакоиди, третиран с β -DM (синя пунктирна линия). Усреднени криви $\pm$ стандартно отклонение, $n=5$. За яснота са обозначени отделните преходи (T1-T8) в термограмата на вариант MS.

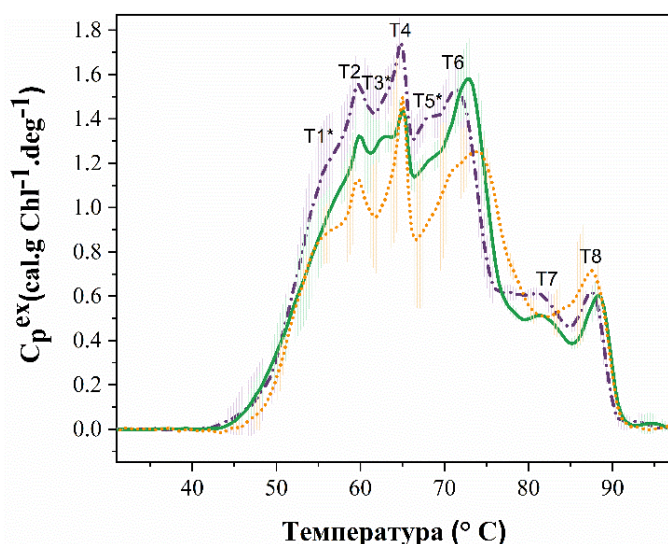


Термодинамичният преход с най-висока амплитуда, T6, протича при температура 73 °C и най-вероятно съответства на КД ивицата (-)657 nm (с T_m^{KD} около 70 °C), отразяваща температурната дестабилизация на мономерите на ССК2. Така, в съгласие с предишни публикации (Smith et al. 1989; Dobrikova et al. 2003; Krumova et al. 2011), термодинамичният

преход T6 може да бъде приписан на денатурацията на протеина с най-висока концентрация в тилакоидите – CCK2.

Термограмите на MU тилакоидите (Фиг. 3) показаха, че разстиковането и липсата на подреденост на пигмент-протеиновите комплекси имат основно два ефекта върху термодинамичния профил на тилакоидите: (i) понижение на енталпията на преходите, протичащи при температури под 65 °C и сливане на няколко пика в интервала 40-65 °C. (ii) отместване на T6 (73 °C) и рамото при около 69 °C към по-високи температури (Фиг. 3, Таблица 3), което може да бъде интерпретирано като стабилизиране на CCK2 спрямо термична денатурация.

Ефектите наблюдавани при разстиковани мембрани показаха частична обратимост при третиране на разстикованите тилакоиди с 0.1% β -DM. Инкубирането на разстиковани мембрани с този детергент доведе до отместване на T6 към по-ниски температури и повишение на амплитудата на T5 и T3* (Фиг. 3).



Фиг. 4 Термограми на MS (плътна зелена линия), LS (лилава пунктирна линия) и LU (оранжева точкова линия) тилакоиди. Усреднени криви $\pm$ стандартно отклонение, $n=5$. За яснота са обозначени отделните преходи (T1-T8) в термограмата на вариант MS

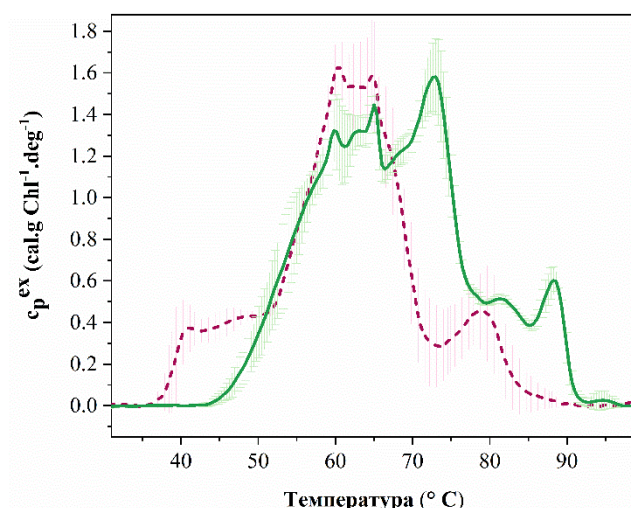
Подобно на интактните MS тилакоидни мембрани, термограмите на LS тилакоидите бяха съставени от 8 ендотермични прехода (Фиг. 4, Таблица 3). Тилакоидите, изолирани от растения, аклимирани към нисък светлинен интензитет, показаха две характерни особености: (i) понижение на $T_m^{ДСК}$ на T1, свързан със стиковането и макроорганизацията на пигмент-протеиновите комплекси в граните средно с около 1.5 °C и (ii) дестабилизиране на прехода T6, дължащ се на денатурация на CCK2 с около 2 °C

Термограмите на LU мембрани се характеризират с понижение на c_p^{ex} на T6 и отместване на този пик към по-високи температури ($T_m^{ДСК}$ около 74 °C) спрямо LS тилакоидите, а рамото T5* не бе повлияно от светлинния режим (Фиг. 4).

Таблица 3 Температура на денатурация ($T_m^{ДСК}$) и специфичен топлинен капацитет (C_p^{ex}) на температурно индуцираните преходи, наблюдавани в термограмите на стиковани и разстиковани тилакоиди. Средни стойности $\pm$ стандартно отклонение, $n=3$. * означава статистически значими разлики според тест на Стюдент при $p=0.05$. MU и LU са сравнени спрямо съответните непретирани варианти, а LS – спрямо MS

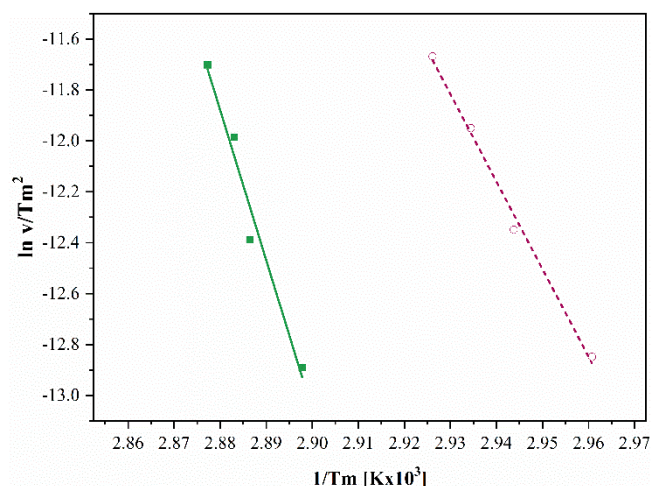
ДСК преход	MS			MU			LS		LU	
	T _m ^{ДСК} (°C)	C _p ^{ex} (cal.g ⁻¹ .deg ⁻¹)	T _m ^{ДСК} (°C)	C _p ^{ex} (cal.g ⁻¹ .deg ⁻¹)	T _m ^{ДСК} (°C)	C _p ^{ex} (cal.g ⁻¹ .deg ⁻¹)	T _m ^{ДСК} (°C)	C _p ^{ex} (cal.g ⁻¹ .deg ⁻¹)	T _m ^{ДСК} (°C)	C _p ^{ex} (cal.g ⁻¹ .deg ⁻¹)
T1*	57.8 ± 1.1	1.16 ± 0.03	56.0* ± 0.1	0.83* ± 0.08	56.3 ± 0.7	1.28 ± 0.14	56.2 ± 0.3	1.02* ± 0.01		
	59.9 ± 0.2	1.33 ± 0.16	59.5 ± 0.0	1.07 ± 0.04	59.7 ± 0.3	1.56 ± 0.17	59.6 ± 0.2	1.28* ± 0.00		
	63.0 ± 0.2	1.32 ± 0.07			63.1 ± 0.4	1.53 ± 0.11	63.5 ± 0.2	1.23* ± 0.07		
T4	65.0 ± 0.0	1.44 ± 0.08	64.9 ± 0.2	1.05* ± 0.01	64.7 ± 0.2	1.77* ± 0.16	65.0 ± 0.0	1.69 ± 0.12		
	68.9 ± 0.5	1.23 ± 0.07	71.6 ± 1.0	1.30 ± 0.18	68.1 ± 0.3	1.42* ± 0.09	70.7* ± 0.2	1.32 ± 0.01		
T6	72.9 ± 0.2	1.58 ± 0.17	75.3* ± 0.8	1.53 ± 0.18	71.5* ± 0.6	1.54 ± 0.14	74.2* ± 0.3	1.43 ± 0.11		
	81.8 ± 0.2	0.51 ± 0.02	82.7* ± 0.5	0.54 ± 0.06	80.8 ± 0.7	0.62* ± 0.02	83.4* ± 0.0	0.58 ± 0.02		
T8	88.4 ± 0.2	0.61 ± 0.06	86.8* ± 0.9	0.50 ± 0.04	87.5* ± 0.4	0.63 ± 0.03	87.7 ± 0.7	0.83* ± 0.08		

Поставянето на MS тилакоиди в среда с ниско рН (5.2) доведе до значителни промени в термодинамичния им профил (Фиг. 5). Бе отчетена появата на нов нискоамплитуден термодинамичен преход в интервала 35-50 °C. Вероятно това се дължи на отместване на прехода T1*, който се наблюдава при около 57 °C при MS с рН 7.6 и би могло да се разглежда като индикация за дестабилизиране на макроорганизацията на тилакоидите, когато те са ресуспендирани в среда с ниско рН.



Фиг. 5 Термограми на MS тилакоиди, ресуспендирани в буфер с рН 7.6 (плътна зелена линия) и рН 5.2 (розова пунктирна линия). Усреднени криви $\pm$ стандартно отклонение, $n=3$

Фиг. 6 Зависимост на $T_m^{ДСК}$ на денатурация на ССК2 от скоростта на нагряване на MS тилакоидни мембрани, ресуспендирани в среда с рН 7.6 (плътна зелена линия) или рН 5.2 (розова пунктирна линия)



Друг ясно изразен ефект от това третиране е отместването на прехода, приписван на денатурация на ССК2 към по-ниска температура (67.5 °C, Фиг. 5), което ясно демонстрира, че ресуспендирането в буфер с рН 5.2 предизвиква дестабилизация на ССК2. Термодинамичното поведение на протеините, които денатурират при температури над 80 °C при MS тилакоиди в среда с рН 7.6 също е променено – при MS мембрани, поставени при ниско рН, се наблюдава само един термодинамичен преход в тази температурна област (около 78 °C, Фиг. 5).

Понижението на общата енталпия (ΔH_{cal}), т.е. енергията, необходима за денатуриране на тилакоидите от $38.7 \pm 1.4 \text{ cal.g}^{-1}$ (при pH 7.6) до $29.8 \pm 5.6 \text{ cal.g}^{-1}$ (при pH 5.2) ясно илюстрира цялостна дестабилизация на тилакоидните мембрани, когато те са в среда с ниско pH.

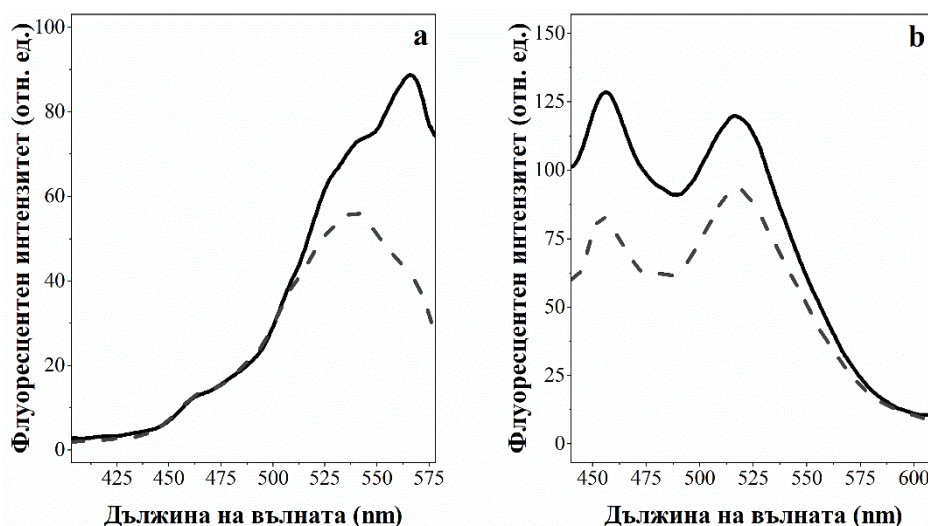
Чрез регистриране на термограмите на тилакоиди, ресуспендирани в двата типа среда, при различна скорост на нагряване бе установено, че $T_m^{ДСК}$ на термодинамичния преход, свързан с денатурацията на CCK2 (Т6) зависи от скоростта на нагряване на пробата. Този резултат потвърждава, че денатурацията на CCK2 е кинетично контролиран процес и в интактни тилакоидни мембрани. Установяването на зависимостта на $T_m^{ДСК}$ на Т6 от скоростта на нагряване (Фиг. 6) позволи изчисляването на активационната енергия (E_a) на процеса на денатурация на CCK2 от наклона на получените криви (Фиг. 6). Бе определено, че E_a на денатурацията на CCK2 при тилакоиди, намиращи се в буфер с pH 7.6 е $111 \pm 5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, докато, при тилакоиди в среда с pH 5.2 същият параметър бе понижен с около 32% ($71 \pm 6 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Това е още едно доказателство за дестабилизирането на тилакоидните мембрани, предизвикано от третирането им с буфер с ниско pH.

IV.1.1.4. Флуидност на липидния матрикс при стиковани и разстиковани тилакоиди

За да се установи дали възникващите в резултат на разстиковането или повишената степен на стиковане изменения в температурната стабилност и термодинамичните характеристики на тилакоидите, могат да бъдат асоциирани с промени и във физико-химичните свойства на техния липиден матрикс, тилакоидните мембрани, бяха изследвани с помощта на два поляризационно-чувствителни липофилни флуоресцентни маркера: MC540 и лаурдан.

В съответствие с вече публикувани данни (Krumova et al. 2008) екситационните спектри на MS мембрани, инкубирани с MC540 (Фиг. 7а), се характеризират с пик при около 563 nm, който се дължи на мономерни MC540, инкорпорирани в мембранный бислой и рамо при 536 nm, което се дължи на формиране на MC540 димери, адсорбирани на повърхността на мембраните. При MS тилакоидните мембрани, стойността на параметъра $F_{563/536}$, отразяващ способността на MC540 да навлиза в липидния матрикс, бе 1.3 ± 0.09 .

При екситационните спектри на суспензии от MU тилакоиди, инкубирани с MC540 (Фиг. 7а), липсва ясно изразен пик при 563 nm, а $F_{563/536}$ бе двойно понижен (0.79 ± 0.1). Тези данни сочат, че способността на MC540 да се инкорпорира в липидния матрикс на тилакоидите се понижава при ресуспендирането им в среда с ниска йонна сила.



Фиг. 7 Екситационни спектри на MC540 (a) и емисионни спектри на лаурдан (b) след инкубация на флуоресцентните маркери с MS (плътна линия) и MU (пунктирна линия) тилакоиди за 30 мин. на стайна температура.

Близките стойности на параметъра $F_{563/536}$ при MS (1.3 ± 0.09) и LS (1.3 ± 0.1) показват идентично фазово поведение на липидите при двата вида мембрани.

Тъй като навлизането на MC540 в липидния матрикс на MU тилакоидите може да бъде възпрепятствано от отрицателни заряди по повърхността на мембраната, които при нормални условия са екранирани от катиони, MU бяха изследвани и с помощта на още един флуоресцентен маркер – лаурдан. Емисионните спектри на лаурдан инкорпориран в MS и MU тилакоиди показаха два пика, при 457 nm и 513 nm (Фиг. 7b), индикатор за наличието на два типа микрообкръжение на флуоресцентния маркер – съответно по-рехаво и по-плътено опаковани липиди. Амплитудите на тези два емисионни максимума се различават при разстикованите и интактните тилакоиди, което е отразено и от параметъра обща поляризация на лаурдан (GP). Въпреки че GP варира значително ($0.03-0.10$ за MS и $-0.06-0.03$ за MU тилакоиди) при всеки индивидуален експеримент, стойностите на GP за стикованите бяха винаги по-високи ($\Delta GP = 0.08 \pm 0.01$) от тези за разстикованите тилакоиди. Това е доказателство, че при подложените на разстиковане тилакоидни мембрани липидният матрикс има по-рехаво организация.

IV.1.2. Ефект на степента на стикване на тилакоидните мембрани върху функционалността на фотосинтетичния апарат

IV.1.2.1. Нискотемпературна флуоресценция на интактни и разстиковани тилакоидни мембрани

Преносът на енергия на възбуждане от CCK2 до двете фотосистеми и от FC2 към FC1 бяха оценени с помощта на 77K флуоресценция (спектрите не са показани). Нискотемпературните емисионни спектри на MS, MU и третирани с β -DM MU тилакоиди

показаха характеристични пикове при 685 nm, 695 nm и 735 nm, които се дължат на флуоресценция съответно на CP43, CP47 (Andrizhiyevskaya et al. 2005), и суперкомплекса ФС1-ССК1 (Croce and Bassi 1998). Математическото (Гаусово) разлагане на спектрите с 5 компонента показва емисионни ивици на тримери на ССК2 (около 680 nm) и агрегати от ССК2 (700 nm). Разстиковането на тилакоидите доведе до силно понижение на амплитудата на емисионните ивици на сърцевинния комплекс на ФС2 (под 700 nm) и относително увеличение на интензитета на ивицата при 735 nm, и съответно до по-ниско съотношение на $F_{684/735}$ (Таблица 4). Това разкрива пренасочване на екситационна енергия от ФС2 към ФС1, както вече е докладвано в редица изследвания на разстиковани тилакоиди (van der Weij de Witt et al. 2007; Kirchhoff et al. 2007a).

Третирането с β -DM доведе до повишение на съотношението $F_{684/735}$ (Таблица 4), но не до пълното му възстановяване до стойностите характерни за контролните тилакоиди. Емисионните спектри на тилакоидите, инкубирани с β -DM показаха отместване към синята спектрална област с около 2 nm и относително увеличение на интензитета на флуоресценция при 680 nm в сравнение с разстиковани тилакоиди.

Таблица 4 Съотношение между интензитетите на емисионните максимуми на флуоресценция при 684 nm (дължаща се на сърцевинния комплекс на ФС2) и 735 nm (произлизаща от комплекса ФС1-ССК1), $F_{684/735}$. Средни стойности $\pm$ стандартно отклонение, $n=3$. Сатистически различимите една от друга стойности според тест на Стюдент ($p=0.05$) са отбелязани с различни букви

Вариант	$F_{684/735}$
MS	$1.11^a \pm 0.06$
MU	$0.29^b \pm 0.02$
MU + β -DM	$0.61^c \pm 0.08$

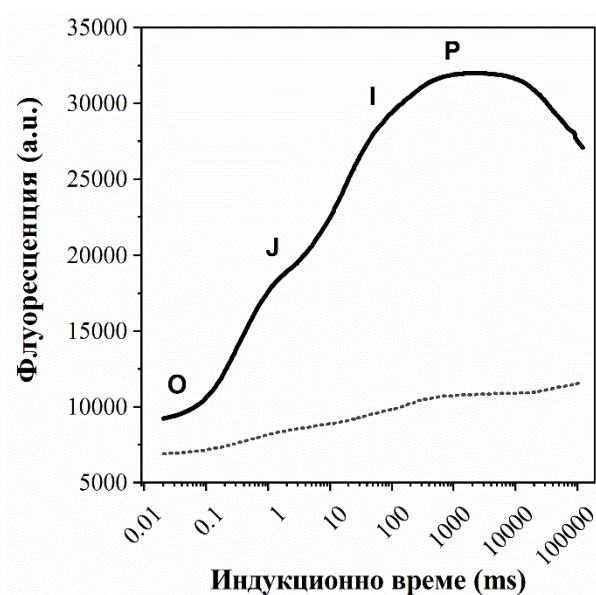
Този ефект вероятно е индикация за това, че ССК2 се отделя от ФС1, но не образува комплекси с ФС2, а остава в тримерна форма. Ниският относителен интензитет (под 1% от общата емисия) на флуоресценция на агрегати от ССК2 (излъчващи при 700 nm) и при трите варианта изключва възможността наблюдаваните особености при разстиковани и третиран с детергента тилакоиди да се дължат съответно на формиране и дисоцииране на агрегати от ССК2.

IV.1.2.2. Индукционни криви на флуоресценция и JIP-тест на изолирани интактни и разстиковани тилакоиди

Сравнението и математическият анализ на индукционните криви на флуоресценция на хл. *a* във ФС2 на MS и MU тилакоиди (Фиг. 8) допринесоха за изясняване на настъпилите в резултат от разстиковането промени във функционалността на ФСА.

Докато индукционните криви на хлорофилната флуоресценция при стиковани тилакоиди съдържаха характеристичните точки O, J, I и P, тези при разстикованите мембрани бяха със значително занижен интензитет, а техните инфлексни точки бяха слабо различими и се

наблюдаваха при по-високи индукционни времена (Фиг. 8). Гасенето на флуоресценцията на ФС2 на разстикованите тилакоиди е още една индикация за пренасочване на екситационна енергия към ФС1. Стойностите на подбрани JIP-параметри, изчислени за MS и MU са представени в Таблица 5. Подобно на публикуваното от Kirchhoff et al. (2007a), при разстиковането на тилакоидите бе наблюдавано понижение на F_M и F_M/F_0 (Таблица 5). Последният параметър показва, че гасенето на флуоресценцията е по-силно при F_M , отколкото при F_0 . Четирикратното намаление на стойностите на F_V/F_0 (Таблица 5) при разстикованите тилакоиди е показател за настъпили изменения в способността на ФСА да оползотворява енергията на възбуждане за фотохимични процеси. Анализът на комплементарната площ над индукционните криви на тилакоиди и от двата варианта, третирани с DCMU, е подход за определяне на относителното съдържание на суперкомплекси ФС2-ССК2, различаващи се по големината на активната си светосъбираща антена и по своята активност. Площта, заградена от индукционната крива на флуоресценция и успоредна на абсцисата права, преминаваща през т. Р може да бъде разглеждана математически като сума от 3 експоненти, които описват 3 типа ФС2 центрове: ФС2- α , ФС2- β и ФС2- γ . ФС2- α се разполагат в граните, притежават най-голяма светосъбираща антена и показват способност за функционално свързване помежду си (групиране).



Фиг. 8 Представителни криви на индукция на бърза флуоресценция при MS (плътна линия) и MU (точкова линия) тилакоиди

Таблица 5 Подбрани JIP-параметри за MS и MU тилакоиди. Количеството на ФС2 α , β , γ е представено като процент от общия брой активни РЦ на ФС2. Средни стойности $\pm$ стандартно отклонение, $n=4$. * обозначава статистически значими разлики спрямо MS според тест на Стюдент ($p=0.5$).

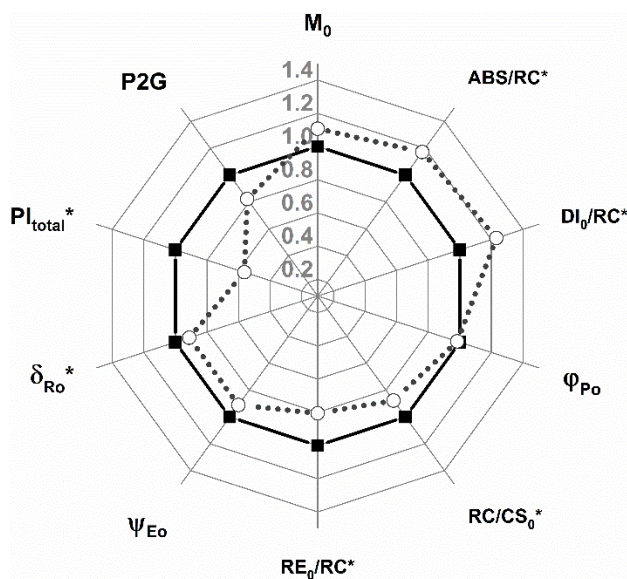
JIP параметър	MS	MU
F_0	9238 ± 1034	7427 ± 547
F_M	31744 ± 1238	$12162^* \pm 1480$
F_V/F_0	2.46 ± 0.25	$0.64^* \pm 0.12$
F_M/F_0	3.46 ± 0.25	$1.64^* \pm 0.12$
M_0	0.77 ± 0.04	$0.48^* \pm 0.03$
PSII α (%)	91.9 ± 0.4	$74.7^* \pm 4.8$
PSII β (%)	6.2 ± 0.6	$22.6^* \pm 5.4$
PSII γ (%)	1.9 ± 0.7	2.6 ± 0.6

ФС2- β се намират главно в стромата, нямат функционална кооперативност и най-вероятно са лишени от периферните си светосъбиращи антени (ССК2). ФС2- γ имат най-малка антена и не са фотохимично активни (Mehta et al. 2010 и цитатите там).

Разстиковането на тилакоидите доведе до намаление в съдържанието на ФС2- α реакционните центрове с около 17% и увеличение на броя на ФС2- β центрове с 16 % (Таблица 5). В същата насока, но в различна степен, са и промените докладвани от Kirchhoff et al. (2007a) и Kaftan et al. (2002) за разстиковани тилакоидни мембрани, изолирани съответно от спанак и маруля.

IV.1.2.3. Индукционни криви на флуоресценция и JIP-тест на интактни грахови растения, адаптирани към нисък светлинен интензитет

Индукционните криви на флуоресценция на тъмнинно-адаптирани листа от LL растения не се различаваха драстично от тези регистрирани при ML растения. Въпреки това измененията на редица JIP-параметри (Фиг. 9, Таблица 6) сочат за наличие на функционални промени, настъпващи във ФСА при адаптация към нисък светлинен интензитет.



Фиг. 9 Подбрани JIP-параметри за интактни грахови растения, адаптирани към оптимален (плътна линия) и нисък (точкова линия) светлинен интензитет. Представените данни са нормирани към стойностите, получени за растения, адаптирани към оптимален светлинен интензитет. * обозначава статистически значима разлика според тест на Стюдент с $p=0.05$, $n=4$

Параметърът φ_{Po} не бе изменен при LL растенията. Адаптираните към нисък светлинен интензитет растения демонстрираха понижение в RC/CS_0 с около 13% и увеличение в ABS/RC с около 14%. Беше наблюдавано и статистически значимо повишение в количеството на дисипираната енергия на възбуждане (DI_0/RC) и по-ниска цялостна производителност на ФСА (PI_{total}). При LL листа M_0 и ψ_{E_0} не бяха повлияни (Таблица 6). Значимо понижени бяха стойностите на параметрите RE_0/RC и δ_{Ro} , показващи способността на електроните да достигат крайните акцептори на ФС1. Противно на докладваното от Kirchhoff et al. (2007b), не беше установено увеличение във функционалната свързаност между РЦ на ФС2.

Таблица 6 Средни стойности на подбрани JIP-параметри за интактни листа от ML и LL грахови растения $\pm$ стандартно отклонение, $n=5$. * обозначава статистически значими разлики спрямо ML според теста на Стюдент при $p=0.05$

JIP параметър	ML	LL
M_0	0.73 ± 0.11	0.88 ± 0.09
ABS/RC	2.08 ± 0.09	$2.37^* \pm 0.08$
DI_0/RC	0.48 ± 0.03	$0.57^* \pm 0.02$
φ_{Po}	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01
RC/CS_0	5620 ± 222	$4889^* \pm 332$
RE_0/RC	0.30 ± 0.03	$0.25^* \pm 0.02$
ψ_{E_0}	0.56 ± 0.04	0.52 ± 0.04
δ_{Ro}	0.33 ± 0.04	$0.27^* \pm 0.02$
PI_{total}	0.96 ± 0.22	$0.52^* \pm 0.11$
$P2G$	0.19 ± 0.07	0.17 ± 0.07

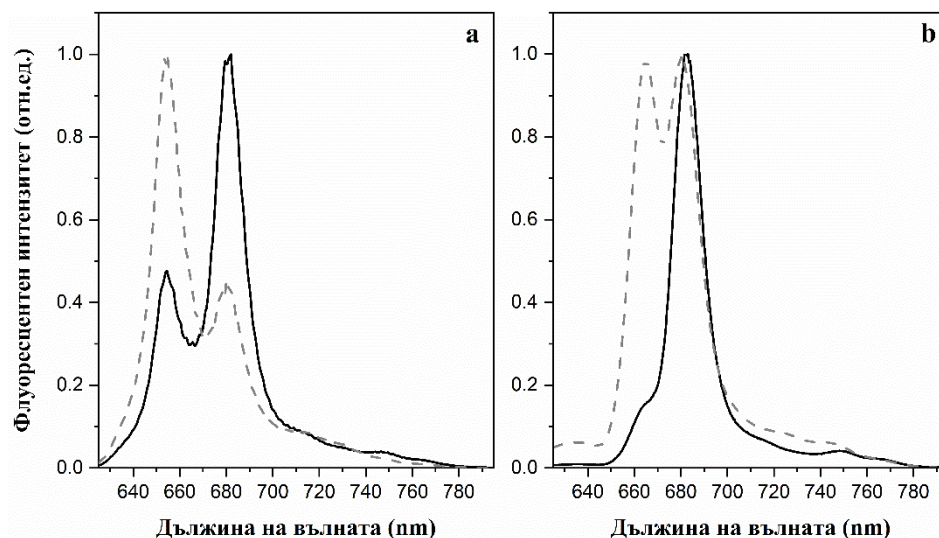
IV.2. Термодинамични свойства на фикобилизоми от *Synechocystis* PCC6803

За целта на изследването бяха изолирани фикобилизоми от клетки див тип и мутанта СК, при който фикобилизомите се състоят единствено от трицилиндричен алофикоцианинов комплекс (Thomas et al. 2006). Интактността на изолираните фикобилизоми бе оценена посредством нискотемпературна флуоресценция, като изолираните фракции бяха сравнени с фикобилизоми подложени на неколнократно замразяване и размразяване – модел за разрушена фикобилизомна структура. Като следваща стъпка бе проследена температурната стабилност на изолираните фикобилизоми и на цели клетки посредством абсорбционна спектроскопия и ДСК. За утвърждаване на приложимостта на ДСК метода като средство за определяне структурната цялост на фикобилизоми в изолирано състояние и в интактни клетки, бяха сравнени калориметричните профили на фотоавтотрофни и фотомиксотрофни клетки *Synechocystis* див тип, а също и подбрани мутанти, при които липсват фикобилизоми и/или някоя от двете фотосистеми.

IV.2.1. 77K флуоресценция на изолирани фикобилизоми

Интактността на изолираните фикобилизоми бе проверена с помощта на нискотемпературна флуоресценция. При интактни фикобилизоми див тип емисионният спектър се характеризира с максимум при 682 nm (Фиг. 10а, Tian et al. 2013; Scott et al. 2006), който съответства на флуоресценцията на крайния излъчвател в алофикоцианиновия комплекс на фикобилизомите и показва протичането на пренос на енергия на възбуждане от фикоцианиновите „пръчици“ към алофикоцианина. При фикобилизоми с добре запазена структура този максимум доминира над пик при 654 nm (Фиг. 10а, Glazer and Stryer 1984), който се дължи на емисията на фикоцианина. При фикобилизоми, подложени на неколнократно замразяване и размразяване, емисионният максимум при 654 nm бе с по-голяма амплитуда от този при 682 nm (Фиг. 10а), което показва понижен пренос на енергия към алофикоцианина и респективно нарушена структура на фикобилизомите.

Емисионните спектри на интактни СК фикобилизоми показаха главен пик при 682 nm, отразяващ флуоресценцията на крайния емитер на алофикоцианините и рамо при около 665 nm (Фиг. 10b), дължащо се на емисията на по-високоенергийни алофикоцианини и/или алофикоцианинови мономери. След подлагане на този тип фикобилизоми на няколко серии от замразяване и размразяване, относителната амплитуда на рамото при 665 nm бе силно повишена (Фиг. 10b). Това показва, че енергията на възбуждане не достига крайния излъчвател на алофикоцианиновия комплекс, защото структурата на фикобилизомите е компрометирана.



Фиг. 10. 77K емисионни спектри на изолирани интактни (плътни линии) и дезинтегрирани (пунктирни линии) фикобилизоми от фотоавтотрофно отглеждан див тип (a) и мутант СК (b). Използваната за възбуждане светлина е с дължина на вълната 590 nm

IV.2.2. Температурна зависимост на абсорбционните спектри на изолирани фикобилизоми и цели клетки *Synechocystis PCC6803* от див тип и мутанта СК

При стайна температура абсорбционните спектри на изолираните фикобилизоми показаха обичайните за съответния вариант характеристики. Спектърът на фикобилизомите от див тип (данните не са показани) бе доминиран от абсорбционния максимум на фикоцианина (около 625 nm) и съдържаше рамо при около 615 nm, което вероятно също се дължи на фикоцианин (негови “по-сини” форми или мономери - артефакт от процедурата на изолиране и/или разреждане) или показва принос от алофикоцианинови мономери. При температурно третиране на суспензиите от фикобилизоми интензитетът на главния пик намалява драстично след достигане на 65 °C.

Абсорбционните спектри на фикобилизомите на мутанта СК (данните не са показани) демонстрираха пик с характерно за тримерите на алофикоцианина червено отместване до 652 nm, придружен от рамо при 620 nm (MacColl 1998; 2004). Нагряването на СК фикобилизоми до 60-65 °C доведе до силно намаление на амплитудата на пика при 652 nm и относително нарастване на интензитета на рамото при около 615 nm.

Интактните клетки и от двата типа клетки показаха абсорбционни ивици на хлорофила (440-470 nm 660-720 nm) и каротеноидите (500-550 nm). При дивия тип те бяха придружени и от пик при около 625 nm (спектрите не са показани), дължащ се на абсорбцията на фикоцианинови хексамери. Получените спектри бяха идентични с вече публикуваните от Collins et al. (2012). При клетки СК липсваше пик при 625 nm (спектрите не са показани).

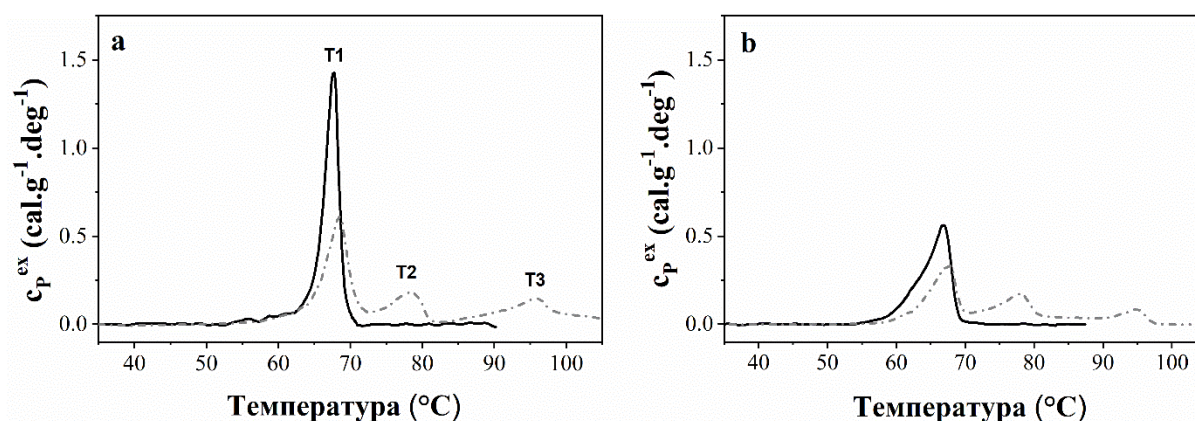
Нагряването на клетъчните култури до 60-65 °C предизвика силно понижение на амплитудата на абсорбционния максимум на фикобилизомите, докато абсорбционните ивици на хлорофила бяха запазени дори при 90 °C.

IV.2.3. Диференциална сканираща калориметрия на изолирани фикобилизоми от автотрофно отглеждани клетки *Synechocystis* див тип и мутанта СК

Термодинамичните профили на свежо изолирани фикобилизоми от див тип и мутанта СК, съхранявани в буфер с висока йонна сила, който запазва тяхната структура, са показани на Фиг. 11а. Термодинамичните параметри $T_m^{ДСК}$ и ΔH_{cal} са обобщени в Таблица 7.

Интактните фикобилизоми от див тип се характеризираха с един силно кооперативен ($T_{1/2}=2.2\pm0.1$) ендотермичен преход при 67 °С (Фиг. 11а). За да бъде установено, дали температурната денатурация на фикобилизомите протича с един или множество припокриващи се термодинамични преходи, беше извършено математическо (Гаусово) разлагане на термограмите на див тип фикобилизоми (данните не са показани). При тази процедура термограмите бяха разложени на три компонента: широк преход с ниска амплитуда при 64 °С и два по-високоамплитудни прехода при 67 и 68 °С. Трябва да се отбележи, обаче, че преходът, при 64 °С не бе наблюдаван при всички индивидуални биологични повторения на експеримента.

Термограмите на интактни фикобилизоми, изолирани от мутанта СК, се състоят от три термодинамични прехода ($T_m^{ДСК1}$, $T_m^{ДСК2}$, $T_m^{ДСК3}$), протичащи съответно при 68, 77 и 96 °С (Фиг. 11а). Основният преход на фикобилизомите при мутанта СК (68 °С) бе стабилизирал с около 1 °С в сравнение със съответния преход при дивия тип (67 °С) и се характеризира с по-нисък специфичен топлинен капацитет и кооперативност ($T_{1/2}=3,4\pm0.5$). $T_m^{ДСК}$ на основния преход при СК фикобилизоми (68 °С) съвпада с $T_m^{ДСК}$ на най-високотемпературния преход, получен след Гаусово разлагане на термограмите на фикобилизомите, изолирани от див тип *Synechocystis*. Математическото разлагане на термограмите на СК фикобилизоми показва, че преходът при 68 °С най-вероятно е резултат от две отделни термодинамични събития, протичащи при близки температури, съответно 67 °С и 68 °С.



Фиг. 11 Термограми на интактни (а) и дезинтегрирани (б) фикобилизоми, изолирани от *Synechocystis* див тип (плътна линия) и мутанта СК (пунктирна линия)

Таблица 7 $T_m^{ДСК}$ и енталпия (ΔH_{cal}) на калориметричните преходи, регистрирани за интактни и дезинтегрирани фикобилизоми от *Synechocystis* див тип и мутанта СК. Средни стойности $\pm$ стандартно отклонение, $n=4$. * означава статистически значими разлики спрямо интактни фикобилизоми от див тип според тест на Стюдент при $p=0.05$

Фикобилизоми	$T_m^{ДСК1}$ (°C)	$T_m^{ДСК2}$ (°C)	$T_m^{ДСК3}$ (°C)	ΔH_{cal} (cal. g ⁻¹ протеин)
див тип, интактни	67.4 $\pm$ 1.3	-	-	4.5 $\pm$ 0.4
див тип, дезинтегрирани	66.8 $\pm$ 0.2	-	-	3.0* $\pm$ 0.1
СК, интактни	68.4 $\pm$ 1.6	77.3 $\pm$ 2.7	96.1 $\pm$ 0.8	6.4* $\pm$ 1.1
СК, дезинтегрирани	67.1 $\pm$ 0.9	77.4 $\pm$ 0.9	95.2 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.5

Термограмите на фикобилизоми, изолирани от див тип и мутант СК, претърпели няколко цикъла на замразяване и размразяване, и следователно с разрушена структура, са представени на Фиг. 11b. Термодинамичните преходи при фикобилизомите с компрометирана структура протичаха при същата температура, както и при съответните интактни изолирани фикобилизоми, но се отличаваха с по-ниска енталпия (Таблица 7). Освен това, преходите при разрушените фикобилизоми бяха по-ниско кооперативни и асиметрични. При математическо разлагане на термограмите на фикобилизоми див тип, подложени на замразяване и размразяване, пиковите при 64, 67 и 68 °C се различаваха по относителна амплитуда от съответните преходи при интактни фикобилизоми, като тази на прехода при 64 °C бе двойно по-голяма (50%) в сравнение с интактните фикобилизоми (19%). При Гаусово разлагане термограмите на разрушени фикобилизоми от мутанта СК освен компонентите, характерни за интактните фикобилизоми (но с редуцирана енталпия), се наблюдава още един компонент - при 74 °C.

IV.2.4. Диференциална сканираща калориметрия на интактни клетки от *Synechocystis* PCC6803 див тип и мутантни форми

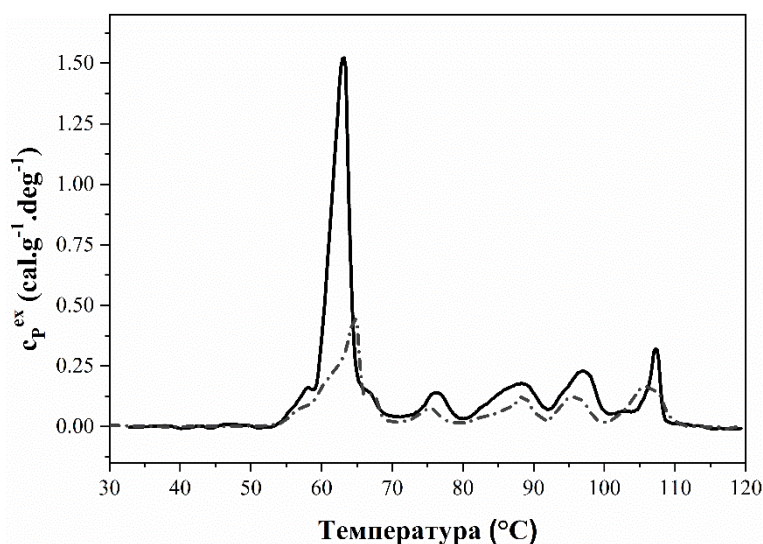
IV.2.4.1. Термодинамично характеризирание на интактни клетки от *Synechocystis* PCC6803: фотоавтотрофно отглеждан див тип и мутанта СК

Термограмите на фотоавтотрофно култивирани клетки от див тип *Synechocystis* и мутанта СК съдържаха 6 добре различими пика над 60 °C и още 1 или 2 по-слабо изразени прехода под тази температура (Фиг. 12).

Термограмите на фотоавтотрофните клетки от див тип бяха доминирани от симетричен, силно кооперативен пик при около 63 °C, който в известна степен се слива със съседните пикове при 58 и 67 °C (Фиг. 12). Взимайки пред вид високата амплитуда на пика при 63 °C и фактът, че фикобилизомите са най-силно представеният протеин в клетката на цианобактериите (около 25% от общото сухо вещество и 50% от разтворимите протеини, Glazer 1988), може да се предположи, че този доминиращ преход се дължи именно на дезинтеграция и/или денатурация

на фикобилизомите. Това се потвърждава и от факта, че подобен пик липсва при термограмите на изолирани тилакоидни мембрани от *Synechocystis* PCC6803, за които е известно, че нямат свързани фикобилизоми (Laczko-Dobos et al. 2011).

За разлика от фотоавтотрофните клетки от див тип, доминиращият термодинамичен преход в термограмите на мутанта СК бе регистриран при по-висока температура (65 °C, Фиг. 12) и се характеризира с асиметричен пик с трикратно по-ниска амплитуда от наблюдаваната при дивия тип.



Фиг. 12 Термограми на клетки *Synechocystis* PCC6803 див тип (плътна линия) и мутант СК (пунктирна линия)

IV.2.4.2. Термодинамично характеризиране на интактни клетки *Synechocystis* PCC6803: фотомиксотрофно отглеждан див тип и мутанти, при които липсват фикобилизоми и/или ФС1 и ФС2

Идентифицирането на термодинамичния преход, протичащ при около 63 °C, като дължащ се на дезинтеграцията на фикобилизомите, бе допълнително подкрепено от термодинамичното характеризиране на мутантни щамове *Synechocystis* и фотомиксотрофно отглеждан див тип. При клетки *Synechocystis*, отглеждани в миксотрофни условия, част от синтезираните фикобилипротеини не се структурират в интактни фикобилизоми и не предават енергия на възбуждане до фотосистемите (Tóth et al. 2015). Мутантът PAL не образува фикобилизоми и не експресира фикоцианин, алофикоцианинови α/β мономери и специфичния линкерен протеин, осъществяващ връзка между фикобилизомите и тилакоидната мембрана (L_{CM}) (Ajlan and Vernotte 1998). Мутантът BE е облигатен хетеротроф, който е конструиран чрез делеция на ген *psbB*, който кодира CP47 на сърцевинния комплекс на ФС2, от PAL и не притежава нито фикобилизоми, нито функционална ФС2 (Krumova et al. 2010b). При мутанта PSII⁻ (облигатен хетеротроф) гените *psbDI/II* и *psbC*, които кодират протеините D2 и CP43 от сърцевинния комплекс на ФС2, са частично делетирани и не се детектират протеините D1 и CP47 (Vermaas et al. 1988; Bittersmann and Vermaas 1991). Мутантът PSI⁻/ArcE⁻ (факултативен хетеротроф) е получен чрез частична делеция на оперона *psaAB* и гена *arcE*, кодиращи съответно сърцевинните протеини на ФС1 и L_{CM} и при него липсва функционална ФС1 и се

образуват нестабилни фикобилизоми, които не са свързани към тилакоидната мембрана и не пренасят екситационна енергия до ФС2 (Shen et al. 1993).

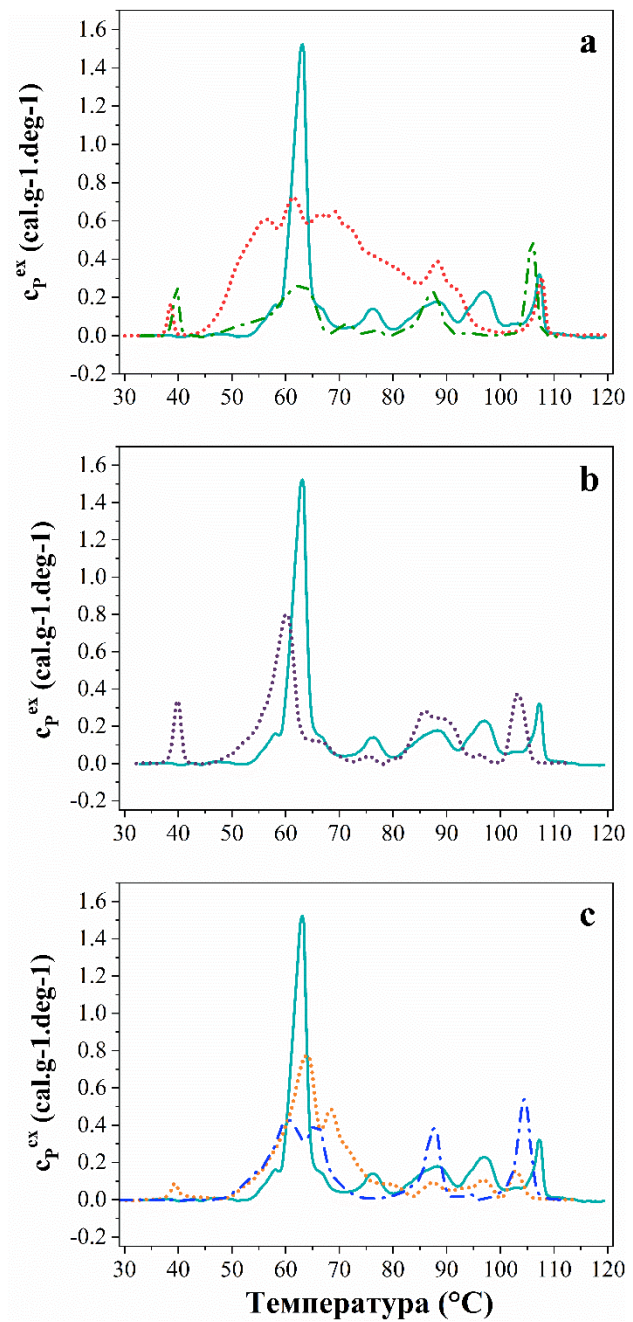
Очаквано, термодинамичните профили на мутантите PAL и BE (Фиг. 13а) не показаха преход, подобен на доминиращия такъв при див тип автотрофни клетки. При PAL в температурния интервал 50-80 °C беше наблюдавано сливане на множество пикове с висока енталпия, което вероятно е резултат от по-високото съдържание на протеини, денатуриращи при тази температура.

Преходът, свързан с фикобилизомите в термограмите на фотомиксотрофно отглежданите клетки от див тип (Фиг. 13b), има по-ниска амплитуда, отместен е към по-ниска температура ($T_m^{ДСК}=59.8\pm1$ °C) и е по-слабо кооперативен ($T_{1/2} = 4.8$ °C) в сравнение със същия преход при фотоавтотрофно култивирани клетки от див тип ($T_m^{ДСК}=62.9\pm0.8$ °C, $T_{1/2} = 3$ °C).

По-ниският специфичен топлинен капацитет на прехода при фотомиксотрофно култивирани цианобактерии може да се дължи на по-ниското съдържание на нормално структурирани фикобилизоми при тези клетки. Протичането на денатурацията на фикобилизомите при по-ниска температура и по-ниската кооперативност на прехода както при фотомиксотрофно отглеждани клетки, така и при изолирани фикобилизоми с нарушена чрез замразяване структура, показва, че тези параметри могат да бъдат смятани за показателни за структурната цялост на фикобилизомите в интактни клетки.

$T_m^{ДСК}$ на денатурацията на фикобилизомите при мутанта PSII⁻ (62.8 ± 1.6 °C) бе близка до тази на фотоавтотрофно култивирани клетки от див тип (Фиг. 13c). При PSI⁻/ArcE⁻ мутанта (Фиг. 13c), аналогично с фотомиксотрофно отглеждания див тип, бе наблюдавано отместване на прехода, приписван на денатурацията на фикобилизомите, към по-ниска температура ($T_m^{ДСК}=61.2\pm1.0$ °C). Това е индикация, че свързването на фикобилизомите с ФС1 или ФС2 води до тяхната стабилизация.

Фиг. 13 Термограми на интактни клетки *Synechocystis*: фотоавтотрофен див тип (плътна синьо-зелена линия, а, b, c), фотомиксотрофен див тип (лилава точкова линия, b) и мутанти PAL (червена точкова линия, a), BE (зелена пунктирна линия, a), PSII (оранжева точкова линия, c), PSI/ArcE⁻ (лилава пунктирна линия, c)



V. ДИСКУСИЯ

V.1. Връзка между архитектурата на тилакоидните мембрани и термодинамичните и функционални характеристики на ФСА на висши растения

Резултатите от настоящата работа доказват, че архитектурната организация на тилакоидните мембрани при висши растения е в сложна връзка с различни фактори като макроорганизацията на фотосинтетичните комплекси, термодинамичната стабилност на най-силно представения пигмент-белтъчен комплекс в тилакоидите - ССК2 и физикохимичните свойства на липидната фаза на тези мембрани.

Установихме корелация между температурната стабилност на специфични КД ивици и $T_m^{ДСК}$ на термодинамичния преход, приписван на денатурацията на ССК2. Тези параметри се повлияват по един и същи начин от степента на стиковане на тилакоидните мембрани и респективно от подредеността (макроорганизацията) на пигмент-белтъчните комплекси в тях. Бе установено, че при тилакоидни мембрани с липса на мембранна сегрегация на гранални и стромални области (MU, LU) $T_m^{КД}$ на ивиците (+)483/(-)473 nm и (-)657 nm е значително повишена, в сравнение с тази на стиковани тилакоиди (Фиг. 2; Таблица 2), а калориметричният преход T_6 (както и рамото T_5^*) се отмества към по-висока температура с около 3 °C при разстиковане на тилакоидните мембрани, независимо дали са адаптирани към умерен или към нисък светлинен интензитет (Фиг. 3, 4, Таблица 3). Тези данни недвусмислено показват, че промяната в микрообкръжението на ССК2 предизвикана от разстиковането на тилакоидите, води до стабилизиране на тримерите и мономерите на ССК2. Ефектът на микрообкръжението на ССК2 бе разгледан в два аспекта: протеин-протеинови и протеин-липидни взаимодействия. Специфични протеин-протеинови взаимодействия, които биха могли да доведат до тази промяна в температурната стабилност на комплекса са агрегирането на ССК2 или образуването на ССК2-ФС1 комплекс. Преходът T_6 бе частично дестабилизиран при третиране на разстиковани мембрани с детергента β -DM (Фиг. 3), за който е известно, че провокира дисоциацията на комплекса ФС1-ССК2 и агрегатите от ССК2 (Lambrev et al. 2007; Wientjes et al. 2013a). Така бе установено, че формирането на протеинови комплекси, което е възпрепятствано от стиковането на тилакоидите има принос за стабилизирането на ССК2 в тилакоидни мембрани, в които пигмент-протеиновите комплекси са хаотично разположени (т.е. разстиковани тилакоиди). Емисионните флуоресцентни спектри, регистрирани при 77K, показаха четирикратно понижение на стойността на параметъра F_{684}/F_{730} в следствие от разстиковането, като при третиране с β -DM този ефект е обратим (Таблица 4). От друга страна нито един от тестваните варианти не показва изменение на интензитета на флуоресценция при 700 nm, дължаща се на формирането на агрегати от ССК2 (Фиг. 8). По този начин бе установено, че наблюдаваното стабилизиране на ССК2, се дължи на относително увеличаване на неговата субпопулация, взаимодействаща с ФС1. Освен добре проучената роля на ССК2 като разпределител на енергия на възбуждане между двете фотосистеми, което е свързано с промяна в степента на стиковане на граните и краткотрайно свързване на ССК2 с ФС1 в отговор на нисък светлинен интензитет или обогатяване на спектъра с червена светлина (Bellafigliore et al. 2005; Minagawa 2011; Tikkanen et al., 2011; Crepin and Caffari 2015), наскоро бяха получени данни за образуване на комплекси между ССК и ФС1 и при други условия. Wientjes et al. (2013a) демонстрират, че в условията на естествена светлина ССК2 служи като антена както на ФС2, така и на ФС1, а съотношението между количеството на ФС1 свързан със ССК1 или ССК2 се регулира

от качеството и интензитета на светлината. Bressan et al. (2016; 2018) докладват за способността на CCK2 да служи като периферна антена на ФС1 при липса на CCK1 протеините. От това следва, че промени в температурното стабилизиране на CCK2 най-вероятно протичат и *in vivo* при упражняването на регулаторните функции на комплекса, една от които е разпределението на енергия на възбуждане между ФС1 и ФС2.

Друг фактор, определящ микрообкръжението на CCK2, е липидният матрикс на тилакоидната мембрана. Известно е, че изолирани липидирани ламеларни агрегати от CCK2 с липиден състав и съотношение белтък:липид близки до нативните са термодинамично по-нестабилни, но запазват способността си да осъществяват светлинно-индуцирана реорганизация от температурно стабилизираните делипидирани CCK2 ламели, които обаче са фотонеактивни (Simidjiev et al. 1997). Данните за физикохимичните свойства на липидите в разстикованите мембрани, получени с два типа флуоресцентни багрила, представени в настоящата работа, бяха на пръв поглед противоречиви. Докато MC540 показва слаба способност за проникване в МУ (Фиг. 7а), което би могло да се обясни с по-плътно опаковане на липидите, лаурдан се инкорпорира добре в мембрания бислой на разстикованите мембрани (Фиг. 7б), което пък е индикация за повишение на флуидността на техния липиден матрикс. Проникването на MC540 зависи от повърхностните заряди на мембраните (Mateašik et al. 2002). Sheng et al. (2018) показват, че стромалната повърхност на тилакоидните мембрани е обогатена на анионни липиди и те образуват домени с висока концентрация на отрицателни заряди. Следователно инкорпорирането на MC540 в липидния матрикс на разстикованите мембрани най-вероятно е възпрепятствано от електростатичното му отблъскване от отрицателно заредени липидни молекули по стромалната повърхност на мембраните, които в стиковано състояние са екранирани от катионите в стромата на хлоропласта. Понижението на параметъра GP на лаурдана при МУ в сравнение с MS недвусмислено показва, че липидният матрикс на разстикованите мембрани е по-флуиден и това може да бъде разглеждано като предпоставка за улеснена дифузия на пигмент-протеиновите комплекси и тяхното хаотично разположение в равнината на мембраните. Частичното разстиковане на тилакоидите, постигнато чрез третиране със светлина с висок интензитет, също предизвиква флуидизация на мембраната (Yamamoto et al. 2013). В разрез с тези резултати, според Rumak et al. (2010), степента на опаковане на липидите и съотношението липиди: протеини не се различава за стиковани и разстиковани мембрани. Причината за това противоречие най-вероятно е по-продължителното промиване на мембраните с буфер с ниска йонна сила, което бе използвано в настоящата работа, и следователно, постигането на по-висока степен на разстиковане.

В съгласие с изводите от множество трудове (Butler and Kitajima 1975; Briantais et al. 1984; van der Weij-deWit et al. 2007; Kirchhoff et al. 2007a) повишената относителна амплитуда на F_{730} в емисионните спектри на нискотемпературна флуоресценция на разстиковани мембрани и ниският интензитет на индукционните криви на бърза флуоресценция на ФС2 на същия обект (Фиг. 8), дават индикация за функционирането на механизъм за пренасочване на енергията на възбуждане от ФС2 към ФС1.

Дигитониновият тест показва, че тилакоидните мембрани, изолирани от растения, отглеждани при нисък светлинен интензитет, имат с около 37% по-голямо относително съдържание на грани (Таблица 1). Според данните от стабилността на Ψ -тип ивиците на КД, повишеното количество грани бе асоциирано с намаление на стабилността на макроорганизацията на фотосинтетичните комплекси в равнината на мембраната

(дестабилизация на ивиците (+)506 nm и (+)694 nm, Таблица 2). Отместването на свързания с хиралната подредба на пигмент-протеиновите комплекси термодинамичен преход T1* към по-ниска температура също потвърждава това наблюдение (Фиг. 4, Таблица 3). От друга страна стабилността на самите гранални структури (отразяваща се на интензитета на ивицата (-)679 nm, Таблица 2) не бе повлияна.

Друг ясно изразен ефект, наблюдаван при тилакоидите, характеризиращи се с по-голямо съдържание на грани (индуцирано чрез отглеждане на растенията при ниска светлина), е дестабилизирането на CCK2, видимо от температурната стабилност на КД ивиците (+)483 nm/(-)473 nm и (-)657 nm (Таблица 2) и отместването на ендотермичния преход T6, показващ денатурацията на CCK2 към по-ниска температура (Фиг. 4, таблица 3). Наблюдаваното дестабилизиране би могло да се дължи на промяна в количественото съотношение на изоформите на Lhcb, както вече е докладвано за растения, отглеждани при нисък светлинен интензитет (Kouril et al. 2013; Albanese et al. 2016). Интересно, след разстиковането на LS, $T_m^{ДСК}$ на прехода T6 се отмества до температура, характерна за МУ мембрани (74-75 °C, Таблица 3) – т.е. и двата варианта мембрани достигат подобно състояние след разстиковане.

Данните от JIP-теста показаха, че адаптацията на граховите растения към нисък светлинен интензитет е съпроводена с увеличаване на количеството на енергията на възбуждане, разсеяна под формата на топлина, флуоресценция или при пренос към ФС1, и понижение на общата ефективност на ФСА (Фиг. 9, Таблица 6). При адаптираните към нисък светлинен интензитет растения бе наблюдавана също и частична декативация на РЦ на ФС2, а фотосинтетичният електронен транспорт бе повлиян на ниво редукция на крайните акцептори на ФС1 (Фиг. 9, Таблица 6). Тези резултати могат да бъдат обяснени чрез повишеното формиране на гранални области, за което е известно, че затруднява поправката на ФС2 и забавя преноса на електрони между ФС2 и ФС1 (Khatoon et al. 2009; Herbstova et al. 2012; Wood et al. 2018).

Аналогично на адаптираните към нисък светлинен интензитет тилакоиди, калориметричните измервания на тилакоидни мембрани, ресуспендирани в среда с ниско рН (за които бе определено, че образуват с около 70% повече грани от MS тилакоиди при рН 7.6, Таблица 1) сочат дестабилизиране на CCK2 с около 5 °C (от 73 °C до 67.5 °C, Фиг. 5), т.е. ефект още по-голям от този на отглеждането на растения при ниска светлина. При този вариант се наблюдава също и намаление на общата енталпия на прехода от нативно в денатурирано състояние. Подобно на тук описаните резултати, според Smith et al. (1989) понижаването на рН на средата, в която са ресуспендирани тилакоидите от рН 7.6 до 6.6 води до отместване на $T_m^{ДСК}$ на CCK2 към температура по-ниска с около 5 °C. Semenova (2002) и Goss et al. (2007) докладват за архитектурна реорганизация и повишаване на относителното съдържание на стиковани грани при тилакоидни мембрани, ресуспендирани в среда с ниско рН. Krumova et al. (2005) демонстрират, че денатурацията на изолирани CCK2 агрегати е кинетично зависим процес. Стабилността на протеините, чиято денатурация е кинетично контролирана, се определя не от по-високата термодинамична стабилност на нативната форма, а от разликата в енергетичното състояние на нативния протеин и междинните конформационни форми, които предхождат неговата денатурация. Тази енергийна бариера (активационна енергия на денатурация, E_a), предотвратява денатурацията на протеина във физиологични условия (Sanchez-Ruiz 2010). Описаните тук резултати потвърждават хипотезата на Krumova et al. (2005) за кинетично контролираната денатурация на CCK2 в неговото нативно мембранно обкръжение в тилакоидите. Според работата на Krumova et al. (2005) E_a на денатурацията на изолирани

делипидирани агрегати от CCK2 е около 200 kJ.mol^{-1} , докато изчисленията в настоящата работа сочат, че E_a на денатурация на CCK2 в тилакоидните мембрани е приблизително двойно по-ниска – около 100 kJ.mol^{-1} при тилакоиди в среда с pH 7.6 и около 70 kJ.mol^{-1} при pH 5.2. (Фиг. 6) Тези резултати потвърждават, че липидното микрообкръжение и степента на протониране на CCK2 комплексите имат голямо значение за тяхната термодинамична стабилност.

In vivo понижаване на pH на лумена на тилакоидите се осъществява при светлинно-индуциран пренос на електрони по фотосинтетичната ЕТВ. Като обратна връзка, при прекалено висок светлинен интензитет това води до потискане на функцията на ФС2 чрез процеса на нефотохимично гасене. При този процес в CCK2 протичат конформационни промени, обуславящи фотозащитната функция на комплекса. Тези изменения са провокирани от протонирането на CCK2 (Belgio et al. 2013), и от деепоксидирането и отделянето на свързания с него виолаксантин (Johnson et al. 2011; Janik et al. 2016). От своя страна, активността на виолаксантин деепоксидазата зависи от трансмембрания градиент на pH и наличието на МГДГ в микрообкръжението на CCK2 (Arnoux et al. 2009; Schaller et al. 2010; Fufezan et al. 2012). Докладвано е (Johnson et al. 2011), че третирането на хлоропласти с висок светлинен интензитет в продължение на 5 минути води до образуване на агрегати от CCK2, като този процес зависи от трансмембрания градиент на pH и активността на виолаксантин деепоксидазата. При тилакоидни мембрани изолирани от растения, осветявани за 30 минути с висок интензитет, от периферията на ФС2-CCK2 суперкомплексите се отделя антенен пентамер (съставен от CP24, CP29 и CCK2-M), който в последствие мигрира към периферията на граните или в стромата, дисоциира и става достъпен за взаимодействие с PsbS, а на по-късен етап е подложен на протеолиза (Betterle et al. 2009).

Същевременно, КД спектрите на изолирани тилакоидни мембрани (Jajoo et al. 2012), инкубирани в среда с pH 5.2, показват реорганизация на глобалната подредба на фотосинтетичните комплекси в равнината на мембраната, като при това не са наблюдавани изменения в конформацията на CCK2. Stoichev et al. (2015) демонстрират, че ресуспендирането на изолирани грани в среда с pH 5.2 води до увеличаване на относителната площ на мембраните, заета единствено от CCK2 комплекси, отделени от ФС2-CCK2 суперкомплексите, както и до хаотично разположение на пигмент-протеиновите комплекси в мембраната и до по-ниска термостабилност. Изследвания върху изолирани CCK2 агрегати, показват, че ресуспендирането в среда с pH 5.2 има ефект върху плътността на пакетиране на CCK2 тримерите и хомогенността на агрегатите (Andreeva et al. 2014). При поставянето на агрегати от протонирани CCK2 комплекси в условия на повърхностно напрежение, характерно за тилакоидната мембрана, не се описват промени във вторичната структура на CCK2, но се наблюдава отслабване на молекулните взаимодействия в и между CCK2 тримерите (Andreeva et al. 2015).

Така, в сравнение със „светосъбиращата“ конформация на CCK2, „фотозащитната“ форма, която се определя от състоянието му на протониране, дисоциирането му от ФС2, взаимодействието му с МГДГ и отделянето на виолаксантин от CCK2, се характеризира с по-ниска стабилност и понижена E_a на процеса на денатурация.

В заключение, бе установено, че термодинамичната стабилност на CCK2 нараства при разстиковане на тилакоидните мембрани и намалява с повишаване на относителното съдържание на грани. В основата на този ефект са промени в макроорганизацията подредбата на фотосинтетичните мембрани, които *in vivo* се модулират от интензитета и качествения състав

на светлината и представляват част от механизмите за адаптация на ФСА към светлинен стрес. По-ниската стабилност на CCK2 в стиковани грани може да бъде считана като следствие от по-висока молекулна гъвкавост на CCK2, необходима за оптималното осъществяване на неговите функции. От друга страна, CCK2 е значително стабилизиран в комплекса CCK2-ФС1 в разстиковани мембрани, при които няма сегрегация и специфична подредба на пигмент-протеиновите комплекси. Вероятно в това архитектурно състояние на тилакоидите CCK2 е достъпен за ензими, чиято функция се асоциира с разрушаване на CCK2 в светлинно-индуцирани процеси на разграждане на светосъбиращите комплекси или стареене. Например ензимът хл. *b* редуктаза, който превръща хл. *b*, важен за поддържането на стабилността на CCK2 тримерите, в производно на хл. *a* е ключов компонент в механизма на разграждане на CCK2 по време на стареене (Horie et al. 2009; Sato et al. 2015). Някои протеази, като FtsH (Želisko and Jackovski 2004) и SppA, която се намира предимно в строматлните ламели (където преимуществено се локализира и ФС1) и се характеризира с кинетика на действие близка до тази на светлинно-индуцираното разграждане на CCK2 (Lensch et al. 2001) са идентифицирани като ензими, които осъществяват протеолиза на CCK2. Želisko and Jackovski (2004) изказват хипотезата, че достъпът на протеолитични ензими до един от главните светоъбиращи комплекси на ФС2 – Lhcb3 е ограничен от стромално ориентиран хидрофилен периферен белтък. Според тези автори, най-вероятно е принадлежащият към ФС1 белтък – PsbD, да изпълнява тази функция. Така, термодинамичното стабилизиране на CCK2 изглежда е в тясна връзка със запазването на неговата структурна цялост в разстикованите мембрани.

V.2. Идентифициране на термодинамичния преход, отразяващ денатурацията на фикобилизомите при Synechocystis PCC6803. Установяване на фактори, които определят температурната стабилност на фикобилизомите.

За пръв път бе проведено изследване на цели клетки от *Synechocystis* и негови мутанти с ДСК, което позволи характеризирането на термодинамичната стабилност на фикобилизоми в нативната им клетъчна среда и оценката на различни фактори, които я контролират.

Термодинамичният преход, който се дължи на денатурацията на изолирани фикобилизоми от див тип *Synechocystis*, протича при 67 °C (Фиг. 11, таблица 7). В потвърждение на това, температурната стабилност на абсорбционните спектри на фикобилизомите сочи, че фикобилипротеиновите комплекси се разрушават при около 60-65 °C. Тъй като съотношението фикоцианин:алофикоцианин е 4:1 (Gnatt 1981), по всяка вероятност денатурацията на фикоцианина има най-голям принос за термодинамичния преход при 67 °C. Поради тяхното ниско съдържание, непигментираните линкерни протеини нямат значителен принос в термодинамичния профил на фикобилизомите. При Гаусовото разлагане на пика при 67 °C бяха получени 3 компонента. Най-нискотемпературният от тях (при 64 °C) има значително по-голяма амплитуда при фикобилизоми с компрометирана структура и допринася за асиметричността на прехода, съответстващ на денатурацията на фикобилизомите. Така, интензитетът на компонента при 64 °C и симетричността на термодинамичния преход могат да бъдат смятани за показателни за интактността на изследваните фикобилизоми. Другите два компонента, получени при математическото разлагане на термограмите на фикобилизоми див тип, са центрирани при 67 °C и 68 °C, и вероятно съответстват на температурите на денатурация на фикоцианина и алофикоцианина. Сходната структура на фикоцианина и алофикоцианина (Zuber 1983; Bryant et

al. 1985) предполага, че денатурацията им протича при близки температури. За разлика от работата на Wang (2013), представените тук термограми на изолирани фикобилизоми не съдържат екзотермични преходи, които се дължат на агрегиране на пробата. Това несъответствие вероятно е породено от използването на две различни среди за ресуспендиране и съхранение на фикобилизомите. В настоящата работа е използван 0.75 M NaKPO₄ буфер, който съдържа и 0.5 M (за див тип) или 0.75 M (за СК) захароза, докато Wang (2013) използва 0.75 M NaKPO₄ буфер без захароза, което е не позволява запазване интактноста на фикобилизомите.

Термограмите на фикобилизоми, изолирани от клетки на мутанта СК, съдържат три термодинамични прехода (при 68 °C, 77 °C и 96 °C, Фиг. 11b) и представят денатурацията на алофикоцианина и линкерните протеини. Определянето на температурната зависимост на абсорбционните спектри на СК фикобилизомите подпомогна разграничаването на тези две събития. Интензитетът на характерната за алофикоцианинови мономер ивица при 615 nm започва да намалява над 65 °C, а при достигане на 80 °C тази ивица изчезва (Фиг.12b). Пикът при 654 nm, който се дължи на абсорбцията от алофикоцианинови тримери изчезва при около 70 °C (Фиг.12b). Подобни данни докладват и други автори (MacColl 1998; 2004 и McGregor 2008). По този начин термодинамичните преходи при 68 °C и 77 °C могат да бъдат приписани съответно на мономеризация на тримерите на алофикоцианина и денатурация на алофикоцианиновите мономер и. Възможно е преходът при 96 °C в термограмите на СК фикобилизомите да се дължи на денатурация на линкерни протеини. Математическото разлагане на главния преход в термограмите на СК фикобилизомите до два компонента може би илюстрира денатурацията на алофикоцианинови тримери, свързани помежду си по два различни начина (описани в Arteni et al. 2009), при образуване на базалните цилиндри на фикобилизомите.

Сравнението между $T_m^{ДСК}$, c_p^{ex} и формата на доминиращите преходи в термограмите на интактни клетки див тип и СК, и на съответните изолирани фикобилизоми, показва голяма прилика, въпреки известни различия в $T_m^{ДСК}$, които най-вероятно се дължат на свойствата и състава на микросредата, в която се намират фикобилизомите (цитоплазма при интактни клетки и фосфатен буфер при изолирани фикобилизоми). Главният пик в термограмата на интактни фотоавтотрофни клетки *Synechocystis* див тип е при 63 °C (Фиг. 12). Stoichkova et al. (2007) докладват, че нагряване до около 60 °C предизвиква реорганизация и нарушаване на енергетичната свързаност между фикобилизомите и фотосистемите. От друга страна нашите данни показват, че амплитудата на абсорбционните ивици, характерни за фикобилизоми в интактни клетки див тип намалява драстично при нагряване до 60-65 °C, което потвърждава, че термодинамичният преход при около 63 °C в интактни клетки див тип (Фиг. 12) се дължи на денатурация на фикобилизомите. Доминиращият пик в термограмите на интактни СК клетки (Фиг. 12), както и този при изолирани СК фикобилизоми (Фиг. 11), бе асиметричен, с по-ниска амплитуда и бе центриран при по-висока температура (65 °C) отколкото при клетките от див тип, което позволява той да бъде приписан на дезинтегрирането на фикобилизоми, съставени единствено от алофикоцианин.

За останалите, по-нискоамплитудни преходи от термограмите на двата типа клетки принос най-вероятно имат температурно-индуцирани реорганизации на цитоплазмата, тилакоидните и плазмените мембрани (Laczko-Dobos et al. 2011). Минималните различия, открити при двата варианта клетки, по отношение на тези термодинамични преходи могат да бъдат отдадени на промени в организацията на тилакоидните мембрани и в клетъчния протеом при мутанта СК (Collins et al. 2012; Liberton et al. 2017).

Според очакванията, за мутантите BE и PAL, при които липсват фикобилизоми не се наблюдаваха термодинамични преходи в областта 60-65 °C, подобни на тези при СК и фотоавтотрофно отглеждания див тип клетки (Фиг. 13a). Наличието на множество припокриващи се пикове между 50 °C и 80 °C при мутанта PAL може да бъде обяснено с повишена експресия на някои от протеините, участващи в електронния транспорт и метаболизма на желязото и азота, както и субединици от ФС2 (Liberton et al. 2017).

Отместването на термодинамичния преход, отразяващ денатурацията на фикобилизомите при фотомиксотрофно отглеждани клетки див тип, към по-ниска температура (около 60 °C, Фиг. 13b), неговата слаба кооперативност и асиметричност в сравнение със същия пик при фотоавтотрофни клетки от див тип, напомнят за измененията, настъпващи при нарушаване на структурата на изолирани фикобилизоми чрез неколккратно замразяване и размразяване. Този извод е в съответствие с наблюдението на Tóth et al. (2015), че фотомиксотрофно отглежданите клетки съдържат частично деградирани фикобилизоми, които не са функционално свързани с фотосистемите.

Денатурацията на фикобилизомите при мутанта PSII⁻, които са свързани с ФС1, но при който липсва ФС2 (Mullineaux 1994), протича при температура около 63 °C (Фиг. 13 c), близка до тази, характерна за фотоавтотрофните клетки от див тип. За сравнение, температурата на денатурация на фикобилизомите при мутанта PSI⁻ /ArcE⁻, при който фикобилизомите не са свързани нито с ФС1, нито с ФС2 (Shen et al. 1993), е по-ниска с около 2 °C (61 °C, Фиг. 13c). Тези данни демонстрират, че взаимодействието на фикобилизомите с ФС1 или ФС2 води до тяхното термодинамично стабилизиране.

VI.ИЗВОДИ

1. Структурната стабилност на CCK2 зависи силно от архитектурата на тилакоидните мембрани.
2. Стабилизирането на CCK2 при разстиковане на тилакоидните мембрани е асоциирано със свързването му с ФС1 и повишаване на флуидността на липидния матрикс на мембраната.
3. Повишаването на степента на стикованост на тилакоидите води до понижение на термодинамичната стабилност на CCK2.
4. Потвърдено е, че увеличеното количество на граните на тилакоиди, адаптирани към нисък светлинен интензитет, е придружено от реорганизация на ФС2 и понижена ефективност на електронния транспорт към ФС1.
5. Фотозащитната форма на CCK2, индуцирана чрез инкубиране на тилакоидните мембрани при рН 5.2, се характеризира с по-ниска термодинамична стабилност, отколкото светосъбиращата му форма.
6. ДСК е метод, подходящ за определяне на структурната цялост на фикобилизоми в изолирано състояние и в интактни клетки на цианобактерии.
7. Термодинамичната стабилност на фикобилизомите зависи от асоциирането им към фотосистемите, като свързването им към ФС1 или ФС2 води до тяхното стабилизиране.

VII. ПРИНОСИ

1. Проведено е детайлно проучване на факторите определящи зависимостта на термостабилността на CCK2 от архитектурата на тилакоидните мембрани. Показано е значението на протеин-протеиновите и протеин-липидните взаимодействия за термодинамичната стабилност на CCK2.

2. Демонстрирана е корелация между степента на стиковане на тилакоидните мембрани, контролирана от условията на осветяване по време на отглеждане на растенията, и температурната стабилност на CCK2.

3. За пръв път е изследвана кинетичната стабилност на CCK2, в нативно мембранно обкръжение, в две функционални състояния - светосъбиращо и фотозащитно.

4. Сравнени са термодинамичните профили на интактни изолирани фикобилизоми, както и цели клетки на редица мутанти на *Synechocystis*. Идентифициран е термодинамичният преход, отразяващ денатурацията на фикобилизомите. Доказана е приложимостта на ДСК, като метод за оценка на структурната цялост на фикобилизомите в цели клетки *Synechocystis* див тип и негови мутанти.

VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Petrova, N., Todinova, S., Laczko-Dobos, H., Zakar, T., Vajravel, S., Taneva, S., ... & Krumova, S. (2018). Structural integrity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 phycobilisomes evaluated by means of differential scanning calorimetry. *Photosynthesis Research*, 137(1), 95-104. – IF **3.057**, Q1

2. Petrova, N., Todinova, S., Paunov, M., Kovács, L., Taneva, S., & Krumova, S. (2018). Thylakoid membrane unstacking increases LHCII thermal stability and lipid phase fluidity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(6), 425-435.- IF **2.548**, Q2

Забелязани цитати:

Lambrev, P. H., & Akhtar, P. (2019). Macroorganisation and flexibility of thylakoid membranes. *Biochemical Journal*, 476(20), 2981-3018.

3. Petrova, N., Stoichev, S., Paunov, M., Todinova, S., Taneva, S. G., & Krumova, S. (2019). Structural organization, thermal stability, and excitation energy utilization of pea thylakoid membranes adapted to low light conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(12), 188. – IF **1.608**, Q2

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. „Relation between thylakoid membrane stacking and drought stress response“, Nia Petrova, Momchil Paunov, Svetozar Stoichev, Svetla Todinova, Stefka G. Taneva, Sashka Krumova, представяне на постер на Международна конференция „Климентови дни“, 8-9 ноември 2018, София, България
2. „Altered structural organization of photosynthetic membranes affects their susceptibility to drought stress“, Nia Petrova, Momchil Paunov, Svetozar Stoichev, Svetla Todinova, Stefka G. Taneva, Sashka Krumova, представяне на постер на Международна конференция „Plant physiology and biochemistry“, 9-10 юли 2018, Виена, Австрия
3. „Growth light intensity effect on the structural stability of LHCII in pea thylakoids“, Nia Petrova, Svetozar Stoichev, Svetla Todinova, Stefka Taneva, Sashka Krumova, представяне на постер на Семинар по екология с международно участие, 26-27 април 2018, София, България
4. „Thylakoid membrane macroorganization affects the thermal stability and functionality of the photosynthetic complexes“, Nia Petrova, Svetla Todinova, Momchil Paunov, Stefka Taneva, Sashka Krumova, представяне на постер на Международния младежки научен форум „The Sao Paulo School of Advanced Science on Biophysical Methods to Study Biomolecular Interactions“, 16-27 октомври 2017, Сао Пауло, Бразилия
5. „Probing the phycobilisome stability in *Synechocystis* cells by microcalorimetry“, Nia Petrova, Svetla Todinova, Tamas Zakar, Tünde Tóth, Stefka Taneva, Zoltan Gombos, Sashka Krumova, представяне на постер на Семинар по екология с международно участие, 27-28 април 2017, София, България
6. „*In vivo* calorimetric characterization of phycobilisomes in *Synechocystis* PCC6803“, Nia Petrova, Sashka Krumova, Svetla Todinova, Anna Sallai, Tamas Zakar, Gombos Zoltan, Stefka G. Taneva, представяне на доклад на Семинар по екология с международно участие, 21-22 април 2016, София, България
7. „Енергетика на формирането на подредени белтъчни макродомени в тилакоидни мембрани от *Pisum sativum* и *Hordeum vulgare*“, Ния Петрова, Светла Тодинова, Стефка Танева, Сашка Крумова, представяне на доклад на Интердисциплинарен докторантски форум, 6-7 април 2016, София, България
8. „Thermodynamics of stacked-unstacked-restacked switch in thylakoids“, Nia Petrova, Svetla Todinova, Wolfgang P. Schröder, Stefka G. Taneva, Sashka Krumova, представяне на постер на международния младежки научен форум „The Venice School on Photosynthesis 2016“, 25-29 януари 2016, Венеция, Италия

X. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Ajlani, G., & Vernotte, C. (1998). Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Molecular Biology*, 37(3), 577-580.
2. Albanese, P., Manfredi, M., Meneghesso, A., Marengo, E., Saracco, G., Barber, J., ... & Pagliano, C. (2016). Dynamic reorganization of photosystem II supercomplexes in response to variations in light intensities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(10), 1651-1660.
3. Allen, M. M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates 1, 2. *Journal of Phycology*, 4(1), 1-4.
4. Andreeva, T. D., Castano, S., Krumova, S., Lecomte, S., & Taneva, S. G. (2015). Effect of protonation on the secondary structure and orientation of plant light-harvesting complex II studied by PM-IRRAS. *Langmuir*, 31(42), 11583-11590.
5. Andreeva, T. D., Krumova, S. B., Minkov, I. L., Busheva, M., Lalchev, Z., & Taneva, S. G. (2014). Protonation-induced changes in the macroorganization of LHCII monolayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 460, 196-203.
6. Andrizhiyevskaya, E. G., Chojnicka, A., Bautista, J. A., Diner, B. A., van Grondelle, R., & Dekker, J. P. (2005). Origin of the F685 and F695 fluorescence in photosystem II. *Photosynthesis Research*, 84(1-3), 173-180.
7. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1.
8. Arnoux, P., Morosinotto, T., Saga, G., Bassi, R., & Pignol, D. (2009). A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(7), 2036-2044.
9. Arteni, A. A., Ajlani, G., & Boekema, E. J. (2009). Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(4), 272-279.
10. Belgio, E., Duffy, C. D., & Ruban, A. V. (2013). Switching light harvesting complex II into photoprotective state involves the lumen-facing apoprotein loop. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(29), 12253-12261.
11. Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., & Rochaix, J. D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433(7028), 892.
12. Betterle, N., Ballottari, M., Zorzan, S., de Bianchi, S., Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., ... & Bassi, R. (2009). Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 15255-15266.
13. Bittersmann, E., & Vermaas, W. (1991). Fluorescence lifetime studies of cyanobacterial photosystem II mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1098(1), 105-116.
14. Bressan, M., Bassi, R., & Dall'Osto, L. (2018). Loss of LHCI system affects LHCII re-distribution between thylakoid domains upon state transitions. *Photosynthesis Research*, 135(1-3), 251-261.
15. Bressan, M., Dall'Osto, L., Bargigia, I., Alcocer, M. J., Viola, D., Cerullo, G., ... & Ballottari, M. (2016). LHCII can substitute for LHCI as an antenna for photosystem I but with reduced light-harvesting capacity. *Nature Plants*, 2(9), 16131.
16. Briantais, J. M., Vernotte, C., Olive, J., & Wollman, F. A. (1984). Kinetics of cation-induced changes of photosystem II fluorescence and of lateral distribution of the two photosystems in the thylakoid membranes of pea chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 766(1), 1-8.

17. Bryant, D. A., De Lorimier, R., Lambert, D. H., Dubbs, J. M., Stirewalt, V. L., Stevens, S. E., ... & Jay, E. (1985). Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha and beta subunits of allophycocyanin from the cyanelle genome of *Cyanophora paradoxa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10), 3242-3246.
18. Butler, W. L., & Kitajima, M. (1975). Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 396(1), 72-85.
19. Chow, W. S., Thorne, S. W., Duniec, J. T., Sculley, M. J., & Boardman, N. K. (1980). The stacking of chloroplast thylakoids: effects of cation screening and binding, studied by the digitonin method. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(1), 347-355.
20. Collins, A. M., Liberton, M., Jones, H. D., Garcia, O. F., Pakrasi, H. B., & Timlin, J. A. (2012). Photosynthetic pigment localization and thylakoid membrane morphology are altered in *Synechocystis* 6803 phycobilisome mutants. *Plant Physiology*, 158(4), 1600-1609.
21. Crepin, A., & Caffarri, S. (2015). The specific localizations of phosphorylated Lhcb1 and Lhcb2 isoforms reveal the role of Lhcb2 in the formation of the PSI-LHCII supercomplex in *Arabidopsis* during state transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(12), 1539-1548.
22. Croce, R., & Bassi, R. (1998). The light-harvesting complex of photosystem I: pigment composition and stoichiometry. In *Photosynthesis: mechanisms and effects* (pp. 421-424). Springer, Dordrecht.
23. Dobrikova, A. G., Várkonyi, Z., Krumova, S. B., Kovács, L., Kostov, G. K., Todinova, S. J., ... & Garab, G. (2003). Structural rearrangements in chloroplast thylakoid membranes revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. Thermo-optic effect. *Biochemistry*, 42(38), 11272-11280.
24. Fufezan, C., Simionato, D., & Morosinotto, T. (2012). Identification of key residues for pH dependent activation of violaxanthin de-epoxidase from *Arabidopsis thaliana*. *PloS One*, 7(4), e35669.
25. Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), 327-347.
26. Garab, G., & van Amerongen, H. (2009). Linear dichroism and circular dichroism in photosynthesis research. *Photosynthesis Research*, 101(2-3), 135-146.
27. Garnier, F., Dubacq, J. P., & Thomas, J. C. (1994). Evidence for a transient association of new proteins with the *Spirulina maxima* phycobilisome in relation to light intensity. *Plant Physiology*, 106(2), 747-754.
28. Glazer, A. N. (1988). [32] Phycobilisomes. In *Methods in enzymology* (Vol. 167, pp. 304-312). Academic Press.
29. Goltsev, V. N., Kalaji, H. M., Paunov, M., Bąba, W., Horaczek, T., Mojski, J., ... & Allakhverdiev, S. I. (2016). Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(6), 869-893.
30. Goss, R., Oroszi, S., & Wilhelm, C. (2007). The importance of grana stacking for xanthophyll cycle-dependent NPQ in the thylakoid membranes of higher plants. *Physiologia Plantarum*, 131(3), 496-507.
31. Harrison, M. A., & Melis, A. (1992). Organization and stability of polypeptides associated with the chlorophyll ab light-harvesting complex of photosystem-II. *Plant and cell physiology*, 33(5), 627-637.

32. Herbstová, M., Tietz, S., Kinzel, C., Turkina, M. V., & Kirchhoff, H. (2012). Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 20130-20135.
33. Horie, Y., Ito, H., Kusaba, M., Tanaka, R., & Tanaka, A. (2009). Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17449-17456.
34. Jajoo, A., Szabó, M., Zsiros, O., & Garab, G. (2012). Low pH induced structural reorganization in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(8), 1388-1391.
35. Janik, E., Bednarska, J., Zubik, M., Sowinski, K., Luchowski, R., Grudzinski, W., ... & Gruszecki, W. I. (2016). The xanthophyll cycle pigments, violaxanthin and zeaxanthin, modulate molecular organization of the photosynthetic antenna complex LHCII. *Archives of biochemistry and biophysics*, 592, 1-9.
36. Johnson, M. P., Goral, T. K., Duffy, C. D., Brain, A. P., Mullineaux, C. W., & Ruban, A. V. (2011). Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. *The Plant Cell*, 23(4), 1468-1479.
37. Johnson, M. P., Goral, T. K., Duffy, C. D., Brain, A. P., Mullineaux, C. W., & Ruban, A. V. (2011). Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. *The Plant Cell*, 23(4), 1468-1479.
38. Kaftan, D., Brumfeld, V., Nevo, R., Scherz, A., & Reich, Z. (2002). From chloroplasts to photosystems: in situ scanning force microscopy on intact thylakoid membranes. *The EMBO Journal*, 21(22), 6146-6153.
39. Khatoon, M., Inagawa, K., Pospíšil, P., Yamashita, A., Yoshioka, M., Lundin, B., ... & Yamamoto, Y. (2009). Quality control of photosystem II thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25343-25352.
40. Kirchhoff, H., Haase, W., Haferkamp, S., Schott, T., Borinski, M., Kubitscheck, U., & Rögner, M. (2007a). Structural and functional self-organization of Photosystem II in grana thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1180-1188.
41. Kirchhoff, H., Haase, W., Wegner, S., Danielsson, R., Ackermann, R., & Albertsson, P. A. (2007b). Low-light-induced formation of semicrystalline photosystem II arrays in higher plant chloroplasts. *Biochemistry*, 46(39), 11169-11176.
42. Krumova, S. B., Koehorst, R. B., Bóta, A., Páli, T., van Hoek, A., Garab, G., & van Amerongen, H. (2008). Temperature dependence of the lipid packing in thylakoid membranes studied by time-and spectrally resolved fluorescence of Merocyanine 540. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(12), 2823-2833.
43. Krumova, S. B., Laptinok, S. P., Borst, J. W., Ughy, B., Gombos, Z., Ajlani, G., & Van Amerongen, H. (2010b). Monitoring photosynthesis in individual cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 on a picosecond timescale. *Biophysical Journal*, 99(6), 2006-2015.
44. Krumova, S. B., Todinova, S. J., Busheva, M. C., & Taneva, S. G. (2005). Kinetic nature of the thermal destabilization of LHCII macroaggregates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78(2), 165-170.

45. Krumova, S. B., Todinova, S. J., Dobrikova, A. G., & Taneva, S. G. (2011). Differential scanning calorimetry of photosynthetic membranes: resolving contributions of the major photosynthetic complexes to the sequential thermal transitions. *Trends Photochem. Photobiol*, 12, 37-51.
46. Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J. B., Croce, R., & Boekema, E. J. (2013). High-light vs. low-light: effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(3), 411-419.
47. Laczkó-Dobos, H., Todinova, S. J., Sözer, Ö., Komenda, J., Kis, M., Sallai, A., ... & Apostolova, E. L. (2011). Identification of thylakoid membrane thermal transitions in *Synechocystis* sp. PCC6803 photosynthetic mutants. *Photosynthesis Research*, 107(3), 237-246.
48. Lambrev, P. H., Várkonyi, Z., Krumova, S., Kovács, L., Miloslavina, Y., Holzwarth, A. R., & Garab, G. (2007). Importance of trimer-trimer interactions for the native state of the plant light-harvesting complex II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(6), 847-853.
49. Lensch, M., Herrmann, R. G., & Sokolenko, A. (2001). Identification and characterization of SppA, a novel light-inducible chloroplast protease complex associated with thylakoid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33645-33651.
50. Liberton, M., Chrisler, W. B., Nicora, C. D., Moore, R. J., Smith, R. D., Koppenaal, D. W., ... & Jacobs, J. M. (2017). Phycobilisome truncation causes widespread proteome changes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PloS One*, 12(3), e0173251.
51. Lichtenthaler, H. K., Kuhn, G., Prenzel, U., Buschmann, C., & Meier, D. (1982a). Adaptation of chloroplast-ultrastructure and of chlorophyll-protein levels to high-light and low-light growth conditions. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 37(5-6), 464-475.
52. Lichtenthaler, H. K., Kuhn, G., Prenzel, U., & Meier, D. (1982b). Chlorophyll-protein levels and degree of thylakoid stacking in radish chloroplasts from high-light, low-light and bentazon-treated plants. *Physiologia Plantarum*, 56(2), 183-188.
53. MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124(2-3), 311-334.
54. MacColl, R. (2004). Allophycocyanin and energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1657(2-3), 73-81.
55. Mateašik, A., Šikurová, L., & Chorvát Jr, D. (2002). Interaction of merocyanine 540 with charged membranes. *Bioelectrochemistry*, 55(1-2), 173-175.
56. Mehta, P., Allakhverdiev, S. I., & Jajoo, A. (2010). Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynthesis Research*, 105(3), 249-255.
57. Minagawa, J. (2011). State transitions—the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 897-905.
58. Mullineaux, C. W. (1994). Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1184(1), 71-77.
59. Nolan, W. G., Hopkins Jr, H. P., & Kalini, S. A. (1992). Differential scanning calorimetric investigation of pea chloroplast thylakoids and thylakoid fractions. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 297(1), 19-27.
60. Rumak, I., Gieczewska, K., Kierdaszuk, B., Gruszecki, W. I., Mostowska, A., Mazur, R., & Garstka, M. (2010). 3-D modelling of chloroplast structure under (Mg²⁺) magnesium ion

- treatment. Relationship between thylakoid membrane arrangement and stacking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(10), 1736-1748.
61. Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophysical Chemistry*, 148(1-3), 1-15.
 62. Sato, R., Ito, H., & Tanaka, A. (2015). Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. *Photosynthesis Research*, 126(2-3), 249-259.
 63. Schaller, S., Latowski, D., Jemioła-Rzemińska, M., Wilhelm, C., Strzałka, K., & Goss, R. (2010). The main thylakoid membrane lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) promotes the de-epoxidation of violaxanthin associated with the light-harvesting complex of photosystem II (LHCII). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(3), 414-424.
 64. Semenova, G. A. (2002). The thylakoid membrane in a wide pH range. *Journal of Plant Physiology*, 159(6), 613-625.
 65. Shen, G., Boussiba, S., & Vermaas, W. F. (1993). Synechocystis sp PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function. *The Plant Cell*, 5(12), 1853-1863.
 66. Sheng, X., Liu, X., Cao, P., Li, M., & Liu, Z. (2018). Structural roles of lipid molecules in the assembly of plant PSII–LHCII supercomplex. *Biophysics Reports*, 4(4), 189-203.
 67. Simidjiev, I., Barzda, V., Mustárdy, L., & Garab, G. (1997). Isolation of lamellar aggregates of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of photosystem II with long-range chiral order and structural flexibility. *Analytical Biochemistry*, 250(2), 169-175.
 68. Smith, K. A., Ardel, B. K., Huner, N. P., Krol, M., Myscich, E., & Low, P. S. (1989). Identification and partial characterization of the denaturation transition of the light harvesting complex II of spinach chloroplast membranes. *Plant Physiology*, 90(2), 492-499.
 69. Stoichev, S., Krumova, S. B., Andreeva, T., Busto, J. V., Todinova, S., Balashev, K., ... & Taneva, S. G. (2015). Low pH modulates the macroorganization and thermal stability of PSII supercomplexes in grana membranes. *Biophysical Journal*, 108(4), 844-853.
 70. Stoitchkova, K., Zsiros, O., Jávorf, T., Páli, T., Andreeva, A., Gombos, Z., & Garab, G. (2007). Heat-and light-induced reorganizations in the phycobilisome antenna of Synechocystis sp. PCC 6803. Thermo-optic effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(6), 750-756.
 71. Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In *Chlorophyll a fluorescence* (pp. 321-362). Springer, Dordrecht.
 72. Szilágyi, A., Selstam, E., & Åkerlund, H. E. (2008). Laurdan fluorescence spectroscopy in the thylakoid bilayer: the effect of violaxanthin to zeaxanthin conversion on the galactolipid dominated lipid environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(1), 348-355.
 73. Thomas, J. C., Ughy, B., Lagoutte, B., & Ajlani, G. (2006). A second isoform of the ferredoxin: NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48), 18368-18373.
 74. Thompson, L. K., Blaylock, R., Sturtevant, J. M., & Brudvig, G. W. (1989). Molecular basis of the heat denaturation of photosystem II. *Biochemistry*, 28(16), 6686-6695.
 75. Tikkanen, M., Grieco, M., & Aro, E. M. (2011). Novel insights into plant light-harvesting complex II phosphorylation and 'state transitions'. *Trends in Plant Science*, 16(3), 126-131.
 76. Tóth, T. N., Chukhutsina, V., Domonkos, I., Knoppová, J., Komenda, J., Kis, M., ... & Van Amerongen, H. (2015). Carotenoids are essential for the assembly of cyanobacterial photosynthetic complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(10), 1153-1165.

77. Tóth, T. N., Rai, N., Solymosi, K., Zsiros, O., Schröder, W. P., Garab, G., ... & Kovács, L. (2016). Fingerprinting the macro-organisation of pigment–protein complexes in plant thylakoid membranes in vivo by circular-dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(9), 1479-1489.
78. van der Weij-de Wit, C. D., Ihalainen, J. A., Van Grondelle, R., & Dekker, J. P. (2007). Excitation energy transfer in native and unstacked thylakoid membranes studied by low temperature and ultrafast fluorescence spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 93(1-3), 173-182.
79. Vermaas, W. F. J., Ikeuchi, M., & Inoue, Y. (1988). Protein composition of the photosystem II core complex in genetically engineered mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In *Molecular Biology of Photosynthesis* (pp. 389-405). Springer, Dordrecht.
80. Wang, Q. (2013). Three step dissociation and covalent stabilization of phycobilisome. In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future* (pp. 156-166). Springer, Berlin, Heidelberg.
81. Wientjes, E., van Amerongen, H., & Croce, R. (2013). LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(3), 420-426.
82. Wood, W. H., MacGregor-Chatwin, C., Barnett, S. F., Mayneord, G. E., Huang, X., Hobbs, J. K., ... & Johnson, M. P. (2018). Dynamic thylakoid stacking regulates the balance between linear and cyclic photosynthetic electron transfer. *Nature Plants*, 4(2), 116.
83. Yamamoto, Y., Hori, H., Kai, S., Ishikawa, T., Ohnishi, A., Tsumura, N., & Morita, N. (2013). Quality control of Photosystem II: reversible and irreversible protein aggregation decides the fate of Photosystem II under excessive illumination. *Frontiers in Plant Science*, 4, 433.
84. Yeang, H. Y., Yusof, F., & Abdullah, L. (1995). Precipitation of *Hevea brasiliensis* latex proteins with trichloroacetic acid and phosphotungstic acid in preparation for the Lowry protein assay. *Analytical Biochemistry*, 226(1), 35-43.
85. Żelisko, A., & Jackowski, G. (2004). Senescence-dependent degradation of Lhcb3 is mediated by a thylakoid membrane-bound protease. *Journal of Plant Physiology*, 161(10), 1157-1170.
86. Zuber, H. (1983). Photosynthetic prokaryotes. *Cell differentiation and function*. Elsevier, New York, 23-42.

Благодарности

На първо място благодаря на своя научен ръководител, проф. д-р Сашка Крумова, за всеотдайността, търпението, безрезервната подкрепа, предоставените възможности и готовността да споделя знанията и уменията си с мен.

Благодаря на своя научен консултант, проф. д-н Стефка Г. Танева, за поощрението и безпристрастния коректив.

Благодаря на всички колеги от секция „Биомакромолекули и междумолекулни взаимодействия“ за прекрасната работна атмосфера и плодотворния обмен на идеи.

Благодарна съм на своите колеги от Института по растителна биология в Центъра за биологични проучвания, гр. Сегед, Унгария – д-р Петър Ламбрев, д-р Ласло Ковач, д-р Парвин Ахтар и д-р Томаш Закар, за гостоприемството, придобития опит за работа в международна среда и достъпа до съвременни техники за проучване на фотосинтезата.

Посмъртно благодаря на проф. д-р Золтан Гомбош от Института по растителна биология в Центъра за биологични проучвания, гр. Сегед, Унгария за чудесните научни идеи, великодушието и увлекателните беседи.

Изказвам благодарности и към проф. д-р Василий Голцев от Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ за безценните съвети при измерване и интерпретиране на хлорофилната флуоресценция, както и за първите уроци по фотосинтеза.

Благодаря на проф. д-р Борис Шивачев, ИМК-БАН за оказаната помощ при измерванията на флуоресценция при стайна температура.

Сърдечно благодаря на семейството си за подкрепата и разбирането и на приятелите си – за удоволствието да растем заедно.