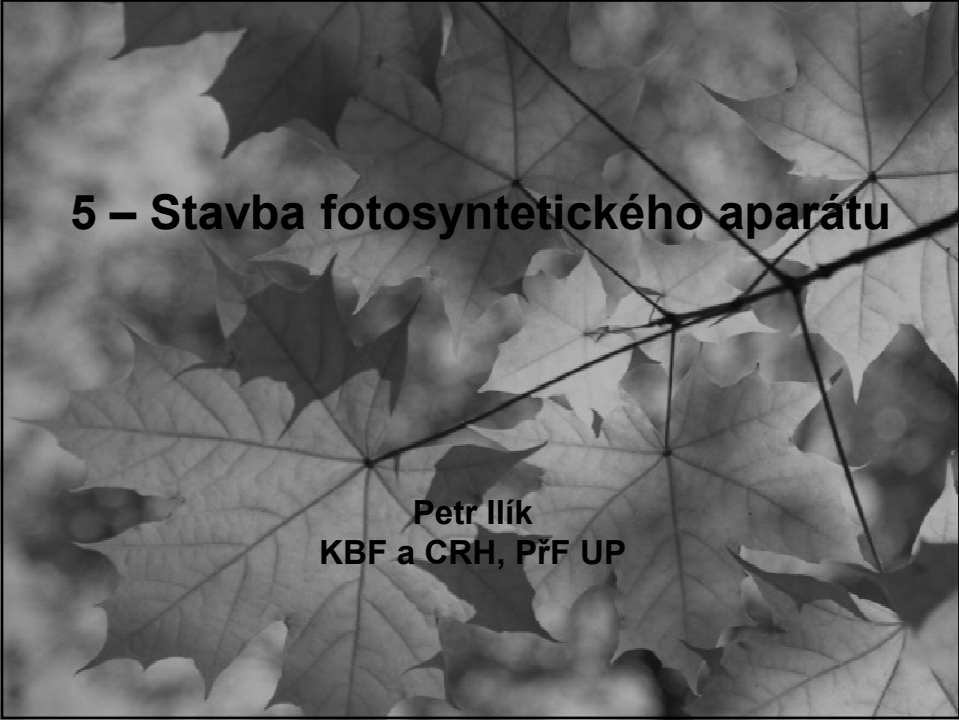




5 – Stavba fotosyntetického aparátu

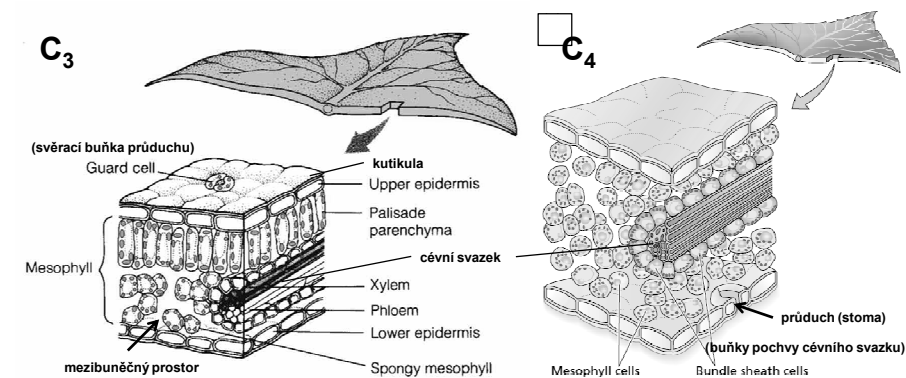
Petr Ilík
KBF a CRH, PřF UP

Strukturní komponenty

Strukturní komponenty – hierarchie:

- **molekulární** (enzymy, pigmenty, lipidy, ...)
- **supramolekulární** (pigment-proteinové komplexy (PPC) v membránách)
- **organely** (chloroplast, oddělený membránami od cytosolu)
- **buňky** (chloroplasty, mitochondrie, peroxizóm, ..., v cytosolu)
- **tkáně** (skupiny buněk, př. mezofylové buňky v listu)
- **orgány** (asociace různých tkání, př. list)

Struktura listu



C₃ – bifaciální list:

- kutikula, svrchní epidermis – proti ztrátám vody, ochrana před UV, regulace průduchy s chloroplasty, u jednoděložných průduchy u nahoře
- palisádový parenchým – 1-3 vrstvy, světlovodný efekt
- houbový parenchým – mnoho rozhraní voda/vzduch – rozptyl (spodek listů světlejší), větší diferenciace na vyšší ozáření
- jednotná funkce chloroplastů

C₄ – mezofylové buňky nahodile + buňky pochvy cévního svazku (Kranzovy, věnčité)

- mezofylové chloroplasty – fixace CO₂ do malátu (bez Rubisco), FS s Rubisco v chloroplastech buněk cévních svazků (C₄ rostliny „pracují“ i s dočasně zavřenými průduchy)

Diferenciace buněk u C₄ rostlin

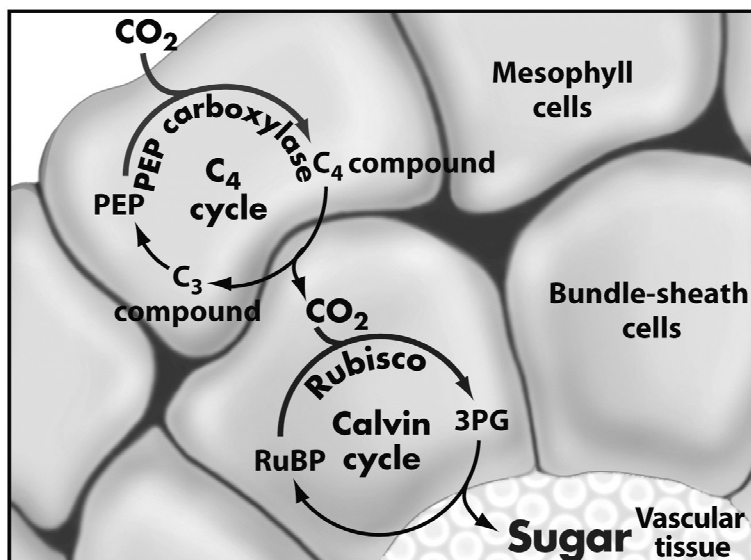
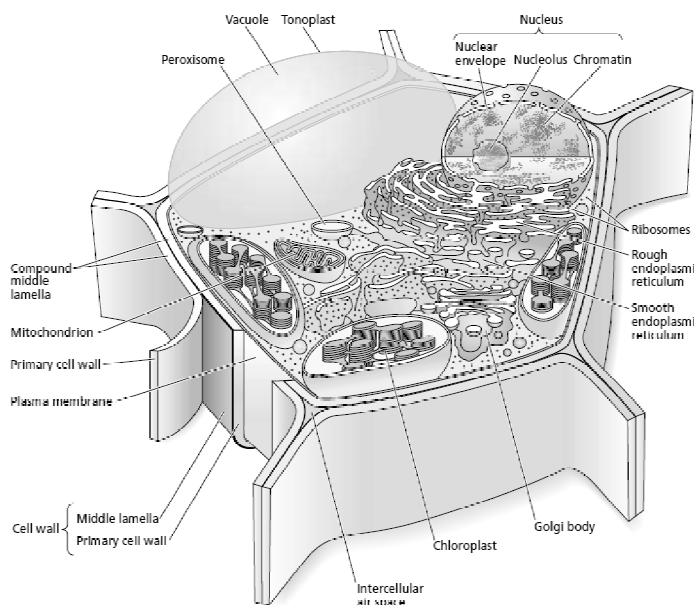


Figure 10-25b Biological Science, 2/e

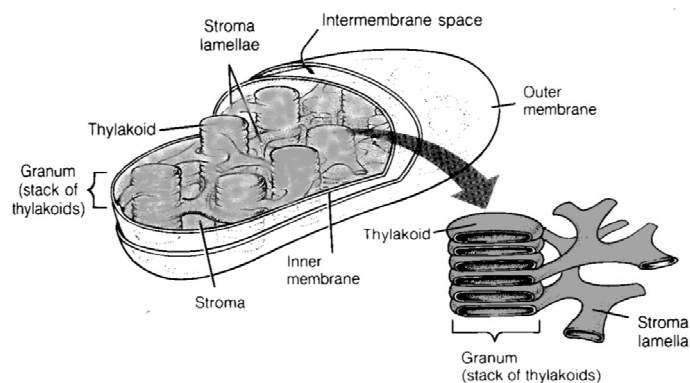
© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Rostlinná buňka



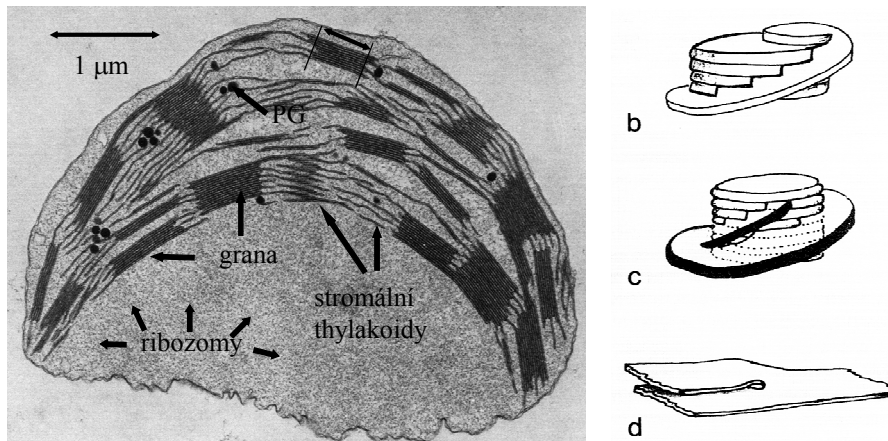
Chloroplasty

- **chloroplast** - organela s vlastní DNA (u řas a vyšších rostlin, dvojitá membrána, endosymbióza sinice), vnitřek chloroplastu - **stroma**, **systém thylakoidů (stromální thylakoidy, grana)**, thylakoid – základní strukturní jednotka FS, v thylakoidních membránách - proteinové komplexy, které váží fotosyntetické pigmenty,
- v buňce 20 – 200 chloroplastů, chloroplasty – mnoho tvarů - oválný (nižší a vyšší rostliny, průměr 3-20 μm), u řas i jiné tvary (miskovité, hvězdicovité, šroubovicové)

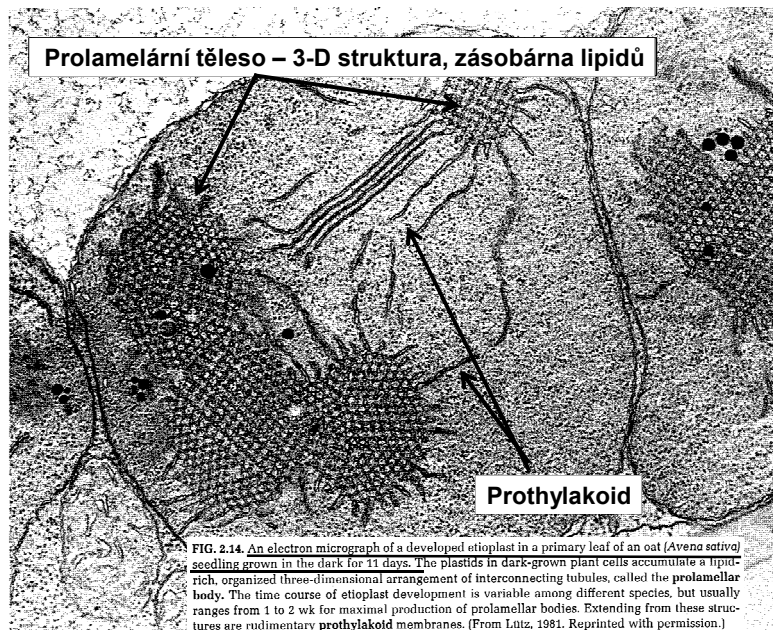


Thylakoidy

- všechny thylakoidy - **navzájem spojeny** (jeden útvar z *prolamelárního tělesa*), shlukování do **gran**, rozměr grana 300-600 nm – rozptyl světla
- snímek ultramikrostruktury chloroplastu - příčný řez - TEM (vizualizace membrán - OsO_4 , KMnO_4), PG – plastoglobule (zásoba plastochinonu – PQ), někdy škrobové zrno



Ontogeneze thylakoidů - 1



Ontogeneze thylakoidů - 2

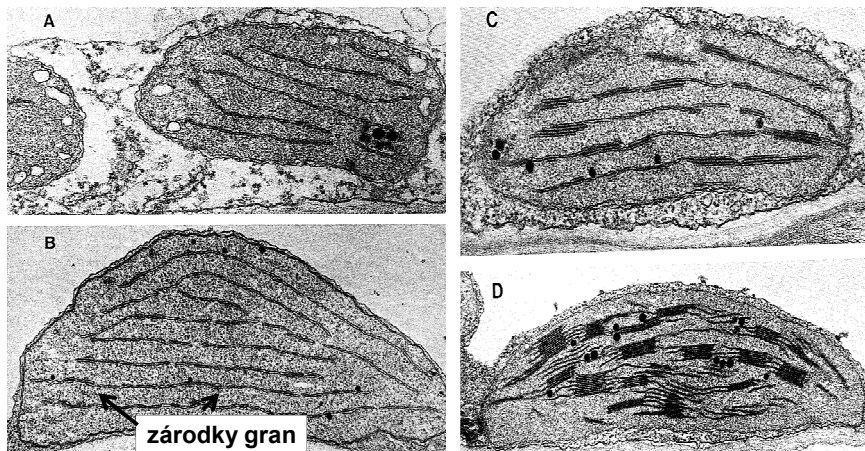
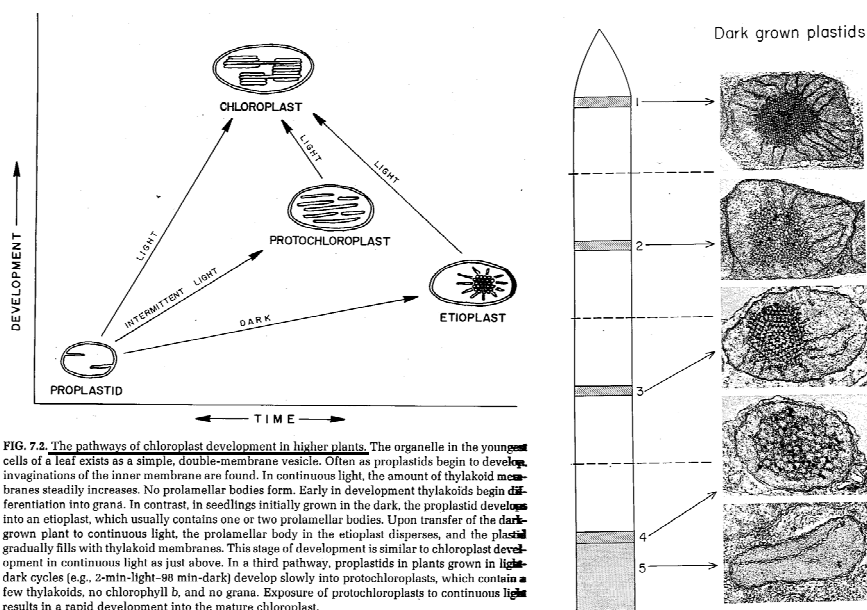
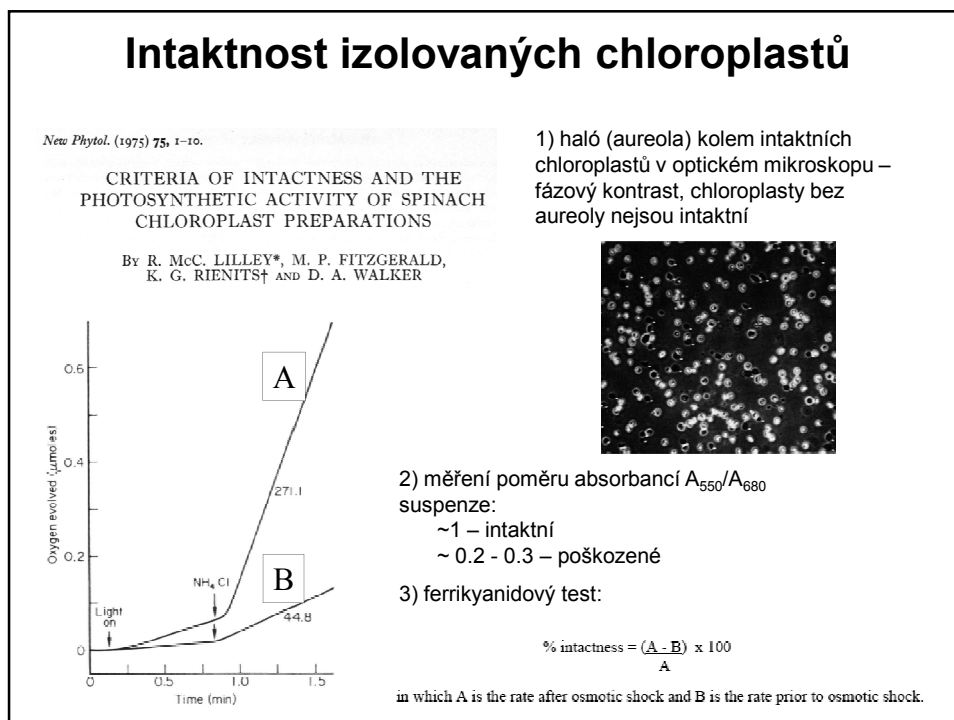
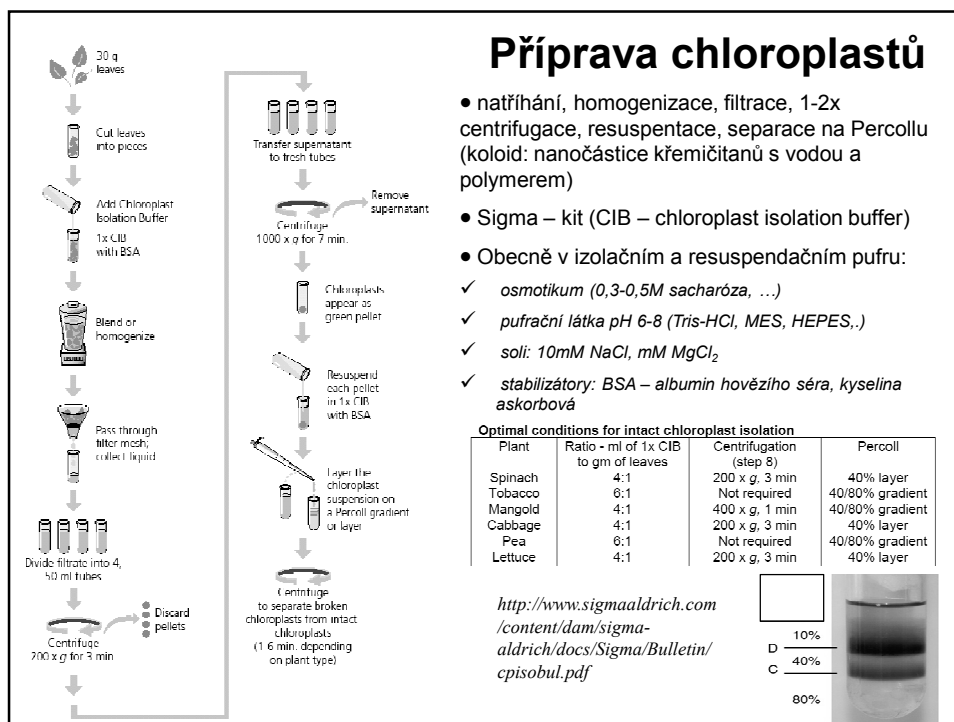


FIG. 7.5. Electron micrographs of chloroplasts at different stages of development in barley leaves. A: A plastid in the earliest stage of development. Thylakoid formation has begun, but all exist as single vesicles. B: A plastid in an intermediate stage of development, with very short regions of thylakoid fusion to form the first, rudimentary grana. C: A plastid at a later, nearly fully developed, stage. Grana formation by thylakoid appression is now extensive. D: A mature plastid with abundant thylakoid membranes, which are distinctly differentiated into granal and stromal thylakoids. This developmental process requires between 24 and 48 hr of continuous light. (From Robertson and Laetsch, 1974. Reprinted with permission. Micrographs courtesy of W. M. Laetsch.)

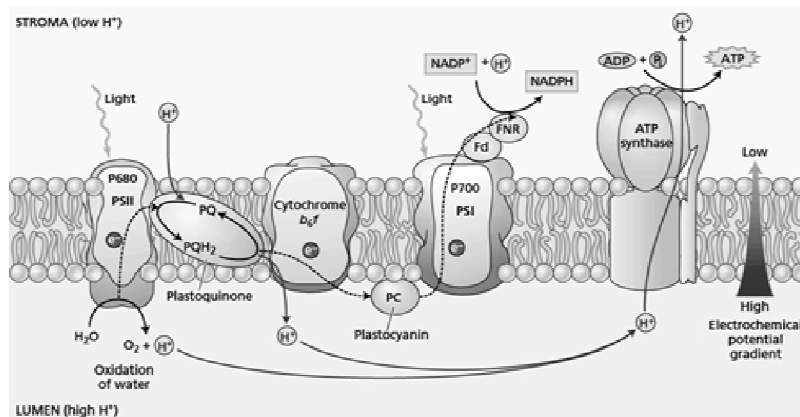
Ontogeneze thylakoidů - 3





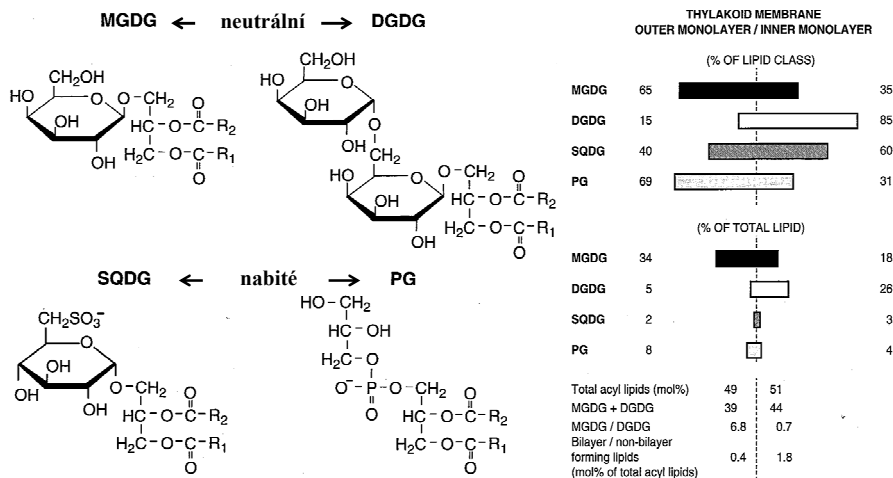
Struktura thylakoidních membrán

- lipidová dvojstva s periperními a integrálními protein. komplexy, tloušťka – 4-6 nm,
- 50 % hmotnosti - lipidy, zbytek proteiny, pigmenty
- lipid – hydrofilní hlava a hydrofóbní ocas (acylový řetězec – zbytek mastné kyseliny)
- hlavní lipidy: galaktolipidy: MGDG – nonogalaktosyldiacylglycerol a DGDG – digalaktosyldiacylglycerol, fosfolipidy: PG – fosfatidylglycerol, sulfolipidy: sulfochinovosyldiacylglycerol - SQDG

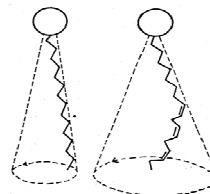
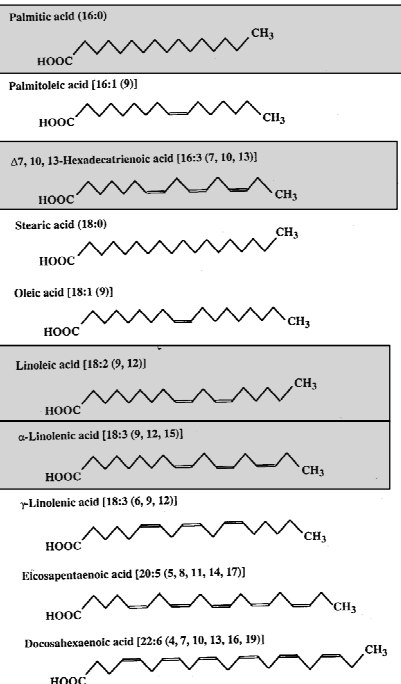


Lipidy thylakoidních membrán

- hlavní MGDG cca 50 % – tvoří dvojvrstvu – asociace s proteiny
- DGDG (30 %), PG (15 %), SQDG (5 %) – tvoří dvojvrstvu
- asymetrie lipidů v dvojvrstvě



- velké zastoupení polynenasycených mastných kyselin – zejména 3 - enol
- linolenová kyselina (18:3) – až 90 % (ω -3 mastná kyselina, esenciální pro člověka)
- linoleová (18:2) (ω -6 mastná kyselina, esenciální pro člověka)
- hexadekatrienolová kyselina (16:3)
- palmitová kyselina (16:0)
- míra saturace (počet =) rozhoduje o fluiditě thylakoidní membrány
- pohyby nasycených a nenasycených řetězců jsou různé



carboxyl group

stearic acid: an 18 carbon saturated fatty acid

oleic acid: an 18 carbon unsaturated fatty acid

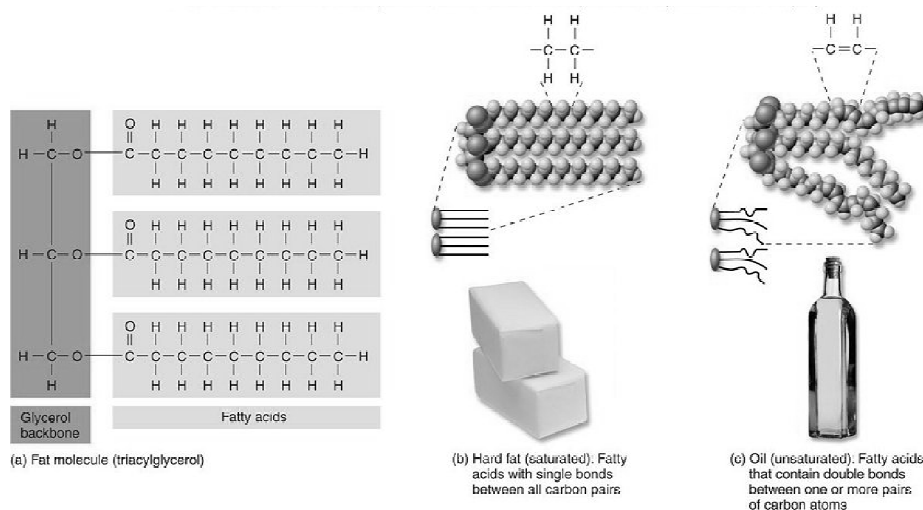
cis
ohnutý řetězec

trans
napřiměný řetězec

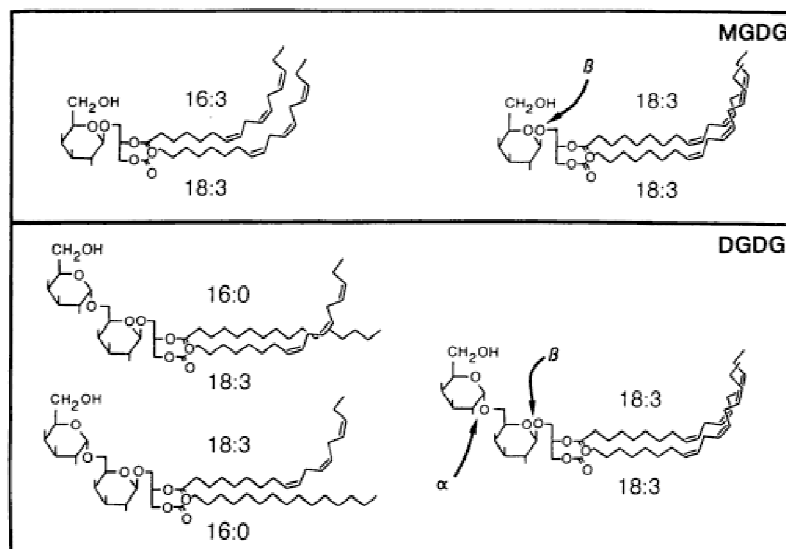
- dvojná vazba se projeví ve ztrátě linearity
- „zlomení“ mastné kyseliny roste s rostoucím počtem dvojných vazeb v cis konfiguraci
- přirozené zejména cis konfigurace (trans mastné kyseliny TFA: jednotky procent v mléce, sádle, vznikají při smažení a kat.

Konformace acylového řetězce

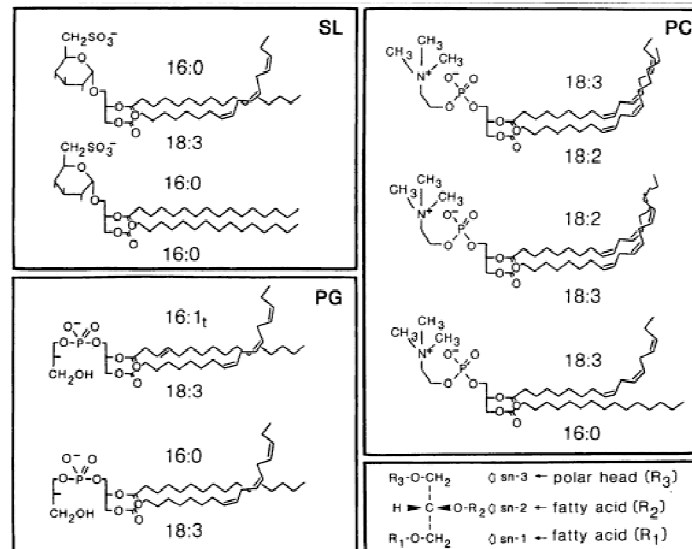
- saturace mastné kyseliny se projeví ve vyšší viskozitě
- ztužování olejů – hydrogenace mastných kyselin



Acylové řetězce lipidů thyl. membrán - 1



Acylové řetězce lipidů thyl. membrán - 2



Struktura thylakoidních membrán

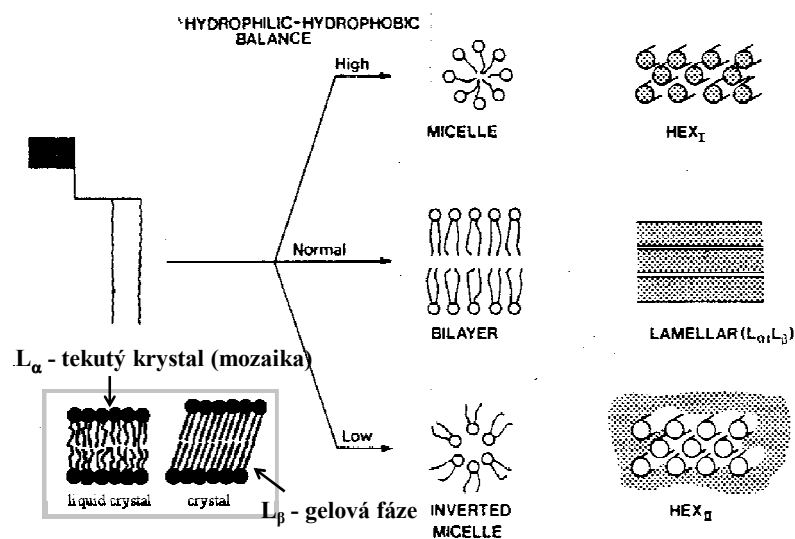
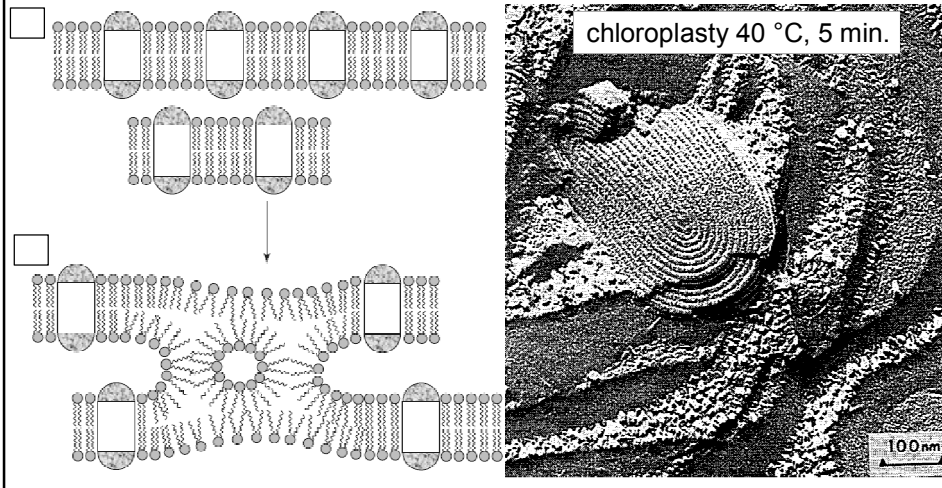


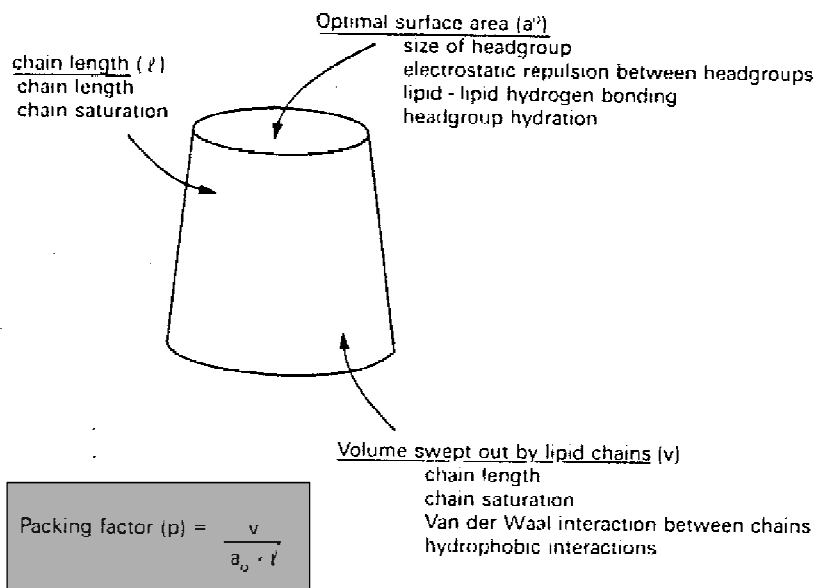
Fig. 1. Dependence of lipid phase behaviour on hydrophilic-hydrophobic balance.

Separace MGDG při stresových podmínkách

- **fázová separace MGDG**: tvorba cylindricky intertovaných micel (Hex II struktur) v thylakoidních membránách - při **vyšších teplotách** (nad 40 °C), **dehydrataci**, vysoké koncentraci cukrů nebo při nízkém pH (<5)



„Packing factor“ lipidů



“Packing factor” vs. struktura membrán

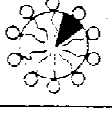
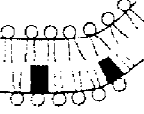
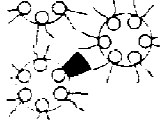
Packing Parameter	Critical packing shape	Structures formed
$<1/3$	Cone 	Spherical micelles 
$1/2 - 1$	Truncated cone 	vesicles 
>1	Inverted truncated cone 	Inverted micelles 

Fig. 3. Classification of lipids in terms of their characteristic packing factors (adapted from Israelachvili et al., 1980).

Fázové přechody vs. faktory prostředí

- s rostoucí teplotou – fázová separace NBL (non-bilayer forming lipids, MGDG), constrained NBL – separované MGDG v membráně, při vyšší teplotě mimo membránu
- s klesající teplotou přechod na z L_α na L_β
- s klesající hydratací membrán přechody stimulovány

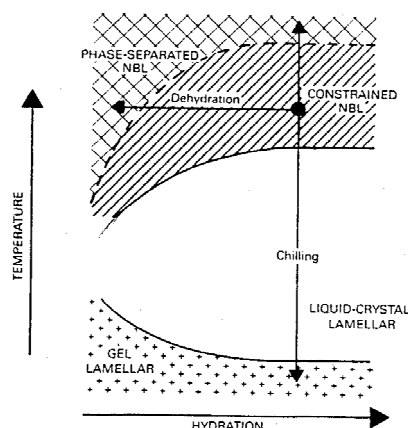


Fig. 7. Diagram illustrating the type of phase separations that might be expected for a natural membrane subjected to different forms of environmental stress.

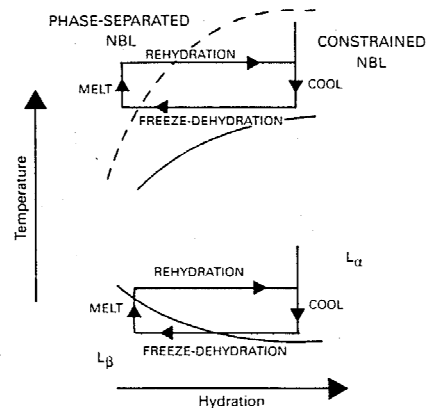


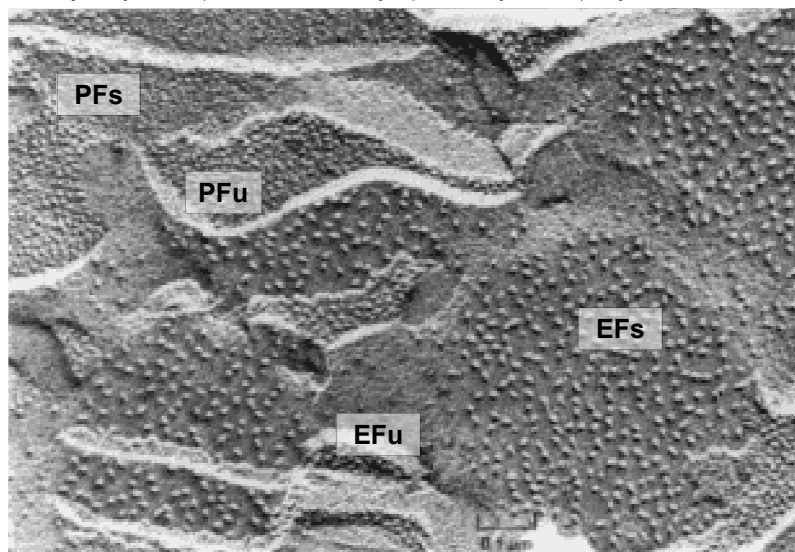
Fig. 9. Diagram illustrating the effects of freeze-dehydration on the phase behaviour of membranes and isolated lipids.

Ultramikrostruktura thylakoidní membrány - 1

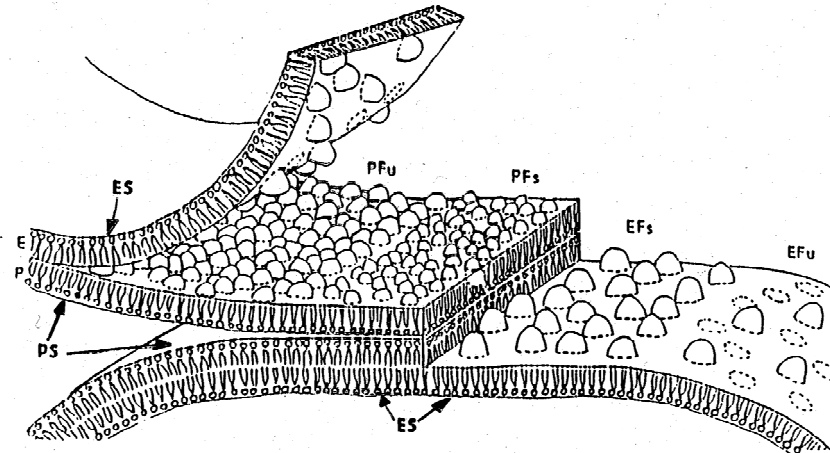
- REM – rastrovací elektronová mikroskopie s přípravou preparátů metodou „freeze fracture“ – mrazové lámání: membrány se zmrazí, krájí se tenká vrstva ultramikrotomem při $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve „vakuu“. Z obnažené plochy se sublimací odstraní povrchová vrstva ledu. Vyvstanou hydrofóbní struktury a povrch se stínuje.
- S – „surface“ (povrchová, původní)
- F – „fractured“ (štípnutá, zlomená)
- P – „protoplasmic“ (v kontaktu se stromatem)
- E – „exoplasmic“ (v kontaktu s lumenem)
- s – „stacked“ (granální)
- u – „unstacked“ (stromální)
- PSu, PSs – Rubisco, CF1 (mebránová část ATP syntázy) (freeze – etching, odlupování)
- EFs, EFu – PSII s LHC, PSII bez LHC (8 – 16 nm)
- PFu, PFs – PSI (8 – 13 nm), cyt b_6f komplex (8 - 9 nm)

Ultramikrostruktura thylakoidní membrány - 2

- freeze-fracture: lomové plochy – místa menšího odporu – místa hydrofóbní interakce lipidů dvojrstvy, rozštěpení na monovrstvy s proteinovými komplexy



Ultramikrostruktura thylakoidní membrány - 3



Obr. 6. Schéma kontaktu dvou thylakoidních membrán po aplikaci mrazového lámání. Rozlišujeme protonplazmatickou (P) a exoplazmatickou (E) polovinu membrány, dále původní povrch (S) a lomový povrch (F) a poslední oblast dotyku membrán (s) a membrán volných (u).

Ultramikrostruktura thylakoidní membrány - 4

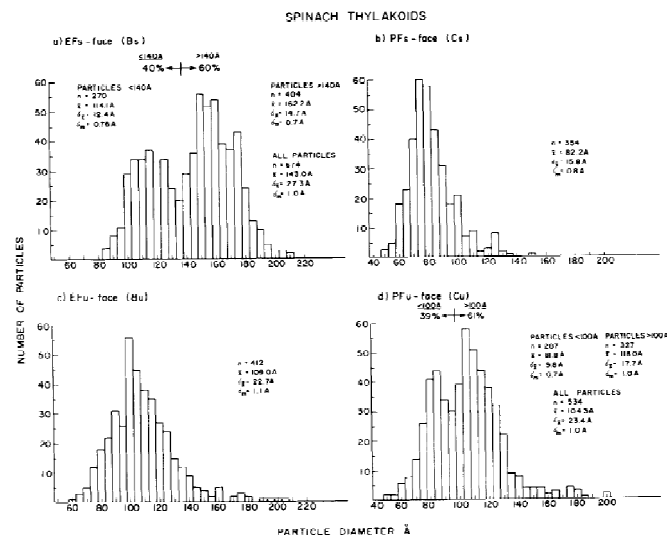


Figure 3. Histograms of particle sizes found on the four types of membrane fracture faces of spinach chloroplasts. The histograms are labeled a-d, and each is identified by individual labels.

Staehelin 1976, Journal of Cell Biology, 71, 136-158

Ultramikrostruktura thylakoidní membrány - 4

- PSI, ATP syntáza – okraje gran a stromální thylakoidy
- PSII s LHCII – vnitřek gran
- Cyt b_6f komplex - všude

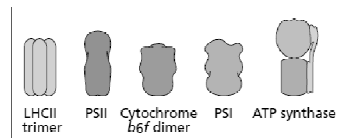
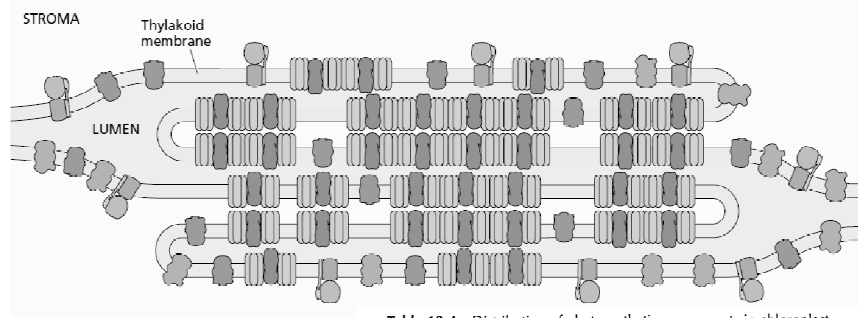


Table 12.4 Distribution of photosynthetic components in chloroplast membrane regions

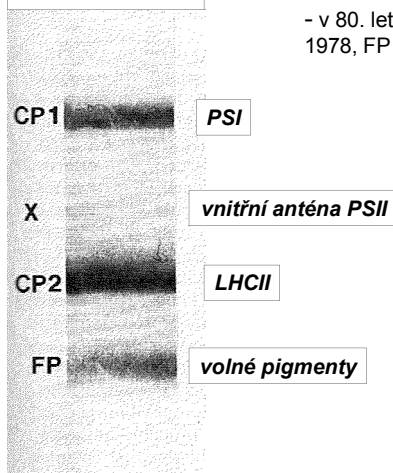
Component	Thylakoids (%)	
	Appressed	Stroma-exposed
PSII	85	15
PSI	10	90
Cytochrome b_6/f complex	50	50
LHC-II	90	10
ATP synthase	0	100
Plastocyanin	40	60

Buchanan a kol.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants 2000

Separace pigment-proteinových komplexů - 1

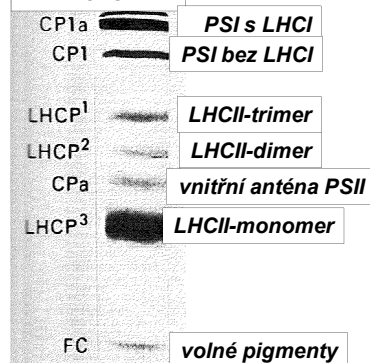
- působení detergentu na thylakoidní membrány a následná ELFO na PAGE
- SDS – dodecylsulfát sodný, není příliš šetrný k separaci PPC, SDS přidáváno i do el. pufru

Thornber 1966



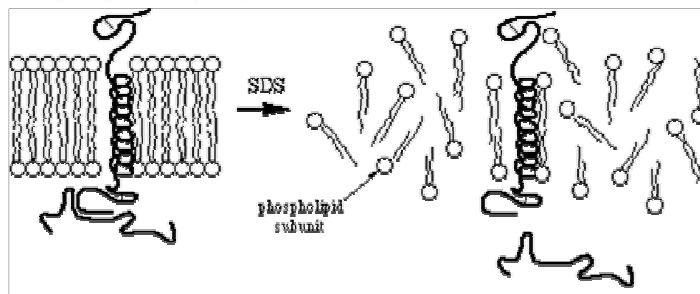
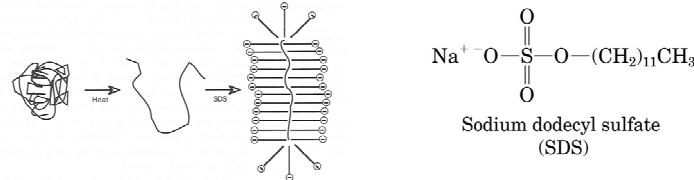
- první separace: Thornber a kol. 70. léta, FP ~ 30 %
- v 80. letech standardem metoda s SDS podle Andersonové 1978, FP ~ 10 %, jsou chl v membráně i volné???

Andersonová 1978



Separace pigment-proteinových komplexů - 2

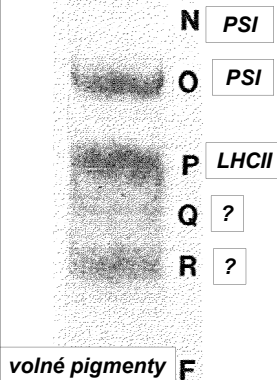
- při vysoké koncentraci SDS – kompletní rozpad PPC na proteiny a denaturace proteinů
- při nižší koncentraci SDS – rozpad PPC ale bez denaturace proteinů
- koncentrace musí být ale vyšší než kritická micelární, pak teprve narušení lipidové dvojvrstvy



Separace pigment-proteinových komplexů - 3

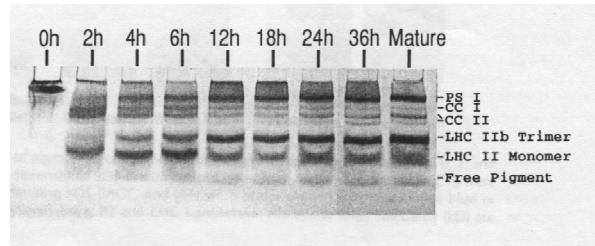
- Markwell et al. 1979 vyměnil SDS v elektrodoém pufru za Deriphat-160 (N-lauryl-β-iminodipropionát, amfoterní detergent), FP ~ 3% a porovnal s předchozími metodami ⇒ volné pigmenty jsou artefaktem PAGE !

Markwell
1979



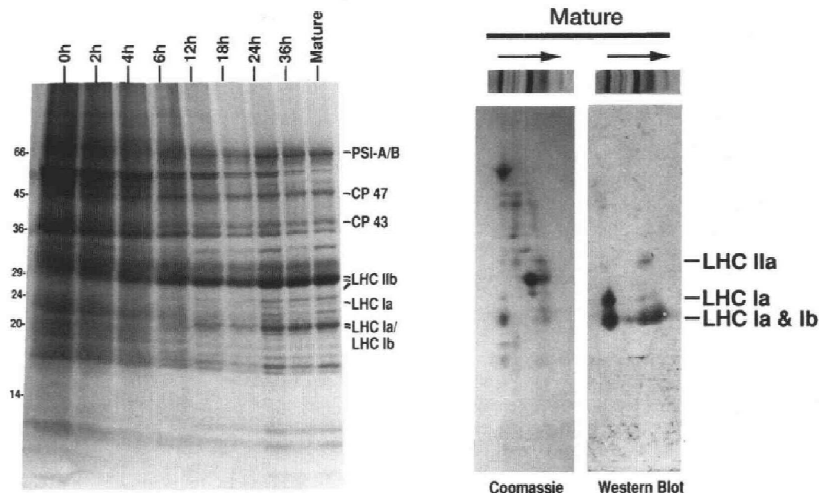
- Peter a Thornber 1991 - nativní Deriphat-PAGE PPC optimalizována na přípravu z listů ječmene. Frakcionalizace pomocí šetrného detergentu – decylmaltoside, Deriphat-160 použit v elektrodoém pufru, FP ~ 5%

- Dreyfuss and Thornber 1994 - mírně upravená metodika Petera a Thornbera (1991) - sledování změn v relativním zastoupení PPC během zelenání listů ječmene na kontinuálním světle, PSI (PSI s LHCI), CCI (PSI bez LHCI), CCII – PSII)



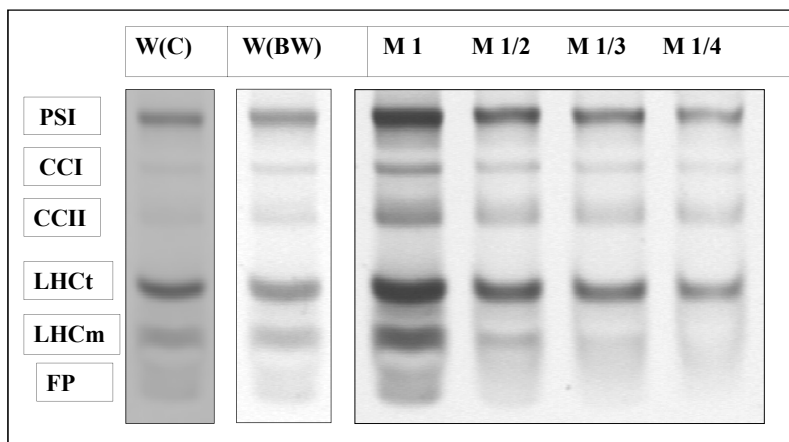
Separace pigment-proteinových komplexů - 4

- Peter a Thornber 1994 – zelenání na kontinuálním světle, SDS – PAGE – proteinové složení thylakoidních membrán během zelenání, 2. rozměr ELFO – proteinové složení separovaných PPC



Separace pigment-proteinových komplexů - 5

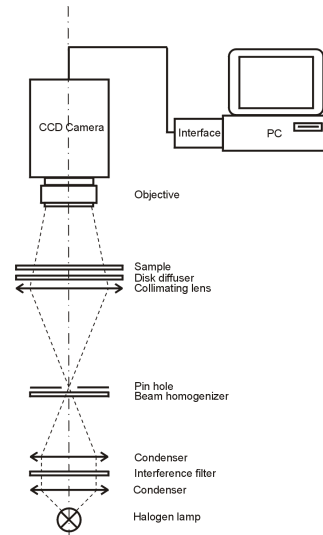
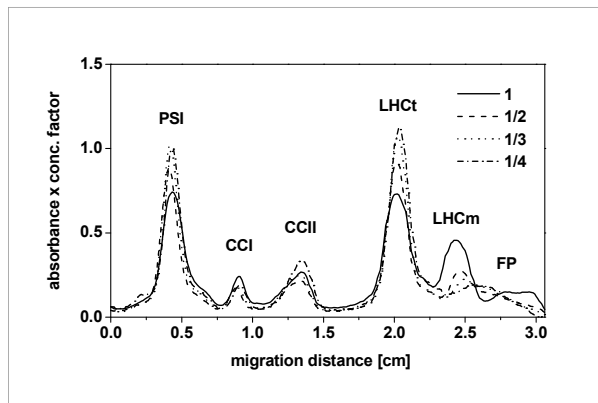
- Ilík a kol. 2002 – Deriphat-PAGE - doporučená koncentrace vzorku (Peter + Thornber) - 1mg chl/ml (10 μ l) na jamku, díky vysokému kontrastu výsledného elektroforeogramu - 1/4 konc.



Separace pigment-proteinových komplexů - 6

- Ilík a kol. 2002 – Deriphat-PAGE – denzitogram – z obrázku – stupně šedi

⇒ LHCm je částečně dílem elektroforetického dělení

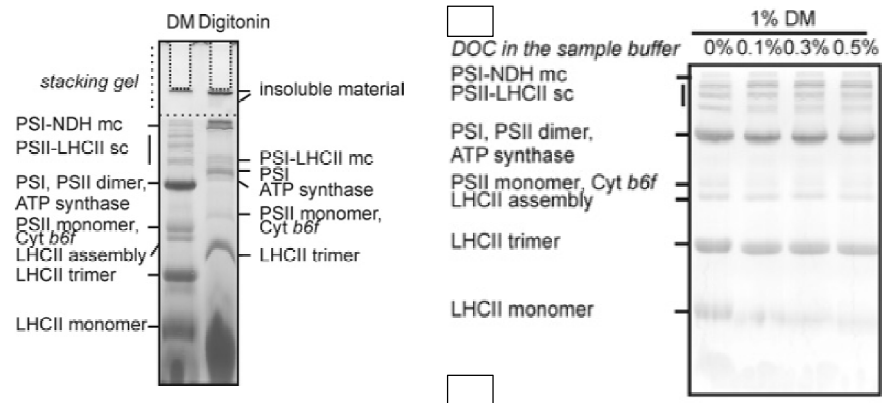


Separace pigment-proteinových komplexů - 7

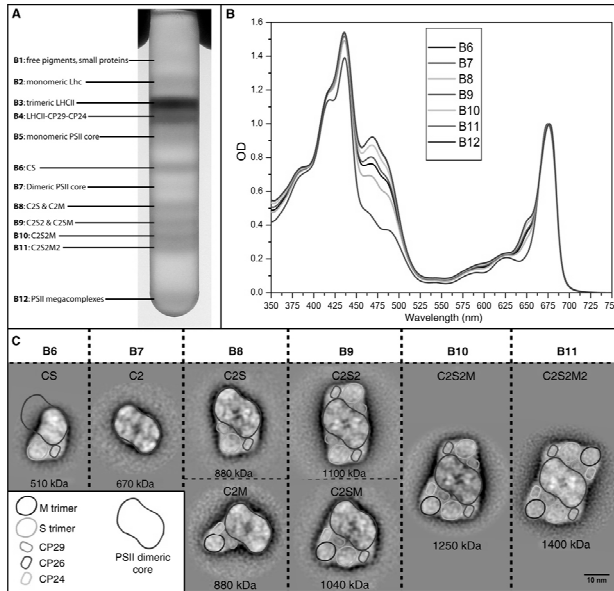
- separační metody používané dnes – **separace superkomplexů !!!**:

- BN-PAGE: jako Deriphat-PAGE ale v elektroodovém pufru je místo Deriphatu Coomassie blue

- BN-PAGE: ve vzorku/elektroodovém pufru je deoxycholát sodný



Separace pigment-proteinových komplexů - 7



Gradientová centrifugace

- solubilizace membrán pomocí šetrného detergentu (např. decylmaltosidu) jako u nativní PAGE

- není nutné další nabití částic pro dělení na gelu v elektrickém poli

- separace komplexů na sacharózovém gradientu 20 – 70%

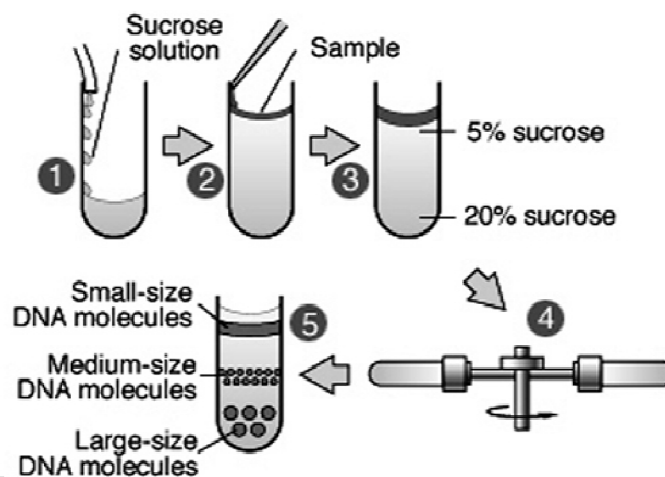
- dělení zejména podle velikosti částic (také vliv tvaru, hustoty, viskozity)

- ultracentrifugace: výkyvný rotor, přetížení >100 000g několik hodin při nízké teplotě

- zóny nejsou ostré jako u nativní PAGE

Caffari a kol. 2009 EMBO J 28, 3052-3064

Princip separace na sacharózovém gradientu

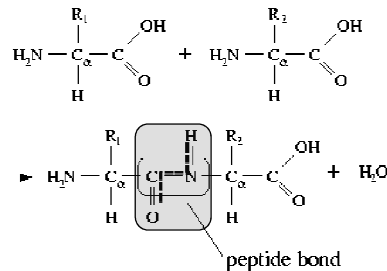


<http://www.freewebs.com/taing/centrifugation.htm>

Proteiny v thylakoidní membráně - 1

Proteiny obecně

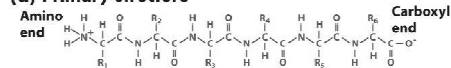
- makromolekuly z animokyselin (AMK) spojené peptidovou vazbou
- částečně dvojný charakter vazby (delokalizace π elektronů) $\Rightarrow$ není volná otáčivost
- $-\text{CO}-\text{NH}-$: plošný útvar, volná otáčivost $-\text{C}_\alpha-\text{CO}-$: řada možných prostorových uspořádání



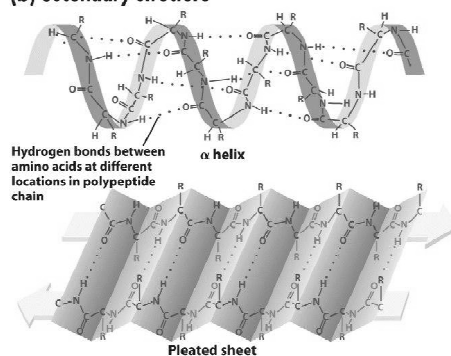
Amino Acid	Abbreviations
Alanine	Ala; A
Arginine	Arg; R
Asparagine	Asn; N
Aspartic acid	Asp; D
Cysteine	Cys; C
Glutamic acid	Glu; E
Glutamine	Gln; Q
Glycine	Gly; G
Histidine	His; H
Isoleucine	Ile; I
Leucine	Leu; L
Lysine	Lys; K
Methionine	Met; M
Phenylalanine	Phe; F
Proline	Pro; P
Serine	Ser; S
Threonine	Thr; T
Tyrosine	Tyr; Y
Tryptophan	Trp; W
Valine	Val; V

- konformace:
 - α helix - atomy tvoří pravotočivou šroubovici (stabilizace H-můstky, napříč lipidové 2-vrstvy)
 - β struktura - rovinný rošt (skládaný list) stabilizace H-můstky

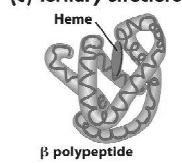
(a) Primary structure



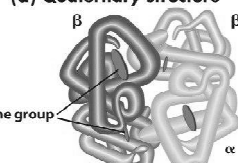
(b) Secondary structure



(c) Tertiary structure



(d) Quaternary structure



Proteiny v thylakoidní membráně - 2

Struktura obecně:

- primární – sekvence AMK
- sekundární – helix, skládaný list
- terciální - segmenty vůči sobě
- kvarterní – proteiny komplexu vůči sobě

Základní komplexy v thylakoidní membráně: (uskutečňuje se molekulární děj)

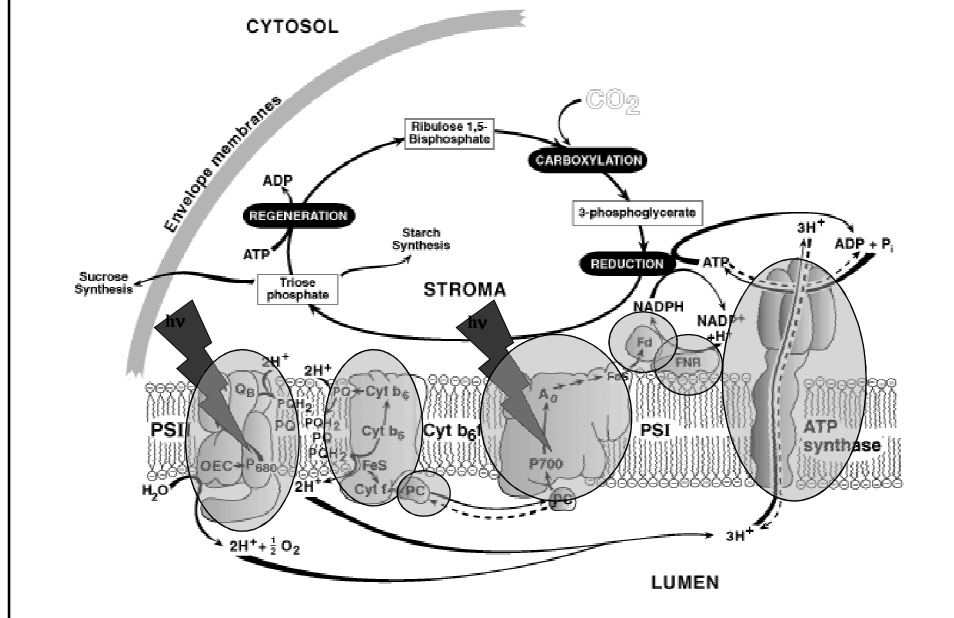
- PSI (s LHCI)
- PSII (s LHCII),
- Cyt b₆f komplex
- ATP-syntáza

Důležité proteiny v thylakoidní membráně:

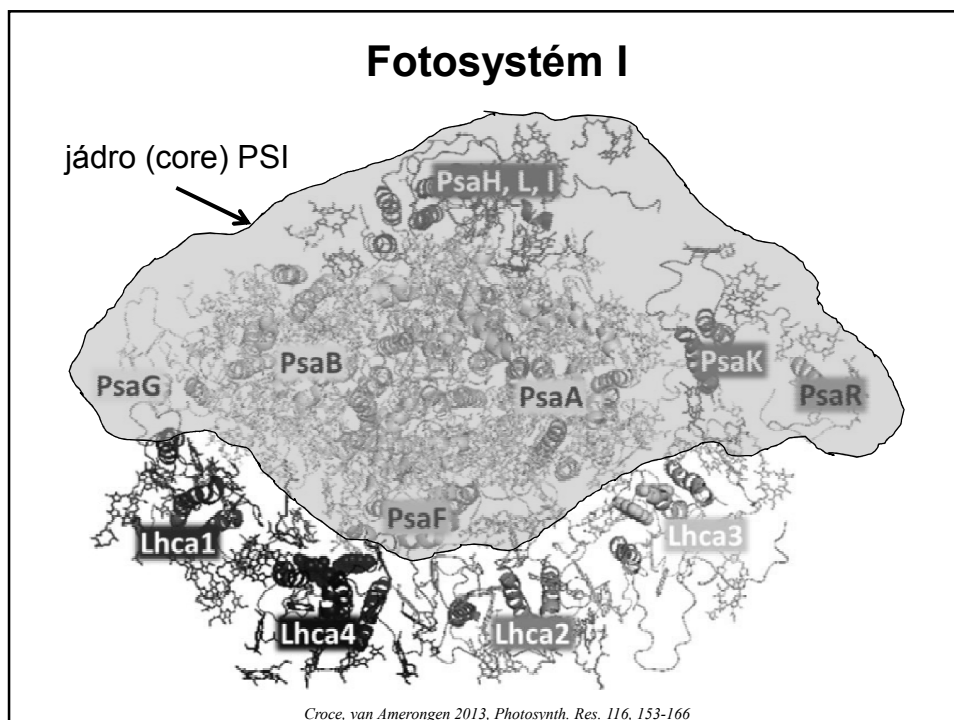
- Plastocyanin (PC)
- Ferredoxin (Fd)
- Fd-NADP+-oxidoreduktáza (FNR)

http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/ph/ph709_a_cellular_world/ph709_a_cellular_world6.html

Důležité proteiny a komplexy thyl. membr.



Fotosystém I



Podjednotky fotosystému I

Table 12.8 Polypeptide subunits of the PSI core complex

Protein	Gene	Location of gene	Mol. mass (kDa)	Function
Hydrophobic subunits				
PsaA	<i>psaA</i>	C	83	Reaction center protein
PsaB	<i>psaB</i>	C	82	Reaction center protein
PsaG	<i>psaG</i>	N	11	Unknown
PsaI	<i>psaI</i>	C	4	Unknown
PsaJ, PsaM	<i>psaJ, psaM</i>	C	5, 3.5	Unknown
PsaK, PsaL	<i>psaK, psaL</i>	N	8.4, 18	Unknown
Hydrophilic subunits				
Stromal orientation				
PsaC	<i>psaC</i>	C	9	Fe-S apoprotein
PsaD	<i>psaD</i>	N	18	Ferredoxin docking
PsaE	<i>psaE</i>	N	10	Cyclic electron transport
PsaH	<i>psaH</i>	N	10	LHC-I linker
Luminal orientation				
PsaF	<i>psaF</i>	N	17	PC docking
PsaN	<i>psaN</i>	N	10	Unknown

Buchanan a kol.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants 2000

- PsaA,B – váží pouze chl *a* (vnitřní anténa PSI), mezi nimi P700
- chl *b* je pouze v LHC komplexech

Fotosystém II

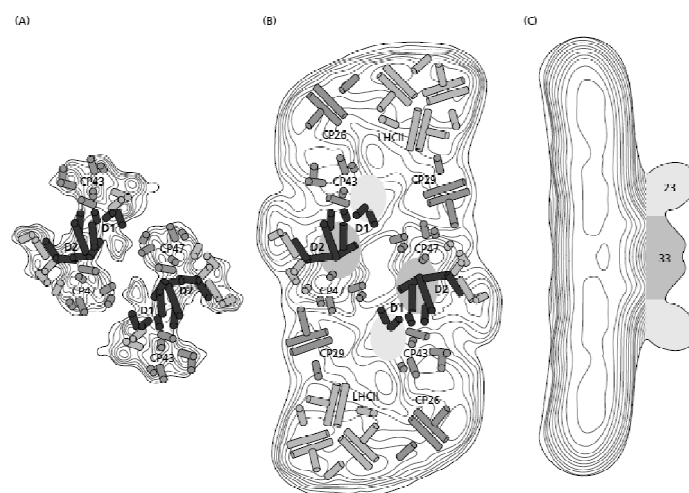


FIGURE 7.24 Structure of dimeric multisubunit protein supercomplex of photosystem II from higher plants, as determined by electron microscopy. The figure shows two complete reaction centers, each of which is a dimeric complex. (A) Helical arrangement of the D1 and D2 (red) and CP43 and CP47 (green) core subunits. (B) View from the luminal

side of the supercomplex, including additional antenna complexes, LHCI, CP26 and CP29, and extrinsic oxygen-evolving complex, shown as orange and yellow circles. Unassigned helices are shown in gray. (C) Side view of the complex illustrating the arrangement of the extrinsic proteins of the oxygen evolving complex. (After Barber et al. 1999.)

Podjednotky fotosystému II

Table 12.6 Protein subunits of the PSII core complex

Protein	Gene	Location of gene ^a	Mol. mass (kDa)	Function
Hydrophobic subunits				
D1	<i>psbA</i>	C	32	Reaction center protein
D2	<i>psbD</i>	C	34	Reaction center protein
CP47	<i>psbB</i>	C	51	Antenna binding
CP43	<i>psbC</i>	C	43	Antenna binding
Cyt b ₅₅₉				
α subunit	<i>psbE</i>	C	9	Unknown
β subunit	<i>psbF</i>	C	4	Unknown
PsbH-PsbN	<i>psbH-psbN</i>	C	3.8-10	Unknown
22 kDa	<i>psbS</i>	N	22	Photoprotection
Hydrophilic subunits				
33 kDa	<i>psbO</i>	N	33	Oxygen evolution
23 kDa	<i>psbP</i>	N	23	Oxygen evolution
17 kDa	<i>psbQ</i>	N	17	Oxygen evolution
10 kDa	<i>psbR</i>	N	10	Unknown

^aTables 12.6 through 12.9: C, chloroplast; N, nucleus.

Buchanan a kol.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants 2000

LHC komplexy

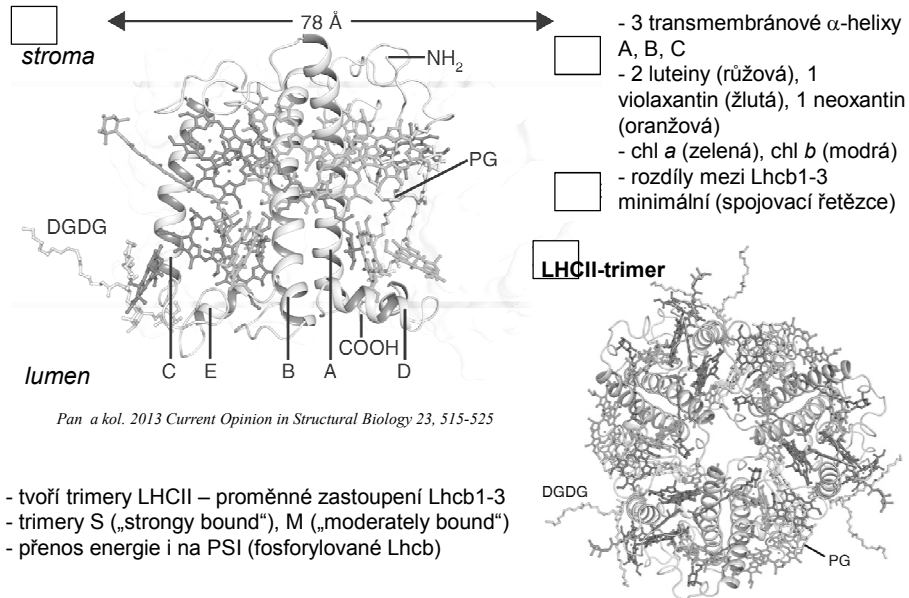
Table 12.3 Properties of light-harvesting chlorophyll protein complexes

Complex	Chl <i>a/b</i> ratio	Gene ^a	Mol. mass (kDa)
Light-harvesting complexes (LHC) associated with PSI			
LHC-Ia	2.0-3.1	<i>lhca3</i>	20.5
(LHC-I 680)		<i>lhca2</i>	18
LHC-Ib	2.2-4.4	<i>lhca1</i>	20
(LHC-I 730)		<i>lhca4</i>	20
Light-harvesting complexes associated with PSII			
LHC-IIa (CP29)	4.0	<i>lhcb4</i>	29
LHC-IIb	1.35	<i>lhcb1</i>	27-28
		<i>lhcb2</i>	25-27
		<i>lhcb3</i>	25
LHC-IIc (CP26)	2.9	<i>lhcb5</i>	26.5
LHC-IIId (CP24)	1.51	<i>lhcb6</i>	24

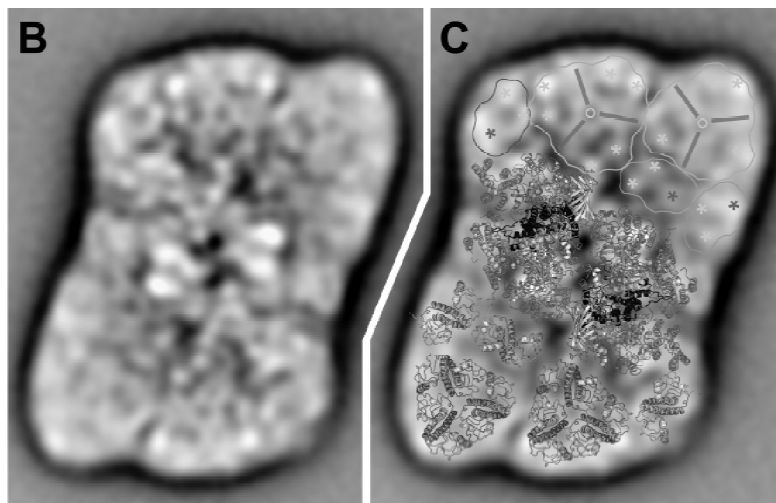
^a Genes are nuclear-encoded.

Buchanan a kol.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants 2000

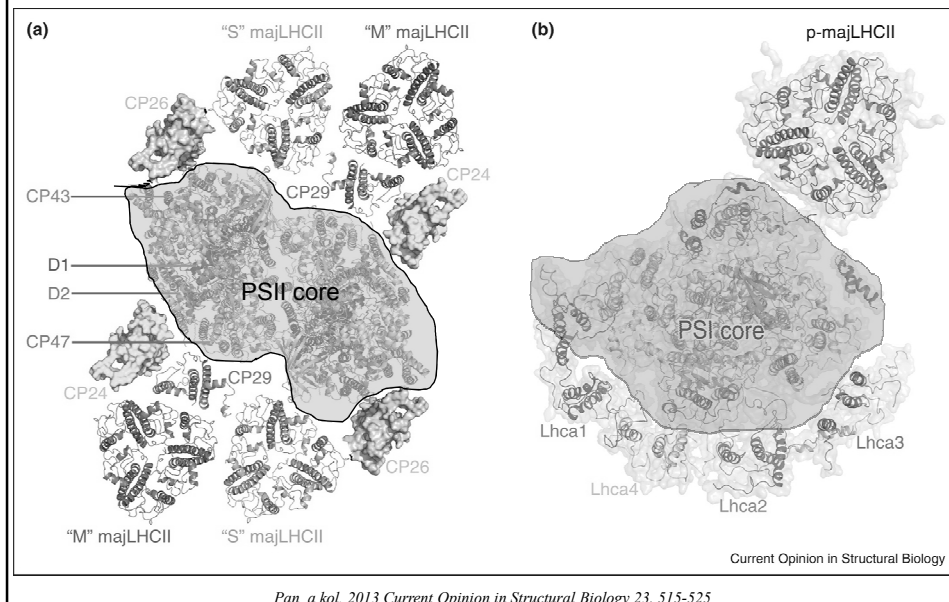
Struktura Lhcb1-3



Fotosystém II

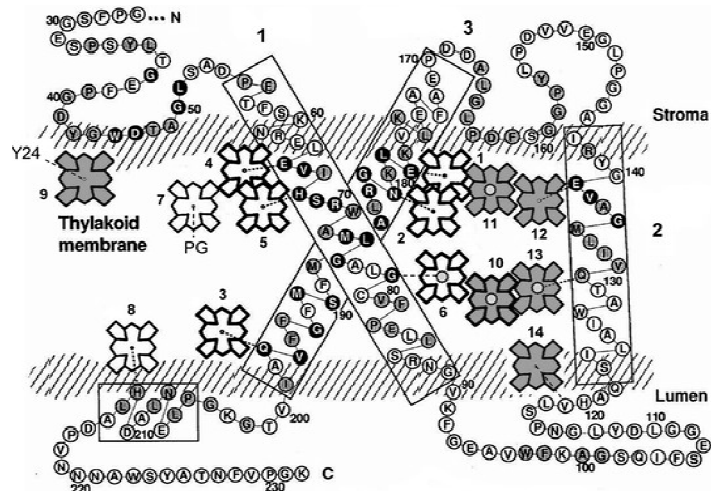


PSII-LHCII (a) a PSI-LHCI (b) komplex

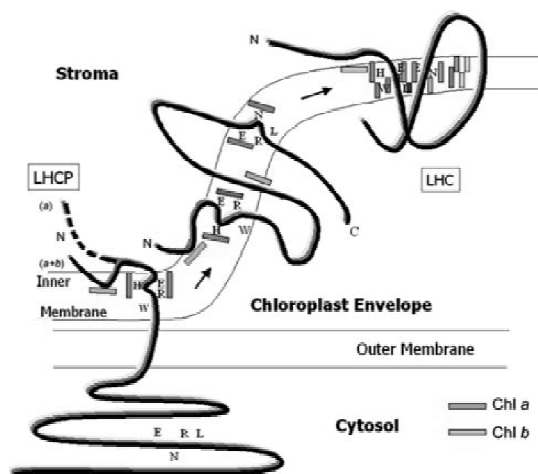


LHC: struktura Lhcb1

- symboly označují chloriny vázané na jednotlivé AMK
- 6 chl b (4 chl b jsou vázány přes molekulu vody – modrá tečka)
- 8 chl a (ozn. 1–8), Chl b (ozn. 9–14) podle Standfuss et al. (2005)



formování LHC



- syntéza apoproteinů v cytosolu

- symboly označují chloriny vázané na jednotlivé aminokyseliny
 - 6 chl b (4 chl b jsou vázány přes molekulu vody – modrá tečka)
 - 8 chl a (ozn. 1–8), Chl b (ozn. 9–14) podle Standfuss et al. (2005)

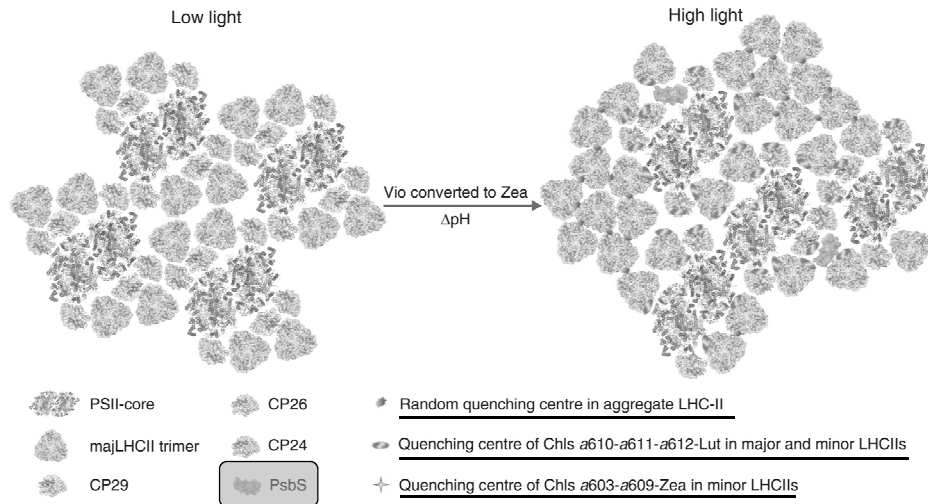
Hooper a kol. 2007: Photosynth. Res. 94, 387–400

Poměr PSII/PSI

Table 12.5 Stoichiometry of the photosystems in different oxygen-evolving systems and in response to changes in light quality

System	PSII/PSI ratio
Cyanobacteria	0.4
Red algae	0.4
Green algae	1.4
Tobacco mutant <i>Su/Su</i>	2.7
Barley chlorina mutant	3.0
Intermittent-light developing plastids	4.1
Pea chloroplasts	
From plants grown in PSII light (550–660 nm)	1.2
From plants grown in sunlight	1.8
From plants grown in PSI light (>660 nm)	2.3
<i>Synechococcus</i> 6301	
Grown in PSII light	0.3
Grown in sunlight	0.5
Grown in PSI light	0.7

Mechanismus NPQ



Current Opinion in Structural Biology

Pan a kol, 2013 Current Opinion in Structural Biology 23, 515-525