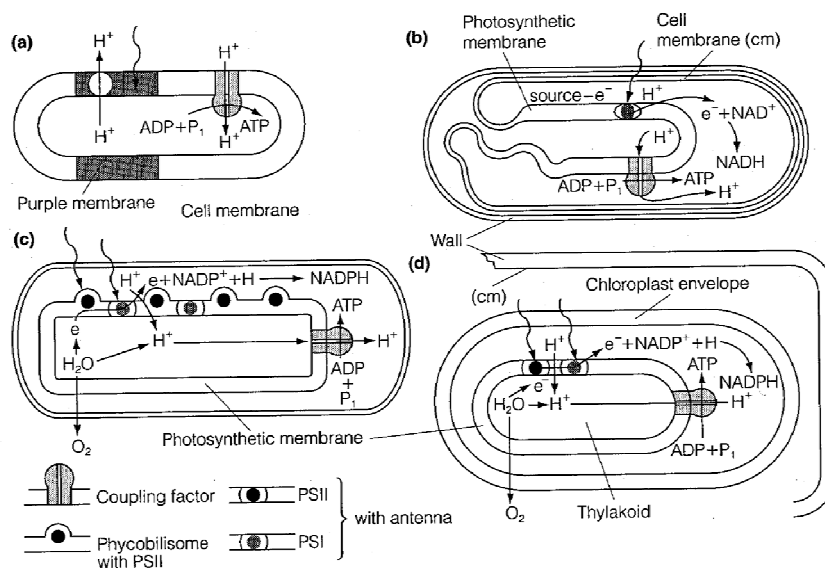


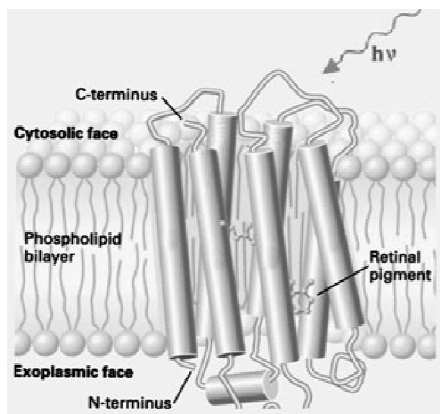
6 – Přenos elektronů a protonů

Petr Ilík
KBF a CRH, PřF UP

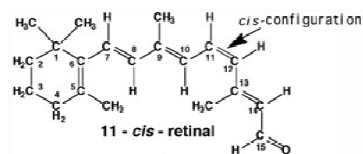
Evoluce FS



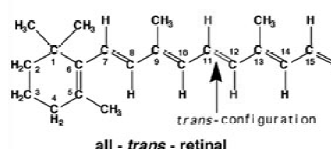
Halobaktérie – H⁺ pumpa



http://www.rsc.org/Publishing/ChemTech/Volume/2008/11/bacteriorhodopsin_insight.asp



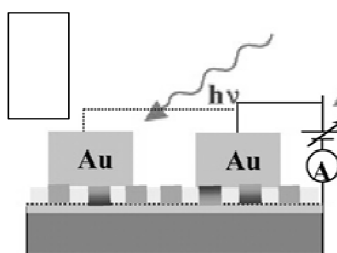
Visible light



<http://course1.winona.edu/sberg/427-2005/427fall05.htm>

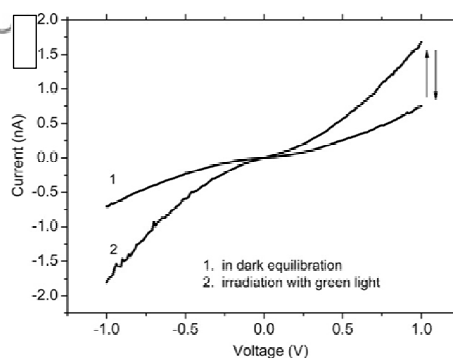
- Protonová pumpa halobakterií obsahuje pigment-protein bakteriorhodopsin (brdp)
- 7 helikálních jednotek s pigmentem – retinalem (aldehyd vitamínu A)
- absorpce fotonu $\Rightarrow$ konformační změna proteinu $\Rightarrow$ translokace protonu
- abs. maximum: 412 nm (neprotonovaný brdp), 570 nm (protonovaný brdp)

Bakteriorhodopsin – elektronická součástka?



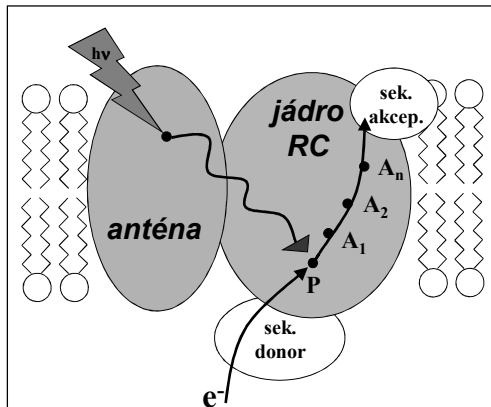
APTMS-modified Al/AIO_x
bR monolayer junctions

Jin Y et al. PNAS 2006;103:8601-8606



- brhp v pevném stavu je schopen vést elektrický proud
 - změna ve vodivosti pod vlivem světla (viz V-A charakteristika)
 - vysoká stabilita
- kandidát pro biomolekulární elektroniku !!!

Obecný princip činnosti RC



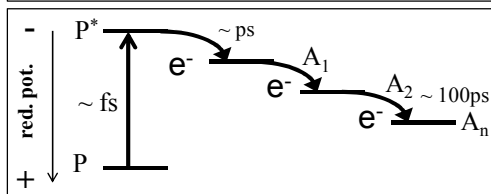
Reakční centrum (RC): e^-

- jádro
- sekundární donor e^-
- sekundární akceptor e^-

Jádro RC:

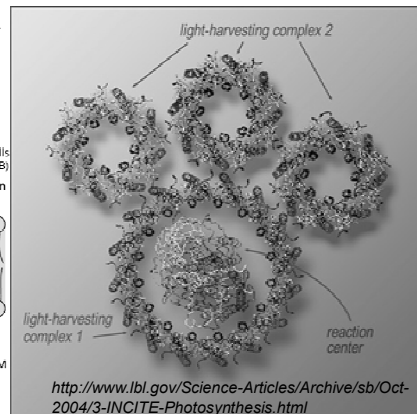
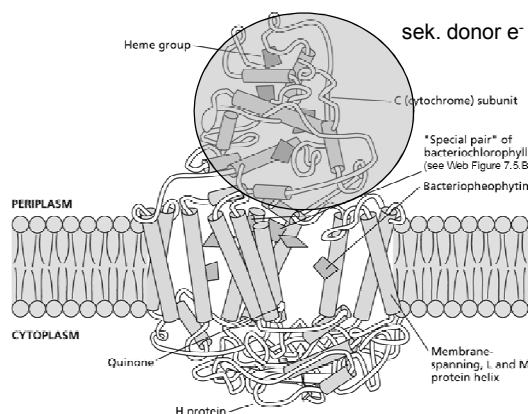
- P - primární donor e^- ((b)chl dimer)
- A_1 - primární akceptor e^-
- A_n - primární stabilní akceptor e^-

- v jádru nábojová separace:
 $P^+ \rightarrow P^+ + e^-$



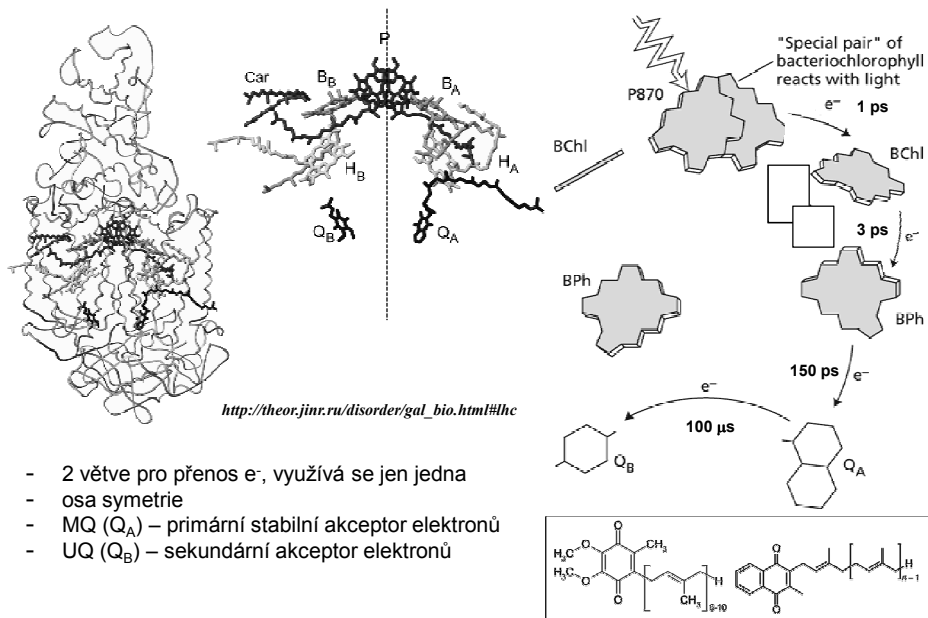
- směrovaný přenos elektronu napříč proteinem membrány
- rychlost přenosu e^- postupně klesá
- přenosu konkuruje rekombinace:
 $P^+ + A_1^- \rightarrow P + A_1$
ale má velmi nízký výtěžek

Bakteriální RC - 1

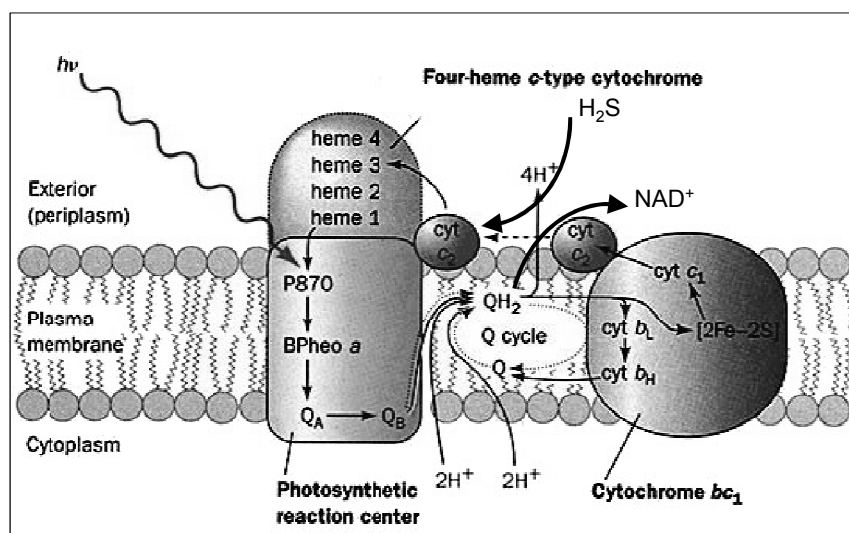


- snadné oddělení od anténních systémů (LH1 a LH2), relativně snadná krystalizace
- 1984 - první RTG struktura na *Rhodospseudomonas viridis* (Deisenhofer, Huner, Michel – Nobelova cena 1988)
- Jádro RC: proteiny L – 21 kDa (low), M – 24 kDa (medium) – 10 transmembránových helixů, 4 bchl b (2 – spec. pár – P960, v př. bchl a - P870), 2 bph b, menachinon (Q_A , MQ), ubiquinon (Q_B , UQ), mezi MQ a UQ je $Fe^{2+/3+}$ (usnadnění přenosu e^-), car - ochrana
- H protein – 28 kDa (high)
- cytochrom c: 4 hemová Fe – sekundární donor e^-

Bakteriální RC - 2

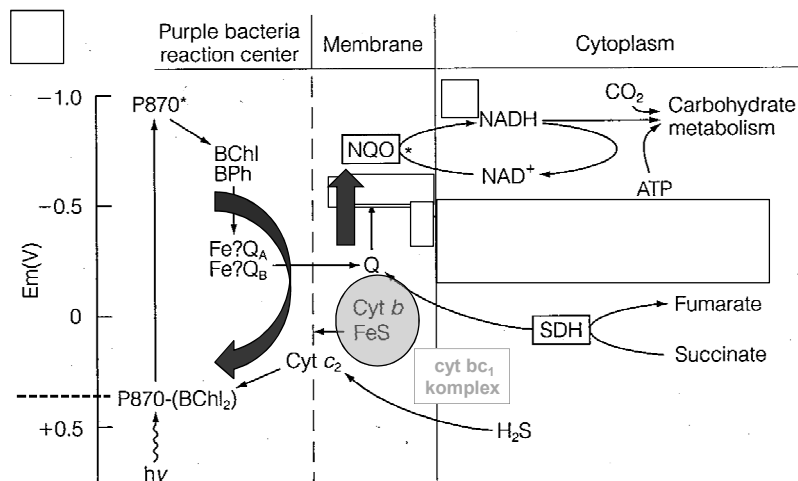


Elektronový transport u purpurových bakterií



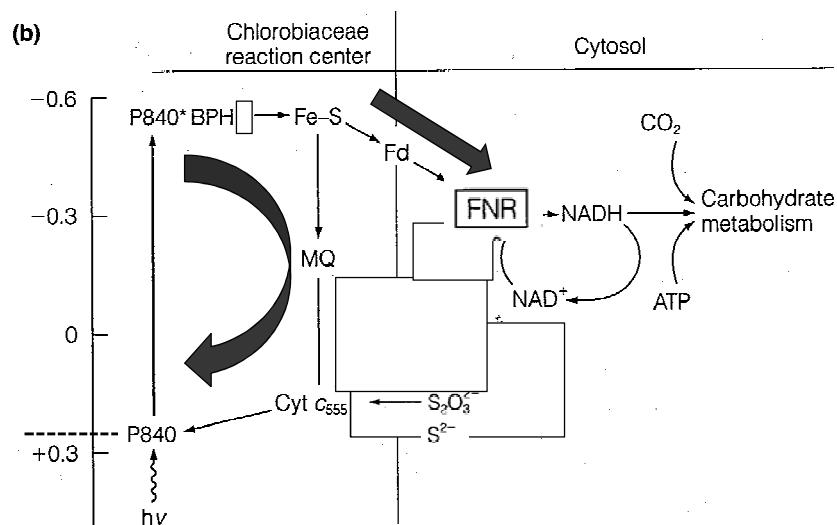
- cyklický i necyklický elektronový transport generuje gradient protonů napříč membránou – syntéza ATP pomocí ATP syntázy

Elektronový transport u purpurových bakterií



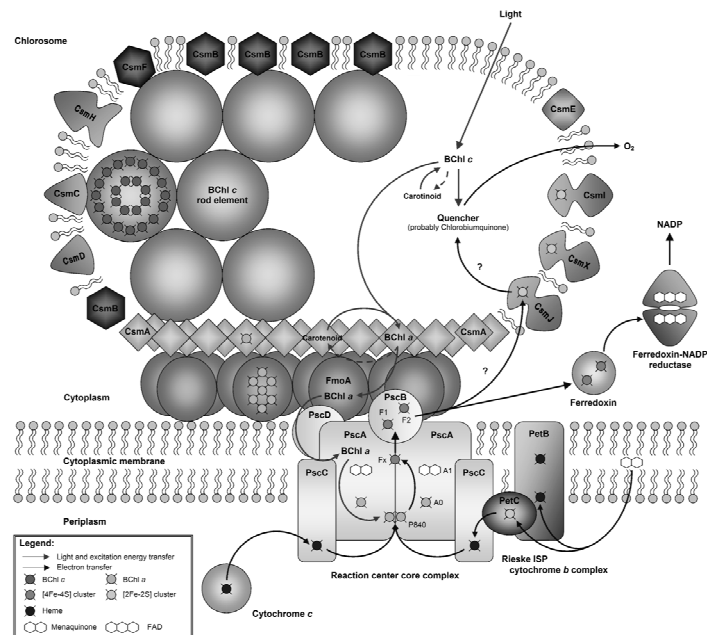
- SDH – sukcinát dehydrogenáza, NQO – chinon- NAD^+ oxidoreduktáza
- reakční centrum typu PSII (chinonový typ)

Elektronový transport u zelených bakterií



- reakční centrum typu PSI (Fe-S centra)

Elektronový transport u zelených bakterií



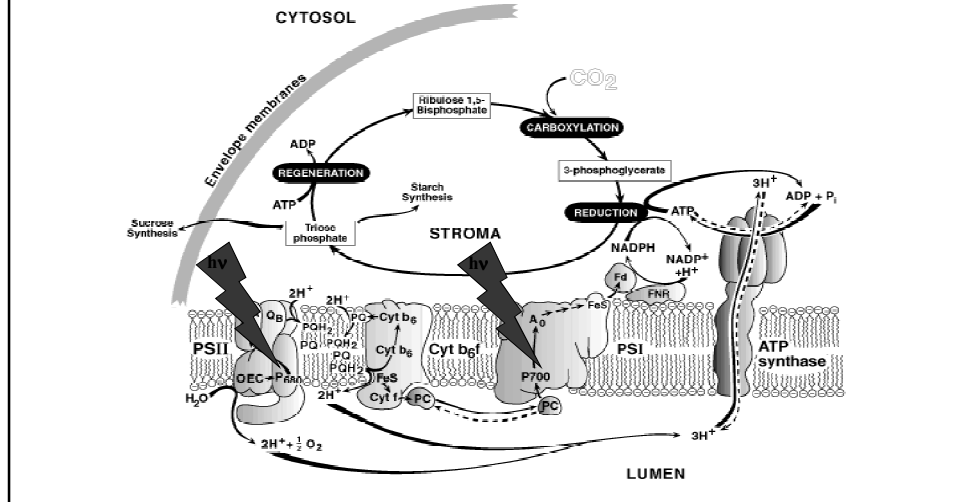
Bakterie – FS charakteristiky

Table 7.1. Characteristics of photosynthetic bacteria

Group	Photosynthetic pigments	e ⁻ donor (substrate for growth)	Growth conditions and other properties	Examples
1. Greens (a) Chlorobiaceae	BChl <i>a</i> plus BChl <i>c</i> , BChl <i>d</i> or BChl <i>e</i> Carotenoids Reaction centre P840 (BChl <i>a</i>)	H ₂ S Na ₂ S ₂ O ₃ H ₂	Light, autotrophic; strict anaerobes; non-motile PS apparatus: Chlorobium vesicles and associated membranes (chlorosomes), PSI-type RC	<i>Chlorobium limicola</i> , <i>Ch. thiosulfatophilum</i> , <i>Prosthecochloris aestuarii</i>
(b) Chloroflexaceae	Similar to (a)	Organics	Facultative aerobic; filamentous gliding; chlorosomes; PSI-type RC	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
2. Purple sulphur bacteria (Chromatiaceae)	BChl <i>a</i> or BChl <i>b</i> Carotenoids Reaction centre P870 or P890	H ₂ S, Na ₂ S ₂ O ₃ , H ₂ Organic, e.g. acetate	Autotrophic and heterotrophic in light; strict anaerobes; PS apparatus: chromatophores; PSII-type RC.	<i>Chromatium D</i> <i>Thiocapsa roseopersicina</i>
3. Purple non-sulphur bacteria (Rhodospirillaceae)	BChl <i>a</i> or BChl <i>b</i> Carotenoids Reaction centre P870 or P960	Organic, e.g. succinate, malate H ₂	Heterotrophic or autotrophic in light and anaerobic; will grow aerobically and heterotrophically in the dark; PSII-type RC	<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodospseudomonas viridis</i> , <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
4. Heliobacteria	BChl <i>g</i> Reaction Centre P798	Organics	No chromatophores or chlorosomes; PSI-type RC.	<i>Heliobacterium chlorum</i> <i>H. mobilis</i>

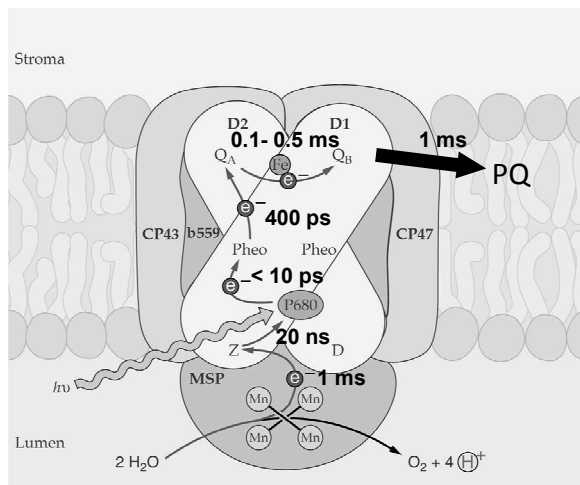
Přenos elektronů – kyslíková FS

- Necyklický (lineární) elektronový transport: voda (PSII) → NADP⁺ (FNR)
- Cyklický elektronový transport kolem PSI: z Fd zpět na plastochinon (PQ)



Elektronový transport v PSII

- základní funkční proteiny (integrální) - D1, D2 (homologie k L a M u bakterií), CP43, CP47 (vnitřní antény PSII), cyt b₅₅₉
- periferní - MSP („manganese splitting protein“), OEC (oxygen evolving complex)
 - 4 atomy manganu v mocenství 2⁺ až 4⁺

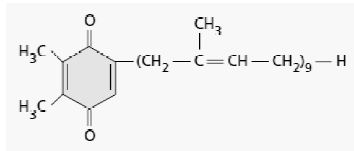


- funkční pouze jedna větev (jako u bakterií)
- **P680** - dimér chl *a* - prim. donor e⁻ (příjem energie excitací z CP47 nebo přímo)
- **Pheo** - feofytin - primární akceptor e⁻
- **Q_A** - chinon - primární stabilní akceptor e⁻
- **Q_B** - vázaný plastochinon (PQ) - sekundární akceptor e⁻ (2e⁻ akceptor, Q_B „kapsa“ - místo kompetice s herbicidy)
- **Z - tyrosin** - sekund. donor e⁻ (D1), D - Tyr (D2); funkční zejména větev přes Tyr Z

Redukce PQ v PSII

- redoxní stav PQ je signálem pro aktivaci/inaktivaci různých regulačních procesů

(A)



Plastoquinone

(B)

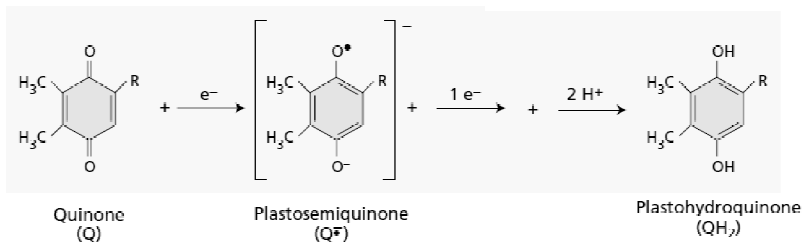
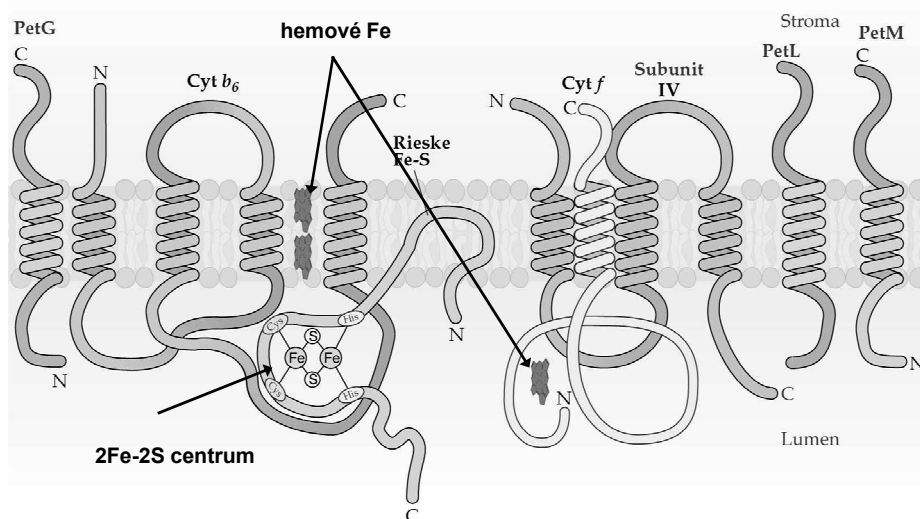
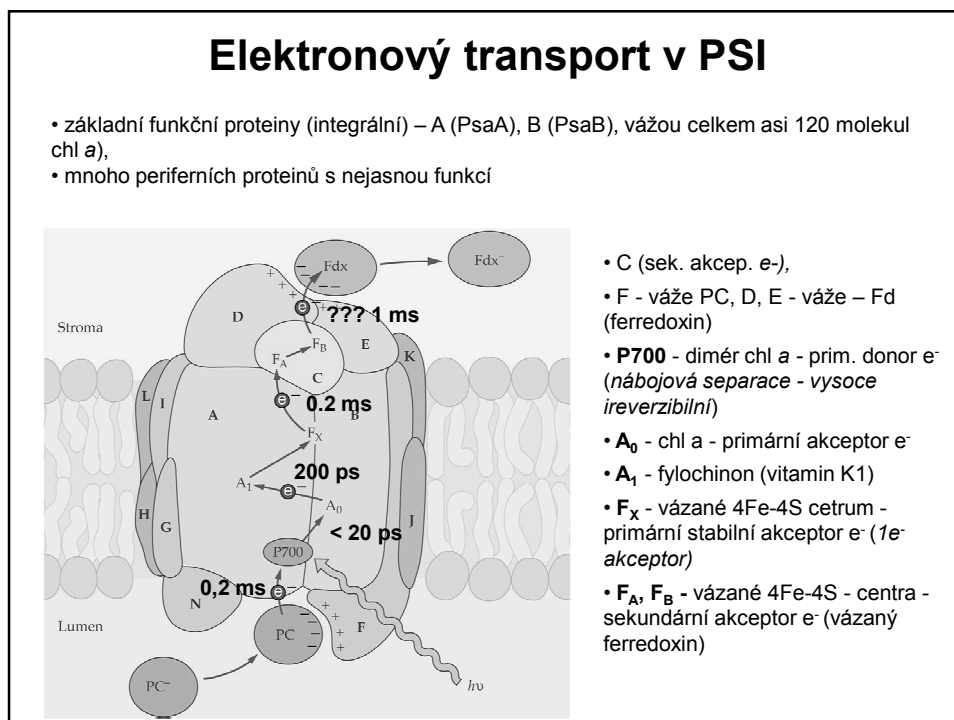
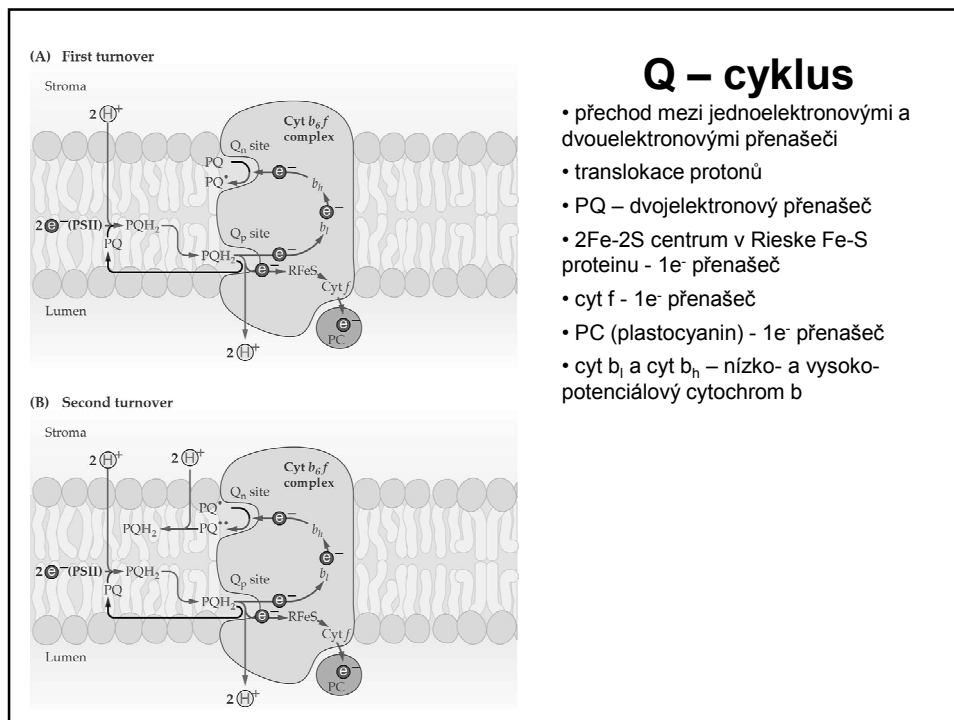


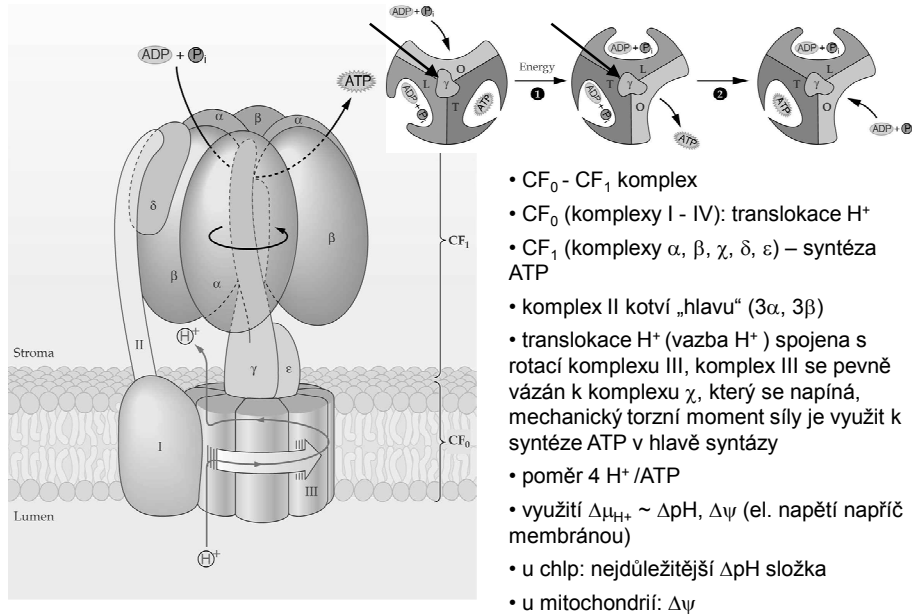
FIGURE 7.27 Structure and reactions of plastoquinone that operate in photosystem II. (A) The plastoquinone consists of a quinoid head and a long non-polar tail that anchors it in the membrane. (B) Redox reactions of plastoquinone. The fully oxidized quinone (Q), anionic semiquinone (Q^{•-}), and reduced hydroquinone (QH₂) forms are shown; R represents the side chain.

Cytochrom b₆f komplex



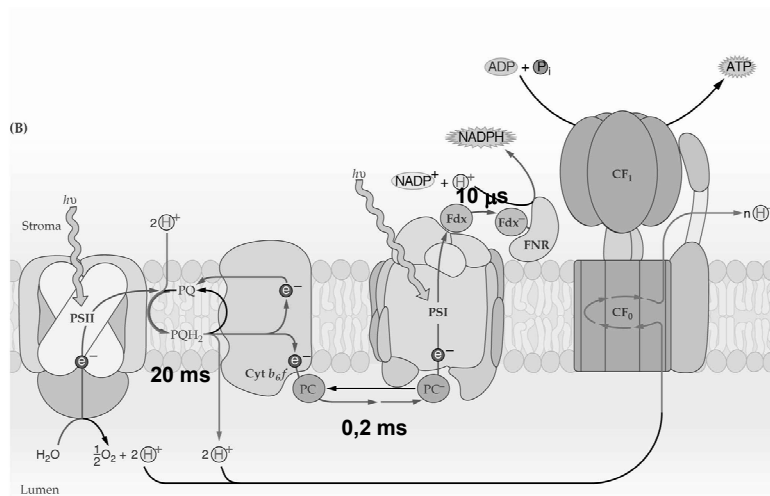


ATP-syntáza



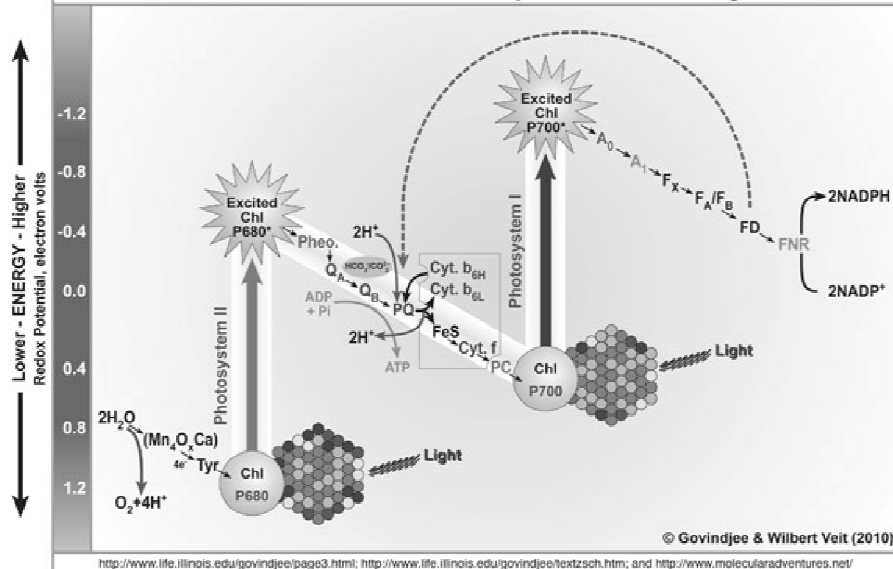
Lineární elektronový transport

- ve tmě pH lumenu a stromatu neutrální
- při osvětlení – pH lumenu až 5,5 a pH stromatu 7,5-8
- nejpomalejší (limitující) reakce přenosu elektronů lineárního transportu – oxidace PQH₂

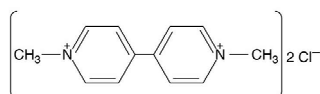
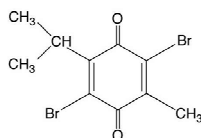
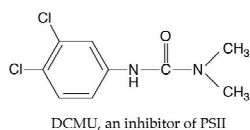
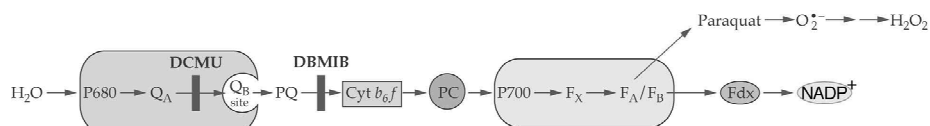


Z schéma kyslíkové FS

Z-Scheme of Electron Transport in Photosynthesis

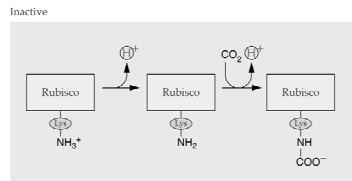
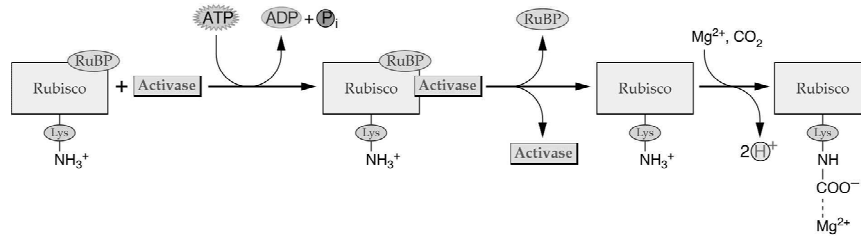


Lineární elektronový transport

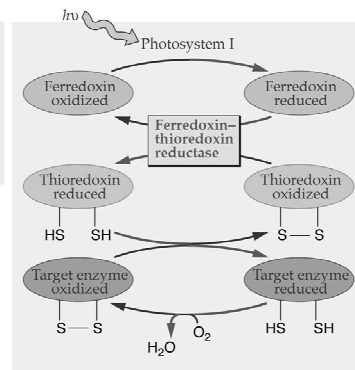


- studium elektronového transportu pomocí inhibitorů a umělých akceptorů
- DCMU: 3-(3,4- dichlorfenyl)-1,1-dimethylkarbonyldiamid (diuron) - herbicid
- DBMIB: 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropylbenzoquinone
- paraquat (methylviologen, MV), N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride - herbicid
- MV – souvislost s Parkinsonovou nemocí (*Tanner a kol. Environmental Health Perspectives 119, 866–872, 2011*)

Aktivace temnotných reakcí FS

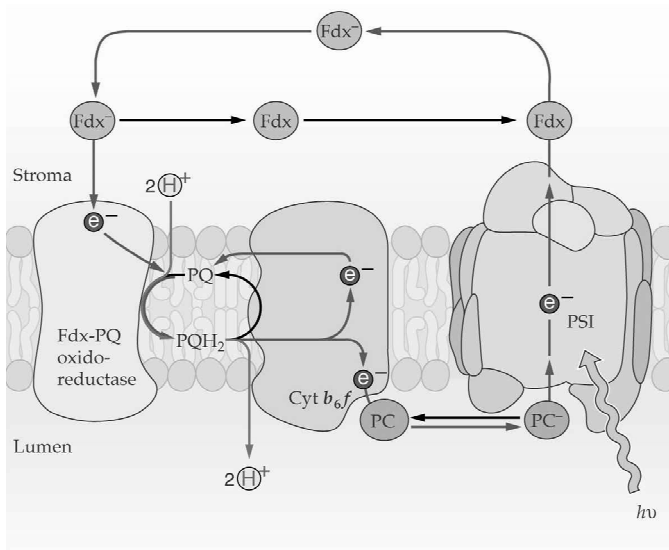


- Fd⁻ aktivuje ferredoxin-thioredoxin reduktázu (FTR), která aktivuje řadu enzymů (i enzymy Calv. cyklu) pomocí redukce disulfidických můstků
- pro aktivaci enzymu Rubisco je třeba z něj vyvázat RuBP, karbamylace a vazba Mg²⁺ - role Rubisco aktivázy, která je aktivována pomocí FTR za spotřeby ATP



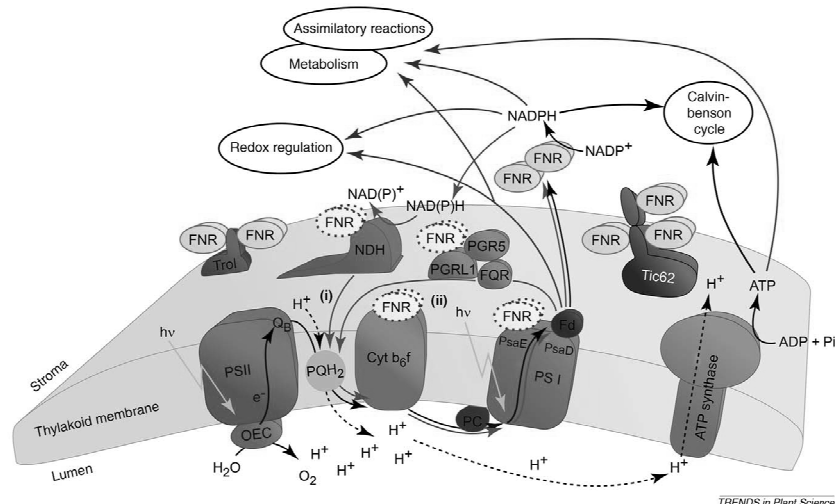
Cyklický elektronový transport kolem PSI

- důležitý pro život rostlin i za normálních podmínek (spotřeba ATP/NADPH = 1,43 v rámci Calvinova cyklu; LEF poskytuje 1,3; 0,13 ATP/NADPH – díky cyklickému el. transportu (CEF)!)
 - Fd⁻ donuje e⁻ zpět na PQ za účasti Fd-PQ-oxidoreduktázy (možná FNR)
 - aktivace když lineární přenos e⁻ na NADP⁺ je inhibován (akumulace NADPH, nedostatek NADP⁺) při např. inhibici fixace CO₂ (stres suchem – zavření průduchů nebo vyšší teploty)
 - generace gradientu H⁺ napříč thylakoidní membránou bez redukce NADP⁺
 - změna poměru NADPH/ATP při zachování elektronového transportu



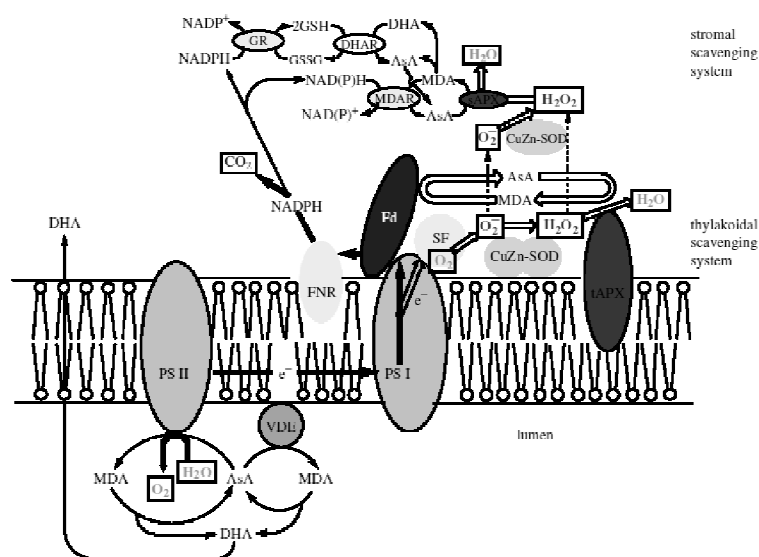
2 typy CET kolem PSI

- (ii) PGR5/PGRL1 (což je FQR, 2013) – využití i za normálních podmínek
- (i) NDH – NAD(P)H-dehydrogenáza (vysoká homologie s komplexem I u mitochondrií) využití za stresových podmínek (nadbytek NADPH)



Cyklus voda - voda

- uplatnění když je Fd redukováný (CET „nestíhá“)



Emersonův efekt – kooperace fotosystémů

- důkaz práce PSI a PSII v sérii (Emerson a kol. 1957), měření kv. výtěžku vývinu kyslíku
- „far red“ ($\lambda > 690$ nm) preferenčně excituje PSI, „red“ ($\lambda \sim 650$ nm) – excituje PSI a PSII
- použití: stanovení rozsahu kooperace po stresovém působení

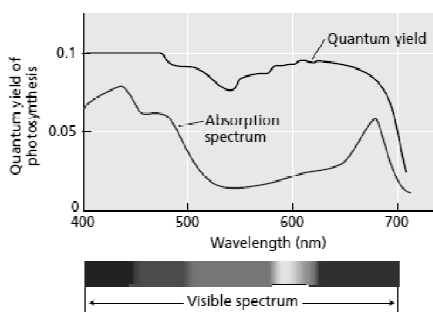


FIGURE 7.12 Red drop effect. The quantum yield of photosynthesis (black curve) falls off drastically for far-red light of wavelengths greater than 680 nm, indicating that far-red light alone is inefficient in driving photosynthesis. The slight dip near 500 nm reflects the somewhat lower efficiency of photosynthesis using light absorbed by accessory pigments, carotenoids.

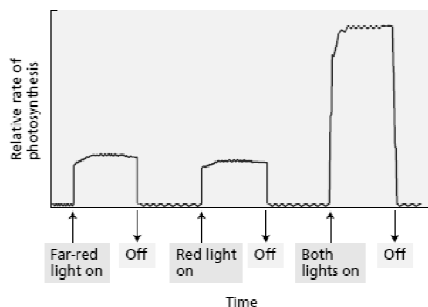


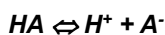
FIGURE 7.13 Enhancement effect. The rate of photosynthesis when red and far-red light are given together is greater than the sum of the rates when they are given apart. The enhancement effect provided essential evidence in favor of the concept that photosynthesis is carried out by two photochemical systems working in tandem but with slightly different wavelength optima.

Přechod stav 1 – stav 2

- povrchový náboj thylakoidní membrány je záporný ($1e^{-}/6 \text{ nm}^2$) díky lipidům PG a SQDG a disociovaným $-\text{COOH}$ skupinám postranního řetězce AMK Glu a Asp proteinů $\Rightarrow$

thylakoidní membrány se odpuzují

Co je spojuje do gran?



$\text{pK} = -\log K$; K – disociační konstanta

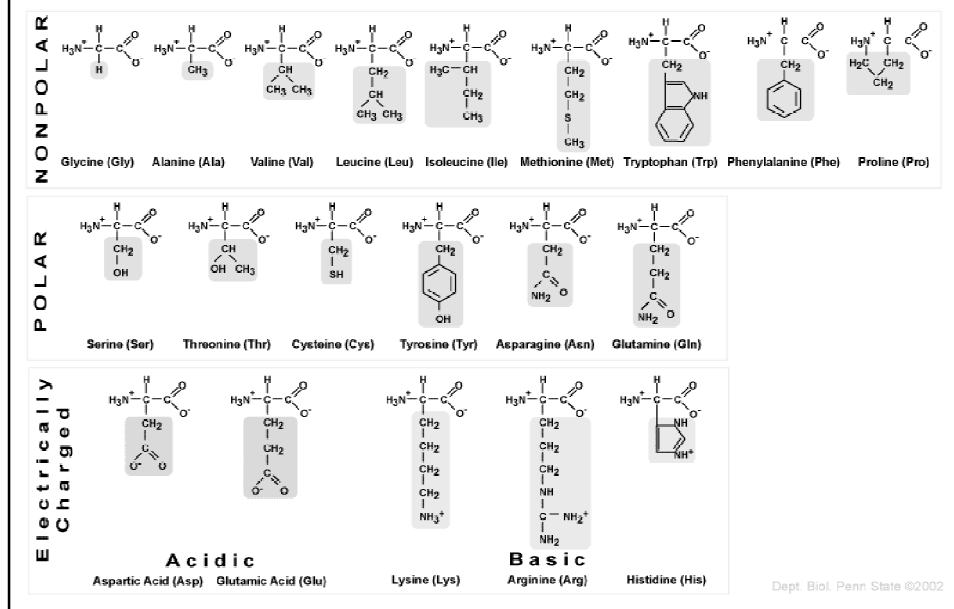
$\text{pH} = \text{pK} + \log ([\text{A}^-]/[\text{HA}])$ (Hendersenova-Hasselbalchova rovnice)

pK kyseliny HA je pH, při kterém je kyselina zpoloviny disociovaná

$\text{pK} (\alpha\text{-COOH}) \sim 2$ (pro $\text{pH} > 2$ je skupina disociovaná $-\text{COO}^-$)

$\text{pK} (\alpha\text{-NH}_3^+) \sim 9.5$ (pro $\text{pH} > 9.5$ je skupina nedisociovaná $-\text{NH}_2$)

Přechod stav 1 – stav 2



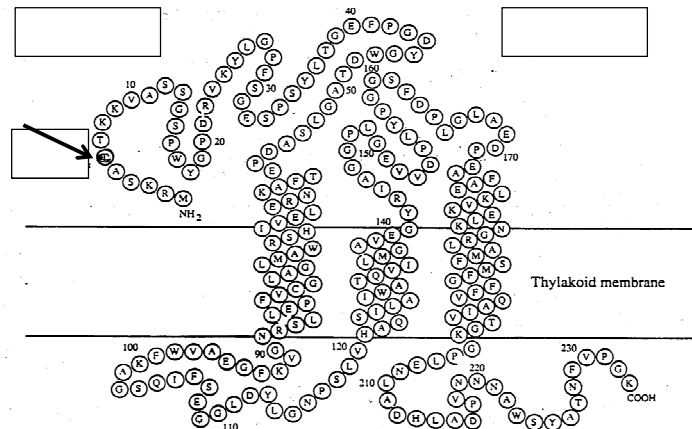
Přechod stav 1 – stav 2

pK funkčních skupin aminokyselin			
Aminokyselina	α -COOH	α -NH ₃ ⁺	skupiny postranního řetězce
Alanin	2.3	9.9	
Glycin	2.4	9.8	
Fenylalanin	1.8	9.1	
Serín	2.1	9.2	
Valin	2.3	9.6	
Kys. Asparagová	2.0	10.0	3.9 (β -COOH)
Kys. Glutamová	2.2	9.7	4.3 (γ -COOH)
Histidin	1.8	9.2	6.0 (imidazolová sk.)
Cystein	1.8	10.8	8.3 (-SH)
Tyrosin	2.2	9.1	10.9 (-OH)
Lysin	2.2	9.2	10.8 (ϵ -NH ₃ ⁺)
Arginin	1.8	9.0	12.5 (guanidinová sk.)

Karlson, P.: Základy biochemie, Stryer L.: Biochemistry

Přechod stav 1 – stav 2

- kationty (zejména divalentní, Mg^{2+}) zmenšují odpuzování membrán
- LHCII komplexy (hlavně v granu) mají kladně nabitý N konec na stromální straně thylakoidní membrány - vazba na jinou thylakoidní membránu („stacking“ - granum), LHCII v granu preferenčně dodává excitace na PSII
- Lhcb1(2) má šestou AMK (od N konce) treonin (s OH skupinou v postranním řetězci), která je při přechodu ze stavu 1 do stavu 2 fosforylována protein kinázou (aktivace redukováním PQ)



Ultramikrostruktura thylakoidní membrány - 4

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

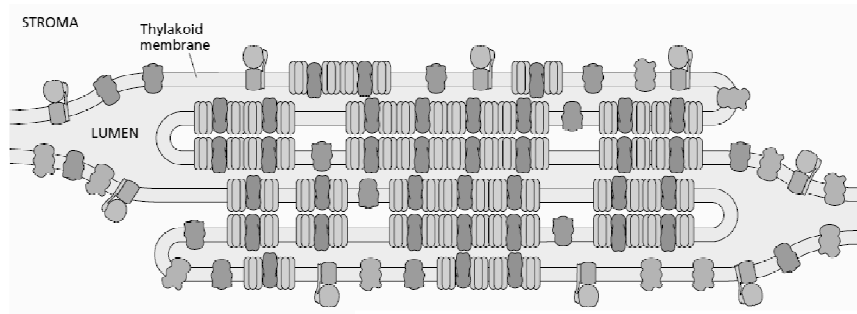


Table 12.4 Distribution of photosynthetic components in chloroplast membrane regions

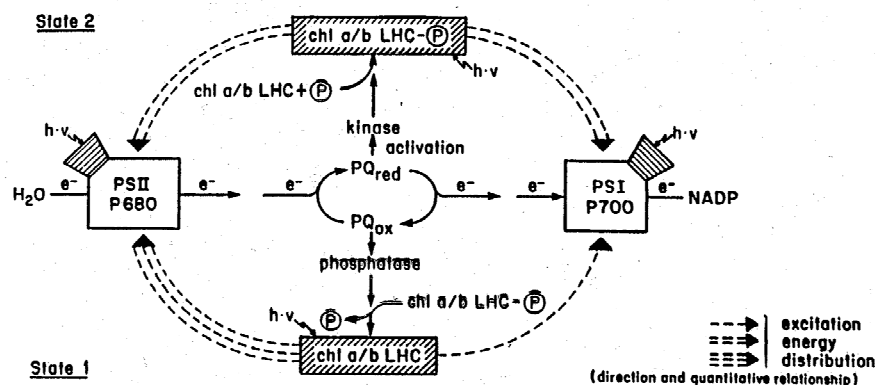
Component	Thylakoids (%)	
	Appressed	Stroma-exposed
PSII	85	15
PSI	10	90
Cytochrome b_6f complex	50	50
LHC-II	90	10
ATP synthase	0	100
Plastocyanin	40	60

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

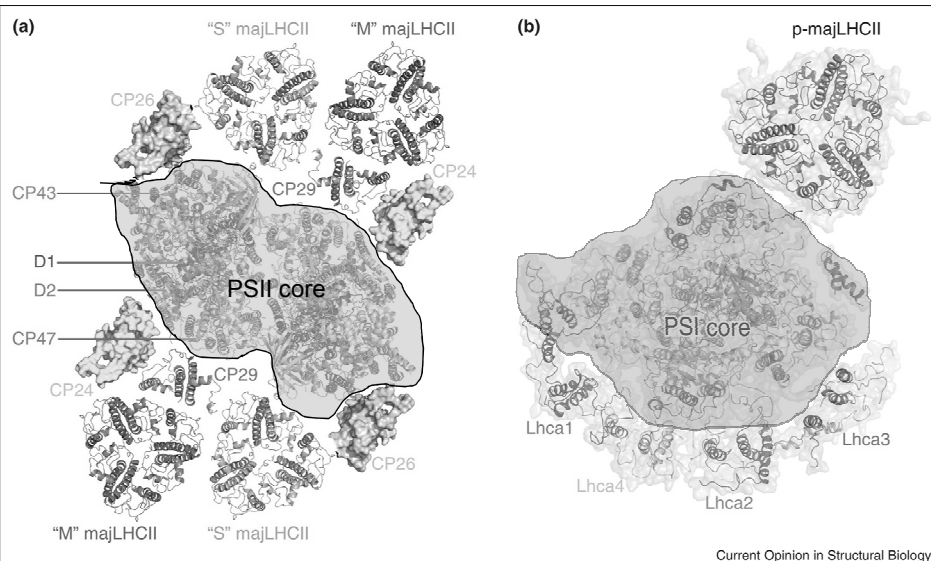
Přechod stav 1 – stav 2

Regulace distribuce excitací mezi PSII a PSI (pro obvyklé intenzity světla):

- nízká koncentrace kationtů – rozpad gran – LHCII distribuuje excitace i na PSI
- aktivace protein kinázy (PQ redukováné) – fosforylované LHCII (LHCIIp) se odpuzují – částečný rozpad gran – migrace LHCIIp do stromálních thylakoidů, kde excitují PSI (stav 2)
- aktivace fosfatázy (PQ oxidované) – defosforylace LHCIIp – více gran (stav 1)
- důležitost: optimální fungování PSI a PSII v sérii (lineární el. transport)
- stav 1: ve tmě nebo při preferenční excitaci PSI ($\lambda > 690$ nm) (PQ oxidované), chemicky
- stav 2: není preferenční excitace PSI (PQ redukováné), chemicky
- na intenzivním světle inhibice kinázy pomocí FTR (hydrogenace –S-S- vazby) – fixace stavu 1!
- doba trvání přechodu stav 1 – stav 2: minuty (u org. s fykobilizomy podobný přechod: sekundy)



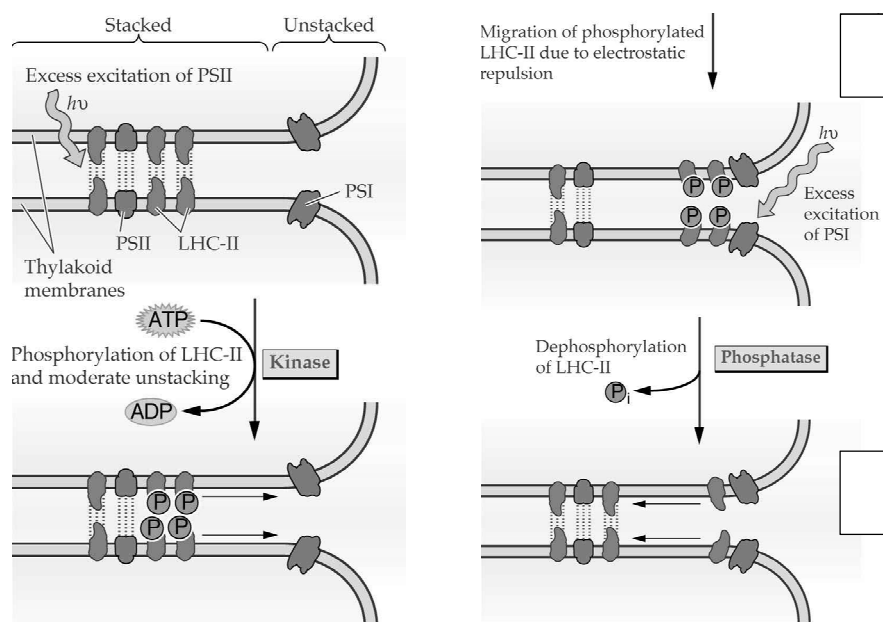
PSII-LHCII (a) a PSI-LHCI (b) komplex



Current Opinion in Structural Biology

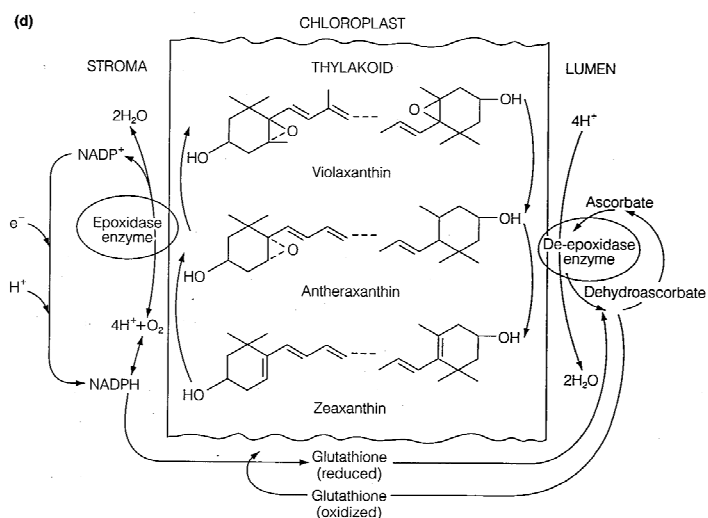
Pan a kol. 2013 Current Opinion in Structural Biology 23, 515-525

Přechod stav 1 – stav 2



Xantofylový cyklus

3) Přenos energie z $^1\text{chl}^*$ na karotenoid iniciovaný acidifikací lumenu thylakoidu a následnou konformační změnou LHCII v souvislosti s deepoxidací violaxantinu na zeaxantin



Xantofylový cyklus

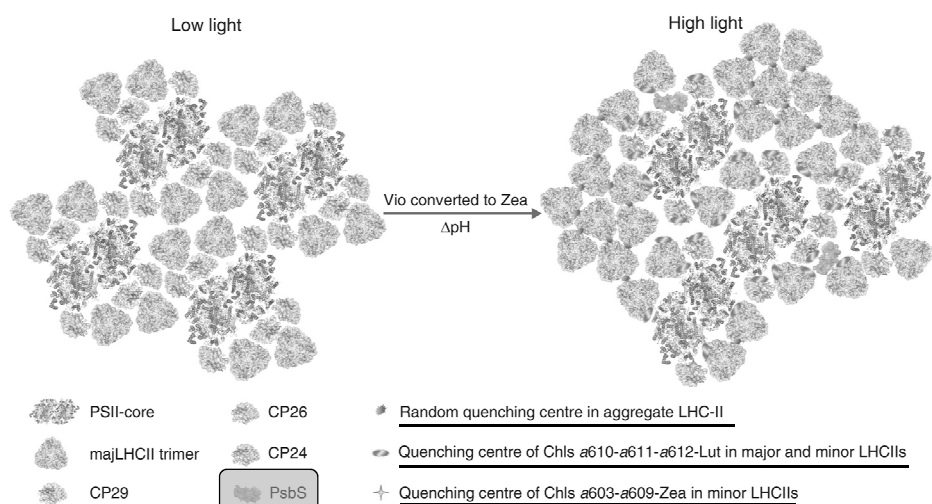
Violaxantin deepoxidáza(VDE):

- 43 kDa enzym v lumeny thylakoidů
- při neutrálním pH – mobilní
- při acidifikaci lumeny pH < 6 (tj. při ozáření vyšší než odpovídá saturaci asimilace CO₂) vazba na thylakoidní membránu
- nutná dostupnost violaxantinu v lipidové dvojvrstvě, V se vyvazuje z LHCII při acidifikaci
- při vyvázání V z LHC fázová separace MGDG (důležitá pro flip-flop antheraxanthinu)
- deepoxidace V→A→Z (cca 1-2 min.)
- Z se naváže místo V a změni konformaci LHCII – přiblížení luteinu k chl a v LHC (také role protonovaného PsbS) – zhášení excitací (nefotochemické zhášení – non-photochemical quenching- NPQ)
- VDE potřebuje ke konverzi V na Z reduktant - askorbát (vitamin C)

Zeaxanthin epeoxidáza (ZE):

- na stromální straně - dosud málo prozkoumaná
- epeoxidace Z→A→V (cca 10 min.) – pomalejší
- pH optimum = 7,5
- spotřeba NADPH

Mechanismus NPQ



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

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