

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Biologie



Kateřina Hlavsová

Grana
Grana

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Miloš Duchoslav

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 5. 2018

Podpis:

Abstrakt

Vývoj života na Zemi je významně spojován s oxygení fotosyntézou, schopností některých organismů oxidovat vodu a redukovat oxid uhličitý pomocí energie ze světla. Podstatná část fotosyntetických reakcí se odehrává na tylakoidní membráně uvnitř sinic a chloroplastů. Mezi hlavní fotosyntetické komplexy v tylakoidní membráně patří fotosystém I a II spolu se svými světlosběrnými anténami, cytochromový komplex a ATP syntáza. Všechny vyšší rostliny vytváří grana (sloupce k sobě přitisknutých tylakoidních membrán), která jsou propojena stromatálními lamelami. Pro správný běh fotosyntézy je pravděpodobně podstatné rozdělení různých dějů mezi grana a stromatální lamely. Tato práce v první části shrnuje dostupné poznatky o jednotlivých proteinech tylakoidní membrány a v druhé části se zabývá strukturou gran, silami, které přispívají k jejich stabilitě, dynamikou gran a proteiny důležitými pro jejich formování. V poslední části jsou popsány některé rozdíly mezi organismy s grany a bez gran a hypotézy o funkci gran.

Klíčová slova: fotosyntéza, chloroplast, tylakoidy, grana, stromatální lamely

Abstract

The evolution of life on Earth is closely connected to the ability of some organisms to oxidise water and reduce carbon dioxide using solar energy in a process called oxygenic photosynthesis. Substantial part of the photosynthetic reactions is located in the thylakoid membrane inside of chloroplasts and cyanobacteria. The main photosynthetic complexes in the thylakoid membrane are photosystems I and II with their light harvesting antennas, cytochrome complex and ATP synthase. All higher plants form grana (stacks of appressed thylakoid membranes) that are interconnected by stroma lamellae. Proper distribution of certain processes between grana and stroma lamellae seems to be crucial for smooth flow of photosynthesis. First part of this thesis is focused on the major photosynthetic complexes while the second part focuses on grana structure, dynamics and stabilising forces as well as proteins essential for grana formation. The last part of the thesis describes some differences between granal and agranal organisms and summarises hypotheses about grana functions.

Key words: photosynthesis, chloroplast, thylakoids, grana, stroma lamellae

OBSAH

1	Úvod	5
2	Tylakoidní membrána rostlin	5
2.1	Hlavní proteinové komplexy tylakoidní membrány	5
2.1.1	Fotosystém II	5
2.1.2	Cytochromový komplex.....	8
2.1.3	Fotosystém I	9
2.1.4	F ₁ F ₀ ATP syntáza	10
2.1.5	PGR5/PGRL1 komplex.....	11
2.1.6	NDH komplex.....	12
2.1.7	Proteiny CURT1.....	13
2.2	Lipidy	13
3	Grana	14
3.1	Struktura gran	16
3.1.1	Vidličkový model.....	16
3.1.2	Bifurkační model.....	16
3.1.3	Helikální model	17
3.2	Laterální heterogenita	17
3.3	Síly ovlivňující stabilitu gran	18
3.3.1	Odpudivé síly	18
3.3.2	Přitažlivé síly	19
3.3.3	Síly v lumen.....	20
3.4	Dynamika gran	21
3.4.1	Koncentrace solí	21
3.4.2	Světlo	22
3.5	Změny exprese genů ovlivňující podobu gran	23
3.5.1	Mutant <i>stn8</i>	23
3.5.2	<i>Stn7/stn8</i> a <i>tap 38</i> mutant.....	24
3.5.3	Snížení množství PsbP a PsbQ.....	24
3.5.4	Mutanti <i>curt1</i>	25
4	Organismy bez vyvinutých gran	26
4.1	Struktura tylakoidů	26
4.2	Světlosběrné antény	28
4.3	Radiální heterogenita	28
5	Funkce gran	29
5.1	Význam gran a jejich dynamiky pro cyklický přenos elektronů	30
6	Použitá literatura	32

1 Úvod

Tylakoidní membrána uvnitř chloroplastů a sinic je místem, kde se odehrává podstatná část fotosyntézy, procesu oxidace vody a redukce oxidu uhličitého za pomoci světelné energie. Rostliny jsou vystaveny stále se měnícím podmínkám okolního prostředí, například neustále se měnící intenzitě světla, teploty, nebo koncentrace dostupných látek, které ovlivňují efektivitu fotosyntézy. Tylakoidní membrána je obydlena velkým množstvím fotosyntetických proteinů, které umí na tyto změny reagovat. Z těch hlavních jsou to fotosystémy I a II se světlosběrnými komplexy, cytochromový komplex a ATP syntáza. Znalost struktury a funkce těchto proteinů spolu se silami, které mezi nimi působí, je zásadní pro pochopení různé struktury tylakoidní membrány a celé škály procesů s touto membránou souvisejících. Cílem předložené práce je shrnout dostupné poznatky o proteinech tylakoidní membrány vyšších rostlin, kterými se zabývá první část, a strukturu gran a jejich dynamice, které se věnuje část druhá. Třetí část má za cíl porovnat některé odlišnosti mezi rostlinami vytvářejícími grana a organismy, které grana nevytváří, a shrnout hypotézy o funkci gran.

2 Tylakoidní membrána rostlin

2.1 Hlavní proteinové komplexy tylakoidní membrány

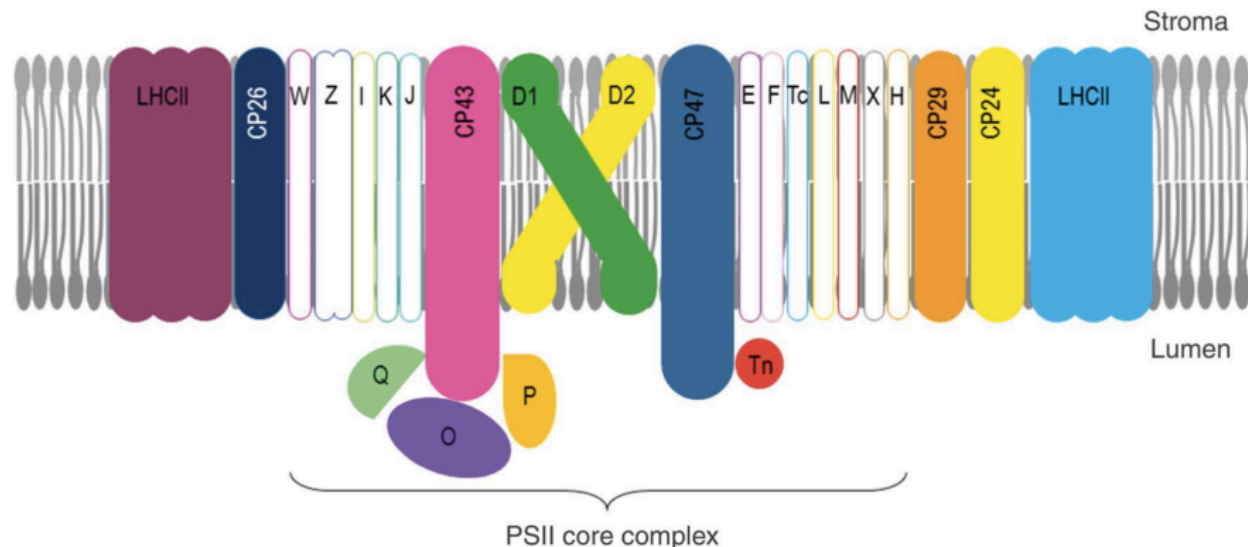
2.1.1 Fotosystém II

Fotosystém II (PSII) je proteinový komplex složený z mnoha podjednotek a kofaktorů, umístěný v membráně tylakoidů. Jádrem PSII je tvořené proteiny D1 a D2 a vnitřními anténními proteiny CP47 a CP43. Kolem jádra se nachází větší množství proteinů o nízké molekulární hmotnosti. K jádru PSII se z lumenální strany v blízkosti komplexu vyvíjejícího kyslík (oxygen evolving complex, OEC) váží vnější proteiny PSII, kterými jsou PsbO, PsbP a PsbQ (Su, Ma, 2017).

PSII oxiduje vodu za vzniku kyslíku a redukce plastochinonu, který přenáší elektrony dále v elektron-transportním řetězci. Přenos elektronu z vody na plastochinon je umožněn díky světelné energii (Shen, 2015).

Reakční centrum PSII je obklopeno světlosběrnými komplexy II (light harvesting complex II, LHCII) vázícími chlorofyl *a* a *b* a karotenoidy lutein, neoxantin, violaxantin, zeaxantin a beta-karoten (Barros & Kühlbrandt, 2009). LHCII je trimerický komplex tvořený podjednotkami

Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3, který se k jádru připojuje skrz monomerní Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb6, nazývané též CP29, CP26 a CP24 (Barros & Kühlbrandt, 2009; Su & Ma, 2017).



Obr. 1. Schématické znázornění fotosystému II a světlosběrných komplexů v tylakoidní membráně (převzato z Su & Ma, 2017).

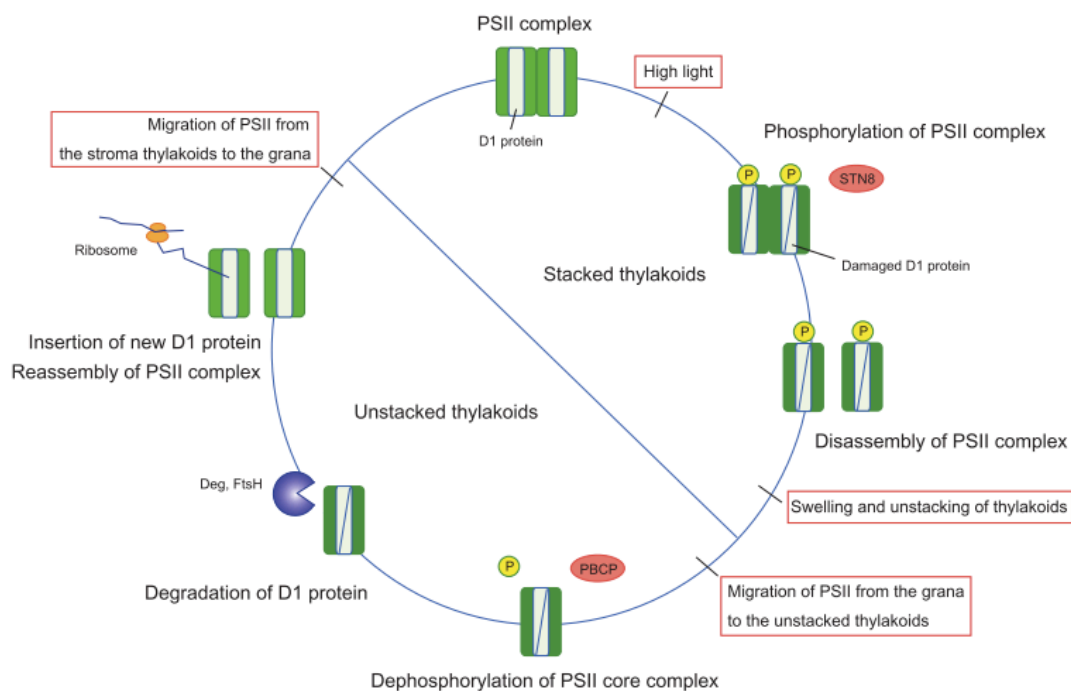
Funkcí LHCII je zefektivnit proces fotosyntézy účinným vychytáváním fotonů ve větší ploše a jejich následným přenosem na reakční centrum PSII, které je kvůli nízkému počtu navázaných molekul chlorofylu v této činnosti velice nesoběstačné (Barros & Kühlbrandt, 2009). Další funkcí LHCII je ochrana fotosystému při nadměrné ozáření, během které přestane LHCII předávat kvanta energie do reakčního centra a nadbytečnou energii uvolní v podobě tepla, čímž zabrání nadměrné redukci v chloroplastu a zvýšené tvorbě volných kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS), které by způsobily poškození fotosyntetického aparátu (Barros & Kühlbrandt, 2009). V literatuře se tento mechanismus označuje jako nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (non-photochemical quenching, NPQ).

Na jeden PSII dimer může být v závislosti na okolních podmínkách (ozáření, dostupnost vody a s tím související pH v lumen tylakoidů) různě pevně navázáno až šest LHCII trimerů spolu s výše uvedenými monomerními CP29, CP26 a CP24 (Kouřil et al., 2012). Takto vzniklé uskupení se nazývá PSII-LHCII superkomplex (Dekker & Boekema, 2005; Kouřil et al., 2012).

2.1.1.1 Opravný cyklus PSII

Na světle dochází k poměrně častému poškozování PSII, konkrétně podjednotky D1. Není zcela jasné, jak přesně k poškození dochází, navrženo bylo víc různých mechanismů poškození PSII (shrnutu v Nixon et al., 2010). Aby byla oprava dostatečně efektivní, mají rostliny vyvinutý opravný cyklus PSII.

Poškozená podjednotka D1 je umístěna v jádru PSII a většina PSII se nachází uvnitř gran. Proteiny zajišťující opravu PSII se nacházejí převážně mimo grana (shrnutu v Yoshioka-Nishimura, 2016), a tak musí při jeho opravě dojít k přesunu z gran do stromatálních lamel, k částečnému rozložení komplexu PSII, náhradě poškozeného proteinu D1 a následnému opětovnému složení. Celý cyklus začíná fosforylací jádra PSII protein kinázou STN8, což způsobí rozložení superkomplexu PSII-LHCII a usnadnění jeho pohybu granální membránou do stromatálních tylakoidů, kde dojde k degradaci proteinu D1 pomocí proteáz FtsH a Deg (shrnutu v Puthiyaveetil et al., 2014; Yoshioka-Nishimura, 2016). Poškozená podjednotka D1 je nahrazena nově nasyntetizovanou, která je vložena zpět do komplexu PSII, který migruje zpět do přitištěných membrán gran (obr. 2, Puthiyaveetil et al., 2014).



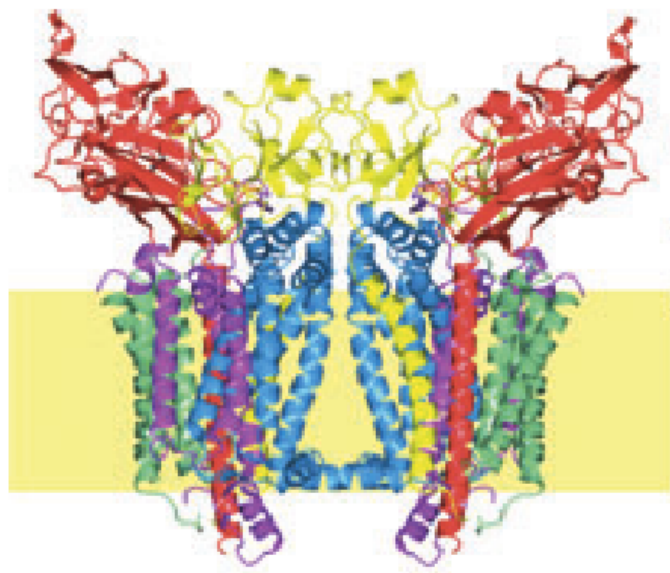
Obr. 2. Schéma cyklu opravy PSII. Po fosforylaci migruje PSII z gran do stromatálních tylakoidů, kde dochází k degradaci poškozeného proteinu D1 proteázami Deg a FtsH a následnému vložení nově

syntetizovaného proteinu D1 a migraci zpět do přitíštěných částí gran (převzato z Yoshioka-Nishimura, 2016b).

Puthiyaveetil et al. (2014) se dále domnívají, že jednotlivé kroky v opravném cyklu PSII jsou vázány k jednotlivým kompartmentům tylakoidní membrány a tímto prostorovým a také časovým oddělením jednotlivých kroků je zajištěna vyšší efektivita tohoto cyklu. Přestože opravný cyklus PSII je poměrně dobře popsán, kolem přesných molekulárních mechanismů je stále mnoho nejasného.

2.1.2 Cytochromový komplex

Cytochromový komplex (cyt b_6f , obr. 3) se nachází v tylakoidní membráně a je tvořen dvěma identickými monomerními komplexy o osmi podjednotkách, přičemž dvě podjednotky vyčnívají do luminálního prostoru, zatímco ostatní jsou zanořeny v membráně (Baniulis et al., 2008; Tikhonov et al. 2014). Největšími z nich jsou cytochrom f (cyt f), cytochrom b_6 (cyt b_6), Rieskeho železo-sirný protein a podjednotka IV (Baniulis et al., 2008). Na tyto proteiny se váží čtyři prostetické skupiny společně i pro ostatní cytochromové komplexy: dva hemy typu b, železo-sirný klastr vázaný v Rieskeho proteinu a jeden hem typu c. Specifickými svou vazbou na cyt b_6f jsou pak hem c_n , chlorofyl a a β -karoten (Baniulis et al., 2008).



Obr. 3: Stužkové schéma cytochromu b_6f u sinice *Mastigocladus laminosus*, pohled paralelně na membránu. Červeně cytochrom f , modře cytochrom b_6 , fialově podjednotka IV, zeleně malé podjednotky (převzato z Baniulis et al., 2008).

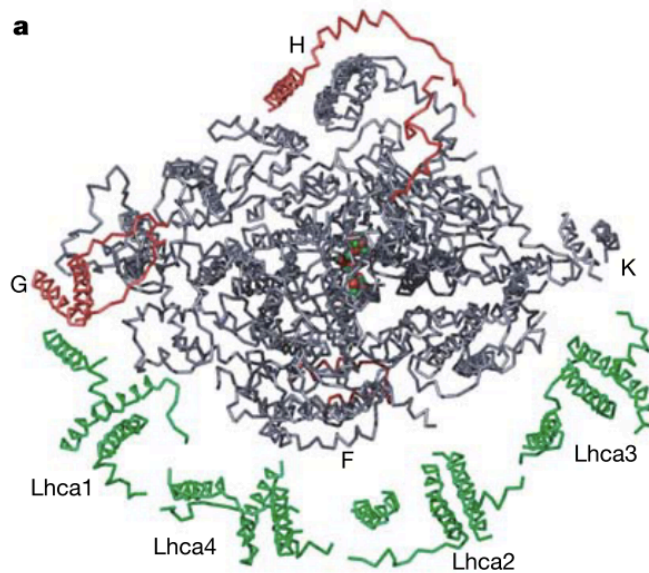
Kolem jednotlivých monomerů v membráně jsou navázány čtyři podjednotky hydrofobního charakteru o nízké molekulární hmotnosti, označované PetG, PetM, PetL a PetN (Baniulis et al., 2008; Kurisu et al., 2003; Schneider et al. 2007), které jsou důležité pro správné fungování a složení cyt *b₆f*, avšak jejich konkrétní úloha v cytochromovém komplexu zůstává nejasná (Schneider et al., 2007).

Cytochromový komplex *b₆f* (cyt *b₆f*) zajišťuje přenos elektronů mezi reakčními centry PSII a PSI za oxidace plastochinolu a redukce plastocyaninu či cytochromu (Schneider et al., 2007). Dále využívá energii přenášených elektronů k pumpování protonů do lumen tylakoidu a podílí se tak na vytváření elektrochemického protonového gradientu, který je nezbytný pro syntézu ATP (Kurisu et al., 2003; Tikhonov, 2014).

2.1.3 Fotosystém I

Dalším proteinovým komplexem zakotveným v tylakoidní membráně je fotosystém I (PSI, obr. 4), jenž je stejně jako PSII proteinovým komplexem vázajícím velké množství pigmentů a dalších kofaktorů. Skládá se z jednoho reakčního centra a světlosběrných komplexů (LHC I; Ben-Shem et al., 2003; Dekker & Boekema, 2005). Stabilní forma jádra komplexu PSI u rostlin je tvořena dvanácti podjednotkami - PsaA až PsaL (Kouřil et al., 2018). Funkce těchto podjednotek zahrnuje zachycování světla, separaci náboje, transport elektronu, vazbu ferredoxinu, plastocyaninu a LHCI, popř. LHCI (při „state transitions“, viz kap 3.4.2.1), nebo regulaci PSI (Jensen et al., 2007).

LHCI je tvořen čtyřmi proteiny Lhca1 – Lhca4, tvořícími dva heterodimery, které dohromady formují polokruhovitý pás asymetricky se vážící k jádru PSI v místě podjednotek PsaF a PsaJ (Jensen et al., 2007; Kouřil et al., 2018). LHCI váže chlorofyl a i b a xantofyly (Dekker & Boekema, 2005), jejichž společnou funkcí je zachytit světelnou energii, kterou následně odvádí do reakčního centra.



Obr. 4: Stuhkovité znázornění komplexu fotosystému I zelené rostliny. Převzato z Ben-Schem et al. (2003).

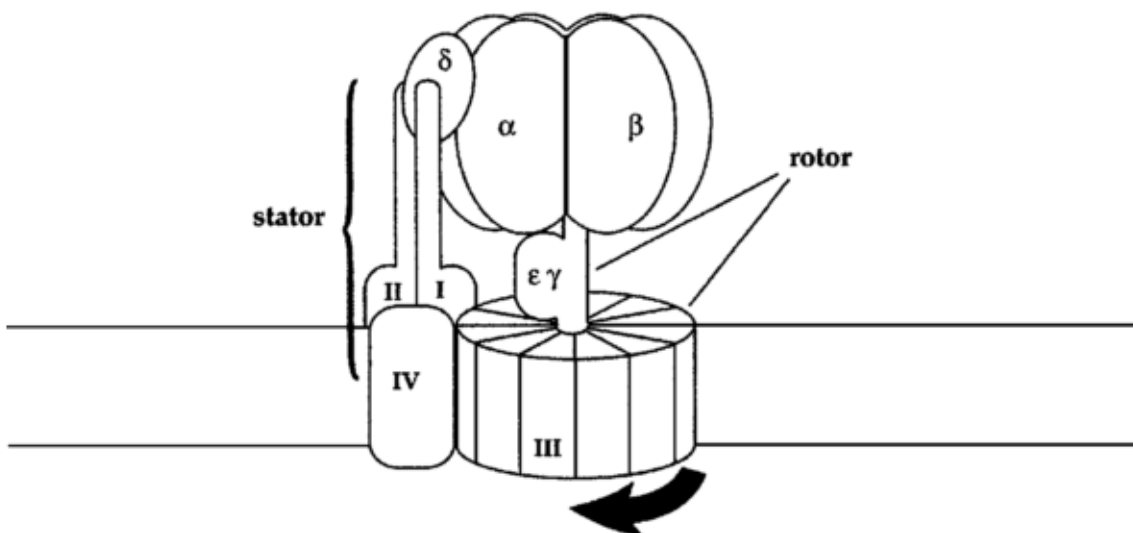
PSI přenáší elektron z plastocyaninu, nacházejícím se na luminální straně tylakoidu, na ferredoxin, nacházejícím se v prostoru stromatu (Jensen et al., 2007).

2.1.4 F_1F_0 ATP syntáza

Chloroplastová ATP syntáza (obr. 5) se skládá ze dvou částí: membránové (CF_0) a stromatální (CF_1). Stromatální část je hydrofilní a je tvořena pěti podjednotkami α , β , γ , δ a ϵ . Jednotky α a β jsou zastoupeny třemi kopiemi, které tvoří šestičlenný kruh o třech heterodimerech, přičemž každý heterodimer $\alpha\beta$ obsahuje vazebné místo pro syntézu nebo za specifických okolností i hydrolýzu ATP (Sharkey et al., 2012). Podjednotky γ a ϵ připojují tento kruh k F_0 části ATP syntázy a jsou každá přítomna pouze v jedné kopii, stejně tak jako podjednotka δ (Kouřil et al., 2012).

CF_0 komplex se skládá ze čtyř polypeptidů označovaných I, II, III a IV, ukotvených v tylakoidní membráně, a zajišťuje průchod protonů z luminu do stromatu (Mccarty et al., 2000). F_1F_0 ATP syntáza vyrábí ATP na základě rozdílů v pH (koncentraci protonů) a elektrickém náboji na membráně, který vzniká nahromaděním vodíkových iontů v lumen tylakoidu rozkladem vody fotosystémem II a transportem protonů prostřednictvím plastochinolu, jednak při přechodu mezi

PSII a cytochromovým komplexem a jednak činností cytochromového komplexu (Tikhonov, 2014).

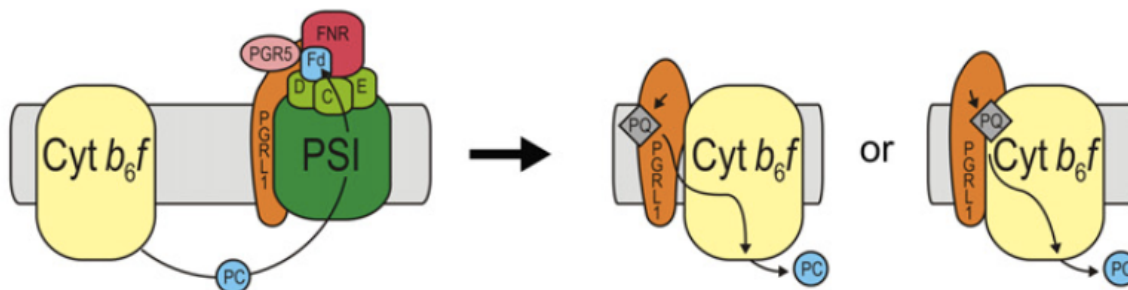


Obr. 5: Model ATP syntázy. Levá a horní část funguje jako stator, spodní (CF_o) a střední část rotuje, hnána protonovým gradientem. CF₁ část je vystavena do stromatu (převzato od Mccarty et al., 2000).

2.1.5 PGR5/PGRL1 komplex

PGR5/PGRL1 (protein gradient regulation 5/protein gradient regulation-like 1; obr. 6) je proteinový komplex významný v jedné ze dvou objevených drah cyklického transportu elektronů (cyclic electron flow, CEF), při kterém dochází k přenosu elektronů z reakčního centra PSI na ferredoxin (Fd) a následně na plastoquinon (PQ) (Hertle et al., 2013). CEF je na rozdíl od lineárního přenosu elektronů (linear electron flow, LEF) poháněn pouze činností PSI a nevzniká při něm NADPH, ale pouze ATP (DalCorso et al., 2008; Peng et al., 2011).

PGRL1 je protein nacházející se v tylakoidní membráně, který má dvě domény vystavené do prostoru stromatu. U *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje ve dvou izoformách PRGL1A a PRGL1B (DalCorso et al., 2008). PRGL1 poskytuje na jedné ze svých stromálních domén vazebné místo pro PGR5 a jeho navázáním vytváří heterodimer. Komplex PGRL1/PGR5 interaguje s fotosystémem I a cytochromem *b₆f* (obr. 6; DalCorso et al., 2008) a zajišťuje předání elektronů z ferredoxinu na plastoquinon při cyklickém přenosu elektronů in vitro (Hertle et al., 2013).



Obr. 6: Schématické znázornění oxidace PSI a redukce cyt b₆f za pomoci PGR5/PGRL1. Vlevo: PGRL1 interaguje s PSI a přijímá elektrony od ferredoxinu. Vpravo: PGRL1 se váže k cyt b₆f a převádí elektrony na plastochinon (převzato od Hertle et al., 2013).

Dráha spojená s heterodimerem PGR5/PGRL1 je majoritní drahou přenosu elektronů z ferredoxinu na plastochinon při cyklickém transportu u *Arabidopsis* a špenátu (Finazzi & Johnson, 2016; Wood et al., 2018) a je klíčová například pro ochranu před nadměrným osvětlením vyvoláním nefotochemického zhášení okyselením lumen (Peng et al., 2011). Přesný mechanismus fungování PGR5/PGRL1 komplexu *in vivo* je však stále předmětem debat (Hertle et al., 2013; Wood et al., 2018b). Otázkou například je, proč je koncentrace PGR5 v membráně daleko nižší než koncentrace PGRL1 (viz tab. 1).

2.1.6 NDH komplex

Minoritním způsobem cyklického transportu elektronů z ferredoxinu na plastochinon je přenos pomocí NADH dehydrogenase-like (NDH) komplexu (Peng et al., 2011). NDH komplex je enzym o čtyřech podjednotkách, který tvoří superkomplex s fotosystémem I a podle dostupných studií má na děje spojené s CEF o mnoho menší vliv než komplex PGR5/PGRL1 (Peng et al., 2011).

Nedávno bylo objeveno, že NDH komplex funguje také jako membránová pumpa, která čerpá protony ze stromatu do lumen tylakoidu. Pumpováním protonů do luminu se zvyšuje množství ATP vyrobeného při CEF za jednotku času, čímž je při cyklickém přenosu elektronů pomocí NDH dosaženo rychlejšího vybalancování poměru ATP/NADPH oproti CEF zprostředkovanému komplexem PGR5/PGRL1 (Strand, Fisher, & Kramer, 2017).

2.1.7 Proteiny CURT1

U huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) jsou známé čtyři relativně malé (11,0 – 15,7kD) proteiny rodiny CURT1 (curvature thylakoid 1 proteins) označované CURT1A-D tvořící oligomery, které se vyskytují ve specifických částech tylakoidní membrány. Přestože jsou oproti hlavním komplexům elektron-transportního řetězce zastoupeny ve velmi malých koncentracích (tab. 1) , velice významně se podílejí na struktuře tylakoidní membrány, konkrétně na jejím charakteristickém ohybu v okrajových částech gran (Armbruster et al., 2013). Změna množství proteinů CURT1 v tylakoidní membráně má výrazný vliv na strukturu gran (viz kapitola 3.5.4).

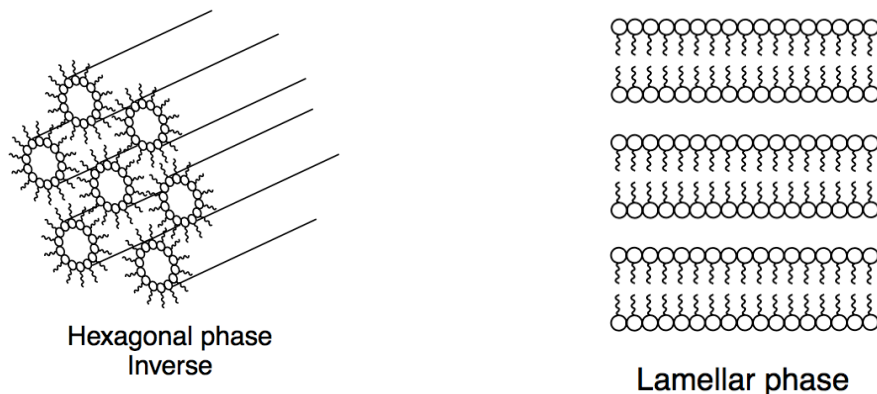
Tab. 1: Koncentrace jednotlivých proteinů v tylakoidní membráně (podle Pribil et al., 2014). Hodnoty pro PGRL1 a PGR5 převzaty z Hertle et al. (2013).

Protein (komplex)	Koncentrace (mmol/mol Chl)
LHC II	33,68
PS II	2,99
PS I	2,21
Cyt <i>b₆f</i>	1,32
ATP syntáza	0,95
PGRL1	0,70
PGR5	0,09
CURT1	0,41

2.2 Lipidy

Výše popsané proteiny jsou ukotveny v lipidové dvojvrstvě tvořící přibližně 20% sušiny tylakoidní membrány (Krumova et al., 2008). Skoro polovinu obsahu lipidů tvoří monogalaktosyldiacylglycerol, který je zajímavý tím, že namísto dvojvrstvy vytváří převážně tzv. inverzní hexagonální fázi (inverted hexagonal phase, obr 7.), což je uskupení sedmi inverzních micel – šest se nachází ve vrcholech šestiúhelníku a jedna uprostřed. Tato fáze byla studovaná *in vitro* a byla prokázána její důležitost pro správný průběh xantofylového cyklu a ochranu struktury a funkce velkého množství membránových proteinů (Krumova et al., 2008; Van Eerden, De Jong, De Vries, Wassenaar, & Marrink, 2015). Další lipidy přítomné v tylakoidní membráně jsou digalaktosyldiacylglyceroly (zastoupené z 32%), sulfoquionovosyldiacylglyceroly (zastoupené z

15%) a fosfatidylglyceroly (13%), které převážně tvoří typickou membránovou dvojvrstvu (Van Eerden et al., 2015).

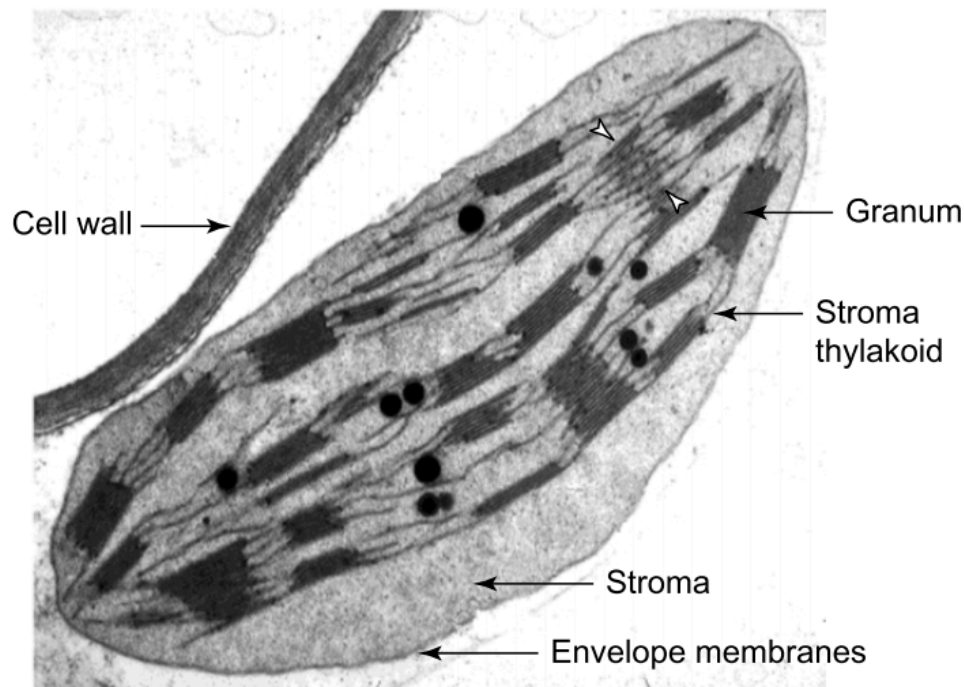


Obr. 7: Schématické znázornění lamelární a invertované hexagonální fáze, které mohou tvořit membránové lipidy (převzato z Lasic, 1995).

3 Grana

V chloroplastech vyšších rostlin nacházíme grana, charakteristické útvary tvořené obvykle pěti až několika desítkami na sebe hustě naskládaných vrstev tylakoidních membrán, jejichž průměr se pohybuje mezi 300 – 400 nm (Pribil et al., 2014; Shimoni, 2005) a výška mezi 200 – 600 nm (Shimoni, 2005). Grana jsou navzájem propojena nenavrstvenými tylakoidními membránami volně ležícími ve stromatu, tzv. stromatálními lamelami, o délce několika stovek nanometrů (shrnuto v Mustárdu & Garab, 2003), které se od gran liší především složením proteinů, funkcí a také morfologicky – membrány k sobě nepřiléhají tak těsně jako v granech (obr. 8; shrnuto v Daum & Kühlbrandt, 2011).

Na základě různého proteinového složení v různých částech se rozlišují tři části gran: přitisklé části gran (stacked membranes, grana cores), koncové části gran (grana end membranes) a okrajové části gran (grana margins; P. Å Albertsson, 2001; Per Åke Albertsson, 1982; Pribil et al., 2014). Přitisklé a koncové části gran jsou velice hustě, až z 80 % obsazeny membránovými proteiny, přičemž tři čtvrtě z nich se nemůže v rozmezí několika minut kvůli tak velké hustotě proteinů v membráně skoro vůbec pohybovat. Zbylé proteiny mohou difundovat mezi grany a stromatálními lamelami v řádech několika sekund a pravděpodobně tak regulují zachycování světla a zajišťují opravu světlem poškozených proteinů (Kirchhoff et al., 2008).



Obr. 8 Chloroplast vyšší rostliny, snímek z elektronového mikroskopu. Patrná jsou grana i stromatální tylakoidy (převzato od Mustárdu & Garab, 2003).

Koncové části gran (grana end membranes) jsou proteinovým složením podobné stromatální lamelám – bohaté na ATP syntázu a chudé na PSII (obr. 12; Pribil et al., 2014).

Vnitřní část gran, lumen, je z velké části obsazena vnějšími podjednotkami fotosystému II obklopujícími komplex vyvíjející kyslík (Kirchhoff et al., 2011) a je stále předmětem debat, zda interakce mezi protějšími proteiny přes lumenální stranu přispívá ke stabilitě gran či nikoliv (viz. kapitola 3.3). Minimální tloušťka lumenálního prostoru se obvykle odhaduje alespoň na dvojnásobek výšky podjednotek PSII vyčnívajících mimo membránu, tedy 8 – 10 nm a mění se se změnou okolních podmínek, typicky například se změnou ozáření (Kirchhoff et al., 2011). Tloušťka lumenálního prostoru však pravděpodobně může být i menší, a to v případě, kdy protější PSII sedí na různých místech (shrnutí v Kouřil et al., 2012).

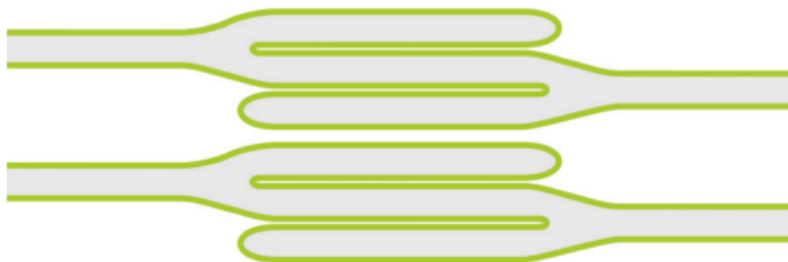
Mezi dvěma sousedícími membránami v granech byla naměřena mezera o velikosti přibližně 2 nm, která je vysvětlena působením hydratačních sil (viz kapitola 3.3.1.2; Wah Soon Chow, Kim, & Anderson, 2005).

3.1 Struktura gran

Byly navrženy tři odlišné modely prostorové podoby gran, které se liší především způsobem vzniku a propojením stromatálních lamel s granálními sloupci (shrnuje v Kirchhoff, 2013; Kouřil et al., 2012; Shimoni, 2005).

3.1.1 Vidličkový model

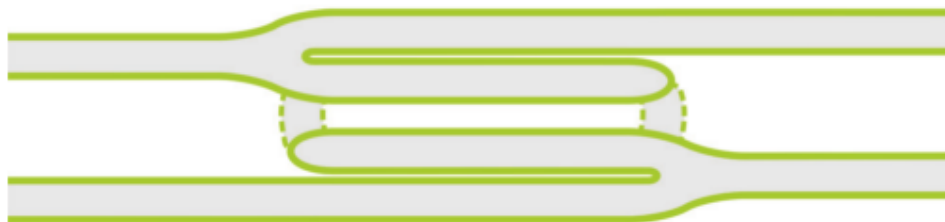
První, tzv. vidličkový model (obr. 9), byl představený v roce 1999 a popisuje grana jako opakující se jednotky sloupečků o třech discích, které vznikají symetrickou invaginací stromatálních tylakoidů, které se následně vrství a tím dosáhnou výsledné sloupečkové struktury gran (shrnuje v Mustárdy & Garab, 2003; Pribil et al., 2014).



Obr. 9: Vidličkový model struktury gran (převzato z Pribil et al. 2014).

3.1.2 Bifurkační model

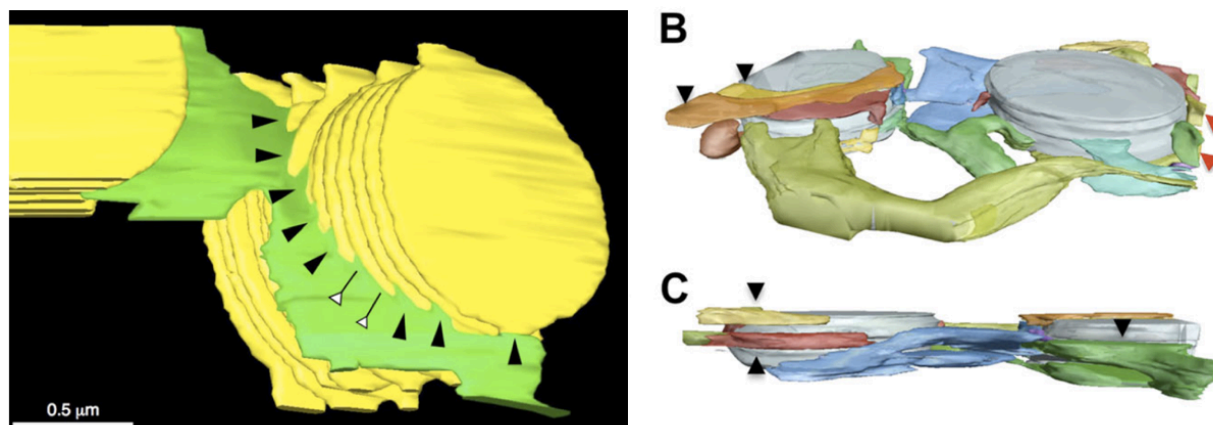
Z vidličkového modelu vychází tzv. bifurkační model představený v roce 2005 Shimoni et al., podle kterého také grana vznikají invaginací, ale pouze z jedné strany a jsou následně propojeny okrajovými částmi membrány sousedících vrstev (obr. 10; Shimoni, 2005).



Obr. 10: Bifurkační model struktury gran (převzato z Pribil et al. 2014).

3.1.3 Helikální model

Třetí, šroubovicový (helikální) model (obr 11.), byl vytvořen v 60. letech 20. století a o mnoho let později podložen poměrně přesvědčivými daty získanými na základě 3D snímků z elektronové tomografie (Austin & Staehelin, 2011). Podle helikálního modelu jsou sloupečky gran propojeny pravotočivou šroubovicí tvořenou tylakoidní membránou, která se vine pod úhlem 20° - 25° a v místě kontaktu s jednotlivými vrstvami gran vytváří různě velké (většinou 30 – 130 nm, někdy až 150 - 435 nm) propojovací štěrbin (junctional slits). Autoři se domnívají, že schopnost rostliny měnit velikost těchto štěrbin by mohla hrát roli při regulaci pohybu protonů a membránových proteinů z gran do stromatálních lamel a tím přispívat k regulaci fotosyntézy při změnách okolních podmínek (více v kapitole 5.1; Austin & Staehelin, 2011).

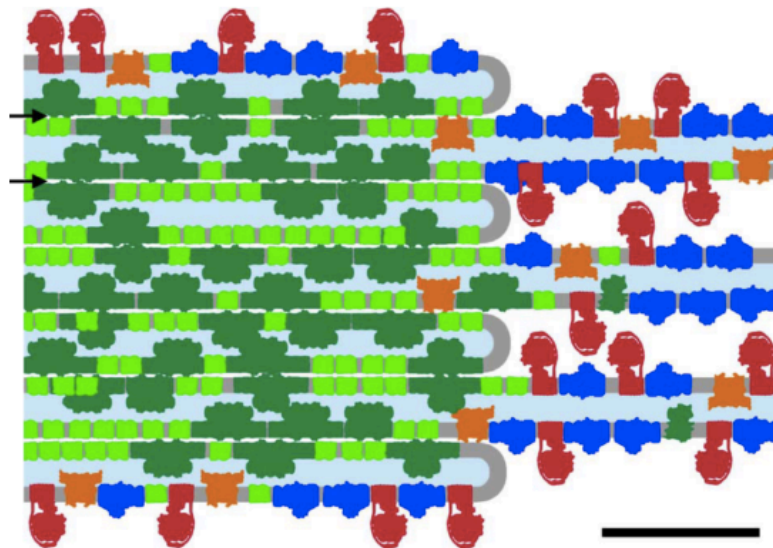


Obr. 11: Snímky gran z elektronové tomografie. A) Na snímku je patrný helix ze stromatální lamely (zeleně), který ovíjí granový sloupec (žlutě; Austin & Staehelin, 2011) B), C) Grana znázorněna světle modře, jednotlivé stromatální lamely dalšími barvami. Převzato Daum & Kühlbrandt (2011).

3.2 Laterální heterogenita

Pro tylakoidní membránu je specifická laterální heterogenita, jíž se rozumí asymetrické rozložení membránových proteinů v různých jejích částech (obr. 12). V přitisklých membránách se vyskytují hlavně superkomplexy fotosystému II. Ve stromálních tylakoidech potom fotosystém I a ATP syntáza, které svými částmi výrazně vyčuhují do stromatu, což jim znemožňuje dostat se do gran (Dekker & Boekema, 2005; Pribil et al., 2014; Ruban & Johnson, 2015). Z menších

proteinových komplexů se pak ve stromatálních lamelách nachází například homodimery PGRL1 (Suorsa et al., 2014) a NDH komplexy (Pribil et al., 2014). Relativně rovnoměrně jsou v obou částech membrány rozprostřeny světlosběrné komplexy fotosystému II, cytochrom *b₆f* (Ruban & Johnson, 2015) a z menších proteinů např. protein PGR5 (Suorsa et al., 2014).



Obr. 12. Schématický model části tylakoidů se znázorněním proteinového složení jednotlivých částí. Tmavě zeleně PSII-LHCII komplexy, světle zeleně LHCII trimery, červeně ATP syntáza, modře PSI, oranžově cyt *b₆f*. Převzato od Dekker & Boekma, (2005).

3.3 Síly ovlivňující stabilitu gran

3.3.1 Odpudivé síly

3.3.1.1 Elektrostatické

Stromatální strana tylakoidní membrány má mírně negativní náboj, jehož povrchová hustota (net surface charge density, σ) je přibližně $-0,025 \text{ C/m}^2$ (Chow et al., 2005). Například u výše zmíněné rostliny *Alocasia macrorrhiza*, vytvářející masivní grana až o stovce membrán, byla naměřena velice malá (blízká nule) hodnota σ (Chow et al., 1988), která koresponduje s nízkými elektrostatickými odpudivými silami a zároveň potvrzuje, že velikost povrchové hustoty náboje ovlivňuje míru přitiskávání membrán (Barber, 1982). Neutralizace elektrostatických odpudivých sil může být dosažena zrušením negativního náboje membrány neutralizací karboxylových skupin membránových proteinů pomocí navázání protonů nebo jiných kationtů (Barber, 1982).

Působením vhodnými chemickými sloučeninami na aminové zbytky lysinu v membránových proteinech se dá dosáhnout ztráty pozitivních nábojů, což povede ke zvětšení negativního náboje membrány, a tím k jejímu rozvolnění (Chow et al., 2005). Tohoto jevu se dá dosáhnout také fosforylací nebo působením trypsinu na superkomplex fotosystému II (Chow et al., 1991).

3.3.1.2 Hydratační

Přesné fungování hydratačního odpuzování (hydration repulsion, HR) zatím není zcela jasné. Obecně platí, že působí mezi jakýmkoli polárními povrchy ve vodném prostředí, mezi kterými udržuje mezeru o několika nanometrech. Hydratační odpuzování souvisí s orientací molekul vody při přiblížení dvou nabitých membrán (Chow et al., 2005) a působí v kontrastu proti van der Waalovým silám (Schneck, Sedlmeier, & Netz, 2012). V granech se jejich působení připisuje 2 - 4 nm velká stromatální mezera mezi jednotlivými vrstvami granových disků (tzv. partition gap; Chow et al., 2005).

3.3.1.3 Sterické

Faktorem, který nepřímo, ale výrazně ovlivňuje rozložení proteinů v tylakoidní membráně, je působení sterických zábran. V tylakoidech sterické zábrany znemožňují fotosystému I a ATP syntáze difundovat do gran, a to kvůli jejich prostorově výrazným podjednotkám vyčnívajícím do stromatu (Chow et al., 2005; Pribil et al., 2014), a jsou tak jednou z příčin laterální heterogenity tylakoidní membrány. Dalším proteinem, který se kvůli sterickým zábranám nenachází v granech, je například proteáza FtsH (Nixon et al., 2005).

3.3.2 Přitažlivé síly

3.3.2.1 Van den Waalsovy síly

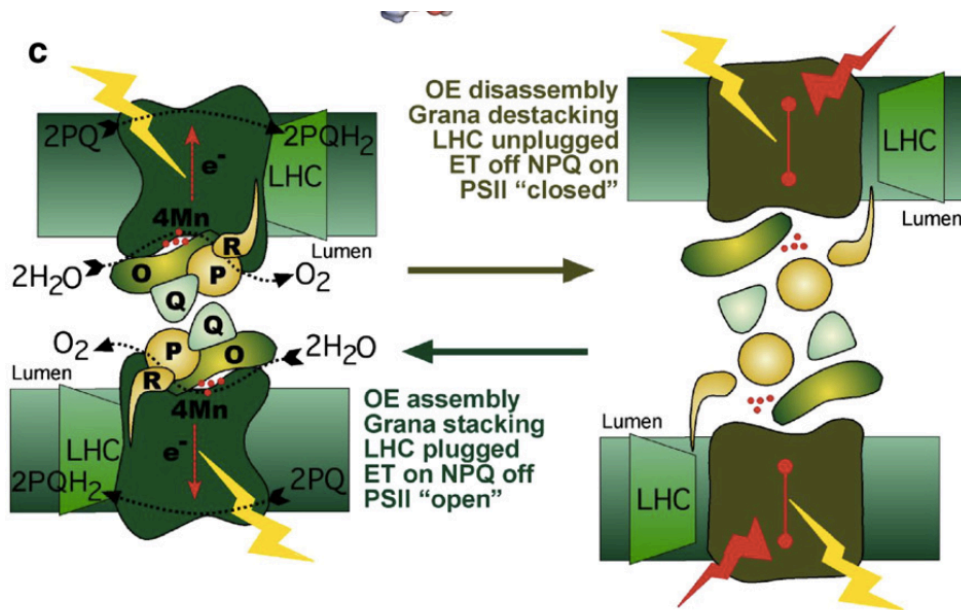
Zásadní vliv na strukturu tylakoidní membrány mají van der Waalsovy síly, které jsou samy o sobě poměrně slabé, ale protože jsou v membráně časté, jsou pro podobu tylakoidní membrány nakonec rozhodující (Chow et al., 2005). V granech, tedy místech bohatých na LHCII, je působení van der Waalsových sil výrazně větší, než je tomu ve stromatálních lamelách, tedy místech na tyto proteiny chudých (Chow et al., 1991).

3.3.2.2 Interakce mezi LHCII

Dále pravděpodobně existují specifické interakce mezi LHCII v sousedících membránách. Negativně nabitě části světlosběrných antén fotosystému II interagují přes stromatální štěrbinu s kladně nabitými částmi. Tato interakce se odehrává na kratší vzdálenost, než interakce mezi stejně nabitými konci, a tak ve výsledku způsobuje přitisknutí membrán a velice významně přispívá ke stabilitě gran (Chow et al., 2005).

3.3.3 Síly v lumen

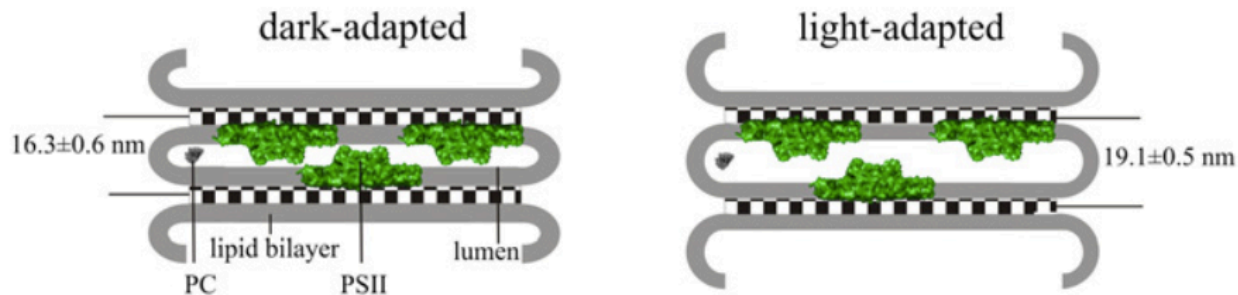
Všechny předchozí síly se týkají stromatální mezery (partition gap), ale byla navržena také hypotéza důležitosti působení proteinů PsbO, PsbP, PsbQ a PsbR přes lumenální mezeru. Jde o vnější proteiny fotosystému II obklopující komplex vyvíjející kyslík, které jsou podle autorů důležité pro vytvoření gran (De Las Rivas, Heredia, & Roman, 2007). Autoři se domnívají, že PSII je plně funkční pouze při úplném připojení všech vnějších proteinů, k čemuž podle nich dochází pouze v granech. Dále navrhují, že pokud jsou vnější proteiny správně připojeny, interagují se superkomplexy PSII sedícími v protější membráně přes lumen tylakoidu pomocí interakcí mezi podjednotkami PsbQ (obr. 13).



Obr. 13: Schématické znázornění uspořádání podjednotek vnějších proteinů PSII v granech – OEC plně sestaven a připojen k PSII, LHCII taktéž připojen, elektronový transport běží (vlevo) a v rozvolněných granech – OEC a LHCII nepřipojen, elektronový transport zastaven (De Las Rivas et al., 2007).

Myšlenka této hypotézy je částečně podpořena výsledky pokusů, jejichž autoři potvrdili interakce PsbQ - PsbQ přes luminální prostor na světle (Yi, Hargett, Frankel, & Bricker, 2009), avšak této interakci nepřisuzují tak velkou váhu jako De las Rivas et al., a naopak jim stabilita gran díky této interakci přijde velmi nepravděpodobná.

V kontrastu s hypotézou autorů Del Las Rivas et al. (2007) stojí měření Kirchhoffa et. al. (2011), jejichž data z rostlin *Arabidopsis* adaptovaných na tmu i na světlo ukazují uspořádání PSII, při kterém se protilehlé fotosystémy spíše vyhýbají, než že by interagovaly (obr. 14). Zároveň zdůrazňují, že interakce mezi protějšími OEC v luminu by musela být nějak stabilizována, protože je energeticky velice nevýhodná. Face-to-face uspořádání OEC v luminu tylakoidu tak považují za velmi nepravděpodobné.



Obr. 14: Schématické znázornění pozice PSII v luminu tylakoidu v rostlinách *Arabidopsis* adaptovaných na světlo (vlevo) a na tmu (vpravo): PSII přímo neinteragují přes luminální štěrbinu (Kirchhoff et al., 2011).

3.4 Dynamika gran

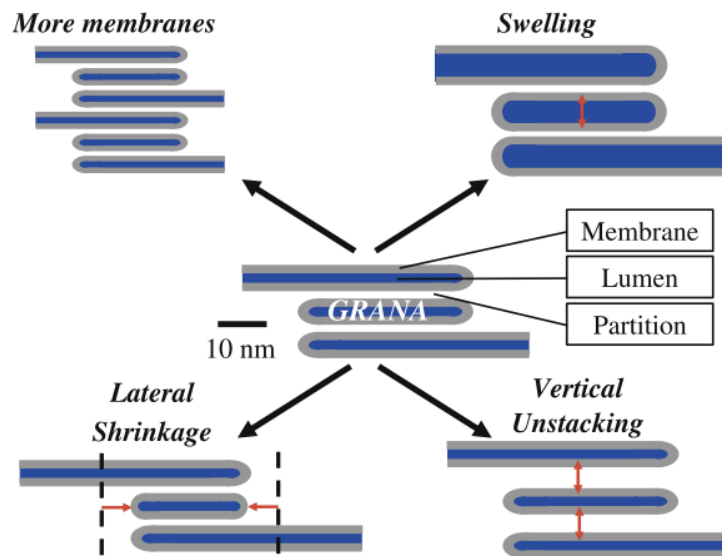
3.4.1 Koncentrace solí

Jedním z dlouho známých faktorů, které mají vliv na formování a rozkládání gran, je koncentrace solí. Při izolaci chloroplastů v roztocích s nízkými koncentracemi solí dochází k rozvolnění gran, které se rozpadají na protáhlé lamely, které k sobě jen volně přiléhají. Přidáním solí, např. chloridu sodného či chloridu hořečnatého, se do různé míry obnoví vrstvení tylakoidů, které může způsobit až znovuvytvoření gran (Izawa & Good, 1966). Tento jev je dobře vysvětlitelný, neboť už v 80. letech byla objevena stabilizace proteinových interakcí v tylakoidních membránách pomocí dvojmocných kationtů. Jejich odstranění z buňky tak vede k rozpadu jimi vytvořených struktur (Kirchhoff et al., 2008).

3.4.2 Světlo

Světelné podmínky, jejichž změna má významný vliv na průběh světelné fáze fotosyntézy, jsou jedním z klíčových faktorů ovlivňujících dynamiku tylakoidní membrány.

U rostlin vystavených na světlo dochází k nafouknutí (swelling) luminu (obr. 15), což mj. usnadňuje pohyb molekul důležitých pro opravy světlem poškozených proteinů (Kirchhoff et al., 2008) Konkrétní mechanismus nafouknutí luminu při osvětlení není přesně znám. Jednou z možností je světlem způsobené okyselení vnitřního prostoru, které je zapříčiněno přílivem vodíkových kationtů do luminu, který následně způsobí osmotické nafouknutí. Toto vysvětlení je navíc podpořeno objevem napěťově ovládaných chloridových kanálů v tylakoidní membráně (Schönknecht et al., 1988).



Obr. 15: Změny ve struktuře gran. Pravá strana při světelném stresu, levá strana při zastínění (Kirchhoff, 2013).

Chloroplasty rostlin rostoucích ve stínu mají grana o více vrstvách než chloroplasty rostlin rostoucích na slunci (Kirchhoff, 2013; Suorsa et al., 2014) a to z důvodu, aby mohly pochyťat více světelné energie (Leong & Anderson, 1986). Například u rostliny *Alocasia macrorrhiza* žijící ve velmi stinných podmínkách v nejnižším patře pralesa bylo pozorováno až sto vrstev v jednom obrovském granovém sloupci (W S Chow et al., 1988). Při světelném stresu se dále mění laterální průměr jednotlivých granových disků, a to až o 20 %. Tento jev je pravděpodobně způsoben fosforylací podjednotek fotosystému II, neboť u mutantů s vypnutými geny pro fosforylaci PSII

až takto velké změny při zvýšené ozářenosti pozorovány nebyly (viz kapitola 3.5.1; Armbruster et al., 2013). Dále při vysokých ozářenostech dochází k rozvolnění gran či k jejich úplnému rozpadu, což umožňuje lepší kontakt světlem poškozených proteinů s látkami a strukturami, které je opravují (Herbstová et al., 2012).

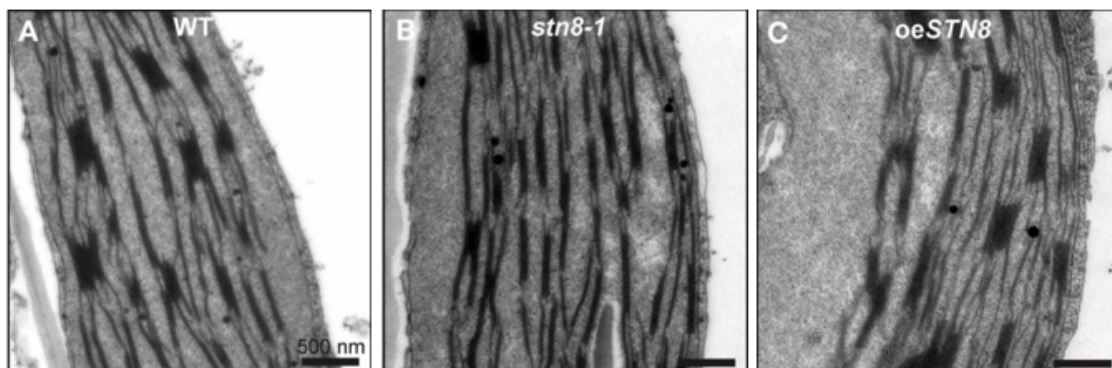
3.4.2.1 State transition

Za normálních okolností je LHCII asociován s PSII (tzv. state 1). Při zvýšené stimulaci fotosystému II díky nadměrnému osvětlení nebo změně spektra světla však dochází k větší redukci plastochinonu a aktivaci kináz, které vede k oddělení LHCII od PSII a přemístění LHCII do míst bohatých na PSI, kde s nimi může tvořit komplex (tzv. state 2; Bellaflore, Barneche, Peltler, & Rochalx, 2005). U *Arabidopsis* byly popsány kinázy STN7 a STN8 (Bellaflore et al., 2005). STN7 zajišťuje především fosforylaci LHCII, STN8 pak především fosforylaci jádra PSII (Wunder et al., 2013). State transition je jev reverzibilní, a jeho reverze lze dosáhnout oxidací plastochinonových zásob zvýšenou stimulací PSI (Bellaflore et al., 2005). Funkce kináz STN7 a STN8 je spojována s regulací opravného cyklu PSII a stabilitou komplexu PSII, jehož fosforylace ovlivňuje uspořádání tylakoidní membrány (Wunder et al., 2013).

3.5 Změny exprese genů ovlivňující podobu gran

3.5.1 Mutant *stn8*

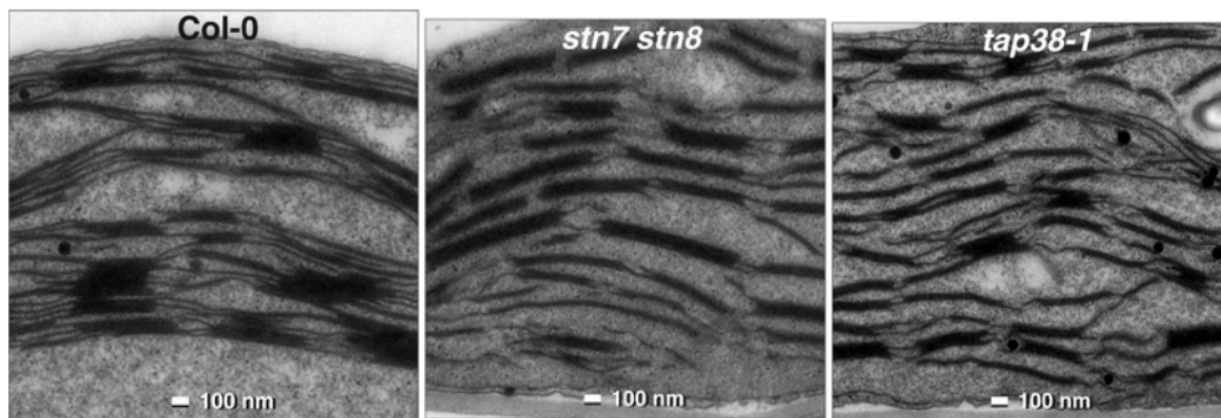
Kináza STN8 fosforyluje převážně jádro PSII a její nepřítomnost ovlivňuje podobu gran v mutantovi, kterému STN8 chybí – tvoří méně granových disků o větším průměru. Vliv STN8 na tvorbu gran je ukázána v rostlinách produkujících zvýšené množství STN8, kde je zvětšen průměr granových disků a zvýšen počet vrstev v granu (obr. 16; Wunder et al., 2013).



Obr. 16: Chloroplasty *Arabidopsis thaliana* pod mírným světlem. WT - wild type, *stn8-1* - mutant postrádající STN8, *oeSTN8* – rostliny exprimující větší množství STN8. Mutant *stn8* má méně granových disků o větším průměru, rostliny exprimující větší množství STN8 mají mírně zvětšený průměr i počet granových disků (Wunder et al., 2013).

3.5.2 *Stn7/stn8* a *tap 38* mutant

Mutanti v genech pro STN 7 a STN 8, kteří jsou neschopni fosforylace LHCII a jádra PSII, vykazují protáhlejší grana (obr. 18) (Armbruster et al., 2013). V granech těchto mutantů nedochází například k dostatečně efektivní opravě PSII, state transition atd. TAP38 je fosfatáza potřebná k defosforylaci LHCII v *Arabidopsis thaliana* (Pesaresi, Pribil, Wunder, & Leister, 2011), takže mutant *tap38* naopak není schopen LHCII defosforylovat. Membrány tohoto mutantu jsou více rozptýlené a grana vypadají maličko jinak než ve WT rostlinách, vyskytují se na více místech a stromatální lamely jsou více rozptýlené (obr. 17). Tito dva mutanti jsou zařazeni k sobě, protože oba souvisí s fosforylací LHCII.

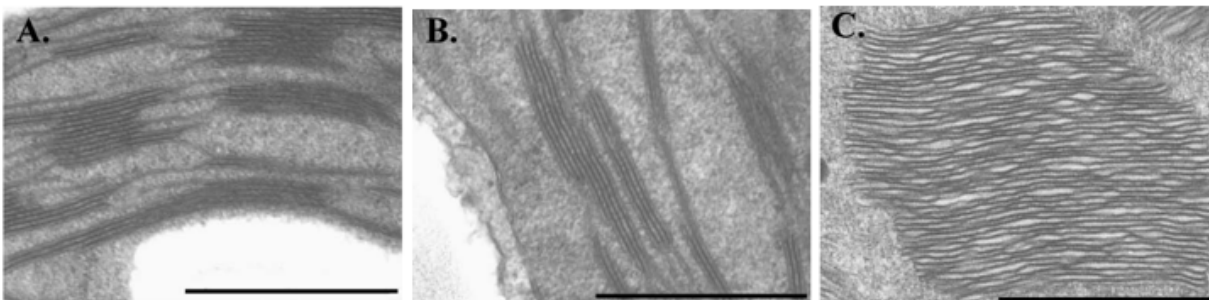


Obr. 17: Chloroplast *Arabidopsis thaliana*. A– WT, B. Dvojité mutant *stn7 stn8*, grana jsou protáhlejší, C. Mutant *tap38* – membrány jsou více rozptýlené, grana vypadají relativně normálně, pouze je jich více. Převzato z Armbruster et al. 2013.

3.5.3 Snížení množství PsbP a PsbQ

PsbP a PsbQ jsou vnější podjednotky PSII, jejichž přesná funkce v rostlinách zatím není přesně známa. Spolu s PsbO interagují s lumenální stranou PSII a tvoří funkční OEC (Yi et al., 2009). Na elektronovém mikroskopu byl pozorován vliv snížení množství těchto podjednotek

pomocí RNA interference na tvorbu gran. V případě snížení množství PsbP došli autoři zjistili, že úplně vymizely stromatální lamely a několikanásobně se navrstvil počet granových disků ve sloupci (obr. 18).

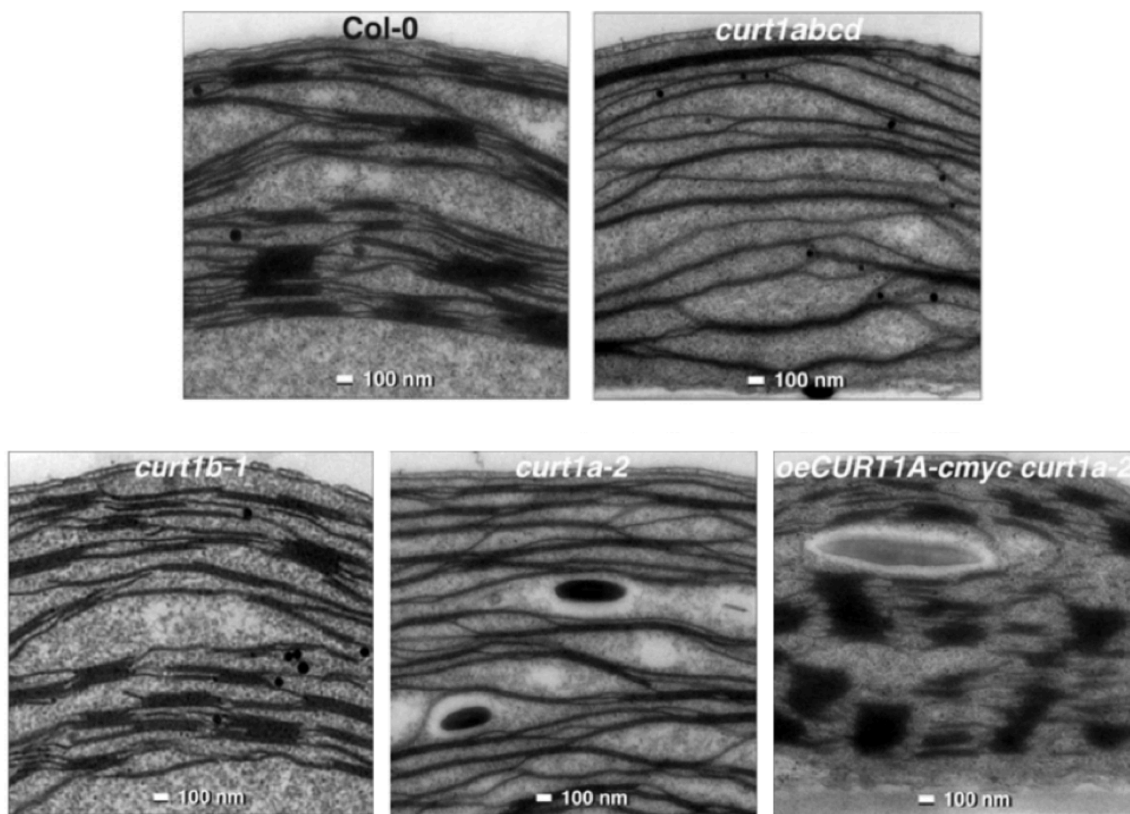


Obr. 18.: Chloroplasty *Arabidopsis thaliana*, snímky pomocí transmisní elektronové mikroskopie, měřítko = 0,5 nm A.: WT – normální grana, B.: Rostliny se sníženým množstvím PsbQ – relativně normální grana C.: Rostliny se sníženým množstvím PsbP– membrány jsou hustě navrstveny, mají zvětšený průměr, stromatální lamely úplně vymizely (Yi et al., 2009).

3.5.4 Mutanti *curt1*

Mutace v genech pro CURT1B-D má za následek tvorbu tzv. pseudogran, které jsou typické snížením počtu vrstev a zvětšením průměru jednotlivých granových disků. Mutace v genu pro CURT1A a dále pak ve dvou a více genech pro CURT B-D pak vede k úplné absenci gran, což by mohlo naznačovat, že zakřivení membrány proteiny CURT1 má na formování gran větší vliv než např. přitiskování membrán v důsledku přitažlivých sil mezi PSII (Armbruster et al., 2013). Nadměrná exprese CURT1A má pak za následek zvýšení tvorby oligomerů CURT1, zmenšení granového disku a zvětšení jeho výšky „nafouknutím“ luminálního prostoru, což spolu s absencí gran u mutanta *curt1a* ukazuje větší vliv proteinu CURT1A na tvorbu gran, než jaký mají ostatní CURT1 proteiny (obr. 19; Armbruster et al., 2013).

Armbruster et al., 2013 prokázali, že mutace v CURT1 nemají přímý vliv na aktivitu žádného z fotosystémů a CURT1 nemá zásadní vliv na funkce hlavních tylakoidních proteinů. U rostlin postrádajících proteiny CURT1A-D byl však snížen, ne ale úplně zastaven, cyklický přenos elektronů a nefotochemické zhášení (NPQ) vyvolané při state transition.

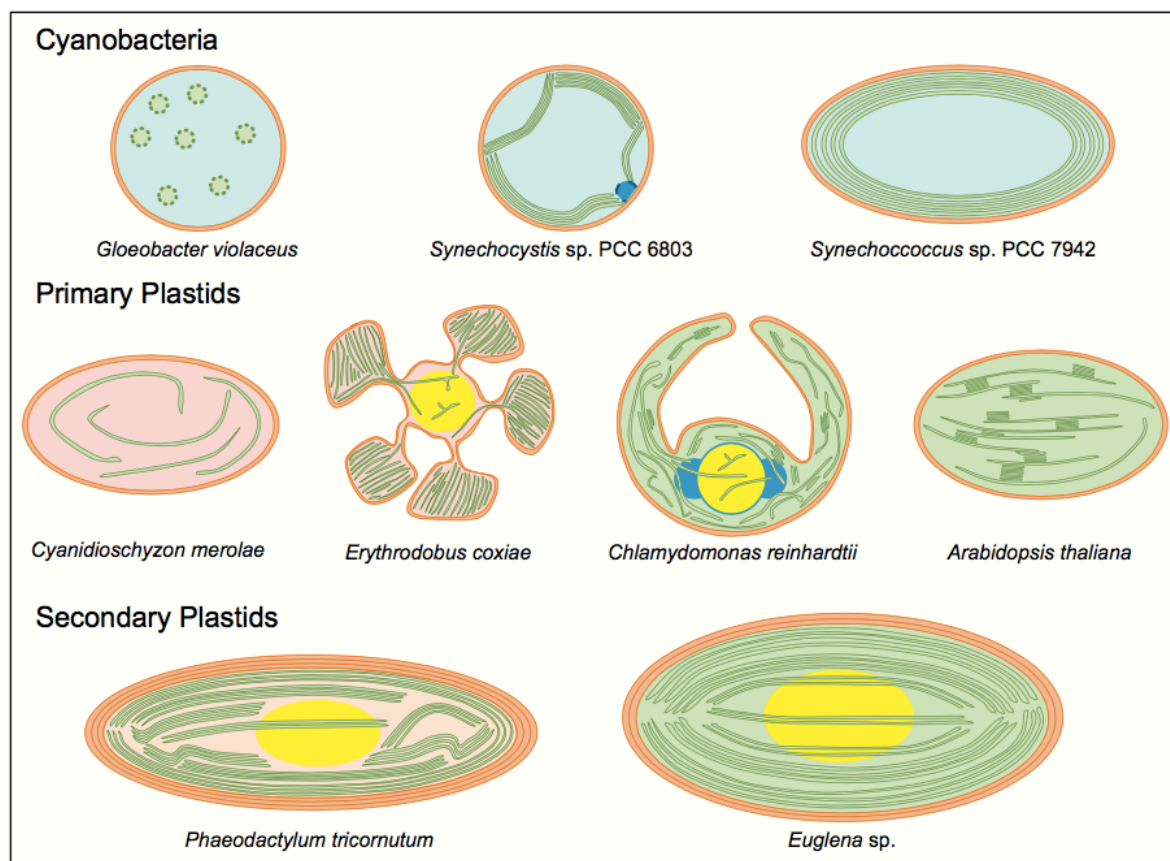


Obr 19. Col-0 Wild type, *curt1abcd* – mutace ve všech genech CURT1, *curt1b-1* - mutace v genu CURT1B, *curt1a-2* - mutace v genu CURT1A, *oeCURT1A-cmyc curt1a-2* – rostliny produkující zvýšené množství CURT1A (Armbruster et al., 2013).

4 Organismy bez vyvinutých gran

4.1 Struktura tylakoidů

Grana nacházíme u zelených rostlin a některých zelených řas. U ruduch (*Rhodophyta*), glaukofýt (*Glaucophyta*) a dalších agranálních eukaryot jsou někdy tylakoidy rozprostřeny volně ve stromatu, často však tvoří tzv. lamely – skupinky dvou až tří dlouhých, volně přitíštěných membrán (pro detaily obr. 20, tab. 2). Podobně je tomu i u prokaryotních organismů (tab. 2; Sherman et al., 1994; Stanier, 1977). Některé zelené řasy, konkrétně *Charophyta*, mohou přitiskávat membrány o šesti až více vrstvách a formovat grana (Levin et al. 1976).



Obr. 20: Schématické znázornění uspořádání tylakoidních membrán u různých fotosyntetizujících organismů. Oranžově – plazmatická membrána a vnější membrány, žlutě - pyrenoid, zeleně – tylakoidní membrána (Rast et al., 2015).

Tabulka 2. Přehled typů chlorofylu, struktury membrán, vytváření gran a přítomnosti fykobilisomů v různých skupinách fotosyntetických organismů. Tabulka vytvořena (podle Van Den Hoek et al., 1995).

	Typ chlorofylu	Přítisklé tylakoidní membrány	Fykobilisomy
<i>Cyanobacteria</i> (prokaryota)	a	Ne	Ano
<i>Prochlorophyta</i> (prokaryota)	a, b	Ano, lamely po 2 ale i více	?
<i>Glaucophyta</i>	a	Ne	Ano

<i>Rhodophyta</i> (ruduchy)	a	Ne	Ano
<i>Heterokontophyta</i>	a, c ₁ , c ₂	Ano, lamely po třech + jedna lamela, která tyto obklopuje	Ne
<i>Haptophyta</i>	a, c ₁ , c ₂	Ano, skupinky po třech	?
<i>Dinophyta</i>		Ano, skupinky po třech	?
<i>Euglenophyta</i>	a, b	Ano, skupinky po třech + jedna lamela, která je obklopuje	?
<i>Chlorophyta</i> (zelené řasy)	a, b; c u některých	Ano, lamely o 6 a více navrstvených	Ne

4.2 Světlosběrné antény

Sinice (*Cyanobacteria*), stejně jako glaukofyta (*Glaucophyta*), červené řasy (*Rhodophyta*) a další skupiny, které získaly chloroplast pohlcením ruduchy, používají jako světlosběrné antény tzv. fykobilisomy (Glazer, 1984). Fykobilisomy (phycobilisomes, PBs) jsou světlosběrné antény nacházející se na stromatální straně (u sinic na cytoplasmatické straně) tylakoidní membrány a jsou tvořeny fykobiliproteiny a pigmenty, které se skládají do struktur o vysoké molekulární hmotnosti, a jejichž přesná podoba je různá v různých organismech (Boekema et al., 1995; Glazer, 1984). Tento komplex vycytává světelnou energii především v zelené části slunečního spektra a svádí ji na fotosystém v tylakoidní membráně. Efektivita přenosu excitační energie z fykobiliproteinů na reakční centra je velice vysoká (skoro 100%; Glazer, 1984). PBs interagují s reakčními centry fotosystémů jen velmi slabě, a tak mohou snadno difundovat po membráně a volně se přesouvat mezi jednotlivými reakčními centry PSI a PSII (C. W. Mullineaux, Tobin, & Jones, 1997). Jakým způsobem jsou fykobilisomy k membráně připojeny není zcela jasné (Conrad W. Mullineaux, 2008).

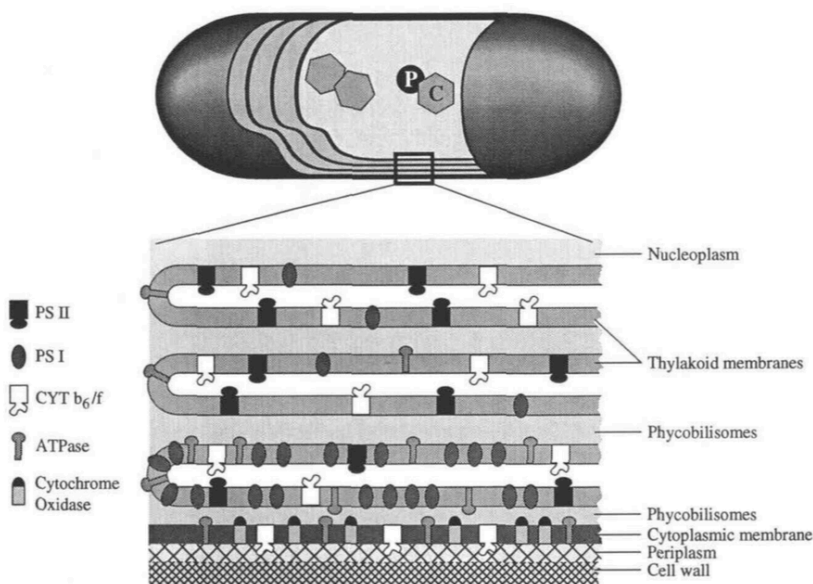
Kvůli fykobilisomům vyčnívajícím do stromatu nemohou tyto organismy tvořit grana, na rozdíl od zelených rostlin a některých zelených řas, které využívají jako světlosběrné antény membránové proteiny z rodiny Lhc.

4.3 Radiální heterogenita

Laterální heterogenita, tedy nehomogenní rozmístění membránových proteinů v tylakoidní membráně organismů s grany (viz kap. 3.2) má pravděpodobně svou obdobu i u agranálních organismů. Byla popsána radiální heterogenita rozložení ATP syntázy a PSI u sinice

Synechococcus kmene PCC7942 s koncentricky uspořádanými membránami (Sherman et al., 1994). U vzorků připravených procedurou freeze-substitution a pomocí imunochemického značení autoři lokalizovali naprostou většinu proteinů ATP syntázy a proteinů reakčního centra PSI do vnějšího tylakoidu a částečně i do cytoplasmatické membrány (obr. 21), zatímco proteiny fotosystému II (D1, D2, CP43 a CP47) byly pozorovány tak, jak bylo predikováno, tedy ve všech tylakoidech rovnoměrně.

Přestože autoři mluví o velmi významném objevu, který vysvětluje evoluční původ laterální heterogenity fotosyntetických proteinů u vyšších rostlin a zelených řas, je potřeba brát jejich výsledky s rezervou. Tento pokus byl stejnými autory zopakován na sinicích s jinak než koncentricky uspořádanými tylakoidy a byl neúspěšný a ani v pozdější literatuře se tyto informace příliš nevyskytují.



Obr. 21: Diagram ukazující rozložení PSI, ATP syntázy, Cyt b_6/f a PSII, znázorňující radiální heterogenitu (Sherman et al., 1994).

5 Funkce gran

Grana nejsou nezbytná pro život rostlin a rostliny, u kterých je zablokována tvorba gran, jsou poměrně dobře životaschopné. Grana ale pravděpodobně rostlinám poskytují výhody, které jim umožňují lépe reagovat a přizpůsobit se na měnící se podmínky okolního prostředí.

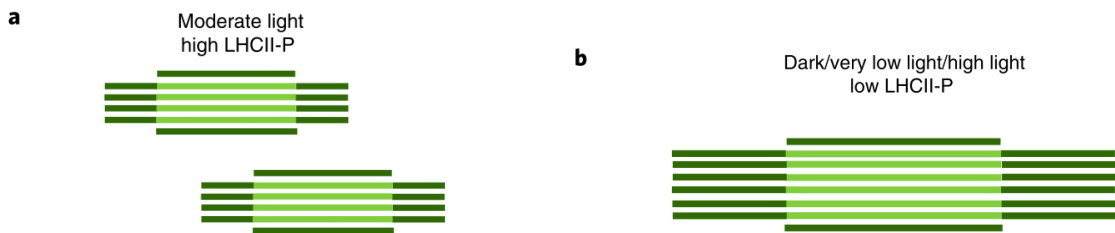
Některými z výhod, které formování gran pravděpodobně umožňuje, jsou (1) zefektivnění zachytávání světla nahromaděním velkého množství fotosystému II, které se ukazuje být velice významné při nízkých osvětleních (více v kapitole 3.4.2; Hertle et al., 2013), (2) optimalizace rozvádění energie do fotosystémů I a II přepínáním mezi state 1 a state 2 (více v kapitole 3.4.2.1; Chow et al., 2005), (3) oddělení cyklického a lineárního elektronového transportu oddělením plastochinonu v granech od plastochinonu ve stromatálních lamelách (více v kapitole 5.1; Wood et al., 2018), nebo (4) efektivnější oprava poškozeného proteinu D1, který je separován od zbytku reakčního centra v přitisklých částech gran, rozložen v okrajích gran, a nahrazen nově vytvořeným proteinem D1 ve stromatálních lamelách (více v kapitole 2.1.1.1; Puthiyaveetil et al., 2014). V granech dále dochází k nefotochemickému zhášení, které je zajišťováno LHCI a slouží k ochraně PSII před poškozením při nadměrném osvětlení. Je stále předmětem debat, jak důležité je formování gran pro průběh tohoto jevu (Horton, 2000).

O všech výhodách se stále debatuje a bylo by dobré zjistit, která je tou hlavní stojící za evolucí gran. Za některými z dalších, které dnes nejsou příliš přijímány, stojí například myšlenka, že grana díky laterální heterogenitě brání přeskokování excitovaného elektronu z „pomalého“ PSII na „rychlý“ PSI (tzv. „spillover“), což by komplikovalo hladký průběh elektronového transportu (Anderson, 1999), avšak někteří autoři tuto myšlenku později zpochybňují (Conrad W. Mullineaux, 2005). Níže je rozebrána jedna z neaktuálnějších hypotéz o významu gran.

5.1 Význam gran a jejich dynamiky pro cyklický přenos elektronů

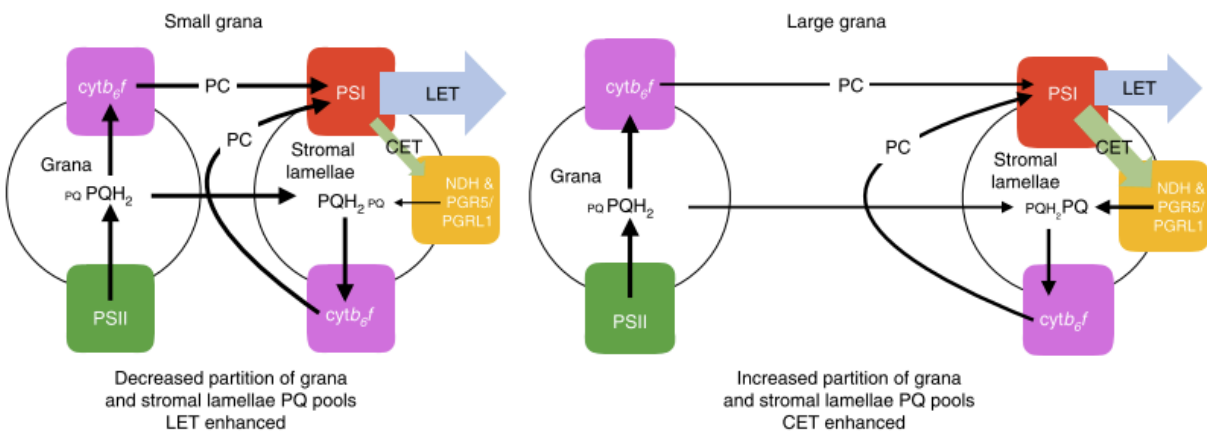
Po uvážení důležitosti cyklického přenosu elektronů pro ochranu fotosystémů před nadměrným světelným stresem aktivací nefotochemického zhášení je zajímavá myšlenka, že formace gran umožňuje oddělení více redukované populace PQ v granech od méně redukované populace ve stromatálních lamelách, čímž podporuje průběh cyklického transportu elektronů (Peng et al., 2011).

Pro intenzivní cyklický přenos elektronů je zapotřebí poměrně velké množství oxidovaných molekul plastochinonu, které mohou přijmout přepravovaný elektron během cyklického přenosu elektronů (Wood et al., 2018). Za tmy, nízké a velmi vysoké ozáření se v chloroplastu tvoří méně gran o větším průměru, čímž je sníženo množství kontaktních ploch mezi PQ vyskytujícími se v granech a PQ vyskytujícími se ve stromatálních tylakoidech (obr. 22).



Obr. 22: Schématické srovnání vzhledu gran při běžném osvětlení (a) se situací za tmy, nízkého a velmi vysokého osvětlení (b). Uspořádání při běžném osvětlení souvisí s fosforylací LHCII, při které jsou oslabeny interakce mezi LHCII a způsobí tak rozpad velkých gran na více malých (převzato z Wood et al., 2018).

Za těchto okolností pak PQ mezi grany a stromatálními tylakoidy difunduje poměrně pomalu, čímž je znemožněno fotosystému II redukovat veškerý PQ včetně PQ ve stromatálních lamelách. Tím je umožněn běh cyklického přenosu elektronů. Při běžné ozářenosti je kontakt mezi grany a stromatálními lamelami větší, což umožňuje intenzivnější běh lineárního přenosu elektronů (obr. 23; Wood et al., 2018).



Obr. 23: Schématické znázornění přepnutí mezi CEF a LEF při změně ozářenosti. Vlevo průměrná ozářenost, hodně PSII fosforylováno, což vede k tvorbě více menších gran, tedy více kontaktu mezi membránami gran a stromatálními lamelami, kdy je difúze PC a PQ mezi grany a stromatálními lamelami rychlá, běží především LEF. Vpravo: Tma, velmi nízká nebo velmi vysoká ozářenost vede k nízké fosforylovanosti PSII, vytváří se větší grana, kde je difúze PC a PQ mezi grany a stromatálními lamelami pomalá, což vede k více oxidovanému PQ ve stromatálních lamelách a intenzivnějšímu CEF (převzato z Wood et al., 2018).

6 Použitá literatura

- Albertsson, P. Å. (1982). Interaction between the lumenal sides of the thylakoid membrane. *FEBS Letters*, 149(2), 186–190. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)81098-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)81098-3)
- Albertsson, P. Å. (2001). A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends in Plant Science*, 6(8), 349–354. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02021-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02021-0)
- Anderson, J. M. (1999). Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(7), 625. <https://doi.org/10.1071/PP99070>
- Armbruster, U., Labs, M., Pribil, M., Viola, S., Xu, W., Scharfenberg, M., ... Leister, D. (2013). Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature. *The Plant Cell*, 25(7), 2661–2678. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113118>
- Austin, J. R., & Staehelin, L. A. (2011). Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography. *Plant Physiology*, 155(4), 1601–1611. <https://doi.org/10.1104/pp.110.170647>
- Baniulis, D., Yamashita, E., Zhang, H., Hasan, S. S., & Cramer, W. A. (2008). Structure-function of the cytochrome b6f complex. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6), 1349–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00444.x>
- Barber, J. (1982). Influence of Surface Charges on Thylakoid Structure and Function. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 261–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.001401>
- Barros, T., & Kühlbrandt, W. (2009). Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(6), 753–772. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.03.012>
- Bellaflora, S., Barneche, F., Peltler, G., & Rochaix, J. D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433(7028), 892–895. <https://doi.org/10.1038/nature03286>
- Ben-Shem, A., Frolow, F., & Nelson, N. (2003). Crystal structure of plant photosystem I. *Nature*, 426(December), 630–635. <https://doi.org/10.1038/Nature02200>
- Boekema, E. J., Hankamert, B., Baldt, D., Kruijff, J., Nieldt, J., Boonstra, A. F., ... Rognert, M. (1995). Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria (transmission electron microscopy/image analysis/subunit positioning). *Cell Biology*, 92(January), 175–179. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.175>
- Chow, W. S., Kim, E.-H., Horton, P., & Anderson, J. M. (2005). Grana stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences

that ensue.

- Chow, W. S., Kim, E., & Anderson, J. M. (2005). Grana stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue†, 1081–1090.
- Chow, W. S., Miller, C., & Anderson, J. M. (1991). Surface charges, the heterogeneous lateral distribution of the two photosystems, and thylakoid stacking. *BBA - Bioenergetics*, 1057(1), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80085-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80085-4)
- Chow, W. S., Qian, L., Goodchild, D. J., & Anderson, J. M. (1988). Photosynthetic Acclimation of *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don. *Functional Plant Biology*, 15(2), 107–122. JOUR. Retrieved from <https://doi.org/10.1071/PP9880107>
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., ... Leister, D. (2008). A Complex Containing PGRL1 and PGR5 Is Involved in the Switch between Linear and Cyclic Electron Flow in Arabidopsis. *Cell*, 132(2), 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.028>
- Daum, B., & Kühlbrandt, W. (2011). Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany*, (7), 2393–2402. <https://doi.org/10.1093/jxb/err034>
- De Las Rivas, J., Heredia, P., & Roman, A. (2007). Oxygen-evolving extrinsic proteins (PsbO,P,Q,R): Bioinformatic and functional analysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(6), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.01.018>
- Dekker, J. P., & Boekema, E. J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta*, 1706(1–2), 12–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.009>
- Finazzi, G., & Johnson, G. N. (2016). Cyclic electron flow: facts and hypotheses. *Photosynthesis Research*, 129(3), 227–230. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0306-2>
- Glazer, A. N. (1984). Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *BBA Reviews On Bioenergetics*, 768(1), 29–51. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(84\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0304-4173(84)90006-5)
- Herbstová, M., Tietz, S., Kinzel, C., Turkina, M. V., & Kirchhoff, H. (2012). Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214265109>
- Hertle, A. P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U., & Leister, D. (2013). PGRL1 Is the Elusive Ferredoxin-Plastoquinone Reductase in Photosynthetic Cyclic Electron Flow. *Molecular Cell*, 49(3), 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.030>
- Horton, P. (2000). Are grana necessary for regulation of light harvesting? *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(6), 645. <https://doi.org/10.1071/PP97167>
- Izawa, S., & Good, N. E. (1966). Effect of Salts and Electron Transport on the Conformation of Isolated Chloroplasts. II. Electron Microscopy. *Plant Physiology*, 41(3), 544–52. <https://doi.org/10.1104/PP.41.3.544>

- Jensen, P. E., Bassi, R., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Jansson, S., Leister, D., ... Scheller, H. V. (2007). Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(5), 335–352. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.03.004>
- Kirchhoff, H. (2013). Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9843-0>
- Kirchhoff, H., Haferkamp, S., Allen, J. F., Epstein, D. B. A., & Mullineaux, C. W. (2008). Protein Diffusion and Macromolecular Crowding in Thylakoid Membranes 1[W]. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115170>
- Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstová, M., Tsabari, O., Nevo, R., & Charuvi, D. (2011). Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104141109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1104141109>
- Kouřil, R., Dekker, J. P., & Boekema, E. J. (2012). Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(1), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.05.024>
- Kouřil, R., Nosek, L., Semchonok, D., Boekema, E. J., & Ilík, P. (2018). Organization of Plant Photosystem II and Photosystem I Supercomplexes. *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, 259–286. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_9
- Krumova, S. B., Dijkema, C., de Waard, P., Van As, H., Garab, G., & van Amerongen, H. (2008). Phase behavior of phosphatidylglycerol in spinach thylakoid membranes as revealed by 31P-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(4), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbammem.2008.01.004>
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J. L., & Cramer, W. A. (2003). Structure of the Cytochrome b6/f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science*, 302(5647), 1009–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1090165>
- Lasic, D. D. (1995). Applications of liposomes. *Handbook of Biological Physics*, 1(C), 491–519. [https://doi.org/10.1016/S1383-8121\(06\)80027-8](https://doi.org/10.1016/S1383-8121(06)80027-8)
- Leong, T. Y., & Anderson, J. M. (1986). Light-quality and irradiance adaptation of the composition and function of pea-thylakoid membranes. *BBA - Bioenergetics*, 850(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90008-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90008-3)
- Mccarty, R. E., Evron, Y., & Johnson, E. A. (2000). The Chloroplast ATP Synthase: Structure, 83–109.
- Mullineaux, C. W. (2005). Function and evolution of grana. *Trends in Plant Science*, 10(11), 521–525. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.001>

- Mullineaux, C. W. (2008). Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 95(2–3), 175–182. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9249-y>
- Mullineaux, C. W., Tobin, M. J., & Jones, G. R. (1997). Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature*, 390(6658), 421–424. <https://doi.org/10.1038/37157>
- Mustárdy, L., & Garab, G. (2003). Granum revisited. A three-dimensional model - Where things fall into place. *Trends in Plant Science*, 8(3), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00015-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00015-3)
- Nixon, P. J., Barker, M., Boehm, M., De Vries, R., & Komenda, J. (2005). FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 357–363. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri021>
- Nixon, P. J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M., & Komenda, J. (2010). Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of Botany*, 106(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq059>
- Peng, L., Yamamoto, H., & Shikanai, T. (2011). Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(8), 945–953. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.015>
- Pesaresi, P., Pribil, M., Wunder, T., & Leister, D. (2011). Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: The roles of STN7, STN8 and TAP38. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(8), 887–896. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.08.002>
- Pribil, M., Labs, M., & Leister, D. (2014). Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru090>
- Puthiyaveetil, S., Tsabari, O., Lowry, T., Lenhart, S., Lewis, R. R., Reich, Z., & Kirchhoff, H. (2014). Compartmentalization of the protein repair machinery in photosynthetic membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(44), 15839–15844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413739111>
- Rast, A., Heinz, S., & Nickelsen, J. (2015). Biogenesis of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(9), 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.007>
- Ruban, A. V., & Johnson, M. P. (2015). Visualizing the dynamic structure of the plant photosynthetic membrane. *Nature Plants*, 1(November), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.161>
- Schneck, E., Sedlmeier, F., & Netz, R. R. (2012). Hydration repulsion between biomembranes results from an interplay of dehydration and depolarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), 14405–14409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205811109>
- Schneider, D., Volkmer, T., & Rögner, M. (2007). PetG and PetN, but not PetL, are essential subunits of the cytochrome b6f complex from *Synechocystis* PCC 6803. *Research in Microbiology*, 158(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.10.002>
- Schönknecht, G., Hedrich, R., Junge, W., & Raschke, K. (1988). A voltage-dependent chloride channel in

- the photosynthetic membrane of a higher plant. *Nature*, 336, 589. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/336589a0>
- Sharkey, T. D., Bock, R., Planck, M., & Plant, M. (2012). *Advances in Photosynthesis and Respiration 34: Photosynthesis - Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1579-0>
- Shen, J.-R. (2015). The Structure of Photosystem II and the Mechanism of Water Oxidation in Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 23–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120129>
- Sherman, D. M., Troyan, T. A., & Sherman, L. A. (1994). Localization of Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Radial Asymmetry in the Photosynthetic Complexes). *Plant Physiology*, 106(1), 251–262. <https://doi.org/10.1104/pp.106.1.251>
- Shimoni, E. (2005). Three-Dimensional Organization of Higher-Plant Chloroplast Thylakoid Membranes Revealed by Electron Tomography. *The Plant Cell Online*, 17(9), 2580–2586. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035030>
- Stanier, R. Y. (1977). THE POSITION OF CYANOBACTERIA IN THE WORLD OF, 42.
- Strand, D. D., Fisher, N., & Kramer, D. M. (2017). The higher plant plastid NAD(P)H dehydrogenase-like complex (NDH) is a high efficiency proton pump that increases ATP production by cyclic electron flow. *Journal of Biological Chemistry*, 292(28), 11850–11860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770792>
- Su, Ma, X. W. (2017). Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex. *Biophysical Reviews*, 820(August), 815–820. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0357-4>
- Suorsa, M., Rantala, M., Danielsson, R., Järvi, S., Paakkarinen, V., Schröder, W. P., ... Aro, E. M. (2014). Dark-adapted spinach thylakoid protein heterogeneity offers insights into the photosystem II repair cycle. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(9), 1463–1471. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.014>
- Tikhonov, A. N. (2014). The cytochrome b6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, 163–183. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.011>
- Van Den Hoek, C., Man, D. G., Jahns H. M., (1995), *Algae: An Introduction to Phycology*, Cambridge University Press
- Van Eerden, F. J., De Jong, D. H., De Vries, A. H., Wassenaar, T. A., & Marrink, S. J. (2015). Characterization of thylakoid lipid membranes from cyanobacteria and higher plants by molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(6), 1319–1330.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.025>

Wood, W. H. J., MacGregor-Chatwin, C., Barnett, S. F. H., 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), 116–127. JOUR.

<https://doi.org/10.1038/s41477-017-0092-7>

Wunder, T., Xu, W., Liu, Q., Wanner, G., Leister, D., & Pribil, M. (2013). The major thylakoid protein kinases STN7 and STN8 revisited: effects of altered STN8 levels and regulatory specificities of the STN kinases. *Frontiers in Plant Science*, 4(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00417>

Yi, X., Hargett, S. R., Frankel, L. K., & Bricker, T. M. (2009). The PsbP protein, but not the PsbQ protein, is required for normal thylakoid architecture in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 583(12), 2142–2147. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.048>

Yoshioka-Nishimura, M. (2016). Close relations between the PSII repair cycle and thylakoid membrane dynamics. *Plant and Cell Physiology*, 0(March), pcw050. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw050>