

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

## **Studium samoorganizace bakteriochlorofylových agregátů**

Lucie Holubková

Školitel: doc. RNDr. František Vácha Ph.D.

České Budějovice 2008

Holubková, L. 2008: Studium samoorganizace bakteriochlorofylových agregátů [Study of self-assembly of bacteriochlorophyll aggregates. Bc. thesis, in Czech] - 28 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation: This bachelor thesis is focused on a study of self-assembly of bacteriochlorophyll *c* isolated from green sulphur bacteria *Chlorobium tepidum*. These organisms contain special system of light harvesting antennae called chlorosomes. When compare to all other light harvesting complexes chlorosomes are build up from self-assembling aggregates of bacteriochlorophyll *c*. The aim of this work was to study the influence of the length of the side esterifying alcohol on the self-assembly of these pigments. We have prepared methyl-bacteriochlorophyllide *c*, which is chemically modified bacteriochlorophyll *c*, where a farnesyl side chain is exchanged for a methyl. The exchange of the methyl for farnesyl led to a loss of the ability of bacteriochlorophyll *c* to constitute self-assembled dimers in water environment. Our results support the idea, that the dimers of bacteriochlorophyll *c* are build by a hydrophobic interaction of the side esterifying alcohols.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 12. května 2008

Lucie Holubková

## **Poděkování**

Děkuji mému školiteli doc. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při psaní této bakalářské práce, děkuji Mgr. Anitě Župčanové za rady a pomoc při měření, děkuji Františku Matouškovi za pomoc při pěstování bakterií a v neposlední řadě patří velký dík mé rodině, která mi je nejen při studiu velkou oporou.

# OBSAH

Seznam zkratk	5
1. Úvod	6
1.1. Fotosyntéza	6
1.2. Zelené sírné bakterie	7
1.3. Chlorosomy	8
1.4. Fotosyntetické pigmenty a jejich agregáty	10
2. Cíle práce	13
3. Materiál a metody	13
3.1. Pěstování bakterií	13
3.2. Extrakce pigmentů	15
3.3. Izolace bakteriochlorofylu c	15
3.4. Chemické modifikace bakteriochlorofylu c	16
3.5. Měření absorpčních spekter	16
4. Výsledky	17
4.1. Chemická modifikace bakteriochlorofylu	17
4.2. Vliv délky postranního řetězce na chování bakteriochlorofylu ve vodném prostředí	21
5. Diskuse	23
6. Závěry	25
Literatura	26

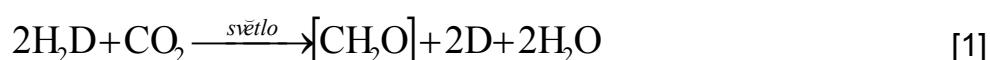
# Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
Bchl	bakteriochlorofyl
FMO komplex	Fenna – Matthews – Olson komplex
H-BChlide	bakteriochlorofylid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Chl	chlorofyl
MetBchlid	methyl-bakteriochlorofylid
MetOH	metanol
MGDG	monogalaktosyl diglycerid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
PSI	fotosystém 1
PSII	fotosystém 2

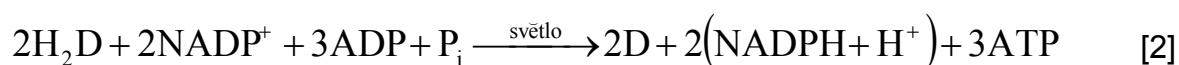
# 1. Úvod

## 1.1. Fotosyntéza

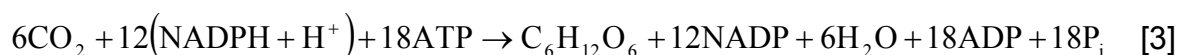
Fotosyntéza patří mezi jeden z nejdůležitějších dějů probíhajících na Zemi. Je hlavním zdrojem energie pro naprostou většinu organismů. Můžeme ji chápat jako proces mnoha různých reakcí, kde zdrojem energie je sluneční záření a produktem cukry. Obecně lze zapsat proces fotosyntézy následovně:



Tuto rovnici nazýváme obecnou rovnicí fotosyntézy, kde  $\text{H}_2\text{D}$  představuje protonů a elektronů (u siřných bakterií, u kterých probíhá neoxygenní fotosyntéza, je donorem vodíku siřvodík  $\text{H}_2\text{S}$ , v případě oxygenní fotosyntézy je to voda),  $[\text{CH}_2\text{O}]$  je chemický vzorec stavební jednotky cukrů, D značí oxidovanou formu donoru a  $h\nu$  je excitační energie elektromagnetického záření. U zelených rostlin je potřeba přibližně 500 kJ energie absorbovaného slunečního záření na jeden mol zredukovaného  $\text{CO}_2$ . Celý proces fotosyntézy sestává ze dvou částí: z fáze světelné a fáze temnotní. Světelná (fotochemická) fáze fotosyntézy probíhá na thylakoidních membránách, energie fotonů je ukládána do molekul ATP a redukovaného NADPH a lze ji zapsat takto:



Temnotní (biochemická) fáze fotosyntézy se odehrává v cytosolu a ke svému průběhu nepotřebuje energii záření. Zde se ATP a NADPH vzniklé ve světelné fázi fotosyntézy využívá k syntéze cukrů. Tuto část fotosyntézy zaznamenáváme následovně:

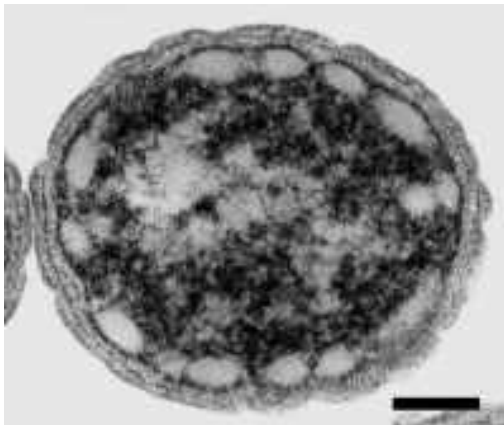


## 1.2. Zelené sirné bakterie

Zelené sirné bakterie byly objeveny přibližně před jedním stoletím. Tyto organismy patří mezi fotoautotrofní a striktně anaerobní fotosyntetické bakterie, u kterých probíhá neoxygenní fotosyntéza. Jsou schopné přežívat v prostředích s velmi nízkou intenzitou světla. K výskytu v těchto podmínkách jim slouží chlorosomy, což jsou světlosběrné antény, jež jsou schopné zachytávat dopadající záření se značnou účinností.

Bakterie, u kterých probíhá neoxygenní fotosyntéza, se liší od těch s oxygenní fotosyntézou tím, že každý druh má pouze jeden typ reakčního centra. U některých fotosyntetizujících bakterií je reakční centrum podobné fotosystému I (PSI), u jiných fotosystému II (PSII).

Zelené sirné bakterie mají Fe-S reakčního centra typu PSI. Fotosyntetické reakční centrum těchto bakterií obsahuje dvě [4Fe-4S] skupiny nazvané  $F_A$  a  $F_B$ , které slouží jako příjemci elektronů. Reakční centrum *Chlorobia tepida* obsahuje také interpolypeptidovou [4Fe-4S] skupinu nazvanou  $F_x$ .



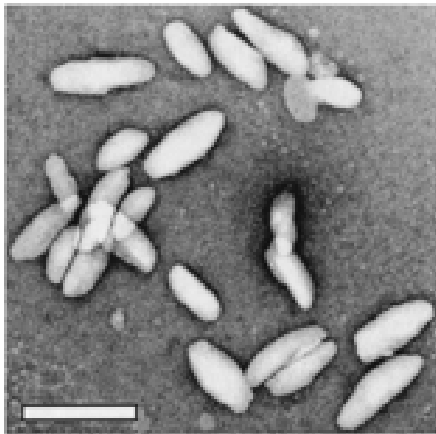
Obrázek 1: *Chlorobium tepidum* – mikrosnímek pořízený transmisičním elektronovým mikroskopem, obdélník v dolní části snímku představuje 100 nm [Frigaard et al 2002]

### 1.3. Chlorosomy

Chlorosomy jsou unikátní světloběrné komplexy, které nacházíme u zelených fotosyntetických bakterií. Jsou pozoruhodné tím, že jsou tvořeny na rozdíl od všech ostatních pigment-proteinových světloběrných fotosyntetických antén agregáty bakteriochlorofylu. Tyto světloběrné antény patří do skupiny vněmembránových antén, nacházejí se tedy mimo fotosyntetizující thylakoidní membránu, ke které jsou pouze přichyceny.

Chlorosomy jsou elipsovité útvary vyskytující se na vnitřní straně cytoplasmatické membrány a jejich velikost se může měnit v závislosti na růstových podmínkách. U zelených sírných bakterií dorůstají do rozměrů přibližně 1500 x 500 x 300 Å (150 x 50 x 30 nm).

Tyto organely sestávají převážně z bakteriochlorofylu (Bchl) *c*, *d*, *e* (v závislosti na druhu bakterií). Dále obsahují také Bchl *a*, karotenoidy, lipidy a částečně i proteiny. Hlavními polárními lipidy v chlorosomech jsou glykolipidy a fosfolipidy. Navíc se v chlorosomech vyskytuje značné množství isoprenoidních chinonů. Chlorosom *Chl. tepida* se skládá přibližně z 200 000 molekul Bchl-u *c*, 2 500 molekul



Obrázek 2: Mikrosnímek pořízený transmisním elektronovým mikroskopem – chlorosomy izolované z *Chlorobia tepida*. Světlý obdélník v levé dolní části fotografie představuje 200 nm. [Frigaard et al. 2004]

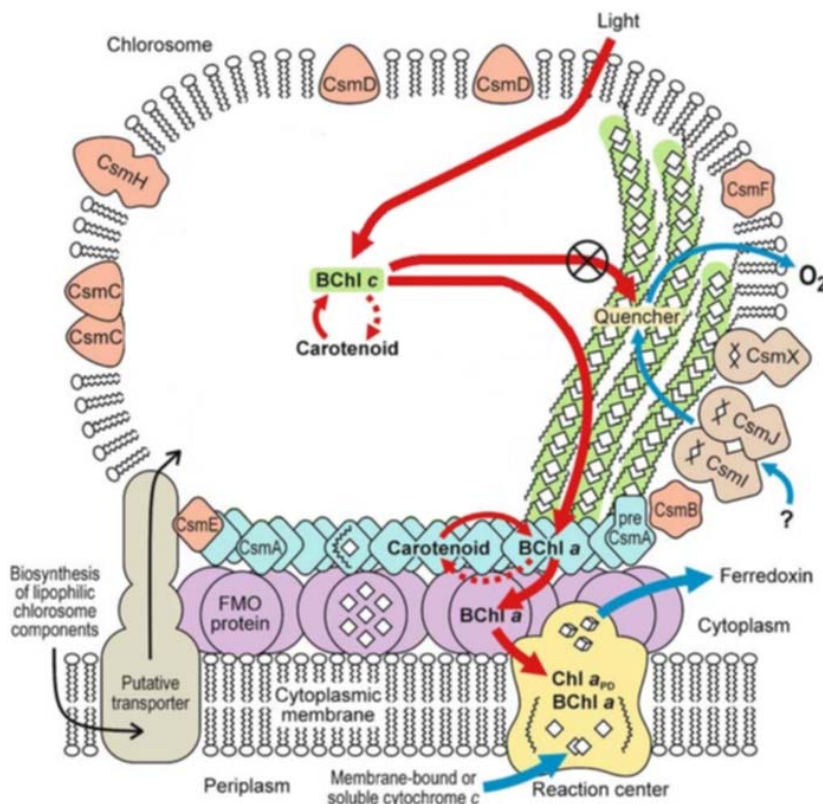
Bchl-u *a*, 20 000 molekul karotenoidů, 18 000 molekul izoprenoidních chinonů, 5000 proteinů a 20 000 molekul lipidů (Frigaard and Bryant 2006).

V jedné buňce je okolo 220 chlorosomů. Bchl agregáty vytvářejí v chlorosomech útvary tvarově podobné lamelám, kterých je v jednom chlorosomu několik. Obal



chlorosomů je tvořen lipidovou schránkou, která je tvořena vrstvou monogalactosyl diglyceridu (MGDG).

Mezi chlorosomem a cytoplasmatickou membránou, na kterou chlorosom dosedá, je tzv. základní proteinová destička, která obsahuje Bchl *a*, na který se přenáší všechna energie zachycená Bchl-em *c* (*d* nebo *e*). Excitační energie z chlorosomu je přenášena přes Fenna-Matthews-Olson (FMO) proteinový komplex do reakčního centra v cytoplasmatické membráně. FMO komplex obsahující Bchl *a* a spojující chlorosom s membránou je ve vodě rozpustný a byl poprvé popsán Johnem Olsonem, na další charakteristice tohoto proteinu se podíleli Roger Fenna a Brian Matthewy, proto tedy FMO protein. Tento protein je také někdy nazýván jako Bchl *a* protein (pro obsah Bchl-u *a*) (Blankenship and Matsuura 2003).

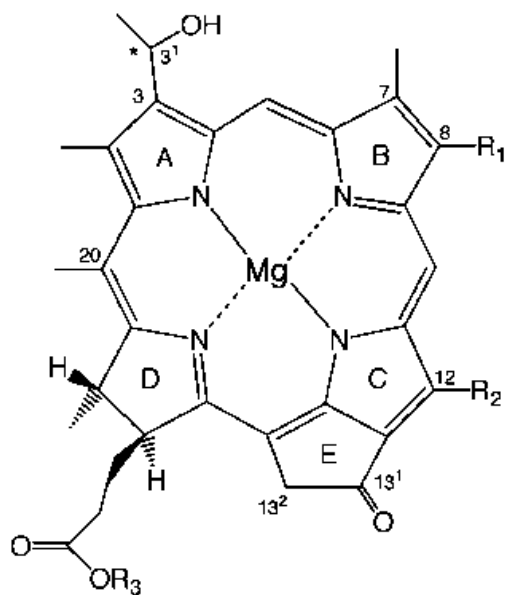


Obrázek 3: Model chlorosomu a fotosyntetické membrány v *Chlorobium tepidu*. Bchl agregáty lamelárního tvaru jsou vyobrazeny v pravé části vnitřku chlorosomu. Mezi válečky a cytoplasmatickou membránou je základní destička tvořená Bchl-em *a*. Červené šipky představují přenos excitační energie, modré šipky znázorňují přenos elektronů. [Frigaard et al. 2006]

## 1.4. Fotosyntetické pigmenty a jejich agregáty

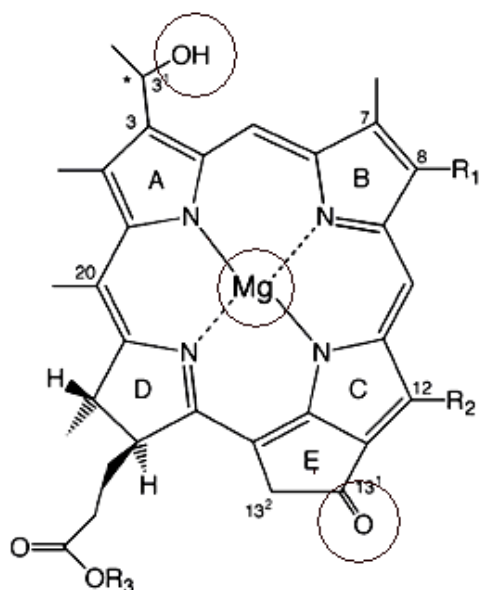
Mezi pigmenty obsažené v chlorosomech zelených sírných bakterií patří Bchl *c*, karotenoidy, chinony a Bchl *a*.

**Bchl *c*** je hlavním pigmentem obsaženým v chlorosomech zelených sírných bakterií. Základem Bchl-u *c* je na rozdíl od ostatních bakteriochlorofylů porfirový skelet chlorofylového a nikoliv bakteriochlorofylového typu, tzn. stejně jako u chlorofylu je zde dvojná vazba mezi uhlíkem C7 a C8.



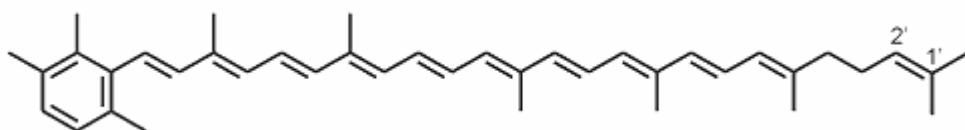
Obrázek 4: Bakteriochlorofyl *c*.  $R_1$ =ethyl, *n*-propyl, iso-butyl nebo neo-pentyl;  $R_2$ =methyl nebo ethyl,  $R_3$ =farnesyl

Bchl *c* má tu výjimečnou schopnost, že dokáže vytvářet agregáty. To je dáno přítomností OH skupiny na uhlíku C<sub>3</sub>. Společně s keto-skupinou na uhlíku C<sub>13</sub> a atomem hořčíku uvnitř tetrapyrolového kruhu (obrázek 5) jsou to tři vazebná místa, která umožňují vznik prostorových agregátů.

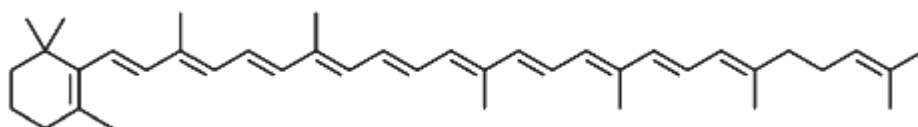


Obrázek 5: Bacteriochlorofyl c; vazebná místa umožňující vznik prostorových agregátů jsou v kroužku

**Karotenoidy** jsou terpenoidy (isoprenoidy) patřící do skupiny tetraterpenů ( $C_{40}$ ). Jsou nepolární, nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v tucích a nepolárních rozpouštědlech. Jejich barevnost způsobuje systém konjugovaných vazeb. U zelených sírných bakterií jsou přítomny jak v chlorosomech, tak v cytoplasmatické membráně. V *Chlorobium tepidu* jsou karotenoidy monocyklické a hlavními karotenoidy jsou chlorobakten,  $\gamma$ -karoten a dále jejich 1', 2'-dihydro-deriváty (1', 2' dihydrochlorobakten a 1', 2'-dihydro - $\gamma$ -karoten )

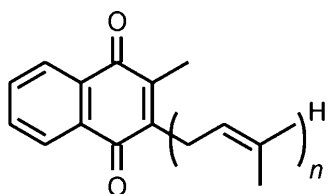


Obrázek 6: Chlorobakten

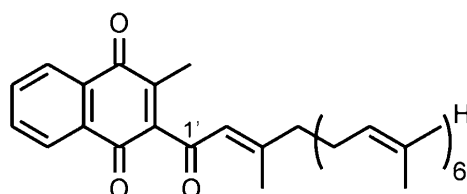


Obrázek 7:  $\gamma$ -karoten

Dalšími pigmenty v chlorosomech zelených sírných bakterií jsou **isoprenoidní chinony**. Jsou to velmi hydrofobní pigmenty a jsou spíše umístěny ve vnitřku chlorosomů než v jejich obalu. Hlavními chinony zelených sírných bakterií jsou chlorobiumchinon (1'-oxomenachinon – 7) a menachinon – 7. Obvykle v malém množství je přítomen i 1'-hydroxymenachinon – 7, který je pravděpodobně prostředníkem v biosyntéze chlorobiumchinonu z menachinonu.

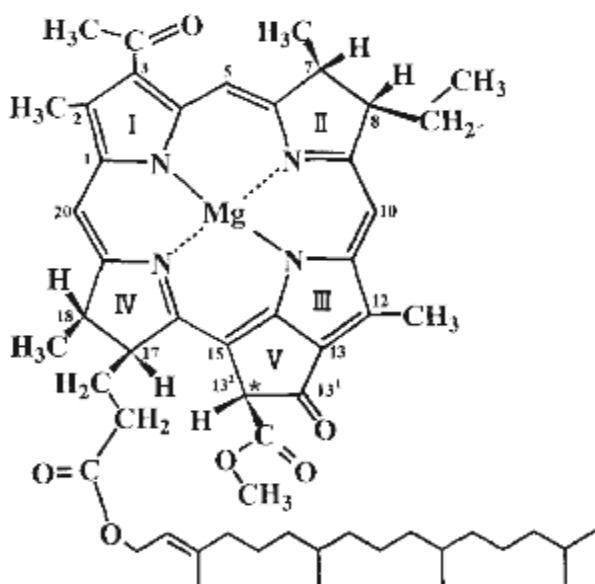


Obrázek 8: Menachinon



Obrázek 9: Chlorobiumchinon

**Bchl-u a** se v chlorosomech vyskytuje pouze malé množství. Je obsažen v základní destičce fotosyntetického aparátu v *Chlorobiu tepidu*. Na rozdíl od Bchl-u c je vázán na protein CsmA.



Obrázek 10: Bakteriochlorofyl a

## 2. Cíle práce

Izolace a separace jednotlivých pigmentů ze zelené sirmé bakterie *Chlorobium tepidum*.

Optimalizace metody přípravy chemicky modifikovaných bakteriochlorofylů c.

Příprava methyl-bakteriochlorofylidu c pomocí transesterifikace v zásaditém prostředí.

Studium vlivu délky vedlejšího esterifikujícího alkoholu na tvorbu dimerů/agregátů ve vodném prostředí.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Pěstování bakterií

Bakterie byly pěstovány v médiu podle Pfenniga (Wahlund et al. 1991). Pro napěstování jedné várky bakterií bylo připraveno 2,5 l média. V destilované vodě byly postupně rozpuštěny jednotlivé složky podle tabulky 1.

Tabulka 1

sloučenina	hmotnost [g]
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,25
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	1,25
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0
$\text{NaCl}$	1,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,125
EDTA	0,03125
$\text{NaHCO}_3$	5

Poté bylo přidáno 2,5 ml roztoku stopových prvků (tabulka 2; uvedené hmotnosti jednotlivých složek roztoku stopových prvků platí pro celkový objem roztoku 2,5 l) a 50 µl 0,2 % (w/v) roztoku vitamínu B<sub>12</sub>. pH bylo upraveno na hodnotu 6,7 – 6,9. Celý objem Pfennigova media byl rozdělen po 800 ml do 3 jednolitrových kultivačních láhví. Každá láhev se nechala 20 minut probublát dusíkem. Po 20 minutách probublávání se do každé láhve přidalo 0,48 g Na<sub>2</sub>S x 9H<sub>2</sub>O a láhev se okamžitě uzavřela. Láhve s médiem se autoklávovaly při teplotě 100 °C po dobu 20 minut, po vyndání z autoklávu se nechaly zchladit přes noc do druhého dne. Jelikož se během autoklávování změnilo pH (přibližně na 7,1), bylo nezbytné ho znovu upravit zpět na hodnotu 6,7 – 6,9 (úpravou pH se také odstranil zákal vzniklý po sterilizaci). Na každých 800 ml media se přidalo přibližně 3,4 ml 10 % HCl. Při tomto kroku bylo nutno použít sterilní stříkačku a jehlu, láhve držet dnem vzhůru a dávat pozor, aby se při přidávání HCl do žádné láhve nedostala vzduchová bublina.

**Tabulka 2**

sloučenina	hmotnost [g]
EDTA	16,75
FeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O	5
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,475
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,475
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,375
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0,250
VSO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,075
NiCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,0625
CuCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,0425
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,015
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,008
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,005

Bakterie se inokulovaly následovně. Z jedné láhve s čerstvým médiem bylo odebráno 20 ml (láhev dnem vzhůru) a tento objem byl přidán do láhve se zásobní kulturou bakterií *Chlorobium tepidum*. Z této láhve (se zásobní kulturou) bylo v tom

samém kroku odebráno opět 20 ml (tentokrát s bakteriální kulturou) a tento objem se přidal do původní láhve s čerstvým médiem Tento postup byl proveden pro každou láhev.

Buňky zelené sirmé bakterie *Chlorobium tepidum* byly kultivovány v 800 ml upraveného Pfennigova média po dobu 3 dnů při teplotě vody 48 °C ve třech litrových láhvích ve vodní lázni při konstantním osvětlení pod 60 W halogenovou žárovkou. 2. den kultivace bylo zkontrolováno pH (popř. se upravilo). Po 3 dnech byly lahve vyndány z lázně, vychlazeny a uskladněny při teplotě 4 °C v chladicí místnosti.

### 3.2. Extrakce pigmentů

Extrakce pigmentů probíhala v šeru, použité nádoby byly zakryté alobalem. Celé buňky byly stáčeny na centrifuze rychlostí 9000 g po dobu 2 minut. Po vylití supernatantu se pelet uchoval ve zkumavce ve tmě. Přibližně 1 ml směsi aceton:metanol (7:2) byl přidán k peletu a pomocí pasteurovy pipety byl pelet homogenizován. Poté se vzorek opět centrifugoval při 9000 g po dobu 2 minut. Supernatant se uchoval v temnu a pelet byl nově resuspendován ve směsi aceton:metanol a opět centrifugován. Proces extrakce pigmentů z jednoho peletu proběhl celkem 3x za sebou. Supernatanty ze všech extrakcí se spojily.

Následně byla k supernatantu přidána směs petrol-ether:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1) v poměru 1 díl supernatantu se 2 díly směsi. Vzniklá směs organických rozpouštědel se nalila do dělené nálevky. Ke směsi v nálevce byl přidán dvojnásobek 1M NaCl, po ustálení roztoku se spodní fáze vypustila a opět se přidaly 2 díly 1M NaCl. Spodní fáze byla vypuštěna a cyklus přidání 1M NaCl a vypuštění spodní fáze byl opakován 3x.

Horní fáze z nálevky obsahující pigmenty rozpuštěné v petrol-etheru a dichlormethanu se nalila do kádinky a pigmenty byly vysušeny proudem dusíku.

### 3.3. Izolace Bchl-u

Vysušená směs extrahovaných pigmentů byla rozpuštěna v metanolu a přefiltrována přes 0,22 µm filtr. Bchl c byl izolován pomocí HPLC (high performance liquid chromatography) na semipreparativní SGX C18 koloně (7 µm, 8 x 250 mm; Tessek,

Česká republika) pomocí zařízení sestávajícího z Pump Controller 600, Delta 600 nastříkujícího systému se 100  $\mu$ l smyčkou a PDA (Photodiode Array detektor) 996 detektoru (vše Watres USA). Během separace se kolona promývala prvních 20 min roztokem 100 % metanolu a poté roztokem směsi metanol-hexan (4:1) do vytěsnění všech pigmentů (přibližně dalších 40 min). Před každým nástřikem se kolona vždy ekvilibrovala roztokem 100 % metanolu po dobu alespoň 10 minut. Průtoková rychlost byla 2 ml/min. Bchl c byl sbírán do zkumavky a vysušen proudem dusíku.

### **3.4. Chemické modifikace bakteriochlorofylu c**

Čistý vysušený bakteriochlorofyl c byl jednou opatrně vymyt hexanem, vysušen a následně rozpuštěn v dichlormetanu. Bchl c v dichlormetanu byl rozdělen do 10 zkumavek a poté vysušen dusíkem.

Proces transesterifikace probíhal v zásaditém prostředí v přítomnosti KOH. Byly připraveny reakční směsi o koncentraci 2,5 %, 1 %, 0,5 % a 0,25 % KOH v metanolu (w/v).

Ve 150  $\mu$ l reakční směsi obsahující různou koncentraci KOH bylo rozpuštěno přibližně 60 nmol Bchl-u c. Tato směs byla vložena do vodní lázně o teplotě 30 °C na dobu 30 min.

Po inkubaci byl vzorek ihned rozdělen pomocí HPLC za stejných podmínek jako při přípravě Bchl-u c. Met-Bchlid byl sbírán do zkumavky a vysušen proudem dusíku.

### **3.5. Měření absorpčních spekter**

Absorpční spektra byla měřena na Unicam UV – 300 spektrofotometru (Cambridge, UK) ve skleněných kyvetách s optickou dráhou 1 cm. Nejdříve u nich bylo provedeno měření v metanolu a poté následovala měření v čase – po 1 minutě, po 10 min, po 30 min a po 24 hodinách v pufru.

Vysušený bakteriochlorofyl c nebo methylbakteriochlorofylid c byl rozpuštěný v metanolu. 10  $\mu$ l směsi metanol-BChl c nebo metanol-MetBchlid c byl smíchán se 3 ml pufru (50 mM Tris-HCl).

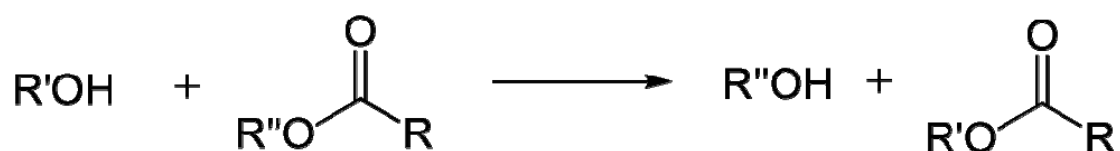


## 4. Výsledky

### 4.1. Chemická modifikace bakteriochlorofylu

Hlavním cílem práce bylo zjistit, jaký vliv má délka a charakter esterifikujících alkoholů na tvorbu dimerů Bchl-u c ve vodném prostředí. Pro chemickou modifikaci Bchl-u c jsme zvolili metodu transesterifikace, která může být provedena jak v kyselém, tak v zásaditém prostředí (obrázek 11). My jsme z důvodu ochrany Bchl-u c zvolili zásadité prostředí, v kyselém prostředí by totiž došlo k feofytinizaci (nastalo by uvolnění hořčíku z tetrapyrolového kruhu).

Transesterifikace je reakce alkoholu a esteru za vzniku jiného alkoholu a jiného esteru. Tyto reakce jsou často katalyzovány přidáním kyseliny nebo báze.



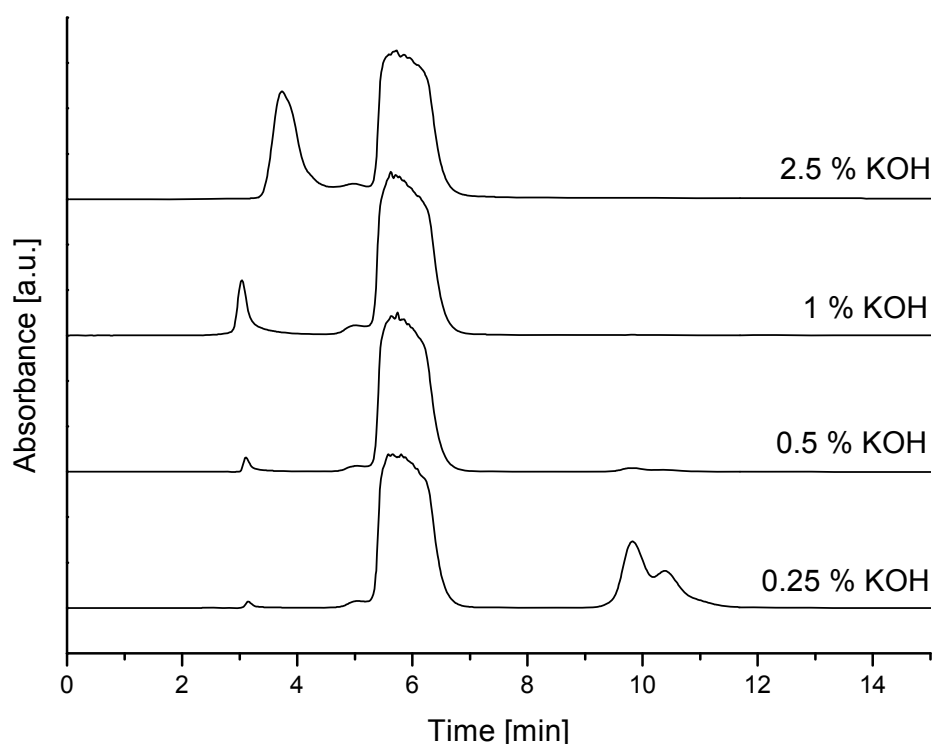
Obrázek 11: Reakce transesterifikace

Kyseliny mohou urychlovat reakci dodáním protonu do karbonylové skupiny, zatímco báze reakci urychlují odstraněním protonu z alkoholu. (podle internetového zdroje - <http://en.wikipedia.org/wiki/Transesterification>)

Výsledkem naší reakce byla výměna vedlejšího farnesylového řetězce Bchl-u c za methyl a vznik methyl-bakteriochlorofylidu (Met-Bchlid-u c). Provedli jsme optimalizaci metody pro 4 různé koncentrace KOH. Výsledné chromatogramy reakční směsi po dokončení reakce jsou zobrazeny na obrázcích 12a a 12b. Na těchto obrázcích lze vidět 4 chromatogramy při různých koncentracích KOH – 0,25 %, 0,5 %, 1 % a 2,5 %. Z důvodu přípravy většího množství MetBchlid-u c jsme na kolonu nanášeli větší množství reakční směsi. Na obrázku 12a jsou znázorněny chromatogramy reakční směsi detekované při vlnové délce 430 nm. Hlavní peak v čase přibližně 6 min představuje MetBchlid c. Chromatogram při nejnižší koncentraci, tj. při koncentraci 0,25 % KOH obsahuje ještě Bchl c (retenční čas kolem

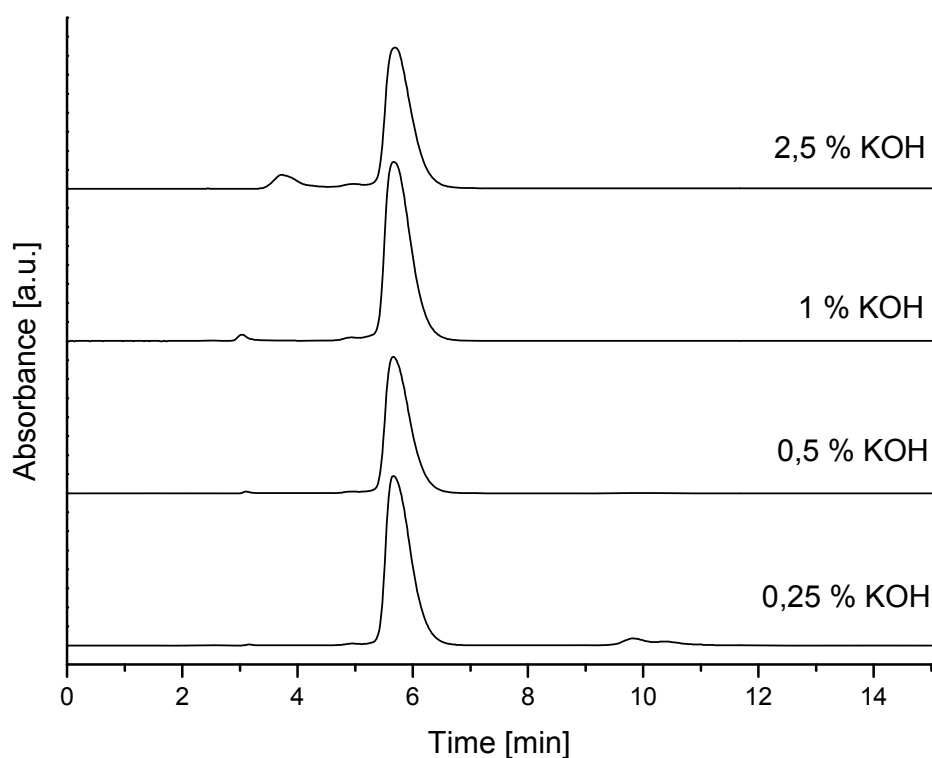
10. minuty), se stoupající koncentrací KOH se množství Bchl-u c ve směsi postupně snižuje a narůstá množství H-Bchlid-u c s retenčním časem kolem 3. minuty.

Z obrázku je patrné, že došlo k nanesení nadměrného množství vzorku na kolonu (z důvodu zvýšení výtěžku izolace), a proto je peak MetBchlid-u saturován. V tomto případě jsou však dobře vidět zbytky Bchl-u c okolo 10. minuty a také H-Bchlid ve 3. minutě.



Obrázek 12a: Chromatogramy reakční směsi Bchl-u c v metanolu s různou koncentrací KOH. Vlnová délka detekce je 430 nm.

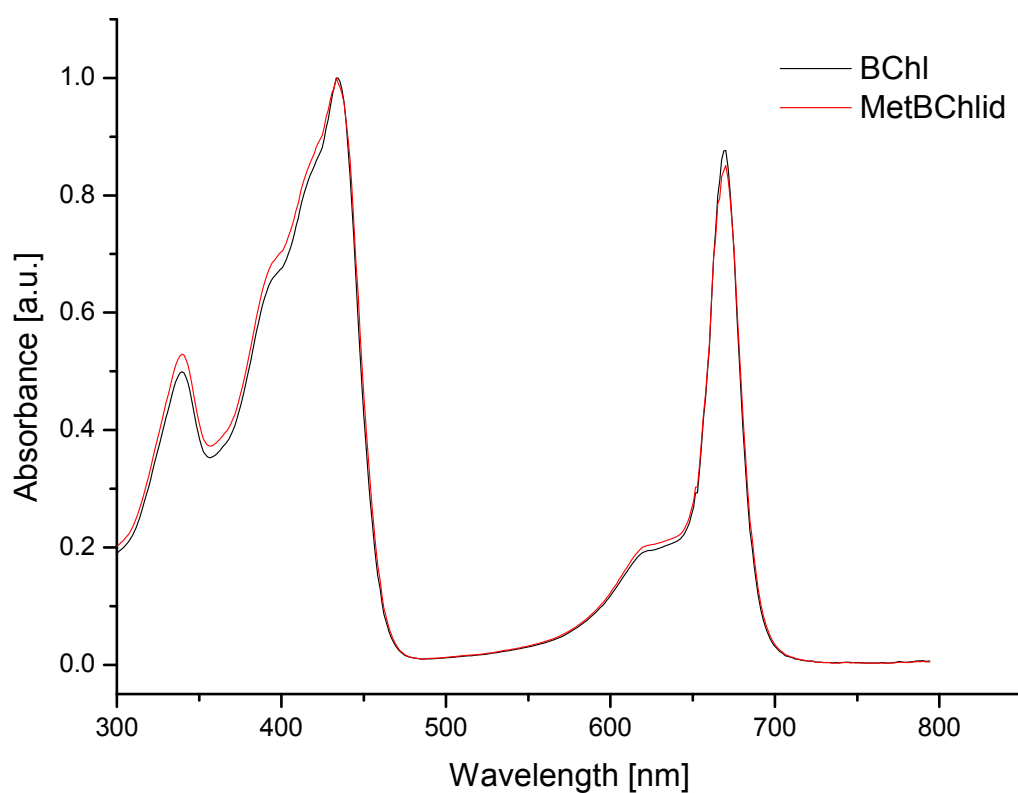
Abychom zjistili, jestli nedochází ke změnám v retenčních časech MetBchlid-u c, provedli jsme detekci chromatogramu při 465 nm. Výsledek je znázorněn na obrázku 12b.



Obrázek 12b: Chromatogramy reakční směsi Bchl-u c a metanolu s různou koncentrací KOH. Vlnová délka detekce je 465 nm.

Jako neoptimálnější pro přípravu MetBchlid-u c se jeví koncentrace KOH 0,5 %, při které již v reakční směsi není téměř žádný Bchl c, ale ještě nedochází ke vzniku mnoho H-Bchlid-u c detekovaného ve 3. minutě.

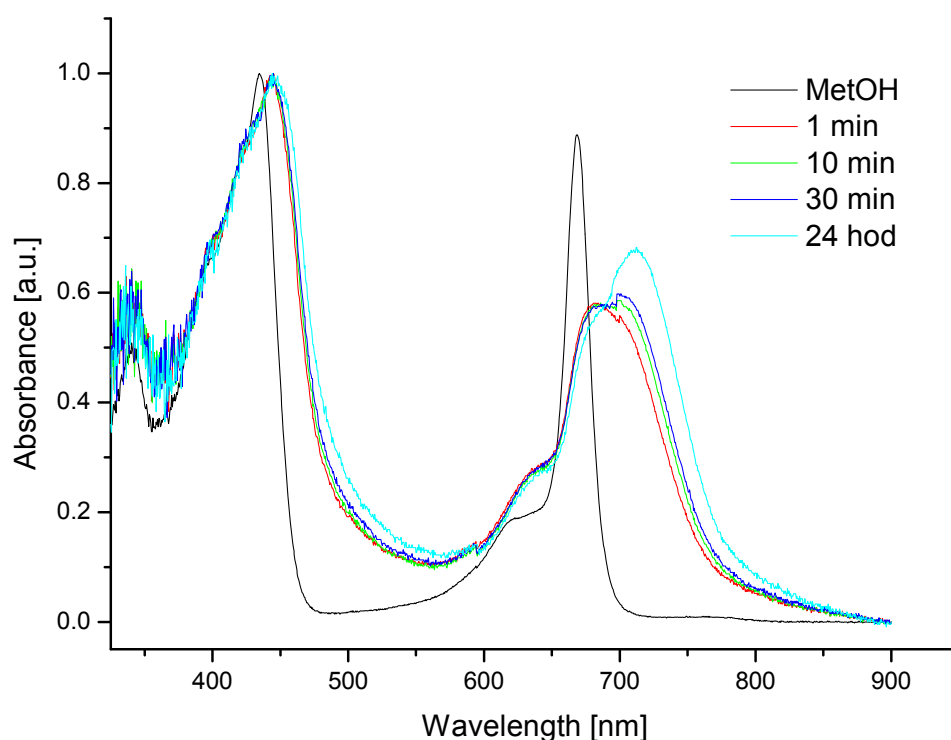
Abychom prokázali, že při transesterifikaci dochází pouze k výměně esterifikujícího alkoholu, změřili jsme absorpční spektra výchozího Bchl-u c a produktu MetBchlid-u c. Na obrázku 13 je porovnání jejich absorpčních spekter. Jak je z obrázku patrné, absorpční spektra Bchl-u a MetBchlid-u se od sebe neliší. Tím, že byl při modifikaci pozměněn pouze postranní (hydrofobní) řetězec, a porfyrinový kruh zůstal stejný, absorpční vlastnosti Bchl-u c a MetBchlid-u c se nezměnily.



Obrázek 13: Absorpční spektra Bchl-u c (zobrazeno černou křivkou) a MetBchlid-u (červená křivka) v metanolu. Spektra jsou normalizována na vrchol v Soretu.

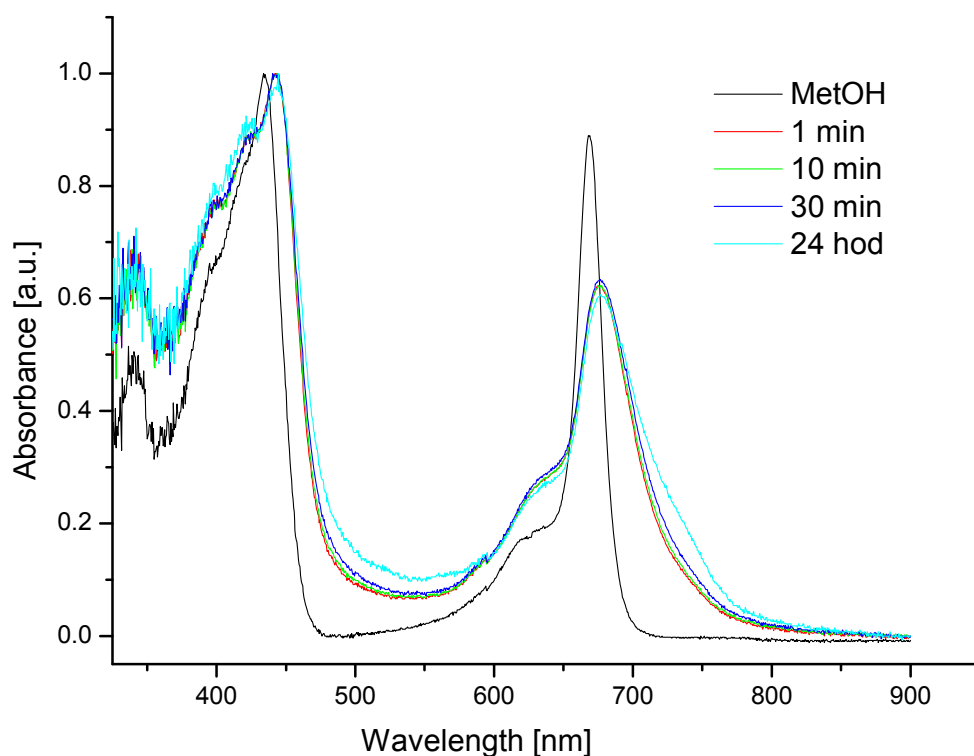
## 4.2. Vliv délky postranního řetězce na chování bakteriochlorofylu ve vodném prostředí

Cílem této části práce bylo prozkoumat vliv délky vedlejšího řetězce na chování Bchl-u c ve vodném prostředí, které simuluje přirozené prostředí v chlorosomech. Porovnali jsme časový průběh a chování Bchl-u c v pufru s chemicky modifikovaným MetBchlid-em c. Jak je patrné z výsledků, výměna delšího postranního řetězce za krátký methyl má velký vliv na chování pigmentu v pufru. Na obrázku 14 je znázorněn standardní průběh tvorby dimerů Bchl-u c ve vodném prostředí a je zde vidět, že již na počátku dochází k posunu  $Q_y$  absorpčního pásu do červené oblasti, což je dáno změnou prostředí rozpouštědla. Po 24 hodinách se ve spektru vytvořil pás při 710 nm, který je charakteristický pro dimery Bchl-u c. Pro porovnání je v obrázku znázorněno i spektrum monomerního Bchl-u c v metanolu.



Obrázek 14: Časová závislost změny absorpčních spekter Bchl-u c ve vodném pufru po 1 min (červená křivka), 10 min (zelená křivka), 30 min (modrá křivka) a 24 hod (světle modrá křivka) v porovnáním s monomerním Bchl-em c v metanolu (černá křivka). Spektra jsou normalizována na maximum absorpce v Soretu.

Na obrázku 15 je znázorněn průběh stejného experimentu, avšak tentokrát s MetBchl<sub>id-em</sub> c namísto Bchl-u c. Jak je patrné z porovnání obrázků 14 a 15, v případě MetBchl<sub>id-u</sub> c nedochází k časovému vývoji spekter, a tudíž ani ke tvorbě dimerů. Spektru v Q<sub>y</sub> oblasti dominuje pás při 676 nm, který je charakteristický pro monomery MetBchl<sub>id-u</sub> c. Poloha absorpčního Q<sub>y</sub> pásu MetBchl<sub>id-u</sub> c ve vodě se ani po 24 hodinách nezměnila, došlo pouze k mírnému rozšíření v červené oblasti spektra.



Obrázek 15: Časová závislost změny absorpčních spekter Bchl<sub>id-u</sub> c ve vodném pufru po 1 min (červená křivka), 10 min (zelená křivka), 30 min (modrá křivka) a 24 hod (světle modrá křivka) v porovnání s monomerním Bchl-em c v metanolu (černá křivka). Spektra jsou normalizována na maximum absorpce v Soretu.

## 5. Diskuse

Většina molekul chlorofylů a bakteriochlorofylů není dobře rozpustná ve vodném prostředí. To je způsobeno jejich převážně hydrofobní povahou danou přítomností vedlejšího esterifikujícího řetězce. Výjimku tvoří např. chlorofyl *c*, který tento postranní řetězec esterifikujícího alkoholu nemá. Z bakteriochlorofylů je ve vodě částečně rozpustný např. bakteriochlorofyl *c* vyskytující se u některých fotosyntetických bakterií. Ten ve vodném prostředí tvoří dimery. Proces vzniku dimerů a jejich struktura nejsou dosud zcela objasněny. Bylo navrženo několik modelů prostorové orientace bakteriochlorofylu *c* v agregátech, paralelní a antiparalelní. Termíny paralelní a antiparalelní se zde týkají vzájemné orientace  $Q_y$  dipolů bakteriochlorofylových molekul. Původně navržený model bakteriochlorofylových agregátů ve světlosběrných komplexech sirných bakterií popisoval agregáty jako válcové struktury o průměru přibližně 5-10 nm (Holzwarth and Schaffner 1994). Nedávno nově navržený model již popisuje agregáty uvnitř chlorosomu zelené sirné bakterie *Chlorobium tepidum* jako lamelární struktury (Pšenčík et al. 2004).

Metoda transesterifikace se jeví jako velmi vhodná k přípravě chemicky modifikovaných bakteriochlorofylů. Při tomto ději dochází k výměně postranního esterifikujícího alkoholu za jiný. Reakce je limitována skupenstvím zvolených alkoholů. Nejvyšším možným alkoholem se jeví dodekanol, který je při teplotě reakce ještě ve skupenství kapalném. Proces transesterifikace může probíhat jak v kyselém, tak v zásaditém prostředí. Z důvodu ochrany centrálního hořčikového atomu je však nutné použít prostředí zásadité. Toho lze dosáhnout pomocí hydroxidu (v našem případě hydroxidu draselného), nebo například pomocí uhličitanu draselného (Balaban et al. 1995). Výhodou KOH je jeho rozpustnost i ve vyšších alkoholech.

Postranní řetězec esterifikujícího alkoholu nijak zvlášť neovlivňuje konjugovanou vazbu na porfirinovém skeletu, a tudíž ani absorpční vlastnosti pigmentu. Z porovnání spekter původního bakteriochlorofylu *c* a modifikovaného MetBchlid-u *c* v metanolu vyplývá, že námi připravený modifikovaný bakteriochlorofyl *c* má oproti čistému bakteriochlorofylu *c* jiný pouze postranní řetězec. Vlastní absorpční spektrum bakteriochlorofylu se totiž po transesterifikační reakci nezměnilo, nicméně došlo k výraznému zkrácení retenčního času při chromatografii. To ukazuje na mnohem polárnější charakter vzniklého MetBChlid-u. Bakteriochlorofyl *c* byl chemicky

upraven, abychom mohli studovat efekt délky esterifikujících alkoholů na tvorbu jeho agregátů. MetBchlid c má velmi krátký postranní řetězec, a proto je v porovnání s bakteriochlorofylem c značně polárnější. Ve vodném prostředí proto nedochází ke vzniku hydrofobní interakce mezi těmito postranními alkoholovými řetězci a MetBchlid c tak nevytváří dimery, ve vodném prostředí se vyskytuje pouze v podobě monomerů. Délka esterifikujícího alkoholu má zjevně vliv na charakter daného bakteriochlorofylidu. Čím delší bude postranní řetězec esterifikujícího alkoholu, tím hydrofobnější bude daný bakteriochlorofylid, a tím lépe bude docházet k tvorbě jeho dimerů ve vodném prostředí. Ověřili jsme, že v případě MetBchlid-u c nedochází ke vzniku dimerů ani agregátů a tudíž, že délka esterifikujícího alkoholu výrazně ovlivňuje agregační vlastnosti Bchl-u c.



## 6. Závěry

- V průběhu práce jsem napěstovala zelené sírné bakterie *Chlorobium tepidum* a připravila jsem z nich bakteriochlorofyl c.
- Optimalizovala jsem metodu přípravy MetBchlid-u c a našla jsem optimální koncentraci KOH.
- Porovnála jsem chování Bchl-u c a MetBchlid-u c v pufru a zjistila, že v případě MetBchlid-u c nedochází ke vzniku dimerů.
- Prokázala jsem, že k tvorbě dimerů Bchl-u c ve vodných roztocích je nutná přítomnost esterifikujícího alkoholu určité délky, a že tvorba dimerů ve vodných roztocích je pravděpodobně z větší části řízena hydrofobní interakcí esterifikujících alkoholů.

# Literatura

Alster J., Župčanová A., Vácha F., Pšenčík J. (2008): Effect of quinones on formation and properties of bacteriochlorophyll c aggregates; *Photosynth. Res.* 95:183-189

Balaban T. S., Holzwarth A. R., Schaffner K., Boender G. J. de Groot H. J. M. (1995): CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR dipolar correlation spectroscopy of <sup>13</sup>C-enriched chlorosomes and isolated bacteriochlorophyll c aggregates of *Chlorobium tepidum*: The self organization of pigments is the main structural feature of chlorosomes; *Biochemistry* 34:15259–15266

Blankenship R. E., Matsuura K. (2003): Antenna complexes from green photosynthetic bacteria; v Green B. R., Pardon W. W. (eds): *Light-harvesting antennas*, 195-217, Kluwer academic publisher, Dordrecht

Borrego C. M., Gerola P. D., Miller M., Cox R. P. (1999): Light intensity effects on pigment composition and organisation in green sulphur bacterium *Chlorobium tepidum*; *Photosynthesis Research* 59:159-166

Frigaard N.-U., Takaichi S., Hirota M., Shimada K., Matsuura K. (1997a): Quinones in chlorosomes of green photosynthetic bacteria and their role in the redox-dependent fluorescence studied in chlorosome-like bacteriochlorophyll c aggregates; *Arch. Microbiol* 167:343-349

Frigaard N.-U., Voight G. D., Bryant D. A. (2002): *Chlorobium tepidum* mutant lacking bacteriochlorophyll c made by inactivation of the *bchK* gene, encoding bacteriochlorophyll c synthase; *Journal of bacteriology*, 184:3368-3376

Frigaard N.-U., Li H., Milks K. J., Bryant D. A. (2004): Nine mutants of *Chlorobium tepidum* each unable to synthesize a different chlorosome protein still assemble functional chlorosomes; *Journal of bacteriology*, 186:646-653

Frigaard N.-U., Bryant D. A. (2006): Chlorosomes:Antenna organelles in photosynthetic green bacteria; Microbiol Monogr., Springer – Verlag Berlin Heidelberg

Holzwarth, A. R. and K. Schaffner (1994): On the structure of bacteriochlorophyll molecular aggregates in the chlorosomes of green bacteria. A molecular modelling study. Photosynth. Res. 41:225–233

Kalač P. (2001): Organická chemie přírodních látek a kontaminantů; Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Klinger P. (2003): Diplomová práce; MFF UK v Praze

Kobayash M. (1996): Study of precise pigment composition of photosystem I – type reaction centers by means of normal-phase HPLC; J. Plant Res. 109:223-230

Orrit M. (1999): Coherent excitation in the antenna complex; Science, ProQuest Medical Library, 285:349-350

Perrson S., Sönksen C. P., Frigaard N.-U., Cox R. P. Roepstorff P., Miller M. (2000): Pigments and proteins in green bacterial chlorosomes studied by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry; Eur. J. Biochem. 267:450-456

Pšenčík J., Ikonen T. P., Laurinmäki P., Merckel M. C., Butcher S. J., Serimaa R. E., Tuma R. (2004): Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria; Biophysical journal, 87:1165-1172

Singhal P. S., Renger G., Sopory S. K., Irrgang K. D., Govinjee (1999): Concepts in photobiology: Photosynthesis and photomorphogenesis; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Vassiliev I. R., Ronan M. T., Hauska G., Golbeck J. H. (2000): The bound electron acceptors in green sulphur bacteria: resolution of the g-tensor for the  $F_x$  iron-sulphur cluster in *Chlorobium tepidum*; *Biophysical Journal* 78:3160-3169

Wahlund T. M., Woese C. R., Castenholz R. W., Madigan M. T. (1991): A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot-springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 156:81–90

Wang Z. U., Umetsu M., Kobayashi M., Nozawa T. (1999a): Complete Assignment of  $^1\text{H}$  NMR Spectra and Structural Analysis of Intact Bacteriochlorophyll c Dimer in Solution; *J. Phys. Chem. B.* 103:3742–3753

Župčanová A., Arellano J. B., Bína D., Kopecký J., Pšenčík J., Vácha F. (2008): The length of esterifying alcohol affects the aggregation properties of chlorosomal bacteriochlorophyll; *Photochemistry and photobiology*, v tisku