

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Samoagregácia
bakteriochlorofylových molekul

Dizertačná práca

Mgr. Anita Župčanová

Školitel: prof. RNDr. František Vácha, Ph.D.
Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta a Biologické centrum
AVČR v.v.i.
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

České Budějovice
2013

Zupcanova A. (2013) Samoagregácia bakteriochlorofylových molekúl, Selfaggregation of bacteriochlorophyll molecules Ph.D Thesis(in Slovak), Série dizertačných prác, No. 8, Přírodovědecká fakulta Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích Česká republika, 113 stránek

Annotation

The main topic of this PhD thesis is a study of self-aggregation mechanism of Bacteriochlorophyll c (Bchl c) isolated from green sulphur bacteria *Chlorobium tepidum* by means of an absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy and X-ray spectroscopy. This special photosynthetic organism contains unique system of light-harvesting antennae called chlorosomes, that are built up mainly from self-assembled aggregates of Bchl c. In this work we have studied an effect of size of a side esterifying alcohol on the self-assembly of these pigments. We have also studied the effect of the environment polarity on the self-assembly process. For these studies we have developed a method for preparation of the modified Bchl c with different length of the side esterifying alcohol chain (from met-Bchl c to dodecyl-Bchl c) by means of chemical modification (trans-esterification). The results show that the driving force of the self-assembly is determined by hydrophobic interactions in polar environments (water solutions) and hydrophilic interaction in the non-polar environments (organic solvents).

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svoji disertační práci 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 disertační práce, a to 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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 6. 6. 2013.

Anita Župčanová

Táto práca vznikla na základe spolupráce Prírodovedeckej fakulty Juhočeskej Univerzity v Českých Budějoviciach a Ústavu molekulárnej biológie rastlín, Biologického centra AV ČR, v.v.i.



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science



PodĎakovanie

Touto cestou by som chcela vyjadriť poďakovanie môjmu školiteľovi prof. Františku Váchovi za jeho odborné vedenie, podporu a trpezlivosť. Veľká vďaka doc. Jakubovi Pšenčíkovi a dr. Juanu Arellanovi, ktorí mi pomáhali pri vedeckej práci a celému Oddeleniu fotosyntézy z Ústavu molekulárnej biológie rastlín za priateľskú atmosféru a ich pomoc.

Túto prácu venujem mojej rodine a všetkým priateľom, ktorí mi boli morálnou oporou a dodali mi silu na dokončenie tejto práce.

Zoznam článkov

1. The length of esterifying alcohol affects the aggregation properties of chlorosomal bacteriochlorophylls. **Zupcanova A**, Arellano JB, Bina D, Kopecky J, Psencik J, Vacha F, Photochem. Photobiol., 2008, 84, 1187-1194 IF: 2.287

AZ – vyvinula metódy transesterifikácie Bchl a spravila [väčšinu](#) experimentálnych meraní, vyhodnotenie experimentov a pripravila manuskript

2. The lamellar spacing in self-assembling bacteriochlorophyll aggregates is proportional to the length of the esterifying alcohol. Psencik J, Torkkeli MA, **Zupcanova A**, Vacha F, Serimaa RE, Tuma R, Photosynth. Res., 2010, 104, 211-219 IF: 2.681

AZ – pripravila pre experimenty všetky modifikované Bchl.

3. Effect of quinones on formation and properties of bacteriochlorophyll *c* aggregates. Alster J, **Zupcanova A**, Vacha F, Psencik J, Photosynth. Res., 2008, 95, 183-189 IF: 4.064

AZ – pripravila pre experimenty všetky modifikované Bchl a zúčastnila sa na niektorých agregáčnych experimentoch.

4. Anisotropic organization and microscopic manipulation of self-assembling synthetic porphyrin micro-rods that mimic chlorosomes, bacterial light-harvesting systems. Chappaz-Gillot C, Marek PL, Blaive BJ, Canard G, Bürck J, Garab G, Hahn H, Jávorfí T, Kelemen L, Krupke R, Mössinger D, Ormos P, Reddy CM, Roussel C, Steinbach G, Szabó M, Ulrich AS, Vanthuyne N, Vijayaraghavan A, **Zupcanova A**, Balaban TS, J Am. Chem. Soc. 2012, 134, 944-954 IF: 9.907

AZ – spravila všetky agregáčné experimenty a niektoré spektroskopické a mikroskopické merania na získaných vzorkách.

Obsah

1.	Úvod	6
2.	Fotosyntetický aparát v oxygénej fotosyntéze	10
2.1.	Štruktúra hlavných proteínových komplexov fotosyntetického aparátu.	11
2.1.1.	Štruktúra PSII	11
2.1.2.	Štruktúra PSI	13
2.1.3.	Štruktúra cytochrómu b6/f komplex	14
2.1.4.	Štruktúra ATP syntázy	14
2.1.5.	Svetlom indukovaný elektrónový transportný reťazec	15
2.2.	Svetlozberné komplexy oxygénej fotosyntézy.	17
2.2.1.	Pigmenty chlorofyly, karotenoidy a ich všeobecné charakteristiky	17
2.2.2.	Svetlozberná anténa LHC II	19
2.2.3.	Svetlozberná anténa LHC I	21
2.2.4.	Fykobilizómy	22
3.	Fotosyntetický aparát v anoxygénej fotosyntéze	23
3.1.	Purpurové baktérie	23
3.1.1.	Reakčné centrá	24
3.1.2.	Svetlozberné komplexy LH	27
3.2.	Zelené baktérie	29
3.2.1.	Reakčné centrum zelených sírnych baktérií	29
3.2.2.	Chlorozómy	30
3.2.3.	Pigmenty fotosyntetických zelených baktérií	32
3.2.4.	Agregáty	34
4.	Ciele práce	38

5.	Materiál a metódy	40
5.1.	Kultivácia baktérií <i>Chlorobium tepidum</i>	40
5.2.	Izolácia chlorozómov z <i>Chlorobium tepidum</i>	42
5.3.	Extrakcia pigmentov (<i>Chlorobium tepidum</i>)	42
5.4.	Izolácia a purifikácia Bchl c	43
5.5.	Optimalizácia prípravy rôznych bakteriochlorofilidov	44
5.6.	Príprava dimérov a umelých agregátov vo vodnom prostredí	44
5.7.	Príprava umelých agregátov v alkánoch	45
5.8.	Absorpčná spektroskopia	45
6.	Zoznam literatúry	46
7.	Výsledky	63
8.	Prílohy	68
	Článok 1.	70
	Článok 2.	82
	Článok 3.	93
	Článok 4.	102

1. Úvod

Fosílné palivá nie sú nevyčerpatelným zdrojom energie. Napriek tomu, že dochádza k ďalším objavom nových nálezísk, je nutné sa už v dnešnej dobe zamýšľať a hľadať náhradu za tento zdroj energie. Počet obyvateľov na zemi rastie, spolu s tým dochádza i k rozvoju ekonomík populačne najviac sa rozvíjajúcich štátov (ako je napr. Čína alebo India). Tento rozvoj je sprevádzaný i výrazne sa zvyšujúcou potrebou energie. Existuje niekoľko možných alternatív ako nahradiť fosílné palivá. Takou alternatívou môže byť jadrová energia alebo energia z obnoviteľných zdrojov. Obnoviteľné zdroje by mali byť bezpečné, stabilné, relatívne lacné, čisté a široko dostupné. Energia slnečného žiarenia je vynikajúcim kandidátom, avšak súčasné technológie nie sú dostatočne efektívne ani účinné a problémom je aj uchovávanie takto získanej energie na dlhšiu dobu.

V prírode však existuje spôsob ako energiu slnečného žiarenia spracovať a využiť. Tomuto procesu hovoríme fotosyntéza a vďaka nej existuje život na našej planéte v podobe, ako ho dnes poznáme. Slovo fotosyntéza pochádza z gréčtiny a doslova znamená výstavba svetlom. Je jedným z najdôležitejších procesov prebiehajúcich na Zemi už približne 3,5 miliardy rokov.

V priebehu tohto procesu dochádza k pohlteniu energie slnečného žiarenia, k jeho prenosu a následnému zabudovaniu do energeticky bohatých chemických zlúčenín. Fotosyntézy sú schopné len tzv. fototrofné organizmy. Môžu to byť nielen eukaryotické rastliny a riasy, ale aj prokaryotické sinice a fotosyntetické baktérie. Procesy fotosyntézy môžeme deliť podľa rôznych kritérií, napr. na oxygénnu (štíepi vodu a produkuje molekulárny kyslík) a anoxygénnu (ako zdroj

elektrónov nepoužíva vodu), aeróbnu (prebieha za prístupu vzduchu) a anaeróbnú (je inhibovaná prítomnosťou kyslíka) a podobne. Napriek tomu, že medzi fotosyntetickými organizmami existujú výrazné rozdiely, princíp fotosyntetickej premeny energie je u všetkých organizmov podobný. V zásade ide o svetlom poháňaný vznik gradientu protónov na biologickej membráne, u niektorých typov fotosyntézy je zároveň sprevádzaný redukciami redukčných ekvivalentov. Protónový gradient je následne využitý k tvorbe vysokoenergetických väzieb v molekulách ATP a tie sú ďalej spolu s redukčnými ekvivalentami spotrebované pri tvorbe redukovaných organických zlúčenín.

Celý proces premeny energie vo fotosyntéze je možné rozdeliť do niekoľkých krokov a to: 1. absorpcia žiarenia a prenos energie v anténových komplexoch, 2. primárne rozdelenie náboja a transport elektrónov v reakčných centrách a ďalej v elektrónovom transportnom reťazci, 3. syntéza a transport stabilných vysoko energetických produktov, 4. tvorba redukovaných uhlíkových zlúčenín.

Primárne fotosyntetické deje sa odohrávajú v pigment-proteínových komplexoch na fotosyntetickej membráne. Energia slnečného žiarenia je pohltaná pigmentami svetlozberných antén a vo forme excitačnej energie prenášaná ďalej do reakčných centier, kde dochádza k rozdeleniu náboja. Výsledkom je vytvorenie oxidačno-redukčného páru, oxidovanej formy chlorofylu a redukovaného elektrónového akceptoru. Elektróny sú potom ďalej prenášané po oxidačno-redukčnom potenciáli v elektrónovom transportnom reťazci. Tok elektrónov cez membránu je sprevádzaný vznikom koncentračného gradientu protónov na membráne, ktorý poháňa ATP-syntázu.

Pri oxygéennej fotosyntéze sú konečnými produktmi fotosyntetických membránových procesov redukovaný

nikotínamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) a adenzíntrifosfát (ATP). Tieto látky sú ďalej využité pri fixácii CO₂ a biosyntéze sacharidov v Kalvin-Bensonovom cykle.

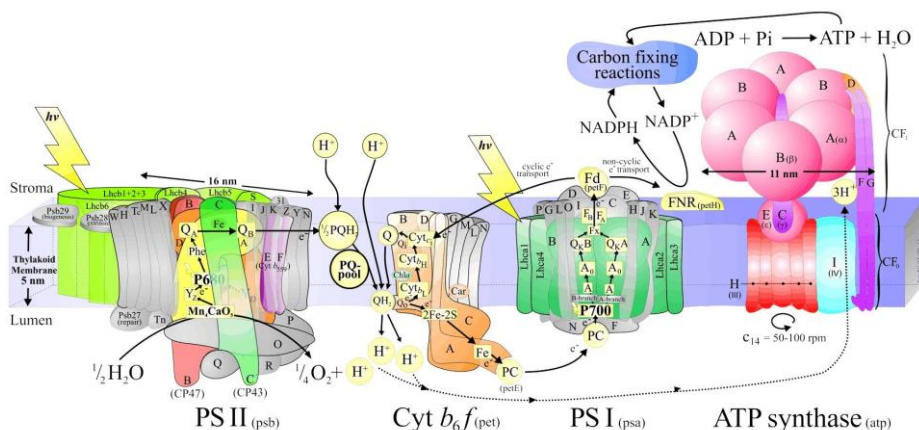
Reakčné centra sú komplexy proteínov s naviazanými pigmentmi, na ktorých dochádza k separácii náboja a transportu elektrónov. Vysoká účinnosť týchto procesov je zabezpečená optimálnym priestorovým usporiadaním molekúl tvoriacich tento pigmentovo-proteínový komplex. Podľa typu konečných akceptorov elektrónov rozlišujeme dva typy reakčných centier:

- železo-sírny typ (RCI) – konečným akceptorom je Fe-S komplex, nachádza sa v zelených sírnych bakteriách, heliobaktériách a vo fotosystéme I (PSI) oxygennej fotosyntézy,
- feofytín-chinónový typ (RCII) – konečným akceptorom je molekula chinónu, nachádza sa v purpurových bakteriách, zelených vláknitých baktériách a vo fotosystéme II (PSII) oxygennej fotosyntézy.

RCI dosahujú nižšie hodnoty redoxných potenciálov ako RCII, a preto môžu redukovať feredoxín a potom aj NADP⁺. Organizmy schopné oxygennej fotosyntézy, teda rastliny, riasy a sinice, obsahujú vo fotosyntetickej membráne obidva typy reakčných centier v pigmentovo-proteínových komplexoch fotosystémov I a II. To im umožňuje prekonať veľký rozdiel v redoxnom potenciáli medzi redoxnými párami H₂O/O₂ a NADP⁺ / NADPH + H⁺, a získavať tak elektróny štiepením molekúl vody. Oxygená fotosyntéza využíva dva dôležité substráty, vodu a oxid uhličitý. Pri štiepení vody sa do atmosféry uvoľňuje plynný kyslík a ako produkt fotosyntézy vznikajú sacharidy, životne dôležité pre ostatné heterotrofné organizmy, vrátane

človeka. Organické zlúčeniny slúžia heterotrofným organizmom ako potrava, kyslík využívajú pri dýchaní.

Jednoduchšia forma anoxygéennej fotosyntézy prebieha u väčšiny ostatných fotosyntetických baktérií. Membrány organizmov s anoxygéennou fotosyntézou obsahujú vždy len jeden druh reakčných centier. Elektronový transport potom môže byť buď i) **lineárny**, kedy donorom elektrónov môžu byť rôzne organické alebo anorganické látky, napr. sírovodík, alebo ii) **cyklický**, kedy dochádza k transportu elektrónov v cykle a elektróny vstupujú späť do reakčného centra.



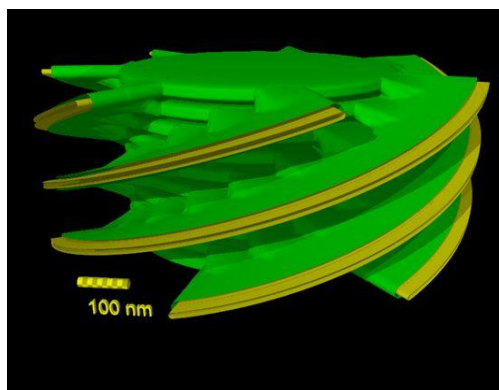
Obr. 1. Detailný model Z-schémy, vrátane štrukturálnych informácií o organizácii proteínových komplexov zúčastňujúcich sa na transporte elektrónov (e^-) a protónov (H^+) v tylakoidnej membráne zelených rastlín (eukaryota). Model je založený na širokej škále známej literatúry, napr. Guskova a kol., (2009, PSII), Stroebel a kol., (2003; CYT B6F), Jordan a kol., (2001, PSI). Amunts a kol., (2007, LHCI-PSI). Obrázok je voľne k dispozícii na

<http://www.queenmaryphotosynthesis.org/nield/ps3images/oxygenicphotosynthmodel.html> autorom je Jon Nield, Queen Mary, University of London, UK; November 2011

2. Fotosyntetický aparát v oxygénnej fotosyntéze

U mnohých fotosyntetických organizmov sa vyvinul zložitý fotosyntetický aparát, ktorý je uložený do vysoko organizovaných membránových štruktúr - tylakoidov. Sinice majú tylakoidnú membránu po obvode bunky. Riasy a vyššie rastliny majú tylakoidy organizované do chloroplastov. Chloroplast je organela v tvare splošteného valca, ktorý má v priemere okolo 5-10 μm (Mustardy a Garab 2003). Chloroplasty sú naplnené vodným matrixom nazývaným stróma. V ňom je zložitý systém tylakoidných membrán, ktoré sú organizované do stromálnych lamiel lebo vrstvených grán. Graná sú valcovitého tvaru zložené z 10-20 vrstiev, ktoré sú vzájomne prepojené s voľnými časťami stromálnych lamiel. Tylakoidnú membránu oxygénnej fotosyntézy tvorí dvojité vrstvy amfipatických lipidov, v ktorej sú zabudované fotosyntetické pigmentovo-proteínové komplexy. Hlavné proteínové komplexy vo fotosyntetickom elektrónovom transportnom reťazci sú fotosystém II (PSII), cytochróm (cyt) b_6/f komplex, fotosystém I (PSI) a ATP syntáza.

Fotosystémy sú zložené z vonkajších antén (LHC1 a LHC2) a jadra, ktoré obsahuje reakčné centrum (RCI a RCII) a vnútornú anténu. Tieto dva fotosystémy sú priestorovo separované. Väčšina PSII-RCII a ich hlavný svetlozberný komplex LHCII, sa nachádzajú v granách. PSI-RCI a jeho LHCI sa nachádzajú prevažne v stromálnych lamelách a čiastočne aj v granách. ATP syntáza je umiestnená v stromálnych lamelách a cyt b_6/f komplex sa môže vyskytovať v oboch častiach membrán. (Andersson a Anderson 1980, Dekker a Boekema 2005).



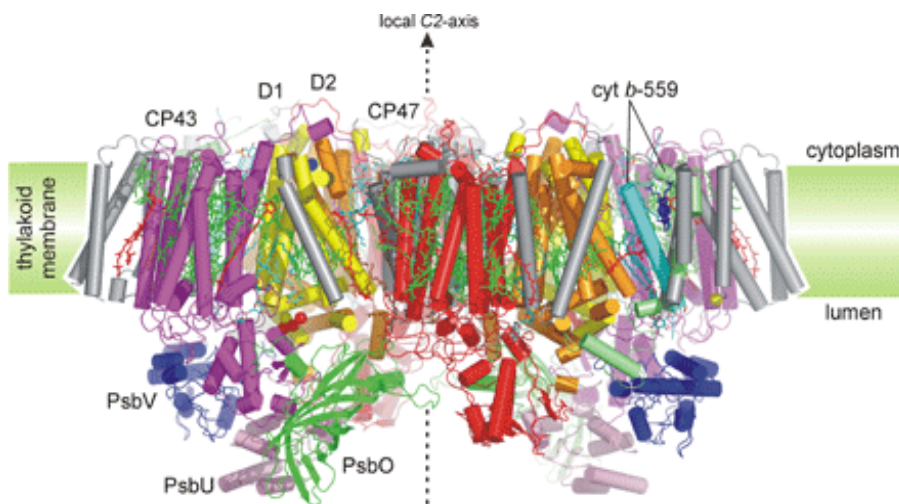
Obr. 2. Model štruktúry chloroplastu (model pripravil Ph.D. Gabor Steinbach)

2.1.Štruktúra hlavných proteínových komplexov fotosyntetického aparátu.

2.1.1. Štruktúra PSII

PSII a PSI sa skladajú zo zložitého systému svetlozberných antén a reakčného centra (RC). Svetlozberné komplexy obsahujú stovky molekúl pigmentov, hlavne chlorofyl *a*, *b* a karotenoidy. Anténový systém sa skladá z vnútorných antén, ktoré sa nachádzajú v blízkosti RC a vonkajších, väčšinou mobilných, periférnych antén. Vnútoraná anténa pre PSII má dve podjednotky, CP43 (PsbC) a CP47 (PsbB). Periférny anténový systém, LHCI, pozostáva z niekoľkých podjednotiek (Jansson 1994, Dekker a Boekema 2005). Reakčné centrum PSII-RCII je heterodimér, tvoria ho dva proteíny, D1 (PsbA) a D2 (PsbD), na ktoré je naviazaných 6 molekúl chlorofylu *a*, 2 molekuly feofytinu, 2 molekuly beta-karoténu, 2 chinóny, hem a atóm železa. Štyri molekuly chlorofylu sú umiestnené v strede na D1 a D2

podjednotkách a tvoria tzv. multimér. Podľa vlnovej dĺžky 680 nm, pri ktorej má PSII-RC absorpčné maximum, ho označujeme P680 (PS II). V minulosti sa predpokladalo, že primárnym donorom elektrónov v PSII-RC je dimér chlorofylu, ale podľa súčasných predstáv je donorom práve multimérne usporiadanie chlorofylov v PSII-RC (Durrant 1995). V PSII dochádza pôsobením excitačnej energie svetelného žiarenia k rozdeleniu náboja a oxidácii primárneho donora (P680). Na D1 podjednotke nachádzame feofytín (Pheo), chl a, β -karotén, a sekundárny chinón QB. Primárny chinón QA, chl a, β -karotén a druhý feofytín sú na D2 podjednotke. Medzi QA a QB je atóm nehémového železa. V procese transportu elektrónov sa v PSII zapája aj tyrozínový zvyšok Tyr_Z (Y_Z) nachádzajúci sa na D1 podjednotke a kyslík vyvíjajúci komplex (OEC, niekedy nazývaný aj komplex oxidujúci vodu, t.j. WOC). Na podjednotke D2 sa taktiež nachádza tyrozínový zvyšok, Tyr_D (Y_D), no tento sa za fyziologických podmienok na transporte elektrónov nezúčastňuje. WOC komplex tvorí zoskupenie štyroch atómov mangánu a jedného atómu vápnika (mangánový klaster), ktoré sú viazané najmä na D1 a tri vonkajšie proteíny, ktoré chránia a zvyšujú účinnosť mangánového klastru. Ostatné komponenty v PSII RCII sú cytochróm cyt b₅₅₉ tvorený dvomi podjednotkami proteínu PsbE a PsbF s jedným hémom, a niekoľko malých proteínových podjednotiek PsbH-PsbY. V posledných niekoľkých rokoch bol vykryštalizovaný komplex PSII RCII. Jeho trojrozmerná štruktúra bola stanovená najprv v termofilných siniciach *Thermosynechococcus elongatus* a *T. vulcanus* s rozlíšením 3,8 Å (Zouni a kol. 2001) a postupne upresňovaná rôznymi skupinami (Kamiya a Shen 2003, Ferreira a kol. 2004) až k súčasnému rozlíšeniu 1,9 Å (Umena a kol. 2011)



Obr. 3. Štruktúra PSII. Bočný pohľad na dimér PSII v tylakoidnej membráne. Sú zobrazené proteíny reakčného centra, podjednotka D1 (žltá) a D2 (oranžová), antény podjednotiek CP43 (fialová) a CP47 (červená), α a β reťazce cytochrómu b-559 (zelená a azúrová), a nízkomolekulárne podjednotky (sivá), vonkajšie podjednotky kyslík vyvíjajúceho komplexu PsbO (zelená), PsbU (ružová), a PsbV (modrá) a kofaktory chlorofylu (zelená), feofytín (žltá), karotenoid (červená), heme (modrá), chinóny (tmavo fialová), lipidy (čierna). Mn (červená), a Ca^{2+} (žltá) kationy sú zobrazené ako gule. Zdroj obrázku http://www.sciencemag.org/site/feature/data/prizes/ge/2006/loll_figure.gif

2.1.2. Štruktúra PSI

Jadro PSI pozostáva približne z 10 až 12 proteínov. Podobne ako v PSII je PSI-RCI tiež heterodimér, tvorený z dvoch podjednotiek proteínov PsaA a PsaB. Primárny donor elektrónov, P700 (špeciálny Chl pár), sa nachádza medzi týmito dvoma podjednotkami. Primárnym akceptorom elektrónu je molekula chlorofylu a, A_0 . Následnými príjemcami elektrónu sú A_1 (fylochinón), tri [4Fe-4S] centrá (F_X , F_B , F_A), feredoxín (Fd) a NADP^+ . Na podjednotku PsaA sú naviazané A_0 ,

A_1 a F_X , na $PsaD$ sa viaže feredoxín a F_A a F_B centrá sa viažu na $PsaC$, čiže vonkajšiu podjednotku PSI. Dosiaľ bola určená kryštálová štruktúra PSI zo sinice *Synechococcus elongatus* s rozlíšením 2,5 Å (Jordán a kol. 2001, Grotjohann a kol. 2004) a z vyšších rastlín (hrach) s rozlíšením 4,4 Å (Ben-Shem a kol. 2003, Fromme a kol. 2006).

2.1.3. Štruktúra cytochrómu b_6/f komplex

Cytochróm b_6/f komplex je integrálny membránový proteínový komplex. Cyt b_6/f obsahuje tri malé a štyri veľké podjednotky: cyt b_6 (24 kDa), cyt f (31 kDa), Rieskeho Fe-S proteín (19 kDa) a podjednotku IV (17 kDa). Cytochróm b_6 obsahuje dve molekuly hému. Kryštálová štruktúra cyt b_6/f komplexu bola stanovená z termofilnej sinice *Mastigocladus laminosus* s rozlíšením 3 Å (Kurisu a kol. 2003), a zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Stroebel a kol. 2003).

2.1.4. Štruktúra ATP syntázy

Komplex ATP syntázy sa skladá z dvoch hlavných podjednotiek, CF_0 a CF_1 . Podjednotka CF_0 je zahrnutá do fotosyntetickej membrány a tvorí protónový kanál cez membránu. CF_1 podjednotka je pripojená k hornej membránovej časti CF_0 na stromálnej strane membrány. CF_1 sa skladá z niekoľkých rôznych bielkovinových podjednotiek, ktoré obsahujú katalytické miesta pre syntézu ATP. Štruktúra ATPázy z mitochondrie hovädzieho srdca bola stanovená Abrahamsonom a jeho skupinou v roku 1994.

2.1.5. Svetlom indukovaný elektrónový transportný reťazec

Prvým krokom pri premene svetelnej energie na chemickú je absorpcia fotónov svetlozberným komplexom antén. Tento proces prebieha veľmi rýchlo, rádovo trvá femtosekundy. Zachytená excitačná energia je ďalej využitá v jednotlivých fotosystémoch. V PSII dochádza pôsobením excitačnej energie svetelného žiarenia k rozdeleniu náboja v RCII a k oxidácii chlorofylu teda primárneho donora (P680). To sa deje tak, že z excitovaného primárneho donora P680* putuje elektrón na feofytín (Pheo), ktorý sa týmto redukuje (Pheo⁻). P680⁺ postupne extrahuje štyri elektróny z dvoch molekúl vody. Oxidovaný P680⁺ je redukovaný elektrónom z tyrozínu Tyr_Z, ktorý je následne redukovaný elektrónom dodaným mangánovým klastrom. Tento proces trvá približne 200-800 μs. Výsledkom je uvoľnenie molekuly kyslíka a štyroch protónov do lumenu. (Hankamer 1997, Blankenship 2002) Konečným donorom elektrónov je teda molekula vody. Elektrón z Pheo⁻ prejde na pevne viazaný chinón Q_A a odtiaľ prechádza na voľne viazaný chinón Q_B. Keď Q_B získa dva elektróny od Q_A v dvoch po sebe idúcich separáciách, sú k nim pridané dva protóny zo strómy chloroplastov. Redukovaný Q_B potom opúšťa svoje miesto a je nahradený novým plastochinónom. Redukovaný plastochinón PQH₂ transportuje elektróny na cyt b₆/f komplex (Barber 1998, Zouni 2001, Ferreira 2004). PQH₂ je najprv oxidovaný na semichinón, jeho elektrón je prenesený na Rieskeho Fe-S klaster, ktorý je vzápätí oxidovaný cytochrómom cyt f. Re-oxidácia PQH₂ je najpomalší krok v elektrón transportnom reťazci, ale dochádza k uvoľneniu dvoch elektrónov a dvoch protónov do lumenu tylakoidu. Na redukcii semichinónu sa podieľajú dva b-hémy a jeden c-hém z komplexu b₆/f

(Kurusu 2003). Tieto hémy pracujú v takzvanom Q cykle podobnom cytochrómu bc_1 a poskytujú ďalšie translokácie protónov do lumenu. Podľa teórie Q-cyklu (Hope 2000, Crofts 2004, Allen 2004, Osyczka a kol. 2005), iba jeden z dvoch elektrónov, ktoré môže darovať PQH₂ odchádza do Rieske Fe-S proteínu vzhľadom k tomu, že ten druhý je prevedený na cyt b₆ hém s nízkym a potom s vysokým potenciálom. Takto Q-cyklus zvyšuje počet protónov, ktoré uvoľní do lumenu za prenesené elektróny. K transportu elektrónu z cytochrómu f k plastocyanínu PC dochádza za 50-100 μ s a PC odovzdá elektróny PS I za 20-200 μ s. Absorbovaná excitačná energia chlorofylmi RC PS I má za následok separáciu náboja a vznik oxidovaného chlorofylu P700⁺, a redukovaného chlorofylu, ktorý označujeme A₀⁻ (rádovo v pikosekundách). Elektrón z plastocyanínu (alebo z cytochrómu c₆) redukuje P700⁺. Z A₀⁻ je elektrón premiestnený na fylochinón a potom je po niekoľkých redoxných reakciách na troch [4Fe-4S] centrách F_X, F_B, F_A nakoniec odovzdaný feredoxínu Fd. Prechod elektrónu z A₀ na A₁ trvá 40-200 ps, v [4Fe-4S] centrách 15-500 ns, a prechod na Fd približne 0,5-20 μ s. (Blankenship 2002, Chitnis 1996). Fd redukuje NADP⁺ na NADPH v reakcii, ktorú katalyzuje enzým feredoxín NADP⁺ reductáza (Jordan 2001, Ben-Shem 2003). PSI je schopný pracovať aj nezávisle na PSII. Následkom tohto elektrónového transportu je vznik elektrochemického potenciálu na membráne. Pozitívny náboj sa koncentruje v lumene. Protónový gradient vytvorený cez membránu, poskytuje energiu pre pohon ATP syntázy. V tomto procese protóny prechádzajú cez podjednotku CF₀ a CF₁ ATP syntázy z lumenu do strómy tylakoidu a výsledkom je syntéza ATP. Konvertovaná solárna energia sa tak ukladá vo forme NADPH a ATP, ktoré poskytujú energiu pre asimiláciu CO₂. (Avenson a kol. 2005). Atmosferická asimilácia CO₂ (Kalvin-Benson cyklus) sa odohráva v

stróme a zahŕňa sériu enzymatických reakcií. Jeden z najdôležitejších krokov v Calvin-Bensonovom cykle je katalyzovaný enzýmom RuBisCo (ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza), ktorý je považovaný za najrozšírenejší a najdôležitejší proteín na Zemi (Portis a kol. 2007).

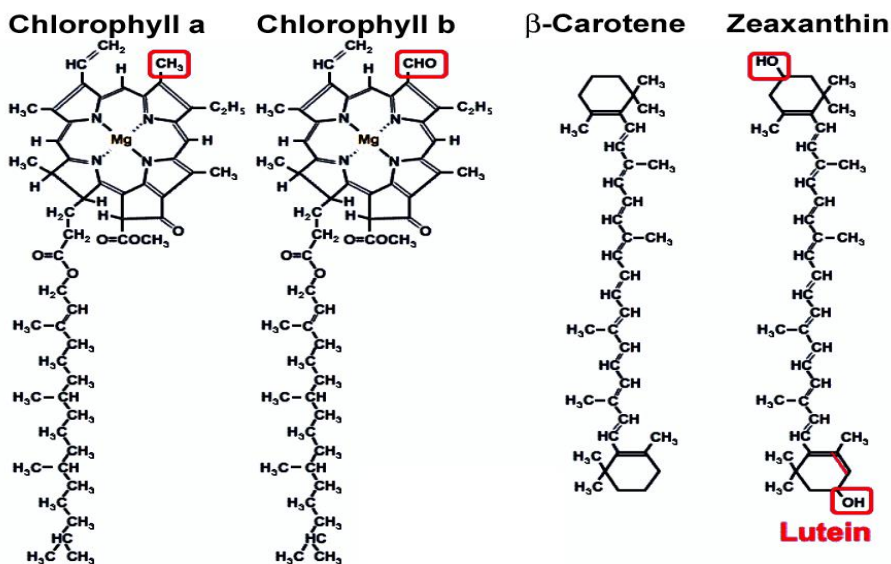
2.2. Svetlozberné komplexy oxygénnej fotosyntézy

Antény sú zložené komplexy, ktoré zvyšujú efektívnosť fotosyntézy. Štruktúrna variabilita svetlozberných komplexov rôznych organizmov odráža rôznorodosť riešenia toho istého problému, t.j. ako získať čo najefektívnejšie maximum energie s využitím rôznych vlnových dĺžok svetla a v širokom rozsahu intenzít. Antény môžu byť považované za energetické cesty, v ktorých sú pigmenty priestorovo a hierarchicky usporiadané tak, aby absorbovaná energia bola dopravená do RC. Pigmenty na okrajoch komplexov absorbujú žiarenie kratších vlnových dĺžok, ktoré má však vyššiu energiu. Prenášajú excitačnú energiu na pigmenty s nižšou energiou absorbujúce pri dlhších vlnových dĺžkach. Rôznorodosť svetlozberných komplexov sa odvodzuje od ich proteínových štruktúr ako aj ich pridružených pigmentov. Pigmenty svetlozberných antén môžeme rozdeliť do troch skupín: 1) chlorofyly (Chl) a bakteriochlorofyly (Bchl), 2) fykobilíny, a 3) karotenoidy (Green a Parsons 2003).

2.2.1. Pigmenty chlorofyly, karotenoidy a ich všeobecné charakteristiky

Chlorofyly sú z chemickej stránky cyklické tetrapyroly a zaraďujeme ich medzi porfyríny. Obsahujú aj piaty izocyklický kruh a v centre

tetropyroly viažu katión horčíka (Mg^{2+}). Okrem toho je na nich naviazaný rôzne dlhý postranný uhl'ovodíkový reťazec, napríklad v prípade chlorofylov *a* a *b* je to fytol. Chlorofyly sú viac-menej planárne molekuly s dlhým konjugovaným π -elektrónovým systémom pozdĺž kruhu, ktorý má za následok pomerne silnú absorpciu v blízkej ultrafialovej (UV) a viditeľnej oblasti. Jednotlivé chlorofyly sa od seba líšia prevažne rôznymi substituentami na tetrapyrolovom centre. Napríklad, chlorofyl *b* sa od chlorofylu *a* líši len substitúciou metylovej skupiny za skupinu aldehydovú na atóme uhlíka C3. I napriek nepatrnému rozdielu v ich štruktúre absorpčné spektrá Chl *a* a Chl *b* (rozpustený v organickom rozpúšťadle) vykazujú pozoruhodné rozdiely. Chl *a* má silné absorpčné maximum pri kratšej vlnovej dĺžke v modrej oblasti ~ 435 nm, (Soret) a ďalšie dve maximá v červenej oblasti ~ 620 nm a $Q_x \sim 670$ nm Q_y , zatiaľ čo Chl *b* absorbuje v zelenomodrej oblasti ~ 465 nm a v červenej oblasti pri ~ 600 nm $Q_x \sim 650$ nm Q_y (Green a Parsons 2003). Absorbčné maximá však taktiež ovplyvňuje väzba chlorofylov na proteíny. Takáto interakcia je využitá fotosystémami a svetlozbernými komplexami k nastaveniu správnej absorpčnej dĺžky pre optimálne fungovanie fotosyntetického aparátu. Karotenoidy rozširujú škálu fotosynteticky aktívneho žiarenia. Sú to tetraterpény a ich molekuly sú najčastejšie tvorené až 40 uhlíkovými atómami. Základnou stavebnou jednotkou karotenoidov je molekula izoprénu. Karotenoidy, na ktorých je viazaný kyslík, nazývame xantofyly. Ich absorpčné vlastnosti úzko súvisia a menia sa podľa dĺžky konjugovaných dvojitych väzieb pozdĺž reťazca (Frank a kol. 1994). Absorpčné spektrum má tri charakteristické maximá v oblasti medzi 420~ 500 nm a ich poloha závisí od použitého rozpúšťadla. Karotenoidy majú dôležitú úlohu ako svetlozberné pigmenty a tiež aj pri ochrane a stabilizácii štruktúry komplexov.

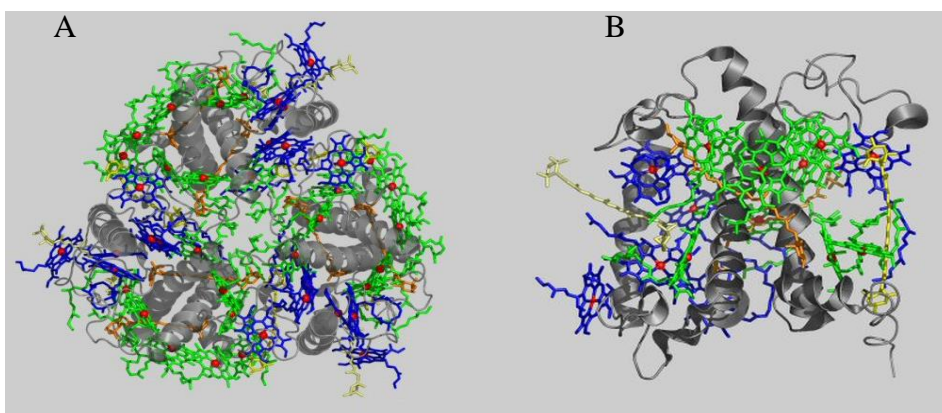


Obr. 4. Chemická štruktúra chlorofylov a karotenoidov.

2.2.2. Svetlozberná anténa LHC II

LHC II je jedným z najčastejších pigmentovo-proteínových komplexov v biosfére. Nachádza sa v chloroplastoch vyšších rastlín a zelených rias. Je to komplex transmembránových hydrofóbných proteínov o hmotnosti 25-27 kDa. Tieto proteíny patrí do gémovej rodiny LHCB, rovnako ako niektoré ďalšie drobné antény ako CP26 (Lhcb5), CP29 (Lhcb4) alebo CP24 (Lhcb3) (Jansson, 1994). Konkrétnejšie, termín 'LHCII' zvyčajne predstavuje zmes produktov Lhcb1 a Lhcb2 génov (Jansson a Gustafsson, 1990). LHCII ukazuje v 2D kryštáloch 3-násobnú symetriu a je tiež pravdepodobné, že trimér je základnou jednotkou LHCII in vivo (Butler a Kühlbrandt, 1988, Kühlbrandt,

1994), kedy tvoria veľké objemné agregáty (Garab a kol., 1988; Barzda a kol., 1994). Kryštálová štruktúra LHCII triméru bola vyriešená s rozlíšením 3,4 Å (Kühlbrandt 1994) a 2,72 Å zo špenátu (Liu a kol 2004). Z údajov vyplynulo, že monomér LHCII sa skladá z troch α -špirál prestupujúcich cez membránu, pričom dve z nich sú umiestnené symetricky v naklonenej polohe. Taktiež sa podarilo identifikovať 12 molekúl chlorofylov (7 molekúl Chl a a 5 molekúl Chl b) a dva luteíny (Lut), (obr. 5).



Obr. 5. Štruktúrny model LHCII stanovený Luim a spol. (Nature 428, 287-292, 2004). A) Trimer, pohľad zhora, B) pohľad zo strany na monomér podjednotky. Chlorofyl a (zelená), chlorofyl b (modrá), Xantofyly (žltá).

Výsledky ukazujú, že chlorofyly sú usporiadané do dvoch vrstiev, paralelne k rovine membrány a sú orientované Krátke vzdialenosti medzi pigmentami v rozmedzí od 4 do 5 Å, umožňujú rýchly prenos excitačnej energie. tetrapyrolovým kruhom kolmo k rovine membrány.

2.2.3. Svetlozberná anténa LHC I

Molekulárna štruktúra PSI-LHCI komplexu z hrachu (*Pisum sativum*) bola vyriešená s rozlíšením 4,4 Å (Ben Shem 2003). Základ antény tvoria štyri rovnomerne rozložené LHCI proteíny. Tie môžu byť tvorené štyrmi génovými produktami Lhc1 (molekulová hmotnosť 22 kDa), Lhc2 (23 kDa), Lhc3 (25 kDa) a Lhc4 (22 kDa). Lhca proteíny sa dajú rozdeliť do dvoch párov vzhľadom na ich vlastnosti a pigmentové zloženie. Prvú skupinu tvoria Lhca1 a Lhca3, ktoré majú vysokú afinitu k Chl *a*, čo sa odráža v ich Chl *a/b* pomere 4.0 / 5.9 (Croce 1998, Castelletti 2003). Skupina Lhca1 a Lhca3 viaže po 3 molekuly kartenoidov hlavne luteín a violaxanthín. Druhá skupina, Lhca2 a Lhca4, má pomer Chl *a/b* nižší, iba 1.9 / 2.4, (Castelletti 2003), a viažu iba po dve molekuly karotenoidov, ktorými sú opäť luteín a violaxantín.

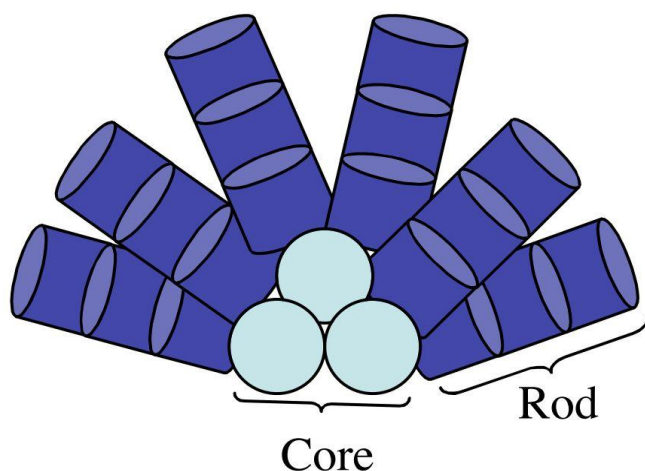
Komplexy LHC I majú osobitnú emisiu pochádzajúcu z Chl_a molekúl absorbujúcich pri vlnových dĺžkach nad 700 nm. Táto dlhovlnná fluorescencia je vo väčšej či menšej miere charakteristická pre všetky Lhca 1 - 4 komplexy a je spôsobená interakciou medzi dvomi excitovanými molekulami chlorofylu. Jedným z týchto chlorofylov je vo všetkých prípadoch chlorofyl A5. (Gobets 2001, Melkozernov 2005, Jensen 2007, Morosinotto 2003)

LHC I viaže iba asi 5-10 % pigmentov z celkového množstva nachádzajúceho sa v tylakoidnej membráne kým LHC II až 40-50%.

2.2.4. Fykobilizómy

Fykobilizómy sú polkruhovitú alebo vejárovitú pigmentovo-proteínové svetlozberné komplexy nachádzajúce sa na stromálnom povrchu tylakoidných membrán siníc a červených rias.

Ich molekulová hmotnosť je až 5-10 000 kDa a veľkosť sa pohybuje medzi 30-40 nm. Fykobiliproteíny sú základnými stavebnými jednotkami týchto antén a sú rozpustné vo vode. Je to jediná anténa, ktorá viaže bilíny, lineárne tetrapyroly. Najčastejšie má dva hlavné konštrukčné prvky a to spodné guľovité jadro (2-3) a vrchné tyče (6), (obr. 6). Jadro a tyče sú ďalej štruktúrované do terčikov s priemerom 11 nm a so stredným otvorom s priemerom 3 nm. Terčíky sú zložené z trimérov a hexamérov základných dimérov, ktoré sú zložené z α a β podjednotiek. Prenos excitácie je smerovaný cez tyče poradím fikobilínových pigmentov od fykoerytrínu (červený), cez fykocyanín (modrý), do jadra viažuceho alofykocyanín (modro-zelený), teda od pigmentov s maximálnou absorpciou pri kratšej vlnovej dĺžke k pigmentom s dlhšou vlnovou dĺžkou (E. Gantt, 1973). Absorbujú vo viditeľnej oblasti svetla medzi 450-665 nm teda medzi modrou a červenou oblasťou, v ktorej chlorofyly neabsorbujú. Vonkajšie podmienky, ako dostupnosť živín, teplota, koncentrácia solí a pH, majú zásadný vplyv na tieto antény (Grossmann 2003, Green a Parsons 2003).



Obr. 6. Schématický model fykobilizómu.

3. Fotosyntetický aparát v anoxygénej fotosyntéze

Medzi organizmy s anoxygennou fotosyntézou zaraďujeme purpurové baktérie (Gammaproteobacteria), zelené sírne baktérie, zelené nesírne (vláknité) baktérie a heliobaktérie.

3.1. Purpurové baktérie

Purpurové baktérie sú organizmy žijúce v anaeróbných vrstvách rybníkov, jazier a vodných tokov (Pfennig 1978). Fotosyntetický aparát purpurových baktérií bol predmetom intenzívneho štúdia a preto je jedným z najlepšie charakterizovaných fotosyntetických systémov fototrofných organizmov. V princípe sa skladá z dvoch typov pigmentovo-proteínových komplexov, a to z RC a svetlozberných

antén - LH (Kaplan a Arntzen 1982, Zuber a Brunisholz 1991, Stoll 1936, Smith 1938, Reed a Clayton 1968, Thornber a kol. 1983, Zuber 1986, Scheer 1988, Zuber a Cogdell 1995).

U baktérií sa vyvinula výrazná energetická hierarchia vo svetlozbernom systéme. Purpurové baktérie absorbujú svetlo v spektrálnej oblasti komplementárnej k rastlinám a riasam, najmä v oblasti vlnových dĺžok približne 500 nm, pomocou karotenoidov a nad 800 nm pomocou BChl. Svetlozberný komplex sa skladá z viacerých LH komplexov s rôznymi spektrálnymi vlastnosťami, veľkosťou a umiestnením. Väčšina purpurových baktérií, obsahuje dva typy LH, bežne označované ako B875 (LHI) a B800-850 (LH-II) komplexy v závislosti na ich *in vivo* absorpčných maximách (Thornber a kol. 1983; Zuber a Brunisholz 1991, Hawthornthwaite a Cogdell 1991). V blízkej infračervenej oblasti má LH-II dva silné absorpčné pásy, a to pri 800 a 850 nm, kým RC-LHI má jeden silný absorpčný pás pri 875 nm. LH-I sa nachádza priamo v okolí RC (Miller 1982, Walz a Ghosh 1997), zatiaľ čo LH-II, nie je v priamom kontakte s RC, ale pomáha pri prenose energie cez LH-I (Monger a Parson 1977, Sundstrom a van Grondelle 1991, van Grondelle a kol. 1994). U niektorých protobaktérií, napríklad rodu *Rhodopseudomonas* (Rps.) a rodu *Rhodospirillum* (Rs.) *molischianum* (Germeroth a kol. 1993), existuje aj tretí typ antén, LH-III. Počet LH-IIs a LH-III sa líši v závislosti od podmienok rastu, ako je intenzita svetla a teploty (Aagaard a Sistro 1972). U ďalších organizmov ako napr. *Rhodopseudomonas palustris* bol nájdený aj svetlozberný komplex LH-IV (Roszak a kol. 2003). Fotosyntetický aparát anoxygénnych fototrofných baktérií sa sústreďuje do „vchĺpenín“ plazmatickej membrány, ktoré majú podobu váčkov alebo trubíc. Významný pokrok v štúdiu fotosyntézy

nastal po stanovení trojrozmernej štruktúry reakčných centier purpurových baktérií s rozlíšením 3Å (Arnoux 1995).

3.1.1. Reakčné centrá

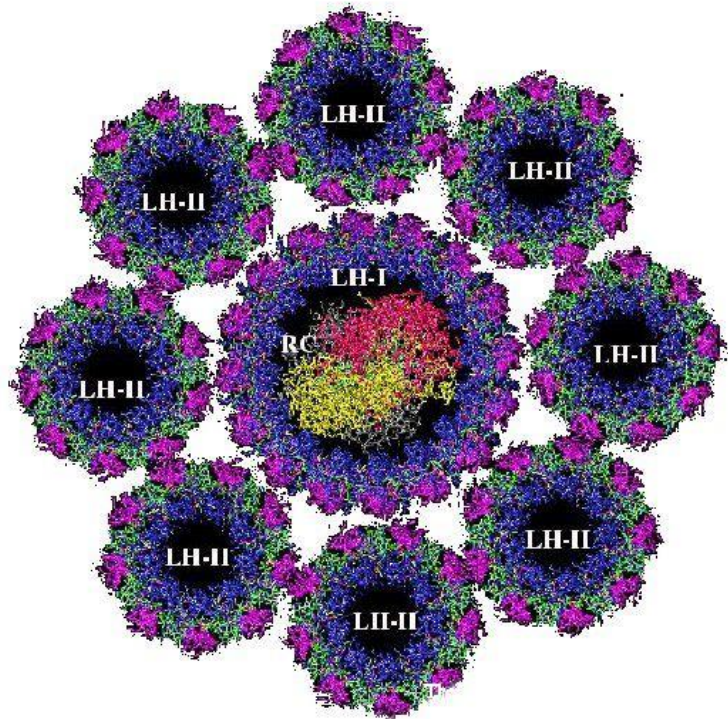
Bakteriálne reakčné centrá RC pozostávajú z troch bielkovinových podjednotiek H, M a L. Podjednotky L a M sú tvorené 5 hydrofóbnymi závitnicami, ktoré prechádzajú cez membránu. Medzi nimi sú naviazané fotosyntetické pigmenty: štyri molekuly bakteriochlorofylu (BChl), dve molekuly bakteriofeofytínu (BPheo), dve molekuly chinónov (Q_A , Q_B), ión železa a molekula karotenoidu. V RC *Rp. viridis* je namiesto bakteriochlorofylu *a* (BChl *a*), BChl *b* (Deisenhofer a kol. 1985). S výnimkou molekuly karotenoidu vykazujú kofaktory a podjednotky L a M symetrické usporiadanie podľa osi kolmej na membránu. Kofaktory tvoria dve symetrické vetvy, pigmenty aktívnej vetvy sú prevažne viazané na podjednotke M a pigmenty neaktívnej vetvy na podjednotke L. Po excitácii dochádza k separácii náboja medzi primárnym donorom špeciálneho páru molekúl BChl *a*, ktorý sa podľa maxima absorpcie označuje ako P870 a medzi primárnym akceptorom, molekulou BPheo. O molekule pomocného BChl *a*, ktorá sa nachádza medzi dimérom BChl *a* a aktívnym BPheo sa pôvodne predpokladalo, že sprostredkováva prenos elektrónu na primárny akceptor BPheo. Dnes sa predpokladá, že sa taktiež zúčastňuje na separácii náboja (Van Brederode a Van Grondelle 1999). Celkový čas separácie náboja v RC purpurových baktériách je približne 3 ps. V blízkosti molekuly BChl naviazaného na podjednotke L sa nachádza molekula karotenoidu, ktorá chráni reakčné centrum pred fotooxidáciou a zhášaním tripletných stavov primárneho donora. Sekundárnymi akceptormi elektrónov sú chinóny; Q_A sa viaže k

podjednotke M a ubichinón Q_B k podjednotke L. Medzi oboma chinónmi je koordináčne viazaný ión železa alebo mangánu. Po separácii náboja odchádza elektrón z BPheo na Q_A za asi 200 ps. Redukovaný Q_A odovzdá za ďalších asi 200 μ s elektrón Q_B . P870 + je redukovaný cytochrómom cyt b/c1 za asi 200 ns, a v iných baktériách, ktoré túto jednotku nemajú, je redukovaný pohyblivým cytochrómom c_2 za asi 20 μ s. Rovnakým spôsobom dôjde k prenosu druhého elektrónu na Q_B . Takto vzniknutý Q_B^{2-} prijme dva protóny z vodnej fázy pri cytoplazmatickom povrchu membrány a uvoľní sa do membrány. Dva protóny a dva elektróny potom prenesie na cyt b/c1 komplex, ktorý protóny vylúči do vodnej fázy pri periplazmatickom povrchu membrány. Prenesené protóny pretekajú po spáde koncentračného gradientu cez membránu a poháňajú tak ATP-syntázu. Veľa purpurových nesírnych baktérií má na donorovej strane viazané ďalšie podjednotky, ktoré sprostredkovávajú prenos elektrónov z mobilného cytochrómu c_2 na oxidovaný primárny donor. Štruktúry reakčných centier purpurových baktérií poukazujú na to, že sa reakčné centrá rôznych baktérií štruktúralne zhodujú. Väčšie rozdiely sa objavujú iba v okolí chinónov Q_B (Arnoux a Reiss-Husson, 1996). Porovnanie sekvencií peptidových reťazcov bakteriálneho reakčného centra a fotosystému II oxygennej fotosyntézy ukazuje na vzájomnú homológiu. Podjednotky D1 a D2 PSII-RC majú štruktúru v hlavných črtách identickú so štruktúrou podjednotiek L a M bakteriálneho reakčného centra. Spoločným znakom PSII a bakteriálneho RC je aj symetria medzi proteínovými podjednotkami a kofaktormi (Michel a Deisenhofer 1988, Allen a Williams 1998).

3.1.2. Svetlozberné komplexy LH

Všetky bakteriálne LH sú konštruované podobným spôsobom (Zuber 1985, Zuber a Brunisholz 1991). Základnou stavebnou jednotkou LH je heterodimér zložený z dvoch krátkych peptidov - transmembránových závitníc - bežne označovaných ako apoproteíny α a β . Tieto apoproteíny pri agregácii do heterodiméru nekovalentne viažu BChl a karotenoidy. Na heterodimér sa naviaže jeden karotenoid orientovaný pozdĺžnou osou približne kolmo k rovine membrány a tri Chl, ktoré sú orientované buď rovnobežne s membránou (emise 800 nm) alebo kolmo k nej (emise 850 nm). Niekoľko heterodimérov sa spája do veľkých oligomérov. Veľkosť komplexov LH I a LH II sa líši podľa druhu baktérie. V rôznych druhoch baktérií môže byť LH-II ako nonamér alebo oktamér. Napríklad u *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* údaje získané pomocou elektrónovej mikroskopie dokazujú, že LH-II je nonamér (Walz a kol. 1998) a u *R. molischianum* kryštálová štruktúra LH-II pri rozlíšení 2,4 Å ukázala, že ide o oktamér (Koepeke a kol. 1996), (obr. 7). Hoci zobrazovanie väčších proteínových komplexov pomocou elektrónovej mikroskopie dosiahlo v posledných rokoch veľký pokrok, dostupná technika zatiaľ neumožňuje získať detailné údaje o štruktúre týchto bielkovín. Z 2D kryštálov *Rps. rubrum* boli pomocou elektrónovej mikroskopie stanovené štruktúry RC-LHI a LH1 s rozlíšením iba 8,5 Å (Karrasch a kol. 1995). Aj preto je molekulové modelovanie cenným nástrojom na preklenutie tejto medzery v štruktúrálom rozlíšení (Schlick a kol. 1999, Hu a kol. 1998). Teoretický model 3D štruktúry z *Rb. sphaeroides* predstavuje LH1 ako hexadekamér zložený z heterodimérov podobne ako LH II (Hu a Schulten 1998). Z analýzy štruktúr LH vyplynuli dve významné charakteristické črty týkajúce sa ich architektúry: celková orientácia

pigmentov je usporiadaná do tvaru kruhu či prstencov v rámci jednotlivých komplexov LH-I a LH-II so vzájomným ko-planárnym usporiadaním (B850-LH-II a B875-LH-I) (Hu a kol. 1997; Hu a Schulten 1998).



Obr. 7. Model svetlozberných komplexov purpurových baktérií (LH I a LH II) a reakčného centra (RC). Zdroj obrázku : Theoretical Biology Group - University of Illinois at Urbana-Champaign

3.2. Zelené baktérie

Zelené baktérie predstavujú rozsiahlu skupinu organizmov, ktorá sa dá charakterizovať prítomnosťou zvláštnych svetlozberných antén, chlorozómov. V podstate je možné rozdeliť zelené baktérie na dva veľké kmene, i) zelené sírne a ii) zelené nesírne baktérie. Zelené sírne baktérie, Chlorobi - *Chlorobacteriaceae* – (Blankenship 1995) patria medzi fotoautotrofné anaeróbne baktérie, ktoré sa vyznačujú prítomnosťou reakčného centra typu I, príbuzného k fotosystému I. Zelené nesírne baktérie, často nazývané aj zelené vláknité baktérie, Chloroflexi - *Chloroflexaceae* - sú fototrofné baktérie schopné heterotrofného vývoja za prítomnosti kyslíka. (Blankenship 1995, Pierson a Castenhollz 1992, 1995) Sú charakteristické prítomnosťou feofytín-chinónového typu reakčného centra II, ktoré sa podobá na fotosystém II.

3.2.1. Reakčné centrum zelených sírnych baktérií

Zelené sírne baktérie majú zachovaný pravdepodobne najstarší Fe-S typ reakčného centra RCI, ktoré sa štruktúrne a funkčne podobá na fotosystém I – PS I. Zaujímavosťou je, že tzv. core-komplex reakčného centra sa skladá z homodiméru, teda z dvoch samostatných identických podjednotiek, na rozdiel od ostatných fotosystémov, u ktorých nachádzame heterodiméry.

Celkový počet molekúl pigmentov v týchto RC nie je presne stanovený, ale hodnoty sa pohybujú v rozpätí 25 až 40 (Blankenship 1995). Analytické merania ukazujú, že RCI obsahuje 16 molekúl BChl_a a 4 molekuly chlorofylu s makrocyclom podobným Chl *a*, ale s odlišným bočným reťazcom (Permentier a kol. 2000).

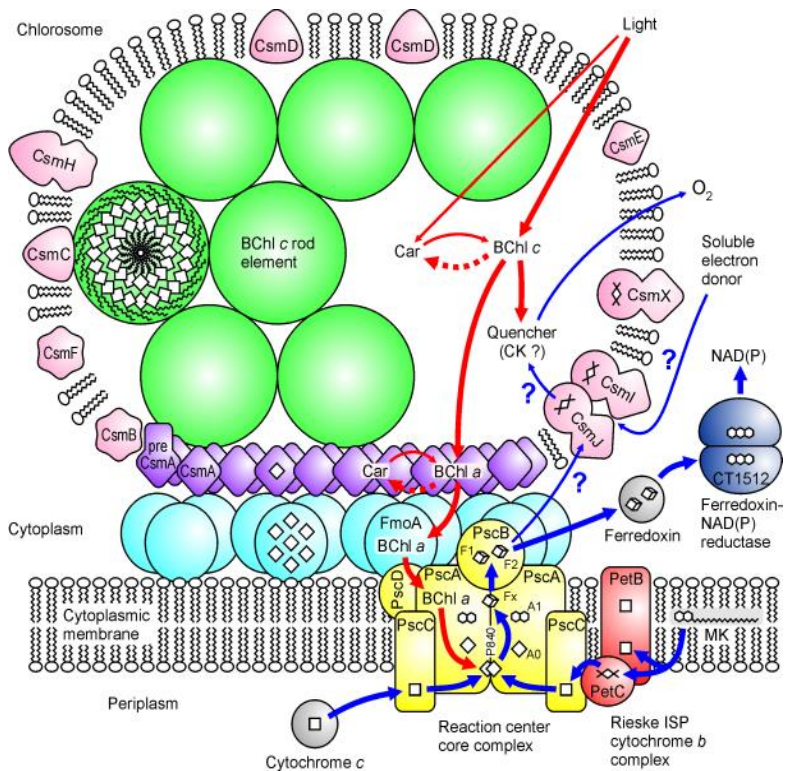
Fotosyntetické reakčné centrum obsahuje 3 [4Fe-4S] skupiny, ktoré nazývame F_x . Primárny akceptor F_x je 4Fe-4S centrum, ktorého dva atómy Fe sú naviazané na PSI-A a dva atómy na PSI-B. F_A a F_B sú sekundárne akceptory, pracujúce súčasne a oba sú viazané na proteín PSI-C.

Zdrojom elektrónov je redukovaná síra, ktorá umožňuje reakciu $PQ + 2H^+ + 2e^- + PQH_2$. V PSI sa transport elektrónov začína excitáciou P840. Elektróny sú prenášané plastocyanínom k reakčnému centru (typ I). Tu dochádza, po excitácii svetlom, k separácii náboja a elektrón, ktorý z reakčného centra prechádza na feredoxín, je v primárnom donore nahradený elektrónom z cytochrómu. Zapojením fotosystému do fotosyntetického reťazca zelených sírnych baktérií a vytvorením komplexu vyvíjajúceho kyslík (OEC) vznikla dnešná podoba oxygénnej fotosyntézy (Raymond a Blankenship 2008).

3.2.2. Chlorozómy

Príroda usporiadala fotosyntetický aparát zelených sírnych baktérií tak, aby mohol fungovať i za veľmi nepriaznivých svetelných podmienok. To je zabezpečené prítomnosťou špeciálnych fotosyntetických svetlozberných antén chlorozómov, ktoré sú schopné zachytiť dopadávajúce žiarenie s vysokou účinnosťou. Chlorozómy sú lokalizované na povrchu tylakoidnej membrány. Zaraďujeme ich medzi vonkajšie membránové antény, ktoré obsahujú obrovské agregáty bakteriochlorofylu *c* (BChl *c*), *d* alebo *e*, ďalej bakteriochlorofyl *a* (Bchl *a*), chinóny, karotenoidy, lipidy a proteíny. Jedným z predstaviteľov tejto skupiny organizmov je *Chlorobium tepidum*, ktorý žije v anaeróbných podmienkach a je schopný prežiť i v hĺbke 100 m a teda aj pri extrémne nízkej intenzite svetla a vysokom

tlaku. V jednej bunke tohto organizmu je 200 až 250 chlorozómov. Sú približne 150 x 50 x 30 nm veľké. Ich vonkajší obal je tvorený približne 3 nm hrubou monovrstvou monogalaktozyl diglyceridu (MGDG) s proteínovými molekulami s hmotnosťou 11 a 18 kDa (Blankenship a kol. 1995). Agregáty BChl sú veľké priemerne 10 nm a v závislosti od druhu organizmu tvoria rôzne usporiadané lamelárne štruktúry. Chlorozóm z *Ch. tepidum* obsahuje asi 200 000 molekúl Bchl *c*, 5000 molekúl Bchl *a*, 20 000 molekúl karotenoidu, 20 000 molekúl izoprenoidných chinónov, 5000 proteínov a 20 000 molekúl lipidov, (obr. 8). Chlorozóm baktérie *Chlorobium vibrioforme* je tvorený bakteriochlorofylom *d* (BChl *d*) a v *Chlorobium phaeobacteroides* nájdeme len bakteriochlorofyl *e* (BChl *e*). BChl *a* sa nachádza len v základnej platničke, tzv. baseplate, ktorou sa chlorozóm spája s cytoplazmatickou membránou a vo Fenna-Matthes-Olson proteínovom komplexe (FMO) (Matthews a Fenna 1980). Tento komplex je vo vode rozpustný a jeho názov vznikol zložením mien vedcov, ktorý ho izolovali a určili jeho presnú štruktúru. Základná platnička je zložená z proteínu s hmotnosťou 5,8 kDa. Každá molekula proteínu viaže 7 molekúl BChl *a*. Energia zachytená agregátmi BChl *c* a karotenoidmi sa prenáša cez FMO komplex, ktorý spája chlorozóm s membránou, až do reakčného centra (Blankenship 1995).



Obr. 8. Model chlorozómu popisujúci proces zachytávania svetla v *Ch. Tepidum*. Model zahŕňa chlorozóm, FMO komplex, a reakčné centrum v cytoplazmatickej membráne. Zdroj: Frigaard a kol. (2003) Photosynth Res

3.2.3. Pigmenty fotosyntetických zelených baktérií

Pigmenty vo fotosyntéze hrajú dôležitú úlohu. Bez nich by nebolo možné zachytiť slnečnú energiu, ktorú potrebujú bunky pre následné fotosyntetické procesy.

Väčšina zelených baktérií obsahuje BChl *a* a buď BChl *c*, BChl *d*, alebo BChl *e*, karotenoidy a chinóny. Baktériochlorofyly *c*, *d* a *e* týchto baktérií sa chemickou štruktúrou viac podobajú chlorofylom

ako BChl *a*, ktorému chýba dvojitá väzba na B kruhu medzi uhlíkom C-7 a C-8 a má acetylovú skupinu na uhlíku C-3. Obr.9. Absencia dvojitej väzby znižuje stupeň konjugácie v makrocykle a tiež znižuje symetriu molekuly v porovnaní s chlorophylom *a*. Bakteriochlorofyly majú v strede tetrapyrrolového kruhu chelatovaný ión horčíku Mg^{2+} alebo zriedkavo sa vyskytuje aj ión zinku Zn^{2+} . Ak centrálny ión chýba, nazývame túto molekulu bakteriofeofytínom. Ten je prítomný predovšetkým vo fotosyntetických reakčných centrách typu II. Takéto štrukturálne zmeny majú zásadný vplyv na spektrálne charakteristiky pigmentov. Ďalším rozlišovacím znakom je esterifikácia zbytku kyseliny propiónovej na uhlíku C-17 rôznymi alkoholmi. Neprítomnosť tohto bočného reťazca má za následok zmenu bakteriochlorofylu (bakteriofeofytínu) na bakteriochlorofylid (bakteriofeofobid). Prítomnosť rôznych substituovaných alkoholov absorpčné vlastnosti neovplyvňuje.

Nezvyčajnou črtou týchto pigmentov je ich pozoruhodná heterogénnosť v chlorozómoch. Na rozdiel od všetkých ostatných dobre definovaných pigmentov, nie je v chlorozómoch len jeden typ bakteriochlorofylu, ale skôr ide o celú skupinu chemicky príbuzných zlúčenín (Smith 1994).

Heterogénnosť bakteriochlorofylových pigmentov sa prejavuje predovšetkým rôznymi alkylovými substituentami na uhlíku C-8 a C-12. Funkcia jednotlivých substitúcií BChl v týchto organizmoch a predovšetkým v chlorozómoch nie je dosiaľ objasnená, ale je zrejmé, že týmto dochádza ku kontrole ich fyzických veľkostí a k optimalizácii absorpčných vlastností ich agregátov.

Charakteristická štrukturálna vlastnosť BChl *c*, ktorou sa odlišuje od BChl *d* je prítomnosť metylovej skupiny na uhlíku C-20. Na uhlíku C-20 má BChl *d* vodík, BChl *e* má síce na uhlíku C-20 metyl, zároveň

však má na uhlíku C-7 naviazanú aj formylovú skupinu. Obr.9. Typické absorpčné maximá *in vivo* sú okolo 740-750 nm pre BChl *c*, 725 nm pre BChl *d* a 712 nm pre BChl *e*.

Karotenoidy sú prítomné v chlorozómoch ako svetlozberné pigmenty, no taktiež zhášajú tripletné stavy bakteriochlorofylov. Sú to látky rozpustné v tukoch a nepolárnych rozpúšťadlách a zaraďujeme ich medzi terpenoidy.

U zelených sírných baktérií sú prítomné ako v chlorozómoch, tak aj v cytoplazmatickej membráne. Nachádzame v nich: chlorobakten, 1'-hydroxy, (-acyl-glucosyl) γ -karotén, hydroxy, (-acyl-glucosyl) a γ -karotén(β, ψ) β -karotén (β, β'), izorenieratén a β -izorenieratén, lykopén (ψ, ψ) neurosporén, fytoén, fytofluén, rodopin-glukozid (Caple 1978) V baktériách *Chlorobia* sú karotenoidy monocyklické a nachádzame v nich chlorobaktén, γ -karotén a ďalej ich 1', 2'-dihydro-deriváty (1', 2'-dihydrochlorobaktén a 1', 2'-dihydro – γ -karotén).

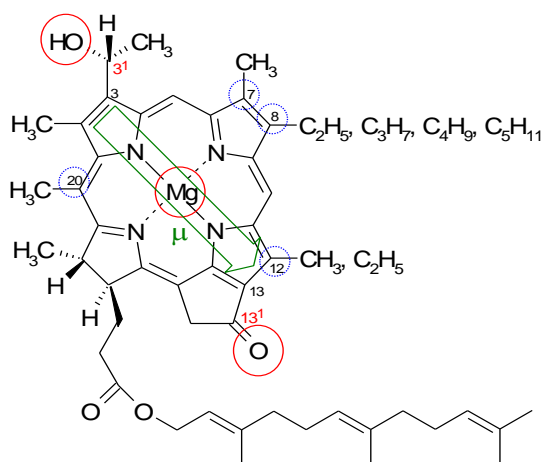
V chlorozómoch zelených sírných baktérií boli tiež nájdené izoprenoidné chinóny (Frigaard 1997). Patria medzi hydrofóbne pigmenty a sú súčasťou vnútornej skladby chlorozómu. Hlavnými chinónmi *Ch. tepida* sú chloróbiumchinón (1'-oxomenachinón – 7) a menachinón – 7 (MK-7). Oba chinóny sú prítomné aj v ostatných členoch *Chlorobiacea* ale dodnes nie je známa ich funkcia a presné umiestnenie.(Powls a kol. 1969).

3.2.4. Agregáty

Chlorozómy sa významne odlišujú od ostatných antén v prírode a to predovšetkým preto, že nejde o klasické pigmentovo-proteínové komplexy, ale antény tvorené pigmentovo-pigmentovými agregátmi.

Molekuly tvoriace tieto agregáty sú predovšetkým BChl *c*, *d* alebo *e*. Skladajú sa z polárneho tetrapyrrolového kruhu (porfyrínu), hlavy a nepolárneho bočného reťazca. Ako prvý pracoval na priestorovom modele agregátov bakteriochlorofylov A. A. Krasnovský už v roku 1959.

Schopnosť agregovať zabezpečuje pigmentom prítomnosť OH skupiny na uhlíku C3 (Smith 1983), keto-skupiny na uhlíku C13 (Lutz a kol. 1988) a centrálny atóm horčíku (Bystrova a kol. 1979, Smith 1983), (obr. 9). Ostatné baktériochlorofyly a chlorofyly ani žiadny feofytín takto agregovať nemôžu (Holzwarth a Schaffner 1994, Blankenship a kol. 1995).

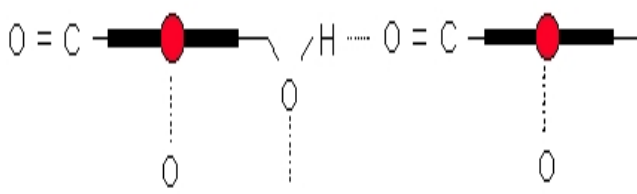


Obr. 9. Štruktúrny vzorec bakteriochlorofylu *c* (Bchl *c*)

Molekuly bakteriochlorofylov *c*, *d* alebo *e* majú tú vlastnosť, že môžu za určitých jasne definovaných podmienok tvoriť agregáty aj *in vitro*. Táto vlastnosť sa dá využiť pri tvorbe umelých svetlozberných antén,

ktoré zložením a optickými vlastnosťami pripomínajú chlorozómy zelených baktérií.

Aj keď dodnes nie je presne známa konečná štruktúra agregátov, existuje niekoľko modelov. Brune v roku 1988 navrhol 2 modely na základe meraní vo viditeľnom a IR spektre BChl *c* v bezvodom chloride uhličitom. Jeho merania ukázali, že keto- skupina jedného pigmentu sa viaže na Mg prostredníctvom OH- skupiny druhého pigmentu. Jednotlivé reťazce potom môžu vytvoriť paralelne alebo antiparalelne sa viažuce vrstvy molekúl pigmentov (obr. 10).

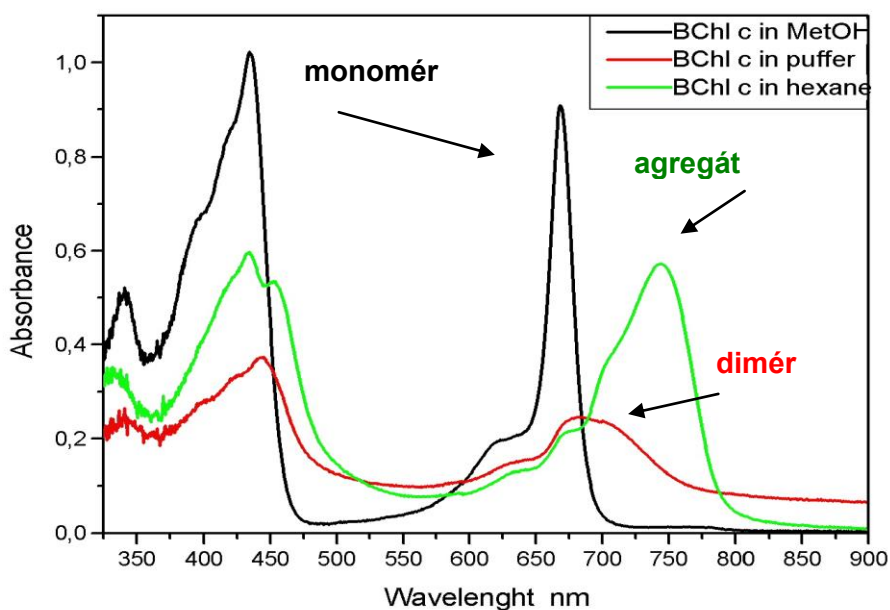


Obr. 10. Antiparalelný model vrstiev pigmentov v Bakteriochlorofylovom agregáte chlorozómu.

Paralelnú verziu modelu potvrdzujú experimenty Uehari (1991-92) a Aldena (1992). Antiparalelný model navrhol Nozawa (1990-1994). Aj v súčasnosti sú oba modely Bchl *c* agregátov aktuálne a v mnohých prípadoch sa zhodujú s výsledkami rôznych skupín, ktoré aj potvrdzujú ich správnosť. Merania na prírodných chlorozómoch *in vivo* v prácach Matsuury, Nozawy a Holzwartha potvrdzujú správnosť antiparalelného modelu (Matsuura a kol. 1993, Holzwarth a kol. 1994).

In vitro poznáme tri formy, v ktorých sa môžu BChl *c*, *d* a *e* pigmenty vyskytovať, a to ako monomér, dimér a agregát. Tieto formy závisia od toho či je prostredie polárne alebo nepolárne, ďalej či je prítomný lipid, karotenoid, chinón alebo iná nepolárna molekula. Čisté pigmenty

rozpustené v metanole alebo dichlórmetáne tvoria vždy len monoméry a majú absorpčné maximá medzi 640-670 nm. Diméry sú tvorené vo vodnom polárnom prostredí a vyznačujú sa absorpčným maximom pri 700 nm. K agregácii dochádza v nepolárnom prostredí, napríklad v hexáne, alebo v polárnom vodnom prostredí za prítomnosti lipofilných látok. Maximá bakteriochlorofylových agregátov sa posúvajú do oblasti medzi 720 až 760 nm. Tieto pozorovania ukazujú aj na dôležitú úlohu hydrofóbnej interakcie postranných ftylových reťazcov pri tvorbe bakteriochlorofylových agregátov.



Obr. 11. Absorpčné spektrum jednotlivých foriem Bakteriochlorofilu c

4. Ciele práce

Hlavným cieľom tejto práce bolo štúdium mechanizmu agregácie bakteriochlorofylu *c* (Bchl *c*) a modifikovaných foriem BChl *c* pomocou absorpčnej spektroskopie, fluorescenčnej spektroskopie a RTG spektroskopie.

Dosiahnutie hlavného cieľa predpokladalo splnenie nasledujúcich čiastkových cieľov:

1. Vyvinutie metódy na modifikáciu postranných reťazcov Bchl *c* chemickou cestou - transesterifikáciou.
2. Sledovanie vplyvu zmeny postranného reťazca na priebeh agregácie Bchl *c*.
3. Sledovanie vplyvu zmeny prostredia na priebeh agregácie pigmentu s rozličnou dĺžkou postranného reťazca v polárnych a nepolárnych rozpúšťadlách.
4. Sledovanie vplyvu dĺžky reťazcov nepolárnych rozpúšťadiel na agregáciu Bchl *c* bez chemickej modifikácie postranneho reťazca.
5. V spolupráci s ďalšími pracoviskami sledovanie vplyvu vybraných lipofilných chinónov (vitamíny K1, K2, K3) na agregáciu Bchl *c* a na zhašenie excitačného stavu Bchl *c* pomocou absorpčnej a fluorescenčnej spektroskopie.

6. Určenie vplyvu dĺžky postranného reťazca Bchl *c* na štruktúru lamelárneho usporiadania ich agregátou pomocou röntgenovej spektroskopie (SAXS a MAXS).

7. Štúdium anizotropických vlastností agregátov umelo pripravených analógov BChl *c* (3,13 Zn-ketol-porfyrin) pomocou makroskopických (absorpčná spektroskopia a spektroskopia cirkulárneho dichroizmu) a mikroskopických metód (FDLD mikroskopie) v magnetickom poli.

5. Materiál a metódy

5.1. Kultivácia baktérií *Chlorobium tepidum*

Pre kultiváciu *Ch. tepida* je najvhodnejšie modifikované Pfenningovo médium. Na prípravu 0,8 l média sú potrebné zložieniny uvedené v Tab. 1. Po rozpustení jednotlivých zložiek v destilovanej vode sa pridá 16,67 μl 0,2 % roztoku vitamínu B₁₂ a 0,834 ml roztoku mikroelementov pripraveného podľa Tab. 2. Hodnota pH sa upravuje HCl na 6,7 – 6,9. Takto pripravené médium sa dá do litrovej fľaše a nechá sa 20 minút prebublávať plynným dusíkom. Pred uzavretím gumovou zátkou sa do fľaše pridá 0,48 g Na₂S x 9H₂O a médium sa sterilizuje v autokláve 20 minút pri 100°C. Po tomto kroku je chladnuci roztok zakalený a pH je posunuté na hodnotu cca 7,2. Hodnota pH sa sterilne upraví roztokom 10 % HCl na pôvodnú hodnotu 6,7 – 6,9. Pred očkovaním kultúry *Ch. tepida* odoberieme z fľaše 20 ml média a nahradíme ho rovnakým objemom bakteriálnej kultúry.

Bunky baktérie *Chlorobium tepidum* boli kultivované po dobu 3 dní vo vodnej nádržke pri teplote vody 48°C. Optimálne je konštantné osvetlenie 60 W halogénovou žiarovkou, kedy na povrchu fľaše je približne 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po 3 dňoch bola fľaša s čerstvou kultúrou otvorená a bunky centrifugované 60 minút pri 10000 g. Pelet bol rozdelený na alikvóty po 2 ml, zamrazený a skladovaný pri -60°C.

Tabuľka 1. Modifikované Pfenningovo médium

Zlúčenina	Hmotnosť [g] (na 800 ml média)
NaHCO_3	1,667
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,833
KH_2PO_4	0,417
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,416
NaCl	0,334
NH_4Cl	0,334
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,167
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,042
EDTA	0,0104

Tabuľka 2. Mikroelementy

Zlúčenina	Množstvo na 1L
EDTA	6,7 g
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	190 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	190 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	150 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{VOSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	30 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	17 mg
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	3,2 mg
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
H_3BO_3	6 mg

5.2. Izolácia chlorozómov z *Chlorobium tepidum*

Bunky sa prevedú do Tris/KSCN tlmivého roztoku (50 mM Tris pH 8, 2M KSCN) a rozbijú sa pomocou French-pressu pri tlaku približne 12000 KPa. Potom sa bunky centrifugujú 10 min pri 10 000 g. Supernatant sa naniesie na diskontinuálny sacharózový gradient z Tris/KSCN tlmivého roztoku s koncentráciou sacharózy 35%, 25% a 15% v jednotlivých vrstvách. Gradient sa centrifuguje pri 37-40 000 rpm (Ti70, Beckman) cez noc. Zóna medzi 15 a 25% sacharózy sa odoberie a zmieša sa so sacharózou tak, aby výsledná koncentrácia sacharózy bola 50%. Pripraví sa diskontinuálny gradient z 25%, a 15% sacharózy v Tris/KSCN tlmivom roztoku a čistého tlmivého roztoku bez sacharózy. Tento gradient sa podvrství vzorkou s 50% sacharózou. Opäť sa centrifuguje cez noc pri rovnakých podmienkach ako v predchádzajúcom kroku. Prečistené chlorozómy sa odoberú zo zóny medzi 25 a 15% sacharózou.

5.3. Extrakcia pigmentov (*Chlorobium tepidum*)

Celý proces extrakcie a izolácie musí prebehnúť v čo najkratšom časovom intervale, pri nízkej teplote a pri minimálnom osvetlení pigmentov.

Po rozmrazení sú celé bunky centrifugované pri 9000 rpm po dobu 2 minút. V prvom kroku sa takto získaný sediment doplní zmesou acetón : metanol (7: 2). Pomocou vortexu sa zmes homogenizuje a opätovne centrifuguje. Supernatant sa po tomto kroku uchová a prvý krok sa opakuje až kým nie sú zo sedimentu vymyté všetky pigmenty.

V druhom kroku sa k 10 ml supernatantu primieša 20 ml zmesi petroléter: dichlórmetán (9:1) a 90 ml 1M NaCl. Táto zmes sa naleje

do separačnej banky, premieša a nechá postáť 10 minút. Vytvorí sa 2 fázy; spodná sa z banky vypustí a k hornej sa pridá opäť 90 ml 1M NaCl. Tento krok sa 2 až 3-krát opakuje. Vrchná fáza obsahuje hlavne petroléter, dichlormetán a úplný pigmentový extrakt. Takto extrahované pigmenty sa vysušia dusíkom od organických rozpúšťadiel a uchovávajú sa v tme pri -60°C .

V prípade, že je potrebné oddeliť Bchl *c* od karotenoidov, pridá sa k vysušenému pigmentovému extraktu hexán, ktorým sa vymyjú karotenoidy a Bchl *c* zostane nerozpustený na stenách nádoby. Tento proces opakujeme pokiaľ nie je hexánová fáza bezfarebná. Nakoniec sa Bchl *c* a karotenoidy vysušia dusíkom a uchovávajú v inertnom prostredí v tme pri -60°C .

5.4. Izolácia a purifikácia Bchl *c*

Vysušený celkový extrakt pigmentov sa rozpustí v metanole a prefiltruje cez $0,22\ \mu\text{m}$ filter aby sa zabránilo znečisteniu chromatografickej kolóny. Na purifikáciu čistého Bchl *c* sa používa metóda chromatografie na reverznej fáze. HPLC (high performance liquid chromatography) aparátúra Waters sa skladala z troch častí; z Pump Controller 600 (riadiaca jednotka), Delta 600 (nástreková jednotka) a PDA 996 detektor (Photodiode Array detektor). Semipreparatívna kolóna bola naplnená nosičom SGX C18 ($7\ \mu\text{m}$, $8 \times 250\ \text{mm}$, Tessek, Česká republika). Na kolónu sa nanášalo $100\ \mu\text{l}$ vzorky. Pigmenty boli separované gradientovým vymývaním pri prietoku $2\ \text{ml/min}$. Do 10. minúty sa kolóna vymývala roztokom 100 % metanolu, medzi 10 a 11 minútou sa lineárnym gradientom vymenil roztok metanolu za zmes metanol-hexan 4:1, ktorým sa kolóna vymývala do 45. minúty. Pred ďalším nástrekom sa kolóna vždy 15

minút ekvilibrovala 100% roztokom metanolu. Hlavné homology Bchl *c* boli nazbierané spolu, vysušené dusíkom a skladované pri – 60°C.

5.5. Optimalizácia prípravy rôznych bakteriochlorofilidov

Všetky bakteriochlorofylidy boli pripravené z Bchl *c* prečisteného pomocou HPLC. Bchl *c* bol modifikovaný pomocou chemickej transesterifikácie. Vysušené pigmenty boli rozpustené v 150 µl reakčnej zmesi, ktorá obsahovala 0,1 % KOH a príslušný alkohol podľa požadované dĺžky vedľajšieho reťazca (metanol, etanol, butanol, prenil, geranol, heptanol, hexanol, oktanol, dekanol a dodekanol). Nasledovala inkubácia vo vodnom kúpeli pri 30°C po dobu 30 minút. Po uplynutí tejto doby sa zmes opäť naniesla na semipreparatívnu kolónu SGX C-18 (7 µm, 8· x 250 mm, Tessek, Česká republika) pripojenú k HPLC systému Waters (Waters, USA). Zmes bakteriochlorofilov a bakteriochlorofilidov (Bchlid) bola rozdelená pomocou izokratickej elúcie 100% metanolom pri rýchlosti prietoku 2 ml/min. Celý proces purifikácie prebiehal pri izbovej teplote. Po zbere sa vzorky vysušili a do ďalšieho použitia skladovali pri -20 °C.

5.6. Príprava dimérov a umelých agregátov vo vodnom prostredí

Pigmenty sa rozpustia vo veľmi malom objeme metanolu. Roztok 10 µl pigmentov sa pomaly za stáleho intenzívneho miešania vstrekuje do skúmavky s 3ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, pričom vznikajú diméry. Pri tvorbe agrerátov sa k metanolovému roztoku pigmentov pridá lipid

monogalaktozyl diglycerid (MGDG, Sigma, USA) do konečnej koncentrácie 40 μM a rovnakým spôsobom ako v predchádzajúcom prípade, sa vzorka vstrekuje do 3ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Výsledná koncentrácia Bchl *c* v roztoku je približne 20 μM . Tvorba agregátov sa pozoruje pomocou absorpčnej spektroskopie pri izbovej teplote.

5.7. Príprava umelých agregátov v alkánoch

V alkánoch sa vzorky pripravujú podobne, až na to, že sa pigmenty nerozpúšťajú v metanole ale v dichlórmetáne CH_2Cl_2 . Aj najmenšia kontaminácia pigmentu metanolom môže dramaticky ovplyvniť výsledok agregácie. Agregáty sa pripravujú tak, že sa 10 μl pigmentov rozpustených CH_2Cl_2 pomaly za stáleho intenzívneho miešania vstrekuje do 3 ml alkánu (hexánu, oktánu, dekánu, dodekánu, tetradekánu a hexadekánu). Pre kontrolu sa 10 μl pigmentu vstrekuje aj do metanolu pre stanovenie celkovej koncentrácie. Výsledná koncentrácia Bchl *c* v roztoku je približne 20 μM . Pripravené agregáty sa kontrolujú pomocou absorpčnej spektroskopie pri izbovej teplote..

5.8. Absorpčná spektroskopia

Absorpčné spektrá boli merané pomocou spektrofotometra Spectronic Unicam UV-300 (Cambridge, UK) v sklenenej kyvete s optickou dráhou 1cm pri izbovej teplote.

6. Zoznam literatúry

Aagaard, J.; Sistrom, W.R. **1972**. Control of synthesis of reaction center bacteriochlorophyll in photosynthetic bacteria. *Photochem Photobiol* 15, 209–225.

Alden, R.G; Lin S.H and Blankenship, R.E. **1992**. Theory of spectroscopy and energy transfer of oligomeric pigments in chlorosome antennas of green photosynthetic bacteria. *J Lumin* 51, 51–66

Allen, J.F. **2004**. Cytochrome b6f: Structure for signalling and vectorial metabolism. *Trends Plant Sci.* 9, 130–137.

Allen, J.P. ; Williams, J.C. **1998**. Photosynthetic reaction centers, 438, 1–2, 5–9.

Andersson, B.; Anderson, J.M. **1980**. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 593, 2, 427–440.

Arnoux, B.; Gaucher, J.F.; Ducruix, A.; Reiss-Husson, F. **1995**. Structure of the photochemical reaction centre of a spheroidene-

containing purple-bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* Y, at 3 Å resolution. *Acta Cryst. D***51**, 368-379.

Arnoux, B.; Reiss-Husson, F. **1996**. Pigment-protein interactions in *Rhodobacter sphaeroides* Y photochemical reaction center; comparison with other reaction center structures, *Eur.Biophys. J.* *24*, 233-242.

Avenson, T.J.; Cruz, J.A.; Kanazawa, A.; Kramer, D.M. **2005**. Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9709–9713

Barber, J. **1998**. Photosystem two. *Biochim. Biophys. Acta* *1365*, 269-277.

Barzda, V.; Mustardy L.; Garab, G. **1994**. Size Dependency of Circular Dichroism in Macroaggregates of Photosynthetic Pigment-Protein Complexes. *Biochemistry* *33*, 10837–10841.

Ben-Shem, A.; Frolow, F.; Nelson, N. **2003**. Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* *426*, 630–635

Blankenship, R.E. **2002**. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. (*Oxford: Blackwell Science*). 95-123.

Blankenship, R.; Madigan, M.T.; Bauer, C.E. (eds). 1995. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria.(Advances in Photosynthesis and Respiration), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Butler, P. J. G.; Kuhlbrandt, W. **1988**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3797-3801.

Bystrova, M.I.; Mal'gosheva, I.N.; Krasnovskii, A.A. **1979**. Study of molecular mechanism of self-assembly of aggregated forms of BChl c. *Mol Biol (English Trans)* 13: 582–594.

Caple, M.B.; Chow, H.; Strouse Ch.E. **1978**. Photosynthetic Pigments of Green Sulfur Bacteria The esterifying alcohols of bacteriochlorophylls c from *Chlorobium Limicola* . *J. Biolog. Chem.* 253, 6730-6737.

Castelletti, S.; Morosinotto, T.; Robert, B.; Caffarri, S.; Bassi, R.;Croce, R. **2003**. Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the photosystem I antenna system. *Biochemistry* 42, 4226–4234.

Croce, R.; Canino, G.; Ros, F.; Bassi, R. **2002**. Chromophore Organization in the Higher-Plant Photosystem II Antenna Protein CP26. *Biochemistry* 4, 7334–7343.

Crofts, A.R. **2004**. The Q-cycle: a personal perspective. *Photosynth. Res.* *80*, 223-243.

Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. **1985**. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* *318*, 618–624.

Dekker, J.P.; Boekema E.J. **2005**. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* *1706*, **1-2** .12–39.

Durrant, J. R., Klug, D. R., Kwa, S. L. S., Van Grondelle, R., Porter, G. and Dekker, J. P. **1995**. A multimer model for P680, the primary electron donor of photosystem II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* *92*, 4798–4802.

Ferreira, K.N.; Iverson, T.M.; Maghlaoui, K.; Barber, J., and Iwata, S. **2004**. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* *303*, 1831–1838.

Frank, H.A.; Cua, A.; Chynwat, V.; Young, A.; Gosztola, D.; Wasielewski, M.R. **1994**. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosyn Res.* *41*, **3**, 389-395.

Frigaard, N.U.; Takaichi, S.; Hirota, M.; Shimada, K.; Matsuura, K. **1997**. Quinones in chlorosomes of green sulfur bacteria and their role in the redox-dependent fluorescence studied in chlorosome-like bacteriochlorophyll c aggregates. *Archives of Microbiology* 167, **6**, 343-349.

Frigaard, N.U.; Bryant, D. **2004**. Seeing green bacteria in a new light: genomics-enabled studies of the photosynthetic apparatus in green sulfur bacteria and filamentous anoxygenic phototrophic bacteria. *Arch. Micro.* 182, 265-276.

Fromme, P.; Yu, H.Q.; DeRuyter, Y.S.; Jolley, C.; Chauhan, D.K.; Melkozernov, A.; Grotjohann, I. **2006**. Structure of Photosystem I and II. *Comptes Rendus Chimie* 9, 188-200.

Garab, G.; Faludi-Daniel, A.; Sutherland, J.S.; Hind, G. **1988**. Macroorganization of chlorophyll a/b light-harvesting complex in thylakoids and aggregates: information from circular differential scattering. *Biochemistry* 27, 2425-2430.

Gantt, E.; Lipsschultz, C.A. **1973**. Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta* 292, 858-861.

Germeroth, L.; Lottspeich, F.; Robert, B.; Michel, H. **1993**. Unexpected similarities of the B800-850 light-harvesting complex

from *Rs. molischianum* to the B870 light-harvesting complexes from other purple photosynthetic bacteria. *Biochemistry* 32, 5615–5621.

Gobets, B.; Van Grondelle, R. **2001**. Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1507, 80-99.

Green, B.R., and Parson, W.W. **2003**. Light Harvesting Antennas in Photosynthesis. (*Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers*).

Grossmann, A.R. **2003**. A molecular understanding of complementary chromatic adaptation. *Photosynthesis Research* 76, **1-3**, 207-215.

Grotjohann, I.; Jolley, C.; Fromme, P. **2004**. Evolution of Photosynthesis and oxygen evolution: implications from the structural comparison of Photosystems I and II. *Phys Chem Chem Phys* 6, 4743-4753 .

Hankamer, B.; Nield, J.; Zheleva, D.; Boekema, E.; Jansson, S.; Barber, J. **1997**. Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur. J. Biochem.* 243, 422–429.

Hawthornthwaite, A.M.; Cogdell, R.J. **1991**. Bacteriochlorophyll-binding proteins. (H. Scheer (Ed.), *The Chlorophylls*, CRC, Boca Raton, FL, 493–528.

Holzwarth, A.R.; Schaffner, K. **1994**. On the structure of bacteriochlorophyll molecular aggregates in the chlorosomes of green bacteria. A molecular modeling study. *Photosynth Res* 41, 225–233.

Hope, A.B. **2000**. Electron transfers amongst cytochrome *f*, plastocyanin and Photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1456, 5–26 .

Hu, X.; Schulten, K. **1997**. Pigment organization of bacterial photosynthetic membrane and dynamics of energy transfer. *Biophys. J.* 72, p. A125

Hu, X.; Schulten, K. **1998**. Model for the light-harvesting complex I (B875) of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys J* 75, 683–694

Chitnis, P.R. **1996**. Photosystem I. *Plant Physiol.*, 111, 661–669.

Jansson, S. **1994**. The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 1–19.

Jansson, S.; Gustafsson, P. **1990**. Type I and Type II genes for the chlorophyll *a/b*-binding protein in the gymnosperm *Pinus sylvestris* (Scots pine): cDNA cloning and sequence analysis. *Plant Mol Biol* 14, 287-296.

Jensen, P.E.; Bassi, R.; Boekema, E.J.; Dekker, J.P.; Jansson, S.; Leister, D.; Robinson, C.; Scheller, H.V. **2007**. Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 335–352.

Jordan, P.; Fromme, P.; Witt, H.T.; Klukas, O.; Saenger, W. and Krauss, N. **2001**. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, 909–917.

Kamiya, N.; Shen, J.R. **2003**. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98–103.

Kaplan, S. ; Arntzen, C.J. **1982**. Energy Conversion by Plants and Bacteria. (Photosynthesis LBTM-CNRS edition), Govindjee (Ed.), *Academic Press*, 65–152.

Karrasch, S.; Bullough, P.A.; Ghosh, R. **1995**. The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *EMBO J.* 14, 631–638.

Koepke, J.; Hu, X.; Muenke, C.; Schulten, K.; Michel, H. **1996**. The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*. *Structure* 4, 581–597.

Kurisu, G.; Zhang, H.; Smith, J.L. and Cramer, W.A. **2003**. Structure of the cytochrome b6/f complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the cavity. *Science* 302, 1009–1014.

Kühlbrandt, W.; Wang, D.N.; Fujiyoshi, Y. **1994**. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614–621.

Liu, Z.; Yan, H.; Wang, K.; Kuang, T.; Zhang, J.; Gui, L.; Xiaomin An, X.; Chang, W. **2004**. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428, 287–292.

Lutz, M.; Van Brakel, G. **1988**. Ground-state molecular interactions of bacteriochlorophyll c in chlorosomes of green bacteria and in model systems: A resonance Raman study. In: Olson JM, Ormerod JG, Atnesz J, Stackebrandt E and Trüper HG (eds) Green Photosynthetic Bacteria, *Plenum Press, New York*, 23–34.

Matthews, B.W.; Fenna, R.E. **1980**. Structure of a green bacteriochlorophyll protein. *Acc. Chem. Res.* 13, 309–317.

Matsuura, K.; Hirota, M.; Shimada, K.; Mimuro, M. **1993**. Spectral forms and orientation of bacteriochlorophylls and in chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Photochem Photobiol* 57: 92–97

Melkozernov, A.N.; Kargul, J.; Lin, S.; Barber, J.; Blankenship, R.E. **2005**. Spectral and Kinetic Analysis of the Energy Coupling in the PS I–LHC I Supercomplex from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* at 77 K. *Photosyn. Res.* 86, 1-2, 203-216

Miller, K.R. **1982**. Three-dimensional structure of a photosynthetic membrane. *Nature* 300, 53–55.

Michel, H.; Deisenhofer, J. **1988**. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochemistry* 27, 1-7 .

Morosinotto, T.; Breton, J.; Bassi R.; Croce R. **2003**. The Nature of a Chlorophyll Ligand in Lhca Proteins Determines the Far Red Fluorescence Emission Typical of Photosystem I*. *J. Biol. Chem* 278, 49223–49229.

Monger, T.G.; Parson, W.W. **1977**. Singlet-triplet fusion in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. A probe of the

organization of the photosynthetic apparatus. *Biochim Biophys Acta*. 460, 393–407.

Mustardy, L; Garab, G. **2003**. Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place . *Trends Plant Sci*, 8, 117-122.

Nozawa, T.; Noguchi, T.; Tasumi, M. **1990**. Resonance Raman studies on the structure of bacteriochlorophyll c in chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus*. *J Biochem* 108, 737–740.

Nozawa, T.; Suzuki, M.; Kanno, S.; Shirai, S. **1990**. CP/MAS ¹³C-NMR studies on the structure of bacteriochlorophyll c in chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus*. *Chem Lett*.,1805–1808.

Nozawa, T.; Suzuki, M.; Ohtomo, K.; Morishita, Y.; Konami, H.; Madigan, M.T. **1991**. Aggregation structure of bacteriochlorophyll c in chlorosomes from *Chlorobium tepidum*. *Chem Lett*, 1641–1644.

Nozawa, T.; Ohtomo, K.; Suzuki, M.; Morishita, Y.; Konami, H. **1992**. CP/MAS ¹³C NMR studies on antenna structure in green bacteria. In: Murata N (ed) *Research in Photosynthesis*, *Kluwer, Dordrecht*, 97–100.

Nozawa, T.; Ohtomo, K.; Takeshita, N.; Morishita, Y.; Madigan, M. **1992**. Substituent effects on the aggregation of bacteriochlorophyll d

homologues purified from *Chlorobium limicola*. *Bull Chem Soc Jpn* 65, 3493–3494.

Nozawa, T.; Ohtomo, K.; Suzuki, M.; Morishita, Y.; Madigan, M.T. **1993**. Structures and organization of bacteriochlorophyll c's in chlorosomes from a new thermophilic bacterium *Chlorobium tepidum*. *Bull Chem Soc Jpn* 66, 231–237.

Nozawa, T.; Ohtomo, K.; Suzuki, M.; Nakagawa, H.; Shikama, Y.; Konami, H.; Wang Z.Y. **1994**. Structures of chlorosomes and aggregated BChl c in *Chlorobium tepidum* from solid state high resolution CP/MAS ¹³CNMR. *Photosynth Res* 41, 211–223.

Olson, J.M. **2004**. The FMO protein. *Photosynth. Res.*, 80, 181-187.

Osyczka, A.; Moser, Ch.C.; Dutton P.L. **2005**. Fixing the Q cycle. *Trends Biochem. Sci.* 30, 176–182.

Permentier, H.P.; Schmidt, K.A.; Kobayashi, M.; Akiyama, M.; Hager-Braun, C.; Neerken, S.; Miller, M.; Ames, J. **2000**. Composition and optical properties of reaction center core complexes from the green sulfur bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium tepidum*. *Photosynth Res* 64, 27–39.

Portis, A.R.; Martin, A.; Parry, J. **2007**. Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective, *Photosyn. Res.*

Pfennig, N. **1978**. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria, Chap. 1 R.K Clayton, W.R Sistrom (Eds.), *Photosynthetic Bacteria, Plenum Press*, 3–16.

Pierson, B.K.; Castenholz, R.W. **1992**. The family Chloroflexaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH (eds) *The Prokaryotes*. 2nd ed, *Springer-Verlag, New York*, 3754–3774.

Pierson, B.K.; Castenholz, R.W. **1995**. Taxonomy and physiology of filamentous anoxygenic phototrophs, In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. *Dordrecht: Kluwer*, 31±47.

Powls, R.; Wong, J.; Bishop, N.I. **1969**. Electron transfer component of wildtype and photosynthetic mutant strains of *Scenedesmus obliquus*. *Biochim. Biophys. Acta* 180, 490-99.

Raymond, J.; Blankenship, R.E. **2008**. The origin of the oxygen-evolving complex, *Coord. Chem. Rev.* 252, 377–383.

Reed, D.W.; Clayton, R.K. **1968**. Isolation of a reaction center fraction from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem Biophys Res Commun* 30, 471–475.

Roszak, A.W.; Howard, T.D.; Southall, J.; Gardiner, A.T.; Law, C.J.; Isaacs, N.W.; Cogdell, R.J. **2003**. Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*. *Science* 302, 1969-1972.

Smith, E.L. **1938**. Solution of chlorophyll-protein compounds (phylochlorins) extracted from spinach. *Science* 88,170–172.

Smith, K.M.; Kehres, L.A.; Fajer, J. **1983**. Aggregation of the bacteriochlorophylls *c*, *d*, and *e*. Models for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria. *J Am Chem Soc* 105, 1387–1389.

Smith, K.M. **1994**. Nomenclature of the bacteriochlorophylls *c*, *d* and *e*. *Photosynth Res* 41, 23–26.

Scheer, H. **1988**. Plant Pigments ,in: H.-P. Köst (Ed.), CRC Handbook of Chromatography, 1CRC press, *Boca Raton* , 235–308

Scheer, H.; Beese, D.; Steiner, R.; Angerhofer, A. **1988**. The Photosynthetic Bacterial Reaction Center - Structure and Dynamics, in: J. Breton, A. Verméglio (Eds.), Series A: *Life Sciences Plenum Press, New York*, 103–114.

Schlick, T.; Skeel, R.; Burger, A.; Kale, L.; Board, J.; Hermans, J.; Schulten, K. **1999**. Algorithmic challenges in computational molecular biophysics. *J. Comp. Phys.* 151, 9-48.

Stoll, A. **1936**. Zusammenhänge zwischen der Chemie des Chlorophylls und seiner Funktion in der Photosynthese. *Naturwissenschaften* 24, 53–59.

Stroebel, D.; Choquet, Y.; Popot, J.L. and Picot, D. **2003**. An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature* 426, 413–418.

Sundstrom, V., and R. van Grondelle. **1991**. Dynamics of excitation energy transfer in photosynthetic bacteria. In Chlorophylls. H. Scheer, editor. CRC Handbook, *CRC Press, Boca Raton, FL*. 1125-1152.

Thornber, J.P.; Cogdell, R.J.; Pierson, B.K.; Seftor, R.E.B. **1983**. Pigment-protein complexes of purple photosynthetic bacteria: an overview. *J Cell Biochem* 23, 159–169.

Uehara, K.; Ozaki, Y.; Okada, K.; Olson, J.M. **1991**. FT-IR studies on the aggregation of bacteriochlorophyll c from *Chlorobium limicola*. *Chem Lett*, 909–912.

Uehara, K.; Olson, J.M. **1992**. Aggregation of bacteriochlorophyll c homologs to dimers, tetramers, and polymers in water-saturated carbon tetrachloride. *Photosynth Res* 33, 251–257.

Umena, Y.; Kawakami, K.; Shen, J.-R., Kamiya, N. **2011**. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473, 55-60.

Van Brederode, M.E.; Van Grondelle, R. **1999**. New and unexpected routes for ultrafast electron transfer in photosynthetic reaction centers. *FEBS Lett.*, 455 , 1–7.

Van Grondelle, R.; Dekker, J.P.; Gillbro, T.; Sundström, V. **1994**. Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1187, 1–65.

Walz, T.; Jamiesona, S.J.; Bowersa, C.M.; Bullougha, P.A.; Huntera, C.N. **1998**. Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Å, LH1 and RC-LH1 at 25 Å. *Journal of Molecular Biology* 282, 833–845

Walz, T.; Ghosh, R. **1997**. Two-dimensional crystallization of the light-harvesting I-reaction centre photounit from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Mol. Biol.* 265, 107–111.

Zouni, A.; Witt, H.T.; Kern, J.; Fromme, P.; Krauss, N.; Saenger, W.; Orth, P. **2001**. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409, 739–743.

Zuber, H.; Brunisholz, R.A. **1991**. Structure and function of antenna polypeptides and chlorophyll-protein complexes: Principles and variability. In: Scheer H (ed) *Chlorophylls*, CRC Press, Boca Raton, 627–703.

Zuber, H. **1986**. Primary structure and function of the light-harvesting polypeptides from cyanobacteria, red algae and purple photosynthetic bacteria. In: Staehelin LA and Arntzen CJ (eds) Photosynthesis III. Photosynthetic Membranes and Light-Harvesting Systems, *Encyclopedia of Plant Physiol*, Springer, Berlin, 238–251.

Zuber, H.; Cogdell, R. **1995**. Structure and organisation of purple bacterial antenna complexes. In: Blankenship R, Madigan M and Bauer C (eds) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, 315–348.

Zuber, H. **1985**. Structure and function of light-harvesting complexes and their polypeptides. *Photochem Photobiol* 42, 821–844.

Zuber, H.; Brunisholz, R.A. **1991**. Structure and function of antenna polypeptides and chlorophyll-protein complexes: Principles and variability. In: Scheer H (ed) Chlorophylls, *CRC Press, Boca Raton*, 627–703.

7. Výsledky

Výsledky mojej práce boli publikované v štyroch článkoch :

1. The length of esterifying alcohol affects the aggregation properties of chlorosomal bacteriochlorophylls. **Zupcanova A**, Arellano JB, Bina D, Kopecky J, Psencik J, Vacha F, Photochem. Photobiol., 2008, 84, 1187-1194
2. The lamellar spacing in self-assembling bacteriochlorophyll aggregates is proportional to the length of the esterifying alcohol. Psencik J, M. Torkkeli A, **Zupcanova A**, Vacha F, Serimaa RE, Tuma R Photosynth. Res., 2010, 104, 211-219
3. Effect of quinones on formation and properties of bacteriochlorophyll c aggregates. Alster J, **Zupcanova A**, Vacha F, Psencik J Photosynth. Res., 2008, 95, 183-189
4. Anisotropic organization and microscopic manipulation of self-assembling synthetic porphyrin micro-rods that mimic chlorosomes, bacterial light-harvesting systems. Chappaz-Gillot C, Marek PL, Blaive BJ, Canard G, Bürck J, Garab G, Hahn H, Jávorfí T, Kelemen L, Krupke R, Mössinger D, Ormos P, Reddy CM, Roussel C, Steinbach G, Szabó M, Ulrich AS, Vanthuyne N, Vijayaraghavan A, **Zupcanova A**, Balaban TS J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 944-954

V článku 1 sme sa zaoberali štúdiom mechanizmu agregácie bakteriochlorofylu *c* (BChl *c*) v závislosti od modifikácie jeho bočného

reťazca a vplyvu prostredia. Vyvinuli sme metódy na prípravu série pigmentov (X-BChlide *c*) s modifikovaným bočným reťazcom chemickou cestou a meranie agregácií týchto pigmentov.

V priebehu práce bolo nutné nájsť správnu koncentráciu KOH pre transesterifikačnú reakciu. Príliš vysoká koncentrácia spôsobuje úplné odstránenie bočného reťazca, pri nízkej koncentrácii je malý výtťažok reakcie. Vyskúšali sme koncentrácie 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05% a na základe HPLC analýz sme zistili, že najvhodnejšia koncentrácia KOH je 0,1% v príslušnom alkohole. Táto koncentračná závislosť bola odskúšaná pre všetky použité alkoholy (metanol, etanol, butanol, prenil, geranol, heptanol, hexanol, oktanol, dekanol a dodekanol). Dodekanol je posledný v rade alkoholov, ktorý je pri laboratórnej teplote v kvapalnom stave a technicky je C12 maximálna dĺžka bočného reťazca BChl *c* dosiahnuteľná transesterifikáciou. Z analýz sme ďalej zistili, že nie je možné oddeliť spoľahlivo BChl *c* od Do-BChlide *c*, pretože ich retenčné časy sa prekrývajú. Preto sme Do-BChlide *c* nepripravovali z BChl *c* ako ostatné modifikované X-B Chlide *c*, ale z Me-BChlide *c*, teda opakovanou transesterifikáciou.

Po inkubácii pigmentu BChl *c* v reakčnej zmesi boli oddelené jednotlivé zložky derivátu na HPLC kolóne (C18). Výsledný chromatogram je zobrazený na obrázku č. 1 v článku 1. Pozorované retenčné časy zodpovedajú očakávanej polarite derivátov. Pre presnejšiu identifikáciu a kontrolu sme pripravené deriváty podrobili analýze na hmotnostnom spektrofotometri. Experimentálne molekulové hmotnosti sa zhodovali s teoretickými, čím bola identita derivátov X-BChlide *c* potvrdená, článok 1 tabuľka 1. V polárnom prostredí sme pozorovali vyššiu tendenciu k tvorbe dimérov u dlhších postranných reťazcov modifikovaných X-BChlide *c*, zatiaľ čo X-BChlide *c* s kratším bočným reťazcom ostávali prevažne v monomérskej forme, obrázok č. 2 v článku 1. Efekt

pripisujeme hydrofóbnej interakcii medzi bočnými reťazcami molekúl X-BChlide *c*. V nepolárnom prostredí hexánu sa prejavila agregácia medzi molekulami pigmentov pri všetkých X-Bchlide *c*, ale proces agregácie bol pomalší v prípade molekúl s dlhším modifikovaným bočným reťazcom, obrázok č. 3 v článku 1. Okrem toho sme skúmali vplyv dĺžky molekuly rozpúšťadla (n-alkánu) na agregáciu BChl *c*. Výsledok je na obrázku č. 4 v článku 1, kde je vidieť spomalenie procesu agregácie pigmentu s rastúcou dĺžkou molekuly rozpúšťadla. Všetky výsledky ukazujú, že hnacou silou vo vodnom prostredí sú hydrofóbne interakcie a v nepolárnom prostredí hydrofilné interakcie. Mojim hlavným príspevkom bolo vyvinutie metódy a väčšina experimentálnej práce.

V článku 2 sme študovali vplyv dĺžky bočného reťazca X-BChlide *c* na štruktúru lamelárneho usporiadania ich agregátov pomocou röntgenovej spektroskopie (SAXS a MAXS).

V prvom rade sme overili zjednodušený model chlorozómu vytvorený agregáciou BChl *c* v hexáne. Röntgenovou spektroskopiou bola potvrdená štruktúrna zhoda medzi modelovým systémom a prírodným chlorozómom. Na základe tohto poznatku sme pripravili sériu agregátov X-BChlide *c* (Methyl-BChlide *c*, Buthyl-BChlide *c*, Octhyl-BChlide *c*) a dokázali sme lineárnu závislosť medzi dĺžkou bočného reťazca X-BChlide *c* a lamelárnou vzdialenosťou pigmentov. Mojou úlohou v tejto práci bola príprava a purifikácia agregátov X-Bchlide *c* v hexáne metódou popísanou v článku 1 a príprava vzoriek na meranie.

V článku 3 sme sledovali vplyv vybraných lipofilných chinónov (vitamíny K1, K2, K3) na agregáciu BChl *c* a na zhášanie excitačného stavu BChl *c* pomocou absorpčnej a fluorescenčnej spektroskopie. V tejto práci sme potvrdili, že nepolárne vitamíny K1 a K2 umožňujú agregáciu,

kým polárny vitamín K3 agregáciu nepodporuje. Tieto výsledky potvrdili zásadnú úlohu hydrofóbných interakcií pri agregácii BChl *c*. Súčasne bol pozorovaný efekt zhášania excitačného stavu u agregátov s vitamínmi K1 a K2, pričom amplitúda zhášania závisela na koncentrácii chinónu v agregáte. Vitamín K3 ani lipid zhášanie nepodporovali. Mojm osobným príspevkom k tejto práci bola purifikácia a príprava BChl *c* a spolupráca pri agregáčnych experimentoch.

V článku 4 sme skúmali agregáty synteticky pripravených analógov BChl *c* (3,13 Zn-ketol-porfyrin) pomocou makroskopických (absorpčná spektroskopia a spektroskopia cirkulárneho dichroizmu) a mikroskopických metód (FDLD mikroskopia) v magnetickom poli. V hexáne pripravené agregáty syntetického 3,13 Zn-ketol-porfyrinu tvoria vysoko organizované štruktúry pripomínajúce tvarom nanotrubičky. Ukázalo sa, že v prítomnosti magnetického poľa sa tieto nanotrubičky silne orientujú rovnobežne s magnetickými siločiarami. Meranie na špeciálne vybudovanom mikroskope DP-LSM ukázalo, že nanotrubičky sú homogénne, majú vysokú anizotropiu a tvoria veľké agregáty. Namerané výsledky ukazujú, že štruktúra nanotrubičiek zo syntetických 3,13 Zn-ketol-porfyrinov má vysokú optickú anizotropiu a silnú anizotropiu diamagnetickej susceptibility. Tieto vlastnosti sa dajú použiť pre mikromanipuláciu a riadené ukladanie nanotrubičiek na katalytických povrchoch, a ich možné biotechnologické využitie v budúcnosti. Tieto výsledky sú zhrnuté na obrázku č. 3 v článku 4. Moja práca spočívala v príprave agregátov a realizácii spektroskopických a mikroskopických meraní.

8. Prilohy

Článok 1. :

Zupcanova A, Arellano JB, Bina D, Kopecky J, Psencik J, Vacha F,
The length of esterifying alcohol affects the aggregation properties of
chlorosomal bacteriochlorophylls. Photochem. Photobiol., 2008, 84,
1187-1194

The length of esterifying alcohol affects the aggregation properties of chlorosomal bacteriochlorophylls.

Anita Zupcanova^{1,2}, Juan B. Arellano³, David Bina^{1,4}, Jiri Kopecky^{2,5},
Jakub Psencik^{2,6}, Frantisek Vacha^{1,2}

¹ Biological Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, Ceske Budejovice, Czech Republic

² Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Nove Hradky, Czech Republic

³ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNASA-CSIC), Salamanca, Spain ⁴ Faculty of Science, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic ⁵ Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Trebon, Czech Republic

⁶ Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Prague, Czech Republic

Photochem. Photobiol., 2008, 84, 1187-1194

Chlorosomes, the main light-harvesting complexes of green photosynthetic bacteria, contain bacteriochlorophyll (BChl) molecules in the form of self-assembling aggregates. To study the role of esterifying alcohols in BChl aggregation we have prepared a series of bacteriochlorophyllide c (BChlide c) derivatives differing in the length of the esterifying alcohol (C1, C4, C8 and C12). Their aggregation behavior was studied both in polar (aqueous buffer) and nonpolar (hexane) environments and the esterifying alcohols were found to play an essential role. In aqueous buffer, hydrophobic interactions among esterifying alcohols drive BChlide c derivatives with longer chains into the formation of dimers, while this interaction is weak for BChlides with shorter esterifying alcohols and they remain mainly as monomers. All studied BChlide c derivatives form aggregates in hexane, but the process

slows down with longer esterifying alcohols due to competing hydrophobic interactions with hexane molecules. In addition, the effect of the length of the solvent molecules (n-alkanes) was explored for BChl c aggregation. With an increasing length of n-alkane molecules, the hydrophobic interaction with the farnesyl chain becomes stronger, leading to a slower aggregation rate. The results show that the hydrophobic interaction is the driving force for the aggregation in an aqueous environment, while in nonpolar solvents it is the hydrophilic interaction.

Článok 2. :

Psencik J, Torkkeli MA, **Zupcanova A**, Vacha F, Serimaa RE, Tuma R,
The lamellar spacing in self-assembling bacteriochlorophyll aggregates is
proportional to the length of the esterifying alcohol. *Photosynth. Res.*,
2010, 104, 211-219

The lamellar spacing in self-assembling bacteriochlorophyll aggregates is proportional to the length of the esterifying alcohol

Jakub Pšenčík^{1,2}, Mika Torkkeli³, Anita Župčanová^{2,4}, František Vácha^{2,4}, Ritva E. Serimaa³, Roman Tůma⁵

¹ Department of Chemical Physics and Optics,

Faculty of Mathematics and Physics, Charles University,

Prague, Czech Republic

² Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Nove´ Hradý, Czech Republic

³ Department of Physics, University of Helsinki, Helsinki, Finland

⁴ Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic, České Budějovice

⁵ The Astbury Centre for Structural Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, UK

Photosynth. Res., 2010, 104, 211-219

Chlorosomes from green photosynthetic bacteria are large photosynthetic antennae containing self-assembling aggregates of bacteriochlorophyll c, d, or e. The pigments within chlorosomes are organized in curved lamellar structures. Aggregates with similar optical properties can be prepared in vitro, both in polar as well as non-polar solvents. In order to gain insight into their structure we examined hexane-induced aggregates of purified bacteriochlorophyll c by X-ray scattering. The bacteriochlorophyll c aggregates exhibit scattering features that are virtually identical to those of native chlorosomes demonstrating that the self-assembly of these pigments is fully encoded in their chemical structure. Thus, the

hexane-induced aggregates constitute an excellent model to study the effects of chemical structure on assembly. Using bacteriochlorophyllides transesterified with different alcohols we have established a linear relationship between the esterifying alcohol length and the lamellar spacing. The results provide a structural basis for lamellar spacing variability observed for native chlorosomes from different species. A plausible physiological role of this variability is discussed. The X-ray scattering also confirmed the assignments of peaks, which arise from the crystalline baseplate in the native chlorosomes.

Článok 3. :

Alster J, **Zupcanova A**, Vacha F, Psencik J,
Effect of quinones on formation and properties of bacteriochlorophyll *c*
aggregates. *Photosynth. Res.*, 2008, 95, 183-189

Effect of quinones on formation and properties of bacteriochlorophyll c aggregates.

Jan Alster¹, Anita Župčanová², František Vácha^{2,3}, Jakub Pšenčík^{1,3}

¹ Department of Chemical Physics and Optics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Prague, Czech Republic

² Biological Centre ASCR, Ceske Budejovice, Czech Republic

³ Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Nove Hradky, Czech Republic

Photosynth Res (2008) 95:183–189

Chlorosomes of green photosynthetic bacterium *Chlorobium tepidum* contain aggregates of bacteriochlorophyll c (BChl c) with carotenoids and iso-prenoid quinones. BChl aggregates with very similar optical properties can be prepared also in vitro either in non-polar solvents or in aqueous buffers with addition of lipids and/or carotenoids. In this work, we show that the aggregation of BChl c in aqueous buffer can be induced also by quinones (vitamin K1 and K2), provided they are non-polar due to a hydrophobic side-chain. Polar vitamin K3, which possess the same functional group as K1 and K2, does not induce the aggregation. The results confirm a principal role of the hydrophobic interactions as a driving force for the aggregation of chlorosomal BChls. The chlorosomal quinones play an important role in a redox-dependent excitation quenching, which may protect the cells against damage under oxygenic conditions. We found that aggregates of BChl c with vitamin K1 and K2 exhibit an excitation quenching as well. The amplitude of the quenching depends on quinone concentration, as determined from fluorescence measurements. No lipid is necessary to induce the quenching, which therefore originates mainly from interactions of BChl c with quinones

incorporated in the aggregate structure. In contrast, only a weak quenching was observed for dimers of BChl c in buffer (either with or without vitamin K3) and also for BChl c aggregates prepared with a lipid (lecithin). Thus, the weak quenching seems to be a property of BChl c itself.

Článok 4. :

Chappaz-Gillot C, Marek PL, Blaive BJ, Canard G, Bürck J, Garab G, Hahn H, Jávorfí T, Kelemen L, Krupke R, Mössinger D, Ormos P, Reddy CM, Roussel C, Steinbach G, Szabó M, Ulrich AS, Vanthuyne N, Vijayaraghavan A, **Zupcanova A**, Balaban TS, Anisotropic organization and microscopic manipulation of self-assembling synthetic porphyrin micro-rods that mimic chlorosomes, bacterial light-harvesting systems. *J Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 944-954

Anisotropic organization and microscopic manipulation of self-assembling synthetic porphyrin micro-rods that mimic chlorosomes, bacterial light-harvesting systems

Cyril Chappaz-Gillot¹, Peter L. Marek², Bruno J. Blaive¹, Gabriel Canard¹, Jochen Burck³, Győző Garab⁴, Horst Hahn^{2,5,6}, Tamás Jávorfí⁴, Lóránd Kelemen⁴, Ralph Krupke^{2,6}, Dennis Mossinger², Pál Ormos⁴, Chilla Malla Reddy², Christian Roussel¹, Gábor Steinbach⁴, Milán Szabó⁴, Anne S. Ulrich^{3,6}, Nicolas Vanthuyne¹, Aravind Vijayaraghavan², Anita Župčanová^{4,7}, Teodor Silviu Balaban¹

¹ ISM2-Chirosciences, Faculte des Sciences, Marseille ² Institute for Nanotechnology, Karlsruhe Institute of Technology ³ Institute for Biological Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology ⁴ Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences ⁵ Joint Research Laboratory Nanomaterials, Karlsruhe Institute of Technology and Technische Universität Darmstadt ⁶ Center for Functional Nanostructures, Karlsruhe Institute of Technology ⁷ Biological Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic

J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 944–954

Being able to control in time and space the position-ing, orientation, movement, and sense of rotation of nano- to micro-scale objects is currently an active research area in nanoscience, having diverse nanotechnological applications. In this paper, we demonstrate unprecedented control and maneuvering of rod-shaped or tubular nanostructures with high aspect ratios which are formed by self-assembling synthetic porphyrins. The self-assembly algorithm, encoded by appended chemical-recognition groups on the periphery of these porphyrins, is the same as the one operating for chlorosomal bacteriochlorophylls (BChl's). Chlorosomes, rod-shaped organelles with relatively long-range molecular order, are the most efficient naturally occurring light-harvesting systems. They are used by green photosynthetic bacteria to trap visible and infrared light of minute

intensities even at great depths, e.g., 100 m below water surface or in volcanic vents in the absence of solar radiation. In contrast to most other natural light-harvesting systems, the chlorosomal antennae are devoid of a protein scaffold to orient the BChl's; thus, they are an attractive goal for mimicry by synthetic chemists, who are able to engineer more robust chromophores to self-assemble. Functional devices with environmentally friendly chromophores – which should be able to act as photosensitizers within hybrid solar cells, leading to high photon-to-current conversion efficiencies even under low illumination conditions – have yet to be fabricated. The orderly manner in which the BChl's and their synthetic counterparts self-assemble imparts strong diamagnetic and optical anisotropies and flow/shear characteristics to their nanostructured assemblies, allowing them to be manipulated by electrical, magnetic, or tribomechanical forces.

© for non-published parts Anita Župčanová

anitazupcanova@gmail.com

Samoagregácia bakteriochlorofylových molekúl
Ph.D. Thesis Series, 2013, No.8

All rights reserved
For non-commercial use only

Printed in the Czech Republic by Vlastimil Johanus
Edition of 20 copies

University of South Bohemia in České Budějovice
Faculty of Science
Branišovská 31
CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

Phone: +420 387 772 244
www.prf.jcu.cz, e-mail: sekret@prf.jcu.cz