

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

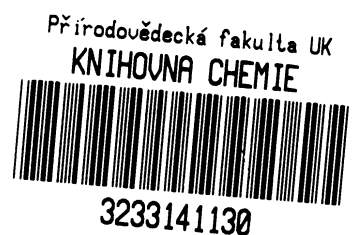


**Izolace a elektroforetická charakterizace komplexu LH1-RC z  
fotosyntetické bakterie *Erythrobacter sp.* NAP1**

Ferdinand Los


Školitel: RNDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Praha, 2007



Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Kučery, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 14. 12. 2014

Podpis: 

**Poděkování:** Děkuji svému školiteli, RNDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D., za zadání tohoto velmi zajímavého tématu, za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky. Děkuji také RNDr. Michalu Koblížkovi, Ph.D. za laskavé poskytnutí bakteriální kultury *Erythrobacter sp.* NAP1.

# Obsah

1	Seznam zkratk.....	5
2	Úvod.....	6
2.1	Fotosyntéza.....	6
2.1.1	Chloroplasty .....	6
2.1.2	Protonový gradient a mechanismus jeho vzniku .....	7
2.1.3	Fotoindukovaný tok elektronů.....	9
2.1.4	Fixace CO <sub>2</sub> .....	12
2.2	Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie .....	13
2.2.1	Taxonomické zařazení .....	13
2.2.2	Výskyt.....	14
2.2.3	Pigmenty .....	14
2.2.4	Reakční centrum .....	17
2.2.5	Světlosběrné komplexy .....	18
2.2.6	Regulace aerobní anoxygenní fotosyntézy a fixace CO <sub>2</sub> .....	19
3	Cíl práce .....	21
4	Materiál .....	22
4.1	Použité chemikálie.....	22
4.2	Použité přístroje.....	22
5	Metody.....	23
5.1	Izolace pigmentoproteinových komplexů LH1-RC .....	23
5.2	Elektroforéza v prostředí SDS.....	24
5.2.1	Princip elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS.....	24
5.2.2	Provedení elektroforézy v prostředí SDS .....	25
5.3	Spektrofotometrie v oblasti UV-Vis.....	26
5.3.1	Princip spektrofotometrie .....	26
5.3.2	Měření absorpčního spektra vzorku .....	26
6	Výsledky.....	28
7	Diskuse.....	30
8	Závěr.....	31
9	Seznam použité literatury .....	32

# 1 Seznam zkratek

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosintrifosfát

Bchl *a* – bakteriochlorofyl *a*

Bfeo – bakteriofeofytin

Chl *a* – chlorofyl *a*

Cyt – cytochrom

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FAD – flavinadenindinukleotid

Feo – feofytin

LHC – světlosběrný komplex

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

OEC – kyslík vyvíjející komplex

PEP - fosfoenolpyruvát

PQ – plastochinon

PS I, PS II – fotosystém I, fotosystém II

Q – chinon

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribosomální ribonukleová kyselina

RC – reakční centrum

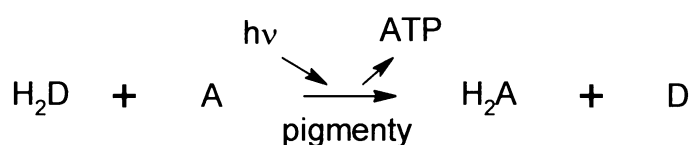
RUBISCO – ribulosabisfosfátkarboxylasa-oxygenasa

*LH1 - světlosběrný komplex některých fotosyntetických bakterií*

## 2 Úvod

### 2.1 Fotosyntéza

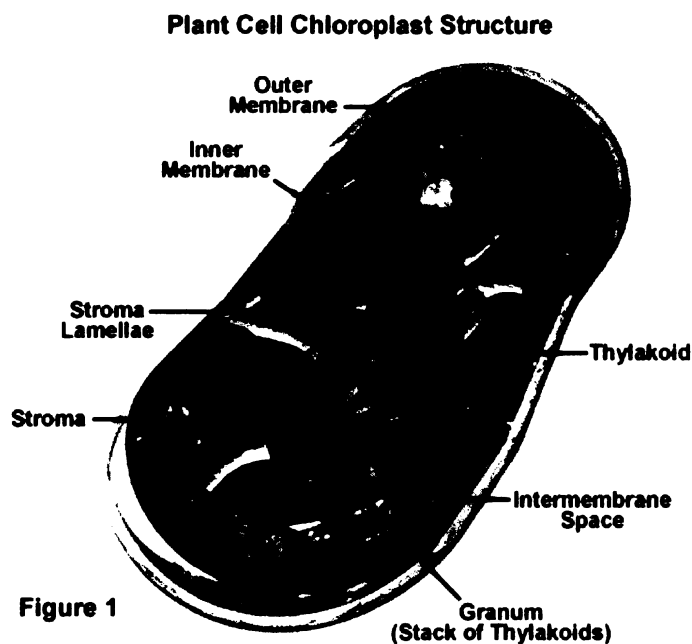
Fotosyntéza je biochemický děj, při kterém je využívána energie světelného kvanta pro tvorbu protonového gradientu na membráně (u eukaryot thylakoidní, u prokaryot cytoplazmatické), v níž jsou zasazeny příslušné bílkovinné komplexy, které fotosyntézu provádějí. Takto získaná energie je ukládána ve formě ATP a NADH či NADPH a může být poté využita k pohánění jiných, endergonických biochemických pochodů. Organismy provádějící fotosyntézu jsou vyšší rostliny, sinice, řasy a některé bakterie. Nejjednodušší vztah pro obecný popis fotosyntézy jakožto přeměny energie záření na energii chemickou je:



kde  $\text{H}_2\text{D}$  značí donor, A akceptor elektronů a protonů a  $h\nu$  energii kvanta záření.<sup>1,2</sup>

#### 2.1.1 Chloroplasty

U vyšších rostlin a řas probíhá fotosyntéza ve zvláštních organelách – chloroplastech. Jedná se o zhruba 5  $\mu\text{m}$  dlouhou organelu nejčastěji elipsovitého průřezu (existují však i výjimky) velmi bohatou na membrány. V buňce může být jeden, ale i tisíc těchto organel, jejich počet závisí na druhu buňky a organismu, ve kterém se vyskytuje. V chloroplastech existují tři druhy membrán. Vnější membrána, která organelu ohraničuje, je velmi propustná narozdíl od vnitřní obalové membrány, která je téměř nepropustná. Tyto dvě membrány jsou od sebe odděleny tenkým mezimembránovým prostorem. Uvnitř vnitřního prostoru chloroplastu se nachází stroma, což je vlastně koncentrovaný roztok enzymů, který dále obsahuje molekuly DNA a RNA a ribozomy, na kterých se syntetizují bílkoviny kódované v DNA chloroplastu. Uvnitř stromatu narazíme na třetí membránový útvar – thylakoidy. Jedná se nejspíše o jediný membránový váček, který je ale velmi složitě poskládaný do drobných měchýřků (gran) naskládaných na sebe do sloupců. Tyto sloupce jsou mezi sebou propojeny pomocí protáhlejších měchýřků jednotlivě probíhajících stromatem - takzvaných stromálních thylakoidů (obrázek 1 na následující straně). A právě thylakoidní membrána je místem průběhu fotosyntézy u eukaryotních fototrofních organismů.<sup>1</sup>



**Obrázek 1** : Počítačový model chloroplastu na němž jsou dobře rozlišena grana (zelené, měchýřkovité útvary) a stromální thylakoidy (žlutě). Mezi oběma obalovými membránami se nachází tenký mezimembránový prostor a prostor mezi vnitřní membránou a thylakoidy vyplňuje stroma.<sup>3</sup>

## 2.1.2 Protonový gradient a mechanismus jeho vzniku

Rozdíl v chemickém potenciálu protonů na opačných stranách membrány dodává energii pro syntézu ATP pomocí enzymu ATP synthasy. Takto vznikající rozdíl v koncentraci iontů, vytváří na membráně kromě koncentračního gradientu také rozdíl elektrických nábojů. Celkově tedy hovoříme o rozdílu chemického potenciálu protonů  $\Delta\mu_{H^+}$ , který má dvě složky - koncentrační ( $\Delta pH$ ) a elektrickou ( $\Delta\psi$ ).

Energii, kterou je možno pomocí vyrovnávání koncentrace látek na různých stranách membrány získat, lze kvantifikovat pomocí Nernstovy rovnice :

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln ([A]_2 / [A]_1) \quad [kJ \text{ mol}^{-1}]$$

Tento tvar platí za podmínek, kdy 1 mol hypotetické látky A poputuje z oddělení 1 do oddělení 2 a  $\Delta G$  pak představuje s tím spojenou změnu *Gibbsovy* energie. Koncentraci sledované látky v roztoku, do něž je přenášena, uvádíme vždy v čitateli a koncentraci v roztoku z něž látku převádíme ve jmenovateli.

Elektrická složka ( $\Delta\psi$ ) pak vzniká proto, že přenášenou látkou jsou nabitě částice a jsou přenášeny přes membránu, která představuje rozhraní, na němž je rozdíl potenciálů. Přenášíme-li 1 mol iontů z jednoho prostředí do jiného, přičemž koncentrace těchto iontů je v obou

prostředích stejná, ale na jejich rozhraní je rozdíl v potenciálech, energie, která je k tomu zapotřebí, nebo kterou je naopak možno získat, je vyjádřena následující rovnicí:

$$\Delta G = -m \cdot F \cdot \Delta \psi \quad [\text{kJ mol}^{-1}]$$

Je-li iont přenášen po spádu potenciálu (kladný iont na zápornou stranu membrány či záporný iont na kladnou stranu) bude se energie uvolňovat. Při přenosu opačným směrem bude nutné stejnou energii naopak dodat.

V případě fotosyntetických membrán, kde se uplatňují jak gradient koncentrace protonů, tak gradient potenciálový je celková změna energie dána součtem obou dílčích energetických změn, tedy:

$$\Delta G = -m \cdot F \cdot \Delta \psi + R \cdot T \cdot \ln ([A^{x+}]_2 / [A^{x+}]_1) \quad [\text{kJ mol}^{-1}]$$

nebo

$$\Delta G = -m \cdot F \cdot \Delta \psi + 2,3 R \cdot T \cdot \log ([A^{x+}]_2 / [A^{x+}]_1) \quad [\text{kJ mol}^{-1}]$$

Takto vyjádřenou změnu volné energie potom nazýváme též elektrochemický gradient iontu a označujeme ho  $\Delta \mu_{A^+}$ .

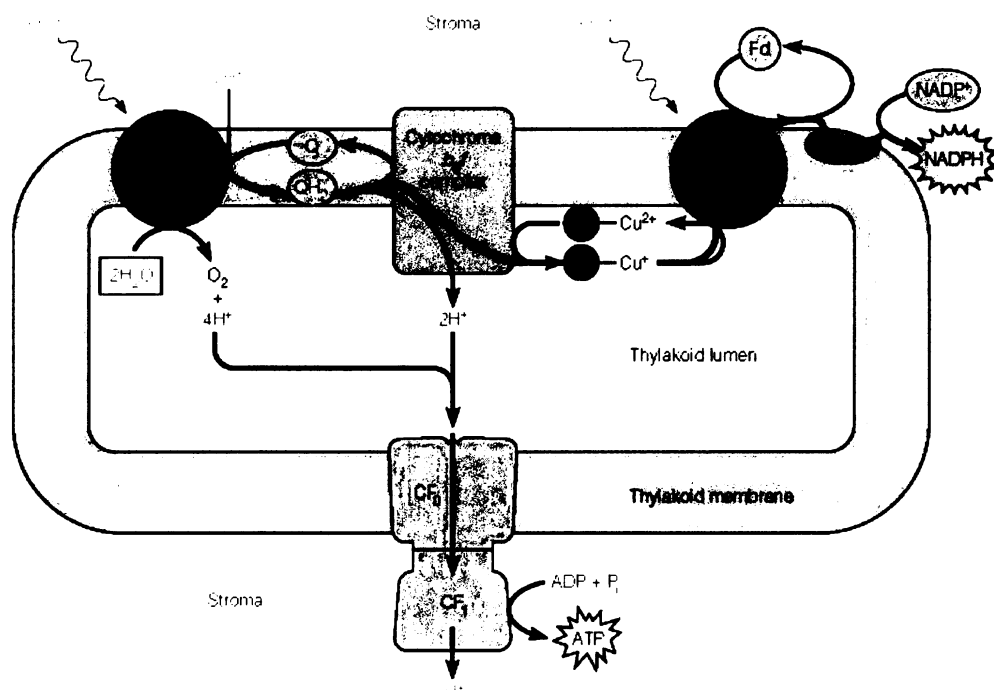
V případě protonů lze vzorec pro elektrochemický gradient zjednodušit. Protože ionty  $H^+$  jsou jednomocné a pH je definováno jako záporný dekadický logaritmus koncentrace protonů, dostáváme při výpočtu pro teplotu 25 °C tento vzorec:

$$\Delta \mu_{H^+} = -96,5 \cdot \Delta \psi + 5,7 \cdot \Delta \text{pH} \quad [\text{kJ mol}^{-1}]$$

Kapacita membrán přeměňujících energii bývá obvykle poměrně nízká, a tak  $\Delta \psi$  by dosahovalo vysokých hodnot, když  $\Delta \text{pH}$  by bylo ještě poměrně malé. Řešením tohoto problému je symport záporně nabitých iontů ( $Cl^-$ ) či antiport kationtů ( $Mg^{2+}$ ). Ty neutralizují elektrické rozdíly na membráně při zachování rozdílu v koncentracích protonů (vnitřek thylakoidu je oproti stromatu výrazně kyselejší). U bakterií však k této neutralizaci nedochází a elektrická složka je výrazně větší než koncentrační.

Pro tvorbu rozdílu koncentrace protonů, a tím i k pohonu ATP synthasy, je nutné dodat energii. K tomu využívají organismy energii uvolněnou při toku elektronů po spádu elektrochemického gradientu. Tato energie je využívána díky bílkovinným komplexům s kofaktory, které pracují v důmyslných sestavách a tvoří tak řetězce přenosu elektronů (viz obrázek 2 na následující straně). Těmito řetězci pak elektrony protékají poháněny rozdílem mezi oxidoredukčními potenciály krajních prvků tohoto řetězce. Tento pozvolný přenos „na etapy“ umožňuje větší energetický zisk.





**Obrázek 2 :** Schéma jednosměrného přenosu protonů při přenosu elektronů přes kaskádu přenašečů (červená čára) do lumen thylakoidu. Tok protonů zpět do stromatu přes CF<sub>0</sub> část ATP synthasy (fialový komplex na spodní straně obrázku) je zdrojem energie pro syntézu ATP z ADP a P<sub>i</sub>.<sup>4</sup>

V případě fotosyntetizujících organismů je rozdíl v oxidoredukčních potenciálech vytvářen díky reakčním centrům. Tyto fotochemické generátory pracují na principu rozdělení náboje. K tomu dochází po absorpci kvanta záření v komplexech bílkovin s pigmenty a dalšími kofaktory, čímž dochází i k tvorbě oxidoredukčního páru – složky oxidované a složky redukováné. Takto vzniklý potenciálový rozdíl se využívá jednak na přímou redukci NADP<sup>+</sup> a jednak, díky dalším složkám elektrontransportního řetězce, na pohánění toku elektronů membránou.<sup>5</sup>

### 2.1.3 Fotoindukovaný tok elektronů

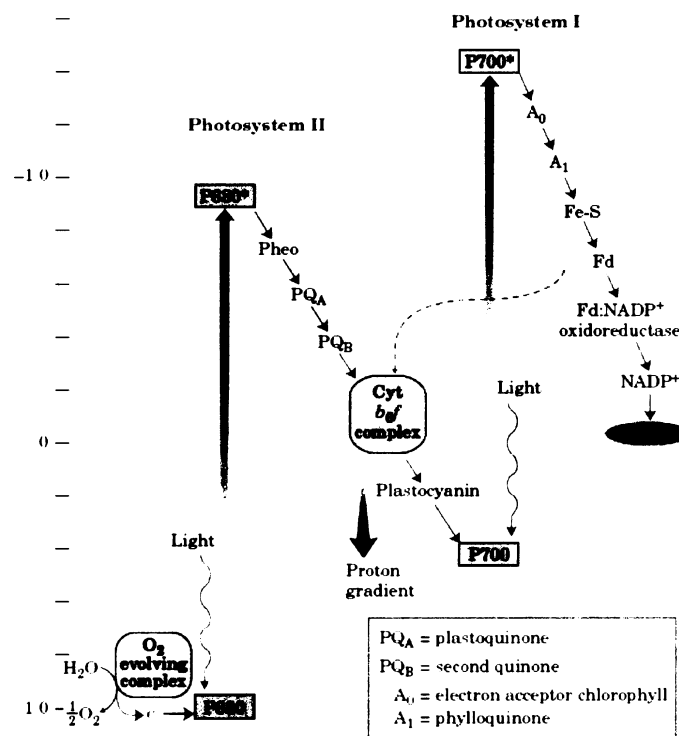
Jedná se o soubor reakcí probíhajících pouze při osvětlení, odtud plyne též používaný název světelná fáze fotosyntézy. Alfou a omegou tohoto sledu reakcí je schopnost chlorofylu *a* (Chl *a*), chlorofylu *b* (Chl *b*) a karotenoidů absorbovat kvantum záření. Tím se molekula pigmentu dostane do excitovaného stavu. Aby se mohla vrátit zpět do stavu základního, energeticky výhodnějšího, předá energii sousední molekule pigmentu. Takto se pohlcená energie přenáší jako takzvaný exciton. Oba typy chlorofylů i karotenoidy mají strukturu konjugovaných dienů a absorbují tedy ve viditelné oblasti spektra. Absorpční spektra Chl *a*, Chl *b* a karotenoidů

se vzájemně doplňují a umožňují tak dohromady absorpci v mnohem širším rozsahu vlnových délek.

Chlorofyl je vždy asociován s bílkovinami a tvoří takzvané světlosběrné komplexy LHC (z anglického *light harvesting complex*). Jen díky vhodné vzájemné orientaci molekul chlorofylu, zajištěné proteiny tvořícími s nimi komplex, je možný vysoce efektivní přenos absorbované energie (u volného chlorofylu je deexcitace prováděna fluorescencí či uvolněním tepla) ke speciálnímu páru Chl *a* v reakčním centru (RC), který jako jediný dokáže přeměnit energii kvanta záření na energii chemickou. Ostatní molekuly pigmentů pouze zachycují záření a absorbovanou energii předávají do reakčního centra.

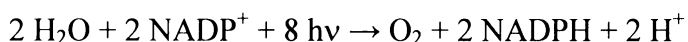
V thylakoidní membráně eukaryotních fototrofů nalézáme dva fotosystémy – PS I a PS II. Oba fotosystémy spolupracují a přenášejí elektrony z vody na  $\text{NADP}^+$ . Mezi sebou jsou propojeny rozpustnou bílkovinou plastocyaninem a PQ,

Přenos elektronů probíhá v souboru reakcí znázorňovaném často jako tzv. Z-schéma (obrázek 3).



Obrázek 3 : „Z-schéma“ přenosu elektronů z vody na  $\text{NADP}^+$ . Dráha elektronů je naznačena modrými šipkami.<sup>6</sup>

Sumární reakci tohoto sledu reakcí lze zapsat jako



kde  $\text{h}\nu$  označuje foton.

RC PS II obsahuje dvě bílkoviny  $\text{D}_1$  a  $\text{D}_2$ , díky kterým má formu prakticky symetrického heterodimeru a obsahuje také speciální pár chlorofylů *a* s absorpčním maximem při 680 nm označované jako P680. Na bílkoviny  $\text{D}_1$  a  $\text{D}_2$  jsou navázány všechny kofaktory činné v přenosu elektronů. Vlastní mechanismus přenosu je následující: Absorpcí fotonu se P680 dostává do excitovaného stavu  $\text{P680}^*$ .  $\text{P680}^*$  je velmi silným redukčním činidlem a předává elektron v řádu pikosekund feofytinu. Tím vznikají kationradikál  $\text{P680}^+$  a anionradikál  $\text{feo}^-$ .  $\text{P680}^+$  se znovu redukuje přijetím elektronu dodaného kyslík vyvíjejícím komplexem (OEC z anglického *oxygen evolving complex*), který ho získal oxidací vody.  $\text{Feo}^-$  předá svůj elektron chinonovému přenašeči  $\text{PQ}_A$  pevně vázanému v kapse tvořené bílkovinou. Ten elektron předá na  $\text{PQ}_B$  vázaný volněji v jiné kapse na povrchu bílkoviny. Celý cyklus se opakuje a takto vzniklý  $\text{PQ}_B^{2-}$  si odebere ze stromatu dva protony a přejde do formy  $\text{PQ}_B\text{H}_2$ . Ten může volně difundovat membránou k cytochromovému komplexu  $\text{b}_6\text{f}$  (cyt  $\text{b}_6\text{f}$ ), kde odevzdá elektrony a reoxiduje se. V komplexu cyt  $\text{b}_6\text{f}$  projde jeden z elektronů přes Fe-S klastr a hem cytochromu f na plastocyanin, druhý pak prochází soustavou dvou hemů ( $\text{b}_L$  a  $\text{b}_H$ ) a vrací se zpět na PQ v takzvaném Q-cyklu, který umožní přenos dalších dvou protonů do lumen thylakoidu.

Sled reakcí v PS I je podobný jako v případě PS II. Absorpcí kvanta záření se P700 excituje a vzniká  $\text{P700}^*$ , který předá elektron přenašeči označovanému jako  $\text{A}_0$  (nejspíše se jedná o chlorofyl, je to homolog feofytinu v PS II). Tím vzniká kationradikál  $\text{P700}^+$  a anionradikál  $\text{A}_0^-$ .  $\text{P700}^+$  je velmi silným oxidačním činidlem a odebere elektron plastocyaninu redukovanému po absorpci záření PS II, čímž se vrátí do základního stavu.  $\text{A}_0^-$  je naproti tomu velmi silné redukční činidlo a předává svůj elektron fylochinonu, ze kterého pak elektron putuje přes tři Fe-S centra na bílkovinu ferredoxin, což je také bílkovina obsahující atomy železa a síry a to ve stechiometrii 2Fe-2S. Tento cyklus proběhne dvakrát a až po nashromáždění dvou elektronů jsou oba prostřednictvím enzymu ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasy (používá FAD jako koenzym) přeneseny na  $\text{NADP}^+$  ve stromatu. Potřebné protony jsou odebrány z média, čímž se dále sníží koncentrace protonů ve stromatu a zvýší se rozdíl v koncentraci protonů na obou stranách thylakoidní membrány.<sup>6</sup>

Syntéza ATP probíhá při toku protonů po jejich koncentračním spádu, to znamená z lumen do stromatu skrz jednu z částí enzymu ATP synthasy.

ATP synthasa má 2 části nazývané  $CF_0$  a  $CF_1$ .  $CF_0$  je zanořena v membráně, kdežto část  $CF_1$  vyčnívá z membrány směrem do stromatu.  $CF_1$  sestává ze tří podjednotek  $\alpha$  a tři podjednotek  $\beta$ , tvořících jakousi „hlavičku“ a dále pak z podjednotek  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ , které tvoří jakousi „stopku“.  $CF_0$  tvoří kanál pro prostup protonů a zprostředkovává konformační změny v  $CF_1$  nezbytné pro její katalytické působení.<sup>5</sup>

Pravděpodobný mechanismus funkce ATP synthasy je tento: V části  $CF_1$  existují tři vazebná místa pro ATP, jedná se tedy o jakýsi  $\alpha\beta$  „trimer“. Každé z vazebných míst může zaujmout jednu ze tří konformací – prázdná, sevřenější konformace (vazba ADP a  $P_i$ ) a velmi sevřená konformace (přiblížení ADP a  $P_i$  k sobě za vzniku ATP). To, v jaké konformaci se daný  $\alpha\beta$  „monomer“ nachází, je dáno jeho vzájemnou polohou s podjednotkou  $\gamma$ , která tvoří hlavní část stopky spojující části  $CF_0$  a  $CF_1$ . Průchod protonů skrz  $CF_0$  z lumen do stromatu způsobí rotaci  $\gamma$  podjednotky a tím se cyklicky mění konformace tří vazebných míst v  $CF_1$  a dochází k syntéze ATP. Tento mechanismus může fungovat i opačně a enzym tak může v případě potřeby pumpovat protony proti jejich koncentračnímu spádu za spotřeby ATP.<sup>6</sup>

## 2.1.4 Fixace $CO_2$

Fixace  $CO_2$  ze vzduchu probíhá hlavně při fotosyntéze ve vyšších rostlinách, sinicích a řasách, které nejsou tématem této práce, a proto ji zde popíšeme jen stručně. Je katalyzována enzymem ribulosabisfosfátkarboxylasou-oxygenasou, zkráceně RUBISCO. Molekula  $CO_2$  je navázána na akceptor, kterým je ribulosa-1,5-bisfosfát. Produkt této reakce je následně rozštěpen na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Každá z těchto dvou molekul je poté fosforylována na kyselinu 1,3-bisfosfoglycerovou a následně se redukuje na glycerinaldehydfosfát. Složitým cyklem zahrnujícím izomerační, ketolázové a aldolázové reakce je pak z trios vzniklých po fixaci molekuly  $CO_2$  regenerován primární pentosový akceptor, kdy z pěti trios vznikají zpět tři pentosy. Na každé 3 fixované molekuly  $CO_2$  tedy připadá 6 vzniklých molekul 3-fosfoglycerátu, přičemž k regeneraci akceptoru je potřeba pouze pěti. Jeden z tříuhlíkatých produktů může tedy být použit k biosyntetickým účelům.<sup>5,7</sup>

## 2.2 Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie

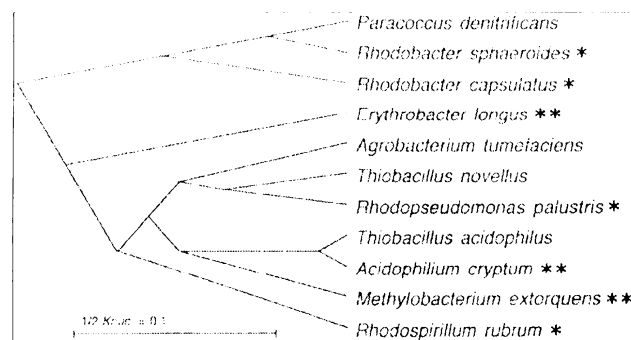
Tato velmi zajímavá skupina bakterií je známa již od osmdesátých let minulého století, kdy japonští vědci poprvé zjistili přítomnost bakteriochlorofylu *a* (Bchl *a*) u aerobních bakterií.<sup>8,9</sup> Od té doby bylo již izolováno více než 20 druhů těchto bakterií a jejich intenzivní výzkum pokračuje i nadále.

Tyto bakterie sice umějí provádět fotosyntézu, čistě autotrofního růstu ale nejsou schopny.<sup>9,10,11</sup> Fotosyntéza jim zřejmě tedy poskytuje přídavný zdroj energie k heterotrofnímu růstu (fotosyntéza může pokrýt až 50 % energetických nároků buňky).<sup>10</sup> Narozdíl od purpurových nesírných bakterií, které jsou jim vývojově nejpříbuznější, jsou tyto organismy striktními aeroby. To jim narozdíl od anaerobních anoxygenních fototrofů umožnilo obsadit mnohem širší ekologické niky.

### 2.2.1 Taxonomické zařazení

Aerobní anoxygenní fototrofové byli zařazeni do podtřídy  $\alpha$  třídy *Proteobacteria*. Tato třída zahrnuje purpurové bakterie a jejich příbuzné a dělí se dále na podtřídy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , a  $\delta$ .<sup>12</sup> Bakterie obsažené v této třídě se vyznačují velkou různorodostí co do tvaru i fyziologie. Odtud také pramení název skupiny (Proteus byl řecký bůh moří, který na sebe mohl brát mnoho podob).<sup>12</sup> Analýzy 16S rRNA těchto bakterií ale ukazují vysoké procento homologie a prokazují tak příbuznost na pohled jinak velmi rozdílných bakterií.<sup>12</sup>

Pomocí těchto analýz bylo zjištěno, že evolučně nejpříbuznější jsou aerobní anoxygenní fototrofové purpurovým nesírným bakteriím.<sup>9</sup> V rámci podtřídy  $\alpha$  nejsou ovšem aerobní anoxygenní fototrofové homogenní skupinou a vyskytují se napříč celým spektrem druhů do této podtřídy spadajících. Tento fakt tedy znamená, že aerobní anoxygenní fototrofové si nemusí být obecně blízce příbuzní<sup>8</sup> (obrázek 4).



**Obrázek 4** : Fylogenetický strom podtřídy  $\alpha$  třídy *Proteobacteria* odvozený na základě analýzy 5S rRNA z reprezentativních zástupců. \* fototrofní purpurové fotosyntetické bakterie, \*\* aerobní fototrofní bakterie<sup>8</sup>

## 2.2.2 Výskyt

Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie byly doposud nalezeny pouze ve vodním prostředí a to v mořské, brakické i sladké vodě. První popsání zástupci byli izolováni z povrchu mořských řas, pobřežního písku a z povlaků sinic a vody v přílivové zóně v Tokijském zálivu v Japonsku.<sup>8</sup> V následujících letech se podařilo izolovat zástupce aerobních anoxygenních fototrofů ze vzorků z Atlantského i Tichého oceánu, Středoziemního moře<sup>11</sup>, Severního moře<sup>13</sup>, z říční vody v Bajkalském regionu a z Neskučinského pramene v Rusku, Jaderského moře, termálního pramene Usami v Japonsku, dokonce i z podmořských hydrotermálních vývěřů na hřebeni Juan de Fuca (v Tichém oceánu) z hloubky kolem 2 km pod mořskou hladinou.<sup>9</sup>

Při odebírání vzorků na otevřeném moři bylo zjištěno, že výskyt aerobních anoxygenních fototrofů se mění s hloubkou. Při výzkumu zahrnujícím vzorky z Golfského proudu, Severního Pacifiku a Atlantského oceánu bylo zjištěno, že se zde tyto bakterie vyskytují v povrchových vrstvách vody, jejich koncentrace se od hladiny zvyšovaly až do hloubek okolo 25 až 50 m pod hladinou, kde byly nejvyšší. Od této oblasti se jejich výskyt spolu se stoupající hloubkou vody snižoval, v hloubkách kam pronikalo méně než 1 % světelného záření byly počty nalezených aerobních anoxygenních fototrofů nejmenší.<sup>14</sup>

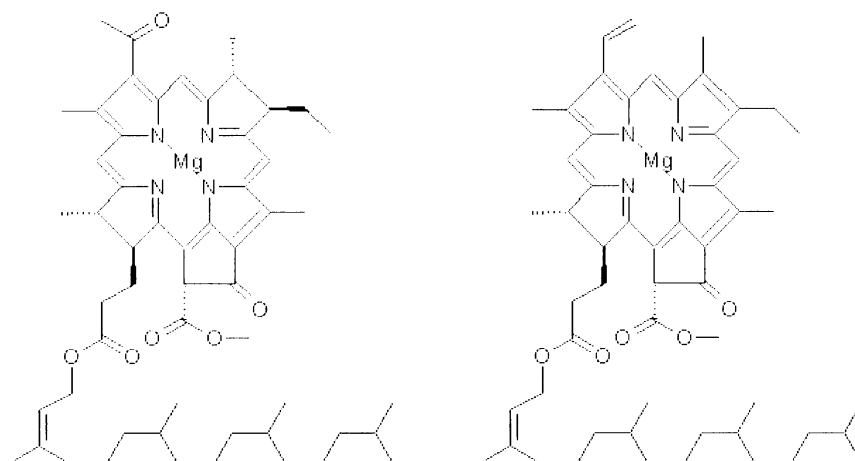
Aerobní anoxygenní fototrofové tvořili na různých místech Pacifiku a Atlantského oceánu od 5 % do 16 % bakteriální komunity. Vyšší procenta tvořili zejména v oblastech chudších na živiny<sup>10, 14</sup>, kde jim možnost krýt část své energetické potřeby pomocí fotosyntézy a omezená schopnost vázat oxid uhličitý<sup>10</sup> zřejmě poskytovaly nezanedbatelnou výhodu oproti čistě heterotrofním bakteriím.

Dosavadní výzkumy tedy vyvrátily počáteční názor, že aerobní anoxygenní fototrofní bakterie obývají pouze malé, na živiny bohaté ekologické niky.<sup>11</sup> Naopak se ukazuje, že se vyskytují v širokém spektru vodních prostředí od mořského přes sladkovodní až po extrémní, jako jsou termální prameny a podmořské hydrotermální vývěry a že v některých oblastech tvoří nezanedbatelnou část bakteriální komunity.<sup>14</sup>

## 2.2.3 Pigmenty

Pigmenty nacházenými u všech druhů aerobních anoxygenních fototrofů jsou karotenoidy a bakteriochlorofyl *a* (Bchl *a*). Bchl *a* je strukturou své molekuly velmi podobný chlorofylu *a*, jedinou odlišností jsou jiné substituenty a jedna chybějící dvojná vazba na tetrapyrrolovém jádře

(obrázek 5) a schopnost bakteriochlorofylu absorbovat záření i v infračervené oblasti spektra v rozmezí 750 až 1100 nm.<sup>10</sup>



**Obrázek 5 :** Struktura molekuly bakteriochlorofylu *a* (vlevo) a chlorofylu *a*.<sup>15, 16</sup>

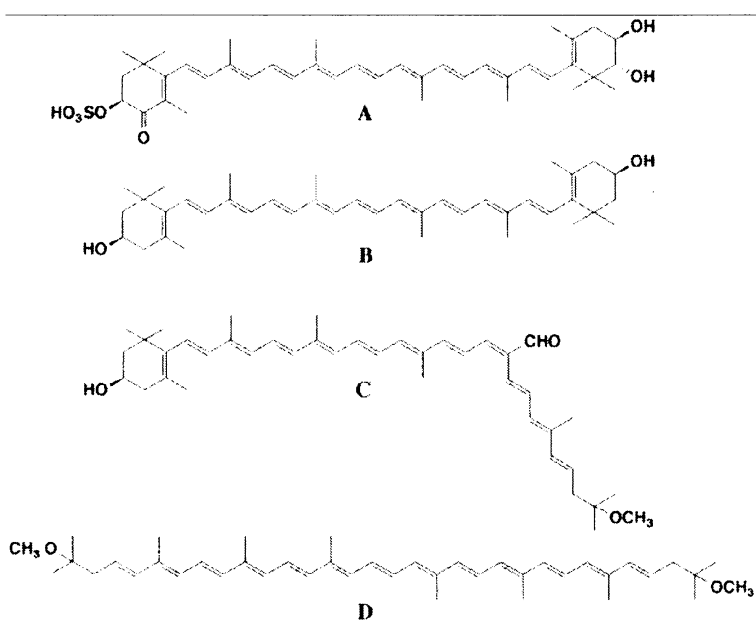
Bchl *a* je přítomen jak v reakčních centrech, kde slouží k vlastní přeměně zářivé energie na energii chemickou (viz dále), tak i ve světlosběrných komplexech, kde slouží pouze k zachycení energie kvanta záření a jejímu přenosu do reakčního centra. Je také jediným typem bakteriochlorofylu, který se u aerobních anoxygenních fototrofů vyskytuje. Je to dáno zřejmě tím, že je v aerobních podmínkách ze všech známých typů bakteriochlorofylu nejstabilnější.<sup>8</sup> Obsah Bchl *a* v buňkách aerobních anoxygenních fototrofů je však oproti purpurovým nesírným bakteriím více než o řád nižší a pohybuje se v rozmezí  $10^{-20}$  až  $10^{-19}$  mol Bchl *a* na buňku.<sup>11</sup> Jeho syntéza je navíc u aerobních anoxygenních fototrofů silně inhibována světlem.<sup>11, 17</sup> Ve všech zkoumaných bakteriích byl esterifikovaným alkoholem v molekule Bchl *a* fytol a jedná se tedy o nejrozšířenější formu bakteriochlorofylu<sup>8</sup> (obrázek 5). Mnoho druhů bakterií však ještě nebylo dostatečně prozkoumáno a je tedy možné, že další výzkumy odhalí u aerobních anoxygenních fototrofů i jiné formy bakteriochlorofylu.

Dalším druhem pigmentů, které se v buňkách aerobních anoxygenních fototrofů vyskytují ve velkém množství jsou karotenoidy, dávající mnoha bakteriálním kmenům této podskupiny jejich typické zabarvení, které může sahát od růžové přes oranžovou až po žlutou barvu.<sup>11</sup> Absorbují při jiných vlnových délkách než Bchl *a* (mezi 350 a 600 nm<sup>11</sup>) a pomáhají tak zvětšovat rozsah zachycovaných a využívaných vlnových délek světelného záření. Protože mají strukturu konjugovaných dienů, mohou ve svých molekulových orbitalech velmi dobře delokalizovat nepárové elektrony a slouží proto jako účinná ochrana před reaktivními sloučeninami, které mohou vznikat během fotosyntézy.

Karotenoidy syntetizované aerobními anoxygenními fototrofy mají oproti karotenoidům nalezeným v ostatních fotosyntetických organismech velmi neobvyklou strukturu<sup>8</sup> a některé

z karotenoidů obsažených v buňkách aerobních anoxygenních fototrofů nebyly nalezeny v žádném jiném organismu.

Karotenoidy nalezené v buňkách aerobních anoxygenních fototrofů jsou v podstatě dvojího druhu. Většina (někdy až přes 70 %<sup>8</sup>) jsou velmi polární karotenoidy, které nejsou součástí reakčních center ani světlosběrných komplexů. V bakterii *Erythrobacter longus* byly jako většinová složka těchto „nefotosyntetických“ karotenoidů v roce 1991 objeveny a popsány zcela nové, sulfát obsahující karotenoidy erythroanthin sulfát a caloxanthin sulfát<sup>8,9</sup> (obrázek 6). Karotenoidy vázané na pigmentoproteinový komplex reakčního centra LH1-RC jsou méně polární.<sup>8</sup> Některé z nich jsou, co se výskytu týče, běžnější, jako například zeaxanthin, který je derivátem  $\beta$ -karotenu (obrázek 6). I zde byly ovšem nalezeny jiné, o poznání méně běžné karotenoidy, které jsou svou strukturou v rámci purpurových bakterií unikátní.<sup>8</sup> Jejich příkladem jsou bakteriorubixanthinal a spiriloxanthin (obrázek 6). Spiriloxanthin byl ovšem nalezen pouze ve velmi malých množstvích.<sup>8</sup>



**Obrázek 6 :** Struktura vybraných charakteristických karotenoidů nalezených v buňkách aerobních anoxygenních fototrofů: (A) erythroanthin sulfát z *E. longus*, (B) zeaxanthin z *E. longus*, (C) bakteriorubixanthinal z *E. longus*, (D) spiriloxanthin z *E. longus*<sup>8</sup> (str. 112)

Karotenoidy nalezené v bakterii *Erythrobacter longus* můžeme tedy rozdělit do tří skupin: (i) bicyklické, (ii) monocyklické a (iii) acyklické. Toto komplexní spektrum karotenoidů se zdá být ve shodě s vývojovou pozicí aerobních anoxygenních fototrofů na půli cesty mezi typickými purpurovými bakteriemi a aerobními organismy.<sup>8</sup>



## 2.2.4 Reakční centrum

Fotosyntetické reakční centrum (RC) je definováno jako minimální funkční jednotka schopná katalýzy světlem indukovaného přenosu elektronů, vedoucího ke stabilnímu rozdělení nábojů.<sup>9</sup> Ve vyšších rostlinách jsou reakční centra nutná pro fotosyntézu umístěna na thylakoidních membránách v chloroplastech. Anoxygenní fototrofní bakterie ovšem chloroplasty neobsahují a fotosyntéza zde probíhá na cytoplazmatické membráně<sup>18</sup>, formace intracytoplazmatických membrán či invaginací cytoplazmatické membrány byla popsána pouze u *Roseobacter denitrificans*, *Sandaracinobacter*<sup>18</sup> a *Erythrobacter sp.* OCh114.<sup>17</sup>

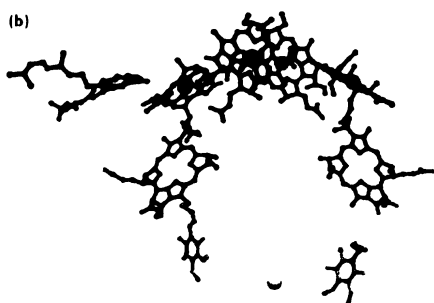
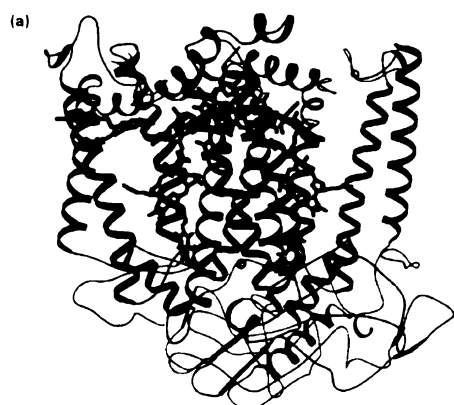
U bakterie *Erythrobacter sp.* NAP1, se kterou jsme pracovali, se vyskytuje reakční centrum typu 2, tedy feofytin-chinonové.<sup>11</sup> V dalším textu se proto budu zabývat pouze tímto reakčním centrem a fotosyntetickými pochody s ním spojenými.










Reakční centrum typu 2 se skládá ze čtyř proteinových podjednotek označovaných jako L (light), M (medium), H (heavy) a některá RC obsahují též cytochrom typu c označovaný jako C. Označení L, M a H pochází z prvotních odhadů jejich relativních molekulových hmotností na základě SDS-elektroforézy: L~21 kDa, M~24 kDa a H~28 kDa. Pozdější výzkum ale ukázal, že s výjimkou relativní molekulové hmotnosti podjednotky H nebyly tyto prvotní odhady přesné. Relativní hmotnosti určené na základě aminokyselinového složení L, M a H podjednotek jsou: L~31 kDa, M~34 kDa a H~28 kDa.<sup>19</sup> Podjednotky L a M obsahují poměrně velké množství hydrofobních aminokyselin a tvoří každá 5  $\alpha$ -šroubovic, jejichž pomocí jsou podjednotky zakotveny do membrány. Na podjednotky L a M jsou vázány fotosyntetické kofaktory, kterými jsou jedna molekula karotenoidu, čtyři molekuly Bchl *a* (dvě z nich tvoří takzvaný speciální pár, druhé dvě slouží pouze jako přídatné kofaktory), dvě molekuly bakteriofeofytinu (Bchl bez atomu hořčíku), dva chinony a jeden atom nehemového železa (obrázek 7 na následující straně). Podjednotka H obsahuje hydrofobních aminokyselin méně a tvoří pravděpodobně pouze jednu transmembránovou  $\alpha$ -šroubovicí.<sup>19</sup> V nepřítomnosti podjednotky H je komplex RC nestabilní a podjednotka H tedy zřejmě plní funkci jakéhosi stabilizátoru. Karotenoidy v RC mají světlosběrnou funkci a slouží také při ochraně RC před fotooxidačním poškozením.

Vlastní mechanismus funkce RC je v některých rysech podobný oxygenní fotosyntéze, výsledkem je však pouze vznik protonového gradientu a nikoli redukovaného NADH či NADPH. V první fázi absorbuje speciální pár Bchl *a* kvantum záření a dostane se tak do excitovaného stavu, kdy je silným redukčním činidlem.

Přes přídatný Bchl *a* je elektron předán bakteriofeofytinu (Bfeo), který se tak stává anionradikálem. Protože jsou primární donor i primární akceptor prostorově odděleny molekulou

přídatného Bchl *a*, dochází i k prostorové separaci náboje a snižuje se tak pravděpodobnost zpětné reakce. Vzniklý Bfeo<sup>-</sup> předá dále elektron molekule chinonu Q<sub>A</sub> a z něj pak elektron putuje přes nehemové železo na chinon Q<sub>B</sub>, který je ke komplexu poután jen volně. Celý pochod se opakuje ještě jednou a po obdržení druhého elektronu Q<sub>B</sub> odebere dva protony z cytoplazmy, čímž se plně redukuje na Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub>, odpoutá se od komplexu RC a difunduje do lipidní membránové dvojvrstvy směrem ke komplexu bc<sub>1</sub>. Ten mu odebere elektrony i protony, protony jsou přeneseny do periplazmy a elektrony jsou prostřednictvím cytochromu c (obsahuje 4 hemy) předány zpět speciálnímu páru Bchl *a*, který je takto znovu redukován.<sup>12</sup>



 M Subunit	 Bacteriochlorophyll dimer
 L Subunit	 Monomeric bacteriochlorophylls
 H Subunit	 Bacteriofeofytins
	 Ubiquinones
	 Non-haem iron
	 Carotenoid

Komplex cytochromů bc<sub>1</sub> vykonává tedy takzvaný Q-cyklus, jehož výsledkem je snižování koncentrace protonů v cytoplazmě a naopak její zvyšování v periplazmatickém prostoru.

**Obrázek 7:**(a) Trojrozměrná struktura reakčního centra typu 2: zeleně – podjednotka M, lila – podjednotka L, tmavě fialová – podjednotka H, (b) Rozmístění kofaktorů: červeně – Bchl *a* dimer (speciální pár), oranžová – přídatné Bchl *a*, modře – bakteriofeofytiny, žlutě – chinony, šedě – nehemový atom železa, fialově – karotenoid<sup>20</sup> (str. 170)

## 2.2.5 Světloběrné komplexy

Stejně jako vyšší fotosyntetické organismy obsahují i aerobní anoxygenní fototrofové světloběrné komplexy.<sup>11</sup> Jejich funkce spočívá v zachycení energie světelného kvanta a v jejím přenosu na speciální pár Bchl *a* v reakčním centru. Jejich struktura je velmi různorodá co do absorpčních maxim a i přes vývojovou příbuznost s purpurovými nesírnými bakteriemi se od jejich světloběrných komplexů svými absorpčními charakteristikami často liší.<sup>9</sup> I přes tyto odlišnosti se ale zdá, že molekulární struktura LHC aerobních anoxygenních fototrofů se od LHC purpurových nesírných bakterií v zásadě neliší<sup>2</sup>. Pro jejich popis je tedy s největší

pravděpodobností vyhovující model získaný na základě studia LHC bakterie *Rhodobacter sphaeroides*.

Rozeznáváme dva typy světlosběrných komplexů – LH1 a LH2. LH1 je přítomen ve všech známých fotosyntetických bakteriích a je velmi úzce asociován s RC. Síla asociace s RC se u jednotlivých bakteriálních druhů může lišit.<sup>19</sup> LH1 obsahuje Bchl *a*, karotenoidy a dva typy transmembránových bílkovin –  $\alpha$  a  $\beta$ . Tyto polypeptidy mají relativní molekulovou hmotnost zhruba 5 až 7 kDa a skládají se z 50 až 60 aminokyselinových zbytků. Analýza aminokyselinové sekvence ukázala, že  $\alpha$  i  $\beta$  obsahují tři domény. Na N-konci, který vyčnívá z membrány do cytoplazmy a C-konci, který se nachází v periplazmě, jsou polární, hydrofilní aminokyseliny. Naproti tomu střední část sekvence sestává z asi 20 hydrofobních aminokyselin a pomocí  $\alpha$ -šroubovice, kterou tvoří, je polypeptid zakotven do membrány.

LH1 se skládá ze 16 dvojic polypeptidů  $\alpha$  a  $\beta$ , na každou tuto dvojici připadá jedna molekula karotenoidu a dvě molekuly Bchl *a*. Celkově tvoří polypeptidy  $\alpha$  a  $\beta$  kruh, kde polypeptidy  $\alpha$  jsou na vnitřní straně a  $\beta$  na straně vnější. Mezi nimi jsou pak přes konzervované histidiny vázány molekuly Bchl *a*, a to blíže periplazmatickému prostoru, přičemž jejich porfyrinové kruhy jsou kolmé na rovinu membrány. Uprostřed tohoto kruhu je pak umístěno reakční centrum.

LH2 se, co do struktury, LH1 velmi podobá. Také obsahuje transmembránové polypeptidy  $\alpha$  a  $\beta$ , Bchl *a* i karotenoidy. Rozdíl je však v tom, že LH2 je menší, skládá se jen z 8 až 9 dvojic (podle bakteriálního druhu) polypeptidů  $\alpha$  a  $\beta$  a obsažený Bchl *a* je vázán jak blíže periplazmatického prostoru (18 molekul Bchl *a*, jejichž porfyrinové kruhy jsou kolmé na rovinu membrány), tak i poblíž cytoplazmatické strany membrány (9 molekul Bchl *a*, jejichž porfyrinové kruhy leží v rovině rovnoběžné s rovinou membrány).

LH2 absorbují oproti LH1 při kratších vlnových délkách. Jsou-li LH2 přítomny, pak jsou umístěny po obvodu LH1 a v centru celého komplexu je umístěno reakční centrum.<sup>19</sup>

## 2.2.6 Regulace aerobní anoxygenní fotosyntézy a fixace CO<sub>2</sub>

Fotosyntéza je u aerobních anoxygenních fototrofů regulována třemi základními faktory: koncentrací živin rozpuštěných v médiu, světlem a přítomností kyslíku.

Pokusy s různými zástupci aerobních anoxygenních fototrofů ukázaly, že mají-li ve svém okolí dostatek živin, upřednostňují vždy heterotrofní růst a fotosyntézu omezují.<sup>21,22</sup> K nárůstu fotosyntetické aktivity dochází až ve chvíli, kdy organické substráty začnou být v médiu

vyčerpány. Zdá se tedy, že fotosyntézu používají pouze jako přídatný mechanismus zajišťující jim přísun energie a přežití i v prostředí chudém na živiny.

Produkce pigmentoproteinových komplexů LH a RC je u těchto bakterií inhibována kontinuálním osvětlením.<sup>9, 17, 21</sup> To se může zdát nelogické, ale buňky se tak s největší pravděpodobností chrání před poškozením vysoce reaktivním singletním kyslíkem (ten by kombinací Bchl, kyslíku a vysokých intenzit záření vznikal a poškozoval části buňky).<sup>21</sup>

Třetím faktorem regulujícím průběh fotosyntézy je koncentrace kyslíku. Narozdíl od purpurových nesírných bakterií, které jsou schopny fotosyntézy pouze za anaerobních podmínek, aerobní anoxygenní fototrofové naopak přítomnost kyslíku pro běh fotosyntézy vyžadují a v anaerobióze u nich fotosyntéza neprobíhá.<sup>9, 11, 21</sup> Možným vysvětlením je vysoký oxidoredukční potenciál chinonu Q<sub>A</sub> nezbytného pro fotoindukovaný tok elektronů. Ten by byl v anaerobním prostředí redukován a tudíž neschopen přijetí elektronu od speciálního páru Bchl *a*.<sup>18</sup>

Tolerance vůči kyslíku tedy určitě přináší aerobním anoxygenním fototrofům výhodu v možnosti obsazení širších ekologických nik (ve srovnání s anaerobními fototrofy) a možnost získu energie pomocí aerobní respirace při zachování schopnosti fotosyntézy, která může sloužit jako přídatný zdroj energie při nízkých koncentracích živin. Kombinace heterotrofie s fotosyntetickým získáváním energie jim jistě poskytuje výhodu oproti ostatním mikroorganismům. Tyto výhody jsou ale vykoupeny nutností složité regulace fotosyntetických pochodů, které by v aerobních podmínkách mohly při velké intenzitě dopadajícího záření vést ke vzniku vysoce reaktivních sloučenin pro buňku jedovatých.

Fixace CO<sub>2</sub>, která byla u aerobních anoxygenních fototrofů popsána<sup>11, 18, 22</sup> rozhodně není stejného typu jako při oxygenní fotosyntéze (viz oddíl 1.4). V žádném případě zatím nebyl u aerobních anoxygenních fototrofů nalezen enzym RUBISCO, pro tento druh fixace nezbytný.<sup>9, 11, 18</sup> K fixaci tedy dochází alternativní cestou, a to buď obráceným citrátovým cyklem, nebo pomocí enzymu fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEP karboxylasy). PEP karboxylasa byla prokázána např. v *Sandaracinobacter sibiricus*, *Erythrobacter longus* či *Roseobacter denitrificans*.<sup>18</sup> Ani jedna z těchto cest však zatím nebyla s jistotou prokázána.

### **3 Cíl práce**

Cílem mé práce bylo izolovat pigmentoproteinový komplex LH1-RC z buněk aerobní anoxygenní fototrofní bakterie *Erythrobacter sp.* NAP1 a určit jeho přibližnou velikost pomocí elektroforézy v prostředí SDS.

## 4 Materiál

### 4.1 Použité chemikálie

Tris: tris(hydroxymethyl)amino<sup>m</sup>ethan, SERVA, Německo  
EDTA: ethylendiamintetraacetát, Lachema, ČR  
NaCl: Lachema, ČR  
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina, Sigma, USA  
MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O: Lachema, ČR  
CaCl<sub>2</sub>: Lachema, ČR  
Sacharosa: Lach-Ner, ČR  
Glycerol: Lachema, ČR  
Methanol: Lachema, ČR  
DDM: dodecyl-β,D-maltosid, Fluka, Švýcarsko  
Lysozym: Drůbežářský průmysl Praha, ČR  
PMSF: fenylmethansulfonylfluorid, Fluka, Švýcarsko  
SDS: dodecylsírán sodný, Sigma, USA  
Akrylamid: SERVA, Německo  
APS: peroxodisírán amonný, Lachema, ČR  
TEMED: N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin, SERVA, Německo  
2-merkaptoethanol: Fluka, Švýcarsko  
CBB: Coomassie Brilliant Blue R250, SERVA, Německo  
Bromfenolová modř: Lachema, ČR  
Bis: N, N'-metylen-bis-akrylamid, SERVA, Německo  
Glycin: REANAL, Maďarsko

### 4.2 Použité přístroje

Třepačka Elpan water bath shaker type 357  
Ultracentrifuga Beckman Coulter Optima LE-80K Ultracentrifuge  
Centrifuga Hettich Universal 32R s rotory r = 66 mm a r = 105 mm  
Spektrofotometr Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Německo  
Spektrofotometr HELIOS α, 103103, v 4.60  
Sada pro elektroforézu, Owl P8DS, USA

## 5 Metody

### 5.1 Izolace pigmentoproteinových komplexů LH1-RC<sup>24</sup>

Před započítím samotné izolace jsem si připravil sadu pufrů o následujícím složení:

**Tabulka 1:** složení pufru TE-NaCl

<b>pufr TE-NaCl, pH = 8,0</b>		
	<b>c (v pufru)</b>	<b>m [g]</b>
Tris	0,05 mol/l	3,028
EDTA	0,01 mol/l	1,861
NaCl	0,3 mol/l	8,766
H <sub>2</sub> O		do 500 ml

**Tabulka 2:** složení pufru A

<b>pufr A, pH = 6,5</b>		
	<b>c (v pufru)</b>	<b>m [g]</b>
HEPES	0,05 mol/l	5,989
MgCl <sub>2</sub>	0,01 mol/l	1,017
CaCl <sub>2</sub>	0,03 mol/l	1,665
sacharosa	1 mol/l	171,15
glycerol	25 % (v/v)	125
H <sub>2</sub> O		do 500 ml

Adjustaci pH na přesnou hodnotu jsem prováděl pomocí vodných roztoků NaOH a HCl k tomu určených.

Bakterie *Erythrobacter sp.* NAP1 byly pěstovány v MBÚ AVČR v Třeboni a kultura byla po zahuštění zmrazena kapalným dusíkem a uchovávána při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Buňky jsem nechal rozmrznout při laboratorní teplotě. K buňkám jsem přidal malý objem pufru TE-NaCl a promíchal. Následně jsem buňky odstředil na centrifuze Hettich ( $16\,920\times g$  / 15 min. /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Takto získanou peletu jsem zvažil a resuspendoval v pufru TE-NaCl (4 ml pufru na gram buněk). Poté jsem si připravil roztok lysozymu v pufru TE-NaCl o koncentraci 10 mg/ml a přidal k suspenzi buněk takové množství, aby koncentrace lysozymu ve vzorku byla 0,02 % a směs jsem dal inkubovat na třepačku ( $34,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $175\text{ min}^{-1}$ ) na 90 minut. Potom jsem přidal 11  $\mu\text{l}$  200 mM ethanolového roztoku PMSF. Následně jsem buňky opakovaně homogenizoval pomocí natahování suspenze skrz úzkou jehlu do skleněné injekční stříkačky a opětovného vytlačování. Materiál byl velmi viskózní, a tak jsem k lyzátu přidal ještě 1 ml pufru TE-NaCl a opakoval protahování jehlou pomocí skleněné injekční stříkačky. Takto získaný roztok jsem převedl do tří

mikrozkumavek a odstředil na centrifuze Hettich ( $10620\times g$  / 20 min). Usadily se velmi malé pelety bílé barvy. Oddělil jsem supernatant, resuspendoval ho v pufru TE-NaCl a homogenizoval ho pomocí injekční stříkačky. Pak jsem vzorek odstředil na ultracentrifuze Beckman Coulter Optima LE-80K Ultracentrifuge ( $110000\times g$  / přes noc /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Resuspendovat takto obdržanou peletu v pufru A bylo kvůli viskozitě (na povrchu byla pokryta slizovitým filmem) nemožné. Doplnil jsem tedy kyvetu puftrem TE-NaCl a vzorek znovu odstředil na ultracentrifuze ( $110\ 000\times g$  / 1 hod. /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Protože se sliz znovu usadil, stočil jsem vzorek znovu ( $110\ 000\times g$  / 15 min. /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Potom již byla viskozita vzorku o poznání menší a vzorek jsem tedy resuspendoval v 1,25 ml pufru A.

Jako další krok jsem provedl extrakci vždy 40  $\mu\text{l}$  vzorku do 1 ml methanolu a změřil absorbanci při 771 nm na spektrofotometru Spekol 11. Pomocí Lambertova-Beerova zákona jsem pak vypočítal koncentraci Bchl *a* ve vzorku, od ní se pak odvíjelo množství DDM, které bylo nutno ke vzorku přidat. Poté jsem vzorek převedl do 2 mikrozkumavek, vložil do plastové lahvičky se šroubovacím uzávěrem, zamrazil spuštěním do kapalného dusíku a uskladnil v mrazicím boxu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Po rozmrazení jsem vzorek převedl do malé skleněné lahvičky, přidal jsem 6  $\mu\text{l}$  10% DDM, lahvičku vložil do kádinky s nadrceným ledem a roztok nechal inkubovat v lednici 1 hodinu za šetrného míchání pomocí magnetického míchadla. Pak jsem vzorek převedl do mikrozkumavky a zcentrifugoval ho na centrifuze Hettich ( $23930\times g$  / 2 hod. /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant jsem oddělil od sedimentu do druhé mikrozkumavky a jak supernatant, tak sediment jsem pak výše uvedeným postupem opět zamrazil.

## **5.2 Elektroforéza v prostředí SDS**

### **5.2.1 Princip elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS**

Principem je dělení nabitých polypeptidů v elektrickém poli na základě jejich různých pohyblivostí. Aniontový tenzid dodecylsírán sodný se váže svým uhlovodíkovým ( $\text{C}_{12}$ ) řetězcem na hydrofobní oblasti polypeptidů, čímž je jednak denaturuje (polypeptidy získávají podobný válcovitý tvar) a jednak jim uděluje konstantní náboj na jednotku délky (záporný náboj SDS překryje vlastní náboj polypeptidů). Polypeptidy se pak v elektrickém poli pohybují směrem k anodě.



Polyakrylamidový gel připravíme radikálovou kopolymerací akrylamidu a N, N'-metylenbisakrylamidu (BIS). BIS slouží jako síťovací činidlo. Velikost pórů můžeme ovlivnit koncentrací obou složek a jejich vzájemným poměrem. Jako iniciátor reakce slouží peroxodisíran amonný. Ten se rozkládá a radikály vzniklé při tomto rozkladu iniciují polymeraci. Jako stabilizátor volných radikálů a katalyzátor reakce přidáváme N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED).

Vzorky nanášíme do velkopórového neboli řadicího gelu. V něm se vzorky fokusují do ostrých zón. Na něj pak navazuje gel malopórový neboli dělicí v němž pak dochází k vlastnímu dělicímu procesu.

Elektroforézu je možno provádět v gradientu koncentrace gelu, kdy se koncentrace akrylamidu zvyšuje ve směru pohybu částic.

## 5.2.2 Provedení elektroforézy v prostředí SDS

Polyakrylamidové gely byly připravovány podle Herbstové.<sup>23</sup>

**Tabulka 4:** Složení roztoků pro přípravu gradientového dělicího gelu

roztok	koncentrace akrylamidu	
	8 %	16 %
1,5M Tris/HCl, pH=8,8	750 $\mu$ l	750 $\mu$ l
30% akrylamid	800 $\mu$ l	1600 $\mu$ l
destilovaná voda	1388 $\mu$ l	588 $\mu$ l
10% SDS	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
10% APS	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
celkový objem	3 ml	3 ml

**Tabulka 5:** Složení roztoku pro přípravu velkopórového řadicího gelu

roztok	objem
0,5M Tris/HCl, pH=6,8	1000 $\mu$ l
30% akrylamid	533 $\mu$ l
destilovaná voda	2377 $\mu$ l
10% SDS	40 $\mu$ l
10% APS	40 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
celkový objem	4 ml

Roztok APS jsem si připravil čerstvý před každou elektroforézou a elektroodový pufr jsem před použitím vždy pětkrát ředil.

Pro přípravu gelu s lineárním gradientem koncentrace akrylamidu jsem používal mísič gradientu. Uzavřel jsem kohout mezi oběma prostory a hadičku ústící z pravého prostoru jsem přichytil k mísiči tak, aby její výtokový otvor směřoval nahoru. Do pravého prostoru jsem pak podle tabulky 4 napipetoval roztok pro přípravu 16% gelu, do levého prostoru pak roztok pro přípravu 8% gelu. Poté jsem otevřel spojovací kohout a pomocí hadičky jsem nechal obsah obou prostorů za stálého míchání magnetickými míchadly vytéct mezi připravená elektroforetická skla.

Používal jsem sadu standardů od firmy Sigma-Aldrich, katalogové číslo M-3788 o rozpětí Mr 36 000–205 000.

Elektroforézu jsem prováděl s aparaturou Owl P8DS v chladové místnosti při 4–7 °C. Elektroforéza probíhala vždy za konstantního napětí 30 V po dobu 15 hodin. Gely jsem barvil v 0,25% roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 ve směsi ethanol-voda-kyselina octová (poměr 5: 5: 1) přes noc. Poté jsem je odbarvoval v odbarvovací lázni (složené z ethanolu, vody a kyseliny octové v poměru 5: 5: 1) po dobu dvou až tří dnů, přičemž jsem odbarvovací lázeň pravidelně vyměňoval.

## **5.3 Spektrofotometrie v oblasti UV-Vis**

### **5.3.1 Princip spektrofotometrie**

Tato metoda je založena na absorpci záření o určité energii zkoumanou látkou. Dopadne-li na vzorek záření s vhodnou energií, je tato energie pohlcena a dochází k excitaci elektronů molekul vzorku na vyšší energetickou hladinu. Makroskopicky se tento jev projevuje jako snížení intenzity záření (nebo jeho části) po průchodu vzorkem.

Spektroskopii používáme k určení koncentrace látek v roztoku (na základě Lambertova-Beerova zákona) nebo k charakterizaci látek pomocí jejich absorpčních spekter. V prvním případě měříme při fixní vlnové délce, v druhém vlnovou délku spojitě měníme. Při UV-Vis spektrofotometrii pracujeme se zářením, jehož vlnová délka spadá do ultrafialové či viditelné oblasti spektra.

### **5.3.2 Měření absorpčního spektra vzorku**

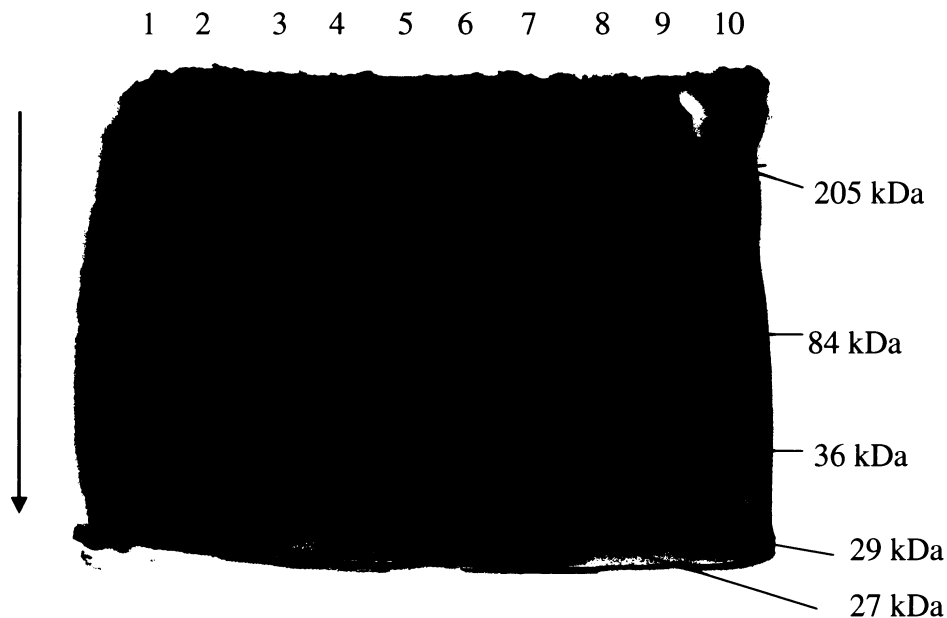
Obě mikrozkumavky (se supernatantem i sedimentem – viz kapitola 5.1) jsem rozmrazil za laboratorní teploty. Poté jsem odebral 80 µl supernatantu a smíchal s 1 ml pufru A.

Z mikrokumavky se sedimentem jsem odebral pomocí špachtle (vzorek byl viskózní a nešlo ho odebírat pomocí pipety) množství materiálu zhruba o objemu 20  $\mu$ l a homogenizoval ho v 1 ml pufru A. Následně jsem na spektrofotometru HELIOS  $\alpha$  proměřil absorpční spektra supernatantu i sedimentu proti pufru A v rozsahu vlnových délek 300–1050 nm.

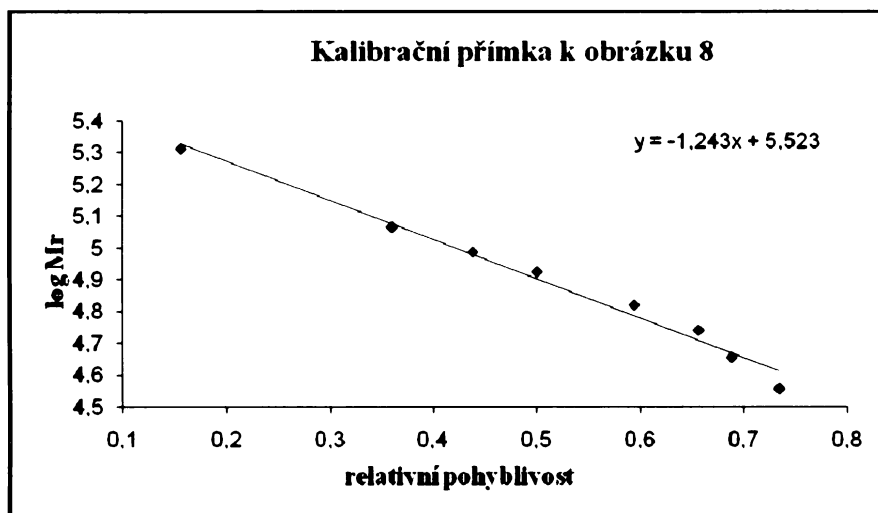
Celý postup jsem zopakoval ještě jednou, ale jako rozpouštědlo jsem použil methanol a spektra jsem tudíž měřil proti methanolu.

## 6 Výsledky

Elektroforéza v prostředí SDS poskytla následující výsledky:

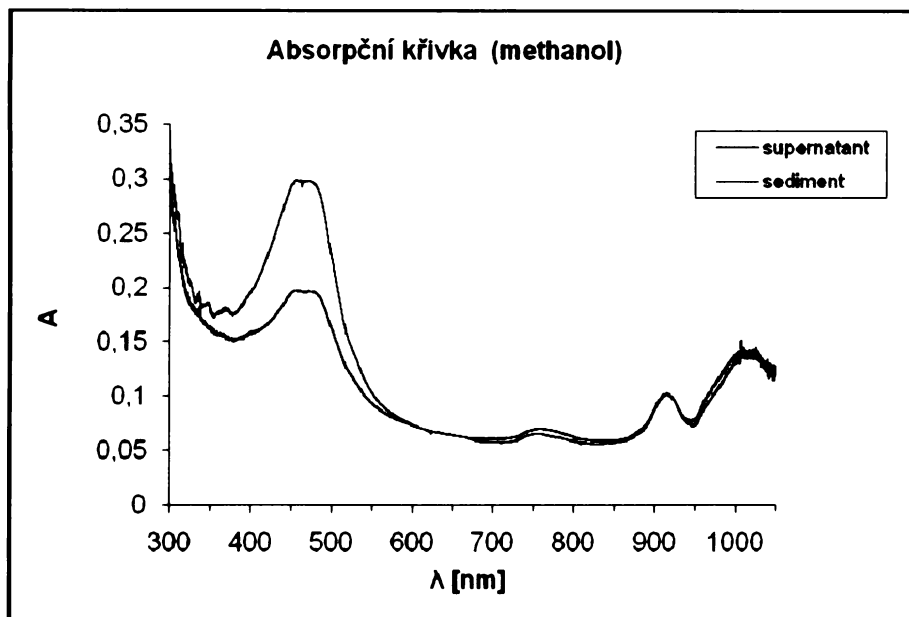


**Obrázek 8:** Snímek gelu č.1: svislá šipka označuje směr gradientu koncentrace akrylamidu. Zbylé šipky označují pruhy odpovídající podjednotkám M (29 kDa) a L (27 kDa). Nanesené vzorky: dráhy 1 a 10 – 4  $\mu$ l roztoku standardů, dráhy 2, 3, 4, 5 – 2, 5, 10 a 20  $\mu$ l supernatantu (viz kapitola 5.1), dráhy 6, 7, 8, 9 – 20, 10, 5 a 2  $\mu$ l sedimentu. Gel je převeden do černobílého zobrazení, kde jsou jednotlivé zóny nejlépe odlišeny.

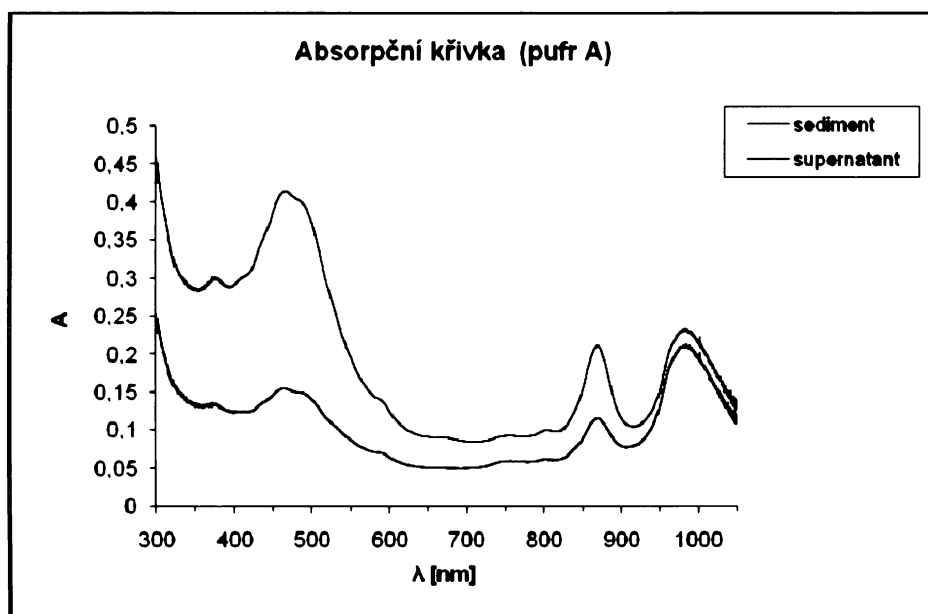


**Obrázek 9:** Kalibrační graf ke gelu č. 1, který byl vypracován na základě relativních pohyblivostí použitých standardů o známých relativních molekulových hmotnostech.

Spektrofotometrická měření vzorků rozpuštěných v methanolu, respektive v pufru A, poskytla následující spektra:



**Obrázek 12:** Absorpční spektra supernatantu a sedimentu při použití methanolu jako rozpouštědla: Absorpce v rozmezí 390–550 nm je způsobena karotenoidy, malý pík při 771 nm je způsoben Bchl *a*, absorpce při delších vlnových délkách je způsobena komponentami komplexu LH1.



**Obrázek 13:** Absorpční spektra supernatantu a sedimentu při použití pufru A jako rozpouštědla: Absorpce v rozmezí 400–600 je způsobena karotenoidy, pík v oblasti 870 nm připadá na Bchl *a* a absorpce při větších vlnových délkách je způsobena komplexem LH1.

## 7 Diskuse

Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie byly objeveny relativně nedávno.<sup>8,9</sup> Jejich reakční centra nejsou doposud detailně prostudována a charakterizována a ani postupy vedoucí k izolaci těchto reakčních center nejsou propracovány do detailů. Na pracovišti, kde jsem tuto práci vypracovával, se jednalo o první experiment s tímto bakteriálním materiálem a tedy o hledání a zavádění vhodného izolačního postupu. Hrubý nástin izolačního postupu mi laskavě poskytl RNDr. Michal Koblížek, Ph.D. z MBÚ AVČR v Třeboni. Ani na tomto pracovišti však ještě izolace RC není dopodrobna propracována, a tak jsem byl nucen některé kroky upravit. Jednalo se zejména o počet a délku centrifugačních kroků, kterých jsem prováděl více ve snaze zbavit materiál slizového obalu, který je použitým druhem bakterie tvořen a který velmi znesnadňuje práci.

Z výsledků elektroforézy plyne, že preparát nebyl zcela čistý. Je tedy nezbytné doplnit izolační postup o další purifikační kroky jako např. gelovou či ionexovou chromatografií nebo ultracentrifugací v hustotním gradientu. Z výsledků pokusů dále vyplývá, že izolace neproběhla kvantitativně, velká část komplexu LH1-RC zůstala po extrakci v sedimentu. Homogenizace pomocí injekční stříkačky byla zřejmě nedostačující, bude nutné nahradit ji účinnější metodou, např. použitím French pressu. Pro usnadnění práce s materiálem bude dále nutné odstranění slizu již před homogenizací. Je možné, že tento sliz navíc poskytuje buňkám vyšší mechanickou stabilitu, čímž je činí odolnějšími proti rozrušení. V jeho nepřítomnosti bude zřejmě i usnadněn přístup hypotonického pufru k buňkám, což také usnadní jejich rozrušení a tím umožní i vyšší účinnost izolace RC.

I přes výše zmíněné nedostatky se mi však v preparátu z bakterie *Erythrobacter sp.* NAP1 podařilo prokázat proteiny odpovídající svou relativní molekulovou hmotností (na základě pohyblivosti při SDS-elektroforéze) podjednotkám M a L bakteriálního reakčního centra. Hodnoty 29 a kDa pro podjednotku M a 27 a kDa pro podjednotku L jsou mírně vyšší než hodnoty uváděné v literatuře pro podjednotky M a L RC purpurových nesírných bakterií.<sup>19,20</sup> Výsledek SDS-elektroforézy byl ale v poměrně dobré shodě s výsledkem obdrženým z MBÚ AVČR v Třeboni pro stejný bakteriální druh.<sup>25</sup> Spektrofotometricky zjištěná absorpční spektra vzorku jsou plně ve shodě s údaji z literatury<sup>11</sup> a potvrzují, že komplex LH1-RC byl v preparátu získaném použitým izolačním postupem skutečně přítomen.

## 8 Závěr

Shromáždil jsem souhrn současných znalostí o výskytu a základních fyziologických charakteristikách aerobních anoxygenních fototrofních bakterií.

Podářilo se mi izolovat transmembránový pigmentoproteinový komplex LH1-RC z aerobní anoxygenní fototrofní bakterie *Erythrobacter sp.* NAP1. Na jeho přítomnost ukazovaly výsledky pokusů zahrnujících elektroforézu v prostředí SDS a spektrofotometrická měření. Elektroforézou zjištěné proteiny o relativní molekulové hmotnosti 29 a 27 kDa odpovídají přibližně podjednotkám bakteriálního reakčního centra M a L uváděným v literatuře.<sup>19,20</sup> Absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 300–1050 nm je plně ve shodě s údaji nalezenými v literatuře.<sup>11</sup>

Pro uspokojivou charakterizaci komplexu LH1-RC je nezbytné zdokonalit izolační postup a získat tak tento komplex v čistší podobě.

## 9 Seznam použité literatury

1. Voet D., Voet J.: Biochemie, Victoria Publishing a. s., Praha (1995)
2. Sofrová D., Tichá M., Barthová J., Entlicher G., Stiborová M., Novák F., Hudeček J., Hladík J., Krajhanzl A.: Biochemie – základní kurz, Karolinum, Praha (1995)
3. <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/chloroplasts/images/chloroplastsfigure1.jpg>  
(staženo dne 9.5.2007)
4. [http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-3/ch19\\_proton-grad.jpg](http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-3/ch19_proton-grad.jpg)  
(staženo dne 9.5.2007)
5. Šetlík<sup>1.</sup>, Seidlová<sup>ř.</sup>, Šantrůček<sup>ř.</sup>: Fyziologie rostlin, <http://kfar.bf.jcu.cz/?act=2>  
(staženo dne 20. 10. 2006)
6. Nelson David, L., Cox Michael, M.: Lehninger's Principles of Biochemistry, Fourth Edition, W. H. Freeman, New York (2004)
7. Leblová S.: Biochemie fotosyntézy – mechanismy fixace atmosférického oxidu uhličitého a jejich regulace, Státní pedagogické nakladatelství, Praha (1988)
8. Shimada K.: Aerobic anoxygenic phototrophs v knize anoxygenic photosynthetic bacteria, (Blankenship a kol.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, str. 105–122 (1995)
9. Yurkov V., Beatty J. T.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 695–724 (1998)
10. Koblížek M., Prášil O.: Vesmír 81, 505–507 (2002)
11. Koblížek M., Bějá O., Bidigare R. R., Christensen S., Benitez-Nelson B., Vetriani C., Kolber M. K., Falkowski P. G., Kolber Z. S.: Arch. Microbiol. 180, 327–338 (2003)
12. Eraso J. M., Kaplan S.: Photoautotrophy, Encyclopedia of life sciences (www.els.net) (2001), (staženo 10. 3. 2007)
13. Allgaier M., Uphoff H., Felske A., Wagner-Döbler I.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 5051–5059 (2003)
14. Cottrell M. T., Mannino A., Kirchman D. L.: Appl. Environ. Microbiol. 72, 557–564 (2006)
15. <http://www.steve.gb.com/images/molecules/porphyrins/bacteriochlorophyll-a.png>  
(staženo dne 18. 5. 2007)
16. <http://www.steve.gb.com/images/molecules/porphyrins/chlorophyll-a.png>  
(staženo dne 18. 5. 2007)
17. Iba K., Takamiya K-I., Toh Y., Nishimura M.: J. Bacteriol. 170, 1843–1847 (1988)
18. Rathgeber Ch., Beatty J. T., Yurkov V.: Photosynth. Res. 81, 113–128 (2004)



19. Ke B.: Photosynthesis (photobiochemistry and photobiophysics), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, str. 48–62 (2001)
20. Cogdell R. J., Lindsay J. G.: *New Phytol.* 145, 167–196 (2000)
21. Beatty J. T.: *Photosynth. Res.* 73, 109–114 (2002)
22. Kolber Z. S., Plumley F. G., Lang A. S., Beatty J. T., Blankenship R. E., VanDover C. L., Vetriani C., Koblížek M., Rathgeber Ch., Falkowski P. G.: *Science* 292, 2492–2495 (2001)
23. Herbstová, M.: Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát sinice *Synechococcus elongatus*, Diplomová práce, Přf UK, Praha (2001)
24. Koblížek, M.: osobní sdělení
25. Koblížek, M.: osobní sdělení

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka