

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Femtosekundová časově rozlišená spektroskopie
světlosběrných komplexů fotosyntetických bakterií**

Bakalářská práce

Ivana Šímová

Školitel: Mgr. Václav Šlouf, PhD.

České Budějovice 2017

Bibliografické údaje:

Šímová, I., 2017: Femtosekundová časově rozlišená spektroskopie světlosběrných komplexů fotosyntetických bakterií. [Femtosecond time-resolved spectroscopy of light harvesting complexes of photosynthetic bacteria., Bc. Thesis, in Czech] - 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main task of this thesis is to study a light-harvesting 1 complex with carotenoid spheroidenone of *Rhodobacter sphaeroides* using a femtosecond pump-probe spectroscopy. Supposing that there are two different groups of spheroidenone varying structurally, diverse transient absorption spectra are expected after the sample is excited by light of different wavelengths.

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

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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 výsledky 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, 16. dubna 2017

.....

Ivana Šímová

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Václavu Šloufovi, Ph.D. za výborný přístup k vedení mé práce, cenné znalosti a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat svému manželovi a rodině za jejich trpělivost.

Seznam použitých zkratek

Bchl - bakteriochlorofyl

Bchl(2) - zvláštní pár

Chl - chlorofyl

ESA - *excited state absorption*

EADS - *evolution-associated difference spectra*

GSB - *ground state bleaching*

ICT - *intramolecular charge transfer*, stav s přeskupením náboje

Kar - karotenoid

LH1 - *light - harvesting 1*

LH2 - *light - harvesting 2*

OPA - optický parametrický zesilovač

RC - reakční centrum

S₀, S_x - základní, x-tý excitovaný stav karotenoidu

spn - sferoidenon

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Fotosyntéza	2
1.1.1	Bakteriální fotosyntéza	3
1.1.2	Purpurové bakterie	4
1.2	Fotosyntetické pigmenty	5
1.2.1	Chlorofyly a bakteriochlorofyly	5
1.2.2	Karotenoidy	8
1.3	Fotosyntetický aparát	12
1.3.1	Světloběrné komplexy	12
1.3.2	Reakční centrum	14
1.3.3	Přenos energie ve světloběrných komplexech a mezi nimi	15
2	Materiál a metody	17
2.1	Spektroskopie	17
2.1.1	UV – VIS spektroskopie bez časového rozlišení	19
2.1.2	Časově rozlišená femtosekundová spektroskopie	20
2.2	Fitování výsledků	22
3	Výsledky	23
3.1	Absorpční spektrum	23
3.2	Tranzientní absorpční spektra	24
3.3	Kinetiky	27
4	Diskuze	28
5	Závěr	30

Cíle práce

Tato bakalářská práce má za úkol pozorovat spektrální aktivitu karotenoidu sferoidenonu pomocí časově rozlišené femtosekundové spektroskopie. Motivací k provedení experimentů byl předpoklad většího stechiometrického podílu karotenoidů na světlosběrný komplex typu 1 (LH1 komplex) u fotosyntetických bakterií druhu *Rhodobacter sphaeroides*. Předpokládá se, že se v komplexu nachází dvě skupiny karotenoidů, které se liší prostorovou konfigurací, a tudíž i spektrální odezvou. [13] Tento rozdíl by se měl projevit odlišnými tranzientními spektry při excitaci zkoumaných karotenoidů různými vlnovými délkami. Primárním cílem práce tedy bylo provést dané měření a na základě obdržených výsledků potvrdit nebo vyvrátit výše popsanou hypotézu.

Práce se mimo to zaměřuje i na aktivitu tzv. ICT stavu, jenž je u zkoumaného karotenoidu díky jeho chemické struktuře pozorován.

1 Úvod

Člověk se již dlouho snaží přijít na to, jak funguje příroda. Raný vývoj vesmíru je sice popsán teorií Velkého třesku, ovšem na otázky ohledně života pravděpodobně ještě nějakou dobu nebudeme znát jasnou odpověď. Poté, co vznikly atomy a následně i jednoduché molekuly, je tudíž vznik primitivních forem života, a s tím spojené činnosti další otázkou, kterou se vědci zabývají.

Jedny z prvních organismů, které začaly na Zemi žít a přizpůsobovat prostředí k obrazu svému, byly nejspíše prokaryotické bakterie. Jejich nejstarší fosilní nálezy jsou datovány jako 3,5 mld. let staré. Na druhou stranu, z této doby nemáme žádný důkaz o existenci eukaryotických buněk. Prokaryotické organismy se brzy začaly diferencovat a vytvořily dvě domény – archea a bakterie. Ještě dnes jsou obě skupiny v hojné míře k nalezení v přírodě, kde obývají široká spektra oblastí. [1]

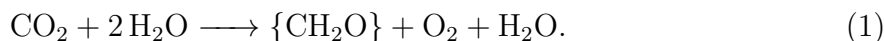
Obecně se prokaryota, jakožto forma života, projevují typickými vlastnostmi, jež jsou pro definici živého organismu požadované. Mezi ně patří růstové a vývojové pochody, rozmnožování a zachovávání genetické informace, reagování na vnější i vnitřní podněty a metabolické procesy. Poslední zmíněná vlastnost je pro nás velice důležitá, protože díky fotosyntéze, která mezi tyto procesy patří, máme okysličenou atmosféru. Přestože

začala prokaryota využívat fotosyntézu jako zdroj energie již brzy po svém samotném vzniku, na svém počátku neprodukovala fotosyntéza O_2 , byla tzv. anoxygenní. Až sinice, obývající planetu Zemi přibližně od doby 3 mld. let nazpět, byly prvními fototrofními organismy, které začaly svou oxygenní fotosyntézou produkovat kyslík. [1] Ten se po nasycení vodních povrchů a hornin obsahujících železo následně začal hromadit i v zemské atmosféře asi před 2,4 mld. lety. [14] Z tohoto krátkého shrnutí vyplývá, že prokaryota byla pro vznik dalšího, složitějšího života na Zemi, klíčová. [1]

1.1 Fotosyntéza

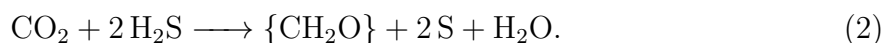
V následující kapitole se budeme zabírat samotnou fotosyntézou jakožto dějem, který obecně slouží k přeměně energie. Naším primárním zájmem nejsou rostliny (tedy eukaryotní organismy), nýbrž bakterie patřící mezi prokaryota. Jejich způsobu fotosyntézy bude tedy věnována další kapitola. Výzkum základních fotosyntetických dějů ale probíhal převážně na rostlinách, a proto jsou poznatky uvedené v této kapitole vztažené hlavně na ně.

V čem tedy spočívá fotosyntéza? Jedna z nejobecnějších definic říká, že jde o zachycení světelné energie a její přeměnu na energii chemickou. Všem dnes dobře známá rovnice fotosyntézy je



Tato rovnice samozřejmě popisuje oxygenní fotosyntézu, tedy takovou, při níž vzniká kyslík a jako zdroj elektronů je použita voda. Oxygenní fotosyntézou disponují rostliny, řasy a sinice. Jak je vidět z rovnice (1), vedle kyslíku jsou produktem reakce i sacharidy. Sacharidy jsou oním produktem, v němž je vázána energie, a který je využit primárně jak fotosyntetickým organismem samotným, tak i sekundárně organismem nefotosyntetickým, jenž jej pozře.

Nutno dodat, že tato rovnice není jediná. Anoxygenní fotosyntézou nevzniká kyslík, ale i přesto je princip víceméně stejný. Ovšem namísto vody využívají organismy jako zdroj elektronů například H_2S a produktem jsou poté atomy síry. Rovnice pro tuto verzi fotosyntézy je

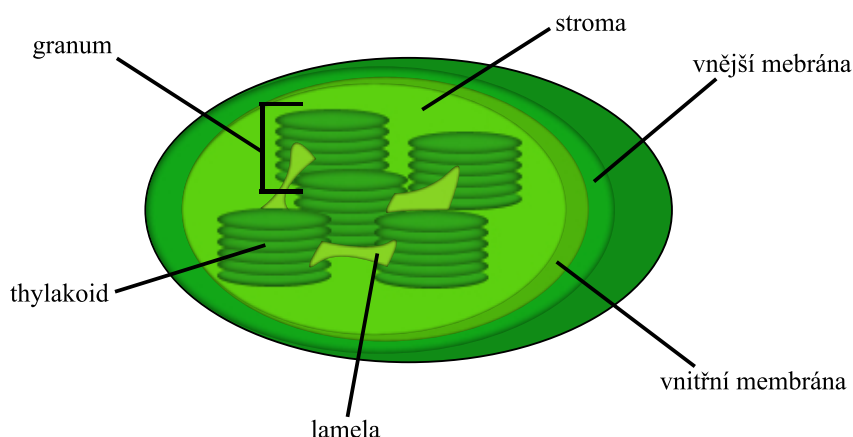


Pokud rovnice (1) a (2) zobecníme, získáme rovnici fotosyntézy ve tvaru



Samotné poznání mechanismu fotosyntézy shrnutého rovnicí (1) trvalo téměř dvě století. Teorie, že rostliny mohou využívat k syntéze hmoty světlo a vzduch, se zdála být poněkud abstraktní a bylo provedeno veliké množství experimentů, než byla tato hypotéza dokázána.[1]

Vzhledem k tomu, že rostliny mají schopnost fotosyntetizovat, musí jejich buňky obsahovat aparát, který fotosyntézu umožňuje. Buňky rostlin jsou eukaryotické a mají tedy složitější strukturu než buňky prokaryotické. Na různé funkce mají zvláštní organely, přičemž organelou zodpovědnou za fotosyntézu je chloroplast.



Obrázek 1: Schéma chloroplastu.

Jak je vidět na výše vloženém schématu, vnitřek chloroplastu je vyplněn thylakoidy, které se seskupují do útvarů zvaných grana. Thylakoidy jsou tvořené membránami, na kterých se nacházejí molekuly chlorofylu vázané v proteinových komplexech. Přesně zde, na thylakoidních membránách, probíhá světelná fáze fotosyntézy, tedy přenos světelné energie fotosystémy do reakčního centra a její následná přeměna na chemickou energii. Ta je posléze využita v temnostní fázi fotosyntézy k syntéze sacharidů z CO_2 a H_2O . [1]

1.1.1 Bakteriální fotosyntéza

Jak rostliny, tak i některé bakterie se adaptovaly na získání energie skrze fotosyntézu. Jedná se o anoxygenní fototrofní bakterie (purpurové (sírné), zelené (sírné)) a oxygenní fototrofní bakterie (sinice). Jejich primární cíl je stejný. Je to navázání energie do makroergních vazeb v ATP. Ke konverzi CO_2 na stavební materiál je zapotřebí mimo ATP i redukční energie. U rostlin, řas a sinic je poskytována vodou, bakterie preferují

redukované sloučeniny síry, případně molekulární vodík. Z této informace vyplývá, že mimo kmen sinic je bakteriální fotosyntéza anaerobní nebo fakultativně aerobní proces, přičemž zelené sírné bakterie a část purpurových jsou striktně anaerobní. [2]

Co se týče přítomnosti různých fotosyntetických pigmentů, najdeme mezi různými bakteriemi poměrně výrazné rozdíly. Pomineme sinice, které již obsahují molekuly chlorofylů. I zelené a purpurové bakterie se vzájemně liší přítomnými bakteriochlorofyly a zastoupením karotenoidů. Například purpurové bakterie obsahují převážně bakteriochlorofyly a,b a široké spektrum karotenoidů, které jsou alifatické. Zelené bakterie obsahují bakteriochlorofyly a,c,d,e a vždy přítomný γ – karoten. [2] [4]

Zatímco vyšší fotosyntetické organismy mají v buňkách chloroplasty, fotosyntetické bakterie chloroplasty vyvinuté nemají. Molekuly bakteriochlorofylů se vyskytují ve výběžcích cytoplazmy do (vnitřní) plazmatické membrány. Tyto fotosynteticky aktivní výběžky jsou nazývány intracytoplazmatickou membránou – ICM. Izolovaným formám se říká chromatofory. Tyto útvary obsahují kompletní fotosyntetický aparát. [3]

1.1.2 Purpurové bakterie

Purpurové bakterie jsou významnou skupinou anoxygenních fototropních bakterií. Patří mezi gramnegativní bakterie, což znamená, že jejich vnější obal tvoří dvě hlavní vrstvy membrán, mezi nimiž se nachází vrstva peptidoglykanů. Díky pestrému zastoupení karotenoidů mohou nabývat od fialové až po oranžovou barvu.

Dnes známe přes 40 různých rodů purpurových bakterií. V laboratorních podmínkách bylo zjištěno, že hodně druhů těchto bakterií snáší dobře extrémní podmínky jako vysokou salinitu a pH. Některé využívají při fotosyntéze jako zdroj elektronů H_2S , jiné H_2 . Purpurové bakterie vytvářející atomy síry se liší jejím ukládáním. Může být skladována uvnitř buňky (např. *Chromatiaceae*) nebo vyloučena ven (např. *Ectothiorhodospiraceae*). [10]

Druhy jako *Rhodobacter* a *Rhodopseudomonas* jsou používány ke zkoumání anoxygenní fotosyntézy. Tyto bakterie jsou fyziologicky velice všestranné. Pro příklad uvedeme *Rhodobacter capsulatus*, která zvládne růst fototrofně s přítomným oxidem uhličitým, příp. uhlíkem z organických zdrojů, nebo i ve tmě pomocí respiračních a fermentačních procesů. Společně s *Rhodobacter sphaeroides* jsou schopny i fixovat N_2 . [10] Fotosyntetický aparát, který byl použit v provedeném měření, byl izolován z *Rhodobacter sphaeroides*.

1.2 Fotosyntetické pigmenty

Fotosyntetickými pigmenty nazýváme souhrně skupinu sloučenin, které jsou svou chemickou strukturou vhodné pro absorpci fotonů, jejichž energie je využita v následných fotosyntetických procesech. Bez jejich přítomnosti ve fotosyntetických systémech by nebylo možné absorbovat záření a přeměňovat jeho energii. Pásky absorpce chlorofylů a bakteriochlorofylů jsou vhodně doplněny absorpčními pásy různých karotenoidů, čímž se zvyšuje množství excitační energie využitelné v pozdějších fázích fotosyntézy. Mimo světlosběrnou činnost mají pigmenty i další funkce. Některé chlorofyly a bakteriochlorofyly zastávají roli *zvláštního páru* v reakčním centru a karotenoidy jsou známé svými fotoprotektivními vlastnostmi.

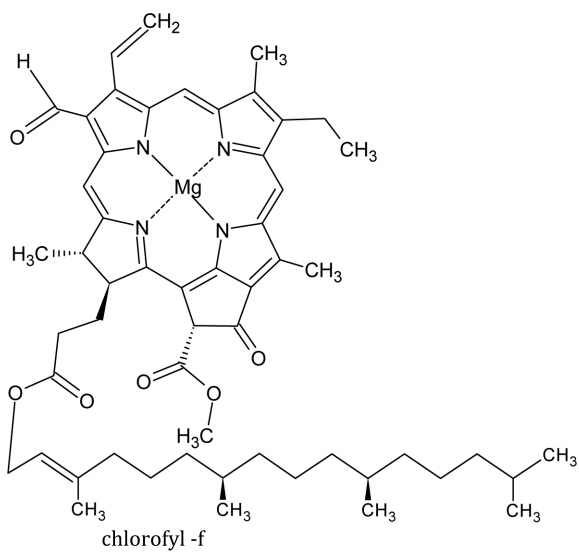
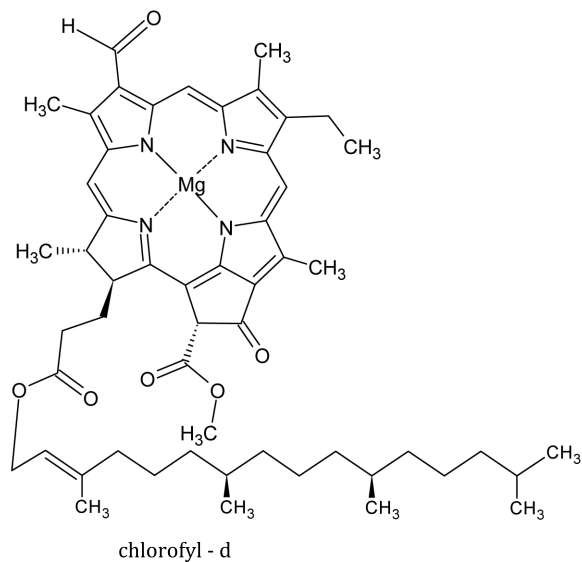
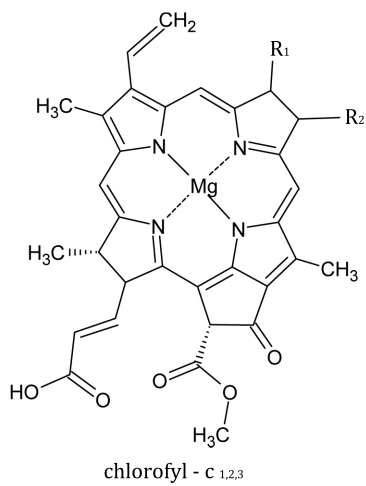
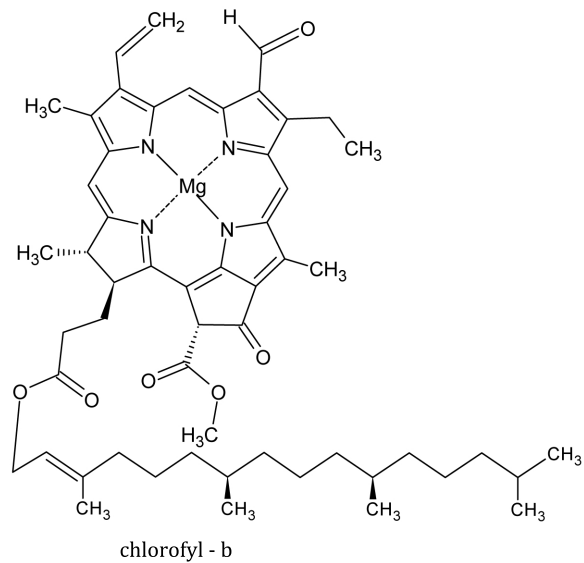
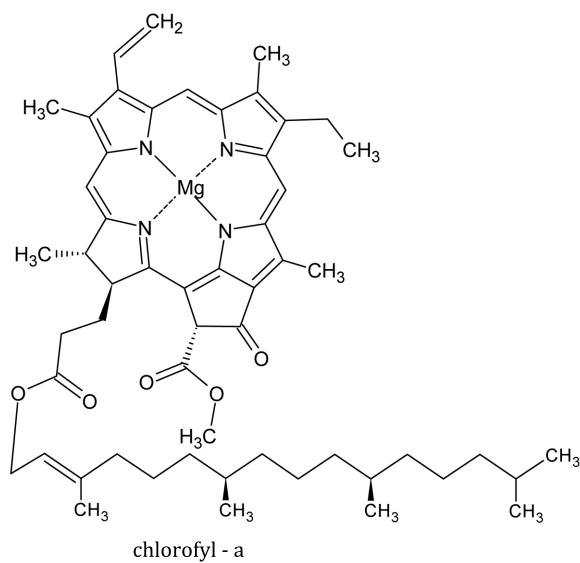
Co způsobuje, že molekula může absorbovat fotony? Molekuly absorbující v ultrafialových nebo viditelných oblastech spektra obsahují ve své chemické struktuře části zvané chromofory. Ty jsou tvořeny systémem tzv. konjugovaných vazeb. To znamená, že se mezi atomy uhlíku (příp. s dusíkem [11]) pravidelně střídají dvojná a jednoduché vazby. To vede ke vzniku π orbitalu s delokalizovanými elektrony, které mohou být excitovány absorpcí fotonů. V našem případě se jedná zejména o $\pi \rightarrow \pi^*$ přechody. [7]

1.2.1 Chlorofyly a bakteriochlorofyly

Chlorofyly jsou složité tetrapyrolové molekuly nacházející se ve všech organismech, které využívají oxigenní fotosyntézu. Rozeznáváme chlorofyly typu a – f, které se nachází v různém množství v různých organismech. Nejčastější výskyt přísluší Chl–a. Ten můžeme najít již v sinicích, přes všechny možné druhy řas, až po rostliny.

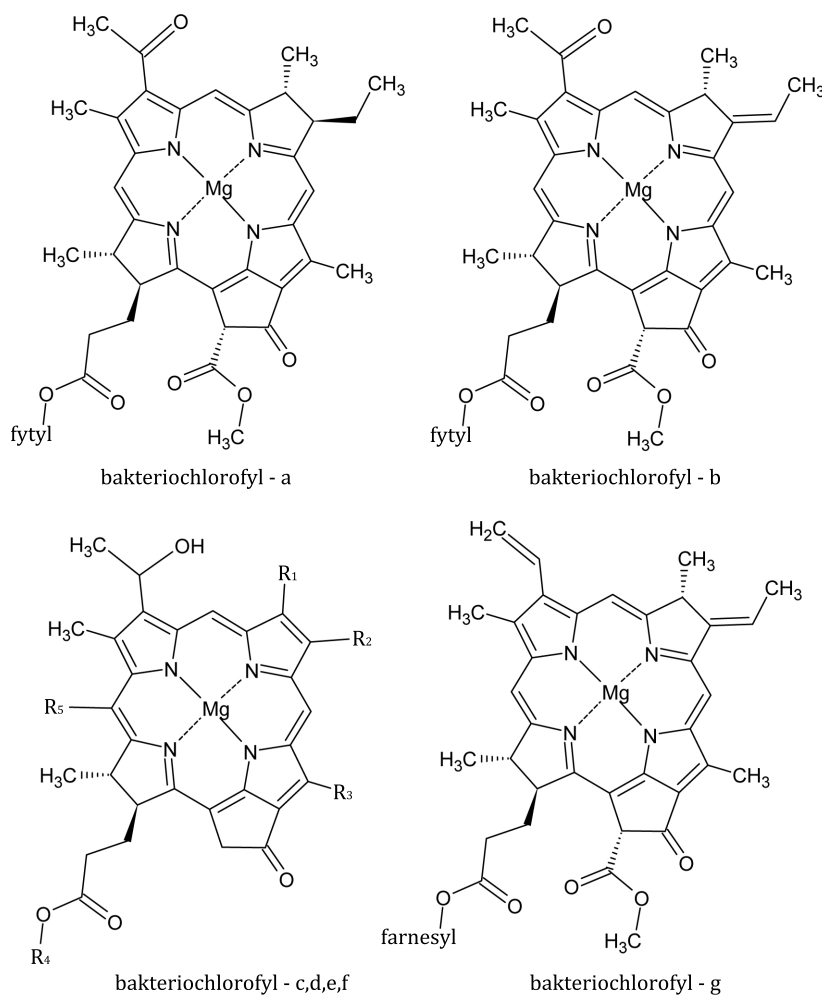
Jak je vidět na obr. 2, základní struktura chlorofylů se moc neliší. Všechny jsou tvořeny čtyřmi pyrolovými jednotkami s vázaným atomem hořčíku uprostřed a pátým cyklickým řetězcem navázaným na jeden pyrolový řetězec. Uhlovodíkový řetězec je navázán na další pyrolovou jednotku a vyskytuje se u všech typů kromě Chl–c. Struktura Chl–e není ještě dobře prozkoumána, a proto na obrázku chybí. [4]

Fotosyntetické bakterie (kromě sinic – ty obsahují klasické chlorofyly) mají své vlastní molekuly chlorofylu. Jsou nazývány bakteriochlorofyly a strukturně jsou podobné chlorofylům. Také jsou tvořeny čtyřmi pyrolovými jednotkami s vázaným atomem hořčíku uprostřed i pátým cyklickým řetězcem navázaným na jednom pyrolovém řetězci a uhlovodíkovým řetězcem na další pyrolové jednotce. V případě



Obrázek 2: Molekuly chlorofylů.

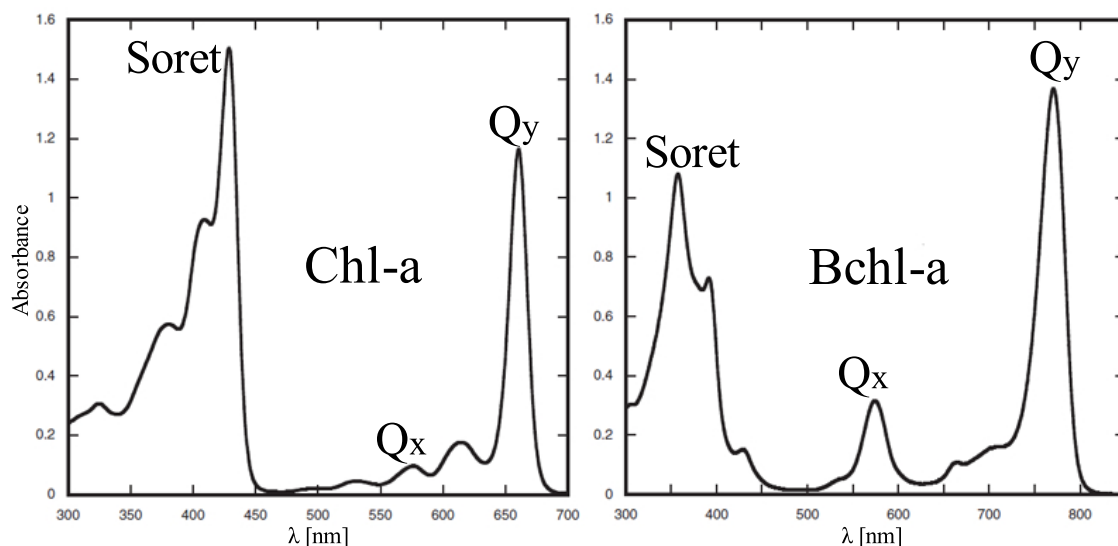
bakteriochlorofylů rozlišujeme typy a – g, přičemž rozdíly mezi nimi opět tkví převážně v navázaných substituentech. [4]



Obrázek 3: Molekuly bakteriochlorofylů.

Purpurové bakterie, na jejichž fotosyntetický aparát je zaměřena tato práce, obsahují Bchl–a nebo Bchl–b, vždy jen jeden z nich. Zkoumaný fotosyntetický aparát z *Rhodobacter sphaeroides* obsahuje Bchl–a. [4] [9]

Pokud se zaměříme na strukturní odlišnosti např. mezi Chl–a a Bchl–a, zjistíme, že je to acetylová skupina na třetím uhlíku a jednoduchá vazba namísto dvojné v cyklu B mezi uhlíkem č.7 a č.8 u Bchl–a. V porovnání s chlorofylem je snížený stupeň konjugace a symetrie. To má dopad na spektrální odezvu, jelikož pokud se podíváme na absorpční spektra Chl–a a Bchl–a na obr. 3, vidíme, že oba hlavní absorpční pásy jsou posunuté. [4]



Obrázek 4: Absorpční spektra Chl-a a Bchl-a. Převzato a upraveno z [4].

1.2.1.1 Spektroskopické vlastnosti

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, fotosyntetické pigmenty obsahují chromofory. V případě (B)chl se jedná právě o skupinu tetrapyrolových jader. Tyto makrocykly, jak také bylo zmíněno, se liší navázanými substituenty, a to ovlivňuje jejich absorbanci. Nicméně i přesto absorpční spektra všech (B)chl obsahují dvě výrazná maxima – jedno v blízké UV a modré oblasti a druhé v blízké IR a červené oblasti spektra. V závislosti na druhu měřeného (B)chl jsou tato maxima více či méně posunutá. [4]

Jak lze tato absorpční spektra vysvětlit? Jedná se o $\pi \rightarrow \pi^*$ přechody, které jsou konány elektrony nalézajícími se v konjugovaných π orbitalech. Modrý absorpční pás (Soretův) přísluší krátce existujícímu excitovanému stavu, který přechází nezářivými přechody do déletrvajícího stavu, který se na absorpčním spektru vyskytuje v podobě červeného pásu nazývaného Q_y a menšího pásu nazývaného Q_x . [4]

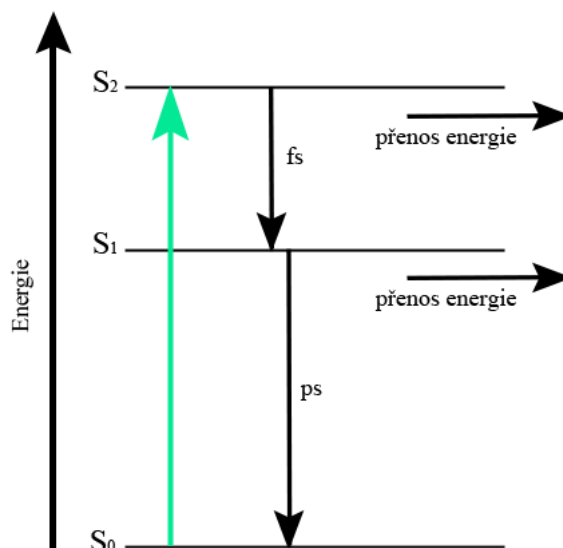
1.2.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou další významné a široce rozšířené pigmenty, jejichž přítomnost umožňuje organismům efektivněji fotosyntetizovat. Dělí se na karoteny a xantofyly, které obsahují oproti karotenům navíc atomy kyslíku. Strukturně patří do skupiny tetraterpenoidů, jsou to tedy molekuly s dlouhým řetězcem konjugovaných vazeb. Ty způsobují, že se i karotenoidy chovají jako chromofory. Jejich absorpční pásy leží v oblasti modrého a zeleného světla, což znamená, že vhodně doplňují absorpční pásy

chlorofylů, které v zelené oblasti světlo neabsorbují. Karotenoidy díky tomu nabývají velké množství barevných odstínů, od červené až po žlutou. [7]

1.2.2.1 Spektroskopické vlastnosti

Karotenoidy mají excitované stavy jinak postavené než (bakterio)chlorofyly. Základní schéma excitovaných stavů karotenoidů je následující:



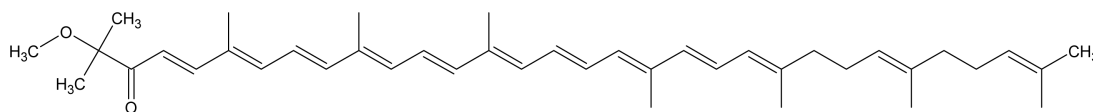
Obrázek 5: Základní schéma excitovaných stavů karotenoidů.

Absorpční pás vzniklý v modro – zelené oblasti odpovídá přechodu ze základního stavu S_0 na S_2 , tedy na druhý excitovaný stav. Na stav S_1 molekulu karotenoidu nelze excitovat jedním fotonem, přechod z S_0 na S_1 je kvůli symetrii molekuly definován jako zakázaný. Doba života S_2 stavu je ovšem velice krátká a molekula rychle přechází procesem vnitřní konverze do stavu S_1 , ze kterého následně deexcituje do základního stavu v řádu jednotek či desítek pikosekund. Energie S_1 a S_2 stavu se snižuje s rostoucí délkou konjugovaného řetězce. Jak S_2 , tak S_1 stav slouží jako donory energie pro molekuly chlorofylů. [4]

1.2.2.2 Karbonylové karotenoidy

Vzhledem k zaměření této práce je třeba zmínit ještě základní informace o karbonylových karotenoidech. Tyto karotenoidy disponují strukturálním prvkem, kterým je konjugativně vázaná karbonylová skupina. Vysoká elektronegativita atomu kyslíku z

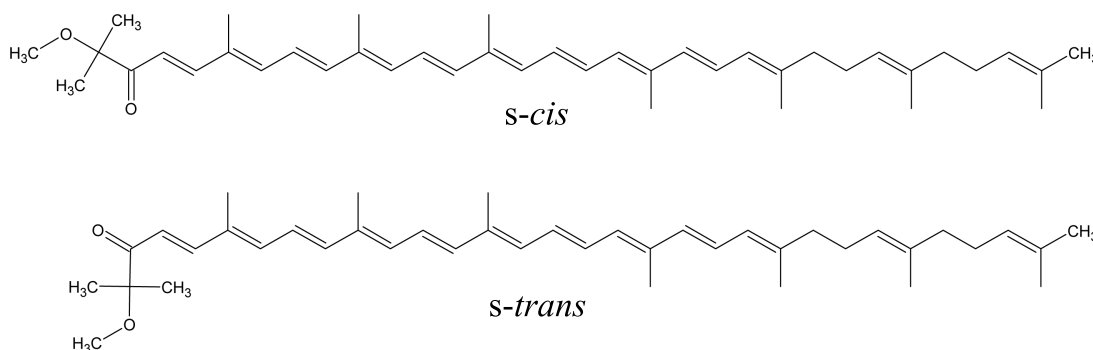
této skupiny ovlivňuje rozmístění elektronů z okolních atomů. [8] Mezi základní zástupce patří například peridinín a sferoidenon. [7]



Obrázek 6: Karbonylový karotenoid sferoidenon.

Karbonylové karotenoidy vykazují mimo již zmíněné stavy S_2 a S_1 také přítomnost tzv. ICT stavu (ICT = *intramolecular charge transfer*, tj. stav s přeskupením náboje). V časově rozlišené spektroskopii můžeme ICT signál pozorovat jako pás posunutý do červené oblasti spektra vzhledem k signálu S_1 stavu a také jako negativní signál viditelný v blízké infračervené oblasti, způsobený stimulovanou emisí. [7] Mimoto se i zkracuje doba života S_1 stavu. [19]

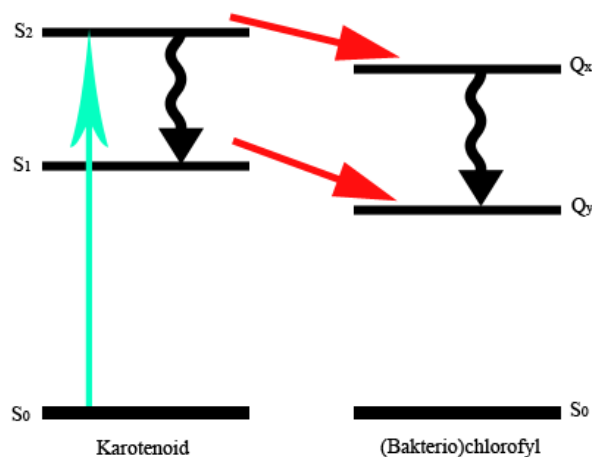
Bylo ovšem zjištěno, že ne vždy pozorujeme u karbonylových karotenoidů ICT signál. Záleží například na typu rozpouštědla. V nepolárních rozpouštědlech ICT stav nepozorujeme, v polárních ano. Ovšem sferoidenon i v polárním rozpouštědle vykazuje pouze slabý ICT signál. [21] Nicméně existují podmínky, za kterých u něj můžeme poměrně vysokou intenzitu signálu z ICT stavu pozorovat – pokud jej máme vázaný v proteinu. [18] Předpokládá se, že je to způsobeno konfigurací karbonylové skupiny vůči zbytku konjugovaného řetězce. Díky své strukturální funkci mohou proteiny udržovat karbonylovou skupinu vzhledem ke konjugovanému řetězci v *s-trans* konfiguraci, což by způsobilo pozorování ICT stavu. V klasickém roztoku, kde je stabilní konfigurace karbonylové skupiny typu *s-cis*, přítomnost ICT stavu nepozorujeme. [18]



Obrázek 7: Možné konfigurace karbonylové skupiny vůči konjugovanému řetězci. [12]

1.2.2.3 Světlosběrná funkce karotenoidů

Tato funkce karotenoidů spočívá ve zvýšení množství fotonů, které mohou být absorbovány fotosyntetickým aparátem. Jak bylo zmíněno, způsobuje to absorpční pás karotenoidů v oblasti modrého až zeleného světla. Tato přijatá energie může být předávána (B)chl, pokud je S_2 nebo S_1 stav energeticky výše než akceptorový stav (B)chl. [7]



Obrázek 8: Schéma přenosu energie z karotenoidů na (bakterio)chlorofyly.

K absorpci fotonů jsou ve fotosyntetických organismech karotenoidy s vhodnou délkou konjugovaného řetězce. V přírodních systémech se vyskytují karotenoidy s N v rozmezí od 7 do 13 (N je počet konjugovaných dvojných vazeb). Mimo tento interval by karotenoidy nemohly plnit světlosběrnou funkci (S_1 stav by měl nižší energii než Q_y (B)chl). Další problém, který by se mohl ještě více projevit zejména u dlouhých karotenoidů, je příliš krátká doba života excitovaných stavů karotenoidů na to, aby mohlo dojít k přenosu na (B)chl. S_2 má u běžných karotenoidů dobu života v řádu stovek fs a S_1 v řádu jednotek až desítek ps. [4] Vzhledem k velkému rozšíření karotenoidů ve fotosyntetických aparátech ovšem musí přenos energie úspěšně konkurovat těmto rychlým dohasínáním excitovaných stavů. [7]

1.2.2.4 Ochranná funkce karotenoidů

Další významnou funkcí karotenoidů je ochrana fotosyntetického aparátu před škodlivými důsledky nadměrného množství světla. Vysoké intenzity světla způsobují velké množství excitovaných chlorofylů. Ve výchozím stavu jsou chlorofyly excitovány

do singletového stavu $^1\text{Chl}^*$. Mezisystémovým přechodem (ISC - *intersystem crossing*) se může takto excitovaných chlorofyl dostat do tripletního stavu $^3\text{Chl}^*$. Tento stav již může reagovat s molekulou kyslíku v základním stavu $^3\text{O}_2$ za vzniku $^1\text{O}_2^*$. Singletní stav kyslíku je vysoce reaktivní a způsobuje degradaci biomolekul. Fotoprotektivní funkce karotenoidů spočívá v deexcitaci $^3\text{Chl}^*$ za vzniku $^3\text{Kar}^*$ nebo v přenosu energie ze singletního kyslíku $^1\text{O}_2^*$ na karotenoid za vzniku $^3\text{Kar}^*$ a $^3\text{O}_2$. Tato absorbovaná energie je poté v karotenoidu neškodně vyzářena ve formě tepla. Mimo výše popsané případy fotoprotekce funguje i na úrovni zhášení singletního excitovaného chlorofylu $^1\text{Chl}^*$, tedy v procesu nefotochemického zhášení (NPQ – non-photochemical quenching). [4] [7]

1.3 Fotosyntetický aparát

Ucelené systémy absorbující a následně zpracovávající světelnou energii obsahují všechny fotosyntetické organismy, od prokaryotických bakterií až po vyšší rostliny. Jejich struktura se ale samozřejmě liší dle specifických vlastností organismu, jejich evoluční historie a obývaného biotopu. Tyto systémy se obecně dělí na anténní komplexy a reakční centrum. Zatímco anténní komplexy zajišťují transport světelné energie právě do reakčního centra, v reakčním centru začínají fotofyzikální reakce, které vedou ke vzniku produktů světelné fáze fotosyntézy. [4]

1.3.1 Světloběrné komplexy

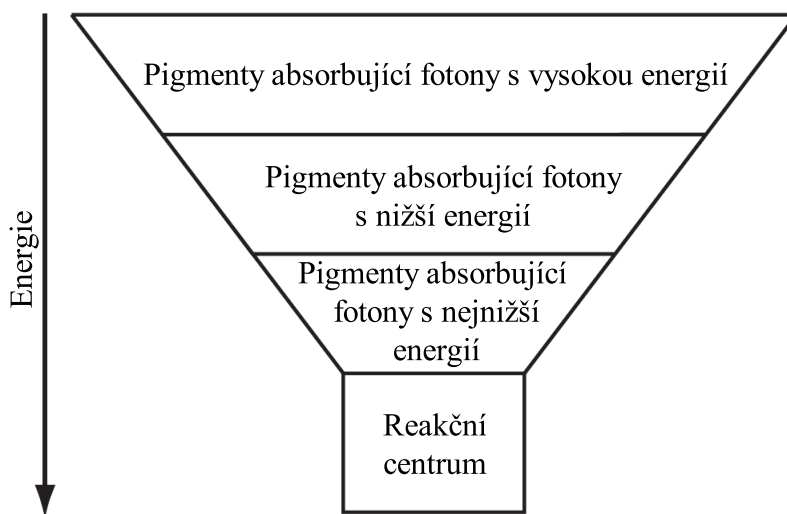
S výsledky, které poprvé naznačily existenci anténních komplexů, přišli v roce 1932 vědci Emerson a Arnold. Ti změřili, že jedna molekula O_2 vzniká přibližně na 2480 chlorofylových molekul. [15] Jako jedno z vysvětlení se nabízelo právě to, že energie je přenášena z jednoho chlorofylu na druhý. Tato teorie byla zavrhována, protože nebyl znám žádný fyzikální popis transportu energie mezi molekulami chlorofylu. První funkční vysvětlení navrhl až ve čtyřicátých letech T. Förster. [4] Podrobnější princip jeho mechanismu bude popsán v části o mechanismech přenosu energie ve světloběrných komplexech a mezi nimi.

Pro podpoření této transportní funkce chlorofylů svědčí i vypočtená hodnota přibližně deseti fotonů absorbovaných chlorofylem za 1 sekundu při plném osvětlení. Vzhledem k rychlosti přenosů energie pomocí excitovaných molekul je toto množství fotonů velice malé a veškerý další fotosyntetický aparát počínaje reakčním centrem by většinu času

nebyl využíván. Pokud ale dochází k rychlým přenosům excitační energie skrze dlouhou řadu chlorofylů až k tomu, který je napojen na reakční centrum, je využití reakčních center a následných pochodů mnohem vyšší. [4]

Ve fotosyntetickém aparátu nenajdeme jen jeden druh anténních komplexů. V závislosti na jejich vzdálenosti od reakčního centra je dělíme na *vnitřní anténní komplexy* a *vnější anténní komplexy*. Vnitřní antény jsou přímo v blízkosti reakčního centra, zatímco vnější jsou odděleny. Oba druhy se strukturně liší. Dle zkoumaného druhu organismů se vyskytují různé druhy těchto komplexů. V případě purpurových bakterií se jedná o LH1 (*light – harvesting 1*) a LH2 (*light – harvesting 2*) komplex. LH1 patří mezi vnitřní anténní komplexy a je v těsném kontaktu s reakčním centrem. LH2 patří mezi vnější komplexy. [4]

Anténní komplexy se liší i svým pigmentovým složením. Model tzv. trychtýřovitého efektu přehledně ukazuje, jak se mění množství absorbované energie pigmentů v závislosti na jejich vzdálenosti od reakčního centra.



Obrázek 9: Model trychtýřovitého efektu. Převzato a upraveno z [4].

Tento model ukazuje, že v okrajových anténních komplexech se nalézají receptory nejkratších použitelných vlnových délek. Ty předávají energii pigmentům s absorpcí delších vlnových délek. Tato energie je dále např. přenesena do komplexů blíže reakčnímu centru, kde je opět předána pigmentům s absorpcí ještě delších vlnových délek. Postup se opakuje, dokud energie nedorazí do reakčního centra. V anténních komplexech se nachází jak (B)Chl, které si předávají energii mezi sebou, tak karotenoidy, jež zde ovšem mají spíše ochrannou funkci.

1.3.1.1 LH2

Pigment–proteinový komplex LH2 patří mezi vnější anténní komplexy. Jeho základní stavební jednotkou je heterodimer dvou peptidů – α –apoproteinu a β –apoproteinu, který má na sobě nekovalentně navázané bakteriochlorofyly a karotenoidy. Tyto jednotky společně tvoří větší celky, nejčastěji oktamery nebo nonamery kruhovitého tvaru. [17] Jak bylo dokázáno, LH2 komplex je spektroskopicky složitější než LH1 komplex. V absorpčním spektru můžeme pozorovat pásy kolem 800 a 850 nm, a proto se tyto bakteriochlorofyly označují jako B800 a B850. B800 bakteriochlorofyly leží rovnoběžně s membránou, zatímco B850 bakteriochlorofyly jsou umístěné kolmo na membránu. Molekuly karotenoidů jsou pravidelně rozmístěné mezi nimi a na jednu $\alpha\beta$ jednotku připadá jeden. Pásy maximální absorpce B800 a B850 se liší právě díky odlišným interakcím s okolními molekulami a s proteiny. [4] [9]

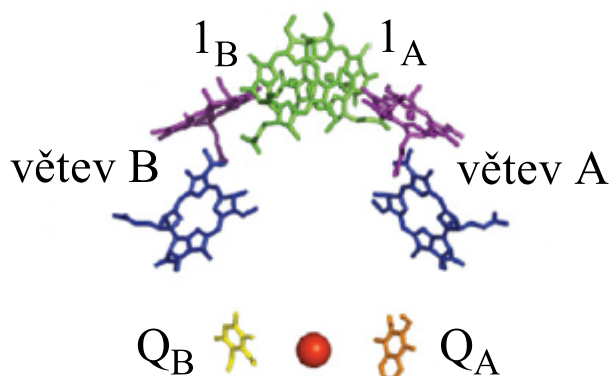
1.3.1.2 LH1

LH1 komplex je následným příjemcem energie od LH2 komplexu. Struktura je podobná LH2 komplexu, ale heterodimery z α a β jednotek tvoří větší komplexy než u LH2. LH1 komplex má také kruhovitý tvar, ale může se vyskytnout i tzv. S–superkomplex, který je tvořen dvěma celky z α a β jednotek. Ty drží pohromadě díky proteinu nazvanému PufX. [7] Stechiometricky připadají na jeden α a β pár dva bakteriochlorofyly. Jejich maximální absorpční pás se působením interakcí v LH1 komplexu *Rhodobacter sphaeroides* posune na 875 nm, a proto jsou v našem případě označovány jako B875. [9] Narozdíl od LH2 komplexu může na jednu $\alpha\beta$ jednotku připadat jeden nebo dva karotenoidy. [13] [22]

1.3.2 Reakční centrum

Reakční centrum je poslední místo, kde se energie ještě vyskytuje ve formě excitonu, tedy v podobě excitované molekuly (B)chl. Z reakčního centra už vychází v podobě chemické energie, tedy té, která může být využita k vytváření NADPH a ATP. Strukturně jsou reakční centra také pigment–proteinové komplexy. Z purpurových bakterií byla izolována reakční centra čtyřjednotková typu LMHC nebo tříjednotková typu LMH (vyskytují se i u *Rhodobacter sphaeroides* [9]). LMH se od LMHC liší chybějící jednotkou C, ale zbývající struktura LMH je velice podobná. L, M a H jsou různě velké bílkovinné jednotky, které prochází membránou. Tento bílkovinný komplex

je umístěn kolem molekul bakteriochlorofylů a bakteriofeofytinů utvářejících dvě větve A a B, které tvoří vnitřní strukturu reakčního centra. Větev A slouží k elektronovému transportu, zatímco funkce větve B není dostatečně známa. Mimo nich se uvnitř reakčního centra vyskytují ještě molekuly menanchinonu (Q_A) a ubichinonu (Q_B). [4]



Obrázek 10: Zjednodušená struktura reakčního centra. Zeleně $1_{A,B}$ - zvláštní pár; modře, fialově - další Bchl reakčního centra; oranžově Q_A - menanchinon; žlutě Q_B - ubichinon. Převzato a upraveno z [4].

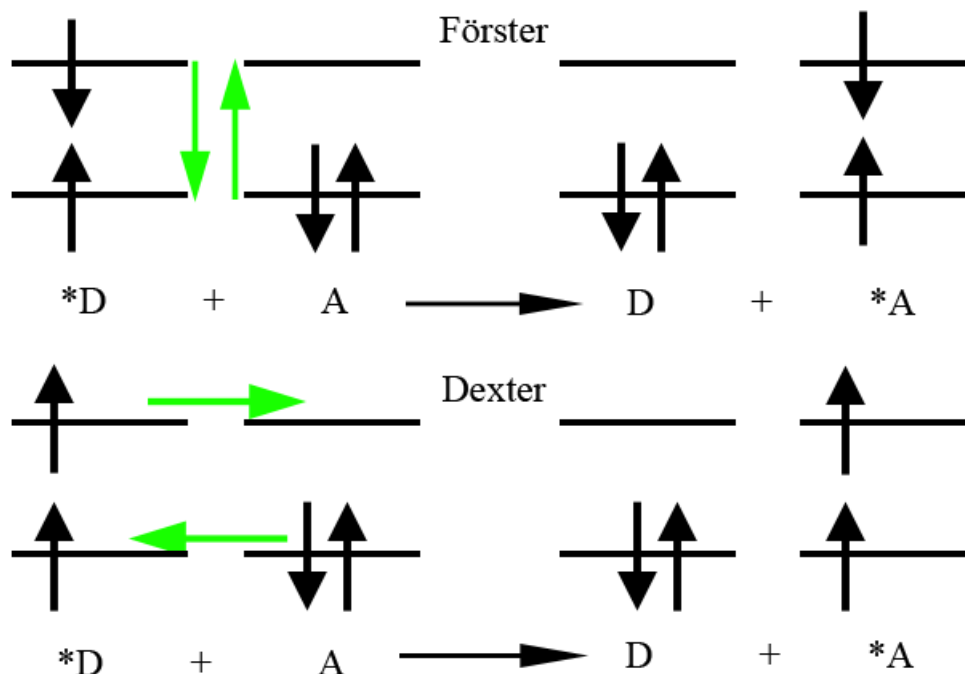
Hlavní dvojice pigmentů, nazývána jako *zvláštní pár*, je tvořena dvěma bakteriochlorofyly. Při absorpci fotonu dojde k excitaci tohoto zvláštního páru na $Bchl(2)^*$. Excitovaný elektron je delokalizován mezi oběma molekulami Bchl. Během této excitace se změní standardní redoxní potenciál a molekuly Bchl změní svou oxidační povahu na redukční. Proto jsou schopné předat excitovaný elektron molekule bakteriofeofytinu za vzniku kationtu $Bchl(2)^+$. Za další časový úsek v řádu stovek pikosekund dorazí elektron na menanchinon, následně ubichinon, a také je zredukuje. Chybějící elektron u $Bchl(2)^+$ je doplněn reakcí cytochromu- c^{2+} za vzniku cytochromu- c^{3+} a $Bchl(2)$. [6] [3]

1.3.3 Přenos energie ve světlosběrných komplexech a mezi nimi

Přenos energie ve světlosběrných komplexech probíhá přes přítomné pigmentové molekuly. Složité proteinové jednotky mají spíše strukturní funkci, případně svými nezávislými interakcemi s pigmenty posouvají pásy jejich absorpčních maxim.

1.3.3.1 Mechanismy přenosu energie

Existují dva základní modely, které používáme při popisu přenosu excitační energie mezi molekulami. Jedná se o dalekodosahový Försterův mechanismus přenosu energie a krátkodosahový Dexterův mechanismus.



Obrázek 11: Försterův a Dexterův mechanismus přenosu excitační energie. V případě Dexterova mechanismu je zde uveden triplet-triplet případ energetického přenosu.

Försterův mechanismus spočívá v tom, že zpočátku excitovaný elektron donorové molekuly D se deexcituje za vzniku nově excitované blízké akceptorové molekuly A. Dexterovým mechanismem je excitace přenesena mezi donorem D a akceptorem A díky výměně excitovaného a neexcitovaného elektronu. Zatímco Försterův model umožňuje přechod mezi dvěma singletovými stavy, Dexterův povoluje i přechod stavů tripletních. Liší se i dosahem působení, Försterův mechanismus pracuje efektivně při vzdálenostech až do 50 Å, zatímco Dexterův pouze při krátkých vzdálenostech v řádu jednotek Å. [9] Je nutno zmínit, že výše popsané mechanismy platí pouze pro ideální případy a ve složitých reálných systémech je často nelze jednoduše aplikovat. [4]

1.3.3.2 Přenos energie mezi jednotlivými pigmenty a komplexy

Tato část je zaměřena na popis praktických příkladů přenosu energie v anténách purpurových bakterií. Čistě Försterův přenos lze aplikovat např. při popisu přenosu

energie mezi molekulami B800 v LH2 komplexech z důvodu vhodné vzdálenosti. Vzdálenost mezi molekulami B850 v témže komplexu je ovšem výrazně menší a oproti B800 se chovají jako jeden veliký agregát, což znemožňuje použití Försterova mechanismu a je nutno použít složitější popis. [4] To samé, i když důvody jsou v některých případech odlišné, platí i pro přenosy mezi B800 a B850 [23], mezi molekulami B875 [24], příp. pro přenos energie mezi stavy Kar a Bchl. [25] Försterův mechanismus nelze použít ani pro triplet–tripletní přenos mezi Kar a Bchl. V tomto případě je nutné aplikovat mechanismus Dexterův. [25]

Výše uvedené přenosy energie probíhají uvnitř anténních komplexů a jsou, s výjimkou triplet–tripletního přenosu [26], velmi rychlé (většinou řádově stovky femtosekund). [16] Přenosy energie mezi anténními komplexy (např. LH2 → LH2 a LH2 → LH1) jsou ve srovnání s předchozími procesy pomalejší. [16] Ještě pomalejším procesem je finální přenos energie z LH1 komplexu do reakčního centra, který trvá několik desítek pikosekund. [4]

2 Materiál a metody

2.1 Spektroskopie

Spektroskopie patří mezi základní analytické metody používané v laboratořích. Její princip je založen na interakci elektromagnetického záření s hmotou, které lze vysvětlit pomocí kvantové mechaniky. Výsledky ve formě různých druhů spekter nám poskytují velké množství informací o chemické struktuře zkoumané látky, její koncentraci atd.

Narozdíl od klasické fyziky popisujeme chování částice v kvantové mechanice pomocí vlnové funkce $\psi(\mathbf{r}, t)$. Ta nám poskytuje veškeré informace o částici včetně pravděpodobnosti jejího nalezení v místě daném polohovým vektorem \mathbf{r} . Tu zjistíme umocněním vlnové funkce na druhou, tedy $|\psi(\mathbf{r}, t)|^2$. Atomovým orbitalem φ nazýváme takovou vlnovou funkci, která nám popisuje stav jednoho elektronu v elektronovém obalu atomu.

Atomy se ale slučují v molekuly, a proto potřebujeme zavést i molekulové orbitaly. Ty jsou matematicky definovány jako lineární kombinace atomových orbitalů φ . Pokud molekulový orbital vznikl z atomových orbitalů typu s, značí se vzniklý molekulový orbital σ . Podle znaménka v lineární kombinaci rozlišujeme vazebné σ nebo antivazebné σ^* molekulové orbitaly. Při absorpci fotonu molekulou můžou elektrony konat přechody

$\sigma \rightarrow \sigma^*$. Z energetického hlediska jsou ovšem náročné a vyžadují fotony z daleké UV oblasti. Pro studium chování biomolekul jsou pro nás zajímavější elektronové přechody z molekulových orbitalů vzniklých z atomových orbitalů typu p. Takto vzniklé molekulové orbitály se značí jako π . Opět podle znaménka lineární kombinace rozlišujeme vazebné π a antivazebné π^* . Při absorpci fotonu můžou tedy elektrony konat přechod $\pi \rightarrow \pi^*$ a ten je již méně energeticky náročný. Navíc se energie přechodu ještě snižuje s rostoucím počtem konjugovaných vazeb, a proto je možné se dostat s absorpcí až do viditelné oblasti spektra. Poslední typ molekulového orbitalu je nevazebný, značený písmenem n a označující orbital s elektrony, které se neúčastní vazby. [6]

Variabilita elektronových přechodů v molekulách je široká. Organické molekuly mají nejvýše obsazené molekulové orbitály (*the highest occupied molecular orbital* – HOMO) typu n , σ a π . Během absorpce fotonů elektron nejčastěji obsadí nejnižší neobsazený molekulový orbital (*the lowest unoccupied molecular orbital* – LUMO) typu σ^* a π^* . V závislosti na druhu chromoforu mohou být pomocí fotonů vykonány různé přechody zahrnující výše vyjmenované orbitály. [5]

K absorpci záření může tedy dojít, když je energie fotonu rovna rozdílu energetických hladin v molekule. Záleží ovšem ještě na veličině nazývané *přechodový dipólový moment*. Ta je definována jako

$$\mu_{IF} = \int \psi_F^* \hat{\mu} \psi_I \, d\mathbf{r}, \quad (4)$$

kde ψ_F^* je komplexně sdružená vlnová funkce popisující konečný stav, ψ_I je vlnová funkce popisující počáteční stav a $\hat{\mu}$ je operátor elektrického dipólového momentu. Přechodový dipólový moment definuje změnu nábojové hustoty v průběhu absorpce fotonu. K absorpci fotonu může dojít, pokud je integrál nenulový. S rostoucí hodnotou integrálu roste i intenzita absorpce. [6]

V libovolném absorpčním spektru molekuly si můžeme všimnout, že spektrální pásy jsou široké. Při excitaci může totiž dojít i k přechodům do vyšších vibračních stavů. Musíme tedy do rovnice (4) zahrnout i vibrační člen, tzv. *Franck – Condonův faktor*.

$$\mu_{IF} = \int \psi_F^* \hat{\mu} \psi_I \, d\mathbf{r} = \int \psi_{F,elekt}^* \hat{\mu}_{elekt} \psi_{I,elekt} \, d\mathbf{r}_{elekt} \int \psi_{F,vibr}^* \psi_{I,vibr} \, d\mathbf{r}_{jad} \quad (5)$$

Absorpce tedy závisí na překryvu nejen elektronových, ale i vibračních vlnových funkcí. [6] Dalším důvodem rozšíření spektrálních pásů jsou interakce s okolními molekulami nebo se stěnami nádoby, v níž se měřený vzorek nachází.

2.1.1 UV – VIS spektroskopie bez časového rozlišení

Jak již bylo zmíněno, spektroskopie patří mezi základní laboratorní metody. Absorpční spektroskopie nám umožňuje zjistit absorpční spektra, jež poskytují informace o pohlcování fotonů v různých oblastech elektromagnetického spektra. Mimoto slouží i k určování koncentrací rozpuštěných chromoforů v roztoku. Metoda samotná je založená na porovnávání intenzit dopadajícího ($I_0(\lambda)$) a prošlého ($I(\lambda)$) světla. Tyto intenzity jsou závislé na vlnové délce. $I_0(\lambda)$ se většinou označuje jako referenční hodnota a zjišťuje se měřením absorbance samotného prostředí (většinou rozpouštědla). Tím získáme při měření pouze absorbanci zkoumané látky.

Spektrofotometry fungují různými způsoby a podle toho je dělíme na jednopaprskové a dvouprskové. U jednopaprskových vkládáme referenční vzorek před samotným měřeným vzorkem. Dnes již přístroje referenční hodnotu ukládají a nemusí se tedy vkládat před každým měřením. Dvouprskové spektrofotometry obsahují rozdělovač paprsků, který paprsek rovnoměrně rozdělí na dva. Jeden je poslán do referenčního vzorku a druhý rovnou do měřeného, což opět umožňuje snadnější a rychlejší manipulaci. Neméně důležitou součástí spektrofotometru je monochromátor. Ten může být umístěn před nebo za vzorkem, podle toho, jaký typ detektoru používáme. Pokud pouštíme na vzorek monochromatické světlo, je monochromátor umístěn před vzorkem a paprsek jde do detektoru tvořeného fotodiodou. Pokud pouštíme na vzorek polychromatické světlo, je monochromátor za vzorkem a rozložené světlo putuje na diodová pole/do CCD kamer, kde je následně vyhodnoceno.[6]

Veličina, od které se spektrofotometrická měření odvíjí, je transmitance.

$$T = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (6)$$

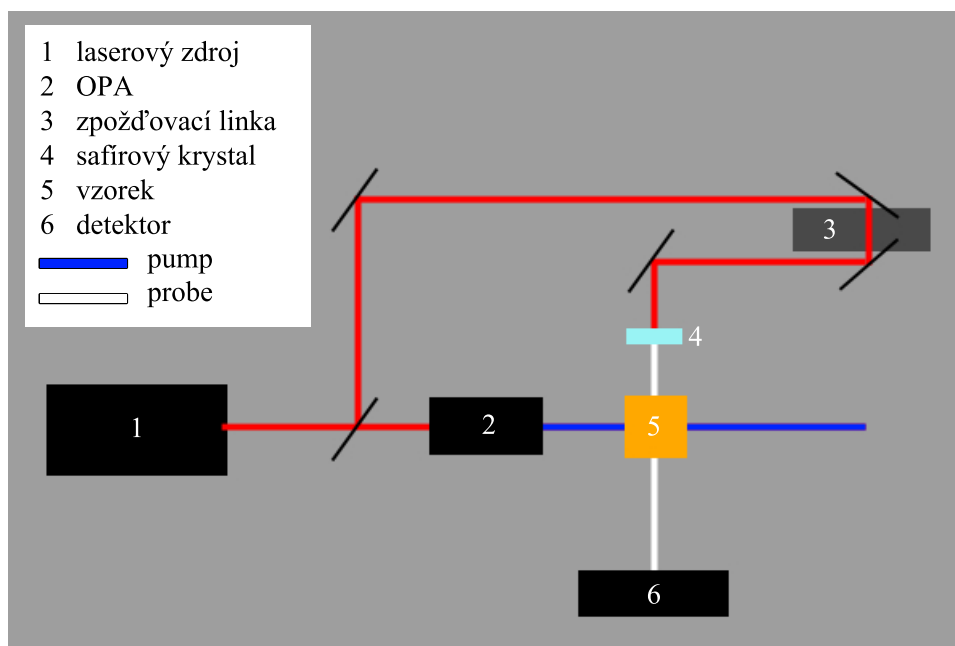
Pomocí transmitance je definována absorbance, která má tu výhodu, že je přímo úměrná koncentraci měřené látky. Absorbance je proto také běžnou výstupní hodnotou spektrofotometrů.

$$A = \log \frac{1}{T} = cl\varepsilon(\lambda) \quad (7)$$

Před samotným časově rozlišeným experimentem a po něm měříme absorpční spektrum kvůli kontrole degradace vzorku během měření.

2.1.2 Časově rozlišená femtosekundová spektroskopie

Pokud potřebujeme sledovat dynamiku dějů, musíme použít metody, které umí pracovat s časovým rozlišením. V našem případě se jedná o studium excitovaných stavů fotosyntetických pigmentů a přenosu energie mezi nimi pomocí pump-probe spektroskopie. Monochromatický laserový pulz *pump* excituje molekuly vzorku. Ten je poté analyzován širokospektrálním pulzem *probe*. Časového rozlišení se docílí nastavitelným zpožděním pulzu *probe*.



Obrázek 12: Schématické znázornění pump-probe spektroskopie.

Technické provedení experimentu je samozřejmě složitější. Laserový systém umožňující produkci krátkých pulsů v řádu sta fs vysílá monochromatický pulz. Tento pulz mívá vlnovou délku kolem 800 nm. Dále je rozdělen na dva pomocí děliče paprsků. Z jednoho se stane pump a z druhého probe paprsek. Nejdříve bude popsána dráha paprsku pump. Požadavky na tento pulz jsou frekvenční variabilita a co nejnižší šířka spektrálního pásu. Frekvenční variabilitu zajistíme pomocí optického parametrického zesilovače (*OPA*). Toto zařízení pracující s nelineárními jevy slouží nejen k modifikaci vlnové délky pulzu pump v rozsahu asi 240 – 2500 nm (pomocí součtových/rozdílových frekvencí), ale i k zesílení signálu pomocí procesu parametrického zesilování. Takto upravený pulz dále prochází zařízením *chopper*, které zabraňuje průchodu každého druhého pulzu pump. To zvyšuje kvalitu signálu, protože umožňuje analyzovat i pulz probe, který není ovlivněn pulzem pump, tzv. *unpumped probe*. Společně s intenzitou

referenčního pulzu počítá detektor korekci na fluktuace výkonu laseru, která je zahrnuta do celkové změny absorbance. Pulz pump poté prochází polarizátorem, kde nastavujeme polarizaci mezi paprsky pump a probe na hodnotu $54,7^\circ$. Tato hodnota, nazývaná též *magický úhel*, zabraňuje ovlivnění měřených hodnot anizotropními efekty. Takto upravený pump již může excitovat molekuly vzorku, načež je následně zablokován. [7]

Dráha paprsku probe vede nejdříve přes zpožďovací linku, kde nastavujeme jeho zpoždění vůči pulzu pump. Dále vede do krystalu, kde dochází díky nelineárním jevům třetího řádu k jeho spektrálnímu rozšíření – generaci bílého kontinua. Než probe paprsek projde vzorkem, je rozdělen na dva – sondující a referenční. Sondující je nasměrován na vzorek. Vzhledem k disperzi světla a z toho vyplývajícím časovému zpoždění jednotlivých barev v pulzu probe, nazývanému *chirp*, používáme pro směřování paprsků sférická zrcadla, která jej do pulzu probe nevnášejí. Když projdou vzorkem, směřuje jejich dráha do detektoru, kde jsou oba paprsky rozloženy optickou mřížkou, nasměrovány na dva CCD detektory a vyhodnoceny. [7]

Celková změna absorbance je vypočtena dle následujícího vztahu.

$$\Delta A(\Delta t, \lambda) = \log \frac{I_{ref}}{I_{p.pr.}} - \log \frac{I_{ref}}{I_{unp.pr.}} \quad (8)$$

Z rovnice vidíme, že výsledná změna absorbance je vypočtena z intenzity referenčního paprsku (I_{ref}), intenzity pulzu probe, kterému předcházela pulz pump ($I_{p.pr.}$ – pre-pumped probe) a intenzity pulzu probe, kterému nepředcházela pulz pump ($I_{unp.pr.}$ – unpumped probe). Druhý člen rovnice zahrnuje korekci na fluktuace intenzity laseru a v ideálním případě je roven nule. [7]

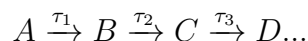
V čem spočívá výhoda tohoto uspořádání? Ilustrativní příklad můžeme uvést na excitovaných stavech karotenoidů. Po absorbování fotonu se karotenoid dostane do stavu S_2 . Pokud v době setrvání ve stavu S_2 projde vzorkem pulz probe, budou absorbovány specifické fotony, což se projeví ve výsledném spektru a umožní nám získat signál z S_2 stavu. Za nějakou dobu se ovšem karotenoid dostane do stavu S_1 a pokud projde díky zpoždění vzorkem pulz probe i v době trvání tohoto stavu, budou absorbovány jiné specifické fotony, což se projeví ve spektru posunutím signálu a díky tomu identifikujeme tento stav jako S_1 . Absorpci odlišných fotonů pro daný excitovaný stav oproti základnímu stavu nazýváme absorpcí z excitovaného stavu (ESA – *excited state absorption*). [8] Nicméně ve spektru můžeme pozorovat i signály negativní. Jeden typ tohoto signálu je tzv. GSB (*ground state bleaching*), který je způsoben malým

množstvím molekul v základním stavu (v důsledku excitace) viditelných sondujícím paprskem. To vyústí v obrácené množství intenzit ($I_{p.pr.} > I_{ref}$), které dorazí do detektoru, a tedy i v negativní signál. Dalším způsobem, jak můžeme negativního signálu dosáhnout, je pomocí stimulované emise (SE – *stimulated emission*). Pokud je molekula v excitovaném stavu, může procházející foton probe pulzu stimulovat vyzáření fotonu. Tím se opět zvýší intenzita v kanálu sondujícího signálu, což se opět v konečném výsledku projeví jako negativní signál. [7]

Jak je vidět ze vztahu (8), celková změna absorbance závisí jak na zkoumané vlnové délce, tak na zpoždění mezi pulzy pump a probe. Ze změřených hodnot tedy můžeme zjistit jak dynamiku excitovaných stavů, tak tranzientní absorpční spektra. Výsledné grafy jsou třídímenzionální a používáme ta tranzientní spektra a kinetické křivky, které jsou řezy v těchto 3D grafech.

2.2 Fitování výsledků

Naměřená data vyhodnocujeme metodou globálního fitování v programu DAFit. Pro správný popis chování měřeného systému používáme systém jednotlivých spekter svázaných časovými konstantami, tzv. EADS.

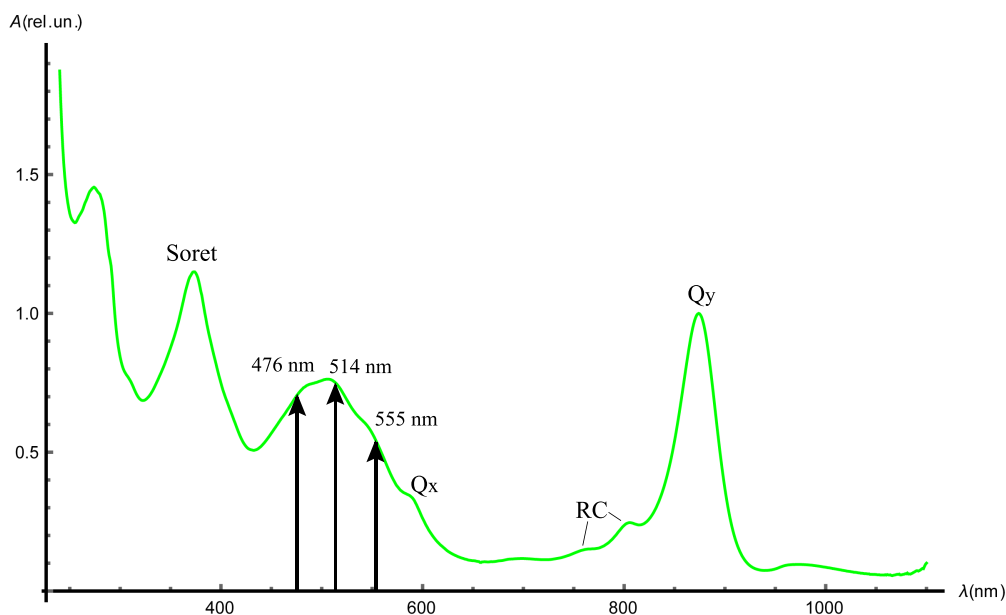


Tento lineární postup interpretujeme tak, že např. spektrum B se objevuje s první časovou konstantou τ_1 a zaniká s druhou časovou konstantou τ_2 , přičemž to samé platí s příslušnými časovými konstantami i pro další jednotky A, C, D apod. Tento způsob nám umožňuje přehledně ukázat spektrální vývoj systému. [7]

3 Výsledky

3.1 Absorpční spektrum

Ještě před samotným časově rozlišeným experimentem bylo změřeno absorpční spektrum našeho vzorku. Zkoumaným vzorkem byly LH1 komplexy s karotenoidem sferoidenonem izolované z *Rhodobacter sphaeroides* bez proteinu PufX.

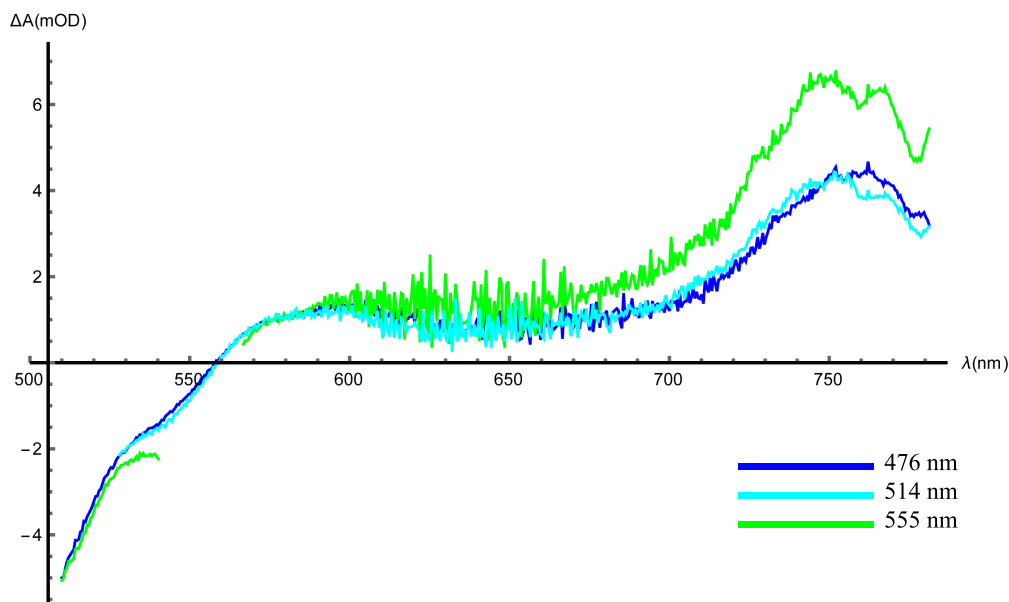


Obrázek 13: Absorpční spektrum RC-LH1-spn komplexu bez PufX proteinu. Šipky znázorňují excitační vlnové délky. Normováno na Q_y .

Naším cílem bylo excitovat karotenoidy, a následně porovnat tranzientní absorpční spektra, proto jsou v absorpčním spektru v oblasti absorpce karotenoidů vyznačené excitační vlnové délky. V absorpčních spektrech karotenoidů většinou pozorujeme tři charakteristické absorpční pásy způsobené třemi různými vibračními hladinami stavu S_2 . Ty jsou na obr. 13 málo výrazné, navázaná karbonylová skupina způsobuje jejich rozšíření, jelikož interakcemi s okolím se ustanoví řada konfigurací karotenoidů s různými absorpčními spektry. Dále můžeme vidět specifické absorpční pásy Bchl-a. Maximum jeho Soretova pásu je na 373 nm, pás Q_x najdeme kolem 590 nm a Q_y kolem 875 nm. Absorpce bakteriofeofytinů reakčního centra, ve spektru označená jako RC, je kolem 760 nm, následována Bchl-a reakčního centra kolem 800 nm. Výrazný pás v UV oblasti pod 300 nm přísluší absorpci proteinů.

3.2 Tranzientní absorpční spektra

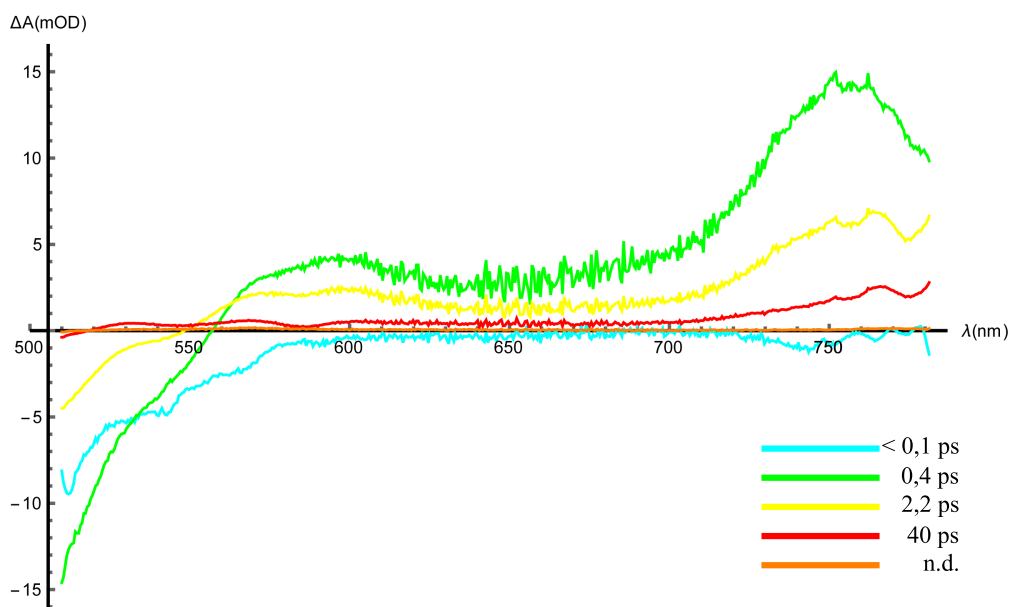
Abychom posoudili vliv excitační vlnové délky na náš vzorek, porovnali jsme tranzientní absorpční spektra v 0,25 ps.



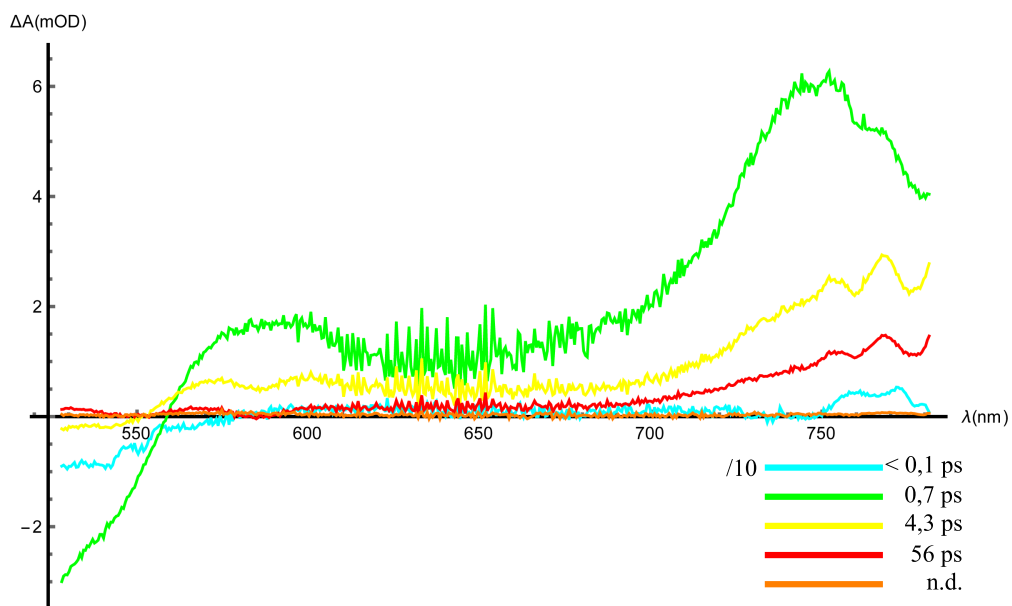
Obrázek 14: Tranzientní absorpční spektra RC-LH1 spn komplexu pro e476, e514 a e555 v čase 0,25 ps. Normováno na oblast 580 nm.

Aby se projevily rozdíly mezi jednotlivými měřeními, byly všechny tři křivky normovány na oblast signálu $S_1 - S_N$. Záporný signál v levé části spektra je způsoben GSB. V oblasti 550 – 620 nm pozorujeme typický pás $S_1 - S_N$ přechodu, zatímco kolem 750 nm dominuje velmi silný signál ICT stavu. [12] Pro excitační vlnové délky 476 nm a 514 nm nepozorujeme téměř žádnou změnu. Jak $S_1 - S_N$, tak ICT signál mají stejnou intenzitu, obě křivky se i v ostatních oblastech překrývají. Pro excitační vlnovou délku 555 nm ovšem pozorujeme silnější ICT signál, přestože $S_1 - S_N$ zůstává podobný jako u 476 nm a 514 nm. Mimoto jsme znovu ověřili, že pokud je sferoidenon vázaný v proteinu, pozorujeme ve spektru silný ICT signál. [12]

Další grafy budou tzv. EADS. Nejdříve bude řeč o EADS pro excitační vlnovou délku 476 nm. První spektrum, které zaniká v čase 0,1 ps, je co do věrohodnosti omezené časovým rozlišením experimentálního zařízení, nicméně již druhé (zelené), které zaniká v 0,4 ps nepochybně obsahuje S_1 a ICT signál. Další EADS postupně klesají a ve 40 ps dochází k dohasnutí signálu v anténách a přenosu energie do RC. V oblasti kolem 580 – 590 nm pozorujeme signál Bchl Q_x , který zmizí v následujícím oranžovém EADS, což znamená úspěšný přenos energie z antén do RC.

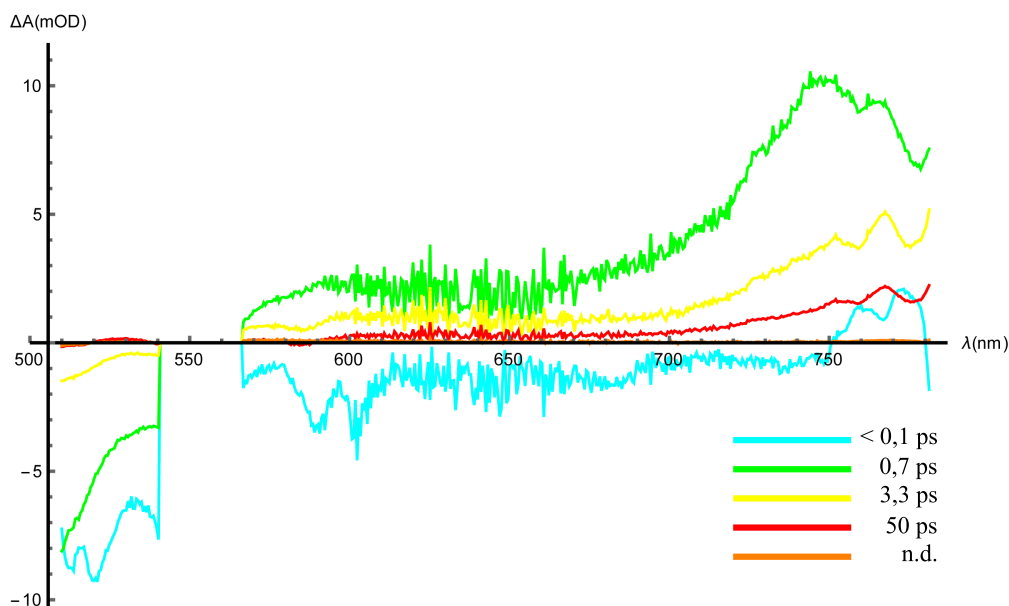


Obrázek 15: EADS pro excitační vlnovou délku 476 nm.



Obrázek 16: EADS pro excitační vlnovou délku 514 nm. Hodnoty prvního EADS jsou vyděleny deseti pro větší přehlednost.

Druhý soubor EADS popisuje vývoj systému po excitaci 514 nm. První spektrum je opět omezené časovým rozlišením experimentálního zařízení. Druhé spektrum, na kterém pozorujeme S_1 a ICT signál, zaniká o 300 fs později než to samé EADS u excitace 476 nm. Podobně můžeme pozorovat u třetího EADS dohasínání s časovou konstantou 4,3 ps, což je také později. Čtvrté EADS zaniká o 16 ps později než to samé při excitaci 476 nm. Všechny děje tedy probíhají pomaleji. Záporné hodnoty v levé části spekter jsou způsobeny GSB.



Obrázek 17: EADS pro excitační vlnovou délku 555 nm.

I EADS vyhodnocená pro excitační vlnovou délku 555 nm obsahují v levé části GSB. První z nich je opět omezeno časovým rozlišením experimentálního zařízení a signál v oblasti spektra > 750 nm je artefakt. Druhé EADS, opět s S_1 a ICT signálem, zaniká ve stejnou dobu jako EADS při excitaci 514 nm. Třetí EADS ovšem zaniká již v 3,3 ps. U posledního EADS opět pozorujeme úspěšný přenos energie z antén do RC díky vymizení signálu Bchl Q_x kolem 580 – 590 nm.

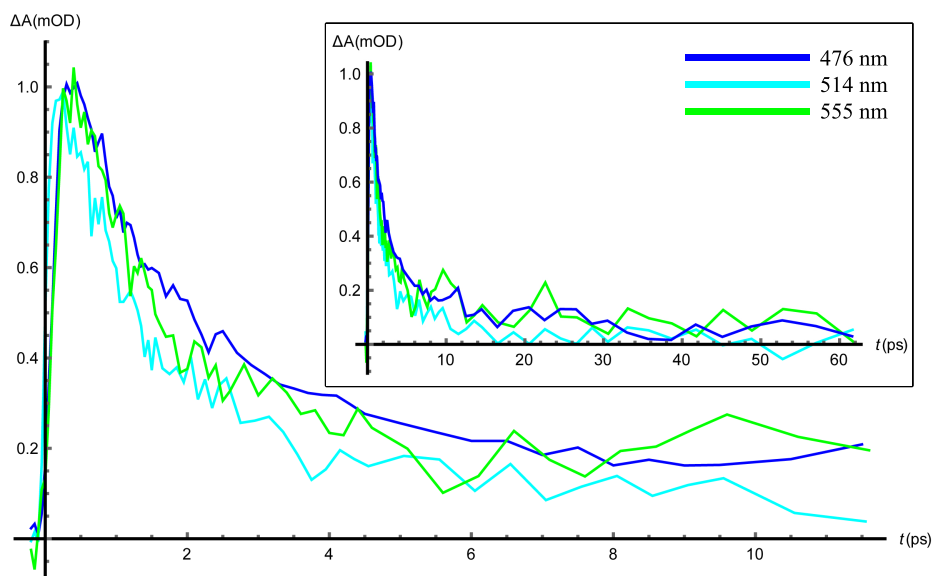
Pořadí EADS	e476	e514	e555
1.	0,1 ps	< 0,1 ps	< 0,1 ps
2.	0,4 ps	0,7 ps	0,7 ps
3.	2,2 ps	4,3 ps	3,3 ps
4.	40 ps	56 ps	50 ps

Tabulka 1: Porovnání časových konstant pro všechny excitační vlnové délky.

Jak je vidět z vyhodnocených spekter, mechanismy přenosu energie se příliš nemění a příslušná spektra se výrazně neliší. S_1 a ICT signál také pozorujeme vždy, pouze časové konstanty se mění. Pro větší přehlednost všechny údaje najdeme v tab. 1.

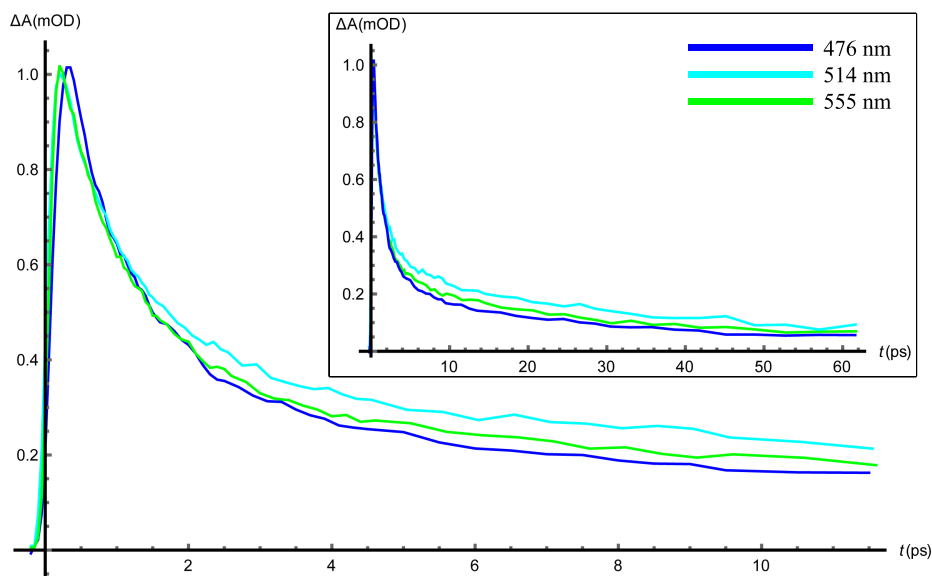
3.3 Kinetiky

Neméně důležitou součástí výsledků měření jsou kinetiky popisující časový průběh dohasínání excitovaných stavů. V našem případě jsme se zaměřili na porovnání rychlosti dohasínání konkrétních excitovaných stavů pro všechny excitační vlnové délky.



Obrázek 18: Dosasínání $S_1 - S_N$ stavu pro všechny excitační vlnové délky. Všechny kinetiky jsou normalizovány na své maximum. Z důvodu přehlednosti jsou naměřené hodnoty bez fitů.

Na obr. 18 pozorujeme, že narozdíl od ICT oblasti na obr. 19 je oblast $S_1 - S_N$ stavu výrazně zkruslená šumem. I přesto nejsou pro různé excitace vidět veliké rozdíly mezi rychlostmi dohasínání. U ICT stavu na obr. 19 pozorujeme stejný trend. Zajímavostí může být mírně poposunutý vrchol maxima ICT stavu pro excitační vlnovou délku 476 nm, který by mohl evokovat možnou delší dobu života S_2 stavu, ale u kinetiky pro $S_1 - S_N$ stav žádný takový posun pro excitační vlnovou délku 476 nm nepozorujeme. Celkově tedy z obr. 18 a 19 vyvozujeme, že se kinetiky pro různé excitace příliš neliší.



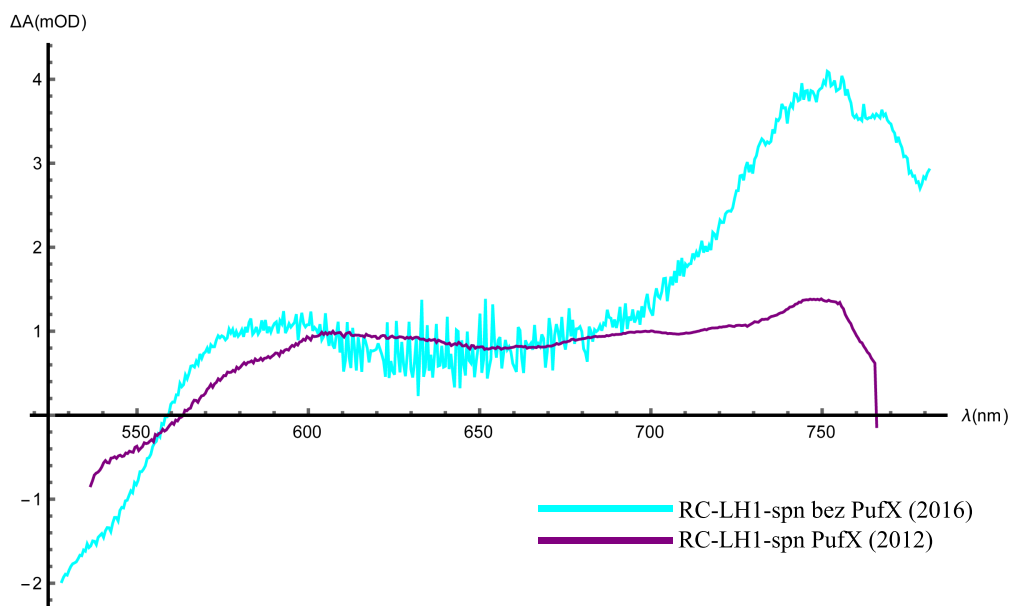
Obrázek 19: Dosahování ICT stavu pro všechny excitační vlnové délky. Všechny kinetiky jsou normalizovány na své maximum. Z důvodu přehlednosti jsou naměřené hodnoty bez fitů.

4 Diskuze

Provedené experimenty poskytly několik výsledků, nad kterými je nutné se zamyslet. V roce 2012 byl měřen stejný komplex RC-LH1-sp_n *Rhodobacter sphaeroides* lišící se pouze přítomností PufX proteinu.[12] Tento komplex byl dokonce excitován stejnou vlnovou délkou, tedy 514 nm. Naměřené výsledky se ovšem významně liší. Pokud se podíváme na tranzientní absorpční spektrum komplexu z roku 2012 na obr. 20, vidíme, že výsledky našeho měření ukazují více než dvakrát větší intenzitu ICT signálu.

To je samozřejmě závažný fakt, jelikož stejné vzorky by při stejné excitaci měly vykazovat víceméně stejná spektra. Vzhledem k tomu, že data z roku 2012 byla ověřena dalším měřením, je logické přisuzovat jim větší věrohodnost. Nicméně nás to přivádí k otázce, čím je způsobena tak vysoká intenzita ICT signálu v našem experimentu. Jednou možností byla nepřítomnost PufX proteinu v našem vzorku oproti měření z roku 2012, ovšem při tomto dřívějším experimentu byl měřen i vzorek bez proteinu PufX a na výsledná spektra neměla jeho absence žádný vliv. [12]

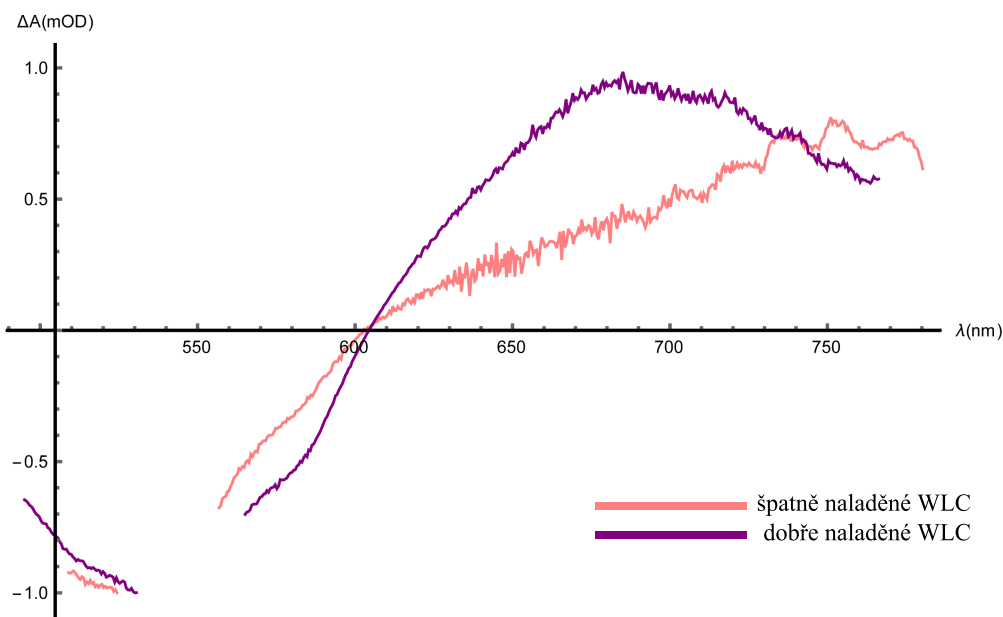
Další možností je ovlivnění paprskem *probe*, tedy naladěním bílého kontinua, jak je vidět na obr. 21. Experiment z tohoto obrázku není součástí bakalářské práce, výsledky jsou zde uvedené pouze z důvodu souvislosti mezi naladěním bílého kontinua a intenzitou ICT signálu. Tranzientní absorpční spektra uvedená na obr. 21 pochází z



Obrázek 20: Porovnání dat z měření RC–LH1–spn komplexu s analogickým měřením komplexu RC–LH1–spn PufX. Obě tranzientní spektra byla pořízena v čase 0,25 ps. Obě křivky jsou normovány na maximum svého $S_1 - S_N$ signálu.

měření LH1 komplexů s karotenoidem diketospiriloxantinem excitovaných v oblasti absorpce karotenoidů. Hlavním úkolem tohoto obrázku je tedy ukázat, jak moc zkresluje naladění kontinua výslednou intenzitu ICT stavu. Růžová křivka ukazuje ICT signál při špatně naladěném kontinuu. Je možné si všimnout, že celé tranzientní spektrum vypadá neobvykle, v signálu se vyskytují podivná lokální maxima. Spektrum se správně naladěným kontinuem již vykazuje typický ICT pás. ICT signál v námi naměřených spektrech (obr. 14 v kapitole Výsledky) sice kopíruje tvar křivky na obr. 21 s dobře naladěným kontinuem, ale jeho intenzita je příliš vysoká v porovnání s měřeními z roku 2012. Je tedy možné, že vysoký ICT signál je zapříčiněn nesprávně naladěným kontinuem, které následně nevhodným způsobem ovlivní i výpočet hodnoty signálu počítačovým programem. Pro případné publikování dat by tedy bylo nutné celé měření provést znovu. V rámci této práce tedy nebudeme při vyhodnocení brát v potaz absolutní hodnotu signálu, ale zaměříme se spíše na porovnání jednotlivých excitací.

Sferoidenon, jakožto karbonylový karotenoid, vykazuje ICT signál, pokud je vázán v proteinu. [12] Je to zvláštní zástupce mezi karbonylovými karotenoidy, jelikož i v polárním rozpouštědle, kde u ostatních karotenoidů tohoto druhu pozorujeme relativně silný ICT signál, sferoidenon disponuje v ICT oblasti pouze slabým absorpčním pásem. [21] Ve studii [20] z roku 2011 byla provedena analýza absorpčních spekter fukoxantinu v cyklohexanolu a methanolu, na základě jejichž výsledků byla navržena teorie o dvou



Obrázek 21: Porovnání výsledků měření a intenzity ICT signálu při rozdílně nalaženém bílém kontinuu. Obě křivky jsou normovány na minimum GSB a poríženy v čase 0,25 ps.

formách tohoto karotenoidu, *modrém* a *červeném* (dle posuvu svého absorpčního pásu ke kratším či delším vlnovým délkám) vyskytujícím se v polárním rozpouštědle. Tuto teorii podporují i získaná tranzientní spektra, která ukazují závislost intenzit signálů na excitačních vlnových délkách. Tato závislost může být způsobena excitací buď jedné nebo druhé skupiny karotenoidů. V případě fukoxantinu způsobila delší excitační vlnová délka vyšší intenzitu ICT signálu. Pokud se podíváme na naše naměřené výsledky, můžeme si povšimnout podobného trendu. Pro excitaci 555 nm byla výsledná intenzita ICT signálu vyšší než u 476 a 514 nm. Na základě těchto výsledků tedy můžeme usuzovat, že v našem měřeném komplexu existuje určitá podskupina *s-trans* konfigurace karotenoidu sferoidenonu, která má absorpční spektrum posunuté více do červené oblasti. I přesto ale nejsou rozdíly spekter tak veliké, abychom mohli prohlásit, že je tato podskupina výrazně odlišná.

5 Závěr

Pro začátek je nutno říct, že vzhledem k potenciálně špatně nalaženému bílému kontinuu je nutné uvažovat i možnost, že naměřená spektra nejsou úplně realistická a jak již bylo zmíněno, pro publikování by bylo nutné zopakovat celé měření. Ze všech naměřených dat v kapitole Výsledky nicméně usuzujeme, že mezi karotenoidy

navázanými na $\alpha\beta$ jednotku LH1 komplexu neexistují výrazné spektroskopické rozdíly. Všechna tři tranzientní absorpční spektra na obr. 14 jsou podobná i přes rozdílné excitační vlnové délky a rozdíl v ICT signálu pro excitaci 555 nm nepovažujeme za natolik veliký, aby svědčil o významně odlišné konfiguraci karotenoidů. Tento závěr podporují i EADS spektra – časové konstanty v tab. 1 se příliš neliší a jednotlivá EADS v porovnání mezi různými excitacemi si také odpovídají. I kinetiky na obr. 18 a 19 mají podobný průběh a nevypovídají o odlišných konfiguracích. V případě, že by zopakovaný experiment poskytl jiné výsledky, mohli bychom za výhodu provedeného měření považovat ukázkou toho, jak může naladění bílého kontinua ovlivnit naměřené výsledky. Před případným opakováním měření by také bylo vhodné provést pigmentovou analýzu vzorku a ujistit se, že v tomto LH1 komplexu se opravdu vyskytuje více karotenoidů na $\alpha\beta$ podjednotku, narozdíl od jiných známých LH1 komplexů.

Reference

- [1] N. A. Campbell, J. B. Reece: *Biologie*. Computer Press a. s., Brno, 2006. ISBN:80-251-1178-4.
- [2] J. Lascelles: *Microbial Photosynthesis*. Dowden, Hutchinson, Ross, Inc., Benchmark Papers in Microbiology, Volume 4, USA, 1973. ISBN: 0-87933-049-X.
- [3] D. Voet, J. G. Voetová: *Biochemie*. Victoria Publishing a.s., Praha, 1995. ISBN: 80-85605-44-9.
- [4] R. E. Blankenship: *Molecular Mechanisms of Photosynthesis – 2nd edition*. John Wiley and Sons, UK, 2014. ISBN: 978-1-4051-8976-7.
- [5] A. Gilbert, J. Baggot: *Essentials of Molecular Photochemistry*. Blackwell Scientific Publications, 1991. ISBN: 0-632-02428-3.
- [6] M. Kodíček, V. Karpenko: *Biofyzikální chemie – 3. vydání opr. a rozš..* Academia, Praha, 2013. ISBN: 978-80-200-2241-7.
- [7] V. Šlouf: *Protein control over carotenoid spectroscopy and functions*. Ph.D. Thesis Series, No. 12, University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic, 2013.
- [8] V. Šlouf: *Energy transfer pathways in the intrinsic light harvesting complex of *Amphidinium carterae**. Mgr. Thesis, University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic, 2009.
- [9] X. Hu, T. Ritz, A. Damjanović, F. Autenrieth, K. Schulten: *Photosynthetic apparatus of purple bacteria*. Cambridge University Press, UK, 2009.
- [10] N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer, J. Th. Beatty: *The Purple Phototropic Bacteria*. Springer, USA, 2009. ISBN: 978-1-4020-8815-5.
- [11] D. Karcz, B. Boroń, A. Matwijczuk, J. Furso, J. Staroń: *Lessons from Chlorophylls: Modifications of Porphyrinoids Towards Optimized Solar Energy Conversion*. Molecules, 2014.

- [12] V. Šlouf, P. Chábera, J. D. Olson, E. C. Martin, P. Qian: *Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependent alteration of carotenoid excited-state properties*. PNAS, 2012.
- [13] K. Woronowicz, O. B. Olubanjo, H. Ch. Sung, J. L. Lamptey, R. A. Niederman: *Differential assembly of polypeptides of the light-harvesting 2 complex encoded by distinct operons during acclimation of Rhodobacter sphaeroides to low light intensity*. Photosynthetic Research, 2011.
- [14] H. D. Holland: *The oxygenation of the atmosphere and oceans*. Philosophical transactions of the royal society B, 2006.
- [15] R. Emerson, W. Arnold: *The photochemical reaction in photosynthesis*. The journal of general physiology, 1932.
- [16] R. Cogdell, A. T. Gardiner: *Light harvesting by purple bacteria: a circular argument*. Microbiology today, 2001.
- [17] G. McDermott, S. M. Prince, A. A. Freer, R. Cogdell : *The 3-dimensional structure of the light-harvesting antenna complex (LH-II) from Rps. acidophila*. Protein engineering, 1995.
- [18] P. J. Walla, P. A. Linden, K. Ohta, G. R. Fleming: *Excited state kinetics of the carotenoid S_1 state in LHC II and two photon excitation spectra of lutein and B-carotene in solution: Efficient Car $S_1 \rightarrow$ Chl electronic energy transfer via hot S_1 states*. The journal of physical chemistry, 2001.
- [19] D. Zigmantas, T. Polívka, R. G. Hiller, A. Yartsev, V. Sundström: *Spectroscopic and dynamic properties of the peridinin lowest singlet excited states*. The journal of physical chemistry, 2001.
- [20] D. Kosumi, T. Kusumoto, R. Fujii, M. Sugisaki, Y. Inuma: *Ultrafast excited state dynamics of fucoxanthine: excitation energy dependent intramolecular charge transfer dynamics*. Physical chemistry, chemical physics, 2011.
- [21] D. Zigmantas, R. G. Hiller, F. P. Sharples, H. A. Frank, V. Sundström: *Effect of a conjugated carbonyl group on the photophysical properties of carotenoids*. Research paper PCCP, 2004.

- [22] R. Picorel, G. Bélanger, G. Gingras: *Antenna holochrome B880 of Rhodospirillum rubrum S1. Pigment, phospholipid, and polypeptide composition*. Biochemistry, 1983.
- [23] J. L. Herek, N. J. Fraser, T. Pullerits, P. Martinsson, T. Polívka: *B800 → B850 energy transfer mechanism in bacterial LH2 complexes investigated by B800 pigment exchange*. Biophysical journal, 2000.
- [24] M. Şener, J. Strümpfer, J. Hsin, D. Chandler, S. Scheuring: *Förster energy transfer theory as reflected in the structures of photosynthetic light harvesting systems*. ChemPhysChem, 2012.
- [25] A. Damjanović, T. Ritz, K. Schulten: *Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophylls in light-harvesting complex II of purple bacteria*. Physical Review E, 1999.
- [26] T. G. Monger, R. J. Cogdell, W. W. Parson: *Triplet states of bacteriochlorophyll and carotenoids in chromatophores of photosynthetic bacteria*. Biochimica et Biophysica Acta, 1976.