

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Přenos energie z antény LH1 do reakčního centra**  
**u fotosyntetických bakterií**

Bakalářská práce

**Ondřej Světlík**

Školitel: Mgr. Václav Šlouf, PhD.

České Budějovice 2020

Bibliografické údaje:

Světlík, O., 2020. Přenos energie z antény LH1 do reakčního centra u fotosyntetických bakterií. [Energy transfer from antenna LH1 to reaction centre in photosynthetic bacteria., Bc. Thesis, in Czech] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main task of this thesis is to study energy transfer dynamic of *Rhodobacter sphaeroides* using femtosecond transient absorption spectroscopy. Part of this task is to compare the dimeric *R. sphaeroides* and the monomeric mutant.

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

V Českých Budějovicích, 22. 5. 2020

.....

Ondřej Světlík

Poděkování:

Rád bych poděkoval školiteli mé bakalářské práce Mgr. Václavu Šloufovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

## Seznam použitých zkratk

AAP – aerobní anoxygenní fototrofové

BCh – bakteriochlorofyl

Chl – chlorofyl

Car – karotenoid

ESA – excited state absorption

EADS – *evolution-associated difference spektra*

FMO – *Fenna-Matthews-Olson*

GSB – *ground state bleaching*

IR – *infrared*

LH1 – light – harvesting 1

LH2 – light – harvesting 2

OPA – optický parametrický zesilovač

PSU – fotosyntetická jednotka

RC – reakční centrum

VIS – visible

# Obsah

Cíl práce.....	1
1 Úvod.....	1
1.1 Fotosyntéza .....	2
1.1.1 Fotosyntetizující bakterie.....	5
1.2 Fotosyntetická barviva.....	6
1.2.1 Chlorofyly a bakteriochlorofyly .....	7
1.2.2 Vlastnosti (B)Chl .....	11
1.3 Karotenoidy .....	12
1.3.1 Excitace karotenoidů.....	12
1.3.2 Světlosběrná funkce karotenoidů.....	13
1.3.3 Ochranná funkce karotenoidů .....	14
1.3.4 Přenos energie mezi pigmenty .....	14
1.4 Fotosyntetický aparát.....	15
1.4.1 Anténní komplex LH2 .....	17
1.4.2 Anténní komplex LH1 .....	17
1.4.3 Reakční centrum .....	18
1.4.4 Fotosyntetický aparát ostatních anoxygenních fotosyntetických bakterií	19
1.4.5 Trychtýřovitý efekt .....	20
1.4.6 Vzájemná interakce antén a reakčních center.....	21
1.4.7 Trapping time.....	22
2 Materiál a metody .....	25
2.1 Absorpční spektroskopie .....	25
2.1.1 Femtosekundová tranzientní absorpční spektroskopie .....	26
2.2 Globální fitování.....	28
3 Výsledky .....	29

3.1	Absorpční spektrum.....	29
3.2	Tranzientní absorpční spektra.....	30
3.3	Kinetiky .....	32
4	Diskuze .....	33
5	Závěr .....	33
	Reference .....	34

## Cíl práce

Cílem této práce je studium dynamiky přenosu energie z anténního komplexu LH1 do reakčního centra fotosyntetických bakterií. Dále se seznámí s pokročilými přístroji a metodami optické spektroskopie pro vědecký výzkum jako je femtosekundová optická spektroskopie. Předmětem zkoumání bude purpurová bakterie *Rhodobacter sphaeroides*, jež obsahuje protein zvaný PufX, a bude porovnána s jejím mutantem postrádající tento protein. PufX umožňuje dimerizaci vnitřních antén a předpokládá se, že přenos energie do reakčního centra bude probíhat rychleji u jedince s PufX.

## 1 Úvod

Člověk je přirozeně tvor zvědavý. Důvodem může být strach z neznámého, touha po vědění či cokoli jiného. Ať už jej za poznáním žene cokoli, vždy to začíná otázkou a hledáním odpovědi. Někdy uspěje a jindy nikoliv, ale vždy se vynoří nové otázky. Jedním okruhem jsou otázky ohledně života. Kdy život vznikl? Jak život funguje? Jaký je smysl života? Na některé otázky si člověk musí odpovědět sám a na jiné samotným zkoumáním přírody.

Samotný život na Zemi začal svůj vývoj v období Archaika v rozmezí před 4 až 2,5 miliardami let. Jednou z nejdůležitějších věcí pro život byla přítomnost vody na Zemi především v kapalném stavu. Látka, která je pro nás tak běžná, že si ani neuvědomujeme její výjimečnost, především z hlediska chemie. Život by bez ní nemohl vzniknout a stále je na ní závislý. Nejdříve pouze přesouvala základní kameny života, dnes nazývané organické sloučeniny<sup>1</sup>, ale svou roli také sehrály pevné minerální částice. Poté z neživé hmoty dlouhou evoluční cestou vznikly první buňky. [1]

Existence života na buněčné úrovni je datována do doby před 3,5 mld. let. Příkladem jsou podle Australského nálezů sedimentu obsahujícího fosilie primitivních jednobuněčných organismů – prokaryotní buňky. Tyto organismy se brzy rozdělily na dvě skupiny, jež se stále v přírodě vyskytují ve velkém množství. Tyto skupiny jsou bakterie a archea. Tím ale evoluce

---

<sup>1</sup> Sloučeniny uhlíku, vodíku, kyslíku a dusíku.

neskončila. Život se dále vyvíjel a před 2,1 ml. let vznikla eukaryotická buňka, která je základem pro život, který vidíme kolem sebe pouhým okem. [2]

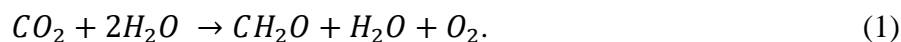
Snad nejdůležitější věcí, bez které by život nemohl existovat je energie. První organismy mohly energii získávat jediným způsobem – chemickými reakcemi. V tomto období se na povrchu Země hojně vyskytovaly organické sloučeniny, což je snadno dostupný zdroj energie, a některé tyto sloučeniny obsahovaly velké množství volné energie. Způsob, jak tuto energii uvolnit, je oxidace těchto sloučenin. Ovšem můžeme namítnout, že se tehdy v zemské atmosféře kyslík nevyskytoval. Přesto mohou oxidační reakce probíhat anaerobně, což lze pozorovat i u některých nynějších organismů. [1]

Organické látky zároveň sloužily a stále slouží jako stavební jednotky. Důsledkem toho začaly zásoby těchto látek ubývat. Tím docházelo ke zpomalení získávání energie. Důležité zásoby uhlíku se nacházely především ve formě oxidu uhličitého a zásoby energie v silně redukovaných organických sloučeninách. Tuto situaci bylo možno vyřešit jediným způsobem, jehož můžeme být svědky či součástí i nyní – adaptovat se na nové prostředí. Jiným vhodným a „neomezeným“ zdrojem energie bylo sluneční záření. Z tohoto důvodu se vyvinuly nové organismy schopné využít světelnou energii k redukci oxidu uhličitého, a tak přeměnit světelnou energii na chemickou. Tímto způsobem se začala rozvíjet na Zemi fotosyntéza – významný biochemický proces pro vývoj dalšího života na Zemi. [1]

## 1.1 Fotosyntéza

Většina lidí v dnešní době má fotosyntézu spojenou především s rostlinami a tvorbou kyslíku. Obecně fotosyntetizující organismy jsou pro život na Zemi jednou z klíčových částí. V podstatě můžeme říci, že jsou prvním článkem v distribuci energie potřebné pro život. Fotoautotrofní organismy jsou využity heterotrofními organismy jako potrava, tedy světelná energie přeměněná na chemickou a uloženou v tělech fotoautotrofů. Mezi heterotrofy patří i člověk a jako lidé jsme na fotoautotrofech závislí potřebou potravy a kyslíku.

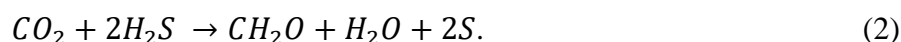
Jak již bylo zjednodušeně zmíněno, fotosyntéza je biochemický proces přeměny sluneční energie na chemickou. Tento proces je zájmem výzkumu již několik století a od 19. století je známa chemická rovnice fotosyntézy rostlin a zjednodušeně popsána následovně:



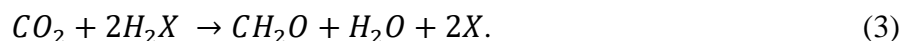


Z rovnice můžeme vidět, že se spotřebovává molekula oxidu uhličitého a dvě molekuly vody, které v tomto případě slouží jako redukční činidlo, a tedy jako zdroj elektronů. Nesmíme ovšem zapomenout, že tato rovnice probíhá při dodání světelné energie. Výsledkem reakce je molekula kyslíku, vzniklá štěpením vody, dále nová molekula vody a  $CH_2O$ , jenž reprezentuje obecné složení sacharidů. Poslední zmíněná část je tou nejdůležitější, protože světelná energie je přeměněna a uložena v podobě chemických vazeb sacharidů.

Nicméně rostliny nejsou prvními fotosyntetizujícími organismy, ale jsou jedním z důležitých objektů ve výzkumu fotosyntézy. Dalšími objekty jsou fotosyntetizující bakterie. Ovšem bakterie nemusí nutně mít stejný způsob fotosyntézy už jen vzhledem k tomu, že bakterie jsou jednobuněčné prokaryotní organismy a rostliny jsou mnohobuněčné eukaryotní organismy. Jedním kmenem bakterií, které mají stejnou chemickou reakci (1) fotosyntézy jako rostliny, jsou sinice. Oproti tomu existují jiné bakterie, které se liší použitým redukčním činidlem při fotosyntéze. Daným činidlem může být například sulfan, pro který se rovnice změní následovně:



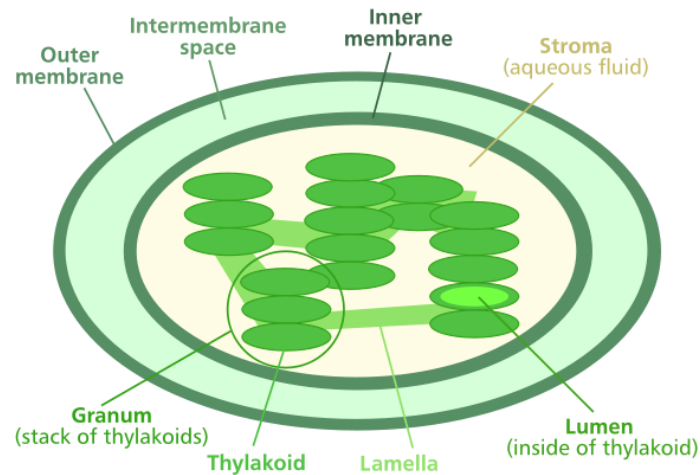
Vzhledem k porovnání rovnic (1) a (2) můžeme opravdu říci, že se kyslík v (1) neuvolňuje z molekuly oxidu uhličitého, ale uvolňuje se z redukčního činidla stejně jako síra v (2). Z tohoto porovnání můžeme zapsat obecnou chemickou rovnici fotosyntézy takto:



Nicméně tato rovnice fotosyntézy nepopisuje žádné reakce, které během fotosyntézy probíhají, ale pouze reaktanty na počátku fotosyntézy a produkty na jejím konci. [2]

Přestože tématem této práce je bakteriální fotosyntéza a než budeme pokračovat kapitolou o bakteriální fotosyntéze, je vhodné nastínit, jak vypadá fotosyntetický aparát rostlin. Rostliny jsou tvořeny eukaryotickými buňkami, které jsou obecně větší než prokaryotické a obsahují organely s různými specializovanými funkcemi. Jedním druhem z těchto organel jsou chloroplasty, v nichž fotosyntéza probíhá. Ty obsahují všechny zelené části rostlin. Samotný chloroplast je tvořen dvěma membránami, které uvnitř obsahují hustou tekutinu nazývanou stroma. Ve stromatu se dále nacházejí různě rozložené tylakoidy, jejichž vnitřní dutinu tvoří lumen. Tylakoidy jsou navzájem propojeny a tvoří sloupce zvané grana, která jsou dále propojena stromálními tylakoidy nazvané lamely. Samotná tylakoidní

membrána však pracuje podobným způsobem jako membrána fotosyntetických prokaryotních organismů.



Obr. 1.: Složení tylakoidu

Kde je tedy umístěn bakteriální fotosyntetický aparát? Fotosyntetické bakterie nemají specializované orgány, jako rostliny mají chloroplasty. Místo chloroplastu však obsahují vezikuly, které obsahují fotosyntetický aparát. Tyto vezikuly se nazývají chromatofory a jsou vázány v cytoplazmatické membráně. Samotný chromatofor je tenký sférický váček s dvojitou stěnou, který vznikl vchlípením několika vrstev membrán. [4]

Fotosyntetický proces lze rozdělit na dvě fáze – světelnou fázi a temnostní fázi. Během světelné fáze pigmentové molekuly ve světlosběrných anténách zachytí světelnou energii a dočasně ji zadrží v podobě excitace. Energie je postupně přenesena ze světlosběrných antén do oblasti reakčního centra. Energie se tak přenesla na bakteriochlorofyly, obsažené v reakčním centru a jejichž excitovaný stav spouští fotochemické reakce, které rozdělují kladný a záporný náboj po celé délce membrány. Toto rozdělení nábojů spouští přenos elektronů, s čímž zároveň probíhá pumpování protonů přes membránu. Tímto se generuje elektrochemický protonový gradient, jež je způsoben rozdílnou koncentrací protonů na obou stranách membrány, tedy rozdílem v pH. Tento potenciál je poté využit k pohonu reakcí typu ATP syntáza, při níž dochází k vzniku makroergických molekul ATP. [3,4]

Navazující temnostní fáze nevyžaduje světelnou energii. Slouží pouze k převedení a uložení chemické energie, získané ve světelné fázi například jako molekulu ATP, v podobě sacharidů.

### 1.1.1 Fotosyntetizující bakterie

Fotosyntetizující bakterie využívají jako hlavní zdroj energie sluneční světlo. Většina z těchto bakterií využívá anorganický uhlík a jsou autotrofní. Přesto existují druhy, které jsou heterotrofní. Celkově lze fotosyntetizující bakterie rozdělit do několika skupin.

Proteobakterie, zelené sírné bakterie, zelené nesírné bakterie, gemmatimonas, acidobakterie, heliobakterie a sinice.

Proteobakterie, na něž je tato práce převážně zaměřena, jsou též označovány jako purpurové bakterie. K proteobakteriím se také řadí skupina aerobních anoxygenních fototrofnů (AAP), kteří jsou podobní purpurovým bakteriím. Jsou významnou skupinou, která je velmi rozšířená. Všechny proteobakterie jsou gramnegativní a jejich vnější membrána je tvořena především lipopolysacharidy. Mnoho z nich je fotoautotrofní, fotoheterotrofní nebo aerobní či anaerobní a je schopno fixovat  $N_2$ . Purpurové fototrofní bakterie patří mezi nejvíce studovanou skupinu z mnoha důvodů jako například modulární povahu fotosyntetického systému nebo přizpůsobivost metabolismu. Proteobakterie lze dále rozdělit na dvě skupiny. Nesírné purpurové bakterie a sírné purpurové bakterie. [3,4]

Nesírné purpurové bakterie většinou jako redukční činidlo využívají organický vodík, nicméně jsou schopné se adaptovat, a tak využívat plynný vodík. Převážně žijí aerobně za přístupu světla, ale jsou též schopny žít aerobně ve tmě za pomoci dýchání, a tak jsou fakultativně fotoheterotrofní. Patří sem například fototrofní *Rhodobacter Sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* nebo chemoheterotrofní *Escherichia coli*. [3,4]

Sírné purpurové bakterie nejsou schopny žít aerobně a jako redukční činidlo využívají látku obsahující anorganickou síru, jako je sulfan. Tyto bakterie jsou tedy oproti nesírným purpurovým bakteriím obligatorně fototrofní. Příkladem z této skupiny je *Chromatium vinosum*. [3,4]

Zelené sírné bakterie jsou striktně anaerobní a nejsou tedy schopny respirace. Jsou schopny využívat stejné látky jako sírné purpurové bakterie, také aktivně fixují  $N_2$  a navíc využívají ostatní organické donory  $H_2$ . Označují se jako fotoautotrofní a fotoheterotrofní obligatorně anaerobní bakterie. Je jím například *Chlorobium tepidum*. [3,4]

Zelené nesírné bakterie se metabolicky velice liší od zelených sírných bakterií oproti purpurovým, kde nesírné a sírné bakterie mají k sobě mnohem blíže. Zelené nesírné bakterie jsou především fotoorganotrofní bakterie, které žijí anaerobně za přístupu světla pomocí

fotosyntézy nebo aerobně ve tmě pomocí dýchání. Dále jsou termofilní a lze je najít v horkých pramenech po celém světě. Od ostatních fototrofních bakterií se liší schopností vlastního pohybu. V této skupině se nachází například *Chloroflexus aurantiacus*. [3,4]

Gemmatimonas jsou nedávno popsanou skupinou bakterií s jediným známým fototrofním zástupcem *Gemmatimonas phototrophica*. Jsou to gramnegativní bakterie tyčového tvaru, které jsou schopny žít anaerobně i aerobně. [5]

Acidobakterie jsou další skupinou nedávno popsaných bakterií. Jsou acidofilní, gramnegativní heterotrofové tyčového tvaru, kteří mohou žít aerobně i anaerobně. Fototrofním zástupcem je *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*. [6]

Heliobakterie jsou poslední zástupcem fotosyntetizujících bakterií, jež při fotosyntéze využívají bakteriochlorofyl. Jako zelené sírné bakterie jsou též striktně anaerobní, protože vystavení kyslíku okamžitě umírají. Heliobakterie jsou grampozitivní jako jediná z fototrofních bakterií. Též aktivně fixuje  $N_2$ . U heliobakterií se zdá, že potřebují organický uhlík, a tak jsou anaerobní fotoheterotrofové. Příkladem je *Heliobacterium chlorum*. [3,4]

Poslední skupinou jsou sinice. Od ostatních fototrofních bakterií se liší tím, že obsahují chlorofyl místo bakteriochlorofylu, mají oxygenní metabolismus, jehož vedlejším produktem je  $O_2$ . Jejich fotosyntéza se velice podobá fotosyntéze eukaryotických buněk. Teměř všechny sinice jsou fotoautotrofní, ale jsou schopny být i fotoheterotrofní. Díky jejich odolnosti je můžeme nalézt od sladkých vod až po oblasti s extrémními podmínkami jako vyprahlé pouště či mrazivou Antarktidu. [3,4]

## 1.2 Fotosyntetická barviva

Jak již bylo zmíněno dříve, pro fotosyntézu je důležitá světelná energie. Pro zachycení této energie v podobě fotonů jsou využita fotosyntetická barviva. Tyto barviva zastávají několik funkcí a chemicky jsou rozdělena do dvou skupin.

Funkcí barviv je: zachytávání fotonů, přenos fotochemické energie, fotoprotekce (ochrana fotosyntetického ústrojí) a strukturální funkce.

Zachytávání fotonů je významná vlastnost fotosyntetických barviv a je dána jejich chemickou strukturou. Část molekuly barviva umožňující absorpci fotonů se nazývá chromofor. Tato část je tvořena systémem konjugovaných vazeb, kdy jde o střídání jednoduchých a dvojných uhlíkových vazeb. Tím dochází k překryvu atomových p orbitalů

jednotlivých atomů uhlíku, a tak vznikají  $\pi$  molekulové orbitály. Tyto molekulové orbitály obsahují delokalizované elektrony, které mohou být absorpcí fotonu excitovány na vyšší energetickou hladinu.

U barviv tedy záleží na počtu konjugovaných vazeb. Od tohoto počtu se odvíjí, při jaké vlnové délce bude daná látka absorbovat. S rostoucím počtem konjugovaných vazeb se posouvá vlnová délka fotonů, které je molekula schopna absorbovat, výše, a tedy s vyšší vlnovou délkou klesá energie fotonu.

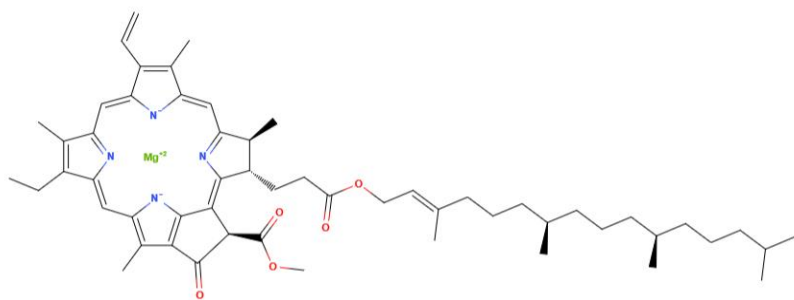
Vzhledem k podmínkám na Zemi (především atmosférické), které ovlivňují množství světla a vlnové délky dopadající na povrch, fotosyntetické systémy využívají takové barviva, které jsou schopné absorbovat vhodné vlnové délky. Těmito barvivy jsou chlorofyly, bakteriochlorofyly a karotenoidy. Dle chemické struktury můžeme tato barviva rozdělit na dvě skupiny a to tetrapyroly, kam patří chlorofyly a bakteriochlorofyly, a terpenoidy, kam patří karotenoidy.

### **1.2.1 Chlorofyly a bakteriochlorofyly**

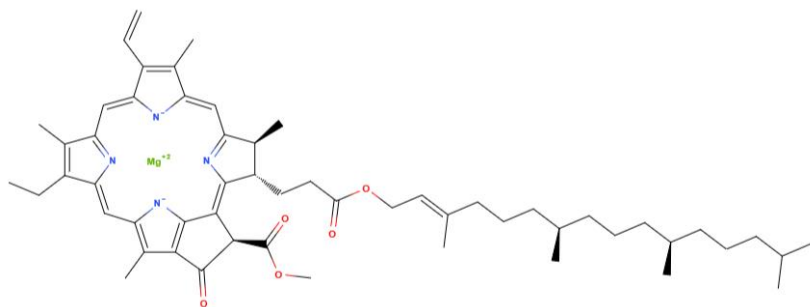
Všechny fotosyntetizující organismy obsahují chlorofyly nebo bakteriochlorofyly. Tyto pigmenty zastávají ve fotosyntéze několik funkcí a to světlosběrnou, přenos fotochemické energie a strukturní. Hlavní rozdíl mezi Chl a BChl není v chemické struktuře, ale v tom, zda u daného organismu probíhá fotosyntéza oxygenní nebo anoxygenní. Mezi oxygenní organismy obsahující chlorofyly patří rostliny, řasy a sinice. Bakteriochlorofyly obsahují všechny ostatní druhy bakterií (viz. Fotosyntetizující bakterie), u kterých probíhá již zmíněná anoxygenní fotosyntéza.

Základem chlorofylů je uzavřený tetrapyrolový makrocycklus – chlorin. Ten je složen ze čtyř pyrolových jednotek a uprostřed chlorinu je vázaný atom hořčíku. Dále je na třetí pyrolovou jednotku navázaný izocyklický kruh a na čtvrtou pyrolovou jednotku je navázána kyselina propionová, na kterou může být vázán další uhlovodíkový řetězec, který může sloužit k ukotvení v proteinové struktuře. Tento základ mají všechny chlorofyly stejné.

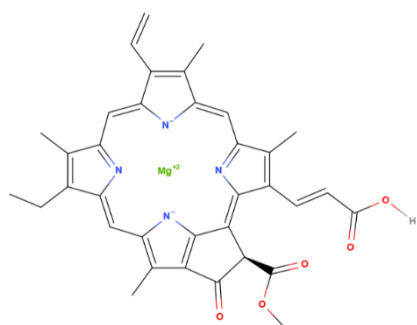
Existuje několik typů chlorofylů a bakteriochlorofylů a tím jsou Chl-a, -b, -c, -d, -f a BChl-a, -b, -c, -d, -e a -g. Jednotlivé typy se liší navázanými substituenty na určité uhlíkové atomy chlorinu. Všechny chlorofyly, kromě Chl-c, se skládají z chlorinového makrocyckladu a navázaným uhlovodíkovým řetězcem je fytylový řetězec, což můžeme vidět na obrázku. [7]



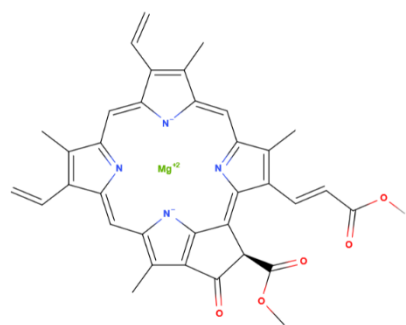
Chl-a,



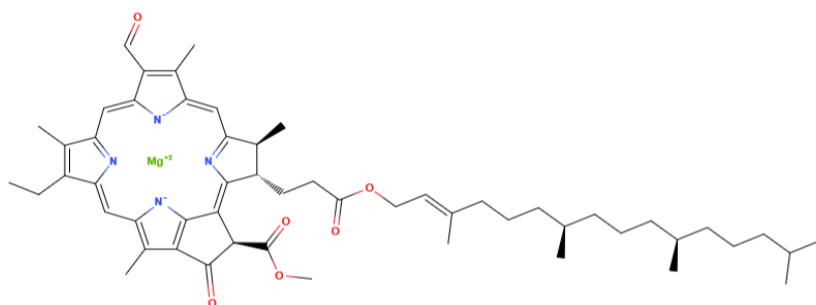
Chl-b



Chl-c1

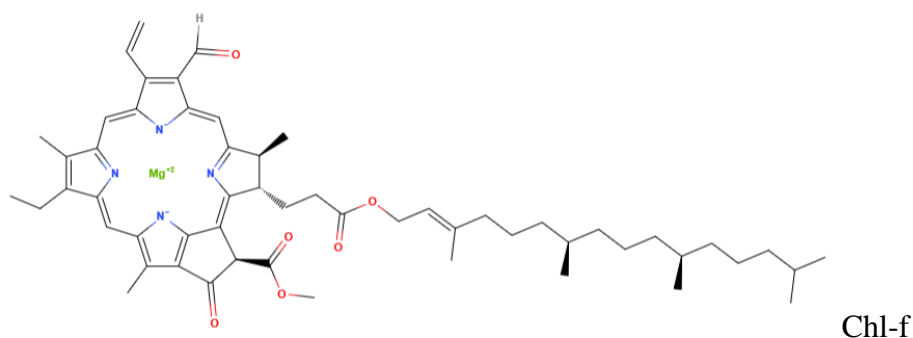


Chl-c2



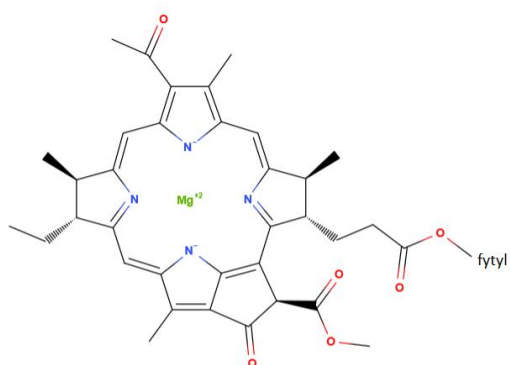
Chl-d

Obr. 2.: Strukturní vzorce chlorofylů. Vytvořeno v molview.org.

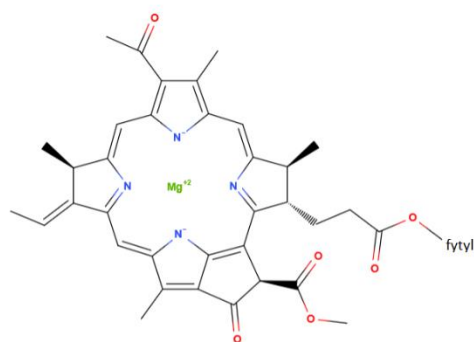


Obr. 3.: Strukturní vzorec chlorofylu. Vytvořeno v molview.org.

Z chlorofylů je nejčastější Chl-a, který se vyskytuje ve všech oxygenních fotosyntetických organismech a vyskytuje se v obou reakčních centrech ve všech světloběrných komplexech s vázaným chlorofylem. Chl-a zastává důležitou úlohu v energetické části oxygenní fotosyntézy, a to separaci náboje a přenos elektronů do transportního řetězce. Chl-b je hlavní doplňkový světloběrný pigment, který obsahují zelené řasy, rostliny a sinice. Konkrétně byl objeven jako protein v reakčních centrech anténních systémech fotosystému II. O Chl-d bylo původně myšleno, že je pouze vedlejším produktem pigmentových extraktů, nicméně je jediným známým pigmentem, jež dokáže zastoupit funkci Chl-a jako speciálního páru. Chl-f je nejvíce červeně posunutý Chl, nicméně jeho funkce není zatím popsána. [7]

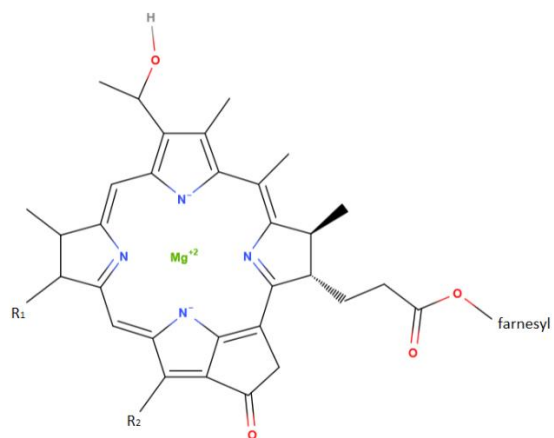


BChl-a

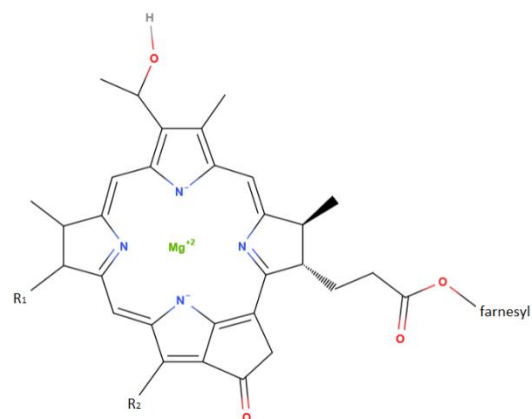


BChl-b

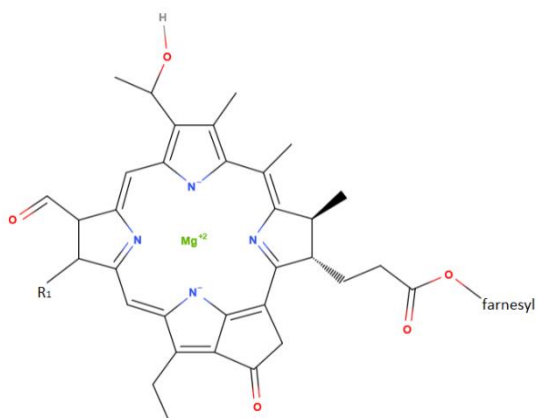
Obr. 4.: Strukturní vzorce bakteriochlorofylů. Vytvořeno v molview.org



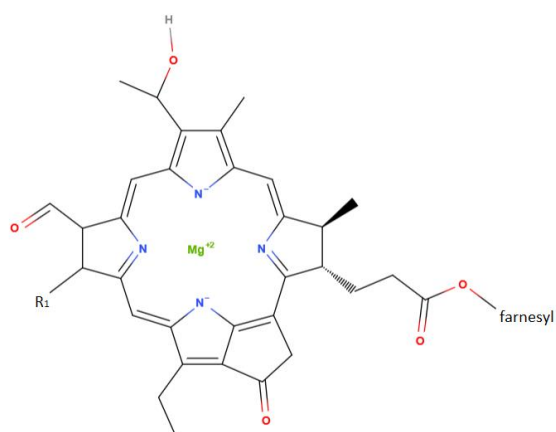
BChl-c



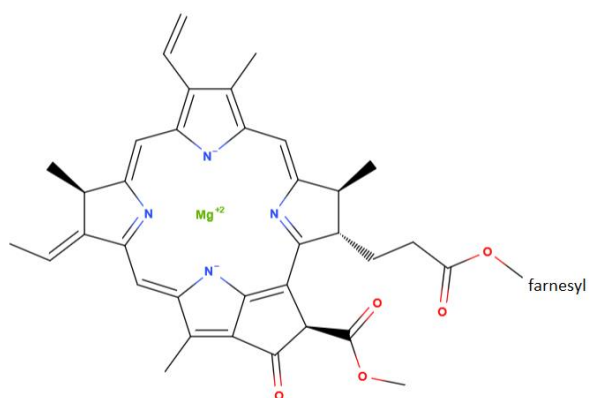
BChl-d



BChl-e



BChl-f



BChl-g

Obr. 5: Strukturální vzorce bakteriochlorofylů. Vytvořeno v molview.org

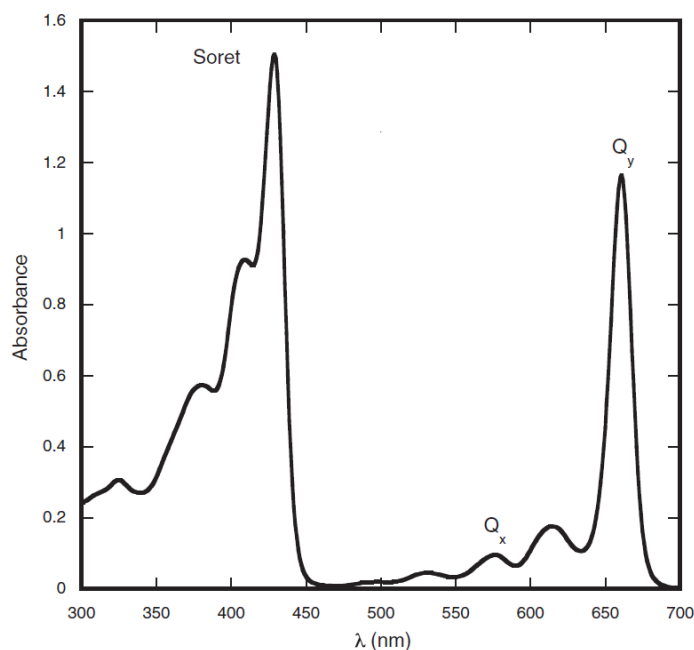


Co se týče bakteriochlorofylů, tak nejrozšířenější mezi anoxygenními fototrofy je BChl-a. BChl-b byl nalezen pouze u několika málo druhů, kde nahrazuje BChl-a. Dále BChl-c, -d, a -e byly objeveny u zelených sírných bakterií. U BChl-f není známo, že by byl zaznamenán u přirozeně se vyskytujících organismů. Ovšem tvorba BChl-f byla pozorována u mutantů zelených sírných bakterií. BChl-g byl objeven pouze u gram-pozitivních heliobakterií, kde je téměř jediným chlorofylovým pigmentem. [7]

### 1.2.2 Vlastnosti (B)Chl

Je všeobecně známo, že chlorofyly jsou zelené molekuly, protože v zelené části spektra světlo nepohlcují, ale absorbují především v modré nebo blízké UV oblasti a zároveň v červené nebo blízké IR oblasti spektra. Tyto vlastnosti zajišťuje již zmíněná část molekuly – chromofor. U (B)Chl je chromoforem tetrapyrrolový makrocyklus. Absorpční spektrum různých (B)Chl navíc ovlivňují navázané substituenty a tím posouvají polohy absorpčních maxim. [7]

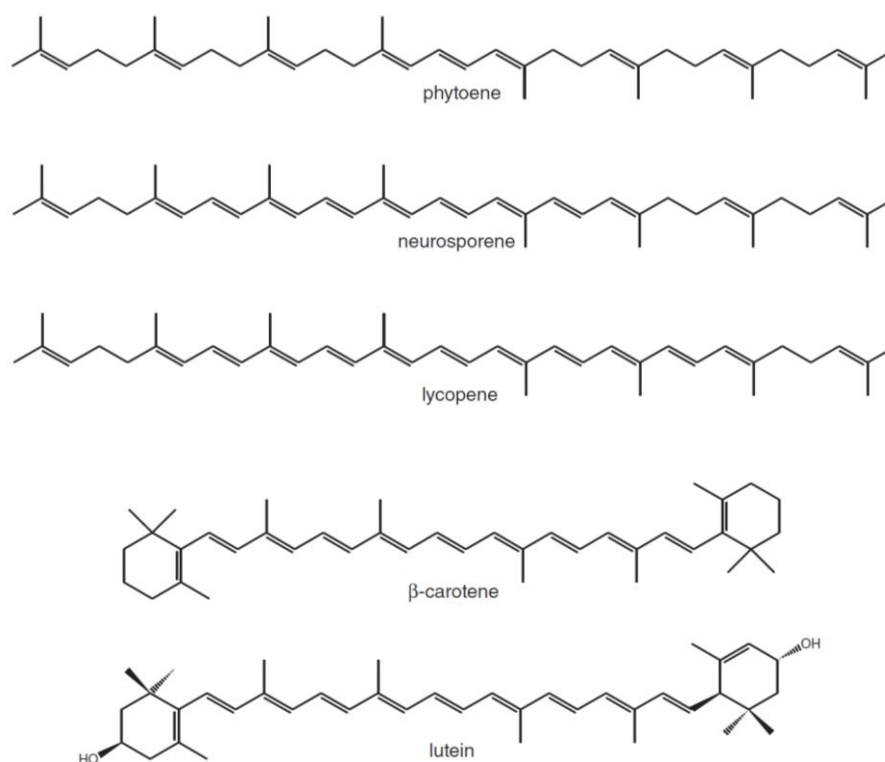
Spektroskopické vlastnosti lze vysvětlit stejným způsobem jako u porfyrinů. Při excitaci elektronů dochází k  $\pi \rightarrow \pi^*$  přechodu, čímž vzniká takzvaný Soretův pás, který se nachází v modré části spektra. Energie z tohoto pásu se poté přenáší do Q pásů v oblasti červeného spektra, které vyhasínají podstatně pomaleji oproti Soretovo pásu. Těmito pásy jsou vyšší  $Q_x$  a nižší  $Q_y$  viz. Obr. 6. [10, 52]



Obr. 6.: Absorpční spektrum BChl-a [45]

## 1.3 Karotenoidy

Další významnou skupinou fotosyntetických barviv jsou karotenoidy, které samotné patří do skupiny terpenoidů. Významné jsou z toho důvodu, že jednou z jejich funkcí je absorbovat světlo v modrozelené oblasti spektra, kde (bakterio)chlorofyly nejsou příliš efektivní. Vzhledem k této absorpci jsou karotenoidy červeně, oranžově nebo žlutě zbarvené. Mají i další funkce jako ochrannou nebo strukturní. Základem většiny karotenoidů je řetězec obsahující 40 atomů uhlíku s 10–13 dvojnými konjugovanými vazbami s delokalizovanými elektrony. Díky tomu mají také karotenoidy charakter chromoforu. Některé karotenoidy mohou navíc obsahovat různé funkční skupiny obsahující atom kyslíku. Z tohoto pohledu se karotenoidy dělí na karoteny bez kyslíku a na xantofyly obsahující kyslík. [7]

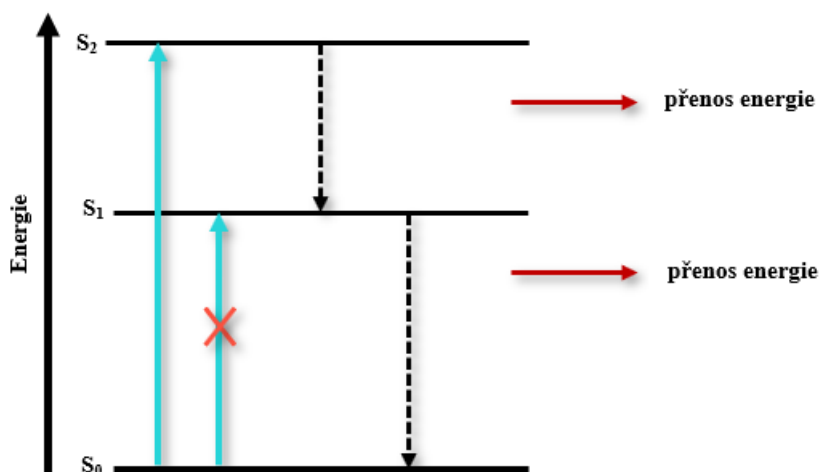


Obr.7: Strukturální vzorce některých karotenoidů.

### 1.3.1 Excitace karotenoidů

Studiem polyenů, mezi které karotenoidy patří, bylo zjištěno, že chování jejich excitačních stavů je jiné, než předpovídá teorie molekulových orbitalů. Důvodem jiného chování je symetrie polyenů. Karotenoidy se chovají tak, že při excitaci nedochází k přechodu ze základního stavu  $S_0$  do excitovaného stavu  $S_1$ , ale přechází ze základního stavu  $S_0$  do stavu

$S_2$ . Tomuto přechodu odpovídá absorpční pás v modrozelené oblasti spektra. Přechod  $S_0 \rightarrow S_2$  se tak nazývá jako povolený přechod a  $S_0 \rightarrow S_1$  jako zakázaný přechod pro excitaci jedním fotonem, kvůli již zmíněné symetrii molekuly. Stav  $S_2$  má životnost v řádu stovek femtosekund, což je velice krátká doba. Obvykle poté molekula přechází vnitřní konverzí do stavu  $S_1$ , jehož životnost je v řádu jednotek ps. [7, 47]

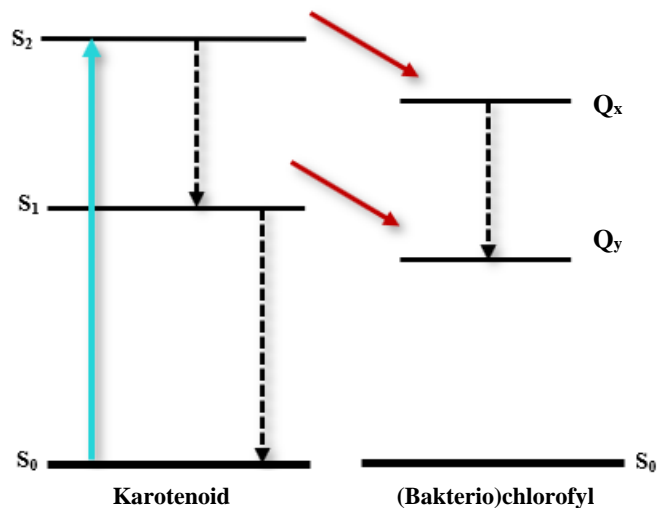


Obr. 8.: Schéma průběhu excitace karotenoidů.

### 1.3.2 Světlosběrná funkce karotenoidů

Světlosběrné vlastnosti karotenoidů a jejich výběr organismy jsou ovlivněny délkou řetězce konjugovaných vazeb. Důvodem zapojení karotenoidů jako dalších pigmentů ve fotosyntetickém systému je snaha maximalizovat počet absorbovaných fotonů vhodným doplněním absorpčních pásů (bakterio)chlorofylů a tím mít dostatek energie pro průběh fotosyntézy, protože samotné (B)Chl nemusí absorbovat dostatečné množství světelné energie. Například kvůli podmínkám prostředí. Energie z excitovaných karotenoidů může být přenesena na (B)Chl, kdy donory energie jsou stav  $S_2$  i stav  $S_1$ . [47]

V přírodě se přirozeně se vyskytují karotenoidy s počtem 7 až 13 konjugovaných dvojných vazeb. Karotenoidy s menším počtem absorbují především v UV oblasti spektra, a tak nemusí pohlcovat dostatečné množství fotonů. Naopak karotenoidy s vyšším počtem než 13 mohou mít stav  $S_1$  energeticky položený níže než  $Q_y$  u (B)Chl a nedocházelo by tak k přenosu energie ze stavu  $S_1$  na  $Q_y$ . Vzhledem k velice krátkým časům životnosti stavů  $S_2$  a  $S_1$  oproti (B)Chl musí být energetický přenos z karotenoidů efektivní, aby byly konkurenceschopné, což se i děje vzhledem k jejich přirozenému výskytu. [47]



Obr. 9.: Schéma přenosu energie z karotenoidu na (B)Chl.

### 1.3.3 Ochranná funkce karotenoidů

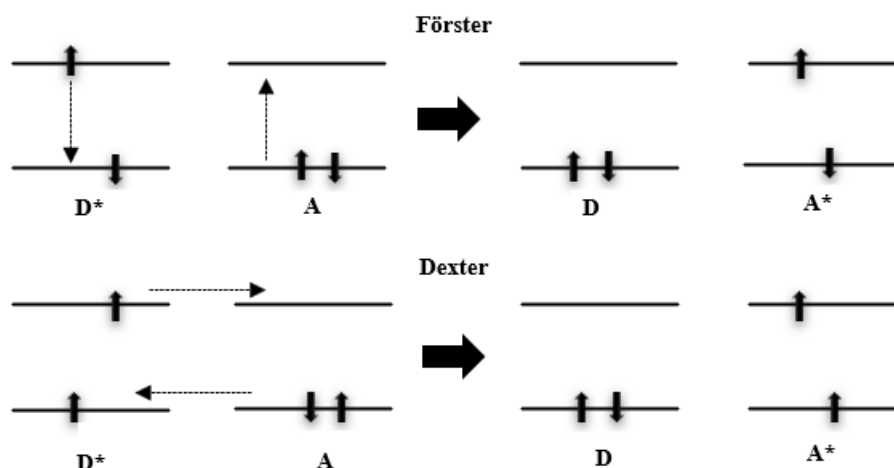
Fotosyntetické organismy se přirozeně snaží získat dostatečné množství světelné energie pro správný průběh fotosyntézy. Někdy může dojít k nadměrné absorpci světla z důvodu vysoké intenzity světla. Tím dochází k nadměrnému množství excitovaných chlorofylů. Běžně tak chlorofyl přechází do singletního excitovaného stavu  $^1Chl^*$ . Poté může mezisystémovým přechodem ze stavu  $^1Chl^*$  přejít do tripletního excitovaného stavu  $^3Chl^*$ . Tento stav chlorofylu je problémový, protože má potenciál reagovat s molekulou kyslíku, která tak přejde ze základního tripletního stavu  $^3O_2$  do singletního excitovaného stavu  $^1O_2^*$ . V této excitované formě se molekula kyslíku stává silným oxidačním, které může poškozovat jednotlivé části fotosyntetického aparátu včetně proteinů nebo DNA. Tomuto nebezpečí lze předejít různými ochrannými mechanismy (fotoprotekce) a v některých mechanismech jsou zapojeny karotenoidy. Jedním z hlavních mechanismů je návrat  $^1Chl^*$  do základního stavu procesem nefotochemického zhášení (NPQ). Karotenoidy mohou pomoci předejít vzniku  $^1O_2^*$  přímým přenosem přebytečné excitační energie z  $^3Chl^*$  za vzniku  $^3Car^*$ . Pokud vznikne  $^1O_2^*$ , tak karotenoid je schopen excitační energii stejným způsobem odebrat opět za vzniku  $^3Car^*$ , jehož energie je v obou případech dále disipována jako teplo. [7, 47]

### 1.3.4 Přenos energie mezi pigmenty

Mezi pigmenty dochází k rezonančnímu přenosu energie, což je nezářivý způsob přenosu energie. Tento proces probíhá tak, že dochází přenosu energie mezi excitovanou

molekulou – donor a sousední molekulou – akceptor. Pro tento přenos musí být akceptor v dosahu a musí se překrývat emisní spektrum donoru s absorpčním spektrem akceptoru. Pokud nejsou tyto podmínky splněny, dochází k relaxaci donoru prostřednictvím relaxačních mechanismů jako vnitřní konverze, mezisystémový přechod či emise fotonu.

Pro popis mechanismu tohoto přenosu energie byly vytvořeny Försterův a Dexterův model. Försterův model je založen na dipól-dipólové interakci donoru a akceptoru, kdy se donor deexcituje a přenosem virtuálního fotonu se excituje akceptor, přičemž vzdálenost mezi nimi je větší než jejich velikost. Typicky je tato vzdálenost 30-100 Å. Dexterův model popisuje přenos energie mezi donorem a akceptorem, kdy excitační energie je mezi nimi přenesena prostřednictvím výměny elektronů, při vzdálenostech srovnatelných s jejich velikostí. Tato vzdálenost se pohybuje v rozmezí 6-20 Å. V důsledku malých vzdáleností dipól-dipólová aproximace selhává, protože může dojít k překrytí molekulových orbitalů. Navíc Dexterův model oproti Försterovu, který bere v úvahu pouze povolené dipólové přechody, umožňuje počítat i se zakázaným triplet-tripletním přechodem. [44, 53]



Obr. 10.: Försterův a Dexterův mechanismus přenosu energie.

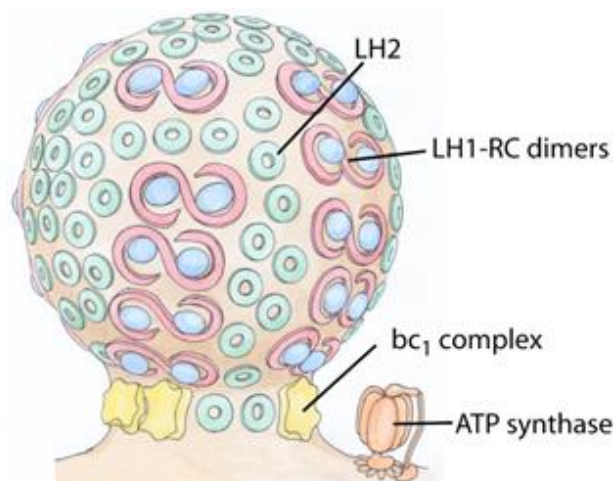
## 1.4 Fotosyntetický aparát

Fotosyntetický aparát je tvořen takzvanými fotosyntetickými jednotkami (PSU), pro jejichž objev se stal základem experiment Emersona a Arnolda v roce 1932. V tomto experimentu určili na buňkách *Chlorelly*, že při záblesku saturujícího světla přibližně na 2500 chlorofylových molekul vznikne jedna molekula  $O_2$ . Na základě toho bylo vyvozeno, že chlorofylové molekuly spolu kooperují při přenosu absorbované energie fotonů, dokud není zachycena ve specifickém místě – reakčním centru (RC). [39]

V samotném RC, které společně s molekulami světlosběrných pigmentů tvoří PSU, dohází k fotochemické reakci. Tato fotochemická reakce zahrnuje absorpci slunečního záření, které poskytuje energii nutnou k přenosu elektronu z donoru, jímž je pigment RC, na molekulu akceptoru a následnou řadu postupných redoxních reakcí. [39]

RC je samo o sobě schopno absorbovat přibližně deset fotonů za sekundu při běžné intenzitě denního světla, avšak transportní řetězec elektronů je schopen přenést přibližně 200 elektronů za sekundu. To by v tomto případě znamenalo, že většinu času nedochází k transportu elektronů, a fotosyntetický aparát by byl převážně nečinný. Tento nedostatek organismy vyřešily anténními komplexy, které tak navyšují množství (B)Chl a zapojují další pigmenty, jež rozšiřují absorbovanou část spektra. [7]

Anténní komplexy lze rozdělit na dva typy, a to na vnitřní a vnější. Vnitřní anténní komplexy jsou vnořeny v membráně a obklopují RC, se kterým jsou těsně spojeny. Vnější antény jsou pouze přichyceny na povrchu membrány a s RC jsou propojeny prostřednictvím vnitřní antény. Antény tak efektivně přenášejí absorbovanou energii do RC. Tento přenos silně ovlivňují scaffold proteiny, jež fixují pigmenty ve specifické orientaci a vzdálenosti. Tím usnadňují přenos excitační energie a minimalizují ztráty konkurenčních drah mezisystémového přechodu, vnitřní konverze a fluorescence. Existuje mnoho druhů anténních komplexů, které se strukturně liší nejen z pohledu umístění komplexu, ale také podle druhu fotosyntetického organismu. U purpurových bakterií jde o vnější komplex LH2 (light-harvesting 2) a vnitřní komplex LH1 (light-harvesting 1). [7]



Obr.11.: Chromatofor. Převzato z [www.ks.uiuc.edu](http://www.ks.uiuc.edu).

### 1.4.1 Anténní komplex LH2

Komplex LH2 je vnějším anténním komplexem, jež obsahuje bakteriochlorofyly i karotenoidy. Absorpční pásy tohoto komplexu leží v rozmezí 400-900 nm, kde absorpční pásy v červené části spektra náleží bakteriochlorofylům. V tomto případě to jsou absorpční pásy soustředěné na 800 nm a 850 nm a dle silné absorpce v těchto pásech jsou dané bakteriochlorofyly nazvány B800 a B850. Pigmenty jsou vázány jednotky  $\alpha$  a  $\beta$  polypeptidů, jež tvoří heterodimer. Tyto dvě jednotky tvoří dva soustředné kruhy a pigmenty jsou sevřeny mezi nimi. Bakteriochlorofyly komplexu LH2 tvoří dva kruhy rozložené v rovině membrány. První kruh je kolmý na rovinu membrány a je tvořen 18 bakteriochlorofyly B850, kdy jeden BChl vychází na každou  $\alpha$  a  $\beta$  polypeptidovou jednotku, pomocí histidinových reziduí. Molekuly histidinu mohou být snadno protonovány a vytvořit tak síť vodíkových vazeb. Ty pomáhají stabilizovat BChl-proteinové interakce a mění absorpční vlastnosti pigmentů. Druhý kruh je rovnoběžný s membránou a je tvořený devíti B800 bakteriochlorofyly, kde jeden BChl vychází na jeden  $\alpha\beta$  pár. [7, 9]

### 1.4.2 Anténní komplex LH1

LH1 je vnitřní anténní komplex a společně s RC, které obklopuje, tvoří jaderný komplex RC-LH1. Komplex LH1 je, stejně jako komplex LH2, tvořen dvěma polypeptidovými jednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ , které také tvoří dva soustředné kruhy svírající pigmenty. Na každou z těchto jednotek je navázán jeden BChl. Tento komplex obsahuje BChl pouze typu B875, který je kolmý na rovinu membrány, a dále obsahuje karotenoidy. LH1 je větší než LH2, aby mohl pojmout zmíněné RC, a má několik druhů uspořádání v závislosti na druhu bakterie. Mohou tvořit uzavřený kruhový monomer z 16  $\alpha\beta$  jednotek nebo z 15  $\alpha\beta$  jednotek přerušovaný proteinem W. Zástupce s uzavřeným monomerním je například purpurová bakterie *Rhodospirillum rubrum* či *Blastochloris viridis* a bakterie vlastnící otevřený monomer *Rhodospirillum rubrum* či *Rhodospirillum rubrum*. Dva takto přerušované kruhy mohou někdy tvořit superkomplex, tzv. dimerní komplex, složený celkem z 28  $\alpha\beta$  jednotek esovitěho tvaru obklopující dvě RC a ze dvou proteinů PufX. Jako zástupce s dimerním komplexem můžeme uvést *Rhodospirillum rubrum* nebo *Rhodospirillum rubrum*. [7, 9]

Význam proteinů W a PufX přerušujících kruhové uspořádání LH1 spočívá v tom, že brání celkovému obklopení RC a tím vzniku bariéry pro výměnu chinonů, respektive chinolů, z a do RC. Samotný PufX je situovaný v koncových částech dimeru LH1. Pak se nicméně

nabízí otázka, jakým způsobem umožňuje uzavřený monomer průchod chinonů. Odpověď se skrývá v menším množství Car zapojených v LH1 a tím vzniku prostoru pro průchod. Monomery LH1-W a dimery LH1-PufX mají poměr BChl a Car 1:2, zatímco uzavřené monomery bez proteinu W mají poměr 1:1. Z toho vyplývá, že W a PufX umožňují zapojení extra karotenoidů a tím poskytnutí výhody lepší světlosběrné funkce a fotoprotekce anténního komplexu LH1. [7, 40, 41]

### 1.4.3 Reakční centrum

Bylo zmíněno, že RC je místem fotochemické reakce, což znamená přeměny excitační energie na elektronový transport. Nejlépe prozkoumané RC purpurových bakterií je u *Rhodobacter sphaeroides*. To se skládá ze tří proteinových podjednotek L (light), M (medium) a H (heavy) nazvané podle molekulové hmotnosti určené elektroforézou. Ale pořadí podle reálné hmotnosti je jiné a to H, M, L. U bakterie *Blastochoris viridis* se vyskytuje oproti *R. sphaeroides* navíc ještě čtvrtá podjednotka – cytochrom c C – zapojená do elektronového transportu. U *R. sphaeroides* činnost podjednotky C zajišťuje protein cytochrom  $c_2$ . [7]

V RC je dále na podjednotky L a M navázané kofaktory, jež jsou obvykle symetricky uspořádaný a dělí se na větve A a větve B. Obě větve jsou tvořeny dvěma bakteriochlorofyly označené  $P_A$  a  $P_B$ , jenž společně utváří dimer známý jako zvláštní pár nebo primární donor, doplňkovými bakteriochlorofyly  $B_A$ ,  $B_B$ , bakteriofeofytyny  $H_A$ ,  $H_B$  a párem chinonů  $Q_A$ ,  $Q_B$  a jeden karotenoid. [43]

Primární donor se obvykle označuje dle vlnové délky jeho maximální absorpce. *R. sphaeroides* má maximum v 870 nm a nese označení P870. Fotochemická reakce se zahajuje excitací P870 vyvolanou buď absorpcí fotonu dané vlnové délky nebo přenosem excitonu z anténních pigmentů. Tím se elektron v rámci primárního donoru dostane do excitační hladiny a primární donor se tak stává silným redukčním činidlem. Poté dochází k separaci náboje a redukci  $H_A$  v čase 2-3 ps. Následným krokem přenos elektronu z redukovaného  $H_A$  na  $Q_A$  za dobu kolem 200 ps a poté z  $Q_A$  na  $Q_B$  za dobu 0,2 ms. Mezitím je primární donor reoxidován elektronem z cytochrom  $c_2$  (C) a tímto řetězcem se přeneše na  $Q_B$  druhý elektron. Poté opouští RC v podobě  $H_2Q$  a následně je oxidován komplexem cytochrom  $bc_1$ . [43]

Vzhledem k fázi fotochemické reakce můžeme RC popsat jedním ze tří stavů. Prvním je otevřené RC, kdy se elektronový akceptor  $Q_A$  nachází v oxidovaném stavu a zároveň má



nenulovou pravděpodobnost přenosu excitonu z anténního systému na donor-akceptorový pár  $PH_A$ , který po zachycení energie přechází do stavu  $P^+H_A^-$ . Otevřené RC můžeme také nazvat jako aktivní. Naopak neaktivní RC se označuje jako uzavřené nebo polouzavřené.

V uzavřeném stavu RC není schopno zachytit exciton z důvodu oxidovaného  $P$  nebo redukováného  $H_A$ . Po separaci náboje vzniká přechodný uzavřený stav  $CP^+H_AQ_A^-$ , který je reoxidací  $P$  transformován na polouzavřený stav  $C^+PH_AQ_A^-$ . V tomto polouzavřeném stavu je RC schopno separace náboje, přestože je  $Q_A$  redukováný. Tyto tři stavy se tedy liší počtem elektronů přenesených elektronů. Otevřený 0, polouzavřený 1 a uzavřený 2 elektrony. [42] Uzavřené stavy mohou být i  $C^+P^+H_AQ_A$ ,  $C^+P^+H_AQ_A^-$  nebo  $C^+PH_A^-Q_A^-$  vlivem různých faktorů jako například teplota, intenzita světla, dostupnost donorů elektronů, chemická činidla a jiné. [42, 39]

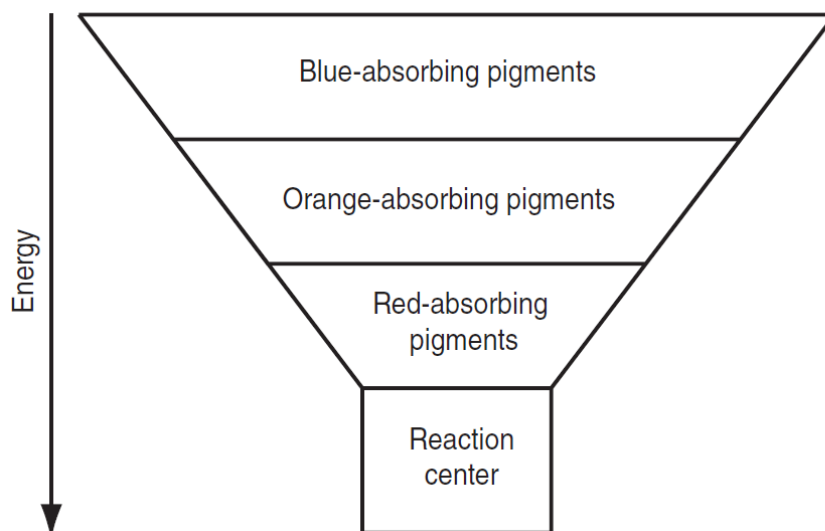
#### 1.4.4 Fotosyntetický aparát ostatních anoxygenních fotosyntetických bakterií

Vzhledem k tomu, že v pozdější kapitole budou zmíněny i zástupci ostatních anoxygenních fotosyntetických bakterií, v následujících několika řádcích nastíníme strukturu jejich fotosyntetického aparátu. První skupinou jsou zelené sírné bakterie. Jejich fotosyntetický aparát je složen z velkých vnějších anténních komplexů nazvaný chlorosomy, které jsou největšími přírodními fotosyntetickými anténami. Na spodní části chlorosomů se nachází pigment-proteinový komplex baseplate. Pro přenos energie zelené sírné bakterie obsahují Fenna-Matthews-Olson (FMO) protein, přes něhož se přenáší energie z chlorosomových baseplate do RC, které obsahuje jaderné světlosběrné pigmenty. [3,7]

Další skupinou jsou zelené nesírné bakterie. Jedinou společnou vlastností se zelenými sírnými bakteriemi jsou chlorosomy. Ve zbylých částech svého aparátu jsou naprosto odlišné včetně RC. Nemají FMO komplexy, ale mají kruhový anténní komplex obklopující RC nazvaný B808-866, k němuž jsou chlorosomy přichyceny. Komplex B808-866 má spektroskopické podobnosti s LH2 purpurových bakterií a podobné řazení proteinů jako u LH1. [3, 7]

Posledními skupinami jsou heliobakterie a aerobní anoxygenní fototrofové (AAF). Heliobakterie v podstatě mají pouze RC podobné zeleným sírným bakteriím bez jakýchkoliv vnitřních či vnějších anténních komplexů. [3, 8] AAF obsahují LH1-RC komplex a někteří mají i vnější světlosběrné komplexy. Samotné RC mají podobné nesírným purpurovým bakteriím. [51]

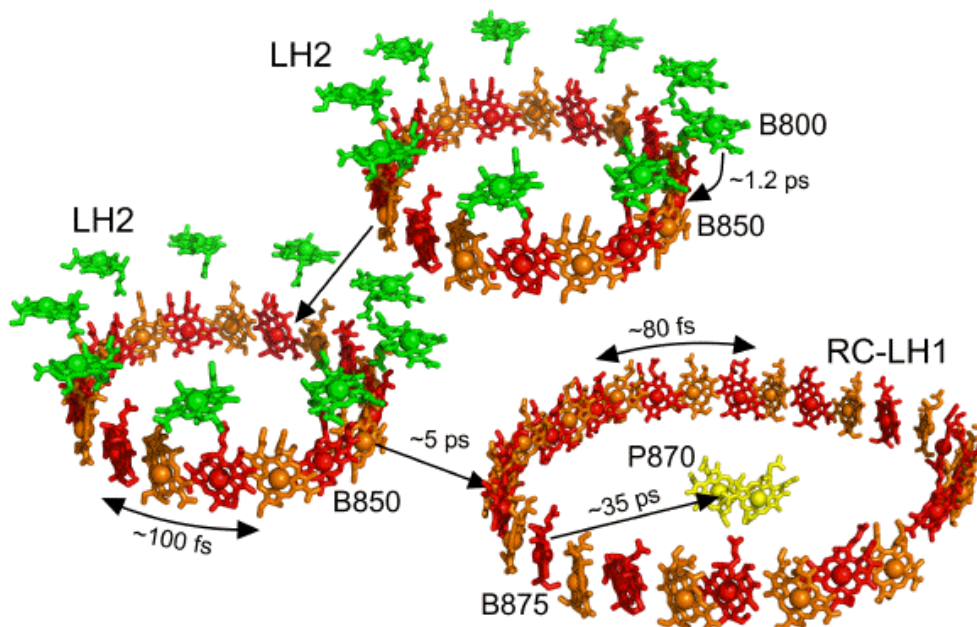
### 1.4.5 Trychtýřovitý efekt



Obr.12.: Schéma přenosu energie podle trychtýřovitého efektu. [45]

Vhodnou analogií pro popis energetického toku ve světlosběrných systémech je takzvaný trychtýřovitý efekt. Tento popis je založen na tom, že vzdálenější části světlosběrného systému od RC pohlcují fotony o kratší vlnové délce a směrem k RC se vlnová délka absorbovaných fotonů zvyšuje. Absorbovaná energie je poté postupně přenášena mezi jednotlivými molekulami pigmentů ve formě excitonu po energetickém spádu z vnějších anténních komplexů LH2 na vnitřní anténní komplex LH1 a odtud do RC. U purpurových bakterií pigment s nejkratší absorbující vlnovou délkou v LH2 je B800, z něž se v rámci LH2 může exciton přenést na B850 za dobu kolem 0,7 ps. Dále z B850 může exciton přeskočit buď na jiný B850 ( $LH2 \rightarrow LH2$ ) v rámci jedné antény s časem přibližně 100 fs nebo se přenese na B875 ( $LH2 \rightarrow LH1$ ) s časem kolem 3 ps. Poté se exciton může přenést opět v rámci anténního komplexu na jiný B875 ( $LH1 \rightarrow LH1$ ) přibližně za 80 fs nebo může být zachycen v RC na P870 ( $LH1 \rightarrow RC$ ) s časem kolem 35 ps, poslední místo přenosu excitonu, protože tato forma energie je následovně přeměněna fotochemickou reakcí Z tohoto pohledu se RC chová jako past (trap) na excitony. Čas přenosu  $LH1 \rightarrow RC$  se nazývá trapping time. Další možnost přenosu energie představují karotenoidy. Z karotenoidů se energie přenáší na BChl podle principu trychtýřového efektu. V určitých však tento princip nefunguje a to, když se má energie přenést proti spádu (*uphill*). K tomu dochází, když absorpční spektrum akceptoru je lehce posunuto ke kratším vlnovým délkám a vzniká tak menší energetická bariéra pro přenos

energie z donoru. Přesto k takovému přenosu energie proti spádu odchází vlivem tepelného pohybu molekul, který stačí k překonání menší energetické bariéry. [44, 45]



Obr. 13.: Schéma přenosu energie ve fotosyntetickém systému. [3]

#### 1.4.6 Vzájemná interakce antén a reakčních center

Existuje několik modelů, které popisují interakci mezi anténami a RC v závislosti na pravděpodobnosti úniku zachyceného excitonu v RC zpět do anténního systému (detrapping). Podle míry pravděpodobnosti, že proběhne detrapping, lze RC rozdělit na tři typy pastí. Tím jsou hluboká past s nízkou pravděpodobností, mělká past s vyšší pravděpodobností, kdy může detrapping nastat, a třetí past tak mělká, že se po separaci náboje může elektron vrátit na primární donor, vytvoří se exciton, který následně unikne z RC. Na první pohled se zdá, že by všechny možnosti mohly být reálné. [45]

V případě hluboké pasti, kdy je únik excitonu nepravděpodobný, dochází vždy k fotochemické reakci. K tomu dochází, pokud je rychlostní konstanta separace náboje mnohem vyšší než pro konstanta pro detrapping. V tomto případě je životnost excitonu silně závislá na excitační vlnové délce. Pokud je exciton v anténním systému, pak konečnému přenosu do RC dominuje životnost excitovaného stavu, což je rychlost limitující krok tohoto

přenosu. Podle toho se model hluboké pasti nazývá transfer-to-trap-limited. Pokud je exciton zachycen pigmenty RC, dochází k zhášení excitonu a jeho životnost odráží tento proces. Tímto modelem jsou dobře popsány fotosyntetizující purpurové bakterie. [45]

Druhým typem je mělká past. Ta má vyšší pravděpodobnost, že proběhne detrapping než pravděpodobnost zhášení excitonu při fotochemické reakci. Oproti předchozímu případu je tak rychlostní konstanta separace náboje mnohem menší než konstanta pro detrapping. Díky tomu může exciton vícekrát uniknout z RC a vrátit se zpět, než dojde k separaci náboje. Rychlost limitující krok je tedy separace náboje a model se nazývá trap-limited. Životnost excitonu tak nezávisí na excitační vlnové délce vzhledem vysoké pravděpodobnosti pro detrapping. Chování dle modelu trap-limited je připisováno fotosystému 1. [45]

Třetí typ je v podstatě speciální případ trap-limited modelu, kdy je velká pravděpodobnost reverzní fotochemické reakce. Může tak dojít návratu elektronu na primární donor a znovuvytvoření excitonu, jež následně unikne z RC do anténního systému. Jedná se o model zvaný radical-pair-equilibrium. Možnost takového chování je přisuzována fotosystému 2. [45]

Existuje ještě jeden model diffusion-limited. Jde o starší model, podle kterého se exciton pohyboval přeskoky postupně z jednoho pigmentu na druhý do RC, přičemž každý přeskok trval několik pikosekund. Tento model je dnes používán pouze pro některé periferní antény, například fykobilizomy. [45]

#### **1.4.7 Trapping time**

V této části se zaměříme na časy přenosů energie z vnitřních anténních komplexů do RC. Studium přenosu excitovaných stavů z antén do RC se vědci zabývají od konce třicátých let. První jasná demonstrace přenosu energie z antény do RC byla provedena v roce 1963. Od té doby vědci postupně docházeli k názoru, že proces přenosu energie do RC je pomalý a trvá přibližně nanosekundu. Později bylo zjištěno, že přenos trvá 50 ps při otevřeném RC a kolem 0,5 ns při uzavřeném RC. Navzdory tomu tento názor nebyl obecně přijímán a byl objasněn až s příchodem vyspělejších laserů a detektorů. [39]

Tab. 1.: Taxonomické rozdělení vybraných fototrofních bakterií. Barvy u druhů značí zařazení dle fotosyntetické skupiny: zelené sírné bakterie (sytě zelená), zelené nesírné bakterie (zelená), heliobakterie (žlutá), purpurové nesírné bakterie (levandulová), purpurové sírné bakterie (hnědá), AAF (červená), Gemmatimonades (modrošedá).

Doména	Kmen	Třída	Řád	Rodina	Gen	Druh
Bacteria	Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	Chlorobiaceae	<i>Chlorobium</i>	<i>C. limicola</i>
					<i>Prosthecochloris</i>	<i>C. tepidum</i>
					<i>Roseiflexus</i>	<i>P. aestuarii</i>
	Chloroflexi	Chloroflexi	Chloroflexales	Chloroflexaceae	<i>Roseiflexus</i>	<i>Rf. castenholzii</i>
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Heliobacteriaceae	<i>Heliobacterium</i>	<i>H. chlorum</i>
						<i>H. modesticaldum</i>
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	<i>R. capsulatus</i>
						<i>R. sphaeroides</i>
					<i>Roseobacter</i>	<i>R. sp. COL2P</i>
			Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>R. cryptolactis</i>
						<i>R. palustris</i>
				Hyphomicrobiaceae	<i>Blastochloris</i>	(dříve <i>R. viridis</i> ) <i>B. viridis</i>
				Rhodobiaceae	<i>Roseospirillum</i>	<i>R. parvum</i>
			Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Rhodospirillum</i>	<i>R. rubrum</i>
			Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Erythrobacter</i>	<i>E. sp. NAP1</i>
			Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	<i>Chromatium</i>
	<i>C. vinosum</i>					
<i>Thermochromatium</i>	<i>C. tepidum</i>					
<i>Thiorhodovibrio</i>	<i>Tch. tepidum</i>					
				<i>Thiorhodovibrio</i>	<i>T. sp. 970</i>	
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	<i>G. phototrophica</i>	

Tab. 2.: Přehled časových konstant přenosu energie do RC fototrofních bakterií. Časové konstanty byly získány z dostupných literárních zdrojů

Druh	Otevřené RC	Uzavřené RC	Polouzavřené RC
<i>C. limicola</i>	23 ps [10]		
<i>C. tepidum</i>	35 ps [11]		
<i>P. aestuarii</i>	25 ps [13], 30 ps [12]		
<i>Rf. castenholzii</i>	60 ps [14]	210 ps [14]	
<i>H. chlorum</i>	20 ps [86]		
<i>H. modesticaldum</i>	25 ps [1x]		
<i>R. capsulatus</i>	40ps [15]	240 ps [15]	95 ps [15]
<i>R. sphaeroides</i>	42 ps [16], 44 ps [48], 45 ps [50], 45 ps [18], 60 ps [19], 60 ps [20], 80 ps [48], 130 ps [21]	210 ps [20]	
<i>R. sp. COL2P</i>	80 ps [47]		
<i>R. cryptolactis</i>	50 ps [22]	200 ps [22]	
<i>R. palustris</i>	40 ps [23]	300 ps [23]	
(dříve <i>R. viridis</i> ) <i>B. viridis</i>	55 ps [24], 60 ps [25], 60ps [26]	140 ps [25], 150 ps [26]	90 ps [26]
<i>R. parvum</i>	55 ps [27]		
<i>R. rubrum</i>	60 ps [50], 60 ps [28]	220 ps [28]	65 ps [28]
<i>E. sp. NAP1</i>	60 ps [47], 70 ps [47]		
<i>C. minutissimum</i>	60 ps [29], 60 ps [30]		
<i>C. vinosum</i>	50 ps [31]	230 ps [31]	
<i>C. tepidum</i>	40 ps [31], 140 ps [31]	310 ps [31]	
<i>Tch. tepidum</i>	55 ps [32], 64 ps [33], 65 ps [34], 70 ps [33]	185 ps [32]	
<i>T. sp. 970</i>	65 ps [35]		
<i>G. phototrophica</i>		200 ps [49]	

Pokud se podíváme do tab. 2., uvidíme značnou variabilitu časových konstant v řádu od dvou desítek pikosekund po několik stovek. To je způsobeno vlivem mnoha faktorů na přenos energie. Jedním z nich jsou možné stavy RC, které může nabývat (viz. kapitola Reakční centrum). Pro otevřené RC probíhá přenos nejrychleji vzhledem k možným stavům, které může nabývat. Oproti tomu, pokud je primární donor oxidován anebo redukován některý z dvou následujících článků elektronového transportního řetězce, časová konstanta se zvyšuje. Pokud je redukován  $Q_A$ , pak je RC v polouzavřeném stavu a čas přenosu excitonu do RC vzroste o zlomek původní hodnoty. [26, 36, 28, 37] V jiném případě je RC uzavřené a čas přenosu vzroste několikanásobně. [31, 22, 36, 28, 23]

Další vliv má posun absorpčního spektra, protože tak dochází ke vzniku energetické bariéry. Většina absorpce BChl-a nebo BChl-b vázaných v anténních komplexech je silně posunuta do červeného spektra oproti BChl v organických rozpouštědlech a jejich maxima jsou tak v oblasti 870-890 nm. Další posun do oblasti červeného spektra způsobuje snížení teploty. U některých bakterií může posun být nad 900 nm. U bakterií s BChl-b zchlazením na 4 K lze dosáhnout 1040 nm. Pro každý druh záleží na jednotlivých podmínkách. Například absence karotenoidu v LH1 u *Rhodobacter sphaeroides* může nastat posun do modrého spektra. [38]

Mezi další vlivy může patřit například vzdálenost antény od RC, modifikace anténního komplexu navázáním kladných iontů, excitační vlnová délka nebo tvar antény.

## 2 Materiál a metody

Pro měření bylo využito spektroskopických metod. Obecně spektroskopické metody jsou v laboratořích jednou z nejčastěji používaných analytických metod. Tyto metody jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s částicemi hmoty, kterou záření prochází. Důsledkem těchto interakcí jsou změny vlastností elektromagnetického záření jako například intenzity, vlnové délky, směru šíření či rychlosti. Tím lze získat optické spektrum zkoumané látky a určit tak její vlastnosti.

### 2.1 Absorpční spektroskopie

Absorpční spektroskopie je metoda pro získání absorpčního spektra testovaného vzorku na základě měření poměru intenzit dopadajícího  $I_0(\lambda)$  a prošlého  $I(\lambda)$  světla vzorkem. Tím lze získat informace o pohlcování elektromagnetického záření v závislosti na vlnové délce. Množství pohlceného záření se také odvíjí od koncentrace látky v měřeném vzorku. Této vlastnosti se využívá především v chemii k určení neznámé koncentrace známé látky pomocí tzv. kalibrační křivky. Jelikož se takto měří rozpuštěné látky a je nutno odečíst vliv rozpouštědla, jako referenční hodnota  $I_0(\lambda)$  se měří absorbance rozpouštědla.

Pro měření spekter se tak používá spektrofotometr. Jeho základními komponenty a princip jsou následovné. Ze zdroje světla je světlo přivedeno do monochromátoru či na difrakční mřížku, jež slouží k disperzi světla. Dále pokračuje monochromatické světlo nastavitelnou štěrbinou přes vzorek a je zaznamenán detektorem, což může být diodové pole nebo CCD kamera. V tomto případě jde jednopaprskový spektrofotometr, u kterého je nutné

nejdříve změřit referenční vzorek před vzorkem testovacím. Oproti tomu, pokud spektrofotometr obsahuje navíc dělič paprsku, který stejnoměrně rozdělí paprsek na dva, jde o dvoupaprskový typ. Ten umožňuje měřit referenční a testovací vzorek zároveň. Principem této metody je měření intenzity monochromatického světla prošlé vzorkem a dále srovnání s intenzitou světla světelného zdroje. [44]

Ze zmiňovaného poměru naměřených intenzit tak získáme transmitanci  $T$ , jež udává pohlcení záření testovaným vzorkem.

$$T = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (4)$$

Transmitanci lze dále převést na častěji používanou veličinu absorbance  $A$  popsanou jako

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda)cl, \quad (5)$$

kde vztah absorbance a koncové části rovnice je znám jako Lambert-Beerův zákon pro popis absorbance v závislosti na molárním absorpčním koeficientu  $\varepsilon(\lambda)$ , koncentraci  $c$  a tloušťce absorbující vrstvy  $l$ .

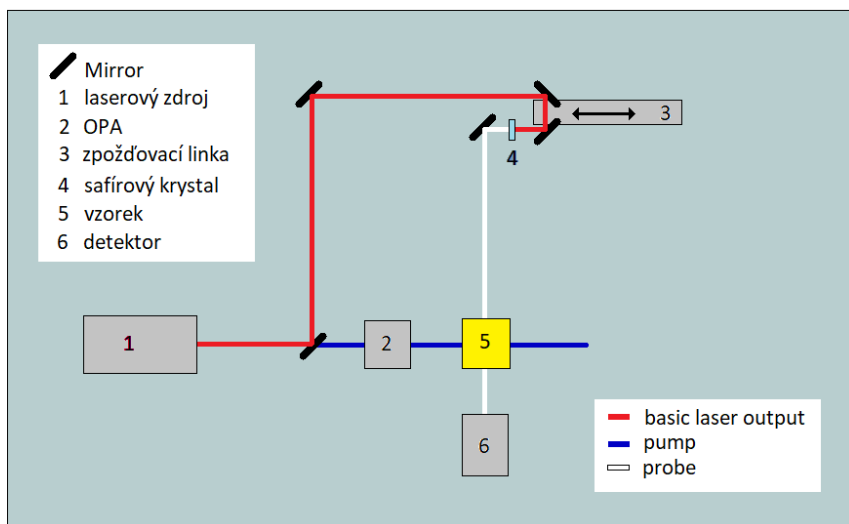
### 2.1.1 Femtosekundová tranzientní absorpční spektroskopie

Pro studium dynamiky mikroskopických procesů, jako jsou excitované stavy, je potřeba použít časově rozlišené spektroskopické metody. Jednou z nich je metoda excitace a sondování *pump-probe*, kdy pomocí krátkých laserových pulzů v řádu 100 fs lze zkoumat excitované stavy molekul a přenos energie mezi nimi. Princip spočívá v tom, že laserový pulz je rozdělen na dva. První je monochromatický pulz *pump*, který dle zvolené vlnové délky excituje určité molekuly vzorku. Druhý je polychromatický sondující pulz *probe*, který ozařuje vzorek se zpožděním díky zpožďovací lince a je tak možno sledovat změny ve vzorku. Dané změny jsou změny v absorpci vzorku a jsou zaznamenány detektorem.

Celá soustava pro měření sestává z několika částí. První část tvoří laser, jehož výstup je přibližně 100 fs monochromatický pulz o střední vlnové délce 800 nm. Poté je pulz rozdělen děličem paprsků na dva. Jeden paprsek, *pump*, je veden do optického parametrického zesilovače (OPA), který dle nastavení dále emituje pulz o požadované vlnové délce. OPA využitím nelineárních jevů umožňuje ze vstupního paprsku generovat spektrálně úzký výstup v rozmezí 240–2500 nm a také zesílit optický signál. Změny vlnové délky je dosaženo součtovými a rozdílovými frekvencemi nebo zdvojením frekvence a zesílení signálu je



dosaženo parametrickým zesílením. Z OPA paprsek pokračuje přes *chopper* a *Berekův kompenzátor* až ke vzorku, za nímž je pump zablokován. Chopper propouští každý druhý pulz a umožňuje zvětšení poměru detekovaného signálu a šumu měřením probe pulzu bez předcházejícího pump pulzu. Berekův kompenzátor slouží k nastavení polarizace světla natočením dvojlomného krystalu, a tedy změny jeho optické osy. Aby se předešlo zatížení měření anizotropními efekty, nastavuje se polarizace mezi paprsky pump a probe na hodnotu *magického úhlu*  $54,7^\circ$ . [44]



Obr. 14.: Zjednodušené schéma pump-probe spektroskopie.

Druhý pulz, probe, je přiveden ke vzorku přes zpoždovací linku a safírový krystal. Zpoždovací linka zajišťuje požadované zpoždění pulzu probe. Safírový krystal mění nelineárními jevy třetího řádu monochromatický pulz na pulz bílého kontinua. Před průchodem vzorku je ještě probe rozdělen na sondující a referenční pulz pro jejichž fokusaci na vzorek jsou použita sférická zrcadla. Jejich použití je nutné k prevenci dodatečného čerpu (*chirp*) vzniklého při generaci bílého kontinua vlivem disperzních jevů. Důsledkem disperzních jevů jsou časově závislé změny frekvence signálu jednotlivých barev, čímž se světlo kratší vlnové délky pohybuje pomaleji než světlo delší vlnové délky. Oba pulzy projdou vzorkem a jsou zaznamenány spektrografem. Nakonec jsou vyhodnoceny změny absorpance vzorku dle vztahu

$$\Delta A(\Delta t, \lambda) = \log \frac{I_{ref}}{I_e} - \log \frac{I_{ref}}{I_n}, \quad (6)$$

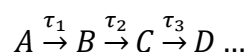
kde  $I_{ref}$  je intenzita referenčního pulzu,  $I_e$  je intenzita pump pulzu před excitačním pulzem a  $I_n$  je intenzita probe bez excitačním pulzu. Druhý člen rovnice má význam korekce z důvodu možných fluktuací intenzity laseru. V ideálním případě je korekční člen roven nule. Tyto data dále závisí na zpoždění  $\Delta t$  mezi pulzy pump a probe a na vlnové délce  $\lambda$  probe pulzu. Data tak tvoří matici absorpcí v závislosti na vlnové délce a zpoždění mezi pulzy, což je 3D graf, a obvykle jsou data prezentovány jako průřez spektrální nebo časovou oblastí. [44]

Výsledné hodnoty signálu absorpance mohou nabývat pozitivních i negativních hodnot případně může docházet k částečnému posunutí vlivem následujících dějů. K pozitivnímu signálu přispívá nejen absorpce základních stavů, ale také absorpce excitovaných stavů (ESA – *excited-state absorption*). Pokud je molekula v excitovaném stavu, pak je schopna v určité spektrální oblasti absorbovat foton navíc, který se energeticky liší od fotonu absorbovaného molekulou v základním stavu. Při průchodu pulzu probe vzorkem tak excitované molekuly absorbují specifické fotony, což se projeví poklesem intenzity probe oproti referenčnímu pulzu v dané části spektra. Tímto způsobem lze identifikovat různé stavy molekul a jejich postupný přechod do základního stavu v čase. [44]

Co se týče možných negativních signálů, jedním je *ground state bleaching* (GSB). Ke GSB dochází, když při referenčním pulzu je absorbováno molekulami v základním stavu více fotonů od referenčního pulzu než od probe pulzu. To vede k naměření větší intenzity probe pulzu než intenzity referenčního pulzu, a tedy k negativnímu signálu. Negativní signál může být také zapříčiněn stimulovanou emisí (SE – *stimulated emission*). Při dopadu fotonu probe pulzu na molekulu, může foton dopadající na molekulu v excitované stavu vyvolat přechod molekuly do základního stavu. S tím dochází k vyzáření fotonu stejným směrem jako foton, který emisi vyvolal. To opět vede k negativnímu signálu jako u GSB. [44]

## 2.2 Globální fitování

Pro vyhodnocení naměřených dat je nejprve nutné data zpracovat metodou globální fitování. v programu DAFit (Pasher Instruments). Výsledkem jsou evolution-associated difference spektra (EADS), která vyjadřují jednotlivá vývojová spektra spojená s časovou konstantou. Podle sekvenčního modelu

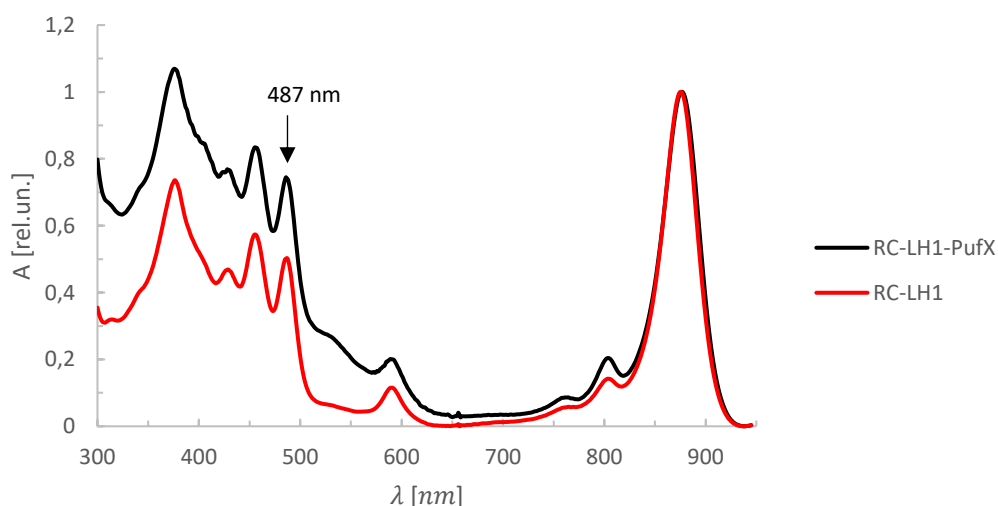


se jednotlivá spektra zkoumaného systému vyvíjí tak, že spektrum A zaniká s časovou konstantou  $\tau_1$  a přechází do spektra B. Spektrum B vzniká s konstantou  $\tau_1$  a zaniká s další časovou konstantou  $\tau_2$ . To platí i pro následující spektra. Navíc jednotlivé časové konstanty umožňují vypočítat například časy přenosů energie  $\tau_{ET}$ . [44]

### 3 Výsledky

#### 3.1 Absorpční spektrum

Na začátku experimentu bylo nutné nejprve změřit absorpční spektrum testovaných komplexů RC-LH1-PufX a RC-LH1, které obsahují karotenoid neurosporen, izolovaných z *R. Sphaeroides*. Naměřená spektra obou vzorků jsou zobrazena v následujícím obrázku.



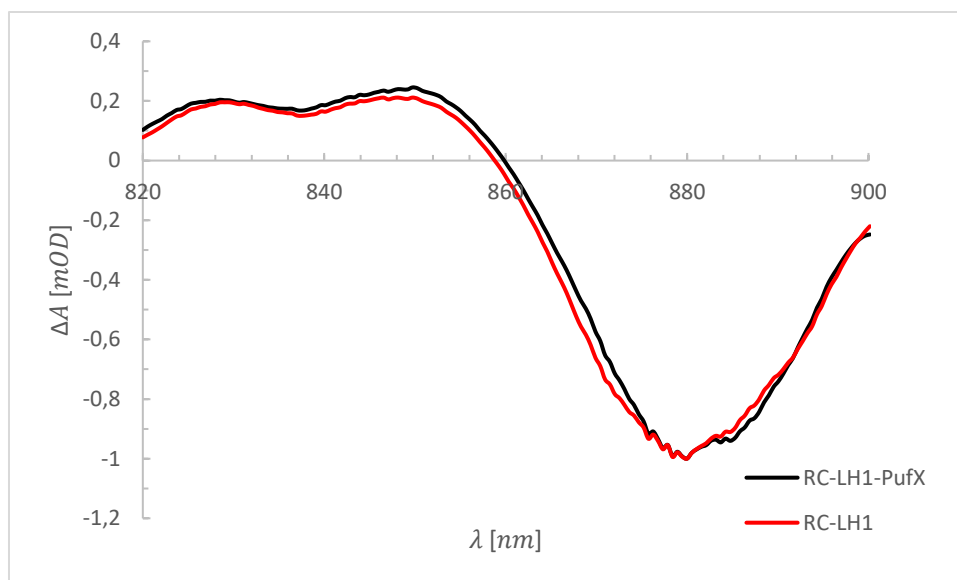
Obr.15.: Absorpční spektrum komplexů RC-LH1-PufX a RC-LH1. Šipka označuje excitační vlnovou délku. Normalizováno na  $Q_y$ .

Vyhodnocením absorpčních spekter můžeme identifikovat několik význačných absorpčních pásů obsažených karotenoidů a BChl-a ve vzorcích. Absorpční spektra obou vzorků mají velmi podobný průběh a téměř totožné vlnové délky všech absorpčních pásů. Liší se pouze míře absorpce. První dva nejvyšší píky obou spekter odpovídají pásům BChl-a, jimiž jsou Soretův pás v modré oblasti spektra o vlnové délce kolem 376 nm a pás  $Q_y$  v červené oblasti kolem 876 nm. Zbývající absorpční pás  $Q_x$  se nachází kolem 590 nm. Pro nás jsou ovšem důležité pásy o vlnových délkách 429 nm, 456 nm

a 487 nm. Ty odpovídají třem karotenoidovým vibračním pásům stavu  $S_2$ . V tomto případě karotenoidu neurosporen. Z těchto tří pásů bylo 487 nm vyhodnoceno jako vhodná excitační vlnová délka pro měření metodou časově rozlišené spektroskopie. Zbývá zmínit dva menší pásy nalevo od  $Q_y$ . První o vlnové délce kolem 760 nm patří bakteriofytinům a zbývající pás kolem 804 nm náleží monomerním BChl-a v RC. Tyto dva pásy jsou tak absorpčním příspěvkem RC.

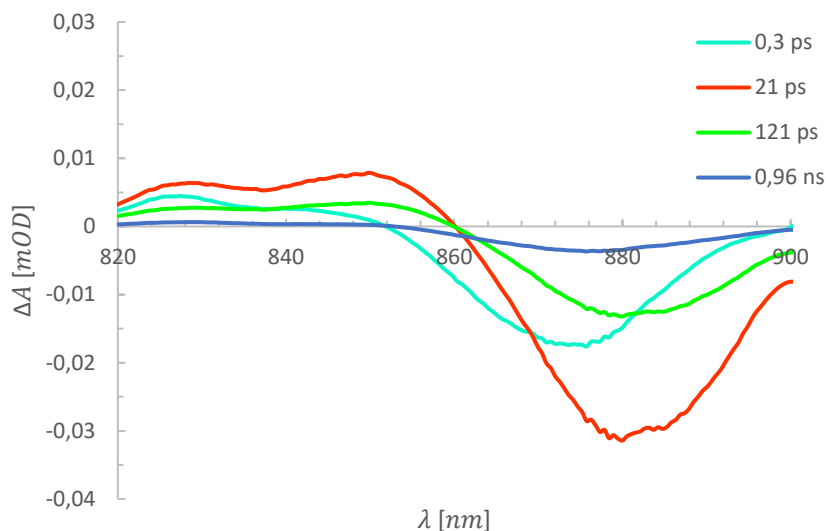
### 3.2 Tranzientní absorpční spektra

Zajímala dynamiku přenosu energie. Pro pozorování dynamiky přenosu energie u komplexů RC-LH1-PufX a RC-LH1 byly oba komplexy excitovány pulzem o vlnové délce 487 nm a následně bylo změřeno časově rozlišené absorpční spektrum v oblasti BChl-a pásu  $Q_y$  (blízká IR část spektra). Nejdříve jsme porovnali tranzientní spektra měřených vzorků po excitaci.



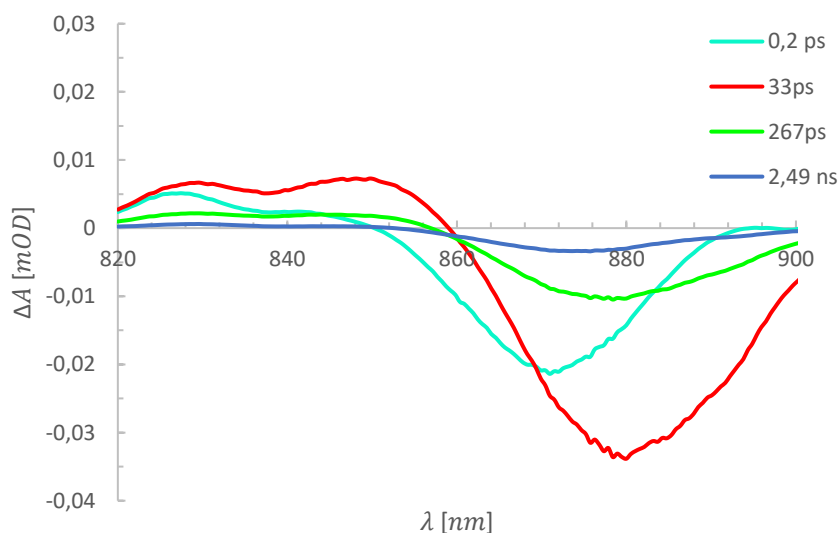
Obr. 16: Tranzientní absorpční spektra zaznamenaná v čase 1,5 ps. Normováno na maximální bleaching.

Samotný průběh tranzientních spekter RC-LH1-PufX a RC-LH1 se od sebe téměř neliší. Nicméně na Obr. 16. vidíme projevy stimulované emise v oblasti kolem 838 nm a GSB v 879 nm. Pro další vyhodnocování bylo provedeno globální fitování naměřených dat a výsledkem jsou následující EADS.



Obr. 17.: EADS pro RC-LH1-PufX.

Z Obr. 17. vidíme, že signál prvního EADS zaniká v čase 0,3 ps, což souvisí s přenosem energie z  $S_2$  na  $S_1$ . Po zániku prvního spektra dochází u signálu dalších spekter k rudému posuvu o 8 nm. To souvisí rychlou excitonovou rovnováhou. [46] Druhé EADS zaniká v čase 21 ps, přičemž dochází k přenosu energie z LH1 do RC. Zbývající EADS postupně zanikají s časy 121 ps a 0,96 ns.



Obr. 18.: EADS pro RC-LH1.

Obr. 18. popisuje vývoj druhého systému s RC-LH1. Všechny EADS mají stejný význam jako u RC-LH1-PufX. Od druhého EADS opět dochází u signálů jednotlivých spekter k rudému posuvu. Oproti prvním systému se všechny EADS systému RC-LH1 liší

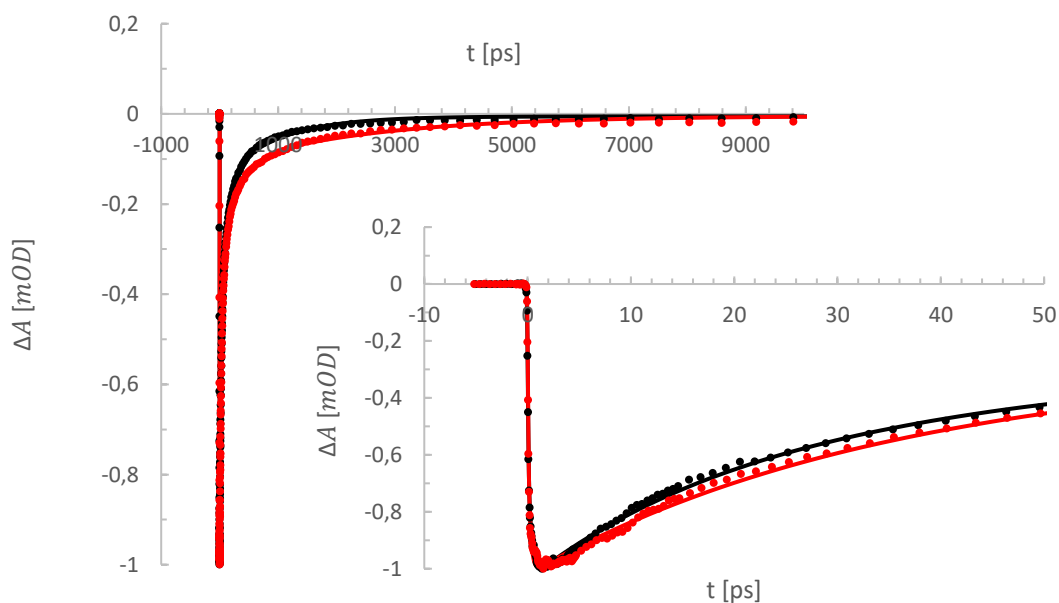
v časových konstantách, s nimiž jednotlivá spektra zanikají. U třetího EADS vidíme, že při přenosu energie do RC došlo jen k přenosu části energie. EADS tak značí relaxaci stavu  $Q_y$ , což zřejmě bude případ i prvního systému. Poslední EADS zaniká v čase 2,49 ns. To poukazuje na jediný proces, který by se mohl týkat stavu  $Q_y$  a trvá v řádu jednotek ns. Tím je konkurenční kanál, kdy  $Q_y$  přechází do základního stavu a také to bude případ i čtvrtého EADS předchozího systému.

Tab. 3.: Porovnání časových konstant systémů RC-LH1-PufX a RC-LH1

RC-LH1-PufX	RC-LH1
0,3 ps	0,2 ps
21 ps	33 ps
121 ps	267 ps
0,96 ns	2,49 ns

### 3.3 Kinetiky

Kinetiky popisují časový průběh zhášení excitovaných stavů a jsou součástí naměřených dat díky časovému rozlišení tranzientních absorpčních spekter.



Obr. 19.: Kinetiky dohasínání stavu  $Q_y$  systému RC-LH1-PufX a RC-LH1. Kinetiky normalizovány vzhledem k minimu.

Na Obr. 19. můžeme vidět srovnání dohasínání stavu  $Q_y$  dvou různých systémů. Stav  $Q_y$  u systému RC-LH1-PufX dohasíná dříve než u RC-LH1. To je v souladu s časovými konstantami uvedenými v tab. 3. Samotný rozdíl mezi jednotlivými kinetikami pro různé systémy není velký.

## 4 Diskuze

Z naměřených dat jsme vyhodnotili, že protein PufX má významný vliv na dynamiku procesu přenosu energie do RC. Díky tomuto proteinu může docházet k dimerizaci vnitřních antén a s tím souvisí více věcí. První z nich je zvýšení účinnosti přenosu z LH1 do RC a tím snížení doby přenosu energie. To je způsobeno tím, že dvě RC mohou zvýšit pravděpodobnost přenosu excitace na primární donor.

Pro zjištění dalších vlivů dimerizace je důležité vědět, v čem se monomerní LH1 liší od dimerizované LH1. Monomerní LH1 tvoří palisádu kolem RC. To by ovšem znamenalo, že z RC by nemohl ubichinol vůbec uniknout. Z tohoto důvodu je v monomerní LH1 zapojeno méně karotenoidových jednotek, což opět vede ke snížení účinnosti přenosu. [40] Některé bakterie s monomerní tak zapojují W protein, který stejně jako PufX umožňuje přerušit monomerní cyklus LH1.

Dalšími bakteriemi tvořící monomerní LH1 jsou například *R. rubrum* nebo *R. palustris*, který nemá monomer uzavřený. Porovnání s jejich časy přenosu také poukazuje na nižší účinnost těchto systémů.

## 5 Závěr

Naším cílem bylo zjistit vliv dimerizace na dynamiku přenosu. Byly změřeny systémy RC-LH1-PufX a RC-LH1. Data byla dále zpracována a vyhodnocena. Časová konstanta rychlosti přenosu pro první systém je 21 ps, což znamená, že druhý systém s 33 ps je méně efektivnější ohledně přenosu energie z LH1 do RC. Dále naměřená EADS nejsou plně uspokojivá pro vyhodnocení celkové dynamiky přenosu LH1-RC, proto by bylo vhodné provést nové měření a zvážit i měření ve VIS pro doplňující informace o chování daných stavů.

## Reference

- [1] Jan Buchar, Jaroslav Drobník, Emil Hadač a kol., *Život*, Mladá fronta Praha, 1987. ISBN: 23-005-87.
- [2] N. A. Campbell, J. B. Reece: *Biologie*. Computer Press a. s., Brno, 2006. ISBN:80-251-1178-4.
- [3] Mike Jones, *BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS*, Department of Biochemistry, School of Medical Sciences University of Bristol, University Walk, Bristol, United Kingdom.
- [4] Blankenship, R.E. and Govindjee, *Photosynthesis. In: The Encyclopedia of Science and Technology*, 10th Edition, Vol. 13, pp. 468-475., McGraw Hill Publishers, New York.
- [5] Takaichi S., Maoka T., Takasaki K., Hanada S., Carotenoids of Gemmatimonas aurantiaca (Gemmatimonadetes): identification of a novel carotenoid, deoxyoscillol 2-rhamnoside, and proposed biosynthetic pathway of oscillol 2,2'-dirhamnoside, *Microbiology*, 2010.
- [6] Noriaki Kishimoto, Yoshimasa Kosako Tatsuo Tano, *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: An acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Current Microbiology* 22, 1–7, 1991.
- [7] Roberta Croce, Rienk van Grondelle, Herbert van Amerongen, Ivo van Stokkum, *Light Harvesting in Photosynthesis*, 2018.
- [8] Rienk van Grondelle, Jan P. Dekker, Tomas Gillbro, Villy Sundström, *Energy transfer and trapping in photosynthesis*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1187, Issue 1, 1994.
- [9] R.J. Cogdell, A.T. Gardiner, A.W. Roszak, C.J. Law, J. Southall, N.W. Isaacs, *Rings, ellipses and horseshoes: how purple bacteria harvest solar energy*, *Photosynth Res.*;81(3):207-214, 2004.
- [10] Kristiane A. Schmidt, Hans-Wilhelm Trissl, *Combined fluorescence and photovoltage studies on chlorosome containing bacteria*, *Photosynthesis Research* 58, 57–70, 1998.



- [11] Hirozo Oh-oka, Shoichiro Kamei, Hiroshi Matsubara, Su Lin, Paula I. van Noort, Robert E. Blankenship, *Transient Absorption Spectroscopy of Energy-Transfer and Trapping Processes in the Reaction Center Complex of Chlorobium tepidum*, J. Phys. Chem. B, 102, 42, 8190–8195, 1998.
- [13] Sieglinde Neerken, Hjalmar P. Permentier, Christof Francke, Thijs J. Aartsma, Jan Amesz, *Excited States and Trapping in Reaction Center Complexes of the Green Sulfur Bacterium Prosthecochloris aestuarii*, Biochemistry, 37, 30, 10792–10797, 1998.
- [14] Yueyong Xin, Jie Pan, Aaron Collins, Su Lin, Robert Blankenship, *Excitation energy transfer and trapping dynamics in the core complex of the filamentous photosynthetic bacterium Roseiflexus castenholzii*. Photosynthesis research, 111, 149-56, 2011.
- [15] Marc G. Müller, Gerhart Drews, Alfred R. Holzwarth, *Excitation transfer and charge separation kinetics in purple bacteria. (1) Picosecond fluorescence of chroma tophores from Rhodobacter*.
- [16] Zivile Katiliene, Evaldas Katilius, Neal W. Woodbury, *Energy trapping and detrapping in reaction center mutants from Rhodobacter sphaeroides*, Biophysical journal, 84(5), 3240-3251, 2003.
- [17] Lucas M. P. Beekman, Frank van Mourik, Michael R. Jones, H. Matthieu Visser, C. Neil Hunter, and Rienk van Grondelle, *Trapping Kinetics in Mutants of the Photosynthetic Purple Bacterium Rhodobacter sphaeroides: Influence of the Charge Separation Rate and Consequences for the Rate-Limiting Step in the Light-Harvesting Process*, Biochemistry, 33 (11), 3143-3147, 1994.
- [18] Fei Ma, Long-Jiang Yu, Zheng-Yu Wang-Otomo, Rienk van Grondelle, *Temperature dependent LHI → RC energy transfer in purple bacteria Tch. Tepidum with shiftable LHI-Qy band: A natural system to investigate thermally activated energy transfer in photosynthesis*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2015
- [19] A. Freiberg, V.I. Godik, T. Pullerits, K. Timpman, *Picosecond dynamics of directed excitation transfer in spectrally heterogeneous light-harvesting antenna of purple bacteria*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 973, Issue 1, 1989.

- [20] A.Yu Borisov, A.M Freiberg, V.I Godik, K.K Rebane, K.E Timpmann, *Kinetics of picosecond bacteriochlorophyll luminescence in vivo as a function of the reaction center state*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 807, Issue 3, 1985.
- [21] Václav Šlouf, Gürkan Keşan, Radek Litvín, David J. K. Swainsbury, Elizabeth C. Martin, C. Neil Hunter, Tomáš Polívka, *Carotenoid to bacteriochlorophyll energy transfer in the RC-LHI-PufX complex from Rhodobacter sphaeroides containing the extended conjugation keto-carotenoid diketospirilloxanthin*, Photosynth Res., 135(1-3):33-43, 2018.
- [22] Hans Kramer, Geurt Deinum, Alastair T. Gardiner, Richard J. Cogdell, Christof Francke, Thijs J. Aartsma, Jan Amesz, *Energy transfer in the photosynthetic antenna system of the purple non-sulfur bacterium Rhodospseudomonas cryptolactis*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 1231, Issue 1, 1995.
- [23] S.R. Beyer, L.Müller, J. Southall, R. J. Cogdell, G.M. Ullmann, J. Köhler, *The open, the closed, and the empty: time-resolved fluorescence spectroscopy and computational analysis of RC-LHI complexes from Rhodospseudomonas palustris*. *The Journal of Physical Chemistry B* 119 (4), 1362-1373, 2015.
- [24] H.-W. Trissl, J. Breton, J. Deprez, A. Dobek, W. Leibl, *Trapping kinetics, annihilation, and quantum yield in the photosynthetic purple bacterium Rps. viridis as revealed by electric measurement of the primary charge separation*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 1015, Issue 2, 1990.
- [25] Kōu Timpmann, Arvi Freiberg, Villy Sundström, *Energy trapping and detrapping in the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas viridis: transfer-to-trap-limited dynamics*. *Chemical Physics*, 194, 275-283, 1995.
- [26] F.G. Zhang, T. Gillbro, R. van Grondelle, V. Sundström, *Dynamics of energy transfer and trapping in the light-harvesting antenna of Rhodospseudomonas viridis*, *Biophysical Journal*, Volume 61, Issue 3, 1992.
- [27] Hjalmar P. Permentier, Sieglinde Neerken, Kristiane A. Schmidt, Jörg Overmann, Jan Amesz, *Energy transfer and charge separation in the purple non-sulfur bacterium Roseospirillum parvum*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 1460, Issues 2–3, 2000.

- [28] Kōu Timpmann, Arvi Freiberg, Valentina I. Godik, *Picosecond kinetics of light excitations in photosynthetic purple bacteria in the temperature range of 300-4 K*, Chemical Physics Letters, Volume 182, Issue 6, 1991.
- [29] I.A. Abdourakhmanov, R.V. Danielius, A.P. Razjivin, *Efficiency of excitation trapping by reaction centres of complex B890 from Chromatium minutissimum*, FEBS Letters, Volume 245, Issues 1-2, 1989.
- [30] A. Freiberg, V.I. Godik, T. Pullerits, K. Timpman, *Picosecond dynamics of directed excitation transfer in spectrally heterogeneous light-harvesting antenna of purple bacteria*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 973, Issue 1, 1989.
- [31] John T.M. Kennis, Thijs J. Aartsma, Jan Amesz, *Energy trapping in the purple sulfur bacteria Chromatium vinosum and Chromatium tepidum*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 1188, Issue 3, 1994.
- [32] Fei Ma, Yukihiro Kimura, Xiao-Hui Zhao, Yi-Shi Wu, Peng Wang, Li-Min Fu, Zheng-Yu Wang, Jian-Ping Zhang, *Excitation Dynamics of Two Spectral Forms of the Core Complexes from Photosynthetic Bacterium Thermochromatium tepidum*, Biophysical Journal Volume 95, 3349–3357, 2008.
- [33] Fei Ma, Long-Jiang Yu, Ruud Hendrikx, Zheng-Yu Wang-Otomo, and Rienk van Grondelle, *Direct Observation of Energy Detrapping in LH1-RC Complex by Two-Dimensional Electronic Spectroscopy*, Journal of the American Chemical Society. 139, 591-594, 2017.
- [34] Fei Ma, Long-Jiang Yu, Zheng-Yu Wang-Otomo, Rienk van Grondelle, *Temperature dependent LH1 → RC energy transfer in purple bacteria Tch. Tepidum with shiftable LH1-Qy band: A natural system to investigate thermally activated energy transfer in photosynthesis*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2015.
- [35] Hjalmar P. Permentier, Sieglinde Neerken, Jörg Overmann, Jan Amesz, *A Bacteriochlorophyll a Antenna Complex from Purple Bacteria Absorbing at 963 nm*, Biochemistry 2001, 40, 5573-5578, 2001.
- [36] Arvi Freiberg, *Coupling of Antennas to Reaction Centers.*, 2004.
- [37] Marc G. Müller, Gerhart Drews, Alfred R. Holzwarth, *Excitation transfer and charge separation kinetics in purple bacteria. (1) Picosecond fluorescence of chroma*

- tophores from Rhodobacter capsulatus wild type*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 1142, Issues 1–2, 1993.
- [38] Karen Bernhardt, Hans-Wilhelm Trissl, *Escape probability and trapping mechanism in purple bacteria: revisited*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 1457, Issues 1–2, 2000.
- [39] Arvi Freiberg, *Coupling of Antennas to Reaction Centers.*, 2004.
- [40] J.D. Olsen, E.C. Martin, C.N. Hunter, *The PufX quinone channel enables the light-harvesting 1 antenna to bind more carotenoids for light collection and photoprotection*, FEBS Lett, 591: 573-580, 2017.
- [41] Melih Şener, Jen Hsin, Leonardo G. Trabuco, Elizabeth Villa, Pu Qian, C. Neil Hunter, Klaus Schulten, *Structural model and excitonic properties of the dimeric RC-LH1-PufX complex from Rhodobacter sphaeroides*. Chem Phys, 2009.
- [42] Wim J. Vredenberg, *A Three-State Model for Energy Trapping and Chlorophyll Fluorescence in Photosystem II Incorporating Radical Pair Recombination*, Biophysical Journal, Volume 79, Issue 1, 2000.
- [43] X. Hu, T. Ritz, A. Damjanović, F. Autenrieth, K. Schulten, *Photosynthetic apparatus of purple bacteria*. Quarterly Reviews of Biophysics, Volume 35, Issue 1, 2002.
- [44] V. Šlouf: *Energy transfer pathways in the intrinsic light harvesting complex of Amphidinium carterae*. Mgr. Thesis, University of South Bohemia, Faculty of Science, Ceske Budejovice, Czech Republic, 2009.
- [45] Robert E. Blankenship, *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, 2nd Edition, 2014.
- [46] C. Neil Hunter, Fevzi Daldal, Marion C. Thurnauer, J. Thomas Beatty, *The Purple Phototrophic Bacteria*, 2009.
- [47] V. Šlouf, M. Fuciman, A. Dulebo, et al. *Carotenoid charge transfer states and their role in energy transfer processes in LH1-RC complexes from aerobic anoxygenic phototrophs*, J Phys Chem B., 117(38):10987-10999, 2013.
- [48] V. Šlouf, P. Chábera, J.D. Olsen, et al. *Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependent alteration of carotenoid excited-state*

- properties*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(22):8570-8575, 2012.
- [49] Dachev, Marko et al., *Unique double concentric ring organization of light harvesting complexes in Gemmatimonas phototrophica*, PLoS biology vol. 15, 2017.
- [50] A.P. Razjivin, R.V. Danielius, R.A. Gadonas, A.Yu. Borisov, A.S. Piskarskas, *The study of excitation transfer between light-harvesting antenna and reaction center in chromatophores from purple bacterium Rhodospirillum rubrum by selective picosecond spectroscopy*, FEBS Letters, 143., 1982
- [51] V. Selyanin, D. Hauruseu, M. Koblížek, *The variability of light-harvesting complexes in aerobic anoxygenic phototrophs*, Photosynth Res., 128(1):35-43, 2016.
- [52] Van Amerongen, Herbert & Valkunas, L. & van Grondelle, Rienk, *Photosynthetic Excitons*, 2000.
- [53] Oleksandr Mikhnenko, *Light Harvesting and Energy Transfer*, Groningen, 2006