

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
FÜÜSIKA INSITUUT

FOTOSÜNTEETILISED EKSITONID
SUPERFÜSIOLOOGILISTEL TEMPERATUURIDEL

Magistritöö

Materjaliteadus

30 EAP

Renata Muru

Juhendajad: PhD Margus Rätsep

Prof Arvi Freiberg

Tartu 2016

Fotosünteesilised eksitonid superfüsioloogilistel temperatuuridel

Magistritöös uuriti katseliselt fotosünteesiliste kvantergastuste – eksitonide – omadusi superfüsioloogilistel temperatuuridel. Konkreetseks uurimisobjektiks olid mesofiilse purpurbakteri fotosünteesilisest membraanist eraldatud valgustneelavad LH2 pigment–valgu kompleksid ja selle B850 pigmendisüsteemis esinevad eksitonid. Katsetulemused ja nende analüüs näitasid, et eksitonsignaal säilib kuni valgu tertsiaarse tugistruktuuri lagunemiseni, mistõttu pigmentide molekulid lahusesse vabanevad. See protsess lõppeb 61 °C juures. Jätkuvalt temperatuuri tõstes näitas ka valgu sekundaarstruktuur teatud lagunemise märke, kuid isegi 90 °C juures oli α -heeliksile vastav signaal hästi mõõdetav. See tõestab valgu sekundaarstruktuuri lausa erakordset termostabiilsust. Üldistatult kinnitavad antud töö tulemused kvantmehaanilise lähenemise asjakohasust bioloogiliste protsesside kirjeldamisel.

Märksõnad: CD-spektroskoopia, valkude termostabiilsus, fotosünteesilised bakterid, fotosünteesilised eksitonid, valgustneelav kompleks II, B850

CERCS: P310 proteiinid, ensüümid; P330 bioenergeetika

Photosynthetic excitons at superphysiological temperatures

This master's thesis explored the properties of photosynthetic quantum excitations (excitons) at superphysiological temperatures using experimental methods. Specifically, the excitons formed in the B850 pigment systems of light-harvesting LH2 pigment-protein complexes were investigated. The LH2 complexes from purple mesophilic bacteria were used. Experimental results and analysis revealed that excitons exist in the complex until the tertiary structure of supporting proteins denatures, because when that happens, pigment molecules get released into the solution. This process takes place until the temperature of 61 °C. In case of continued heating the secondary structure of proteins starts to denature also, but even at 90 °C the signal that corresponds to α -helices was easily measured. This proves that the secondary structure of proteins is extraordinarily thermostable. In general, the results of this thesis support the validity of using the quantum mechanical approach to describe biological processes.

Keywords: CD-spectroscopy, protein thermostability, photosynthetic bacteria, photosynthetic excitons, light-harvesting complex II, B850

CERCS: P310 Proteins, enzymology; P330 Bioenergetics

Sisukord

Fotosünteetilised eksitonid superfüsioloogilistel temperatuuridel	2
Photosynthetic excitons at superphysiological temperatures	3
Sissejuhatus	5
1. Ülevaade valdkonnast	7
1.1 Kvantmehaanika fotosünteesis ning eksitoni mõiste tutvustus	7
1.2 LH2 – valgustneelav kompleks II purpurbakterites	8
2. Metoodika.....	13
2.1 Proovi kirjeldus.....	13
2.2 Mõõtmisvahendid	13
2.3 Ringpolarisatsioonispektroskoopia.....	14
3. Tulemused ja analüüs	17
3.1 Neeldumis- ja CD-spektrite ülevaade toatemperatuuril	17
3.1.1 <i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	17
3.1.2 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	19
3.2 Ringpolarisatsioonispekter erinevatel temperatuuridel	21
3.2.1 <i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	21
3.2.2 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	23
3.2.3 Detailsem temperatuurisõltuvus - <i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	24
3.3 Neeldumisspekter erinevatel temperatuuridel	25
3.3.1 B850 ning B800 erinevatel temperatuuridel	25
Kokkuvõte	28
Kasutatud kirjandus.....	31
Tänuavaldused.....	35
Lisad	36
Lisa 1. Valgu termiline stabiilsus	36

Sissejuhatus

Meie arusaam fotosünteesist on viimase paarisaja aastaga arenenud oluliselt kaugemale teadmistest, et taimed teeb roheliseks klorofüll. Küsimusi jagub aga ka tänapäeva. Üks olulisemaid teemasid, mida järjepidevalt üritatakse lahti mõtestada, on fotosüsteemide kadestamisväärselt suur efektiivsus valgusenergia kasutamisel. Ühelt poolt on nende energeetiliste protsesside mõistmine oluline lihtsalt maailma lahti mõtestamiseks. Teisalt on tegu väga praktilise väljakutsega. Maailm liigub taastuvenergia kasutamise suunas ning meie planeedi esmaseks energiaallikaks on Päike. Mõistmine, kuidas täpselt fotosüntees toimib, aitab aru saada ka sellest, kuidas luua veelgi paremaid materjale ja süsteeme päikeseenergia maksimaalseks kasutamiseks.

Käesolev töö keskendub LH2 (*light-harvesting complex II*, ing. k), fotosünteetiliste purpurbakterite fotosüsteemi olulise komponendi uurimisele. Valgust neelavad LH2 kompleksid on teadlastele kõneainet andnud juba aastakümneid. Üheks põhjuseks on tema hästi teadaolev aatomstruktuur, mis võimaldab detailselt uurida tema struktuuri ja bioloogilise funktsiooni vahelisi seoseid. Tegemist on bioloogias fundamentaalse probleemiga. Lisaks (ja see on antud töö seiskohalt esmatähtis) on LH2 kompleksis krüogeensetel temperatuuridel hästi näha energiatasemete lõhenemine fotoergastuse kollektiivse (eksitoonse) iseloomu tõttu. Eksitonide võimalikkuse üle fotosünteetilistes süsteemides on diskuteeritud juba aastast 1938 [1]. Samas on teadmine, et kvantmehaanika seadused võiksid dikteerida olusid LH2 kompleksides ka toatemperatuuril, olnud visa tulema [2]. Füüsika Instituudi Biofüüsika laboris on fotosünteetiliste eksitonidega tegeletud vähemalt viimased 15 aastat (ülevaateks vt [3]). Sealjuures on näiteks eksitonide olemasolu tõestatud kuni temperatuurideni 263 K [4] ja LH2 Q_y tüüpi eksitontsooni laiust hinnanud K. Timpmann kaasautoritega [5].

Seni vastamata on jäänud aga küsimus, mis saab fotosünteetilistest eksitonidest veelgi kõrgematel temperatuuridel. Eksiton on aine struktuuriga seotud kvantergastus. On selge, et piisavalt kõrgel temperatuuril kaob igasugune aine struktuur, seega ka eksiton. Millisel temperatuuril ja kuidas täpselt see LH2 kompleksis toimub? Vastuse otsimine nendele küsimustele oligi käesoleva töö eesmärgiks. Meie hüpoteesiks oli, et eksitoni säilimine kompleksis on väga tugevalt seotud valgustruktuuri termovastupidavusega.

Uurimistöös kombineeriti kahte spektroskoopilist uurimismeetodit - neeldumis- ja ringpolarisatsioonispektroskoopiat, sest nende abil saab kindlaks teha nii eksitoni olemasolu kui ka uurida valgu struktuuri ja selle muutumist. Ringpolarisatsioonispektroskoopiat

kasutataksegi sageli just valkude struktuuri uurimiseks. Uurimistöös olid kasutusel kahe mesofiilse bakteri *Rhodopseudomonas acidophila* ning *Rhodobacter sphaeroides*'e valgustneelavad kompleksid. Mesofiilsed mikroobid on mikroorganismid, kelle jaoks soodsaim elu- ja kasvutemperatuur on 20 °C kuni 45 °C vahel. Mõõtmisi sooritati kuni proove lagundavate temperatuurideni. Uurimistöös on otstarbekusest lähtuvalt esitatud valik tehtud mõõtmistest ning analüüsitud saadud tulemusi.

1. Ülevaade valdkonnast

1.1 Kvantmehaanika fotosünteesis ning eksitoni mõiste tutvustus

Looduse alusprotsessid molekul- ja aatomtasemel võiksid tähendada kvantmehaaniliste seaduste rakendumist klassikalise füüsika asemel. Samas on bioloogilises maailmas palju kaost, seetõttu on kvantmehaaniliste seaduste aktsepteerimine biomaailmas olnud kohati vaevaline [6], kuid nüüdseks on tehtud suuri edasiminekuid. Näiteks on tõestatud molekulide laine-osake duaalsus [7] ning kvant-tunnelleerumine ensümaatilistes reaktsioonides [8].

Eksiton on algselt puhtkristallilistest süsteemidest pärit mõiste, mis väljendab elektron-auk seotud olekut. Elektroni ergastamisel valguskvandiga liigub see valentstsoonist juhtivustsooni ning moodustab valentstsooni maha jäänud positiivse auguga seotud paari Coloumbi tõmbejõude tõttu. Sellises paaris on ergastatud elektroni energia veidi madalam kui eksitoni tekkimiseta ergastatud elektronil. Eksiton tähistab kollektiivset lokaliseerimata ergastust – sellise mudeli töötas välja Frenkel pea 80 aastat tagasi [9, 10]. See tähendab, et ergastatuks ei saa lugeda ühte aatomit või molekuli vaid energia on jaotunud kogu süsteemile, tekitades energiatasemete lõhestumise. Eksitonid lubavad energia ülekannet ilma laengu ülekandeta.

Bioloogilistes süsteemides on eksitoni mõiste veidi abstraktsem – süsteem, mille peale energia jaotunud on, ei ole lõpmatu. Jagatud ergastuse olulisus fotosünteesilistes süsteemides seisnebki just selles, et eksitoonne ergastus võimaldab energia edasi kandumist ilma laengu edasi andmiseta. Fotosünteesilised eksitonid on hästi demonstreeritavad madalatemperatuursetes bioloogilistes proovides [2]. Toatemperatuuril on peamiselt soojusliikumisest tingitud spektriribade laienemise tõttu nende tuvastamine keerulisem. Enne Mihkel Pajusalu tööd olid eksitonid näidatud toatemperatuuril mõnedes modifitseeritud süsteemides, kuid ka nende seostamine puhtlooduslike objektidega tekitas kõhkclusi [11]. Praeguseks hetkeks on fotosünteesiliste eksitonide olemasolu toatemperatuuril tõestatud ja näidatud on ka nende vastupidavust erinevatele häiritustele. Käesolev töö keskendub just kõrgematele temperatuuridele – eksitonide püsivuse sõltuvusele temperatuurist.

1.2 LH2 – valgustneelav kompleks II purpurbakterites

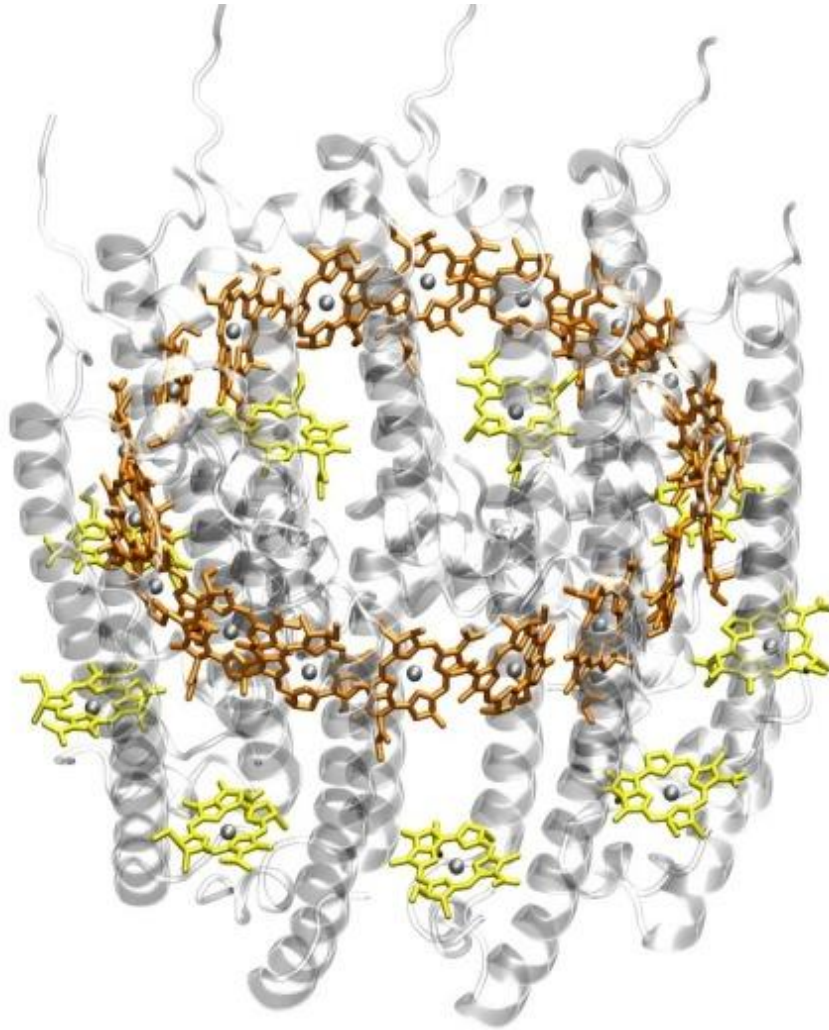
Käesolevas töös uuriti kahe purpurbakteri *Rhodospseudomonas (Rps.) acidophila* ja *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides*'e LH2 komplekse. Nimelt on purpurbakterite fotosüntees väga efektiivne protsess ja arvatakse, et energia neeldub peamiselt valgustneelavates kompleksides eksitonide kujul. Valgustneelavatest kompleksidest liigub ergastusenergia reaktsioonitsentrisse [2, 12]. Purpurbakterites on ka reaktsioonitsentrit ümbritsev valgustneelav kompleks I (LH1), mis sarnaselt LH2-le sisaldab väga regulaarse ehitusega bakteriklorofüll a (BChl a) gruppe, mis tunduvad eksitonide tekkimiseks väga sobilikud [13]. Keskenduti just LH2 uurimisele, sest mõõtmiste käigus selgus, et nendes kompleksides avaldub eksitoonne mõju spektris selgemalt ehk on paremini demonstreeritav. Erilise tähelepanu all olid *Rps. acidophila* proovid, sest selle bakteri fotosünteesiaparati on varasemalt juba väga põhjalikult uuritud [12, 14-16] ja selle struktuur hästi teada [17, 18].

Valgustneelav kompleks LH2 sisaldab kahte BChl a molekulide ringi – üheksast pigmendimolekulist koosnevat B800 ringi ja 18 molekulist koosnevat B850 ringi (vt joonis 1) [19]. Tähistused B800 ning B850 tulenevad BChl-st ja vastavate struktuuride neeldumisspektrite maksimumidest nanomeeterskaalal.

Jooniselt pole seda selgelt näha, kuid *Rps. acidophila* LH2 valgukompleks koosneb üheksast dimeerses alamüksusest, mille kaks transmembraanset α -heeliksi moodustavad kaks kontsentrilist ringi: α - ehk sisemine ring ja β - ehk välimine ring. Nii eristatakse dimeerse alamüksuse B850 ringis α - ja β -tüüpi α -heeliksiga koordineeritud BChl a molekule, samas kui B800 ringi kuuluv üksik BChl a molekul on koordineeritud vaid β -tüüpi α -heeliksiga. Siin on huvitav, et kuna α - ja β -koordineeritud BChl a molekulid on erinevates mikrokeskkondades, on α -koordineeritud molekulidel kõrgem ergastusenergia [20]. Sellest muidu ühesuguste BChl a molekulide lähiümbruse erinevusest johtub ka B800 ja B850 ringi kuuluvaid molekule iseloomustavate spektrite väga erinev kuju ja asukoht LH2 kompleksi spektris.

BChl a molekulidel on käesoleva töö seisukohast neli olulist optilist üleminekut: B_y ja B_x lähilultravioletse valguse piirkonnas, mis moodustavad Soret' riba, Q_x nähtavas alas ning Q_y lähilultrapunasel alas. Eelkõige nendest molekulaarsetest üleminekutest moodustuvad joonisel 2 nähtavad LH2 kompleksi neeldumisspektrid lainepikkuste vahemikus 300–1000 nm. Kolm maksimumi vahemikus 450 nm kuni 550 nm seostuvad karotenoidi molekulidega. Edaspidi

nimetame kogu spektriala vahemikus 300–1000 nm lihtsustatult pigmendi piirkonnaks. Sellest lühematel lainepikkustel neelavad valgus kromofoorid osised – valgus sekundaarstruktuuri määravad peptiidid (180–250 nm), tertsiaarstruktuuri piiritlevad soolasillad (250–300 nm) ning aromaatsed aminohapped (260–300 nm). Seetõttu nimetame edaspidi spektriala 180–300 nm valgus piirkonnaks.

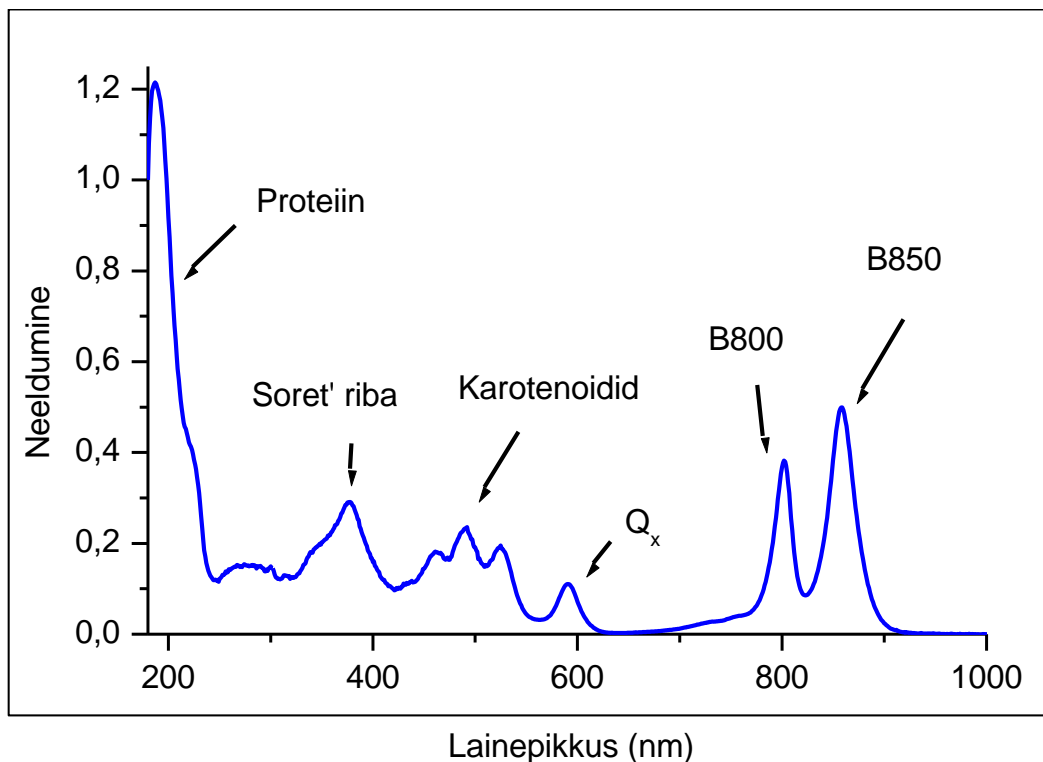


© aegon / Wikimedia Commons / [CC-BY-SA-3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/)

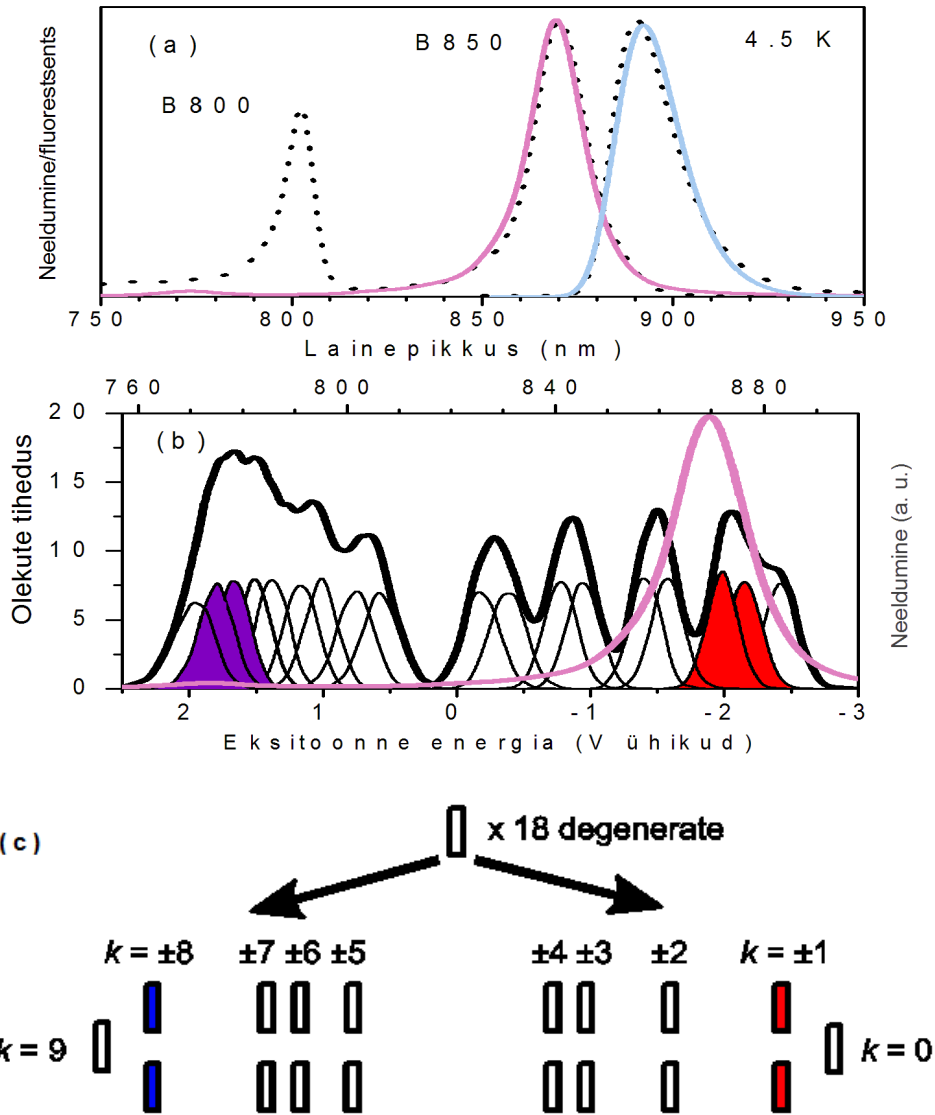
Joonis 1. LH2 struktuur. Kujutatud on kahte ringi (B800 (kollane) ja B850 (pruun)) organiseerunud BChl a molekule ja neid paigas hoidvad valgulisi α -heelikseid. Jooniselt puuduvad selguse huvides karotenoidid, mis omavad tähtsat rolli LH2 struktuuri stabiliseerimisel ja mõjutavad ka tema spektraalseid omadusi, kuid millele käesolevas töös ei keskendutud.

Regulaarses struktuuris nagu LH2 kompleks moodustavad kõik individuaalsed molekulaarsed elektronsiirded, sealhulgas valgus kromfooridega seotud üleminekud, eksitone. See tähendab, et vastavad elektronergastused on delokaliseeritud üle mitme kromfoori. Järgnevalt vaatleme eksitonspektri kujunemist BChl a Q_y siirde näitel B850 ringis (joonis 3). B850 kompleksis

esinevad erinevate BChl a molekulide Q_y üleminekute vahel tugevad eksitoonsed mõjud [2, 21], sest seal asuvad pigmendimolekulid üksteisele väga lähedal – 0,9 nm ühe dimeeri sees ja ligikaudu 1 nm eri dimeeride vahel [17, 18, 22-24]. Eksitonide moodustumisega kaasneb molekulaarsete (lokaliseeritud) energiatasemete lõhenemine. B850 ringis tekib seega 18 eksitoonset energiataset, mis ideaalselt korrastatud ringis kõduvad paari kaupa (v.a. energeetiliselt kõige kõrgem ja kõige madalam tase), nagu näidatud joonisel 3c. Kui molekulaarsed dipoolmomendid asuksid täpselt B850 ringi tasandil, oleks ideaalse ringi korral optiliselt aktiivsed vaid kvantarvudega $k=\pm 1$ ja $k=\pm 8$ tähistatud üleminekud. Tegelikult on dipoolmomendid ringi tasandi suhtes veidi kaldu. Samuti erinevad üksteisest pisut molekulide konformatsioonid ning vahetu ümbrus, mis kõik muutuvad ajas. See dünaamiline mittehomoogeensus häirib üleminekuenergiate paari kaupa kõdumist, nii-öelda määrades spektri laiali ja lisades vähesel määral optilist aktiivsust ka teistele eksitonsiiretele (vt joonis 3b). Lõpptulemusena tekib neeldumisspektrisse kaks laia riba: üks riba on 850 nm juures ja teine, oluliselt nõrgem, kattub B800 neeldumisribaga, olles detekteeritav ainult erivõtteid kasutades [5, 25].



Joonis 2. Toatemperatuuril mõõdetud *Rps. acidophila* LH2 kompleksi neeldumisspekter. Spektri punasest servast alates on näha BChl a Q_y elektronsiiretest tingitud B850 ja B800 ribad maksimumiga vastavalt 858 nm ja 802 nm, Q_x neeldumisriba (592 nm) ning Soret' riba (377 nm). Lainepikkuste vahemikus 450-550 nm on hästi näha kolm karotenoidi S_2 tüüpi vibroonset neeldumisriba. Proteiin neelab valgust alates 300 nanomeetrist.



© Mihkel Pajusalu, vaata [11]; [26]

Joonis 3. LH2 eksitonspektri interpretatsioon. (a) Katkendlik joon tähistab 4,5 K juures mõõdetud *Rps. acidophila* LH2 komplekside neeldumis- ning emissioonispektreid. Roosa joon vastab simuleeritud B850 ringi neeldumisspektrile ja helesinine joon tema simuleeritud emissioonispektrile. Simuleeritud on vaid tihedalt pakitud B850 agregaatide spektreid, jättes välja suhteliselt nõrgalt seostunud B800 pigmentid. Arvutused hõlmasid 2000 erinevat B850 agregaati ja esitatu on üle selle mitthomogeense ansambli keskmistatud tulemus. (b) Roosa joonega on uuesti esitatud arvutatud B850 neeldumine. Must paks joon kujutab sellele vastavat olekute tiheduse jaotusfunktsiooni. Peenikese musta joonega on tähistatud 18 rida, mis vastavad tahvlil (c) näidatud individuaalsetele eksitonolekutele $k=0, \pm 1, \dots, \pm 8, 9$ (alustades lugemist madalama energia poolt), kui tegu oleks perfektselt korrapärase ringiga. Mitthomogeenses ansambelis kirjeldavad individuaalseid olekuid nende jaotusfunktsioonile vastavad ribad. Paneme tähele, et siin on energia skaala antud lähinaabrite paardumisenergia ühikutes (V). (c) Lilla ja punasega on näidatud B850 ringile vastava eksitonriba ülemised $k=\pm 8$ ja alumised $k=\pm 1$ kõdunud seisundid. Ideaalses ringis, kui ülemineku dipoolmomendid paikneksid ringi tasapinnal, oleks optiliselt aktiivsed vaid need seisundid, kusjuures suurem osa dipoolsest jõust oleks kontsentreeritud punasega tähistatud $k=\pm 1$ piirkonda. Tahvlitelt (a) ja (b) näeme, et see valikureegel rakendub suures osas ka reaalsele süsteemidele.

Nagu on selgelt näha joonisel 1, on LH2 kompleksides bakterklorofüllidega seotud eksitonide stabiliseerimisel oluline roll valkudel, kus domineerivad α -heeliksid, mis moodustavad omavahel seondudes tertsiaarseid struktuur. Seega on igati loogiline eksitoni püsivuse uurimisel pöörata tähelepanu valgu struktuurile ja selle muutustele sõltuvalt välistest parameetritest. Antud töös on selleks parameetriks temperatuur. Mõningal määral osalevad kompleksi stabiliseerimises samuti karotenoidid ning nende mõju tuleb edaspidi kindlasti lähemalt uurida.

2. Metoodika

2.1 Proovi kirjeldus

Põhiliseks uurimisobjektiks olid valgustneelavad LH2 kompleksid fotosünteetilisest purpurbakterist *Rps. acidophila*. Nende bakterite fotosünteetisivatest membraanidest sobivate detergentide abil eraldatud kompleksid saadi annetusega Glasgow' ülikoolist (Prof R. Cogdell). Mõõtmiste jaoks lahjendati proove 20 mM TRIS (pH 8) puhvriga ning LH2 komplekside agregeerumise vältimiseks lisati puhvrile 0,1% detergenti LDAO. Karotenoid nendes kompleksides on rodopsiinglükosiid. Võrdluseks ja tulemuste üldistamiseks mõõdeti ka LH2 komplekse, mis olid eraldatud teisest purpurbakterist *Rb. sphaeroides* (Prof N. Hunter'i annetusega Sheffieldi Ülikoolist). Neis kompleksides on natiivsed karotenoidid sferoideen ja sferoidenoon asendatud neurosporeeniga [27]. Enne mõõtmist lahjendati neid proove 20 mM HEPES pH 7,5 puhvriga ja lisati 1% detergenti β -OG.

Mõlemad eelmainitud bakterid on mesofiilsed ehk keskmiselt sooja vajavad organismid. Nende jaoks on parim kasvutemperatuur vahemikus 20 °C kuni 45 °C.

Kvalitatiivselt kirjeldab proovide puhtust teiste, asjasse mittepuutuvate valkude seisukohalt pigmendi (B850) ja valgu (195 nm) neeldumisribade intensiivsuste suhe. See püsis kasutatud proovides standardi piires.

Kõiki proove säilitati enne kasutamist -78 °C juures külmikus. Mõõtmistel kasutati 0,1 ja 1,0 mm optilise teepikkusega Hellma Analytics kvartsküvette, milles oleva proovi temperatuuri mõõdeti ja stabiliseeriti täpsusega 0,3 °C.

2.2 Mõõtmisvahendid

Mõõtmistel kasutati kahte mõõtesüsteemi. Ringpolarisatsiooni- ja neeldumisspektreid mõõdeti Applied Photophysics'i spektrofotomeetriga Chirascan Plus. CD-spektromeetris (ingl k väljendist *circular dichroism*, tõlkes „ringpolarisatsioon“) hoiti proove termostabiliseeritud hoidikus, mis võimaldas teha mõõtmisi temperatuuridel 10–90 °C. Tüüpiliselt kasutati spektrograafi sellist väljundpilu, mis andis kahe nanomeetri laiuse spektririba ja seda skaneeriti ühenanomeetrise sammuga. Vastavalt valitud ksenoonlambile oli mõõtepiirkonnaks 180–1000 nm või 230–1000 nm (osoonivaba Xe-lambiga). Mõõtmisel alates 180 nm tuli nii

lambi, spektromeetri kui ka proovi kambri hapniku eemaldamiseks gaasilist lämmastikku läbi puhuda. Nimelt neelab hapnik UV-kiirgust, takistades mõõtmist ja tekitades osooni, mis kahjustab mõõtesüsteemi ning on väga mürgine ka inimesele.

Parema signaal–müra suhtega neeldumisspektrite saamiseks lähi-infrapunases piirkonnas kasutati Andor Technology Shamrock SR-303i spektrograafi. Nendes mõõtmistes kasutati detektorina Andor Technology CCD kaamerat DV420A-OE, mis piirkonnas 400–1000 nm võimaldas lahutust 0,57 nm ühe piksli kohta. Valgusallikaks oli optilise tagasisidestusega stabiliseeritud 5 W hõõglamp BPS100 (BWTek) koos sobivalt valitud optiliste filtritega.

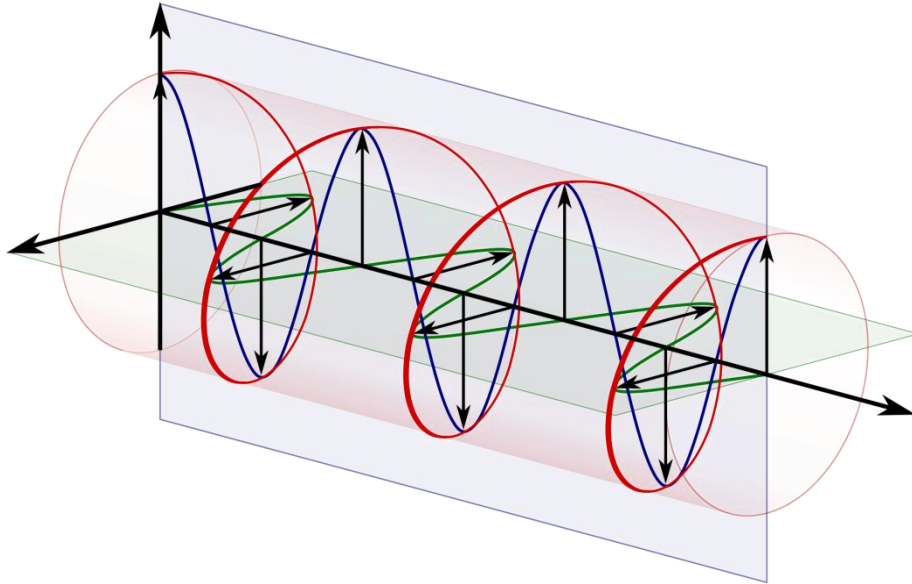
2.3 Ringpolarisatsioonispektroskoopia

Suur osa biomolekulidest on kiraalsed ehk käelised. See tähendab, et nad on asümmeetrilised seesugusel viisil, et nende peegelpilt ei ole kokkulangev algkujundiga. Kiraalsed molekulid on ühtlasi optiliselt aktiivsed, see tähendab, et nad pööravad neid läbiva valguse polarisatsioonitasandit. Ringpolarisatsioonispektroskoopias kasutatakse ringpolariseeritud valgust (vt joonis 4) optiliselt aktiivsete molekulide uurimiseks.

Ringpolarisatsioonispektrofotomeetriga mõõdetakse erinevust parem- ja vasakpidi ringpolariseeritud valguse neeldumise vahel. Monokromaatne lineaarselt polariseeritud valgus juhatakse läbi veerandlaineplaadi, mille peatelg on lineaarselt polariseeritud valguse polarisatsioonitasandi suhtes 45-kraadise nurga all. Chirscan Plus CD-spektrofotomeetril on kasutusel fotoelastne modulaator, mis oma piesoelektrilise ostsilleeriva elemendi abil umbes 50 kHz sageduse juures muudab selle külge kinnitatud räniplaadi veerandlaineplaadiks, tekitades vaheldumisi vasak- ja parempidi ringpolariseeritud valgust. Ostsilleerumise sagedus muutub nii, et see on sobilik parasjagu modulaatorit läbiva valguse ringpolariseerimiseks. Saadud valgus läbib proovi, kus see osaliselt neeldub, ning jõuab detektorisse. Kui neeldumist ei toimu, siis signaal puudub. Kui neeldub rohkem vasakpidi ringpolariseeritud valgust, on signaal positiivne, kui rohkem parempidi ringpolariseeritud valgust, on signaal negatiivne, sest

$$CD = \Delta A(\lambda) = A(\lambda)LCPL - A(\lambda)RCPL,$$

kus λ on lainepikkus, LCPL tähistab vasakpidi ringpolariseeritud valgust ning RCPL tähistab parempidi ringpolariseeritud valgust. Tulemust parandab tarkvara automaatselt keskmise valguse intensiivsuse suhtes selle lainepikkuse juures. [28]



© Dave3457/Wikimedia Commons

Joonis 4. Ringpolariseeritud valgust iseloomustav joonis. Vastuvõtja seisukohast on joonisel kujutatud vasakukäeliselt polariseeritud valgus. Horisontaalne komponent ja vastav polarisatsioonitasand on tähistatud rohelistega, vertikaalne komponent ja vastav tasand on lillat värvi. Horisontaalne komponent on vertikaalsest veerandi lainepikkuse võrra ees, seetõttu saame ka öelda, et tegu on vasakukäeliselt polariseeritud valgusega. Veerandlainepikkuseline vahe tingib selle, et horisontaalse komponendi maksimumile vastab vertikaalse komponendi miinimum ja vastupidi.

Ringpolarisatsioonispektroskoopia on leidnud laialdast kasutust valgu konformatsioonide ja natiivsuse uurimisel. Umbes 2/3 kõikidest valkudest on globulaarsed vees lahustuvad valgud. Neid on seetõttu ka rohkem uuritud ning nende jaoks on koostatud põhjalikud andmebaasid, mille alusel on võimalik spetsiaalseid programme kasutades tuletada erinevate struktuuride osakaalu proovis. Membraanivalgud on üldiselt palju keerulisemad ja vastavad andmebaasid on veel puudulikud. Seetõttu on kvantitatiivne analüüs nende puhul raskendatud, kuid kvalitatiivne analüüs siiski teostatav. Antud töö puhul oli CD-spektroskoopia kasutamise oluliseks plussiks just valgustruktuuri uurimise võimekus koos pigmendispektri uurimisega. CD-spektris tulevad eksitonefektid samuti hästi esile.

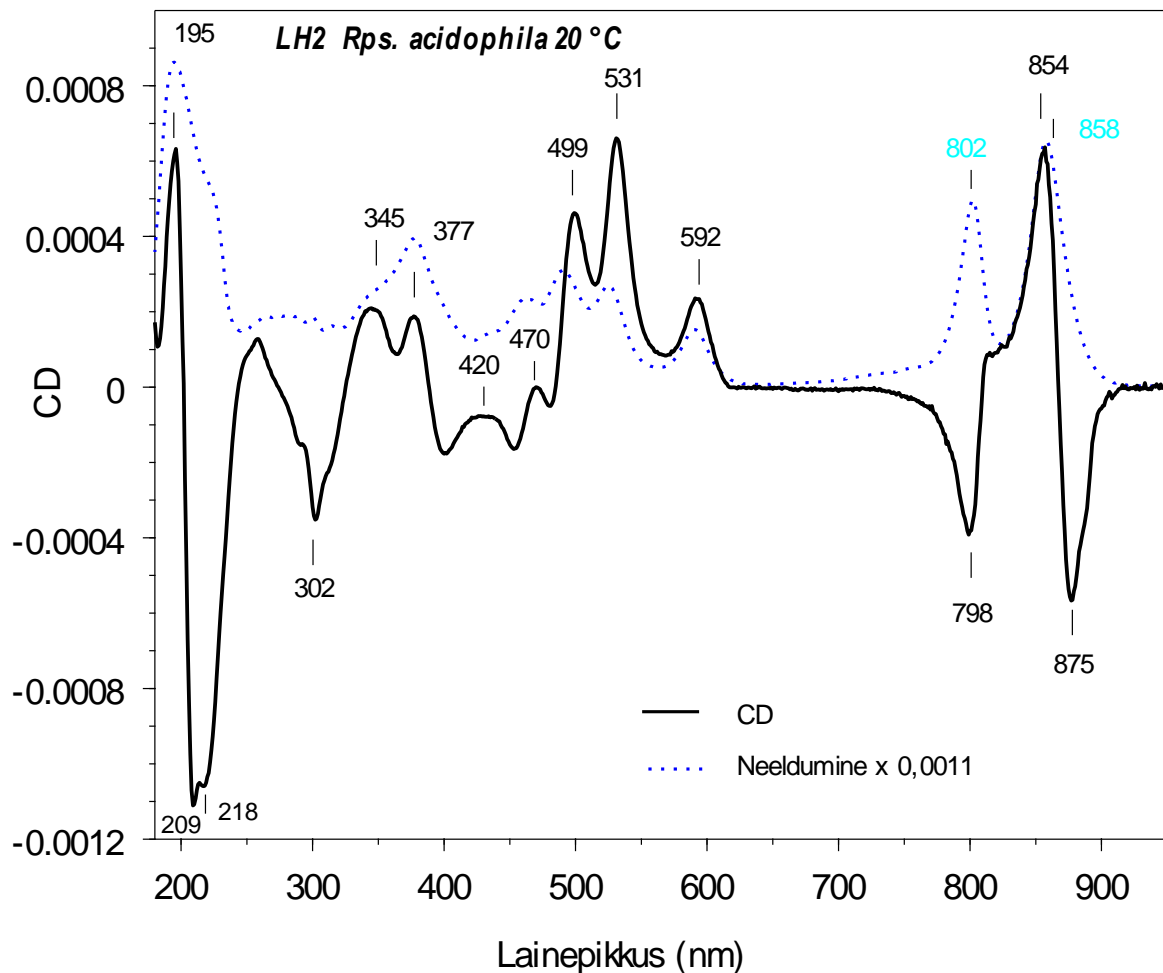
Temperatuurist sõltuvate mõõtmisega seoses tuleb märkida, et need toimusid nõ loomulikus rütmis (ühe spektri mõõtmiseks kulus 7 min, spektrite mõõtmise vahe isegi kuni 10 min) ja

võimalike spektri mõõtmisele kuluvast ajast aeglasemate dünaamiliste efektidega pole arvestatud. Samas, selliseid efekte ka juhtumisi silma ei torganud.

3. Tulemused ja analüüs

3.1 Neeldumis- ja CD-spektrite ülevaade toatemperatuuril

3.1.1 *Rhodospseudomonas acidophila*



Joonis 5. *Rps. acidophila* LH2 neeldumis- ning ringpolarisatsioonispekter toatemperatuuril. Must pidevjoon kujutab ringpolarisatsioonispektrit ning sinine katkendlik joon neeldumisspektrit, mida on samas mõõtkavas esitamiseks korrutatud faktoriga 0,0011. Joonisel olevad numbrid vastavate vertikaaljoonte juures tähistavad spektrijoonte asukohti nanomeetrites.

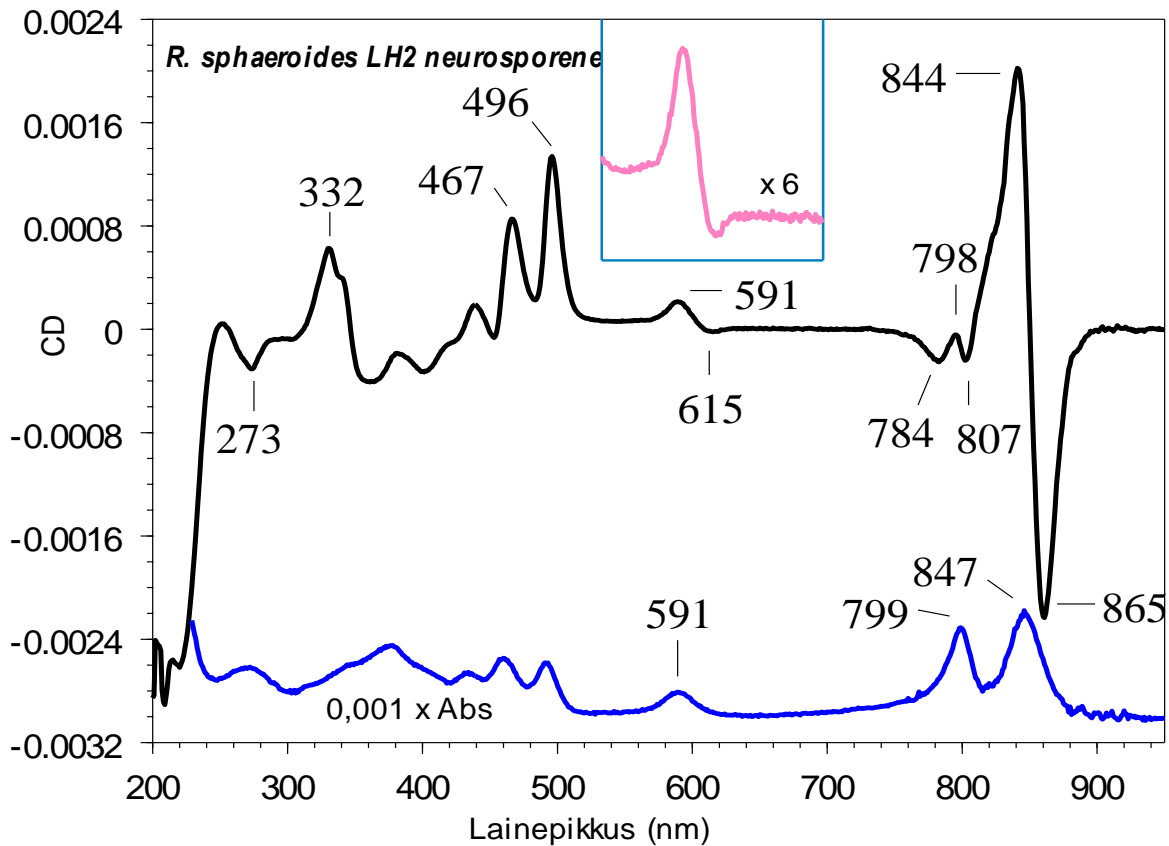
Joonis 5 kujutab *Rps. acidophila* valgustneelava kompleksi LH2 neeldumis- ja ringpolarisatsioonispektrit 20 °C juures ja 180–1000 nanomeetri vahemikus. Neeldumisspektrit on käesolevas töös juba tutvustatud (vaata joonis 2). B850 neeldumisriba juures avaldub eksitonidele väga iseloomulik +/- (s.t positiivne ja negatiivne) ringpolarisatsioonispektri struktuur. 854 nm juures asub positiivne riba ning 875 nm juures negatiivne riba. B800 neeldumisribale vastab ainult tugev negatiivne CD-spektri riba 798 nm

juures, samas kui Q_x -il on vaid positiivne riba 592 nm juures. See CD-spekter on B800 ja B850 piirkonnas heas vastavuses varasemate mõõtmistega. Georgakopoulou kaasautoritega jälgis samuti tüüpilist +/- eksitonstruktuuri B850 juures, kusjuures B800 piirkonnas positiivse CD-komponendi puudumist selgitati B800 ja B850 riba energeetilise kattumisega ning B850 ringi väga tugeva eksitoonse interaktsiooniga [29].

Karotenoidide piirkonna CD-spektris on näha ribad 470, 499 ning 531 nm juures, mis jällegi on kvalitatiivselt sarnased Georgakopoulou grupi eksperimentaalsete ja modelleeritud tulemustega *Rps. acidophila*'s sisalduva karotenoidi rodopsiinglükosiid jaoks [30]. Soret' riba neeldumisalas asub tugev negatiivne CD-riba 302 nm juures ning kaks positiivset riba 345 ja 377 nm juures – need kuuluvad suure tõenäosusega BChl a-le. UV-alas on ringpolarisatsioonipektris näha kaks negatiivset riba 209 nm ja 218 nm juures ning positiivne riba 195 nm kohal, mis tähendab, et proovis on märgatavas koguses valgulisi α -heelikseid [31].

Antud mõõtmine näitab, et B850 ringil avaldub toatemperatuuril tugev eksitonstruktuur; eksitonile iseloomulikud spektristruktuurid esinevad ka karotenoidide alas. Q_x neeldumine on aga tugevalt mõjutatud karotenoididest, s.t toimub osaline spektriribade kattumine, mistõttu pole eksitoni olemasolu tuvastatav. Seega saab öelda, et antud objekt on mõõtmisteks igati sobiv ning õigustatud on ka B850 ringile keskendumine.

3.1.2 *Rhodobacter sphaeroides*



Joonis 6. *Rhodobacter sphaeroides*'e CD- ja neeldumisspekter. All tumesinise joonega on märgitud 1000 x vähendatud neeldumisspekter (nihutatud skaalal allapoole). Must joon näitab CD-spektrit 200–1000 nm. Eraldi väljalõikel on roosa joonega joonistatud kuus korda suurendatud CD-spektri lõik 591 ja 615 nm juures, et välja tuua Q_x -i eksiton. Joonisele märgitud numbrid vastavate vertikaaljoonte juures tähistavad spektrijoonte asukohti nanomeetrites.

Võrdlemise eesmärgil uuriti ka *Rhodobacter sphaeroides*'e neurosporeeniga LH2 kompleksi CD- ja neeldumisspektrit (vt joonis 6). Neeldumisspektris on selgelt eristatavad B850 maksimum 847 nm juures ning B800 maksimum 799 nm kohal. Q_x neeldumisriba on 591 nm juures ning 500 ja 400 nm vahele jääb karotenoidide neeldumine. Soret' riba maksimum joonistub välja 378 nm ümbruses; joonisel ei ole kujutatud allpool 210 nm paiknevat intensiivset valgu neeldumisriba.

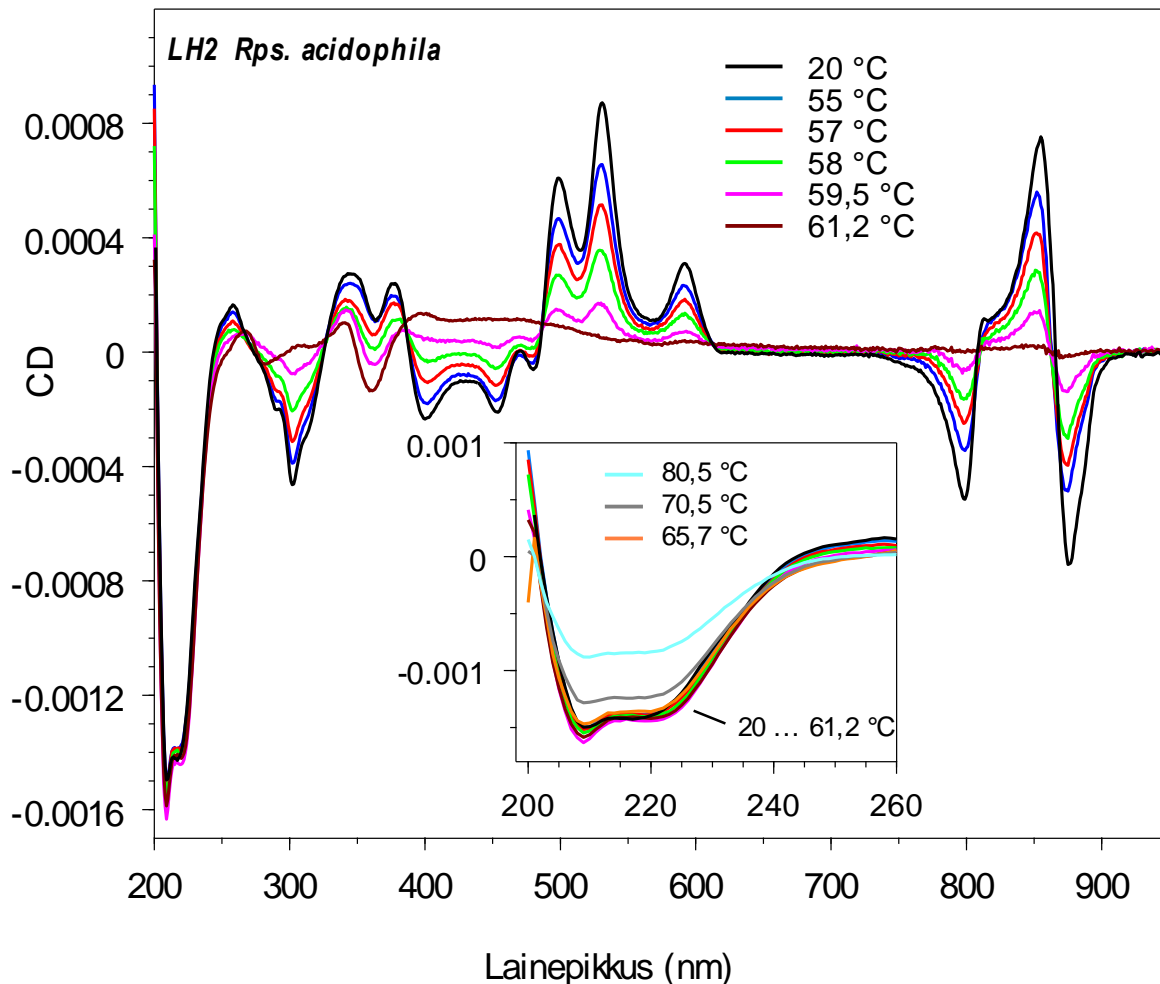
Rb. sphaeroides'e CD-spektris joonistub väga tugevalt välja B850 ringi eksiton miinimumiga 865 nm ning maksimumiga 844 nm. Kergeid eksitoonseid efekte võib märgata ka B800 ringi korral, kus maksimum jääb 798 nm juurde ning eristub kaks miinimumi 807 nm ja 784 nm. Süviti uurimiseks osutusid Q_x eksitoonsed mõjud natuke liiga nõrgaks, kuid erinevalt *Rps*.

acidophila proovist siiski iseloomulik miinimum–maksimum paar avaldus miinimumiga 615 nm ja maksimumiga 591 nm. Selles proovis on karotenoidina kasutatud just neurosporeeni, et vältida karotenoidi neeldumisribade kattumist Q_x ribaga – nimelt neelab neurosporeen väiksematel lainepikkustel kui teised karotenoidid. Karotenoidi osas esinesid tugevad CD-maksimumid 496 ja 467 nm juures. 332 nm võib pidada Soret' piirkonna maksimumiks, kuid 273 nm riba päritolu tuleb veel lähemalt uurida. Valgulise osa intensiivne CD-miinimum kahe tipuga 210 ja 220 nm viitab jällegi α -heeliksiilisele struktuurile, mida oli sellest proovist ka oodata. *Rb. spheroides*'e neeldumis- ja CD-spekter on omavahel heas kooskõlas ja samuti on omavahel võrdlemisi sarnased kahe erineva purpurbakteri LH2 komplekside spektrid.

Antud tulemused kinnitavad, et kahest erinevast purpurbakterist eraldatud LH2 kompleksid on küllaltki sarnased. Pigmentide osas avalduvad mõningased erinevused B800 ringi CD-signaalis. Olulise tulemusena võib välja tuua, et kuna karotenoidide neeldumine enam Q_x riba neeldumisega ei kattunud, tuli ka Q_x spektris välja nõrk eksitonstruktuur, andes alust järeldada, et *Rps. acidophila* mõõtmisel ei avaldu Q_x eksiton spektris just karotenoidi häiriva mõju tõttu.

3.2 Ringpolarisatsioonispekter erinevatel temperatuuridel

3.2.1 *Rhodospseudomonas acidophila*



Joonis 7. *Rps. acidophila* LH2 komplekside ringpolarisatsioonispektrid 20 °C kuni 61,2 °C. Väiksemal lisajoonisel on eraldi välja toodud valgulise osa (180–260 nm) ringpolarisatsioonispekter temperatuurivahemikus 20 °C–80,5 °C. Kujutatud ei ole spektreid 20 °C ja 55 °C vahel, sest seal toimusid väga väikesed muutused.

Käesoleva töö üks põhieesmärke oli uurida valgu ja eksitonide käitumist toatemperatuurist kõrgematel temperatuuridel. *Rps. acidophila* LH2 ringpolarisatsioonispektreid mõõdeti erinevatel temperatuuridel vahemikus 20–80,5 °C (vt joonis 7). LH2 valk (vaata väikest lisajoonist joonisel 7) osutus väga stabiilseks – kuni 65,7 °C vähenes signaali tugevus minimaalselt, 70 °C võib pidada temperatuuriks, mille juures valguline α -heeliks hakkas märkimisväärselt lagunema, kuid ka 80,5 °C juures oli pool signalist veel alles. Säilisid α -heeliksile omased miinimumid 209 ning 218 nm juures, st α -heeliksiline struktuur ise ei lagunenu täielikult nende temperatuuride juures.

See tulemus ei ole ka üllatav, sest näiteks Matsuo kaasautoritega on põhjalikult CD-spektreid analüüsides näidanud, et vastavalt denatureerimise meetoditele jäävad pärast denatureerimist alles erinevad struktuurid ja seda ka erineval määral. Kuumutamise teel denatureerides osa α -heelikseid katkeb, kuid osa säilib. Alles jäävad ka näiteks pöörded, kuid β -lehed lagunevad. Seega ei ole denatureeritud valk kunagi päris puhas nn organiseerumata valk [31].

Valgu sekundaarstruktuuri α -heeliksi stabiilsus on mõistetav ka puhtenergeetilisest seisukohast. Nimelt hinnatakse α -heelikseid koos hoidvate vesiniksidemete tugevuseks ligikaudu 3500-8000 J [32, 33] – see oleneb suuresti ka aminohapetest – samas kui 90 °C juures antakse ainele energiahulk umbes 500 J ($E = k \cdot T$, kus k = Boltzmanni konstant ja T = temperatuur kelvinites).

Vähesed muutused valgulises struktuuris, millega kaasnesid suured muudatused B850 eksitonile, viitavad autori arvates sellele, et LH2 struktuuri stabiilsuse juures mängivad olulist rolli ka karotenoidid, mille tähtsust kompleksi stabiilsena hoidmisel tuleb kindlasti edasi uurida.

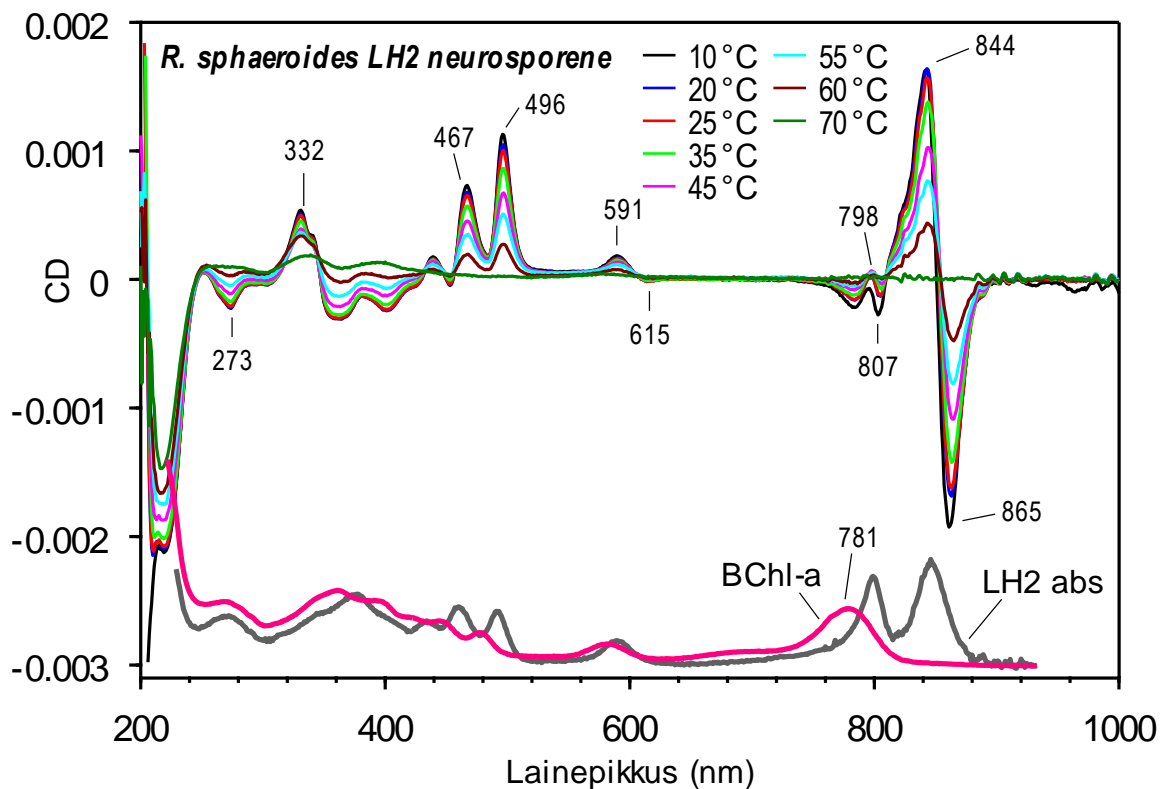
Eksitonile iseloomulik signaal püsis 20 °C ja 50 °C vahel peaaegu muutumatuna (pole joonisel näidatud, sest mõõdetud kõverad langesid praktiliselt kokku), kuid 55 °C ümbruses toimus intensiivsuse järsk vähenemine. CD-signaal kadus temperatuurini 60 °C soojendamisel täielikult. Sarnaselt BChl a pigmentidele käitusid ka karotenoidid – nende signaal kadus spektrist peaaegu täies mahus 61,2 °C kraadini jõudes. Joonisel on kujutatud veel viimane mõõtmine, millel oli näha eksitoni olemasolu, kõrgematel temperatuuridel säilus signaal lisaks valgule veel 300–400 nm piirkonnas. Seda võib pidada vaba BChl a signaaliks.

Jooniselt 7 nähtub, et hoolimata CD-signaali intensiivsuse vähenemisest B850 eksitoni parameetrid (eksitonspektrite asukoht ja lõhenemine) peaaegu ei muutunud. See tulemus näib esmapilgul ootamatu, kuna varasemad uuringud on näidanud eksitonspektrite suhteliselt tugevat temperatuurisõltuvust [4]. Tuleb aga arvestada, et nendes võrdluseks olevates töödes tehti mõõtmised vahemikus 4,5–290 K, st temperatuuri muutused olid kordades suuremad kui käesolevas töös.

Mõõtmistest järeldub, et LH2 kompleksi jaoks kriitilise ~60 °C juures kaasnevad väikeste muutustega valgulises osas väga suured muutused bakterklorofüllide ringidele. Samuti ei ole tegelikult vähemalt selliste temperatuuride juures eksitoni stabiilsus piiratud klorofüllimolekulite omadustega. Kuni ümbritsev struktuur hoiab klorofüllimolekule paigas, esineb ka eksiton

ning efektiivne energiaülekanne. On teada, et eraldiseisev klorofüll a molekul sulab umbes 150-153 °C juures [34]; ümbritsevate struktuuridega saab seda efektiivselt ka kuumuse eest kaitsta. Seega ei ole fotosünteetiliste eksitonide moodustumine võimatu ka oluliselt kõrgematel temperatuuridel kui 70 °C.

3.2.2 *Rhodobacter sphaeroides*

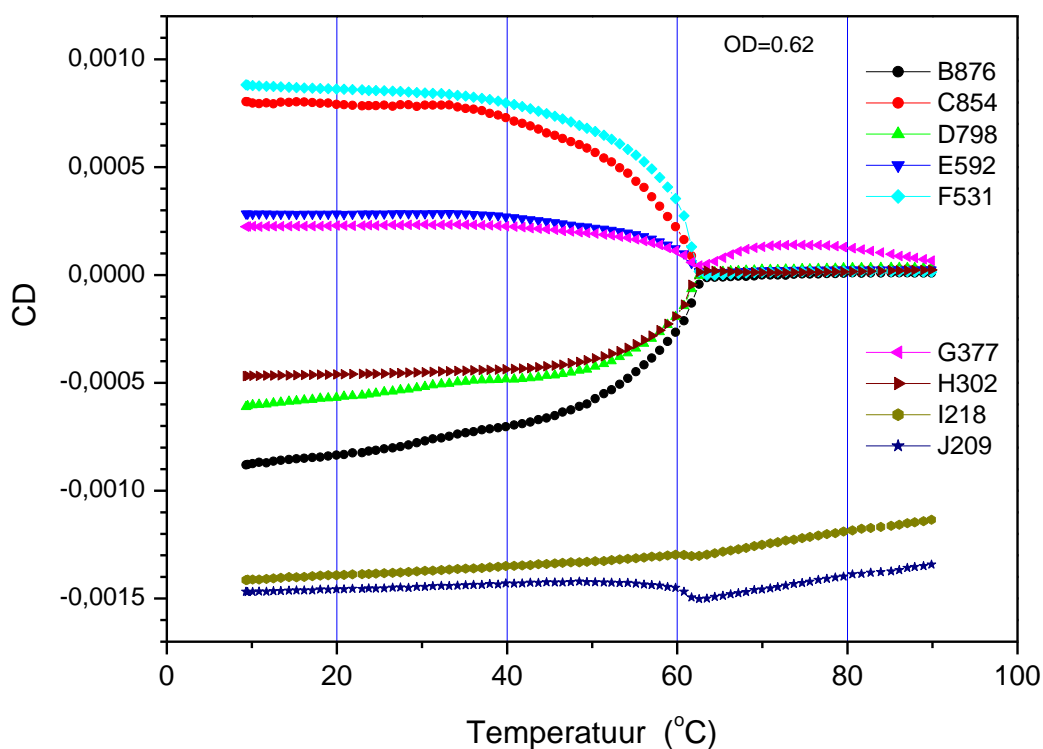


Joonis 8. Neurosporeeniga *Rb. sphaeroides*'e CD-spekter temperatuuridel 10-70 °C. All halli joonega on tähistatud LH2 kompleksi 1000 korda vähendatud neeldumisspekter ning tumeroosaga 90 °C kuumutatud ning seejärel toatemperatuurini jahutatud proovi neeldumisspekter. Viimases on 781 nm juures selgelt näha vaba BChl a neeldumisriba ning LH2 kompleksid on püsivalt lagunened. Spektrijoonte asukohad on näidatud vastavate sirgjoonte juures olevate numbritega nanomeetrites.

Rb. sphaeroides'e LH2 spektri (joonisel 8) muutumine temperatuuri tõstmisel on heas kooskõlas juba *Rps. acidophila* juures nähtuga (võrdle joonisega 7). Kuigi valk on siin temperatuurile natuke tundlikum – selle signaal väheneb märgatavalt juba 45 °C juures, siis eksiton peab kuumutamisele ikkagi üsna pikalt vastu. Veel 60 °C juures on hästi näha B850 ringi eksiton, kuid 70 °C juures on LH2 kompleksid juba niivõrd lagunened, et BChl a on vabanened. Viimast illustreerib hästi ka tumeroosa joon, mis on 90 °C kuumutatud ning

seejärel jahutatud proovi neeldumisspekter. Selgelt eristub neeldumismaksimum 781 nm juures, mis vastab vaba BChl a neeldumisele. Kiirema eksitoni lagunemisega on kooskõlas ka valgulise osa väiksem stabiilsus – siin on valgu signaal vähenenud 1/3 võrra, kui *Rps. acidophila* proovis toimusid minimaalsed muutused. Suuri järeldusi ei saa teha valgu enda kohta, sest selle stabiilsust mõjutavad näiteks nii puhver kui ka kompleksis olevad karotenoidid. Märkimist väärib mõõtmiste käigus selgunud asjaolu, et valgu stabiilsus sõltub teatud määral ka proovi kontsentratsioonist. Käesolevas töös sellele ei keskendutud, kuid edaspidi tuleks sedagi edasi uurida (vt esialgseid tulemusi lisast 1). Autori arvates võib *Rb. sphaeroides*'e LH2 kompleksi väiksem temperatuuritaluvus olla otseselt seotud ka just teistsuguse karotenoidse koostisega.

3.2.3 Detailsem temperatuurisõltuvus - *Rhodopseudomonas acidophila*



Joonis 9. *Rps. acidophila* isoleeritud LH2 komplekside CD-signaali tugevuse sõltuvus temperatuurist valitud lainepikkustel. Igale värvile vastab üks lainepikkus, mis on näidatud joonisel. Proovi temperatuuri tõsteti kiirusega 1 °C/min.

Joonisel 9 on üheksa diskreetse lainepikkuse jaoks kujutatud CD-signaali spektrijoonte amplituudide sõltuvus temperatuurist. Vastavad lainepikkused valiti joonise 5 põhjal nii, et kõik struktuurid oleksid esindatud. Valgule vastavate ribade 209 ja 218 nm, karotenoidile vastava riba 531 nm, B800 riba 798 nm ja B850 ribade 854 ja 876 nm amplituudid vähenevad kergelt 10 ja 40 °C vahel. Soret' ribad 302 nm ja 377 nm ning Q_x riba 592 nm on peaaegu konstantse intensiivsusega.

Kõrgematel temperatuuridel kiireneb CD-signaali vähenemine kõikidel lainepikkustel, v.a valgulises osas. Umbes 62 °C juures toimub mainitud lainepikkustel faasiüleminekule omane ülikiire signaali intensiivsuse langus ning signaal jääb nullilähedaseks, v.a lainepikkusel 377 nm. Selle intensiivsus suureneb uuesti 62 ja 75 °C vahel ja hakkab seejärel uuesti langema, jõudes 90 °C juures peaaegu sama väärtuseni, kui mõõdeti 62 °C juures. Võrreldes seda käitumist CD-spektritega joonisel 7, võib arvata, et tegu on maksimumide nihkumisest tekkinud kunstliku efekti, mitte tõelise käitumisega.

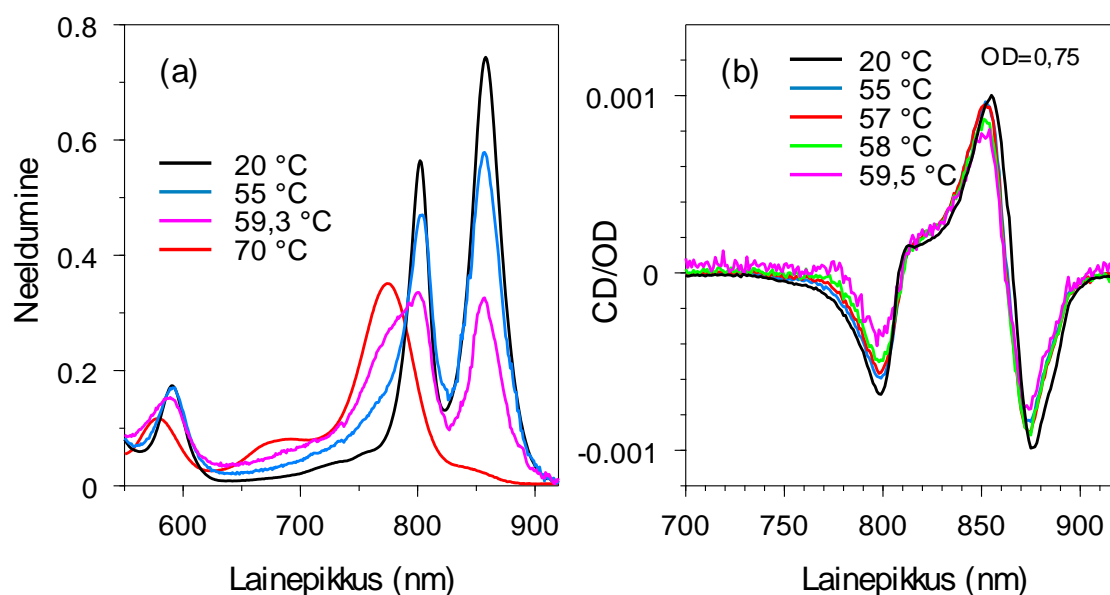
62 °C kõrgematel temperatuuridel jätkub valguliste, 209 ja 218 nm ribade intensiivsuse ühtlane vähenemine kiiremini kui madalamatel temperatuuridel, kuid isegi temperatuuril 90°C on suurem osa valgust pärinevast signaalist alles, mis tõestab valgu sekundaarstruktuuri suurt temperatuurikindlust. Ühtlasi järeldeb veel kord, et valk on oluliselt stabiilsem kui B800 ja B850 pigmentiringid. Joonisel 9 esitatud temperatuurisõltuvus, kus CD-signaal kahaneb ühtlaselt 40–60 °C vahel, näitab, et LH2 pigment-valgu komplekside ansambel on oma stabiilsuse poolest heterogeenne. Võib arvata, et iga üksikut kompleksi iseloomustab kindel komponentideks lagunemise temperatuur. Komplekside kogumi jaoks saab rääkida vaid temperatuuride piirkonnast, kus lagunemine algab ja kus suures osas lõpeb.

3.3 Neeldumisspekter erinevatel temperatuuridel

3.3.1 B850 ning B800 erinevatel temperatuuridel

Samaaegselt ringpolarisatsioonispektriga talletati ka neeldumisspektreid erinevatel temperatuuridel (joonis 10a). Rohkem tähelepanu sai just pikalainelisem spektriosa, sest selles osas avaldusid B800 ja B850 ringidega seotud eksitoonsed efektid. *Rps. acidophila* neeldumisspektri muutused temperatuuri tõustes olid heas kooskõlas CD-mõõtmiste tulemustega.

Spekter muutus marginaalselt 20 °C ja 50 °C vahel. 55 °C alates hakkasid B850 ja B800 ringidele iseloomulikud spektriribad vähenema ning tekkis uus riba 775 nm juurde, 70 °C juures oli see uus riba juba domineeriv ning B850 ning B800 peaaegu kadunud. 775 nm spektririba vastab monomeerse BChl a neeldumisele, seega hakkasid 55 °C juures LH2 bakteriklorofüllide ringid lagunema ning 70 °C olid need peaaegu kadunud. Spektrisse tekkisid ka nõrgad ribad 845 nm ja 695 nm juurde, mis kõige tõenäolisemalt vastavad agregeerunud BChl a-le (845 nm) ning oksüdeerunud BChl a-le (695 nm). 59,3 ja 70 °C juures mõõdetud neeldumisspektrid on komponentideks lahutatuna esitatud joonisel 11. B850 ning B800 ribade vahetel erinevatel temperatuuridel paljastab, et need lagunevad temperatuuri suurenemisel sama kiirusega.



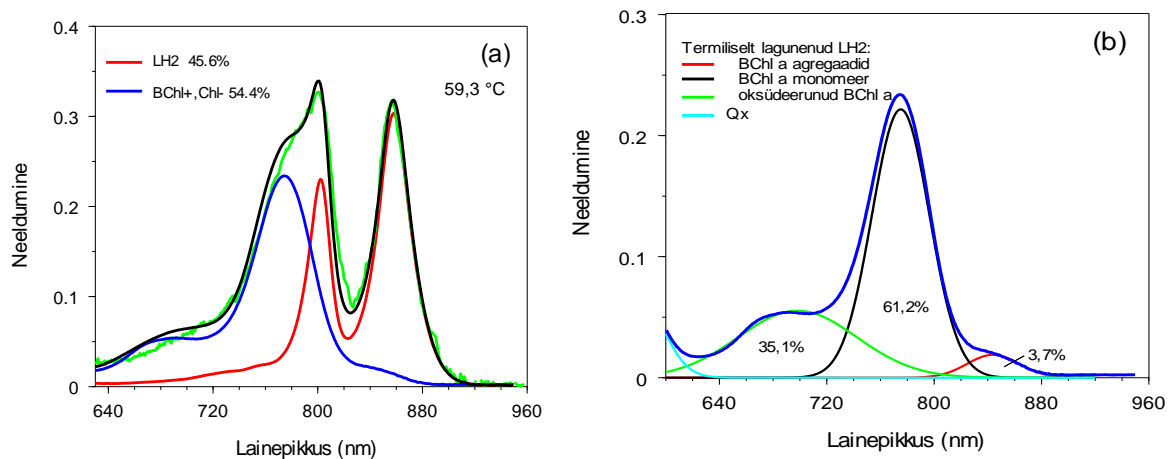
Joonis 10. *Rps. acidophila* neeldumisspekter (a) ja normeeritud ringpolarisatsioonispekter (b) joonistel näidatud temperatuuridel.

Joonisel 10b on näidatud vastavalt neeldumise intensiivsusele normeeritud ringpolarisatsioonispekter infrapunases spektripiirkonnas, mis on juba varasemalt kujutatud normeerimata kujul joonisel 7. Normeeritud spektris on selgelt näha, et signaali amplituud ja kuju on muutunud väga vähe.

Siit järeldub, et järelejäänud LH2 ringstruktuuride omadustes on muutused tühised. Toimunud on ligikaudu kahe-nanomeetrine sininihe nii positiivse 854 nm kui ka negatiivse 875 nm spektririba korral, mis on heas vastavuses B850 neeldumisriba kahenanomeetrise nihkega temperatuuri tõstmisel. Normeeritud ringpolarisatsioonispektrites ilmnevad kerged

amplituudikõikumised on ilmselt tingitud raskustest B850 riba neeldumisspektri mõõtmisel üleminekutemperatuuri, st 60 °C ümbruses.

Seega leiti, et kuni BChl a-d on veel ringstruktuuris, eksiton eksisteerib. See tähendab, et näha ei ole märke vahepealsetest, nn poolenisti organiseerunud ringidest, sest eksitoni kuju ja amplituud säilivad, kui spektrid on neeldumise järgi normeeritud.



Joonis 11. (a) *Rps. acidophila* 59,3 °C juures mõõdetud neeldumisspekter (heleroheline) kaheks komponendiks jaotatuna. Punane joon on temperatuuril 20 °C mõõdetud LH2 neeldumisspekter ning sinine joon tähistab laguprodukti, mis on mõõdetud 70 °C juures. Nende kahe spektrijoone summa on märgitud musta joonena. (b) 70 °C juures mõõdetud laguprodukti (sinine joon) jaotamine kolmeks erinevaks BChl-a vormiks Gaussi kõverate abil. Monomeerse BChl-a neeldumisspekter on esitatud musta joonena, oksüdeerunud BChl-a spekter roheline joonena ning agregeeritud BChl-a-d tähistab punane joon.

Pigmentide neeldumisspektrite kuju (vt. joonis 10a) ja CD-spektrijoonte amplituudide muutused (vt. joonis 9) näitavad, et valkude tertsiaarstruktuur (see määrab α -heeliksi ruumilise struktuuri) hakka olulisel määral lagunema juba 40 °C juures. See on mesofiilsete bakterite elutegevuse ülempiir, sealt kõrgematel temperatuuridel hakkavad BChl a pigmendid üha kiirenevalt ringstruktuurist väljuma ning ~61 °C juures kaob kogu pigmentidele vastav CD-signaali. See tähendab, et ka kõige vastupidavamad kompleksid on oma struktuuri kaotanud.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida fotosünteesiliste eksitonide olemasolu ja nende püsivust superfüsioloogilistel temperatuuridel. Konkreetselt analüüsiti mesofiilse fotosünteesilise bakteri *Rps. acidophila* valgustneelava pigment-valgu kompleksi LH2 B850 pigmendisüsteemis esinevaid eksitone. Eksitonspektrites temperatuuri tõstmise käigus ilmnenu muutusi seostati valgu struktuuri teisendustega.

Uurimisobjekti valikul sai määravaks asjaolu, et *Rps. acidophila* LH2 kompleksi struktuur on tuvastatud peaaegu atomaarse lahutusega. Samuti on see üks kõige paremini uuritud pigment-valgu komplekse. Tulemuste üldistamise huvides ja võrdlemise eesmärgil uuriti lisaks erineva päritoluga mesofiilsest bakterist *Rb. sphaeroides* eraldatud LH2 komplekse.

Uuritava nähtuse – eksitoni – omadustest tulenevalt kasutati otsingutes optilise spektroskoopia meetodeid. Pigment-valgu kompleksis on kaks füüsiliselt eristuvat alamsüsteemi – pigmendi osa ja valgu osa – mis paralleelse uurimise vajadusest lähtudes õnneks ka spektraalselt selgelt eristuvad. Mõningaid raskusi tekitas asjaolu, et valgu ja pigmendi (eelkõige BChl a) elektronspektrite kõige iseloomulikumad alad asuvad üksteisest väga kaugel: valk kaug-UV piirkonnas ja BChl a lähi-IR piirkonnas. Tõmbamaks paralleeli füüsikainstituudis tavapäraselt uuritavate objektidega, on tegu lisandimolekulidega dopeeritud maatriksiga, kus lisandid (BChl a ja karotenoidid) neelavad nähtavat valgust ja maatriksi (valk) omaneeldumine leiab aset kaugel UV-s. Niivõrd laia spektriala (180–1000 nm) hõlmamiseks sobivad vaid vähesed meetodid, millest käesoleval juhul oli peale tavapärase neeldumisspektroskoopia kättesaadav CD-spektroskoopia. Tulemused kinnitavad, et see meetodiline valik oli antud teema seisukohalt ka optimaalne, olles teostuselt suhteliselt lihtne, samas sisult piisavalt informatiivne.

Uurimistöö viis järgmiste oluliste tulemusteni:

- B850 pigmendisüsteemi eksiton, mis on seotud BChl a molekuli Q_y tüüpi elektronsiirdega, on jälgitav seni, kuni püsib pigment-valgu kompleksi tertsiarne (kolmandat järku) struktuur. Mingeid eksitoni füüsikalisest olemusest lähtuvaid põhjusi eksitoni lagunemiseks ei tuvastatud. Selles (ja vaid selles) mõttes on fotosünteesiline eksiton valgu funktsioon.
- Eksitoni parameetrid (otsustades neeldumisspektris jälgitava eksitonspektri asukoha ja CD-spektris jälgitava eksitonlõhenemise järgi) temperatuuri tõstmise käigus

märkimisväärselt ei muutu. Pealiskaudsel kaalumisel ja eelnevate temperatuurisõltuvuste uurimiste tulemuste valguses võib see järeldus näida vastuoluline. Põhjalikum analüüs aga näitab, et nii peabki olema. Nimelt toimusid võrdluses kasutatud mõõtmised temperatuurivahemikus 4,5–290 K, st temperatuur nendes katsetes muutus ligi 65 korda. Käesolevas töös aga toimetati temperatuuride vahemikus 20–90 °C, millele termodünaamilisel skaalal vastab kõigest 1,24-kordne temperatuuri muutus ($\sim 363/293=1,24$).

- Pigment-valgu komplekside ansambel on oma stabiilsusomadustelt heterogeenne. Ehkki tõenäoliselt igat kompleksi iseloomustab kindel lagunemistemperatuur, saab komplekside ansambli puhul rääkida vaid temperatuurivahemikust, kus lagunemine algab ja kus valdavalt lõpeb.
- Pigmentide neeldumisspektri kuju ja CD-spektri ribade intensiivsuse languse järgi otsustades hakkab kõige labiilsemate valkude tertsiaarstruktuur lagunema juba ~ 40 °C juures, s.o alates mesofiilsete bakterite elutegevuse ülemisest temperatuuripiirist. Sealt edasi hakkavad BChl a (samuti karotenoidi) molekulid nähtavalt ringstruktuurist vabanema ning ~ 61 °C juures kaob eksitonsignaal sootuks. Sellest saab järeldada, et alates 61 °C on ka kõige nn paremas vormis olevad kompleksid oma tertsiaarstruktuuri kaotanud.
- Samal ajal toimusid valgu sekundaarstruktuuri iseloomustavas spektris vaid väikesed muutused ning α -heeliksile vastav spektrikuju oli isegi veel 90 °C juures (mis oli katse-tehniliselt maksimaalne meile kättesaadav temperatuur) hästi näha. Need katsed tõestavad valgu sekundaarstruktuuri suurt temperatuuripüsivust, mis on hästi põhjendatav neid struktuure siduvate vesiniksidemete suhteliselt kõrge energiaga (võrreldes keskmise termilise energiaga aktuaalsetel temperatuuridel).

Kahest erinevast fotosünteesilisest bakterist (*Rps. acidophila*, *Rb. sphaeroides*) pärit olevad LH2 kompleksid käitusid sarnaselt.

Selle põhjal joonistub välja LH2 kompleksi termilise käitumise järgmine kvalitatiivne füüsikaline pilt. Kompleksid on valgu esimest (millele vastab valguahelate primaarstruktuur ehk aminohapete valguspetsiifiline järjestus), teist (mida siin kirjeldab eelkõige α -heeliks) ja kolmandat (mis määrab α -heeliksrite ruumilise struktuuri) järku organisatsiooni suhtes enamasti stabiilsed kuni temperatuurini ~ 61 °C. Edasine temperatuuri tõstmine lõhub tertsiaarstruktuuri, vabastades ümbritsevasse vesilahusesse kõik valguahelate vahel paiknenud pigmendimolekulid, nii bakteriklorofüllid kui ka

karotenoidid. Temperatuur ~61 °C tähistab seega fotosünteetilise eksitoni füüsilise eksistentsi lõppu nendes kompleksides. Valgu sekundaarstruktuur on sellel temperatuuril veel suuremas osas intaktne. Valgu veelgi tõsisem denatureerumine, mis seisneb sekundaarstruktuuri lagunemises ja vastava spektri intensiivsuse olulises vähenemises, ilmneb CD-spektrites alates 70 °C. See protsess ei jõua nähtavalt lõpuni ka veel katsetes kasutatud piirtemperatuuril 90 °C, kus α -heeliksile iseloomulik CD-spektri struktuur on veel selgelt jälgitav.

Töö käigus tõstatis ka rida küsimusi, mis väärivad edaspidist uurimist:

- Töös uuritud membraanvalgud asusid mittefüsioloogilistes *in vitro* tingimustes. Õigem oleks *in vivo* olukord, kus objektid paikneksid loomulikus membraanis ümbritsetuna teistest valkudest. Esiolgu oli siiski otstarbekas sellist komplitseeritud keskkonda vältida, kuid tulevikus tuleks seda veelgi kaalukama informatsiooni hankimiseks tingimata teha.
- Karotenoidid jäid selles töös väärilise tähelepanuta. Biokeemilistest uuringutest on teada karotenoidide suur tähtsus LH2 komplekside stabiliseerimisel. Seda arvestades planeeritakse Biofüüsika laboris edaspidi selle teema juurde tagasi tulla, kasutades erineva karotenoidikoostisega mutantseid komplekse.
- LH2 on vaid üks – olgugi, et väga oluline – paljudest fotosünteetilistest valgustkoguvatest kompleksidest. Üldistatult tuleb LH2 kompleksi siin käsitleda kui ühte näidet fotosünteetilisi eksitone toetavast bioloogilisest tugistruktuurist. Edaspidi kavatseb Biofüüsika labor oma objektide ringi laiendada, hõlmates ka taimse päritoluga komplekse.

Teadaolevalt on see esimene sarnase ülesandepüstitusega uurimus. Töö on baasteaduslik, kuid selles võib näha ka praktilist perspektiivi. Nimelt uuritakse laias maailmas üsna intensiivselt fotosünteetiliste pigment-valkude võimalikke rakendusi molekulaarelektronikas. Selle juures on pigment-valgu komplekside termiline stabiilsus esmatähtis küsimus. Valkude säilimine kõrgendatud temperatuuride juures võiks olla oluline samuti kaasajal järjest aktuaalsemaks muutuva kliima soojenemise ning sellega kaasneva biosfääri muutuste kontekstis.

Kasutatud kirjandus

- [1] J. Franck, E. Teller, Migration and photochemical action of excitation energy in crystals, *J. Chem. Phys.*, 6 (1938) 861-872.
- [2] H. van Amerongen, L. Valkunas, R. van Grondelle, *Photosynthetic Excitons*, World Scientific, Singapore, 2000.
- [3] A. Freiberg, G. Trinkunas, Unraveling the hidden nature of antenna excitations, in: A. Laisk, Nedbal, L., Govindjee (Ed.) *Photosynthesis in Silico: Understanding Complexity from Molecules to Ecosystems*, Springer, 2009, pp. 55-82.
- [4] M. Pajusalu, M. Rätsep, G. Trinkunas, A. Freiberg, Davydov Splitting of Excitons in Cyclic Bacteriochlorophyll *a* Nanoaggregates of Bacterial Light-Harvesting Complexes between 4.5 and 263 K, *ChemPhysChem*, 12 (2011) 634-644.
- [5] K. Timpmann, G. Trinkunas, J.D. Olsen, C.N. Hunter, A. Freiberg, Bandwidth of excitons in LH2 bacterial antenna chromoproteins, *Chem. Phys. Lett.*, 398 (2004) 384-388.
- [6] H.C. Longuet-Higgins, Quantum mechanics and biology, *Biophysical Journal*, 2 (1962) 207.
- [7] L. Hackermüller, Uttenthaler, S., Hornberger, K., Reiger, E., Brezger, B., Zeilinger, A., Arndt, M., Wave nature of biomolecules and fluorofullerenes, *Physical Review Letters*, 9 (2003) 090408.
- [8] Y. Cha, Murray, C. J., Klinman, J. P., Hydrogen tunneling in enzyme reactions, *Science*, 243 (1989) 1325-1330.
- [9] A.W. Frenkel, *Recollections*, *Photosynth. Res.*, 35 (1993) 103-116.
- [10] J. Frenkel, On the transformation of light into heat in solids. II, *Physical Review Letters*, 37 (1931).
- [11] M. Pajusalu, *Localized Photosynthetic Excitons*, in: Institute of Physics, University of Tartu, 2014.
- [12] R.J. Cogdell, A. Gall, J. Köhler, The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes, *Quart. Rev. Biophys.*, 39 (2006) 227-324.

- [13] R.E. Blankenship, M.T. Madigan, C.E. Bauer, Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, in: . (Ed.), Kluwer, Dordrecht, 2004.
- [14] X. Hu, T. Ritz, A. Damjanovic, F. Autenrieth, K. Schulten, Photosynthetic apparatus of purple bacteria, *Quart. Rev. Biophys.*, 35 (2002) 1-62.
- [15] H. Sumi, Bacterial photosynthesis begins with quantum-mechanical coherence, *The Chemical Record*, 1 (2001) 480-493.
- [16] V. Sundström, T. Pullerits, R. van Grondelle, Photosynthetic light-harvesting: Reconciling dynamics and structure of purple bacterial LH2 reveals function of photosynthetic unit, *J. Phys. Chem. B*, 103 (1999) 2327-2346.
- [17] M.Z. Papiz, S.M. Prince, T. Howard, R.J. Cogdell, N.W. Isaacs, The structure and thermal motion of the B800-850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution at 100 K: New structural features and functionally relevant motions, *J. Mol. Biol.*, 326 (2003) 1523-1538.
- [18] G. McDermott, S.M. Prince, A.A. Freer, A.M. Hawthornthwaite-Lawless, M.Z. Papiz, R.J. Cogdell, N.W. Isaacs, Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria, *Nature*, 374 (1995) 517-521.
- [19] T. Walz, S.J. Jamieson, C.M. Bowers, P.A. Bullough, C.N. Hunter, Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Å, LH1 and RC-LH1 at 25 Å, *J. Mol. Biol.*, 282 (1998) 833-845.
- [20] V. Liuolia, L. Valkunas, R. van Grondelle, Excitons in dimerized chains, *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 7343-7349.
- [21] G.D. Scholes, G. Rumbles, Excitons in nanoscale systems, *Nature Materials*, 5 (2006) 683-693.
- [22] B.P. Krueger, Scholes, G. D, Fleming, G. R., Calculation of couplings and energy-transfer pathways between the pigments of lh2 by the ab initio transition density cube method, *Journal of Physical Chemistry B*, 102 (1998) 5378-5386.
- [23] A. Freer, S. Prince, K. Sauer, M. Papiz, A. Hawthornthwaite-Lawless, G. McDermott, R. Cogdell, N.W. Isaacs, Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna

complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*, *Structure* (London), 4 (1996) 449-462.

[24] S. Jang, S.E. Dempster, R.J. Silbey, Characterization of the static disorder in the B850 of LH2, *J. Phys. Chem. B*, 2001 (2001) 6655-6665.

[25] G. Trinkunas, A. Freiberg, A disordered polaron model for polarized fluorescence excitation spectra of LH1 and LH2 bacteriochlorophyll antenna aggregates, *J. Luminescence*, 119-120 (2006) 105-110.

[26] A. Freiberg, M. Pajusalu, M. Rätsep, Excitons in Intact Cells of Photosynthetic Bacteria, *J. Phys. Chem. B*, 117 (2013) 11007-11014.

[27] M.R. Jones, G.J.S. Fowler, L.C.D. Gibson, G.G. Grief, J.D. Olsen, W. Crielaard, C.N. Hunter, Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-center, LH1, and LH2 genes, *Mol. Microbiol.*, 6 (1992) 1173-1184.

[28] Circular Dichroism (CD) Spectroscopy, *Applied Photophysics*, <https://www.photophysics.com/resources/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy>, 2015.

[29] S. Georgakopoulou, R.N. Frese, E. Johnson, C. Koolhaas, R.J. Cogdell, R. van Grondelle, G. van der Zwan, Absorption and CD Spectroscopy and Modeling of Various LH2 Complexes from Purple Bacteria, *Biophys. J.*, 82 (2002) 2184-2197.

[30] S. Georgakopoulou, R. van Grondelle, G. van der Zwan, Circular Dichroism of Carotenoids in Bacterial Light-Harvesting Complexes: Experiments and Modeling, *Biophys. J.*, 87 (2004) 3010-3022.

[31] K. Matsuo, Y. Sakurada, R. Yonehara, M. Kataoka, K. Gekko, Secondary-Structure Analysis of Denatured Proteins by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy, *Biophys. J.*, 92 (2007) 4088-4096.

[32] S.M. J. M. Scholtz, R. L. Baldwin, E. J. York, J. M. Stewart, M. Santoro, D. W. Bolen, Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88 (1991) 2854-2858.

[33] B.H. An-Suei Yang, Free energy determinants of secondary structure formation: I. α -helices., *Journal of Molecular Biology*, 252 (1995) 351-365.

[34] <http://www.scbt.com/datasheet-214684-chlorophyll-a.html>, SCBT.

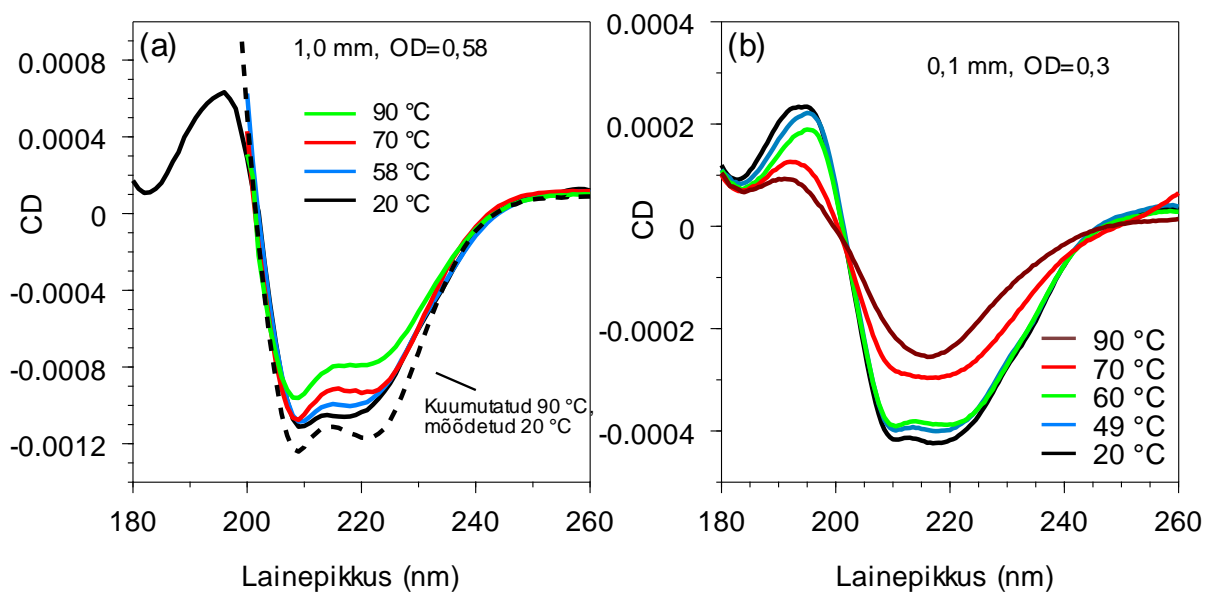
Tänuavaldused

Sügavad tänuavaldused juhendajatele Margus Rätsep'ile ja Arvi Freiberg'ile, kes väsimatult aitasid kaasa antud töö valmimisele.

Lisad

Lisa 1. Valgu termiline stabiilsus

Mõneti üllatusena selgus, et valgu stabiilsus sõltub olulisel määral valgus kontsentratsioonist. Joonisel 12 on kujutatud *Rps. acidophila* isoleeritud LH2 valgulise osa CD spekter erinevatel temperatuuridel optilise tihedusega OD=0,58 1-mm küvetis ning optilise tihedusega OD=0,3 õhemas, 0,1-mm küvetis. Hetkel on ebaselge täpne kontsentratsiooni mõju stabiilsusele ning seda tuleb edasi uurida.



Joonis 12. *Rps. acidophila* isoleeritud LH2 kompleksi valgulise osa CD spekter erinevatel temperatuuridel. (a) OD=0,58 ning mõõdeti 1 mm küvetis. Katkendliku joonega on tähistatud objekt, mis mõõdeti 20 °C juures pärast 90 °C kuumutamist. (b) OD=0,3 ning mõõdeti 0,1 mm küvetis.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Renata Muru _____

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 29.07.1989 _____)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Fotosünteesilised eksitonid superfüsioloogilistel
temperatuuridel _____,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Margus Rätsep, Arvi Freiberg _____,

(*juhendaja nimi*)

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'is kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, _01.06.2016_____ (*kuupäev*)