

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Elerin Albin

**Karotensoomi alusplaadis paiknevate BChl α molekulide
vaheliste interaktsioonide uurimine optilise spektroskoopia
meetoditega**

Juhendajad: PhD Margus Rätsep

prof Arvi Freiberg

PhD Juha Matti Linnanto

TARTU 2014

Sisukord

Lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
Töö eesmärgid.....	6
1 Valdkonna ülevaade	7
1.1 Klorosoomid	7
1.1.1 Klorosoomide ehitus	7
1.2 Alusplaat.....	10
1.3 Karotenoidid ja nende roll klorosoomides.....	11
1.3.1 Karotenosoomid	13
2 Uurimismeetodid	15
2.1 Spektraalsälgamine	16
2.2 Fluorestsentsi joone kitsenemise meetod	18
2.3 Tsirkulaarne dikroism.....	20
2.4 Eksitoninteraksioonid	22
3 Materjal ja mõõtmistingimused.....	24
3.1 Katseobjekti ettevalmistamine.....	24
3.2 Mõõtesüsteemid ja katseskeem	24
4 Tulemused ja arutelu	27
4.1 Neeldumis- ja fluorestsentspektrid.....	27
4.2 SHB-spektraalsälgamine	31
4.3 SHB-mõjuspektroskoopia.....	34
4.4 Δ FLN	35
4.5 CD spektroskoopia	38
Kokkuvõte	41
Tänuavaldused.....	43
Summary.....	44

Kasutatud kirjandus	46
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	55

Lühendid

BChl – bakterklorofüll (ingl *bacteriochlorophyll*)

BPheo – bakterfeofütiin (ingl *bactriopheophytin*)

C. – *Chlorobaculum*

Chl. – *Chlorobium*

CCD – laengsidestusseadis (ingl *charge coupled device*)

CD – tsirkulaarne dikroism (ingl *circular dichroism*)

FLN – fluorestsentsi joone kitsenemine (ingl *fluorescence line-narrowing*)

FMO – Fenna-Matthews-Olson kompleks (ingl *Fenna-Matthews-Olson complex*)

fwhm – joone täislaius poolel kõrgusel (ingl *full width at half maximum*)

IDF – mittehomoogenne jaotusfunktsioon (ingl *inhomogeneous distribution function*)

Krüo-EM – krüo-elektronmikroskoopia (ingl *cryo-electron microscopy*)

LH1 – bakterite valgust neelav kompleks 1 (ingl *light harvesting complex 1*)

LH2 – bakterite valgust neelav kompleks 2 (ingl *light harvesting complex 2*)

LHCII – fotosüsteem II valgust koguv antenn (ingl *light harvesting complex II*)

NMR – tuuma magnetresonants (ingl *nuclear magnetic resonance*)

PSB – foonontiib (ingl *phonon side-band*)

SHB – spektraalsälgamine (ingl *spectral hole burning*)

ZPH – foononvaba auk (ingl *zero-phonon hole*)

ZPL – foononvaba joon (ingl *zero-phonon line*)

TEA – trietüülamiin (ingl *triethylamine*)

Δ FLN – spektraalsälgatud fluorestsentsi joone kitsenemine (ingl *difference fluorescence line-narrowing*)

Sissejuhatus

Biosfääri kõige olulisemaks energiaallikaks on Päike, millelt saabuva valguskiirguse salvestavad meile kasutatavaks keemiliseks energiaks fotosünteesivad organismid. Sarnaselt paljude elusorganismidega püüab ka inimene Päikeselt saabuvat energiat salvestada, näiteks selleks, et elektrit toota. Ükski kunstlik fotosünteesiline süsteem ei ole suutnud jäljendada kõiki kasulikke omadusi, mis on looduslikel süsteemidel. Fotosünteesi aparaatide efektiivsust elusorganismides suurendavad märkimisväärselt valgusantennid, mille funktsioonideks on suurendada neelatava valguse hulka ja tagada selle efektiivne ülekanne reaktsioonitsentritesse, kus see muundatakse keemiliseks energiaks. Teadaolevalt suurimad ja ühed efektiivsemad valgusantennid on bakterites leiduvad klorosoomid. Selle valgusantenni suurepäraseid omadused on ajendanud teadlaseid leidma viise, kuidas seda elektri tootmisel ära kasutada. Seda on isegi otseselt rakendatud päikesepatareides valgustundlike värvide asemel (O'Dell jt, 2012; Shah jt, 2012), kuna need katavad palju laiemat spektraalset ala ja seega suurendavad saadavat fotopinget ning seejuures ei tõsta oluliselt seadme hinda (Chen and Scheer 2013). Kuna klorosoomide kasutamisel on omad miinused (degradeerumine, õige paigutuse saavutamine), oleks üheks võimaluseks ka looduslike või kunstlike bakteriklorofüllide kasutamine (Alster jt, 2012b; Balaban 2005; Chappaz-Gillot jt, 2011; Huijser jt, 2007; Mass jt, 2011), mille abil aga tagatakse soovitud efektiivsus vaid siis, kui on saavutatud parim pigmentide omavaheline asetus.

Käesolevas töös on kirjeldatud bakterites leiduva klorosoomi ehitust, sellega seondunud alusplaati, mis on oluliseks vahelülis energia suunatud liikumisel reaktsioonitsentritesse, ning arutletud on ka karotenoidide rolli üle klorosoomides. Ülevaade on toodud ka töös kasutatud kõrglahutusega optilise spektroskoopia meetoditest nagu spektraalsälgamine, fluorestentsijoonete kitsenemine ja tsirkulaarne dikroism. Magistritöö uurimisobjektiks oli „lihtsustatud“ klorosoom ehk karotenosoom ja sellega seotud intaktne alusplaat. Karotenosoom on oma nime saanud selle järgi, et suurima osa pigmentidest moodustavad selles karotenoidid, kuna peamised pigmendid (bakteriklorofüll *c*, *d* ja *e*) on sealt geeni inaktivatsiooni teel eemaldatud. Töö käigus uuriti karotenosoomi alusplaadis paiknevate molekulide omavahelisi orientatsioone ja interaktsioone, kasutades selleks optilise spektroskoopia meetodeid.

Töö eesmärgid

Karotenosoomi alusplaadi ehitust on varasemates töödes uuritud elektronmikroskoopia ja tuuma magnetresonantsi meetoditel (Pedersen jt, 2010), saades väärtuslikku teavet BChl *a* molekulide omavaheliste orientatsioonide ja interaktsioonide kohta. Samas jäävad paljud küsimused lahtiseks, näiteks väga oluline BChl *a* pigmendi ja CsmA valgu omavaheline paiknemine, mistõttu katsetulemustele vastavate kõikvõimalike struktuuride arv on suur. Põhimõtteliselt võimaldab optilise spektroskoopia struktuuride ringi veelgi piirata. See oligi käesoleva töö eesmärgiks. Alusplaadi struktuuri selgitamiseks ja tema osaluse mõistmiseks energiaülekande protsessis on lisaks alusplaadi molekulide orientatsioonidele väga oluline saada ühene vastus küsimusele, kas need molekulid võiksid vastastikmõjus olles moodustada eksitone toetava dimeeri või siis mõne kõrgemat järku multimeeri. Antud töö on üheks osaks mahukamast klorosoomi uurimistest, mis tipneb katseandmetel põhinevate kvantkeemiliste arvutuste ja arvutisimulatsioonidega.

Nõutavate andmete saamiseks oli vaja mõõta ja analüüsida:

- neeldumis- ja kiirgusspektreid erinevatel temperatuuridel;
- spektrite mittehomogeenset laienemist;
- energia ülekannet karotenosoomi alusplaadis;
- elektron-foonon ja elektron-võnke vastastikmõjusid;
- spektrite käelisust (CD spektreid) ja nende temperatuurisõltuvusi.

1 Valdonna ülevaade

1.1 Klorosoomid

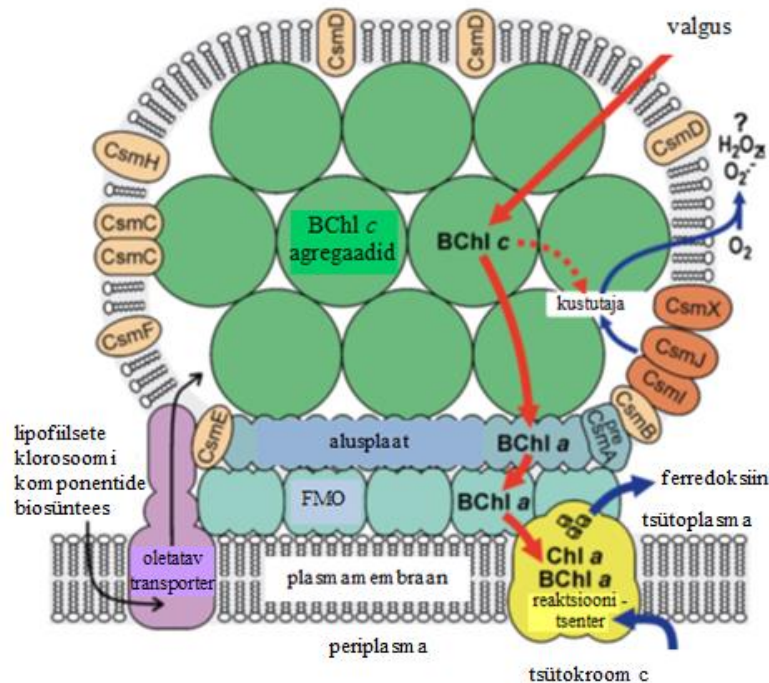
Valgusantennid on fotosünteesi kompleksides väga olulised struktuurid, suurendades valguse neeldumise tõenäosust ning reguleerides neeldunud energia voolu reaktsioonitsentritesse. Ühed efektiivsemad valgusantennid on klorosoomid, mida leidub kõigis roheliste väävlbakterite (*Chlorobi*) hulka kuuluvates liikides, lisaks on neid leitud ka mõnedest filamentsetest mitteoksügeensetest *Chloroflexi* hõimkonda kuuluvatest bakteritest ning *Acidobacteria* hõimkonda kuuluvast aeroobsest fototroofist *Candidatus Chloroacidobacterium thermophilum* (Bryant jt, 2007). Klorosoomid võimaldavad fotosünteesida ekstreemselt madala valgusintensiivsusega keskkonnas, näiteks järvede footilise tsooni põhjaosas, kus valguse intensiivsus on vaid mõni μmol footonit $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ehk ligikaudu miljon korda väiksem kui maapinnal (Beatty jt, 2005; Manske jt, 2005; Marschall jt 2010; Overmann jt, 1992). Mõned *Chlorobi* liigid aga suudavad kasutada süvavee termaalsetest avaustest emiteeruvat infrapunast kiirgust (Beatty jt, 2005).

Klorosoomi uurimise mudelorganismiks on kujunenud roheliste väävlbakterite hulka kuuluv *Chlorobaculum (C.) tepidum*, varasema nimetusega *Chlorobium (Chl.) tepidum*, mis avastati Uus-Meremaa kuumaveeallikatest (Wahlund jt, 1991). *C. tepidum* on kujunenud laialt levinud uurimisobjektiks, kuna selle bakteri genoom on hõlpsasti manipuleeritav (Frigaard ja Bryant 2001; Frigaard jt, 2004c) ning valminud on ka ülegenoomne DNA järjestus (Eisen jt, 2002). Kuna meie töö uurimisobjekt on pärit samast bakterist, siis võtame antud liigi ka edaspidi lähema vaatluse alla. *C. tepidum* on termofiilne range anaeroob ja obligatoorne fotoautotroof, mis sisaldab $215\,000 \pm 80\,000$ BChl *c* molekuli klorosoomi kohta (Montaño jt, 2003a). Lisaks BChl *c*-le sisaldavad klorosoomid ka karotenoide, kinoone ja BChl *a* molekule (Blankenship jt, 1995; Blankenship ja Matsuura 2003).

1.1.1 Klorosoomide ehitus

Klorosoomid (joonis 1) on teadaolevalt suurimad valgust neelavad antennikompleksid. Need on olenevalt liigist ellipsoidsed, koonilised või ebaregulaarse kujuga valke sisaldava lipiidse üksikkihiga ümbritsetud kehakesed (Staehelein jt, 1978, 1980). Oma mõõtmetelt on need erakordselt suured, tüüpiliselt $150 \times 50 \times 20$ nm suurused, kuigi võivad erinevate liikide vahel varieeruda isegi 5 korda. Klorosoomide suurust seletab BChl molekulide hulk valgusantenni

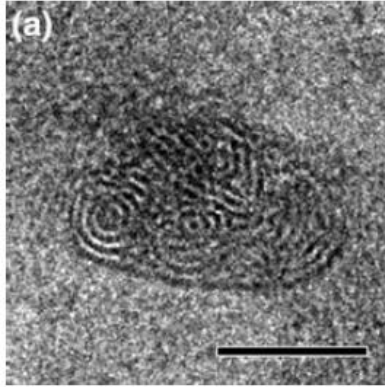
sisemuses, kus see varieerub 50 000–250 000 molekulini (Martinez-Planells jt, 2002; Montaña jt, 2003a; Saga jt, 2007), kusjuures üks rakk võib sisaldada umbes 200–250 klorosoomi.



Joonis 1. Klorosoom plasmamembraani küljes. Klorosoom kinnitub peamiselt CsmA valgust ja BChl *a* molekulidest koosneva alusplaadi kaudu trimeerse FMO valgu külge, mis on viimane vahelüli klorosoomi ja plasmamembraanis paiknevate reaktsioonitsentrite vahel. Klorosoomi sisemuses on rohelistele ringidena kujutatud BChl *c* agregaate, mida ümbritseb lipiidne üksikkiht, mis sisaldab ka erinevaid Csm-valke. Punaste nooltega on kujutatud ergastuse ja sinistega elektronide ülekannet (Frigaard ja Bryant 2004, modifitseeritud).

Klorosoomide erilisus seisneb selles, et valgust neelavad pigmendid, BChl *c*, *d* või *e*, ei ole seotud tugivalkudega, nagu teistes antennikompleksides esinevad pigmendid, vaid on omavahel agregeerunud (Blankenship jt, 1995; Blankenship ja Matsuura 2003; Frigaard jt, 2004c; Smith jt, 1983). Agregeerumist soodustab ka lipiidne üksikkiht, mille hüdrofoobsed sabad on suunatud klorosoomi sisemusse ja tekitavad sellega hüdrofoobse keskkonna, mis „sunnib“ pigmendid paigutuma nii, et polaarne/polaarne ja mittepolaarne/mittepolaarne kontakt oleks maksimeeritud (Sørensen jt, 2008). BChl agregaatide struktuuri üle on palju vaieldud ja välja on pakutud erinevaid mudeleid, sh ühedimensionaalsed „vardad“ (Staelin jt, 1978, 1980) või kahedimensionaalsed lamellid (Pšeničik jt, 2004). Klorosoomide ristlõike uurimine krüo-elektronmikroskoopia ehk krüo-EM (ingl *cryo-electron microscopy*) meetoditega näitas, et BChl molekulid agregeeruvad klorosoomide sisemuses kõverdunud lamellideks, mis osaliselt moodustavad mitmekihilisi silindreid (joonis 2)(Oostergetel jt,

2007). Omavahel paigutuvad need kõige tõenäolisemalt *syn-anti* dimeeridena, mis ainsana väljapakutud teooriatest ühtib ka tuuma magnetresonantsi ehk NMR (ingl *nuclear magnetic resonance*) mõõtmiste ja arvutuste andmetega (Ganapathy jt, 2009).



Joonis 2. Amorfses jääkihis fikseeritud *C. tepidum*'i klorosoom otsavaates. Krüo-EM pildilt on näha kuidas BChl *c* molekulid on pakitud lamellidesse. Osa lamelle on pakitud konsentrilisteks ringideks, ülejäänud paiknevad aga ebaregulaarselt (Oostergetel jt, 2010).

Sellise pigmentide paigutuse tulemusel esinevad klorosoomides pika elueaga eksitonseisundid, mis võimaldavad väga kiiret ja kõrge kvantsaagisega energiaülekannet järgmisele aktseptorkompleksile. See omadus muudab klorosoomid väga efektiivseteks valgusantennideks ning võimaldabki bakteritel fotosünteesida väga madala valgusintensiivsusega keskkonnas.

Energiaülekanne *C. tepidum*'i klorosoomides on kujutatud joonisel 1, kus on näidatud, et kui foton neeldub BChl *c* molekulis, kantakse ergastus edasi esmalt CsmA valguga seondunud ja seejärel FMO valguga seondunud BChl *a* molekulidele, kust see jõuab lõpuks reaktsioonitsentrisse, milles ergastusenergia jõul toimub juba elektronide liikumine.

C. tepidum'i klorosoomide lipiidises üksikkihis on kirjeldatud üle kümne erineva valgu, mida kutsutakse Csm- Valkudeks (*Chlorobi* hõimkonnas CsmA, CsmB, CsmC, CsmD, CsmE, CsmF, CsmH, CsmI, CsmJ, CsmK ja CsmX). Klorosoomi valkude funktsiooni kohta on siiani väga vähe teada. Need jagatakse struktuursete motiivide alusel nelja perekonda: CsmA/E, CsmB/F, CsmC/D, CsmI/J/X. CsmB/F ja C/D perekondade puhul on leitud, et need mõjutavad pigmentide sünteesi taset ja kokkupanekut, mis omakorda mõjutab klorosoomide suurust ja efektiivsust ja seega ka bakterite kasvukiirust (Li ja Bryant 2009). CsmI/J/X perekonna valgud seovad [2Fe-2S] klastrit ja võtavad osa redokstingimuste hoidmisest ning energiaülekannde taastamisest (Li 2006; Li jt, 2013; Vassilieva jt, 2001). Raku eluks

hädavajalik on vaid CsmA, mis moodustab ka umbes poole klorosoomi valkude hulgast (Frigaard jt, 2004a).

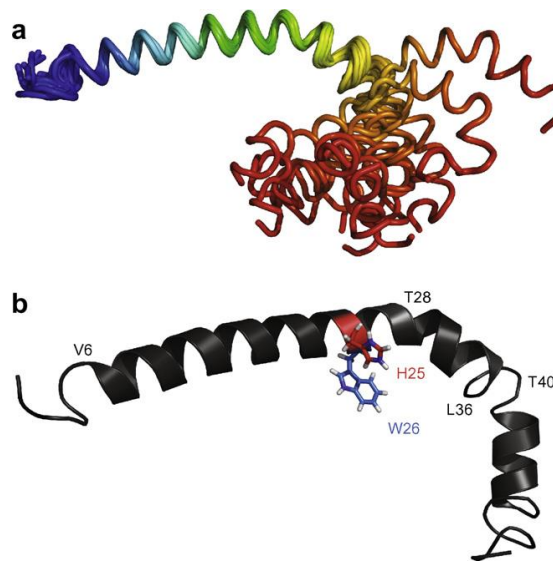
1.2 Alusplaat

Alusplaat (ingl *baseplate*) on klorosoomi osa, mis seob seda rakumembraani küljes olevate Fenna-Matthews-Olson valgu ehk FMO (ingl *Fenna-Matthews-Olson protein*) trimeeridega. See on ilmselt polaarsete lipiidide üksikkiht, kuid sisaldab ka vahasid. Alusplaat koosneb peamiselt CsmA valgust, millega on seondunud BChl *a* molekulid (Bryant jt, 2002; Montaña jt, 2003b; Sakuragi jt, 1999). CsmA valk on helikaalne 59 aminohappest koosnev valk, mis moodustab alusplaadi kahedimensionaalse parakristallilise struktuuri (Betti jt, 1982; Bryant jt, 2002; Feick ja Fuller 1984; Gerola ja Olson 1986; Montaña jt, 2003a; Pedersen jt, 2008a). CsmA α -helikaalne struktuur on tõestatud tsirkulaarse dikroismi mõõtmiste abil (Pedersen jt, 2008b) ning samal aastal tehti kindlaks ka CsmA vedela oleku NMR struktuur, mis on kujutatud joonisel 3 (Pedersen jt, 2008a). Jooniselt on näha, et valk koosneb kahest α -heeliksist. Selle hüdrofoobne N-terminaalne heeliks on lipiidse üksikkihi sees ja C-terminaalne interakteerub FMO valguga (Frigaard jt, 2004a; Pedersen jt, 2006). Valgu N-terminaalses osas paikneb ka histidiini jääk (H25), mis tõenäoliselt seob BChl *a* molekuli, kuna histidiin koordineerib Mg^{2+} ioone ning histidiini kõrval olev trüptofaan (W26) moodustab klorofüllil C-3 atsetüülühmaga vesiniksideme (Pedersen jt, 2008a). Seda teooriat kinnitavad ka *Rhodobacter sphaeroides*'e valgust neelava antennikompleksi LH1 (ingl *light harvesting complex 1*) uurimused, mille puhul leiti, et BChl *a* ja trüptofaan on seotud vesiniksidemega ja selle tagajärjel on valguga seotud BChl *a* spekter punanihkes võrreldes vaba pigmentiga (Olsen jt, 1994; Sturgis jt, 1997). Umbes 30 nm suurust punanihet on mõõdetud ka CsmA valguga seotud BChl *a* puhul, võrreldes atsetoonis oleva vaba pigmenti spektriga (Pedersen jt, 2008a).

CsmA moodustab klorosoomi alusplaadis stabiilseid oligomeere (Li jt, 2006). Pedersen jt pakkusid välja, et *C. tepidum*'i klorosoomide alusplaadis esinevad CsmA valgud dimeeridena, et kaks BChl *a* molekuli satuks lähestikku (Pedersen jt, 2008a). Valgud on omavahel seotud N-terminaalsete α -heeliksiste kaudu hüdrofoobsete interaktsioonide abil (Li jt, 2006; Pedersen jt, 2010). Dimeeride ridadest moodustubki parakristalliline struktuur, mida on uuritud ka elektron-mikroskoobiga (Staehelin jt, 1980). Krüo-EM piltidel on vaadeldud paksenenud pärlikee sarnast struktuuri, mida peetakse alusplaadiks (Oostergetel jt, 2010). Krüo-EM

piltidel nähtut toetab ka samas töös modelleerimise teel saadud pärlikee-struktuuri difraktsioonipilt.

BChl *a* moodustab 1–2 % klorosoomi pigmentidest. Seotuna CsmA valguga alusplaadis, on BChl *a* aktseptormolekuliks klorosoomi sisemuses paiknevate bakterklorofüllidelt tulevate energiale ja kindlustab sel moel energia suunatud liikumise reaktsioonitsentrite poole (Bryant jt, 2002; Gerola ja Olson 1986; Montaña jt, 2003a; Sakuragi jt, 1999). CsmA-BChl *a* kompleks on tõenäoliselt üks lihtsamaid valgustneelavaid kogumeid ja võib esindada fotosünteesi varajastes faasides tekkinud valgusantenne.



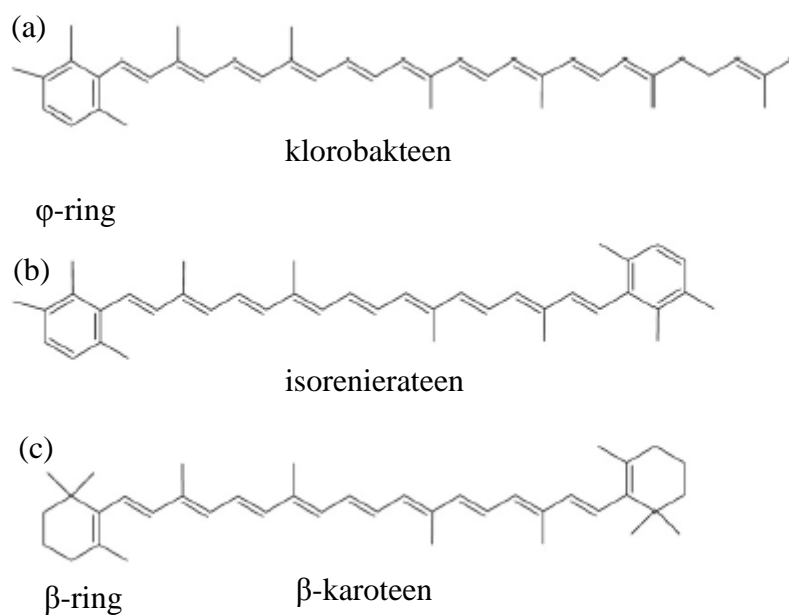
Joonis 3. NMR kujutis CsmA valgust. (a) CsmA valgu neliteist madalama energiaga struktuuri neljakümne hulgast; (b) CsmA keskmine struktuur. H25 märgib joonisel histooni jääki, mis koordineerib Mg^{2+} ioone ja W26 on tüptofaani jääk, mis moodustab BChl *a* molekuli vesiniksideme (Pedersen jt, 2008a, modifitseeritud).

1.3 Karotenoidid ja nende roll klorosoomides

Karotenoididel on fotosünteesikompleksides leitud järgnevaid rolle: a) valgusenergia neelamine; b) klorofüllide triplett-seisundite mittefotokeemiline kustutamine (fotoproteksioon); c) singlett-hapniku eemaldamine; d) liigse ergastusenergia hajutamine; e) struktuuri stabiliseerimine.

Chloroflexus aurantiacus'e klorosoomide uurides on leitud, et vähese valguse tingimustes on karotenoidide sisaldus ühe BChl *c* molekuli kohta 20% suurem kui suure valguse intensiivsuse juures kasvanud klorosoomides. See viitab sellele, et klorosoomides on karotenoididel ülekaalus pigem valgustneelav funktsioon kui kaitse fotodegradatsiooni eest (Pšenčik jt, 2013). Samas, vähendatud karotenoidide sisaldusega *C. tepidum*'i mutantide

puhul on vaadeldud selget kasvukiiruse vähenemist, mis ühe võimalusena võib olla põhjustatud BChl *c* ja *a* molekulide triplett-seisundite kõrge tasemest, kuigi nende rakustruktuure või fotosünteesi protsessi kahjustav mehhanism ei ole hapnikuvabas keskkonnas kasvavate bakterite puhul teada (Frigaard jt, 2004b). Kuid arvestada tuleb ka sellega, et paljud *Chlorobium*'i liigid kasvavad vaid mõne meetri sügavusel vees (Guerrero jt, 1985; van Gemerden ja Mas 1995), kus hapniku kontsentratsioon on veel $\geq 10 \mu\text{M}$ (Kim jt, 2007). On leitud, et kui viia *C. tepidum*'i hapnikku sisaldavasse keskkonda, siis karotenoidi vaba mutant (*crtB*) fotodegradeerub kolm korda kiiremini kui metsiktüüpi bakter. Sellistes mutantides oli ka BChl *a* sisaldus vähenenud, seega võis kasvukiiruse vähenemine olla põhjustatud hoopis ergastusenergia ülekande häirumisest ning karotenoididel võib olla alusplaadis hoopis struktuurne roll (Frigaard jt, 2004b). Neil on *C. tepidum*'i klorosoomides tõenäoliselt väga oluline osa ka BChl *c* agregaatide stabiliseerimisel, kuna arvatavasti tekivad seal BChl *c* molekulide kloriini ringi ja karotenoidide ϕ -ringi vahelised π - π interaktsioonid (Fuciman jt, 2010; Pšenčik jt, 2013), mis on oluline jõud bakterklorofüllide vaheliste agregaatide stabiliseerimisel (Alster jt, 2012a). Nimetatud pigmentide vahelisi interaktsioone kinnitavad ka muutused BChl-i Starki spektris (Frese jt, 1997) ja neeldumisspektris (Arellano jt, 2000; Kim jt, 2007) karotenoidide puudumisel. Samas on näidatud, et BChl *e* molekule sisaldava *Chl. phaeovibrioides*'e ja *Chl. phaeobacteroides*'e klorosoomides paiknevad karotenoidid hoopis kloriini tasapindade vahelises apolaarses ruumis, kus asuvad ka klorofüllide alkoholi-sabad (Pšenčik jt, 2006). Lisaks on leitud, et karotenoidid põhjustavad hüdrofoobset jõudu, mis aitab kaasa BChl molekulide agregeerumisele (Alster jt, 2008; Klinger jt, 2004). Ka karotenoidide struktuur *Chlorobi* hõimkonda kuuluvate bakterite klorosoomides toetab lisaks valguse neelamisele nende võimalikku rolli klorofüllide agregaatide stabiliseerimisel. Nimelt, klorobakteen (ingl *chlorobactene*) *C. tepidum*'is ja näiteks isorenierateen (ingl *isorenieratene*) *Chl. phaeovibrioides*'e klorosoomides sisaldab eespool mainitud ϕ - ehk arüülringi (joonis 4), mis ei ole molekuli selgroo konjugeeritud süsteemiga seotud ja seega ei mõjuta neeldumise spektraalset katvust võrreldes nende eellasmolekulidega, γ - ja β -karoteeniga (Fuciman jt, 2010).



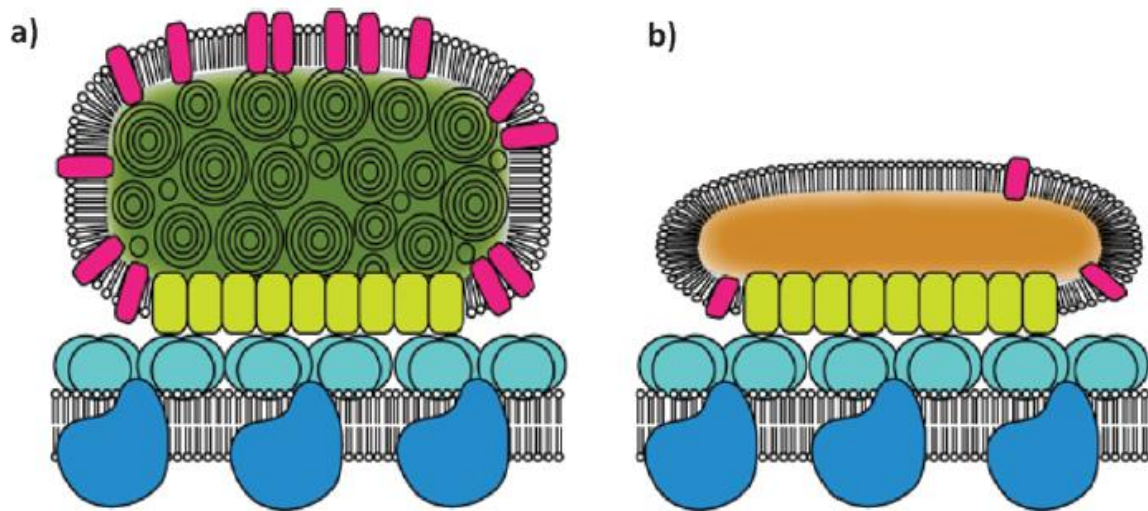
Joonis 4. Klorobakteeni (a), isorenierateeni (b) ja β -karoteeni (c) keemilised struktuurid (Pšenčik jt, 2013, modifitseeritud).

Kuigi karotenoidide rolli klorosoomides on üsna erinevatest vaatenurkadest uuritud, on nende täpsed funktsioonid siiani segased. Asja muudab keeruliseks see, et ühe liigi klorosoomis on palju erinevat tüüpi karotenoide, samuti on üsna suur varieeruvus liigiti ja eriti hõimkondade vahel, kus nende peamised funktsioonid tõenäoliselt erinevad. Seega vajab see molekulide rühm kindlasti edasist uurimist.

1.3.1 Karotenosoomid

Karotenosoomid (joonis 5) on sisuliselt lihtsustatud klorosoomid, millest peamine pigment (BChl *c*, *d* või *e*) on geeni inaktivatsiooni teel eemaldatud (Frigaard jt, 2002). *C. tepidum*'i karotenosoomid on oma kujult lamendunud, kuna nendest puuduvad BChl *c* agregaadid. Samuti pole neis mitmed klorosoomi membraanis paiknevaid valke, kuid olulisemad neist, CsmA ja CsmD ning pigmentid BChl *a* ja karotenoidid, on üksteise suhtes samades vahekordades nagu metsiktüüpi klorosoomideski (Frigaard jt, 2005). Samuti on karotenosoom täiesti funktsionaalne, kuigi energia ülekande karotenoididelt BChl *a* molekulidele on üsna nõrk. Karotenosoomid on tänu oma lihtsustatud ehitusele hea katseobjekt roheliste bakterite struktuuri, biogeneesi ja funktsiooni uurimiseks. See on võimaldanud uurida karotenoidide ja BChl *a* rolli ja paiknemist, mis metsiktüüpi bakterites on raskendatud BChl *c* molekulide väga

tugeva neeldumise tõttu. Samal põhjusel on ka käesoleva töö uurimisobjektiks valitud karotenosoom.



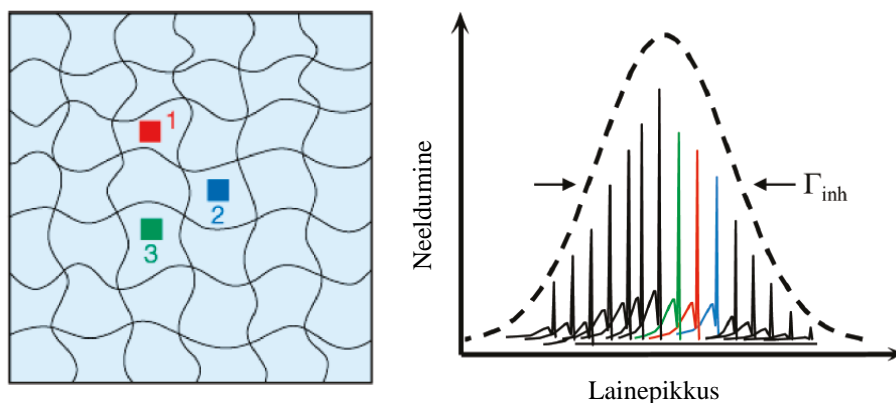
Joonis 5. Skeem *C. tepidum*'i fotosünteesi aparaadist. a) klorosoom; b) karotenosoom. Klorosoom on lipiidse üksikkihiga ümbritsetud ja sisaldab peamiselt BChl *c* agregaatide (roheline). Helerohelisega on kujutatud CsmA-BChl *a* alusplaati, mis on seotud FMO trimeeridega (helesinine). FMO trimeerid on kinnitunud lipiidse plasmamembraani külge, milles paiknevad reaktsioonitsentrid (tumesinine). Karotenosoomides puuduvad BChl *c* molekulid ja selle sisemusse jäävad alles oranžiga märgitud karotenoidid, samuti on karotenosoomides klorosoomidega võrreldes puudu enamik membraanis paiknevaid Csm-valke (roosa) (Kulminskaya jt, 2012).

2 Uurimismeetodid

Fotosünteesiliste pigment-komplekside neeldumisspektrid on tavaliselt laiad ja koosnevad paljudest kattuvatest ja üksteise all „peidus“ olevatest neeldumisribadest, mis kuuluvad erinevatele optiliselt aktiivsetele molekulidele.

Valgusantennide spektroskoopilisel uurimisel on levinud meetoditeks neeldumise ja fluorestsentsi spektrite mõõtmine, mis annavad meile infot näiteks selle kohta, milliste pigmentidega üldjoontes tegu on, kus on madalaima energiaga oleku spektraalne asukoht ning mis on pigmentide omavaheline suhe uuritavas kompleksis. Kuid neeldumis- ja fluorestsentsispektrid on ka madalatel temperatuuridel ikka veel väga laiad ja ei anna meile seetõttu piisavalt infot nt elektron-foonon vastastikmõjude või vibroonsete üleminekute kohta.

Spektrite laienemist põhjustavad erinevad protsessid, neid liigitatakse homogeenseteks ja mittehomoogenseteks. Homogeenne laienemine on määratud elektroni ergastatud seisundi elueaga ning molekuli ja seda ümbritseva keskkonna vaheliste interaktsioonide kõrgsageduslike kõikumistega (faasirelaksatsioon), see mõjutab kõigi molekulide optilisi üleminekuid ühtemoodi. Mittehomoogenset laienemist põhjustavad aga lokaalsed erinevused pigmente ümbritsevas keskkonnas, mis tekitavad molekulidel üleminekuenergiate erinevusi ning viivad molekulide ansambelis üleminekusageduste jaotuse tekkimiseni. Lihtsustatud kujul illustreerib mittehomoogenset laienemist joonis 6, kus vasakpoolsel pildil on kujutatud pigmendid, mis paiknevad tardunud maatriksis. Kõverjoontega on näidatud, et samu pigmente võib ümbritseda väga erinev mikrokeskkond, mis osaliselt määrab ära neelatava valguse lainepikkuse ühes konkreetses pigmendimolekulis. Joonise parempoolsel osal on kujutatud mittehomoogenset laienemist (katkendjoon), mis madalatel temperatuuridel on sageli normaalkõver, kuid tegelikkuses koosneb paljudest kitsastest homogeenset laienenud neeldumisribadest, mida tekitavad erinevates mikrokeskkondades paiknevad molekulid.



Joonis 6. Joonise vasakpoolsel osal on eri värvi ruutudega kujutatud pigmente, mis kõik paiknevad veidi erinevas keskkonnas ja sellest tulenevalt neelavad ja emiteerivad veidi erineva lainepikkusega valgust, mis põhjustab spektri mittehomoogeenset laienemist. Paremalt on kujutatud samade värvidega nende pigmentide homogeenselt laienenud neeldumisspektrid, mis koos teiste maatriksis olevate pigmentidega moodustavad mittehomoogeenselt laienenud jaotuse (katkendjoon) (Jankowiak jt, 2011, modifitseeritud).

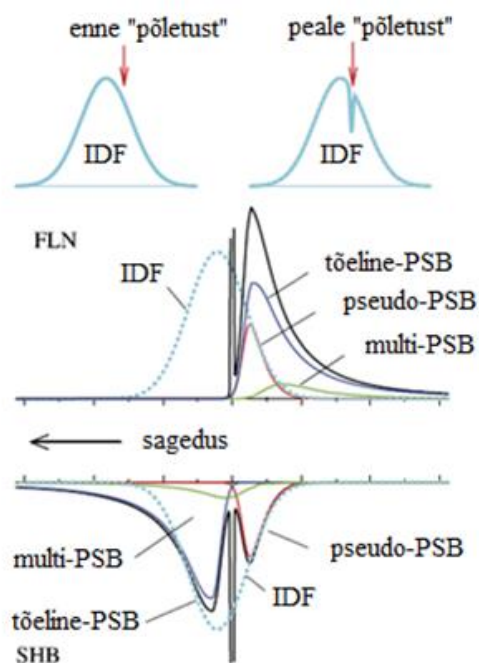
Mittehomoogeense laienemise eemaldamiseks spektritest võime kasutada selektiivse spektroskoopia meetodeid nagu spektraalsätkamine ehk SHB (ingl *spectral hole burning*), SHB-mõjuspektroskoopia, selektiivne fluorestsents ehk fluorestsentsi joone kitsenemine ehk FLN (ingl *fluorescence line-narrowing*), spektraalsätkatud fluorestsentsi joone kitsenemine ehk Δ FLN (ingl *difference fluorescence line-narrowing*) ja ühe molekuli spektroskoopia (ingl *single molecule spectroscopy*).

2.1 Spektraalsätkamine

Spektraalsätkamise meetod võimaldab hinnata spektrite homogeense ja mittehomoogeense laienemise ulatust, ergastatud seisundite positsioone ning elektron-foonon vastastikmõjusid. Spektri sätkamiseks valgustatakse objekti spektraalselt kitsa laserkiirega madalal temperatuuril (tavaliselt He veeldumise temperatuuril ~ 4.2 K) ja seejärel mõõdetakse proovi neeldumisspekter. Täpsemalt, mõõdetakse spektrid enne ja pärast laseriga mõjutamist ja leitakse spektrite vahe, mis ongi sätkspekter. Proovis ergastuvad vaid need molekulid, mille üleminekuenergiad on laseri sagedusega resonantsis. Molekulide ergastamine kutsub esile kas fotoreaktsiooni, mille tulemusena tekkinud uus produkt neelab valgust mingil teisel lainepikkusel, s.t väljaspool esialgset neeldumisriba (fotokeemiline sätkamine) või siis ergastatud molekulid naasevad oma madalaimale energia tasemele ehk põhiolekusse veidi muutunud keskkonna poolt mõjutatud konfiguratsioonis, mis samuti viib muutusteni neeldumisspektris (mittefotokeemiline sätkamine). On ka kolmas võimalus, mida nimetatakse

populatsiooni pudelikaela mehhanismiks, mille korral neeldumine põhiseisundis väheneb suhteliselt pika elueaga triplett-seisundite asustatuse tõttu. Sellise mehhanismi puhul ei ole muutus neeldumisspektris püsiv, vaid on määratud tripleti elueaga.

Seega, kui proovi mingi kindla aja jooksul laseriga valgustada, elimineeritakse laseriga samal lainepikkusel valgust neelavad molekulid ning tulemuseks on neeldumisspekter, mille vastaval lainepikkusel proovi neeldumine on märgatavalt vähenenud, spektrisse on tekkinud „sälk“ (joonis 7). Selle nähtuse avastasid 1974. aastal Tartu füüsikud Gorohhovski, Kaarli ja Rebane (Gorokhovskii jt, 1974).



Joonis 7. Selektiivse fluorestsentsi (FLN) ja spektraalsälkamise (SHB) spektrite mudelid. Ülemises osas on kujutatud mittehomoogeenselt laienenud spektri jaotusfunktsiooni enne ja pärast laseriga mõjutamist. Joonise alumisel skeemil on kujutatud FLNi ja SHB spektrite põhikomponente. FLN spekter koosneb foononvabast joonest ja sellest väiksemal sagedusel paiknevast tõelisest, pseudo- ja multi-foonontiivast. SHB spektris on ZPLile vastav foononvaba auk, millest kõrgemal sagedusel paikneb tõeline ja multi-foonontiib ning pseudo-foonontiib on madalamal sagedusel (Rätsep ja Freiberg 2007, modifitseeritud).

Laseriga tekitatud sälku neeldumisspektris nimetatakse foononvabaks auguks ehk ZPH-ks (ingl *zero-phonon hole*), mille laius ehk fwhm (mõõdetud sälgu intensiivsuse poolelt kõrguselt) annab meile homogeense laienemise suuruse, mida mõnel juhul saame seostada ergastatud oleku elektroonsete üleminekute dünaamikaga, kuna ülemineku energia võib laieneda elektroonsete üleminekute suure kiiruse (s.t lühikese eluea) tõttu. SHB spektris näeme veel foonontiiba ehk PSBd (ingl *phonon side-band*), mis neeldumisspektris paikneb

foononvaba sälgu suhtes kõrgemal energial, kus paikneb ka multi-PSB ning pseudo foonontiiba, mis paikneb sälgust madalamal energial. Foonontiibade tekkpõhjustest tuleb juttu järgmises alapeatükis. Kui mõõdame spektreid piisavalt laias piirkonnas, siis võime SHB spektris näha ka satelliitsälke laserist erinevatel lainepikkustel (resonantse sälkamise puhul) ning uuritava proovi madalaima energiaga olekule vastavat laia auku (energia ülekande korral). Tihti esineb spektrites ka sälguga sininihkes olevaid antisälke (ingl *anti-hole*), mida põhjustab sälkamisega kaasnev molekulide ümberjaotumine mittehomogeense jaotusfunktsiooni ehk IDF (ingl *inhomogeneous distribution function*) piires.

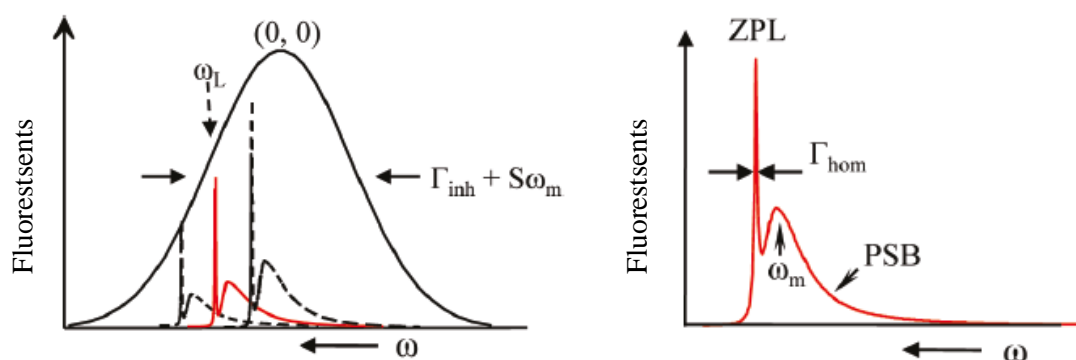
Üks spektraalsälkamisel põhinev meetod on ka SHB-mõjuspektroskoopia, mille puhul „põletatakse“ laseriga neeldumisspektrisse erinevatel lainepikkustel rida „sälke“ ehk foononvabu auke konstantse laseri doosiga. Meetod võimaldab mõõta mittehomogeense laienemise ulatust, mida kirjeldab mittehomogeenne jaotusfunktsioon IDF. SHB-mõjuspekter peegeldab vaid kompleksi madalaima energiaga pigmentide jaotusfunktsiooni, kuna molekulid, mis suudavad energiat kiiresti edasi anda, on väga väikese ergastatud oleku elueaga ja seega ei tekita neeldumisspektrisse püsivat „sälku“.

SHB meetodit on üksikasjalikult kirjeldatud paljudes originaal- ja ülevaateartiklites, vt näiteks Gorokhovskii jt, 1974; Jankowiak jt, 1993; Jankowiak jt, 2011; Reinot jt, 2001; Rätsep ja Freiberg 2007). Selle abil on uuritud erinevaid antennikomplekse nagu näiteks tsüanobakteritest pärit fotosüsteem I (Rätsep jt, 2000), taimede CP29 (Pieper jt, 2000) ja LHCII (Pieper jt, 2009).

2.2 Fluorestsentsi joone kitsenemise meetod

Selektiivne fluorestsents (FLN) on oma põhimõttelt lähedalt seotud spektraalsälkamisega ning see meetod võimaldab fluorestsentsi spektrist kõrvaldada mittehomogeense laienemise panuse. FLN spektroskoopias mõõdetakse fluorestsentspektrit, mis üldjoontes on analoogne SHB-s tekitatud „sälgule“ neeldumisspektris. Selleks kasutatakse samuti kvaasimonokromaatset laservalgust, millega ergastatakse selektiivselt vaid laseriga resonantsis olevad pigmendid. Selle tulemusena tekib spektraalselt kitsas fluorestsentsi spekter, mis on oma kujult lähedane homogeensele spektrile (Szabo 1970). Seda meetodit (nagu ka spektraalsälkamist ja mõjuspektroskoopiat) saab kasutada ainult väga madalatel temperatuuridel (<10 K), mille juures spektrijooned ei ole veel termiliselt laienenud.

FLN spekter koosneb kahest põhilisest komponendist (vt joonis 8). Foononvaba joon ehk ZPL (ingl *zero-phonon line*) on laseri ergastussagedusega resonantsis ja tekib optilisest üleminekust, mille käigus foononeid ei teki. ZPList madalamal energial paikneb foonontiib, mis pärineb elektronsete üleminekute interaktsioonist maatriksi võnkumistega, s.t osa energiat läheb foononite tekitamiseks. Täpsemalt vaadates, FLN spektris moodustub foonontiib kolmest komponendist (vt joonis 7, keskmine osa). Tõeline PSB esindab foononitega üleminekuid, mis pärinevad molekulidelt, mis on ergastatud resonantselt ZPLiga. Pseudo-PSB moodustub mitte-resonantselt (foonontiibade kaudu) ergastatud molekulide foononvabade joonte jaotusest. Multi-PSB on pseudo-PSBd moodustavate foononvabade joonte foonontiibade summa.



Joonis 8. Fluoresentsi homogeenselt ja mittehomoenselt laienuenud spektri skemaatiline kujutis. Vasakul oleva mittehomoense spektri joonisel tähistab ω_L ergastava laseri sagedust, $\Gamma_{inh}+S\omega_m$ väljendab mittehomoenselt laienuenud spektri laiust ehk fwhm'i. Paremalt on laseriga sagedusel ω_L ergastatud homogeenne spekter, mis koosneb foononvabast joonest (ZPL) ja foonontiivast (PSB) (Jankowiak jt, 2011, modifitseeritud).

Antud meetodi abil on võimalik uurida elektron-foonon vastastikmõjusid ning pigmentide optiliselt aktiivseid võnkesagedusi. Elektron-foonon interaktsioonide tugevust kirjeldab Huang-Rhys ehk S-faktor, S_{ph} , mis väljendab keskmist foononite arvu, mis ühe elektroni üleminekul kiiratakse või neelatakse. Huang-Rhys faktori saab leida järgneva valemi abil (Rebane 1970):

$$e^{-S_{ph}} = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL}+I_{PSB}} \quad (1)$$

Võrrandis (1) on I_{ZPL} ja I_{PSB} vastavalt foononvaba joone ja foonontiiva integraalsed intensiivsused. Vaid FLN spektrit kasutades on selle parameetri välja arvutamine aga raskendatud, kuna a) ergastava laseri hajuvus varjab täielikult ära ZPLi ning b) tõeline, pseudo- ja multi-PSB paiknevad kõik koos foononvabast joonest madalamal energial, mis

põhjustab Huang-Rhys faktori ülehindamist (Rätsep ja Freiberg 2007). Siin tuleb appi FLN meetodi edasiarendus, milles kombineeritakse meetodit spektraalsälgamisega. Mõõdetakse järjest ühesugustes tingimustes kaks FLN spektrit, vahepeal viiakse läbi spektraalsälgamine ning seejärel võetakse kahe mõõdetud spektri vahe, s.t saadakse spektraalsälgatud selektiivse fluorestsentsi ehk Δ FLN spekter. See meetod annab võimaluse mõõta ZPLi, mis muidu on ergastava laseri poolt varjatud (Rätsep ja Freiberg 2007; Rätsep jt, 2008) ning eemaldada spektrist pseudo-PSB (Fünfschilling jt, 1986; Jaaniso ja Avarmaa 1986; Reppert jt, 2010).

Δ FLNi kasutatakse selleks, et esile tuua fluorestsentsi spektri detailsed foonon- ja vibroonsed struktuurid ning selle abil on võimalik määrata elektron-foonon ja elektron-võnke (vibroonsete) interaktsioonide tugevust, mida ainult FLN spektri abil teha pole võimalik.

Δ FLN meetodist on lähemalt räägitud ülevaateartiklis Jankowiak jt, 2011, samuti on seda kirjeldatud artiklites Rätsep ja Freiberg 2007 ning Rätsep jt, 2005. Valgusantennidest on selle abil uuritud nt purpurbakterite valgusantenne LH1 ja LH2 (Freiberg jt, 2009; Rätsep ja Freiberg 2003; Timpmann jt, 2004), roheliste taimede antennikomplekse CP29 (Rätsep jt, 2008) ja LHCII (Pieper jt, 2009).

2.3 Tsirkulaarne dikroism

Tsirkulaarne dikroism ehk CD (ingl *circular dichroism*) põhineb valguse neeldumisel optiliselt aktiivsetes molekulides. Beer-Lamberti seaduse järgi on valguse neeldumine (A) proovis kontsentratsiooniga C defineeritud järgmise valemiga:

$$A = \varepsilon Cl, \quad (2)$$

kus l on valguse teepikkus proovis ja ε ekstinktsiooni koefitsient, mis juhul kui l on mõõdetud sentimeetrites ja kontsentratsiooni ühik on mol dm⁻³, siis ε ühikuks on mol⁻¹ dm⁻³ cm⁻¹. Neelduvus on defineeritud, kui molekulidele pealelangeva (I_0) ja läbituleva (I) valguse logaritmiline suhe, mida väljendab järgnev seos:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

Beer-Lamberti seadus kehtib juhul kui I on mõõdetav ja ei esine kontsentratsioonist sõltuvaid molekulidevahelisi interaktsioone.

Tsirkulaarne dikroism on vasaku- ja paremakäelise ringpolariseeritud valguse neelduvuse erinevus, mida väljendab võrrand (4), kus A_l ja A_r on vastavalt vasaku- ja paremakäeline neelduvus.

$$CD = A_l - A_r \quad (4)$$

Ringpolariseeritud valgus moodustub kahest lineaarselt polariseeritud kiirgusest (joonis 9). See tekib juhul, kui kahe võrdse amplituudiga lineaarselt polariseeritud kiirgused on üksteise suhtes ortogonaalselt polariseeritud ja nende faaside erinevus on $\pi/2$ (veerand lainepikkust). Tsirkulaarselt polariseeritud valguskiirguse elektrivälja vektor säilitab ajas konstantse suuruse, kuid moodustab ümber levimissuuna heeliksi. CD signaal tekib kahe lineaarselt polariseeritud valguskiire selektiivsest neeldumisest kiraalsetes molekulides, mistõttu ei ole nende kahe kiire intensiivsus enam sama ning liitumisel tekib elliptiliselt polariseeritud valgus. Seega saab CD signaali väljendada nii neeldumise ühikutes kui ka elliptilisuse ühikutes (mdeg). Seetõttu toon välja nende omavahelise seose:

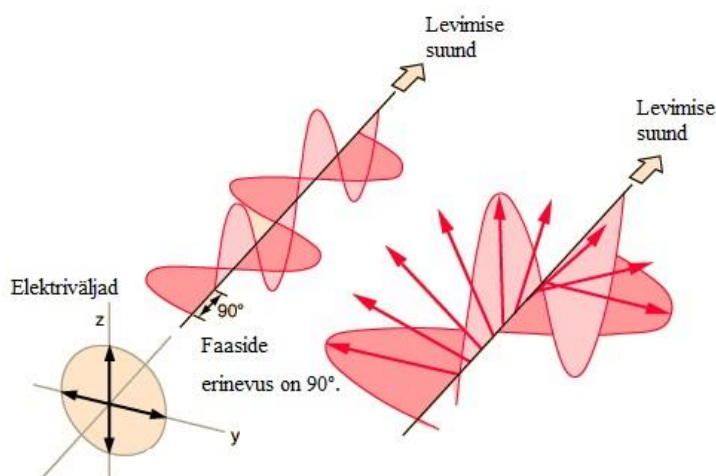
$$1 \text{ mdeg} = 3,03 \times 10^{-5} \Delta A \quad (5)$$

$$1 \Delta A = 32982 \text{ mdeg}$$

Ühe molekuli piires tekib CD molekulisisesest asümmeetriast. CD spektri kuju on samasugune nagu neeldumisspektril, kuid sõltuvalt molekuli käelisusest on spekter kas y-telje negatiivses või positiivses alas. Lihtsamates molekulide kompleksides või agregaatides põhjustavad CD signaali kromofooridevahelised eksitoninteraktsioonid. Tulemuseks on konservatiivse kujuga spekter, kus energiaskaalas esitatud spektri negatiivne ja positiivne ala on võrdse pindalaga. Komplekssüsteemides, nagu DNA agregaadid, viirused ja kromatiin, tekib väga intensiivne CD signaal, mis on mitte-konservatiivse kujuga. Hierarhiliselt organiseerunud struktuurid nagu graanitulakoidide membraanid ja LHCI kompleksid sisaldavad kõiki kolme CD signaali, mis kattuvad üksteisega.

CD spektroskoopiat saab kasutada kiraalsete molekulide uurimisel. Laialt levinud on see valkude ja nukleinhapete uurimisel, mille puhul uuritakse põhiliselt konformatsioonilisi muutusi ning interaktsioone väikeste molekulidega, eriti akiraalsetega, mille indutseeritud CD tuleb nende interaktsioonidest makromolekulidega. CD spektris on infot ka näiteks valgu selgroo asümmeetrilistest tunnustest ja kõrvalahelate orientatsioonist, DNA puhul võib kindlaks teha, kas tegu on A-, B-, või Z-DNAGA.

CD spektroskoopia kasutamine on võimalik ka fotosünteesiliste süsteemide puhul. Monomeersetes lahustes on klorofüllide CD spekter väga nõrk (Dratz jt, 1966), kompleksis valkudega aga annavad need sageli konservatiivse kujuga CD spektri, mis pärineb eksitoninteraktsioonidest. Tülakoidmembraanid ja LHCII makroagregaadid annavad mittekonservatiivse CD spektri äärmiselt suure amplituudiga ja pikkade hajumissabadega, mis on kaugemale leviva kromofooride vaheliste interaktsioonide tunnuseks (Garab jt, 1988; Finzi jt, 1989).



Joonis 9. Tsirkulaarselt polariseeritud valguse graafiline kujutus.¹ Joonisel on näidatud, et tsirkulaarselt polariseeritud valgus koosneb kahest võrdse amplituudiga lainest, millede elektriväljad on üksteise suhtes risti ning kahe laine faasinihe on 90° ehk veerand lainepikkust. Veidi suurendatult on näidatud, et elektrivälja vektor pöörleb piki liikumistelge ja kui kujutleda, et laine liigub vaatleja suunas, siis võiks ta näha, et elektrivälja vektori pöörlemise suund on vastupäeva. Sellist lainet nimetatakse paremakäeliselts ringpolariseerituks.

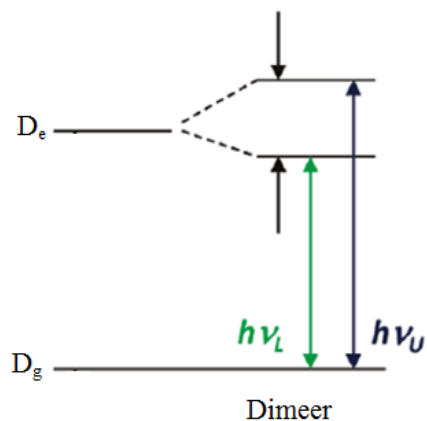
2.4 Eksitoninteraktsioonid

Eksiton on ergastatud seisundi delokaliseerumine üle paljude molekulide. See kehtib juhul kui molekulid on üksteisele väga lähedal ja interakteeruvad väga tugevalt nii, et võimatu on öelda, milline molekul on antud ajahetkel ergastunud. Eksitonil on osakese laadsed tunnused, kuna selle delokalisatsioonil on lainesarnased omadused ning sellel on mass, kindel impulss ja energia, kuid puudub laeng. Fotosünteesiliste antennikomplekside puhul räägime Frenkeli eksitonidest (Frenkel 1931), mille puhul ergastatud elektron või vakants liiguvad koos ühelt molekulilt teisele. Veidi erinev on Wannier-Mott eksiton (Wannier 1937), mille puhul

¹ <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/phyopt/polclas.html#c3>, modifitseeritud

interakteeruvad molekulid on üksteisest kaugemal, mistõttu elektroni ja augu paar on nõrgemalt seotud elektrostaatiliste jõududega. See levib kristallvõres, kandes edasi impulssi ja energiat. Ergastuse levikut üle paljude molekulide nimetatakse eksitoninteraktsioonideks.

Eksitoninteraktsioonidega seotud dimeeride või oligomeeride neeldumis-, fluorestentsi- ja CD spektrid on võrreldes ühe molekuli spektritega märgatavalt erinevad. Seda kirjeldab skemaatiliselt joonis 10, millel on kujutatud dimeeri ergastatud oleku lõhenemine kaheks erineva energiaga seisundiks.



Joonis 10. Eksitoninteraktsiooni mõju dimeersete klorofüllide spektrile. D_g – dimeer põhiolekus, D_e – dimeer ergastatud olekus, $h\nu_L$ – madalama ergastatud taseme ülemineku energia, $h\nu_U$ – kõrgema ergastatud taseme üleminekuenergia (Jankowiak jt, 2011, modifitseeritud).

3 Materjal ja mõõtmistingimused

3.1 Katseobjekti ettevalmistamine

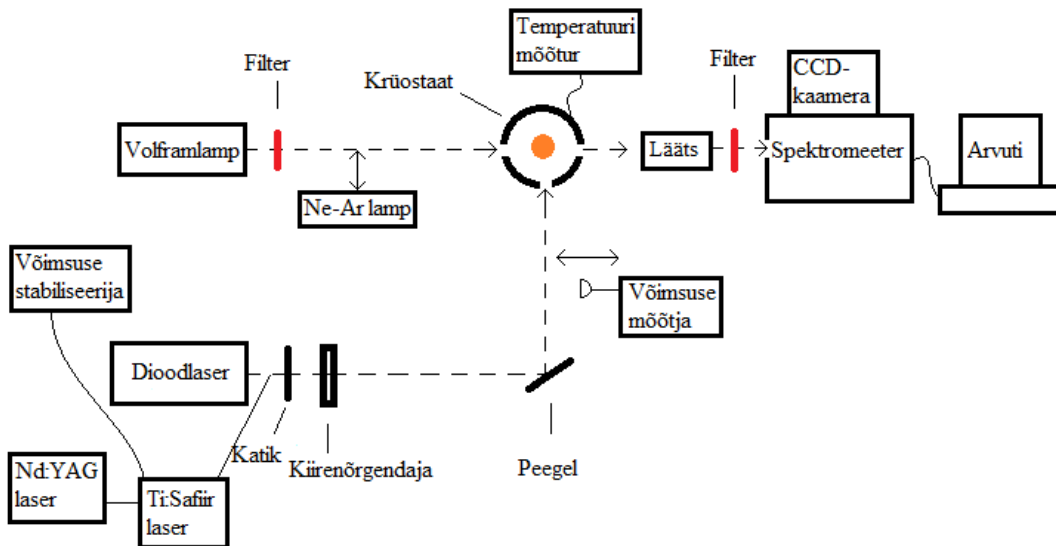
Katseobjektina kasutati karotenosoomi, mis on valmistatud Niels-Ulrik Frigaardi uurimisrühma poolt Kopenhaageni Ülikoolis. Need on ekstraheeritud mutantsest bakterist *Chlorobaculum tepidum*, mille genoomis on inaktiveeritud *bchK* geen, mis vastutab BChl *c* biosünteesiraja viimase etapi eest. Selliste mutantsete bakterite klorosoomid ei sisalda BChl *c* molekule ja tekkinud karotenoidi rikkaid kehakesi nimetataksegi karotenosoomideks (Frigaard jt, 2002). Uurimisobjektile lisati vedelas heeliumis ja lämmastikus läbiviidavate katsete eel 70% glütserooli lahust 50 mM Tris (pH 8) puhvril, mis kaitseb karotenosoomi madalate temperatuuride kahjustava mõju eest. Karotenosoomide agregeerumise vältimiseks lisati ~2 M NaSCN lahust. Objekti lahjendus valiti selline, et optiline tihedus huvipakkavas spektripiirkonnas (800 nm juures) oleks 0,2–0,6 ühe cm kohta. Kiirguse ja neeldumise mõõtmiseks madalatel temperatuuridel asetati proov He-krüostaati 4 mm läbimõõduga želatiinkapslis või 10 mm läbimõõduga plastikküvetis.

3.2 Mõõtesüsteemid ja katseskeem

Katseskeem neeldumise ja fluorestsentsi mõõtmiseks koos vastava aparatuuriga on esitatud joonisel 11. Enne mõõtmiste alustamist sätiti spektromeetri skaala täpselt paika erilise Ne-Ar kalibreerimislambi joonte abil. Neeldumise mõõtmisel kasutati valgusallikana stabiliseeritud volframlampi BPS100 (BWTek) värvustemperatuuriga 2700 K, mille valget spektrit vajadusel piirati ja nõrgendati hajutajaga ning värviliste filtritega XC17, C3C-16, CC-2 ja HC-7. Proovi läbinud valgus suunati spektromeetrisse Shamrock SR-303i ning detekteeriti termoelektriliselt jahutatava CCD kaameraga iDus DV420V-OE (mõlemad Andor Technology). Esmalt mõõdeti lambi spekter ilma proovita (referents) ja seejärel läbi proovi (signaal). Neeldumisspekter on leitav järgmise valemiga: $A = \log(\text{referents}/\text{signaal})$.

Mitteresonantse fluorestsentsi mõõtmiseks ergastati objekti dioodlaseriga, mille võimsus lainepikkusel 407 nm oli 5 mW. Spektromeetri ette asetatud punane filter KC-13 välistas laserikiire segava mõju uuritavale spektrile. Selektiivsete mõõtmiste korral kasutati ergastamiseks monokromaatse valgusega ja muudetava lainepikkusega Ti:safiir laserit (joone laius $0,5 \text{ cm}^{-1}$), mida pumbati 10 W-võimsusega Millennia Prime tahke keha laseriga (mõlemad Spectra Physics). Sama Ti:safiir laserit kasutati spektraalsälkamisel. Laseri

võimsust, mida mõõdeti 842-PE tüüpi mõõturiga, nõrgendati enne proovile suunamist timmitava neutraalse filtriga M925B (mõlemad Newport). Kõik töös esitatud fluorestsents-spektrid on parandatud vastavalt mõõtesüsteemi spektraalsele tundlikkusele.



Joonis 11. Neeldumis- ja fluorestsents-spektrite mõõtmise katseskeem. Skeemi keskne osa on krüostaat, mille sees on oranži ringiga kujutatud katseobjekt. Läbi krüostaadi otse spektromeetrisse on suunatud volframlamp neeldumise mõõtmiseks ning spektromeetri optilise telje suhtes risti on objektile suunatud kas diod- või Ti:safiir laser vastavalt fluorestsentsi mitteresonantseks või resonantseks ergastamiseks ja spektraalsäkkamiseks.

Mõõtmistel kasutati vastavalt vajadusele mitmeid erinevaid spektromeetri difraktsioonivõresid joonte arvuga 1800, 600 ja 150 millimeetri kohta. Neile vastavad lahutusvõimed on ligikaudu 0,03, 0,13 ja 0,57 nm ühe piksli kohta ning mõõteaknad 32, 129 ja 560 nm.

Mõõtmiseks madalatel temperatuuridel kasutati vedela heeliumi krüostaati firmalt Utreks, mis tagas vedeliku kohal paiknevas proovis temperatuuri $4,5 \pm 0,2$ K. Lämmastiku krüostaadis Optistat DN (Oxford Instruments) tehti mõõtmised temperatuuridel 77–290 K. Krüostaadis paikneva proovi temperatuuri mõõdeti ränidiodiga DT670B ja reguleeriti kontrolleri mudel 211 (LakeShore Cryotronics).

Tsirkulaarse dikroismi spektrite mõõtmiseks kasutati CD spektromeetrit Chirscan Plus mõõtepiirkonnaga 180–1100 nm firmalt Applied Photophysics.

Andmeid töödeldi ja joonised tehti programmidega Origin 6.0 (Microcal Software) ja Pro-Data Viewer (Applied Photophysics).

4 Tulemused ja arutelu

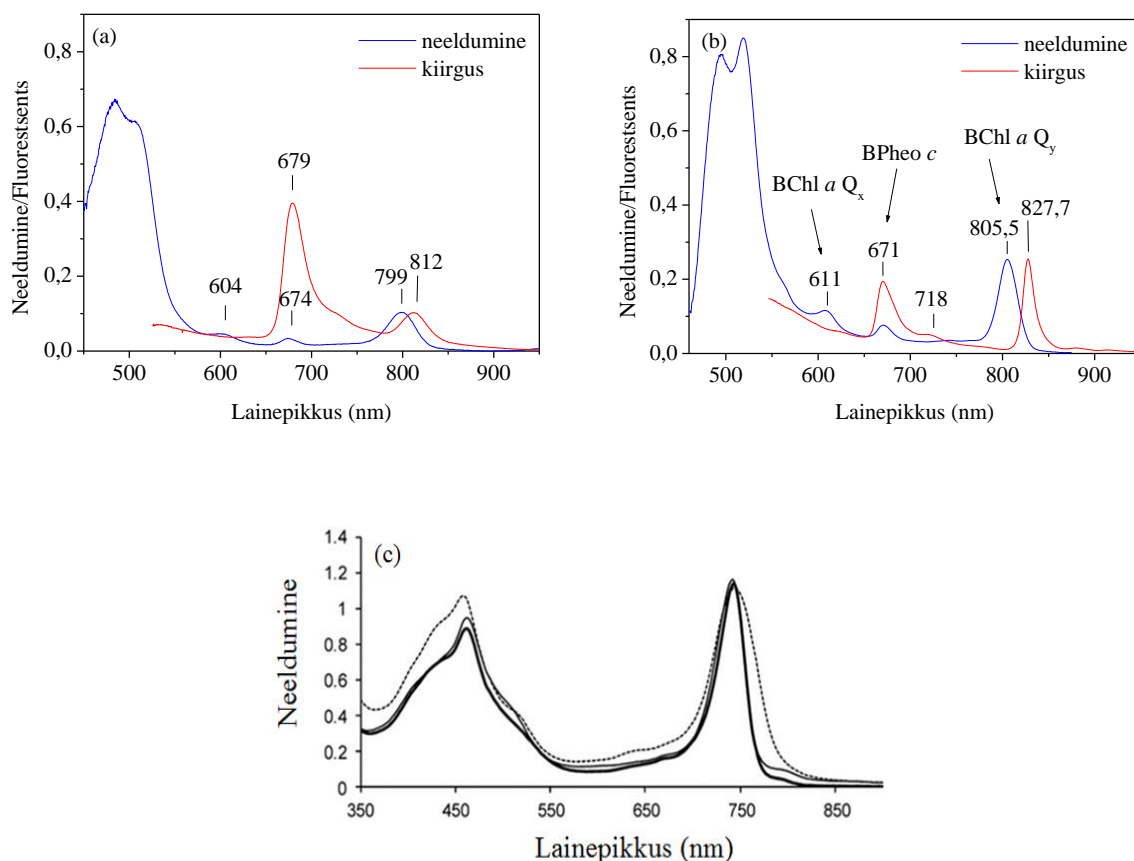
4.1 Neeldumis- ja fluorestsentspektroid

Esmalt mõõdeti neeldumisspekter toatemperatuuril (joonis 12 a) ja määrati objekti optiline tihedus ning tehti kindlaks, et proov on hästi säilinud ja NaSCN töötlus on karotenosoomid üksteisest eraldanud. Seejärel asetati proov krüostaati ja jahutati maha temperatuurini 4,5 K ning mõõdeti uuesti neeldumine (joonis 12 b). Ühe spektri mõõtmisaeg oli 0,2 sekundit, joonisel on summeeritud 100 spektrit, seega summaarne neeldumisspektri mõõtmisaeg oli $100 \times 0,2 = 20$ s.

Mitteresonantse fluorestsentsi (samuti joonisel 12) mõõtmiseks ergastati objekti monokromaatse laservalgusega lainepikkusel 407 nm ja seejärel mõõdeti kiirgust. Mõõtmisajaks oli 50×1 s. Nii kiirguse kui ka neeldumise mõõtmisel kasutati spektromeetri väikseima joonte arvuga (150 joont/mm), s.t ühtlasi suurima mõõtealaga spektraalvõret.

Karotenosoomide neeldumisspekter (joonisel tähistatud sinise joonena) on nii toatemperatuuril kui ka 4,5 K juures üsna lai ja koosneb mitmest üksteisega kattuvast neeldumisribast. Toatemperatuurises spektris on eristatavad infrapunases piirkonnas 799 nm juures olev BChl *a* molekuli Q_y (ehk madalaima energiaga elektronüleminekut märkiv) neeldumisriba. BChl *a* molekuli energeetiliselt järgmine, Q_x ülemineku maksimum paikneb 604 nm juures, mis karotenosoomi spektris on hästi näha, kuid klorosoomide spektris jääb suhteliselt intensiivse BChl *c* neeldumismaksimumi (750 nm) varju (Orf jt, 2013; Pšenčik jt, 2013). Kõige tugevam on neeldumine karotenoidide neeldumispirkonnas 400–550 nm juures, mis tuleneb karotenoidide suhteliselt suurest kogusest võrreldes BChl *a* molekulidega, sama neeldumisriba sisse jäävad ka BChl *a* kõrgema energiaga üleminekud (Soret neeldumisriba). 674 nm juures olev neeldumisriba võib olla pärit bakterfeofütiin *c* (BPheo *c*) molekulidelt, mida kinnitavad ka kõrgsurve-vedelikkromatograafia tulemused (Frigaard jt, 2005). Bakterfeofütiin esineb *bchK* mutantides, kus need moodustuvad mittetäieliku BChl *c* biosünteesiraja vaheühendite ebaspetsiifilise esterdamise BChl *a* süntaasi ja/või Chl *a* süntaasi poolt (Frigaard jt, 2005).

Võrreldes BChl *c* molekule sisaldavate klorosoomidega, puudub karotenosoomide spektris neeldumisriba 750 nm juures, mis vastab agregeerunud BChl *c* Q_y ribale (Costas jt, 2011; Orf jt, 2013; Pšenčik jt, 2013).



Joonis 12. Karotenoosomide neeldumis- ja fluorestsentsispektrid toatemperatuuril, 295 K (a) ja 4,5 K juures (b). Joonistele on märgitud neeldumise ja fluorestsentsi maksimumide asukohad lainepikkuste skaalas ning nooltega on viidatud neeldumisribade päritolule. (c) Klorosoomi neeldumisspektrid toatemperatuuril. Paksem must joon kuulub bakterile *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, punktiirjoon *C. tepidum*-le ja õhuke must joon *Chloroflexus aurantiacus*-le (klorosoomi spektrid Costas jt, 2011 järgi).

Mitteselektiivselt ergastatud fluorestsentsispektrite põhjal on võimalik teha järeldusi energia ülekande ja kiirgavate seisundite kohta karotenoosomis. Fluorestsentsispektrites 550–650 nm juures olev lai ja iseärasusteta kiirgusfoon kuulub tõenäoliselt karotenoididele.

BPheo c kiirgusele vastavad maksimumid on lainepikkustel 679 nm (temperatuuril 295 K) ja 671 nm (4,5 K), mis madalal temperatuuril ühtib BPheo c neeldumisriba asukohaga. See, et 671 nm juures olev fluorestsentsi maksimum on samal lainepikkusel, mis sellele vastav neeldumisriba viitab sellele, et samal lainepikkusel neelab valgust veel mingi molekul, mis aga ei fluorestseeru. Bakterfeofütiini neeldumisribaga resonantsis oleva fluorestsentsi maksimumil on madalamal energial paiknev õlg ~718 nm juures, mis on põhjustatud BPheo c võnkesagedustest. Sellist spektrit võib tekitada ka mõni feoforbiidi molekul, mida *bchK* mutantsete bakterite rakkudest määrati kõrgsurve vedelikkromatograafia abil vähemalt 15 erinevat tüüpi, kusjuures nende kõigi Q_y neeldumisriba oli 670 nm juures (Frigaard jt, 2002).

Tugev karotenoidide kiirusfoon ja BPheo *c* kiirusriba 679 nm juures näitab, et mitte kogu energiat ei kanta üle madalaimal energiatasemel paiknevatele BChl *a* molekulidele. Kui kogu energia kantaks üle madalaimale seisundile, siis pärineks kogu kiirus BChl *a* molekulidelt. See tähendab ka, et antud süsteemis ei ole BPheo *c* ja BChl *a* omavahel funktsionaalselt seotud. Kirjandusest on teada, et energia ülekande efektiivsuseks karotenoididelt BChl *a*-le on hinnatud vaid <5% (Frigaard jt, 2005). Väike efektiivsus tuleb sellest, et enamik karotenoide paikneb klorosoomi sisemuses, kus nad on seotud hoopis BChl *c* molekulidega. Kui arvestada aga seda, et iga BChl *a* molekuliga on seotud üks karotenoid (Montaño jt, 2003b), siis nende molekulide energiaülekande efektiivsus on 60% (Frigaard jt, 2005). Huvitav, et BPheo *a* ja BChl *a* kiirguse omavaheline suhe (s.t energia ülekande efektiivsus) muutub oluliselt temperatuuri alandamisel.

Madalaima energiaga olekule vastav kiirusriba, toatemperatuuril maksimumiga 812 nm, tuleb BChl *a* molekulidest. Temperatuuril 4,5 K nihkub vastav kiirusriba lainepikkusele 827,7 nm. Suurendatud pildil on selgelt näha tema kaks satelliitriba 890 ja 910 nm juures, mis viitavad BChl *a* Q_y oleku võnkumistele. Detailsemalt uurime BChl *a* võnkumisi tagapool esitatavates Δ FLN spektrites.

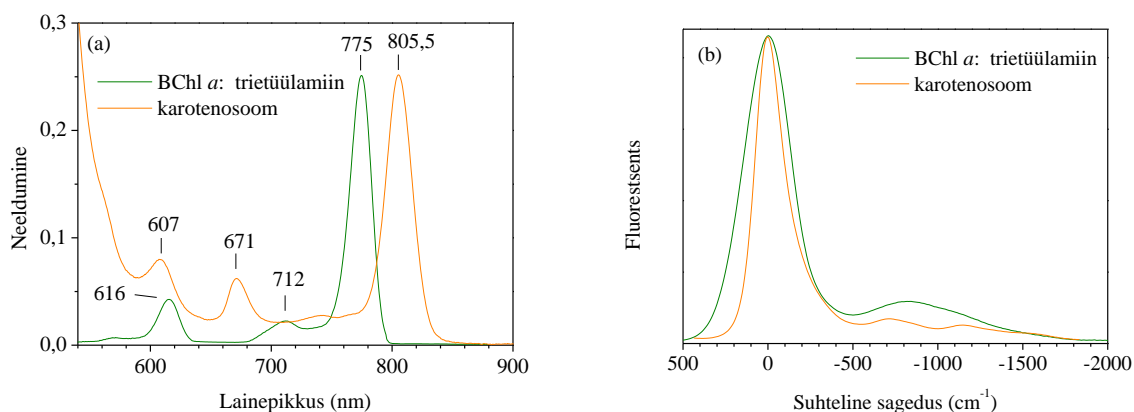
Temperatuuri alandamisel 4,5 K juurde kitsenevad ja nihkuvad nii neeldumise kui ka kiirguse ribad. BChl *a* mõlemad (Q_y ja Q_x) neeldumisribad nihkuvad 6,5 nm võrra pikemate lainepikkuste poole ja kiirgusspekter koguni 15,7 nm võrra. Seevastu toatemperatuuril 674 nm juures olev riba paikneb ümber lühemate lainepikkuste poole, asudes madalal temperatuuril 671 nm juures. Temperatuurinihked on osaliselt põhjustatud keskkonna üleminekust vedelast tahkesse olekusse, kuid BChl *a* puhul viitab tugev punanihe ka võimalikele eksitoninteraktsioonidele. Eksitoni olemasolu saame kontrollida spektraalsälgamise ja CD spektroskoopia abil.

Neeldumis- ja fluorestsentsi spektrite maksimumide abil saame määrata Stokesi nihke, mis kujutab endast nimetatud maksimumide spektraalset erinevust ehk nihet. See kirjeldab energia kadu, mis on tekkinud footonite eraldumise käigus, kui süsteem naaseb oma põhiolekusse. Karotenosoomis on Stokesi nihe BChl *a* Q_y neeldumisriba suhtes 333 cm^{-1} (temperatuuril 4,5 K) ning toatemperatuuril on see 214 cm^{-1} , mis näitab, et BChl *a* molekul on ergastatud olekust põhiolekusse tagasiminekul kaotanud üsna palju energiat. Vabal BChl *a* molekulil solvendis (trietüülamiin) on 4,5 K juures mõõdetud Stokesi nihe 98 cm^{-1} ja toatemperatuuril 173 cm^{-1}

(Rätsep jt, 2011). Mõnevõrra suurem nihe 225 cm^{-1} on mõõdetud toatemperatuuril püridiini lahuses (Niedzwiedzki ja Blankenship 2010).

Karotenosoomi $805,5 \text{ nm}$ neeldumisriba laius $4,5 \text{ K}$ juures on $26,7 \text{ nm}$ (412 cm^{-1}), olles ligi kaks korda suurem kiirgusriba laiusest, mis on $14,6 \text{ nm}$ (213 cm^{-1}). Toatemperatuuril on vastavad suurused 38 nm (595 cm^{-1}) ja 45 nm (682 cm^{-1}). Neeldumis- ja kiirgusribade tunduvalt erinev laius koos ülalmainitud ebarealistlikult suure Stokesi nihkega (333 cm^{-1}), viitab selle alusplaadis asuvate BChl *a* molekulidega seostatava riba komplekssele päritolule. Nende tulemuste alusel võime järeldada, et mitte kõik alusplaadi molekulid ei kiirga otseselt, vaid alles peale BChl *a* molekulide vahelist energiaülekannet madalaimal energiatasemel paiknevatele molekulidele või seisunditele. See on järjekordne vihje võimalikule BChl *a* molekulide vahelisele tugevale interaktsioonile. Energia ülekannet ja molekulide jaotumist uurime järgnevalt spektraalsälgamise meetodil.

Enne veel võrdleme karotenosoomi ja monomeerse BChl *a* spektreid. Joonisel 13 on välja toodud monomeerse BChl *a* trietüülamiinis ehk TEAs (Rätsep jt, 2011) ja karotenosoomi spekter $4,5 \text{ K}$ juures ja siit on näha, et karotenosoomides on selle pigmendi Q_y neeldumisriba $\sim 30 \text{ nm}$ punanihkes, mida on täheldatud ka eelnevalt (Pedersen jt, 2008a). Punanihe karotenosoomide spektris toetab teooriat, et BChl *a* on vesiniksidemete kaudu seotud CsmA valguga (Pedersen jt, 2008a), mida nagu ka alapeatükis 2.2 mainiti, on nähtud ka LH1 antennikompleksi puhul, kus trüptofaaniga vesiniksideme kaudu seotud BChl *a* spekter on samuti punanihkes (Olsen jt, 1994; Sturgis jt, 1997). Kuid see võib viidata ka eksitoninteraktsioonidele BChl *a* molekulide vahel. BChl *a* Q_x riba on karotenosoomis aga hoopis $8,5 \text{ nm}$ sininihkes. Sininihe on põhjustatud sellest, et TEA lahuses on BChl *a* tsentraalne Mg aatom seotud kahe lahusti molekuliga, kuid alusplaadis ühe aminohappejäägiga. Monomeerse BChl *a* neeldumisspektris on näha ka kolmas maksimum 712 nm juures, mida karotenosoomi neeldumises on nõrgalt näha $\sim 742 \text{ nm}$ juures.



Joonis 13. Monomeerse BChl *a* (trietüülamiinis) neeldumine (a) ja fluorestsents (b) 4,5 K juures. BChl *a* neeldumise ja fluorestsentsi spektrite (roheline) kõrvale on võrdluseks toodud karotenosoomi vastavad spektrid (oranž) (BChl *a* spektrid Rätsep jt, 2011 andmetel).

Jooniselt 12 on selgelt näha, et BChl *a* fluorestsentspektri maksimum on karotenosoomi omast laiem, vastavad väärtused on 328 cm^{-1} (BChl *a*) ja 213 cm^{-1} (karotenosoom). Neeldumisspektris on aga karotenosoomi Q_y riba laius 412 cm^{-1} ja BChl *a*-l 352 cm^{-1} . See tõestab veelkord, et karotenosoomi Q_y riba on heterogeenne. Kiirgusspektrid erinevad veel selle poolest, et kui karotenosoomi puhul on näha kaks satelliitstruktuuri, siis BChl *a* molekuli puhul vaid üks, mis viitab võnkespektrite olulisele erinevusele.

4.2 SHB-spektraalsälgamine

Nagu eespool mainitud, kasutati spektraalsälgamiseks muudetava lainepikkusega Ti:safiir laserit. Objekti ergastati resonantselt BChl *a* Q_y neeldumisriba erinevatesse piirkondadesse lainepikkustel 780, 805 ja 822 nm ja mõõdeti spektraalse lahutusega $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ (joonis 14 a-c). Lainepikkusel 821 nm sälgatud auke mõõdeti laiemas spektraalpiirkonnas, kuid madalama spektraalse lahutusega (joonis 14 d). Signaali mõõtmisaeg oli $200 \times 0,5 \text{ s}$. Samal lainepikkusel sälgati objekti korduvalt ning iga kord tõsteti põletusdoosi (märgitud joonisel 14). Joonisel on kõigis SHB spektrites hästi näha foononvaba sälg, mille intensiivsus sõltub põletusdoosist mittelineaarselt. 780 nm juures põletusdoosil alates $4,3 \text{ J/cm}^2$ enam sälgu sügavus ei kasva, kuna see on ära küllastunud. Spektrites joonisel 14 a ja b foonontiiba näha ei ole ja seega Huang-Rhys faktorit suurema täpsusega välja arvutada ei saa. Näha on siiski pseudo-foonontiiba 822,2 nm juures sälgamisel (joonis 14 c), kuigi vaid tugeva sälgamisdoosi, s.t

foononvaba joone tugeva küllastuse korral. Nende spektrite alusel saab valemi (1) abil välja arvutada S-faktori. Tulemus on küll üsna suure määramatusega, kuna tegu ei ole esiteks foonontiiva vaid pseudo-foonontiivaga ning teiseks on seda näha vaid kõrgetel põletusdoosidel, kus toimub ZPLi küllastumine. Esmase hinnangu saab siiski anda ja arvutuste põhjal on S-faktori väärtus 822,2 nm lainepikkusel sälgatud spektrite alusel 0,32...0,43. Neid väärtuseid tuleb käsitleda kui S-faktori alumist piiri. Ülemist piiri saab hinnata ka foononvaba sälgu maksimaalse sügavuse järgi, kasutades järgmist seost (Hayes jt, 1994):

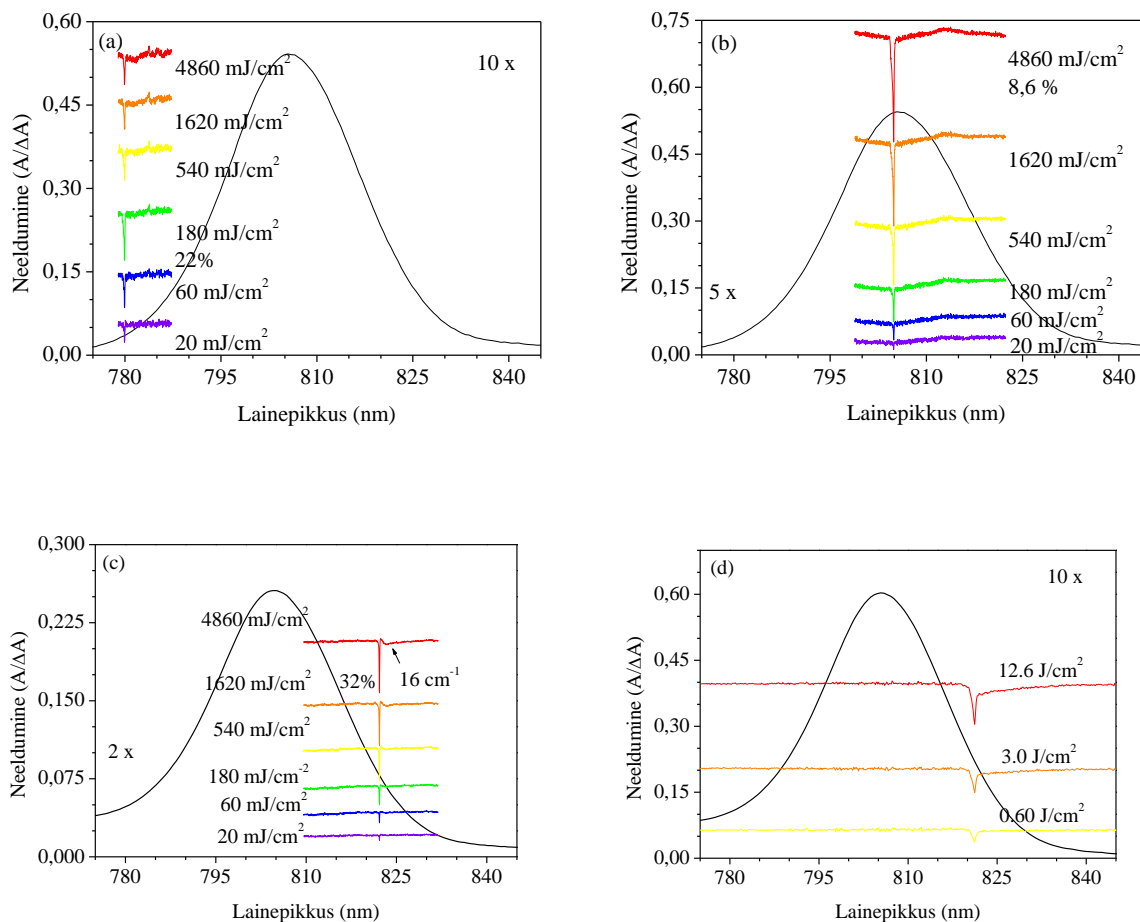
$$e^{-S_{ph}} = \frac{\Delta A}{A} \quad (6)$$

Valemis (6) on $\frac{\Delta A}{A}$ augu suhteline sügavus. Arvestama peab aga ka sellega, et laserijoone laius on $0,5 \text{ cm}^{-1}$ ja spektromeetri lahutusvõime on 822 nm juures $1,1 \text{ cm}^{-1}$. Analüüsides mitmeid mõõdetud SHB spektreid valem (6) abil võib järeldada, et Huang-Rhys faktori väärtus on väike ja jääb vahemikku 0,4...0,7. Seega, karotenosoomis paiknevate BChl *a* molekulide elektron-foonon vastastikmõjud on nõrgad.

Sälgu laiuse $\Delta\omega$ ja ergastatud seisundi eluea τ (mõõdetuna vastavalt cm^{-1} ja ps ühikutes) vahel kehtib lihtne seos:

$$\Delta\omega \cdot \tau \approx 10,6 \quad (7)$$

Lainepikkusel 780 nm sälgatud augu laius on $2,1 \text{ cm}^{-1}$. Kui võtta arvesse piiratud lahutusvõimest tingitud aparatuurne laienemine (mis sellel lainepikkusel võrdub $1,1 \text{ cm}^{-1}$), saame seisundi elueaks ehk energia ülekande kiiruseks hinnanguliselt 6 ps. Pikematel lainepikkustel on joon kitsam ja praktiliselt määratud süsteemi lahutusvõimega, mistõttu saab ainult öelda, et vastav eluiga on kindlasti pikem kui ~ 10 ps.



Joonis 14. Erinevatel lainepikkustel [780 nm (a), 805 nm (b), 822 nm (c) ja 821 nm (d)] „sissepõletatud“ sälspektrid. Taustal on BChl *a* Q_y neeldumisriba. Sälspektrid on võimendatud (märgitud joonisele) ning ära on toodud laseri põletusdoosid. (a-c) spektrite juurde on märgitud laseriga resonantsis oleva ZPH maksimaalne sügavus protsentides ning 822 nm spektri puhul on näidatud pseudo-PSB spektraalne asukoht pöördsentimeetrites. Spektraalne lahutus 2 cm^{-1} (a-c) ja 8 cm^{-1} (d).

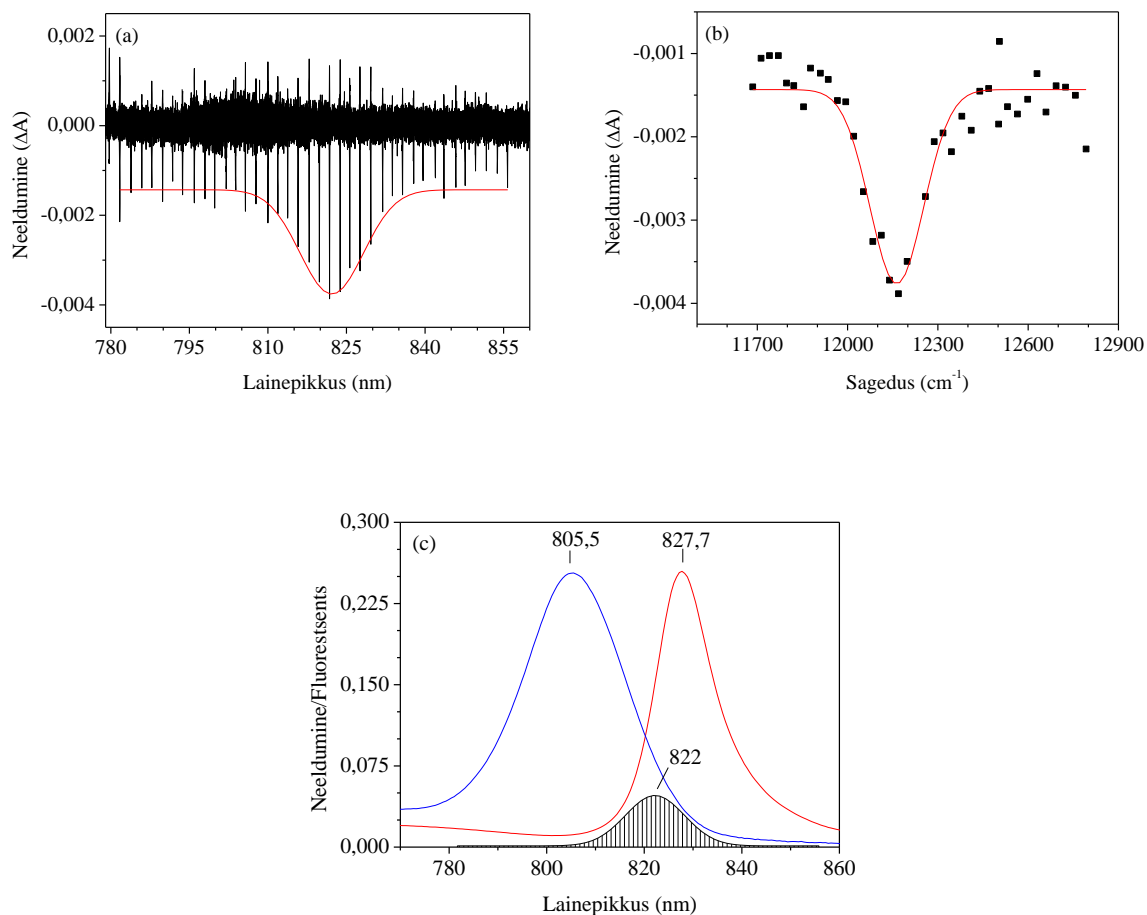
Kirjanduses on välja pakutud, et klorosoomi alusplaadi väikseimad ühikud on CsmA dimeerid, millega seondunud BChl *a* molekulid paiknevad lähestikku ja moodustavad samuti dimeeri (Li jt, 2006; Pedersen jt, 2008b; Pšenčik jt, 2009). Selliste molekulide vahel peaks olema eksitoninteraksioonid, juhul kui bakterklorofüllid paiknevad piisavalt lähestikku. Kui vaadelda BChl neeldumisriba, siis dimeeride vaheliste eksitoninteraksioonide puhul lahkneb esialgne molekulaarne neeldumisriba kaheks ja uued maksimumid moodustuvad endise neeldumisriba äärealadesse. Kahjuks jäävad nad enamasti mittehomoogeenselt laienenud spektri alla varju. Varjatud eksitonseisundite olemasolu väljaselgitamiseks saab kasutada SHB spektroskoopiat. Kui „põletada“ laseriga Q_y neeldumispirkonna äärtel resonantselt ühe dimeeri eksitonseisundiga, siis peaksime eksitoninteraksioonide puhul nägema neeldumisriba teises ääres samuti sätku. Võimaliku eksitoni olemasolu väljaselgitamiseks valgustati objekti

laseriga lainepikkusel 821 nm ja mõõdeti neeldumist kogu Q_y riba ulatuses enne ja pärast laseriga töötlemist. Jooniselt 14 d on näha, et oodatavat auku (iseegi mitte laia lohku) vahespektris ei tekkinud, seega SHB spektri põhjal me eksitoni olemasolule BChl *a* molekulide vahel karotenosoomi alusplaadis kinnitust ei saa.

4.3 SHB-mõjuspektroskoopia

SHB-mõjuspektri abil saame kindlaks määrata klorosoomi madalaima energiaga olekute spektraalse jaotuse täpse asukoha ning selle laiuse, s.t mittehomogeense jaotusfunktsiooni IDF. Mõjuspektri mõõtmiseks suunati objekti 1 cm^2 suurusele pinnale 30 sekundiks Ti:safiir laser võimsusega 1 mW, summaarne põletusdoos on seega 30 mJ cm^{-2} . Põletust korraldi lainepikkuste vahemikus 780–856 nm 2 nm intervalliga. Iga põletuse järel mõõdeti läbitulevat valgust mõõtmisajaga 100 s. Mõõtmiste tulemus on näha joonisel 15, kus iga kitsas foononvabale joonele vastav sälk tähistab ühte mõõtmist ja sälgu sügavus iseloomustab pigmentide suhtelist arvu antud lainepikkusel. Sälkude mähisjoont (joonisel 15 a punane pidevjoon) on lähendatud Gaussi jaotusfunktsiooniga, mille maksimum on $822,2 \pm 0,5 \text{ nm}$ juures ning selle laius on $178 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$. Joonisel 15 b on mähisjoon esitatud energiaskaalas, mustad ristkülikud märgivad sälkude maksimume.

Joonisel 15 c on koos esitatud karotenosoomi Q_y neeldumisriba, IDF (kaksikümne korda võimendatud) ja fluorestsentspekter. Sellest nähtub, et saadud Gaussi-kujuline IDF kirjeldab hästi kiirgavate BChl *a* molekulide jaotust. Ühtlasi leidis kinnitus meie ülaltehtud oletus, et mitte kõik neeldumisriba 805,5 nm moodustavad molekulid ei kiirga otse, vaid kannavad oma energia selle riba alumistele (punastele) seisunditele, mille jaotust kirjeldabki IDF.

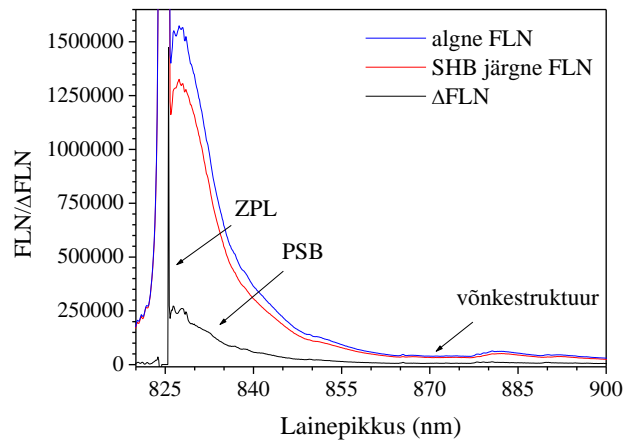


Joonis 15. Karotenosoomi SHB-mõjuspekter. (a) SHB-mõjuspekter ja sellele lähendatud Gaussi funktsioon (punane). Spekter on mõõdetud 4,5 K juures, põletusdoosiga 30 mJ cm^{-2} ; (b) Mõjuspektri mähisjoon ja sälkude maksimume märkivad punktid (mustad ristkülikud) energiaskaalas; (c) kaksikümme korda võimendatud IDF (must) koos temperatuuril 4,5 K mõõdetud klorosoomi neeldumise (sinine) ja fluorestsetsi spektriga (punane).

4.4 ΔFLN

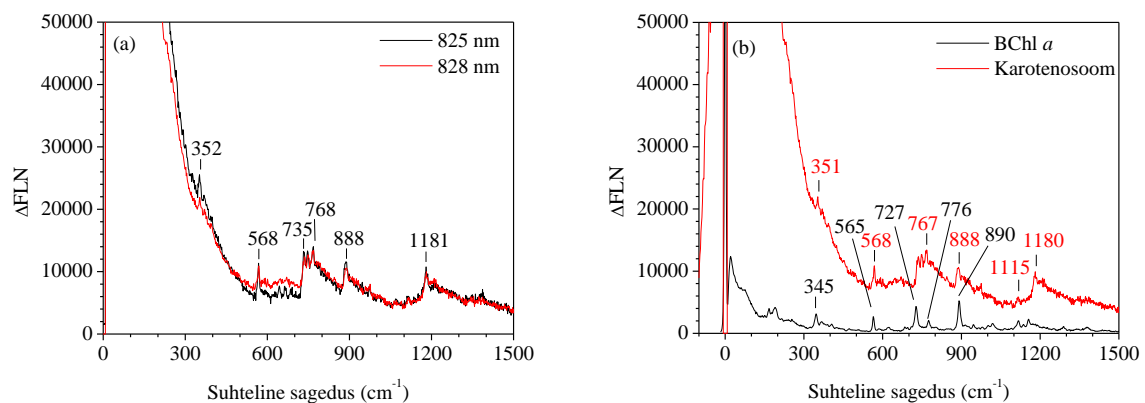
Nagu juba varem öeldud, ΔFLN spektroskoopiat kasutatakse selleks, et fluorestsentsspektrite detaile välja tuua ning määrata elektron-foonon ja vibroonsete interaktsioonide tugevust. Mõõtmisel kasutati spektromeetris keskmise lahutusega (600 joont/mm) spektraalvõret, laseri võimsust 1 mW ja mõõtmisaega 160 s. Objekti ergastati resonantselt erinevatel lainepikkustel 825 nm ümber, mis jääb BChl *a* IDFi maksimumist pikemate lainepikkuste poole ning samaaegselt mõõdeti kiirgust. Ühel ja samal lainepikkusel mõõdeti FLN spekter kahel järjestikusel korral. Vahepeale jäi spektraalsätkamise etapp, mille ajal jätkati proovi valgustamist laseriga. Kiiritusdoosi suurendamiseks pikendati laseriga mõjutamise aega ja korduvate katsetega leiti sobivad doosid. Võttes kahe FLN spektri vahe, saadi ΔFLN spekter. Mõõtmised lainepikkusel 825 nm on esitatud joonisel 16, kus on näha algne FLN spekter

(sinine joon), SHB järgne FLN spekter (punane joon) ja nende vahe ehk Δ FLN spekter (must joon).



Joonis 16. Karotenoosomi FLN ja Δ FLN spektrid, ergastatud 825 nm juures. Nooltega on viidatud Δ FLN spektri foononvabale joonele (ZPL), foonontiivale (PSB) ja võnkestruktuurile. Sinine joon on FLN spekter enne spektraalsätkamise etappi ja punane peale SHB-d.

Δ FLN spektris näeme väga kitsast ja intensiivset foononvaba joont, mis paremal pool (suurematel lainepikkustel) külgneb foonontiiva ning suhteliselt nõrga vibroonse külgribaga. Viimane on võimendatud kujul ja suhteliste sageduste skaalas esitatud joonisel 17. Paneme tähele, et joonis 16 näitab foononvaba joont vaid $\sim 5\%$ ulatuses (95% temast on ära lõigatud).



Joonis 17. (a) 825 nm (must) ja 828 nm (punane) juures ergastatud Δ FLN võnkespektrid. Võnkespektrite juurde on märgitud keskmistatud võnkesagedused pöördseintimeetrites; (b) punane joon on karotenoosomi Δ FLN spekter (ergastatud 825 nm juures) ja must on 780 nm juures ergastatud BChl *a* Δ FLN spekter TEAs (Rätsep jt, 2011 andmed). Välja on toodud mõned intensiivsemad võnkesagedused (± 2 cm⁻¹).

Joonisel 17 a on võrreldud Δ FLN spektreid vibroonses piirkonnas kahel erineval ergastaval lainepikkusel 825 nm (tähistatud punase joonega) ja 828 nm (must). Nendes spektrites selgesti näha olevad võnkumisjooned (keskmistatud võnkesagedused energiaskaalas on märgitud joonisel) kattuvad üksteisega katsevea piires. Joonis 17 b võrdleb omavahel BChl *a* (must, ergastatud 780 nm juures) ja karotenosoomi (punane, ergastus 825 nm juures) Δ FLN võnkespektreid. On näha, et ka sel juhul võnkesagedused ühtivad suures ulatuses, mis veelkord tõestab vastava karotenosoomi spektri seotust BChl *a*-ga.

Tabel 1. Karotenosoomi ja monomeerse BChl *a* võnkesagedused (± 2 cm⁻¹). Spektrid on mõõdetud 4,5 K juures. BChl *a* Δ FLN spektri (TEA lahuses) mõõtmisel ergastati objekti laseriga lainepikkusel 780 nm (Rätsep jt, 2011).

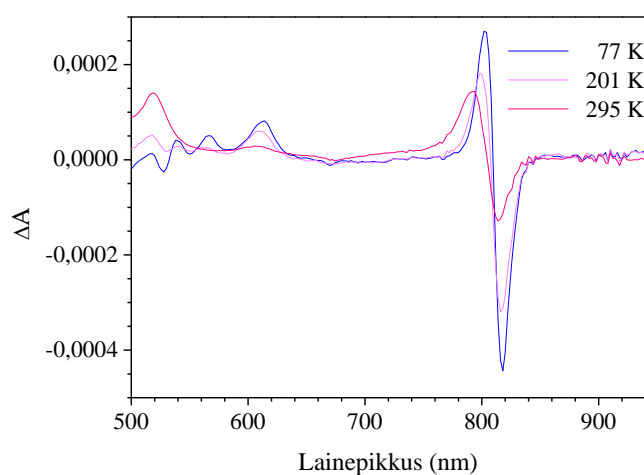
Karotenosoom ergastus: 825 nm	Karotenosoom ergastus: 828 nm	BChl <i>a</i>	Karotenosoom ergastus: 825 nm	Karotenosoom ergastus: 828 nm	BChl <i>a</i>
171	171	167	747	748	
198	199	191	767	768	
351	353	345	777		776
369	369	368	800		803
393	393	388		845	845
	424	423	888	888	890
	441	442	972		967
	477	473	1008		1001
568	568	565		1063	1066
	591	587	1070		1066
644	647			1089	1089
666	670		1115	1116	1117
685		684	1180	1182	1180
691		696		1209	1211
704		710		1215	1211
733	736	727			

Siiski on nende kahe spektri vahel ka erisusi. Silmapaistvaim erinevus on sagedusel 735–768 cm⁻¹, kus karotenosoomis on kolm maksimumi, mis BChl *a* spektris täielikult puuduvad, samas kui viimasel on üks intensiivsemaid maksimume 727 cm⁻¹ juures, mis puudub aga karotenosoomi spektris. Võimalik, et BChl *a* võnkespektris on karotenosoomi puhul toimunud nihkumine ja 735–768 riba on moodustunud intensiivse 727 riba baasil. Huvitav on see, et

riba on selgelt kolmeks jooneks lõhenenud, sellest võib järeldada, et alusplaadis BChl *a* dimeeride paiknemises suur heterogeensus. Täpsemalt saab monomeerse ja alusplaadis paikneva BChl *a* võnkesagedusi võrrelda tabelis 1.

4.5 CD spektroskoopia

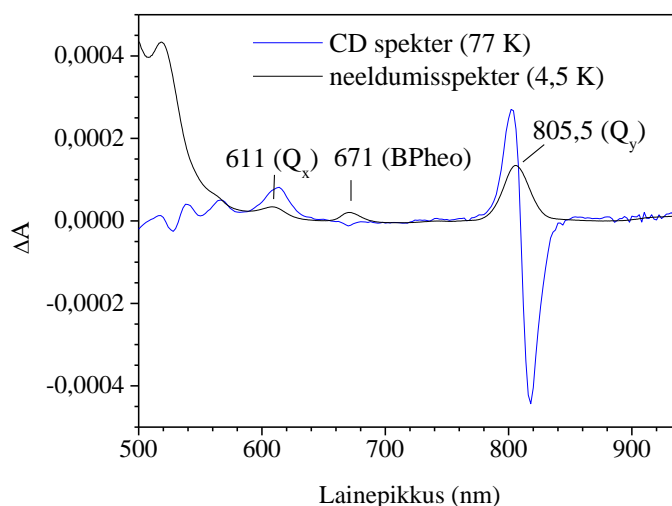
CD spekter annab meile infot molekulide omavaheliste orientatsioonide kohta. Karotenosoomi CD spekter (joonis 18) mõõdeti varieerides proovi temperatuuri vahemikus 77–295 K.



Joonis 18. Karotenosoomi CD spektrid. Mõõtmisi alustati toatemperatuuril ja seejärel langetati järk-järgult temperatuuri kuni 77 K.

BChl *a* Q_y piirkonnas (vt joonis 19) ilmneb CD spektris kaks maksimumi, üks positiivse ja teine negatiivse pöörlemistugevuse väärtusega. Selline spektri kuju on iseloomulik vähemalt kahte elektroonset üleminekut omavatele eksitonidele. CD spektri kuju on esmapilgul konservatiivne, sellel on positiivne ja negatiivne neeldumisriba, mis paiknevad kahel pool Q_y maksimumi, kuid lähemal uurimisel näeme, et neeldumisribade pindalad ei ole ühesuursed. Kõige lihtsam viis selle seletamiseks on, et Q_y üleminek ja teised energeetiliselt lähedalasuvad molekulaarsed energiatasemed (nt Q_x või Soret) on mingil määral omavahel segunenud. Segunemise tulemusel BChl *a* kõrgemad energiatasemed kas „annavad juurde“ või „laenavad“ Q_y taseme pöörlemistugevust. See annab meile vihjeid alusplaadis paiknevate pigmentide omavahelisest orientatsioonist. CD spektris on madalate temperatuuride juures

hästi näha üsna intensiivne neeldumisriba 614 nm juures, mis neeldumisspektri põhjal järeldades pärineb BChl *a* Q_x energiatasemest. Kui selle riba pindala liita CD spektri teise positiivse ribaga, siis saame sama pindala, mis negatiivsel CD maksimumil ning võime järeldada, et alusplaadis BChl *a* molekuli(de) Q_x ja Q_y energia tasemed interakteeruvad. Bakterfeofütiini neeldumispirkonnas (671 nm juures) on CD spektris näha negatiivne maksimum.



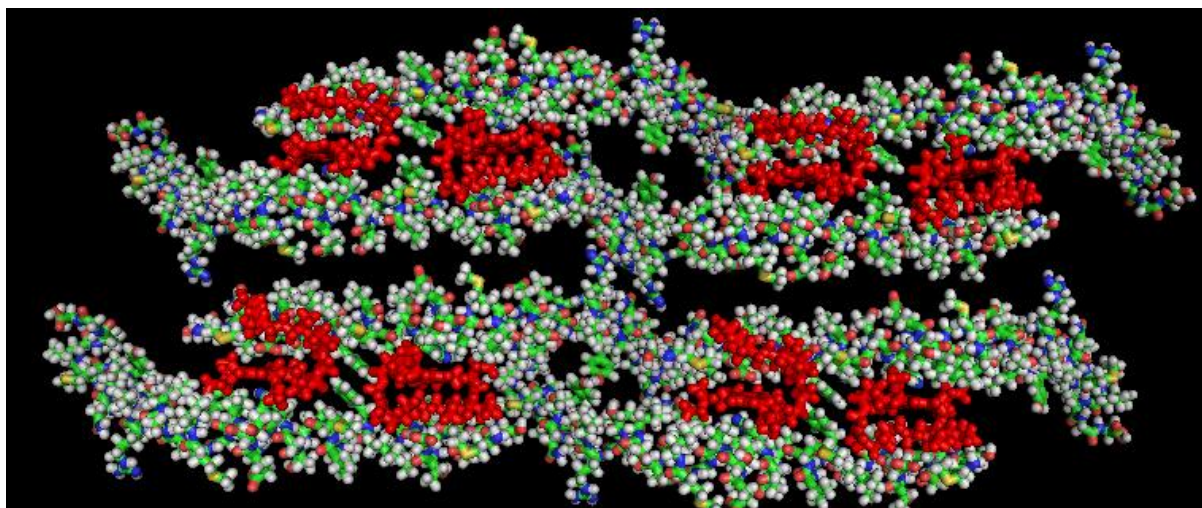
Joonis 19. CD spekter (77 K) (sinine) koos neeldumisspektriga (4,5 K) (must). Joonisele on märgitud neeldumisspektri maksimumide spektraalsed asukohad (nm).

Kuigi spektraalsälkamine eksitoni olemasolu ei tõestanud, võime CD spektri põhjal öelda, et sellised interaktsioonid alusplaadis siiski esinevad. Selgub, et SHB ei ole antud juhul piisavalt tundlik meetod. CD spektrilt (joonis 19) näeme, et neeldumises kajastuvad eksitoni komponendid väga erinevate intensiivsustega. Eksitonaugu puudumisel SHB spektris võib olla kaks põhjust: 1) auk on väga lai ja seetõttu ka madal ja märkamatu võrreldes resonantse sälguga; 2) fotoproduktid katavad võimaliku augu kinni (analoogselt reaalse foonontiivaga).

Jooniselt 18 on veel näha, et CD spektri Q_y ribade intensiivsus tõuseb temperatuuri alandamisel ja tõenäoliselt vibroonsed ribad Q_y piirkonna sinises osas kaotavad oma intensiivsust. Sarnast mehhanismi näeme ka neeldumisspektris, kus Q_y ja karotenoidide riba omavaheline suhe väheneb umbes kaks korda temperatuuri alanedes. Lisaks ei tule madalatel temperatuuridel CD spektri Q_y piirkonnas nähtavale ka lisa maksimume, mille alusel eeldame, et dimeerne BChl *a* moodustab alusplaadi ehituses väikseima ühiku.

CD spektis nähtud tulemused on kooskõlas uurimustega, kus eksitoni olemasolu vähemalt kahe BChl *a* molekuli vahel tõestati CD spektroskoopia abil ka *Chl. limicola* alusplaadi preparaadis (Gerola ja Olson 1986), detergendi mitsellides taastatud *C. tepidum*'i (Pedersen jt, 2008b) ning *Chloroflexus aurantiacus*'e (Montaño jt, 2003b) CsmA ja BChl *a* kompleksis. Eksitoni olemasolu näitab seda, et BChl *a* molekulid on klorosoomi alusplaadis üksteisega lähedalt seotud. Käesolevas töös saadud tulemused toetavad ka Pederseni jt hüpoteesi, et CsmA paikneb *C. tepidum*'i klorosoomi alusplaadis dimeeridena nii, et kaks valguga seotud BChl *a* molekuli paiknevad lähestikku (Pedersen jt, 2008a).

Ülalkirjeldatud CD spektriga saab vastavusse seada Juha M. Linnanto koostatud ja antud töö valmimise ajal veel publitseerimata karotenosoomi alusplaadi struktuurimudeli (joonis 20). Mudel põhineb NMR ja elektronmikroskoopia uuringutel, mille alusel pakuti välja parkümmend võimalikku struktuurimudelit. CD spektroskoopia tulemused koos arvutisimulatsioonidega lubavad neist enamiku kõrvale jätta. Joonisel on esitatud üks võimalik mudel, mis on vastavuses nii käesolevas töös eksperimentaalselt mõõdetud CD ja neeldumisspektriga. Mudelis on BChl *a* molekulid CsmA valguga seotud histidiini jäägi kaudu ning moodustavad dimeerse struktuuri. Dimeeris on porfüriinringid peaaegu risti alusplaadiga (kalle 10–40°) ja ülemineku dipoolmomentide vaheline nurk on 120–160°. Klorofüllide kaugus (Mg-Mg vaheline) dimeeris on ~20 Å (2 nm) ja erinevate dimeeride vaheline kaugus on ~40 Å. Jätkuurintega on loodetavasti võimalik leida unikaalne lahend antud probleemile.



Joonis 20. Karotenosoomi alusplaadi struktuurimudel. Kaheksa BChl *a* molekuli on kujutatud seotud punaste kujunditena, millest moodustub neli paari dimeere. Molekuli tasandid dimeeris on siin üksteise suhtes ~15° võrra pööratud. Iga BChl *a* molekul on seotud ühe CsmA valguga. Erineva värviga kuulikesed märgivad erinevaid aatomeid: roheline – süsinik, sinine – lämmastik, valge – vesinik, punane – hapnik. Struktuurimudel põhineb Juha M. Linnanto arvutustel.

Kokkuvõte

Töö sisuks oli karotenosoomi võimalikult mitmekülgne spektraalne iseloomustamine, selgitamaks tema alusplaadi struktuuri.

Klorosoomid on rohelistes väävlibakterites (*Chlorobi*), filamentsetes mitteoksügeensetes bakterites (*Chloroflexus*) ning aeroobses fototroofis *Candidatus Chloroacidobacterium thermophilum* leiduvad väga efektiivseid valgusantennid, mis on erilised selle poolest, et nad võimaldavad fotosünteesida ekstreemselt nõrga valgusega keskkondades. Selle omaduse tõttu pakuvad nad suurt huvi kunstliku fotosünteesi tehnoloogiate arendamisel.

Alusplaadi spektreid on klorosoomides raske uurida, sest nad kattuvad palju tugevamate, klorosoomide koostises olevate, BChl *c* (ja BChl *a*) spektritega. Käesoleva töö uurimisobjektiks oli *C. tepidum*'i *bchK* geeni mutantsest tüvest puhastatud karotenosoom. Inaktiveeritud geeni *bchK* näol on tegu BChl *c* biosünteesiraja viimase ensüümiga, mistõttu moodustunud mutantsed klorosoomid ehk karotenosoomid ei sisalda BChl *c* molekule.

Töö sissejuhatavas osas antakse ülevaade klorosoomidest ja nende ehitusest, lisaks tutvustatakse pigment-valk komplekside spektroskoopia põhimõisteid ning rakendatud uurimismeetodeid.

Töö katselises osas uuriti klorosoomi alusplaadi omadusi optilise spektroskoopia meetoditega. Esmalt mõõdeti kiirgus- ja neeldumisspektrid toatemperatuuril ja ka väga madalal temperatuuril 4,5 K juures. Detailsematel uuringutel rakendati kõrget spektraalset lahutust võimaldavaid meetodeid, spektraalsätkamist ja selektiivset fluorestsentsi, sellele lisaks ka optilist aktiivsust (käelisust) mõõtvat CD spektroskoopiat.

Karotenosoomi mitmekülgne spektraalne iseloomustamine võimaldas saada andmeid alusplaadi struktuuri ja selles paiknevate BChl *a* molekulide vastastikmõjude kohta. Saadud tulemused lubavad täpsustada alusplaadi ehitust kirjeldavat struktuurimudelit ja on heaks aluseks klorosoomis toimuvate protsesside edasisel modelleerimisel.

Töö põhitulemused:

- Käesolevas töös mõõdetud neeldumis- ja CD spektrite alusel ning toetudes Juha M. Linnanto kvantkeemilistele arvutustele, pakuti välja alusplaadi uus struktuurimudel.

Sellele vastavalt on alusplaadi BChl *a* molekulid dimeriseerunud, molekulide vaheline kaugus dimeeris on 2 nm ning iga molekul dimeeris on seotud ühe CsmA valguga.

- Kinnitust leidis eksitootne vastastikmõju karotenosoomi alusplaadis, kusjuures väikseimaks käsitletavaks ühikuks on BChl *a* molekulidest moodustunud dimeer, mille porfüriinringid on peaaegu risti alusplaadiga (kalle 10–40°) ja ülemineku dipoolmomentide vaheline nurk on 120–160°.
- Alusplaadi Q_y neeldumisriba on heterogeenne; mittehomogeenset laiust kirjeldab Gaussi kujuline jaotusfunktsioon maksimumiga 822,2 ± 0,5 nm kohal ja laiusega 178 ± 15 cm⁻¹. Mittehomogeense riba piires toimub mõõduka kiirusega energia ülekande kõrgemate energiaseisundite poolt kõige alumisele energiaseisundile Ülekandeajad on hinnanguliselt 6 ps ja pikemad.
- Elektron-foonon vastastikmõju karotenosoomi alusplaadis on väike, seda kirjeldav Huang–Rhys faktor jääb vahemikku 0,4...0,7. BChl *a* võnkesagedustes klorosoomi alusplaadis on olulisi erinevusi võrreldes monomeerse BChl *a* sagedustega, mis võib viidata CsmA valguga seotud BChl *a* molekulide konformatsiooni erinevusele võrreldes normaalses lahustites olevate molekulide konformatsiooniga.

Tänuavaldused

Soovin avaldada suurt tänu oma juhendajatele, Margus Rätsepale, Arvi Freibergile ja Juha Matti Linnantole, kes olid suureks abiks töö valmimisel. Soovin tänada ka kõiki teisi biofüüsika laboratooriumi liikmeid nõuannete ja abi eest.

Eriline tänu karotenosoomide valmistamise eest, Niels-Ulrik Frigaard.

Study of interactions between BChl *a* molecules in carotenosome baseplate complex by optical spectroscopy methods

Elerin Albin

Summary

Chlorosomes are the largest known antenna complexes, which is found in green sulfur bacteria (*Chlorobi*), green filamentous bacteria (*Chloroflexi*) and aerobic phototroph *Candidatus Chloroacidobacterium theroophilum*. Its' lipid-protein monolayer surrounds huge amount of self-aggregated BChl *c*, *d*, or *e* molecules and is bound to cytoplasmic membrane via CsmA-BChl *a* baseplate complex. The most prominent property of this antenna is capability to extract energy from extremely low light intensities, including the infrared radiance near deep-sea hydrothermal vents (Beatty *et al.*, 2005).

The object of study is carotenosome, which is roughly flattened chlorosome without the main pigment, BChl *c* (Frigaard *et al.*, 2002). Carotenosomes are isolated from BChl *c*-less, *bchK* mutant of green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* by Niels-Ulrik Frigaards' research group in University of Copenhagen. Carotenosome antenna complex was investigated by techniques of optical spectroscopy at low temperatures (up to 4.5 K).

The aim of this study was to draw conclusions on orientations and interactions between BChl *a* molecules in carotenosome baseplate. This is a part of bigger research of chlorosomes, which also includes quantum chemical calculations and computer simulations to find out the structure of CsmA-BChl *a* baseplate complex.

Carotenosomes were investigated by techniques of optical spectroscopy. First the absorption and fluorescence was measured at room and cryoscopic temperature (~4.5 K). To investigate it in more detail, spectrally selective methods, spectral hole-burning and fluorescence line-narrowing was used. Also, circular dichroism spectroscopy, which measures optical activity (handedness) of molecules, was used.

Wide-range characterization of carotenosomes' spectral properties allowed to obtain data about the structure of baseplate and interactions between BChl *a* molecules in it. The results permit to specify the structure model of baseplate complex and is the basis for further modeling of processes in chlorosomes.

The main results of this study are following:

- On the basis of absorption and circular dichroism spectra and quantum chemical calculations by Juha M. Linnanto, structure model of baseplate was proposed. In the model BChl *a* molecules are binding to histidine residues of CsmA protein and form dimeric building structure with intra-pigment distance of about 20 Å in the dimer unit.
- Excitonic interactions in baseplate complex of carotenosomes were confirmed, whereby smallest unit is considered to be BChl *a* dimers, whose porphyrin planes are almost perpendicular to the baseplate (tilted by 10–40°). The angle between the Q_y transition dipole moments is 120–160°.
- It was identified that the lowest energy (Q_y) absorption band is heterogenous and there is energy transfer to the lowest energy states inside the Q_y band. The lowest energy state is described by Gaussian inhomogeneous distribution function (IDF) centered at 822.2 ± 0.5 nm with a width of 178 ± 15 cm⁻¹. The estimated rates of energy transfer times are 6 ps and longer.
- Electron-phonon coupling in carotenosome baseplate is very weak. This is described by Huang-Rhys factor, which varies between 0.4...0.7. There are some significant differences in vibrational frequencies of BChl *a* in carotenosome compared to monomeric BChl *a*.

Kasutatud kirjandus

- Alster, J., Kabeláč, M., Tuma, R., Pšenčík, J., Burda, J. (2012a). Computational study of short-range interactions in bacteriochlorophyll aggregates. *Computational and Theoretical Chemistry*. 998: 87–97.
- Alster, J., Polivka, T., Arellano, J. B., Hříbek, P., Vácha F., Hála, J., Pšenčík, J., (2012b). Self-assembly and energy transfer in artificial light-harvesting complexes of bacteriochlorophyll *c* with astaxanthin. *Photosynth. Res.* 111: 193–204.
- Alster, J., Zupcanova, A., Vacha, F., Pšenčík, J. (2008). Effect of quinones on formation and properties of bacteriochlorophyll *c* aggregates. *Photosynth. Res.* 95: 183–189.
- Arellano, J. B., Bernt Melø, T., Borrego, C. M., Garcia-Gil, J., Naqvi, K. R. (2000). Nanosecond laser photolysis studies of chlorosomes and artificial aggregates containing bacteriochlorophyll *e*: Evidence for the proximity of carotenoids and bacteriochlorophyll *a* in chlorosomes from *Chlorobium phaeobacteroides* strain CL1401. *Photochemistry and Photobiology*. 72(5): 669–675.
- Balaban, T. S. (2005). Tailoring porphyrins and chlorins for selfassembly in biomimetic artificial antenna systems. *Acc Chem. Res.* 38: 612–623.
- Beatty, J. T., Overmann, J., Lince, M. T., Manske, A. K., Lang, A. S., Blankenship, R. E., Van Dover, C. L., Martinson, T. A., Plumley, F. G. (2005). An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(26): 9306–9310.
- Betti, J., Blankenship, R., Natarajan, L., Dickinson, L., Fuller, R. (1982). Antenna organization and evidence for the function of a new antenna pigment species in the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 680(2): 194–201.
- Blankenship, R. E., Olson, J. M., Miller, M. (1995). Antenna complexes from green photosynthetic bacteria. *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (pp. 399–435) Springer.
- Blankenship, R., Matsuura, K. (2003). Antenna complexes from green photosynthetic bacteria. In B. Green, & W. Parson (Eds.), (pp. 195–217) Springer Netherlands.
- Bryant, D. A., Costas, A. M. G., Maresca, J. A., Chew, A. G. M., Klatt, C. G., Bateson, M. M., Tallon, L. J., Hostetler, J., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., Ward, D. M. (2007). *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: An aerobic phototrophic acidobacterium. *Science*. 317(5837): 523–526.

- Bryant, D. A., Vassilieva, E. V., Frigaard, N., Li, H. (2002). Selective protein extraction from *Chlorobium tepidum* chlorosomes using detergents. evidence that CsmA forms multimers and binds bacteriochlorophyll a. *Biochemistry*. 41(48): 14403–14411.
- Chappaz-Gillot, C., Marek, P. L., Blaive, B. J., Canard, G., Bürck, J., Garab, G., Hahn H. jt (2011). Anisotropic organization and microscopic manipulation of self-assembling synthetic porphyrin microrods that mimic chlorosomes: bacterial light-harvesting systems. *Journal of the American Chemical Society*. 134(2): 944–954.
- Chen, M., Scheer, H. (2013). Extending the limits of natural photosynthesis and implications for technical light harvesting. *J Porphyrins Phthalocyanines* 17:1–15.
- Costas, A. M. G., Tsukatani, Y., Romberger, S. P., Oostergetel, G. T., Boekema, E. J., Golbeck, J. H., Bryant, D. A. (2011). Ultrastructural analysis and identification of envelope proteins of “*Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*” chlorosomes. *Journal of bacteriology*. 193(23): 6701–6711.
- Dratz, E. A., Schultz, A. J., Sauer, K. (1966). Chlorophyll-chlorophyll interactions. *Brookhaven Symp. Biol.* 19: 303–318.
- Eisen, J. A., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J. F., Wu, M., Dodson, R. J., Deboy, R. jt (2002). The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(14): 9509–9514.
- Feick, R. G., Fuller, R. C. (1984). Topography of the photosynthetic apparatus of *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochemistry*. 23(16): 3693–3700.
- Finzi, L., Bustamante, C., Garab, G., Juang, C-B. (1989). Direct observation of large chiral domains in chloroplast thylacoid membranes by differential polarization microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 8748–8752.
- Freiberg, A., Rätsep, M., Timpmann, K., Trinkunas, G. (2009). Excitonic polarons in quasi-one-dimensional LH1 and LH2 bacteriochlorophyll *a* antenna aggregates from photosynthetic bacteria: A wavelength-dependent selective spectroscopy study. *Chemical Physics*. 357(1): 102–112.
- Frenkel, J. (1931). On the Transformation of light into Heat in Solids. I. *Physical Review*. 37: 17.
- Frese, R., Oberheide, U., van Stokkum, I., Van Grondelle, R., Foidl, M., Oelze, J., van Amerongen, H. (1997). The organization of bacteriochlorophyll *c* in chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus* and the structural role of carotenoids and protein. *Photosynthesis Research*. 54(2): 115–126.

- Frigaard, N. U., Bryant, D. A. (2001). Chromosomal gene inactivation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* by natural transformation. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6): 2538–2544.
- Frigaard, N. U., Bryant, D. A. (2004). Seeing green bacteria in a new light: genomics-enabled studies of the photosynthetic apparatus in green sulfur bacteria and filamentous anoxygenic phototrophic bacteria. *Archives of Microbiology*. 182(4): 265–276.
- Frigaard, N. U., Li, H., Milks, K. J., Bryant, D. A. (2004a). Nine mutants of *Chlorobium tepidum* each unable to synthesize a different chlorosome protein still assemble functional chlorosomes. *Journal of bacteriology*. 186(3): 646–653.
- Frigaard, N. U., Maresca, J. A., Yunker, C. E., Jones, A. D., Bryant, D. A. (2004b). Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Journal of bacteriology*. 186(16): 5210–5220.
- Frigaard, N. U., Voigt, G. D., Bryant, D. A. (2002). *Chlorobium tepidum* mutant lacking bacteriochlorophyll *c* made by inactivation of the *bchK* gene, encoding bacteriochlorophyll *c* synthase. *Journal of Bacteriology*. 184(12): 3368–3376.
- Frigaard, N., Li, H., Martinsson, P., Das, S., Frank, H., Aartsma, T., Bryant, D. A. (2005). Isolation and characterization of carotenosomes from a bacteriochlorophyll *c*-less mutant of *Chlorobium tepidum*. *Photosynthesis Research*. 86(1–2): 101–111.
- Frigaard, N-U., Sakuragi, Y., Bryant, D. A. (2004c). Gene inactivation in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 7002 and the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* using in vitro made DNA constructs and natural transformation. *Methods Mol. Biol.* 274: 325–40.
- Fuciman, M., Chábera, P., Župčanová, A., Hříbek, P., Arellano, J. B., Vácha, F., Pšenčík, J., Polívka, T. (2010). Excited state properties of aryl carotenoids. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 12(13): 3112–3120.
- Fünfschilling, J., Glatz, D., Zschokke-Gränacher, I. (1986). Hole-burning spectroscopy as a tool to eliminate inhomogeneous broadening. *J. Lumin.* 36: 85–92.
- Ganapathy, S., Oostergetel, G. T., Wawrzyniak, P. K., Reus, M., Gomez Maqueo Chew, A., Buda, F., Boekema, E. J., Bryant, D. A., Holzwarth, A. R., de Groot, H. J. (2009). Alternating syn-anti bacteriochlorophylls form concentric helical nanotubes in chlorosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(21): 8525–8530.

- Garab, G., Wells, K. S., Finzi, L., Bustamante, C. (1988). Helically organized macroaggregates of pigment-protein complexes in chloroplasts: Evidence from circular intensity differential scattering. *Biochemistry*. 27: 5839–5843.
- Gerola, P. D., Olson, J. M. (1986). A new bacteriochlorophyll *a*-protein complex associated with chlorosomes of green sulfur bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 848(1): 69–76.
- Gorokhovskii, A. A., Kaarli, R. K., Rebane, L. A. (1974). Hole burning in the contour of a pure electronic line in a Shpol'skii system. *JETP letters*. 20: 216.
- Guerrero, R., Montesinos, E., Pedrh-AM, C., Esteve, I., Mas, J., Van Gemerden, H., Hofman, P. A. G., Bakker, J. F. (1985). Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.* 30: 919–931.
- Hayes, J. M., Lyle, P. A., Small, G. J. (1994). A theory for the temperature dependence of hole-burned spectra. *J. Phys. Chem.* 98: 7337–7341
- Huijser, A., Marek, P. L., Savenije, T. J., Siebbeles, L. D. A., Scherer, T., Hauschild, R., Szmytkowski, J., Kalt, H., Hahn, H., Balaban, T. S. (2007). Photosensitization of TiO₂ and SnO₂ by artificial self-assembling mimics of the natural chlorosomal bacteriochlorophylls. *The Journal of Physical Chemistry C* 111(31): 11726–11733.
- Jaaniso, R., Avarmaa, R. (1986). Measurement of the inhomogeneous distribution function and homogeneous spectra of an impurity molecule in a glassy matrix. *Sov. J. Appl. Spectroscopy*. 44(4): 365–370.
- Jankowiak, R., Hayes, J. M., Small, G. J. (1993). Spectral hole-burning spectroscopy in amorphous molecular solids and proteins. *Chem. Rev.* 93: 1471–1502.
- Jankowiak, R., Reppert, M., Zazubovich, V., Pieper, J., Reinot, T. (2011). Site selective and single complex laser-based spectroscopies: a window on excited state electronic structure, excitation energy transfer, and elektron-phonon coupling of selected photosynthetic complexes. *Chem. Rev.* 111: 4546–4598.
- Kim, H., Li, H., Maresca, J. A., Bryant, D. A., Savikhin, S. (2007). Triplet exciton formation as a novel photoprotection mechanism in chlorosomes of *Chlorobium tepidum*. *Biophysical Journal*. 93(1): 192–201.
- Klinger, P., Arellano, J. B., Vacha, F. E., Hala, J., Pšenčík, J. (2004). Effect of carotenoids and monogalactosyl diglyceride on bacteriochlorophyll *c* aggregates in aqueous buffer: implications for the self-assembly of chlorosomes. *Photochem. Photobiol.* 80:572–578.
- Kulminskaya, N. V., Pedersen, M. Ø., Bjerring, M., Underhaug, J., Miller, M., Frigaard, N., et al. (2012). In situ Solid-State NMR spectroscopy of protein in heterogeneous membranes:

- The baseplate antenna complex of *Chlorobaculum tepidum*. *Angewandte Chemie*. 124(28): 6997–7001.
- Li, H. (2006). Organization and function of chlorosome proteins in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. The Pennsylvania State University, University Park.
- Li, H., Bryant, D. A. (2009). Envelope proteins of the CsmB/CsmF and CsmC/CsmD motif families influence the size, shape, and composition of chlorosomes in *Chlorobaculum tepidum*. *Journal of Bacteriology*, 191(22): 7109–7120.
- Li, H., Frigaard, N. U., Bryant, D. A. (2006). Molecular contacts for chlorosome envelope proteins revealed by cross-linking studies with chlorosomes from *Chlorobium tepidum*. *Biochemistry* 45:9095–9103.
- Li, H., Frigaard, N., Bryant, D. A. (2013). [2Fe-2S] proteins in chlorosomes: CsmI and CsmJ participate in light-dependent control of energy transfer in chlorosomes of *Chlorobaculum tepidum*. *Biochemistry*. 52(8): 1321–1330.
- Manske, A. K., Glaeser, J., Kuypers, M. M., Overmann, J. (2005). Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 8049–8060.
- Marschall, E., Jogler, M., Henßge, U., Overmann, J. (2010). Large-scale distribution and activity patterns of an extremely low-light-adapted population of green sulfur bacteria in the Black Sea. *Environmental Microbiology*. 12(5): 1348–1362.
- Martinez-Planells, A., Arellano, J. B., Borrego, C. M., López-Iglesias, C., Gich, F., Garcia-Gil, J. (2002). Determination of the topography and biometry of chlorosomes by atomic force microscopy. *Photosynthesis Research*. 71(1-2): 83-90.
- Mass, O., Pandithavidana, D. R., Ptaszek, M., Santiago, K., Springer, J. W., Jiao, J., Tang, Q. jt (2011). De novo synthesis and properties of analogues of the self-assembling chlorosomal bacteriochlorophylls. *New J Chem* 35:2671.
- Montaño, G. A., Bowen, B. P., LaBelle, J. T., Woodbury, N. W., Pizziconi, V. B., Blankenship, R. E. (2003a). Characterization of *Chlorobium tepidum* chlorosomes: A calculation of bacteriochlorophyll *c* per chlorosome and oligomer modeling. *Biophysical Journal*. 85(4): 2560–2565.
- Montaño, G. A., Wu, H. M., Lin, S., Brune, D. C., Blankenship, R. E. (2003b). Isolation and characterization of the B795 light-harvesting baseplate from the chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochemistry*. 42(34): 10246–10251.

- Niedzwiedzki, D. M., Blankenship, R. E. (2010). Singlet and triplet excited state properties of natural chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Photosynthesis research*. 106(3): 227–238.
- O'Dell, W. B., Beatty, K. J., Tang, J. K. H., Blankenship, R. E., Urban, V. S., O'Neill, H. (2012). Sol–gel entrapped light harvesting antennas: immobilization and stabilization of chlorosomes for energy harvesting. *Journal of Materials Chemistry*. 22(42): 22582–22591.
- Olsen, J. D., Sockalingum, G. D., Robert, B., Hunter, C. N. (1994). Modification of a hydrogen bond to a bacteriochlorophyll a molecule in the light-harvesting 1 antenna of *Rhodobacter sphaeroides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(15): 7124–7128.
- Oostergetel, G. T., Reus, M., Gomez Maqueo Chew, A., Bryant, D. A., Boekema, E. J., Holzwarth, A. R. (2007). Long-range organization of bacteriochlorophyll in chlorosomes of *Chlorobium tepidum* investigated by cryo-electron microscopy. *FEBS Letters*. 581(28): 5435–5439.
- Oostergetel, G. T., van Amerongen, H., Boekema, E. J. (2010). The chlorosome: a prototype for efficient light harvesting in photosynthesis. *Photosynth Res*. 104(2-3): 245–255.
- Orf, G. S., Tank, M., Vogl, K., Niedzwiedzki, D. M., Bryant, D. A., Blankenship, R. E. (2013). Spectroscopic insights into the decreased efficiency of chlorosomes containing bacteriochlorophyll *f*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1827(4): 493–501.
- Overmann, J., Cypionka, H., Pfennig, N. (1992). An extremely low-light-adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnology and Oceanography*. 137(1): 150–155.
- Pedersen, M. Ø., Linnanto, J., Frigaard, N., Nielsen, N. C., Miller, M. (2010). A model of the protein–pigment baseplate complex in chlorosomes of photosynthetic green bacteria. *Photosynthesis Research*. 104(2–3), 233–243.
- Pedersen, M. Ø., Pham, L., Steensgaard, D. B., Miller, M. (2008a). A reconstituted light-harvesting complex from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* containing CsmA and bacteriochlorophyll *a*. *Biochemistry*. 47(5): 1435–1441.
- Pedersen, M. Ø., Underhaug, J., Dittmer, J., Miller, M., Nielsen, N. C. (2008b). The three-dimensional structure of CsmA: A small antenna protein from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *FEBS Letters*. 582(19): 2869–2874.
- Pedersen, M. Ø., Borch, J., Højrup, P., Cox, R. P., Miller, M. (2006). The light-harvesting antenna of *Chlorobium tepidum*: interactions between the FMO protein and the major

- chlorosome protein CsmA studied by surface plasmon resonance. *Photosynth Res.* 89(2-3): 63–9.
- Pieper, J., Irrgang, K.-D., Rätsep, M., Voigt, J., Renger, G., Small, G. J. (2000). Assignment of the lowest Q_y -state and spectral dynamics of the CP29 chlorophyll *a/b* antenna complex of green plants: a hole-burning study. *Photochem. Photobiol.* 71(5): 574–581.
- Pieper, J., Rätsep, M., Irrgang, K.-D., Freiberg, A. (2009). Chromophore-chromophore and chromophore-protein interactions in monomeric light-harvesting complex II of green plants studied by spectral hole burning and fluorescence line narrowing. *J. Phys. Chem. B.* 113: 10870–10880.
- Pšenčík, J., Arellano, J. B., Collins, A. M., Laurinmäki, P., Torkkeli, M., Löflund, B., Serimaa, R. E., Blankenship, R. E., Tuma, R., Butcher, R. J. (2013). Structural and functional roles of carotenoids in chlorosomes. *Journal of Bacteriology.* 195(8): 1727–1734.
- Pšenčík, J., Arellano, J. B., Ikonen, T. P., Borrego, C. M., Laurinmäki, P. A., Butcher, S. J., Serimaa, R. E., Tuma, R. (2006). Internal structure of chlorosomes from brown-colored *Chlorobium* species and the role of carotenoids in their assembly. *Biophys. J.* 91: 1433–1440.
- Pšenčík, J., Collins, A. M., Liljeroos, L., Torkkeli, M., Laurinmäki, P., Ansink, H. M., Ikonen, T. P., Serimaa, R. E., Blankenship, R. E., Tuma, R., Butcher S. J. (2009). Structure of Chlorosomes from the Green Filamentous Bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of bacteriology.* 191(21): 6701–6708.
- Pšenčík, J., Ikonen, T. P., Laurinmäki, P., Merckel, M. C., Butcher, S. J., Serimaa, R. E., Tuma, R. (2004). Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria. *Biophysical Journal.* 87(2): 1165–1172.
- Rebane, K. K. (1970). *Impurity Spectra of Solids*. New York, Plenum Press.
- Reinot, T., Zazubovich, V., Hayes, J. M., Small, G. J. (2001). New insights on persistent nonphotochemical hole burning and its applications to photosynthetic complexes. *J. Phys. Chem. B.* 105(22): 5083–5098.
- Reppert, M., Naibo, V., Jankowiak, R. (2010). Accurate modeling of fluorescence line narrowing difference spectra: direct measurement of the single-site fluorescent spectrum. *J. Chem. Phys.* 133: 014506.
- Rätsep, M., Cai, Z., Reimers, J. R., Freiberg, A. (2011). Demonstration and interpretation of significant asymmetry in the low-resolution and high-resolution Q_y fluorescence and

- absorption spectra of bacteriochlorophyll *a*. *The Journal of Chemical Physics*: 134(2): 024506.
- Rätsep, M., Freiberg, A. (2003). Resonant emission from the B870 exciton state and electron–phonon coupling in the LH2 antenna chromoprotein. *Chemical Physics Letters*. 377(3): 371–376.
- Rätsep, M., Freiberg, A. (2007). Electron–phonon and vibronic couplings in the FMO bacteriochlorophyll *a* antenna complex studied by difference fluorescence line narrowing. *Journal of Luminescence*. 127(1): 251–259.
- Rätsep, M., Hunter, C. N., Olsen, J. D., Freiberg, A. (2005). Band structure and local dynamics of excitons in bacterial light-harvesting complexes revealed by spectrally selective spectroscopy. *Photosynthesis Research*. 86(1–2): 37–48.
- Rätsep, M., Johnson, T., Chitnis, P., Small, G. (2000). The red-absorbing chlorophyll *a* antenna states of photosystem I: A hole-burning study of *Synechocystis sp.* PCC 6803 and its mutants. *The Journal of Physical Chemistry B*. 104(4): 836–847.
- Rätsep, M., Pieper, J., Irrgang, K.-D., Freiberg, A. (2008). Excitation wavelength-dependent electron-phonon and electron-vibrational coupling in the CP29 antenna complex of green plants. *J. Phys. Chem. B*. 112(1): 110–118.
- Saga, Y., Shibata, Y., Itoh, S., Tamiaki, H. (2007). Direct counting of submicrometer-sized photosynthetic apparatus dispersed in medium at cryogenic temperature by confocal laser fluorescence microscopy: Estimation of the number of bacteriochlorophyll *c* in single light-harvesting antenna complexes chlorosomes of green photosynthetic bacteria. *The Journal of Physical Chemistry B*. 111(43): 12605–12609.
- Sakuragi, Y., Frigaard, N., Shimada, K., Matsuura, K. (1999). Association of bacteriochlorophyll *a* with the CsmA protein in chlorosomes of the photosynthetic green filamentous bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1413(3): 172–180.
- Shah, V. B., Orf, G. S., Reisch, S., Harrington, L. B., Prado, M., Blankenship, R. E., Biswas, P. (2012). Characterization and deposition of various light-harvesting antenna complexes by electrospray atomization. *Anal Bioanal Chem*. 404: 2329–2338.
- Smith, K. M., Kehres, L. A. Fajer, J. (1983). Aggregation of the bacteriochlorophylls *c, d*, and *e*. Models for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 1387–1389

- Sørensen, P. G., Cox, R. P., Miller, M. (2008). Chlorosome lipids from chlorobium tepidum: Characterization and quantification of polar lipids and wax esters. *Photosynthesis Research*. 95(2-3): 191–196.
- Szabo, A. (1970). Laser-induced fluorescence-line narrowing in ruby. *Physical Review Letters*. 25(14): 924–926.
- Staehelin, L. A., Golecki, J. R., Drews, G. (1980). Supramolecular organization of chlorosomes (chlorobium vesicles) and of their membrane attachment sites in *Chlorobium Limicola*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 589(1): 30–45.
- Staehelin, L. A., Golecki, J. R., Fuller, R. C., Drews, G. (1978). Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (*Chlorobium* type vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*. *Archives of Microbiology*. 119(3): 269–277.
- Sturgis, J. N., Olsen, J. D., Robert, B., Hunter, C. N. (1997). Functions of conserved tryptophan residues of the core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*. 36(10): 2772–2778.
- Timpmann, K., Rätsep, M., Hunter, C. N., Freiberg, A. (2004). Emitting excitonic polaron states in core LH1 and peripheral LH2 bacterial light-harvesting complexes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 108(29): 10581–10588.
- van Gemerden, H., Mas, J. (1995). Ecology of phototrophic sulfur bacteria. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (pp. 49–85) Springer.
- Vassilieva, E. V., Antonkine, M. L., Zybailov, B. L., Yang, F., Jakobs, C. U., Golbeck, J. H., Bryant, D. A. (2001). Electron transfer may occur in the chlorosome envelope: The CsmI and CsmJ proteins of chlorosomes are 2Fe-2S ferredoxins. *Biochemistry*. 40(2): 464–473.
- Wahlund, T. M., Woese, C. R., Castenholz, R. W., Madigan, M. T. (1991). A thermophilic green sulfur bacterium from new zealand hot springs, *chlorobium tepidum* sp. nov. *Archives of Microbiology*. 156(2): 81–90.
- Wannier, G. (1937). The Structure of Electronic Excitation Levels in Insulating Crystals. *Physical Review*. 52 (3): 191.

Kasutatud veebiaadressid:

¹ <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/phyopt/polclas.html#c3> (25.05.2014)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Elerin Albin

(sünnikuupäev: 17.02.1990)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Karotenosoomi alusplaadis paiknevate BChl *a* molekulide vaheliste interaktsioonide uurimine optilise spektroskoopia meetoditega,

mille juhendajad on Margus Rätsep, Arvi Freiberg ja Juha Matti Linnanto,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014