

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Füüsika Instituut

Alexandra Lehtmets

***Thiorhodovibrio* tüvi 970 optiliste spektrite  
tähelepanuväärse punanihke olemus**

BAKALAURUSETÖÖ (6 EAP)

FÜÜSIKA ERIALA

*Juhendajad:*

Margus Rätsep, PhD

Prof. Arvi Freiberg

# *Thiorhodovibrio* tüvi 970 optiliste spektrite tähelepanuväärse punanihke olemus

Fotosünteesilised organismid – taimed, vetikad ja bakterid – konkureerivad üksteisega oma elutegevuseks vajaliku valgusenergia pärast. Enamik suuremate organismide varjus toimetavad bakterid on kohanenud valgusega 850-875 nm piirkonnas. Erandiks on kaltsiumiioone sisaldav purpurbakter *Thiorhodovibrio* tüvi 970, mille neeldumisspekter on kuni 100 nm rohkem punasesse nihkunud. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli selle iseäraliku punanihke põhjus(t)e ja mehhanismi selgitamine. Baasteadusliku huvi kõrval võiks selline uus teadmine kaasa aidata aktuaalsele rohepöördele energeetikas, näiteks uute tehnilike fotosünteesi elemente konstrueerimise ja valmistamise kaudu.

Probleemi lahenduse otsimisel kombineeriti omavahel erinevaid optilise spektroskoopia meetodeid, millest saadud tulemuste seisukohalt kaalukamad olid kõrgtehnoloogilised spektraalse augusälgamise, diferentsiaalse fluorestsentsikitsenemise, tsirkulaarse dikroismi ja fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektri mõõtmise tehnikad.

Töö põhitulemusena leiti, et *Thiorhodovibrio* tüvi 970 neeldumisspektri suure punanihke põhjuseks võrreldes teiste tuntud purpurbakteritega on oluliselt laiem eksitontsoon, mis iseloomustab tugevamat pigmentide vahelist interaktsiooni. Eksitoninteraktsiooni kasvu seos kaltsiumiioonidega vajab täiendavat uurimist.

Oluliste lisatulemustena tuleb nimetada eksiton-foonon interaktsiooni tugevust iseloomustava Huang-Rhys faktori numbrilise väärtuse ( $1,9 \pm 0,3$ ), eksitoni alumist seisundit iseloomustava mittehomoogeense jaotusfunktsiooni laiuse ( $88 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$ ) ja bakteri termostabiilsust iseloomustava temperatuuri ( $\sim 50 \text{ C}$ ) esmakordset määramist *Thiorhodovibrio* tüvi 970 spektrite kaudu. Need arvud välistavad kirjanduses pakutud punanihke võimaliku seose vastavalt eksiton-foonon interaktsiooni tugevnemisega, süsteemi kasvanud korrastamatusega ja suurenenud termostabiilsusega.

Märksõnad: fotosüntees, tüvi 970, optiline spektroskoopia, spektraalsed nihked

CERCS koodid: P230 Aatomi- ja molekulaarfüüsika, B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

# The origin of the remarkably red-shifted optical spectra of *Thiorhodovibrio* strain 970

Photosynthetic organisms - plants, algae and bacteria - compete with each other for the light energy they need to live. Most bacteria that carry in the shadow of larger organisms have adapted to light in the 850-875 nm range. The exception is the calcium ion-containing purple bacterium *Thiorhodovibrio* strain 970, which has an absorption spectrum shifted up to 100 nm more red. The aim of this bachelor's thesis was to explain the cause(s) and mechanism of this peculiar redshift. In addition to basic scientific interest, such new knowledge could contribute to the current green revolution in energy, for example through the design and manufacture of new artificial photosynthetic elements.

In the search for a solution to the problem, various methods of optical spectroscopy were combined, the most important of which were high-tech spectral hole-burning, differential fluorescence narrowing, circular dichroism and fluorescence anisotropy excitation spectra.

As a main result of the work, it was found that the reason for the large redshift of the absorption spectrum of *Thiorhodovibrio* strain 970 compared to other known purple bacteria is a significantly wider exciton, which characterizes a stronger interaction between pigments. The association of increased exciton interaction with calcium ions needs further investigation.

Important additional results are the first determination of the numerical value of the Huang-Rhys factor characterizing the strength of the exciton-phonon interaction ( $1.9 \pm 0.3$ ), the width of the inhomogeneous distribution function characteristic of the lower state of the exciton ( $88 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$ ) and the temperature characterizing the thermostability of the bacterium ( $\sim 50 \text{ C}$ ) through the spectra of *Thiorhodovibrio* strain 970. These figures rule out the possible association of the redshift suggested in the literature with the intensification of the exciton-phonon interaction, the increased disorder of the system and the increased thermostability, respectively.

Keywords: photosynthesis, strain 970, optical spectroscopy, spectral shifts

CERCS codes: P230 Atomic and molecular physics, B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# Sisukord

<b>Kasutatud lühendid.....</b>	<b>5</b>
<b>Sissejuhatus.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Kirjandusülevaade .....</b>	<b>8</b>
1.1 Fotosünteesi mehhanism purpurbakterites .....	8
1.2 Purpurbakter <i>Thiorhodovibrio</i> tüvi 970.....	12
1.3 Looduses enamlevinud spektrite timmimise võtted .....	13
<b>2. Katsetoodika .....</b>	<b>18</b>
2.1 Proovi ettevalmistamine .....	18
2.2 Aparatuur.....	18
<b>3. Katsetulemused ja nende analüüs.....</b>	<b>20</b>
3.1 Neeldumis- ja fluorestsentsispektrid .....	20
3.2 Kõrglahutusega neeldumisspektrid .....	22
3.3 Kõrglahutusega kiirgusspektrid.....	27
3.4 Fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektrid .....	30
<b>Kokkuvõte .....</b>	<b>33</b>
<b>Kasutatud kirjandus .....</b>	<b>34</b>
<b>Lisad .....</b>	<b>39</b>
Lisa 1: Molekulide kiraalsus ja tsirkulaarse dikroismi spektroskoopia.....	39
Lisa 2: CD spektrid ja termostabiilsus.....	41

## Kasutatud lühendid

- BChl – *bacteriochlorophyll*, bakterklorofüll
- BPhe – *bacteriopheophytin*, bakterfeofütiin
- Car – *carotenoid*, karotenoid
- CCD – *charge coupled device*, laengsidestusseadis
- CD – *circular dichroism*, tsirkulaarne dikroism
- EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid* , etüleendiamiintetraäädikhappe
- FLN – *fluorescence line-narrowing*, fluorestsentsi joone kitsenemine
- FWHM – *full width at half maximum*, täislaius poolel maksimumil
- HB – *hole-burning*, sälkamine
- S-faktor – *Huang-Rhys factor*, Huang-Rhys faktor
- IDF – *inhomogeneous distribution function*, mittehomogeenne jaotusfunktsioon
- LH1 - *light-harvesting complex I*, valgust neelav kompleks 1
- LH2 - *light-harvesting complex II*, valgust neelav kompleks 2
- OD – *optical density*, optiline tihedus
- P-RPV - *right handed circularly polarised light*, paremakäeline ringpolariseeritud valgus
- PSB – *phonon side-band*, foonontiib
- Punanihe (batokroomne nihe) – molekuli spektraalse riba asukoha muutus pikemale lainepikkusele.
- Q<sub>y</sub> – energeetiliselt madalaim (singletne) ergastatud olek
- Q<sub>x</sub> – energeetiliselt madalaim (singletne) ergastatud oleku järgmine energeetiline olek
- *Rba.* – *Rhodobacter*, purpuse mittevävlibakteri perekond
- RC - *reaction center*, reaktsioonitsenter
- *Tch.* – *Thermochromatium*, purpuse vävlibakteri perekond
- TEA – *triethylamine*, trietüülamiin
- *Trv.* – *Thiorhodovibrio* , purpuse vävlibakteri perekond
- *Trv.* tüvi 970 – *Thiorhodovibrio strain 970*, *Thiorhodovibrio* tüvi 970
- V-RPV – *left-handed circularly polarised light*, vasakukäeline ringpolariseeritud valgus
- ZPH – *zero-phonon hole*, foononvaba sälk
- ZPL – *zero-phonon line*, foononvaba joon
- ΔFLN – *difference fluorescence line-narrowing* , spektraalsälgatud fluorestsentsi joone kitsenemine

# Sissejuhatus

Päikesevalgus on Maal põhiliseks elu tagavaks energia allikaks. Päikesevalgus kujundab, toidab ja reguleerib kõiki Maal olevaid eluvorme. Fototroopsed organismid, nagu näiteks taimed, vetikad ja fotosünteesivad bakterid, muudavad päikeseenergia keemilises vormis energiaks täpselt kindlaks määratud fotofüüsikaliste ja fotokeemiliste reaktsioonidega, mida tuntakse üldiselt fotosünteesi mõiste all.

Fotosünteesi käigus olevaid protsesse saab jagada põhimõtteliselt neljaks astmeks. Esimene aste on valguse neeldumine; teine on elektronide transport, kus üks positiivselt laetud nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat ( $\text{NADP}^+$ ) muutub selle redutseerunud vormiks NADPH-ks; kolmas aste on adensiintrifosfaadi (ATP) tootmine ja neljas on süsivesikute saamine süsihappegaasist ( $\text{CO}_2$ ).

Fotosüntees võib toimuda kahte moodi, hapnikuga ja anoksügeenselt. Hapnikuga fotosünteesis redutseeritakse vee abil süsihappegaas süsivesikuteks ning mille oksüdeerumise tagajärjel vabaneb hapnik. Hapnikuga fotosünteesi esineb taimedes, vetikates ja tsüanobakterites. Anoksügeenses fotosünteesis kasutatakse süsihappegaasi redutseerimiseks teisi ühendeid, mida organismid saavad kätte ümbritsevast keskkonnast, näiteks väävel. Anoksügeenne fotosüsteem toimub bakterites, välja arvatud tsüanobakterid, kus eraldub hapnik. [1] Anoksügeensed fotosünteesivad bakterid jagatakse omakorda väävli- ja mitteväävlibakteriteks alusel, et kas nad elementaarväävli fotosünteesil kasutavad ja kui suuri vesiniksulfiidi ( $\text{H}_2\text{S}$ ) kontsentratsioone taluvad. Klorofüllil omavat anoksügeensed fotosünteesijad jagatakse neljaks rühmaks: Purpursed väävlibakterid, purpursed mitteväävlibakterid, rohelised väävlibakterid ja rohelised mitteväävlibakterid. [1]

Üks kõige vanemaid fotosünteesilisi organisme on purpurbakterid. Kuna purpurbakterid pole struktuuriliselt keerulised ning ei ole evolutsiooniliselt palju arenenud, siis on neil üks lihtsamaid teadaolevaid fotosünteesimehhanisme. Tänu sellele on purpurbakterid ideaalsed kandidaadid fotosünteesis toimuvate protsesside uurimiseks.

Käesolevas töös uuriti purpuse väävlibakteri *Thiorhodovibrio* tüvi 970 (edaspidi *Trv.* tüvi 970) neeldumist erinevatel spektroskoopilistel meetoditel. Selle bakteri teeb eriliseks tema võime neelata valgust ebatavaliselt kaugel spektri punases piirkonnas (elusates rakkudes lainepikkusel 963 nm). Sellist nähtust saaks rakendada kunstiliku fotosünteesi elementide valmistamiseks, et toota looduslikku elektrienergiat. Rakendusi leidub ka toidutootmises ja põllumajanduses.

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks on uurida *Trv.* tüvi 970 neeldumist kaugel punases spektrialas ja selgitada välja seda võimaldav füüsikaline mehhanism. Ühes esimeses nimetatud bakterit käsitlevas töös on pikalainelisuse põhjustena pakutud välja tugevat elektron-foonon vastastikmõju ja suurenenud eksiton interaktsioone. [2] Seoses struktuuri määramisega kõrglahutusega on võimaliku põhjusena nähtud  $\text{Ca}^{2+}$  ioonidega täiendatud vesiniksidemete võrgustikku ja struktuuri korrastamatust. [3,4] Võttes arvesse eeltoodud punanihke tekkimise arvatavaid põhjuseid ja tuginedes eelnevatele kogemustele, püstitati hüpoteesiks, et punanihke põhjus on seotud eksitonidega. Töö lisas tuuakse välja uuritava bakteri termostabiilsuse uuringu tulemused, kuna seni kirjeldatud juhtudel on  $\text{Ca}^{2+}$  ioone leitud vaid termofiilsetes bakterites [5,6,7], kuid *Trv.* tüvi 970 esmaleid pärineb mõõduka kliimaga Põhjamere saarelt.

Töö on jaotatud kaheks osaks. Esimeses on ülevaade purpurbakteritest ja looduses enamlevinud spektrite timmimise võtetest. Teises osas on aparatuuri ja katseobjekti ettevalmistamise kirjeldused. Kolmas osa on eksperimentaalne, kuhu alla lähevad katsete kirjeldused, saadud tulemuste esitamine koos vastavate joonistena ning tulemuste analüüs. Uurimustöö lõpus on eksperimentaalse osa kokkuvõte, kasutatud kirjanduse loetelu ning lisas on esitatud *Trv.* tüvi 970 termostabiilsuse uuringu tulemused.

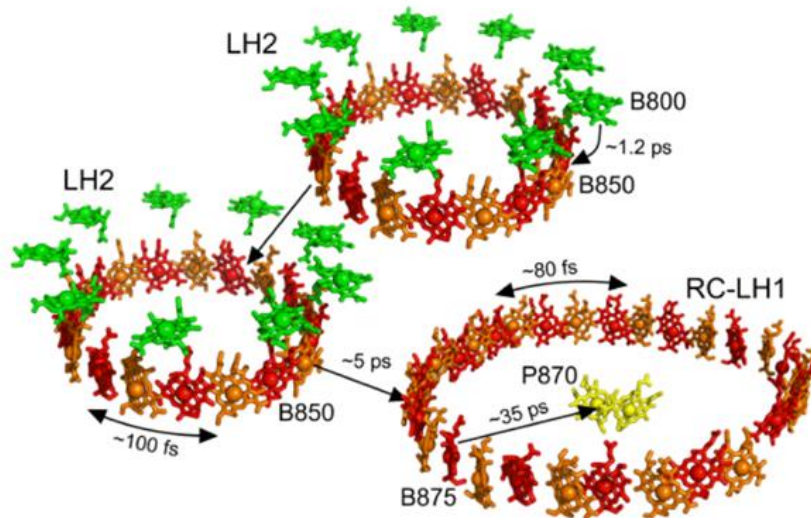
# 1. Kirjandusülevaade

## 1.1 Fotosünteesi mehhanism purpurbakterites

Purpurbakterid on lillakaspunase värvusega anaeroobsete bakterite koondrühm, mis kuuluvad proteobakterite erinevatesse alamhõimkondadesse. Nad eelistavad elada keskkondades, kus leidub vett ja vesiniksulfiidi, näiteks järved, jõed, kanalisatsioonid ja muud mitte sügavad veekogud. Purpurbakterid saavad vee põhjakihis kätte valguse, mida pinnapealsemad organismid pole veel 'neelanud'. Sellisteks valguse piirkondadeks on infrapunase ja roheline valguse piirkonnad, kus neelavad valgust purpurbakteri pigmendid, mis on vastavalt bakteriklorofüllid (BChl - *bakteriochlorophyll*) ja karotenoidid (Car - *carotenoid*).

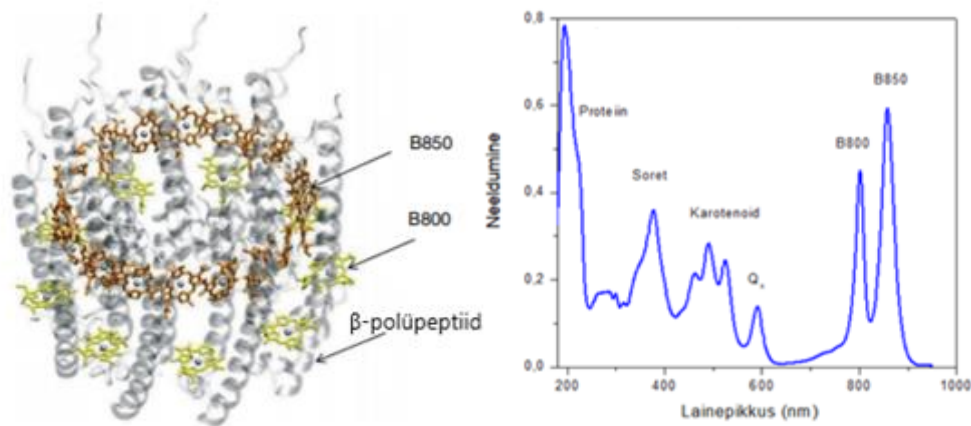
Purpurbakterites toimub anoksügeenne fotosüntees, mis põhineb peamiselt membraanis toimuvatel valgusreaktsioonidel. Purpursed väävlibakterid kasutavad redutseeritud väävliühendeid eksogeense redutseerijana, kus väävliühendite oksüdatsioonil moodustub väävelvesinikust elementaarväävel, kus elementaarväävel on vaheproduktiks ning seda hoitakse ajutiselt rakus. Kui elukeskkonnas hakkab H<sub>2</sub>S sisaldus langema, siis oksüdeeritakse elementaarväävel edasi sulfaadiks. Valgusreaktsioone viivad läbi bakteris pigmendi-valgu kompleksid: valgust neelavad valgusantennid ning fotokeemiline reaktsioonitsenter (RC – *reaction center*) (vaata joonist 1.1) Valgusantennid neelavad päikesekiirgust ning suunavad päikesest kätte saadud energia reaktsioonitsentrisse, kus järgnevalt toimub laengute eraldumine. [8]

Purpurbakteritel on harilikult tsütoplasma membraanis kahte tüüpi valgust neelavaid valgusantenne – sisemine valgusantenn (LH1 – *light-harvesting complex 1*) ja väline valgusantenn (LH2 – *light-harvesting complex 2*). Mõlemad valgusantennid on ringikujulised multimeeride kompleksid, mis koosnevad peamiselt  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiididest, mis hoiavad koos kahte või kolme BChl molekuli. [2] Sisemist valgusantenni LH1 ja reaktsioonitsentrit RC saab võtta üheks üksuseks – LH1-RC kompleksiks ehk tuumikkompleks (vaata joonist 1.3). LH1-RC kompleks on bakteriaalse fotosünteesi keskne osa, mille ülesanne on neelata valgust ja eraldada laengud. LH1 on olemas kõigis fotosünteesilistes purpurbakterites. Paljudel purpurbakteritel on veel lisaks LH2, selle olemasolu ja suhteline kogus sõltub purpurbakteri liigist ja keskkonna tingimustest – mida pimedamas keskkonnas on purpurbakter, seda rohkem on bakteris välist valgusantenn kahte. [8]



Joonis 1.1 : Purpurbakteri fotosünteesi energiaülekannete mehhanismi lihtsustatud skeem. Rohelisega on märgitud LH1 antenni B800 ringi bakterklorofüllid. Oranži ja punasega on tähistatud LH2 antenni B850 ringi ja LH1 antenni B875 ringi bakterklorofüllid. Kollasega on märgitud reaktsioonitsentri P870 bakterklorofüllid. Numbrid B800, B850, ... juures tähistavad vastavate pigmentide neeldumisspektrite maksimume nanomeetrites. Pikosekunditega on märgitud energiaülekannete ajad ja nooltega nende suund. [9]

LH2 on diameetriga  $\sim 68 \text{ \AA}$  rõngakujuline antennikompleks, mis koosneb 8-10 alamüksusest, kus üks alamüksus koosneb kahest rakumembraani läbivast  $\alpha$ - (sisemisest) ja  $\beta$ - (välimisest) polüpeptiididest, kolmest bakterklorofüllist ja ühest karotenoidist. Fotosünteesi valgusreaktsiooni käigus neelab LH2 kindlatel lainepikkustel valgust ning suunab valguse edasi LH1 kaudu reaktsioonitsentrisse. [10] Näiteks purpurbakteri *Rhodoblastus acidophilus* väline valgusantenn LH2 koosneb 27 BChl-a molekulist, mis moodustavad kaks ringi – B800 ja B850. Ringide nimetused tulenevad neeldumismaksimumi asukohast lainepikkuse skaalas. B800 ring, diameetriga  $62,2 \text{ \AA}$ , koosneb üheksast BChl-a molekulist, mis asuvad membraani proteiini tsütoplasma välises pooles. B850 ring diameetriga  $53 \text{ \AA}$  koosneb 18-st BChl-a molekulist periplasma sisemisel poolel (vaata joonist 1.2). B800 ja B850 asuvad membraani  $\alpha$ -heeliksi  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidide vahel, kus 9 karotenoidi ühendavad neid ringe kokku. [11] Lähedistiku paiknevate B850 pigmentide vaheline eksitonmõju viib LH2 neeldumise infrapunasesse (vaata joonise 1.2 spektrit).



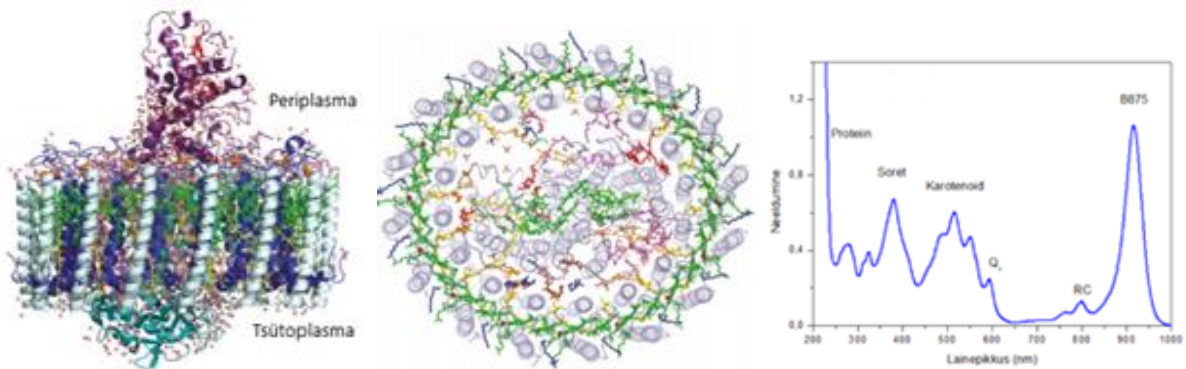
Joonis 1.2: *Rhodospirillum rubrum* LH2 kompleksi lihtsustatud struktuur (puuduvad karotenoidi molekulid ning pooled transmembraansed polüpeptiidi ahelad) ja neeldumisspekter toatemperatuuril. [11]

Karotenoidid on hüdrofoobsed molekulid, mis võivad olla igal purpurbakteri liigil erinevad. Nende roll purpurbakteris on olla nii pigment (valguse neelaja) kui ka struktuuri kindlustav element. Karotenoidide põhiahel koosneb 40 süsiniku aatomist ja ta neelab valgust 500 nm ümbruses. LH2-s seovad karotenoidid omavahel erinevaid alamüksusi.

BChl-a molekulide keskse osa moodustab metallporfüriini (heme) ring. Ring koosneb vesiniksidemetega karbonüülrühmadest, mille keskel on magneesiumi aatom. Bakteriklorofüllid molekulid on mitmeid, aga purpurbakterites esinevad enamasti BChl-a ja BChl-b molekulid. [8]

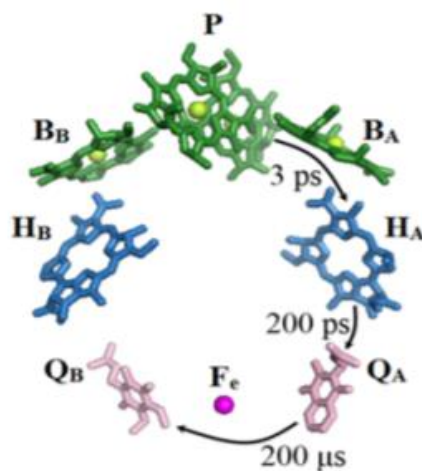
LH1-RC kompleks koosneb reaktsioonitsentrist ja seda ümbritsevast LH1-st, mis on kokku pandud proteiinide alamüksustest (vaata joonist 1.3). LH1  $\alpha\beta$ -heterodimeeride kuju tuumikkompleksis on kas kinnine ring või siis lahtine/kinnine ellips. LH1 ringi tähistatakse traditsiooniliselt B875, olenemata kompleksi täpsest neeldumismaksimumist. Proteiini alamüksusi reaktsioonitsentris nimetatakse H (raske), L (kerge), M (keskmine) ja tsütokroomiks (Cyt – *cytochrome*). HLM kompleks koosneb 4 bakteriklorofüllist, kus kaks bakteriklorofüllid on sümmeetrilises järjestuses ( $P_A$ ,  $P_B$ ), mis moodustavad paari P. Lisaks kaks läheduses olevat lisa-bakteriklorofüllid ( $B_A$ ,  $B_B$ ), kaks bakterifeofütiini (BPhe - *bacteriopheophytin*) ( $H_A$ ,  $H_B$ ) ja 2 kinooni (*quinone*) molekuli ( $Q_A$ ,  $Q_B$ ) (vaata joonist 1.4). Sisemise valgusantenniga kinni püütud valgusenergia kantakse üle reaktsioonitsentrisse, et käivitada fotosünteesiline laengu eraldamine, millele järgneb mitmeid elektronide ülekande reaktsioone. Energiaülekanne valgusantennide ja reaktsioonitsentri vahel käib järgmiselt: LH2-lt kandub energia energeetiliselt "allamäge" LH1-te, sealt edasi energia kandub energeetiliselt

”ülesmäge” reaktsioonitsentrisse (vaata joonist 1.1). Energiaülekanne efektiivsus ja kiirus sisemiselt valgusantennilt reaktsioonitsentrisse oleneb energiaülekanne keelutsooni laiuusest. [12]



Joonis 1.3: *Thermochromatium tepidum* LH1-RC tuumikkompleksi struktuuri külj- ja pealtvaade [5] ning tema neeldumisspekter. [7] Vasakpoolsel külgvaatel on LH1  $\alpha$ -polüpeptiidid värvitud siniseks,  $\beta$ -polüpeptiidid hele-tšiaansiniseks ja RC valgu alamüksused lillaks. Keskmisel pildil on kõik proteiini alamüksused hallid. Bakterklorofüllid on rohelised, *spirilloxanthin* on kollane,  $\text{Ca}^{2+}$ -ioonid on tähistatud oranžide ja vee molekulid roosade täppidena.

Fotosünteesilist bakterite membraani ehituse, LH1-RC ja LH2 komplekside kuju, konformatsiooniliste erinevuste ja üksikute polüpeptiidide struktuuri uurimiseks on kasutusel mitmed meetodid, näiteks krüo-transmissioonelektronmikroskoopia, röntgendifraktsiooni analüüs, tuumamagnetresonants-spektroskoopia ja aatomijõu-mikroskoopia. [8]



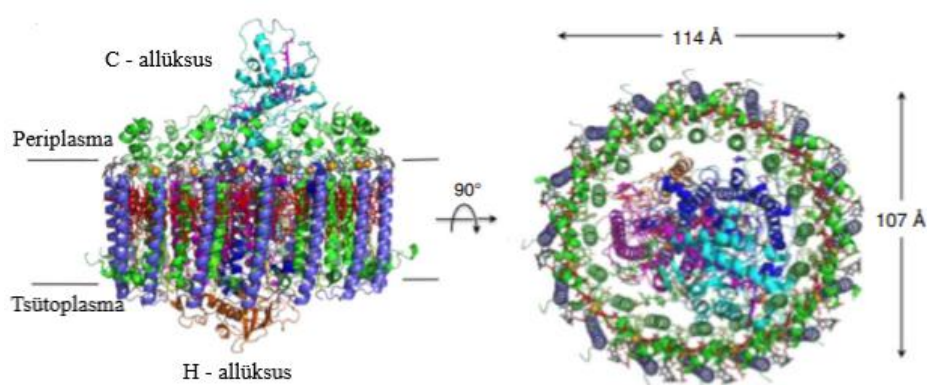
Joonis 1.4: *Blastochloris viridis* reaktsioonitsentri pigmendistruktuur. Spetsiaalse paari P fotoergastusele järgneva elektroni ülekande rada on näidatud nooltega, juures vastavad ülekandeajad mikro- ja pikosekundites. Magneesiumi aatomid bakterklorofüllides on märgitud heleroheliste keradena, eraldi asuva raua aatom lilla kerana. Vaata täiendavaid selgitusi tekstis. [12]

## 1.2 Purpurbakter *Thiorhodovibrio* tüvi 970

Purpurbakter *Trv.* tüvi 970 eraldati Baltrumi saarelt, mis asub Saksamaa rannikul Ida - Friisi saarestikus. *Trv.* tüvi 970 kuulub *Chromatiaceae* sugukonnas *Thiorhodovibrio* perekonda. *Thiorhodovibrio* sugukonnas on tuntumateks bakteriliikideks *Trv. winogradsky* ja *Trv. sibirica*. [2]

*Trv.* tüvi 970 on fototroopne purpurbakter, mille isoleeritud LH1-RC kompleksi neeldumismaksimum asub 963 nm juures, mis on kõige suurema punanihkega neeldumine BChl-a sisaldavates bakterites. Seda neeldumisriba tähistatakse  $Q_y$ , mis on BChl-a madalaima energiaga singletne olek, aga ka B875 purpurbakterite tüüpilise neeldumismaksimumi järgi.

*Trv.* tüvi 970 struktuuri on uuritud ja kirjeldatud krüogeense elektronmikroskoopiaga (krüo-EM), lahutusvõimega 2,82 Å (vaata joonist 1.5). *Trv.* tüvi 970 LH1 allüksused moodustavad suletud ja kergelt elliptilise kaksiksilindri, mis on ühtlaselt jaotunud reaktsioonitsentri ümber. LH1 koosneb 16 paarist  $\alpha\beta$ - polüpeptiididest, 16 kaltsiumioonist, 32 BChl-a molekulist ja 16 karotenoidist. Stõhhiomeetria pigmendi ja  $Ca^{2+}$  vahel on kooskõlas biokeemilisest analüüsist määratud parameetritega. LH1-RC kompleksis asetseb reaktsioonitsenter LH1 kergelt elliptilise ringi keskel ja seob sisemise  $\alpha$ -polüpeptiidi ringi reaktsioonitsentri transmembraanses piirkonnas olevate L- ja M-subühikutega. Reaktsioonitsentri kaasfaktorite hulgas on neli BChl-a molekuli, kaks bakterfeofütiini a, üks menakinoon, üks ubikinoon ja üks 15-cis-karotenoid. LH1 välise ja sisemise polüpeptiidide ringi vahel olevas C-allüksuses asetsevad 16 Ca-iooni. [3]



Joonis 1.5: *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi struktuur kül- ja pealtvaates. Kahepoolsete nooltega on näidatud välimise  $\beta$ -polüpeptiidide ringi mõõtmed. LH1  $\alpha$ -polüpeptiidid on rohelised,  $\beta$ -polüpeptiidid on tumesinised; RC valgu L-alamühik on tähistatud violetsena, M-alamühik sinisena, C-alamühik tsüaniidina, H-alamühik oranžina; BChl-a kromofoorid on kujutatud punasega; kuldsed kerad, mis on nähtavad valgu ja ümbritseva valgu piirpinnal, tähistavad  $Ca^{2+}$ ioone. [4]

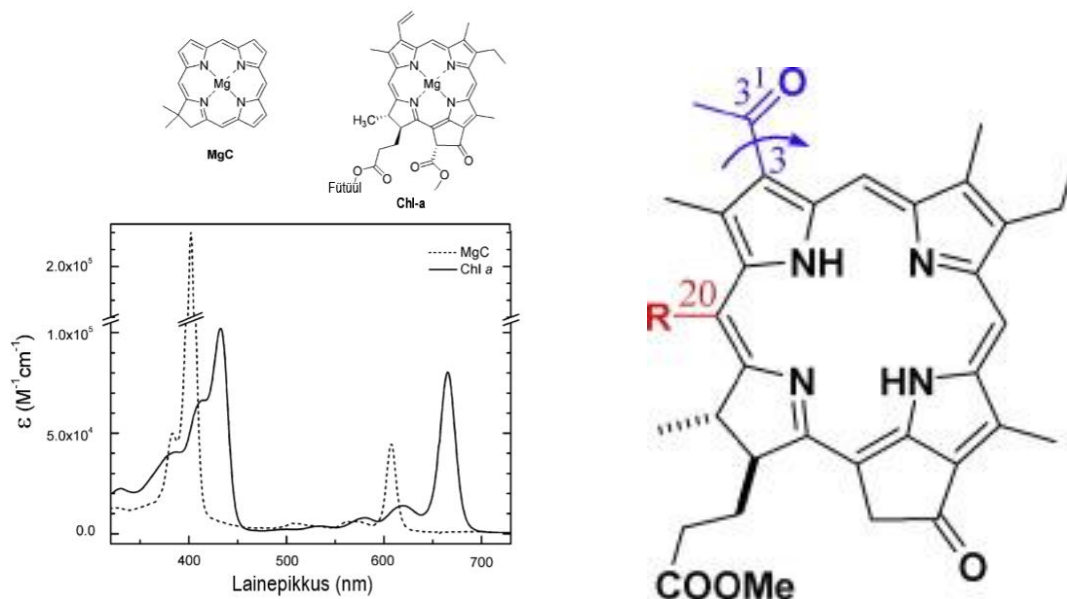
*Trv.* tüvi 970-s struktuuris on olulised Ca-ioonid. Kui kahandada kaltsiumiioonide arvu, siis nihkub  $Q_y$  neeldumisriba 959 nanomeetrilt 875 nanomeetrile. Kui lisada tagasi kaltsiumiioonid, siis algsed spektraalsed omadused taastuvad. Tähelestatud on ka asjaolu, et *Trv.* tüvi 970 ei kasva kultuuris, kus ei ole piisavalt Ca-ioone. [3] Sellisest käitumisest nähtub, et *Trv.* tüvi 970 on integreerinud kaltsiumiioonid enda LH1-RC kompleksi, et suurendada oma valguse kogumise võimet infrapunases spektriosas, kus teised purpurbakterid ei konkureeri valguse pärast.

### 1.3 Looduses enamlevinud spektrite timmimise võtted

Fotosünteesilistel organismidel takistavad päikesevalguse efektiivset kogumist peamiselt looduskeskkondade erinevused ja päikesevalguse koguse muut aja jooksul, mille tagajärjel võib tekkida fotosünteesimehhanismides liigne ergastus, fotokahjustus või isegi organismi surm. Nende takistuste ületamiseks on loodus kasutusele võtnud erinevad mehhanisme, mis timmivad fotosünteesiliste organismide valgust neelavate komplekside neeldumisspektreid. Spektraalset timmimist saab saavutada erinevate vahenditega. [13,14] Konkreetselt purpurbakterite puhul on valguse neeldumise seisukohast oluline uurida BChl-a molekuli  $Q_y$  neeldumisriba energiat kontrollivaid tegureid, sealhulgas bakterklorofüllid keskset metalliooni, külghelaid ja nende konformatsiooni, keskkonna polaarsust ja molekulide omavahelist seostumist ehk agregeerimist. [13]

Keskne metallioon (milleks on magneesiumi ioon, vaata joonist 1.6) muutmine võib nihutada BChl-a neeldumisspektrit. Kuid seda looduslikult ei kasutata, kuna keskse metalliooni muutmine võib dramaatiliselt muuta BChl-a ergastatud oleku dünaamikat, mis omakorda vähendab valguse neeldumise efektiivsust.

Külghelate suur mõju optiliste spektrite asukohale ja kujule on hästi näha joonisel 1.6. [13,16] Üks tähtsamaid külghelaid on atsetüülkarbonüülrühm (joonisel 1.6), mille konformatsioon avaldab olulist mõju makrotsükli biofüüsikalistele omadustele. Kui atsetüülkarbonüülrühm on molekuli tasapinnas, siis  $Q_y$  neeldumisriba on kõige punasemas asendis. Rühma tasapinnast välja pöördel nihkub spekter sinisesse. Maksimaalne sininihe (mis sõltuvalt tingimustest võib ulatuda 40 nm) vastab ristiasendile. Atsetüülrühma pöörlemise reguleerimine, millega muudetakse  $Q_y$  üleminekule vastava konjugeeritud elektronsüsteemi ruumilist ulatust (konjugeeritud ahela pikkust), on levinud viis BChl-a molekuli elektronide siirdeenergiate timmimiseks. Ahel on pikim, kui rühm on molekuli tasandis ja lüheneb tasapinnast välja pöördel. [1,13,17,18]



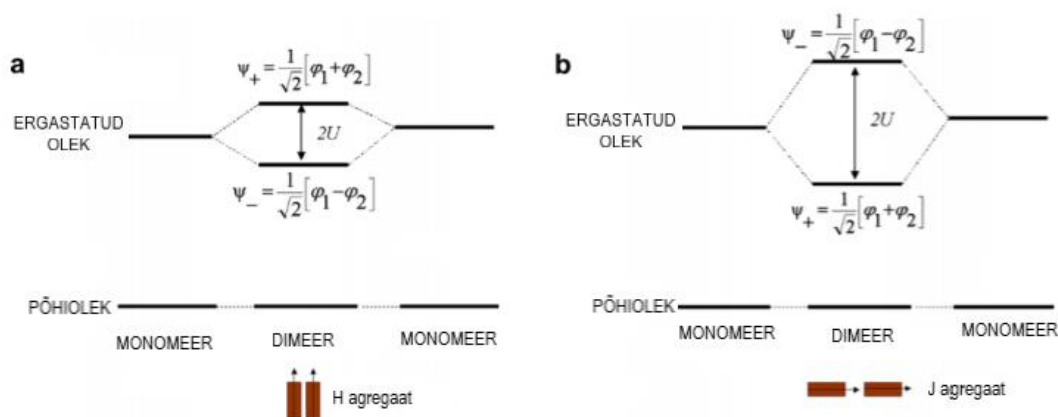
Joonis 1.6: Vasakul joonisel on kujutatud toluenis lahustunud magneesiumkloriid ja klorofüll-a neeldumisspektrite võrdlus ning nende molekulaarne struktuur. [19] Paremalt joonisel on BChl-a struktuur, kus sinisega on ära märgitud atsetüülkarbonüülrühm ja sinise noolega selle rühma pööre. [15]

Bakteriaalsetes pigment-valgu kompleksides sätitakse atsetüülkarbonüülrühma soovitud asend paika BChl-a ja teatud valgu aminohape jääkide (tavaliselt trüptofaani ja/või türosiini) vahel moodustuvate vesiniksidemetega.

Elementaarse ettekujutuse keskkonna mõjust BChl-a spektrile saab tema neeldumisspektri mõõtmise kaudu erinevates orgaanilistes lahustes. Need mõjud on suhteliselt nõrgad, põhjustades  $Q_y$  riba nihkeid umbes 5 nm. Valgu hüdrofoobsesse keskkonda maetud punktlaengud võivad põhjustada oluliselt suuremaid efekte. Spektrite nihked sõltuvad nii punktlaengu märgist kui ka punktlaengu asukohast BChl-a molekuli tasandi suhtes. [13]

Antud töö seisukohalt kõige olulisem mehhanism valgust neelavate komplekside spektrite asukoha ja kuju mudimiseks on pigmendimolekulide agregeerimine. Kui kahest identsest BChl-a molekulist moodustada dimeer (vaata joonist 1.7), siis molekulide vahelise interaktsiooni tõttu asenduvad üks ühel ja teine teisel molekulil lokaliseerunud isoenergeetilist ( $e$  kõdunud) singletset ergastatud olekut kahe erineva energiaga olekuga, milles samaaegselt osalevad mõlemad molekulid. Neid delokaliseeritud elektronseisundeid nimetatakse eksitonseisunditeks (ning vastavaid kvantosakesi eksitonideks). Eksitonidest täpsemalt on ülejäärgmises lõigus. Spektrite keeles rääkides tekib monomeersele BChl-a molekulile vastava ühe neeldumisjoone

(näiteks  $Q_y$ ) asemel kaks  $Q_y$  tüüpi eksitoni neeldumisriba, millest üks on madalama energiaga ja teine suurema energiaga.



Joonis 1.7: Kromfooride dipolaarsest ühinemisest dimeeriks tulenev energiatasemete jagunemine. Joonisel näidatakse eksitonide sümmeetrilist ( $\Psi_+$ ) ja ( $\Psi_-$ ) antisümmeetrilist ühinemist, kui kromfooridel on (a) H-agregaadi geometria ja (b) J-agregaadi geometriaga. [20]

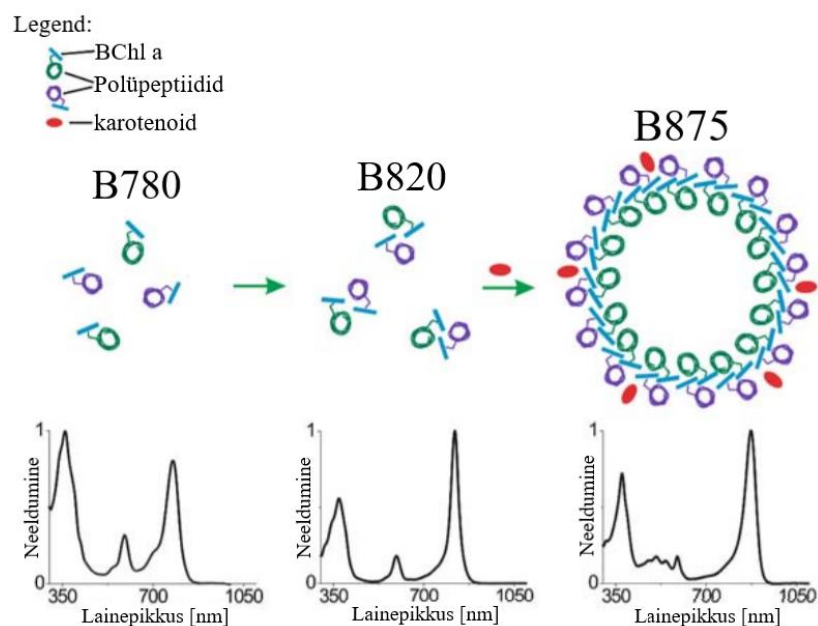
Üldjuhul on kahe eksitontsooni vaheline energeetiline lõhe seda suurem, mida tugevamini on dimeeri osapooled omavahel seotud. [13,16] Eksitontsooni laius ehk energeetiline lõhe  $2U$  (vaata joonist 1.7) on kromfooride omavahelise interaktsiooni energia, mis on ligilähedane monomeeride üleminekudipoolmomentide vahelise Coulombi interaktsiooniga. Interaktsiooni energia  $U$  on antud järgmiselt:

$$U = - \frac{(3 \cos \theta_1 \cos \theta_2 - \cos \theta_{12})|\mu|^2}{4\pi\epsilon_0 r^3}, \quad (1)$$

kus  $1/r^3$  on dipoolmomentide vaheline kaugus,  $\epsilon_0$  on dielektriline konstant,  $\mu$  on üleminekudipoolmoment,  $\theta_{12}$  on kahe dipoolmomendi vaheline nurk,  $\theta_1$  on nurk 1. dipoolmomendi ja dipoolmomentide vahelise telje vahel ning  $\theta_2$  on nurk 2. dipoolmomendi ja dipoolmomentide vahelise telje vahel. [20] Valemist (1) näeb, et lõhe ning kahe eksitontsooni intensiivsuste omavaheline suhe sõltub ka agregaadi geometriast.

Eksitoni mõiste leidis esmalt kasutamist kristallilistes süsteemides, kus selle all mõisteti elektroni ja augu vahelist elektrostaatiliselt seotud olekut. [21] See olek levib kristallvõres, kandes edasi impulssi ja energiat, kuid mitte laengut. Bioloogilistele süsteemidele, sealhulgas fotosünteesilistele valgusantennidele, rakendatav molekulaarse eksitoni mõiste on laiem. [22] Kui molekulid on üksteisele piisavalt lähedal ja interakteeruvad tugevalt, siis vastavalt kvantmehaanikale ei saa öelda, milline molekul on antud ajahetkel ergastunud. Eksiton tähistab

siin elektronergastust, mis on samaaegselt ja koherentselt jaotunud kahe või enama molekuli peale. Eksiton on lineaarne kombinatsioon erinevate molekulide ergastustest. Igale molekuli elektronüleminekule vastab N eksitonseisundit, kus N on interakteeruvate molekulide arv agregaadis. Näiteks on LH2 antenni B850 ringis 18 omavahel tugevalt seotud BChl-a molekuli, mille optiliselt lubatud singletseid elektronsiirdeid (madalamalt energialt alustades) tähistatakse kui  $Q_y$ ,  $Q_x$  jne. Siis igale molekuli elektronsiirdele vastab 18 eksitoni, mis üksteisest eristuvad nii oma lainefunktsiooni ruumilise jaotuse kui ka energia poolest. [23] Energiatasemete energeetiline jaotus on seda laiem, mida tugevamad on molekulidevahelised eksitoninteraktsioonid, aga vastavate üleminekute ostsillaatori jõud (st. eksitonspektrite nähtav kuju) on määratud molekulide omavahelise geomeetriaga agregaadis. Valgust neelavates kompleksides parandavad eksitonid päikeseenergia neelamise tõhusust, kuna spekter laieneb ja tekib võimalus spektri nihutamiseks organismi seisukohalt soodsamasse (vähem kasutatud) spektrialasse, nagu kirjeldatud eelmises peatükis ja demonstreeritud joonisel 1.8.



Joonis 1.8: LH1 moodustumise etapid koos vastavate spektritega. Monomeerne  $\alpha$ -heeliksiga mittekovalentselt seotud BChl-a neelab ~780-nm lainepikkusega valgust, dimeerne BChl-a lainepikkusel 820 nm ja kõrgemat järku multimeerne BChl-a ring veelgi pikemal lainepikkusel 875 nm. B780 ühikute dimeriseerumist, mille tulemusena tekivad B820 (ehk  $\alpha\beta(\text{BChl-a})_2$ ) ühikud, põhjustavad interaktsioonid pigmentide ja/või polüpeptiidide vahel. Sarnastel põhjustel oligomeriseeruvad B820 ühikud suuremateks B870 ( $16 \alpha\beta(\text{BChl-a})_2$ ) ühikuteks. Oligomeeride  $Q_y$  neeldumisriba punanihe võrreldes B780 neeldumisega tuleneb suuresti pigmentide vahelisest eksiton-vastastikmõjudest. Joonise koostamisel on aluseks artikkel [24].

Nõrga elektroonse vastastikmõju korral kandub ergastus üle pigem lokaliseeritud olekutena. Väga nõrga vastastikmõju korral on erinevused eksitonide ja individuaalsete molekulide spektrite vahel minimaalsed, andes vaid väikseid spektraalseid häireid.

## 2. Katsemetoodika

### 2.1 Proovi ettevalmistamine

Katseobjektina kasutati *Trv.* tüvi 970 isoleeritud LH1-RC proovi, mis saadi kontsentreeritud kujul ( $OD_{967\text{nm}} = 28 \text{ cm}^{-1}$ ) professor Wang-Otomo laborist (Ibaraki University, Jaapan), kus need olid kasvatatud ja rakkudest eraldatud vastavalt kirjeldusele artiklites [3,4]. Proovi säilitati sügavkülmikus temperatuuril  $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ . Optiliseks mõõtmiseks valmistati sobiva kontsentratsiooniga proov, lahjendades seda proovile spetsiifilise puhvriga.

Enne katsete tegemist katseobjekte lahjendati 20 mM Tris-HCl puhvriga (pH 8,0) ja lisati 0,05% n-dodetsüül-P-D-maltopüranosiidi ehk DDM detergendi, et vältida LH1-RC komplekside agregatsiooni. Stabiilse küllastunud  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni säilitamiseks pandi katseobjektile juurde 60 mM  $\text{CaCl}_2$  lahust. Sobiva kontsentratsiooniga Tris-HCl puhvri, DDM detergendi ja  $\text{CaCl}_2$  lahused valmistati vastavatest kontsentreeritud lahustest, lisades sinna ülipuhast mQ vett.

Madala temperatuuri mõõtmisel, umbes 4,5 K juures, pandi katseobjektile juurde glütseriini mahu suhtega 1:2, et proovi tahkestumisel tagada pragudeta klaasjas katseobjekt. Glütseriini lisamisel oli vajalik suurendada ka detergendi kontsentratsiooni kuni 0,12 protsendini.

### 2.2 Aparatuur

Katseskeem ja aparatuur on kujutatud joonisel 2.1. Laia valge spektriga volframlampi BPS100 (BWTek) kasutati neeldumise mõõtmisel stabiliseeritud valgusallikana, selle värvustemperatuur on 2700 K. Sobiva spektraalse koostise ja intensiivsusega valguse saamiseks nõrgendati lambi valgust mattklaasist hajutitega ja kujundati spektrit värviliste klaasfiltritega. Spektrite mõõtmiseks suunati proovi läbinud valgus spektrograafi Shamrock SR-303i (Andor Technology), mille fookuskaugus on 0,3 m. Enne mõõtmist kalibreeriti spektromeetri skaala neon-argoon (Ne-Ar) jooni sisaldava kalibreerimislambi abil, et kindlustada piisav spektraalne täpsus. Spektromeetris oli võimalik valida kolme eri omadustega võre vahel (150, 600 ja 1800 joont/mm), mis tagasid vastavalt võrele spektraalse lahutuse (ühe piksli väärtus) 0,56 , 0,13 ja 0,032 nm ja spektraalakna 570, 134 ja 32 nm. Spektrograafi väljundtasandis asus termoelektriliselt jahutatav CCD kaameraga DV420A-OE (Andor Technology, UK).

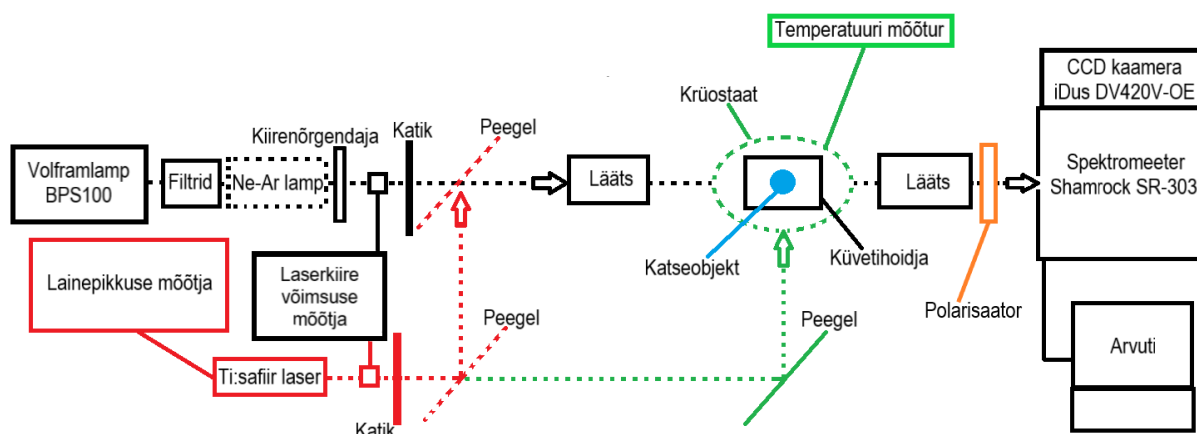
Selektiivse fluorestsentsi ja spektraalsätkamise mõõtmisel kasutati ergastamiseks kitsa spektri-

joonega titaan-safiir (Ti:safiir) laserit mudel 3900S (Spectra Physics), mille tööpiirkond on 700-1040 nm ja joone laius  $0,5 \text{ cm}^{-1}$ . Ti:safiir laserit pumbatakse tahke keha laseriga Millennia Prime (Spectra Physics). Mitteselektiivse fluorestsentsi ergastamiseks kasutati 407 nm diodlaserit võimsusega 5 mW. Fluorestsentsispektrid korrigeeriti vastavalt kasutatud aparatuuri spektraalsele tundlikkusele.

Mõõtmiseks temperatuuril  $4,7 \pm 0,5 \text{ K}$  pandi  $5 \times 10 \text{ mm}$  PMMA plastikküvetid (Brand) vedela heelium krüostaati (Utreks). Hajumise vähendamiseks hoiti vedela heeliumi nivood allpool küveti. Temperatuuri mõõtmiseks kasutati kalibreeritud ränidiodi koos mudel 211 regulaatoriga (Lakeshore Crytronics).

Tsirkulaarse dikroismi mõõtmiseks kasutati Chirscan Plus (Applied Photophysics) spektrofotomeetrit, mille optiline skeem on kujutatud lisa 1 joonisel L1.1. Spektromeetri mõõtepiirkond on 180-1100 nm ja spektraalne lahutus 0,5-4 nm. Termostabiliseeritud rakuhooidja võimaldab kasutada 0,1-10 mm teepikkusega küvette ja muuta temperatuuri sujuvalt 10-90 °C ulatuses. Küvettidena leidsid enim kasutust 0,1 ja 2 mm kvartsküvetid (Hellma Analytics). CD spektrite mõõtmisel on proovi spektrist lahutatud maha eelnevalt mõõdetud puhvri taustspekter.

Andmete töötlemiseks ja jooniste tegemiseks kasutati järgmisi programme: Origin 6.0 (Microcal Software), Spectra Solve (versioon 2.01 PRO: Thermomutant, LASTEK Pty. Ltd.) ja Pro-Data Viewer (Applied Photophysics).



Joonis 2.1: Katseskeem, kus mustaga on kujutatud neeldumisspektrite mõõtmise osa ja punasega fluorestsentsispektrite mõõtmise osa. Rohelisega kujutatud osa kasutatakse madalatel temperatuuridel ja fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektrite (juurde tuleb oranžiga märgitud polarisaator) läbi viidud mõõtmistel. Seejuures eemaldatakse alumine punane peegel. Seadme kalibreerimiseks kasutati Ne-Ar lampi.

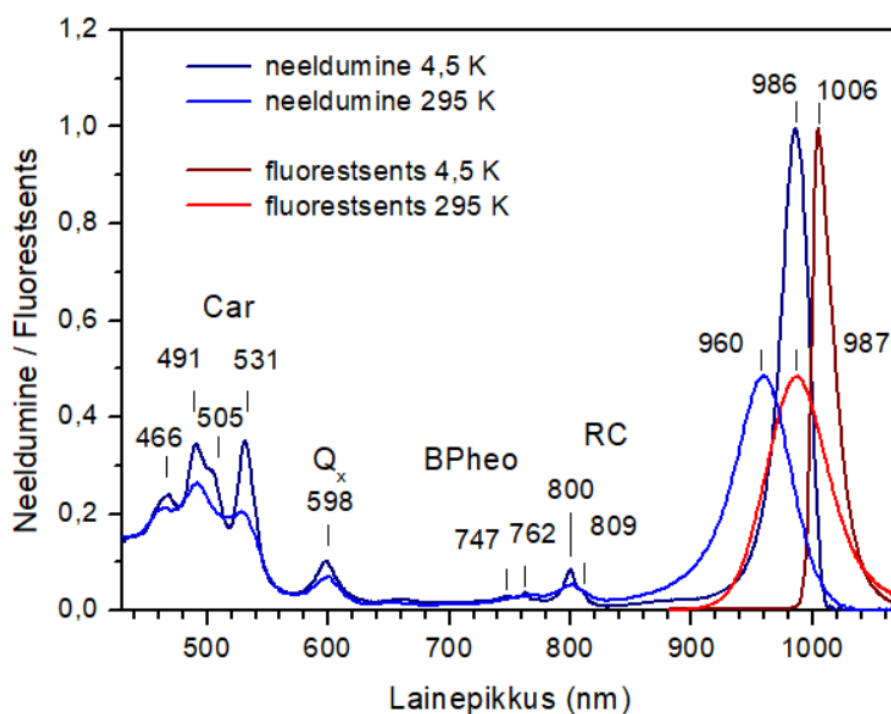
## 3. Katsetulemused ja nende analüüs

### 3.1 Neeldumis- ja fluorestsentsispektrid

Trv. tüvi 970 LH1-RC komplekside neeldumis- ja fluorestsentsispektrid on näidatud joonisel 3.1. Esmalt mõõdeti proovi neeldumine toatemperatuuril ning joonisel on neeldumisspektrid antud optilise tihedusena ( $OD$  – *optical density*) ehk neelduvuse suurusega, mis on määratletud proovile pealelangeva valguse intensiivsuse ja läbituleva valguse intensiivsuse logaritmilise suhtena.

Toatemperatuuril mõõdetud proovi neeldumisriba maksimum on lainepikkusel 960 nm ja selle neeldumisriba laius on  $593\text{ cm}^{-1}$ . Madalal temperatuuril 4,5 K juures nihkub neeldumisriba 987 nanomeetrile ja laius väheneb  $272\text{ cm}^{-1}$ -ni. Neeldumisribade laiuse all peetakse silmas täislaiust poolel kõrgusel riba maksimumist ( $FWHM$  – *full width at half maximum*). Seda LH1 antenni neeldumisriba kutsutakse B875-ks, mis on sama tähistus kõigil purpurbakteritel. Nõrka neeldumisriba, mis asub lainepikkuste 730 nm ja 820 nm vahel, seostatakse RC kompleksi pigmendi kofaktoritega. [2] Lainepikkuste 747 ja 763 nm vahemikus olevad neeldumisribad kuuluvad kahele BPheo-a molekulile ning lainepikkuste 800 ja 810 piirkonnas olevad ribad kuuluvad RC kompleksi kahele lisa-bakterklorofüllile. BChl-de ülemineku  $Q_x$  neeldumisriba on lainepikkusel 598 nm ja karotenoidide neeldumisribasid on näha lainepikkustel 461 nm, 466 nm, 505 nm ja 531 nm. Need neeldumisribad on lühematel lainepikkustel (umbes 21-24 nm) võrreldes *Tch. tepidum* karotenoidide neeldumisribade lainepikkustega. [3]

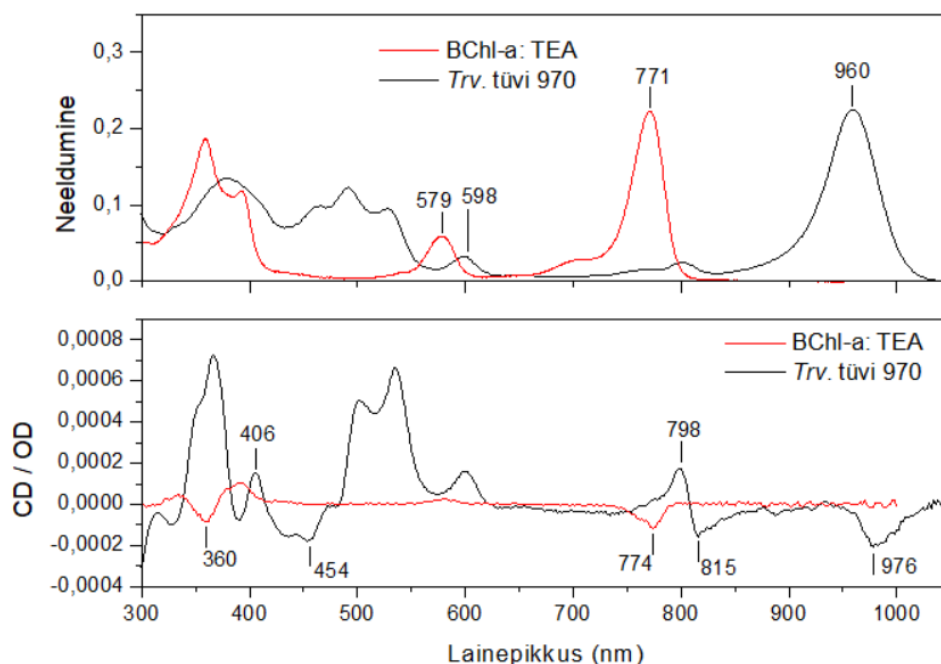
Fluorestsentsispektril LH1 antenni maksimum asub toatemperatuuril lainepikkusel 986 nm ja vastava riba laius on  $617\text{ cm}^{-1}$ . 4,5 K juures nihkub maksimum 1005 nm juurde ja laius väheneb  $210\text{ cm}^{-1}$ -ni. Fluorestsentsiriba madalal temperatuuril kitseneb võrreldes toatemperatuurse fluorestsentsiga kuna see tuleneb enamasti madalaima energia tasemest, lisaks vähenevad temperatuuri alanedes nii homogeenne kui mittehomogeenne laienemine. [25]



Joonis 3.1: *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi neeldumise (sinine) ja fluorestsentsi (punane) spektrid temperatuuridel 4,5 K ja 295 K. Numbritega on näidatud spektriribade asukohad nanomeetrites.

Jooniselt on näha, et *Trv.* tüvi 970-l eristuvad madalal temperatuuril kaks BPheo neeldumisriba, mis on ka järgmistel purpurbakteritel – *Rhodobium marinum* ja *Rhodovibrio sodomensis*. Neeldumisspektril olev lisabakterklorofüllide neeldumispiirkond 800 nm juures on sarnase kujuga nagu on täheldatud ka *Rba. sphaeroidese* isoleeritud reaktsioonitsentritel ja *Rhodobium marinumi* membraanides. [2] Kõrgema energiaga LH1 eksitonseisundid joonisel 3.1 kattuvad RC neeldumisribaga.

Joonise 3.2 ülasos on *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi neeldumisspektrit võrreldud trietüülamiinis (TEA - *triethylamine*) lahustunud BChl-a spektriga temperatuuril 295 K. Madala kasutatud kontsentratsiooni ( $\sim 3 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ ) tõttu on pigmendiolekud lahuses monomeersel kujul.



Joonis 3.2: *Trv. tüvi 970* LH1-RC kompleksi (must joon) ja TEA-s lahustatud monomeerse BChl-a (punane joon) neeldumise (ülemine raam) ja CD (alumine raam) spektrite võrdlus temperatuuril 295 K.

Toodud joonis illustreerib hästi ebatavaliselt suurt punanihet LH1-RC kompleksi ja monomeerse BChl-a neeldumisribade vahel, mis  $Q_y$  riba korral ulatub lausa 189 nm (960 nm versus 771 nm), aga on märkimisväärselt suur (19 nm) ka  $Q_x$  riba puhul (598 nm versus 579 nm). Töös näitame, et suurem osa  $Q_y$  riba nihkest on eksiton päritolu.

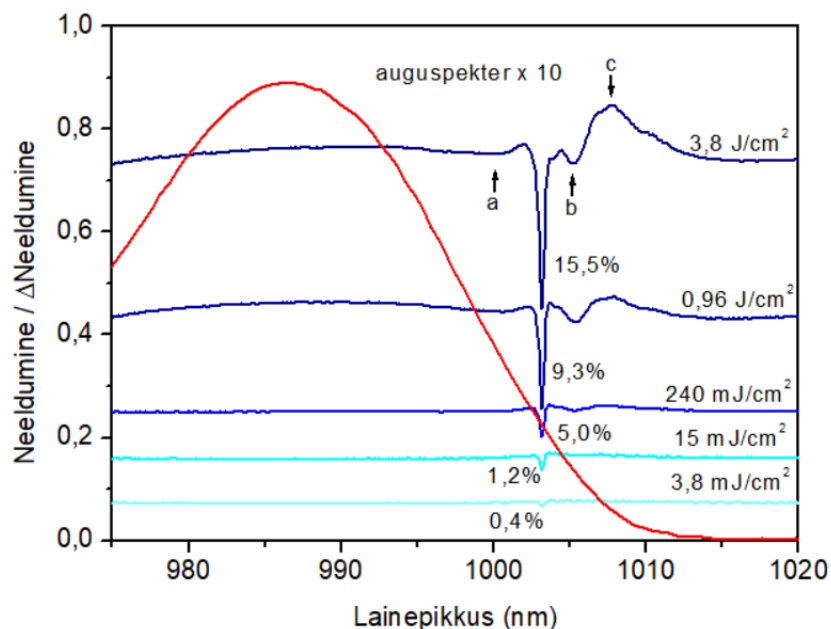
Eksitonide tekkimisega kaasneb tihti tugev CD signaal. See on ka põhjuseks, miks bakterklorofüllil monomeerses ja multimeerses (nagu LH1-RC kompleksis) olekus näeme erineva tugevusega CD signaale. Siiski on LH1 antennile vastav CD signaal 976 nm juures suhteliselt nõrk, olles vaid ligikaudu 2 korda tugevam kui monomeerse BChl-a signaal lainepikkusel 774 nm. LH1-RC kompleksi CD spektris on 800 nm piirkonnas näha iseloomulik vahelduva polaarsusega riba, mis osaliselt kattub monomeerse BChl-a  $Q_y$  spektriga. Selle spektri päritolu on peaaegu eranditult RC kompleks. CD spektroskoopia kohta on kirjutatud põhjalikult töö lisas. Detailsem LH1-RC kompleksi CD spektri analüüs väljub selle töö raamest.

### 3.2 Kõrglahutusega neeldumisspektrid

Spektraalsätkamise spektroskoopia meetodi abil saab kindlaks teha madalaima energiaga eksitonseisundi spektraalse asukoha (seega ka fluorestsentsi lähteasukohta) ja

mittehomogeense laienemise arvulise väärtuse. Rohkem infot spektraalsälkamise kohta leiab artiklitest [26,27,28]. Spektrite sälkamiseks kasutati kitsa spektrijoonega Ti:safiir laserit, mis suunati madalal temperatuuril olevale proovile. Laseriga proovi valgustamine mõne aja jooksul põhjustas proovis laseri lainepikkusel neelduvate molekulide arvu vähenemise, mille tagajärjel tuli spektrisse "sälk" vastaval lainepikkusel. Sälkspekter saadakse siis, kui laseriga mõjutatud neeldumisspektrist lahutakse maha esialgne neeldumisspekter. Laseriga tekitatud kitsast sätku neeldumisspektris nimetatakse foononvabaks auguks (ZPH - *zero-phonon hole*) ja selle laius annab homogeense laienemise suuruse (Antud katses oli ZPH laius määratud peamiselt siiski mõõtesüsteemi spektraalse lahutusega). Spektris on ka ZPH-st kõrgema energiaga foonontiib (PSB - *phonon side-band*) ja madalamal energial asub pseudo-PSB. Lisaks on spektrites tihti eristatav ka anti-auk (*anti-hole*) ehk fotoprodukt mis on tavaliselt sälgu suhtes rohkem sinise spektripiirkonna poole ja seda põhjustab sälkamisega kaasnev molekulide ümberjaotamine mittehomogeense jaotusfunktsiooni (IDF - *inhomogeneous distribution function*) ulatuses. [28]

Erinevate põletusdoosidega sälkspektrid on näidatud joonisel 3.3. Lainepikkusel 1003,5 nm sälgati proovi korduvalt erinevate põletusdoosidega vahemikus  $3,8 \text{ mJ/cm}^2$  kuni  $3,8 \text{ J/cm}^2$  temperatuuril 4,5 K. Joonisel olev suur negatiivne sälk on foononvaba auk. Mida suuremaks läks põletusdoos, seda sügavamaks läks ZPH sügavus, kuigi nad ei sõltu üksteisest lineaarselt.



Joonis 3.3: Erinevate põletusdoosidega saadud kitsas foononvabale joonele vastav sälk 1003,5 nm juures. Nooled osutuvad foonontiivale (a), pseudo-foonontiivale (b) ja anti-augule (c). LH1-RC kompleksi neeldumine on joonisel kujutatud punase joonega. Sälgu sügavus on antud protsendides.

Suurendades põletusdoosi suurust tuleb paremini nähtavale anti-auk (joonisel tähistatud noolega c), mis on põhjustatud ümberjaotunud molekulide (fotoprodukti) neeldumisest. Lisaks on põletusdoosil 3,8 J/cm<sup>2</sup> selgelt näha ka foonontiib (a) ja pseudo-foonontiib (b). Anti-auk muutub paremini nähtavaks kõrgematel põletamisdoosidel tänu ZPH küllastumisele, mis moonutab tugevasti reaali- kui ka pseudo-foonontiiba.

Elektron-foonon vastastikmõju kirjeldab Huang-Rhys faktor (dimensioonitu arv) ehk S-faktor. S - faktorit saab leida järgmise valemiga

$$e^{-S} = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PSB}}, \quad (2)$$

kus  $I_{ZPL}$  on foononvaba joone ja  $I_{PSB}$  on foonontiiva integraalsed intensiivsused. [29] Ülemist piiri saab hinnata ka foononvaba sälgu maksimaalse sügavuse järgi, kasutades järgmist seost:

$$e^{-S} = \frac{\Delta A_{max}}{A}, \quad (3)$$

kus  $\frac{\Delta A_{max}}{A}$  on augu suhteline sügavus. [30] Põletusdoosiga 3,8 J/cm<sup>2</sup> on augu suhteline sügavus 15,5% lainepikkusel 1003,5 nm, sellele vastab valemi (3) kohaselt S-faktori:

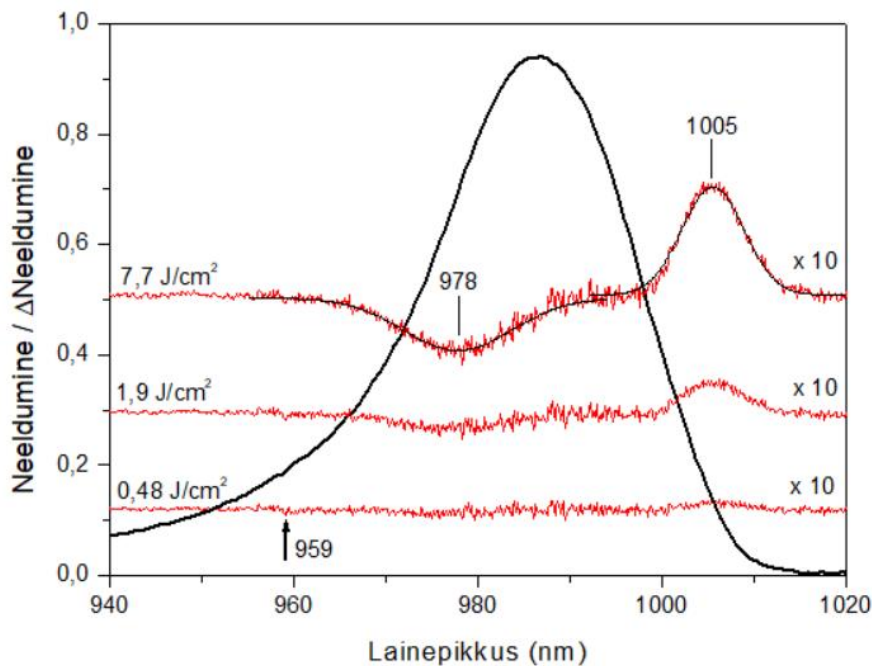
$S = -\ln\left(\frac{\Delta A_{max}}{A}\right) \approx 1,9$ . Valem (3) ei ole rangelt täpne, vaid annab ligikaudse hinnangu Huang-Rhys faktori väärtuse ülempiirile. Tabelist 1. näeb, et *Trv.* tüvi 970 Huang-Rhys faktor on samas suurusjärgus teiste purpurbakterite S-faktoritega.

**Tabel 1.** *Rba. sphaeroidese* LH1 ja LH2, *Tch. tepidum* LH1 ja *Trv.* tüvi 970 LH1 IDF-i andmed ja Huang-Rhys faktor temperatuuril 4,5 K. IDF asukoht ja laius on saadud Gaussi jaotusfunktsioonist ja S-faktor on leitud valemi (3) järgi.

Bakter	Valgusantenn	IDF asukoht	IDF laius	S-faktor	Viide
<i>Rba. sphaeroides</i>	LH1-RC	900,1 ± 0,2 nm	121 ± 10 cm <sup>-1</sup>	1,6	[25,27]
	LH2	870,5 ± 0,2 nm	150 ± 10 cm <sup>-1</sup>	2,0	[25,27]
<i>Tch. tepidum</i>	LH1-RC	951,3 ± 0,8 nm	117 ± 20 cm <sup>-1</sup>	2,1	[29]
<i>Trv.</i> tüvi 970	LH1-RC	1002,8 ± 0,8 nm	88 ± 12 cm <sup>-1</sup>	1,9	Käesolev töö

Mitteresonantse spektraalsätkamise spektrid laserergastusel 959 nm on esitatud joonisel 3.4. Lainepikkusel 959 nm on näha vaid väga nõrka resonantset sätku, kui sätkamise tulemusena tekib lai mitteresonantne auk laiusega  $146 \text{ cm}^{-1}$  lainepikkusel 978 nm. Lisaks tekib spektrisse fotoproduktide põhjustatud anti-auk asukohaga 1005 nm ja laiusega  $79 \text{ cm}^{-1}$ . *Trv.* tüvi 970 IDF laius  $88 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$  on seni leitud kõikide tsükliliste fotosünteesiliste kompleksidest kõige teravam, hoolimata *Trv.* tüvi 970  $\alpha$ -polüpeptiidide heterogeensest sisaldusest. [4]

Eksperimenti määramatuse piirides on positiivsete ja negatiivsete muutuste piirkonnad, mida saab tõlgendada kui intensiivsuste ümberjaotamist eksitonseisundite vahel. See võib tuleneda sellest, et laseri ergastuse tagajärjel tekib fotofüüsikaline protsess, tänu millele eksitonseisundite osakaal muutub.

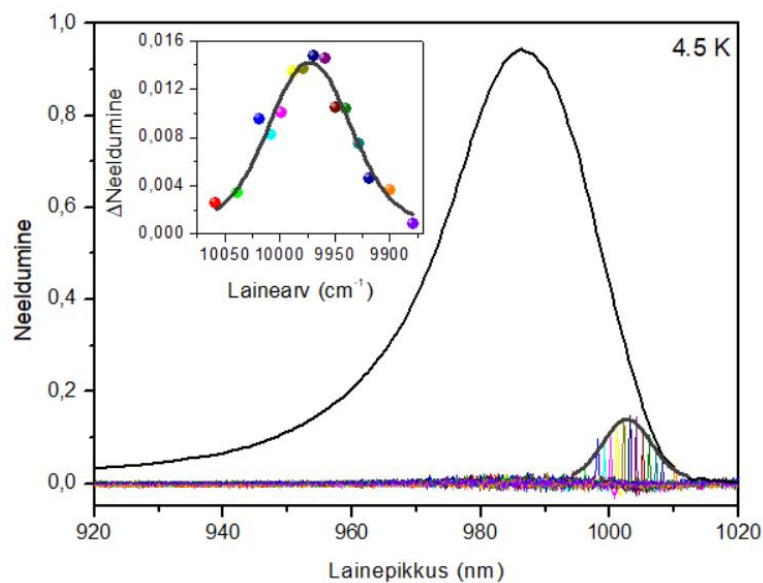


Joonis 3.4: Erinevatel põletusdoosidel saadud mitteresonantselt (lainepikkusel 959 nm) ergastatud selektiivspektrid temperatuuril 4,5 K. Joonisel toodud 978 nm augu Gaussi lähenduse laius on  $146 \text{ cm}^{-1}$  ja 1005 nm anti-augu laius  $79 \text{ cm}^{-1}$ . Parema nähtavuse huvides on viimased läbi korrutatud koefitsiendiga 10 ning pikki vertikaaltelge üksteise suhtes nihutatud. Mustad jooned tähistavad mõõdetud spektrite mudellähendusi. Taustal on näha objekti neeldumisspekter.

Madalaima energetilise (eksiton) oleku asukoht määratakse sätkamise mõjuspektroskoopia meetodil, kasutades võimalikult väikest (et vältida sätku küllastumist) kuid konstantset põletusdoosi erinevatel lainepikkustel neeldumisspektri pikalainelises piirkonnas.

Mittehomogeenne jaotusfunktsioon saadakse ZPH sälkude sügavuse jaotusest sõltuvalt sälkamise lainepikkusest. Optimaalne põletusdoos leiti eelnevalt doosist sõltuvast spektraalsätkamisest lainepikkusel 1003,5 nm, vt joonist 3.3.

Saadud mõjuspekter, mis on mittehomogeenne jaotusfunktsioon IDF, ja selle Gaussi lähendamine on näidatud joonisel 3.5. ZPH mõjuspekter saadi põletuslainepikkuste skaneerimisel sammuga 1-2 nm üle madalaima energiaga eksitoni olekus, kus põletusdoosiks 15 mJ/cm<sup>2</sup>. Mõjuspektri iga sälk tähistab üht mõõtmist ja sälgude sügavus iseloomustab pigmentide suhtelist arvu antud lainepikkusel. Sälkude mähisjoont on lähendatud Gaussi jaotusfunktsiooniga, mille maksimum on 1002,8 ± 0,8 nm ja laius (FWHM) on 88 ± 12 nm. Saadud maksimum ja laius on mõistlikult lähedane eelnevalt mitteresonantse spektraalsätkamise tulemusena saadud anti-augu parameetritele lainepikkusel 1005 nm. Joonise 3.5 aknas on esitatud sälkude sügavus värviliste kuulikestena ja nendele vastav Gaussi jaotus (hall pidevjoon) lainearvude skaalas.



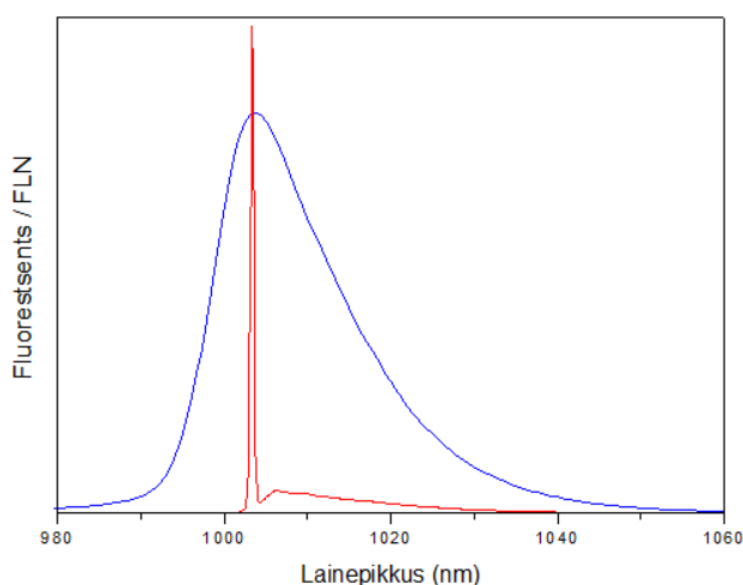
Joonis 3.5: Joonis 3.4: *Trv*. Tüvi 970 LH1-RC kompleksi eksitoni kõige alumise seisundi mittehomogeense laienemise hindamine foononvabade joonte (värvilised kitsad jooned, skaalat on parema nähtavuse huvides meelevaldsel suurendatud) mõjuspektri mõõtmise kaudu. Lisaaknas on korrektses skaalas esitatud mõjuspekter (värvilised täpid) ja selle Gaussi lähendus funktsioonina (must kõver)

Mõjuspektri saamiseks korrati katset mitu korda, tulemused jäid mõõtevea piirides samaks. Kõige parem tulemus (katsepunktide hajumise suhtes) on välja toodud joonisel 3.5. Saadud mittehomogeenne jaotusfunktsioon on silmnähtavamalt kitsam kui teistel samasugustel

purpurbakteritel. Siit saab järeldada, et *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi struktuur on korrastatum kui teistel bakteritel nagu näiteks *Tch. tepidum*, mille Gaussi jaotusfunktsiooni laius on  $117 \pm 20 \text{ cm}^{-1}$ . [29]

### 3.3 Kõrglahutusega kiirgusspektrid

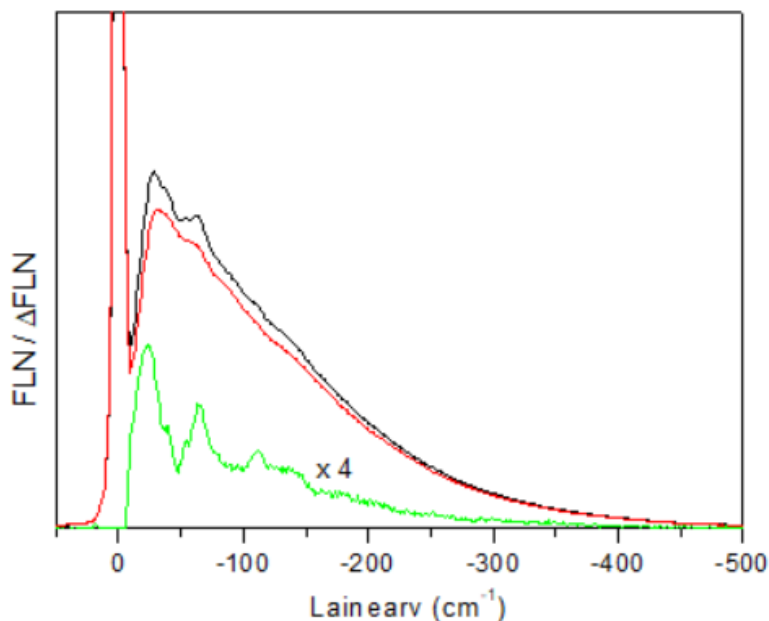
Joonisel 3.6 on võrreldud tavapäraselt (sinine joon, ergastus 407 nm juures) ja selektiivselt ergastatud kiirgusspektrit temperatuuril 4,5 K. Ilmekalt on näha, et proovi resonantsel ergastamisel spektri kuju oluliselt muutub. Spektris tuleb esile kitsas resonantne joon ergastuslainepikkusel 1004 nm ja selle kõrval väiksema intensiivsusega lai kõrvalriba, mis on suures osas põhjustatud foonontiiva poolt. Sellist spektrit nimetatakse kitsenenud fluorestsentsjoonega (FLN - *fluorescence line-narrowing*) spektriks. Kitsenemise põhjuseks on mittehomoogeensuse mahasurumine, kuna ergastatakse vaid lainepikkusel 1004 nm neelavaid molekule. Seevastu mitteresonantsel ergastusel molekulid ergastuvad ühtlaselt kogu mittehomoogeense jaotuse IDF piirides ja tulemuseks on laiaribaline kiirgus. Kitsas resonantne joon on summa kahest komponendist: foononvaba kiirgus (ZPL - *zero-phonon line*) ja hajunud laseri panus, kus viimast saab paljudel juhtudel elimineerida  $\Delta$ FLN meetodil, kuid antud proovis see meetod ei töötanud, kuna segavaks teguriks oli tugeva antisälgu teke 1005 nm juures, vaata joonist 3.4.



Joonis 3.6: *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi mitteresonantselt ergastatud (lainepikkusel 407 nm) fluorestsentsispekter (sinine) võrreldes resonantselt ergastatud (lainepikkusel 1004 nm) fluorestsentsikitsenemise (FLN, punane) spektriga temperatuuril 4,5 K.

Mitthehomogeensuse täiendavaks mahasurumiseks rakendati lisaks selektiivsele ergastamisele veel spektraalsälgamist kahe järjestikuse FLN spektri mõõtmise vahel. Seda meetodit nimetatakse spektraalsälgatud fluorestsentsjoone kitsenemise ( $\Delta$ FLN) spektroskoopiaks [27] ja kasutatakse foonontiiva detailse kuju ning elektron-foonon vastastikmõju määramiseks. Üldjuhul on  $\Delta$ FLN spektris väga kitsas ja intensiivne foononvaba joon, mis suurematel lainepikkustel külgneb foonontiiva ja suhteliselt nõrga vibroonse külgribaga.

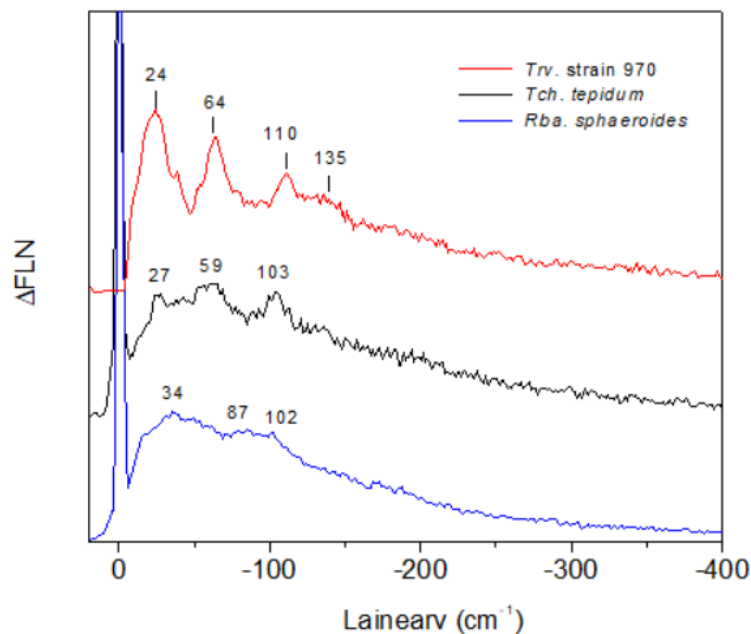
LH1-RC kompleksi FLN ja  $\Delta$ FLN spektrid ergastusel 1004 nm on esitatud joonisel 3.7. Esimene FLN spekter (must joon) ergastati võimsusega  $0,8 \text{ mW/cm}^2$ , signaali koguti 10 sekundit ja doos oli  $8 \text{ mJ/cm}^2$ . Sellele järgnes spektraalsälgamise etapp, kus jätkati proovi valgustamist laseriga, nii et lisandus sälgamisdoos  $280 \text{ mJ/cm}^2$ . Seejärel mõõdeti uuesti FLN spekter (punane joon) täpselt samadel tingimustel nagu esimene FLN spekter. Sälgamise tulemusena vähenes  $\Delta$ FLN spektri intensiivsus, kuna kiirgavate molekulide hulk vähenes väljasälgatud molekulide tõttu. Muutused ja spektri struktuur kajastuvad selgelt kahe spektri vahes. Lahutades esimesest FLN spektrist teise, saadakse nende spektrite vahe ehk  $\Delta$ FLN spekter (roheline joon). Muutused ja spektri struktuur kajastuvad selgelt kahe spektri vahes. Lahutades esimesest FLN spektrist teise, saadakse nende spektrite vahe ehk  $\Delta$ FLN spekter (roheline joon).



Joonis 3.7: LH1-RC kompleksi FLN ja  $\Delta$ FLN spektrid, näidatud suhtelisel lainearvu skaalal. Must ja punane kõver tähistavad vastavalt sälgamiselset ja -järgset FLN spektrit. FLN spektrite vahe on esitatud roheline joonena, seda on suurendatud 4 korda ja eemaldatud on resonantne joon.

Siin katses oli eesmärgiks foonontiiva kuju määramine, mistõttu kitsas ja intensiivne foononvaba joon on jooniselt eemaldatud. Foonontiib on tugevalt asümmeetriline ja ulatub vähemalt  $400\text{ cm}^{-1}$  kaugusele. Tipp paikneb  $24\text{ cm}^{-1}$  juures, lisaks on selgelt eristatavad kitsad tipud sagedusel  $64$  ja  $110\text{ cm}^{-1}$ .

Joonisel 3.8 on võrreldud kolme erineva bakteri *Trv.* tüvi 970, *Tch. tepidumi* ja *Rba. sphaeroidese* LH1-RC komplekside  $\Delta\text{FLN}$  spektreid. Need on esitatud lainearvude skaalas, kus skaala nulliks on loetud foononvaba joone asukoht. Tähelepanu on suunatud foonontiibadele, need on hõlpsama võrdlemise eesmärgil intensiivsuste järgi normeeritud.



Joonis 3.8: *Trv.* tüvi 970 (punane joon), *Tch. tepidum* (must joon) ja *Rba. sphaeroides* (sinine joon) LH1 antennide  $\Delta\text{FLN}$  temperatuuril  $4,5\text{ K}$ . Selguse huvides on spektrid üksteise suhtes vertikaalselt nihutatud. [7]

*Trv.* tüvi 970 foonontiiva struktuuril saab kergelt eristada nelja tippu, teistel purpurbakteritel kolme tippu ja kõige halvemini on eristada tippe *Rba. sphaeroides* bakteril. *Trv.* tüvi 970 vasakpoolseim tippu lainearv on  $24\text{ cm}^{-1}$ , mis on võrdlusspektritest kõige suurema lainearvuga, vasakult teise tippu lainearv on  $64\text{ cm}^{-1}$ , mis on võrdlusspektrite keskmine ning viimased tipud on  $110$  ja  $135\text{ cm}^{-1}$  on võrreldes teiste võrdlusspektritega, väiksema lainearvuga vibroonses piirkonnas. Spektrit vaadates näeb, et *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi foonontiib on ilusa struktuuriga, mis tähendab, et proovi heterogeensus on väike.

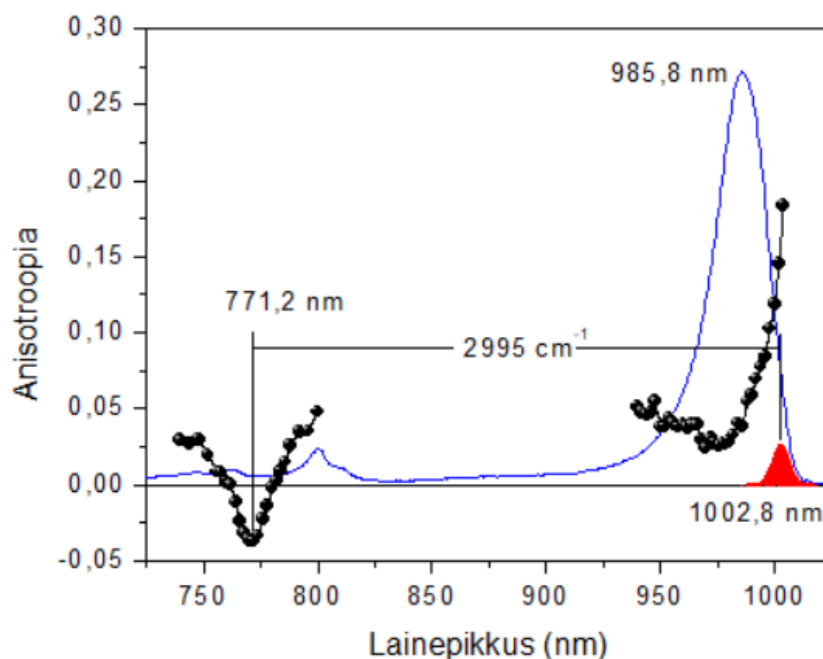
### 3.4 Fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektrid

$\text{Ca}^{2+}$  ioone sisaldavate purpurbakterite neeldumisspektri suure punanihke põhjuseks on peetud BChl pigmentide tugevat elektron-foonon vastastikmõju. [2,3] Eelnevalt näitasime, et see ei saa olla oluliseks põhjuseks, kuna vastastikmõju suurust iseloomustavad Huang-Rhys faktorid on vaadeldavates purpurbakterites lähedaste suurustega (vt. punkt 3.2 ja Tabel 1). Varasemalt on teada, et tsükliliste fotosünteesikomplekside punanihke oluliseks põhjuseks on eksitontsooni laienemine, näitena vaata artiklit [23]. Sobivaks meetodiks eksitontsooni laiuse määramiseks on fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektroskoopia, [31,32] kus anisotroopia spekter  $r(\omega)$  avaldub valemiga:

$$r(\omega) = \frac{I_{\parallel}(\omega) - I_{\perp}(\omega)}{I_{\parallel}(\omega) + 2I_{\perp}(\omega)}, \quad (4)$$

kus  $I_{\parallel}(\omega)$  ja  $I_{\perp}(\omega)$  on ergastava kiire suhtes paralleelselt ja risti polariseeritud fluorestsentsi integraalsed intensiivsused. [22] Mõõtmised viidi läbi temperatuuril 4,5 K, et saada võimalikult kõrge polarisatsiooniastmega spektrid.

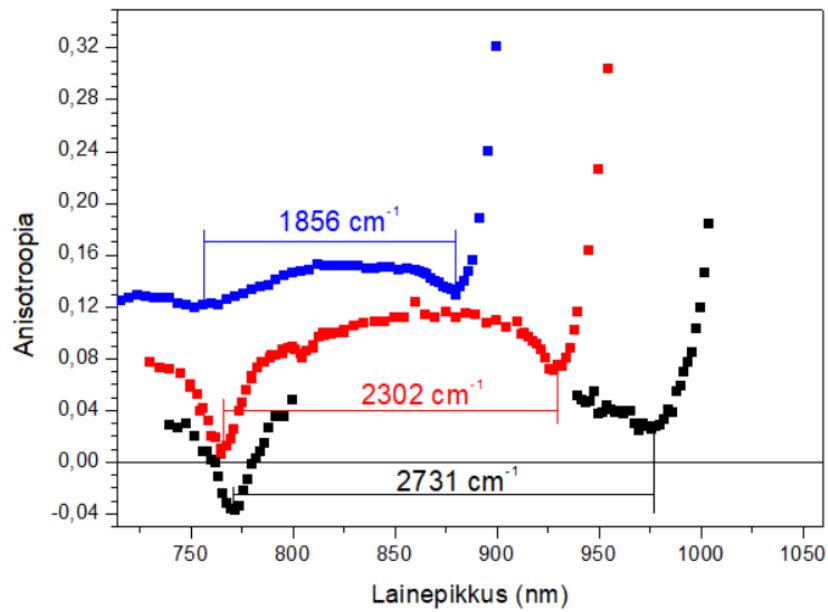
Joonisel 3.9 on näidatud fluorestsentsi anisotroopia spekter (mustad täidetud ringid) koos eelnevalt mõõdetud neeldumisspektri (sinine kõver) ja spektraalsälgamise mõjuspektriga IDF (punane täidetud kõver). Neeldumis ja IDF spektrid on siin joonisel anisotroopia suhtes meelevaldses skaalas. Seevastu lainepikkuste skaala on eri spektripiirkondade parema võrdlemise huvides esitatud lineaarsena energeetilises skaalas. Kuna on teada (vt. näiteks joonis 3.10) et anisotroopia spekter muutub kahe miinimumi vahel suhteliselt vähe, siis aja kokkuhoiu eesmärgil on jäetud anisotroopia mõõtmata vahemikus 810 kuni 940 nm.



Joonis 3.9: *Trv.* tüvi 970 LH1-RC fluorestsentsi anisotroopia ergastusspekter (mustad täidetud ringid) koos tagaplaanil oleva neeldumisspektriga (sinine joon) temperatuuril 4,5 K. Joonisel toodud number 2995  $\text{cm}^{-1}$  tähistab eksitontsooni laiust. Punasega näidatud mõjuspekter tähistab eksitontsooni alumist (kõige madalama energiaga) olekut.

Anisotroopia miinimum 771,2 nm juures vastab eksitontsooni energeetiliselt kõrgeimatele seisunditele, seda loetakse eksitontsooni lühilaineliseks servaks. Teine miinimum 977,0 nm juures on seotud intensiivsete eksitonkomponentidega, mis annavad suurima panuse neeldumisspektrisse, kuid on energeetiliselt siiski kõrgemal kõige alumisest seisundist, mille asukohta näitab spektraalsälgamise abil määratud mõjuspekter IDF asukohaga 1002,8 nm. Eksitontsooni laiuseks on seega IDF-i ja anisotroopia spektri lühilainelise miinimumi energeetiline vahe, antud juhul on see 2995  $\text{cm}^{-1}$ .

Joonisel 3.10 on *Trv.* tüvi 970 fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektrit võrreldud varem mõõdetud *Tch. tepidumi* ja *Rba. sphaeroidese* tuumikkomplekside spektritega. *Tch. tepidum* on samuti  $\text{Ca}^{2+}$  ioone sisaldavate purpurbakter, samas kui *Rba. sphaeroides* esindab niinimetatud tüüpilisi purpurbaktereid. Erinevalt eelnevast on joonisel 3.10 lihtsuse huvides näidatud anisotroopia miinimumide, mitte aga ülemise ja alumise eksitonseisundi vahekaugused.



Joonis 3.10: Erinevate purpurbakterite tuumikkomplekside fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektrite võrdlus temperatuuril 4,5 K: *Trv.* tüvi 970 (must) ja *Tch. tepidum* (punane) ja *Rba. sphaeroides* (sinine). [32]

Kuna anisotroopia spektri pikalaineline iseärasuse asukoht on väga heas korrelatsioonis  $Q_y$  eksitoni neeldumisspektri asukohaga, siis saab joonisel 3.10 toodud andmetest järeldada, et  $Ca^{2+}$  ioone sisaldavate fotosünteesiliste bakterite valgust neelavate antennide eksitontsoonid on tunduvalt laiemad kui kaltsiumit mittesisaldavate bakterite tsoonid ja *Trv.* tüvi 970  $Q_y$  neeldumisspektri neeldumine punases spektri piirkonnas on eelkõige seotud eksitontsooni laienemisega.  $Ca^{2+}$  ionide täpne roll selles laienemises on järgnevate uurimiste teema.

## Kokkuvõte

Purpurbakter *Thiorhodovibrio* tüvi 970 on fototroopne purpurbakter, mis on pälvinud suurt tähelepanu oma lähi-infrapunasesse spektri piirkonda (960 nm) nihkunud neeldumismaksimum tõttu. Tegemist on suurimat punanihet omava bakteriga kõikide BChl-a sisaldavate bakterite hulgast. Antud töö eesmärgiks oli välja selgitada selle iseärasuse põhjus või põhjused. Looduslikke spektraaltimmimise võtteid tundma õppides on neid teadmisi edaspidi võimalik kasutada loodussõbralike, seega jätkusuutlike energiaallikate loomisel, näiteks tehislake fotosünteesi elementide valmistamisel.

Töö ülevaate osas kirjeldatakse purpurbakterite fotosünteesi aparatuuri ja valgushaarde põhilisi mehhanisme, tutvustakse lähemalt uuritavat purpurbakterit *Thiorhodovibrio* tüvi 970 ning kirjeldati looduses enamlevinud spektrite immimise võtteid.

Töö metoodilises osas tutvustatakse prooviobjekti valmistamist ja uuringutes kasutatud aparatuuri.

Töö katseline osa, kus rakendati erinevaid rohkem ja vähem standardseid spektroskoopilisi meetodeid, kajastab tehtud töö sisu ja saadud tulemusi. Alustuseks uuriti *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi neeldumisspektrit ja fluorestsentsispektrit erinevatel temperatuuridel, mis andis alusinfo uuritava bakteri spektraalsete omaduste kohta. Seejärel uuriti temperatuuril 4,5K kõrglahutusega neeldumisspektrit, fluorestsentskitsenemise spektrit ja nn mõjuspektrit, mille koos analüüsist järeldus, et, erinevalt kirjanduses pakutule, ei saa suurenenud elektron-foonon vastastikmõju olla *Trv.* tüvi 970 spektrite täiendava punanihke põhjus. Tegelikult on elektron-foonon vastastikmõju kirjeldav Huang-Rhys faktor kõikides uuritud purpurbakterite tuumikkompleksides üsna võrdne. Samuti ei leidnud kinnitust väidetav *Trv.* tüvi 970 bakteri suurem spektraalne heterogeensus. Sisuliselt on *Trv.* tüvi 970 struktuur seni uuritud bakteritest spektraalselt kõige korrastatum. Lõpuks uuriti fluorestsentsi anisotroopia ergastusspektreid, lootuses saada informatsiooni LH1 antenni eksitontsooni struktuuri ja ulatuse kohta. Nende uuringute tulemusena leiti, et *Trv.* tüvi 970 Q<sub>y</sub> neeldumisspektri täiendava punanihke põhjus võrreldes teiste uuritud bakteritega on tunduvalt laienenud eksitontsoon. Lisas toodud termostabiilsuse uuringu tulemuseks saadi, et *Trv.* tüvi 970 otsest seost kaltsiumiioonide ja bakteri termofiilsete omaduste vahel ei kinnita.

Ehkki sellega sai töö esmane eesmärk täidetud, jääb erakordselt huvitav küsimus eksitontsooni laienemise mehhanismist järgmiste uuringute selgitada.

## Kasutatud kirjandus

- [1] T. Mirkovic, E. E. Ostroumov, J. M. Anna, R. van Grondelle, Govindjee, G. D. Scholes, ``Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms,`` Chemical Reviews 117 (2), 249-293 (2017).
- [2] H. P. Permentier, S. Neerken, J. Overmann, J. Amesz, ``A Bacteriochlorophyll a Antenna Complex from Purple Bacteria Absorbing at 963 nm,`` Biochemistry 40, 5573-5578 (2001).
- [3] M. Imanishi, M. Takenouchi, S. Takaichi, S. Nakagawa, Y. Saga, S. Takenaka, M. T. Madigan, J. Overmann, Z.-Y. Wang-Otomo, Y. Kimura, ``A Dual Role for Ca<sup>2+</sup> in Expanding the Spectral Diversity and Stability of Light-Harvesting 1 Reaction Center Photocomplexes of Purple Phototrophic Bacteria,`` Biochemistry 58 (25), 2844–2852 (2019).
- [4] K. Tani, R. Kanno, Y. Makino, M. Hall, M. Takenouchi, M. Imanishi, Long-Jiang Yu, J. Overmann, M. T. Madigan, Y. Kimura, A. Mizoguchi, B. M. Humbel, Z.-Y. Wang-Otomo, ``Cryo-EM structure of a Ca<sup>2+</sup>-bound photosynthetic LH1-RC complex containing multiple  $\alpha\beta$ -polypeptides,`` Nature Communications 11, 4955 (2020).
- [5] L.-J. Yu, M. Suga, Z.-Y. Wang-Otomo, J.-R. Shen, ``Structure of photosynthetic LH1–RC supercomplex at 1.9 Å resolution,`` Nature 556, 209-213 (2018).
- [6] H. Suzuki, Y. Hirano, Y. Kimura, S. Takaichi, M. Kobayashi, K. Miki, Z.-Y. Wang, ``Purification, characterization and crystallization of the core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*,`` Biochim. Biophys. Acta 1767, 1057-1063 (2007).
- [7] L. Kangur, M. Rätsep, K. Timpmann, Z.-Y. Wang-Otomo, A. Freiberg, ``The two light-harvesting membrane chromoproteins of *Thermochromatium tepidum* expose distinct robustness against temperature and pressure,`` Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1861, 148205 (2020).
- [8] P. A. Bullough, P. Qian, C. N. Hunter, ``The Purple Phototrophic Bacteria,`` kogumikus: C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnae, J. T. Beatty, ``The Purple Phototropic Bacteria,`` 155-179 (2009).
- [9] M. Jones, ``Bacterial Photosynthesis,`` <http://photobiology.info/Jones.html>
- [10] D. Chandler, J. Hsin, J. C. Gumbart, ``Case study: light harvesting complex 2,`` <http://www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/lh2.pdf>
- [11] M. Rätsep, R. Muru, A. Freiberg, ``High temperature limit of photosynthetic excitons,`` Nature Communications 9, 99 (2018).

- [12] M. Chenchiliyan, "Nano-structural Constraints for the Picosecond Excitation Energy Migration and Trapping in Photosynthetic Membranes of Bacteria," Doktoritöö, Tartu Ülikool, Tartu (2016).
- [13] R. J. Cogdell, T. D. Howard, N. W. Isaacs, K. McLuskey, A. T. Gardiner, "Structural factors which control the position of the Q(y) absorption band of bacteriochlorophyll a in purple bacterial antenna complexes," *Photosynth. Res.* 74 (2), 135-41 (2002).
- [14] L. De Vico, A. Anda, V. Osipov, A. O. Madsen, T. Hansen, "Macrocycle ring deformation as the secondary design principle for light-harvesting complexes," *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (39), E9051-E9057 (2018).
- [15] L.O. Björn, G. C. Papageorgiou, R. E. Blankenship, Govindjee, "A viewpoint: why chlorophyll a?," *Photosynth. Res.* 99 (2), 85-98 (2009).
- [16] M. Michalik, M. Zbyradowski, D. S. Heriyanto, L. Fiedor, "Tuning the Photophysical Features of Self-Assembling Photoactive Polypeptides for Light-Harvesting," *Materials (Basel)* 12(21), 3554 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12213554>
- [17] G. D. Scholes, G. R. Fleming, A. Olaya-Castro, R. van Grondelle, "Lessons from nature about solar light harvesting," *Nat. Chem.* 3 (10), 763-74 (2011).
- [18] L. G. Kwa, A. Garcia-Martin, A. P. Vegh, B. Strohmann, B. Robert, P. Braun, "Hydrogen Bonding in a Model Bacteriochlorophyll-binding Site Drives Assembly of Light Harvesting Complex," *Bio.Chem.* 279, 15067-15075 (2004).
- [19] H. Tamiaki, Y. Kotegawa, K. Mizutani, "Rotational deviation of 3-acetyl group from cyclic tetrapyrrole  $\pi$ -plane in synthetic bacteriochlorophyll-a analogs by 20-substitution," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 (23), 6037-6040 (2008).
- [20] P. K. Jain, M. El-Sayed, "Plasmonic Coupling in Noble Metal Nanostructures," *Chemical Physics Letters.* 487, 153-164 (2009).
- [21] G. D. Scholes, G. Rumbles, "Excitons in nanoscale systems," *Nature Materials* 5, 683-693 (2006).
- [22] H. Van Amerongen, L. Valkunas, R. Van Grondelle, "Photosynthetic Excitons," *World Scientific*, 590 (2000).
- [23] M. Pajusalu, M. Rätsep, G. Trinkunas, A. Freiberg, "Davydov splitting of excitons in cyclic bacteriochlorophyll a nanoaggregates of bacterial light-harvesting complexes between 4.5 and 263 K," *Chemphyschem*, 12 (3), 634-644 (2011).
- [24] P. Braun, L. Fiedor, "The Purple Phototropic Bacteria," *kogumikus: C.N. Hunter, F. Daldal, M.C. Thurnauer, J.T. Beatty*, "The Purple Phototropic Bacteria," 913-946 (2009).

- [25] K. Timpmann, M. Rätsep, C. N. Hunter, A. Freiberg, ``Emitting excitonic polaron states in core LH1 and peripheral LH2 bacterial light-harvesting complexes,`` J. Phys. Chem. B 108, 10581–10588 (2004).
- [26] R. Jankowiak, M. Reppert, V. Zazubovich, J. Pieper, T. Reinot, ``Site Selective and Single Complex Laser-Based Spectroscopies: A Window on Excited State Electronic Structure, Excitation Energy Transfer, and Electron–Phonon Coupling of Selected Photosynthetic Complexes,`` Chem. Rev. 111, 4546–4598 (2011).
- [27] J. Pieper, P. Artene, M. Rätsep, M. Pajusalu, A. Freiberg, ``Evaluation of Electron–Phonon Coupling and Spectral Densities of Pigment–Protein Complexes by Line-Narrowed Optical Spectroscopy,`` J. Phys. Chem. B 122, 9289–9301 (2018).
- [28] M. Rätsep, A. Freiberg, ``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 (2007).
- [29] M. Rätsep, K. Timpmann, T. Kawakami, Z.-Y. Wang-Otomo, A. Freiberg, ``Spectrally Selective Spectroscopy of Native Ca-Containing and Ba-Substituted LH1-RC Core Complexes from *Thermochromatium tepidum*,`` J. Phys. Chem. B 121, 10318–10326 (2017).
- [30] J. M. Hayes, J. K. Gillie, D. Tang, G. J. Small, ``Theory for spectral hole burning of the primary electron donor state of photosynthetic reaction centers,`` Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 932, 287-305 (1988).
- [31] K. Timpmann, G. Trinkunas, J. D. Olsen, C. N. Hunter, A. Freiberg, ``Bandwidth of excitons in LH2 bacterial antenna chromoproteins,`` Chem. Phys. Lett. 398 , 384-388 (2004).
- [32] K. Timpmann, G. Trinkunas, P. Qian, C. N. Hunter, A. Freiberg, ``Excitons in core LH1 antenna complexes of photosynthetic bacteria: Evidence for strong resonant coupling and off-diagonal disorder,`` Chem. Phys. Lett. 414, 359-363 (2005).
- [33] Applied Photophysics, ``Chirascan Series Spectrometers,`` kasutaja manuaal (2012). [https://people.bath.ac.uk/gp304/cd/manuals/Chirascan/Chirascan\\_Series\\_User\\_Manual.pdf](https://people.bath.ac.uk/gp304/cd/manuals/Chirascan/Chirascan_Series_User_Manual.pdf)
- [34] Applied Photophysics, ``An introduction to circular dichroism spectroscopy,`` õpetlik manuaal (2020). <https://fdocument.org/embed/v1/an-introduction-to-circular-dichroism-spectroscopy-an-introduction-to-circular.html>
- [35] S. Georgakopoulou, G. van der Zwan, J. D. Olsen, C. N. Hunter, R. A. Niederman, R. van Grondelle, ``Investigation of the Effects of Different Carotenoids on the Absorption and CD Signals of Light Harvesting 1 Complexes,`` J. Phys. Chem. B 110, 3354-3361 (2006).

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

# Lihtlitsents

Mina, Alexandra Lehtmets,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

**„*Thiorhodovibrio* tüvi 970 optiliste spektrite tähelepanuväärse punanihke olemus”**

mille juhendajad on Margus Rätsep ja Arvi Freiberg,

- (a) reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
  - (b) Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Alexandra Lehtmets,*

***Tartu, 28. mai 2021.***

# Lisad

## Lisa 1: Molekulide kiraalsus ja tsirkulaarse dikroismi spektroskoopia

Tsirkulaarne dikroism (CD - *circular dichroism*) on polariseeritud valguse ja kiraalsete molekulide interaktsiooni tagajärg, mis kokkuvõtlikult on paremakäelise ringpolariseeritud valguse (P-RPV - *right handed circularly polarised light*) ja vasakukäelise ringpolariseeritud valguse (V-RPV - *light left-handed circularly polarised light*) neelduvuse erinevus. Kiraalsus on üks asümmeetria viise, kus vaadeldav objekt ei ole identne iseenda peegelpildiga. Kiraalsed võivad ka olla molekulidega seotud agregaadid ning oligomeerid. Nende elektronergastusel tekivad eksitoniid, kus kiraalsus on üks eksitonide omadusi. Eksitonide kiraalsus ei sõltu tema koostisosade kiraalsusest, see tähendab, et isegi mittekiraalsete molekulide elektronseisunditel on kiraalsed omadused. CD nähtus esineb ainult aktiivsetes molekulides ehk sellistes molekulides, kus on üks või sellest rohkem kiraalseid kromofore, mis on valgust neelavad grupid. Enamus bioloogilisi molekule on kiraalsed. Tsirkulaarset dikroismi saab avaldada valemiga

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{\text{VRPV}} - A(\lambda)_{\text{PRPV}}, \quad (\text{L1})$$

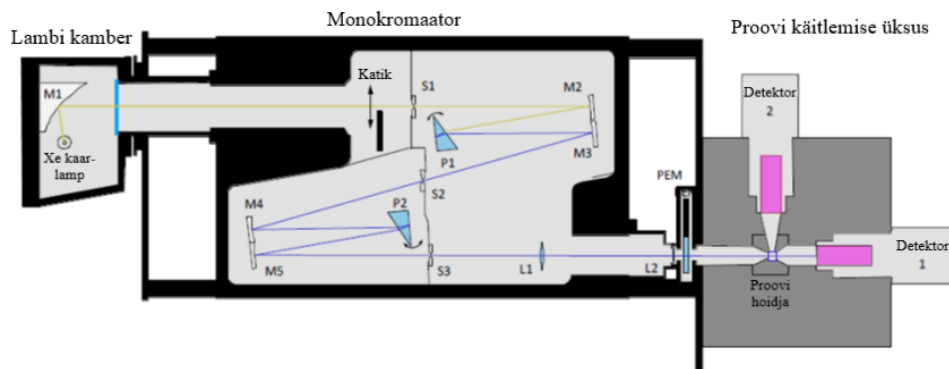
kus  $\lambda$  on lainepikkus ja neelduvus  $A(\lambda)$  avaldub molekulide peale langeva ( $I_0$ ) ja läbituleva ( $I$ ) valguse logaritmilise suhtena

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I}. \quad (\text{L2})$$

Kiraalsete molekulide isomeeride paare, millel pole konfiguratsioon identne, aga on üksteise peegelpildid, nimetatakse enantiomeerideks. Enantiomeeride paar on füüsiliste ja keemiliste omaduste poolest peaaegu identsed. Erinevused tulevad välja enantiomeeri paaril siis, kui vaadelda nende interaktsiooni polariseeritud valgusega ja teiste kiraalsete molekulidega.

CD spektroskoopia põhimõtte selgitamiseks vaadeldakse lineaarselt polariseeritud valgust, mis asub ühel tasapinnal. Polariseeritud valgust saab kirjeldada kui kahe täisnurga all oleva lineaarselt polariseeritud oleku summana, mida saab siis vaateleja suhtes jagada kaheks polarisatsiooni olekuks – vertikaalselt ja horisontaalselt polariseeritud valguseks. Kui vaadeldakse sama amplituudi ja faasiga vertikaalset ja horisontaalset valguslainet, siis saadakse resultantlaine lineaarselt polariseeritud laine 45 kraadi juures. Nüüd vaadeldakse juhtu, kus polariseeritud vertikaalse ja horisontaalse valguslaine faaside erinevus on  $\pi/2$ , siis nende resultantlaine on ringpolariseeritud valguslaine heeliks, mida jagatakse omakorda

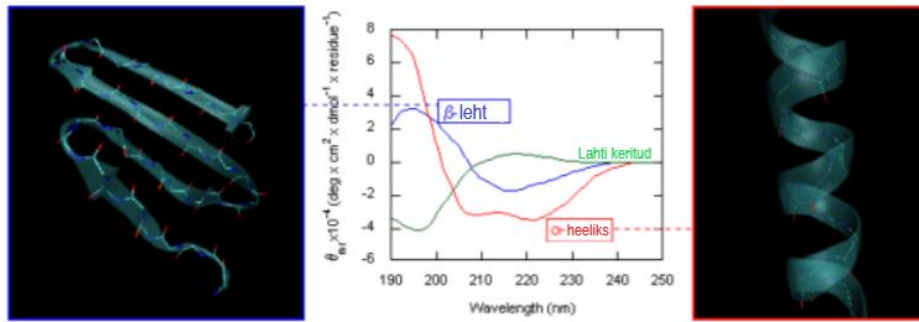
paremakäeliseks ja vasakukäeliseks ringpolariseeritud valguslaineks. Saadud valguslained ei ole üksteise peegelpildis ühitatavad. Ringpolariseeritud valgust saab kergelt kätte lineaarselt polariseeritud valgusest, kui kasutada veerandlaineplaati. CD mõõtmisteks on välja töötatud spetsiaalsed spektromeetrid, näiteks *Chirascan Plus* (vaata joonist L1.1), mis võimaldavad mõõta spektreid laias optilises piirkonnas, alates kaug-ultravioletist kuni lähi-infrapunaseni, lainepikkustel 180 - 1100 nm.



Joonis L1.1: Chirascan Plus spektromeetri optiline skeem, kus M1 on koondav peegel, S1-S3 on pilud, L1 ja L2 on läätsed, Detektor 1 on läbilaskvuse detektor, M2-M5 on peeglid, P1 ja P2 on prismad, PEM on fotoelastne modulaator. Detektor 1 mõõdab objekti läbipaistvust/neeldumist, Detektor 2 aga objekti kiirgust. [33]

Positiivse CD signaali puhul neelab makromolekul vasakukäelist ringpolariseeritud valgust rohkem kui paremakäelist ringpolariseeritud valgust. Negatiivse signaali puhul on vastupidi. Kui signaal on 0, siis makromolekul neelab võrdselt paremakäelist ja vasakukäelist ringpolariseeritud valgust.

CD spektroskoopia leiab rohket rakendust valkude uurimisel ja ravimite arendamisel. Enamasti uuritakse CD spektroskoopiaga proteiinide (makromolekulide) sekundaarset struktuuri, sekundaarse struktuuri tundlikkust välistele teguritele ja kuidas sekundaarne struktuur nende mõjutuste tõttu muutub. [34] Joonisel L1.2 on näitena toodud valkudele tüüpiliste struktuurielementide CD spektrid.

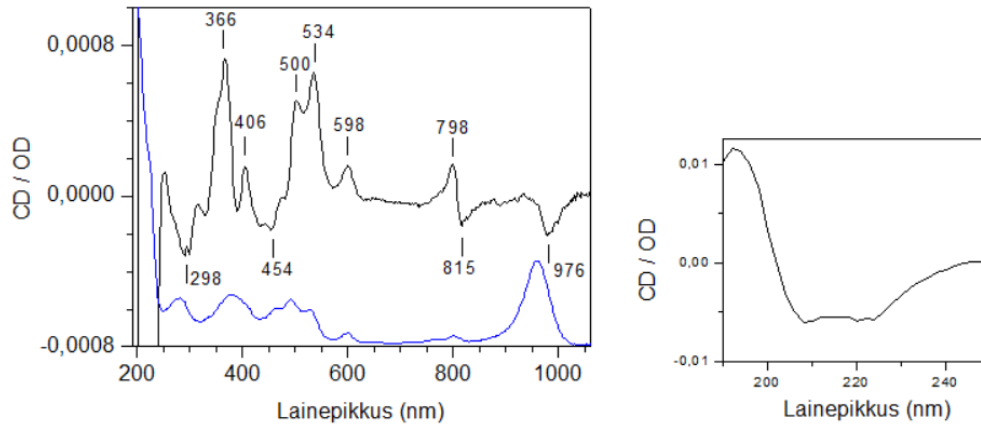


Joonis L1.2: : Valguahelate erinevatele konformatsioonidele vastavad CD spektrid. Kõrval olevad pildid kujutavad peptiidahela  $\beta$ -leht-tüüpi konformatsiooni (vasakul) ja  $\alpha$ -heeliks-tüüpi konformatsiooni (paremal). [34]

CD spektroskoopiat saab kasutada ka kiraalsete molekulide termostabiilsuse mõõtmiseks, kus siis lainepikkuse muudu asemel on temperatuuri muut valitud lainepikkustel. CD spekter on väga tundlik struktuurimuutuste suhtes, seetõttu on ta temperatuuri suhtes tundlikum kui tavapärane neeldumisspekter. Termilist stabiilsust saab analüüsida, kui proovi soojendada järkjärgult, lastes proovil antud temperatuuril tasakaalustada enne mõõtmise tegemist. Siis saab lõpuks graafiku, kus näeb erinevate purpurbakterite osakeste lagunemist. [34]

## Lisa 2: CD spektrid ja termostabiilsus

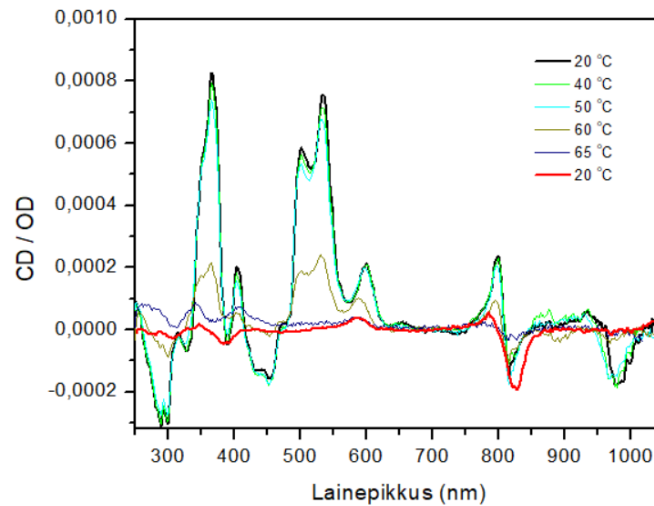
CD spektrid annavad infot vaadeldava objekti molekulide omavaheliste orientatsioonide kohta. Joonisel L2.1 on kujutatud *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi neeldumis- ja CD spekter koos CD spektri valguga piirkonnaga. CD spektrid on normeeritud (jagatud läbi) optilise tihedusega lainepikkusel 960 nm. Väiksemal joonisel on näidatud eraldi valguga piirkonnas CD spektrit, suurel joonisel ei mahu see tervikuna skaalasse.



Joonis L2.1: Vasakul: *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi CD (must joon) ja neeldumisspekter (sinine joon) temperatuuril 20 °C. Numbrid näitavad CD-joonte positsioone nanomeetrites. Neeldumisspekter korrutati teguriga  $2 \cdot 10^{-3}$  ja nihutati allapoole, et näidata neeldumis- ja CD-spektreid ühel ja samal joonisel. Paremalt: Lähivaade valgu CD spektrile lainepikkustel 190-250 nm.

CD spektril on kromofooride  $Q_y$  piirkonnas LH1 ja LH1-RC kompleksidele tüüpiline väike ja mittekonservatiivne LH1 antenni signaal lainepikkusel 976 nm, mis on sarnane ka teistes purpurbakterites. [6,7,35] Positiivne riba lainepikkusel 598 nm, vastab LH1  $Q_x$  üleminekule. Karotenoidi ja Soret'i piirkonnas jääb CD signaal enamasti konservatiivseks, omades arvukalt positiivseid ja negatiivseid ribasid, vaata joonist L2.1. Valkude vahemikus näitab CD spekter kahte negatiivset riba lainepikkustel 220 ja 228 nm ning positiivset riba lainepikkusel 195 nm, mis on transmembraansete polüpeptiidide tunnuseks  $\alpha$ -spiraalses konformatsioonis. [36] Termilist stabiilsust analüüsitakse proovi järkjärgulise soojendamise käigus kuni objekti lagunemiseni, lastes proovil antud temperatuuril tasakaalustada enne järjekordse mõõtmise tegemist. [34]

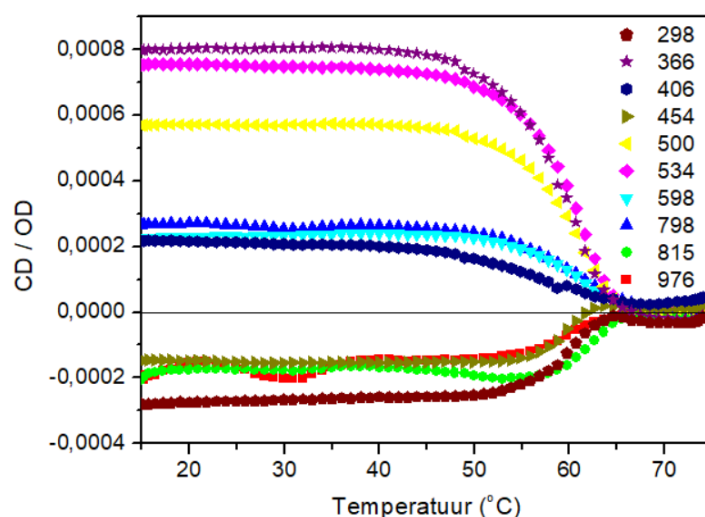
Termostabiilsuse uurimiseks registreeriti CD spektrid erinevatel temperatuuridel 20 kuni 65 °C või 20 kuni 74 °C. Joonisel L2.2 kujutatud spektrid näitavad kuni temperatuuril 50 °C suhteliselt väikeseid muutusi vahemikus 250 kuni 1050 nm. Kõrgematel temperatuuridel signaal langes kiiresti ja kadus temperatuuril 65 °C peaaegu täielikult ära, vaata ka joonist L2.3. Seejärel jahutati proov tagasi toatemperatuurini 20 °C, mis oli algse proovi algne temperatuur.



Joonis L2.2: *Trv.* tüvi 970 CD spektrid erinevatel temperatuuridel. Punase joonega on näidatud CD spekter, mis on mõõdetud temperatuuril 20 °C pärast LH1-RC kompleksi kuumutamist 65 °C-ni ja sellele järgnevat jahutamist temperatuurini 20 °C. Kõik spektrid on normeeritud proovi esialgse neeldumise järgi lainepikkusel 960 nm.

Huvitaval kombel näitab CD spekter osalist taastumist 800 nm piirkonnas (punase joonega kõver). Nii negatiivsed kui ka positiivsed ribad laienesid ja nihkusid 10 nm võrra vastavalt pikematele ja lühematele lainepikkustele. Lisaks vähenes märkimisväärselt positiivse riba intensiivsus. Vastav  $Q_x$  signaal vähenes ja nihkus 598 nm-lt 590 nm-ni. CD spektri Soret'i piirkonnas intensiivsus oluliselt vähenes. Karotenoidide piirkonnas, 450 kuni 550 nm, ei tuvastata CD signaali.

Joonisel L2.3 on toodud *Trv.* tüvi 970 üksikute valitud CD ribade sõltuvus temperatuurist. CD intensiivsus normaliseeriti LH1-RC kompleksi neeldumisega 20 °C juures. Proovi temperatuuri tõsteti kiirusega 1 °C/min, mõõtmisaeg temperatuuripunkti kohta oli umbes 1 min. CD signaali registreeriti valitud lainepikkustel, mis on valitud vastavalt joonisel L2.2 näidatud signaali maksimumidele ja miinimumidele.

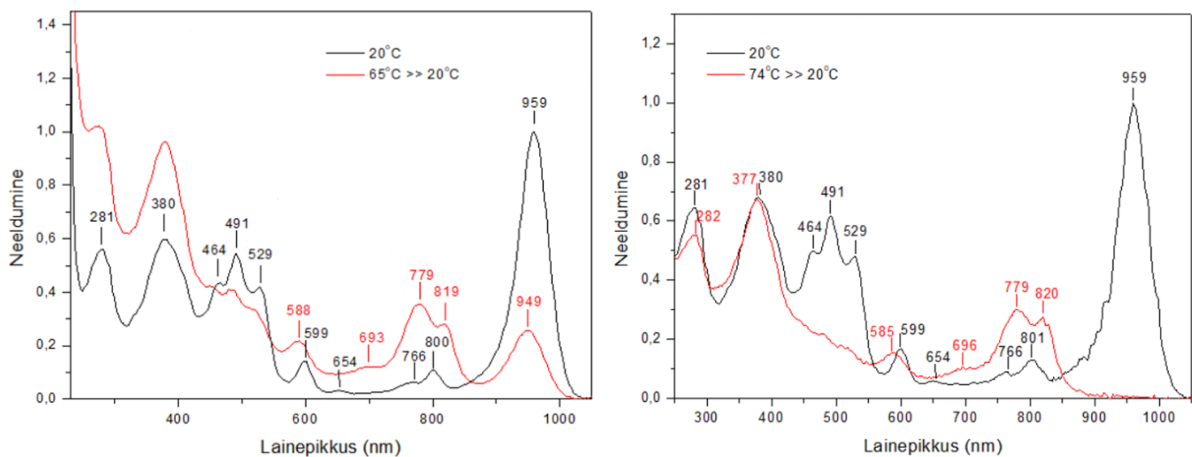


Joonis L2.3: Valitud CD spektriribade intensiivsuse sõltuvus temperatuurist. Numbrid tähistavad valitud joonte lainepikkust nanomeetrides.

CD spektrilt on näha, et pigmendi-eksitonide ribade intensiivsused on peaaegu konstantsed temperatuurini 48 °C, kus siis kõigi ribade intensiivsused järk-järgult alanevad kuni nad kaovad umbes 64 °C juures. Kuigi spektrid muutuvad mõnevõrra ka mõõtmise ajal (mõõtmisaeg oli umbes 1 minut), eriti kõrgematel temperatuuridel, on muutuste kiirus suhteliselt aeglane, seega tulemuste suhtes kvalitatiivselt ebaoluline. [5] Nendest andmetest saab järeldada, et *Trv.* tüvi 970 ei ole termofiilne bakter.

Joonisel L2.4 registreeriti kahel erineval kuumutamisel riknenud proovide neeldumisspekter. Esimesel neeldumisspektril on näidatud algset proovi (must joon) ja proovi, mis kuumutati 65 °C-ni ja siis jahutati toatemperatuurile 20 °C (punane joon). Teisel spektril on aga proovi kuumutatud 74 °C-ni ja jahutatud 20 °C-le (punane joon).

Neeldumisspekter, kus kuumutati proovi 65 °C, näitab märkimisväärset LH1 antenni neeldumise kadu lainepikkusel 959 nm koos 10 nm nihet sinise poole. Kui proovi kuumutati temperatuurini 74 °C, siis kadus LH1 neeldumisriba täielikult. LH1 neeldumisriba kaoga kooskõlas tekib kaks uut neeldumisriba 779 ja 819 nm ümber. Neid ribasid saab omistada monomeersetele ja dimeersetele bakterklorofüllidele, mis on LH1 antennirõngast eraldatud. See on ka kooskõlas riknenud proovide CD-andmetega, mis näitavad suhtelist tugevat punanihkega negatiivset CD neeldumisriba lainepikkusel 826 nm.



Joonis L2.4: *Trv.* tüvi 970 neeldumisspektrid mõõdetuna temperatuuril 20 °C enne (must joon) ning pärast (punane joon) proovi kuumutamist temperatuurini 65 °C (vasakpoolse joonis) või 74 °C (parempoolne joonis) ja selle maha jahutamist.

Kuna  $\text{Ca}^{2+}$  tagab märkimisväärselt termostabiilsust purpurbakteris *Tch. tepidum*, kui võrrelda *Trv.* tüvi 970 termostabiilsust artiklis [3] antud LH1-RC kompleksiga, kus ei ole  $\text{Ca}^{2+}$ , ja joonisel L2.4 saadud LH1-RC kompleksiga, kus on  $\text{Ca}^{2+}$  sees. Artiklis [3] uuritud LH1-RC kompleksi ilma  $\text{Ca}^{2+}$ -ta oli vähem intensiivsem neeldumisriba maksimum lainepikkusel 877 nm, kus siis ka temperatuuri tõstes muutus 777 nm neeldumisriba intensiivsemaks. Saab järeldada, et LH1-RC kompleksis, kus ei ole  $\text{Ca}^{2+}$ , on neeldumisribade intensiivsus väiksem, kui  $\text{Ca}^{2+}$  olemasolul ning see suurendab ka *Trv.* tüvi 970 spektraalset mitmekesisust. [3]

Joonise L2.1 valgus spektrist saab järeldada, et *Trv.* tüvi 970 LH1  $\alpha$ -poplüpeptiidis leidub histidiinjääk (His48) asendis, kus teistes purpurbakterites asub leutsiin. See on praegusel andmetel *Trv.* tüvi 970 ainulaadne omadus. Struktuurist võiks järeldada, et histidiini külghel asetseb BChl-a lähedal ja võiks mõjutada *Trv.* tüvi 970 spektraalseid omadusi. [4]