TARTU ÜLIKOOL

LOODUS-JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

FÜÜSIKA INSTITUUT

Alexandra Lehtmets

EKSITONID CA SISALDAVATES FOTOSÜNTEESIVATES BAKTERITES

MAGISTRITÖÖ (30 EAP)

FÜÜSIKA ERIALA

Juhendajad:

Margus Rätsep, PhD

Juha Matti Linnanto, PhD

Prof. Arvi Freiberg

TARTU 2023

Eksitonid Ca sisaldavates fotosünteesivates bakterites

Üheks peamiseks globaalse soojenemise piiramise võimaluseks peetakse kasvuhoonegaaside vähendamist elektrienergia tootmisel, kus fossiilseid kütuseid nagu maagaas ja kivisüsi asendavad süsinikuvabad energiaallikad nagu Päike. Päikeseenergia laialdasemaks rakendamiseks uuritakse praegu innukalt erinevaid tehislikke fotosünteesi elemente. Need arendustööd vajavad täiendavaid fotosünteesi alusuuringuid, mille hulka kuulub ka käesolev töö.

Fotosünteesivad bakterid kasutavad oma elutegevuseks punasemat valgust kui taimed. Selline taimedest „üle jääva" energia rakendamine võimaldab oluliselt suurendada Päikese kiirgusest saadava energia kasutamise efektiivsust. Kõige enam punasesse nihkunud spektrit omavad kaks kaltsiumi ioone sisaldavat purpurbakterit *Thiorhodovibrio* 970 ja *Thermochromatium tepidum*. Neid baktereid antud töös uuritigi, saamaks paremini aru nende spektrite ekstreemse punanihke põhjustest ja sellega kaasnevatest bakterite füüsikaliste omaduste muutustest.

Töö teoreetilises osas simuleeriti *Thiorhodovibrio* 970 tuumkompleksi neeldumisspektrit, kasutades erinevaid kvantkeemilisi ja molekulaarse eksitoni mudeleid. Võrdlusest mõõdetud spektriga selgus vajadus lisaks tavapärasele Q_y elektronseisundite vahelisele resonantsele eksitoninteraktsioonile arvestada ka täiendavaid interaktsioone Q_y ja Soret elektronseisundite vahel, mis kuuluvad erinevatele bakterklorofüll *a* molekulidele. Nende kirjanduses harva käsitletavate vastastikmõjudega saab seletada kuni 35% jälgitavast Q_y eksitoni neeldumisspektri täiendavast punanihkest.

Töö katselises osas uuriti kirjanduses levinud väidet, et kaltsiumit sisaldavate bakterite spektrite punanihe seostub nende suurema vastupidavusega äärmuslike temperatuuride suhtes (mis ühteaegu oluliselt suurendaks nende atraktiivsust tööstuslike rakenduste seisukohalt). Kombineerides erinevaid optilise spektroskoopia meetodeid leiti, et ehkki kaltsiumi ioonide sisaldus suurendab purpurbakterite valgust neelavate valgukomplekside termostabiilsust, puudub sellel vahetu seos nende optiliste spektrite nihetega.

Märksõnad: fotosüntees, optiline spektroskoopia, spektraalsed nihked, kaltsiumit sisaldavad purpurbakterid, tuumkompleks, tsirkulaarne dikroism, kvantkeemia, molekulaarne eksiton, tiheduse funktsionaali teooria
CERCS koodid: P230 Aatomi- ja molekulaarfüüsika; B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; P410 Teoreetiline ja kvantkeemia; P230 Aatomi- ja molekulaarfüüsika

Excitons in Ca-containing photosynthetic bacteria

One of the main ways to limit global warming is to reduce greenhouse gases in electricity production, where fossil fuels such as natural gas and coal are replaced by carbon-free energy sources such as the Sun. Various artificial photosynthetic elements are currently being eagerly explored for the wider application of solar energy. These developments require additional basic photosynthesis research, which includes the present work.

Photosynthetic bacteria use redder light than plants for their life activities. This kind of application of "leftover" energy from plants allows to significantly increase the efficiency of using energy from the Sun's radiation. Two purple bacteria containing calcium ions, *Thiorhodovibrio* 970 and *Thermochromatium tepidum*, have the most red-shifted spectrum. These bacteria were studied in this work to better understand the causes of the extreme redshift of their spectra and the accompanying changes in the physical properties of the bacteria.

In the theoretical part of the work, the absorption spectrum of the *Thiorhodovibrio* 970 core complex was simulated using different quantum chemical and molecular exciton models. The comparison with the measured spectrum revealed the need to consider additional interactions between Q_y and Soret electronic states, which belong to different bacteriochlorophyll *a* molecules, in addition to the usual resonant exciton interaction between Q_y electronic states. Up to 35% of the observed additional redshift in the Q_y exciton absorption spectrum can be explained by these interactions, which is rarely discussed in the literature.

In the experimental part of the work, the common claim in the literature, that the red shift of the spectra of calcium-containing bacteria is associated with their greater resistance to extreme temperatures (which would at the same time significantly increase their attractiveness from the point of view of industrial applications), was investigated. By combining different optical spectroscopy methods, it was found that although the content of calcium ions increases the thermostability of the light-absorbing protein complexes of purple bacteria, it has no direct relation to the shifts in their optical spectra.

Keywords: photosynthesis, optical spectroscopy, spectral shifts, Ca-containing bacteria, core complex, circular dichroism, quantum chemistry, molecular exciton, density functional theory
CERCS codes: P230 Atomic and molecular physics; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; P410 Theoretical chemistry, quantum chemistry; P230 Atomic and molecular physics

Sisukord

Kasutatud lühendid **5**

Sissejuhatus **6**

Töö eesmärgid ja hüpoteesid **7**

1. Kirjandusülevaade **8**

1.1 Purpurbakterid ja nende valgust koguvate üksuste ülesehitus 8

1.2 *Thiorhodovibrio* 970 10

1.3 *Thermochromatium tepidum* 11

1.4 Valgust koguvate pigment-valgu komplekside fotoergastuste eksitonmudel 12

2. Töös kasutatud arvutuslikud meetodid **14**

2.1 Neeldumisspektrite simuleerimise põhimõtteline skeem 14

2.2 Kvantkeemilised meetodid (DFT ja TD-DFT) 15

2.3 Monomeeri ja dimeeri BChl arvutamine 15

2. 4 *Trv*. 970 LH1-RC neeldumisspektri arvutamine 19

3. Katsemetoodika **21**

3.1 Proovi ettevalmistamine 21

3.2 Aparatuur 21

4. Töö tulemused ja nende analüüs **23**

4.1 *Trv*. 970 simuleeritud neeldumisspekter ja selle analüüs 23

4.2 Termostabiilsuse uurimuse katsete tulemused 29

Kokkuvõte **37**

Kasutatud kirjandus **38**

Lisad **41**

Lisa 1: Kuumutamise tagajärjel toimuvad CD ja neeldumisspektri muutused 41

Lisa 2: Fluorestsentsi ergastusspektrite programm 43

Lisa 3: Neeldumis-ja kiirgusspektrite andmed 44

Tänuavaldused **46**

Lihtlitsents **47**

Kasutatud lühendid

- B3LYP – Becke, 3 - parameetri, Lee-Yang-Parri vahetus-korrelatsiooni funktsionaal (*Becke, 3 – parameeter, Lee-Yang-Parr exchange-correlation functional*)
- BChl – bakterklorofüll *a* (*bacteriochlorophyll a*)
- Chl – klorofüll (*clorophyll*)
- BPheo – bakterfeofütiini *a* (*bacteriopheophytin a*)
- Car – karotenoid (*carotenoid*)
- CCD – laengsidestusseadis (*charge coupled device*)
- CD – tsirkulaarne dikroism (*circular dichroism*)
- DFT – tiheduse funktsionaali teooria (*density functional theory*)
- EDTA – etüleendiamiintetraäädikhappe (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
- FWHM – täislaius poolel maksimumil (*full width at half maximum*)
- GS – põhiolek (*ground state*)
- HF – kvantkeemiline Hartree-Focki molekulaarorbitaali meetod (*quantum chemical Hartree-Fock molecular orbital method*)
- IDF – mittehomogeenne jaotusfunktsioon (*inhomogeneous distribution function*)
- LH1 - valgust neelav kompleks 1 (*light-harvesting complex I*)
- LH2 - valgust neelav kompleks 2 (*light-harvesting complex II*)
- OD – optiline tihedus (*optical density*)
- Punanihe (batokroomne nihe) – molekuli spektririba nihe pikemale lainepikkusele (*redshift*)
- Q_y – energeetiliselt madalaim singletne ergastatud olek
- Q_x – energeetiliselt madalaim singletne ergastatud oleku järgmine energeetiline olek
- RC – reaktsioonitsenter (*reaction center*)
- *Tch.* – purpurse väävlibakteri perekond (*Thermochromatium*)
- *Tch. tepidum* – *Thermochromatium tepidum*
- TD – ajast sõltuv (*time-dependant*)
- TEA – trietüülamiin (*triethylamine*)
- *Trv.* – purpurse väävlibakteri perekond (*Thiorhodovibrio*)
- *Trv*. 970 – *Thiorhodovibrio* 970

Sissejuhatus

Tänapäeval on aktuaalseks teemaks globaalse soojenemise pidurdamine. Üheks lahenduseks on pakutud kivisöe ja maagaasist tulenevate heitgaaside vähendamist atmosfääris, rakendades elektrienergia tootmises taastuvad energiaallikaid. Taastuvateks energiaallikateks on Päike, vooluvesi, hoovused, maapõuesoojus ja tõusud-mõõnad. Antud töös soovitakse saada samm lähemale efektiivseima tehisliku fotosünteesi elemendi valmistamisele, mis on oletatavalt tõhusam kui praegused meetodid.

Fotosünteesi kui mehhanismi saab jääkprodukti järgi jagada kaheks – oksügeenne ja anoksügeenne fotosüntees. Oksügeenset fotosünteesi, kus jääkproduktiks on hapnik, viivad läbi peamiselt taimed, vetikad ja tsüanobakterid. Anoksügeenset fotosünteesi viivad läbi peamiselt fotosünteetilised bakterid, kes toodavad hapniku asemel teist keemilist elementi nagu näiteks väävel. Fotosünteesi mehhanismi energia ülekanne on mõlemal põhimõtteliselt sama. Energia ülekande alla kuuluvad protsessid nagu footonite neeldumine, ergastusenergia ülekanded ja esmase laengu eraldumine. [1]

Käesolevas töös uuriti fotosünteetilisi kaltsiumi iooni sisaldavaid purpurbaktereid, *Thiorhodovibrio* 970 (edaspidi *Trv*. 970) ja *Thermochromatium tepidum*i (edaspidi *Tch. tepidum*), kuna nende tuumkompleksid neelavad bakterklorofüll *a* (BChl) bakteritest valgust kõige kaugemal punases spektripiirkonnas. Kirjanduses [2] leiti, et väävelpurpurbakteritel on vaja kaltsiumi ioone, et tuumkompleks oleks termostabiilsem. Antud töös uuriti aga kaltsiumi ioone sisaldavate purpurbakterite termostabiilsuse mõju spektri nihkumisele. Sellega seonduvad püstitati töö eesmärgid ja hüpoteesid, mis on toodud järgmises peatükis.

Töö jaotub neljaks osaks. Esimeses osas kirjeldatakse purpurbaktereid, uuritavaid baktereid ja töös kasutatud eksitonmudelist. Teises osas räägitakse lähemalt arvutuslikest meetoditest ja neeldumisspektri simuleerimisest. Kolmandas osas tutvustatakse spektroskoopilist katsemetoodikat. Teostatud uuringuid ja saadud tulemusi kirjeldatakse ning analüüsitakse töö neljandas osas. Töö lõpus on kokkuvõte, kasutatud kirjanduse loetelu ning lisad. Lisad sisaldavad ruumi puudusel põhiosast välja jäänud kokkuvõtlikke andmeid kuumutatud proovide spektrite kohta ja fluorestsentsi ergastusspektri mõõtmise programmi koostamist.

Töö eesmärgid ja hüpoteesid

Käesoleva väitekirja esimene eesmärk tulenes autori 2021. aastal kaitstud bakalaureusetööst [4] ja selle põhjal avaldatud artiklist [3]. Neis töödes, kus katseliselt uuriti bakteri *Trv.* 970 neeldumisspektris avalduvat erakordselt suurt punanihet, järeldati, et selle nähtuse tõenäoliseks põhjuseks on tugevam interaktsioon lähinaabruses asuvate pigmentide vahel ehk eksitonefekt. Antud töös püütakse seda hüpoteesi põhjendada, võrreldes omavahel mõõdetud ning kvantkeemilistel ja eksitonteooria meetodeil arvutatud neeldumisspektreid.

Uurimustöö teiseks eesmärgiks oli kirjanduses (nt. [5, 6]) tihti esinenud väite, et fotosünteesivates bakterites esinev punanihe ja nende vastupidavus kõrgemate temperatuuride suhtes on omavahel seotud, paikapidavuse lähem uurimine. Üldistest printsiipides lähtudes tundub meile sellise üksühese seose olemasolu vähe tõenäoline.

1. Kirjandusülevaade

1.1 Purpurbakterid ja nende valgust koguvate üksuste ülesehitus

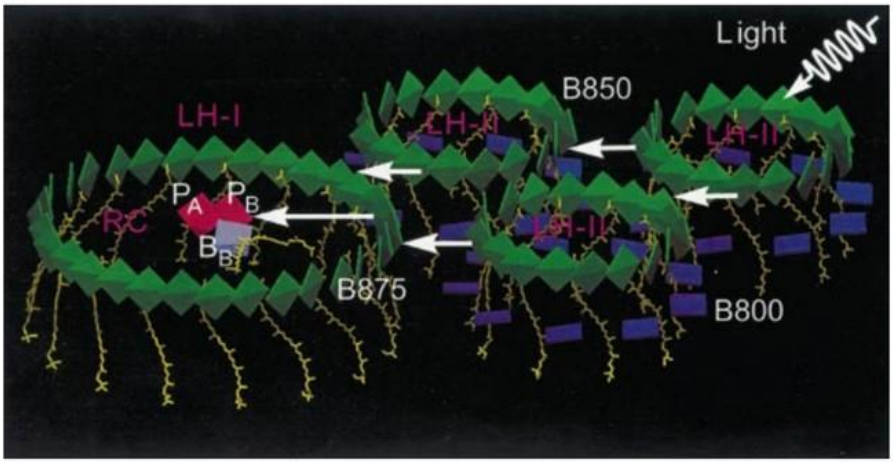
Purpurbakterid on anaeroobsed fotosünteetilised organismid, kes neelavad valgust punases spektripiirkonnas. Nad elutsevad tiikide, järvede ja jõgede kõige alumises anaeroobses kihis. Anaeroobne kiht on veekogude põhjas olev hapnikuta kiht, kuhu jõuab ülemisest aeroobsest kihist klorofüllide (Chl) ja karotenoidide (Car) poolt filtreeritud valgus. Klorofüllid neelavad peamiselt sinist (360 – 470 nm) ja punast valgust (620 – 680 nm), seega anaeroobsetesse kihtidesse jõuab sini-roheline (380 – 500 nm), mida neelavad karotenoidid, ja sinine (310 - 420) ning infrapunase lähedane valgus (üle 750 nm), mida neelavad bakterklorofüllid. [8] Bakterklorofüllid on struktuurselt klorofüllidele sarnased, aga neil on tavaliselt vähem süsiniku aatomite vahel olevaid kaksiksidemeid kui klorofüllil.

Üheks anoksügeenset fotosünteesi läbi viivaks bakteriks on väävelpurpurbakter, kus jääkproduktiks on väävel. Väävelpurpurbakterite fotosünteesis osalevad mitmed pigmendi-valgu kompleksid nagu reaktsioonitsenter (RC), sisemine valgusantenn (LH1) ja väline valgusantenn (LH2) (jn. 1.1). Bakterite RC koosneb peamiselt neljast valgu allüksusest - kerge (L), keskmine (M), raske (H) ja tsütokroom (Cyt). L- ja M-allüksused on üksteisega sarnased ning seotud omavahel pseudo-kahekordse ringsümmeetriaga. Üksik allüksus koosneb järgmistest pigmendi molekulidest – spetsiaalsest paarist (tugev dimeer) ehk kahest BChl molekulist (P_A, P_B), spetsiaalse paari lähedal olevatest kahest lisa-BChl molekulist (B_A, B_B), 2 bakterfeofütiini *a* molekulist (BPheo) (H_A, H_B) ja 2 kinooni (*quinone*) molekulist (Q_A, Q_B) (jn. 1.1).

Bakteriaalsete fotosünteetiliste antennikomplekside (LH1, LH2) struktuurid on sarnased, kus põhiline struktuuriüksus on rõngakujuline multimeeride kompleks. Tüüpiline allüksus multimeeri kompleksis koosneb tavaliselt kahest lühikesest peptiidi heterodimeerist (α- ja β-polüpeptiidid), mida omakorda hoiavad koos 2 - 3 bakterklorofülli ja 1 – 2 karotenoidi molekuli.

Antennikomplekside suurused on liigiti erinev, kus tavaliselt LH1 antenni B875 rõnga diameeter on umbes 10 nm ja LH2 antenni B800 ring 5 - 6 nm (850 ring on umbes 4,5 nm; jn. 1.1). [2] Näiteks tavalise (ei seo Ca^{2+} ioone) purpurbakteri *Rhodospirillum rubrum*i LH1 B875 ringi diameeter on umbes 9,5 nm. Tema sisemine valgusantenn koosneb 16 transmembraansest αβ-polüpeptiididest, 32 BChl molekulist ja 16 trans-karotenoidist. RC aga koosneb spetsiaalsest

BChl paarist, 2 lisa-BChl molekulist, 2 BPheo molekulist, raua ioonist, 3 ubikonoonist, rhodokinoonist ja 15-cis-karotenoidist. [9]

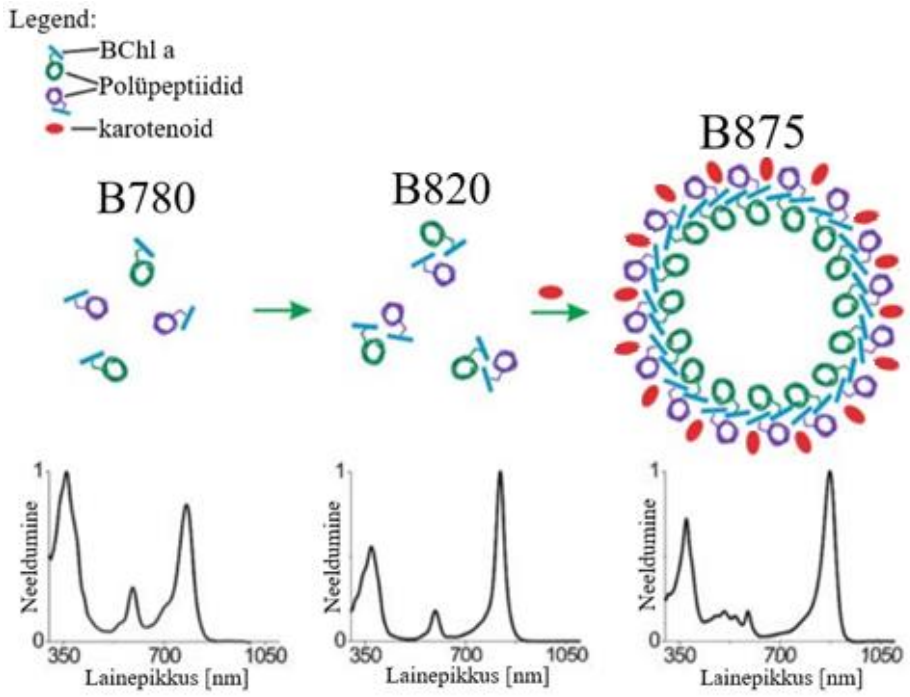


Joonis 1.1: Fotosünteetilise üksuse (RC, LH1, LH2) lihtsustatud pigmentide skeem, kus BChl molekulid on toodud B875 ja B850 ringis roheliste ja B800 ringis siniste ruutudena. Spetsiaalne paar P_A, P_B on toodud punaste ruutudena ja spetsiaalse paari lähedal olevaid kahte BChl molekuli B_A, B_B hallide ruutudena. Karotenoidid on toodud kollaste pulkadena. Numbrid B800, B850 ja B875 tähistavad vastavate pigmentide neeldumisspektrite maksimume nanomeetrites. [10]

Hüdrofoobsetel karotenoididel on oma roll kõikides fotosünteetilistes organismides. Purpurbakterites on see kui pigmendina ja struktuuri kindlustajana. Karotenoidide põhiahel koosneb 40 süsiniku aatomist, millel esineb looduses 9 - 15 konjugeerunud kaksiksidet (olenevalt liigist). LH2 antennis olevad karotenoidid seovad ka omavahel erinevaid allüksusi.

Purpurbakterite üks bakterklorofülli variantidest on BChl (teine on bakterklorofüll *b*), kus molekuli keskses osas on heme tüüpi molekul, mille keskel on magneesiumi aatom. BChl oligomeeri (kus eksitonid seostuvad) neeldumismaksimum asub elusal bakteril ~ 870 nm juures ja BChl monomeeril (kus eksitonid ei seostu) ~ 770 nm juures (jn. 1.2). [7, 11]

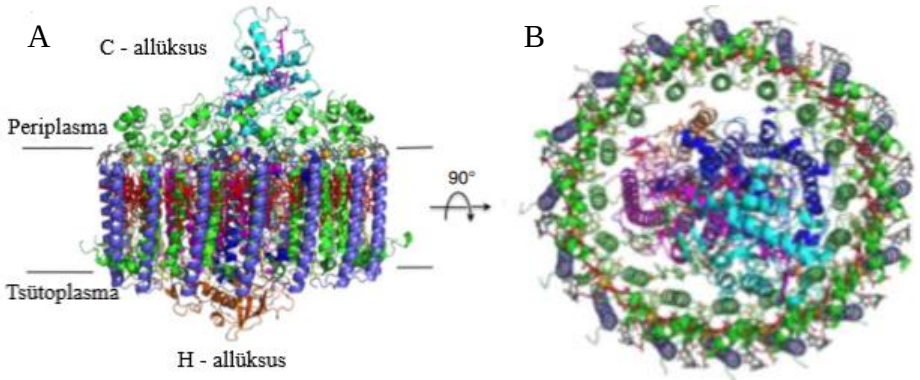
Käesolevas uurimustöös uuriti põhiliselt BChl molekule ja kaltsiumioone sisaldavaid väävelpurpurbaktereid *Thiorhodovibrio* 970 ja *Thermochromatium tepidum*i. Töös kasutati nende LH1-RC komplekside krüo-EM (jn. 1.3, [14]) ja röntgendifraktsioonianalüüsi struktuuride andmeid (jn. 1.4, [16]).



Joonis 1.2: Lihtsustatud skeem LH1 moodustumise etappidest koos vastavate spektritega ja legendiga. Allpool spektritelt on näha, et monomeeri BChl (B780) neelamismaksimum on ~780 nm, dimeeri BChl molekul (B820) ~ 820 nm ning multimeerse BChl ringi (B875) ~875 nm juures. [4]

1.2 *Thiorhodovibrio* 970

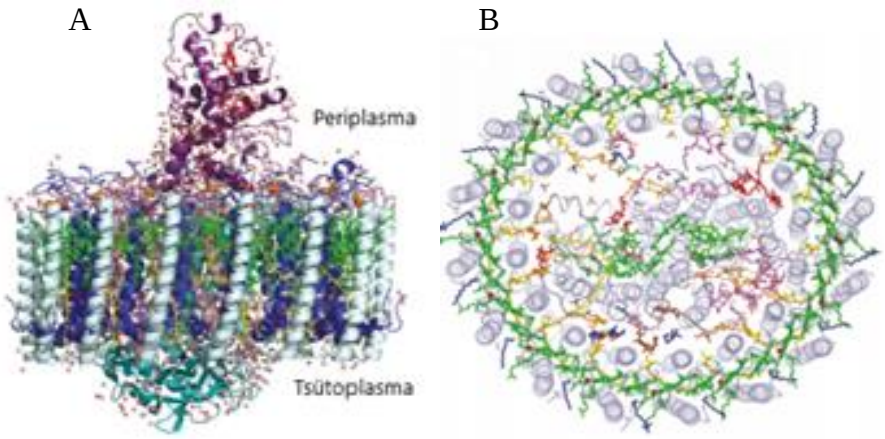
Mesofiilsel purpurbakteril *Trv*. 970 on ainult tuumkompleks, mille isoleeritud kompleksi neeldumismaksimum (B875) asub 960 nm juures. Tal on teadaolevatest BChl *a* molekuli sisaldavatest bakteritest kõige infrapunasem neeldumine. *Trv*. 970 sisemise valgusantenni allüksused moodustavad reaktsioonitsentri ümber ühtlaselt jaotunud kergelt elliptilise ja suletud kaksiksilindri (jn. 1.3). LH1 B875 ringi diameeter on 9,5 nm ja koosneb 32 BChl molekulist, 16 αβ-polüpeptiidist, 16 kaltsiumioonist (LH1 C-allüksuses) ja 16 trans-karotenoidist. Reaktsioonitsentris on 4 BChl molekuli, 2 BPheo molekuli, raua ioon, menakinoon, ubikinoon ja 15-cis-karotenoid. Trans-karotenoid ja 15-cis-karotenoid on struktuuri poolest erinevad (jn. 1.2). [4, 13]



Joonis 1.3: *Trv*. 970 tuumkompleksi struktuuri külg- (A) ja pealtvaade (B). LH1 α-polüpeptiidid on rohelised, β-polüpeptiidid on tumesinised ning RC valgu L-allüksus on tähistatud violetsena, M-alamühik sinisena, C-alamühik tsüaniidina, H-alamühik oranžina. BChl kromofoorid on kujutatud punasega ja Ca^{2+}ioone tähistavad kuldsed kerad. [14]

1.3 *Thermochromatium tepidum*

Termofiilsel purpurbakteril *Tch. tepidum*il on LH1-RC ja LH2, kus isoleeritud LH1-RC kompleksi neeldumismaksimum (B875) asub 915 nm juures. Seega neelab see bakter teisena valgust infrapunase piirkonna lähedal teadaolevatest BChl *a* bakteritest. Purpurbakteri tuumkompleksi LH1 on suletud elliptilise kujuga (jn. 1.4), mille B875 ringi diameeter on 9,4 nm, ning koosneb 32 BChl molekulist, 16 αβ-polüpeptiididest, 16 kaltsiumioonidest (LH1 periplasmalisel poolel) ja 16 trans-karotenoididest. Reaktsioonitsenter koosneb 4 BChl molekulist, 2 BPheo molekulist, raua ioonist, magneesiumi ioonist, menakinoonist, ubikinoonist ja 15-cis-karotenoidist. [15, 16]



Joonis 1.4: *Tch. tepidum*i LH1-RC kompleksi struktuuri külg- (A) ja pealtvaade (B). LH1 α-polüpeptiidid on värvitud siniseks, β-polüpeptiidid hele-tsüaansiniseks ja RC valgu allüksused on vasakul pildil lillad ja paremal pildil hallid. Bakterklorofüllid on rohelised, karotenoidid on kollased, Ca^{2+} -ioonid on oranžid täpid ja vee molekulid roosad täpid. [16]

1.4 Valgust koguvate pigment-valgu komplekside fotoergastuste eksitonmudel

Fotosünteesi keskmeks on fotosünteetilises üksuses olevad pigmendimolekulid, milleks on peamiselt bakterklorofüllid (fotosünteetilistes bakterites) ja klorofüllid (taimedes ja vetikates). Tänu nendele toimub Päikesest tulevate footonite neeldumine, kus peale neeldumist muutuvad valgust neelavate antennide molekulid elektrooniliselt ergastatuks. Ergastus viiakse edasi reaktsioonitsentrisse, kus toimub stabiilne esmane laengute eraldamine. Selle tagajärjel tekib väga redutseeriv anioon ja tugevalt oksüdeeruv katioon. [7, 12]

Oletatakse, et on olemas täiuslikult korrastatud agregaatide süsteem, kus on ainult üks oluline molekulaarne elektrooniline üleminek põhiolekust (GS) ergastatud olekusse. Seega kehtiks järgmine hamiltoniaan:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^{N} \varepsilon_i \hat{B}^{\dagger}{}_i \hat{B}_i + \frac{1}{2}\sum_{i\neq 1}^{N} J_{ij} \left(\hat{B}^{\dagger}{}_i \hat{B}_j + \hat{B}^{\dagger}{}_j \hat{B}_i\right), \quad (1)$$

kus *i* ja *j* tähistavad erinevaid molekule, ε_i on molekuli *i* elektroonne üleminekuenergia, J_{ij} on *i* ja *j* molekulide vahelise interaktsiooni operaatori maatriksi element ning $\hat{B}_i$ on molekuli *i* eksitonide Pauli tekke- ja kaooperaatorid. Tekkeoperaator $\hat{B}_i$ vastab molekuli *i* üleminekule ergastatud olekust põhiolekusse ja kaooperaator $\hat{B}^{\dagger}{}_i$ üleminekule põhiolekust ergastatud olekusse. Eksitoni hamiltoniaani (1) saab ülevaatlikumalt esitada maatrikskujul:

$$\left(\hat{H}\right)_{N\times N} = \begin{pmatrix} \varepsilon_i & J_{ij} & \cdots & J_{1N} \\ J_{ji} & \varepsilon_j & \cdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & J_{N-1,N} \\ J_{N1} & \cdots & J_{N,N-1} & \varepsilon_N \end{pmatrix}, \quad (2)$$

Üleminekuenergiad ε_i (mida sageli nimetatakse molekulide energiateks) ja molekulide vahelised interaktsioonenergiad J_{ij} arvutatakse üldiselt välja kvantkeemiliste meetoditega. Pigment-valgu komplekside puhul on tegemist keeruliste arvutustega, sest näiteks üleminekuenergiate arvutustes tuleb arvestada, et pigment asub valgu ümbruses ja see omakorda ümbritsevas füsioloogilises lahuses, mis kõik mõjutavad (nihutavad) pigmendi üleminekuenergiaid. Sarnased raskused ilmnevad interaktsioonide arvutamisel.

Kahe interakteeruva molekuli puhul on molekulide vahelised mõjud võrdsed $J_{ij} = J_{ji}$. Sellisel juhul arvutatakse kollektiivsete (mõlemat molekuli hõlmavate) ergastuste (eksitonide) energiad E järgmise valemiga:

$$E_{1,2} = \frac{1}{2}\left(\varepsilon_i + \varepsilon_j \pm \sqrt{\left(\varepsilon_i - \varepsilon_j\right)^2 + 4J^2{}_{ij}}\right). \quad (3)$$

Molekulide interaktsioonid J_{ij} lühikestel molekulide vahelistel kaugustel arvutatakse kvantkeemiliste meetoditega ja suurte kauguste korral (mõni Ongström) kasutatakse dipool-dipool interaktsiooni lähendust

$$J_{ij} \approx J^{dip}{}_{ij} = \frac{1}{4\pi\varepsilon}\left[\frac{\vec{\mu}_i \cdot \vec{\mu}_j}{R^3{}_{ij}} - \frac{3(\vec{\mu}_i \cdot \vec{R}_{ij})\,(\vec{\mu}_j \cdot \vec{R}_{ij})}{R^5{}_{ij}}\right], \quad (4)$$

kus $\vec{\mu}_i$ on molekuli *i* efektiivne ülemineku dipoolmomendi vektor ($\overrightarrow{\mu_n} = \frac{\varepsilon+2}{3}\,\overrightarrow{\mu^0{}_n}$), $\vec{R}_{ij}$ on kahe dipooli asukoha vektor ja R_{ij} on kahe dipooli vaheline kaugus. [20]

Neeldumisspektri simuleerimisel arvutatakse vaja minevaid neeldumismaksimumide intensiivsusi järgmise valemiga:

$$\mu^2{}_e = \sum_{i,j=1}^{N} |\vec{\mu}_i||\vec{\mu}_j|\left[\hat{\mu}_i \cdot \hat{\mu}_j\right] c_{ei} c_{ej}\,, \quad (5)$$

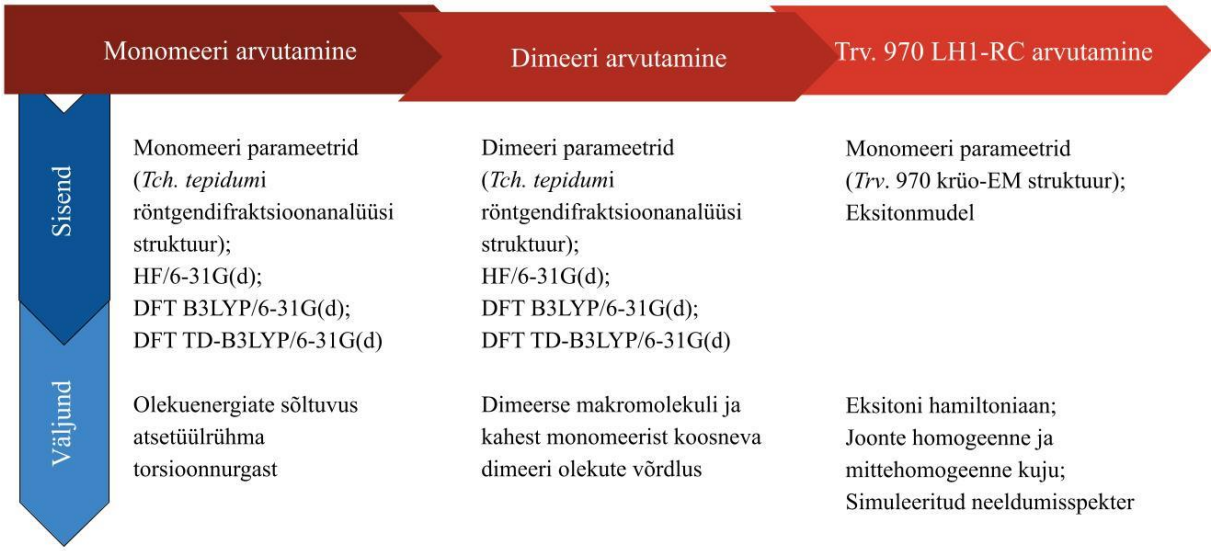
kus $\vec{\mu}_i$ on molekuli *i* efektiivne ülemineku dipoolmomendi vektor, $\hat{\mu}_i$ on molekuli *i* ülemineku suuna ühikvektor ja c_{ei} on ergastatud oleku *e* omavektori *i* element.

2. Töös kasutatud arvutuslikud meetodid

2.1 Neeldumisspektrite simuleerimise põhimõtteline skeem

Käesoleva töö teoreetilise osa üks peaeesmärke oli keskse LH1 valgust koguva pigment-valgu kompleksi neeldumisspektri simuleerimine, kasutades ja varieerides erinevaid varem väljatöötatud teoreetilisi arvutusmudeleid. Rehkendatud spektri võrdlus mõõdetud spektriga lubab mitte üksnes kvalitatiivset hinnangut spektri olemusele, vaid soodsatel asjaoludel võimaldab ka kvantitatiivselt hinnata erinevate füüsikaliste mehhanismide osatähtsust spektri kujunemisel.

LH1 kompleks on tervikuna liiga suur ja keeruline kvantkeemilisteks rehkendusteks. Seega oli esimeseks ülesandeks süsteemi lihtsustamine arvutuslikult jõukohasteks (aga füüsikaliselt põhjendatud) üksusteks. Esmalt eeldati, et üksikute BChl molekulide (monomeeride) spektrite arvutuste tulemusi saab võtta aluseks suurte oligomeeride (nt. B875) spektrite arvutamiseks. Selle tõestamiseks arvutati kõigepealt välja lihtsaima BChl dimeeri (B875 struktuurne „ehituskivi“) ergastatud olekute energiad. Lõpuks arvutati dimeeri peal timmitud parameetritega ja *Trv.* 970 struktuuri alusel välja kogu LH1-RC tuumkompleksi neeldumisspekter (jn. 2.1).



Joonis 2.1: *Trv.* 970 LH1-RC neeldumisspektri arvutamise põhimõtteline skeem. Rehkendatud neeldumisspektrit võrreldi lõpus mõõdetud neeldumisspektriga.

2.2 Kvantkeemilised meetodid (DFT ja TD-DFT)

Käesolevas töös kasutati järgnevat kirjeldatud arvutusmeetodit, kuna selline meetod võiks artiklite [7, 19, 20] järgi olla hea viis neeldumisspektrite simuleerimiseks. Struktuuri optimeerimiseks tiheduse funktsiooni teooriat (DFT*)* koos hübriidse funktsionaaliga B3LYP/6-31G(d). Ergastatud olekute energiate leidmiseks rakendati ajast sõltuvat tiheduse funktsiooni teooriat (TD-DFT) koos ajast sõltuva hübriidse funktsionaaliga TD-B3LYP/6-31G(d). DFT on kvantmehaaniline modelleerimise meetod, mis võimaldab arvutada aatomite ja molekulide elektroonilist ja ruumilist struktuuri. Süsteemi omadusi selles teoorias kirjeldatakse funktsionaalide kaudu. B3LYP ehk hübriidne Becke, 3 - parameetri, Lee-Yang-Parri vahetus-korrelatsiooni funktsionaal on üks enim kasutatud DFT meetod molekulaarspektroskoopias, mis ligikaudu arvestab elektronide vahetus-korrelatsioonienergiaid. [17] DFT arvutuste algsed struktuurid saadi kasutades kvantkeemilist Hartree-Focki molekulaarorbitaali meetodit (HF/6-31G(d), jn. 2.1), kus HF meetod arvutab välja molekulaarsed elektroonilised olekud ja struktuurid kasutades lainefunktsioone. [18]

Kasutatava funktsionaali nimes olev laiend 6-31G(d) tähistab polaarse baasiga X-YZG(d) lainefunktsiooni. X näitab, et iga sisemise kihi (1s orbitaali) Slateri orbitaal on lineaarne kombinatsioon 6 primitiivsest Gaussi funktsioonist. Y ja Z näitavad, et iga valentskihi Slateri orbitaal on jagatud sisemiseks ja välimiseks osaks, kasutades 3 ja 1 primitiivset Gaussi funktsiooni. Tähis (d) näitab, et algne funktsioon on polariseeritud ehk lubatakse orbitaalidel muuta suurust, aga mitte kuju.

Molekulide geomeetria ja üleminekuenergiate arvutusteks kasutati Tartu Ülikooli 24 protsessoriga superarvutit *Rocket* (1 protsessori 24 tunnine tööaeg on võrdne 24 protsessori 1 tunnilise tööajaga). Ühe protsessori jõudlust arvestades oleks kõigi rehkenduste peale (ilma sunnitud vaheaegadega) kulunud 520 päeva. Tegelikult kulus paralleelarvutuse võimalust kasutades tunduvalt vähem aega (umbes 150-200 päeva).

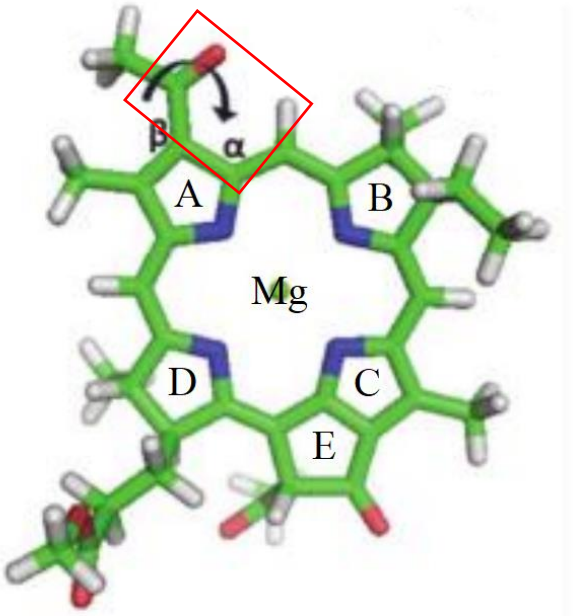
Andmete töötluseks ja jooniste tegemiseks kasutati programme Gaussian 16 (Gaussian Inc.) ja Origin 6.0 (Microcal Software).

2.3 Monomeeri ja dimeeri BChl arvutamine

Bakteriaalse fotosünteesi tsentraalseteks molekulideks on tsüklilised tetrapürroolsed bakterklorofüllid (BChl). BChl molekulid on peamiselt bakterkloriinid ehk neil on bakterkloriini makrotsükliline ring, millel on kaks redutseeritud pürroolitsüklit (B ja D ringid

joonisel 2.2) ja ringi keskel magneesiumi aatom, mis on seotud bakteriokloriini N aatomitega. [12] Arvutuste käigus lühendati aja kokkuhoiu mõttes BChl fütüülsaba, kuna on leitud [24, 25, 26], et fütüülsabal ei ole üleminekuenergiate arvutamisel suurt rolli. Kirjandusest [12] on samuti teada, et BChl optiliste spektrite asukoht ja kuju (ehk üleminekute suhteline intensiivsus) sõltuvad tema funktsionaalsete gruppide asendist ruumis. Eriti tundlikud on spektrid pigmendimolekuli 3-atsetüülrühma torsioonnurga suhtes. LH1 kompleksis on need nurgad määratud atsetüülrühma ja ümbritseva valgu vahel kujunevate vesiniksidemete poolt.

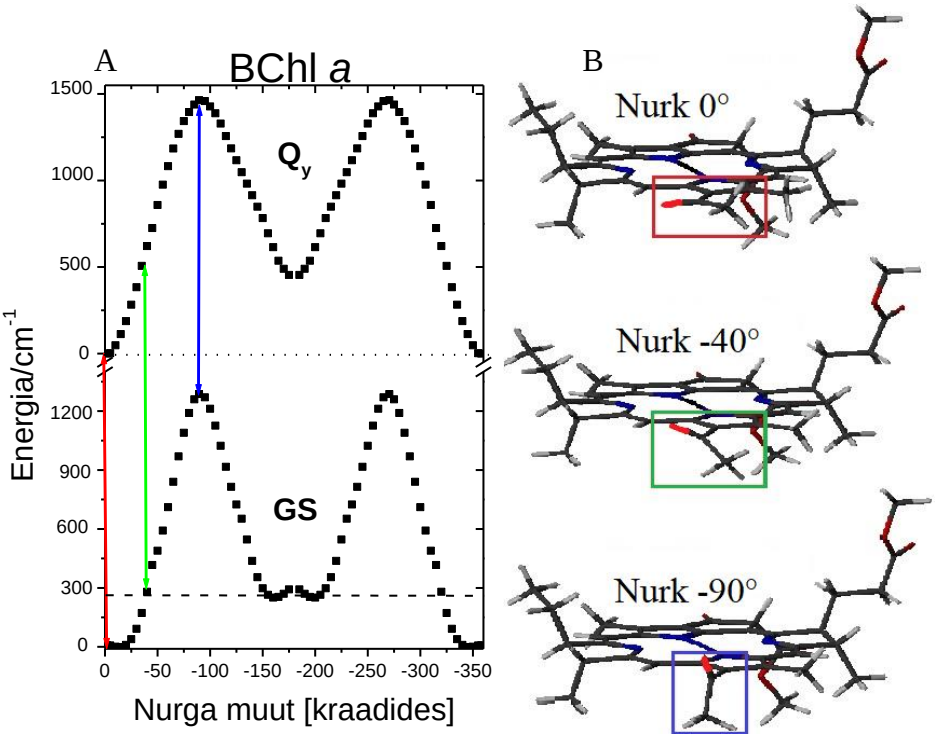
Joonisel 2.2 on punase kastiga näidatud 3-atsetüülrühma asukoht BChl molekulis ja musta noolega sellega seotud torsioonnurga võimalikku muutus makromolekuli tingliku tasapinna suhtes (negatiivse nurga muutuse suunas). Torsioonnurgaga seoses tuleb arvestada, et kaasa liiguvad ka metüülgrupid ja nende prootonid. Vesinikuaatomite positsioonid optimeeriti B3LYP meetodi abil.



Joonis 2.2: BChl mudelmolekuli MeBChlide-a struktuur, mis on optimeeritud kasutades TD-CAM-B3LYP/6-31G (d) arvutusmudelit. Punane kast raamib 3-atsetüülrühma; nool osundab muutuvat torsioonnurka O-C-C_β-C_α atsetüülrühma ja tsüklilise tetrapürrooli makromolekuli tasandi vahel. Tähtedega (A, B, C, D, E) on IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) märgistusskeemi järgi toodud tetrapürroolide järjestus. [14]

Joonis 2.3 A kujutab BChl põhioleku GS ja ergastatud oleku Q_y energiate sõltuvust 3-atsetüülrühma pöördenurgast. Lisaks on joonis 2.3 B näidatud molekuli geomeetria, mis vastab kolmele valitud torsioonnurgale: 0, - 40 ja - 90 kraadi. Näeme, kuidas koos torsioonnurkadega

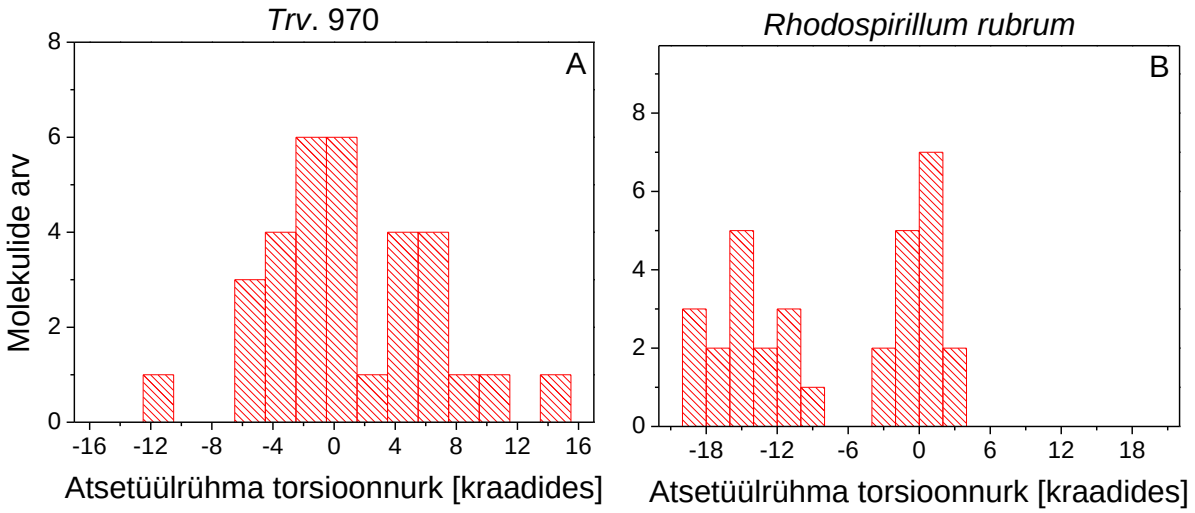
muutuvad nii molekuli üleminekuenergiad (vertikaalne erinevus Q_y ja GS olekutele vastavate energiakõverate vahel) kui ka molekuli ruumiline konfiguratsioon. [12]



Joonis 2.3: (A) Põhioleku (GS) ja ergastatud oleku (Q_y) energiate sõltuvus torsioonnurgast. Horisontaalse katkendjoon GS paneelil tähistab keskmist soojusenergiat toatemperatuuril (k_BT ≈201,6 cm^{-1}). Tulemused on saadud kasutades TD-B3LYP/6-31G (d) arvutusmudelit. [7, 19] Parempoolsel joonisel (B) on näidatud MeBChlide-a struktuur kolme torsioonnurga väärtuse juures: 0, - 40 ja - 90 kraadi ülevalt alla lugedes. Ruudu sees olev punane pulk tähistab O (hapniku) aatomit. Paneelil A olevad kolm värvilist kaksiknoolt tähistavad Q_y ja GS seisundite vahelisi üleminekuenergiaid, mis vastavad valitud torsioonnurgad 0, - 40 ja - 90 kraadi.

Katseliselt saadud röntgen- ja krüo-EM struktuuridest [14, 16] on näha, et erinevate LH1 kompleksidel on täiesti erinevad BChl atsetüülrühma torsioonnurgad.

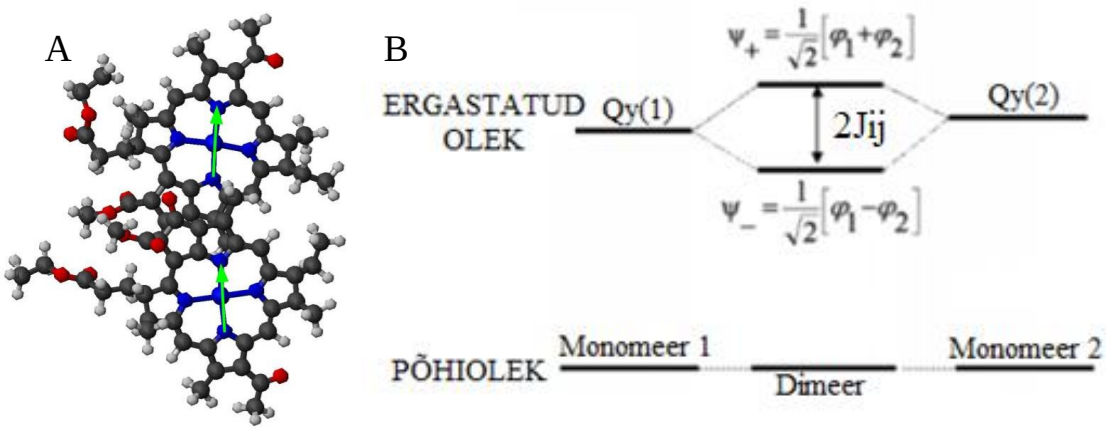
Joonisel 2.4 on näidatud molekulide jaotusi atsetüülrühma torsioonnurga järgi, mis on saadud *Trv*. 970 (A) ja *Rhodospirillum rubrum*i (B) LH1 kompleksi krüo-EM struktuurist. Kuna krüo-EM struktuuride saamiseks külmutatakse proove väga kiiresti, siis võib juhtuda, et mõned atsetüülrühma torsioonnurgad võivad paremini esindada kõrgemat energiastruktuuri, mitte tingimata minimaalset energiastruktuuri. *Rhodospirillum rubrum*i LH1 B875 ringi neeldumisriba maksimum asub 880 nm juures, samas *Trv*. 970 oma asub 960 nm juures.



Joonis 2.4: *Trv*. 970 (A) ja *Rhodospirillum rubrum*i (B) LH1 pigment-valgu krüo-EM struktuuris leiduva 32 BChl molekuli jaotus astetüülrühma torsioonnurga järgi. Andmed on saadud vastavalt artiklitest [14] ja [9]. Näeme, et *Trv*. 970-l suurem osa molekule mahuvad väikese ± 6 kraadi tasandist irduva nurga järgi, samas kui *Rhodospirillum rubrum*i jaotusfunktsioonis eristub selgelt kaks erinevate nurkadega molekulide gruppi.

Jooniselt 2.4 A on näidatud *Trv*. 970 molekulide põhipopulatsioon, mis on peamiselt 0 ja - 2 kraadi vahel. Joonisel 2.4 B on näha, et *Rhodospirillum rubrum*i molekulidel on kaks põhipopulatsioonide atsetüülrühma torsioonnurkade vahemikku, kus üks on 2 ja - 2 kraadi vahel ning teine - 10 ja - 20 kraadi vahel. Histogrammil olevat teavet (jn. 2.4 A) kasutati *Trv*. 970 tuumkompleksi Q_y üleminekudipoolide ja üleminekuenergiate mittehomogeensete jaotuste genereerimiseks.

Artiklis [7] oletati, et LH1 neeldumisriba asukoht võib olulisel määral sõltuda atsetüülrühma torsioonnurgast. Selle oletuse paikapidavust kontrolliti väikese dimeerse subühiku peal, kasutades *Tch. tepidum*i röntgenstruktuuri [16] ja TD-B3LYP meetodit. Arvutuste käigus muudeti atsetüülrühma torsioonnurki ja fikseeriti kõik aatomid, välja arvatud vesiniku aatomid ja ringi A metüülrühm (jn. 2.2), antud struktuuri koordinaatidega. Paralleelselt rehkendati dimeeri alumiste energiaüleminekute (mis vastavad monomeri Q_y energiaüleminekule) lõhenemist eksitonmudeli järgi (jn. 2.5).



Joonis 2.5: (A) *Tch. tepidum*i LH1-RC BChl dimeeri röntgenstruktuur [16], kus rohelise noolega on näidatud Q_y üleminekudipooli suunda, ja (B) monomeeride ühinemisest dimeeriks tulenev energiatasemete jagunemine, kus dimeeri molekulide interaktsioon on antud joonisel kui J_{12}. [21]

Kui saadud kahest monomeerist koosneva dimeeri tulemused kattuvad piisavalt hästi kvantkeemiliselt rehkendatud dimeeri tulemustega, siis oleks võib-olla võimalik seda lihtsustatud lähenemist rakendada suurte oligomeersete süsteemide rehkendamiseks.

2. 4 *Trv*. 970 LH1-RC neeldumisspektri arvutamine

Parima lahutuse huvides simuleeriti artiklis [3] madalal temperatuuril mõõdetud neeldumisspektrit. Arvutuste aluseks võeti BChl, BPheo ja karotenoidide molekulide asukohad ning orientatsioonid. Lisaks võeti arvesse BChl molekulide konformatsioonilised parameetrid. Andmed saadi *Trv*. 970 krüo-EM struktuurist [14], mille lahutusvõime on 0,282 nm. Lisaks loeti BChl ja BPheo üleminekudipoolmomentide vektorite suundadeks N(A) – N(C) (Q_y ja Soret y) ning N(B) – N(D) (Q_x ja Soret x; jn. 2.2). Karotenoididel võeti üleminekudipoolmomendi vektori suunaks karotenoidide pikaks venitatud skelett.

Tuumkompleksi pigmentide vahelist eksitoni interaktsiooni arvutati nii kvantkeemilistel meetoditel kui dipool-dipool lähendusega (4). Eksitoni interaktsioonienergiate esialgseks hindamiseks kasutati dimeerse supermolekuli Q_y üleminekuenergiate vahet. Kuna eksitoninteraktsioonid BChl erinevate ergastatud olekute vahel, eriti Q_y - Soret olekute vahel, võivad samuti mõjutada tuumkompleksi üleminekuenergiaid. [21, 22] Seega arvestati eksitonmudelis nii madalaimat (Q_y) kui ka teist (Q_x), kolmandat, neljandat ja viiendat BChl singletset ergastatud olekut. Arvesse võeti ka BPheo viis singletset ergastatud olekut. BChl ja BPheo üleminekuenergiate hindamiseks kasutati lineaarset regressiooni arvutatud TD-B3LYP

ning eksperimentaalselt saadud molekulide üleminekuenergiate vahel (tabel 4.1 üleminekuenergia väärtused). [7] Karotenoidide puhul rehkendati vaid kõige madalamat optiliselt lubatud ergastatud olekut S_2, kuid selle juures arvestati tugevat interaktsiooni nelja molekulisisese võnkumisega. Neeldumisspektris tekitavad need vibroonsed üleminekud karotenoidide elektroonsetele spektritele iseloomulikud kolm riba. Karotenoidide S_2 olekute üleminekuenergiad ja üleminekudipoolide suurusjärgud saadi hinnanguliselt LH1 katselisest neeldumisspektrist. Ilma S_2 olekut arvestamata annavad kvantkeemilised rehkendused oluliselt vale tulemuse. [20]

Eksitoni hamiltoniaani maatriks (2) koosnes 258 reast ja 258 veerust, mis pärinevad 36 BChl (LH1-RC) molekulist, 17 karotenoidi (LH1-RC) molekulist ja 2 BPheo (RC) molekulist. Iga BChl ja BPheo molekuli puhul on arvestatud 5 olekuga (Q_y, Q_x ja 3 Soret (x ja y polarisatsiooniga) olekut), mis kokku annab (36 + 2) x 5 = 190 olekut. Karotenoididel on arvestatud 4 vibroonse üleminekuga, mis lisab veel 17 x 4 = 68 olekut. Kokku siis 258 olekut. Sellise suurusega eksitoni hamiltoniaani maatriksit (2) diagonaliseerides leiti 258 eksitoni omaväärtust (antud molekulaarse süsteemi kollektiivset üleminekuenergiat), aga ka 258 neile vastavat oleku lainefunktsiooni ning ülemineku dipoolmomenti väärtust kui orientatsiooni. Viimased on vajalikud spektrijoonte intensiivsuse arvutamiseks valemi (5) järgi.

Diagonaliseerimise tulemuseks on eksitonide nn. joonspekter, mis vastab ühele kindlale molekulide konfiguratsioonile. Tegelikult omavad ka temperatuuril 0K juures mõõdetud spektrijooned lõplikku laiust ja kindlat, keerulist kuju. [3] Siin on arvutuste lihtsustamise huvides kõikidele spektrijoontele rakendatud ühesugust homogeenset Gaussi joonekuju, mille laius poolel kõrgusel (FWHM) on 220 cm^{-1}.

Tegelikus katses, kus lahuse kontsentratsiooniks on c = 5,43 x 10^{-9} M ja mõõdetava objekti ruumalaks on V = 1 x 10^{-6} L, mõõdetakse üheaegselt ~ 3,26 x 10^{10} LH1-RC kompleksi spektrit. Igaüks neist kompleksidest asub veidi erinevas keskkonnas, mis omakorda muutub (fluktueerib) ajas. Seepärast tuleb reaalsete spektrite simuleerimisel arvestada komplekside spektrite nn. mittehomogeense laienemisega. Artiklis [3] leiti, et *Trv*. 970 tuumkompleksi kõige madalama energiaga Q_y eksitoni energia temperatuuril 4.5K jaotub Gaussi kujuga mittehomogeensesse jaotusfunktsiooni (IDF) järgi täislaiusega FWHM 88 ± 12 cm^{-1}. Antud töös genereeriti iga spektri arvutamiseks vähemalt 1000 erinevat molekulide konfiguratsiooni, et saada katsega võrreldavaid tulemusi. Detailsemalt kirjeldatakse seda peatükis 4.

3. Katsemetoodika

3.1 Proovi ettevalmistamine

Katseobjektidena kasutati *Trv*. 970 ja *Tch. tepidum*i isoleeritud LH1-RC proove, mis olid kasvatatud ja rakkudest eraldatud professor Wang-Otomo laboris (Ibaraki University, Jaapan) [13]. Enne kasutamist säilitati kontsentreeritud proove sügavkülmikus temperatuuril -78 °C.

Spektroskoopilisteks mõõtmisteks lahjendati proove spetsiifilise lahusega, mis sisaldas 20 mM Tris-HCl puhvrit (pH 7,5), lisaks 0,05% n-dodetsüül-β-D-maltopüranosiid (DDM) detergenti tuumkomplekside agregatsiooni vältimiseks ja 50–100 mM $CaCl_2$ stabiilse küllastunud Ca^{2+} taseme säilitamiseks. Sobiva kontsentratsiooniga Tris-HCl puhvri, DDM detergendi ja $CaCl_2$ lahused valmistati vastavatest kontsentreeritud lahustest, lisades sinna ülipuhast mQ vett.

Uuriti ka Ca^{2+} vaba *Trv*. 970 proovi, millele lisati kaltsiumi ioonide eemaldamiseks 5-10 mM etüleendiamiintetraäädikhapet (EDTA). Proovi inkubeeriti mitu tundi enne mõõtmist.

3.2 Aparatuur

Neeldumisspektrite mõõtmiseks kasutati Cary 60 UV-Vis spektromeetrit (Agilent) koos temperatuuri kontrolliva rakuga (Quantum Northwest). Proovide temperatuure muudeti vahemikus 20 – 85 °C kiirusega 1 – 2 °C/min, kus temperatuuri määramatus oli ± 0,2 °C. Spektri mõõtmisaeg ühel kindlal temperatuuril oli keskmiselt 2 minutit. Neeldumisspektrite mõõtmiseks kasutati 10 mm kvartsküvette (Hellma Analytics), kus proovi kogus oli 1-2 mL.

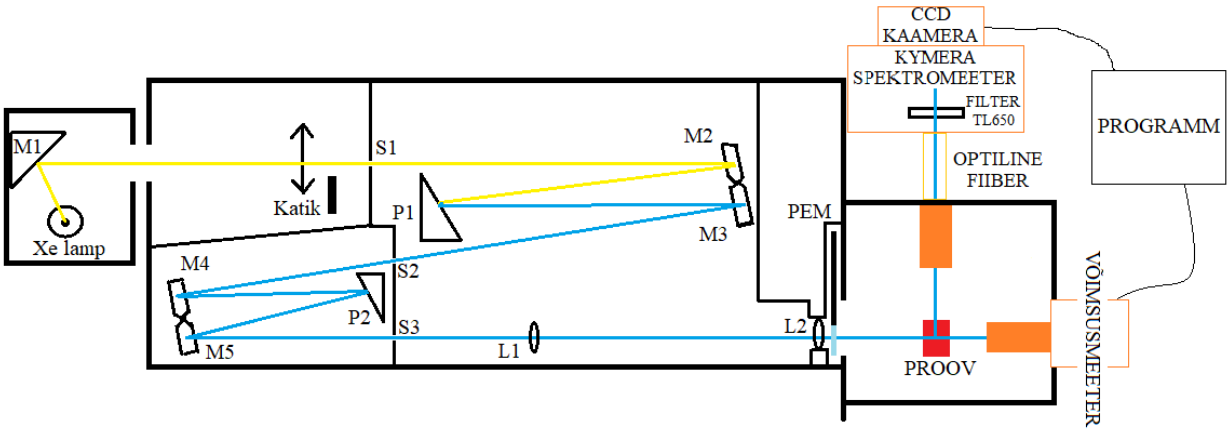
Kiirgusspektrite mõõtmiseks kasutati 0,3 m fookuskaugusega spektrograafi Shamrock SR-303i ja termoelektriliselt jahutatavat CCD kaamerat DV420A-OE (mõlemad Andor Techology). Spektrograafi mõõtepiirkond 150 j/mm võrega oli 550-1128 nm ja sisendpilu laius 50 μm. Fluorestsentsi ergastamiseks kasutati 407 nm dioodlaserit võimsusega 2 mW. Ergastava lainepikkuse äralõikamiseks oli spektrograafi sisendpilu ees filter OC-14, mis laseb läbi valgust spektraalvahemikus 560–3000 nm. Mõõdetud spektreid korrigeeriti vastavalt aparatuuri spektraalsele tundlikkusele.

Fluorestsentsi ja ergastusspektrite mõõtmiseks kasutati valgusallikana Chirascan Plus (Applied Photophysics) spektrofotomeetris olevat Xe-lampi ning signaali registreerimiseks Kymera 193i-B1 spektromeetrit (Andor Tehnology) koos CCD kaameraga DV420A-OE. Ergastava valguse intensiivsust sõltuvalt lainepikkusest mõõdeti võimsusmeetriga mudel 1830-R (Newport), katseseadme optiline skeem on kujutatud joonisel 3.1.

Fluorestsentsispektrite saamiseks skaneeriti ergastava Xe-lambi valgust läbi Chirascani spektromeetri spektraalse lahutusega 4 nm ja sammuga 2 nm. Igal lainepikkusel registreeriti vastav fluorestsentsispekter Kymera spektromeetriga. Kymera ees paiknes filter TL 650 (läbilaskvus alates 650 nm) ja sisendpilu 200 µm, mis tagas 4 nm spektraalse lahutuse. Tüüpiline mõõteaeg sõltuvalt signaali tugevusest oli 1 kuni 4 sekundit. Registreeritud kiirgusspektrite kogumit töödeldi omatehtud ergastusspektrite esitlemise programmiga (Lisa 2), mis võimaldas sujuvalt valida ergastusspektri parameetreid ehk registreerimise spektraalset asukohta ja laiust.

Tsirkulaarse dikroismi (CD) spektrite saamiseks kasutati Chirascan Plus spektrofotomeetrit selle tavapärases mõõterežiimis. CD spektromeetri spektraalne lahutus on valitav vahemikus 0,5 – 4 mm ja maksimaalne mõõtepiirkond 180 –1100 nm. Selles paiknev termostabiliseeritud proovihoidja võimaldab muuta temperatuuri sujuvalt 10 – 90°C ulatuses ning hoidjasse saab paigutada 0,1 – 10 mm teepikkusega küvettisid. Tuumkomplekside CD spektrite mõõtmiseks kasutati 0,1 ja 2 mm kvartsküvette. Täpsema tulemuse saamiseks lahutati mõõdetud CD spektrist maha eelnevalt samas küvetis mõõdetud puhvri CD spekter.

Andmete töötluseks ja jooniste tegemiseks kasutati programme Origin 6.0 (Microcal Software) ja fluorestsentsi ergastusspektrite esitlemise programmi (Lisa 2).



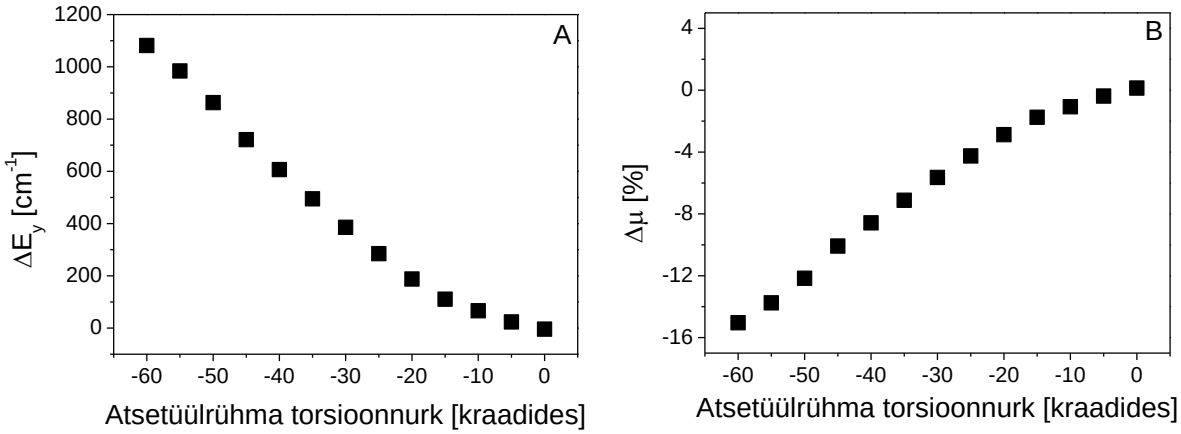
Joonis 3.1 Fluorestsentsispektrite mõõtmiste katseskeem. M1 on koondav peegel; S1 kuni S3 on pilud; L1 ja L2 on läätsed; M2 kuni M5 on peeglid; P1 ja P2 on prismad ning PEM on fotoelastne modulaator.

4. Töö tulemused ja nende analüüs

4.1 *Trv*. 970 simuleeritud neeldumisspekter ja selle analüüs

Käesoleva töö teoreetilise osa hüpoteesi tõestamiseks kasutati *Tch. tepidum*i BChl dimeeri röntgenstruktuuri andmeid, kuna sellel on katseobjektidest parima lahutusvõimega struktuur, ja TD-DFT poolt arvutatud dimeeri andmeid võrdlemiseks eksitonlähendusega saadud monomeeride parameetritest saadud dimeeri andmetega. Andmete all mõeldakse üleminekudipoolimomendi suurusjärke ja üleminekuenergiad, mis sõltuvad atsetüülrühma torsioonnurgast. Valitud atsetüülrühma, mille torsioonnurka muudeti, on näha joonistel 4.1 ja 4.2. Kuna jooniselt 4.2 näeb, et hüpotees peab paika, siis *Trv*. 970 tuumkompleksi neeldumisspektri simuleerimiseks kasutati tema monomeeri parameetritega eksitonmudelit, kus atsetüülrühma torsioonnurga andmed saadi krüo-EM struktuurist. [14]

Joonisel 4.1 kujutatakse BChl monomeeri Q_y üleminekuenergia (mis valemis (3) vastab suurusele ε; A) ja ülemineku dipoolmomendi (mis valemis (4) vastab suurusele μ; B) muutust sõltuvalt atsetüülrühma torsioonnurgast. Positiivsete nurga väärtuste korral muutuvad suurused 0 kraadi suhtes peegelpildis. Näeme, et nurga suurenedes üleminekuenergia kasvab, ehk vastav spektrijoon nihkub nähtava spektri sinise otsa suunas. Samas kui dipoolmoment kahaneb, siis toimub vastava spektrijoone nõrgenemine.



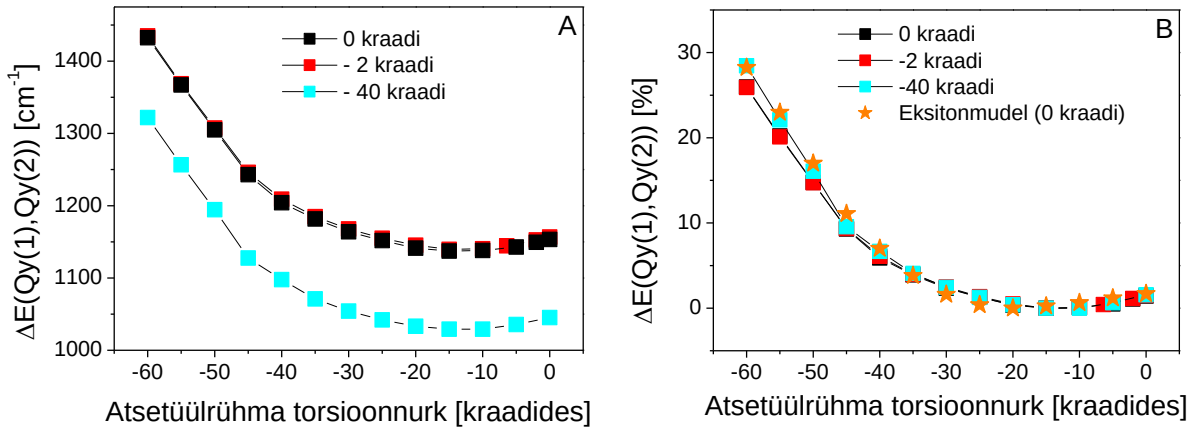
Joonis 4.1: BChl monomeeri Q_y üleminekuenergia muutus mõõdetuna lainearvude ühikutes (A) ja vastava ülemineku dipoolmomendi protsentuaalne muutus 0-kraadise nurgale vastava dipoolmomendi väärtuse suhtes (B) sõltuvalt atsetüülrühma torsioonnurgast makromolekuli tasandi suhtes. Tulemused on saadud kasutades TD-B3LYP/6-31G (d) arvutusmudelit.

Seda protseduuri kirjeldati lihtsaima oligomeeri ehk dimeeri eksitonenergiate (valemis (3) tähistatud kui E_1 ja E_2) arvutamise kaudu, kasutades TD-DFT meetodit. Järgides valemeid (3)

ja (4), tuleb kõigepealt välja arvutada kahe molekuli interaktsioonienergiad J_{12} erinevatel atsetüülrühma torsioonnurkadel ühes ja/või teises molekulis. Selleks vajalikud üleminekudipoolmomentide väärtused (jn. 4.1 B) etteantud torsioonnurkadel arvutati välja kvantkeemistel meetoditel ning nende omavaheline ruumiline torsioonnurk aga võeti kirjanduses avaldatud *Tch. tepidum*i LH1-RC röntgenstruktuurist (lihtsalt selleks, et töötada realistliku BChl dimeeri mudeliga).

Kasutades TD-B3LYP meetodit, saadi algne informatsioon eksitonenergiadest E_1 ($Q_y(1)$) ja E_2 ($Q_y(2)$). Nende energiate vahe võrdub kahekordse interaktsiooni energiaga $|E_1 - E_2| = 2|J_{12}|$. Saadud eksitonenergia ja atsetüülrühma torsioonnurkade andmetega saadi infot üleminekuenergiate ja üleminekudipoolmomentide kohta atsetüülrühma (torsioonnurga) funktsioonist (valem (3)).

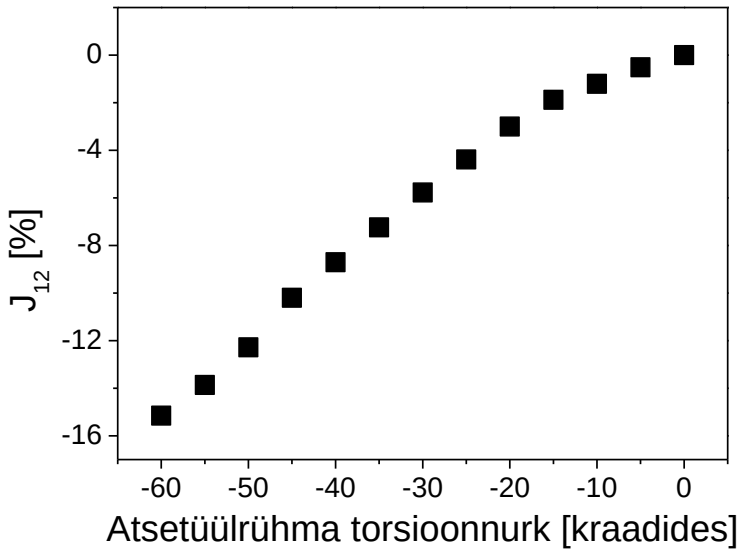
Joonisel 4.2 A on näidatud mitme erineva atsetüülrühma orientatsiooniga BChl dimeerkompleksi TD-B3LYP arvutatud energia erinevus kahe madalaima singletse ergastatud oleku ($Q_y(1)$ ja $Q_y(2)$) vahel. Joonisel 4.3 B on näidatud neid energiaid protsentide minimaalse väärtuse suhtes. Lisaks on esitatud oranžide tähtedena monomeerist põhinevad arvutuste tulemused.



Joonis 4.2: TD-B3LYP mudeliga arvutatud BChl dimeeri kahe madalaima singletse ergastatud olekute ($Q_y(1)$, $Q_y(2)$) energiate vahe sõltuvus esimese molekuli atsetüülrühma torsioonnurgast teise molekuli atsetüülrühma kolme fikseeritud (0, -2 ja -40 kraadi) nurga puhul. Andmed paneelil (A) on esitatud energia ühikutes ja paneelil (B) protsentides minimaalse väärtuse suhtes. Võrdluseks on paneelil (B) esitatud monomeerist põhinevate arvutuste tulemused, mis põhiosas kattuvad TD-B3LYP saadud andmetega.

Joonisel 4.3 on näidatud eksitoninteraktsiooni energia sõltuvust atsetüülrühma funktsioonist. Interaktsioonienergia on kooskõlas monomeeri Q_y dipooli sõltuvusega atsetüülrühma torsioonnurga pöördest. Kuna suudeti saada TD-DFT arvutatud dimeeri tulemusi lihtsa

monomeeri parameetrite abil (üksikul monomeeril vaakumis ei ole monomeeri ümber täiendavaid BChl molekule), siis naabermolekulil ei ole Soret või kõrgemaid ergastatud olekuid ega ka molekulide vahelisi laenguülekande olekuid, mis oleks andnud midagi juurde. Joonisel 4.2 B on näha, et on võimalik saada dimeeri tulemusi ainult monomeeri parameetritega, siis peab selles dimeeri süsteemis domineerima monomeeri iseloom (Q_y üleminekudipool) või interaktsioonid Q_y ja kõrgemate ergastatud olekute ning laenguülekande olekute vahel peaksid tekitama monomeeri parameetritega sarnase sõltuvuse.



Joonis 4.3: BChl dimeeri Q_y eksitoninteraktsiooni energia tugevuse protsentuaalne muutus mõõdetuna 0-kraadise nurgale vastava eksitoninteraktsiooni energia sõltuvalt atsetüülrühma torsioonnurgast makromolekuli tasandi suhtes. Tulemused on saadud kasutades TD-B3LYP/6-31G (d) kahe nivoolist eksitoni arvutusmudelit.

Kui võrrelda jooniseid 4.2 B ja 4.3, siis on näha, et dimeeri madalaima ja kõrgeima Q_y oleku energia erinevus suureneb, kui väändenurk muutub - 20 kuni - 60 kraadi, ja eksitonide interaktsiooni energia väheneb. Seda põhjustab monomeeri üleminekuenergia erinevuse suurenemine, mis on näidatud joonisel 4.1 A.

Töö teoreetilise osa üks põhiküsimusi oli järgmine – kas LH1 dimeeri sub-ühiku üleminekuenergiad on piisava täpsusega arvutatavad, kui kasutada BChl monomeeride üleminekuenergiate ja ülemineku dipoolmomentide arvutamiseks TD-DFT meetodit, aga BChl molekulide vahelise interaktsiooni arvutamiseks lihtsustatud eksitonmudelit. Üks moodus selle tõestamiseks oli uurida, et kas monomeeri andmed suudavad adekvaatselt seletada dimeeri eksitonlõhenemist (jn. 2.4), kui ainukeseks muutujaks muutujaks on atsetüülrühma torsioonnurk. Kuna õnnestus näidata, et see eeldus peab piisava täpsusega paika (jn. 4.3 B), siis

järgnevalt rakendasime sama lähendust *Trv*. 970 LH1-RC täiskompleksi neeldumisspektrite arvutamisel. Alusinformatsioonina kasutati simuleerimisel *Trv*. 970 krüo-EM struktuuri andmeid [14] (millest saadi jn. 2.4 A näidatud histogramm) ning kvantkeemilistel meetoditel rehkendatud monomeersete molekulide üleminekuenergiad ja üleminekudipoolmomente, mis on toodud tabelis 4.1.

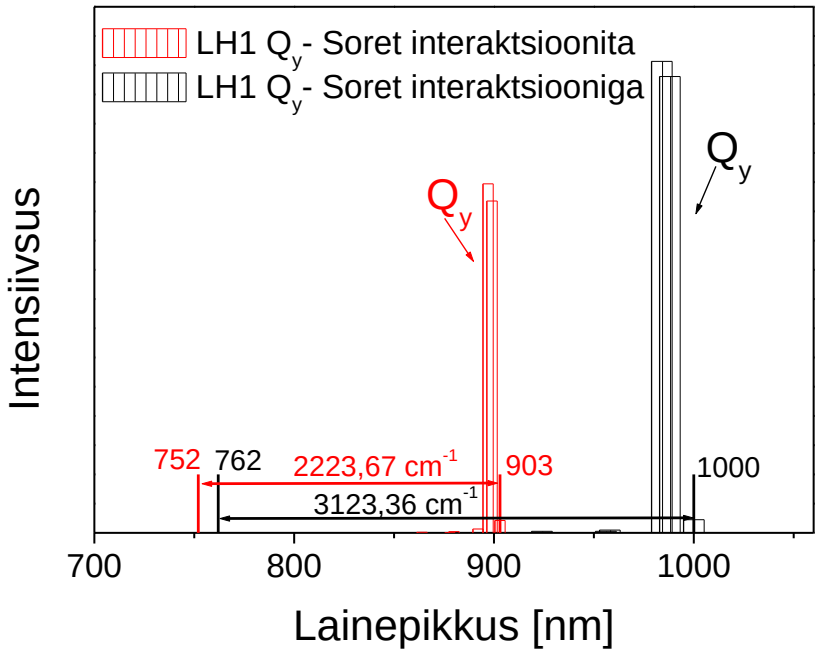
Tabel 4.1: LH1-RC koostises olevate monomeersete molekulide ülemineku dipoolmomentide väärtus Debye ühikutes ja spektraalsed asukohad nanomeetrites. (LH1 BChl puhul kajastavad toodud andmed vaid molekule torsioonnurgaga 0 ja -2 kraadi.)

Spektririba tähis	Üleminekudipoolmoment [D]	Riba asukoht [nm]
LH1 BChl Qy	6,14	805
RC BChl Qy	6,14 (spetsiaalne paar) 6,14 (lisa-BChl)	800 (spetsiaalne paar) 793 (lisa-BChl)
RC BPheo Qy	6,14	761
LH1 BChl Qx	2,1	599
RC BPheo Qx	2,1	540
LH1 Car.	4,9 5,8 5,1 4,2	529 493 461 450
Soret	3,6 (Soret x) 9,6 (Soret x) 10,7 (Soret y)	395 373 357
RC BPheo Soret	3,6 (Soret x) 9,6 (Soret x) 10,7 (Soret y)	400 375 370

Kuna ükski kvantkeemiline meetod ei ole siiani võimeline üleminekuenergiaid päris täpselt ette ennustama, siis peab neid väärtusi kuidagi kalibreerima. Kõige parem on seda teha katseliste andmete järgi. Näiteks LH1 BChl Q_y ülemineku spektraalse asukoha määramise puhul võtsime meie aluseks LH1 kompleksi lagunemise monomeerse jääkprodukti (mis jn. 1.2 on tähistatud kui B780) spektri asukoha madalal temperatuuril.

Lähinaabruses asuvate BChl molekulide vahelist interaktsiooni B875 ringis ja RC spetsiaalses paaris arvutati TD-B3LYP meetodil. Üksteisest kaugemal asuvate BChl vaheliste seoste energiad arvutati dipool-dipool lähenduses (4). Suurimad interaktsioonienergiad B875 ringi molekulide vahel on suurusjärgus 570 cm^{-1}, sarnaselt joonisel 4.2 näidatud dimeeri seoseenergiaga.

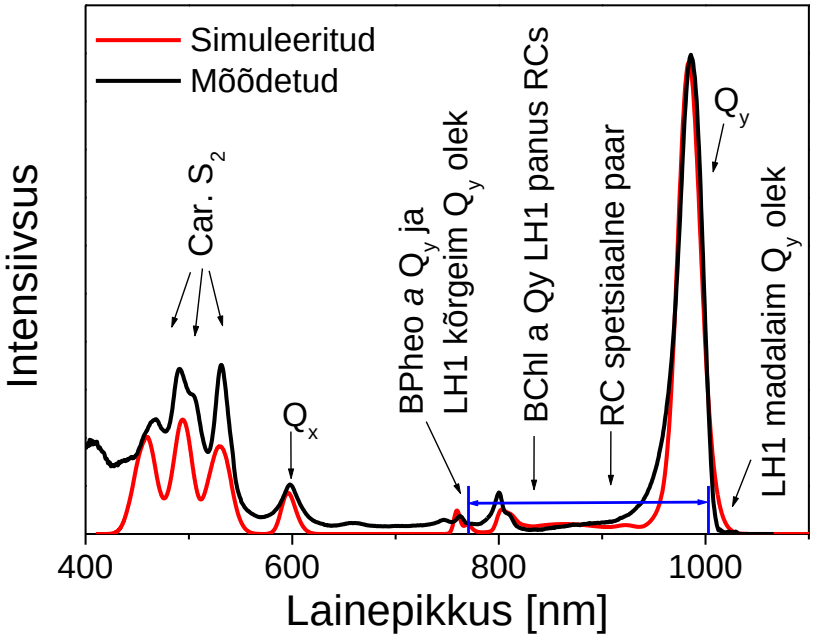
Tuletame meelde, et selles töös huvitab meid eelkõige Q_y eksitonriba suure punanihke olemus, aga ka selle riba lõhenemine kaheks (madala ja kõrge energiaga) komponendiks. Erinevate interaktsioonide mõju nendele parameetritele saab edukalt uurida, nullides erinevaid mittediagonaalliikmeid eksitoni hamiltoniaanis (2). Joonis 4.4 illustreerib seda osa antud tööst, kus uuriti LH1 BChl erinevate elektronseisundite (Q_y, Q_x, Soret) mõju Q_y eksitonriba nihkele (ja lõhenemisele). Jooniselt on näha Q_y - Soret olekute vahelise interaktsioonide suur mõju nii Q_y eksitonriba nihkumisele kui ka tema lõhenemisele. Ilma selle interaktsioonidega on energia erinevus kõrgeima ja madalaima Q_y ergastatud oleku vahel umbes 35% väiksem kui koos Q_y-Soret interaktsioonide arvutustest saadud väärtus (~ 900 cm^{-1}).



Joonis 4.4: *Trv*. 970 LH1 eksitoni joonspekterid, mis arvestavad (mustad tulbad) või ei arvesta (punased tulbad) interaktsioone Q_y-Soret olekute vahel. Sinine kaksiknool tähistab madalama energiaga Q_y riba nihet, punased ja mustad kaksinooled aga vastavate Q_y spektrite lõhenemist.

Tuumkompleksi struktuurist [14] oli näha, et BChl molekulidel pole valgu keskkonnas eriti ruumi vabaks liikumiseks. Seepärast eeldati arvutustes, et pigmendi asukohad võivad muutuda mitte enam kui ± 0,05 nm ja torsioonnurgad ± 5 kraadi. Seega saavad vastavalt joonisele 4.1

monomeeride dipoolmomentide väärtused muutuda vahemikus ± 1 % ja üleminekuenergiate FWHM vahemikus ± 100 cm^{-1} (Q_y, Q_x). Karotenoidide ja Soret piirkonna üleminekute jaoks tuli katsega parema kokkumineku huvides kasutada suuremat FWHM väärtuste variatsiooni vahemikus ± 400 cm^{-1}, nagu on näidatud joonisel 4.5



Joonis 4.5: *Trv*. 970 LH1-RC 4.5K juures mõõdetud (must joon, [3]) ja käesolevas töös simuleeritud madalatemperatuurne (punane joon) neeldumisspekter koos vastavate neeldumisribade interpretatsiooniga. Sinise kaksiknoolega ja kriipsudega on näidatud eksitonlõhenemine, kus ülemine piir on 770,6 nm ja alumine 1002,8 nm. [3]

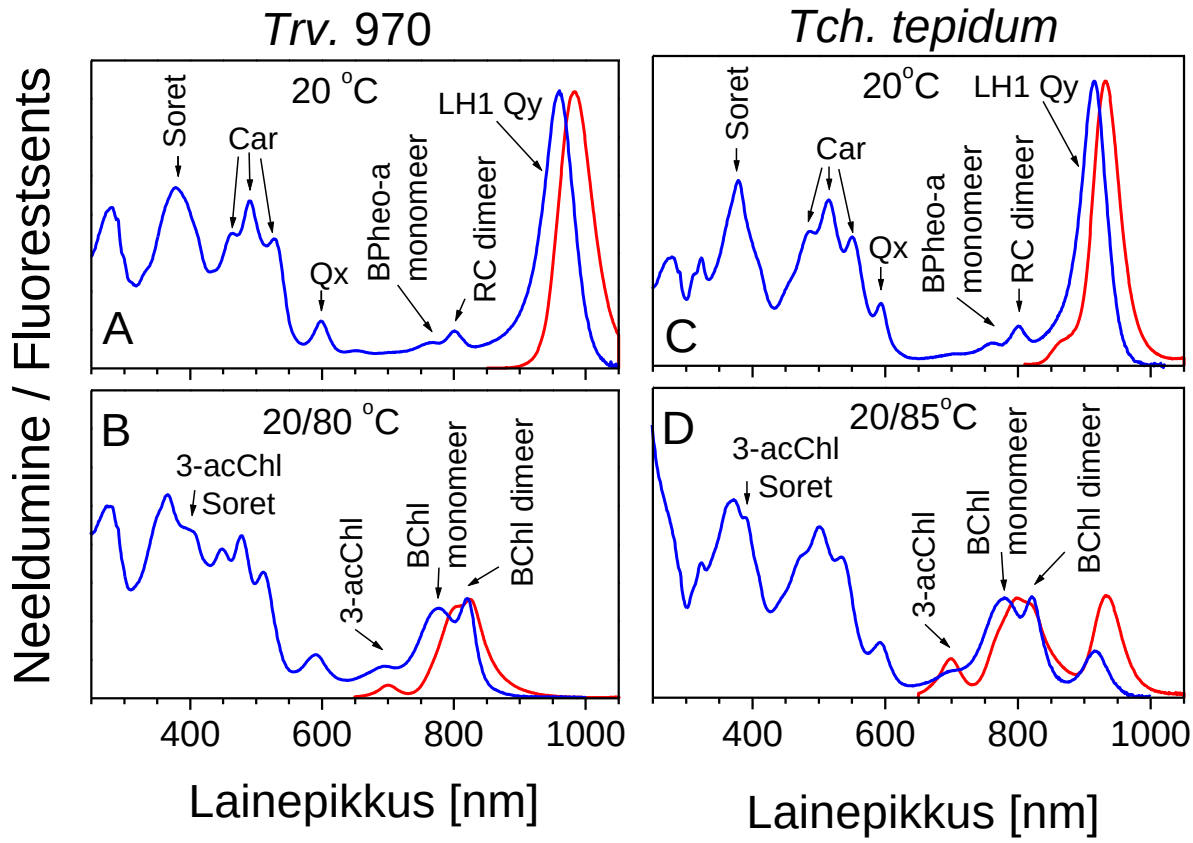
Arvestades kõiki mudelis tehtud lihtsustusi, demonstreerib joonis 4.5 üllatavalt head kooskõla simuleeritud ja katselise spektri vahel. Oluline lahknevus ilmneb vaid Soret piirkonnas (< 400 nm), kus mudel on arvestanud ilmselt liiga väikese arvu olekutega. Seevastu on karotenoidide spektri asukohad ja ribade intensiivsuse jaotus üsna hästi välja tulnud.

Ainult rehkendatud LH1 Q_y eksitonide põhiriba saba 930 nm kandis on katselisest oluliselt nõrgem. Selle esmaseks põhjuseks võib pidada elektronide ja tuumade vahelise interaktsiooni ignoreerimist antud arvutustes. Nende interaktsioonide olemasolu on ilmne meie varasematest katsetest [3], kuid nende korrektne ühitamine eksitonspektrite rehkendamisega jääb tuleviku ülesandeks. Nagu ka eksitonide interaktsioon tõenäoliste laenguülekande olekutega LH1 dimeeride sub-ühikutes.

4.2 Termostabiilsuse uurimuse katsete tulemused

Joonisel 4.6 on esitatud *Trv*. 970 ja *Tch. tepidum*i neeldumis- ja kiirgusspektrid värsketes ja kuni 80°C (*Trv*. 970) või 85°C (*Tch. tepidum*) kuumutatud ja seejärel alla jahutatud proovides. Selgituseks on juurde märgitud peamiste neeldumisribade päritolud. Intensiivsed neeldumisribad asukohaga 960 nm *Trv*. 970-s ja 915 nm *Tch. tepidum*is vastavad tuumkompleksi LH1 üksuse neeldumisele, mida nimetatakse tihti lihtsalt Q_y ribadeks, et rõhutada seost singletsete elektronsiiretele individuaalsetes BChl molekulides. Suhteliselt nõrgad neeldumisribad 760–800 nm piirkonnas on seotud reaktsioonitsentriga, kus riba ~760 nm kuulub kahele BPheo molekulile ja ~800 nm kahele lisa-BChl molekulile. Sellesse piirkonda jäävad ka LH1 eksitonide kõrge energiaga, kuid intensiivsuselt nõrgad, komponendid. Lühemate lainepikkuste juures kattuvad erinevate molekulide spektrid, mistõttu nimetatakse neid ribasid peamise panustaja järgi. Tänu erinevatele struktuuris olevatele karotenoididele asuvad karotenoidide neeldumisribad *Trv*. 970-s 465, 490 ja 527 ja *Tch. tepidum*is 488, 515 ja 550 nm juures. BChl molekulide poolt domineeritud Soret piirkonna neeldumisribad on mõlemal bakteril ~380 nm juures. Suurim panustaja neeldumisribasse 280 nm on ebaselge. Punase joonega kujutatud fluorestsentsispektrid on ergastatud lainepikkusel 380 nm. Selline valgus neeldub peamiselt BChl Soret ribades ja osaliselt ka karotenoidides. Sealt kandub neeldunud energia üle LH1 antennikompleksi madalamatele eksitonseisunditele. Värskes proovis mõõdetud fluorestsentsispektri tipud asuvad lainepikkustel 983 nm *Trv*. 970-s ja 932 nm *Tch. tepidum*is.

Kuumutamisel kaob täielikult *Trv*. 970 Q_y ribale vastav neeldumine lainepikkusel 960 nm, seevastu *Tch. tepidum*i neeldumisriba lainepikkusel 915 nm osaliselt säilib. Karotenoidide ja Q_x neeldumisriba intensiivsuses ja kujus kvalitatiivseid muutusi peale ribade spektraalse nihke ei toimu. Soret piirkonnas lisandub algsele tipule ~ 370 nm kuumutamise tulemusena märgatav õlg lainepikkusel ~ 410 nm. Suurimad muutused, lisaks LH1 Q_y nõrgenemisele või kadumisele, toimuvad 800 nm piirkonnas. Kuumutatud proovi alla jahutamisel temperatuurini 20°C eristub 821 nm tipp koos laiema neeldumisribaga 776 nm (*Trv*. 970) või 778 nm (*Tch. tepidum*) juures.



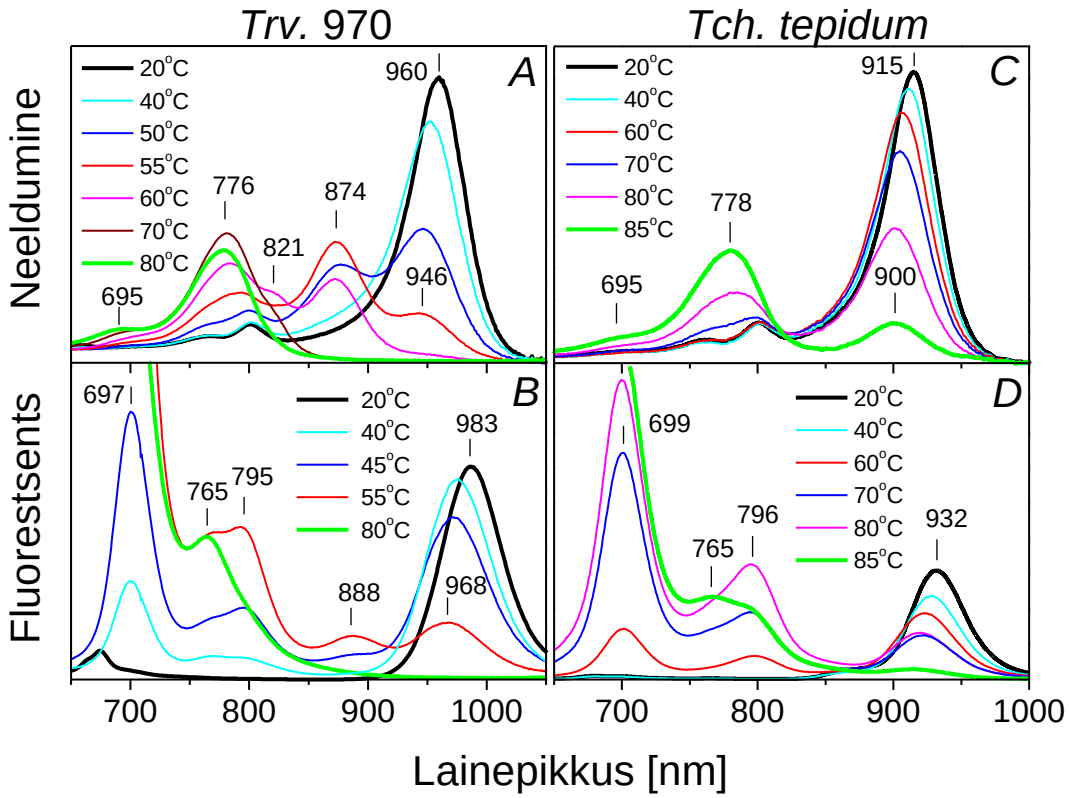
Joonis 4.6: *Trv*. 970 ja *Tch. tepidum*i neeldumis- (sinised jooned) ja kiirgusspektrid (punased jooned) temperatuuril 20°C värskes (A ja C) ning kuni 80°C (B) või 85°C (D) kuumutatud ja seejärel alla jahutatud proovis. Joonistele on märgitud neeldumisribade päritolu. Kiirgusspektrid on ergastatud lainepikkusega 380 nm ja normeeritud intensiivseima Q_y neeldumisriba järgi.

Spektrite põhjal võib eeldada, et neeldumisriba 776/778 nm juures on monomeeri B777 alamüksus, 821 nm riba aga dimeeri B820 üksus, mis on sarnane varem mitte-väävel purpurbakteris *Rhodospirillum rubrum* detergendiga töötlemise tulemusele. [8, 27] B777 moodustub üksteisest isoleeritud, kuid lahuses α- või β-polüpeptiidahelaga seotud BChl molekulidest. Tavaliselt tekib see dimeeri B820 edasisel dissotsiatsioonil detergendi kontsentratsiooni suurendamise tulemusena. [26, 27] Kuumutamisel tekkinud kahe riba päritolu, vastavalt monomeeri ja dimeeri BChl, saab kinnitust alljärgnevas uuringus.

Kuumutatud proovide fluorestsentsispektrid osutavad lisaks veel oksüdeerunud BChl molekulidele, mis on eeldatavalt analoogsed artiklites [28, 29] leitud 3-atsetüül-klorofüll-a (3-aceChl) molekulidele.

Põhjalikult on kuumutamisel toimuvaid neeldumisspektri muutusi näha Lisas 1, joonis L1.1. Kokkuvõtlikul kujul tabelina (Lisas 3) on esitatud spektriribade loetelu koos soojendamise tagajärjel ilmnenud muutustega.

Detailsemalt on neeldumis- ja fluorestsentsispektrite sõltuvust temperatuurist vahemikus 20 – 85°C jälgitud joonisel 4.7. Mõlemas proovis temperatuuri astmelisel tõstmisel Q_y riba nihkus järk – järgult sinisema spektripiirkonna poole ning intensiivsus kahanes. *Trv*. 970 Q_y riba muutus kuumutamise tõttu uuteks neeldumisribadeks – 874, 821, 776 ja 695 nm. Nendest ribadest kaks esimest on nähtavad vaid ~ 50°C läheduses, viimased kaks kasvavad pidevalt temperatuuri tõstmisel. Artikli [4] järgi võib riba 874 nm seostada Ca^{2+} vaba tuumkompleksi tekkimisega (jn. 4.8, jn. 4.9), seevastu *Tch. tepidum*is vastavat vormi ei teki. Samuti ei ilmne *Tch. tepidum*is temperatuuri tõstmisel 821 nm riba, seega enamus LH1-RC komplekse laguneb otse monomeeri B777 üksusteks. *Tch. tepidum*is tekib joonisel 4.6 D olev B820 alamüksus alles jahutamise tulemusena monomeeri B777 üksuste assotsiatsiooni käigus.



Joonis 4.7: *Trv*. 970 (vasakul) ja *Tch. tepidum*i (paremal) LH1-RC komplekside neeldumise- (A, C) ja fluorestsentsispektrid (B, D) sõltuvalt temperatuurist ergastusel 407 nm. Paksemate joontega on märgitud madalaimal ja kõrgeimal temperatuuril mõõdetud spektrid.

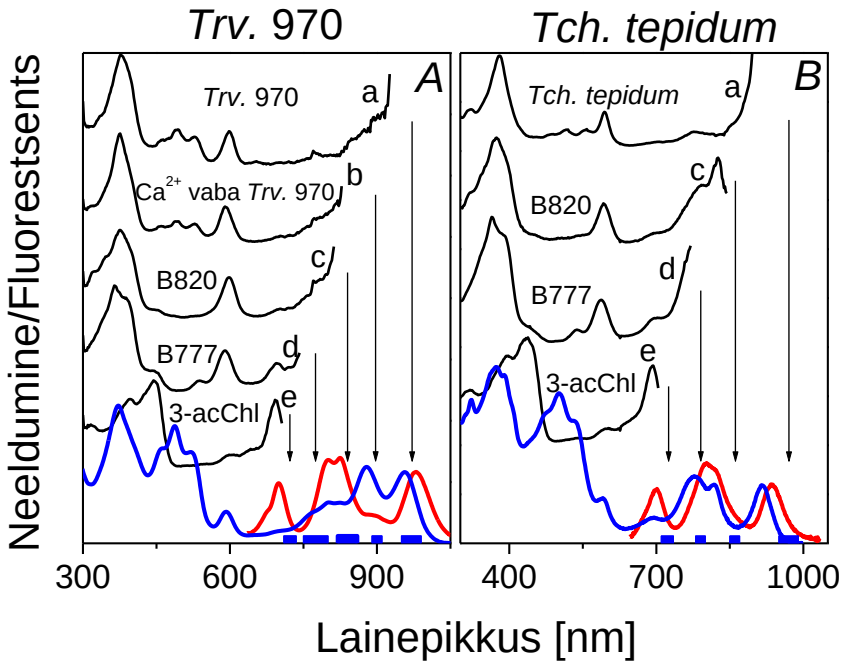
Fluorestsentsispektrid joonisel 4.7 (B, D) on kooskõlas vastavatel temperatuuridel mõõdetud neeldumisspektritega (A, C). *Trv*. 970 temperatuuri tõus 20°C kuni 55°C nihutab Q_y riba 986 nm-lt 968 nm-le. Selle protsessi käigus tekivad uued fluorestsentsiribad 888, 795, 765 ja 697 nm juures. Fluorestsentsiriba 888 nm vastab ilmselt Ca^{2+}-vabade komplekside neeldumisribale 874 nm. *Tch. tepidum*is analoogset Ca^{2+}-vaba kompleksi kuumutamisel ei teki.

Fluorestsentsiriba 795 nm tuleb nähtavale mõlemas proovis ja see on heas kooskõlas B777 neeldumisribaga lainepikkustel 776 nm (Trv. 970) või 778 nm (*Tch. tepidum*). Kiirgus maksimumiga 697/699 nm on pärit oksüdeerunud BChl molekulidest, tugeva 765 nm kõrvalriba moodustavad samade molekulide vibroonsed üleminekud. Jooniselt järeldub veel oksüdeerumise järsk suurenemine alates temperatuurist 40°C (*Trv*. 970) või 60°C (*Tch. tepidum*).

Jooniselt 4.7 selgub, et vastupidiselt termofiilsele *Tch. tepdium*ile, kus arvestatav osa komplekse säilib temperatuuril 85°C, mesofiilse Trv. 970 vastav neeldumine kaob juba 60°C juures. Selline käitumine läheb kokku artiklites [2, 30] esitatud diferentsiaalse skaneeriva kalorimeetria meetodil tehtud uuringutega, mille kohaselt *Tch. tepidum*il (75.0°C) on oluliselt kõrgem termilise denaturatsiooni temperatuur kui *Trv*. 970-l (61.5°C).

Lainepikkus 407 nm ergastab erinevaid pigmente ühtlasemalt (punane kõver joonisel 4.8), veel täielikuma selguse kiirgavatest komponentidest saab samal joonisel esitatud fluorestsentsi ergastusspektritest. Joonisel on näidatud sinise joonega neeldumine, kui proovi soojendati kuni 50°C (*Trv*. 970) või 85°C (*Tch. tepidum*) ja mõõtmiseks jahutati alla temperatuurini 20°C.

Kuumutamise/jahutamise tsükli tulemusena tekib ergastusspektris viis (*Trv*. 970) või neli (*Tch. tepidum*) selgelt eristatavat riba. Üksikute ribade fluorestsentsi ergastusspektrid on esitatud üksteise suhtes vertikaalselt nihutatuna. Kuigi kõik need spektrid üldjoontes järgivad tüüpilisi neeldumisspektri omadusi nagu näiteks BChl molekulide Q_y, Q_x ja Soret ribad, siis leidub ikkagi erisusi. Esiteks, ainult ülemised spektrid (a), mis vastavad tervetele LH1-RC kompleksidele, näitavad karotenoididega seotud panust. Vastava neeldumisspektriga võrreldes on karotenoidide panus ergastusspektrisse siiski vähenenud, mis kinnitab varem artiklis [31] kirjeldatud karotenoidide ja BChl eksitonite vahelise ergastusenergia ülekande efektiivsuse vähenenemist. Ca^{2+} vaba *Trv*. 970 LH1-RC kompleks (b) näitab veelgi nõrgemat karotenoidide intensiivsust, seega loodusliku valgu struktuuri lõhkumine põhjustab karotenoidide osalist kadu. Karotenoidid kaovad täielikult B820 kompleksidest (c) kuumutamisest tuleneva dissotsiatsiooniprotsessi käigus. Ülejäänud spektrid (d ja e) ilmutavad BChl ja Chl tüüpilisi tunnuseid ja kinnitavad vastavust eelnevale, vastavalt B777 ja 3-acChl, interpretatsioonile.



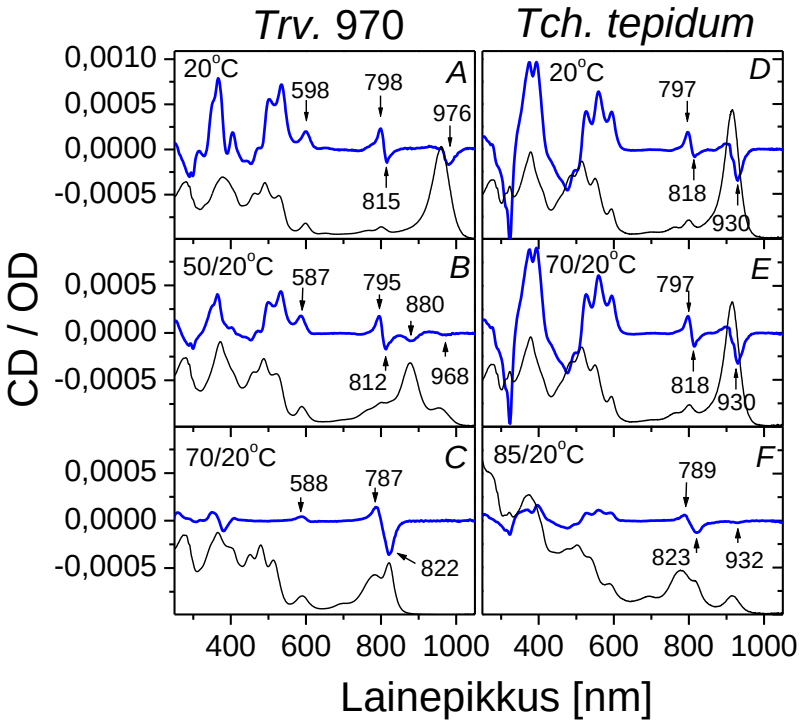
Joonis 4.8: *Trv*. 970 (A), kuumutati kuni 50°C, jahutati 20°C-ni ja *Tch. tepidum*i (B), kuumutati kuni 85°C, jahutati 20°C-ni, fluorestsentsi ergastusspekterid (vertikaalselt nihutatud mustad jooned). *Trv*. 970 spektrid registreeriti lainepikkustel: (a) 950–990 nm, (b) 890–910 nm, (c) 820–860 nm, (d) 750–800 nm ja (e) 710–735 nm; *Tch. tepidum* (a) 950–990 nm, (c) 850–870 nm, (d) 780–800 nm ja (e) 710–735 nm. Vastavaid lainepikkusi illustreerivad sinised ribad koos neile osutavate nooltega. Sinise ja punase kõverjoonega on kujutatud vastavad neeldumis- ja fluorestsentsispektrid.

Tsirkulaarse dikroismi (CD – *circular dichroism*) spektroskoopia annab infot individuaalsete kromofooride kiraalsusest ja nende vahelistest interaktsioonidest. Seda meetodit rakendati LH1-RC komplekside termilise lagunemise vaheetappide uurimiseks. Joonisel 4.9 on esitatud mõlema kompleksi CD ja neeldumisspektrid, kus proove on kuumutatud kindla temperatuurini (50 või 70°C) ja siis maha jahutatud ning mõõdetud temperatuuril 20°C.

Joonistel 4.9 A, D on näidatud LH1-RC komplekside CD ja neeldumisspektrid temperatuuril 20°C. Suhteliselt nõrk ja mittekonservatiivne CD signaal lainepikkustel 976/930 nm (*Trv*. 970 ja *Tch. tepidum*) vastab LH1 komplekside Q_y neeldumisele; selline spekter on tüüpiline kõikide purpurbakterite tuumkompleksidele. [5, 6, 32] Negatiivne 815/818 nm ja positiivne tipp 798/797 nm (A, D) on pärit RC kompleksi lisa-BChl molekulidest. [33]

Trv. 970 suuremalt jaolt positiivne tipp 598 nm kirjeldab LH1-RC kompleksi kõikide BChl kromofooride Q_x üleminekuid. *Tch. tepidum* Q_x üleminekutega seotud CD signaal kattub karotenoidide CD spektriga ja pole eristatav. Karotenoidide ja Soret piirkondades on *Tch. tepidum*i CD signaal konservatiivne ehk nendes piirkondades on näha mitut üksteist

tasakaalustavat positiivset ja negatiivset riba. Põhjalikult on valgu piirkonna kuumutamisel toimuvaid CD spektri muutusi näha Lisas 1, joonis L1.2.



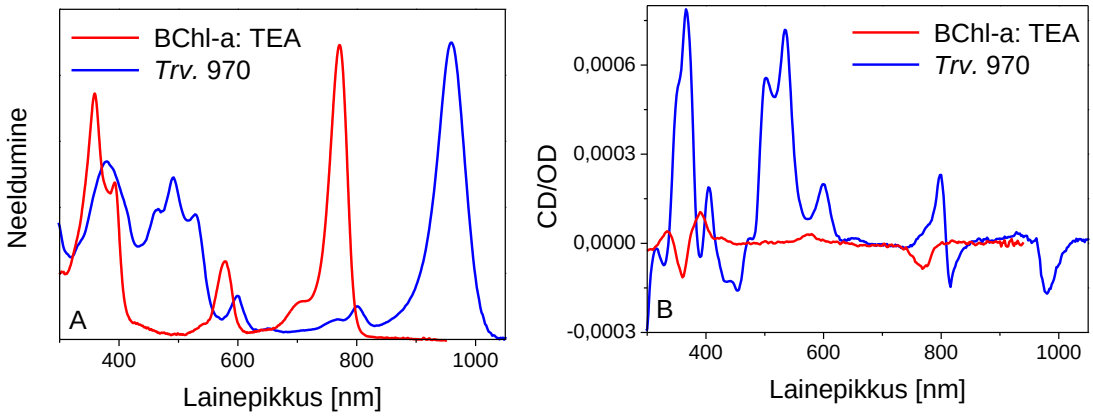
Joonis 4.9: *Trv*. 970 (vasakul) ja *Tch. tepidum*i (paremal) LH1-RC komplekside CD (sinine joon) ja neeldumise (must joon) spektrid temperatuuril 20°C (A, D) ja peale soojendamist 50/70°C-ni (B, E) või 70/85°C-ni (C,F) ning siis mõõdetuna 20°C juures. Spektrid on normaliseeritud värske proovi Q_y neeldumismaksimumi järgi. Musta joonega tähistatud neeldumisspektrid on korratud faktoriga 10^{-3} ja nihutatud allapoole, et näidata neeldumis- ja CD spektreid samal joonisel.

Joonised 4.9 B kuni F iseloomustavad proove, mis on soojendatud teatud kindla temperatuurini (andmed joonisel) ja seejärel jahutatud maha ning mõõdetud temperatuuril 20°C. Üldiselt on teada, et kui tõsta temperatuuri bakteri optimaalse kasvu temperatuurini, siis spekter oluliselt ei muutu. Nimetatud spektrid näitavad selgelt, et *Tch. tepidum* on termiliselt oluliselt stabiilsem kui *Trv*. 970, see on täielikus kooskõlas teistel meetoditel saadud tulemusega. [5, 6] *Trv*. 970-s on näha juba 50°C juures naturaalsete pigmentide struktuuride osalist lagunemist (jn. 4.9 B) ja kui kuumutada 70°C-ni, siis funktsionaalne valgust neelav kompleks on täielikult hävinud (jn. 4.9 C). *Tch. tepidum*is seevastu on aga teisiti, isegi kui kuumutada 85°C-ni, jäävad mõned loomulikud spektriomadused alles (jn. 4.9 F).

Trv. 970 LH1-RC kompleksi kõige märgatavam CD spektri muutus temperatuuril 50°C on algse negatiivse 976 nm riba tugev vähenemine ja uue negatiivse riba tekkimine lainepikkusel 880 nm. Lisaks tekib märgatav Q_x riba nihe (314 cm^{-1}) lainepikkuselt 598 nm kuni 587 nm. Jooniste

4.9 A, B põhjal järeldub, et need CD spektri muutused on seotud algsete LH1 komplekside osalise lagunemisega Ca^{2+} vabasse vormi. Karotenoidide ja Soret signaalide tugevused langesid umbes pooleni oma esialgsest väärtusest, kuid nende positsioonid spektris jäid püsima. Signaali nõrgenemine on seotud sellega, et valgukompleksist eraldunud pigmentide optiline aktiivsus on palju nõrgem (BChl molekulid, jn. 4.10) või puudub täielikult (karotenoidid, [35]), võrreldes korrastatud pigmentidega valgust neelavas kompleksis.

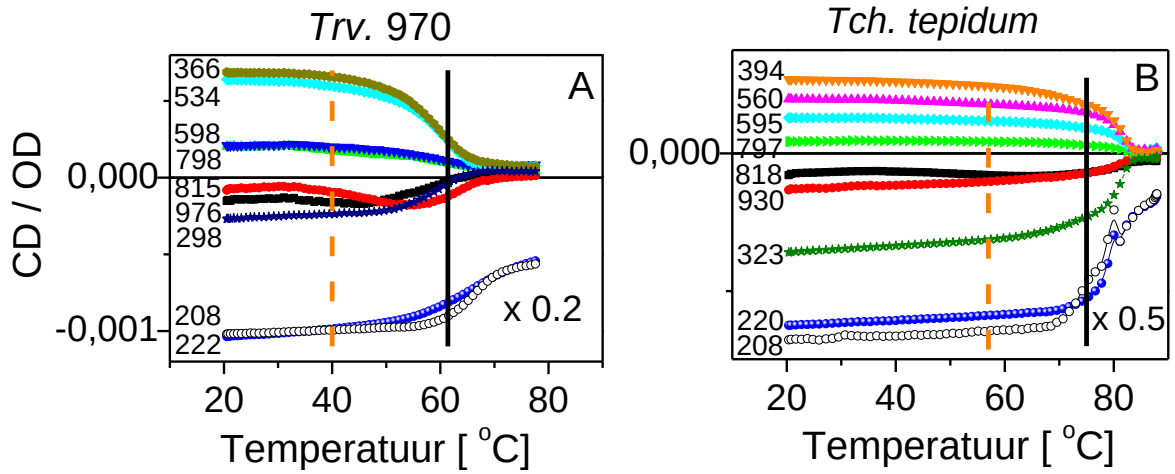
Kui kuumutada edasi 70°C-ni, siis kaob täielikult CD signaal 850 – 1000 nm ümbruses (LH1 komplekside Q_y piirkonnas) samuti 450 – 550 nm vahel (karotenoidide üleminekud). Seevastu karotenoidide neeldumine ei muutu. Soret üleminekutega seotud CD signaal on nõrgenenud monomeeridele vastavale tasemele (jn. 4.10). Seega, sinisesse nihkunud neeldumisriba (jn. L1.1) ja CD spekter näitavad, et allesjäänud neeldumine on põhjustatud lahustifaasis olevatelt pigmentidelt. CD spektri kuju 800 nm ümbruses on väga sarnane B820 allüksuse spektrile *Rhodospirillum rubrum*is, kus B820 alamüksused tekitati detergendi abil [9].



Joonis 4.10: *Trv*. 970 tuumkompleksi (sinine joon) ja monomeeri BChl (punane joon) neeldumisspektri (A) ja CD spektri (B, normaliseeritud Q_y järgi) võrdlus temperatuuril 20°C. BChl molaarse kontsentratsiooniga $2x10^{-6}$ on lahustatud trietüülamiinis (TEA).

Valkude füüsikas on termiline stabiilsus seotud sulamistemperatuuriga T_m, mida defineeritakse kui temperatuur, millal valgu kontsentratsioon volditud olekus on sama mis mittevolditud olekus. Kuna enamus volditud valke on hierarhilise struktuuriga, siis on oluline uurida valgu peamiste (sekundaarne ja tertsiaalne) konformatsioonide sulamise korrelatsiooni. Käesolevas töös kasutatakse spektroskoopilist lähenemist, [36] kus jälgitakse pigmendi ja valgu kromofooride spetsiifiliste CD joonte amplituudide sõltuvust temperatuurist (jn. 4.11).

Joonisel 4.11 on selgelt näha, et *Tch. tepidum*il (B) on oluliselt suurem termiline stabiilsus kui *Trv*. 970-l (A). Joonisel kirjeldatakse erinevate pigmentide ja valgu CD muutusi kolmes etapis: (1) laias temperatuuri vahemikus peaaegu püsiva signaaliga etapp, (2) kahaneva signaaliga etapp bakteri maksimaalse fotosünteetiline kasvutemperatuuri ja tuumkomplekside kalorimeetrilise termilise denatureerimise vahel ning (3) denatureerimise temperatuurist kõrgem olev signaalivaba etapp. Nendest andmetest saame, et *Trv*. 970-l on $T_m \approx 60 \pm 2$°C ja *Tch. tepidum*il $T_m \approx 80 \pm 2$°C. Saadud temperatuurid on kvalitatiivses vastavuses kalorimeetrilisel denaturatsiooni meetodil leitud väärtustega, vastavalt 61,5 °C ja 75,0 °C. [2, 13] Erinevalt pigmentide CD amplituudidest, valgu amplituudid joonistel 4.11 ja L1.2 ei kao täielikult ära isegi kõrgeima temperatuuri juures. Alles jäänud signaal võib viidata säilinud sekundaarse struktuuri elementidele, peptiidsidemega kromofooride juhusliku torsioonnurgaga konformatsioonidele või üksikutele aromaatsetele konfomeeridele nagu näiteks trüptofaanid.



Joonis 4.11: *Trv*. 970 (A) ja *Tch. tepidum*i (B) temperatuurist sõltuv CD signaal (lahutusega 2 nm) üksikutel lainepikkustel (arvud joonisel nanomeetrites). Valitud jooned on märgistatud joonistelt 4.9 ja L1.2 nooltega. Proovi temperatuuri tõsteti kiirusega 1°C min^{-1} ning mõõtmisaeg igal temperatuuril oli ~1 minut. Vertikaalne katkendlik joon on maksimaalne kasvutemperatuur [37] ja pidevjoon termilise denaturatsiooni temperatuur. [2, 13]

Kuna tertsiaarne struktuur juhib kromoproteiini kõikide pigmentide sidumiskohtade kujunemist, siis katses ilmnenud BChl molekulide ja karotenoidide CD signaalide üheaegne kadu on otseselt seotud tertsiaarse struktuuri sulamisega. Siit järeldub, et *Trv*. 970 ja *Tch. tepidum*i kromoproteiinide sekundaarne ja tertsiaarne struktuur sulavad peaaegu üheaegselt, hoolimata bakterite erinevast termostabiilsusest. See on huvitav, kuna tüüpiliselt valgud lagunevad lagunevad alates kõrgemat järku struktuurist madalamat järku struktuuri poolevastavalt neid struktuure koos hoidvate sidemete tugevusele.

Kokkuvõte

Fossiilsete kütuste asendamine Päikeseenergiaga võiks olla üks parimaid võimalusi globaalse soojenemise pärssimiseks. Selle idee realiseerimiseks uuritakse praegu erinevate tehislike fotosünteesi elementide kasutatavust. Neid rakenduslikke töid on kutsutud toetama fotosünteetiliste protsesside alusuuringud, mille hulka kuulub ka käesolev väitekiri.

Antud töö on kaheosaline, koosnedes teoreetilisest ja katselisest poolest. Erinevaid pooli ühendab uuritavate katseobjektide valik, milleks on kaltsiumi ioone sisaldavad purpurbakterid, ja ühine kasutatud spektroskoopiline metoodika. Töö teoreetiline osa on pühendatud bakterite keeruliste valgust koguvate pigment-valgu kompleksite optiliste neeldumisspektrite simuleerimisele kasutades erinevaid teoreetilisi mudeleid. Töö katselises osas uuriti oletatavat seost uuritavate bakterite spektrite ja nende termostabiilsuse vahel.

Uuringute tulemusena

1. Leidis kinnitust hüpotees, et *Thiorhodovibrio* 970 LH1-RC tuumkompleksi neeldumisspektrites avalduv suur punanihe on eksitonpäritolu.
2. Selgus, et keerulise tuumkompleksi neeldumisspektrit on võimalik rahuldava kvaliteediga simuleerida, kasutades lihtsat eksitonmudelit dipool-dipool interaktsiooni lähenduses, kuid kvantkeemiliselt rehkendatud monomeeride spektri ja üleminekudipoolmomentide parameetreid. Molekulide vahelise vastastikmõju rehkendamisel tuleb lisaks kõige madalate energianivoode vahelisele Q_y - Q_y interaktsioonile arvestades ka interaktsioone kõrgemate energianivoodega. Nii leiti, et Q_y - Soret interaktsioonid võivad moodustada kuni 35% jälgitavast neeldumismaksimumi punanihkest.
3. Näidati, et suurema punanihkega *Thiorhodovibrio* 970 tuumkompleksil on madalam termiline stabiilsus kui väiksema punanihkega *Thermochromatium tepidum*il. Sellega kummutati kirjanduses levinud väide, et kaltsiumit sisaldavate bakterite spektrite punanihe on üheselt seotud nende termostabiilsusega.

Seega said kõik uurimustöö eesmärgid täidetud ning püstitatud hüpoteesid kinnitatud.

Saadud katsetulemuste alusel koostatud artikli käsikiri on ajakirja *Photosynthetica* poolt juba avaldamiseks vastu võetud. Kvantkeemiliste arvutuste suure ajakulu tõttu oleks enne nende tulemuste avaldamist täiendavalt vaja uurida erinevate atsetüülrühmade torsioonnurkade struktuure.

Kasutatud kirjandus

[1] X. Hu, T. Ritz, A. Damjanovic, F. Autenrieth, K. Schulten*; Photosynthetic apparatus of purple bacteria*; Quart. Rev. Biophys.; 2002; *35*; lk 1-62.

[2] Y. Kimura, L.-J. Yu, Y. Hirano, H. Suzuki, Z.-Y. Wang; *Calcium Ions Are Required for the Enhanced Thermal Stability of the Light-harvesting-Reaction Center Core Complex from Thermophilic Purple Sulfur Bacterium Thermochromatium tepidum*; J. Biol. Chem.; 2009; 284; lk 93-99.

[3] K. Timpmann, M. Rätsep, L. Kangur, A. Lehtmets, Z. Y. Wang-Otomo, A. Freiberg; *Exciton Origin of Color-Tuning in Ca^{2+}-Binding Photosynthetic Bacteria*; Int. J. Mol. Sci.; 2021; 22 (14); lk 7338.

[4] A. Lehtmets; *Thiorhodovibrio tüvi 970 optiliste spektrite tähelepanuväärse punanihke olemus*; Tartu Ülikool; 2021; bakalaureusetöö; lk 1-33.

[5] H. Suzuki, Y. Hirano, Y. Kimura, *et al.*; *Purification, characterization and crystallization of the core complex from thermophilic purple sulfur bacterium Thermochromatium tepidum*; Biochim. Biophys. Acta; 2007; 1767; lk 1057-1063.

[6] L. Kangur, M. Rätsep, K. Timpmann, *et al.*; *The two light-harvesting membrane chromoproteins of Thermochromatium tepidum expose distinct robustness against temperature and pressure*; Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics; 2020; 1861; lk 148205.

[7] J. M. Linnanto; *Electronic Structure of Chlorophyll Monomers and Oligomers*. Raamatust S. Ameen, M. Shaheer Akhtar, H.-S. Shin; *Chlorophylls*; IntechOpen; 2022; DOI:10.5772/intechopen.104089.

[8] R. J. Cogdell, A. Gall, J. Köhler; *The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membraanes*; Quart. Rev. Biophys.; 2006; *39*; lk 227-324.

[9] M. C. Chang, P. M. Callahan, P. S. Parkes-Loach; *Spectroscopic characterization of the light-harvesting complex of Rhodospirillum rubrum and its structural subunit*; Biochemistry; 1990; 29; lk 421-429.

[10] M. Chenchiliyan; *Nano-structural Constraints for the Picosecond Excitation Energy Migration and Trapping in Photosynthetic Membranes of Bacteria*; Tartu Ülikool; 2016; doktoritöö; lk 18.

[11] P. A. Bullough, P. Qian, C. N. Hunter; *The Purple Phototrophic Bacteria*. Raamatust C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnaue, J. T. Beatty; *The Purple Phototropic Bacteria*; Springer; 2009; 28 ; lk 155-179.

[12] T. Ritz, X. Hu, A. Damjanovic, K. Schulten; *Excitons and excitation transfer in the photosynthetic unit of purple bacteria*; J. Lumin.; 1998; 76 ja 77; lk 310-321.

[13] M. Imanishi, M. Takenouchi, S. Takaichi, *et al.*; *A Dual Role for Ca^{2+} in Expanding the Spectral Diversity and Stability of Light-Harvesting 1 Reaction Center Photocomplexes of Purple Phototrophic Bacteria*; Biochemistry; 2019; 58 (25); lk 2844–2852.

[14] K. Tani, R. Kanno, Y. Makino, *et al.; Cryo-EM structure of a Ca^{2+}-bound photosynthetic LH1-RC complex containing multiple αβ-polypeptides*; Nature Communications; 2020; 11; lk 4955.

[15] L.-J. Yu, M. Suga, Z.-Y. Wang-Otomo, J.-R. Shen*; Structure of the LH1–RC complex from Thermochromatium tepidum at 3.0 Å*; Nature; 2014; 508; lk 228–232.

[16] L. J. Yu, M. Suga, Z. Y. Wang-Otomo, J. R. Shen; *Structure of photosynthetic LH1-RC supercomplex at 1.9 Å resolution*; Nature; 2018 ;556 (7700); lk 209-213

[17] L. Lu; *Can B3LYP be improved by optimization of the proportions of exchange and correlation functionals*?; Int. J. Quantum Chem; 2015; 115; lk 471– 476.

[18] J. A. Pople; *Nobel lecture: Quantum chemical models*; Rev. Mod. Phys.; 1999; 71; lk 1267–1274.

[19] K. Leiger, J.M. Linnanto, A. Freiberg; *Establishment of the Q_y Absorption Spectrum of Chlorophyll a Extending to Near-Infrared*; Molecules; 2020; 25(17); lk 3796.

[20] J. Linnanto, J. E. I. Korppi-Tommola, V. M. Helenius; *Electronic States, Absorption Spectrum and Circular Dichroism Spectrum of the Photosynthetic Bacterial LH2 Antenna of Rhodopseudomonas acidophila as Predicted by Exciton Theory and Semiempirical Calculations;* The Journal of Physical Chemistry B*;* 1999*;* 103 (41); lk 8739-8750.

[21] P. K. Jain, M. El-Sayed; *Plasmonic Coupling in Noble Metal Nanostructures*; Chemical Physics Letters.; 2009; 487; lk 153-164.

[22] A. Scherz, W. W. Parson; *Exciton interactions in dimers of bacteriochlorophyll and related molecules*; Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics; 1984; 766 (4); lk 666-678.

[23] A. Scherz, W. W. Parson; *Oligomers of bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin with spectroscopic properties resembling those found in photosynthetic bacteria*; Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics; 1984; 766 (4); lk 653-665.

[24] L. Fiedor, A. Kania, B. Mysĺ iwa-Kurdziel, Ł. Orzeł, G. Stochel; *Understanding Chlorophylls: Central Magnesium Ion and Phytyl as Structural Determinants*; Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg; 2008; 1777; lk 1491−1500.

[25] D. L. Bruce, D. C. B. Duff, N. J. Antia; *The Identification of Two Antibacterial Products of the Marine Planktonic Alga Isochrysis Galbana*; J. Gen. Microbiol; 1967; 48; lk 293−298.

[26] A. S. Holt, E. E. Jacobs; *Infra-Red Absorption Spectra of Chlorophylls and Derivative*; Plant Physiol.; 1955; 30; lk 553−559.

[27] L. Fiedor, H. Scheer; *Trapping of an assembly intermediate of photosynthetic LH1 antenna beyond B820 subunit. Significance for the assembly of photosynthetic LH1 antenna*; J. Biol. Chem.; 2005; 280 (22); lk 20921-6.

[28] J. R. L. Smith, M. Calvin; *Studies of the Chemical and Photochemical Oxidation of Bacteriochlorophyll*; J. Am. Chem. Soc.; 1966; 88; lk 4500-4506.

[29] K. Leiger, J.M. Linnanto, M. Rätsep, *et al.*; *Controlling Photosynthetic Excitons by Selective Pigment Photooxidation*; J. Phys. Chem. B; 2019; 123; lk 29–38.

[30] L.-J. Yu, T. Kawakami, Y. Kimura, Z.-Y. Wang-Otomo; *Structural Basis for the Unusual Qy Red-Shift and Enhanced Thermostability of the LH1 Complex from Thermochromatium tepidum*; Biochemistry; 2016; 55; lk 6495-6504.

[31] H. P. Permentier, S. Neerken, J. Overmann, *et al.*; *A bacteriochlorophyll a antenna complex from purple bacteria absorbing at 963 nm*; Biochemistry; 2001; 40; lk 5573-5578.

[32] S. Georgakopoulou, G. van der Zwan, J. D. Olsen, *et al.*; *Investigation of the effects of different carotenoids on the absorption and CD signals of light harvesting 1 complexes*; J. Phys. Chem. B; 2006; 110; lk 3354-3361.

[33] T. Nozawa, J. T. Trost, T. Fukada, *et al.*; *Properties of the reaction center of the thermophilic purple photosynthetic bacterium Chromatium tepidum*; Biochim. Biophys. Acta; 1987; 894; lk 468-476.

[34] K. Matsuo, Y. Sakurada, R. Yonehara, *et al.*; *Secondary-structure analysis of denatured proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy*; Biophys. J.; 2007; 92; lk 4088-4096.

[35] R. J. Cogdell, N. W. Isaacs, A. A. Freer, *et al.*; *The structure and function of the LH2 (B800–850) complex from the purple photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas acidophila strain 10050*; Prog. Biophys.; 1997; 68 (1); lk 1-27.

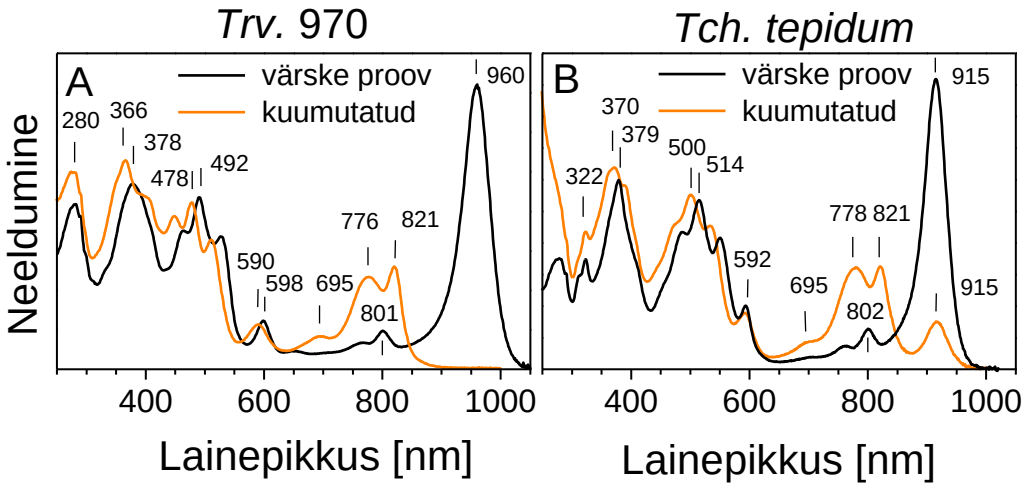
[36] M. Rätsep, R. Muru, A. Freiberg; *High temperature limit of photosynthetic excitons*; Nature Commun.; 2018; 9; lk 99.

[37] D. Di Bari; S. Timr; M. Guiral; *et al.*; *Diffusive dynamics of bacterial proteome as a proxy of cell death*; ACS Central Science; 2023; 9; lk 93-102.

Lisad

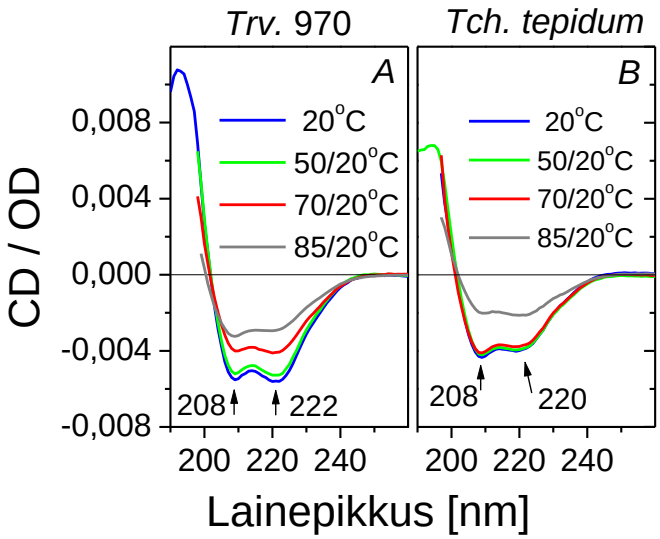
Lisa 1: Kuumutamise tagajärjel toimuvad CD ja neeldumisspektri muutused

Joonisel L1.1 on toodud *Trv*. 970 (A) ja *Tch. tepidum*i (B) värske ja kuumutatud neeldumisspektri tippude erinevused temperatuuril 20°C. *Trv*. 970 kuumutati 80°C-ni ja *Tch. tepidum*i 85 °C-ni. Mesofiilsel Trv. 970-l on näha, et kuumutamise tagajärjel kaob neeldumismaksimum (960 nm) ja RC piirkonda (801 nm) tekivad tipud 695, 776 ja 821 nm. Teised tipud nihkuvad sinise poole ning muudavad kuju. Termofiilsel *Tch. tepidum*il aga jääb vähesel määral peale kuumutamist neeldumismaksimum (915 nm) alles ja RC piirkonda (802 nm) tekivad tipud 695, 778 ja 821 nm. Nagu *Trv*. 970-l, nihkuvad teised tipud ka sinise poole ja muudavad kuju.



Joonis L1.1: Kuumutamisest põhjustatud neeldumisspektri muutused *Trv*. 970 (A) ja *Tch. tepidum*i (B) isoleeritud LH1-RC kompleksis. Oranži joonega on tähistatud kuni 80°C (A) või 85°C (B) kuumutatud ning siis temperatuurini 20°C alla jahutatud proovide spektrid. Joonisel olevad arvud näitavad vastavate spektriribade asukohta nanomeetrites.

Joonisel L1.2 on kujutatud erinevatele temperatuuridele kuumutatud *Trv*. 970 (A) ja *Tch. tepidum*i (B) CD spektrid valgu piirkonnas. Spektreid on mõõdetud toatemperatuuril. Need spektrid on kuju poolest sarnased tüüpilistele α-heeliksi konformatsioonis polüpeptiididele [34] ja ei kao täielikult ära isegi kõrgeima temperatuuri juures.



Joonis L1.2: *Trv*. 970 (A) ja *Tch. tepidum*i (B) CD spektri valgu piirkond temperatuuril 20°C ja peale soojendamist temperatuurideni 50, 70°C ja 85°C ning mõõdetuna 20°C juures. Spektrid on normeeritud LH1 Q_y eksitoni neeldumise järgi.

Lisa 2: Fluorestsentsi ergastusspektrite programm

Fluorestsentsispektreid mõõdeti vahemikus 250 – 1000 nm. Mõõdetud spektrid ja võimsuse näidud salvestati erinevatesse kaustadesse. Töös tehtud ergastusspektrite programmi abil saadakse fluorestsentsispektride ja võimsusspektrite kaudu ergastusspekter, integreerides kindlat lainepikkuste vahemikku. Lainepikkuste vahemik saadi fluorestsentsispektrite, mis registreeriti 380 nm juures, tippude asukohtadest. Ergastusspektrite programmi jaoks oli vaja mõõdetud spektrite ja võimsuste kaustad muuta zip-failideks. Järgmisena toob programm ette 380 nm saadud fluorestsentsispektri, kust saab valida integreerimisvahemikku. Peale selle valimist, arvutab programm ergastusspektri, mis on saadud integreerides fluorestsentsispektri valitud tippu ja jagades nendel lainepikkustel mõõdetud keskmise võimsusega. Lõpuks on võimalik see ergastusspekter alla laadida (jn. L2.1).

Joonis L2.1: *Tch. tepidum*i fluorestsentsispekter (A, registreeritud 380 nm juures) ja fluorestsentsi ergastusspekter (B, integreeritud vahemikku 940-980 nm). Programmis integreeriti (B) kolme valemi järgi: Riemanni integraalsumma (sinine joon), Simpsoni valem (punane joon) ja trapetsvalemit (roheline joon).

Ergastusspektrite programmi tegemiseks kasutati järgmisi Pythoni raamatukogu tööriistu: Pandas, Re, Zipfile, Scipy, Plotly ja Ipywidgets. Programm kirjutati Google Colab keskkonnas.

Lisa 3: Neeldumis-ja kiirgusspektrite andmed

Tabel L3.1: *Trv*. 970 spektririba tähised ja päritolu koos spektriribade lainepikkuste nihked kuumutamise tagajärjel. Nihke kiirus (temperatuur) kirjeldab nihet, mis on tekkinud kuumutamisel, ja nihke kiirus (proov) kirjeldab nihet, mis on tekkinud samal temperatuuril eelkuumutatud ja kuumutatud proovi vahel. Tabelis on antud neeldumisspektrid (*abs*) ja fluorestsentsispektrid (*fluo*). Tugeva spektraalse kattuva signaali tähis on a ja mitte mõõdetud kiirguse tähis on b.

Spektririba tähis	Päritolu	Spektri tüüp (abs/fluo)	Abs/fluo 20 °C (nm)	Abs/fluo 55 °C (nm)	Abs/fluo 20 °C (nm) Peale soojendamist	Nihke kiirus $cm^{-1}/°C$ (temperatuur)	Nihke kiirus $cm^{-1}/°C$ (proov)
960	LH1, Qy natiivne	Abs	960	942	-	5,5 ± 0,4	-
		Fluo	985	964	-	3,99 ± 0,28	-
875	LH1, Qy Ca-vaba	Abs	-	875	-	8,3 ± 2,9	-
		Fluo	-	883	-	-	-
820	BChl *a* dimeer	Abs	-	-	820	-	-
		Fluo	-	-	-	-	-
801	RC dimeer	Abs	800	a	a	0,57 ± 0,09	-
		Fluo	-	-	-	-	-
776	BChl *a* monomeer	Abs	-	a	776	-	-
		Fluo	-	800	-	0,4 ± 0,1	-
767	BPheo monomeer	Abs	767	a	a	0,04 ± 0,01	-
		Fluo	770	a	a	-	-
695	Chl*, Qy oksüdeeritud	Abs	-	(~700)	695	0,62 ± 0,03	-
		Fluo	700	702	701	0,8 ± +0,3	0,4
675	BPheo	Abs	-	-	-	-	-
		Fluo	678	a	a	1,6 ± 0,4	-
653	(BPheo)	Abs	653	-	-	0,13 ± 0,3	-
		Fluo	-	-	-	-	-
599	LH1, Qx	Abs	599	590	591	0,29 ± 0,02	0,13
		Fluo	-	-	-	-	-
527 490 465	Karotenoidid	Abs	572 490 465	513 484 458	511 478 448	0,44 ± 0,04 0,35 ± 0,06 0,35 ± 0,04	0,25 0,2 0,25
		Fluo	-	-	-	-	-
406	Chl*, Soret oksüdeeritud	Abs	-	(~402)	406	1,15 ± 0,26	-
		Fluo	-	-	-	-	-
378	LH1, Soret	Abs	378	372	366	0,38 ± 0,03	0,21
		Fluo	-	-	-	-	-
282	Aromaatsed ühendid	Abs	282	278	277	0,081 ± 0,007	0,05
		Fluo	b	b	b	-	-

Tabel L3.2: *Tch. tepidum*i spektririba tähised ja päritolu koos spektriribade lainepikkuste nihked kuumutamise tagajärjel. Nihke kiirus (temperatuur) kirjeldab nihet, mis on tekkinud kuumutamisel, ja nihke kiirus (proov) kirjeldab nihet, mis on tekkinud samal temperatuuril eelkuumutatud ja kuumutatud proovi vahel. Tabelis on antud neeldumisspektrid (*abs*) ja fluorestsentsispektrid (*fluo*). Tugeva spektraalse kattuva signaali tähis on a ja mitte mõõdetud kiirguse tähis on b.

Spektririba tähis	Päritolu	Spektri tüüp (abs/fluo)	Abs/fluo 20 °C (nm)	Abs/fluo 55 °C (nm)	Abs/fluo 20 °C (nm) Peale soojendamist	Nihke kiirus $cm^{-1}/°C$ (temperatuur)	Nihke kiirus $cm^{-1}/°C$ (proov)
915	LH1, Qy natiivne	Abs	915	907	918	2,47 ± 0,09	0
		Fluo	931	925	929	2,82 ± 0,24	7,67
821	BChl *a* dimeer	Abs	-	-	821	-	-
		Fluo	-	-	-	-	-
801	RC dimeer	Abs	801	803	-	1,00 ± 0,14	-
		Fluo	-	-	-	-	-
779	BChl *a* monomeer	Abs	-	a	779	-	-
		Fluo	-	803	-	6,1 ± 0,8	-
761	BPheo monomeer	Abs	761	765	-	2,06 ± 0,54	-
		Fluo	-	-	766	-	-
700	Chl*, Qy oksüdeeritud	Abs	-	-	-	-	-
		Fluo	-	701	700	1,9 ± 0,4	-
594	LH1, Qx	Abs	594	593	593	1,76 ± 0,22	0,81
		Fluo	-	-	-	-	-
488 515 550	Karotenoidid	Abs	486 515 550	485 513 548	473 500 534	3,8 ± 1,3 8,7 ± 1,9 2,98 ± 0,63	8,1 11,5 7,8
		Fluo	-	-	-	-	-
379	LH1, Soret	Abs	379	379	369	8,5 ± 3,8	11,2
		Fluo	-	-	-	-	-
323	(?)	Abs	323	323	322	1,6 ± 0,9	2,73
		Fluo	-	-	-	-	-
279	Aromaatsed ühendid	Abs	279	276	-	26,3 ± 4,4	-
		Fluo	b	b	b	-	-

(?) – Selle tipu päritolu veel ei teata, aga kirjanduses arvatakse, et see on kuidagi seotud karotenoididega.

Tänuavaldused

Tänan südamest oma juhendajaid Margus Rätsepa, Juha Matti Linnantot ja Arvi Freibergi mulle pühendatud aja ja energia eest. Eraldi tänaks Margus Rätsepa lihtsate selgituste ning spektroskoopiliste aparatuuride kasutamise õpetamise eest; Juha Matti Linnantot huvitavate kvantkeemiliste loengute eest ja Arvi Freibergi küsimuste ning arutluste eest.

Sooviks ka tänada Kristjan Leigerit, kes aitas mul teha fluorestsentsi ergastusspektrite programmi, ja teisi Biofüüsika labori liikmeid, kes seminaril küsisid töö kohta küsimusi ja andsid ideid.

Tahaksin veel tänada oma vanemaid, Andra ja Sven Lehtmetsa, kelle toetuseta poleks ma nii kaugele jõudnud.

Alexandra Lehtmets

Lihtlitsents

Mina, Alexandra Lehtmets,

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

   „Eksitonid Ca sisaldavates fotosünteesivates bakterites"

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

   reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

1. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, 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, 29. mai 2023.