TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Membraanvalkude rõhust tingitud denatureerimise pööratavus

Bakalaureusetöö

12 EAP

Laura Hitrova

Juhendajad: PhD Liina Kangur

Prof. Arvi Freiberg

TARTU 2022

INFOLEHT

Membraanvalkude rõhust tingitud denatureerimise pööratavus

Purpurbakterid on vanimad fotosünteesivad organismid Maal. Nende fotosünteesiv aparaat ja fotosünteesi protsessid on seni avastatud organismidest kõige lihtsamad, mis teeb neist tänuväärsed kandidaadid erinevate uuringute läbiviimiseks. Üks vähe rakendatud parameeter, mille abil saab uurida valkude struktuuri ja funktsiooni on kõrgrõhu mõjutamine. Kõrgrõhk avaldab purpurbakteritele denatureerivat toimet, samas kui rõhk taastada toimub ka bakteri struktuuri ja funktsiooni taastumine ehk renatureerimine.

Märksõnad: Ca^{2+}-LH1-RC, purpurbakterid, kõrgrõhu barospektroskoopia, neeldumisspektroskoopia, dissotsiatsioon.

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

Reversibility of high pressure-induced denaturation of membrane proteins

Purple bacteria are the oldest photosynthetic organisms on Earth. Their photosynthetic apparatus and photosynthetic processes are the simplest of the organisms discovered to date, making them admirable candidates for a variety of studies. One little-used parameter that can be used to study the structure and function of proteins is influencing with high pressure. High pressure has a denaturing effect on purple bacteria, while restoring the pressure also restores the structure and function of the bacterium.

Keywords: Ca^{2+}-LH1-RC, purple bacteria, high pressure barospectroscopy, absorption spectroscopy, dissociation.

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology, P230 atomic and molecular physics

SISUKORD

SISUKORD 3

KASUTATUD LÜHENDID 5

SISSEJUHATUS 6

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7

1.1. Fotosüntees purpursetes väävli bakterites 7

1.2. Purpurbakterite fotosünteesiaparaat 8

1.3. Purpurbakter *Thiorhodovibrio* tüvi 970 10

1.3.1. *Trv*. tüvi 970 Ca-LH1-RC struktuur 10

1.4. Trv. tüvi 970 LH1-RC kaltisumi seondumissait 11

1.5. Valgud rõhu all 12

2. EKSPERIMENTAALOSA 14

2.1. Töö eesmärgid 14

2.2. Materjal ja metoodika 14

2.3. Proovi ettevalmistamine 14

2.4. Aparatuur 15

2.4.1. Rõhurakk 16

2.5. Andmete analüüs 17

2.5.1. Rõhuandmete töötlemine 17

2.5.2. Neeldumisspektrite töötlemine 18

3. TULEMUSED JA ARUTELU 19

3.1. Kaltsiumiga ja kaltsiumita neeldumisspektrid 19

3.2. Kaltsiumi dissotsiatsioon kõrge rõhu all 21

3.3. Kaltsiumi assotsiatsioon madala rõhu all 22

3.4. Spektri jagamine komponentideks 24

3.5. Ca^{2+} dissotsiatsioon ja assotsiastisoon *Trv*. tüvi 970 LH1 kompleksis 25

3.6. LH1-RC kompleksi poolestusaja sõltuvus rõhust 28
Summary 31
KASUTATUD KIRJANDUS 32
KASUTATUD VEEBIAADRESSID 36
LIHTLITSENTS 37

KASUTATUD LÜHENDID

ATP – adenosiintrifosfaat

BChl a – bakterklorofüll a (*bacteriochlorophyll*)

β-DDM – n-dodetsüül-P-D-maltopüranosiidi

CO_2 – süsihappegaas

EDTA – etüleendiamiintetraäädikhappe

LHC – vlaguse kogumise kompleks (*light-harvesting complex*)

LH1 – valguse kogumise kompleks 1 (ingl *light-harvesting complex* 1)

LH2 – valguse kogumise kompleks 2 (*light-harvesting complex* 2)

LH1-RC – valguse kogumise kompleksi 1 reaktsioonitsenter

nm – nanomeeter

PS – fotosüsteem (*photosystem*)

RC – reaktsioonitsenter (*reaction center*)

Trv. – *Thiorhodovibrio*

Trv. tüvi 970 – *Thiorhodovibrio* tüvi 970 (*Thiorhodovibrio strain 970*)

SISSEJUHATUS

Elu Maal saab toimuda peamiselt tänu päikesevalgusele ja paljudele eluvormidele on ta otsene energia allikas. Taimed, vetikad ja fototroofsed bakterid toetuvad päikesevalgusele, et toota endale vajalikku energiat ja toitaineid, samuti muundavad nad päikeseenergia keemiliseks energiaks.

Fotosüntees jaguneb üldiselt neljaks faasiks. Esimeses faasis toimub valguse neeldumine, teises elektronide transport, kolmandas adenosiintrifosfaadi (ATP) tootmine ja neljandas süsihappegaasist (CO_2) süsivesikute saamine. Fotosünteesi esimesi protsesse viivad läbi pigmendi-valgukompleksid, milledeks on reaktsioonitsentrid ja valgust koguvad antennid.

Fotosüntees jaguneb omakorda oksügeenseks fotosünteesiks ja anoksügeenseks fotosünteesiks. Oksügeenses fotosünteesis eraldavad bakterid protsessi käigus hapnikku, anoksügeenses fotosünteesis seda aga ei toimu. Anoksügeenses fotosünteesis kasutavad bakterid CO_2 redutseerimiseks väävliühendeid. Anoksügeensed fotosünteesisvad bakterid jagunevad omakorda väävli- ja mitteväävlibakteriteks.

Purpurbakterid on teadaolevalt kõige vanemad ja ühed enam uuritud fotosünteesivad organismid. Kuna purpurbakterid on sisuliselt lihtsa ehitusega, on neil ka üks lihtsamaid fotosünteesi-mehhanisme. See on peamiseks põhjuseks, miks on purpurbakterid ideaalsed uurimaks fotosünteesis toimuvaid protsesse.

Käesolevad töös jälgitakse *Thiorhodovibrio* tüvi 970 valgust koguva kompleksi I reaktsioonitsentri (LH1-RC) kaltsiumi dissotsiatsiooni protsessi ajas, erinevatel rõhu väärtustel. Samuti jälgitakse toimuvate protsesside pööratavust. Uurimus on läbi viidud optilise spektroskoopia meetodiga spektri lähi-infrapunases piirkonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Fotosüntees purpursetes väävli bakterites

Purpurbakterid on lillakaspunased anoksügeensed fototroofsed bakterid, kes jagunevad nii väävlibakteriteks kui ka mitteväävlibakteriteks. Üldiselt kuuluvad purpursed väävlibakterid aneroobsete bakerite hulka, kuid on ka mingil määral mikroaerofiilid ehk taluvad väikeses kontsentratsioonis hapnikku. Purpurbakterid asustavad keskkondi, kus leidub vesiniksulfiidi ja vett, näiteks kanalisatsioonid, järved, tiigid ja muud madalad veekogud. Purpurbakterid sisaldavad fotosünteetlisi pigmente, milleks on bakterklorofüllid (BChl) ja karotenoidid (Madigan ja Jung, 2009).

Purpurbakterite fotosüntees toimub valdavalt hapniku vabades tingimustes. Bakterid saavad valguse vee sügavamates kihtides, mis pole veel pinnapoolsete organismide poolt ära "neelatud". Purpurbakterite fotosüntees toimub fotosünteetilise membraani valgusreaktsioonidel, mida viivad läbi valgust neelavad valgusantennid ja reaktsioonitsenter (Madigan ja Jung, 2009).

Valgust neelavaid valgusantenne on purpurseltel väävli bakteritel kahte tüüpi- sisemine ehk tuuma valgusantenn (LH1) ja välimine ehk perifeerne valgusantenn (LH2). Valgust koguvad valgusantennid koosnevad α- ja β-polüpeptiididest (Permentier *et al*., 2001). Need polüpeptiidid on suhteliselt lühikesed (~46 – ~80), mille võiks jaotada 3 osaks, milles polaarsed N-ja C-terminaalsed asuvad kummalgi pool hüdrofoobset α-helikaalset transmembraani. Neil on sügavalt konserveerunud histidiini jääk, mis kordineerib bakterklorofülle (BChl) (Madigan & Jung, 2009). Bakterklorofüllid on pakitud tihedalt valgu ahelate vahele ja on antennideks, mis püüavad valguskavnte ning kannavad saadud energia edasi fotosüsteemi reaktsioonitsentrisse. Reaktsioonitsenteri bakterklorofüll on elektroni transpordi ahelas viimane kõige madalama energiaga akseptor (Lichtenthaler ja Babani, 2004). Reaktsioonitsentris toimub esmane laengute eraldamine valgus kvandi energia fikseerimiseks keemilises sidemes.

Reaktsioonitsenter koosneb kolmest ahelast: L (kerge), M (keskmine), H (raske) ja tsütokroomist. Reaktsioonitsentri subühikute vahele on pakitud 4 bakterklorofülli, millest kaks on sümeetriliselt paigutatud ja moodustavad nn P paari ning 2 paiknevad individuaalselt, 2 feofütiini ja 2 kinooni, mille vahel on redoksaktiivne raua aatom (Ermler *et al*., 1994).

LH1 on rõngaskujuline multimeer, mis vastavalt oma struktuurile koosneb 15, 16 või 28 allüksusest, mis omakorda koosnevad α- ja β-polüpeptiidide paaridest. Polüpeptiidid hoiavad koos kuni kolme bakterklorofülli molekuli (Permentier *et al*., 2001). Bakterklorofülli kõrval on valguse neelamise seisukohalt purpurbakterites kasutusel ka karotenoidid ja need varieeruvad liigiti. Karotenoidide rolliks valgusantennides on struktuuri stabiliseerimine ja valguse püüdmine. Karotenoidid neelavad valgust 500 nm ümber. Struktuurselt on üles ehitatud tavaliselt nad40 süsiniku aatomist (Hunter *et al*., 2009).

LH1 neelab valgusenergiat ning edastab ergastusenergia edasi fotosünteesi reaktsioonikeskusesse (RC). Reaktsioonikeskust ümbritseb südamikuantenn, mida kutsutakse LH1 või B875 (Beekman *et al*., 1997). Nimetus B875 tuleneb LH1 bakterklorofülli a neeldumismaksimumist in vivo lähi-infrapunases spektri piirkonnas (Hu ja Schulten, 1998). Mõnes bakteris on LH1 antenn ümbritsetud mõne LH2 või B800-850 antenniga. Sellises paigutuses on valguse ergastus suunatud reaktsioonitsentri poole. Ergastus jääb tsentris lõksu ning toimub laegu eraldumine. Lõpuks toimub energia stebiliseerimine mitmete sekundaarsete elektronide ülekande etappidega (Beekman *et al*., 1997).

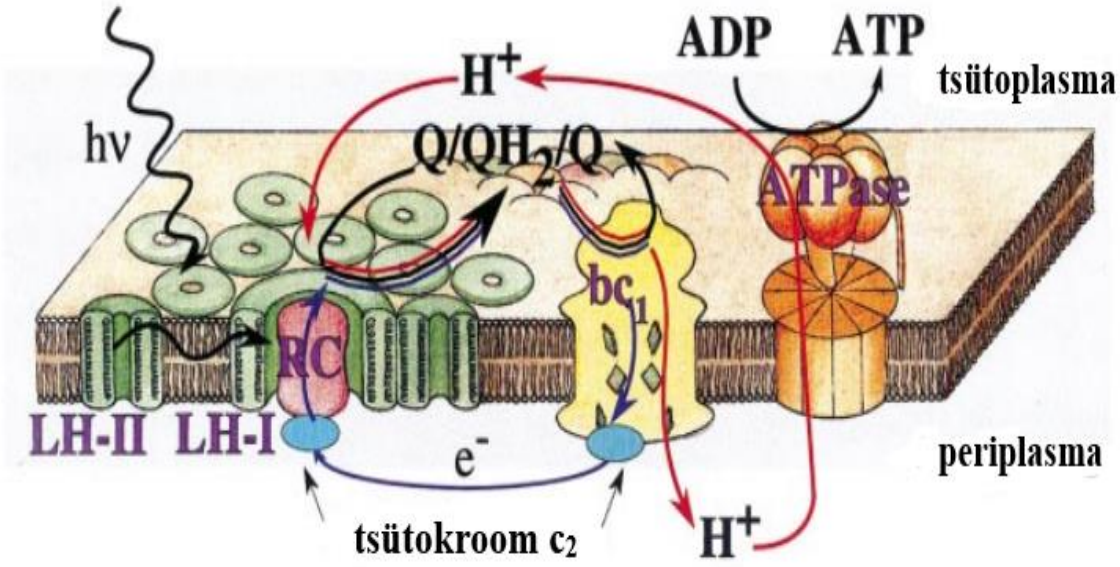
1.2. Purpurbakterite fotosünteesiaparaat

Purpurbakterite fotosünteetilineaparaat paikneb intratsütoplasmaatilistes membraanides, mis moodustavad vesiikuleid, sissesopistusi sõltuvalt liigist. Nende membraanide funktsiooniks on salvestada valguse energia keemilise sideme energiaks ja tagada bakterile elutegevusesk vajalik energia.

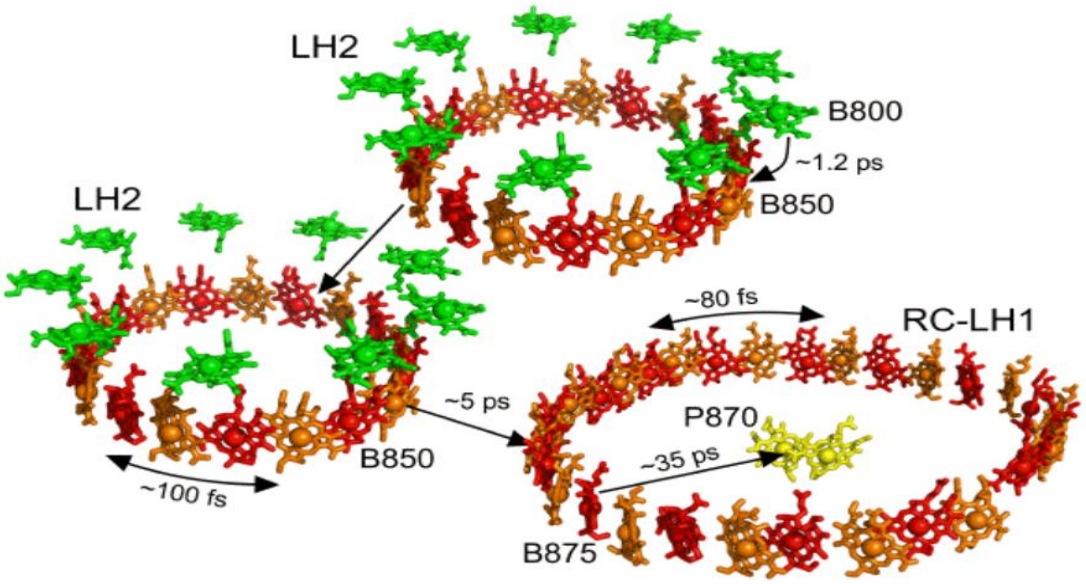
Joonisel 1 on kujutatud purpurbakterite esmane fotosünteesi mehhanism. Protsess algab valguse neeldumisest valgust kogumise antennides, kus see liigub reaktsioonitsentri P paarile. Reaktsioonitsentris toimub ergastuse energia arvelt laengute eraldumine. See toimub ergastatud elektroni liikumisel P paarilt feofütiinile mida vahendavad monomeerne BChl a koos bakter feofütiiniga. Selle käigus oksüdeerub P paar, mis taandatakse tsütokroom c_2 abil. Kinooni (Q) taandumisel kahe elektroniga seostub sinna 2 vesinik iooni ning moodustub hüdrokinoon (QH_2). Hüdrokinoon on membraanis vabalt difundeeruv ühend, mida oksüdeerib tsütokroom c oksüreduktaas (bc_1). Hüdrokinoonilt eraldatud vesinikud pumbatakse periplasmaatilisse ruumi ja elektronidega taandatakse tsütokroom c_2 ning taandatakse osaliselt teine kinoon. Vesinik

ioonide pumpamise tulemusena tekitatakse läbi membraani prootongradient, mille arvelt ATP süntaas sünteesib ATP. Kinooni tsüklilise taandamise ja oküdeerumise tõttu nimetatakse seda protsessi Q tsükliks (Hu *et al*., 2002).

Valguse neeldumise liikumine valgust koguvatel antennidel ja energia ülekanne on toodud joonisel 2. Energia liigub antenni ringides 100 fs suurusjärgus ja energia ülekanne erinevate komplekside vahel on pikosekund suurusjärgus. Valguse kogumist viivad läbi LH1, LH2 ning RC. LH1 ja LH2 valgusantennid suunavad neeldunud päikeseenergia reaktsioonitsentrisse, kus toimub laengute eraldamine (Hunter *et al*., 2009).



Joonis 1. Purpurbakterite fotosünteesi mehhanism. Punase noolega on näidatud prootnite liikumine, sinisega elektroni liikumine ja mustaga kinooni liikumine (Hu *et al*., 2002).



Joonis 2. Lihtsustatud energia ülekande skeem purpurbakteri fotosüsteemis. Antud skeemil on rohelisega tähistatud LH1 antenni B800 ringi bakterklorofüllid. Punase ja oranžiga on märgitud LH1 antenni B875 ringi bakterklorofüllid ja LH2 antenni B870 bakterklorofüllid. Kollasega on tähistatud reaktsioonitsentri P870 bakterklorofüllid. Pikosekunditega (ps) on tähistatud energiaülekannete ajad ning nooltega nende suund (Jones, 2009).

1.3. Purpurbakter *Thiorhodovibrio* tüvi 970

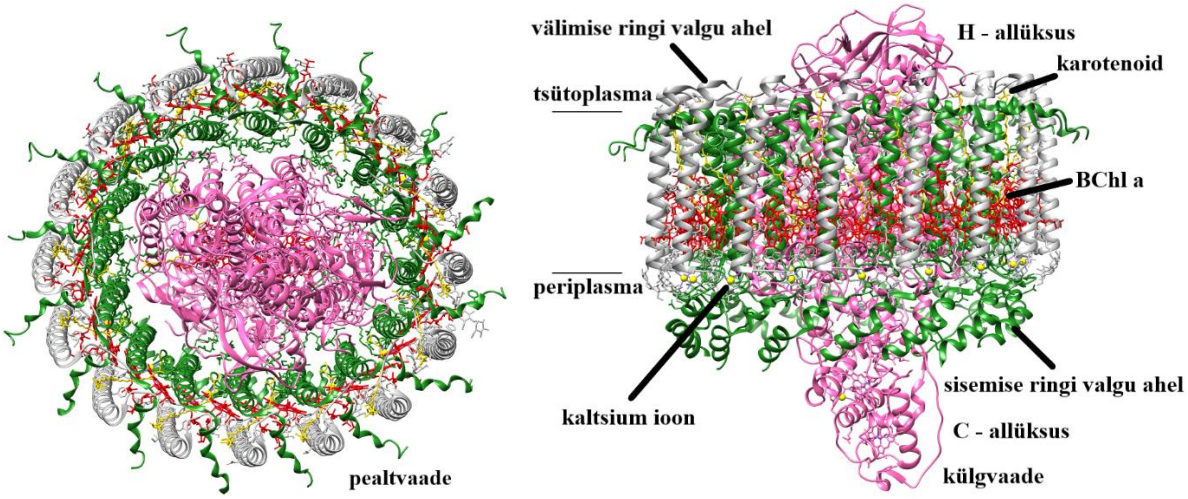
Thiorhodovibrio tüvi 970 on eraldatud Saksamaa Põhjamere saarelt Mellumilt (Biocyc). *Trv.* tüvi 970 on mikroaerofiil, fototroof ja mesofii ning kuulub *Chromatiaceae* sugukonda ja sealt *Thiorhodovibrio* perekonda (NCBI). Valgust neelavatset antennidest on *Trv*. tüvi 970-el ainult üks, milleks on LH1 (Permentier *et al*., 2001).

1.3.1. *Trv*. tüvi 970 Ca-LH1-RC struktuur

Purpurbakteri *Trv.* tüvi 970 isoleeritud valguse kogumise reaktsioonitsenteri kompleks (LH1-RC) neeldumismaksimum asub 960 nm juures, mis kõige suurema punanihkega neeldumine bakteriklorofülli sisaldavate bakterite puhul. Antud neeldumisriba tähistatakse Q_y, mis on madalaima energiaga siglente seisund (Imanishi *et al*., 2019).

Trv. tüvi 970 LH1-RC kompleksi on uuritud krüogeense elektronmikroskoopiaga (krüo-EM), kus kasutati 2,82 Å lahutusvõimet (joonis 3). *Trv.* tüvi 970 LH1 moodustab suletud ringi kujulise struktuuri jaotudes ühtlaselt ümber reaktsioonitsentri. LH1 koosneb 16-st αβ-polüpeptiidide

paarist, sisaldab 16 kaltsiumiooni, mida kordineerivad nii α- kui ka β-polüpeptiidide vastavad aminohappe jäägid, valgu sisse on pakitud16 karotenoidi ja 32 BChl-a molekuli (Imanishi *et al.*, 2019). LH1 ringi sees paiknev reaktsioonitsenter asetseb LH1 ringi keskel ning reaktsioonitsentris olevate L- ja M- subühikud on seotud LH1 sisemise ringi valgu ahelaga. Reaktsioonitsentris on neli bakterikloro fülli molekuli, kaks bakterfeofütiini a, 15-cis-karotenoid (dimetoksülükopeen), menakinoon ja ubikinoon. LH1 välise ja sisemise ringi valgu ahelad koordineerivad 16-st kaltsiumi iooni (Imanishi *et al.*, 2019).



Joonis 3. *Trv.* tüvi 970 LH1-RC kompleksi struktuur pealt- (a) ja külgvaates (b). Struktuur on saadud Protein Data Bank andmebaasist ja kohandatud UCSF Chimera programmiga. Välimise ringi moodustab β- ahel (hall), sisemise ringi – α-ahel (roheline) ja nende vahel asuvad BChl a (punane) ning karotinoidi (kollane) molekulid. Kaltsiumi ioonid on toodud kollaste täppidena joonise b osas. LH ringi keskel (roosa) on reaktsioonitsentri (RC) M-, C-, H- ja L-subühikud (roosa).

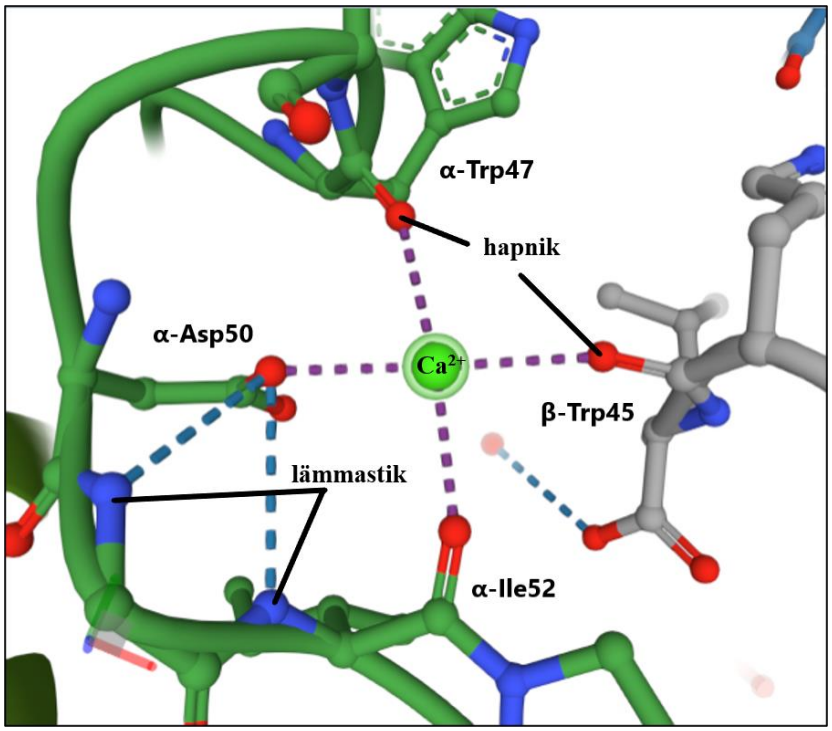
Trv. tüvi 970-s struktuuris omavad olulist rolli kaltsiumi ioonid. Kui nende arvu kahandada, siis nihkub Q_y neeldumisriba 959 nm 875 nanomeetrile. Kui kaltsiumiioonid tagasi seostuvad, siis taastuvad algsed spektraalsed omadused. Sellisest käitumisest võib täheldada, et *Trv.* tüvi 970 integreerib kaltsiumioonid enda LH1-RC kompleksisse, et nihutada enda valguse kogumise võimet infrapunasemasse spektriossa (Tani *et al.*, 2020).

1.4. Trv. tüvi 970 LH1-RC kaltisumi seondumissait

Trv. tüvi 970 LH1-RC struktuuris on leitud kaltsiumi ioonid (Tani *et al.*, 2020). Kaltsium on keemiline element, mille avastas Humphry Davy 1808. aastal. Kaltsium on halli värvusega leelismetall, mida looduses vabal kujul ei esine. Kaltsiumiioon esineb keemilistes ühendites

oksüdatsiooniastmega 2+ (Jaiswal, 2001). Kaltsium on väga oluline metall kõikidele rakkudele, sest bioloogilistes süsteemidesta omastab struktuuri säilitamise funktsiooni.

Joonisel 4 on toodud kaltsiumi seostumisesait. Kaltsium ioon fikseerib α- ja β-valgu ahelat kordinatiivsete sidemetega oma seostumise saidi ümbruses. Kaltsiumi kordinatsioonis osalevad hapniku aatomid, millest 3 kuuluvad α-ahelale ja 1 β-ahelale. α ahelas osalevad arparagiin 50 karboksüülrühma hapnikud, trüptofaan 47 ja iseoleutsiin 52 peaahela hapnikud ning β-ahela leutsiin 46 peaahela hapnik. Asparagiin 50 hapnikud on fikseeritud glütsiin 51 ja isoleutsiin 52 peaahela lämmastikkudega.



Joonis 4. *Trv.* tüvi 970 kaltsiumi seondumissait Ca-LH1-RC kompleksis. Kaltsium ioon (roheline), hapnikud (punased pallid), kordinatiivsed sidemed (lilla punktiirjoon), β-ahel (hall) ja α- ahel roheline, vesiniksidemed (sinine punktiirjoon). Struktuur on saadud Protein Data Bank andmebaasist.

1.5. Valgud rõhu all

Bridgman oli esimene inimene, kes avaldas teabe kõrge rõhu mõjust valgule. Oma katses näitas ta, et munavalk denatureerub pöördumatult, mitme 100 MPa rõhu all (Bridgman, 2013). Elusorganisme uuritakse rõhu all, just sellepärast, et neil on suurepärane võime kohaneda karmide keskkonnatingimustega, milleks võib olla näiteks kõrge rõhk (Meersman *et al.*, 2013).

Valkudel on sekundaarne, tertsiaalne ja kvaternaarne struktuur. Valgu funktsionaalsed konformatsioonid on tingitud suhteliselt nõrkadest interaktsioonidest nagu vesiniksideme interaktsioonid, hüdrofoobsed interaktsioonid ja teatud ioonsed interaktsioonid. Üldiselt on kõikide struktuurselt oluliste valkude vastasmõjud tingitud välisest survest (Bridgman, 2013).

Rõhk ja selle muutmine on üks parameeter, mille abil saab uurida valkude struktuuri ja funktisooni. On kindlaks tehtud, et integreeritud membraanvalgud on selle metoodika jaoks ühed sobivaimad valgud. Seda sellepärast, et pigmendidel on iseloomulik toimida, kui sisemiste sondidena, mis jälgivad rõhust põhjustatud valgustruktuuri muutusi (Kangur *et al*., 2008).

Vähesel määral on uuritud monomeersete valkude kokku- ja lahtipakkumist rõhu all (Daniel *et al*., 2006). Need uuringud näitasid, et rõhu tõstmisel valgu sekundaarstruktuur ei hävi, küll aga nõrgenevad kõrgemat järku struktuurid, mida hoiavad kokku hüdrofoobsed interaktsioonid. Samuti näitasid need uuringud, et valk denatureerub täielikult temperatuuri või keemiliste denaturantide mõjul. Sellest uuringust võib järeldada, et rõhk ei denatureeri valku täielikult, selle toime on üldiselt nõrk ning samuti toimub rõhu langetamisel valgu renaturatsioon. Tsütoplasmaatiliste valkude puhul on denaturatsioon veidi keerulisem, kuna nende puhul mängivad olulist rolli ka tsütoplasma teiste komponentide kontsentratsioonid. Rõhu all mõjutavad valkude stabiilsust, lahustuvust ning konformatsiooni enamasti tsütoplasmas lahustuvad ained, milleks võivad olla näiteks suhkrud või soolad (Winter ja Dzwolak, 2005).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud töö eesmärgiks on uurida, purpurbakteri *Thiorhodovibrio* tüvi 970 Ca^{2+}-LH1-RC kompleksi stabiilsust kaltsium ioonide suhtes erinevatel rõhu tingimustel. Jälgida membraanvalgu stabiilsust ning protsessi pööratavust optilise spektroskoopia meetodiga spektri lähi-infrapunases piirkonnas.

Töö konkreetsed eesmärgid on:

- Mõõta kompleksi neeldumisspekter
- Mõõta Ca^{2+} vabanemist kompleksist rõhu all
- Mõõta Ca^{2+} assotsiatsioon madalatel rõhkudel
- Leida vastavad kineetilise kõverad ja koostada graafikud kompleksi käitumisest rõhu all

2.2. Materjal ja metoodika

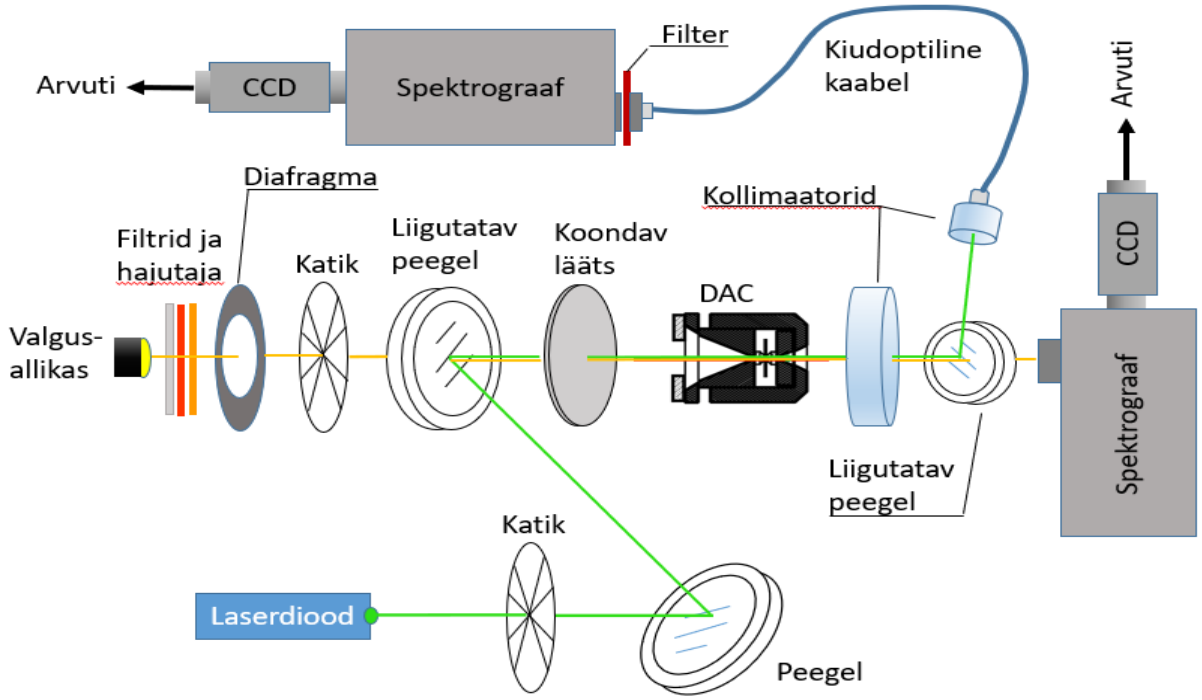
Uurimisobjektina on kasutatud purpurse väävlibakteri *Thiorhodovibrio* tüvi 970 isoleeritud LH1-RC proovi, mis saadi juba kontsentreeritul kujul Jaapanist, Ibaraki Ülikoolist, kus neid kasvatati ja eraldati (Imanishi *et al*., 2019). Objekti isoleeriti kasutades β-DDM, millega lõhuti ära membraani pind ning vabastati membraani pinnaga ühenduses olevad kompleksid, mis jäid detergendis vabalt liikuma. Proovi säilitati sügavkülmikus temperatuuril -78°C.

2.3. Proovi ettevalmistamine

Kõrgrõhu spektroskoopia mõõtmise ettevalmistamiseks kasutati detergent-isoleeritud objekti mille algne optiline tihedus oli 28 ja seda lahjendati optilise tiheduseni 1, et rõhu rakus optiline tihedus oleks 0,3-0,4 absorptsiooni B960 riba maksimumi intensiivsuse järgi. Proovile lisati 60 µl $CaCl_2$, seejärel proovi lahjendati 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) puhvriga, mis sisaldas 0,05% n-dodetsüül-P-D-maltopüranosiidi (β-DDM). Kaltsiumi vaba vormi tekitamiseks ksautati 10 mM etüleendiamiintetraäädikhappega ehk EDTA reaktsioonisegus.

2.4. Aparatuur

Katsete tulemuste mõõtmiseks kasutati kahte ühendatud optilist süsteemi, mille skeem on kujutatud joonisel 5. Esimene süsteem on vajalik selleks, et mõõta LH1 neeldumisspektrit ning teine süsteem on rõhu registreerimiseks. Mõlemat optilist süsteemi kalibreeriti kasutades Ne-lampi, mille gaas sisaldab vähesel määral argooni.



Joonis 5. Katse skeem. Katses kasutati kahte ühendatud optilist süsteemi: süsteem, mis registreeris valgu neeldumisspektreid, märgitud skeemil kollasega (valgusallikas, filter, hajutaja, diafragma, katik, peegel, koondav lääts, teemantalasirõhurakk (DAC), kollimaator, peegel ja spektrograafiga ühendatud CCD-kaamera) ning süsteem, mis mõõtis rõhku, märgitud skeemil rohelisega (laser, katik, peeglid, koondav lääts, rõhurakk, kollimaator, peegel, kollimaator, ühendatud kiudoptilise kaabliga, filter ja spektrograafiga ühendatud CCD-kaamera).

Rõhu mõõtmiseks ergastati mirkoskoopilised rubiinikristallid diood laseriga, 532 nm juures. Rubiinide kiirgusspektrit lahutas 1,5 meetri fookuskaugusega Jobin-Yvon TH150 spektrograaf. Spektrograaf oli ühendatud termoelektriliselt jahutatud CCD-kaameraga (EEV30-11, Andor Technology).

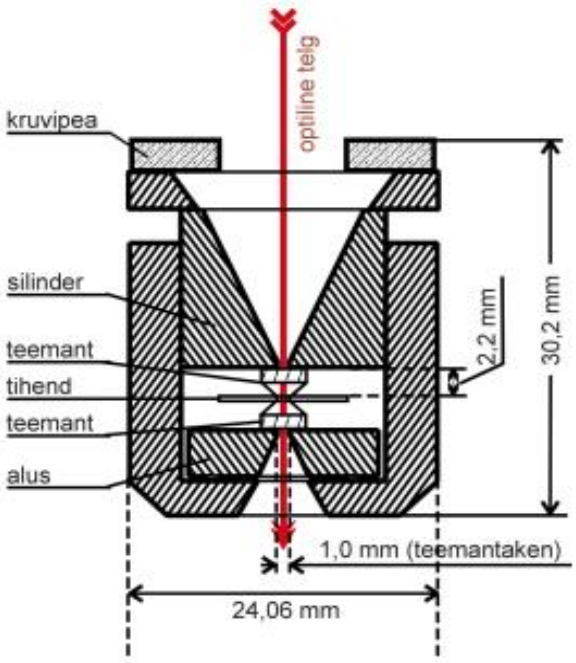
Proovi neeldumisspektrite mõõtmiseks kasutati 0,3m fookuskaugusega Shamrock SR-303i spektrograafi. Spektrograafis lahutati valgust võrega, millel oli 150 joont millimeetri kohta ja maksimaalne tundlikus 800 nm juures. Spektrograafia pilu Laius oli 50 µm. Spektrite

registreerimiseks kasutati termoelektriliselt jahutatud CCD-kaamerat iDUS DV420A-OE (Andor Technology). Valgusallikaks kasutati volframist hõõgniidiga (temperatuuril 2700 K) lampi, mille kiire tee paiknesid hajutaja ja filter. Neeldmisspektrite mõõtmiseks rõhurakus kasutati filtrit (СССР Государственный Стандарт гост 9411-66) ОС-12. Filtrit oli vaja selleks, et ära lõigata lainepikkused vastavalt 530 ja 560 nanomeetrini.

Süsteem oli varustatud automaatse katikuga, seega registreeris neeldumisspektrit iga 5 minuti tagant ja vastavalt katse tingimustele 1-4 ööpäeva jooksul. Rõhu süsteem oli samuti automaatne ning registreeris rõhu väärtusi terve katse vältel ligikaudu 10 korda. Kuna Jobin-Yvon spektrograaf on väga temperatuuritundlik, pidime kalibreerima spektrograafi iga mõõtmise jaoks uuesti.

2.4.1. Rõhurakk

Rõhu mõõtmiseks kasutati teemantalasi-rõhurakku, mida on kujutatud joonisel 6. Rõhurakk on metallsilindrist koosnev ehitis, mis lisaks omab kesta ja kahte osa kokku hoidvast kaanest, mis on raku külge kruvitavad. Sellest, kui kõvasti on kruvisi pingutatud sõltub ka teemantlasi-rõhurakus tekkiv hüdrostaatlise rõhu suurus. Selleks, et mõõta rõhku on vaja teemantit. See liimitakse nii rõhuraku kesta pinnale kui ka silindri pinnale. Teemandid on teineteisest eraldatud avaga metalltihendiga. Rõhusensoritena toimivad sfäärilised rubiinikristallid, mida asetatakse rakku enne proovi sisestamist. Rubiinikristallid on diameetriga ligikaudu 5 – 20 µm (RSA Le Rubis SA). Rõhuraku komplekteerimine toimus mikroskoobi all. Rõhurakk püsis kogu aja labori toatemperatuuril 22°C (+/- 1°C).



Joonis 6. Teematalasi-rõhurakk ristlõikes. Kasutatud on Liina Kanguri joonist, mida on autori loal kohandanud Laura Hitrova.

2.5. Andmete analüüs

Andmete töötluseks ja jooniste tegemiseks kasutati Origin 9.0 (OriginLab Corporation). Andmete töötlusel oli vaja esialgu leida rõhu väärtused ning seejärel analüüsida LH1 neeldumisspektreid.

2.5.1. Rõhuandmete töötlemine

Selleks, et määrata teemantlasi-rõhurakus olevat hüdrostaatilist rõhku läbiti alljärgnevad sammud:

1. Esialgu leiti Loretnzi lähenduse abil rubiini kiirgusspektri maksimumi asukoha CCD-kaamera pikslivääртuste skaalas;
2. Lorentzi lähenduste abil saadud maksimumide kaudu kalibreeriti CCD-kaamera skaala reeperlambi Ne-joone ja Ar-joone;
3. Kasutades normaalrõhul mõõdetud rubiinide spektreid nullpunktina leiti rubiini maksimumile vastav rõhu väärtus;

4. Leiti väärtuse määramatuse hindamine ja keskmistamine.

2.5.2. Neeldumisspektrite töötlemine

Baasjoont kallibreeriti lainepikkuste skaala reeperlabi Ne-joone alusel ning peale seda leiti talle Lorentzi lähendus. Enne LH1 neeldumisspektrite mõõtmist oli vaja mõõta referentsspekter. Selle mõõtmiseks kasutati puhvrit (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Referentsspektri suhtes mõõdeti LH1 neeldumisspektrid. Igas katses mõõdetud 10-15 spektrit analüüsiti. Andme töötlemisel esialgu korrigeeriti baasjoont, kasutades Rayleigh´i hajumist. Lainepikkuste skaala kallibreeriti neoon lambi spektri alusel, kus kalibratsioon teostati Lorentzi lähendusega kiirgusjoonele 837,761 nm. Mõõdetud spektri lahutamine $+Ca^{2+}$-LH1-RC ja $-Ca^{2+}$-LH1-RC komponendiks toimus puhta $+Ca^{2+}$ vormi kaudu, mida edaspidi lahutati summarsest mõõdetud spektrist. Spektri lahutamiseks kasutatud koefitsendid kirjeldavad otseselt tekkinud või järele jäänud antud komponendi hulka, mille alusel konstrueeriti kineetilised kõverad. Saadud kineetilistest kõveratest leitud 50% reageerimis aegadest, moodustati sõltuvus poolestusaja sõltuvus rõhust.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

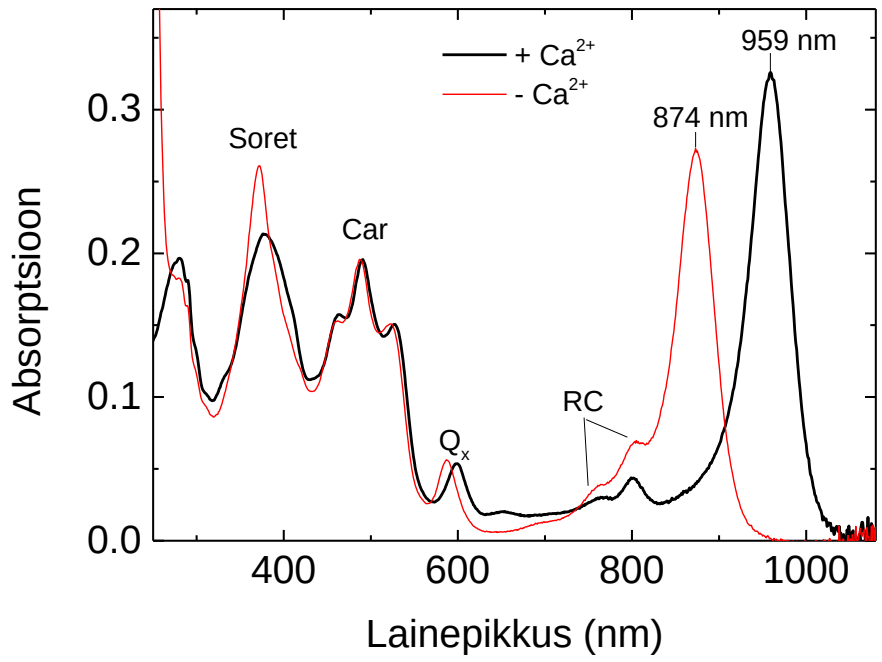
3.1. Kaltsiumiga ja kaltsiumita neeldumisspektrid

Kaltsiumiga LH1-RC neeldumisspektrit kui ka kaltsiumita LH1-RC neeldumisspektrite kuju on toodud joonisel 7. $+Ca^{2+}$-LH1-RC neeldumisspektri maksimum on 959 nm ning neeldumisriba pool laius (FWHM) on 612 cm^{-1}. Võrdluseks $-Ca^{2+}$-LH1-RC neeldumisspektri maksimum on 874 nm ning neeldumisriba pool laius (FWHM) on 684 cm^{-1}. Imanishi et al,. 2019 isoleeritud $+Ca^{2+}$-LH1-RC vormi maksimumi asukohaks on leitud 957 nm ja $-Ca^{2+}$-LH1-RC maksimumiks on leitud 875 nm ja väike maksimumide erinevus võib olla tingitud mõõteaparatuuri erinevusest, selle mõõte tõesusest ja proovi valmistamise viisist. Erinevalt Imanishi et al,. 2019 poolt valmistatud kaltsiumi vaba vorm, mille saamiseks kasutati 60 minutilist inkubeerimist 1 mM EDTA-ga ja proovist eraldamiseks kasutati EDTA välja pesemist ultrafiltreerimise meetodit, lisasime meie proovile 10 mM EDTA ning valgu kaltsiumist täielikuks vabanemiseks inkubeerisime proovi toatemperatuuril 20 tundi. Jooniselt on näha, et selle aja jooksul olulist valgu denatureerumist ei toimu. Võrreldes Imanishi et al,. 2019 toodud $+Ca^{2+}$-LH1-RC ja $-Ca^{2+}$-LH1-RC spektrite intensiivsuse suhet, võib teha järelduse, et $-Ca^{2+}$-LH1-RC vormi neeldumis omadused on mõnevõrra väiksemad, kui $+Ca^{2+}$-LH1-RC vormil, seda näitab Q_y spektri ribade intensiivsus (Imanishi *et al*., 2019).

Q_y ribade laiused, mis kirjeldavad struktuuri kompaktsust, on $-Ca^{2+}$-LH1-RC 72 cm^{-1} laiem. See kirjeldab kaltsiumi panust valgu struktuuri, sidudes teda jäigemaks ja stabiliseerides BChl a molekulide asukohta. Spektrite kuju Q_y riba piirkonnas on kasutatud vajaliku informatsiooni ja spektri kujude ligilähedaseks hindamiseks rõhu mõõtmiste tarvis.

Joonisel on näha veel BChl a Q_x riba, mis nihkub kooskõlaliselt Q_y ribaga. Spektraalvahemikus 420 – 570 nm vahel paikneb karotinoidide neeldumine, mille kolm lokaalset maksimumi liiguvad minimaalselt. See on kooskõlas Imanishi et al,. 2019 saadud tulemustega, kus ta väidab, et karotenoidide neeldumispektri maksimumid ei erine suurel määral mõlema vormi vahel. Seega töö katse tulemuste põhjal jõuti järeldusele, et erinevalt BChl a-st, on karotenoidide interaktsioon kaltsiumi ja selle seostumissaitidega väga nõrk või isegi olematu, mida näeb ka meie katsest (Imanishi *et al*., 2019).

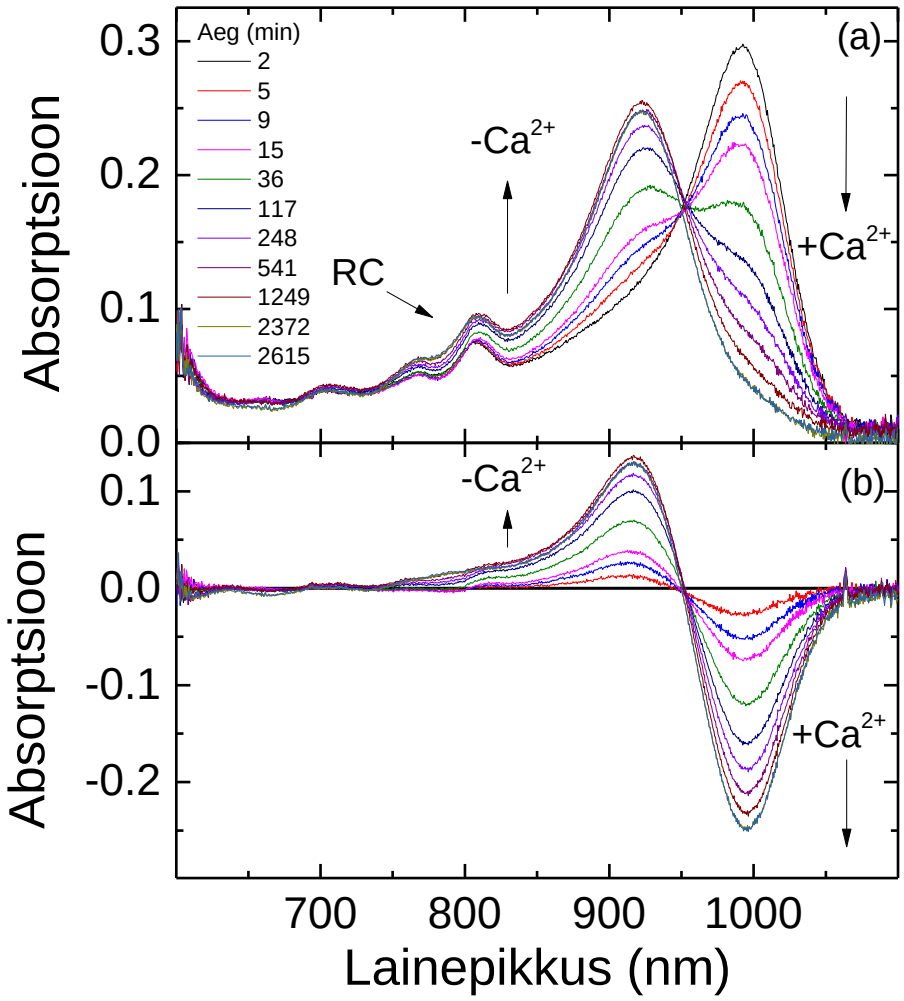
Veidi alla 400 nm on neeldumisriba mis on seotud bakterklorofülli soret neeldumisega. +Ca^{2+}-LH1-RC riba kuju on oluliselt erinev -Ca^{2+}-LH1-RC soret riba kujust, see on ka üks tunnus, et valgu kompleks on kaotanud kaltsiumi. Analoogset nihkumist näitab ka oma töös Imanishi et al,. 2019 ja valgus sisaldava aromaatika neeldumine alla 300 nm on hästi välja joonistunud +Ca^{2+}-LH1-RC vormil, kuna meie lahus sisaldab EDTA-d suhteliselt suures kontsentratsioonis, siis -Ca^{2+}-LH1-RC vormi spekter on selles osas EDTA pool varjatud (Imanishi *et al*., 2019).



Joonis 7. *Trv*. tüvi 970 +Ca^{2+}-RC-LH1 (must joon), -Ca^{2+}-RC-LH1-EDTA (punane joon) neeldumisspektrid. Spektrid on mõõdetud normaalrõhul ja labori toatemperatuuril. Kaltsiumi vaba vorm on tekitatud 10 mM EDTA lisamisega kaltsiumi vormi lahusele minimaalsel hulgal (20µl).

3.2. Kaltsiumi dissotsiatsioon kõrge rõhu all

Joonisel 8 on toodud näide rõhu all toimuvast kaltsiumi vormi muutumisest kaltsiumi vabaks vormiks, 3,4 kbar all ajas. Toodud spektrid on korrigeeritud baasjoonele. Graafikul 8a osal on näha, kuidas kaltsiumi vorm ajas väheneb ja kaltsiumi vaba vormi intensiivsus ajas kasvab. Antud katset on mõõdetud 43,5 tundi ning selle aja jooskul ei ole toimunud täielikku kaltsiumi vabanemist valgust. Samas esimene mõõdetud spekter (joonisel märgitud mustaga), sisaldab juba kaltsiumi vaba vormi. Erinevates katsetes sõltuvalt rakendatud rõhust, toimub kaltsiumi vabanemine kas kiirelt või aeglaselt. Sel viisil sõltuvalt katsest on spektrite alg- ja lõppkujud erinevad. Spektite lahutamist komponentideks on kirjeldatud peatükkis 3.4. Joonise 8b osas leitud diferentsiaalspektrid, kus kineetilise sõltuvuse esimene spekter on lahutatud igast järgnevast. Selle alusel saame me hinnata protsessi puhtust valgu alg- ja lõppsesundi intaktsuse kohta. Selle järgi võib öelda, et antud reeglina ei toimu katses olulist valgu denaturatsiooni, mille iseloomulikuks avaldumise piirkonnaks spektris on piirkond 760 – 780 nm juures. Ühe vormi üleminekut teiseks kirjeldab ka isopestiline punkt, mida kõik spektri jooned peavad läbima. Läbiviidud katsetes isopestiline punkt on küllalt hästi avaldunud.

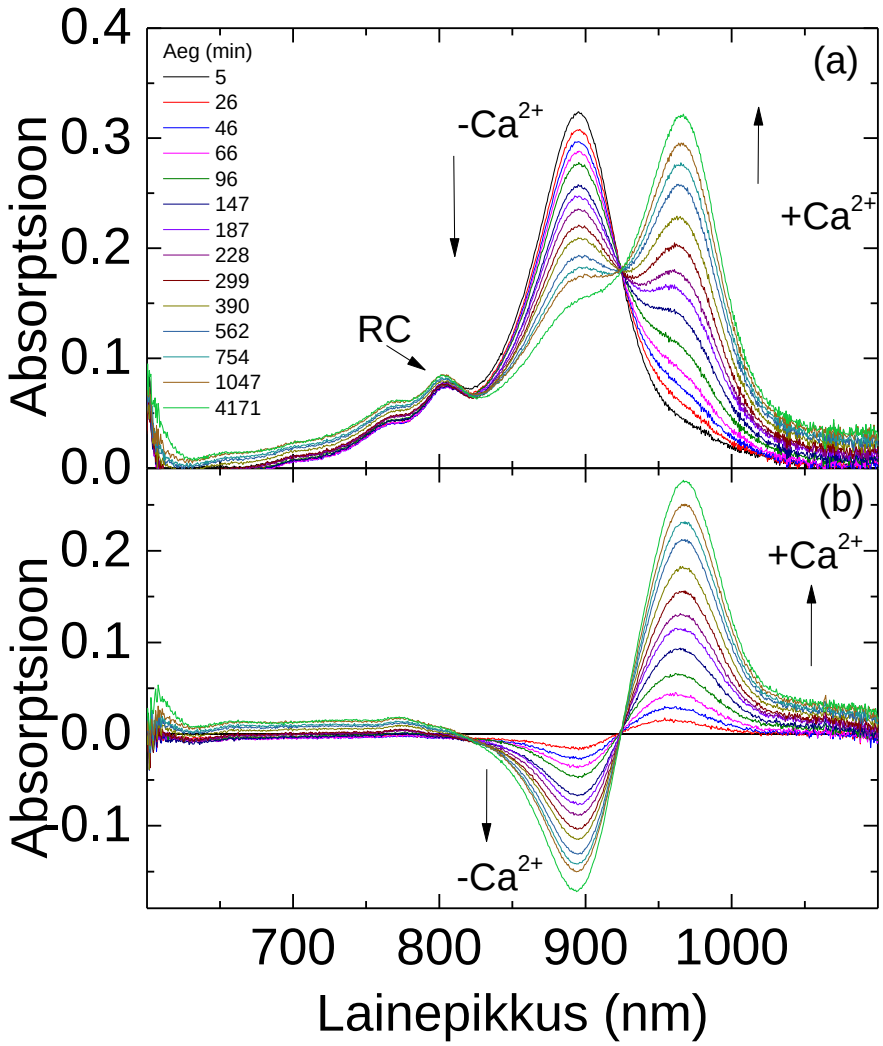


Joonis 8. *Trv.* tüvi 970 LH1-RC Ca^{2+}-iooni dissotsiatsioon 3,4 kbar kõrgrõhu all ajas ja selle diferentsiaalspekter (b), koos ühendatud legendiga joonise (a) osas.

3.3. Kaltsiumi assotsiatsioon madala rõhu all

Joonisel 9 on näide katsest, kus kaltsiumi vaba vorm assotsieerub kaltsiumi vormiks 0,6 kbar juures. Joonisel 9a toodud spektrid on korrigeeritud baasjoonele. Selles katses toimub erinevalt eelmises punktis toodud näitest, kaltsiumi vaba vormi vähenemine ja kaltsiumit sisaldava vormi taastumine. Antud näites joonistub välja vormide üleminekul moodustuv isopestiline punkt, kuid erinevates katsetes võib see protsess mingil määral varieeruda ja sisaldada mingeid vahevorm, milleks ilmselt võib olla valgu lagunemisel tekkiv dimeer ning rohkemal või vähemal määral esinev vaba BChl. Joonise 9b osas leitud diferentsiaalspektrite alusel läheb üks vorm üle teiseks. Joonisel on näha baasjoone nihe, mida oli raske korrigeerida ja see näitab, et rõhu vähendamisel

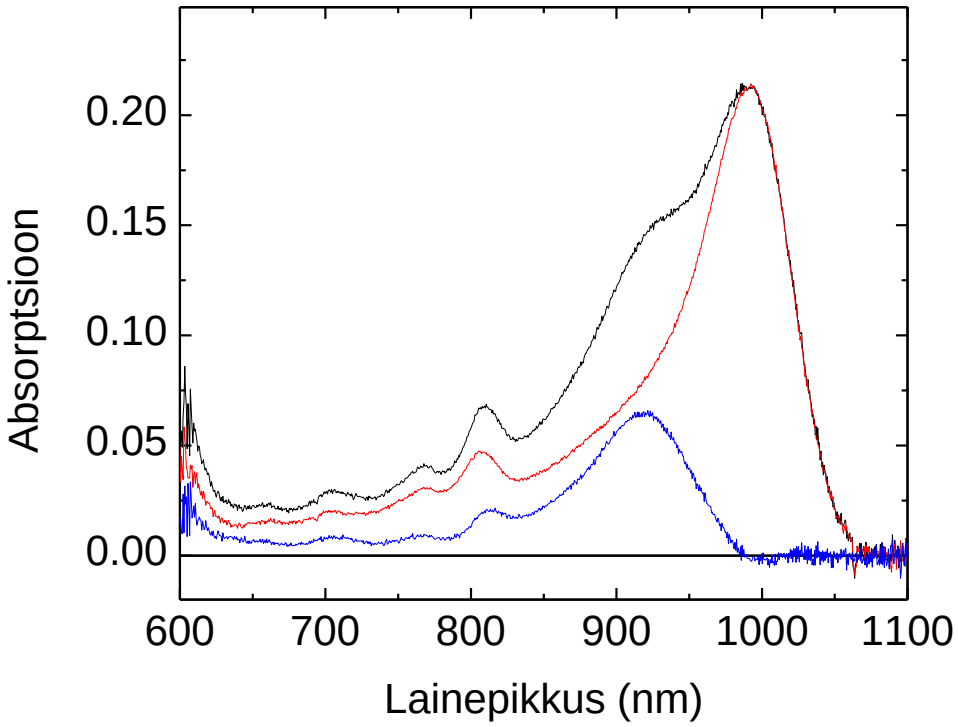
spektrite mõõtmise korrektsus väheneb, kuna mõõtesüsteem on väga tundlik objekti läbivale kiire teele. Arvestades spektri joonte intensiivsust, saab öelda, et rõhu vähenemisel objekti stabiilsus on häiritud ja objekt laguneb mingil määral. Lagunemise hulka on aga raske hinnata, siiski see ei ole nii suur, et see ei võimaldaks teostada katset ja enamus uurimise all olevatest valgu molekulidest säilitab oma intaktsuse. Imanishi et al poolt mõõdetud kaltsiumi sisenemist Trv. tüvi 970 LH1-RC valku näitab täielikku valgustruktuuri taastumist 100 mM kaltsiumi iooni juuresolekul. Tema andmetel on erinevate kahelaenguliste ioonide seostumine kõige stabiilsem ainult kaltsiumil. Imanishi et al,. 2019 poolt avaldatud kaltsiumi vormi tekkimine näitab, et pika aja jooksul, 5 ööpäeva, $+Ca^{2+}$ vorm on nihkunud kogu spektri ulatuses sinisemaks, kui esimese ööpäeva mõõtmised, mis näitab, et valgu $+Ca^{2+}$ vorm aja jooksul organiseerib ja stabiliseerib oma struktuuri. Sellist efekti esines ka meie katsetes (Imanishi *et al*., 2019).



Joonis 9. *Trv*. tüvi 970 LH-RC Ca^{2+}-iooni assotsiatsioon (a) 0,6 kbar rõhu all ajas ja selle diferentsiaalspekter (b), koos ühendatud legendiga joonise (a) osas.

3.4. Spektri jagamine komponentideks

Komponentideks jagamist on võimalik teha vaid tingimusel, et algne spekter ei sisalda produkti või lõppkomponent ei sisalda lähteainet või sisadlavad üht või teist komponenti vähesel määral. Sellise tingimusega on võimalik kasutada sõltuvuses mõõdetud esimest või viimast spektrit koponentide jaotamisel kui katse tingimused seda võimaldavad. Joonis näitab spekti jagamist kaltsiumi vormiks ja kaltsiumi vabaks vormiks. Kuna joonisel on selgesti näha, et kaltsiumi vaba vormi neeldumisspekter lõppeb ära enne kaltsiumiga vormi maksimum asukohta, toimub puhta vormi leidmine kaltsiumi vabale vormile.



Joonis 10. *Trv*. tüve 970 LH1-RC kompleksi katsetes mõõdetud spektrite jaotamine komponentideks. Mõõdetud spekter (must), lahutamiseks kasutatav spekter +Ca^{2+}-LH1-RC (punane) ning leitud -Ca^{2+}-LH1-RC spekter (sinine).

3.5. Ca^{2+} dissotsiatsioon ja assotsiastisoon *Trv*. tüvi 970 LH1 kompleksis

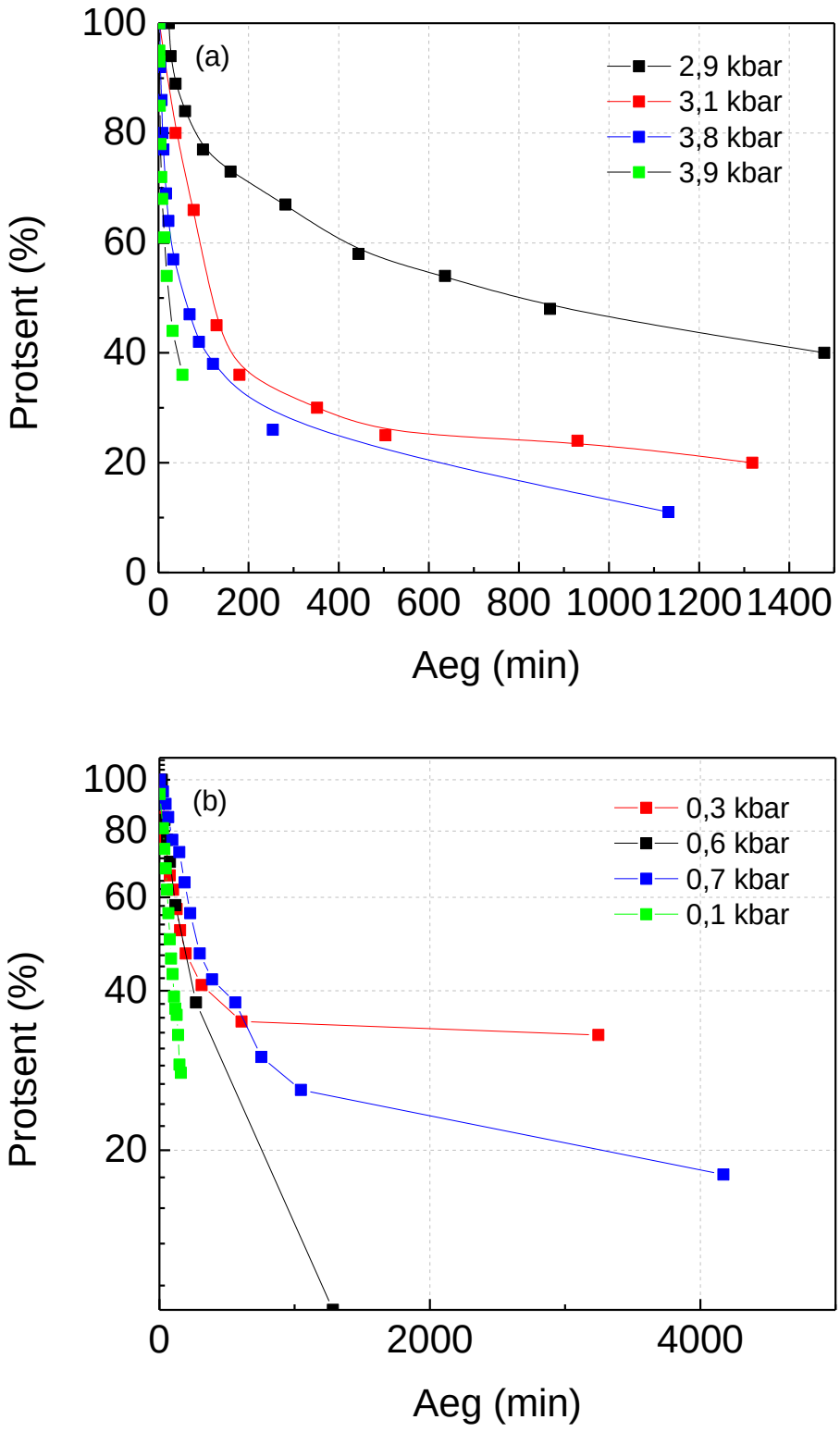
Joonisel 11 on toodud LH1-RC Ca^{2+}-ioonide dissotsiatsiooni ja assotsiatsiooni reaktsioonide toimumise kineetilised kõverad. Läbiviidud katsete alusel toimus Ca^{2+}-ioonide dissotsiatsioon alates 2,9 kbar-st ja kõrgemate rõhkude suunas toimus protsess aina kiirenevalt (joonis 11a), seega mida suuremat rõhku valgule avaldada, seda kiiremini jõuab protsess lõpuni. Alates 5 – 6 kbar on jõuab reaktsioon praktiliselt lõppu juba mõnekümne minutiga. Rakendades reaktsiooni järgu sõltuvusi Ca^{2+} dissotsiatsioonile, siis on vastav protsess keerulise iseloomuga. Siin võib hüpotiseerida sellest, et kuna Ca^{2+}-ioon paikneb valgu sisemuses, siis on tema väljumine seostumissaidist ruumiliselt takistatud. Teiseks võib-olla dissotsiatsiooni keerulise mehhanismi aluseks Ca^{2+}-ioonide seotus nelja ligandiga, millega mõne neist kordinatiivsetest sidemetest katkemine võib anda asendussideme valgu mõne teise hapniku rühmaga.

Ca^{2+}-ioonide reassotsiatsiooni mõõtmiseks tekitati Ca^{2+}-vaba vorm 6 kbar rõhu juures ja neis tingimustest rõhu vabastamisel kuni vahemikku, kus toimub reassotsiatsioon, vahemikus kuni 1

kbar. Reassotsiatsiooni reaktsiooni kineetilised kõverad on toodud joonisel 11b. Protsessi alguses toimub Ca^{2+} ioonide sisenemine LH1-te kiiresti ja sõltuvalt rõhust kiire protsessi ulatus kahaneb, hetkest toimub aeglustumine. Siin on näha, et 0,1 kbar rõhu väärtusel toimub reaktsioon lineaarsesõltuvusena ning on pseudo-0 järku reaktsioon (Ca^{2+}-ioonid seostuvad sõltumata kontsentratsioonist). 0,3 kbar juures toimuv Ca^{2+}-ioonide assotsiatsioon toimub II-järku reaktsioonina, kus kontsentratsiooni kajastav spektri osakaal protsendilises väärtuses on pöördvõrdelises sõtuvuses ajast. Ning nõrgematel rõhkudel toimub reassotsiatsioon keerulisema mehhanismi alusel. Kuna kõik mõõdetud sõltuvused on erineva iseloomuga, siis ei ole võimalik teha ühtset joonist. Kuid saadud informatsioon kirjeldab Ca^{2+}-seostumise iseloomu normaaltingimustel ja ilmselt ka bakteri sisemuses kiire ühtse protsessina Ca^{2+}-LH1-RC moodustumiseks.

Kirjanduses leidub vähe analoogseid töid, millega võrrelda saadud tulemusi. Midagi sarnast on uuritud kaseiini dissotsiatsioon mitsellist, millega on ka seotud kaltsiumfosfaat. Kuna tegu on lõssis oleva rasvatilgas sisalduvate kaseiini molekulidega, mis võiks olla sarnane analoog antud töös esitatud membraanse valguga. Kuid seal esinev kaltsium on fosfaadi ühendina ning selline laetud osake võib omada testsugust funktsiooni. Siiski uurimuses leitud rõhu vahemik mitselli katemiseks 2-3 kbar vahemikus, langeb hästi kokku meie saadud tulemustega (Orlien *et al*., 2006). Töö autorite hinnangul mängib kaltsium olulist rolli mitsellide tervilikuse ja dissotsiatsiooniprotsessis, kuid siiski mitselli dissotsiatsiooni mehhanism ja kaltsiumi roll selles ei ole veel teada (Orlien *et al*., 2010).

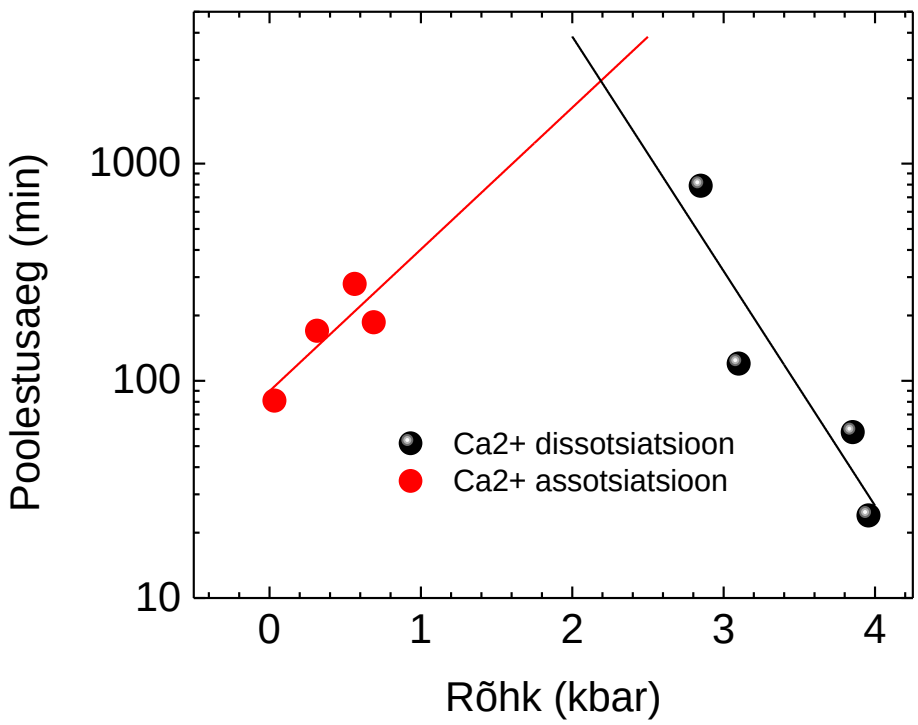
Kuigi kaltsiumi sisaldavaid valke esineb palju siis ilmselt sisemise anduri olemasolu puudumisel, mis aitaks jälgida kaltsumiga toimuvat, esineb harva. See tõttu on antud uurimustöös leitud hea võimalus jälgida kaltsiumi rolli struktuuris BChl a abil.



Joonis 11. *Trv.* tüvi 970 LH1 kompleksi kaltsiumi dissotsatsiooni (a) ja assotsiatsioon (b) kineetika (protsentides) erinevatel rõhu väärtustel. Mõõdetud punkte ühendavad jooned on toodud jälgimise hõlbustamiseks.

3.6. LH1-RC kompleksi poolestusaja sõltuvus rõhust

Teostatud eksperimentide alusel toimub Ca^{2+}-LH1-RC kompleksist Ca^{2+}-ioonide vabanemine 2,9 kbar-st kõrgema rõhul ja Ca^{2+}-ioonide sisenemine tagasi valku 1 kbar ümber. Läbi viidud katsete poolestusaegade (kui 50% Ca^{2+} on väljas, või sees, vastavalt reakstiooni suunast) andmete alusel on koostatud graafik (Joonis 12), mis kirjeldab päri- ja vastasuunaliste protsesside toimumise piirkondi rõhu skaalas. Antud tulemuste alusel peaks 2,2 kbar juures olema Ca^{2+} -ioonide seostumise ja dissotsiatsiooni kiirused võrdsed ja selle saavutamiseks kuluv aeg on 40 tundi. Parema ülevaate saamiseks on siiski vaja teha täiendavaid katseid ning kulutada rohkem aega kineetiliste kõverate mõõtmiseks. Kahjuks on selgunud, et vaatluse all oleva tasakaalureakstiooni korrektseks väljamõõtmiseks kulub osadel rõhuväärtustel väga kaua aega (mitmeid ööpäevi).



Joonis 12. Poolestusaja sõltuvus rõhust. Jooned tähistavad mõõtmisandmete lineaarset lähendust. Vertikaaltelg on esitatud logaritmilises skaalas. Lähendusjoonte lõikumispunkt ~2.2 kbar juures tähistab kriitilist rõhku, mille ületamisel rõhu tõstmise käigus (alustades algseisust +Ca^{2+}-RC-LH1) algab valgu denaturatsioon ja rõhu alandamisel käigus (alustades algseisust -Ca^{2+}-RC-LH1) järgneb valgu renaturatsioon.

Tulemused näitavad, et põhimõtteliselt on Ca^{2+}-ioonide dissotsiatsiooni-assotsiatsiooni reaktsioon pärast rõhuga valgu struktuuri mõjutamist pöörduv ja kuigi LH1-RC kompleks erinevates katsetes käitus veidi erinevalt valgu stabiilsuse suhtes, siis jääb siin küsimus, kas need erinevused on tingitud otseselt rõhu poolt valgule tekitatud deformatsioonidest, või on see tingitud tasakaalureaktsiooni mehhanismide erinevusest erinevatel rõhkudel.

KOKKUVÕTE

Purpurbakterid on vanimad fotosünteesivad organismid Maal. Nende fotosünteesiv aparaat ja fotosünteesi protsessid on seni avastatud organismidest kõige lihtsamad, mis teeb neist tänuväärsed kandidaadid erinevate uuringute läbiviimiseks. Antud töö kuulub membraanvalkude biofüüsika valdkonda.

Töö eesmärgiks oli uurida *Thiorhodovibrio* tüvi 970 valgust koguva kompleksi I (LH1) stabiilsust kõrge hüdrostaatilise rõhu tingimustes. Uurimismeetodina kasutati valguomase optilise markeri (milleks oli bakterklorofüll-a pigment-kromofoor) neeldumisspektroskoopiat. Konkreetselt uuriti rõhu mõju LH1 kompleksiga seotud kaltsiumi ioonide (Ca^{2+}) dissotsiatsiooni- ja assotsiatsiooniprotsessidele.

Ca^{2+} dissotsiatsiooniprotsesse jälgiti rõhkude vahemikus 2.8-4.0 kbar ja assotsiatsiooniprotsesse vahemikus 0.1-0.7 kbar. Mõlemad protsessid on heas lähenduses kirjeldatavad eksponentsiaalne sõltuvusena rõhust, kuigi kvalitatiivselt erineva tõusuga. Dissotsiatsioon rõhu kasvades kiireneb, samal ajal kui assotsiatsioon rõhu suurenedes hoopis aeglustub. Kuigi dissotsiatsiooni-assotsiatsiooni kineetikad on keerulise iseloomuga, võib protsesside poolestusaegadest lähtudes rääkida kriitilisest (faasiülemineku) rõhust 2.2 kbar, mille ületamisel rõhu tõstmise käigus algab valgu denaturatsioon ja rõhu alandamisel käigus järgneb valgu renaturatsioon.

Töö pealkirjas püstitatud küsimusele vastates tuleb tõdeda, et antud valgus ei ole denatureerimis-renatureerisprotsessid termodünaamilises mõttes pööratavad. Lõplike järelduste tegemine nõuab täiendavaid katseid ja kvaliteetsemat kvantitatiivset analüüsi.

Study on reversibility of denaturation due to pressure of membrane proteins

Laura Hitrova

Summary

Purple bacteria are the oldest photosynthetic organisms on Earth. Their photosynthetic apparatus and photosynthetic processes are the simplest of the organisms discovered to date, making them admirable candidates for a variety of studies. This work belongs to the field of membrane protein biophysics.

The aim of this study was to investigate the stability of *Thiorhodovibrio* strain 970 protein-collecting complex I (LH1) under high hydrostatic pressure. Absorption spectroscopy of a protein-specific optical marker (bacteriochlorophyll-a pigment chromophore) was used as the research method. In particular, the effect of pressure on the dissociation and association processes of calcium ions (Ca^{2+}) bound to the LH1 complex was studied.

Ca^{2+} dissociation processes were monitored at pressures in the range of 2.8 - 4.0 kbar and association processes in the range of 0.1 - 0.7 kbar. Both processes can be described in a good approximation as an exponential dependence of pressure, albeit with qualitatively different increases. The dissociation accelerates as the pressure increases, while the association slows down as the pressure increases. Although the kinetics of dissociation-association are complex, the critical half-life pressure of 2.2 kbar can be considered as the half-life of the process, above which denaturation of the protein begins, and renaturation of the protein follows.

In answer to the question posed in the title of the work, it should be noted that the denaturing-renaturing processes in this light are not thermodynamically reversible. Drawing definitive conclusions requires further experimentation and better quantitative analysis.

KASUTATUD KIRJANDUS

Kangur, L., Timpmann, K., & Freiberg, A. (2008). Stability of Integral Membrane Proteins under High Hydrostatic Pressure: The LH2 and LH3 Antenna Pigment- Protein Complexes from Photosynthetic Bacteria. *The Journal of Physical Chemistry B*, *112*(26), 7948–7955.

DOI: https://doi.org/10.1021/jp801943w (30.09.2021)

Lichtenthaler, H. K., & Babani, F. (2004). Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. In *Chlorophyll a fluorescence*. Springer.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_28 (30.09.2021)

von HEIJNE, G., & GAVEL, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *European Journal of Biochemistry*, *174*(4), 671–678.

DOI: https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14150.x (30.09.2021)

Imanishi, M., Takenouchi, M., Takaichi, S., Nakagawa, S., Saga, Y., Takenaka, S., Madigan, M. T., Overmann, J., Wang-Otomo, Z.-Y., & Kimura, Y. (2019). A dual role for Ca2+ in expanding the spectral diversity and stability of light-harvesting 1 reaction center photocomplexes of purple phototrophic bacteria. *Biochemistry*, *58*(25), 2844–2852.

DOI: https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00351 (11.05.2022)

Madigan, M. T., & Jung, D. O. (2009). An overview of purple bacteria: Systematics, physiology, and habitats. *The Purple Phototrophic Bacteria*, 155-179.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_1 (09.05.2022)

Hu, X., Ritz, T., Damjanović, A., Autenrieth, F., & Schulten, K. (2002). Photosynthetic apparatus of purple bacteria. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *35*(1), 1–62.

DOI: https://doi.org/10.1017/S0033583501003754 (16.05.2022)

Kotecha, A., Georgiou, T., & Papiz, M. Z. (2013). Evolution of low-light adapted peripheral light-harvesting complexes in strains of Rhodopseudomonas palustris. *Photosynthesis Research*, *114*(3), 155–164.

DOI: https://doi.org/10.1007/s11120-012-9791-0 (16.05.2022)

Permentier, H. P., Neerken, S., Overmann, J., & Amesz, J. (2001). A bacteriochlorophyll a antenna complex from purple bacteria absorbing at 963 nm. *Biochemistry*, *40*(18), 5573–5578.

DOI: https://doi.org/10.1021/bi0024308 (16.05.2022)

Daniel, I., Oger, P., & Winter, R. (2006). Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chemical Society Reviews*, *35*(10), 858–875.

DOI: https://doi.org/10.1039/B517766A (23.05.2022)

Hu, X., & Schulten, K. (1998). Model for the light-harvesting complex I (B875) of Rhodobacter sphaeroides. *Biophysical Journal*, *75*(2), 683–694.

DOI: https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77558-7 (23.05.2022)

Tani, K., Kanno, R., Makino, Y., Hall, M., Takenouchi, M., Imanishi, M., Yu, L.-J., Overmann, J., Madigan, M. T., Kimura, Y., & others. (2020). Cryo-EM structure of a Ca2+-bound photosynthetic LH1-RC complex containing multiple αβ-polypeptides. *Nature Communications*, *11*(1), 1–9.

DOI: https://doi.org/10.2210/pdb7C9R/pdb (23.05.2022)

Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., & Beatty, J. T. (2009). *The purple phototrophic bacteria* (Vol. 28). Springer.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5 (23.05.2022)

Jones, M. (2009). Bacterial photosynthesis. *Photobiological Sciences Online, American Society for Photobiology*.

Madigan, M. T., & Jung, D. O. (2009). An overview of purple bacteria: Systematics, physiology, and habitats. *The Purple Phototrophic Bacteria*, 1–15.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5 (23.05.2022)

Winter, R., & Dzwolak, W. (2005). Exploring the temperature–pressure configurational landscape of biomolecules: From lipid membranes to proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *363*(1827), 537–563.

DOI: https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1507 (23.05.2022)

Beekman, L. M., Steffen, M., van Stokkum, I. H., Olsen, J. D., Hunter, C. N., Boxer, S. G., & van Grondelle, R. (1997). Characterization of the light-harvesting antennas of photosynthetic purple bacteria by stark spectroscopy. 1. LH1 antenna complex and the B820 subunit from Rhodospirillum rubrum. *The Journal of Physical Chemistry B*, *101*(37), 7284–7292.

DOI: https://doi.org/10.1021/jp963445b (24.05.2022)

Timpmann, K., Rätsep, M., Hunter, C. N., & Freiberg, A. (2004). Emitting excitonic polaron states in core LH1 and peripheral LH2 bacterial light-harvesting complexes. *The Journal of Physical Chemistry B*, *108*(29), 10581–10588.

DOI: https://doi.org/10.1021/jp049165a (24.05.2022)

Orlien, V., Boserup, L., & Olsen, K. (2010). Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatment: Effects of pressure, pH, and temperature. *Journal of Dairy Science*, *93*(1), 12–18.

DOI: https://doi.org/10.3168/jds.2009-2244 (24.05.2022)

Ermler, U., Michel, H., & Schiffer, M. (1994). Structure and function of the photosynthetic reaction center fromRhodobacter sphaeroides. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *26*(1), 5–15.

DOI: https://doi.org/10.1007/BF00763216 (25.05.2022)

Bridgman, P. (2013). The coagulation of albumen by pressure. In *Volume II Collected Experimental Papers, Volume II* (pp. 735–736). Harvard University Press.

DOI: https://doi.org/10.4159/harvard.9780674287808.c8 (25.05.2022)

Jaiswal, J. (2001). Calcium—How and why? *Journal of Biosciences*, *26*(3), 357–363.

DOI: https://doi.org/10.1007/BF02703745 (25.05.2022)

Meersman, F., Daniel, I., Bartlett, D. H., Winter, R., Hazael, R., & McMillan, P. F. (2013). High-pressure biochemistry and biophysics. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, *75*(1), 607–648.

Orlien, V., Knudsen, J. C., Colon, M., & Skibsted, L. H. (2006). Dynamics of casein micelles in skim milk during and after high pressure treatment. *Food Chemistry*, *98*(3), 513–521.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.082 (25.05.2022)

Permentier, H. P., Neerken, S., Overmann, J., & Amesz, J. (2001). A bacteriochlorophyll a antenna complex from purple bacteria absorbing at 963 nm. *Biochemistry*, *40*(18), 5573–5578.

DOI: https://doi.org/10.1021/bi0024308 (25.05.2022)

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Taxonomy browser (Thiorhodovibrio sp. 970) (nih.gov) (09.05.2022)

Summary of Thiorhodovibrio sp. 970, version 26.0 (biocyc.org) (09.05.2022)

https://www.rcsb.org/ (24.05.2022)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Hitrova,

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

„Membraanvalkude rõhust tingitud denatureerimise pööratavus“,

mille juhendajad on Liina Kangur, Arvi Freiberg,

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

2. 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.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Laura Hitrova
02.06.2022