

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
Füüsika Instituut

Mikk Sarapuu

BAKTERIAALSETE REAKTSIOONITSENTRITE FLUORESTSENSSI
SPEKTROSKOOPIA KÕRGETE RÕHKUDE TINGIMUSTEL

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja:
Kõu Timpmann, füüs.-mat. teaduste kand.

Tartu 2015

Sisukord

Sissejuhatus	4
1. Valdkonna ülevaade	5
1.1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	5
1.2. Fotosünteesiline ühik	5
1.3. Reaktsioonitsentri struktuur	6
1.3.1. Reaktsioonitsentri valgud	6
1.3.2. Kofaktorid	7
1.3.3. Kofaktorite funktsionaalsed erisused	8
1.3.4. <i>Rb. sphaeroides</i> 'e RC mutant MY210W	10
1.4. Valgud kõrge rõhu tingimustes	10
1.5. Kõrge rõhu eelised.....	11
1.6. Elu kõrge hüdrostaatilise rõhu tingimustes	11
2. Eksperiment	13
2.1. Proov ja rõhurakk	13
2.2. Optilised süsteemid	13
2.3. Andmete töötlemine	15
3. Mõõtmistulemused ja analüüs	18
3.1. Statsionaarsed kiirgusspektrid	18
3.1.1. mMY210W kiirgusspekter.....	18
3.1.2. iMY210W kiirgusspekter.....	19
3.1.3. Kiirgusriba maksimumide nihked ja nihkekiirused	20
3.1.4. Kromovalkude renaturatsioon	22
3.2. Esmase elektronsiirde kineetika	23
Kokkuvõte	27
Tänuavaldused	28

Fluorescence spectroscopy of bacterial reaction centres at high pressure conditions	29
Kasutatud kirjandus	30

Sissejuhatus

Fotosünteesi esmaseid protsesse teostavad kaks fundamentaalselt erinevat tüüpi fotosünteesilises membraanis paiknevat pigment-valgukompleksi: valgustkoguvad antennid ja reaktsioonitsentrid (RC). Päikese valgusenergia neeldub antenni molekulides, mille järel ergastuse energia transporditakse RC-sse, kus toimub elektroni siirete tulemusena valgusenergia konverteerimine elektrostaatiliseks potentsiaalseks energiaks, mida fotosünteesilised organismid kasutavad keemilise energia tootmiseks. Pigmentvalkude ehk kromovalkude struktuur ja funktsionaalsed omadused sõltuvad ümbriseva keskkonna omadustest. Kuna RC-de ehituslik spetsiifika on põhjalikult uuritud ja dokumenteeritud, siis edasiste uuringute motivatsioon on leida, milliseid muutusi RC-s kutsuvad esile erinevad välised mõjutused. Käesolevas bakalaureusetöös mõõdetakse kõrgete hüdrostaatiliste rõhkude all purpurbakteri *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides*'e sihipäraselt muteeritud RC-de kiirgusspektreid ja kiirguse eluigasid ning põhieesmärgiks on uurida, kuidas muutub RCs laengute eraldumise dünaamika sõltuvalt välisest rõhust.

Töö koosneb kolmest peatükist. Esimeses peatükis tutvustatakse fotosünteesi uuringutes tihti mudelorganismina kasutatavat purpurbakterit *Rb. sphaeroides*'t. Samuti kirjeldatakse lühidalt fotosünteesilise ühiku (PSU) ja antennide ehitust ja ülesandeid. Seejärel tuuakse välja RC struktuurid ja funktsionaalsed erisused. Peatüki lõpus selgitatakse, milline on kõrge rõhu mõju valkudele ja loetletakse rõhu-uuringute eesmärgid ja eelised.

Teises peatükis kirjeldatakse katseobjekti ning antakse ülevaade eksperimendi ülesehitusest ja katseseadmetest, millega mõõdeti hüdrostaatilist rõhku, RC statsionaarset kiirgusspektrit ja RC vastavate pigmendimolekulide (spetsiaalse paari) fluorestsentsi kustumiskineetikat. Seejärel antakse ülevaade andmete töötlustest.

Kolmas peatükk jaguneb kaheks alapeatükiks. Esimeses alapeatükis esitatakse membraansete ja isoleeritud RC mutantide kiirgusspektrid erinevatel rõhkudel. Peamiselt pööratakse tähelepanu kromofoori spetsiaalse paari kiirgusriba muutustele ning võrreldakse kahe mutandi mõõtmisel saadud erinevusi. Teises alapeatükis antakse ülevaade spetsiaalse paari kiirguse kustumiskineetika ehk eluea mõõtmistulemustest erinevatel rõhkudel. Katseobjektiks oli ainult isoleeritud RC mutante sisaldav proov. Lõpuks on töö põhitulemused kokku võetud.

1. Valdkonna ülevaade

1.1. *Rhodobacter sphaeroides*

Rb. sphaeroides on purpurne mitteväävlibakter, mis tänu füsioloogilisele mitmekülgsele on olnud fotosünteesi uurimise mudelobjektiks üle 70 aasta. Samuti on *Rb. sphaeroides*'e reaktsioonitsentrid enim uuritud omasuguste seas. Purpurbakterid on anaeroobsed fotosünteesivad organismid, mis elavad veekogu hapnikuvaestes kihtides ning nende fotosünteetiline aparaat intratsütoplasmaatilises membraanis on oluliselt lihtsam kui kõrgematel fototroofidel [1, 2, 3]. Purpurbakterid kasutavad fotosünteesiks rohelist ja lähi-infrapunast valgust ($\lambda > 750$ nm), sest nendeni jõudev valgus on kõrgemates, valgusrikkamates veekihtides paiknevate fototroofide poolt filtreeritud. Filtreerimine seisneb selles, et aeroobsed fototroofid neelavad sinise ja punase ($\lambda < 750$ nm) valguse, sest fotosüntees kõrgemates fototroofides (rohelised taimed ja vetikad) toimub just nendel lainepikkustel. Kui aeroobse fotosünteesi puhul kasutab organism oksüdeeritud klorofüllid redutseerimiseks veemolekuli, siis anaeroobses fotosünteesis täidab sama ülesannet vesinik. Fotosüntees purpurbakterites on võimalik, kuna nad sisaldavad pigmente bakteriklorofüll (BChl) ja karotenoid (Car), kus BChl neelab lähi-infrapunast ja Car rohelist valgust. *Rb. sphaeroides* sisaldab bakteriklorofüllid BChl *a* [4].

1.2. Fotosünteetiline ühik

Fotosünteetiline ühik on assotsiatsioon fundamentaalselt erinevate pigment-valgukomplekside vahel, mis asuvad organiseeritult intratsütoplasmaatilises fotosünteetilises membraanis. Pigment-valgukompleksideks on reaktsioonitsentrid ja valgust koguvad kompleksid I ja II (vastavalt LH1 ja LH2, ingl *light harvesting complex*). Viimastes toimub valguse energia neeldumine ja transportimine RC-sse.

LH1-d ja LH2-d moodustavad antennid, mis suurendavad valguse neeldumise ristlõike pindala ja laiendavad neelatavate footonite spektraalvahemikku. LH1 ja LH2 komplekside ehitus on üldjoontes sarnane – ringikujuliselt sümmeetriliselt asetsevad heterodimeerid ja nendega mittekovalentselt seotud BChl *a* ning karotenoidi molekulid moodustavad silindrikujulise kompleksi. LH1-d ümbritsevad otseselt reaktsioonitsentreid, aga LH2-del otseühendus RC-dega puudub ning energia kantakse

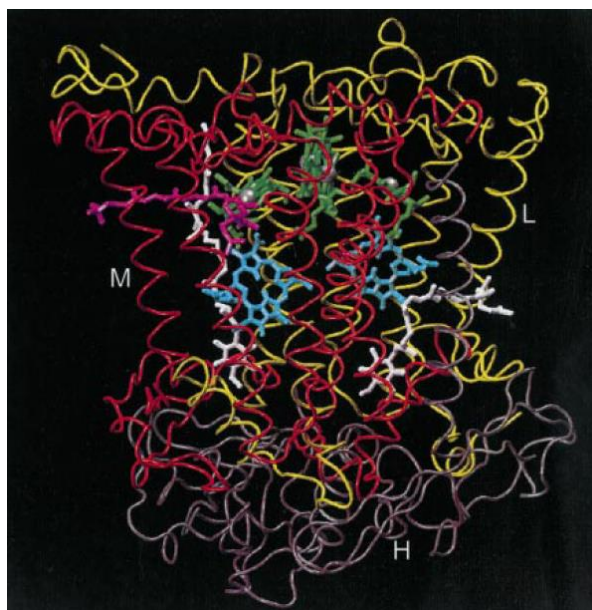
esmalt LH1-le, mis omakorda kannab selle RC-sse. Spektroskoopilised mõõtmised ja mudelarvutused on näidanud, et ergastusenergia kandub LH2-lt LH2-le, LH2-lt LH1-le ja LH1-lt RC-sse vastavalt *ca* 10 ps, 3-4 ps ja 14-15 ps jooksul. Valguse neeldumisest kuni elektroniergastuse RC-sse jõudmiseks kulub olenevalt PSU ülesehitusest ligikaudu 60-200 ps [3, 4, 5].

1.3. Reaktsioonitsentri struktuur

Fotosünteesiva bakteri RC on membraanisine valkude kompleks, mis sisaldab fotokeemilisi protsesse teostavaid kofaktoreid [6]. Reaktsioonitsentri ülesandeks on valgusenergia konverteerimine laengute eraldamise protsessi kaudu elektrostaatiliselt potentsiaalseks energiaks [8], mida bakterid omakorda kasutavad elutähtsa keemilise energia tootmiseks, mis talletatakse ühendites ATP ja NADP [7].

1.3.1. Reaktsioonitsentri valgud

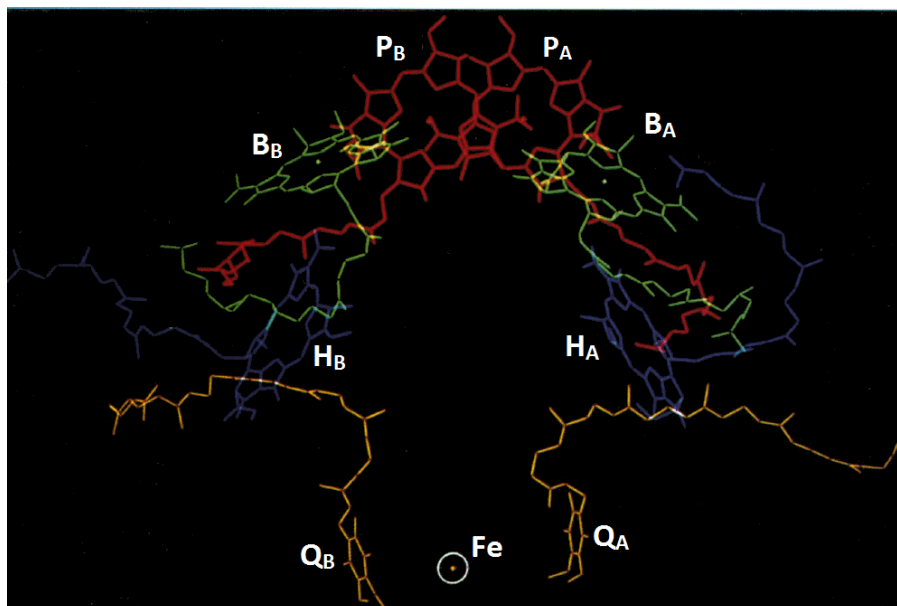
Rb. sphaeroides'e reaktsioonitsentri fotosünteesiline osa koosneb kolmest hüdrofoobsest valgualamüksusest nimetustega L (ingl *light*), M (*medium*) ja H (*heavy*) (Joonis 1). Reeglina on bakterite fotosünteesilise RC osaga perifeerselt seotud ka neljas alamüksus – tsütokroom C (*cytochrome*), kuid *Rb. sphaeroides*'l see puudub [3, 9]. Valgud moodustavad RC-d ümbritseva kihi ning määravad RC positsiooni membraanis. Ringsümmeetrilisel paiknevad L- ja M-alamüksused koosnevad mõlemad viiest läbi membraani ulatuvast α -heeliksist. Enamus heeliksistest on sirged, kuid mõned on ka ositi kõverdnud. Heeliksiste spetsiifilised asendid tagavad L- ja M-üksuse põimumise, et moodustuks terviklik L-M kompleks. Keraja põhiosaga alamüksus H koosneb ainult ühest heeliksist ja on L-M-ga ligikaudu risti. L-M kompleksi tsütoplasmaatiline pool ja fH-alamüksus moodustavad omavahel palju sidemeid, mis tagavad RC tervikliku stabiilsuse. RC valgulise struktuuri muutus või mingi alamüksuse puudumine mõjutab oluliselt pigmentimolekulide funktsioone [6]. See tähendab, et reaktsioonitsentrite mõõtmiste käigus ei tohi seda erinevateks osadeks lõhkuda, mis muudab uurimise väga komplitseerituks.



Joonis 1. *Rb. sphaeroides*-i RC struktuur. RC valkude L-, M,- ja H-alamüksused on vastavalt kollast, punast ja halli värvi. Alamüksuste vahel paikneb pigmendimolekul. Allikas: [3].

1.3.2. Kofaktorid

Valgukompleksi sees L- ja M-alamüksustega vesiniksidemete kaudu seotud RC pigmendimolekulid (Joonis 2) paiknevad struktuurina, mis koosneb kahest sümmeetrilisest harust (A, B). *Rb. sphaeroides* korral ühendab harusid dimeerne BChl *a* molekulide paar (P_A, P_B) (nn spetsiaalne paar). Kummaski harus asub spetsiaalse paari vahetus läheduses üks monomeerne BChl *a* molekul (B_A, B_B), üks bakterfeofütiini (BPhe) molekul (H_A, H_B) ja üks ubikinooni molekul (Q_A, Q_B). Lisaks asub kinoonide Q_A ja Q_B vahel (mõnevõrra Q_B -le lähemal) raua-aatom [3, 10, 11]. BChl dimeer asub membraanis periplasmaatilisel poolel ning kaks pigmendiharu ulatuvad läbi valgustruktuuri membraani tsütoplasmaatilisele poolele. BChl *a* dimeeri ja Fe aatomit ühendav sirge on ligilähedane harude sümmeetriateljele. Sümmeetriatelje vasakut ja paremat poolt kutsutakse seoses erineva valguümbrusega vastavalt L ja M küljeks [8]. Teiste purpurbakterite, nagu näiteks *Rps. viridis*, pigmentide ülesehitus on põhimõtteliselt sama, kuid võib sisaldada teisi bakterklorofüllü tüüpe (*Rps. viridis* pigmentides on BChl *b*) ning samuti erinevad kofaktorite vahelised kaugused ja nurgad [12].



Joonis 2. *Rb. sphaeroides*'e RC pigmendimolekulide struktuur. Dimeerne BChl *a* (spetsiaalne paar) (P_A, P_B) on värvitud punaseks, monomeersed BChl *a* molekulid (B_A, B_B) rohelisteks, BPhe molekulid (H_A, H_B) siniseks ja ubikinooni molekulid (Q_A, Q_B) kollaseks. Samuti on joonisel välja toodud raua-aatom, mis koos dimeeri keskpunktiga moodustab pigmendimolekuli sümmeetriatelje. Allikas: mugandatud joonis viitest [12].

1.3.3. Kofaktorite funktsionaalsed erisused

Röntgenkristallograafia analüüsid ja spektroskoopilised mõõtmised näitavad, et elektronide kulg fotosünteesilises bakteris on tsükliline protsess ning lisaks RC-le osalevad selles liikuv kinoonivõre, tsütokroomi bc_1 oksiidoreduktaas ning vaba tsütokroomi molekul c [3].

RC-i BChl *a* dimeeris neeldunud valguskvant viib dimeeri ergastatud seisundisse, mille järel eraldub spetsiaalsest paarist elektron – toimub spetsiaalse paari fotooksüdeerumine. (Termin „spetsiaalne“ tuleb sellest, et BChl *a* dimeer omab vaba elektroni ning on esmane elektroni doonor [3, 12].) Seejärel liigub elektron 2-3 ps jooksul mööda L-poolset haru B_A kaudu H_A -le. BPhe loovutab elektroni 200 ps jooksul Q_A -le, kust omakorda 200 μ s jooksul kulgeb elektron Q_B molekulile, muutes selle semikinooni radikaaliks. Samal ajal loovutab membraanis periplasmaatilisel poolel asuv tsütokroom c_2 BChl *a* dimeerile elektroni, mille tulemusena viimane neutraliseerub. Ka järgmise footoni neeldumise korral dimeeris jõuab elektron sama teed mööda Q_B -sse. Kuna ubikinoon Q_B omab nüüd kahte üleliigset elektroni, liituvad Q_B -ga membraani tsütoplasmaatilisel poolelt pärit kaks prootonit ning kinoonist saab kinool (H_2Q_B). H_2Q_B

molekul lahkeb RC-st ja ühineb liikuva kinoonivõrgustikuga ning elektroni ülekanne lõppeb kinooli oksüdatsiooniga tsütokroomi bc_1 oksiidoreduktaasi poolt. Viimase käigus vabastakse periplasmaatilisse ruumi kaks prootonit ja moodustub redutseeritud tsütokroom c_2 . Membraani välis- ja sisepinna vahel tekkinud prootongradiendi toimel sünteesitakse ATP molekul [3]. Oluline on rõhutada, et elektroni ülekanne toimub ainult mööda haru A. Viimane võib olla tingitud asümmeetrilistest interaktsioonist kromofoori harude ja valkude vahel (erinevad vesiniksidemed) ning pigmendimolekulide vahekauguste erinevusest [13].

Kinooli H_2Q_B (või Q_B^{2-}) vabanemise järel liitub RC-ga neutraalne eksogeenne kinoon. Q_B^{2-} lahkumine ei põhjusta RC struktuuri muutumist, kuid kinooni Q_A lahkumise korral see ei kehtiks. Üks meetod, kuidas H_2Q_B RC-st vabaneb, seisneb mooduses, et H_2Q_B ja RC vahele lisanduvad uued vesiniksidemed, mis vähendavad RC ja kinooli vahelist tõmbejõudu. Teine võimalus on, et Q_B^{2-} vabaneb elektrostaatiliste jõudude mõjul juba enne prootonitega liitumist [11].

BChl dimeeri ergastatud seisundi ja põhiseisundi potentsiaalide vahest sõltub, milline on neeldumisspektri asend. Näiteks BChl b korral on potentsiaalide vahe väiksem kui BChl a korral, mis tähendab, et BChl b dimeeri ergastamiseks läheb vaja vähem energiat ehk neeldunud valguse spektripiirkond on mõnevõrra suuremate lainepikkuste väärtustega. Potentsiaalide vahet võib täpsemalt vaadata kui dimeeri selle punkti potentsiaali väärtust, kus toimub oksüdatsioon. Potentsiaali väärtus sõltub vesiniksidemete arvust kromofoori (dimeeri karboksüülrühmade) ja aminohappejääkide vahel, mis moodustavad valgud. Näiteks tähendab purpurbakterite korral ühe sideme katkemine $\sim 0,1$ V suurust potentsiaali langust, aga kolme sideme lisandumisel potentsiaal tõuseb kuni $0,25$ V võrra [7]. Vesiniksidemete arv on tingitud valgu konformatsioonilisest muutusest, mis võib muuta kromofoori deformatsiooni, mille tulemusena muutub molekulisisene võnkumiste spekter [8].

Reaktsioonitsentrite struktuuri ja talitluste uurimise muudavad keeruliseks tugevad interaktsioonid elektroni doonorite ja aktseptorite vahel ning neid ümbritseva valgulise struktuuri olemasolu tähtsus. RC-s toimuva paremaks mõistmiseks on oluline leida võimalikud seaduspärasused doonorite ja proteiinide vahel [7].

1.3.4. *Rb. sphaeroides*'e RC mutant MY210W

Nagu eelmises alapeatükis märgitud toimub nn WT (ingl *wild type*) *Rb. sphaeroides*'e RC doonoris esmane laengute eraldumine 2-3 ps jooksul. Elektroni ülekannete efektiivsus sõltub kofaktorite läheduses paiknevate aminohappejääkide tüübist. Oluline roll esmasel elektroni ülekandel doonorilt BPhe-le on türosiinil (Tyr) MY210, mis kuulub küll M-alamüksusesse, kuid asub see siiski L-alamüksuse poolse haru läheduses P_A ja H_A vahel. Haru B asub P_B ja H_B vahel L-alamüksusega seotud fenüülalaniin (Phe) L181.

Rohelises mittesulfurbakteris *Chloroflexus aurantiacus* on türosiini asemel leutsiin (Leu), mille tulemusena kestab laengute eraldamine kaks korda kauem. Sellest ajendatuna on eksperimentide lihtsustamise huvides otsitud viise, kuidas pikendada teiste fotosünteesiliste bakterite doonorite eluiga. Selgub, et kui asendada Tyr MY210 trüptofaaniga (Trp), pikeneb doonori eluiga mitukümmend pikosekundit. Sealjuures on muutused RC struktuuris väga väikesed. Sellist RC mutatsiooni, kus Tyr MY210 on asendatud Trp-ga, tähistatakse kombinatsiooniga MY210W [14, 15].

1.4. Valgud kõrge rõhu tingimustes

Multimeersed valgud on rakus ühed kõige rõhutundlikumad makromolekulid. Kõrge hüdrostaatilise rõhu toimel muutub valkude ruumala, mis kutsub esile muutused valgu struktuuris ja funktsioonis [16]. Rõhu mõju valkude denaturatsioonile oleneb valgu struktuuri omadustest ning üldiselt on rõhu mõju füüsikalises-keemilises protsessis määratud valgu ruumala muutusega ΔV (reaktsiooni- ja aktivatsiooniruumala vahe). Normaalarõhust kuni 10 kbar-ni saab rõhu tõstmisega süsteemis kontrollitult muuta biomolekulide tertsaar- ja kvaternaarstruktuuris mittekovalentseid sidemeid ning niisuguses vahemikus ei katke ega muutu molekulisisesed kovalentsed sidemed. Primaarse ja sekundaarse struktuuri muutused toimuvad kõrgematel rõhu väärtusel kui 10 kbar. Oligomeersete proteiinide dissotsiatsioon võib juba toimuda madalamatel rõhkudel kui 3 kbar [17].

Valgud on 5-10 korda vähem kokkusurutavamad kui vesi, mis tähendab, et rõhust tingitud ruumala muutus on väiksem kui 1%. [18]. Rõhu all toimuvad reaktsioonid alluvad Le Châtelier' printsiibile, mille kohaselt on süsteemi tasakaal vastassuunaline välise teguri muutusega ehk antud juhul muutub rõhu rakendamisel valgu tasakaal koos

vastavate protsessidega nii, et valgu ruumala oleks väiksem [19]. On teada, et raku tsütoplasma sisaldab erinevaid soolasisid, suhkruid ja teisi ühendeid, mille roll on hoida kõrge rõhu all oleva tsütoplasmaatilise valgu stabiilsust ja konformatsiooni [18].

1.5. Kõrge rõhu eelised

Tavaliselt kasutatakse proteiinide denaturatsiooni uurimiseks kõrget temperatuuri või kõrge kontsentratsiooniga denaturante nagu guanidiinhüdrokloriid või urea. Need meetodid denatureerivad valgu täielikult. Seevastu on rõhk nõrga denatureeriva toimega, mis tähendab, et kõrge rõhu toimel hävivad kõrgemat järku struktuurid, kuid sekundaarstruktuur säilib. Samuti pole atmosfäärirõhul erinevate temperatuuridega mõõtmisel võimalik eristada biokeemilises süsteemis soojushulga ja ruumala muutuste poolt põhjustatud efekte. Rõhu-uuringute käigus on efektide eristamine võimalik. Lisaks on kõrge rõhu all võimalik mõõta väga madalal temperatuuril või superkriitilises olekus valkude denaturatsiooni iseärasusi. Kuna mittekovalentsed sidemed määravad biokeemilise süsteemi stabiilsuse, siis rõhu abil on võimalik kontrollida molekulisidemeid vastastikmõjusid, muutmata temperatuuri või lahuse kontsentratsioone.

Rõhu kasutamise eelis seisneb ka selles, et rõhu vähendamisel valgud üldjuhul renatureeruvad ning on võimalik jooksvalt mõõta rõhu all oleva kokku- ja lahtipakkimise protsessides osaleva valgu ruumala. Rõhu abil saab muuta lahuste viskoossust ning rõhu-uuringutega võib avastada uusi faase ja protsesse. Tänu rõhu-uuringutele saab leida keemiliste reaktsioonide aktivatsiooni- ja reaktsiooniruumalad, mis on olulised parameetrid, et teha järeldusi reaktsiooni tasakaalu ja mehhanismi kohta [18, 20].

1.6. Elu kõrge hüdrostaatilise rõhu tingimustes

Tänaseks on jõutud selgusele, et enamused biosfäärist elutseb ookeani põhjas või sügaval mandrite ja ookeani põhja-kihtides. Elusorganisme on leitud nii 11 km sügavuselt Mariaani süvikust kui ka 2 km sügavuselt ookeani põhja setetest. Suurem osa nendest organismidest on prokarioidid. Kuna nende areng Maal on kestnud kõige kauem, on nad seetõttu kohastunud elama ka kõige ekstreemsemates tingimustes. Kõrge rõhu tingimustes kohanenud organismid elavad vedelikke sisaldavates kivimite pragudes ja poorides, mis on hapniku- ja valgusevaesed keskkonnad [16]. 1977. aastal leiti 2600 m

sügavuselt hüdrotermaalsete lõõride ümbert elujõuline selgrootute populatsioon, mis kinnitas, et elu sügavikes on reaalsus. Need leiud tõestasid, et elu Maal on võimalik ka ilma fotosünteesita ning energiat on võimalik saada ka mineraalide keemilisest muundamisest [18].

Kõrge hüdrostaatilise rõhu tingimustes elavaid organisme nimetatakse piesofiilideks, kuhu kuuluvad peamiselt bakterite ja ahrede perekonnad. Ühe levinuima hüpoteesi järgi algas elu Maal ~4 miljardit aastat tagasi ning arvatakse, et ka piesofiilsete ja hüpertermofiilsete (kuumalembeliste) organismide juured on pärit sellest ajast, sest nad olid kohastunud elama Maa ekstreemsetes tingimustes: pidevad asteroidide tabamused, Päikese radiatsioon, ookeanite aurustumine, laamade aktiivne üksteise alla liikumine jm. See ei tähenda, et nad olid esimesed elusorganismid Maal. Seega demonstreerib kõrge rõhu tingimustes ökosüsteemide uurimine, milline võis elu Maal olla enne fotosünteesi metabolismi välja kujunemist ning kuidas elu üldse alguse sai. Bioloogidele pakub piesofiilide ja hüpertermofiilide uurimine ka huvi, et kindlaks teha, milline oli kõigi elusorganismide üldine ühine eellane LUCA (ingl *Last Universal Common Ancestor*) [16, 18].

Kõrgrõhu-organisme hakati uurima 1940ndatel, kui teadlased ZoBell ja Morita suutsid esimesena laboritingimustes piesofiilseid organisme kasvatada. Kirjeldatud on paljude mikroorganismide kui ka eukarüootide metabolismi ja geenide avaldumise rõhust sõltuvust. Kõrge hüdrostaatiline rõhk vähendab membraani voolavust, proteiinide ja nukleiinhapete sünteesi ning pärsib ensüümide funktsioneerimist ja metabolismi. Samuti muutub raku arhitektuur. Kõrge rõhu tingimustes elavad organismid sisaldavad rohkem valke stabiliseerivaid ühendeid. Mikroorganismide tapmiseks piisab üldjuhul rõhust 2-5 kbar [16, 18].

2. Eksperiment

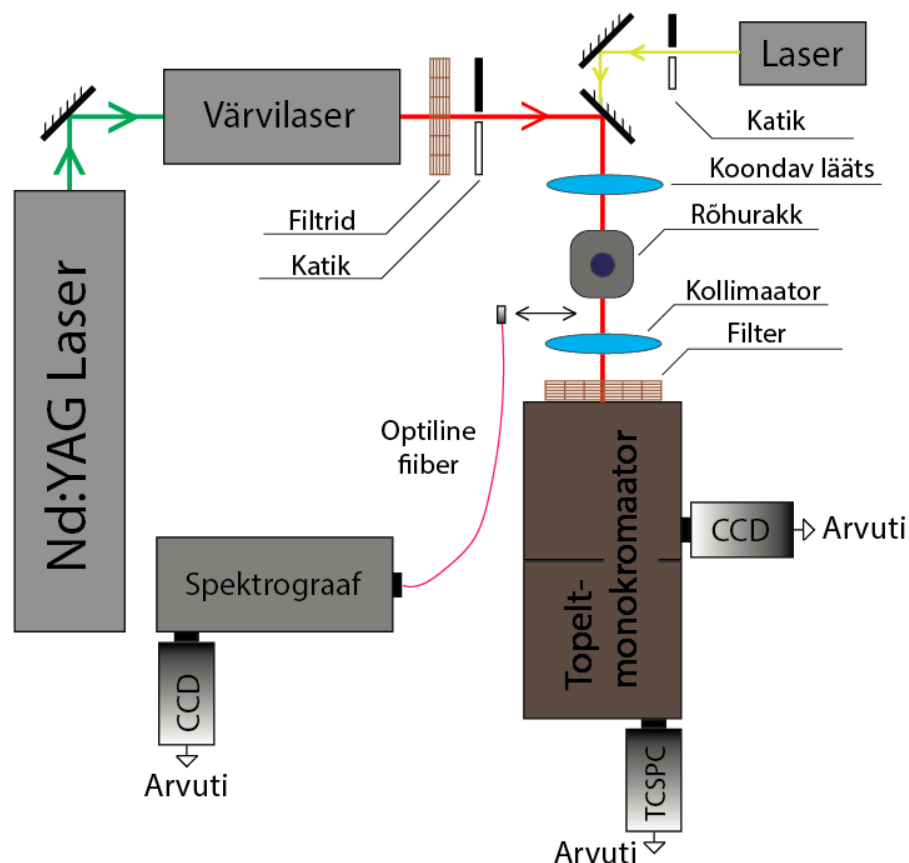
2.1. Proov ja rõhurakk

Katsetes kasutatud RC mutandid mMY210W ja iMY210W on saadud Bristol Ülikoolist Inglismaalt. Siin "m" tähistab RC paiknemist natiivses lipiidmembraanis, kuid "i" märgib, et tegmist on isoleeritud RC valkudega, mille hüdrofoobset osa kaitsevad membraani asemel sünteetilise pesuaine ehk detergendi molekulid [8]. Mõõtmiseks lahustati proovid puhvris (20 mM Tris-HCl pH=8,0). Isoleeritud RC proovile lisati detergendina 0,1% laurüülmetüülamiini-N-oksiidi (LDAO) vesilahust. Selleks, et imiteerida aktiivse RC doonori eluea ajalist kestvust, lisati puhvrile 5 mM naatriumaskorbaati ning 25 µM fenasiinmetosulfaati (PMS, ingl *phendazine methosulfate*). PMS, kui elektronide doonor toetab tsütokroomi bc_1 , et vältida intensiivse valgustuse korral oksüdeeritud spetsiaalsete paaride liiasust [21].

Kõrge hüdrostaalise rõhuga keskkonna tekitamiseks kasutati teemantalasi-rõhurakku (D-02, Diacell Products Ltd.). Proov asetati normaalrõhul 0,3-millimeetrise diameetriga avasse, mis asub kahte teemanti eraldavas metalltihendis paksusega ~0,35 mm. Teemantid on liimitud silindri ja kesta pinnale. Teemantakna läbimõõt on 1 mm. Teemantalasi-rõhurakus tekkiva hüdrostaatilise rõhu suurendamiseks pingutati metallsilindrit ja rõhuraku kesta kooshoidva kaane kruvisid. Rõhu suuruse määramiseks paigaldati proovi avasse mikroskoopilised rubiinikristallid (RSA Le Rubis SA), mis toimivad rõhusensorina. Katseseeriade jooksul oli rõhurakk termostateeritud temperatuurile (termostaat Haake Q/F3 80047) 25 °C.

2.2. Optilised süsteemid

Katse optilise süsteemi skeem on kujutatud joonisel 3. Süsteemi võib jaotada kaheks osaks, millest esimesega mõõdeti RC statsionaarseid kiirgusspektreid ja spetsiaalse paari spontaanse fluorestsentsi kustumiskineetikat ning teisega katsetes kasutatud rõhu väärtusi.



Joonis 3. Optilised süsteemid. Katsetes kasutati kaht ühendatud optilist süsteemi: kiirgusspektri ja kiirguse eluea registreerimiseks mõeldud süsteem (Nd:Yag laser, värvilaser, topeltmonokromaatoriga ühendatud CCD- ja TCSPC-kaamera, filtrid, katik, optika), kus kiire tee on tähistatud tumerohelise ja punasega, ning rõhu mõõtmise süsteem (laser, katik, peeglid, optika, optiline fiiber ja spektrograafiga ühendatud CCD-kaamera), kus kiire tee on tähistatud helerohelisega, mis hiljem kattub esimese süsteemi kiire teega.

Proovi ergastamiseks kasutati pidevatoimelist impulssrežiimis värvilaserit Coherent 700 impulsi kestvusega ~ 3 ps. Värvilaserit pumbati laseriga Antares 76-S Nd:YAG sagedusel 76 MHz ning lainepikkusel 532 nm. Värvilaseris kasutati värvainet Styryl 9 (muudetav lainepikkuste vahemik 780-870 nm) või Rhodamin 6G (lainepikkuste vahemik 565-615 nm). Ergastuse maksimaalne võimsus oli ~ 30 mW, mida mõõdeti optilise võimsusmõõtmisega 1916-C Handheld Optical Power Meter (Newport). Proovi kiirgusspektrite mõõtmiseks kasutati 0,3-meetrise fookuskaugusega topeltmonokromaatorit DTMc300 (Bentham Instruments Ltd.) koos termoelektriliselt jahutatud CCD (ingl *charge-coupled device*) kaameraga (iDUS DV420A-0E, Andor Technology), pikosekundilise ajalise lahutusega fluorestsentsi mõõtmiseks aga sama spektromeetrit koos TCSPC (ingl *time-correlated single photon counting*) kaameraga

(HPM-100-50, Becker & Hicki GmbH). Spektrograafis lahutati valgus võrega, millel on 300 joont millimeetri kohta ning maksimaalne tundlikkus 800 nm juures. Ergastava laseri signaali nõrgendamiseks kasutati erinevaid filtreid, sh kõrgpääsfiltrit LP830 ja ribafiltrit BP900/25, mis lõikavad ära lainepikkused vastavalt kuni 830 nanomeetrini ja väljaspool vahemikku 875 kuni 925 nm.

Rõhu mõõtmiseks ergastati mikroskoopilised rubiinikristallid DPSS-laseriga (Viasho) lainepikkusel 532 nm. Rubiinide kiirgusspektri lahutas 1,5 m fookuskaugusega Jobin-Yvon TH150 spektrograaf. Spektrograafiga oli ühendatud termoelektriliselt jahutatud CCD-kaamera (iDUS DV420-0E, Andor Technology).

Statsionaarset kiirgusspektrit mõõdeti erineva arvu rõhu väärtuste korral vahemikus ~0,1-10 kbar spektraalse lahutusega ~0,5 nm. Fluorestsentsi kustumiskineetikat mõõdeti rõhu väärtuste vahemikus ~0,1-6 kbar, kusjuures iga rõhu väärtuse korral tehti 4-6 kordusmõõtmist, mille käigus muudeti detekteeritavaid lainepikkusi vahemikus 860-920 nanomeetrit. Süsteemi ajaline aparaatfunktsioon kiirguse eluea mõõtmiste korral oli ~180 ps ning spektraalne lahutus 5-10 nm. Rõhku mõõdeti iga rõhu väärtuse muutmise järel ning katseseeria viimane mõõtmine toimus võimalikult minimaalseks vähendatud rõhu korral.

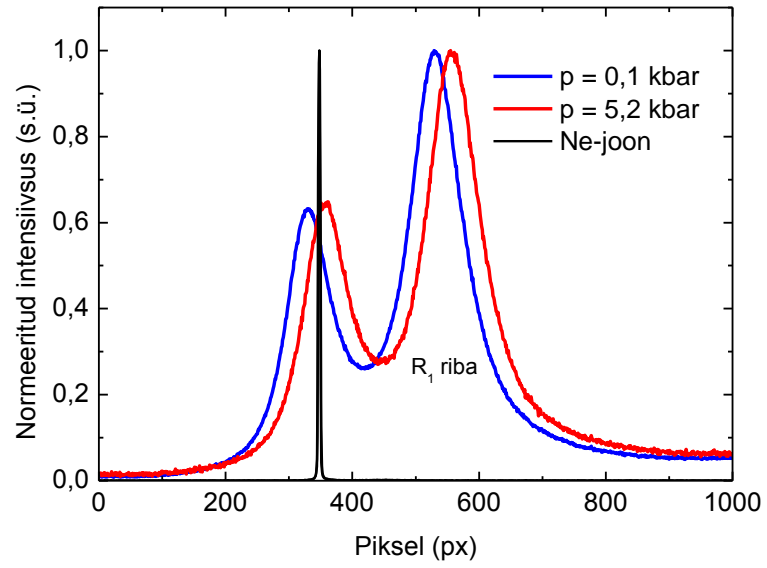
2.3. Andmete töötlemine

RC statsionaarsete kiirgusspektrite töötlemiseks kasutati Origin 6.0 (OrigiLab) programmi. Korrektse spektri saamiseks kalibreeriti neonlambi spektrijoonte abil CCD-kaamera piksliväärtuste skaalat. Samuti arvestati kiirgusspektri töötlemisel kaamera spektraalset tundlikkust. Spektraalse tundlikkuse registreerimiseks kasutati fikseeritud valgustemperatuuriga hõõglampi (СИПИИ 6-40). Antud töös huvi pakkuv spektripiirkond on spetsiaalse paari kiirgusriba, mis normaalrõhul asub 908 nm ümbruses ning mille maksimumi asukoha määramiseks kasutati asümmeetrilist lähenduskõverat (ingl *asymmetric double sigmoidal*). Lainepikkuste skaala teisendati protsessi energeetiliselt paremini kirjeldavaks cm^{-1} skaalaks.

Pikosekundilise ajalise lahutusega fluorestsentsi kustumiskõverate lähendamiseks kasutati Spectra Solve (Version 2.01 PRO, LASTEK Pty. Ltd.) programmi. Mõõdeti ainult RC mutanti iMY210W. Kuna spetsiaalse paari kiirgusriba maksimum asub normaalrõhul ligikaudu lainepikkusel 908 nm, siis kineetika andmete töötlemiseks valiti

fluorestsentsi kustumiskõverad, mis olid mõõdetud lainepikkusel 920 nm. Sellisel juhul kajastus kustumiskõveral peamiselt spetsiaalse paari signaal. Kõrgematel rõhkudel toimuv spetsiaalse paari kiirgusspektri punanihe oleks eeldanud mõõtmisi pikematel lainepikkustel, kuid seda ei võimaldanud mõõdekaamera spektraalse tundlikkuse langus selles piirkonnas. Arvestades, et kineetikad on heterogeensed (neid pole võimalik lähendada ühe-eksponentsiaalse kustumisega), tuli eksponentsiaalsete lähenduskõverate arvutamiseks leida selliste eluigade τ_i ja vastavate amplituudide A_i kombinatsioonid, mille korral lähenduskõvera viga oleks väikseim. Vastavate parameetrite muutmiste seaduspärasuste kontrollimiseks tugineti kirjandusele [8, 26].

Rõhuandmete töötlemiseks kasutati samuti Origin 6.0 programmi. Rõhurakus oleva hüdrostaatilise rõhu määramiseks leiti rubiinikristalli kiirgusspektri R_1 riba maksimumi (normaalrõhul 694,2 nm) asukoht CCD-kaamera piksliväärtuste skaalas modifitseeritud Gaussi lähenduse (ingl *Amplitude version of Gaussian peak function*) abil. Kiirgusspektrid mõõdeti referentsjoone suhtes, milleks oli reeperlambi Ne-joon (629,94673 nm) [22] ning mille maksimumi leidmiseks kasutati samuti Gaussi lähendust. Arvestades piksliväärtuste ja lainepikkusväärtuste skaala suhet ning R_1 riba maksimumi nihkumise kiirust 0,036 nm/kbar (0,768 $\text{cm}^{-1}/\text{kbar}$) [23], arvutati rubiini R_1 riba maksimumidele vastavad rõhu väärtused. Rubiinikristalli kiirgusspektri rõhust sõltuvust illustreerib joonis 4. Tuginedes käesoleva töö teemaga tegelevate inimeste kogemustele, on esimeseks ehk minimaalseks rõhu väärtuseks valitud 0,1 kbar põhjusel, et rubiini kiirgusspektri mõõtmine rõhurakus normaalrõhule vastavates tingimustel on komplitseeritud.



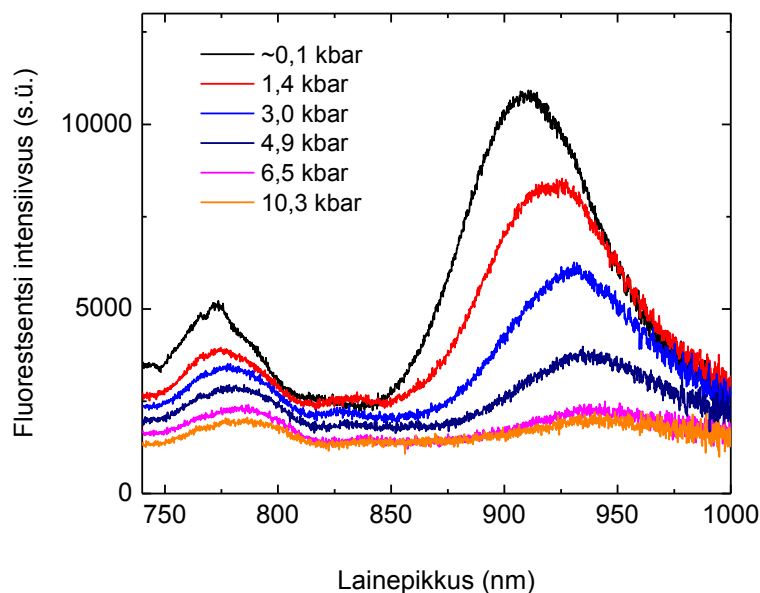
Joonis 4. Rubiini kiirgusspekter 0,1 ja 5,2 kbar juures. Rubiini spektrid on mõõdetud termostateeritud rõhurakus temperatuuril 25 °C. R1 nihkub kõrgematel rõhkudel punasemasse spektri piirkonda.

3. Mõõtmistulemused ja analüüs

3.1. Statsionaarsed kiirgusspektrid

3.1.1. mMY210W kiirgusspekter

Joonisel 5 on kujutatud membraanse RC mutandi MY210W kiirgusspektreid erinevatel rõhkudel. Proovi ergastamiseks kasutati oranži valgust lainepikkusega $\lambda \approx 590$ nm. Normaalrõhul asub doonori kiirgusriba mutandis mMY210W lainepikkustel 909 nm ning umbes 10 kbar juures on see nihkunud 942 nanomeetrini. Näeme, et rõhu kasvades toimub spektrite punanihe ja kiirguse intensiivsuse vähenemine ning riba määrduv laiali. Alates rõhust 6 kbar intensiivsuse vähenemine aeglustub oluliselt ning suurematel rõhkudel kui ~ 10 kbar on kiirgusriba eristamine signaali müra tunduvalt keerulisem. Kiirgusriba intensiivsuse ja kuju muutus on seotud rõhust tingitud RC ümbruse muutustega. Intensiivsuse vähenemine võib viidata laengute eraldumise aja lühenemisele või ka mittekiirguslike kanalite kasvule. Viimane tähendab, et osa ergastusi võib kustuda ilma kiirgamata, nagu näiteks ergastusenergia muutumine soojuseks.



Joonis 5. mMY210W RC kiirgusspekter temperatuuril 25 °C. Üldisel punanihke taustal on lisaks spetsiaalse paari kiirgusribale näha ka vaba klorofüllü kiirgusriba.

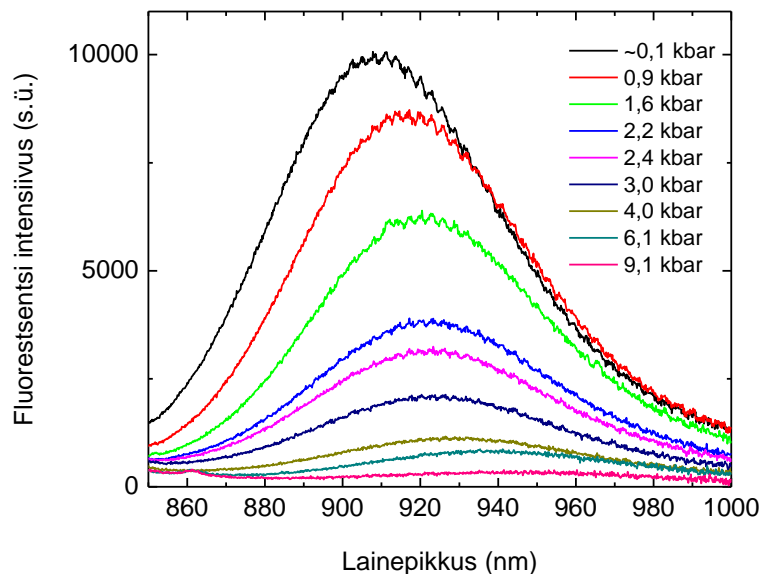
Lisaks spetsiaalsele paarile kajastub mMY210W spektris lainepikkusel *ca* 770 nm ka vaba bakterioklorofüll, mis koosneb kromoproteiinide tükikestest ja ei ole tervete

reaktsioonitsentritega energeetiliselt seotud. Vaba bakterioklorofüll võib tekkida kõrgetel rõhkudel RC valkude dissotsiatsioonil, kuid antud juhul selline protsess selgelt ei eristu, sest vaba klorofüllü kiirguse intensiivsus väheneb koos doonori omaga. Kuna rõhuraku täitmine prooviga ei toimu täielikult hermeetilistes tingimustes, siis võib vaba bakterioklorofüll olla tekkinud proovi oksüdeerumisel proovi rõhurakku sisestamise käigus. Vaba bakterioklorofüllü kiirgusriba on piisavalt lai ja ulatub doonori riba piirkonda, muutes viimase spektraalseid andmeid. Kuigi oletuste kohaselt vaba klorofüllü kogus katse käigus oluliselt ei suurenenud, on jooniselt näha, et kõrgetel rõhkudel (alatas 6 kbar) on vaba bakterioklorofüllü kiirgusriba intensiivsus doonori kiirgusriba intensiivsusest suurem. See tuleneb asjaolust, et kromoproteiini tükikeste kiirguse eluiga on spetsiaalse paari kiirguse elueast kõrgetel rõhkudel oluliselt pikem ja seetõttu muutub statsionaarses spektris domineerivaks. Vaba bakterioklorofüllü kiirgusriba muutis andmete töötamise oluliselt tülikamaks ja kõrgmatel rõhkudel arvatud tulemused ebausaldusväärsemateks.

3.1.2. iMY210W kiirgusspekter

Joonisel 6 on kujutatud isoleeritud RC mutandi MY210W spektri spetsiaalse paari kiirgusribasid erinevatel rõhkudel. Et vältida vaba bakterioklorofüllü spektri suurt mõju, ergastati proovi lähi-infrapunase valgusega lainepikkusel $\lambda \approx 805$ nm. Lühemate lainepikkustega kui 830 nm kiirgusspektri piirkond eemaldati filtriga, kuid sellegi poolest tuli arvestada, et mõõtmistulemusi mõjutas vaba bakterioklorofüllü kiirgusriba, mille punane serv ulatus filtrite poolt mitte eemaldatud lainepikkuste piirkonda.

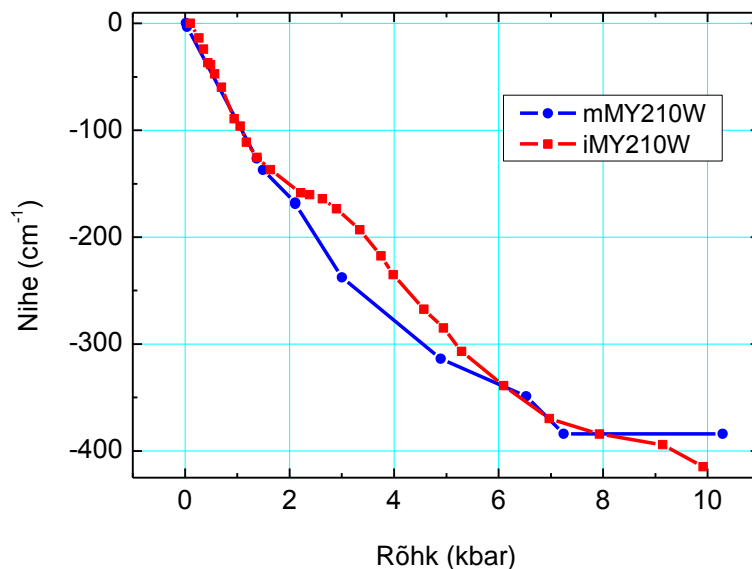
Sarnaselt eelmisele eksperimendile, toimub ka isoleeritud RC korral rõhu kasvamisel punanihke taustal doonori kiirgusriba intensiivsuse vähenemine ja laiali valgumine. Rõhu suurenemisel *ca* 10 kbar võrra nihkub riba maksimum samade lainepikkuste vahemikus, mis membraanse RC korralgi, umbes 35 nm. Jooniselt on näha, et vahemikus ~2-3 kbar on riba nihe silmapaistvamalt tagasihoidlikum, mida selgitatakse järgmises alapeatükis.



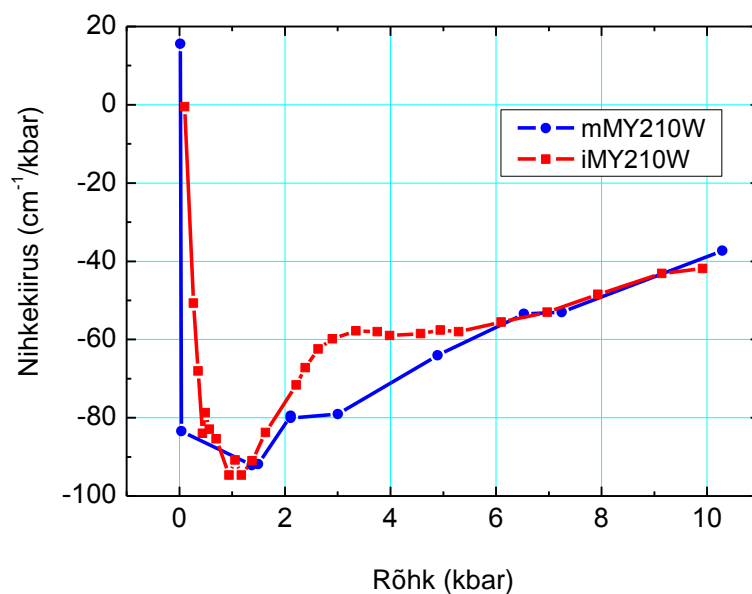
Joonis 6. iMY210W RC kiirgusspektri spetsiaalse paari kiirgusribad temperatuuril 25 °C. Rõhu kasvades kiirguse intensiivsus väheneb, mille käigus toimub kiirgusriba maksimumi punanihe.

3.1.3. Kiirgusriba maksimumide nihked ja nihkekiirused

Joonisel 7 on võrreldud mutantide iMY210W ja mMY210W spetsiaalse paari kiirgusriba maksimumi asukohta erinevatel rõhkudel. Jooniselt on näha, et madalatel rõhkudel toimub mõlema proovi puhul ühtlane punanihe, kuid ~2 kbar juures ilmneb oluline erinevus. Vahemikus 2-3 kbar isoleeritud RC doonori spektri punanihkes toimub oluliselt suurem aeglustumine kui membraanse RC doonori puhul. Sarnast erinevust võib märgata ka neeldumisspektrite korral, kuid sellisel juhul toimub lisaks nihke aeglustumisele ühtlasi ka sininihe [8]. Kõrgematel rõhkudel kui ~6 kbar on punanihke kiirus mõlema proovi puhul sarnane ning väiksema väärtusega (Joonis 8).



Joonis 7. iMY210Y ja mMY210Y mutantide RC spetsiaalse paari kiirusriba maksimumi nihked. ~2 kbar juures ilmneb i-tüüpi ja m-tüüpi mutandi korral kiirusriba punanihkes oluline erinevus.



Joonis 8. iMY210Y ja mMY210Y mutantide RC spetsiaalse paari kiirusriba maksimumi nihkekiirused. ~2 kbar juures on näha m-tüüpi mutandi korral nihke intensiivsemat aeglustumist. Madalatel (< 2kbar) ja kõrgematel (> 6 kbar) on nihete kiirused võrdsed.

Kangur *et al.* on näidanud, et ka LH2-e rõhu-uuringutel neeldumisspektrites avaldub selline hälve. Lahenduseks pakutakse, et sellise olukorra põhjustab teatud vesiniksidemete katkemine, mille käigus antenni funktsionaalsed omadused säilivad,

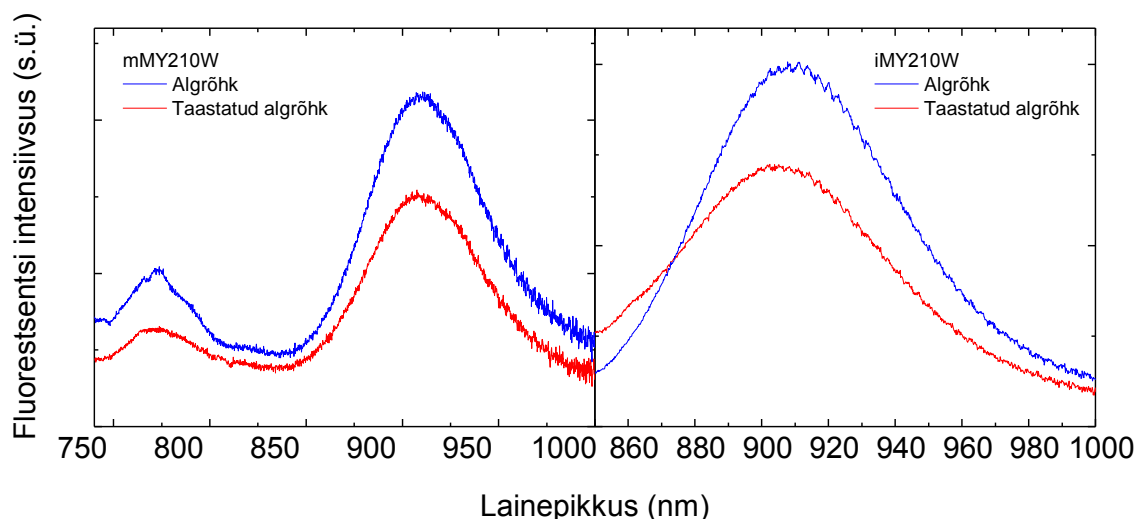
kuid kõrgematel rõhkudel on neeldumisriba punanihke tendents sama, mis LH3-1, millel sellised vesiniksidemed puuduvad [25]. Võiks arvata, et ka RC-de puhul kehtib sarnane analoogia, kus teatud vesiniksidemete katkemise korral muutub kromoproteiini "tüüp".

Samuti võib sellist anomaaliat põhjendada loomulik globul – sula-globul faasisiirdega. Loomulik globulaarne faas on globulaarse valguga (RC valk) stabiilne faas vesilahuses, mida iseloomustab tahkisetaoline (tertiaalne) struktuur. Sula-globuli faasile on loomulik sekundaarne struktuur, kuid eelmise olekuga võrreldes väiksem valguga kõrvalahelate pakketihedus. Madalatel rõhkudel toimub valguga kokkusurumine, 2-3 kbar piirkonnas faasisiire ning kõrgematel rõhkudel uue struktuuri kokkusurumine [8].

m-tüüpi proovi reaktsioonitsentrite puhul sellist hälvet ei märgata, kuna RC valgud on loomulikus lipiidmembraanis, mis kaitseb neid rõhu muutustest tingitud kokkusurumise vastu efektiivsemalt kui detergent. Põhjus, miks isoleeritud RC objektis punanihke hälve avaldub neeldumisspektris teravamalt kui kiirgusspektris, vajab täiendavat uurimist.

3.1.4. Kromovalkude renaturatsioon

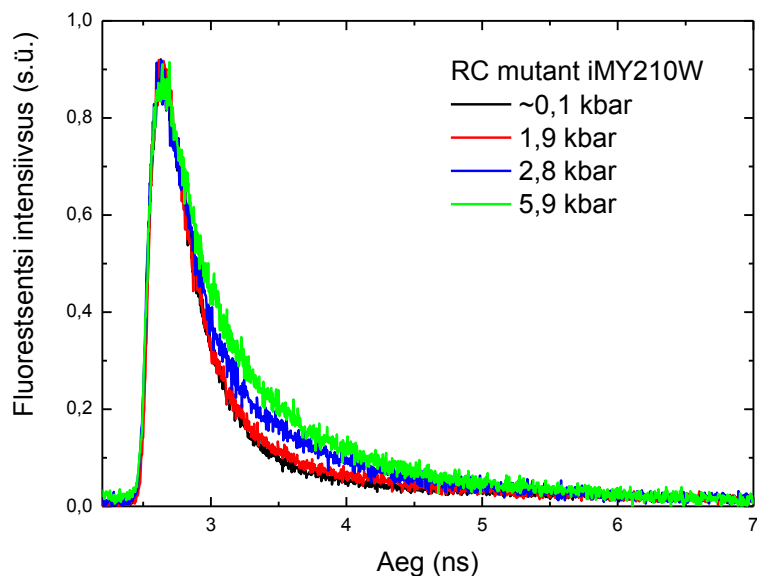
Iga katseseeria lõpus vähendati rõhurakus rõhk miinimumväärtuseni ning sooritati kiirgusspektri kordusmõõtmine. Sellega sooviti näidata kromovalkude renaturatsiooni. Joonisel 9 on näha, et nii membraani kui ka isoleeritud RC puhul kiirgusriba maksimum nihkub tagasi ligikaudu esialgsele lainepikkusele. Samas mõlema proovi spektris toimus spetsiaalse paari kiirgusriba intensiivsuse vähenemine ning vaba bakterioklorofüllüüli spektri intensiivsuse suhteline kasv spetsiaalse paari kiirguse suhtes. Viimane asjaolu avaldus tugevamini isoleeritud proovi puhul.



Joonis 9. mMY210Y ja iMY210Y mutantide RC spetsiaalse paari kiirgusribad algrõhu ja taastatud algrõhu korral.

3.2. Esmase elektronsiirde kineetika

Esmase elektronsiirde kineetikat on võimalik mõõta ergastunud spetsiaalse paari fluorestsentsi kustumise kineetika kaudu. Isoleeritud RC mutandi MY210W kiirguse kustumiskineetika katsetulemused on välja toodud joonisel 10.



Joonis 10. Isoleeritud RC mutandi MY210W kiirguse kustumiskineetika sõltuvus rõhust temperatuuril 25 °C.

Nagu eelpool mainitud on kineetikad heterogeensed, sellepärast lähendati registreeritud signaale kolme eksponentsiaalse kustumisega $A_1\exp(-k_1t) + A_2\exp(-k_2t) + A_3\exp(-k_3t)$, kus t on aeg, A_i on eksponentsiaalne amplituud ja k_i on parameeter, mis iseloomustab kustumise kiirust ning $k_i = 1/\tau_i$. Amplituudid määravad, kui suur on kustumiskineetikas vastava kustumisaja τ_i kaal. Tabelis 1 on esitatud katseandmete lähenduskõverate parameetrid iMY210W RC-de puhul, kus amplituudide summaarne väärtus on normeeritud ühele. Parameetrite rõhust sõltuvused on graafiliselt välja toodud joonisel 11.

p (kbar)	τ_1 (ps)	A_1 (%)	τ_2 (ps)	A_2 (%)	τ_3 (ps)	A_3 (%)
0,1	45,1	82,3	299	16,4	4610	1,3
0,9	39,6	85,9	301	12,7	4360	1,4
1,2	37,3	83,2	294	15,2	3360	1,6
1,9	31,3	87,4	289	11,2	2810	1,5
2,8	29,3	85,5	301	11,3	1650	3,2
5,2	27,0	84,6	313	10,4	1300	4,9
5,9	25,6	85,2	312	10,0	1290	4,8

Tabel 1. Reaktsioonitsentri mutandi iMY210W doonori kiirguse kustumiskineetika lähenduse regressioonparameetrid erinevatel rõhkudel temperatuuril 25 °C. Parameetrite määramise viga on hinnatud vahemikku 5-10 %.

τ_1 on tähistatud RC kiirguse kustumise komponent, mis vastab esmase laengu eraldumise ajale ehk on ajavahemik, mille jooksul elektron siirdub doonorkromofoorilt P aktseptorkromofoorile H. Kuni rõhuni ~2 kbar toimub τ_1 väärtuse kiire vähenemine ning alatest ~3 kbar-st vähenemine aeglustub või peatub (Joonis 11A). 6 kbar-se rõhu juures on τ_1 lühenenud ligikaudu kaks korda. Selline aja muutus illustreerib väidet, et rõhu all molekulide vahelised kaugused vähenevad ning elektronide siirete ajad lühenevad. Seevastu väga kõrgetel rõhkudel molekulide kokkusurutatavus väheneb ning siirdeajad praktiliselt ei muutu. Jooniselt 11B on näha, et A_1 on kõrgematel rõhkudel mõnevõrra suurem, kui normaalrõhul.

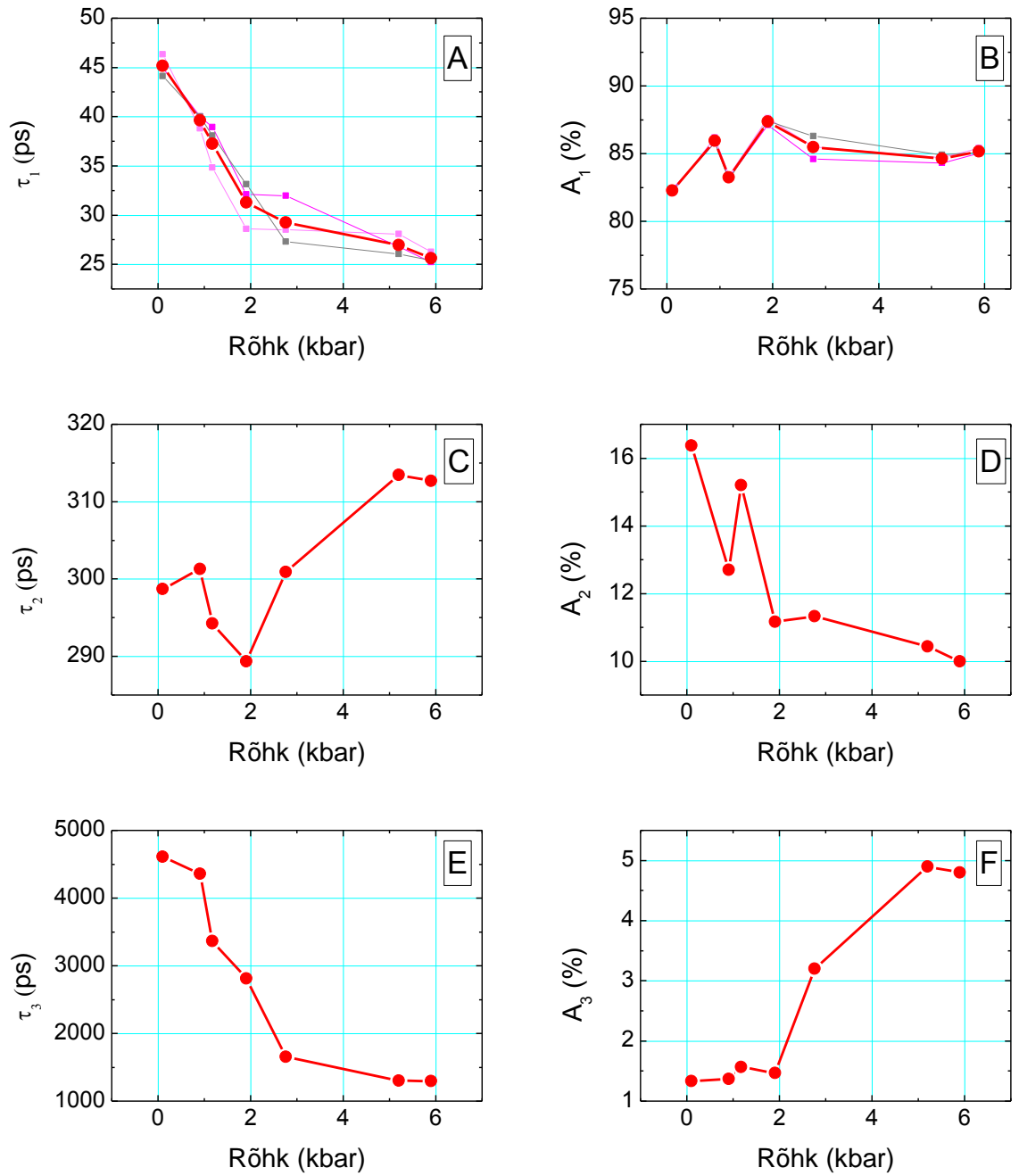
τ_3 on RC spetsiaalse paari rekombinatsiooniline eluiga, mis on ajavahemik doonori ergastumisest kuni neutraliseerumiseni [13]. Kui looduslikult toimub RC doonori neutraliseerimine tänu membraani periplasmaatilisel poolel asuva tsütokroomi elektroni

loovutamisele, siis antud eksperimendis tagab muudetud lahuse keemiline koostis olukorra, kus ei toimu kinooni oksüdatsiooni ning sinna siirdunud elektron kandub sama teed mööda doonorisse tagasi, põhjustades pikaelulist rekombinatsioonilist kiirgust. Kuigi τ_3 kestab mõõdetava mutandi korral normaalarõhul umbes sada korda kauem kui esmane laengu eraldumine, siis sarnaselt τ_1 -le väheneb ka τ_3 väärtus rõhu kasvades (Joonis 11E) ning 6 kbar juures on selle väärtus vähenenud peaaegu neli korda. Hoolimata et rekombinatsioonilise eluea osakaal kasvab (Joonis 11F), jääb see siiski oluliselt väiksemaks kui ergastunud doonori kiirguse kustumise eluea osakaal.

Eluea τ_2 kohta kindel seletus puudub, kuid on näha, et erinevatel rõhkudel selle väärtus oluliselt ei muutu. Kuigi joonisel 11C võib jälle 2 kbari juures tähele panna eluea nn lokaalset miinimumi, siis tuginedes kordusmõõtmistele (pole näidatud) on see tingitud lähendusel tehtud veast. Vastupidiselt eespool kirjeldatud eluigadele τ_2 -e osakaal rõhu kasvades väheneb.

Olemasolevate andmete põhjal ei ole võimalik otsustada, kas kustumiskineetikate rõhusõltuvus on korrelatsioonis statsionaarsete kiirgusspektrite rõhust sõltuva käitumisega. Täiendavalt oleks vaja mõõta isoleeritud RC proovi rohkemates rõhupunktides (eriti vahemikus 2-3 kbar) ning lisaks omada andmeid membraansete RC kiirguse eluigade kohta.

Varasemad samalaadsed RC esmase elektronsiirde kineetika uuringud on näidanud, et WT reaktsioonitsentrite vastavad eluead on ligikaudu kümme korda lühemad [13, 26].



Joonis 11. Isoleeritud RC mutandi iMY210W doonori kiirguskineetika lähendusparameetrite sõltuvused rõhust temperatuuril 25 °C. Graafikutel A ja B on lisaks keskmistatud tulemustele välja toodud ka üksikud lähendusparameetrite väärtused, mis on saadud erinevate lähenduste tulemusena.

Kokkuvõte

Käesolevas bakalaureusetöös on spektroskoopiliste meetoditega uuritud purpurbakteri *Rhodobacter sphaeroides*'e sihipäraselt muteeritud reaktsioonitsentreid (RC) kõrgete rõhkude tingimustes. Eelkõige sooviti selgitada RC esmase fotokeemia kineetika rõhusõltuvuse füüsikalisi põhjuseid.

Töö esimeses pooles registreeriti CCD-kaameraga membraanse ja isoleeritud RC mutandi MY210W statsionaarsed kiirgusspektrid. Osutus, et kõrgetel rõhkudel toimus spetsiaalse paari kiirgusriba punanihe, intensiivsuse vähenemine ja riba laienemine. Mõõtmisi sooritati kuni ~10 kbar-ni ning mõlema proovi korral nihkus kiirgusriba maksimum ligikaudu lainepikkuste vahemikus 908-945 nm. Oluline erinevus membraanse ja isoleeritud RC kiirgusspektrites ilmnes vahemikus ~2-3 kbar, kus toimus isoleeritud RC puhul märgatav punanihke aeglustumine. Seevastu varasemad rõhuuringud on näidanud, et isoleeritud membraanivalkude neeldumisspektrites (sh RC) toimub samas vahemikus sininihe. Kuigi kindlat seletust sellisele hälbele pole leitud, arvatakse, et nendel rõhkudel leiab aset globulaarse valgu faasisiire sula-globulaarseks või muutub RC, kui kromoproteiini „tüüp“ [8, 25]. Kõrgematel rõhkudel toimub mõlema RC puhul üldine punanihke aeglustumine, mis on tingitud valgu kokkusurutavuse vähenemisest.

Töö teises pooles mõõdeti RC spetsiaalse paari fluorestsentsi kustumiskineetikat erinevatel rõhkudel, mille põhjal analüüsiti esmase elektronsiirde kineetika seaduspärasusi. Registreeritud signaalid olid kompleksed, sisaldas lisaks domineerivale laengute eraldumise aega kirjeldavale komponendile teisi kiirguse komponente. Laengute eraldumise aeg, olles rõhul ~0,1 kbar 45 ps muutus 6 kbar juures ligemale kaks korda kiiremaks. Ka rekombinatsioonilise kustumise komponendi eluiga lühenes rõhu kasvades märgatavalt. Saadud andmed ei olnud siiski piisavad, et teha põhjendatud järeldusi rõhu mõjumise kohta RC funktsioneerimisele.

Käesoleva töö autoril ei õnnestunud ajaliste piirangute tõttu osaleda jätkunud uuringutel, kus võeti kasutusele suurema ajalise lahutusvõimega aparatuur ning mõõdeti ka membraanse RC fluorestsentsi kustumiskineetikaid.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Kõu Timpmanni toetava suhtumise ja konstruktiivse tagasiside eest. Samuti tänan meeldiva koostöö eest Liina Kangurit ja Manoop Chenchiliyan'i, kelle juuresolekul toimusid kõik mõõtmised.

Fluorescence spectroscopy of bacterial reaction centres at high pressure conditions

Mikk Sarapuu

Summary

The primary processes of photosynthesis are carried out by two fundamentally different types of pigment-proteins: reaction centres (RC) and light-harvesting complexes. Their structural and functional properties depend on external influences. The purpose of this Bachelor's thesis is to study the effect of high hydrostatic pressure on the fluorescence spectra and kinetics of primary charge separation in *Rhodobacter sphaeroides* modified RC.

Firstly, the steady-state emission spectra of the membrane-bound and isolated mutant RCs were measured. In both cases results showed that under high pressure a redshift of the spectra occurs and the intensity of the emission band of the special pair is decreasing with the pressure. Although the general redshift decreases with pressure there is a distinguishable retardation of redshift between 2-3 kbar in the spectra of isolated RCs. This kind of retardation does not occur in spectra of membrane-bound RCs.

Secondly, the effect of hydrostatic pressures as high as 6 kbar on the kinetics of primary charge separation in isolated mutant RCs was examined. As emission kinetics is non-monoexponential its decay rate depends on at least three different components (lifetimes) and pre-exponential factors. The latter determine notability of certain lifetime. The most dominant lifetime is a lifetime of primary charge separation in donor. The duration of this lifetime in MY210W mutant RC was about 45 ps at pressure ~0,1 kbar and it shortened approximately two-fold during the applied pressure. Even though the other two lifetimes were also changed with increasing pressure they still had much less impact on kinetics of decay than the first one.

Due to restricted time schedule author of the thesis was not able to participate in further experiments where kinetics of emission of primary donor in membrane-bound RCs was measured. Furthermore apparatus with improved time resolution resolution was used in following experiments. However these measurements have proven that decay constants obtained in the present thesis are reliable.

Kasutatud kirjandus

- [1] Jaschke, P. R., Saer, R. G., Noll, S., Beatty, J. T., „Modification of the genome of *Rhodobacter sphaeroides* and construction of synthetic operons,“ *Methods in Enzymology* **497**, 519-538 (2011).
- [2] Rojas-Duran, M. F., Vazquez, R., Rios-Velazquez, C., „Molecular and morphological characterization of *Rhodobacter sphaeroides* bacteriophages from Puerto Rico,“ *Caribbean Journal of Science* **45**, 118-124 (2009).
- [3] Hu, X., Ritz, T., Damjanovic, A., Autenrieth, F., Schulten, K., „Photosynthetic apparatus of purple bacteria,“ *Quarterly Reviews of Biophysics* **35**, 1–62 (2002).
- [4] Cogdell, R. J., Gall, A., Köhler, J., „The architecture and function of the lightharvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes,“ *Quarterly Reviews of Biophysics* **39**, 227–324 (2006).
- [5] Kühlbrandt, W., „Structure and function of bacterial light-harvesting complexes,“ *Structure* **3**, 521-525 (1995).
- [6] Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., Rees, D. C., „Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits,“ *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **84**, 6162-6166 (1987).
- [7] Allen, J. P., Williams, J. C., „Photosynthetic reaction centers,“ *FEBS Letters* **438**, 5-9 (1998).
- [8] Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi Biofüüsika Laboratooriumi gradi 3865 lõpparuanne (2002).
- [9] Lancaster, C. R. D., Hartmut, M., „Photosynthetic reaction centers of purple bacteria“ kogumikus *Handbook of Metalloproteins*, Messerschmid, A., Huber, R., Puolos, T., Wieghardt, K. (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001), lk. 119-135.
- [10] Ermler, U., Fritsch, G., Buchanan, S. K., Hartmut, M., „Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactors interactions,“ *Structure* **2**, 925-936 (1994).
- [11] Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., Rees, D. C., „Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: Protein-cofactor (quinones

- and Fe²⁺) interactions,” National Academy of Science of the United States of America **85**, 8487-8491 (1988).
- [12] Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., Rees, D. C., „Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The cofactors,” National Academy of Science of the United States of America **84**, 5730-5734 (1987).
- [13] Woodbury, N. W., Allen, J. P., „The Pathway, Kinetics and Thermodynamics of Electron Transfer in Wild Type and Mutant Reaction Centers of Purple Nonsulfur Bacteria,” kogumikus *Advances in Photosynthesis VOLUME 2: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995), lk. 527-557.
- [14] Shochat, S., Thomas, A., Francke, C., Gast, P., van Noort, P. I., Otte, S. C. M., Schelvis, H. P. M., Schmidt, S., Vijgenboom, E., Vrieze, J., Zinth, W., Hoff, A. J., „Sperctroscopic characterization of reaction centers of the (M)Y210W mutant of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*,” Photosynthesis Research **40**, 55-66 (1994).
- [15] McAuley, K. E., Fyfe, P. K., Cogdell, R. J., Isaacs, N. W., Jones, M. R., „X-ray crystal structure of the YM210W mutant reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*,” FEBS Letters **467**, 285-290 (2000).
- [16] Oger, P. M., Jebbar, M., „The many ways of coping with pressure,” Research in Microbiology **161**, 799-809 (2010).
- [17] Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B. ja Clark, D. S., „Pressure effects on intraand intermolecular interactions within proteins,” Biochimica et Biophysica Acta **1595**, 235–249 (2002).
- [18] Daniel, I., Oger, P., Winter, R., „Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions,” Chemical Society Reviews **35**, 858–875 (2006).
- [19] Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C., „High pressure effects on protein structure and function,” PROTEINS: Structure, Function and Genetics **24**, 81-91 (1996).
- [20] Winter, R. ja Dzwolak, W., „Exploring the temperature–pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins,” Philosophical Transactions of the Royal Society **363**, 537–563 (2005).

- [21] Timpmann, K., Manoop, C., Jalviste, E., Timney, J. A., Hunter, C. N., Freiberg, A., „Efficiency of light harvesting in a photosynthetic bacterium adapted to different levels of light,“ *Biochimica et Biophysica Acta* **1837**, 1835-1846 (2014).
- [22] *Таблицы спектральных линий* (Наука, Москва, 1977)
- [23] Grasset, O., „Calibration of the R ruby fluorescence lines in the pressure range [0-1 Gpa] and the temperature range [250-300 K],“ *High Pressure Research* **28**, 75-126 (2001).
- [24] Leiger, K., Freiberg, A., Dahlbom, M. G., Noel, S. H., Reimers, J. R., „Pressure-induced spectral changes for the special-pair radical cation of the bacterial photosynthetic reaction center,“ *The Journal Of Chemical Physics* **126**, 215102 (2007).
- [25] Kangur, L., Timpmann, K., Freiberg, A., „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 (2008).
- [26] Timpmann, K., Ellervee, A., Laisaar, A., Jones, M. R., Freiberg, A., „High pressure-induced acceleration of primary photochemistry in membrane-bound wild type and mutant bacterial reaction centers,“ *kogumikus Ultrafast Processes in Spectroscopy*, Kaarli, R., Freiberg, A., Saari, P., eds (University of Tartu, Tartu 1998), lk. 236-247.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mikk Sarapuu (sünnikuupäev: 23.02.1990),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Bakteriaalsete reaktsioonsentrite fluorestsentsi spektroskoopia kõrgete rõhkude tingimustel“, mille juhendaja on Kõu Timpmann,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2015**