TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Fluorestsentsspektroskoopia kasutamine membraanvalkude struktuuri ja dünaamika uurimiseks

Bakalaureusetöö

12 EAP

Joanna Liisa Orav

Juhendajad PhD Kõu Timpmann

PhD Liina Kangur

Prof. Arvi Freiberg

TARTU 2022

INFOLEHT

Fluorestsentsspektroskoopia kasutamine membraanvalkude struktuuri ja dünaamika uurimiseks

Fotosünteesivad purpurbakterid koguvad päikesekiirgust membraani integreeritud ringikujuliste valk-pigment komplekside abil. Sellist tüüpi komplekse on kaks: LH2 ja LH1. Töös uuriti fotosünteetilise purpurbakteri *Rhodobacter sphaeroides*'e metsiktüübist isoleeritud LH2 kompleksis leiduva trüptofaani kiirguse spektreid. Trüptofaan on aromaatne aminohape, mis reageerib teda ümbritsevale keskkonna muutusele. Muutuste uurimiseks mõõdetakse trüptofaani kiirgusspektreid ning nende analüüsimisega on võimalik saada informatsiooni valgu konformatsiooniliste muutuste ja dünaamika kohta. Antud töös mõõdeti *Rb. sphaeroides*'e metsiktüübi isoleeritud LH2 kompleksi neeldumis- ja kiirgusspektrid, mida töödeldi programmiga Origin 6.0 (Microcal Software). Töös saadud tulemused kinnitavad valkude olulisust struktuurse materjalina ning minimaalset osalemist energia ülekandmisel.

Märksõnad: fotosünteetilised membraanikompleksid, fluorestsentsspektroskoopia, trüptofaan

CERCS kood: B120 Molekulaarne biofüüsika; P330 Bioenergeetika

Study of membrane proteins structure and dynamics by fluorescence spectroscopy

Photosynthetic purpura bacteria gather solar radiation through circular pigment-protein complexes which are integrated into the membrane. There are two types of those complexes: LH2 and LH1. The spectra of tryptophan in the isolated LH2 complex of the photosynthetic purpura bacterium *Rhodobacter sphaeroides* were investigated. Tryptophan is an aromatic amino acid that responds to changes in the environment around the protein. To investigate the changes, it is necessary to measure the radiation spectra of tryptophan, and by analyzing these spectra, it is possible to gather information about the conformational changes and dynamics of the protein. In this work, absorption and emission spectra of the isolated LH2 complex of wild type *Rb. sphaeroides* were measured and were processed with Origin 6.0 (Microcal Software). The results confirm the importance of proteins as a building material and minimal involvement in energy transfer.

Keywords: photosynthetic membrane complexes, fluorescence spectroscopy, tryptophan

CERCS code: B120 Molecular biophysics; P330 Bioenergetics

SISUKORD

SISUKORD 3
KASUTATUD LÜHENDID 5
SISSEJUHATUS 6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7
1.1. Purpurbakterid ja nende fotosüntees 7
1.2. Fotosünteetilise aparaadi ehitus 7
1.3. *Rhodobacter sphaeroides* 8
1.4. LH2 ehitus 8
1.4.1. LH2 struktuur 9
1.4.2. Aromaatsed aminohapped LH2 kompleksis 11
1.5. Fluorestsents valkudes 12
1.5.1. Aromaatsed aminohapped 13
1.5.2. Trüptofaan 13
2. EKSPERIMENTAALOSA 15
2.1. Töö eesmärgid 15
2.2. Materjal ja metoodika 16
2.2.1. Uuritav proov ja kasutatavad vahendid 16
2.2.2. Neeldumisspektrite mõõtmine 16
2.2.3. Kiirgusspektrite mõõtmine 17
2.2.4. Andmete analüüs ja metoodilised märkused 17
2.3 Tulemused ja arutelu 18
2.3.1. Neeldumisspekter 18
2.3.2. UV-s mõõdetud kiirgusspektrite parandamine 20
2.3.3. UV kiirgusspektrite võrdlus 21
2.3.4. Kiirgusspektrite maksimumi asukoha spektraalne sõltuvus 23
2.3.5. BChl ja valgu ergastusspektrid 25

KOKKUVÕTE 29
SUMMARY 30
TÄNUSÕNAD 31
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU 32
KASUTATUD VEEBIAADRESSID 40
LIHTLITSENTS 41

KASUTATUD LÜHENDID

ATP	ingl *adenosine triphosphate*, adenosiintrifosfaat
BChl	ingl *bacteriochlorophyll*, bakterioklorofüll
BChl a	ingl *bacteriochlorophyll* a, bakterioklorofüll a
B800	bakterioklorofüllide 800-nm neeldumisriba, ka B800 oligomeeri nimetus
B850	bakterioklorofüllide 850-nm neeldumisriba, ka B850 oligomeeri nimetus
β-OG	oktüül glükosiid, lahutamatute membraanvalkude lahustamiseks
IR	infrapunakiirgus ehk IR-kiirgus
LH	ingl *Light-Harvesting Complex*, valgust koguv kompleks
LH1	ingl *Light-Harvesting Complex* I, valgust koguv kompleks I
LH2	ingl *Light-Harvesting Complex* II, valgust koguv kompleks II
mm	millimeeter
mmol	millimolaarne
nm	nanomeeter, lainepikkuse (λ, lambda) mõõtühik
Phe	fenüülalaniin, aromaatne aminohape
pdb	Protein Data Bank
Q_B	kinoon
Rb. sphaeroides	*Rhodobacter sphaeroides*
RC	ingl *Reaction Centre*, reaktsioonitsenter
Tris	2-amino-2-(hüdroksümetüül)propaan-1,3-diool
Trp	trüptofaan, valguahela üks aromaatsetest aminohappejääkidest
Tyr	türosiin, valguahela üks aromaatsetest aminohappejääkidest
UV	ultraviolettkiirgus ehk UV-kiirgus
WT	ingl *wild type*, metsiktüüpi genoomiga
µl	mikroliiter

SISSEJUHATUS

Päikeselt tulevat valguskiirgust salvestavad keemiliseks energiaks fotosünteesivad organismid. Ühed teadaolevad fotosünteesivad mikroorganismid on purpurbakterid, kes sisaldavad fotosünteetilisi pigmente: bakterioklorofülle ja karotenoide. Purpurbakterite fotosünteesi toimumiseks on vajalik fotosünteetiline aparaat, mis on pakitud intratsütoplasmaatilistesse vesiikulitesse ehk kromatofooridesse. Kromatofoorid koosnevad membraani lipiidsest kaksikkihist, kuhu on pakitud valgust koguvad antennid ning reaktsioonitsenter, mis on vajalik laengute eraldamiseks. Valgust koguvad kompleksid on loodud valguse neeldumiseks, energia salvestamiseks ja kompleksi vaheliseks energia ülekandeks ning see aine omadus võimaldab ka otseselt uurida neid protsesse spektroskoopiliste meetoditega. Valgust koguvaid komplekse on kaks: LH2 ja LH1. LH2 koosneb alfa-helikaalsetest transmembraansetest valkudest, mis sisaldavad spetsiifiliselt paigutunud aromaatseid aminohappeid. Looduses esineb kolm aromaatset aminohapet: trüptofaan, türosiin ja fenüülalaniin. Trüptofaan on neist kolmest aminohappest oluliseim, mida kasutatakse valkude struktuuri uurimiseks. Membraanvalgud on tähtsad oma funktsionaalsuse poolest, kuid nende struktuuri ja organiseerituse kohta pole kristallstruktuuride vähesuse tõttu palju teada. Fluorestsentsspektroskoopia kasutamine membraanvalkude struktuuri ja dünaamika uurimiseks võimaldab trüptofaani kiirgus-, ergastus- ja neeldumisspektrite põhjal saada uut informatsiooni valgu konformatsiooniliste muutuste ja dünaamika kohta.

Antud töö eesmärgiks on uurida *Rhodobacter sphaeroides*'e LH2 kompleksis paikneva trüptofaani kiirguse olemust. Töös on kasutatud *Rhodobacter sphaeroides*'e metsiktüübist isoleeritud LH2 kompleksi, mõõtes neeldumis- ja kiirgusspektreid. Töö aluseks on hüpotees, et trüptofaani ergastamise tulemusena tekkivad muutused kajastuvad spektri kuju muutustena, mis annaks informatsiooni trüptofaani panusest fotosünteesi energeetikasse. Töö on teostatud Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi Biofüüsika laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Purpurbakterid ja nende fotosüntees

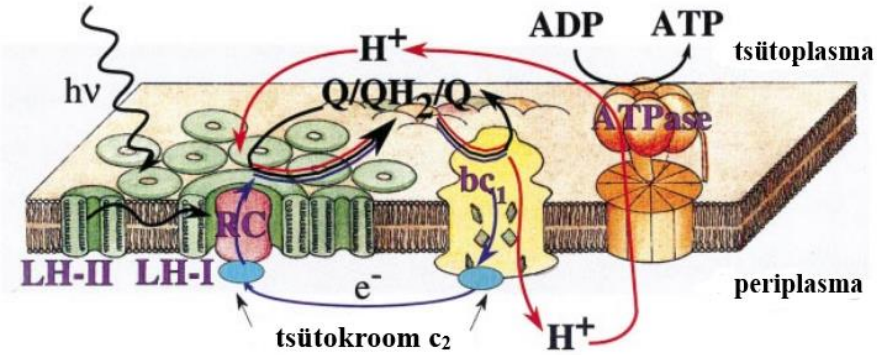
Rhodobacter sphaeroides (*Rb. sphaeroides*) on purpurbakterite hulka kuuluv mitteväävlibakter. Purpurbakterid on fotosünteesivad gramnegatiivsed prokarüoodid sisaldades fotosünteetilisi pigmente: bakterioklorofülle (BChl) ja karotenoide. Need bakterid on selletõttu võimelised anoksügeenseks fotosünteesiks ehk bakteriaalseks fotosünteesiks. Selle protsessi käigus muudavad purpurbakterid valguse energia keemiliseks energiaks. Anoksügeensed fototroofsed purpurbakterid moodustavad ühe osa fototroofsetest mikroorganismidest, kes on võimelised elama nii vesikeskkondades kui ka maismaal (Madigan ja Jung, 2009).

Purpurbakterite fotosüntees algab kui footon on kinni püütud valgust koguva kompleksi (LH) poolt. Ergastamisel tekkinud energia kantakse kiirelt üle reaktsioonitsentrisse (RC), kus seda kasutatakse fotosünteesi protsessis osalevate elektronide transpordi algatamiseks ning membraanilaengute eraldamise läbiviimiseks (van Grondelle *et al.*, 1994). Purpurbakterite fotosünteetiline aparaat on kombinatsioon antennikompleksidest koos RC-ga (Cogdell *et al*., 1999).

1.2. Fotosünteetilise aparaadi ehitus

Fotosünteesivates purpurbakterites on valgust koguvad kompleksid, mida kasutatakse fotosünteetilise valguse kogumiseks. Nende komplekside kogumit nimetatakse fotosünteetiliseks aparaadiks. Purpurbakterites paikneb fotosünteetiline aparaat intratsütoplasmaatilistes vesiikulites ehk kromatofoorides (Şener *et al*., 2007). Kromatofooride abil laiendatakse purpurbakterite efektiivset fotosünteesitavat pinda. Kromatofooride membraani pakitud antennikompleksid püüavad valguskvante, et juhtida see energia RC-sse (Scheuring *et al*., 2014). RC-s toimub laengute eraldumine neeldunud kvandi arvelt ning elektronid kantakse üle kinooniga (Q_B-ga). Selliselt toimuvat protsessi nimetatakse Q-tsükliks (vt joonis 1) (Cooley *et al.*, 2009).

On teada, et purpurbakterite fotosünteetilise aparaadi põhimõte sarnaneb taimede ja tsüanobakterite fotosünteetilise aparaadiga. Mõlemad koosnevad neljast komponendist: valgust koguvatest antennidest, RC-st, bc_1 tsütokroomi oksüreduktaasist ning ATP-süntaasist. Valgust koguvad antennid jaotuvad kaheks kompleksiks: valgust koguv kompleks 2 (LH2) ja valgust koguv kompleks 1 (LH1) (Şener *et al*., 2007). LH2 on perifeerne kompleks, mis püüab footoneid mittekovalentselt seotud pigmentidelt (Scheuring *et al*., 2014).



Joonis 1. (Mugandatud) Purpurbakterite fotosünteetilise aparaadi struktuur. Struktuur koosneb valgust koguvast kompleksist 2 (LH2), reaktsioonitsentrist (RC), mida ümbritseb valgust koguv kompleks 1 (LH1). RC ja LH1 koos moodustavad LH1-RC kompleksi. Joonisel on punase noolega tähistatud prootonite liikumine, sinise noolega on elektronide liikumine ning musta joonega kinooni liikumine (Hu *et al.*, 2002).

1.3. *Rhodobacter sphaeroides*

Rb. sphaeroides on gramnegatiivne purpurne mitteväävlibakter, mis kuulub proteobakterite α-3 alajaotusesse (Woese, 1987). Alates aastast 2020 on klassifitseeritud *Rb. sphaeroides* perekonda *Cereibacter*. Antud töös kasutatakse nimetust *Rb. sphaeroides*. *Rb. sphaeroides* on fakultatiivne fotosünteetiline bakter (Aizawa, 2013). *Rb. sphaeroides* on eraldatud seisuveekogudest ja sügavatest järvedest (Pfennig, 1978). Kuna *Rb. sphaeroides* elab veekogudes, siis tema konkureerib valguse pärast roheliste taimede ja vetikatega, kes sisaldavad klorofülli ja kasutavad spektri sinisemat piirkonda. Selle tulemusena jääb tal võimalus kasutada põhiliselt spektri lähi-infrapunase piirkonda (Cogdell *et al.*, 2006).

Rb. sphaeroides on võimeline kasvama mitmesugustes tingimustes sealhulgas autotroofsetes, fototroofsetes ja anaeroobsetes heterotroofsetes tingimustes, kasutades erinevaid elektronaktseptoreid, nagu dimetüülsulfoksiid (DMSO), trimetüülamiin-N48 oksiid (TMA) ja nitraat (Martínez-Luque *et al*., 1991). *Rb. sphaeroides* on võimeline läbi viima metallide redutseerimist (Moore ja Kaplan, 1992; Nepple *et al*., 2000), lämmastiku sidumist ja süsinikdioksiidi assimilatsiooni (Joshi ja Tabita, 1996). Need biokeemilised protsessid on seotud *Rb. sphaeroides*'e fotosünteesiaparaadiga, mis on olnud anoksügeense fotosünteesi mudeliks.

1.4. LH2 ehitus

Antennikompleksi olulisteks komponentideks on BChl a ja karotenoidid. Karotenoidid on enamasti C_{40} terpenoidid, süsivesinike klass, mis osalevad taime erinevates bioloogilistes protsessides, nagu fotosüntees ja fotomorfogenees (Nisar *et al*., 2015). *Rb. sphaeroides*'es esineb kahe erineva karotenoidi segu: sferoideen ja sferoidenoon. Sferoideen paikneb üldjuhul LH2 kompleksis ning sferoidenooni kasutatakse LH1 kompleksis (Yeliseev *et al*., 1996). BChl

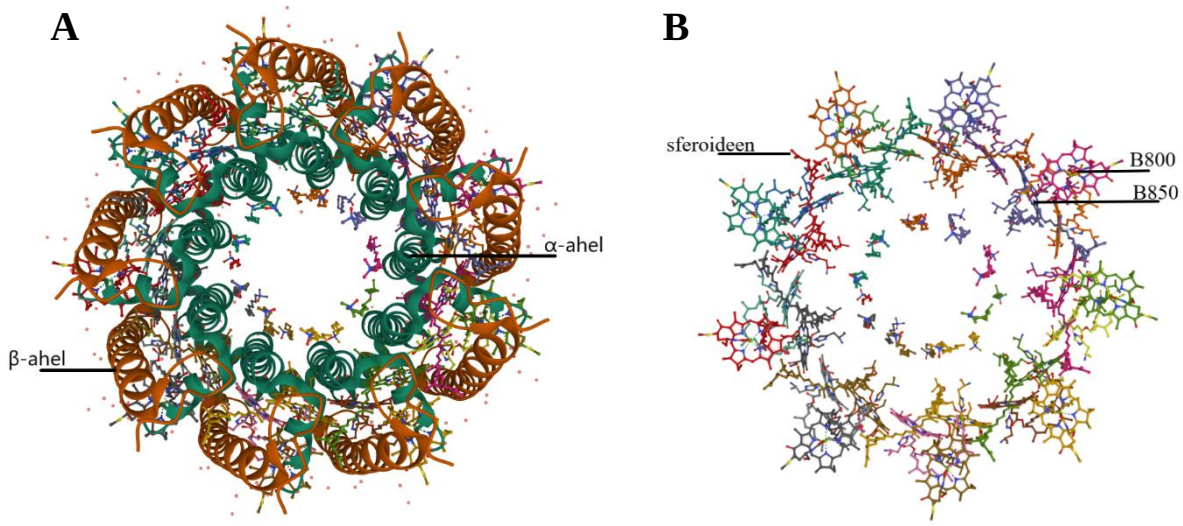
a ning karotenoidide tähtsamad funktsioonid on seotud nii struktuuri kui ka funktsionaalsusega. Mõlemad on seotud nii energia püüdmisega kui ka ergastusenergia suunamisega RC-le, kus toimuvad fotosünteesi esimesed etapid. Karotenoidide peamine funktsioon on seotud energia püüdmisega. Karotenoidid neelavad suure energiaga footoneid ning annavad need edasi B800 BChl-dele (Polívka ja Frank, 2010). Karotenoidid võivad aga vastupidiselt ka hoopis energiat kustutada, hoides sellega ära reaktiivsete hapniku ühendite moodustumise (Clayton ja Smith, 1960; Sistrom *et al.*, 1956).

1.4.1. LH2 struktuur

LH2 kompleks on oligomeer (vt joonis 2A), mis koosneb alfa- ja beeta-apoproteiinide dimeeridest (McDermott *et al.*, 1995). Apoproteiinideks nimetatakse alfa-helikaalseid transmembraanseid valke, mille arvukus on liigiti varieeruv. *Rb. sphaeroides*'es on selliseid paare üheksa. Kompleksi sisesein on moodustunud üheksast alfa-apoproteiini heeliksist, välimine sein aga üheksast beeta-apoproteiini heeliksist. Suurem osa LH2 kompleksi pigmentidest on paigutatud alfa- ja beeta-apoproteiinide vahele jäävasse ruumi (Brunisholz ja Zuber, 1992).

Rb. sphaeroides'i LH2 kompleksi uurimisel on teada saadud, et pigmendid paiknevad kahes korrapärases ringis. Need ringid on moodustunud oligomeeri subühikute vahele ning koosnevad eritüübilistest BChl-dest: B850 BChl a ja B800 BChl a (McDermott *et al.*, 1995). Esimeses ringis on üheksa membraani tasapinnaga paralleelset B800 BChl-i, mille omavaheline interaktsioon on väike. Teise ringi moodustavad üksteisega kattuvad B850 BChl-d (vt joonis 2B). Neid on kokku 18 ning need asetsevad membraani tasapinnaga risti (Cogdell *et al.*, 2006). Number *B*-tähe taga tähendab neeldumismaksimumi, mis on vastaval BChl-l olemas. Seega B800 neeldumismaksimum on 800 nm juures ning B850 neeldumismaksimum on 850 nm juures.

Kuna B850 ringi BChl-d paiknevad tihedalt, põhjustab see π-elektroonsete süsteemide kattumist. Selle tulemusena toimub väga kiire ergastuste ülekanne ringi sees. Valgulisel keskkonnal on täita väga tähtis struktuurne roll ning selle kaudu on võimalik muuta BChl-de neeldumisomadusi. Nimelt valgulise keskkonna muutmisega on võimalik reguleerida BChl-de neeldumisomadusi (Cogdell *et al.*, 2006).



Joonis 2. (Mugandatud) *Rhodobacter sphaeroides*'e valgust koguva kompleks 2 struktuur (LH2) määratud krüogeense elektronmikroskoopiaga (krüo-EM) (Qian *et al*., 2021). Joonisel A on välja toodud tumeoranži värvusega tähistatult kompleksi välimine ring ning tumerohelise värvusega kompleksi sisemine ring. Kompleksi sisering on moodustunud üheksast alfa-proteiini heeliksist, välimine ring aga üheksast beeta-proteiini heeliksist (Cogdell *et al*., 2006). Jooniselt B on eemaldatud polümeerid (sisemine ja välimine ring) ning alles on jäänud ainult ligandi osa. Ligandi hulka kuuluvad joonisel ära märgitud karotenoid sferoideen, B800 ja B850. Esimeses ringis on üheksa membraani tasapinnaga paralleelset B800 bakterioklorofülli. Teise ringi moodustavad 18 membraani tasapinnaga risti asetsevat B850 bakterioklorofülli (Cogdell *et al*., 2006). Molekulid, mis moodustavad joonise B sisemise ringi on valgu struktuuri seostunud detergent. Struktuur on saadud Protein Data Bank (pdb) andmebaasist ja mugandatud programmiga UCSF Chimera.

LH2 antenn on perifeerne ja koosneb polüpeptiidi heterodimeeridest (α- ja β-subühikud), mis on paigutatud ringikujuliselt. Iga heterodimeer koosneb kolmest BChl a molekulist. Kaks BChl-i molekuli on igas heterodimeeris tihedalt seotud ning moodustavad suure ringikujulise struktuuri, mis neeldub 850 nm juures. Kolmas BChl-i molekul on nõrgemalt seotud ning neeldub 800 nm juures (van Oijen *et al*., 1999). Valgu ja BChl-i molekulide vahel toimuvad interaktsioonid annavad süsteemile struktuurse stabiilsuse. Kuna BChl-id on kindlatele positsioonidele fikseeritud ja seotud, siis annab see struktuurile väga kõrge energia ülekande efektiivsuse (Cogdell ja Gardiner, 2001).

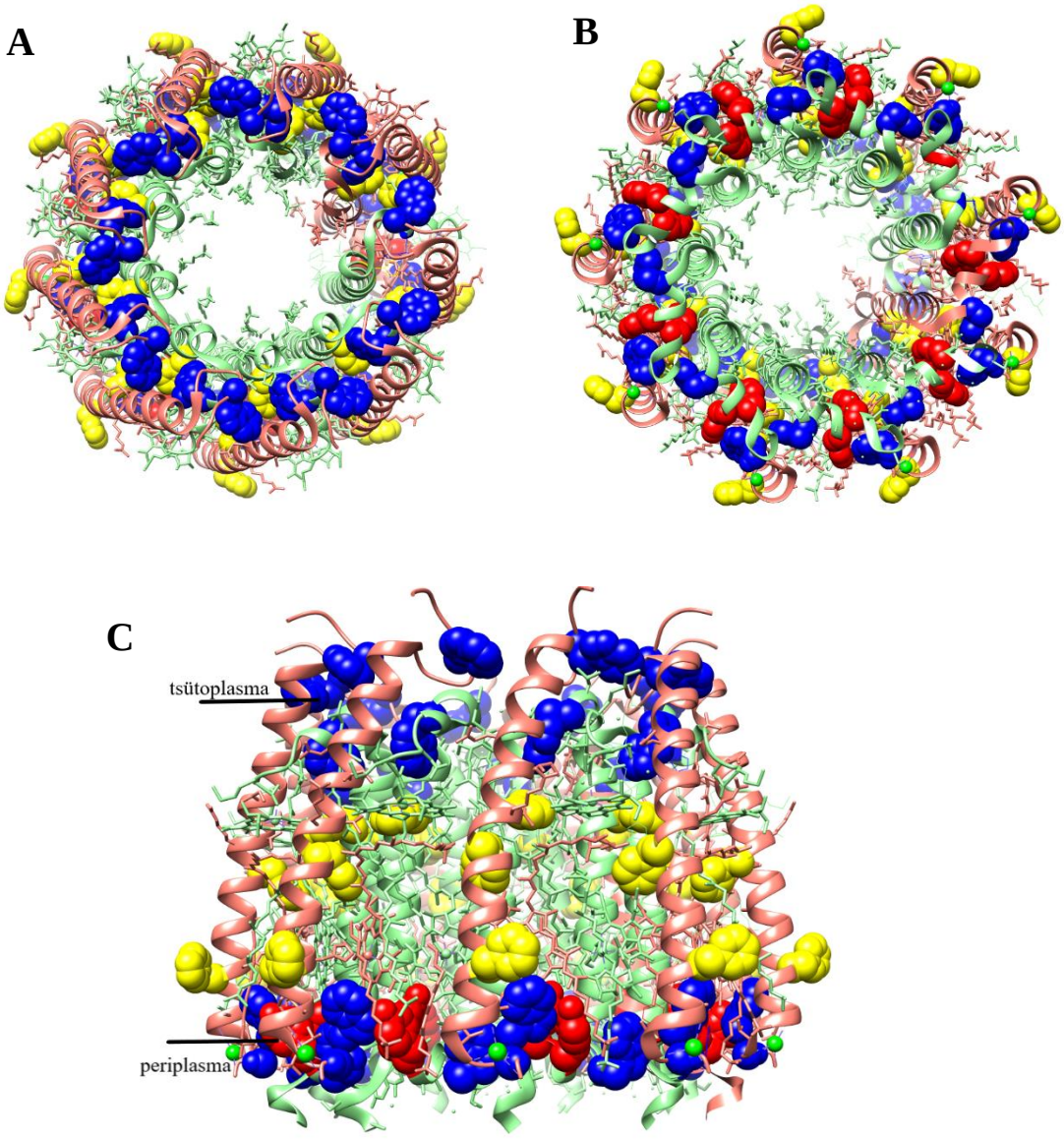
1.4.2. Aromaatsed aminohapped LH2 kompleksis

Rb. sphaeroides'e LH2 kompleksi α- ja β-ahela aminohapete järjestus on toodud tabelis 1. LH2 membraanvalgu dimeeris valgu ahela paari kohta on spetsiifiliselt paigutunud 4 Trp jääki, 2 Tyr jääki ja 3 Phe jääki.

Tabel 1. Tabelis on välja toodud fluorestseeruvad aminohappejäägid (Tyr, Y; Phe, F; Trp, W) *Rb. sphaeroides*'e LH2 α- ja β-polüpeptiidide järjestuses (Uniprot).

Rb. sphaeroides	Aminohappe järjestus
α-ahel	MTNGKI**W**LVV KPTVGVPL**F**L SAAVIASVVI HAAVLTTTT**W** LPA**YY**QGSAA VAAE
β-ahel	MTDDLNKV**W**P SGLTVAEAEE VHKQLILGTR V**F**GGMALIAH **F**LAAAATP**W**L G

Joonisel 3 on toodud aromaatsete aminohapete ruumiline paigutus LH2 krüogeense elektronmikroskoopiaga (krüo-EM) määratud struktuuris (vt joonis 3) (Qian *et al.*, 2021). LH2 kompleks on membraani paigutunud sel viisil, et membraane kaksikkiht moodustab vöö ümber valgu keskse hüdrofoobse silindrilise osa (vt joonis 3C). Valgu ahela C-terminaalne ots on periplasmaatilises osas ja N-terminaalne ots paikneb tsütoplasmaatilises keskkonnas *(*Wang *et al.*, 2002). Trüptofaanid on paigutunud sel viisil, et pooled on valgu silindri ühes otsas (tsütoplasmas) ja kaks paiknevad teises otsas (periplasmas). Tsütoplasmaatilise osa üks kahest Trp-st on eksponeeritud veele (vt joonis 3A ja 3C) ning teine Trp paikneb sügavamal valgu sisemuses. Türosiinid paiknevad ainult periplasmaatilises osas ja Trp-ga samas kihis (vt joonis 3B ja 3C) ning võivad olla samuti eksponeeritud veele (Schiffer *et al.*, 1992). Fenüülalaniinid paiknevad eranditult membraaniga kaetud hüdrofoobses kihis (García-Martín *et al.*, 2008).



Joonis 3. Aromaatsete aminohapete (trüptofaan, türosiin ja fenüülalaniin) paiknemine *Rb. sphaeroides*'e LH2 kompleksis (pdb). Joonise töötlemisel UCSF Chimera programmiga on sinise värviga tähistatud joonisel trüptofaani molekulid, kollase värviga on fenüülalaniini molekulid ning punase värviga türosiini molekulid. Heleroosa ja helerohelise värvusega on joonisel tähistatud *Rb. sphaeroides*'e LH2 kompleksi teised komponendid (vt joonis 2).

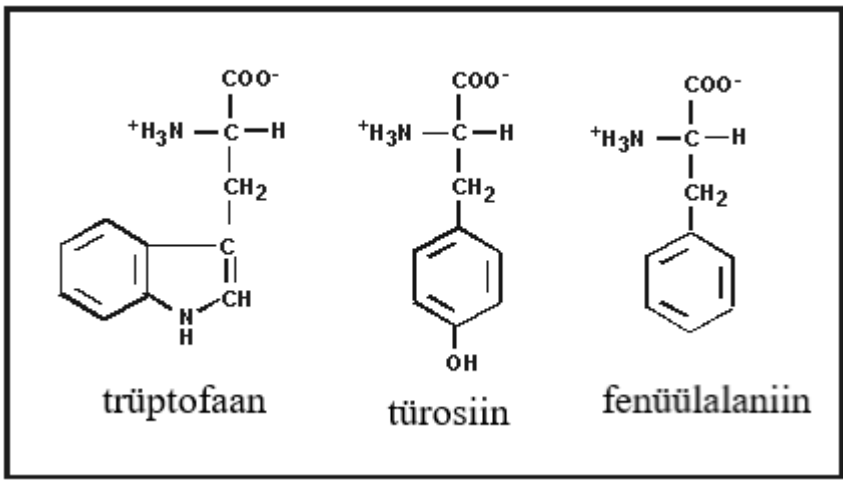
1.5. Fluorestsents valkudes

Fluorestsents on üks fotoluminestsentsi liikidest, mis on määratud elektronoleku ja energia kiirgumise mehhanismi põhjal (Verhoeven, 1996). Fluorestsentsiks nimetatakse molekulide omadust, mille abil saavad molekulid neelatud valgusfootonite toimel ergastuda kõrgema energiaga singletsesse olekusse (kõik elektronid on paardunud) ja tagasi põhiolekusse kui toimub relakseerumine (Lakowicz, 1999). Peptiidide ja valkude fluorestsents on tingitud looduslikest fluorofooridest, mida leidub kõikidest valkudest. Fluorofoorid on keemilised ühendid ja neid iseloomustab omadus neelata valgust kindlal lainepikkusel ning kiirata valgust sellest pikemal lainepikkusel. Valkudes esineb peamiselt fluorofoorina Trp, kuid leidub ka Tyr.

Fluorestsentsi teket valkudes põhjustavad Trp jäägid ja nende jääkide indoolituum, mis on väga tundlik ja keeruline fluorofoor. Trp, indool ja nende ühendite derivaadid on väga tundlikud lahusti polaarsuse suhtes ning selle tulemusena võivad Trp-jääkide emissioonispektrid väljendada ümbritseva keskkonna polaarsust (Lakowicz, 1983).

1.5.1. Aromaatsed aminohapped

Aminokarboksüülhapped ehk aminohapped on orgaanilised ühendid sisaldades kahte funktsionaalset rühma ning aminohappespetsiifilist kõrvalahelat. Funktsionaalseteks rühmadeks on aminorühm (-NH_2) ja karboksüülrühm (-COOH). Aminohappeid klassifitseeritakse erinevatel viisidel: struktuuri alusel, polaarsuse, kõrvalahela tüübi põhjal või pH-väärtuse järgi. Üheks eraldi aminohapete klassiks on aromaatsed aminohapped (Meister, 1957). Aromaatsed aminohapped on molekulid, milles esineb benseeniring. Need on fenüülalaniin (Phe), türosiin (Tyr) ja trüptofaan (Trp) (vt joonis 4) (Sprenger, 2006).



Joonis 4. (Mugandatud) Trüptofaani, türosiini ja fenüülalaniini keemilised struktuurid (Held, 2003).

Aromaatsed aminohapped neelavad ultraviolettvalgust (UV) lainepikkustel üle 250 nm ning saadakse fluorestsents. Phe neeldumismaksimum on 260 nm juures ning Tyr ja Trp neeldumismaksimumid on 280 nm juures. On leitud, et Tyr neeldumismaksimum on mõne võrra väiksem kui Trp neeldumismaksimum. Need neeldumismaksimumid on aluseks, et määrata valkude kontsentratsiooni lainepikkusel 280 nm, kasutades lihtsat spektrofotomeetrilist mõõtmist (Sprenger, 2006).

1.5.2. Trüptofaan

Trüptofaan on ainulaadne oma füüsikalis-keemiliste omaduste poolest. Tegemist on aromaatse asendamatu aminohappega, mis erineb Tyr-st ja Phe-st selles poolest, et omab külgahelas indoolitsüklit, mis omakorda koosneb benseeniringist ja sellega ühendatud pürroolitsüklist

(Khemaissa *et al*., 2021). Trp üheks omaduseks on neelata ja emiteerida valgust UV-piirkonnas, mis võimaldab kasutada Trp-i fluorestsentsi lainepikkust vahendina valkude struktuuri muutuste ja dünaamika uurimiseks (Vivian ja Callis, 2001). Analüüsides aminohapete jaotust valkudes, on leitud et Trp paikneb enamasti transmembraansetes valkudes, kus see moodustab 3,3% aminohapete koostisest (von Heijne, 1986). Erinevad uurimisrühmad on loonud aminohapete hüdrofoobsuse/hüdrofiilsuse skaalasid ning nende põhjal on Trp oma omadustelt hüdrofoobne. Küll võib aga indoolitsüklis olev lämmastik põhjustada vesiniksideme teket, mis mõjutab valgu lahustuvust (Khemaissa *et al*., 2021). Kui võrrelda trüptofaani türosiini ja fenüülalaniiniga, siis Trp luminestsentsomadused on nendest kahest teisest aromaatsest aminohappest tugevamad. See on peamiseks põhjuseks, miks Trp on peamiseks valkudes olevaks fluorofooriks (Lakowicz, 2006).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Eelnevalt on uuritud fotosünteetilisi valk-pigment komplekse kasutades infrapunaspektroskoopiat, millega mõõdetakse pigmendi (klorofülli) spektreid. Kuna kompleks koosneb kahest osast, valgust ja pigmendist, siis on hakatud rohkem uurima ka valkude spektreid. On teada, et valgu spektrites domineerivad eelkõige trüptofaan ja türosiin. Valgu spektrite uurimise põhieesmärgiks on aru saada, kas need valgud esinevad ainult struktuurse materjalina valk-pigment kompleksides (hoiavad neid paigal ehk fikseerivad struktuuri) või on need valgud seotud ka energeetikaga.

Antud töö eesmärgiks on uurida fotosünteetilise purpurbakteri *Rb. sphaeroides*'e WT-st isoleeritud LH2 kompleksis leiduva trüptofaani (Trp) kiirguse olemust. Kõikidest valkudest umbes 30-40% moodustavad membraanvalgud, kuid nende struktuursete omaduste uurimine võrreldes vees lahustuvate valkudega on keeruline. Selle uurimiseks kasutatakse asjaolu, et põhilised valgu enda kiirgusesse panustavad aminohapped (Trp, Tyr, Phe) eelistavad valgu sees koonduda piirkondadesse, mis ühtivad lipiidmembraani ja vesikeskkonda eraldavate piirkihtidega. Trp reageerib väga tundlikult valku ümbritseva keskkonna omaduste muutustele. Sellepärast võib Trp kiirgusspektri uurimisel saada väga olulist informatsiooni valgu konformatsiooniliste muutuste ja nende dünaamika kohta.

Eelöeldust tulenevalt oli antud bakalaureusetöö ülesanneteks

- *Rb. sphaeroides*'e WT-st isoleeritud LH2 kompleksi neeldumis- ja kiirgusspektrite mõõtmine;
- kiirgusspektrite alusel uurida Trp ja Tyr kiirguse osakaalu valkude UV kiirguses ning uurida võimalust Trp kiirguse kasutamiseks valkude dünaamika uurimiseks;
- vastavatele kiirgusspektritele arvutada sobivad ergastusspektrid;
- neeldumis- ja ergastusspektrite võrdlemise tulemusena tuvastada, kas valgud panustavad fotosünteesi energeetikasse või esinevad ainult struktuurse materjalina valk-pigment kompleksides.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Uuritav proov ja kasutatavad vahendid

Töös kasutati uurimisobjektina *Rb. sphaeroides*'e WT-st isoleeritud LH2 kompleksi, mis on valmistatud John D. Olseni poolt Sheffieldi Ülikoolis Suurbritannias. Tegemist on *Rb. sphaeroides*'e deletsioonitüvega, mis sisaldab ainult perifeerset valgust koguvat kompleksi LH2. Seda tüve kasvatati ja isoleeritud kompleksid valmistati vastavalt meetoditele, mida on Olsen varasemas töös kasutanud (Olsen *et al.*, 1994). Madalal temperatuuril (-80 °C) säilitatud objekt sulatati enne mõõtmisi ja lahjendati sobiva kontsentratsioonini 10 mM Tris-HCl pH 7.5 puhverlahuses. Lisaks sisaldas puhverlahus 1 % β-OG detergenti, et isoleeritud kompleksid ei agregeeruks mõõtmise käigus. Mõõtmistel kasutatud objekti optiline tihedus 2 mm paksuses küvetis oli väiksem kui 0,1 optilise tiheduse ühikut mõõtmispiirkonnas. Kui objekti optiline tihedus oleks suurem, siis võib tekkida nähtus, mida nimetatakse reabsorptsiooniks. Selle käigus valgus, mis kiirgub molekulist välja, jõuab enne detektorini jõudmist uuesti neelduda (kui neeldumine on suur) ning selle tulemusena on võimeline uuesti kiirgama. See aga moonutab omakorda spektri kuju.

Kuna antud töös suur osa mõõtmistest on sooritatud UV-piirkonnas, siis on väga oluline, et mõõtmiste jaoks kasutatav puhver ise ei neelaks valgust vastavas UV-piirkonnas. Katsetades veendusime, et Hepes puhvril on tugev neeldumine 200 – 250 nm piirkonnas ehk puhver neelab kogu signaali ära ning mõõtmisi ei ole võimalik teostada. Seetõttu kasutatakse antud töös võimalikult lahjat Tris puhvrit, et neeldumine oleks minimaalne. Neeldumis- ja kiirgusspektrite mõõtmiste sooritamiseks kasutati kvartsküvetti paksusega 2 mm.

Korrektsete tulemuste saamiseks on vaja mõõta kõigepealt puhvri jaoks nii neeldumis- kui ka kiirgusspektrid. Seejärel lisatakse puhvrisse juurde sobivas koguses kontsentreeritud objekt. Järgnevalt mõõdetakse objekti spektrid ning andmete töötlemisel lahutatakse objekti spektritest maha samadel tingimustel mõõdetud puhvri spektrid ja nii saadakse ainult molekulidele vastav spekter.

2.2.2. Neeldumisspektrite mõõtmine

Neeldumisspektrite mõõtmiseks kasutati Agilent Technologies aparatuuri Cary 60 UV-Vis. Tegemist on standardse spektrofotomeetriga, mis võimaldab mõõta neeldumisspektreid laias spektri piirkonnas. Ksenoonlambi abil on võimalik mõõta neeldumisspektreid alates 200 nm-st kuni 1100 nm-ni. Töös kasutatavad neeldumisspektrid mõõdeti 1 nm sammuga ning

lahutusvõimega 1 nm, kasutades skaneerimiskiirust 600 nm/minutis. Ergastusspektritega võrdlemiseks vajaliku lineaarskaalas oleva neeldumisspektri arvutamiseks kasutati neeldumisspektri ja läbilaskvusspektri vahelist logaritmilist seost. Selleks seoseks on A= -log(T), kus A on neeldumisspekter (*absorbance*) ja T on läbilaskvusspekter (*transmissioon*).

2.2.3. Kiirgusspektrite mõõtmine

Rb. sphaeroides'e isoleeritud LH2 kompleksi infrapunakiirgusspektrite (IR) (BChl) ja UV (Trp) kiirgusspektrite ning puhverlahuse UV kiirgusspektrite mõõtmiseks kasutati Chirascan Plus CD spektromeetrit, mis on firma Applied Photophysics toode. Erinevatel lainepikkustel ergastamiseks kasutati Chirascan-i UV-lampi koos arvutisse paigaldatud Chirascan-i programmiga, mis võimaldas seda lampi vastavalt soovitud tingimustele skaneerida ja valida sobivaid lainepikkusi. UV kiirgusspektrite mõõtmisel (nii objekt kui ka puhverlahus) sooritati ergastamised 2 nm sammudega, vahemikus 200 nm – 310 nm. Ergastuslambi spektraalseks laiuseks oli valitud 3 nm. Kiirgussignaali mõõtmiseks oli Chirascan-i külge ühendatud Kymera monokromaator (Oxford Instruments), mis lahutas objektist tuleva kiirguse spektriks. UV kiirgusspektrite korral kasutati võre 300 j/mm (difraktsioonivõre joonte arv millimeetri kohta), registreerivat pilu laiusega 2 nm. Spektri registreerimiseks vastavat signaali loeti CCD (*charge-coupled device*) kaameraga. Kogumisajaks oli 10 sekundit ning mõõtmised sooritati ilma ergastavat lampi lõikava filtrita.

IR kiirgusspektrite mõõtmisel kasutati sama mõõtmissüsteemi. Ergastamised sooritati 5 nm sammudega, vahemikus 200 nm – 650 nm. Kogumisajaks oli 2 sekundit ning mõõtmistel kasutati ergastust lõikavat filtrit 700LP.

2.2.4. Andmete analüüs ja metoodilised märkused

UV-s teostatavad mõõtmised on keerulisemad kui nähtavas ja IR kiirguse piirkonnas tehtavad mõõtmised. UV tingimustes korrektse mõõtmise läbi viimiseks kasutatavate seadmete kõik detailid peavad olema sellised, mis UV valgust ei neelaks. Kõik optilised elemendid, mida UV kiirgus läbib – läätsed, filtrid, küvetid – peavad olema valmistatud kvartsist. Samuti tuleb jälgida, et objekti lahjendamiseks kasutatud lahused omaksid minimaalset neeldumist ja kiirgusvõimet aktuaalses UV piirkonnas.

Kõik töös esitatud kiirgusspektrid ja neeldumisspektrid on parandatud baasjoonele (puhvrist tulevale kiirgusele või neeldumisele ehk objekti spektritest on maha lahutatud puhverlahuse spekter) ja kiirgusspektrid parandatud vastavale mõõtesüsteemi spektraalsele tundlikkusele.

Ergastusspektrite arvutamiseks vajalik UV ergastuslambi spekter mõõdeti iseseisvas eksperimendis piirkonnas 200 – 650 nm, kasutades firma Spectra Physics võimsusemõõtjat.

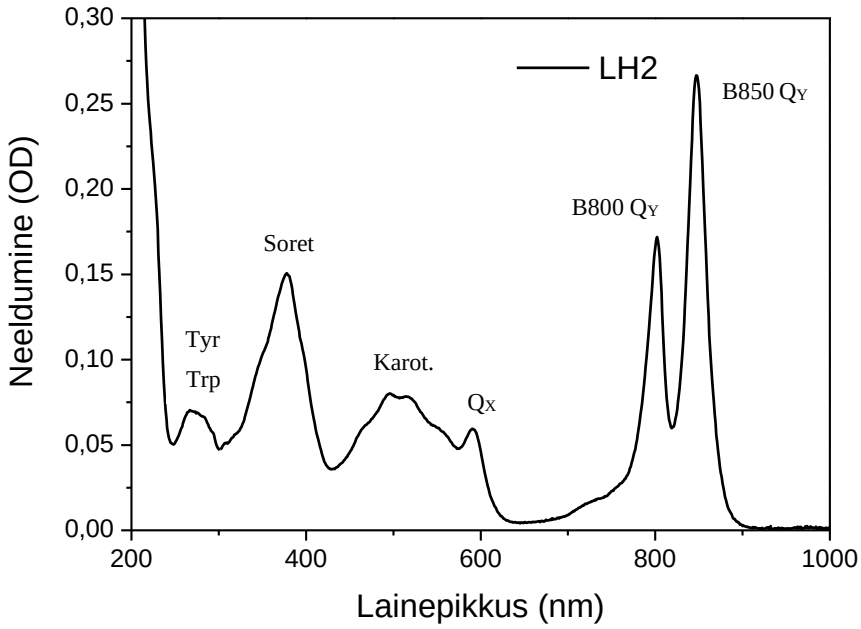
Andmete töötlemiseks ja jooniste tegemiseks kasutati programmi Origin 6.0 (Microcal Software).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1. Neeldumisspekter

Fotosünteetilisi valk-pigment komplekse iseloomustavad laiad neeldumisspektrid, mis koosnevad rohkelt kattuvatest neeldumisribadest. Need neeldumisribad on iseloomulikud erinevatele molekulidele, mis on optiliselt aktiivsed.

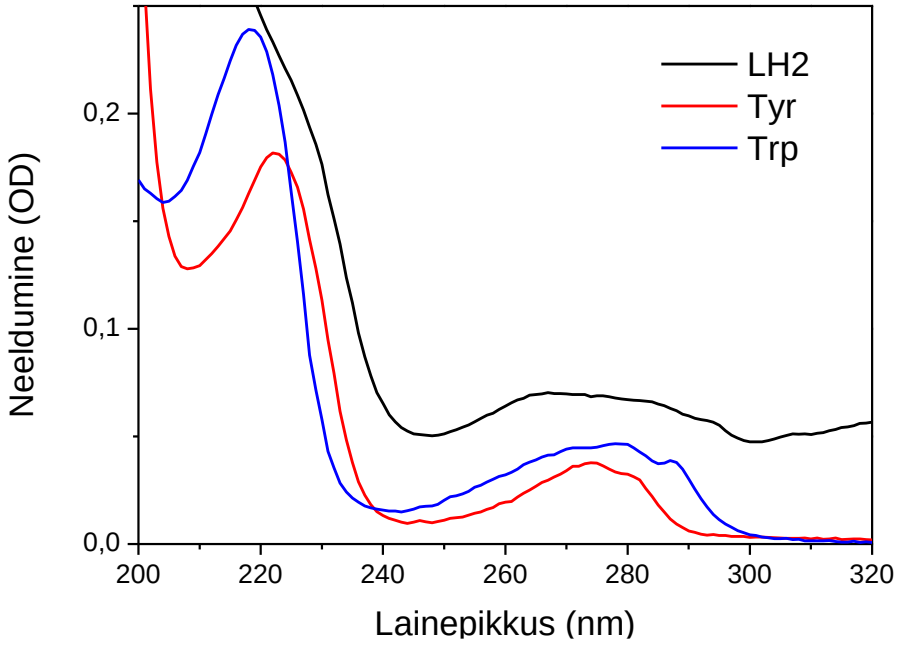
Rb. sphaeroides'e puhastatud LH2 kompleksi neeldumisspekter on esitatud joonisel 5. Neeldumine kirjeldab seda osa valgusest, mida objekt on võimeline ära neelama. *Rb. sphaeroides*'e Q_Y neeldumisriba (tähistab madalaima energiaga elektronüleminekut) BChl a molekulide jaoks paikneb vastavalt kas 850 nm (B850) või 800 nm (B800) juures. Q_X ülemineku maksimum paikneb nii B850 kui ka B800 jaoks 590 nm piirkonnas. Edasi on karotenoidide neeldumisriba, millele järgneb Soret riba. Need 4 riba moodustavad neeldumisspektri ühe osa – pigmentide neeldumise. Neeldumisspektri teise osa moodustab valkude neeldumine. Seda iseloomustab UV-neeldumisriba.



Joonis 5. *Rb. sphaeroides*'e puhastatud LH2 kompleksi neeldumisspekter. Neeldumisspekter jaguneb valkude neeldumiseks ja pigmentide neeldumiseks. Joonisel on välja toodud pigmentide neeldumist iseloomustavad BChl a molekulide Q_Y ja Q_X neeldumisribad, karotenoidide neeldumisriba ja Soret neeldumisriba. Valkude neeldumist UV-piirkonnas iseloomustab sekundaarstruktuuride neeldumisriba ning aromaatsete aminohappejääkide (Tyr, Trp) neeldumisriba.

Joonisel 5 on *Rb. sphaeroides*'e valgust koguva antenni LH2 neeldumisspekter, mis on mõõdetud vahemikus 200 – 1000 nm. Spektri alguses leiab aset valkudes toimuv UV-valguse neeldumine. UV-valgus on kõrge energiaga ja lühemalaineline 200 – 300 nm valgus. Valkudes toimuvat UV-valguse neeldumist iseloomustab kahe neeldumisriba tekkimine spektri alguses. Esimese neeldumisriba moodustumisega 220 nm juures on seotud sekundaarstruktuurid ning 280 nm juures tekkivasse neeldumisribasse panustavad valkude aromaatsed aminohappejäägid. Peamiselt annavad oma panuse Trp ja Tyr. Vähesemal määral panustab Phe (Lakowicz, 2006). Kuna pigmendid neelavad ka UV piirkonnas, siis nende neeldumine kattub valkude neeldumisega. Neelduvad erineva lainepikkusega (300 – 1000 nm) footonid. Selleks, et vastavaid komponente üksteisest eraldada on vaja kasutada ergastusspektreid. Pigmentide neeldumise vahemikus moodustavad ühe neeldumisriba karotenoidid. Energia, mis karotenoidi neeldub, kandub BChl üle. Karotenoidid püüavad footoneid vahemikus 400-600 nm (Croce *et al.*, 2018). Karotenoidid hajutavad liigset kiirgusenergiat ning aitavad säilitada valk-pigment komplekside struktuuri terviklikkust. Karotenoidid on valk-pigment kompleksidega mittekovalentselt seotud (Britton, 1993; Kühlbrandt *et al.*, 1994). Spektri lõpu osas toimuva pigmentide neeldumise tulemusena tekib kaks neeldumismaksimumi. Esimene neeldumismaksimum on 800 nm (B800) juures ja teine neeldumismaksimum on 850 nm (B850) juures.

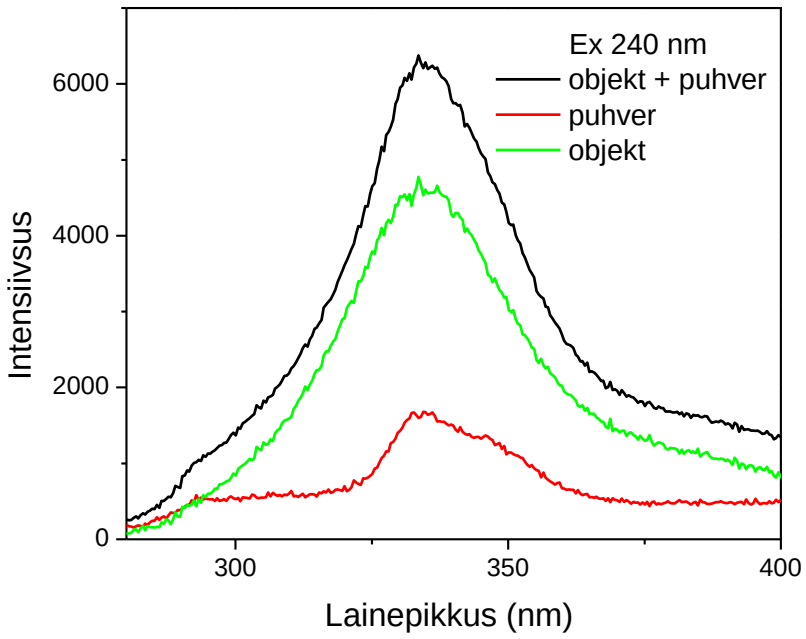
Töös kasutatava uurimisobjekti *Rb. sphaeroides*'e valgust koguv antenn LH2 sisaldab valgumolekule, BChl molekule, karotenoidi molekule ning veel muid komponente, mis neelavad valgust. Joonisel 6 on välja toodud 280 nm piirkonnas *Rb. sphaeroides*'e valgust koguva antenni LH2 neeldumisspekter (musta joonega). Kuna valkude neeldumisega seotud teise neeldumisriba (280 nm) tekkesse panustavad Trp ja Tyr, siis on joonisele 6 lisatud võrdluseks Trp ja Tyr neeldumisspektrid. Trp ja Tyr neeldumisspektrid on mõõdetud puhverlahuses. Kõikidele molekulidele on omane neid iseloomustav neeldumisvõime, mis näitab seda, kui palju valgust mingi molekul on suuteline neelama. Tyr-i neeldumisvõime on Trp-i omast palju väiksem ja seetõttu on potentsiaalselt Tyr kiirgus väiksem.



Joonis 6. *Rb. sphaeroides*'e puhastatud LH2 kompleksi, Tyr ja Trp neeldumisspektrite võrdlus. Joonisel on töötlemise tulemusena saadud neeldumisspektrid, mis on fokuseeritud 280 nm piirkonnale. Musta joonega on joonisel LH2 kompleksi neeldumisspekter. Punase joonega on Tyr neeldumisspekter puhverlahuses ning sinise joonega Trp neeldumisspekter puhverlahuses.

2.3.2. UV-s mõõdetud kiirgusspektrite parandamine

Antud töös on mõõtmiste sooritamise jaoks viidud objekt puhverlahusesse. Puhverlahuse valmistamiseks valiti Tris puhver, mis UV-piirkonnas neelaks minimaalselt. Puhverlahuse neelamist ei ole võimalik täielikult elimineerida. Seega annab ka puhver meile omapoolse signaali, mis mõjutab puhverlahusesse viidud objekti kiirgusspektrit. Selle tõttu on mõõtmistulemuste töötlemisel vaja maha lahutada puhverlahuse kiirgusspekter, et saada objekti kiirgusspekter.



Joonis 7. *Rb. sphaeroides*'e WT-i isoleeritud LH2 kompleksi UV-piirkonnas mõõdetud kiirgusspektri parandus. Joonisel on töötlemise tulemusena saadud objekti kiirgusspekter (roheline joon), mis on ergastatud lainepikkusel 240 nm ning parandatud puhvrist tulevale kiirgusele.

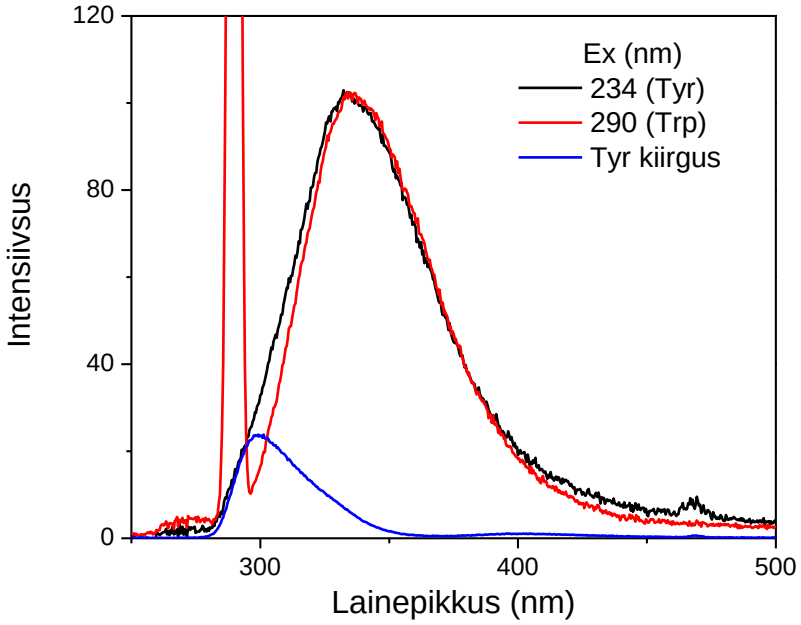
Joonisel 7 on näidatud, milline mõju puhvri signaalil puhvrisse viidud objekti kiirgusspektrile on. Joonise tegemiseks valiti ergastamiseks kasutatud lainepikkus 240 nm. Kui võrrelda omavahel joonisel 7 toodud musta joonega tähistatud objekt + puhver kiirgusspektri intensiivust punase joonega tähistatud puhvri kiirgusspektri intensiivsusega, siis on näha et objekt + puhver intensiivsus on palju suurem kui puhvri intensiivsus. Selleks, et saada ainult objekti kiirgusspekter (joonisel 7 rohelise joonena), on vaja puhvri signaal maha lahutada. Lahutamise tulemusena saadud spektrid on vaja parandada vastavale mõõtesüsteemi spektraalsele tundlikkusele. Mõõtepiirkonna servades, s.o 200 – 210 nm ja 300 – 310 nm on puhvri signaal võrreldav või isegi suurem kui objekti signaal ning seetõttu pole nendes piirkondades parandatud spektrid piisavalt usaldusväärsed korrektsete tulemuste saamiseks.

2.3.3. UV kiirgusspektrite võrdlus

Neeldumisspektrite analüüsi tulemusena (joonis 6) selgus, et kui viia läbi ergastamine piirkonnas 200 – 300 nm, siis töös kasutatava uurimisobjekti UV fluorestsentsi ribas peaks esinema 2 kiirgust. Ühe kiirgusena peaks olema näha Tyr kiirgus ning teise kiirgusena Trp kiirgus. Kahe erineva kiirguse nägemiseks tuleks valida ergastamiseks sellised lainepikkused, kus ühel lainepikkusel ergastub rohkem üks aromaatsetest aminohappejääkidest ning teisel lainepikkusel teine aromaatne aminohappejääk. Tyr on võimalik ergastada Trp-ga sarnastel lainepikkustel, kuid see kiirgab Trp-st erinevatel lainepikkustel (Lakowicz, 2006). Kui ergastada ~234 nm (Tyr ergastub rohkem) või 290 nm (Trp ergastub rohkem) peal, siis peaksid

joonisel 6 esitatud spektrid omavahel erinema. Spektrite kujus (joonis 6) peaks olema näha mingisugune iseärasus, sest Tyr kiirgab palju sinisemas piirkonnas kui Trp.

Kiirgusspekter on oma olemuselt lainepikkuse funktsioon, mis sõltub kiiratud valguse intensiivsusest. Joonisel 8 on valitud kaks kiirgusspektrit, mida on ergastatud erinevatel lainepikkustel.



Joonis 8. Parandatud kiirgusspektrite võrdlus. Joonisel on töötlemise tulemusena saadud objekti parandatud kiirgusspektrid, mis on ergastatud vastavalt lainepikkustel 234 nm (musta joonega) ja 290 nm (punase joonega). 234 nm ergastatud lainepikkusega kiirgusspektris on rohkem ergastatud Tyr ning 290 nm ergastatud lainepikkusega kiirgusspektris on rohkem ergastatud Trp. Lisaks on joonisel sinise joonega Tyr kiirgusspekter puhverlahuses.

Musta joonega on joonisel 8 kiirgusspekter, mida ergastati lainepikkusega 234 nm ja punase joonega on kiirgusspekter, mis on ergastatud lainepikkusega 290 nm ehk see kiirgusspekter on mõõdetud spektri punases osas. Tegemist on kiirgusspektriga, kus ei ole enam Tyr, kuna Tyr ei ole enam võimeline sellisel lainepikkusel neelama.

Tyr kiirgus on Trp kiirgusest palju nõrgem ning selle maksimumpunkt on ligikaudu 305 nm juures (Ferreira *et al.*, 1994). Joonisel 8 on sinise joonega tähistatud meie poolt mõõdetud Tyr kiirgusspekter maksimumiga ~298 nm juures. Tyr ei ole nii tundlik ümbritseva keskkonna suhtes kui Trp ehk Tyr spekter ei muutu väga palju. Tyr spekter võiks olla seega enam-vähem ühesugune nii puhverlahuses kui ka valgu keskkonnas. Trp domineeriva kiirguse tõttu tuleks Tyr fluorestsentsi jälgida valkudes, milles puuduvad Trp jäägid (Lakowicz *et al.*, 1995). Joonisel 8 on näha, et Tyr spekter, mille maksimum asub 298 nm juures, annab oma panuse ning see kajastub ka spektri kujus.

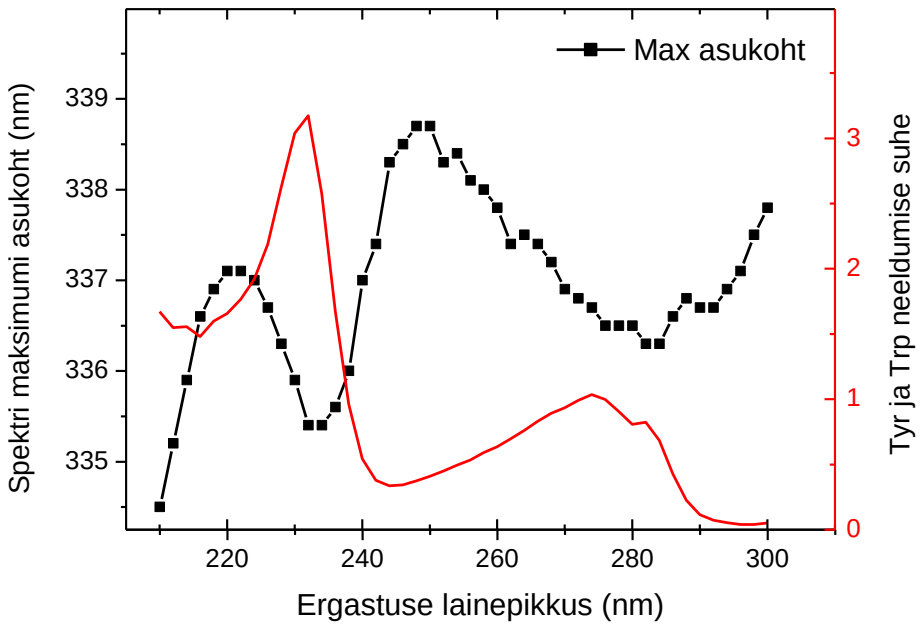
Musta joonega tähistatud kiirgusspektris on kõige rohkem ergastatud Tyr. Kui neid kahte spektrit omavahel võrrelda, siis on näha, et sinises spektri osas on Tyr panus tugevam. Toimub spektri sinisesse nihkumine ehk spektri sininihe tugeva Tyr ergastuse korral.

Fluorestsentsi kiirgusspekter näitab teavet fluorofoori ümbritseva keskkonna polaarsuse kohta (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Demchenko *et al.*, 2009; Raghuraman ja Chattopadhyay, 2003). Täpsemalt, kui keskkonnatundlik fluorofoor muudab oma asukohta polaarsest keskkonnast (vesikeskkonnast) mittepolaarsesse (membraani) keskkonda, suureneb kiirgusspektri fluorestsentsi intensiivsus koos fluorestsentsi kiirgusmaksimumi nihkega lühemate lainepikkuste suunas (sinine nihe). Seega saab neid muutusi järgides jälgida peptiidide/valkude jaotumist vesilahuse ja membraanide vahel (Ho *et al.*, 2013; Koehorst *et al.*, 2008; Kyrychenko ja Ladokhin, 2018; Raghuraman ja Chattopadhyay, 2004).

Trp lahuses on hästi pikalaineline. Sõltuvalt lainepikkusest, millega ergastatakse, on näha, et spektri punane osa on enam-vähem ühesugune, aga sinises osas on näha erinevused. Erinevused võivadki tulla, kas Tyr panusest või hoopis Trp-st endast. Järgmises osas üritatakse kogu ergastuspiirkonnas mõõdetud spektrite parameetrite sõltuvuse järgi aru saada, millised komponendid spektrites võivad esineda.

2.3.4. Kiirgusspektrite maksimumi asukoha spektraalne sõltuvus

Homogeensed ja mittehomogeensed protsessid mõjutavad spektrite laienemist. Mittehomogeense laienemisega on seotud lokaalsed erinevused keskkonnas, mis ümbritsevad pigmente. Homogeenset laienemist põhjustavad elektroni ergastatud oleku eluiga ning vastava molekuli ja seda ümbritseva keskkonna vahel toimuv interaktsioonide kõrgsageduslik kõikumine.



Joonis 9. Parandatud kiirgusspektrite maksimumi asukohtade ja Tyr/Trp suhte võrdlus. Joonisel on töötlemise tulemusena saadud objekti parandatud kiirgusspektritele arvutatud maksimumide asukohad (musta joonega). Punase joonega on joonisel varasemalt puhverlahuses mõõdetud Tyr ja Trp neeldumisspektrite suhe (Tyr suhe Trp-i).

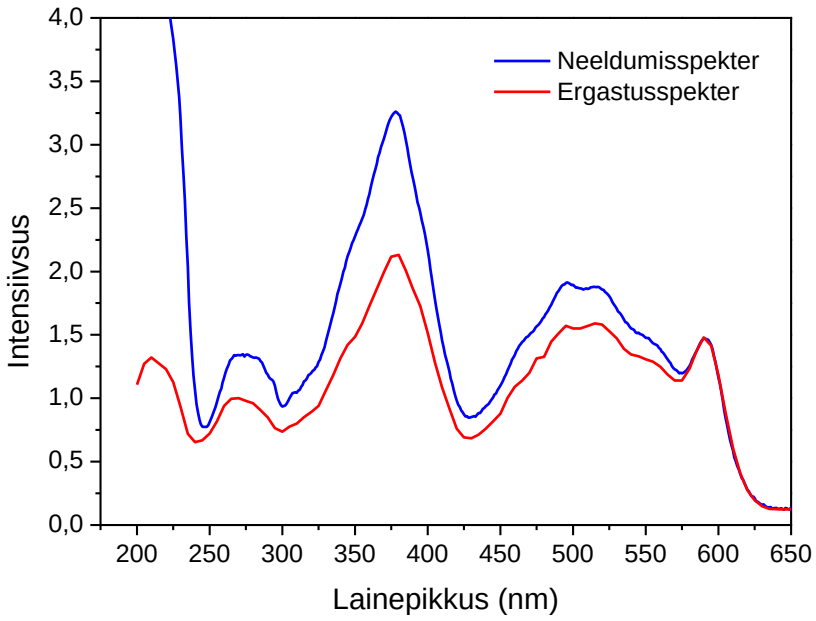
Joonisel 9 on esitatud musta joonega kiirgusspektrite maksimumide asukohad, mis vastavad igale ergastatud lainepikkusele. Tegemist on väga keerulise ja kummalise sõltuvusega. Kui kiirgusspektrisse panustaksid ainult ühesugused molekulid, siis spekter oleks homogeenne ja puuduks spektri maksimumi asukoha sõltuvus ergastuse lainepikkusest. Tuvastatud keeruline sõltuvus aga näitab seda, et spekter ei ole homogeene, vaid on heterogeene (erinevate komponentide segu). Komponentideks on erinevad kiirgurid, mis sõltuvalt ergastamiseks kasutatavast lainepikkusest, hakkavad domineerima ja seetõttu saavutavad spektris ülekaalu ja muudavad spektri kuju. Joonisel 6 esitatud neeldumisspektritest võib järeldada, et meie uurimisobjekti fluorestsentsi ribas esinevad nii Tyr kui ka Trp kiirgused, mis omavad erinevat spektri kuju ja spektraalset asukohta (vt joonis 8). Lisaks võib Trp kiirgus koosneda kahest komponendist. Peale Tyr esineb fluorestsentsi ribas veel ka Trp. Aromaatsetest hapetest on kõige laialdasemalt kasutusel Trp fluorestsents valkude lokaalse struktuuri ja dünaamika muutuste jälgimiseks (Callis ja Tusell, 2014; Raghuraman *et al*., 2005; Vivian ja Callis, 2001). Trp fluorestsentsi on eelnevalt mõõdetud *Rb. sphaeroides*'e isoleeritud LH2 kompleksi, kus mutantsel vormil on karotenoidina neurosporeen (Timpmann *et al*., 2021). Trp kiirgusspekter sõltub tugevalt keskkonna polaarsusest (selle maksimum võib ulatuda umbes 310 – 350 nm) ja see omadus on kasulik peptiid-membraani seose jälgimiseks (Lakowicz, 2006). Trp võib olla esindatud kahe erineva vormina, sest Trp-d paiknevad valgu erinevates osades, kus on erinevad tingimused. Trp fluorestsentsi spekter on väga tundlik oma ümbruse suhtes. Kui Trp on tugevalt

eksponeeritud veele (vt joonis 3), kui polaarsele lahustile, siis toimub spektri nihkumine punasesse. Punanihe võib olla seotud ka stabiilsusega. Kui Trp ergastatud olek paikneb mittepolaarses keskkonnas, siis on see vähem stabiliseeritud (Gasic *et al.*, 2019). Kui Trp asub sellises piirkonnas, kus vesi ei pääse ligi (valgu keskkond) (vt joonis 3), siis spekter nihkub sinisesse.

Joonisel 6 toodud Tyr ja Trp neeldumisspektrite läbijagamisel on leitud Tyr ja Trp neeldumiste suhe. Vastav suhe näitab, millise panusega antud lainepikkusel kumbki molekul ergastub. Joonisel 9 on punase joonega esitatud see suhe, mille puhul on suurema signaali korral Tyr rohkem ergastatud kui Trp. Võrreldes nüüd mõõdetud spektri asukoha käitumist Tyr/Trp neeldumisspektri suhtega võime näha järgmist sõltuvust: kui Tyr on rohkem ergastatud, siis toimub spektri nihkumine sinisesse (Tyr panus on suurem ja spekter nihkub). Joonisel 9 on Tyr rohkem ergastatud kui Trp lainepikkuste vahemikus 230 – 240 nm. Vastavalt toimub selles piirkonnas meie mõõdetud spektri maksimumi nihkumine sinisesse, mis viitab spektris Tyr osakaalu suurenemisele. 250 nm ümbruses ergastades on ergastunud ainult Trp ja spektri asukoht on maksimaalselt punane. Piirkonnas 260 – 280 nm kasvab ergastamise tulemusena Tyr mõju ning spektri maksimumi asukoht on minimaalne. Selles piirkonnas on spekter kõige laiem ning kõige rohkem sinises. Piirkonnas 290 – 300 nm Tyr enam ei neela ning ergastatud on Trp. Spektri asukoht on taas punases ehk on toimunud punanihe. Punanihke põhjuseks võib olla kahe pisut erineva Trp vormi esinemine. Töös saadud mõõtmistulemuste põhjal ei ole võimalik seda aga kindlalt tõendada.

2.3.5. BChl ja valgu ergastusspektrid

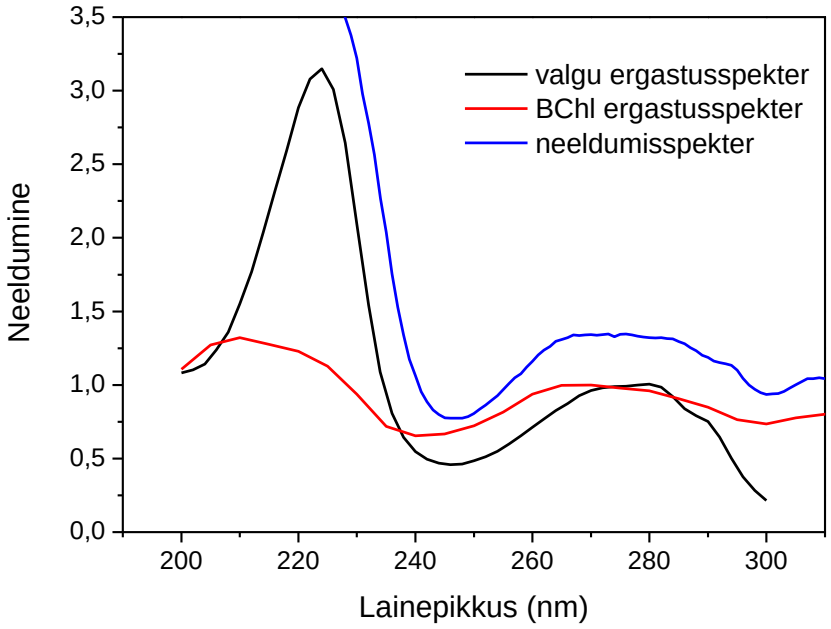
Objekti ergastusspektrid ja neeldumisspektrid on omavahel kindlas seoses. Kui neid omavahel võrrelda, siis võiks võrdluse tulemusena olla näha energia liikumist fotosünteetilistes valk-pigment kompleksides, näiteks bakteriaalsetes antennides. Ergastusspektri võrdlemiseks neeldumisspektriga, tuleb viimane viia lineaarsesse skaalasse, st esitada 1 – T (läbilaskvuse) vormis. Teades, millisest neeldumise ribast toimub 100%-line energia ülekanne uuritavasse molekuli ning normeerides ergastusspektri sellele neeldumisribale, on võimalik neeldumisspektri ja ergastusspektri suhte kaudu hinnata energia ülekande efektiivsust erinevatest spektri piirkondadest antud uuritavasse molekuli.



Joonis 10. *Rb. sphaeroides*'e WT-i isoleeritud LH2 kompleksi ergastusspektri ja neeldumisspektri (1 – T, lineaarses skaalas neeldumisspekter) võrdlus. Joonisel on punase joonega ergastusspekter ning sinise joonega lineaarses skaalas arvutatud neeldumisspekter.

Joonisel 10 on esitatud BChl ergastusspekter (registreeritud spektri vahemikus 840 – 860 nm) ja neeldumisspekter. Ergastusspekter on normeeritud nii, et BChl Q_X riba asukohas 590 nm langeksid ergastusspekter ja neeldumisspekter kokku. On teada, et sellest spektriribast kandub energia 100% efektiivsusega üle B850 ribasse, millest toimub BChl kiirgus. Ülejäänud piirkonnas spektrid ei lange kokku, millest võib järeldada, et sealt toimub väiksema efektiivsusega energia ülekanne BChl molekulidele. Eriti suur erinevus on jälgitav 200 – 220 nm piirkonnas. Põhjuseks oleks, et *Rb. sphaeroides*'e valgust koguv antenn LH2 sisaldab lisaks BChl molekulidele veel teisigi molekule, näiteks karotenoide, valke, aminohappejääke, mis neelavad valgust, aga edastavad energiat BChl molekulidele ebaefektiivselt või üldse mitte. Uurimisobjekti valgust koguva antenni LH2-s paiknevate fluorofoorsete aminohappejääkide (Tyr, Trp) ning sekundaarstruktuuride neeldumine leiab aset spektri UV-piirkonnas. Flurofoorsete aminohappejääkide neeldumisvahemikuks on umbes 220 – 300 nm. Sekundaarstruktuuride neeldumisvahemik jääb aga 200 – 220 nm vahele. Varasemalt on leitud, et Tyr ja Trp neeldumine võib olla vahemikus 275 – 295 nm osaliselt kattuv (Lakowicz, 2006).

Huvitav on võrrelda spektrite kujusid 200 – 300 nm piirkonnas, kus toimub Trp neeldumine.



Joonis 11. *Rb. sphaeroides'*e WT-i isoleeritud LH2 kompleksi valgu ergastusspektri, BChl ergastusspektri ja neeldumisspektri (1 – T, lineaarses skaalas neeldumisspekter) võrdlus. Joonisel on musta joonega valgu ergastusspekter, mis on registreeritud vahemikus 370 – 380 nm. Punase joonega on BChl (pigmendi) ergastusspekter. Sinise joonega on LH2 kompleksi lineaarses skaalas arvutatud neeldumisspekter.

Spektrid on omavahel nihkes ja nende kujud erinevad. BChl ergastusspektri ja valgu (Trp) ergastusspektri erinevust põhjustab spektraalne nihe. Kõige suurem erinevus kahe ergastusspektri vahel on näha 220 nm piirkonnas. Nihkumisel viitab spektrite maksimumide asukoha erinevus UV piirkonnas. UV piirkonnas paikneb BChl maksimum 210 nm peal, valgu ergastusspektri maksimum aga 224 nm juures. Kui võrrelda neeldumisspektri kuju mõlema ergastusspektri kujuga, siis oleks nagu näha, et mõlemad ergastusspektrid annavad oma panuse neeldumisspektrisse. Kui vaadata neeldumisspektrit 220 nm juures, siis on tugevalt näha Trp neeldumist. Kui aga vaadata 220 nm juures BChl ergastusspektrit ja võrrelda seda 220 nm juures oleva neeldumisspektriga, siis on näha nende spektrite vahelist erinevust. Selline ergastusspektri erinevus neeldumisspektrist viitab sellele, et energia ülekannet ei toimu või on see väga väike. Kokkuvõtvalt, kõik spektrite erinevused viitavad sellele, et valgud ei kanna neis neeldunud energiat BChl-i ehk nad ei osale energeetiliselt fotosünteesis. Valkude peamiseks funktsiooniks on seega toimida struktuurse materjalina valk-pigment kompleksis. Membraanvalkudes, nagu näiteks kaaliumikanalites, KcsA (Zhou *et al*., 2001) ja KirBac1.1 (Kuo *et al*., 2003), maltoporiini (Schirmer *et al.*, 1995), glütserooli juhtivas kanalis (Fu *et al.*, 2000), on Trp- ja Tyr-jääkidel „ankurdusroll" ning on seotud transmembraansete heeliksite hüdrofoobse osa pikkuse määramisega (de Jesus ja Allen, 2013; Demmers *et al.*, 2001; Killian ja von Heijne, 2000; Yau *et al*., 1998).

Kokkuvõtvalt, antud bakalaureusetöö raames mõõdeti ja analüüsiti fotosünteetilise bakteri *Rb. sphaeroides* isoleeritud kompleksi LH2 neeldumis-, kiirgus- ja ergastusspektreid. Läbi viidud eksperimendid tõestasid, et fotosünteetiliste valk-pigment komplekside neeldumisspektrid on laiad ning koosnevad omavahel kattuvatest neeldumisribadest, mis on iseloomulikud mitmetele erinevatele optiliselt aktiivsetele molekulidele. *Rb. sphaeroides*'e fotosünteetilise valk-pigment kompleksi kuuluvate aromaatsete aminohapete (Tyr ja Trp) panus energia ülekandumisel bakterioklorofülli on väga väike. Sellisele järeldusel viib neeldumis- ja ergastusspektrite võrdlus UV piirkonnas. *Rb. sphaeroides*'e fotosünteetiline valk-pigment kompleksi kiirgus UV piirkonnas koosneb türosiini ja kahest erinevast trüptofaani vormi kiirgusest. Selleks et teha kindlamaid järeldusi UV kiirguse täpsemast olemusest, oleks edasise uurimise käigus vaja uurida teisi fotosünteetilist valk-pigment kompleksi omavaid bakteriliike, kus varieerub türosiini ja trüptofaani osakaal ja paiknemine valgus. Selleks tuleks mõõta ja analüüsida vastavate bakteriliikide spektreid ja neid siis eelnevalt mõõdetud spektritega võrrelda.

Vaatamata tehnoloogilistele edusammudele sünkrotronkiirguse vallas ja hiljutistele suurepärastele edusammudele membraanivalkude struktuursel määramisel (Hendrickson, 2016; Moraes *et al.*, 2014), on membraanivalkude ja peptiidide kõrge eraldusvõimega molekulaarne iseloomustamine erinevatel põhjustel endiselt suur väljakutse.

Selleks ongi hetkel fluorestsentsspektroskoopilised lähenemisviisid kõige mitmekülgsemad ja neid kasutatakse nii membraaniga seotud valkude struktuuri kui ka dünaamika hindamiseks nende füsioloogilistes tingimustes (Chattopadhyay ja Raghuraman, 2004; Johnson, 2005).

KOKKUVÕTE

Töös uuriti *Rb. sphaeroides*'e WT-st isoleeritud LH2 kompleksis paikneva aromaatse aminohappe Trp kiirguse olemust. Varasemad uuringud on piirdunud infrapunaspektroskoopia abil pigmendi (klorofülli) spektrite mõõtmisega. Fotosünteetiline valk-pigment kompleks koosneb aga kahest osast. Valgu spektrite abil on võimalik uurida, kas valkude funktsioon valk-pigment kompleksis on seotud ainult struktuuri fikseerimisega (struktuurne materjal) või toimub nende kaudu ka energia ülekandumine.

Rb. sphaeroides'e WT-i isoleeritud LH2 kompleksi valkude uurimiseks mõõdeti kiirgusspektreid, ergastusspektreid ja neeldumisspektreid. Spektrite töötlemise ja analüüsimise tulemusena selgus, et Trp pole ainuke aromaatne aminohape, mis saab erinevatel lainepikkustel ergastatud. Olulise panuse annab spektrite kuju muutusele ja nihkumisele teine aromaatne aminohape - Tyr. Kui Tyr on domineerivamalt ergastatud kui Trp, siis toimub spektri nihkumine sinisesse. Spektrite analüüsimisel eeldati, et Trp kiirgus võib esineda kahe erineva vormina. Üks kiirguse vormidest vastab Trp molekulidele, mis on veele eksponeeritud, teine vorm aga Trp molekulidele, mis on veele kättesaamatus piirkonnas. Vastavalt ühe või teise vormi domineerivamale ergastamisel, võib toimuda spektri nihkumine kas punasesse või sinisesse. Kuna komponentspektrid on väga laiad, siis toimuvaid muutusi on keeruline tuvastada ja raske interpreteerida.

Neeldumisspektrite ja ergastusspektrite võrdlemise põhjal võib järeldada, et fotosünteetilistes valk-pigment kompleksides ei toimu valkudes neeldunud energia ülekannet fotosünteesivatele pigmentidele ja seega on valkude peamine funktsioon toimida struktuuri ehitusmaterjalina. Kui aga valgud energia ülekande protsessis osalevad, siis nende panus selles protsessis on väga väike ning selles töös kasutatava eksperimendiga pole võimalik selle ülekande efektiivsust määrata. Üheks võimaluseks oleks uurida teiste bakteriliikide spektrite kujusid ja neid siis omavahel võrrelda.

Study of membrane proteins structure and dynamics by fluorescence spectroscopy

Joanna Liisa Orav

Summary

Photosynthetic purpura bacteria gather solar radiation through circular pigment-protein complexes which are integrated into the membrane. There are two types of those complexes: LH2 and LH1. LH2 complex is an oligomer composed of dimers of alpha and beta apoproteins. Apoproteins are alpha-helical transmembrane proteins and their abundance depends on the species. *Rb. sphaeroides* LH2 complex inner wall is composed of nine alpha-apoprotein helices and the outer wall is composed of nine beta-apoprotein helices.

In this study isolated LH2 complex of *Rb. sphaeroides* wild type was investigated by fluorescence spectroscopy. The aim of the study was to examine nature of tryptophan (Trp) radiation in the LH2 complex. Previous studies have been limited to measuring pigment (chlorophyll) spectra by infrared spectroscopy. Measuring protein spectra, it is possible to study whether the function of proteins in the protein-pigment complex is related only to the structure (building material) or whether energy transfer also takes place through them. For the study emission spectra, excitation spectra and absorption spectra were measured. The study has demonstrated that Trp is not the only aromatic amino acid that can be excited at different wavelengths. It was found that another aromatic acid Tyr has also important contribution to change the shape of the spectra. The LH2 complexes structure data suggest that Trp could exist in two different forms. One of the forms is in an area, what is exposed to water and the other form is in an area, what is inaccessible to water. Complex dependence of spectral characteristics from excitation wavelength supports this idea. Still, due to overlapping of broad spectra it is complicated to perform the detailed analyses of spectral features of the emission.

Spectral measurements show that proteins are not involved in the energy transfer process of photosynthesis. Their main function of the proteins is to stabilize the structure of the complex. If proteins are involved in the process, their contribution to this process is minor, under the reach with current method. To explore this problem further one possibility is to measure and analyze the spectra of other bacteria.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Kõu Timpmanni toetava suhtumise, konstruktiivse tagasiside ning heade nõuannete eest nii laboris kui ka lõputöö kirjutamisel. Samuti soovin avaldada suurt tänu oma juhendajatele, Liina Kangurile ja prof. Arvi Freibergile, kes olid suureks abiks töö valmimisel.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Aizawa, S.-I. (2013). The flagellar world: Electron microscopic images of bacterial flagella and related surface structures. Elsevier.

Britton, G. (1993). Carotenoids in chloroplasts pigment-protein complexes. Pigment-protein complexes in plastids: synthesis and assembly, 447–485.

Brunisholz, R. A., & Zuber, H. (1992). Structure, function and organization of antenna polypeptides and antenna complexes from the three families of Rhodospirillaneae. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 15(1–2), 113–140.

DOI: https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)87010-7 (26.05.2022)

Callis, P. R., & Tusell, J. R. (2014). MD+ QM correlations with tryptophan fluorescence spectral shifts and lifetimes. Fluorescence Spectroscopy and Microscopy (lk 171–214). Springer.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_8 (26.05.2022)

https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_8

Chattopadhyay, A., Mukherjee, S., & Raghuraman, H. (2002). Reverse micellar organization and dynamics: A wavelength-selective fluorescence approach. The Journal of Physical Chemistry B, 106(50), 13002–13009.

DOI: https://doi.org/10.1021/jp021801m (26.05.2022)

Chattopadhyay, A., & Raghuraman, H. (2004). Application of fluorescence spectroscopy to membrane protein structure and dynamics. Current Science, 175–180.

DOI: https://www.jstor.org/stable/24108862 (26.05.2022)

Clayton, R. K., & Smith, C. (1960). Rhodopseudomonasspheroides: High catalase and blue-green double mutants. Biochemical and biophysical research communications, 3(2), 143–145.

DOI: https://doi.org/10.1016/0006-291X(60)90210-2 (26.05.2022)

Cogdell, R., & Gardiner, A. T. (2001). Light harvesting by purple bacteria: A circular argument. Microbiology Today, 28, 120–123.

Cogdell, R. J., Gall, A., & Köhler, J. (2006). The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: From single molecules to in vivo membranes. Quarterly reviews of biophysics, 39(3), 227–324.

DOI: https://doi.org/10.1017/S0033583506004434 (26.05.2022)

Cogdell, R. J., Isaacs, N. W., Howard, T. D., McLuskey, K., Fraser, N. J., & Prince, S. M. (1999). How photosynthetic bacteria harvest solar energy. Journal of bacteriology, 181(13), 3869–3879.
DOI: https://doi.org/10.1128/JB.181.13.3869-3879.1999 (26.05.2022)

Cooley, J. W., Lee, D.-W., & Daldal, F. (2009). Across membrane communication between the Qo and Qi active sites of cytochrome bc 1. Biochemistry, 48(9), 1888–1899.
DOI: https://doi.org/10.1021/bi802216h (26.05.2022)

Croce, R., Van Grondelle, R., Van Amerongen, H., & Van Stokkum, I. (2018). Light harvesting in photosynthesis. CRC press.

de Jesus, A. J., & Allen, T. W. (2013). The determinants of hydrophobic mismatch response for transmembrane helices. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1828(2), 851–863.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.012 (26.05.2022)

Demchenko, A. P., Mély, Y., Duportail, G., & Klymchenko, A. S. (2009). Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. Biophysical journal, 96(9), 3461–3470.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.012 (26.05.2022)

Demmers, J. A., van Duijn, E., Haverkamp, J., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., Heck, A. J., & Killian, J. A. (2001). Interfacial positioning and stability of transmembrane peptides in lipid bilayers studied by combining hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. Journal of Biological Chemistry, 276(37), 34501–34508.
DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M101401200 (26.05.2022)

Ferreira, S. T., Stella, L., & Gratton, E. (1994). Conformational dynamics of bovine Cu, Zn superoxide dismutase revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy of the single tyrosine residue. Biophysical journal, 66(4), 1185–1196.
DOI: https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80901-4 (26.05.2022)

Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., & Stroud, R. M. (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. science, 290(5491), 481–486.
DOI: 10.1126/science.290.5491.481 (26.05.2022)

García-Martín, A., Pazur, A., Wilhelm, B., Silber, M., Robert, B., & Braun, P. (2008). The role of aromatic phenylalanine residues in binding carotenoid to light-harvesting model and wild-type complexes. Journal of molecular biology, 382(1), 154–166.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.002 (26.05.2022)

Gasic, A. G., Boob, M. M., Prigozhin, M. B., Homouz, D., Daugherty, C. M., Gruebele, M., & Cheung, M. S. (2019). Critical phenomena in the temperature-pressure-crowding phase diagram of a protein. Physical Review X, 9(4), 041035.
DOI: https://doi.org/10.1103/PhysRevX.9.041035 (26.05.2022)

Held, P. (2003). Peptide and Amino Acid Quantification Using UV Fluorescence in Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader. Biotek. Apr.

Hendrickson, W. A. (2016). Atomic-level analysis of membrane-protein structure. Nature structural & molecular biology, 23(6), 464–467.
DOI: https://doi.org/10.1038/nsmb.3215 (26.05.2022)

Ho, D., Lugo, M. R., & Merrill, A. R. (2013). Harmonic analysis of the fluorescence response of bimane adducts of colicin E1 at helices 6, 7, and 10. Journal of Biological Chemistry, 288(7), 5136–5148.
DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436303 (26.05.2022)

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: 10.1017/S0033583501003754 (26.05.2022)

Johnson, A. E. (2005). Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. Traffic, 6(12), 1078–1092.
DOI: https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00340.x (26.05.2022

Joshi, H. M., & Tabita, F. R. (1996). A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(25), 14515–14520.
DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14515 (26.05.2022)

Khemaissa, S., Sagan, S., & Walrant, A. (2021). Tryptophan, an Amino-Acid Endowed with Unique Properties and Its Many Roles in Membrane Proteins. Crystals, 11(9), 1032.
DOI: https://doi.org/10.3390/cryst11091032 (26.05.2022)

Killian, J. A., & von Heijne, G. (2000). How proteins adapt to a membrane–water interface. Trends in biochemical sciences, 25(9), 429–434.
DOI: https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01626-1 (26.05.2022)

Koehorst, R. B., Spruijt, R. B., & Hemminga, M. A. (2008). Site-directed fluorescence labeling of a membrane protein with BADAN: probing protein topology and local environment. Biophysical journal, 94(10), 3945–3955.
DOI: https://doi.org/10.1529/biophysj.107.125807 (26.05.2022)

Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., & Doyle, D. A. (2003). Crystal structure of the potassium channel KirBac1. 1 in the closed state. Science, 300(5627), 1922–1926.
DOI: 10.1126/science.1085028 (26.05.2022)

Kühlbrandt, W., Wang, D. N., & Fujiyoshi, Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. Nature, 367(6464), 614–621.
DOI: https://doi.org/10.1038/367614a0 (26.05.2022)

Kyrychenko, A., & Ladokhin, A. (2018). Fluorescence tools for studies of membrane protein insertion. Biopolymers and Cell.
DOI: http://dx.doi.org/10.7124/bc.00097F (26.05.2022)

Lakowicz, J. R. (1983). Protein fluorescence. Principles of fluorescence spectroscopy (lk 341–381). Springer.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7658-7_11 (26.05.2022)

Lakowicz, J. R. (1999). Introduction to fluorescence. Principles of fluorescence spectroscopy (lk 1–23). Springer.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6_1 (26.05.2022)

Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_2 (26.05.2022)

Lakowicz, J. R., Kierdaszuk, B., Callis, P., Malak, H., & Gryczynski, I. (1995). Fluorescence anisotropy of tyrosine using one-and two-photon excitation. Biophysical chemistry, 56(3), 263–271.
DOI: https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00040-5 (26.05.2022)

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_1 (26.05.2022)

Martínez-Luque, M., Dobao, M., & Castillo, F. (1991). Characterization of the assimilatory and dissimilatory nitrate-reducing systems in Rhodobacter: A comparative study. FEMS microbiology letters, 83(3), 329–333.
DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04485.x (26.05.2022)

McDermott, G., Prince, S., Freer, A., Hawthornthwaite-Lawless, A., Papiz, M., Cogdell, Rj., & Isaacs, N. (1995). Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. Nature, 374(6522), 517–521.
DOI: https://doi.org/10.1038/374517a0 (26.05.2022)

Meister, A. (1957). Biochemistry of the amino acids. Academic Press.

Moore, M. D., & Kaplan, S. (1992). Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class Proteobacteria: Characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in Rhodobacter sphaeroides. Journal of Bacteriology, 174(5), 1505–1514.
DOI: https://doi.org/10.1128/jb.174.5.1505-1514.1992 (26.05.2022)

Moraes, I., Evans, G., Sanchez-Weatherby, J., Newstead, S., & Stewart, P. D. S. (2014). Membrane protein structure determination—The next generation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1838(1), 78–87.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.010 (26.05.2022)

Nepple, B., Kessi, J., & Bachofen, R. (2000). Chromate reduction by Rhodobacter sphaeroides. Journal of industrial Microbiology and Biotechnology, 25(4), 198–203.
DOI: https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000049 (26.05.2022)

Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. Molecular plant, 8(1), 68–82.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007 (26.05.2022)

Olsen, J., Sockalingum, G., Robert, B., & Hunter, C. (1994). Modification of a hydrogen bond to a bacteriochlorophyll a molecule in the light-harvesting 1 antenna of Rhodobacter sphaeroides. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(15), 7124–7128.
DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7124 (26.05.2022)

Pfennig, N. (1978). General physiology and ecology of photosynthetic bacteria. The photosynthetic bacteria, 3–18.

Polívka, T., & Frank, H. A. (2010). Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids. Accounts of chemical research, 43(8), 1125–1134.

DOI: https://doi.org/10.1021/ar100030m (26.05.2022)

Qian, P., Swainsbury, D. J., Croll, T. I., Castro-Hartmann, P., Divitini, G., Sader, K., & Hunter, C. N. (2021). Cryo-EM Structure of the Rhodobacter sphaeroides Light-Harvesting 2 Complex at 2.1 Å. Biochemistry, 60(44), 3302–3314.

DOI: https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00576 (26.05.2022)

Raghuraman, H., & Chattopadhyay, A. (2003). Organization and dynamics of melittin in environments of graded hydration: A fluorescence approach. Langmuir, 19(24), 10332–10341.

DOI: https://doi.org/10.1021/la035126z (26.05.2022)

Raghuraman, H., & Chattopadhyay, A. (2004). Interaction of melittin with membrane cholesterol: A fluorescence approach. Biophysical journal, 87(4), 2419–2432.

DOI: https://doi.org/10.1529/biophysj.104.043596 (26.05.2022)

Raghuraman, H., Kelkar, D. A., & Chattopadhyay, A. (2005). Novel insights into protein structure and dynamics utilizing the red edge excitation shift approach. Reviews in fluorescence 2005 (lk 199–222). Springer.

DOI: https://doi.org/10.1007/0-387-23690-2_9 (26.05.2022)

Scheuring, S., Nevo, R., Liu, L.-N., Mangenot, S., Charuvi, D., Boudier, T., Prima, V., Hubert, P., Sturgis, J. N., & Reich, Z. (2014). The architecture of Rhodobacter sphaeroides chromatophores. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1837(8), 1263–1270.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2014.03.011 (26.05.2022)

Schiffer, M., Chang, C.-H., & Stevens, F. (1992). The function of tryptophan residues in membrane proteins. Protein Engineering, Design and Selection, 5(3), 213–214.

Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y.-F., & Rosenbusch, J. P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. Science, 267(5197), 512–514.

DOI: 10.1126/science.7824948 (26.05.2022)

Şener, M. K., Olsen, J. D., Hunter, C. N., & Schulten, K. (2007). Atomic-level structural and functional model of a bacterial photosynthetic membrane vesicle. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(40), 15723–15728.
DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0706861104 (26.05.2022)

Sistrom, W., Griffiths, M., & Stanier, R. (1956). The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. Journal of cellular and comparative Physiology, 48(3), 473–515.
DOI: https://doi.org/10.1002/jcp.1030480309

Sprenger, G. A. (2006). Aromatic amino acids. Amino acid biosynthesis~ pathways, regulation and metabolic engineering (lk 93–127). Springer.
DOI: https://doi.org/10.1007/7171_2006_067 (26.05.2022)

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., & MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K+ channel–Fab complex at 2.0 Å resolution. Nature, 414(6859), 43–48.
DOI: https://doi.org/10.1038/35102009 (26.05.2022)

Timpmann, K., Linnanto, J. M., Yadav, D., Kangur, L., & Freiberg, A. (2021). Hydrostatic High-Pressure-Induced Denaturation of LH2 Membrane Proteins. The Journal of Physical Chemistry B, 125(35), 9979–9989.
DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.1c05789 (26.05.2022)

van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T., & Sundstrom, V. (1994). Energy transfer and trapping in photosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1187(1), 1–65.
DOI: https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90166-X (26.05.2022)

van Oijen, A. M., Ketelaars, M., Kohler, J., Aartsma, T. J., & Schmidt, J. (1999). Unraveling the electronic structure of individual photosynthetic pigment-protein complexes. Science, 285(5426), 400–402.
DOI: 10.1126/science.285.5426.400 (26.05.2022)

Verhoeven, J. (1996). Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996). Pure and Applied Chemistry, 68(12), 2223–2286.
DOI: https://doi.org/10.1351/pac199668122223 (26.05.2022)

Vivian, J. T., & Callis, P. R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. Biophysical journal, 80(5), 2093–2109.
DOI: https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76183-8 (26.05.2022)

von Heijne, G. (1986). The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. The EMBO journal, 5(11), 3021–3027.
DOI: https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04601.x (26.05.2022)

Wang, Z.-Y., Shimonaga, M., Kobayashi, M., & Nozawa, T. (2002). N-terminal methylation of the core light-harvesting complex in purple photosynthetic bacteria. FEBS letters, 519(1–3), 164–168.
DOI: https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02744-8 (26.05.2022)

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. Microbiological reviews, 51(2), 221–271.

Yau, W.-M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., & White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. Biochemistry, 37(42), 14713–14718.
DOI: https://doi.org/10.1021/bi980809c (26.05.2022)

Yeliseev, A. A., Eraso, J. M., & Kaplan, S. (1996). Differential carotenoid composition of the B875 and B800-850 photosynthetic antenna complexes in Rhodobacter sphaeroides 2.4. 1: Involvement of spheroidene and spheroidenone in adaptation to changes in light intensity and oxygen availability. Journal of bacteriology, 178(20), 5877–5883.
DOI: https://doi.org/10.1128/jb.178.20.5877-5883.1996 (26.05.2022)

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

https://www.biotek.com/resources/application-notes/peptide-and-amino-acid-quantification-using-uv-fluorescence-in-synergy-ht-multi-mode-microplate-reader/ (kasutatud 26.05.2022)

https://www.rcsb.org/structure/7pbw (kasutatud 26.05.2022) (DOI: 10.2210/pdb7PBW/pdb)

The UniProt Consortium. Järjestused - *Rb. sphaeroides* (pucA, Q3J144) www.uniprot.org (kasutatud 26.05.2022)

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q3J144?csm=50495C5332E23220 (kasutatud 26.05.2022)

https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q3J145?template=7pbw (kasutatud 26.05.2022)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Joanna Liisa Orav,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Fluorestsentsspektroskoopia kasutamine membraanvalkude struktuuri ja dünaamika uurimiseks“, mille juhendajad on Kõu Timpmann, 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 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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.

Joanna Liisa Orav

02.06.2022