

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Fotoszintetizáló baktériumok fluoreszcencia indukciója és relaxációja

Asztalos Emese

Témavezető: dr. Maróti Péter
egyetemi tanár

Fizika Doktori Iskola
SZTE TTIK és ÁOK Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

Szeged

2014

Bevezetés és kutatási háttér

A fény elnyelésével gerjesztett állapotba került festékmolekulák fotonok emissziójával térhetnek vissza alapállapotukban. A kibocsátást fluoreszcenciának nevezzük, ha az átmenet szinglett állapotok között zajlik. A (bakterio)klorofill festékeknek köszönhetően fotoszintetizáló szervezetek (zöld növények és baktériumok) is képesek fluoreszcencia kisugárzására, amely ugyan nagyon gyenge (kis hatásfokú) és szemmel láthatatlan (a közeli infravörös spektrum-tartományba esik), mégis elterjedten használják az élő szervezetek fotoszintetizáló képességének megállapítására. A fluoreszcencia intenzitása jellegzetes időbeli változást (*ú.n.* „indukciót”) mutat, miközben a sejteket sötétből (állandó intenzitású fényel gerjesztve) megvilágított állapotba visszük. Noha az alapjelenséget már több, mint 80 éve felfedezték zöld növényeken [Kautzky és Hirsch 1931], értelmezésének a helyes irányba tett első lépése csak 1963-ban született [Duysens és Sweers 1963]. Ez volt az *ú.n.* „Q-hipotézis”, amely szerint a fluoreszcencia hatásfokát Q (elsődleges kinon) redox-állapota határozza meg: a hatásfok (így a megfigyelt fluoreszcencia intenzitása) kicsiny (F_0), ha Q oxidált, és nagy (F_{max}), ha Q redukált. Mivel Q redox állapotát a fotoszintézis kezdeti fotokémiai folyamatai határozzák meg, ezért a „Q-hipotézis” a fluoreszcencia és a fotokémia egymást kiegészítő (komplementer) viszonyát jelenti. A '90- es évek eleje óta a magasabb rendű növények és algák fluoreszcencia indukciójának mérésére számos laboratóriumi berendezés(-család) született (pl. PAM és verziói), és az ezek működésére és a tényleges fotoszintetikus folyamatokkal való relevanciájukra vonatkozó elméletek, magyarázatok irodalma azóta is növekszik, sőt, mára nehezen áttekinthetővé és sok esetben ellentmondásossá vált. Mindezek ellenére általánosságban kijelenthetjük, hogy a zöld növények esetén a fluoreszcencia indukció jól körüljárt, vizsgálatára gazdag eszközpark készült és mindennapi alkalmazása széleskörűen elterjedt. Ezzel párhuzamosan a baktériumok fluoreszcencia indukcióját leíró irodalom sokkal szegényesebb, akárcsak vizsgálati eszközparkja és a pusztán a fluoreszcencia indukciót leíró kevés elmélet is ellentmondásos. Ennek szemléltetésére csupán egyetlen munkát említek meg, amelyben a fluoreszcencia indukció 1- 50 ms között mért emelkedésében 5- 6 fázist véltek megkülönböztethetőnek *Rhodobacter sphaeroides* baktérium esetében [Bina és mtsi 2010]. A disszertációban bemutatott kísérleteink alapján kialakított véleményünk szerint a mért kinetikát erősen átlapolhatják a mérőberendezésből és a mérési körülményekből származó műtermékek.

A sötét → fény átmenet során mért fluoreszcencia indukciót a fény kikapcsolása után a fluoreszcencia hatásfokának relaxációja (az eredeti sötét szintre való visszaállása) követi. Ez a változás is érzékeny a fotoszintetikus folyamatokra, és így (az indukcióhoz hasonlóan) diagnosztikus jelentőségű eszközzé válhat megfelelő elmélet birtokában a kutató kezében. Az irodalomban fellelhető eddigi eredmények és értelmezésük kezdeti próbálkozásoknak tekinthetők

[Kolber és mtsi. 1998]. Ezek mindegyike szinte kizárólag az akceptor oldal redukált kinonjainak visszaoxidálásával hozták kapcsolatba a megfigyelt relaxáció kinetikáját. Tapasztalatunk szerint azonban bakteriális rendszerekben nem csak az akceptor oldal és annak redox reakciói, hanem elsősorban a donor oldali reakciók határozzák meg a RC kinyitását, azaz a fluoreszcencia határfokának esését. Zöld növényeknél a relaxációért elsősorban ténylegesen az akceptor oldal a felelős, hiszen ott a donor oldal szubmikroszekundumnyi idő alatt redukálja vissza a dimert. Ez bakteriális rendszerekben nem így van, az oxidált dimér visszaredukálásának ideje széles időskálán ($10^{-7} - 10^{-1}$ s) változhat a különböző baktérium törzsek esetén.

A baktérium fluoreszcenciája látszólag egyszerűbbnek tűnik az algákhoz vagy a magasabb rendű növényekéhez képest, mégis ezek mérésére és az eredmények értelmezésére sokkal kevesebb munka született. Emiatt nagyon időszerű megbízható fluorométer építése, a különböző baktérium-törzseknél megfigyelt fluoreszcencia kinetikai változásainak összehasonlító vizsgálata, és egységes modell keretén belül való értelmezése. Ezek indokolják a disszertáció megszületését.

Célkitűzések

A következő kutatási célokat tűztük ki:

- Fotoszintetikus baktériumok fluoreszcencia indukcióját meghatározott törzseken, jól meghatározott körülmények között, széles időtartományban vegyük föl, különböző módszerekkel: folyamatos, téglalap alakú gerjesztés alatt, vagy flash sorozattal. Az időtartomány szubmikroszekundumtól egészen a szekundum tartományokig terjed. A flash sorozattal való mérésnek az az előnye a folyamatos gerjesztéshez képest, hogy az egyedi rövid flash-ek által kiváltott fluoreszcencia változás érzéketlen a háttér esetleges fluktuációjára.
- Az előző pontban leírt módokon meghatározott fluoreszcencia indukció fázisainak eredetére magyarázatot találjunk.
- Ha már ezeket megnyugtatóan tudjuk magyarázni, akkor fiziológiai vizsgálatokra, a baktériumok fotoszintetikus kapacitásának meghatározására használjuk fel, például nehézfémek hatásának kimutatására.
- A fluoreszcencia relaxáció hátterének felderítése bakteriális rendszerekben.

Alkalmazott módszerek

Sejt tenyészetek

A baktériumtörzseket Siström-féle tápoldatban neveljük. A fotoszintetikus növekedésre képes törzsek (*Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum* *Rvx. gelatinosus*) tenyészeit teljesen feltöltött üveg-edényekben tartjuk (csiszoltdugós kémcső vagy nagyobb csavaros tetejű Duran üveg) anaerob

környezetben, 40 W-os wolframszál izzók fénye mellett. A megvilágítás erőssége körülbelül 13 W/m² az üvegek felszínén. A fotoszintetikus növekedésre képtelen, citokróm *c*₂ mentes *Rba. sphaeroides* CYCA I törzset rázóasztalon, sötétben, Erlenmeyer lombikokban neveljük ugyanabban a tápoldatban, szemi-anaerob környezetben, kanamicin és spectinomycin antibiotikumok jelenlétében. A CYCA I törzs használatával kikerülhető a donor oldal redox állapotainak kinetikai keveredése, hiszen a cit *c*₂ hiánya miatt a P⁺ hosszú élettartamú.

A mérések döntő többségét intakt baktériumsejteken végeztük, az egész sejtek optikai úton való detektálása sokkal nehezebb, mint akár a kromatofórákon (izolált membránfrakció) vagy az izolált RC fehérjéken történő méréseknél. Ennek két oka van, egyrészt a sejtekben a megfigyelendő anyagok koncentrációja sokkal kisebb, mintha azok kémiai tisztított oldatát használnánk, például RC fehérje 1-2 μM- os oldatán már nagyon jó jel/ zaj viszonytal tudunk mérni, míg az általában 10⁹ sejt/ml nagyságrendű koncentrációnál a RC csak nM koncentrációban van jelen. Másrészt a sejtek optikailag erősen szóró közeget alkotnak. Ahhoz, hogy fiziológiai körülmények között, *in-situ* fotoszintetikus kapacitást lehessen mérni, elengedhetetlen az ilyen egész sejteket mintaként használó berendezések építése.

Fluoreszcencia indukció és relaxáció

A fluoreszcencia indukciót folyamatos, téglalap alakú gerjesztés alatt, vagy rövid flash-ek sorozatával mérjük. A flash-eket minden esetben nagy energiájú lézer dióda szolgáltatja, amelynek hullámhossza 808 nm és fénytéljesítménye maximum 2 W. Ideális gerjesztést biztosít, mivel éppen eltalálja a baktériumok perifériás antennájának B800 komplexét. Közvetlenül a sejtenyészeten végezzük a méréseket, 3*3*15 mm³- es, kvarc hasáb küvettát használunk, ebben homogén a megvilágítás, és a rétegvastagság is kellően kicsi a másodlagos effektusok elkerüléséhez. A detektálást lavina fotodiódával végezzük, amit 850 nm felett átengedő vörös szűrővel védünk a szórt lézer fénytől. A fluoreszcencia relaxáció mérésére építettünk egy fluorimétert, ami a gerjesztés utáni fluoreszcencia lecsengés meghatározását tapogató flash sorozat használatával végzi. Az eddig használt berendezések a fluoreszcencia indukció és relaxáció külön- külön való mérését tették csak lehetővé, az általunk épített fluoriméter viszont a kettő egyidejű mérésére is alkalmas. Ezenkívül alkalmas fény-indukált abszorpció-változás mérésre is.

Késleltetett fluoreszcencia

A baktériumsejteket frekvenciakettőzött és Q-kapcsolt Nd:YAG lézerrel gerjesztjük 532 nm hullámhosszal, és a késleltetett fluoreszcenciát (DL) hűtött fotoelektronsokszorozóval (PMT) detektáljuk. A PMT-t az intenzív prompt fluoreszcenciától elektronikusan vezérelt mechanikus fényzárral vagy elektronikus kapuzással védjük. A késleltetett fluoreszcenciát fotonszámoló kártyával mérjük az MCDWIN program segítségével.

Fényindukált abszorpcióváltozás

Egész sejtek flash indukált abszorpcióváltozásának meghatározásához házilag épített berendezést használtunk. A hasáb alakú küvettába helyezett mintán folyamatos monokromatikus mérőfény halad át, amit monokromátorral választunk ki volfrámszálas izzó fényéből. Csökkentendő a gerjesztő flash szórt fényének hatása, a minta és a fénydetektor közé egy másik monokromátort is elhelyeztünk. A minta abszorpciója fénygerjesztés hatására megváltozik. Ennek időbeli változását követjük nyomon. A detektor egy fotoelektron sokszorozó, a gerjesztő fényforrás lézerdióda vagy megfelelő színszűrővel ellátott Xe-flash lámpa.

Vegyszerek

A sejtek redox állapota különböző vegyszerekkel módosítható: K-ferricianid vizes oldatát használtuk az aktuális redox potenciálnak oxidatív irányba és Na-ditionit szintén vizes oldatát a redukív irányba való elmozdításához.

Az interkinon elektrontranszportot ($Q_A^- \rightarrow Q_B$) hatékonyan blokkolja a terbutrin, ami a Q_B helyre kötődik versenyezve az ubikinon különböző redox formáival. A cit bc_1 komplex gátlására myxotiazolt és/vagy antimicin A-t használtunk.

Matematikai módszerek

A megfelelő reakciókinetikai egyenletek kis részének megoldása analitikus formában lehetséges volt. Minden további esetben a megoldáshoz numerikus módszereket kellett alkalmazni. Ezek egy része a mért és a számított adatok közti eltérések négyzetösszegeinek minimalizálását megvalósító (Marquardt-típusú) illesztést jelentett, a másik (nagyobb) része számítógépes szimulációt foglalt magában. Az alkalmazott számítógépes módszerek alkalmazásának elsődleges szerepe nem a változó és ismeretlen mennyiségek precíz meghatározása, hanem csupán a tendenciák felismerése ill. nyomon követése volt. Ez a megközelítés inkább kvalitatív, mintsem kvantitatív értelmezést szolgáltatott, és dönthetett az alkalmazott kinetikai modellek alkalmasságáról.

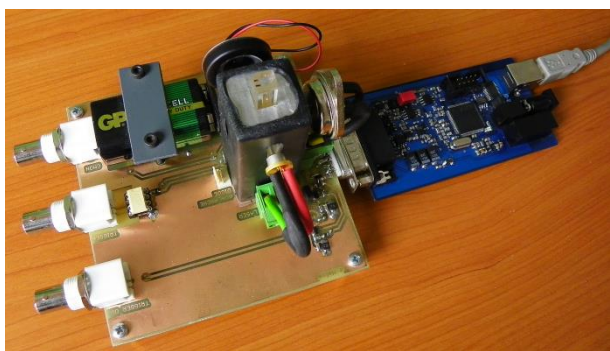
Eredmények, tézispontok

1) Részt vettem egy olyan bakterioklorofill fluoriméter fejlesztésében, mely kompakt felépítésének köszönhetően hordozható, olcsó, egyszerűen kezelhető, számítógép vezérelt és alkalmas intakt baktériumsejtek fluoreszcenciájának mérésére. Az én feladatomból az elkészült fluoriméter tesztelése és biofizikai alkalmazhatóságának vizsgálata.

A megvalósított bakterioklorofill fluoriméter egy olyan hordozható készülék, mely flash indukált fluoreszcencia-változások mérésével alkalmas fotoszintetizáló baktériumsejtek elektrontranszfer tulajdonságainak meghatározására. A készülékkel követhetjük a gerjesztő flash utáni reakciócentrum dimer abszorpcióváltozását, a bakterioklorofill fluoreszcencia lecsengését (relaxáció) és

flash alatti emelkedését (indukció). A készülék előnye, hogy ez a három módszer egyetlen elrendezésbe integrált. A gerjesztő (808 nm) és a tapogató (785 nm az abszorpció-változáshoz és 808 nm a fluoreszcenciához) flash-eket is lézer diódák szolgáltatják (1. ábra).

A kompakt elrendezésnek köszönhetően a mintatérfogó kicsiny (200 μ l), a készülék nagy időfelbontású (5 μ s), érzékeny (16 bit), és a biológiai mintából származó jel stabil és jól reprodukálható. A készülék a szokásos „pump- and- probe” módszert használja a kibocsátott fluoreszcencia, vagy a sejtek transzmisszió változásának meghatározásához. A minta gerjesztését különböző hosszúságú, erős flash biztosítja, ezzel fotofizikai és fotokémiai reakciókat indítunk el, majd ezek lecsengését gyenge tapogató flash sorozattal követjük nyomon. A gerjesztő flash intenzitásának és hosszának (10 μ s – 1 ms) változtatásával a baktérium fotoszintetikus apparátusát



1. ábra A bakterioklorofill fluoriméter.

különböző állapotokba hozhatjuk, amiket a tapogató fényfelvillanások (flash) alatti fluoreszcencia (F) vagy abszorpcióváltozás (ΔA) megfigyelésével tudunk kimutatni. A gerjesztő flash téglalap alakját kihasználva, a fluoreszcencia indukció közvetlenül mérhető a gerjesztés alatt, a relaxáció pedig utána, a sötétben. A készülék fluoreszcencia indukció és relaxáció, valamint abszorpcióváltozás mérésre alkalmas.

Kocsis P, Asztalos E, Gingl Z, Maróti P (2010) Kinetic bacteriochlorophyll fluorometer. Photosynth. Res, 105: 73-82.

2) A késleltetett fluoreszcencia két prekursor állapotát (cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ és $P^+Q_A^-$) azonosítottam *Rba. sphaeroides* intakt sejtekben, melyek élettartamát a cit bc_1 komplex (cit $c_2^{3+} \rightarrow cit c_2^{2+}$) és a töltésrekombináció ($P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$) határozza meg

Fiziológiás körülmények között intakt sejtekben a RC-ből egy rövid flash hatására keletkezett töltések a gyors előre irányuló, és a 2-3 nagyságrenddel lassabb visszafelé irányuló elektron transzfer reakcióknak köszönhetően stabilizálódnak, és az elraktározott szabadenergia később energiaigényes reakciók fenntartásához használható. Noha a visszafelé haladó reakcióknak általában csak kis szerepük van ($k_{r1} \ll k_2$ vagy k_3 és $k_{r2} \ll k_1$), jelentősekké válhatnak, ha a töltések elszállítása akadályba ütközik különböző kémiai kezelések (pl. gátló szerek) hatására, és/vagy a komponensek szabadenergia szintjeit módosulásával. A késleltetett fluoreszcencia mérése kiváló eszköz a visszafelé haladó reakciók nyomon követésére. Ezzel párhuzamosan prompt fluoreszcencia és flash indukált abszorpcióváltozás méréseket is végeztünk a töltésrekombináció szerepének tanulmányozására.

Intakt sejtekben a DL az antenna bakterioklorofilok termális repopulációjából származik a $P^+Q_A^-$ vagy a $cit\ c_2^{3+}PQ_A^-$ prekursor állapotból P^* -on keresztül. A visszafelé irányuló reakciókat kísérő entalpiaváltozást van't Hoff ábrázolást használva határoztuk meg: $\Delta H_{P^*Q} = 340$ meV (pH 7.8) a $P^+Q_A^- \leftrightarrow P^*$ folyamatra. A szabadenergia változása egész sejtekben szobahőmérsékleten $\Delta G^0_{P^*Q} = 870$ meV, így az entrópiaváltozás ($-T \cdot \Delta S^0 = 530$ meV) hozzájárulása nagyobb, mint az entalpiaváltozásé. A $cit\ c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow cit\ c_2^{2+}PQ_A$ átmenet entalpiaváltozásának meghatározása a megfigyelt DL- ből nem olyan egyszerű a prekursor rövid élettartama miatt, ami a $cit\ c_2^{3+}$ vissza-redukció sebességállandójának meredek hőmérsékletfüggésének köszönhető. Magasabb hőmérsékleten P^* repopulációja növekszik, de csökken a prekursor rövidebb élettartama miatt. A két ellentétes hatást figyelembe véve igen számottevő 1020 meV entalpiaváltozás becsülhető a $cit\ c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow cit\ c_2^{2+}PQ_A$ reakcióra.

A P^* és $P^+Q_A^-$ közötti szabadenergia rés kicsi, de határozott pH függését mutattuk ki, ami a kinon kötőhely körüli flash indukált protonációs lépésekre utal. Miután a szabadenergia rés enyhe pH függését formálisan illesztettük két Henderson- Hasselbalch típusú görbe összegével, nagyon kis pK eltolódást kaptunk a savas ($pK_1' - pK_1 = 0.75$) és bázikus ($pK_2' - pK_2 = 0.4$) csoportokra, ami jelzi, hogy a protonálható csoportok gyenge kölcsönhatásban állnak a Q_A^- n és P^- n lévő flash indukált töltésekkel. A $cit\ c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow cit\ c_2^{2+}PQ_A$ reakció szabadenergia rés teljesen pH független mivoltát figyeltük meg, ami P^+ részvételére utal.

A késleltetett fluoreszcenciát eredményező visszafelé irányuló reakciók a fényenergia hasznosítás szempontjából veszteséget jelentenek, mértéküket redox anyagok, gátlószerek alkalmazásával és a megvilágítás hosszának megválasztásával szabályozzuk. Az eredmények alapját képezhetik egy a fotoszintetikus baktériumok fényhasznosítását figyelő biomonиторing rendszer építésének.

Asztalos E, Maróti P (2009) Export or recombination of charges in reaction centers of intact cells of photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1444-1450

3) A fotoszintetikus baktériumok fluoreszcencia indukciója összetett: a fotokémia, a PSU-k közötti csatolás, triplettek képződése, donor és akceptor oldali elektrontranszfer reakciók valamint a ciklikus elektrontranszport határozza meg.

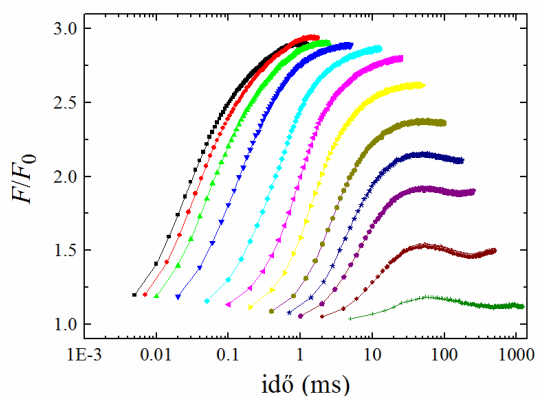
Az egyes fázisok kinetikai elkülönülés szerint az alábbi csoportokba oszthatók.

Ha viszonylag kis gerjesztő fényintenzitást használunk, akkor fotokémiai fázis fog dominálni, ez azt a folyamatot tükrözi, amelynek során sötét állapotú (nyitott) RC zárt állapotba kerül ($P^+Q_A^-$). Ez a fotokémiai változás mind a kisebb, mind a nagyobb időtartományok felé haladva módosulást szenved, hiszen ez a fázis csak akkor mérhető ilyen szépen, ha minden más elektrontranszfer komponens a gerjesztés után megszűnik, befagy. Az élő rendszerben ez nem következik be, miután

létrehoztuk a primer töltéspárt, a donor és az akceptor oldalon a töltések elmozdulhatnak elektrontranszfer következtében, ezért a tiszta fotokémiai fázis kimérése nehézségekbe ütközik.

A hosszabb időtartományok felé mozdulva (> 1 ms), vagyis kisebb fényintenzitáson, létrehozunk újabb és újabb töltéspárt, de mivel ez rendkívül széles időtartományra húzódik szét, a töltések a donor és akceptor oldalon is eltávozhatnak, a RC újra kinyit, így a fluoreszcencia szintje csökkenni fog.

Minél kisebb a gerjesztő fényintenzitás, a fluoreszcencia annál kisebb szintre tud felemelkedni (2.



2. ábra Baktériumsejtek flash sorozattal felvett fluoreszcencia indukciója

ábra), a donor oldali elektrontranszfer versenyez vele, és ez a versenyzés annál inkább a cit c_2 oxidáció irányába mozdítja el a folyamatot, minél lassabb a fotokémiai emelkedés. Ez a kioltás a fotokémiai kioltás témakörében magyarázható, így nincs szükség egy további fluoreszcencia kioltó feltételezésére. A fluoreszcencia indukció mérése a lassú időtartományban lehetőséget szolgáltat a látszólagos fotokémiai kioltás mérésére, ami összefüggésbe hozható a fotoszintetikus kapacitással, hogy milyen

sebességgel halad az elektrontranszfer ebben a rendszerben. Az elektrontranszfer gyorsabb vagy lassabb, annak megfelelően fog a fluoreszcencia alacsonyabb, vagy magasabb szintet elérni, így lehetőséget nyújt a fiziológiás viselkedés meghatározására.

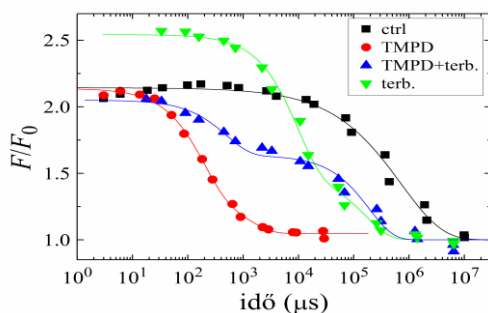
Egyre nagyobb fényintenzitáson, egyre rövidebb időn belül történik meg a RC betöltése. A fluoreszcencia indukció felemelkedése tolódik a rövidebb időtartományokba. Egy viszonylag szűk időtartományban kimérhető a reciprocitási összefüggés, vagyis a fényintenzitás és a félemelkedési időnek a szorzata állandó: nagyobb fényintenzitáshoz gyorsabb felemelkedés és kisebb félemelkedési idő tartozik. Itt a nagyobb fényintenzitásoknál valódi fluoreszcencia kioltók léphetnek föl: triplettek keletkeznek. A triplett kioltás karotenoid (Car) vagy bakterioklorofill (BChl) triplettektől származik, melyek akkor keletkeznek, amikor a RC már bezáródott. Élettartamuk a baktérium törzstől függően körülbelül 2-10 μ s (Car) és 60 μ s (BChl).

A kísérleteinkhez használt baktériumtörzsek mindegyikénél kétfázisú emelkedést figyeltünk meg a fluoreszcenciában. Mindkét fázis függ a gerjesztő fény intenzitásától. A második fázis amplitúdója az interkinon elektrontranszfert blokkoló terbutrin hatására csökken, ebből arra következtetünk, hogy ennek a fázisnak a megjelenéséhez a RC átfordulására, többszöri foton találatra van szükség. Ezt alátámasztja, hogy a CYCA I törzsnél, ahol a cit c_2 hiány miatt a megfigyelt

időtartományban csak egy találat (egy töltésszétválasztás) lehetséges, a második fázis amplitúdója szintén sokkal kisebb. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy a fluoreszcencia a maximális szintjét, bármilyen erős vagy hosszú a gerjesztő flash, csak akkor érheti el, ha a RC donor és akceptor oldalról is zárt, valamint az ubikinon pool (készlet) is redukált, vagyis valódi F_{\max} szintet $P^+Q_A^-Q^-$ állapotban kapunk. Terbutrin hatására a RC PQ_A^- , a cit c_2 hiány miatt $P^+Q_A^-$ állapotban reked, a fotokémiai emelkedés után mégis marad egy további emelkedő fázis, aminek már sokkal kisebb az amplitúdója és nem köthető fotokémiához. Ennek megjelenését magyarázhatjuk a fotoszintetikus egységek közötti csatolással (konnektivitással), ami azt jelenti, hogy a gerjesztési energia egy zárt RC-tól átadódik egy nyitott RC-nak. Ez a jelenség felel a fluoreszcencia indukció exponenciális emelkedéstől való eltéréseért. A fluoreszcencia az elején enyhe lag (késleltetett) fázissal (CYCA I sejtek) vagy egyenessel (2.4.1. vad típus) indul, majd a végén tovább emelkedik, mint ami az exponenciális emelkedésből következne.

4) A fluoreszcencia relaxáció kinetikáját donor és akceptor oldali reakciók határolják: *Rvx. gelatinosus* az akceptor oldalról, *Rsp. rubrum* pedig a donor oldalról határolt, *Rba. sphaeroides* a kettő között van, a donor oldal dominál, de az akceptor oldal szerepe is kimutatható.

Baktériumokban a fluoreszcencia relaxáció összetett kinetikájú és ennek meghatározásában domináns az oxidált dimer redukciója. Zöld növények esetén a relaxációban a donor oldal nem játszik szerepet, mivel nagyon gyors, ott kizárólag az akceptor oldal redox viszonyai, visszaoxidálásának kinetikája a meghatározó.



3. ábra Fluoreszcencia relaxáció CYCA I sejteken. Kezeletlen (■), + 100 µM terbutrin (●), + 5 mM TMPD (▲), + terbutrin és TMPD (▼). Gerjesztés: 40 µs-os lézer flash.

citokrómok oxidációja határozza meg a kinetikát. CYCA I törzsben a relaxáció 100 ms- 1 s körüli, ezt a gerjesztés hossza nem befolyásolja. *Rsp. rubrum* relaxációja 10 ms körüli időállandóval cseng le (ez a törzs csak lassú cit c_2 -t tartalmaz) és a terbutrin nem módosítja jelentősen a relaxációt. Ilyen feltételek mellett a donor oldal a meghatározó. *Rba. sphaeroides* gyors és kevésbé gyors

Baktériumoknál a helyzet összetettebb, a relaxáció kinetikáját mindazon reakciók összessége adja, melyek a RC-ot kinyitják (3. ábra). Ezek donor és akceptor oldali reakciók. Megfigyeltük, hogy hosszabb gerjesztés után a relaxáció kinetikája 10-100 ms-os lecsengést mutat, rövid, vagy pillanatszerű gerjesztés után viszont gyorsabbá és összetettebbé válik. A pool kinonok és pool citokrómok redox állapotának stabilizációja, vagyis a pool kinonok redukciója és a pool

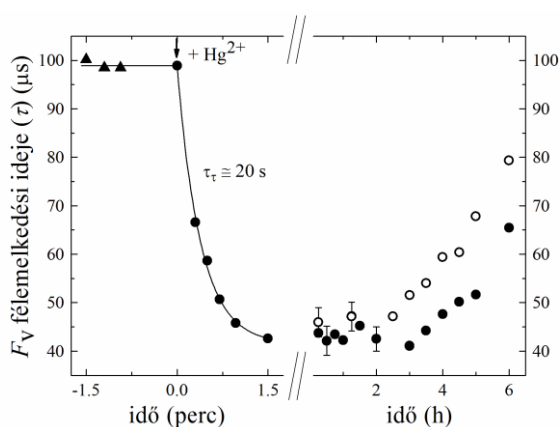
citokrómok is tartalmaz, itt a donor oldal domináns hatása mellett már láthatunk akceptor oldali hatást is. Valódi akceptor oldali korlátozásra (limitációra) egy másik baktériumtörzs, a *Rvx. gelatinosus* szolgált példát: ez a törzs a RC-hoz kötött citokróm alegységgel rendelkezik, így P⁺ vissza-redukálása gyors. Az interkinon elektrontranszfer sebességére (350 μs)⁻¹ mértünk elektrokróm abszorpcióváltozással (ΔA₅₃₀) végzett kettős-flash kísérletből. A *Rba. sphaeroides* sejteken végzett redox titrálásokról a cit c₂²⁺/cit c₂³⁺ középponti potenciáljára 347 mV-ot, a P/P⁺ redox középponti potenciáljára 412 mV-ot kaptunk.

Beküldött kézirat. *Photosynthesis Research*, referencia szám: PRES-D-14-00118

5) A Hg²⁺ ionok erősebb roncsoló hatást fejtenek ki fényen tartott és a növekedés exponenciális fázisában lévő *Rba. sphaeroides* sejtekre, mint a sötétben tartott és a stacioner fázisban lévőkére. A Hg²⁺ ionok elsődlegesen a RC fehérje károsításával fejtik ki növekedés gátló hatásukat.

A fotoszintetikus baktériumok a vizsgált nehézfémek közül Hg²⁺ jelenlétére a legérzékenyebbek, már néhány μM koncentráció is gátolja a sejtek növekedését, míg más nehézfémek (Co²⁺, MoO₄²⁻, CrO₄²⁻) csak mM-os mennyiségben. A Hg²⁺ a koncentrációjától függő ideig teljes mértékben gátolja a sejtosztódást, de ezután a lag fázis után a sejtek közel normál ütemben szaporodnak. A lag fázis alatt feltételezhetően a sejtek valamilyen módon ártalmatlanítják a Hg²⁺-t: fizikailag elkülönítik, kelátokat képeznek vele, vagy egyéb kémiai módosítással védekeznek ellene. A higany hatását fluoreszcencia indukció mérésével követtük, ami nagyon érzékeny módszernek bizonyult, így biomonitoring rendszer alapja lehet.

Tapasztalataink szerint a Hg²⁺ rendkívül káros a fotoszintetikus apparátusra nézve, elsősorban



4. ábra Hg²⁺ hatása a fluoreszcencia indukció félemelkedési idejére.

a RC fehérje működését befolyásolja hátrányosan. Azonnali hatásként megfigyeltük, hogy a fluoreszcencia indukció félemelkedési ideje a higanyionok hozzáadása után ($t_{1/2} \sim 20$ s) körülbelül a felére csökken, és ez az állapot csak órák múlva kezd el helyreállni (4. ábra). A fluoreszcencia indukció további paraméterei is mind módosulnak a higanykezelés alatt. A fluoreszcencia kezdeti (F_0) értéke változatlan marad, mivel a sejtek nem osztódnak, emellett új pigmenteket sem termelnek. A maximum

fluoreszcencia (F_{max}) folyamatosan csökken, így a változó fluoreszcencia ($F_v = (F_{max} - F_0) / F_0$) is. A higanykezelt sejtek fotoszintetikus kapacitása, amire az F_v / F_{max} hányadosból következtetünk,

csökken a megfigyelés alatt, míg a kezeletlen sejteké változatlan marad. Az F_{max} szintjére kifejtett csökkentő hatás attól is függ, hogy milyen növekedési fázisban lévő tenyészetet végezzük a kezelést és a továbbiakban fényben vagy sötétben tartjuk-e a megfigyelt sejteket. A fiatal, osztódásban lévő tenyészetek sokkal érzékenyebbek a higanyra, valamint nagyobb hatás tapasztalható fényben, mint sötétben. A fluoreszcencia indukcióból és azt kiegészítő mérési módszerekkel kapott eredményekből arra következtetünk, hogy a Hg^{2+} a RC donor és akceptor oldalán kifejtett hatásaival csökkenti a fotoaktív RC- ok mennyiségét és a fotoszintetikus egységek közötti csatolást.

Asztalos E, Italiano F, Milano F, Maróti P, Trotta M (2010) Early detection of mercury contamination by fluorescence induction of photosynthetic bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9: 1218-1223

Asztalos E, Sipka G, Kis M, Trotta M, Maróti P (2012) The reaction center is the sensitive target of the mercury(II) ion in intact cells of photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.*, 112: (2): 129-140.

Irodalmi utalások

Kautsky H and Hirsch A (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 964.

Duysens LNM, Sweers H E (1963) Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In 'Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria'. (Eds Japanese Society of Plant Physiologists) pp. 353-372 (University of Tokyo Press: Tokyo)

Bína D, Litvín R, Vácha F (2010) Absorbance changes accompanying the fast fluorescence induction in purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Photosynth. Res.* 105:115-121

Kolber ZS, Prasil O, Falkowski PG (1998) Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochim Biophys Acta* 1367:88–106.

Publikációk

A disszertációban felhasznált közlemények:

Asztalos E, Maróti P (2009) Export or recombination of charges in reaction centers of intact cells of photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1444-1450
IF: 3.835

Kocsis P, **Asztalos E**, Gingl Z, Maróti P (2010) Kinetic bacteriochlorophyll fluorimeter. *Photosynth. Res.*, 105: 73-82
IF: 3.24

Asztalos E, Italiano F, Milano F, Maróti P, Trotta M (2010) Early detection of mercury contamination by fluorescence induction of photosynthetic bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9: 1218-1223
IF: 2.208

Asztalos E, Sipka G, Kis M, Trotta M, Maróti P (2012) The reaction center is the sensitive target of the mercury(II) ion in intact cells of photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.*, 112: (2): 129-140
IF: 3.24

Maróti P, **Asztalos E** (2012): Calculation of Connectivity of Photosynthetic Units in Intact Cells of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis: Research for Food, Fuel and Future—15th International Congress on Photosynthesis*, 27-31

P. Maróti, **E. Asztalos**, G. Sipka (2013): Fluorescence assays for photosynthetic capacity of bacteria *Biophys J* 104(2) Supplement 1, 545A
IF: 3.83

Asztalos E, Sipka G, Maróti P (2014) Fluorescence relaxation in intact cells of photosynthetic bacteria: donor and acceptor side limitations of reopening of the reaction center. *Photosynth. Res.* (bírálat alatt), referencia szám: PRES-D-14-00118

Egyéb közlemények:

Asztalos E, Kis M and Maróti P: Aging photosynthetic bacteria monitored by absorption and fluorescence changes. *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 54(2):149-154, 2010

Asztalos E, Kis M and Maróti P: Oxygen-dependent production and arrangements of the photosynthetic pigments in intact cells of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis: Research for Food, Fuel and Future—15th International Conference on Photosynthesis*, 32-36, 2012

Onidas D, Sipka G, **Asztalos E**, Maróti P (2013): Mutational control of bioenergetics of bacterial reaction center probed by delayed fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827: 1191–119
IF: 4.624

Konferencia poszter:

P. Maróti, **E. Asztalos**: Induction and relaxation of bacteriochlorophyll fluorescence: Electron transfer through reaction center in intact cells of photosynthetic bacteria. 15th International Congress of Photosynthesis, august 22-27. 2010, Beijing, China.

E. Asztalos, Z. Gingl and P. Maróti: Field instrument for determination of the photosynthetic capacity of intact photosynthetic bacteria (abstarct) 8th EBSA European Biophysics Congress, Budapest, Augustus 23-27, 2011: *European Biophysics Journal with Biophysics letters*, Vol. 40. pp. 174

M. Kis, **E. Asztalos**, P. Maróti: Ontogenesis of photosynthetic bacteria tacked by absorption and fluorescence kinetics (abstract)
8th EBSA European Biophysics Congress, Budapest, Augustus 23-27, 2011: European Biophysics Journal with Biophysics letters, Vol. 40. pp. 177

Emese Asztalos and Péter Maróti: Fluorescence induction of photosynthetic bacteria
A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, 2012. június 10-13., Debrecen

Kis M., **Asztalos E.**, Maróti P.: Foszintetikus baktériumok membránátalakulásainak vizsgálata abszorpció és fluoreszcencia kinetikával

A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, 2012. június 10-13., Debrecen

D. Onidas, G. Sipka, E. Asztalos, P. Maróti: Mutational control of bioenergetics of bacterial reaction center probed by delayed fluorescence. Proceedings of the molecular machinery COST conference, Visegrád, 15-17 September 2014, ISBN: 978-963-508-787-7

Konferencia előadás:

Péter Maróti, **Emese Asztalos**: Luminescence as indicator of state of the photosynthetic apparatus of bacteria.

Italian national conference on photobiology, Locorotondo, Bari 2009. 4-6. June.

Asztalos Emese, Maróti Péter: Foszintetikus baktériumok szinkronizálása: Molekuláris és membránátrendeződések.

MBFT XXIII. Kongresszusa, Pécs, 2009. augusztus 23- 26.

Maróti Péter, **Asztalos Emese**, Laczkó Gábor: Fehérjéken belüli elektrontranszport.

MBFT XXIII. Kongresszusa, Pécs, 2009. augusztus 23- 26.

P. Maróti and **E. Asztalos**: Relaxation of bacteriochlorophyll fluorescence in intact cells of photosynthetic bacteria (abstract)

8th EBSA European Biophysics Congress, Budapest, Augustus 23-27, 2011: European Biophysics Journal with Biophysics letters, Vol. 40. pp. 178

P. Maróti, **E. Asztalos**, G. Sipka: Fluorescence assays for photosynthetic capacity of bacteria
57th Annual Meeting of Biophysical Society, February 2-6, 2013

P. Maróti, **E. Asztalos**, G. Sipka: Fluorescence quenchers in photosynthetic bacteria
COST (Molecular machineries for ion translocation across biomembranes, CM 0902) Final Meeting, Innsbruck 9-10 November, 2013

M. Kis, **E. Asztalos**, G. Sipka, P. Maróti: Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells.

Proceedings of the molecular machinery COST conference, Visegrád, 15-17 September 2014, ISBN: 978-963-508-787-7

Könyvfejezet:

Maróti Péter és **Asztalos Emese**: A fotoszintetikus egységek közötti kapcsolat kvantitatív mértékének megállapítása fotoszintetizáló baktériumokban.

J. Vincze: Biophysics 40. (2011) 171-182.

Asztalos Emese, Kis Mariann, Maróti Péter: Oxigén-függő membránátalakulások *Rhodobacter sphaeroides* fotoszintetizáló baktériumokban

J. Vincze: Biophysics 40. (2011) 209-218.