

Bakterioklorofill fluoreszcencia, mint a fotoszintetikus  
baktériumok fiziológiai állapotának jelzőrendszere

Ph.D. értekezés

Sipka Gábor

Témavezető: Dr. Maróti Péter

Fizika Doktori Iskola

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

SZTE TTIK

Szeged, 2017



# Tartalomjegyzék

---

<b>Rövidítések és szimbólumok jegyzéke .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés.....</b>	<b>5</b>
2.1. Fotoszintézis .....	5
2.2. Anoxikus fototróf baktériumok.....	6
2.3. Bíborbaktérium .....	6
2.4. LH1 és LH2 antenna komplexek .....	10
2.5. Fotoszintetikus reakciócentrum fehérje .....	14
2.5.1. Abszorpciós spektruma.....	16
2.5.2. Fotokémiai reakció és elektrontranszfer a bakteriális reakciócentrumban.....	17
2.6. Bakteriális reakciócentrumban célzottan kialakított mutációk .....	21
2.7. Gerjesztési energia átadása .....	23
2.8. Késleltetett fluoreszcencia .....	24
2.9. Fényindukált elektrontranszfer, Marcus-elmélet .....	26
<b>3. Célkitűzések.....</b>	<b>28</b>
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>30</b>
4.1. Baktériumtörzsek tenyésztése .....	30
4.2. Reakciócentrum izolálása .....	30
4.3. Spektroszkópiai módszerek .....	31
4.3.1. Késleltetett fluoreszcencia .....	31
4.3.2. Fluoreszcencia indukció .....	35
4.3.3. Cirkuláris dikroizmus .....	36
4.3.4. Fluoreszcencia anizotrópia .....	36
4.3.5. Spektrofotometria .....	38
4.3.6. Fényindukált abszorpcióváltozások.....	38
4.3.7. Spektroelektrokémia .....	40
<b>5. Eredmények és megvitatásuk .....</b>	<b>42</b>
5.1. Energetikai változások mutáns <i>Rba. sphaeroides</i> reakciócentrumban .....	42
5.1.1. Egyetlen hidrogénkötés eltávolítása vagy hozzáadása a dimerhez .....	44
5.1.2. Többszörös hidrogénkötés létrehozása a donor oldalon. ....	45
5.1.3. A késleltetett fluoreszcencia lecsengésének sebességállandója a szabadenergia-változások függvényében.....	46
5.1.4. A $P^*Q_A$ és $P^+Q_A^-$ közötti szabadenergia különbség pH-függése. ....	48
5.1.5. Termodinamikai paraméterek.....	50
5.1.6. Kölcsönhatások változása a mutáns reakciócentrumokban.....	54
5.2. Mutáns és vad típusú <i>Rba. sphaeroides</i> reakciócentrum fluoreszcencia indukciója és anizotrópiája .....	57
5.2.1. Mutáns és vad típusú RC fluoreszcencia indukciója .....	58
5.2.2. Mutáns és vad típusú RC fluoreszcencia anizotrópiája .....	60
5.3. $Hg^{2+}$ ion indukált fotokémiai folyamatok gátlása bakteriális reakciócentrumban .....	64

5.3.1.	Donor oldali hatások.....	66
5.3.2.	Akceptor oldali hatások .....	70
5.4.	Erős fény elleni védelem intakt fotoszintetizáló bíborbaktériumokban .....	79
5.4.1.	Szingulett és triplett excitonok vándorlás- és ütközés-elmélete az antennában .....	85
5.4.2.	Különböző lánc hosszúságú konjugált kettős kötések tartalmazó karotinoidok triplett állapotának lecsengési sebessége egész sejtekben.....	89
5.4.3.	A fotokémiai és a karotinoid triplett kioltók párhuzamos keletkezése.	93
5.4.4.	Fényvédelem: sötét-fény konformáció kapcsolás a triplett disszipáció növeléséhez az antennában .....	94
<b>6.</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>Közlemények .....</b>	<b>105</b>
8.1.	A disszertáció alapjául szolgáló közlemények .....	105
8.2.	Egyéb közlemények .....	105
<b>9.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>106</b>
<b>10.</b>	<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>107</b>

## Rövidítések és szimbólumok jegyzéke

ADP	Adenozin-difoszfát
ATP	Adenozin-trifoszfát
Bfeo	Bakteriofeofitin
Bkl	Bakterioklorofill
CAPS	3-[Ciklohexilamino]-1-propánszulfonsav
CD	Cirkuláris dikroizmus
CHES	2-[N-Ciklohexilamino]etánszulfonsav
cit.	Citokróm
DL	Késleltetett fluoreszcencia
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
$E_m$	Középponti redoxpotenciál
FRET	Förster rezonancia-energiatranszfer
HOMO	Legnagyobb energiájú betöltött molekulapálya
$k_{AHP}$	$P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ indirekt töltésrekombináció sebességi állandója
$k_{AP}$	$P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció sebességi állandója
Kar	Karotinoid
$k_{BAP}$	$P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ indirekt töltésrekombináció sebességi állandója
$k_{BP}$	$P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltésrekombináció sebességi állandója
$k_{HP}$	$P^+H^- \rightarrow PH$ töltésrekombináció sebességi állandója
LD50	(fél)Halálos dózis <sup>1</sup>
LDAO	Laurildimetilamin-oxid
LH1	Egyes fénygyűjtő antenna-rendszer
LH2	Kettes fénygyűjtő antenna-rendszer
LUMO	Legkisebb energiájú betöltetlen molekulapálya
MCS	Sokcsatornás idő analízátor
MES	2-[N-Morfolino]etánszulfonsav
MOPS	3-[N-Morfolino]propánszulfonsav
NAD(P)H <sub>2</sub>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Foszfát)
P	Bakterioklorofill dimer

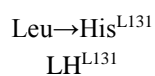
<sup>1</sup> Egy olyan anyag mennyisége, amelyet egyszerre beadva, a tesztállatok 50%-os halálozási arányát okozza

PA	Fotoakusztikus
PF	Prompt fluoreszcencia
P <sub>i</sub>	Inorganikus foszfát
PSI	Első fotokémiai rendszer
PSII	Második fotokémiai rendszer
PSU	Fotoszintetikus egység
Q <sub>A</sub> , Q <sub>B</sub>	Elsődleges és másodlagos kinon elektron akceptor
<i>Rba.</i>	<i>Rhodobacter</i>
RC	Reakciócentrum
<i>Rps.</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Rsp.</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Rvx.</i>	<i>Rubrivivax</i>
SEC	Spektro-elektrokémiai cella
<i>Thio.</i>	<i>Thiocapsa</i>
TL-puffer	10 mM Tris; 0,03% LDAO
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol
UQ <sub>10</sub>	Ubikinon-10; 2,3-dimetoxi-5-metil-6-[10-izoprenoid]-1,4-benzokinon
$\Delta G_{P^*Q_A}$	P* és a P <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> redox állapotok szabadenergia-különbsége
$\Delta G_{B_{feo}Q_A}$	P <sup>+</sup> B <sub>feo</sub> <sup>-</sup> és a P <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> redox állapotok szabadenergia-különbsége
$\Delta H_{P^*Q_A}$	P* és a P <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> redox állapotok entalpia-változása
$\Delta S_{P^*Q_A}$	P* és a P <sup>+</sup> Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> redox állapotok entrópia-változása

A dolgozatban előforduló fehérjeépítő aminosavak egy és hárombetűs rövidítése

A; Ala	Alanin	I; Ile	Izoleucin
C; Cys	Cisztein	L; Leu	Leucin
D; Asp	Aszparagin	R; Arg	Arginin
E; Glu	Glutaminsav	T; Thr	Treonin
F; Phe	Fenil-alanin	W; Trp	Triptofán
H; His	Hisztidin	Y; Tyr	Tirozin

A RC-ban kialakított aminosav pont-mutáció jelölése egy kiragadott példán keresztül:



A RC fehérje L alegységében a 131-es pozícióban lévő leucin aminosav cseréje hisztidinre – két rövidítési változatban.

Az esetleges idegen eredetű szavak előfordulása a dolgozatban a könnyebb érthetőség, vagy a fordítás nehézsége miatt maradtak meg az eredeti nyelven.

---

## 1. Bevezetés

Az életet a Nap fénye táplálja. A fénynek az élet minden területén lényeges szerepe van: végsősorban az életfolyamatokhoz szükséges szabadenergiát szolgáltatja, és a látásnak, mint az egyik érzékelési formának a legfontosabb információhordozója. A mélytengeri kéregrepedésekben a Föld hőenergiáját felhasználó mikroorganizmusoktól eltekintve a fotoszintézis az egyik legfontosabb biológiai folyamat a Földön, amelynek során az élőlények a Nap energiáját hasznosítják szabadenergia-forrásként az életműködésükhöz. Mivel lényegében minden földi élet által használt energia visszavezethető a napenergiának kémiai energiává való fotoszintetikus átalakítására, ezért túlzás nélkül állítható, hogy a fotoszintézis a földi élet motorja, és tanulmányozása napjainkban is a tudományos érdeklődés középpontjában áll (Govindjee és mtsai. 2005; Eaton-Rye és mtsai. 2012; Blankenship 2014; Niederman 2017).

A fotoszintézis folyamata fény-, és a sötét reakciókra tagolható. A fényreakciók a foton abszorpcióját követően - néhány kivételtől eltekintve - fehérjébe ágyazott, speciálisan elhelyezkedő és orientált pigmentek közreműködésével mennek végbe. Ezeknek a pigment-fehérje komplexeknek a működése a pigment molekulák és a fehérje aminosavainak kooperatív hálózatán alapul. Fény hatására a festékek (klorofilok) gerjesztődnek, és közülük néhány képes elektront felszabadítani (oxidálódni). A leadott elektronok képesek egyrészt energiájukat fotofoszforilációs mechanizmus révén kémiai energiává (ATP-vé) alakítani, másrészt erős redukálószerként  $[NAD(P)H_2]$  létrehozni. Tehát a fotoszintetikus membránban található pigmentek és enzimek együttműködésének eredményeként ATP és redukált koenzimek képződnek párhuzamosan zajló folyamatok révén. A zöld növények, algák esetében a fényreakció folyamatában két egymástól jól elkülöníthető fotokémiai rendszer (PSI és PSII) vesz részt. A PSII-höz kapcsolódó komplex egyedülálló módon képes a víznek protonokká és molekuláris oxigénné történő fényindukált elbontására, miközben redukáló ekvivalensek láncolatán keresztül az energia egy része proton elektrokémiai potenciál formájában raktározódik. Ez a potenciál az ATP szintézisének energiaforrásául szolgál (Mitchell 1966). Az energia másik hányada átkerül a PSI-re, ahol egy újabb foton abszorpciója révén válik a folyamat teljessé a NADP redukcióját eredményezve. A sötétszakasz fényt nem igényel, ebben a szakaszban kötődik meg és alakul át a szén-dioxid szerves anyagokká a fényszakaszban előállított redukált koenzimek  $[NAD(P)H_2]$  és ATP felhasználásával.

A fotoszintetizáló baktériumokban a fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai lényegesen egyszerűbbek, mint zöld növényekben. Amíg a zöld növényekben két fotokémiai reakció működik, addig baktériumokban csak egy van. A zöld növények lineáris elektrontranszport-láncával szemben a baktériumoké ciklikus, melynek során a reakciócentrumban keletkezett töltéspár rekombinálódik. A reakció szabadentalpia-

változása proton gradienssé alakul át, amelyet felépítő vektoriális (a membrán citoplazmikus oldaláról a periplazmikus oldal felé mutató) protonelmozdulás a reakciócentrum protonfelvételének eredménye. A protonpumpa-mechanizmust a reakciócentrumhoz kapcsolódó citokróm  $bc_1$  komplex teszi teljessé (protonmozgató kinon ciklus).

A modern fotoszintézis-kutatásban jelentős szerepe van a nemkén típusú bíborbaktériumoknak, mert reakciócentrumának atomi szintű térbeli meghatározása (Deisenhofer és mtsai. 1984) lehetővé tette egy fotoszintetikus energiaátalakító rendszer felépítésének és működésének megismerését és modellként való alkalmazását. Bár az energia átalakításának részletei más-más fajoknál változhatnak, vannak szerkezeti és funkcionális hasonlóságok. A bakteriális reakciócentrumnak igen magas a fotokémiai kvantumhatásfoka ( $\sim 100\%$ ), hiszen majdnem minden elnyelt foton töltéspárt hoz létre (Wraight és Clayton 1974). A legnagyobb szabadenergia-vesztés a primér kinon ( $Q_A$ ) redukálásához kapcsolódik, ami azt is jelenti, hogy fiziológias körülmények között ez a lépés teszi visszafordíthatatlanná a töltésszétválasztást. A fényhasznosítás energiahatásfoka és az elektronvándorlás kinetikája nagymértékben függ a keletkezett töltéspárok energetikai viszonyaitól, ezért utóbbiak feltérképezése alapvető fontosságú.

A fotoszintetizáló baktériumok figyelemre méltó hatékonysággal és gyorsasággal védik és működtetik energiaátalakító rendszerüket. Ennek igen fontos része a fény intenzitásának növelésével arányos módon keletkező bakterioklorofill (Bkl) triplett állapotok kezelése, amely elengedhetetlen a fotoszintetikus organizmusok túléléséhez. A Bkl triplett állapot energiája ugyanis könnyedén átadódik a triplett állapotú molekuláris oxigénnek ( $^3O_2$ ), és szingulett gerjesztett állapotú oxigént ( $^1O_2^*$ , erős oxidálószer) állít elő. Ennek megakadályozására számos mechanizmus működik, amelyekben kiemelt szerepet játszanak a karotinoid festékek.

A nagy fényintenzitás mellett a fotoszintetizáló baktériumoknak számos egyéb kihívással (stressz hatással) is (pl.: nehézfémionok jelenlétével) szembesülniük kell. A disszertációmban arra az alapvető kérdésre keresem a választ, hogy mely tényezők teszik az intakt fotoszintetizáló baktériumot, illetve annak reakciócentrumát kellően robusztussá és mégis rugalmassá ahhoz, hogy hatékonyan tudjon különböző körülmények között is működni.

Az eredményeimhez elsősorban a fotoszintetizáló baktériumból (ill. reakciócentrumból) fénygerjesztés hatására kiváltott Bkl fluoreszcencia sokirányú mérésével jutottam. Ez magában foglalta a prompt és a késleltetett fluoreszcencia hatásfokának kinetikai mérését, valamint a prompt fluoreszcencia relaxációjának, anizotrópiájának és spektrumának vizsgálatát. Megmutattuk, hogy mindezek a Bkl fluoreszcencia megfigyelésére alapozott módszerek együttesen képesek a baktérium ill. egyes fehérje-komplexek (reakciócentrum, fénybegyűjtő rendszerek) állapotában bekövetkező fiziológiai változások nyomon követésére.



---

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Fotoszintézis

A fotoszintézis a legfontosabb fény által kiváltott folyamat, amely lehetővé teszi a növények, algák, cianobaktériumok és anoxikus fotoszintetizáló baktériumok számára, hogy a pigmentjeik által elnyelt fényenergiát a szabadenergia egyéb formáivá (redoxpotenciállá, ion- és proton elektrokémiai potenciállá, valamint foszfátpotenciállá) alakítsák át. Ezek a szabadenergia-formák már közvetlenül alkalmasak a sejt életfolyamataihoz szükséges energia fedezésére (Blankenship 2014).

A fotoszintézis folyamatai két részre oszthatók – fényreakciókra és sötétreakciókra. A fényreakciókban az első lépés a fény abszorpciója, ami (kevés kivételtől eltekintve) fehérjékhez kötött speciálisan orientált pigment molekulákban megy végbe. A pigmentekben elnyelt fény a molekulát gerjesztett állapotba hozza, amely átadódhat a szomszédos, általában alacsonyabb gerjesztési energiájú pigment molekulának. A gerjesztési energia átadási folyamatának igen nagy szerepe van abban, hogy a gerjesztési energia igen nagy hatékonysággal a reakciócentrumhoz jusson. Itt töltésszétválasztás történik, amelyben raktározódó szabadenergia számos lépés után a fotoszintetikus organizmusok belső membránjának két oldala közötti transzmembrán elektrokémiai potenciál gradienssé ( $\Delta\mu_{H^+} = \Delta\Psi - \frac{2,3 \cdot R \cdot T}{F} \Delta pH$ ) alakul át. A keletkező proton gradiens energiát (elektrokémiai potenciált) halmoz fel  $H^+$  koncentráció gradiens, ill. potenciál különbség formájában. A belső membrán két oldalán létrejött proton gradiens mentén visszaáramlanak a protonok egy membránhoz kötött ATP-szintáz molekulán keresztül. A felszabaduló energia segítségével ADP-ből és  $P_i$ -ből a sötétreakciók energiaforrása, ATP képződik, amely lehetővé teszi, hogy különböző biokémiai anyagcsere-folyamatok (sötétreakciók) láncolatán keresztül a széndioxid asszimilálódjon.

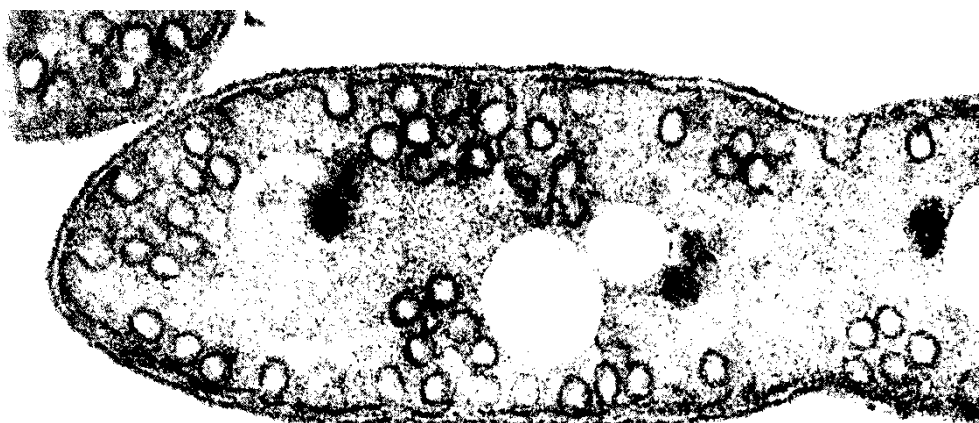
A fotoszintézis folyamatának részletei fajoként eltérőek lehetnek, de a fényreakciók a fotoszintetikus fehérje komplexekben mindig a beeső fotonnak a pigmentek általi abszorpciójával kezdődnek. A fényreakciókban kétféle pigment-fehérje-komplex vesz részt, amelyek egyik típusa a fénygyűjtő komplexek (light-harvesting complexes - LHCs), a másik pedig a fotoszintetikus reakciócentrum (RC) fehérje, ahol megtörténik az elsődleges töltésszétválasztás, majd a szétválasztott töltések stabilizálódása. A fotoszintetizáló organizmusok szinte tökélyre fejlesztették a pigment-fehérje hálózatuk felépítését, hogy minél gyorsabban és minél nagyobb hatásokkal működhessen az energiatranszfer és a töltésszétválasztás (Blankenship 2002).

## 2.2. Anoxikus fototróf baktériumok

Mindazon fotoszintézisre képes szervezetet, amely az ATP termelésre fényenergiát képes hasznosítani, fototrófnak nevezzük. A baktériumok népes családjából csak viszonylag kevés képes fotoszintetizálni, ezek közül az anoxikus fototróf baktériumokat négy nagy csoportba sorolhatjuk: zöld kénbaktériumok vagy Chlorobiaceae (Chlorobi) (Imhoff 2014), heliobaktériumok, Heliobacteriaceae (Firmicutes) (Madigan és Ormerod 1995), zöld nemkén baktériumok vagy Chloroflexaceae (Pierson és Castenholz 1995; Bryant és mtsai. 2007; Tank és Bryant 2015) és a bíbor fototróf baktériumok (bíbor kén- és bíbor nemkén baktériumok), amelyek  $\alpha$ ,  $\beta$  vagy  $\gamma$ -proteobaktériumok (Imhoff 2006c, d, a, b). Mivel a disszertációmban intakt bíbor nemkén baktériumot és annak izolált RC-át vizsgálom, ezért alább ezeket tárgyalom részletesebben.

## 2.3. Bíborbaktérium

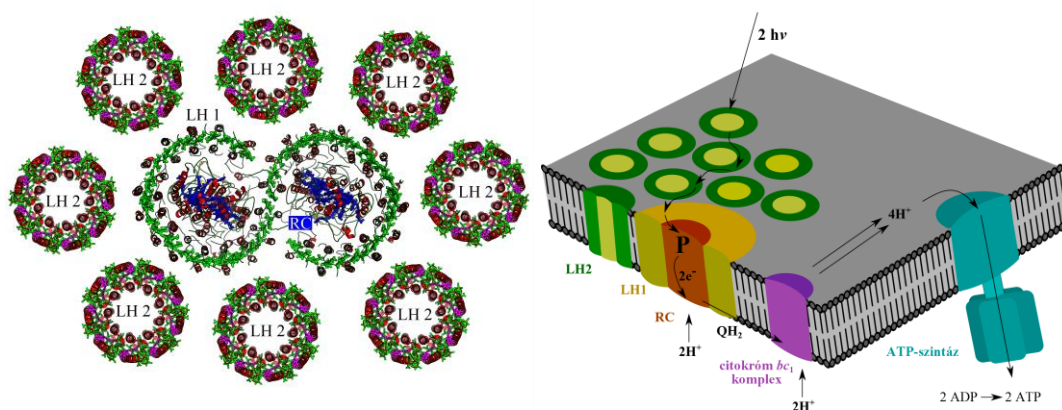
A bíborbaktériumok anoxikus, oxigént nem termelő fototróf anyagcserére képes szervezetek, melyek képesek fotoautotróf és fotoheterotróf módon, valamint aerob és anaerob légzés útján növekedni. (Swingley és mtsai. 2009) Minden bíborbaktériumban pigmenteket tartalmazó belső, intracitoplazmatikus fotomembrán (ICM) rendszerek találhatók, melyek a citoplazmamembrán közvetlen nyúlványai és a membrán betüremkedésével jönnek létre (2.1. ábra). Ezek az ICM-ek általában hólyagocskák (szférikus), másokban csöves (lamelláris) testek, vagy csöves-hólyagos hálózatként fordulnak elő, de komplex lemezes rendszerek is lehetnek. (Drews és Golecki 1995)



**2.1. ábra.** *Rhodospirillum rubrum* transzmissziós elektronmikroszkópos felvétele, melyben jól kivehetők a fotoszintetikus vezikulumok, vagyis a sejthártya befűződéseiből keletkezett, kettős lipidréteggel határolt apró, gömb alakú testecskék (képet készítette: Timothy Donohue<sup>2</sup>)

<sup>2</sup> A felvétel elérhető az alábbi oldalon: <http://news.wisc.edu/newsphotos/rhodospirillum.html> (2017. június 4.)

A bíborbaktériumok citoplazmikus membránrendszere tartalmazza a fényenergiát elektrokémiai energiává alakító fotoszintetikus apparátust. Ez a fotoszintetikus apparátus több, a kettős lipid membránban található pigment-fehérje komplexből valamint egy ATP-szintáz rendszerből áll. A fotoszintetikus membránba ágyazódik be az a legkisebb szerkezeti egység, amelyben még létrejöhet a primér fotokémiai reakció, a töltésszétválasztás. Ezt a fehérjéből és pigment molekulákból (ún. kofaktorokból) felépülő egységet reakciócentrumnak (RC) nevezzük. A RC átnyúlik a határhártyán, sőt annak két oldalán ki is türemkedik, és kapcsolatot teremt (pl. protontranszporttal) a két oldal között. A RC-ot antennarendszer veszi körül. A kettes fénygyűjtő rendszer (LH2) a periférikus antenna-rendszer, melynek feladata az abszorpció hatáskeresztmetszet növelése, a fény elnyelése, valamint a gerjesztési energia átadása az egyes fénygyűjtő rendszer (LH1) és a RC alkotta komplex számára. Az antenna komplex kombinációja a reakciócentrummal a fotoszintetikus egység (PSU - photosynthetic unit) (2.2. ábra).



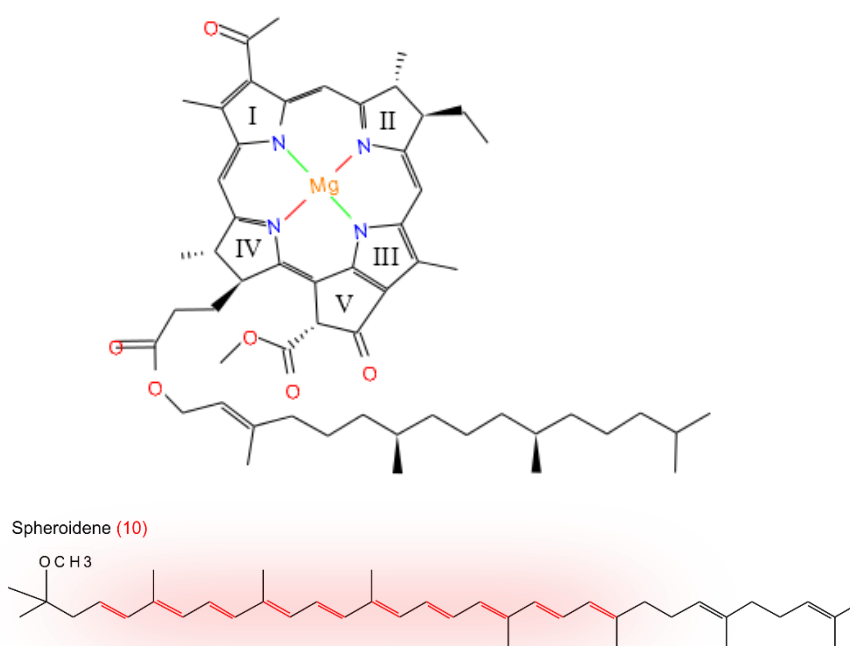
**2.2. ábra.** Bakteriális reakciócentrumok és az azt körülvevő antenna komplexek (bal oldali ábra) illetve az membránba ágyazott pigment-fehérje komplexek elhelyezkedése az intracitoplazma membránban (jobb oldali ábra, amely mutatja a citokróm komplex és az ATP-szintáz beágyazódását és a főbb fotokémiai reakciókat is)<sup>3</sup>. Jelölések: RC – reakciócentrum, LH1 – egyes fénygyűjtő rendszer, LH2 – kettes fénygyűjtő rendszer

A membránba ágyazott pigment-fehérje komplexekből 3 (kétféle antenna komplex [LH 1 és LH 2] és reakciócentrum) specifikusan csak a fényhasznosító folyamatban fontos, míg a citokróm  $bc_1$  komplex egyaránt szerepel a légzési és a fény által hajtott elektrontranszportlánc részeként. A fotociklus alatt a fényhajtotta elektrontranszport révén transzmembrán elektrokémiai potenciál gradiens alakul ki a membránok két oldala között. Ezt az ATP-szintáz hasznosítja, miközben ADP-ből és szervetlen foszfátból ( $P_i$ ) nagyenergiájú ATP-t hoz létre. Az elektrontranszfer ciklusba zárásához egy másik

<sup>3</sup>Az antenna struktúrák és az intracitoplazmikus membránba ágyazott komplexek ábrázolásához PyMol (DeLano 2002) ill. Inkscape szoftvereket használtam

membránfehérje, a citokróm  $bc_1$  komplex is szükséges. A fotoszintetikus elektrontranszfer azonban a baktériumokban nem tekinthető teljesen ciklikusnak, hiszen a forrás (a RC oxidált dimerje) elektronjának több elnyelője is lehet (RC kinon-akceptor rendszere, cit  $bc_1$  komplex vagy a légzési lánc).

A fotoszintetikus baktériumokban a legfőbb pigmentek a bakterioklorofilok (Bkl) és a karotinoidok (Kar) (2.3. ábra), melyekből a fénygyűjtésére alkalmas antenna rendszerek alakulnak ki. A pigment molekulák nem kovalensen kötődnek a fehérjékhez, amelyekkel funkcionális fotoszintetikus pigment-protein komplexeket alkotnak. Az általam vizsgált baktérium törzsekben bakterioklorofil  $a$  (Bkl  $a$ ) és spheroidene/spiriloxanthin karotinoid szintézis útvonalon képződött pigmentek találhatók (Schmidt 1978; Takaichi 1999)



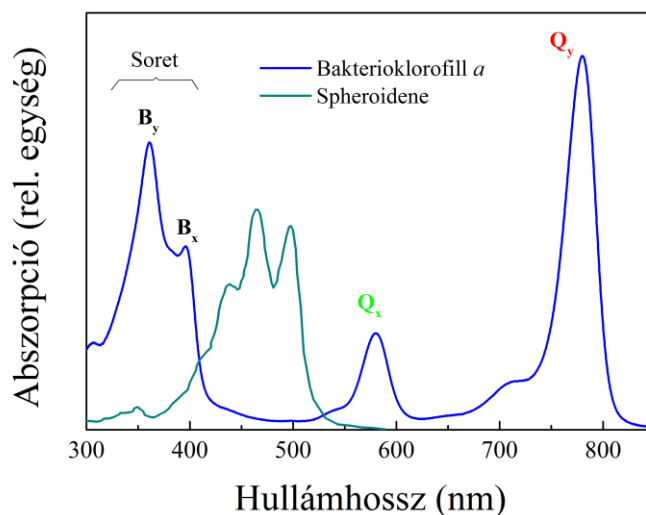
**2.3. ábra.** Bakterioklorofil  $a$  kémiai szerkezete<sup>4</sup> (fent), melyből jól kivehető a bakterioklorin-váz és a hidrofób farokcsoport. A bakterioklorofilok kromofórja a bakterioklorin, amelynek két átmeneti dipólmomentuma van:  $Q_x$  (piros) és  $Q_y$  (zöld). Spheroidene karotinoid (lent) szerkezete, pirossal kiemelve a konjugációs hossz. A konjugált kettős kötések száma (N) zárójelben piros színnel jelölve (N = 10).

A (bakterio)klorofilok a természetben megtalálható legfontosabb fotoszintetikus pigmentek közé tartoznak. Minden (bakterio)klorofilnak ugyanolyan alapvető tetrapiról-gyűrűs struktúrája van. A természetben előforduló Bkl molekulák bakterioklorin típusúak, ami nagymértékben meghatározza a molekula spektrális tulajdonságait, különösen a legalacsonyabb energiájú elektronátmenetek (a  $Q$ -sávok) abszorpciós helyét. A bakterioklorin-váz öt aromatikus gyűrűt és közepén egy magnéziumiont tartalmaz. A

<sup>4</sup> A szerkezeti ábrát WinDrawChem programmal készítettem, melyhez a \*.mol kiterjesztésű fájl a <http://www.chemspider.com> oldalon elérhető (2017. június 4.).

bakterioklorofilok színét ez a bakterioklorin-váz adja, melynek konjugált  $\pi$  elektron rendszere ( $18 \pi$  elektron) és 9 kettős kötése van. A klorofilok optikai tulajdonságai a Gouterman által javasolt négy-molekulapálya modellel írhatók le (Gouterman és Wagnière 1963). Ebben a modellben az elektronikus átmenetek a két legnagyobb energiájú betöltött molekulapályák (HOMO - highest occupied molecular orbit - és HOMO - 1) és a két legalacsonyabb üres be nem töltött molekulapályák (LUMO - lowest unoccupied molecular orbit - és LUMO + 1) közötti lineáris kombinációból származnak. A két legalacsonyabb szingulett gerjesztett állapothoz tartozó átmeneti dipólusok a  $Q_x$  és  $Q_y$ . A Bkl  $Q_y$  abszorpciós maximumának helyét számos külső tényező befolyásolhatja; például oldatban, az oldószer polaritása. Továbbá, a Bkl molekulák aggregációja a  $Q_y$  sáv vöröseltolódását okozza, mely eltolódás egyre jobban nő a Bkl-ok számának növekedésével az aggregátumban (lásd LH2 antennában a B800 és B850-es abszorpciós maximumait).

A bíborbaktériumokban előforduló további fotoszintetikus pigmentek a karotinoidok. A karotinoidok hidrofób, lineáris molekulák, hosszú szénhidrogén láncuk vannak, jellemzően *össz-transz* konfigurációjúak és konjugált kettőskötés-rendszerük hossza meghatározza abszorpciós spektrumukat (pl.: **2.4. ábra** spheroidene 10 konjugált kettős kötéssel). Minél több konjugált kettős kötet tartalmaznak, annál inkább a vörös felé tolódik az abszorpciós sávjuk. Jellemzően a Bkl által le nem fedett spektrum régióban, a 400 nm-től 600 nm-ig tartó hullámhossztartományban abszorbeálnak és tipikusan három abszorpciós csúcsuk van.

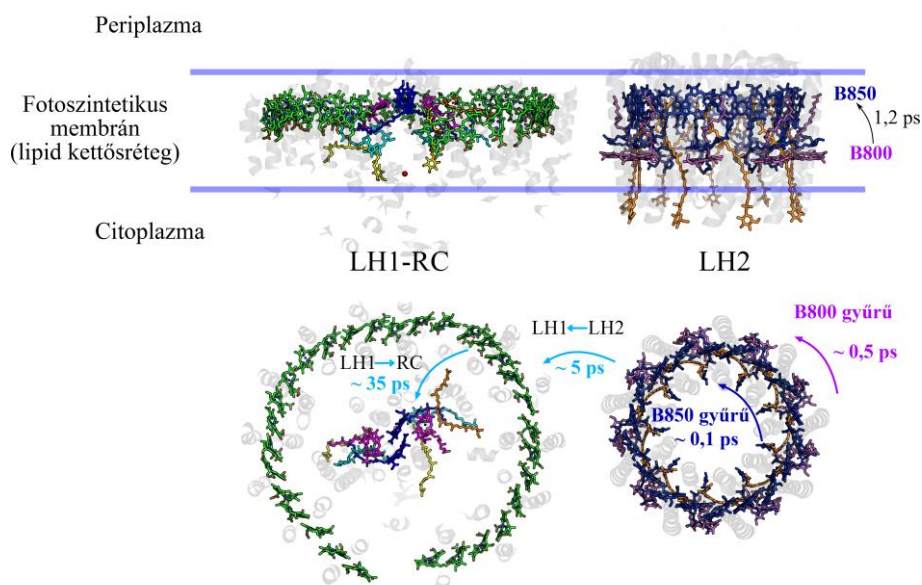


**2.4. ábra.** Bakterioklorofill *a* (kék) és Spheroidene karotinoid (zöld) abszorpciós spektruma metanolban. A Bkl abszorpciós spektruma különálló csúcsokból áll, amelyek a megfelelő átmeneti dipólus momentumokhoz tartoznak,  $Q_y$ ,  $Q_x$ ,  $B_x$  és  $B_y$ . A  $B_y$  és  $B_x$  átmeneti dipólus momentumai együtt Soret sávként ismertek. A karotinoid három egymáshoz közel lévő abszorpciós csúcsa a 400-600 nm tartományban van. A karotinoid és a bakterioklorofill abszorpciós csúcsainak helyzete függ a pigment típusától és a környezet vagy oldószer polarizálhatóságától és polaritásától.

A bakteriális fotoszintetikus pigmentek egy másik kategóriája a bakteriofeofitinek (Bfeo). A Bfeo szerkezetileg szinte azonosak a Bkl-kal, azzal a különbséggel, hogy nincs központi  $Mg^{2+}$  fémionjuk. A Bfeo-nak magasabb a redukciós potenciálja, mint a Bkl-nak (Kobayashi és mtsai. 2007). A Bfeo elektron-akceptorként fontos szerepet játszik a reakciócentrum fehérjékben lezajló töltésszétválasztási folyamatban (lásd 2.5.2 fejezet).

## 2.4. LH1 és LH2 antenna komplexek

Az antenna rendszerek legfőbb feladatai, hogy növeljék az abszorpciós hatáskeresztmetszetet, továbbá, hogy az elnyelt fényenergiát hatékonyan juttassák el a reakciócentrumba, ahol lejátszódhat a töltésszétválás, és ezzel biztosítva legyen a további kémiai reakciókhoz szükséges szabadenergia. Molekuláris szinten az energiaátadást a pigment molekulák, leginkább pedig Bkl-k gerjesztett állapotai közvetítik a fotoszintetikus pigment-protein komplexben. A bíborbaktériumokban általában két típusú antenna komplex található: az egyes és a kettes fénygyűjtő antenna komplex. Minden bíbor fotoszintetikus baktérium tartalmazza az LH1 komplexet, és a legtöbb - de nem mindegyik - tartalmazza az LH2 komplexet is (2.5. ábra).



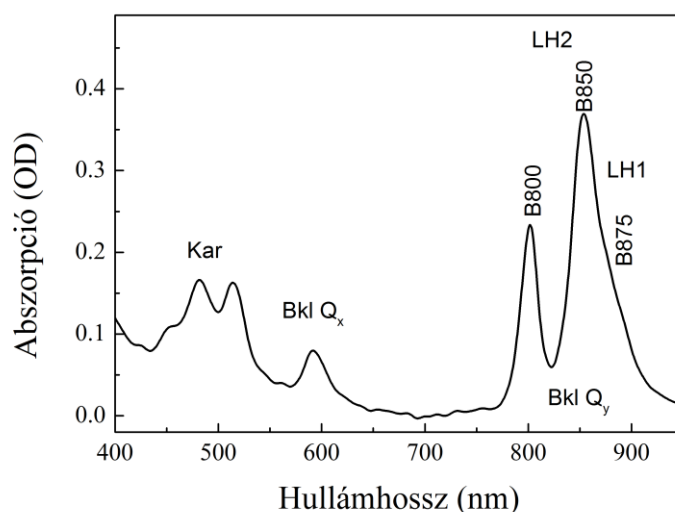
**2.5. ábra.** Bíbor fotoszintetikus baktérium LH2 komplex struktúrája (jobb oldal) *Rps. acidophila*-ból (PDB: 2FKW), ahol különböző színekkel van jelölve a Kar - narancssárga; B800 Bkl gyűrű - lila; B850 Bkl gyűrű - sötétkék. Az RC-LH1 alkotta „core” komplex (bal oldal) *Rba. sphaeroides*-ből (PDB: 4V9G)<sup>5</sup>, ahol B875 Bkl nyitott gyűrű – zöld; a RC kofaktorai: Bkl dimer – sötétkék; Bkl monomer – lila; Bfeo – világoskék; Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> – sárga; Fe - piros. A felső panel a fotoszintetikus membrán vízszintes irányú nézetben, az alsó panel pedig a periplazma oldal felőli nézet.

<sup>5</sup> Az antenna struktúrákat PyMol szoftver használtával ábrázoltam (DeLano 2002)



Az LH2 egy kisebb perifériás fénygyűjtő antenna komplex, amely rövidebb hullámhosszakon abszorbeálja a fény energiáját, mint az LH1. Az LH2 által elnyelt gerjesztési energia hatékonyan és gyorsan továbbítódik az LH1-re (Hess és mtsai. 1995). Mivel az LH1 közvetlenül veszi körül a (monomerikus vagy dimerikus) RC-ot (Walz és mtsai. 1998; Roszak és mtsai. 2003; de Rivoyre és mtsai. 2010; Qian és mtsai. 2013; Niwa és mtsai. 2014), ezért az LH1-RC alkotta komplexet „core” (mag) komplexnek is nevezik.

Az antennák alapvető építőegysége az  $\alpha/\beta$  heterodimer, ami két helikális transzmembrán polipeptid. Mindkét hélix egy-egy Bkl  $\alpha$ -t köt egy konzervált hisztidin pozícióban (Olsen és mtsai. 1997; Olsen és mtsai. 2008). Az LH2 antennánál a  $\beta$  polipeptid egy második Bkl  $\alpha$ -t is köt (Walz és mtsai. 1998), azaz három Bkl  $\alpha$  per LH2 protomer jön létre. Két B850 molekula szorosan kapcsolt dimereket képezve (merőlegesen a membrán felületre) helyezkedik el a polipeptidek között, és egy B800 Bkl  $\alpha$  a membrán felületével párhuzamosan (Freer és mtsai. 1996). Az  $\alpha/\beta$  heterodimerek síkbéli gyűrűvé aggregálódnak. Az LH1 antenna egy 28  $\alpha/\beta$  heterodimerből álló nyitott gyűrű, amihez egy Puf-X fehérje kapcsolódik, és így vesznek körbe egy-egy feofitin-kinon típusú RCot és alkotnak dimer struktúrát. A LH2 antenna esetében 9  $\alpha/\beta$  heterodimer alkot zárt gyűrűt. A kötött bakterioklorofilok az abszorpciós maximumuk szerint kaptak nevet: LH1: B875, LH2: B850, B800 (2.6. ábra).



**2.6. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 bimbóbaktérium abszorpciós spektruma. A rövidítések: Kar - karotinoid abszorpciós sáv (spheroidene); Bkl - bakterioklorofil; Q<sub>y</sub> és Q<sub>x</sub> - Bkl  $\alpha$  abszorpciós sávja; B800 és B850 - LH2 komplexhez kötött monomerikusan ill. dimerikusan gyűrűbe rendeződött Bkl  $\alpha$  abszorpciós sávja; B875 - LH1 komplexhez kötött dimerikusan gyűrűbe rendeződött Bkl  $\alpha$  abszorpciós sávja

A RC körül elhelyezkedő LH1 antennában a Bkl – Kar arány tipikusan 2:1 *Rhodospirillum* (*Rsp.*) *rubrum* és 1:1 *Rhodobacter* (*Rba.*) *sphaeroides* esetén (Koepke és mtsai. 1996; Papiz és mtsai. 2003; Qian és mtsai. 2013). Az LH2-ben a Bkl - Kar arány 3:1 *Rubrivivax* (*Rvx.*)

*gelatinosus*-ban (Ranck és mtsai. 2001) valamint *Rba. sphaeroides*-ban (Cogdell 1978). Az antenna komplexekben a Kar-ok mindamellett, hogy kiegészítik a Bkl-ok által lefedett spektrális tartományt (Cogdell és Frank 1987), szerkezeti szerepet is játszanak (Lang és Hunter 1994; Fraser és mtsai. 2001; Formaggio és mtsai. 2001), valamint védelmet nyújtanak a fotooxidatív károsodások ellen (Griffiths és mtsai. 1955; Cogdell és mtsai. 2000; Cogdell és mtsai. 2004; Glaeser és Klug 2005). A karotinoidok által - a látható spektrum kék-zöld tartományában (ahol a Bkl-ok gyengébben abszorbeálóknak) - elnyelt fényenergia gyorsan és hatékonyan átkerül a Bkl-okra, így növelve a baktériumok abszorpciós hatáskeresztmetszetét. Ahhoz, hogy ezeket a feladatokat el tudják látni a Kar-ok a Bkl-ok közvetlen közelében kell kötődniük (**2.5. ábra**). A Kar-ról a Bkl-ra történő hatékony energiatranszfer viszonylag régóta, még a röntgen krisztallográfiás szerkezetvizsgálatok előttről ismert. A fluoreszcencia gerjesztési spektrumok alapján a Kar-Bkl energiatranszfer kvantumhatásfoka *Rba. sphaeroides* esetén 80-100% (Angerhofer és mtsai. 1995). Bíborbaktériumokban a karotinoidok alapvető fotoprotektív szerepe már több mint 60 éve ismert (Griffiths és mtsai. 1955). Griffiths és munkatársai megmutatták, hogy a *Rhodobacter sphaeroides* R26 karotinoid mentes mutáns bíborbaktériumot a fény és az oxigén kombinációjának kitéve gyorsan roncsolódik. Ez a káros fotodinamikai reakció megakadályozható vad típusú törzsekben, ahol karotinoidok fordulnak elő. A karotinoidok a fényvédő funkciójukat akár közvetlenül, akár triplett-triplett energiatranszferrel is kifejezhetik a gerjesztett triplett állapotú Bkl-ból ( $^3\text{Bkl}^*$ ) kiindulva:



vagy közvetve a szingulett oxigén képződése révén:



(Spin)rendszerek közötti átmenettel (ISC – intersystem crossing) a gerjesztett szingulett Bkl-ból ( $^1\text{Bkl}^*$ ) gerjesztett triplett állapotú Bkl ( $^3\text{Bkl}^*$ ) (**2.1. egyenlet**) keletkezik. A gerjesztett triplett állapotú Bkl-nak viszonylag hosszú élettartama lényegesen lerövidül, ha a triplett állapotú oxigén ( $^3\text{O}_2$ ) energiatranszferrel („kioltja”) lerövidíti azt, ami gerjesztett szingulett oxigén-t ( $^1\text{O}_2^*$ ) eredményez (**2.2 egyenlet**). A gerjesztett szingulett oxigén erősen roncsoló hatású számos sejtösszetevőre. Mindemellett a karotinoidok sokkal hatékonyabban képesek a  $^3\text{Bkl}^*$  állapotot kioltani a  $^3\text{O}_2$ -nél, amellyel megakadályozzák a nagyon reaktív szingulett oxigén kialakulását, ezért ez az uralkodó reakció. A  $^3\text{Bkl}^* + ^1\text{Kar} \rightarrow ^1\text{Bkl} + ^3\text{Kar}^*$  reakciót egy elektroncserélődési-kölcsönhatás közvetíti (Dexter mechanizmus). Régebbi és utóbbi időben publikált munkákban megállapították, hogy a *Rba. sphaeroides* karotinoidmentes mutánsában a  $^3\text{Bkl}^*$  életideje 10  $\mu\text{s}$  körüli a bakteriális



RC-ban, míg a fénygyűjtő antenna komplexben körülbelül 100  $\mu$ s (Monger és mtsai. 1976; Daviso és mtsai. 2009; Mandal és mtsai. 2017). A karotinoidok kettős védelmet nyújtanak a baktérium számára: nem csak kioltják a  $^3\text{Bkl}^*$  állapotát (**2.1. egyenlet**) (Borland és mtsai. 1989; Pan és mtsai. 2011) (amellyel megakadályozzák a szingulett oxigén képződését), de scavengerként („gyökfogóként”) is védenek a szingulett oxigén káros hatásaival szemben, ha az már korábban képződött (**2.2 egyenlet**) (Foote és Denny 1968). A folyamat végén a triplett karotinoid  $\mu$ s időtartamon belül, hő emissziójának révén ( $^3\text{Kar}^* \rightarrow ^1\text{Kar} + \text{h}\nu$ ), oxigénfüggő módon kerül vissza alapállapotba. A  $^3\text{Kar}^*$  védő szerepe megalapozottnak tekinthető, bár a  $^3\text{Kar}^* \rightarrow ^1\text{Kar}$  relaxáció pontos sebessége és mechanizmusa az intakt sejtekben még vita tárgyát képezi. Mindemellett ahhoz, hogy a fotoprotektív mechanizmus működhessen, a karotinoid gerjesztési energia állapotának alacsonyabbnak kell lennie (pl. LH2-ben a spheroidene karotinoid triplett,  $^3\text{Kar}^* 84,1 \text{ kJ/mol} = 7030 \text{ cm}^{-1}$  (Rondonuwu és mtsai. 2004)), mint a  $^1\text{O}_2$  gerjesztési energiája ( $94 \text{ kJ/mol} = 7858 \text{ cm}^{-1}$  (Bensasson és mtsai. 1976)). A  $^3\text{Bkl}^*$  állapot kioltására a több mint hét konjugált kettős kötésű karotinoidok képesek, továbbá a kilenc vagy több kettős kötésűek képesek a szingulett oxigén állapotot is megszüntetni (Claes és Nakayama 1959; Mathis és Kleo 1973).

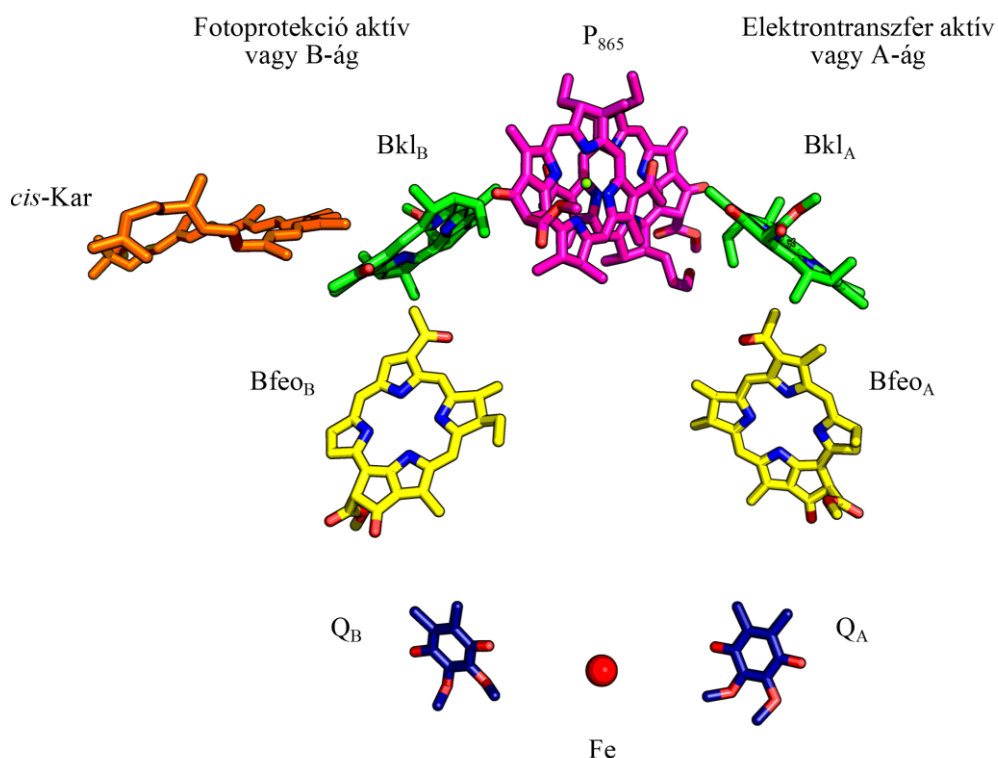
A gerjesztett triplett állapotú elsődleges donor ( $^3\text{P}^*$ ) és a Kar közötti energiatranszfer valamint a Kar szerkezete közötti kapcsolat már régóta ismert és tanulmányozott (Farhoosh és mtsai. 1997). A fotoszintetizáló baktériumok reakciócentrumában lévő karotinoidok általában 15-*cisz* konfigurációban vannak a fehérjeváz mentén (Hashimoto és mtsai. 2006), és össz-*transz* konfigurációban az antenna komplexekben (Koyama-szabály, (Koyama 1991)). Az össz-*transz* és a 15-*cisz* karotinoid konfigurációk természetes szelekciója összefüggésben áll az LH és RC karotinoidok fénygyűjtő és fotoprotektív funkcióival (Koyama és mtsai. 2007). A karotinoidok fénygyűjtő és fotoprotektív funkcióinak szigorú megkülönböztetése vitatható, mivel a Bkl tripletek nemcsak az RC-ban, de az LH-ban is könnyen előállíthatók. Ezen bizonytalanság mellett a karotinoid tripletek fotoprotektív funkciójának molekuláris mechanizmusait még mindig nem határozták meg részletesen.

Természetes körülmények között a gerjesztési energia hatékonyan átkerül az antennáról az RC fotokémiai aktív pigmentjére, és töltésszétválasztással csapdába esik, közel 100% kvantumhatásfokkal (Wraight és Clayton 1974). Az abszorbeált fény kis hányadát a Bkl-k fluoreszcenciaként emittálják, amelyet nem csak a fotokémia, de a karotinoid tripletekkel való kölcsönhatás - a gerjesztett állapot annihilációs folyamattal (szingulett-triplett fúzióval) – is kioltathatja (Monger és Parson 1977; Breton és mtsai. 1979). Ezért az időfelbontott Bkl fluoreszcencia mérése hatékony analitikai eszközt nyújt a gerjesztési energiatranszfer, a fotoprotekció és a fotokémiai csapdák vizsgálatára (van Grondelle és Duysens 1980; Kocsis és mtsai. 2010; Maróti és mtsai. 2013; Sipka és Maróti 2016).

## 2.5. Fotoszintetikus reakciócentrum fehérje

A fotoszintetikus reakciócentrum egy olyan pigment-protein komplex, amelyben az elsődleges töltésszétválasztás és az ahhoz társuló protonálódási folyamatok mennek végbe. Az integrális membránfehérjék közül elsőként a *Rhodopseudomonas (Rps.) viridis* RC-át kristályosították (Michel 1982), és határozták meg szerkezetét (Deisenhofer és mtsai. 1984, 1985). Ez a magasabb rendű növények fotoszintézisének megismerésében is nagy előrelépést jelentett, hiszen a már ismert hasonlóság alapján a bakteriális RC-ot a PSII RC (szerkezeti) modelljeként használták fel.

A *Rba. sphaeroides* 2.4.1 reakciócentrumba három fehérjealegységből áll. A polipeptideket L, M és H-val jelölik az angol elnevezésük (light, middle és heavy) kezdőbetűi után, amely az elektroforetikus mozgékonyaságuk alapján meghatározott molekulatömeg szerinti felosztás. A jelölés azonban félrevezető, mert a későbbi szekvencia analízis igazolta, hogy a H-alegység a legkisebb (Williams és mtsai. 1984). A félreértést az okozta, hogy ez az alegység a legkevésbé hidrofób, így az SDS-gélen a legkisebb mozgékonyaságot (azaz a legnagyobb molekulatömeget) mutatta (az elnevezést azonban megtartották az irodalomban). Az L- és az M -polipeptidek 180°-os forgási szimmetriát és nagyfokú homológiát mutatnak, továbbá az L és M alegységek egyenként öt transzmembrán  $\alpha$ -hélixből állnak, és az általuk formált komplexhez kötődnek a pigmentek és a kofaktorok. Az LM-komplex stabilitását egy nemhem-típusú vasionnak a hélixek négy hisztidinjével ( $\text{His}^{\text{L190}}$ ,  $\text{His}^{\text{L230}}$ ,  $\text{His}^{\text{M219}}$  és  $\text{His}^{\text{M266}}$ ), valamint egy glutaminsav ( $\text{Glu}^{\text{M234}}$ ) aminosavval képzett hat koordinációs kötése biztosítja (Allen és mtsai. 1988). A H-alegységnek csak egy transzmembrán hélice van, amely globuláris szerkezetű, és szorosan kapcsolódik az LM-komplexhez a citoplazmatikus oldalon. Mivel a két kinon kötőhelyet zárja le, így eltávolítása elsősorban a két kinon működésében okoz jelentős változásokat. Az LM-komplexhez kapcsolódnak redoxaktív kofaktorok is: 4 bakterioklorofill, melyek közül 2 dimert alkotva képezi a primer donort (P), míg a másik kettő a dimertől mintegy 5 Å távolságban helyezkedik el majdnem tökéletesen szimmetrikusan ( $\text{Bkl}_\text{A}$ ,  $\text{Bkl}_\text{B}$ ), 2 bakteriofeofitin ( $\text{Bfeo}_\text{A}$ ,  $\text{Bfeo}_\text{B}$ ), 2 kinon ( $\text{Q}_\text{A}$ ,  $\text{Q}_\text{B}$ ) a köztük elhelyezkedő nemhem típusú vasion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) és egy karotinoid molekula (*cis*-Kar) (2.7. ábra). A kofaktorok a dimeren és a vason átmenő tengelyre közelítőleg tükröszimmetriát mutató, A-val és B-vel jelzett ágat képeznek.



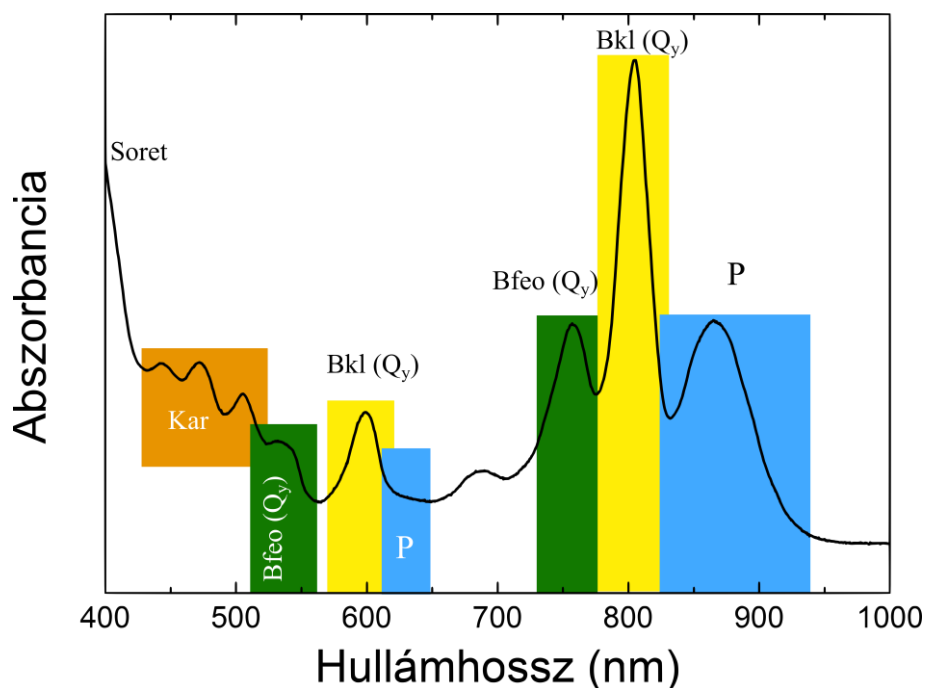
**2.7. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 reakciócentrum L és M polipeptidjeiben lévő kofaktorainak háromdimenziós elrendezése (PDB: 3I4D). A kofaktorok fitil- és izoprenoid oldalláncai az egyszerűség kedvéért nincsenek ábrázolva.

A szimmetria azonban nem tökéletes, ugyanis az A és B-ág funkcionálisan aszimmetriát mutat: fiziológiás körülmények között az elektrontranszfer az A ág mentén legalább hússzor nagyobb hatékonysággal megy végbe, mint a B-ágban (Michel-Beyerle és mtsai. 1988). Ennek lehetséges okai között szerepelhet: a dimer aszimmetriája (a tetrapirologyűrűk egyike nem tökéletesen sík); a szomszédos kofaktorok elektronfelhőinek különböző mértékű átlapolása a két ágban (az A-ágban közelebb van a Bkl a P-hez és a Bfeo-hez); a fitil (Bkl és Bfeo) és az izoprenoid (kinon) láncok aszimmetriája; a poláros aminosavak különböző eloszlása a két ágban a vasionnak nem tökéletesen szimmetrikus helyzete a kinonmolekulák között (körülbelül 2 Å-mel közelebb helyezkedik el a B ágban lévő kinonmolekulához).

<sup>6</sup> Az ábrát a PyMol szoftverrel készítettem.

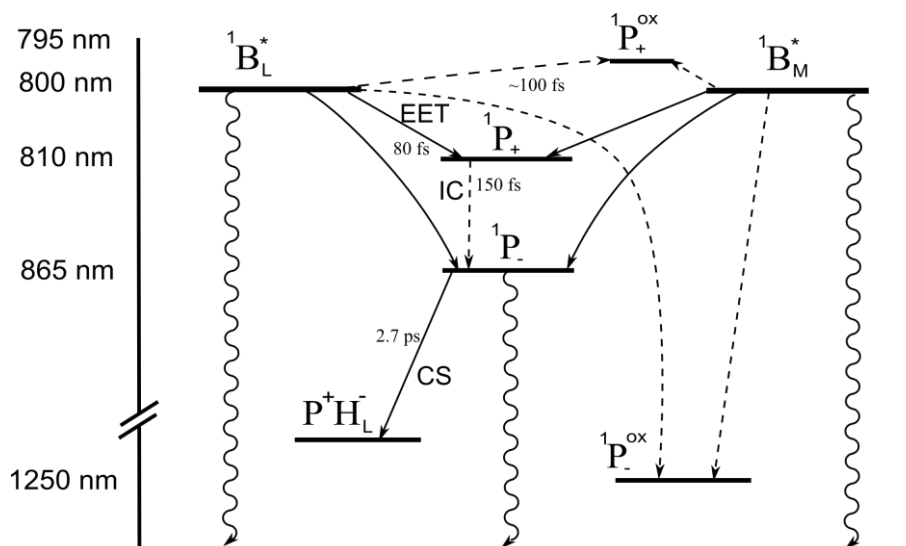
## 2.5.1. Abszorpciós spektruma

Az *Rba. sphaeroides* izolált reakciócentrum Q-sávjai megfelelnek a különböző típusú kofaktorok porfirin átmeneteinek. A Bkl speciális pár (P) abszorpciós maximumai 620 és 865 nm-nél van, a Bkl két keskeny sávban 600 és 800 nm között található, a bakteriofeofitin pedig körülbelül 540 és 750 nm-en nyel el (2.8. ábra).



**2.8. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 bíborbaktériumból tisztított RC abszorpciós spektruma, melyen más-más színnel jelöltem a Kar és a különböző kofaktorok jellemző abszorpciós hullámhossztartományát. Kondíciók: 2  $\mu$ M RC, 0,03 % LDAO, 10 mM Tris; pH 8.

A speciális pár exciton jellege miatt a  $Q_y$  sáv két lehetséges állapotot,  $P_+$  és  $P_-$ -t tartalmaz. A  $P_-$  gerjesztett állapot, abszorpciós maximuma 865 nm-nél van, amint azt már fentebb említettem. A második  $P_+$  gerjesztett állapot 810 nm hullámhosszon figyelhető meg, mely átfedésben van a monomer bakterioklorofillal (Jonas és mtsai. 1996), alacsony hőmérsékleten vállként figyelhető meg (Parson és Warshel 2009). Az abszorpciós spektrumot, valamint a lineáris dikroizmus (LD – linear dichroism) és cirkuláris dikroizmus (CD – circular dichroism) spektrumokat Hamilton-operátor segítségével viszonylag egyszerűen lehet modellezni (Knapp és mtsai. 1985).



**2.9. ábra.** A szingulett gerjesztett állapotú bakterioklorofill monomernek ( $^1B_A^*$  és  $^1B_B^*$ ), a dimer alsó ( $^1P_-$ ) és felső ( $^1P_+$ ) gerjesztett energia állapotainak energiaszint diagramja. A gerjesztési energiatranszfer (EET – excitation energy transfer), a belső konverzió (IC – internal conversion), a töltésszeparáció (CS – charge separation) és a fluoreszcencia emisszió (hullámos nyíl).

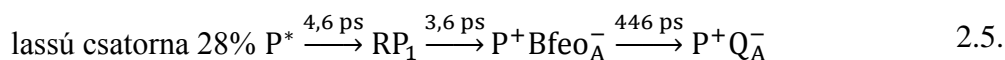
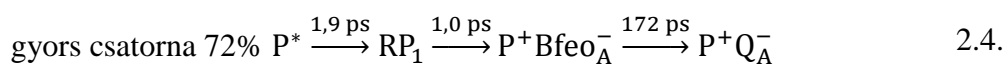
### 2.5.2. Fotokémiai reakció és elektrontranszfer a bakteriális reakciócentrumban

A fotokémiai folyamat akkor kezdődik, amikor a RC által elnyelt fény vagy az oda érkező gerjesztési energia a dimert gerjesztett szingulett állapotba ( $P^*$ ) hozza, amelyből korábbi modellek alapján az első jól elkülöníthető töltéspár ( $P^+B_{\text{feoA}}^-$ ) közel 4 ps alatt képződik. Az elektronnak a primer donorról a bakteriofeofitinre juttatását a bakterioklorofill monomer segíti a primer donor és a bakteriofeofitin, mint akceptor elektronfelhőinek átlapolásával. Ezt a kvantummechanikai jelenséget szuperkicserélődésnek vagy alagúteffektusnak nevezik (Marcus és Sutin 1985). Ezt felhasználva nem-adiabatikus (Nagarajan és mtsai. 1993), ill. adiabatikus (Woodbury és mtsai. 1994) közelítésben írták le a Bkl monomer szerepét. A legújabb vizsgálatok a monomer aktív részvételét mutatták ki az elektrontranszfer-láncban. Kakitani és munkatársai (Kakitani és mtsai. 2010) 870 nm-es gerjesztési kísérletet hajtottak végre 0,1  $\mu\text{J}$ -os és 1 kHz-es ismétlési sebességgel, -1 ps-től 30 ps-ig. A fehérfény-kontinuumot 800 nm-es hullámhosszon generálták, majd a 800 nm körüli régiót notch szűrővel blokkolták. Globális és target analízist alkalmaztak csak az első 4 szinguláris érték felhasználásával. Az illesztett időállandók  $\tau_1 = 1,9$  ps,  $\tau_2 = 2,7$  ps,  $\tau_3 = 200$  ps,  $\tau_4 = \infty$ . A következő modellt javasolták:

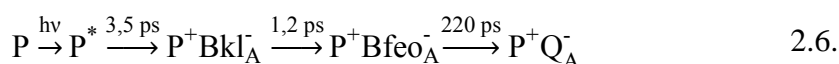


Ezenkívül a  $P^+Bkl_A^-$  számított abszorpciós hatáskeresztmetszetében 920 nm-nél erős negatív emissziós jelet figyeltek meg. Ezt fordított töltés rekombinációs folyamatként értelmezték.

Zhu és munkatársai (Zhu és mtsai. 2013) mágikus szögben 870 nm-es gerjesztéssel és 1 kHz-es ismétlési sebességgel végeztek méréseket. Az adatokat globális és target analízissel elemezték, melynek során a következő időállandókat kapták:  $\tau_1 = 3,2$  ps,  $\tau_2 = 1,3$  ps,  $\tau_3 = 201$  ps,  $\tau_4 = \infty$ . Ők a Kakitani és munkatársai által bemutatott munkában (Kakitani és mtsai. 2010) szereplő modellt elvetették és egy  $RP_1$  második közbenső állapotot vezettek be, melyet a  $P^+Bkl_A^-$  és  $P^+Bfeo_A^-$  elegyeként értelmezték. Ez a modell nem tudta teljesen reprodukálni az adatokat, így a minta heterogenitását feltételezték és egy elágazó modellel vizsgálták:

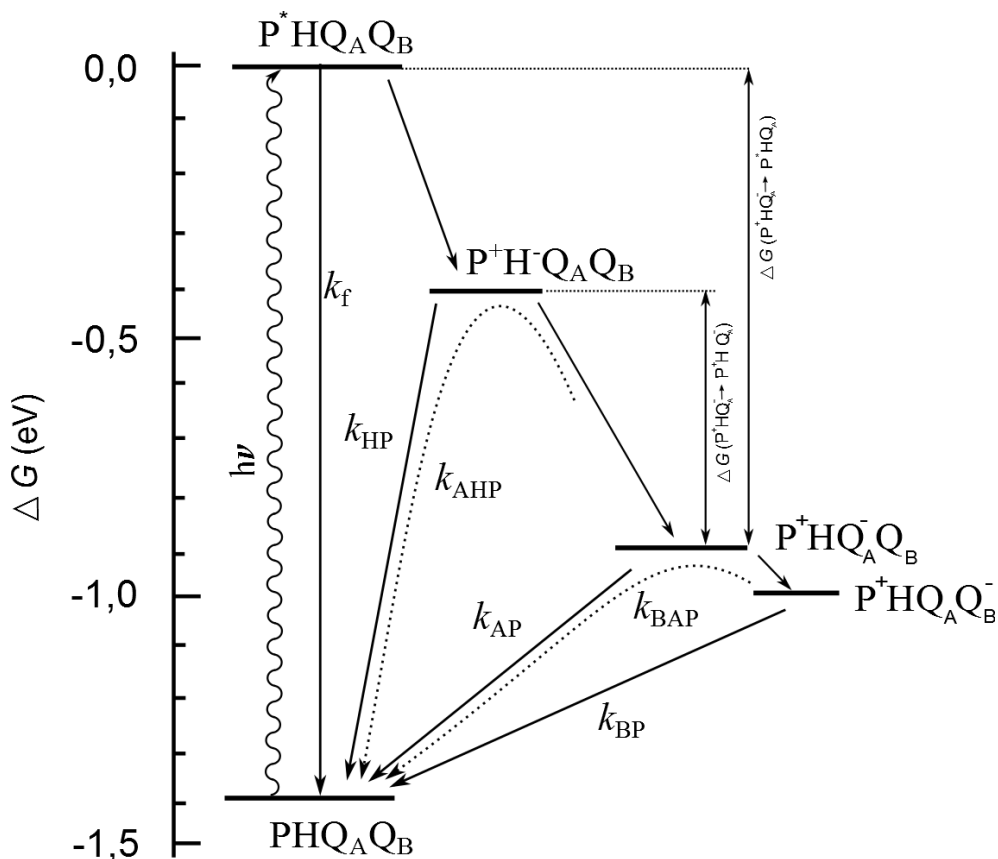


Dominguez és munkatársai (Dominguez és mtsai. 2014) a *Rba. sphaeroides* reakciócentrumainak primer dinamikáját szobahőmérsékleten alacsony gerjesztési intenzitással és alacsony gerjesztési sebességgel vizsgálták. A dekompozíciós analízis alapján három időállandót határoztak meg pikoszekundumos tartományban (kb. 1,2 ps, 3,5 ps és 220 ps). Az általuk mért spektrális és időbeli jelek összhangban vannak a korábban publikált lépcsős elektrontranszfer modellel, ahol az elektron a bakterioklorofillra 3,5 ps-os, majd a bakteriofeofitinra 1,2 ps-os időállandóval jut el. Továbbá nem találtak az adiabatikus elektrontranszferre utaló jelet 0,5 ps nál nagyobb időtartamban. Dominguez és munkatársai a következő modellt javasolták:



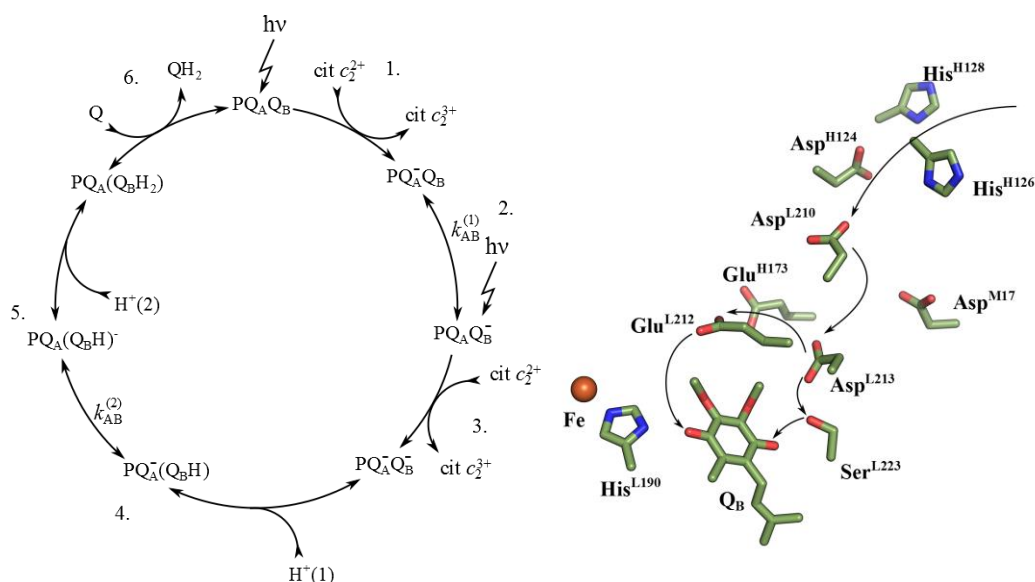
Tehát az elektrontranszfer legkorábbi szakaszán egy gyors lépést ( $P^* \rightarrow P^+Bkl_A^-$ ) egy még gyorsabb lépés ( $P^+Bkl_A^- \rightarrow P^+Bfeo_A^-$ ) követ. Ez azért szokatlan, mert az elektrontranszfer későbbi szakaszainál az elektrontranszfer sebessége folyamatosan csökken (**2.10. ábra**). Azaz a kialakult töltéspár további (egyre lassuló) elektronátadási lépésekkel stabilizálódik: először az elsődleges kinon, majd ezt követően a másodlagos kinon redukálódik. A kialakult töltéspár stabilizálódásának legfontosabb lépése a primer kinon redukciója. Ez a folyamat szolgáltatja a legnagyobb szabadenergia csökkenést ( $\Delta G$ ), ami gyakorlatilag irreverzibilissé teszi a töltésszétválasztást. A  $P^* \rightarrow P^+Q_A^-$  reakcióval járó szabadenergia-változást a bakterioklorofill dimer késleltetett fluoreszcenciás vizsgálatával határozták meg ( $-860 \pm 20$  meV (Arata és Parson 1981b), lásd **2.8 fejezet**).

Az elsődleges töltésszétválasztott állapot ( $P^+BfeoQ_A^-$ ) létrejötte után az elektrontranszfer az elsődleges kinonról ( $Q_A$ ) a másodlagos kinonra ( $Q_B$  -  $P^+BfeoQ_A^-Q_B^-$ ) kb. 100  $\mu s$  alatt történik. *In vitro*, amikor fiziológias vagy mesterséges elektrondonor nem áll rendelkezésre a fényindukált  $P^+$  redukálására, az elektron  $P^+Q_B^-$  rekombinációján keresztül kerül vissza alapállapotba.



**2.10. ábra.** Elektrontranszfer útvonalak *Rba. sphaeroides* reakciócentrumban, amelyekben nincs külső elektrondonor (pl.: cit. c<sub>2</sub>). A szaggatott vonalak a felfelé irányuló termikus vissz reakciók (töltés rekombináció) útvonalát jelzik. A fényelnyelés után a  $P$  szingulett gerjesztett állapota ( $P^*$ ) redukálja az  $A$ -ágban lévő  $Bfeo$ -t ( $H$ ),  $\sim 4$  ps alatt. Az elektron ezt követően  $\sim 220$  ps alatt kerül át  $Q_A$ -ra, majd  $Q_B$ -re 5-200  $\mu s$  alatt. A reakcióciklus minden egyes szakaszában vannak olyan versengő töltésrekombinációs reakciók, amelyek visszaredukálják  $P^+$ -t. Ha nincs  $Q_A$  akkor ez  $Bfeo$ -ról  $\sim 10$  ns fog megtörténni ( $k_{HP} \approx 7 \cdot 10^7 s^{-1}$ ). Ha az elektron eléri a kinonokat, akkor  $P^+$  visszaredukálása történhet direkt ( $k_{AP} P^+Q_A^-$  vagy  $k_{BP} - P^+Q_B^-$ ), vagy indirekt úton termikus aktiválással. Indirekt úton  $P^+Q_A^-$  töltésrekombináció a bakteriofeofitin redukálásán keresztül megy végbe  $k_{AHP}$  sebességi állandóval ( $P^+Q_A^-$ ,  $P^+H_A^-$  on keresztül), míg  $P^+Q_B^-$  töltésrekombináció  $P^+Q_A^-$  on keresztül megy végbe  $k_{BAP}$  sebességi állandóval. A megfigyelt sebességek a  $k_{AP}^{obs}$  vagy a  $k_{BP}^{obs}$  az összes útvonal sebességének összege (lásd részletesen (Shinkarev és Wraight 1993)). A natív RC-ben az  $Q_A$  visszaredukálása ( $Q_B$  hiányában)  $\sim 100$  ms ( $k_{AP}^{obs} \approx k_{AP}$  körülbelül  $10 s^{-1}$ ), és  $Q_B$  ról való töltésrekombináció  $\sim 1$  s ( $k_{BP}^{obs} \approx k_{BAP}$  körülbelül  $1 s^{-1}$ ).

*In vivo* körülmények között a RC fehérjéhez kapcsolódó citokróm alegység (*Rvx. gelatinosus*) vagy diffúzió útján odakerülő és bekötődött vízdékony citokróm  $c_2$  (*Rba. sphaeroides* 2.4.1 és *Rsp. rubrum*) gyorsan (1  $\mu$ s) képes redukálni a fényabszorpció után kialakult  $P^+Q_A^-$  töltéspárt (2.11. ábra 1. folyamata, (Adir és mtsai. 1996)). Ezzel a töltésrekombináció valószínűsége elhanyagolhatóvá válik fiziológiai körülmények között, így az elnyelt foton egyhez nagyon közeli kvantumhatásfokkal alakul át töltéspárrá (Wraight és Clayton 1974). A  $P^+Q_A^-$  töltéspár kialakulásával a citoplazmatikus oldalon pH-tól függően a RC szubsztöchiometrikus mértékben protonálódik, majd az elektrontranszfer hatására (0,1  $H^+/RC$ ) protonkötés figyelhető meg, ahol a protont a  $Q_B$  környezetében elhelyezkedő Glu<sup>L212</sup> aminosav veszi fel (Adelroth és mtsai. 2000). A  $P^+$  redukálása után a RC újabb töltésszétválasztásra válik alkalmassá, miután funkcionális  $Q_B$  jelenlétében az elektron eljut a másodlagos kinonra (2. folyamat).



**2.11. ábra.** A kinon redukciós ciklusa *Rba. sphaeroides* reakciócentrumában (bal oldali ábra) és a proton útja (jobb oldali ábra). P - Bkl-dimer;  $Q_A$ , ill.  $Q_B$  - elsődleges, ill. másodlagos kinon-akceptorok;  $QH_2$  - dihidrokinol; cit  $c_2$ - citokróm donor;  $H^+$  - proton. A (2), (4), (5) és (6) folyamatok reverzibilisek. Az első fényfelvillanás után az elektrontranszfer révén az akceptor (kinon) redukálódik, és a fotooxidált primer donor ( $P^+$ ) másodrendű donorral redukálódik (cit  $c_2$ ). A 2. és 3. lépésben az anionos szemikínontöltésindukált  $pK_a$  változásokat hoz létre egyes ionizálható aminosav csoportokban és  $H^+$ -t vesz fel – egészen pontosan a Glu<sup>L212</sup>-ban. Egy második fényfelvillanás után a második elektron átvitele  $Q_A^-$ -ről csak a  $Q_B^-$  protonálása után történik meg (4). A protonálás gyors, de kedvezőtlen, mivel a  $Q_B^-/Q_BH$   $pK_a$ -ja alacsony, de a második elektron átvitelével a kinon nagy  $pK_a$ -val rendelkezik mindkét proton esetében. A redukált  $Q_B$  két protonfelvételével kinol ( $Q_BH_2$ ) képződik, mely leválik és helyére új kinon köt be. A C1-O hely az első ami protonálódik ( $H^+(1)$ ), Asp<sup>L213</sup> és Ser<sup>L223</sup> aminosavakon keresztül. A C4-O csoport protonálódik másododjára ( $H^+(2)$ ), Glu<sup>L212</sup>-en keresztül. Az útvonal kettős elágazódása az Asp<sup>L210</sup> alatt vagy után történik (Wraight 2006).



A második foton abszorpciója már egy megosztott RC-ot ér ( $Q_A^-Q_B$  és  $Q_AQ_B^-$  állapotok) és csak azokban következik be újabb töltésszétválasztás, ahol  $Q_A$  oxidált állapotban van. A  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektronmegoszlást az egyelektronos egyensúlyi állandó ( $K_e$ ) adja meg, és mivel ez semleges pH-n igen nagy ( $K_e = 10$ -15, (Shinkarev és Wraight 1993)), a RC-ok többségében a kinon-akceptor rendszerbe a második fényfelvillanást követően két elektron van jelen ( $Q_A^-Q_B^-$ ). A második elektronnak  $Q_B^-$ -ra jutása végeredményben két proton felvételével társul (4. és 5. folyamatok). Ezek eredményeképpen kinol keletkezik ( $Q_BH_2$ ), amely lényegesen lazábban kötődik a RC-hoz, mint a szemikinin, leválik és helyét a kinon raktárból egy másik kinon tölti be (6. folyamat) (McPherson és mtsai. 1990). A kinon fotokémiai redox ciklusának ideje igen rövid (1 ms), amelyet a mobilis kofaktorok (citokróm és  $Q_B$ ) pH-függő redox ciklusa jelentősen befolyásol (Osváth és Maróti, 1997). Noha mindkét kinon-akceptor ubikinon-10 ( $UQ_{10}$ ) molekula a *Rba. sphaeroides* RC-ában, kötőhelyeik fehérjekörnyezete különbözik, és emiatt a  $Q_B$  két elektronnal, míg a  $Q_A$  csak egy elektronnal redukálódik. A  $Q_B$ -kötőhely sokkal polárosabb, több protonálható csoport található körülötte, mint a  $Q_A$  körül, ezért hasonlóan viselkedik mint szerves oldószerben, azaz kétszeresen redukálható. A  $Q_B/Q_B^-$  pár középponti redoxpotenciálja 60 meV-tal pozitívabb, mint a  $Q_A/Q_A^-$  páré in vivo pH = 8-nál (Rutherford és Evans 1980). A  $Q_B^-$  által felvett második elektron és az ezzel csatolásban álló protonfelvétel részfolyamatai sokáig tisztázatlanok voltak (4. folyamat). Korábban úgy vélték, hogy először a  $Q_AQ_B^{2-}$  állapot alakul ki, és ezután következik mindkét proton felvétele (Kleinfeld és mtsai. 1985). Későbbi eredmények már rámutattak arra, hogy a  $Q_A^-Q_BH$  állapot bizonyos körülmények között energetikailag stabilabb (Maróti és Wraight 1990). Graige és munkatársai (Graige és mtsai. 1996) hibrid reakciócentrumokkal ( $Q_A$ -helyen naftokinon származékok,  $Q_B$ -helyen ubikinon) végzett kísérletei az utóbbi elképzelést támasztották alá. A felsorolt folyamatok egymást követő fényfelvillanásokra a szemikinin ( $Q_A^-$  vagy  $Q_B^-$ ) felhalmozódását (páratlan fényfelvillanás), ill. eltűnését (páros fényfelvillanás) okozzák. Veszteségi tényezők miatt (egy- és két-elektronos egyensúlyi állandók, kinonkészlet nagysága, kinonbekötődés, kinolleválás, proton-hozzáférhetőség) az oszcilláció csillapított (Kleinfeld és mtsai. 1984).

## 2.6. Bakteriális reakciócentrumban célzottan kialakított mutációk

A fehérjék dinamikáját az aminosavak komplex kölcsönhatásai irányítják (Wraight 2006; Benkovic és mtsai. 2008; Frauenfelder és mtsai. 2009), következésképp a kulcsfontosságú helyeken létrehozott mutációk nagy változásokat okozhatnak a fehérje funkcióiban és energetikájában (Townley és mtsai. 2001; Wang és mtsai. 2006). A redox fehérjék mutációszabályozásának általános elve tesztelhető a fotoszintetikus baktériumok RC-aiban, amely mint modell rendszer szolgálhat ezekre a vizsgálatokra. A bakteriális RC a membránfehérjék 3D-s struktúrái egyre jobb (2,5 Å (Stowell és mtsai. 1997) és 1,87 Å

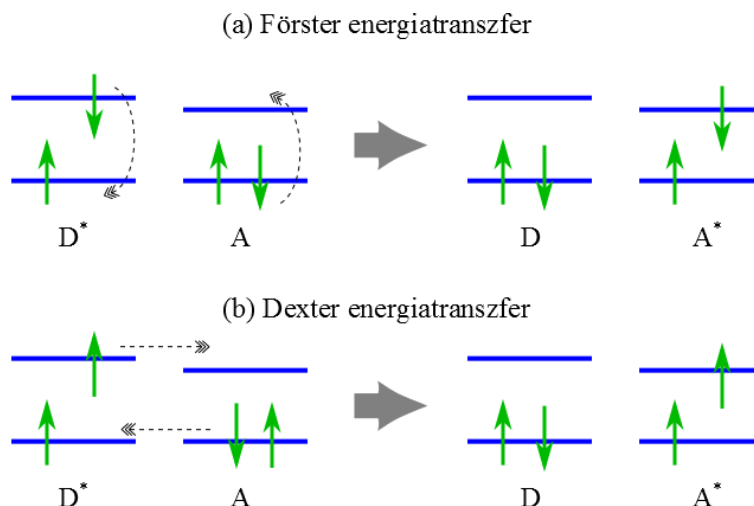
(Koepke és mtsai. 2007)) felbontással válnak elérhetővé, mellyel egyre pontosabb szerkezeti információkhoz jutunk. A szerkezeti információk feltárják a kofaktorok kötőhelyeit és pontos orientációját, valamint azok kölcsönhatását a fehérjékkel. Az így nyert adatok szilárd alapot nyújtanak az abszorpciós és fluoreszcenciás vizsgálatok eredményeinek atomi szintű értelmezéséhez (Guo és mtsai. 2012). A töltésszétválasztás kinetikáját és termodinamikáját meglehetősen könnyű tanulmányozni a kofaktorok különböző redox állapotokban bekövetkező fényindukált abszorpció-változásának detektálásával. Mindezek az előnyök lehetővé teszik a struktúra energetika-függő kapcsolatának finomelemzését, beleértve az elektron- és protontranszfer folyamatok értelmezését (Maróti és Wraight 1997; Okamura és mtsai. 2000; Wraight 2004). A bakteriális RC fényenergia kémiai energiává való átalakításának hatékonysága miatt hosszú ideje modellfehérje a mesterséges rendszerek tervezésénél (Maróti és Trotta 2012). A RC vizsgálatokból kapott eredményeket gyakran használják a fotoaktív vagy légúti rendszerekben részt vevő hasonló redox- és/vagy proton-transzport fehérjék funkciójának megértéséhez (Zannoni és mtsai. 2009).

Mutáns reakciócentrumon végzett kísérletek kimutatták, hogy a speciális párt (P) alkotó Bkl molekulák karbonil csoportjai és a hisztidin aminosavak közötti hidrogénkötések szignifikánsan befolyásolják az elsődleges donor redoxpotenciálját (Moser és mtsai. 1992; Williams és mtsai. 1992). A dimer középponti potenciálja, kb. 500 mV, mely közvetlenül viszonylag könnyen mérhető (a RC 865 nm-es (dimer) abszorpciós csúcsának nyomon követésével). A kofaktorok kémiai természetének megváltozása közvetlen hatással van a középponti potenciáljukra. Például egy Bkl→Bfeo mutáció létrehozása egy heterodimer mutánsban körülbelül 130 mV-val megnöveli a dimer redoxpotenciálját (Allen és mtsai. 1996). Mivel az elektronikus állapotok energiái érzékenyek a környezetre, ezért a dimernek a fehérjével való kölcsönhatásai (ideértve a hidrogénkötéseket és a reziduumok töltöttségéből származó elektrosztatikus erőket) befolyásolhatják a dimer középponti potenciálját. Emiatt a RC fehérjében kiváltott mutációk modulálhatják a dimer energiáját. A dimer fehérjével való kölcsönhatásának egyik közvetlen módja a konjugált karbonil csoportok hidrogénkötéseinek keresztül lehetséges, melynek hatása a dimer középponti redoxpotenciáljára jól dokumentált (Allen és Williams 1995; Williams és Allen 2009). Egy hidrogénkötés hozzáadása 60-120 mV-tal növeli a dimer középponti potenciálját, míg egy hidrogénkötés elvesztése a vad típusú RC-ban lévőhöz képest körülbelül 80 mV-tal csökkenti a potenciált (Stocker és mtsai. 1992; Murchison és mtsai. 1993). A hidrogénkötések hálózatának többszörös, szisztematikus változása a középponti potenciálok széles skáláját eredményezi (Lin és mtsai. 1994). Ha azonban a bakterioklorofill monomerhez alakítunk ki hidrogénkötéseket, azokat nem befolyásolják lényegesen az elsődleges fotokémiát (Chen és mtsai. 2004). Mindezeket figyelembe véve a reakciócentrum fehérjének mind a biokémiai manipulációval, mind a mutációval szembeni figyelemre méltó robusztussága lehetőséget biztosít az

elektrontranszfer tulajdonságainak széleskörű vizsgálataira, amellyel éltünk is a munkánk során.

## 2.7. Gerjesztési energia átadása

Amennyiben a pigment-molekulák nem híg oldatban, hanem kompakt struktúrában foglalnak helyet (a pigment-molekulák kölcsönhatnak egymással), a gerjesztési energiájukat a gerjesztési energia átadásával is elveszíthetik. Ha a gerjesztett szingulett ( $S_1$ ) illetve tripllett ( $T_1$ ) állapotú bakterioklorofilok fényemisszióval, vagy belső konverzióval (IC – internal conversion) térnek vissza alapállapotba, akkor a gerjesztési energia a fotoszintézis számára elvész. Az  $S_1$  vagy  $T_1$  állapotú molekula a gerjesztési energiáját átadhatja egy másik, alapállapotban lévő molekulának. Ekkor az alapállapotban lévő molekula kerül  $S_1$  vagy  $T_1$  állapotba, míg az energiadonor molekula visszatér az alapállapotba. Ezt a jelenséget energiatranszfernek nevezzük. A gerjesztési energia átadása két pigment-molekula között két úton mehet végbe (2.12. ábra): a **Förster-típusú** mechanizmus során (az angol elnevezés alapján röviden **FRET** – Förster resonance energy transfer) a molekulák dipól-dipól kölcsönhatás során (sugárzás nélküli energiaátadás formájában) cserélik ki a gerjesztési energiát az energetikai rezonanciában álló donor és akceptor között. A gerjesztési energiatranszfer létrejöttéhez egyrészt a molekuláknak jól meghatározott távolságban (1-10 nm) kell lenniük egymástól, másrészt a donor pigment emissziós (kibocsátási) és az akceptor pigment abszorpciós (elnyelési) spektrumainak átfedésben („rezonanciában”) lenni (Scholes 2003; Sener és mtsai. 2011; Grayson és mtsai. 2017). A **Dexter-típusú** mechanizmus során a gerjesztési energia átadását vegyértékelektron-csere kíséri. Az ilyen jellegű mechanizmus részben a szingulett-szingulett, de különösen a tripllett-tripllett interakciókat kíséri (Koyama és Kakitani 2006). A fotoszintetikus pigmentek gerjesztési energia átadási folyamatai többnyire Förster-típusú mechanizmussal működnek. Az összetett gerjesztési energiatranszfer folyamat végeredményeképpen a donor-molekula visszatér  $S_0$  állapotba, míg az akceptor-molekula  $S_1$  állapotba kerül. Az energiatranszfer kémiaiilag különböző és azonos molekulák között is lejátszódhat. Ha kémiaiilag azonos molekulák között történik, akkor a folyamat többször ismétlődhet, azaz egy foton abszorpciója során felvett gerjesztési energia molekuláról molekulára adódhat át, amit energia-migrációnak nevezünk (Nyitrai és Solti 2013).



**2.12. ábra.** (a) Förster energiatranszfer és (b) Dexter energiatranszfer, mely lehetővé teszi a gerjesztési energia vándorlását a pigment-rendszerben. A vízszintes vonalak a donor (D) és az akceptor (A) molekulák HOMO és LUMO energiaszintjei; a csillag a gerjesztett állapotot jelzi; a szaggatott nyilak az elektronikus konfiguráció egyidejű átrendeződését jelzik.

A Förster energiatranszfer hatásfoka annál nagyobb, minél nagyobb a megfelelő spektrumok átfedése, továbbá erősen függ a transzferben résztvevő molekulák egymástól való távolságától ( $\sim R^{-6}$ ) és irányítottságától. A FRET-el ellentétben a Dexter-típusú energiaátadás nem igényli a donor és az akceptor molekulák emissziós és abszorpciós spektrumának átfedését. Ugyanakkor a Dexter energiaátadás valószínűsége szintén erősen függ a donor és az akceptor közötti távolságtól (távolság növekedésével az energiaátadás valószínűsége exponenciálisan csökken). A FRET felülmúlja a Dexter energiatranszfer hatékonyságát a szingulett excitonok esetében, míg a tripletteket nagyobb valószínűséggel a Dexter mechanizmus segítségével lehet átvinni a molekulák között (Koyama és Kakitani 2006). A hatékony transzferhez az akceptor gerjesztési energiájának azonban alacsonyabbnak kell lennie a donor molekulához képest.

## 2.8. Késleltetett fluoreszcencia

Minden fotoszintetizáló szervezet képes fényt kibocsátani hosszabb idővel a megvilágítását követően is. A sugárzás mérése lehetőséget nyújt olyan következtetések levonására, amelyek biokémiai, fotofizikai reakciók felléptére, azok sebességi állandóira vonatkoznak, és más mérések eredményeivel összevetve hasznos adalékul szolgálnak az élő rendszerek egyes szerkezeti és működési problémáinak tisztázására.

A késleltetett fluoreszcencia (DL – Delayed Light) az  $S_1 \rightarrow S_0$  szingulett átmenetből keletkezik, akár csak a prompt fluoreszcencia (PF), de attól időben késleltetve (Goedheer 1963). A gerjesztési energia az  $S_1$  alatt lévő valamely nívórendszeren (csapdarendszeren)

befogódik, de előfordulhat, hogy véges valószínűséggel termikusan aktiválódik, és újra  $S_1$  állapotú kromofór keletkezik, ami foton emisszióval dezaktiválódik.

Bakteriális reakciócentrum dimerjéből származó késleltetett fluoreszcencia a gerjesztett állapotú Bkl dimer ( $P^*$ ) termikus repopulációjából ered, bármely töltésszétválasztott  $P^+Q^-$  állapotból történő fordított elektrontranszfer útján. Ez a visszafelé folyó reakció azonban igen kis valószínűséggel következhet be. Továbbá a keletkezésének természetéből adódóan a prompt fluoreszcenciától spektrálisan lehetetlen elválasztani, hiszen a két spektrum megegyező. A nehézséget a két fluoreszcencia-típus időbeli szétválasztással lehet megoldani.

A RC töltésszétválasztott állapotának, mint csapdának nincs tripllett jellege, ezért az oxigénnek és az ütközésnek gyakorlatilag nincs kioltó hatása a késleltetett fluoreszcenciára. Ezzel szemben jól ismert, hogy a karotinoid tripllett a fotoszintetizáló rendszerekben kioltja a klorofill (prompt) fluoreszcenciát. Az eltérés a két fluoreszcencia keletkezési helyzetében mutatkozik: míg a prompt fluoreszcencia az antenna bármely pontjából származhat, és így a fluoreszcencia kioltóknak (pl.:  $^3\text{Kar}$ -nak) szabadon kitett, a késleltetett fluoreszcencia a RC-hoz ill. annak közvetlen környezetében kötött, és így a kioltóktól jobban elszigetelt. Továbbá, a DL szobahőmérsékleten is detektálható, ami egyáltalán nem elhanyagolható szempont az élő rendszerek vizsgálatában.

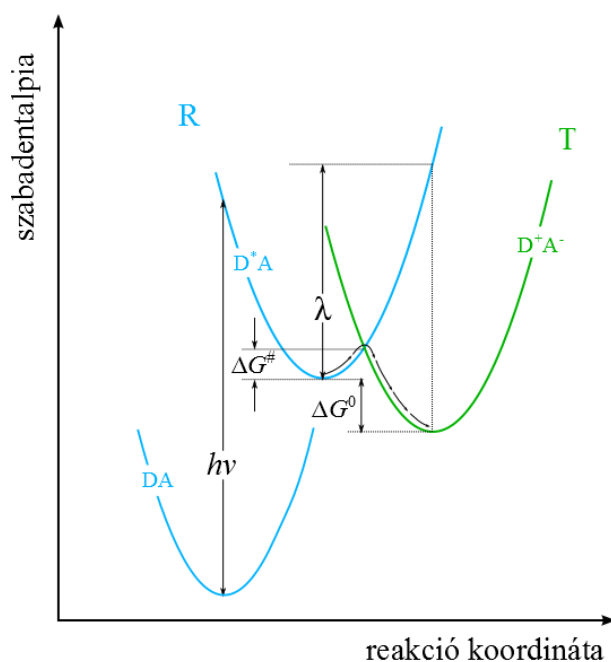
Késleltetett fluoreszcenciát először spenótból izolált zöldszíntesten sikerült megfigyelni (Strehler és Arnold 1951), majd bíborbaktériumokon Arnold és Thompson mért DL-t (Arnold és Thompson 1956), de a megfigyelt fényintenzitás lényegesen kisebb volt, mint a magasabb rendű növények és algák esetében. A fotoszintetikus baktériumok késleltetett fluoreszcenciájáról szóló első részletes tanulmány Clayton nevéhez fűződik (Clayton 1965). Az 1980-as években kezdtek el foglalkozni a *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium RC-ának késleltetett fluoreszcenciájával (Arata és Parson 1981a). Az izolált RC mintáknál az egyik fő nehézséget a fluoreszcencia hatásfoka jelenti, amely rendkívül kicsiny,  $4 \pm 1,5 \cdot 10^{-4}$  (Woodbury és mtsai. 1985; Zankel és mtsai. 1968). Ennek ellenére a  $P^*$  által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia mérése nagyon érzékeny módszer a töltésstabilizáció során kialakuló redox párok szabadenergia-szintjeinek különböző körülmények következtében bekövetkező változásának nyomon követésére (Arata és Parson 1981a; Schenck és mtsai. 1982; Woodbury és Parson 1984; Woodbury és mtsai. 1986; Turzó és mtsai. 2000; Rinyu és mtsai. 2004; Onidas és mtsai. 2013). Szinte az egyedüli módszer, amellyel abszolút módon megkaphatjuk a tranziens állapotok szabadenergia-szintjeit. A töltésszétválasztott állapotok *in situ* szabadenergia szintjei ugyanis meghatározhatók a gerjesztett dimerhez viszonyítva, a késleltetett és a prompt fluoreszcencia amplitúdóinak (vagy intenzitásainak) arányából (Arata és Parson 1981a). A  $P^*$  és  $P^+Q_A^-$  állapotok közti szabadenergia különbséget ( $\Delta G_{P^*A}^0$ ) *Rhodobacter sphaeroides* esetében  $-860 \pm 20$  meV, 303 K hőmérsékleten (Arata és Parson 1981a; Woodbury és Parson 1984), később (pH = 8,0)  $-910 \pm 20$  meV (Turzó és mtsai. 2000);  $-900 \pm 20$  meV

(Onidas és mtsai. 2013), *Rba. sphaeroides* GA esetében  $-880 \pm 20$  meV-ban (Rinyu és mtsai. 2004) határozták meg.

## 2.9. Fényindukált elektrontranszfer, Marcus-elmélet

A fényindukált elektrontranszfer az egyik legalapvetőbb fotokémiai reakció, amely egyúttal a legkedvezőbb módja a fényenergia átalakításának vagy a fényenergia tárolásának. Ez a folyamat egy donor és egy akceptor molekula között zajlik le a gerjesztést követően, ami egy töltésszétválasztott állapot kialakulását eredményezi, amely elektron-lyuk rekombináción keresztül kerülhet vissza alapállapotba (back-reakció).

Az elmélet (melyet Rudolph Arthur Marcus dolgozott ki) a fényindukció után létrejövő rögzített és nem túl nagy távolságra történő elektrontranszfer leírására és értelmezésére szolgál (Marcus 1963; Marcus és Sutin 1985). Az elméletben az elektrontranszfer reakciót értelmezhetjük az átmeneti állapot elméletével, ahol a reaktáns állapot a gerjesztett donor – akceptor ( $D^*A$ ), és a termékállapot a donor és akceptor ( $D^+A^-$ ) töltésszétválasztott állapota (2.13. ábra).



**2.13. ábra.** A Marcus-elmélet szerint a reaktánsok (R - alap állapot, DA és gerjesztett állapot,  $D^*A$ ) és a termékek (T - töltésszétválasztott állapot,  $D^+A^-$ ) szabadentalpiája egy-egy parabolikus potenciálfelülettel szemléltethető a reakciókoordináták függvényében. A kiindulási molekulákat az aktiválási energiának ( $\Delta G^\ddagger$ ) megfelelő potenciálgát választja el a terméktől. Az átmeneti állapot (aktivált komplex) konfigurációját és energiatartalmát ennek a potenciálgátnak a legmagasabb pontja adja.

A Franck-Condon-elv szerint a fénygerjesztés egy vertikális átmenetet idéz elő a potenciálfelületek között, azaz a nukleáris koordináták és impulzusok közben nem változnak, továbbá az energia-megmaradás miatt az elektrontranszfer csak horizontálisan

történhet, azaz a donor molekula gerjesztését követően az elektrontranszfer a két parabola metszéspontját jellemző állapot környezetében jöhet létre.

A két minimum közötti potenciális energia-különbség a redox reakció szabadenergia-változásával ( $\Delta G^0$ ) egyenlő. A reorganizációs energia ( $\lambda$ ) annak az energiának felel meg, amelyet a kezdeti egyensúlyi állapothoz kell hozzáadni ahhoz, hogy a kiinduló állapotot olyan geometriai helyzetbe vigyük, amely megfelel a végállapot egyensúlyi geometriai állapotának anélkül, hogy az elektrontranszfer-reakció lezajlott volna. A harmonikus modellhez kapcsolódó, a kiindulási molekulákat a terméktől elválasztó potenciálgát, az aktiválási energia ( $\Delta G^\ddagger$ ):

$$G^\ddagger = \frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda} \quad 2.7.$$

Az elektrontranszfer sebességi állandója ( $k_{DA \rightarrow D^+A^-}$ ) - rögzített donor-akceptor távolság mellett - függ a reakció során létrejövő szabadenergia-változástól -  $\Delta G^0$  -, a molekula, illetve környezetének relaxációjához tartozó reorganizációs energiától -  $\lambda$  -, a donor- és az akceptor-állapotok közötti elektronikus csatoltságot megadó Hamilton-mátrixtól -  $V$ .

$$k_{DA \rightarrow D^+A^-} = \frac{2\pi}{\hbar} |V|^2 \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} e^{-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda k_B T}} \quad 2.8.$$

---

### 3. Célkitűzések

A fotoszintetizáló bíborbaktériumok kitűnő modellként szolgálnak a fényindukált szerkezeti változások, az elektron- és protontranszfer, az elektrosztatikai folyamatok valamint az olyan károsító hatások elleni védelem tanulmányozására, mint a magas fényintenzitás és a nehézfémion-szennyezés. Emiatt a vizsgálataimat intakt fotoszintetikus bíborbaktériumokkal és izolált reakciócentrum fehérjével végeztem.

1. A bakteriális RC-ban néhány kulcsfontosságú aminosav módosításával közelebbről feltárhatjuk a fehérjemátrixnak az elektrontranszferben játszott szerepét. Ezért munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- 1.1. Milyen energetikai változásokat idéznek elő a RC donor oldalán a dimernek a  $P_A$  és a  $P_B$  2-acetil- és 9-ketocsoportjaihoz közeli pontmutációi, amelyek a hidrogénhid-kötések módosulásával járnak?
- 1.2. Hogyan befolyásolják az akceptor oldalon a  $Q_A$  termodinamikai tulajdonságait a közelben és a vas ligandumban létrehozott aminosav mutációk?
- 1.3. Hogyan módosul a tripla mutánsban ( $LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}$ ) a Bkl prompt fluoreszcenciájának hatásfoka, anizotrópiája és indukciója? Az erre adott válaszból a RC fehérjén belüli, a Bkl dimer és Bkl monomer közötti energiatranszfer jobb megértését várjuk.

A fenti kérdések megválaszolására a bakterioklorofill szelektív gerjesztésével (kvázi) steady-state (fluoreszcencia anizotrópia) és kinetikai (fluoreszcencia indukció, késleltetett fluoreszcencia) spektroszkópiai méréseket végeztem. Ezek a módszerek bizonyítottan megfelelő és érzékeny eljárások a bakteriális fotoszintézis kinetikai és termodinamikai jellemzőinek tanulmányozásához.

2. A nehézfém-ionok és közülük is a két vegyértékű higany-ion különösen kártékonyak az élővilágra, és ezen belül a fotoszintetizáló baktériumokra. Az utóbbiak egyszerűségüknél és molekuláris részletességgel feltárt működésüknél fogva (mint modellek) elsődlegesen alkalmasak a roncsoló hatások tanulmányozására. Általános célként tűztem ki a bakteriális RC fehérjéhez kötött  $Hg^{2+}$  ion által kiváltott hatásmechanizmusok felderítését, ezért arra az általános kérdésre keresem a választ, hogy milyen szerkezeti és funkcionális változásokat idéz elő, és ha azonosítható ezen vizsgálatok alapján, melyek a specifikus támadási helyek?

- 2.1. Maga után von-e energetikai változásokat, ha a RC donor oldalához  $Hg^{2+}$  ion kötődik? Befolyásolja-e ez a másodlagos elektron donornak, a redukált citokrómnak a RC-hoz való kötődését és az elektronnak az oxidált donorhoz való átadását?
- 2.2. Milyen hatásokat vált ki a  $Hg^{2+}$  ionnak a RC akceptor oldalához való kötődése? Hogyan módosul a kinon-akceptor rendszer energetikája, a kinonok közti



elektrontranszfer kinetikája és a proton-felvétel? Ezek mindegyike alapvető fontosságú a RC alapműködéséhez.

3. A nehézfémion-szennyezés mellett az erős fényintenzitás is a gyakori környezeti (stressz)hatások közé tartozik. A mechanizmusuk megértése és az ellenük való védelem tanulmányozása és kidolgozása napjainkban központi jelentőségűvé vált.
  - 3.1 Ennek jegyében feladatul tűztem ki, hogy a Bkl fluoreszcencia mérésére alapozva érzékeny módszert dolgozzak ki a gerjesztett triplett állapotú Kar-ok és/vagy Bkl-ok mérésére. Elsősorban a fény-indukált karotinoid tripletek ( $^3\text{Kar}$ ) keletkezésére és élettartamának mérésére koncentráltam, hogy ezzel feltérképezhessem a környezetükkel kialakított dinamikus kölcsönhatásukat.
  - 3.2 Célnak tekintettem, hogy a fotoszintetizáló baktériumok minél szélesebb körét vizsgálhassam, és állapíthassak meg minél általánosabb összefüggéseket. Ennek érdekében a kísérleteinkbe az alábbi baktériumokat vontuk be: *Rubrivivax* (*Rvx.*) *gelatinosus* (anaerob és semianaerob), *Rhodospirillum* (*Rps.*) *rubrum*, *Thiocapsa* (*Thio.*) *roseopersicina*, *Rhodobacter* (*Rba*) *sphaeroides* 2.4.1 valamint karotinoid és citokróm módosított mutánsokat: *Rba. sphaeroides* Ga, R-26 és *cycA*.
  - 3.3 Mivel intakt sejtekben a  $^3\text{Kar}$  fényvédő funkciója nem csak a RC-ra korlátozódik, ezért logikusan adódik a kérdés, hogy a  $^3\text{Kar}$  fotoprotektív működése leírható-e egy olyan modellel, amelyben a karotinoidok nem csupán a RC-ban (vagy annak közvetlen közelében vannak), hanem kiterjednek a Bkl pigmentek által meghatározott pigment-rendszerre (antenna-rendszerre)?
  - 3.4 Az intenzív fénygerjesztés hatására keletkező  $^3\text{Kar}$  követi-e a fotokémiát (töltésszétválasztást) vagy azzal párhuzamos és attól független folyamat eredménye?
  - 3.5 Meghatározható-e a bakteriális törzsben különböző számú konjugált kettős kötéssel előforduló karotinoidok ismeretében a megfigyelt  $^3\text{Kar}$  élettartam?
  - 3.6 Megfigyeltük, hogy a fénygerjesztés alatt mért  $^3\text{Kar}$  élettartama lényegesen rövidebb, mint a sötétben mért  $^3\text{Kar}$  élettartama. Mi lehet ennek az oka?

---

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Baktériumtörzsek tenyésztése

A munkám során *Rba. sphaeroides* bíbor nemkén fotoszintetikus baktériumokat Siström-féle tápoldatban (Siström 1960) neveltünk, mely K-szukcinátot tartalmaz elektron forrásként. A fotoszintetikus növekedésre képes törzsek (*Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum*, *Rvx. gelatinosus*, *Thiocapsa (Thio.) roseospicina*) tenyészeit teljesen feltöltött üvegedényekben tartottuk (csiszolt dugós kémcső vagy nagyobb, csavaros tetejű Duran üveg) oxigén nélküli (fotoheterotróf és anaerob növekedés) környezetben, 40 W-os wolframszálas izzók fénye mellett. A megvilágítás erősségét  $13 \text{ W/m}^2$ -re állítottuk. Az *Rba. sphaeroides* R26 karotinoid mentes mutáns esetében az átoltást követően a megvilágítás előtt a sejteket 5-8 órán keresztül sötétben tartottuk, hogy a tápoldatban oldott oxigén a sejtlélegzés során felhasználódjon (Maróti és Wraight 1988b). A *Rvx. gelatinosus* törzset André Verméglio (CEA Laboratoire de Bioenergetique Cellulaire, Saint-Paul-lez-Durance, France), a *Thio. roseospicina* törzset pedig Bagyinka Csaba (MTA-SZBK, Biofizikai Intézet) laboratóriumából kaptuk. A fotoszintetikus növekedésre képtelen, citokróm  $c_2$  mentes *Rba. sphaeroides* *cycA* törzset (Timothy J. Donohue -tól, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin USA) rázóasztalon (1 Hz), sötétben, Erlenmeyer lombikokban neveltük ugyanabban a tápoldatban kanamycin és spectinomycin antibiotikumokkal kiegészítve, szemianaerob környezetben. A sejteket a növekedésük stationer fázisában használtuk fel, és a mérések előtt nitrogénnel 15 percre buborékolattuk.

A mutáns RC-okat tartalmazó *Rba. sphaeroides* törzset Dr. Valérie Derrien (Laboratoire de Chimie Physique, Université de Paris-Sud, Franciaország) tervezte és állította elő. Mivel a mutáns sejtek nem fotoszintetizálnak (nem voltak „fotokompetensek”), és beépített kazetták miatt két antibiotikumra is rezisztensek voltak, ezért sötétben  $30^\circ\text{C}$ -on, rázógépen (140 fordulat/perc) félig töltött Erlenmeyer-lombikban kanamycin ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) és tetraciklin ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) antibiotikummal kiegészített tápoldatban nevelődtek (Spitz és mtsai. 2005).

### 4.2. Reakciócentrum izolálása

A reakciócentrumok preparálásához mintegy 100 g vizes tömegű sejtre volt szükség, amelyeket a preparálás előtt többször átmostunk Tris-pufferrel (10 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 8,0). A sejtszuszpenziót Tris-pufferrel 160 mL-re feltöltöttük, majd ultrahanggal feltörtük a sejteket. Az ultrahangos feltáráshoz SONOPLUS Ultrasonic homogenizer-t használtunk (Bandelin, Németország). Egy speciálisan a sejtfeltáráshoz tervezett, jégbe állított üvegedényben a készülék TT 13 titánfejét használva 1 órán át közel 100% (kb. 70 W) teljesítménnyel ultrahangoztuk a sejteket impulzus üzemmódban (5

impulzus/periódus). A sejtmarmadványokat (sejtfal, feltöretlen sejtek) centrifugálással távolítottuk el (10 perc,  $40000 \times g$ ), majd a felülúszót ultracentrifugáltuk (90 perc,  $240000 \times g$ ). Az üledékben kapott kromatofórákat finom ecsettel felszuszpendáltuk, majd a fehérjét 0,45% LDAO detergenst tartalmazó Tris-pufferrel kioldottuk. A nem szolubilizált részeket újabb ultracentrifugálással választottuk el. A felülúszóból a RC-ot frakcionált ammónium-szulfátos kicsapással, majd DEAE Sephacell anioncserélő oszlopkromatográfiával különítettük el. Az oszlopkromatográfia előtt a mintát dializálással sómentesítettük. A sómentesített fehérjeoldatot anioncserélő oszlopra kötöttük, sómentes, majd 60 mM NaCl-ot tartalmazó oszlopmosó pufferrel (10 mM Tris; 20  $\mu$ M EDTA; 0,02% LDAO) mostuk, amíg az eluátum abszorpciós spektruma nem változott. A RC-ot az oszlopról 250 mM NaCl-ot tartalmazó pufferrel (10 mM Tris; 20  $\mu$ M EDTA; 0,1% LDAO) eluáltuk és kistérfogató frakciókat gyűjtöttünk. A feltárás hatékonyságát és a RC tisztaságát optikai úton ellenőriztük. A mennyiségi viszonyokra a monomer bakterioklorofil 802 nm-es csúcsánál mért abszorpció ( $\epsilon = 318 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (McPherson és mtsai. 1994)), míg a RC tisztaságára az OD280nm/OD800nm arány (optikai denzitások viszonya adott hullámhosszakon, tipikusan 1,3 körüli érték) adott felvilágosítást. A koncentráció és a tisztaság megállapítása után a reakciócentrum frakciók ismételt dializálása következett TL pufferben (10 mM Tris; 0,03% LDAO; pH 8,0) a sókoncentráció csökkentése érdekében, majd a reakciócentrumokat mélyhőmérsékleten befagyasztva ( $-80^\circ\text{C}$ -on) tároltuk.

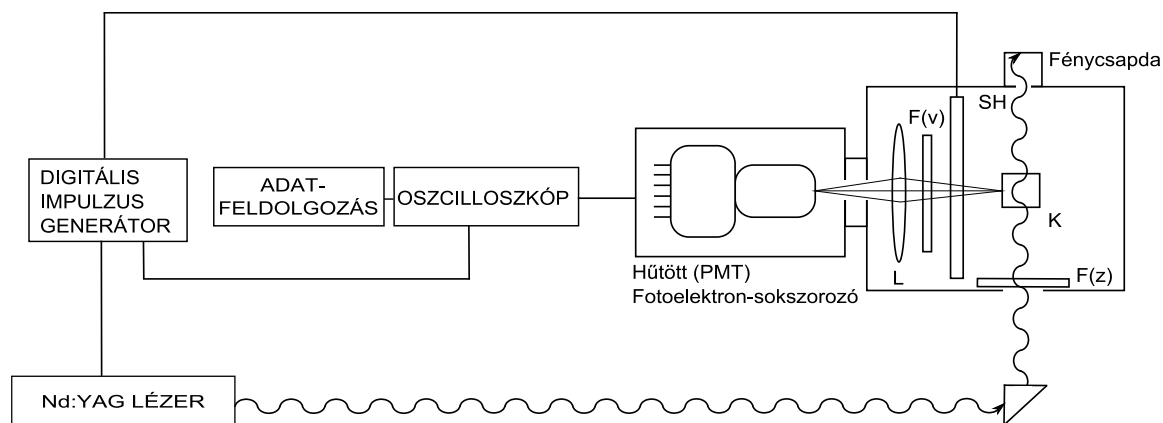
*A pH beállítása és mérése.* A vizsgált oldat tipikusan 2  $\mu$ M RC-ot tartalmazott 0,03% LDAO, 0-100 mM NaCl és 1-5 mM puffermix mellett. A vizsgált pH tartománytól függően a következő puffereket alkalmaztam: 2-[N-Morfolino]etánszulfonsav (MES; Sigma): pH 5.5 és pH 6.5 között; 3-[N-Morfolino]propánszulfonsav (MOPS, Sigma): pH 6,5 és pH 7,9 között; 1,3-bis[tris(hydroxymethyl) methylamino] propane (Bis-Tris propane; Sigma): pH 6.3 és pH 9.5 között; 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol (Tris) (Sigma): pH 7.5 és pH 9.0 között; valamint 3-[Ciklohexilamino]-1-propánszulfonsav (CAPS; Calbiochem) és 2-[N-Ciklohexilamino]etánszulfonsav (CHES, Sigma): pH 9.5 felett. Az oldat pH értékét egy kombinált üvegelektóddal (91-03, Orion) mértük

### 4.3. Spektroszkópiai módszerek

#### 4.3.1. Késleltetett fluoreszcencia

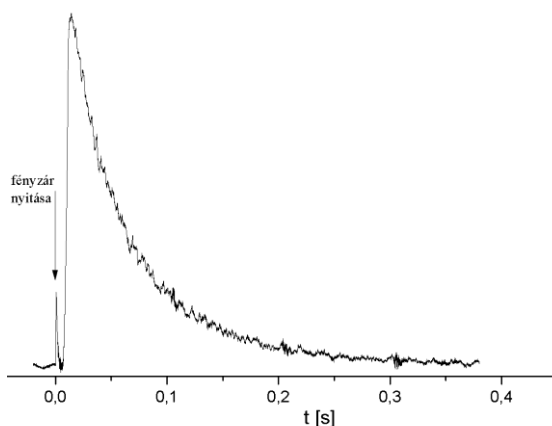
A késleltetett fluoreszcencia amplitúdója érzékeny jelzője a  $P^*$  állapothoz képest mért  $P^+Q_A^-$  állapot szabadenergia-szintjének. A RC bakterioklorofil dimerje által emittált milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia kinetikáját egy speciálisan erre tervezett berendezéssel mértem, melynek blokk-sémája a **4.1. ábrán** látható. A mérési nehézségeket elsősorban a késleltetett fluoreszcencia rendkívül alacsony intenzitása, közeli infravörös (~920 nm) színe, és a gerjesztés alatt a minta által kibocsátott nagyon erős prompt

fluoreszcencia okozzák. A mechanikus fényzárral működő mérőberendezéssel a milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia kinetikák felvételére van lehetőség.



**4.1. ábra.** Milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia méréséhez használt optikai mérőberendezés blokk-sémája. Jelölések: L – bikonvex optikai lencse, SH – mechanikus fényzár, K – kvarc küvette, F(v) – vörös felüáteresztő szűrő, F(z) – zöld sáváteresztő szűrő.

A RC-fehérjét tartalmazó mintát igen rövid, állandó frekvenciájú fényimpulzusokkal gerjesztettük, mely lézervény egy zöld üvegszűrőn (Schott BG18) keresztül jutott be a kvarc küvetát tartalmazó fényzáró dobozba. A minta telítési gerjesztését Q-kapcsolt Nd:YAG lézer frekvencia kétszerezett fényimpulzusával (Quantel YG 781-10) érték el. A gerjesztő lézerimpulzus hullámhossza 532 nm, időtartama 5 ns, energiája 200 mJ, ismétlési frekvenciája 1 Hz volt. A késleltetett fluoreszcenciát egy infravörösben is érzékeny fotoelektron-sokszorozó cső (Hamamatsu R3310-03; PMT photomultiplier) detektálta a gerjesztő fényre merőlegesen egy 850 nm-es felüáteresztő szűrőn (Schott RG850) keresztül. A PMT sötét áramának 2-3 nagyságrenddel történő csökkentése érdekében a PMT-t -30 °C-ra (Photocool PC 410CE, Products for Research) hűtöttem. A fotoelektron-sokszorozót egy elektronikusan vezérelt fényzárral (Uniblitz VS25) védtük a szórt gerjesztő fénytől és a gerjesztés alatt a mintából érkező (késleltetett fluoreszcenciától sok nagyságrenddel intenzívebb) prompt fluoreszcenciától. A fotoelektromos jelet felerősítettük, és egy digitális tároló oszcilloszkóppal (Tektronix TDS3032B) rögzítettük a tipikusan 64 - 128 mérés átlagát (**4.2. ábra**).



**4.2. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia lecsengésének mérése mechanikai fényzárral. Feltételek: RC TL-pufferben; 100 mM NaCl, pH = 8; 2  $\mu$ M RC; 120  $\mu$ M terbutrin. A fényzár nyitását közvetlenül a gerjesztés után indítottuk (a fényzár lemezei között átszökő kis prompt fluoreszcencia látható a mérés kezdetén). A fényzár nyitási ideje  $\sim 10$  ms. A késleltetett fluoreszcencia sebességi állandója hasonló a töltésrekombinációéhoz, amely a DL szívargási karakterét jelzi.

*P\** és a  $P^+Q_A^-$  állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbség meghatározása:

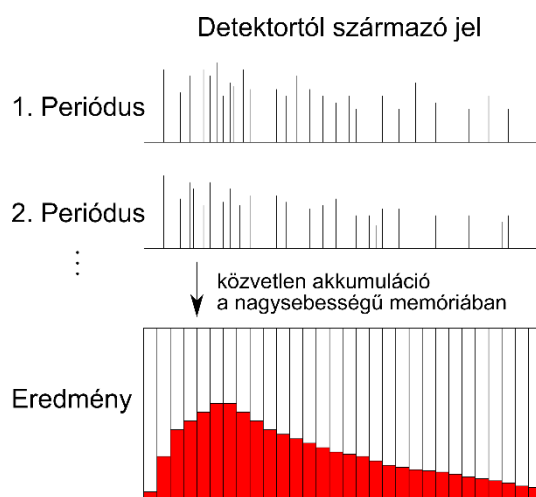
Izolált RC esetében, amennyiben gátlószer segítségével blokkoljuk a másodlagos kinon kötőhelyet, a RC által kibocsátott késleltetett és prompt fluoreszcencia integrált intenzitás viszonyai alapján meg tudjuk határozni a  $P^*$  és a  $P^+Q_A^-$  állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbséget. Erre az ad lehetőséget, hogy a töltésszeparált  $P^+Q_A^-$  és a  $P^*$  gerjesztett állapotok között mindig termikus egyensúly áll be, ezért a szintek populációit Boltzmann eloszlással lehet leírni. Ezt tartalmazza az Arata és munkatársai által megadott összefüggés (Arata és Parson 1981a), amely a késleltetett (D) és a prompt (P) fluoreszcencia lecsengéseinek élettartamaival ( $\tau$ ) és amplitúdóival (A) egészül ki:

$$\Delta G_{P^*A}^0 = k_B \cdot T \cdot \ln \left( \frac{A_D \cdot \tau_D}{A_P \cdot \tau_P} \cdot t_{\text{szűrő}} \cdot \frac{k_D \cdot \eta_{fl}}{k_{fl} \cdot \eta_{ph}} \right) \quad 4.1.$$

ahol  $\Delta G_{P^*A}^0$  - két állapot közötti szabadenergia-különbség,  $k_B$  – Boltzmann állandó,  $T$  - hőmérséklet,  $\eta_{ph}$  – fotokémiai csapdázódás hatásfoka ( $\approx 1$ , (Wraight és Clayton 1974)),  $\eta_{fl}$  – a gerjesztett dimer prompt fluoreszcenciájának hatásfoka RC-ban ( $4,0 \cdot 10^{-4}$ , (Woodbury és mtsai. 1985)),  $k_{fl}$  a bakterioklorofill sugárzási sebességi állandója ( $8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ , a Strickler-Berg összefüggés alapján, (Arata és Parson 1981a)),  $k_d$  – késleltetett fluoreszcencia sebességi állandója, késleltetett és prompt fluoreszcenciához tartozó A amplitúdó és  $\tau$

élettartam (indexben D és P),  $t_{\text{szűrő}}$  a prompt fluoreszcencia mérése során alkalmazott mikroszkóp tárgylemezek és szürke-szűrő transzmissziója.

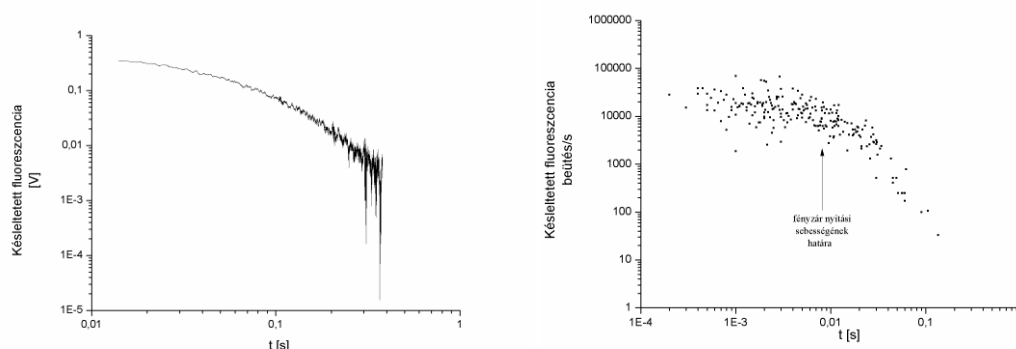
A mechanikus fényzár nyitási sebességének korlátait Filus Zoltán és Laczkó Gábor által tervezett elektronikus kapuzó-áramkör oldotta fel (Filus és mtsai. 2004). Ezzel a kapuzási technikával a szubmikroszekundumos késleltetett fluoreszcencia kinetikákat is képesek vagyunk mérni. A késleltetett fluoreszcencia mérése elektronikus kapuzással a mechanikus fényzár folyamatos nyitva tartása mellett, a PMT dinódáinak feszültségszabályozásával történik. A késleltetett fluoreszcencia jelet fotonszámlálással mérjük egy sokcsatornás számláló kártya segítségével. A sokcsatornás számláló (MCS - multichannel scaler) az összes bejövő impulzust egy adott időintervallumban (dwell time) egy adott memóriahelyre, csatornába számolja, majd a számlálást a gyors adatmemória következő memóriahelyre mozgatva ugyanolyan időintervallumon számolja tovább a fotonokat, és így tovább. Az általános elvet a **4.3. ábra** mutatja. A sokcsatornás számlálóknak két verziója létezik, más-más akkumulációs technikával. Az egyik a fotonok közvetlen számlálásával és felhalmozásával egy nagy és gyors adatmemóriába tárolja azokat, a másik az egyes fotonokat és azok detektálási idejét egy FIFO memóriában tárolja, majd a hullámforma a mérés befejezésekor rekonstruálódik. A közvetlen felhalmozódás nagyobb, folyamatos számlálási sebességet eredményez, a FIFO-elvvel pedig könnyebben elérhető a rövid csatornaszélesség. A közvetlen akkumulációs MCS-k 1 ns csatornaszélességgel, 1 GHz folyamatos számolási sebességgel állnak rendelkezésre (Becker&Hickl-GmbH 2001). A FIFO alapú sokcsatornás számlálók akár 100 ps-os csatornaszélességgel is rendelkezhetnek.



**4.3. ábra.** Sokcsatornás számláló (digitális I/O/timer/counter kártya). Minden egyes mérési ciklus egyforma, annyiszor kell mérni, amíg az egyes csatornáknak a statisztikai feldolgozáshoz elegendő beütésszám nem gyűlik össze.

Az általam használt fotonszámláló egy Fastcomtech P7882, amely 100 ns csatornaszélességű FIFO elven működő PCI számlálókártya (FASTComTech-GmbH). A

sokcsatornás számláló kártyák kiváló megoldást jelentenek a késleltetett fluoreszcenciás mérésekre, ezenkívül használják még a sokcsatornás számlálókat például LIDAR, foszforeszcencia és lumineszcencia élettídmérésekre is. A technikának számos előnye van: közel tökéletes a számolási hatékonysága, amelynek köszönhetően optimális jel-zaj arány érhető el egy adott számú érzékelt fotonhoz; képes több fotont is rögzíteni jel periódusonként; rendkívül magas beütésszámot képes kezelni; továbbá a sokcsatornás számláló rendkívül hosszú időintervallumokat képes lefedni nagy felbontással, akár egy ciklus alatt is.



**4.4. ábra.** Késleltetett fluoreszcencia mérése mechanikus fényzárral ill. egy-fotonszámlálás módszerrel, *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC-ban. Feltételek: 2  $\mu$ M RC TL-pufferben, pH = 8; 100mM NaCl; 120  $\mu$ M terbutrin.

#### 4.3.2. Fluoreszcencia indukció

Bíborbaktériumok bakterioklorofill fluoreszcenciájának (fluoreszcencia indukciójának) méréséhez 804 nm  $\pm$  0,5 nm hullámhosszú lézer diódát használtam (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W), hiszen ez a hullámhossz nagyon közel van a LH2 antenna 800 nm-es abszorpciós maximumához (B800), illetve a RC monomer bakterioklorofill abszorpciós maximumához, így optimális a gerjesztés. A lézerdiódát egy általam épített áramgenerátor hajtotta, mely TTL jelszinttel vezérelhető. A mérésekhez használt gerjesztő lézerfény profiljának fel/lefutási ideje  $\sim$ 100 ns volt, maximális intenzitása: 2,1 einstein/m<sup>2</sup>/s, mely intenzitást kalibrált szűrőkkel csökkentettem. A Bkl fluoreszcencia hatásfokának és kinetikájának meghatározásához IR-806 (Sigma) fluoreszkáló festéket alkalmaztam referenciaként. A detektálást a gerjesztés irányára merőlegesen elhelyezett lavina fotodiódával (APD; model 394-70-72-581; Advanced Photonix, Inc., USA), ill. vörös-érzékeny fotoelektron sokszorozóval (PMT) (Hamamatsu R3310-03) végeztem. Az APD detektort 850 nm felett áteresztő szűrővel (Schott RG-850) a PMT-t monokromátorral (Jobin-Yvon H-20) védtem a szóródó lézerfénytől. A méréseket intakt baktériumok

esetében 3 mm x 3 mm-es kvarc küvettában, RC esetén 1 cm x 1 cm-es kvarc küvettában végeztem, amit hőmérséklet-szabályozott mintatartóba helyeztem.

A fluoreszcencia indukció tranzienseinek méréséhez Kocsis Péter és Gingl Zoltán által tervezett és épített készüléket használtam (Kocsis és mtsai. 2010). A mérőberendezés kiváló eszköz a fluoreszcencia indukció (és relaxáció) logaritmikus skálán való felvételére, ugyanakkor az általam használt beállításoknál a fényimpulzusok (flashek) közötti választott távolság nem logaritmikus. A flashek ugyanolyan lézerdiódák biztosították, mint amit a fluoreszcencia indukció méréshez használtam (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W). A készülék számítógépről vezérelhető, az áramellátása is az USB kábelén keresztül történik.

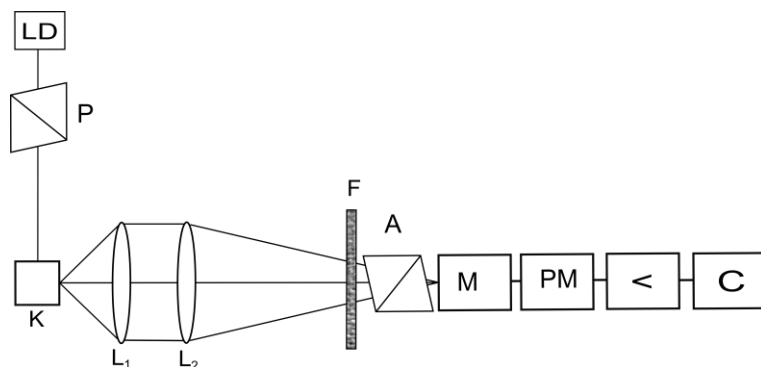
#### 4.3.3. *Cirkuláris dikroizmus*

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumokat 500 nm-től 900 nm-ig terjedő spektrális tartományon mértem JASCO 815 spektropolariméterrel. A RC-ot tartalmazó mintákat TL-pufferben (10 mM Tris, 0,03% LDAO, pH 8) oldottam fel. A RC koncentrációja minden esetben 3  $\mu$ M volt (RC abszorpcióspektruma 802 nm-nél  $\sim 1$  OD). A méréseket szobahőmérsékleten 1 cm-es optikai úthosszú kvarc küvettában végeztem.

#### 4.3.4. *Fluoreszcencia anizotrópia*

A reakciócentrum fluoreszcencia kinetikájának és hatásfokának méréséhez infravörös lézerdiódát alkalmaztam, melynek gerjesztő lézerfény időprofilja téglalap alakú. A lézerdiódák teljesítménye 1-2 W (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W és Roithner Laser Technik QL86T4HD, 1 W), gerjesztési hullámhossza és sávszélessége  $808 \text{ nm} \pm 0.5 \text{ nm}$  és  $865 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$  volt. A lézer intenzitását kalibrált szűrőkkel csökkentettem. A RC fluoreszcenciáját a gerjesztő lézerfény irányához képest  $90^\circ$ -ban elhelyezett vörös-érzékeny fotoelektron sokszorozóval (PMT) (Hamamatsu R3310-03) mértem egy infravörös tartományban is használható monokromátoron keresztül (Jobin-Yvon H-20 homorú holografikus ráccsal). A PMT sötét áramának 2-3 nagyságrenddel történő csökkentése érdekében a PMT-t  $-30^\circ\text{C}$ -ra (Photocool PC 410CE, Products for Research) hűtöttem. A reakciócentrum ricinusolajban mért fluoreszcencia anizotrópiáját derékszögben elrendezett mérőrendszerrel végeztem (**4.5. ábra**) (Ebrey és Clayton 1969). A gerjesztő lézerfény polarizációját Glan-Taylor polarizátorral (P) állítottam be. A mintából származó Bkl fluoreszcenciát egy, a polarizátor irányával merőlegesen vagy párhuzamosan beállított Glan-Thompson analizátorral (A) mértem. A polarizátort és analizátort egy-egy New Focus forgó tartóban (8401) helyeztem el, mely a New Focus Intelligent Picomotor Driver által számítógépről vezérelhető, LabView környezetben. A RC-ot tartalmazó kvarc küvettát egy hőmérséklet-szabályozott küvettatartóban helyeztem el.





**4.5. ábra.** A polarizált fluoreszcencia gerjesztésére és érzékelésére használt berendezés vázlatos elrendezése. Jelölések: LD: 804 vagy 865 nm hullámhosszú lézergyő, P: Glan-Taylor polarizátor, K: 1 x 1 cm-es kvarc kővetta hőmérséklet szabályozott tartóban, L1 és L2: lencserendszer a fluoreszcencia kollimációjához, F: infravörös felüáteresztő szűrő, A: Glan-Thompson polarizátor, M: infravörös monokromátor, PM: hűtött fotoelektron-sokszorozós, < - elektromos erősítő és C: számítógép.

A fluoreszcenciát a laboratóriumi rendszerhez rendelt elektromos vektor függőleges (V) vagy vízszintes (H) irányú lineárisan polarizált lézerfénye gerjesztette. A fluoreszcencia anizotrópia ( $r$ ) a következőképpen határozható meg:

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}}, \quad 4.2.$$

ahol a  $G$  az mérőrendszerre jellemző tényező. A fluoreszcencia intenzitás ( $I$ ) alsó indexében lévő két betű a gerjesztés (első betű) és a emisszió (második betű) polarizációjának irányát jelöli. A polarizáció, illetve anizotrópia meghatározásához figyelembe kell venni, hogy a készülék (monokromátor, detektor) nem azonosan érzékeny a vertikálisan és a horizontálisan polarizált fényre. Ez azt eredményezi, hogy a mért  $I_{VV}$  és  $I_{VH}$  értékek közvetlenül nem hasonlíthatók össze. Ezért szükséges bevezetni a  $G$  korrekciós faktort:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}, \quad 4.3.$$

amely műszer-tényező, minden olyan optikai elem (például a monokromatikus holografikus rács) hozzájárulását írja le, amely a polarizációs állapot módosítását idézi elő, és el kell különíteni a mintából származó fluoreszcencia anizotrópiától. A  $G$ -faktort a mérés előtt és a beállítások módosulása esetén határoztam meg. A fluorométert wolfrám szálal izzó fényének ludoxoldatban történő szórásával és ricinusolajban oldott IR-806 festék fluoreszcenciájával kalibráltam.

#### 4.3.5. Spektrofotometria

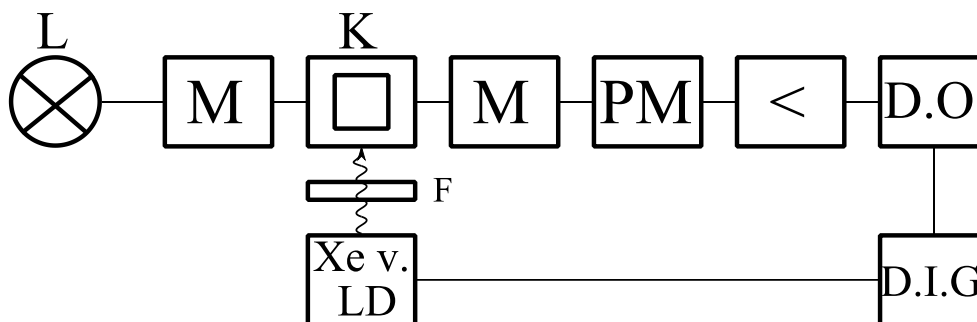
A minták abszorpciós spektrumát Helios  $\gamma$  típusú spektrofotométerrel vettem fel. A méréseket 1 cm optikai úthosszú küvetákkal végeztem. A spektrumok felvételekor referenciaként minden esetben a vizsgált anyagot (fehérjét, fluorofórt) nem tartalmazó puffert használtam. Intakt baktériumok esetén a sejtek által keltett fényszórásra korrigáltam a távoli vörös tartományban (ahol már nincs a pigmenteknek számottevő elnyelése) észlelt (látszólagos) abszorpció- csökkenés menetének felhasználásával.

A bakterioklorofillt, illetve karotinoidokat extrahálással nyertem ki a sejtekből, aceton: metanol (7:2 v/v%) keverékének felhasználásával. A bakterioklorofill kvantitatív meghatározására  $75 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (770 nm-nél mért) extinkciós koefficienszt használtam (Clayton és Clayton 1981).

Izolált reakciócentrum koncentrációját a monomer bakterioklorofill (802 nm) abszorpciós maximumánál határoztam meg,  $\epsilon^{802 \text{ nm}} = 318 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  moláris abszorpciós (extinkciós) koefficienszt használva (McPherson és mtsai. 1994)).

#### 4.3.6. Fényindukált abszorpcióváltozások

A fényindukált abszorpcióváltozást egy házilag épített spektrofotométerrel (Maróti és Wraight 1988a) illetve annak kissé módosított változatával mértem (**4.6. ábra**). Az optikai gerjesztés Xe villanólámpával (EG&G FX200, félélettartama 8,5  $\mu\text{s}$ ), 1 kV töltőfeszültség és 4  $\mu\text{F}$  kapacitású kondenzátor használatával, vagy szabályozott áramgenerátorról működtetett lézerdiódával (Roithner LaserTechnik LD808-2-TO3, 808 nm, 2 W) történt. A villanólámpa fényét 1 cm átmérőjű fényvezető plexirúd segítségével vezetem a mintát tartalmazó 1 cm x 1 cm-es kvarc küvetta oldalához (RC esetben), hogy a telítési gerjesztést biztosítsam. A lézerdióda fényét kollimátor lencsével párhuzamosítottam, hogy a mintát tartalmazó 3 mm x 3 mm-es kvarc küvetában lévő mintát homogén módon gerjesszem (egész sejtek esetén) A membrán energetizált állapotára utaló fényindukált elektrokróm jelet 510-600 nm es hullámhossztartományban vettem fel. A detektáláshoz Hamamtsu R928 típusú fotoelektron-sokszorozót használtam. A nem gerjesztő intenzitású mérőfényt egy stabilizált áramforrásról táplált halogén izzó szolgáltatta (12 V, 100 W). Az izzólámpa fényét kondenzor lencsével egy monokromátor (Jobin-Yvon H20 VIS ill. VIS-IR) belépő részére fókuszáltam, míg a kilépő rést a mintatartóban elhelyezett küvetán keresztül egy másik monokromátor (Jobin-Yvon H20 VIS ill. VIS-IR) belépő részére képeztem, majd a kilépő rést a fotoelektron-sokszorozó fotokatódjára képeztem le.



**4.6. ábra.** Egysugaras kinetikai spektrofotométer blokk-sémája. Jelölések: L - fényforrás, M – monokromátor; K - temperálható küvettatartó (1 cm x 1 cm vagy 3 mm x 3 mm); Xe – villanólámpa (esetén: F – sáváteresztő szűrő) vagy LD – lézerdíóda, mint gerjesztő fényforrás; PM - fotoelektron-sokszorozó; < - elektronikus előerősítő; D.O. – Digitális oszcillátor; D.I.G. – Digitális impulzus generátor

Egész sejtekben mért  $\mu$ s-os elektrokróm jelet két-monokromátoros elrendezésben lézerdíóda gerjesztéssel végeztem. A fotoelektron-sokszorozó DC-szintjét, egy általam épített differenciál erősítőn keresztül, 100 mV-ra állítottam be, amit a mérőfény hatására a változtatható munkaellenálláson fellépő feszültséggel kiegyenlítettem a fényfelvillanás előtt. A detektor jelét egy digitális oszcilloszkóp (Tektronix TDS 3032B) segítségével gyűjtöttem, és átlagoltam, majd a kapott kinetikák kiértékelését számítógépen végeztem. A minták optikai sűrűségét (denzitását) alacsonyan tartottam ( $OD(808\text{ nm}) < 0.1$ ), hogy elkerüljem a másodlagos hatásokat (fényszórást, Bkl fluoreszcencia re-abszorpcióját, másodlagos fluoreszcenciát, stb.).

Izolált RC esetében másodlagos elektrondonor (citokróm) hiányában egyetlen telítési fényfelvillanást követően a 430 nm-nél vagy 865 nm-nél megfigyelhető gyors abszorpcióváltozás az elsődleges donor oxidációját ( $P^+$ ) jelzi, amelyet lassabb, összetett kinetikával leírható lecsengés követ (Ortega és mtsai. 1996; Schmid és Labahn 2000). A kinetika két jól elkülöníthető komponenssel jellemezhető, amely a natív, másodlagos kinon aktivitással rendelkező RC-okban abból származik, hogy a  $Q_B$  kötőhelyek betöltöttsége nem teljes, így a RC-ok populációja heterogén. Csak  $Q_A$ -t tartalmazó RC-ok esetében a töltésrekombináció mintegy 10-szer gyorsabb ( $k_{AP} \sim 10\text{ s}^{-1}$ ), mint a  $Q_B$  aktív RC esetén megfigyelhető érték ( $k_{BP} \sim 1\text{ s}^{-1}$ ). A stabilizált töltéspárok ( $P^+Q_A^-$  és  $P^+Q_B^-$ ) rekombinációja elsőrendű folyamatként kezelhető, így exponenciális függvénnel írható le. Mivel a töltésrekombináció összetett is lehet, ezért a kinetika, több exponenciális lineáris kombinációjaként kezelhető:

$$[P^+](t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-k_i t}, \quad 4.4.$$

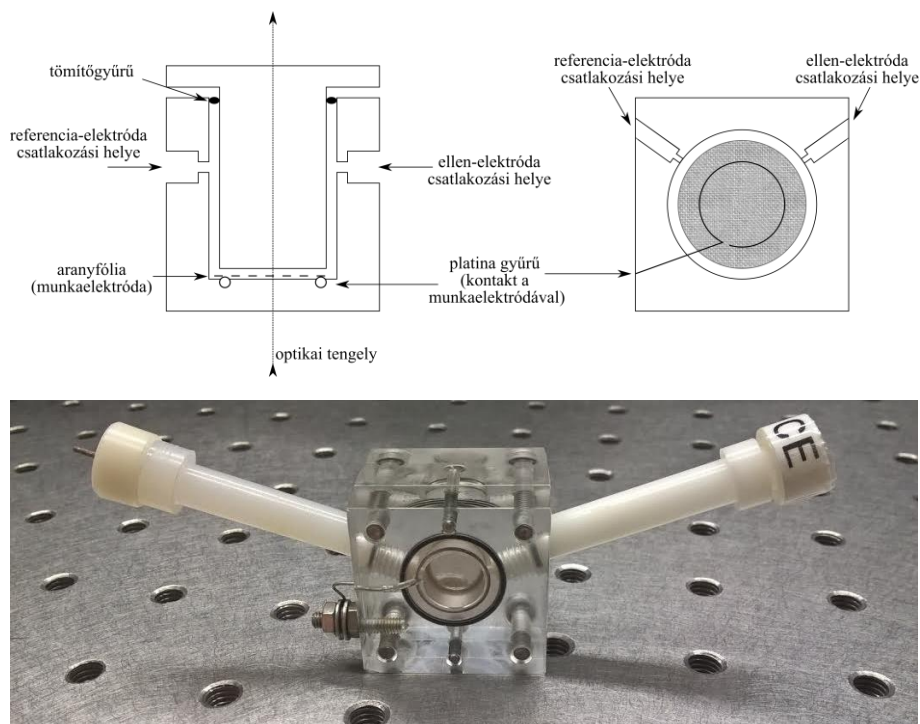
ahol  $[P^+](t)$  az oxidált dimer koncentrációja a  $t$  időpillanatban,  $A_i$  és  $k_i$  pedig az  $i$ -edik komponens amplitúdója, ill. sebességi állandója. A görbeillesztést a Levenberg-Marquardt-féle nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével végeztem. Az abszorpcióváltozás amplitúdójából meghatározható a fotoaktív RC-ok koncentrációja a Beer-Lambert törvény alapján ( $\epsilon^{430\text{ nm}} = 26\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  ill.  $\epsilon^{865\text{ nm}} = 126\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

A szemikononnak 400 nm közvetlen környezetében megfigyelt abszorpcióváltozásával az első elektrontranszfert követhetjük nyomon (Li és mtsai. 1998). Míg 397 nm-nél maximális a  $Q_A/Q_A^-$  interkinon elektrontranszferhez köthető abszorpcióváltozás, addig 402 nm-nél a dimer  $P/P^+$  redoxváltozásának izoszbesztikus pontja van. A két, amplitúdójában nagyon különböző kinetika elkülönítésére ezt a spektrális tartományt célszerű felhasználni. A  $Q_A/Q_A^-$  változásához köthető rendkívül kis intenzitású jel 32-64 mérés átlagolása után vált elfogadható jel/zaj viszonyúvá a kiértékeléshez. Mivel a második elektrontranszfer létrehozásához a  $P^+$  előzetes redukálása szükséges (2.5.2 fejezet), ezért a RC-ot tartalmazó oldathoz 20-szoros feleslegben ló szívből preparált citokróm  $c$  (Sigma) elektron donort adtam. A második elektrontranszfer kinetikáját 450 nm-es hullámhosszon (Kleinfeld és mtsai. 1985) követtem az első flash-t 500 ms múlva követő flash után. Az így kapott kinetikák egy exponenciálissal jól illeszthetőek voltak (a kinetikák konstans részét a citokróm abszorpcióváltozása képezte).

A citokróm  $\text{cit } c^{3+}/\text{cit } c^{2+}$  abszorpcióváltozását 550 nm-es hullámhosszon mértem. Mivel a  $P^+$ -nak 540 nm-nél izoszbesztikus pontja van, ezért a tényleges citokróm abszorpcióváltozást az 550 nm-nél és 540 nm-nél felvett különbségi kinetika adja.

#### 4.3.7. Spektroelektrokémia

A spektroelektrokémiai cella (SEC – spectroelectrochemical cell) egy háromelektrodos polimetil metakrilát anyagból házilag készült elektrokémiai cella. A SEC feladata kettős: egyrészt biztosítja, hogy a minta redoxpotenciálja a potenciosztáton (PGSTAT10 - Metrohm-Autolab) beállított értéket vegye fel, másrészt, hogy a benne lévő oldat abszorpciós spektrumának változásait nyomon lehessen követni. Ennek a kettős feladatnak a 4.7. ábrán látható felépítés tud megfelelni. A munkaelektroda egy hozzávetőlegesen 55 %-os transzmissziójú aranyfólia, mely a cella akril falára simul rá úgy, hogy elektromos kontaktusban van egy körben meghajlított platina szállal. A cella feltöltésére, tisztítására egy kapilláris nyíláson keresztül van lehetőség. Ezekbe a nyílásokba csatlakoztathatók az elektródok, mind a referencia- (vonatkoztatási-), mind az ellenelektrod. Ezek az elektródok kerámia diafragmán keresztül tartják a kapcsolatot a cella belső részeivel. Feltöltés után a minta az aranyfólián terül szét, úgy, hogy az optikai úthossz, vagyis a mintatér rétegvastagsága körülbelül 50  $\mu\text{m}$ , térfogata 200  $\mu\text{L}$ .



**4.7. ábra.** Spektro-elektrokémiai cella blokkvázlata (felül) és fényképe (alul). Baloldalt fent: oldalnézetből egy metszeti kép, ill. jobboldalt fent: fényút felől nézeti kép a SEC-ről.

A SEC-ban használt referencia elektróda egy Ag/AgCl elektróda, potenciálja 208 mV a standard hidrogén elektródhoz képest. A referencia elektródot frissen kellett előkészítenem a mérés előtt. Az ezüst szálát (mint anódot) elektrolízissel  $5 \text{ mA/cm}^2$  (a platinaszállal mint katóddal szemben) állandó áramsűrűség mellett előzőleg 1 M-os HCl oldatban tároltam 30 percig, hogy a felületén kialakuljon az AgCl réteg. Ezután egy éjszakára desztillált vízben hagytam használat előtt. A referencia oldat 3 M-os KCl volt.

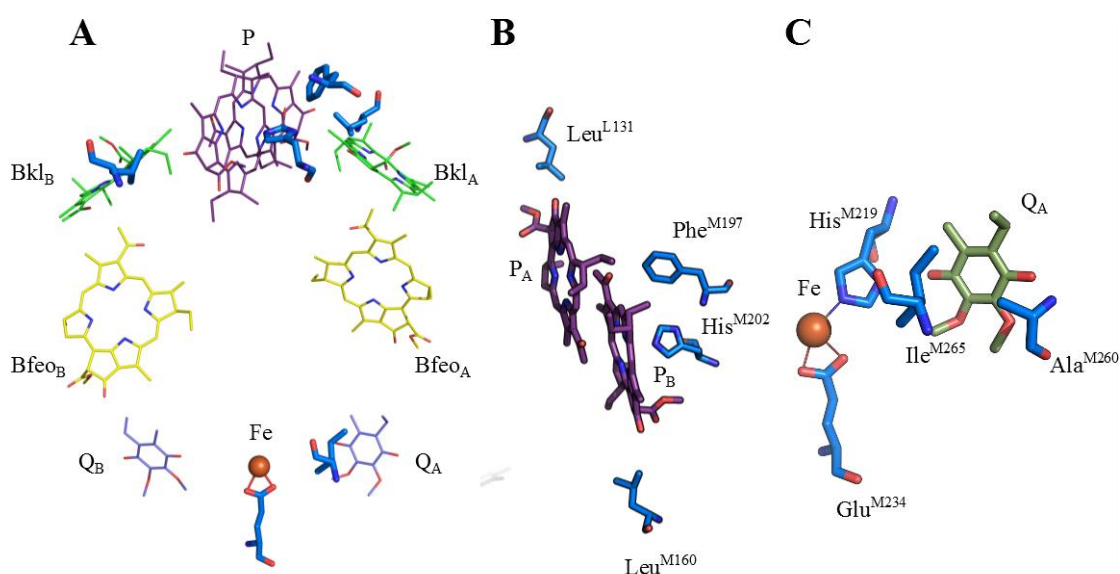
A RC-ot tartalmazó oldat redox aktív molekulát (redox mediátort:  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  kálium ferricianidot) tartalmazott  $150 \mu\text{M}$  koncentrációban, amely a közvetítő szerepét töltötte be az elektród és a RC redox aktív komponensei között.

A munkaelektrodát (aranyfóliát), amely elektromos kontaktusban van egy platina szállal, időről-időre meg kellett újítani a felületére rátapadó fehérjék miatt, mindamellett, hogy a mérések előtt felületmódosító oldatban tároltam egy éjszakát. A felületmódosító molekulák réteget képeznek az arany elektróda felületén, mely réteg csökkenti a fehérjék tapadását a fémfelülethez, viszont a töltésvándorlást nem gátolják meg a fehérje és a munkaelektroda között. Felületmódosítóként 1 mM bipyridint (4,4'-Bipyridine) használtam. Az ellenelektrodát ugyanabba az oldatba merítettük, mint amibe a RC került.

## 5. Eredmények és megvitatásuk

### 5.1. Energetikai változások mutáns *Rba. sphaeroides* reakciócentrumban

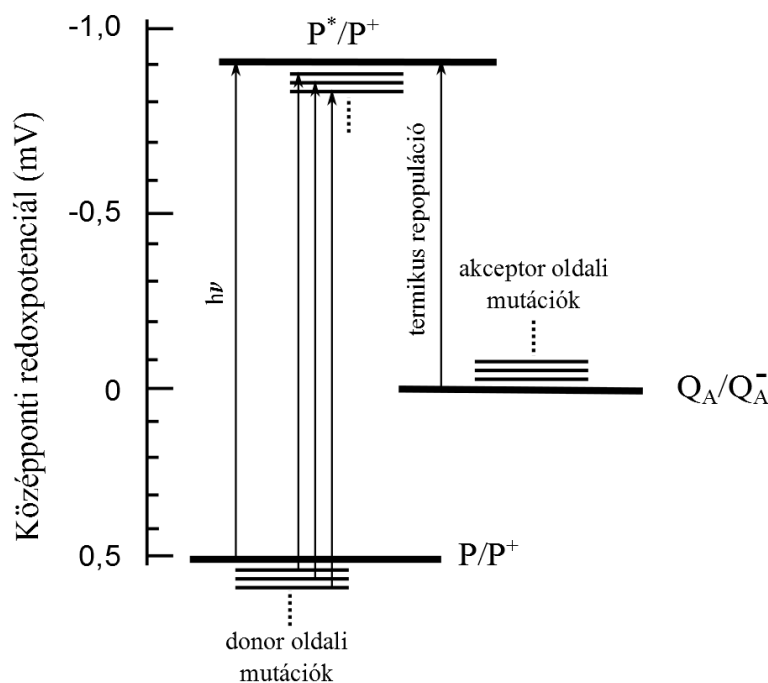
A töltésszétválasztás szabadenergia szintje jelentősen módosul kulcsfontosságú helyeken lévő aminosavak mutációjával mind a RC donor, mind pedig az akceptor oldalán. Ennek bizonyítására a RC fehérje különböző helyein, célzottan alakítottunk ki aminosav mutációkat, amely aminosavakat az **5.1. ábra** tartalmazza. Célzott aminosav mutációkkal könnyen megváltozhat a donor oldal energetikája a dimer környezetében lévő hidrogénhid-kötések módosulásával (Williams és Allen 2009), vagy a dimer képződésének megváltoztatásával (Kirmaier és mtsai. 1988). A jelen dolgozatban a donor oldalon kialakított egyetlen (Leu→His<sup>L131</sup> és His→Leu<sup>M202</sup>), dupla (Leu→His<sup>L131</sup> - Leu→His<sup>M160</sup> és Leu→His<sup>L131</sup> - His→Leu<sup>M202</sup>) valamint tripla (Leu→His<sup>L131</sup> - Leu→His<sup>M160</sup> - Phe→His<sup>M197</sup>) mutáns által okozott energetikai változásokat vizsgáltam.



**5.1. ábra.** (A) A reakciócentrum kofaktorainak elrendeződése és az aminosav származékok elhelyezkedése a fehérje struktúrában (*Rba. sphaeroides* 2.4.1 szerkezete; 3I4D.pdb). A donor (B) és az akceptor (C) oldalon kialakított célzott aminosav mutációi jelentősen megváltoztatják a dimer (P/P<sup>+</sup>) és az elsődleges kinon-akceptor (QA/QA<sup>-</sup>) középponti redoxpotenciálját.

Más kutatóhelyeken elvégzett korábbi mérésekből kiderült, hogy a PB (His<sup>M202</sup>) tengelyirányú hisztidin ligandum Leu-ra való változtatása miatt a Bkl-Bfeo heterodimernek emelkedett a P/P<sup>+</sup> középponti redoxpotenciálja a vad típusú RC-hoz képest (Allen és mtsai. 1996). Ezáltal inspirálva kezdtük vizsgálni az M202 helyen a hisztidin → leucin aminosav egyszeres mutánst (His→Leu<sup>M202</sup>) és az L131 pozícióval kiegészítve a dupla mutánst is

(Leu→His<sup>L131</sup> - His→Leu<sup>M202</sup>), amelyben a heterodimer mutáció volt kombinálva egy hidrogénkötés mutációval. A fent említett mutánsokban késleltetett fluoreszcencia vizsgálatokat ezidáig nem végeztek, ezáltal a homo- és heterodimer hidrogénkötés-rendszerének új aspektusai tárhatók fel. Hasonlóképpen, a citoplazmatikus hidrogénkötés-hálózatokra vonatkozó információk várhatóak a Q<sub>A</sub> (Ile<sup>M265</sup> (Takahashi és mtsai. 2001; Wells és mtsai. 2003; Martin 2011)) és a nemhem típusú vas (Glu<sup>M234</sup> (Cheap és mtsai. 2009)) közvetlen közelében lévő mutációktól, amelyek megváltoztatják az elsődleges kinon redoxpotenciálját (5.1. ábra, C panel). Mivel a megfigyelt DL intenzitása függ a donor és az akceptor oldal redox kofaktorainak P/P<sup>+</sup> és Q<sub>A</sub>/Q<sub>A</sub><sup>-</sup> szabadenergia szintjétől, a mutáció eredményeképp bekövetkező változásuk jól követhető és értelmezhető a bakterioklorofill dimer DL mérésével.



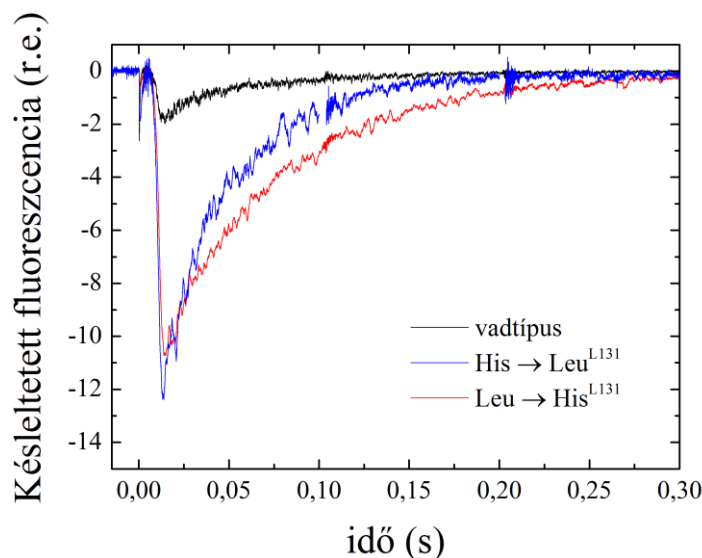
**5.2. ábra.** A kofaktorok középponti redoxpotenciálja fontos szerepet játszik a késleltetett fluoreszcencia keletkezésében. Egy foton abszorpcióját követően az elsődleges elektron donor (P), a bakterioklorofill dimer szingulett gerjesztett állapotba kerül (P<sup>\*</sup>/P<sup>+</sup> középponti redoxpotenciálja ( $E_m$ ) – 900 mV) mely állapotában erős redukáló. A vizsgált RC-ok P → P<sup>\*</sup> gerjesztési energiája a donor és akceptor oldalon kialakított mutáció hatására nem változik meg. A dimer gerjesztését követően elektrontranszfer jön létre, ami P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> töltésszétválasztott állapotot eredményez. Hozzávetőlegesen a P/P<sup>+</sup> középponti redoxpotenciálja +500 mV, míg a Q<sub>A</sub>/Q<sub>A</sub><sup>-</sup> középponti redoxpotenciálja -50 mV (Maróti és Wraight 1988a). A késleltetett fluoreszcencia a P<sup>\*</sup> állapot, P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> állapotból történő termikus repopulációjából ered. Bármilyen változás a donor ill. az akceptor oldalon, legyen az például mutáció vagy pH változás, hatással van a DL-ra.

Mint majd látni fogjuk, a kiválasztott mutánsok olyan általános energetikai változásokat mutatnak, amelyek a dimer, az elsődleges kinon és a nemhem vas atom közötti

hidrogénkötések számának módosításából adódó szabadenergia-változásokból tevődnek össze. Ezen túlmenően, a folyamatok entrópia-változásaira is becslést kaphatunk, vagyis arra, hogy a megfigyelhető szabadenergia-változáshoz az entrópikus összetevők mennyiben járulnak hozzá. Példaként említem, hogy a  $P^* \rightarrow P^+Q_A^-$  töltésszétválasztásban megfigyelhető azon szabadenergia-változás, amelyet a RC akceptor oldalán kialakított mutánsok okoznak, elsősorban entrópia-változásra vezethető vissza. Ez arra enged következtetni, hogy az Ile<sup>M265</sup> és Glu<sup>M234</sup> aminosavak mutációja révén megnövekszik a strukturális rugalmasság.

#### 5.1.1. Egyetlen hidrogénkötés eltávolítása vagy hozzáadása a dimerhez

Az egyik leglényegesebb kérdés, hogy egyetlen hidrogénkötés hozzáadása illetve eltávolítása a dimerhez hogyan változtatja meg a megfigyelt késleltetett fluoreszcenciát. Egy hidrogénkötés létrehozásával, a Leu $\rightarrow$ His<sup>L131</sup> mutációval (röviden: LH<sup>L131</sup>) a DL intenzitása jelentősen megnő a vad típusú RC-ban mért értékhez képest (5.3. ábra).



**5.3. ábra.** A donor oldali LH<sup>L131</sup> és HL<sup>M202</sup> mutáns DL kinetikája a vad típusú RC hoz képest. A leucin hisztidinre való cseréje a donor oldalon egy hidrogénkötés hozzáadásával jár, míg a hisztidin leucinra cserélése az M202 pozícióban egy hidrogénkötés elvételével és heterodimer formálódásával. Feltételek: 2  $\mu$ M RC; 100 mM NaCl; 10 mM Tris; 0,03% LDAO, 120  $\mu$ M terbutrin, pH 8. A megfigyelt fluoreszcencia hullámhossza  $915 \pm 10$  nm. A mechanikus fényzár zárva van a gerjesztés alatt (ezzel kizárva a nagyon intenzív prompt fluoreszcenciát). A fényzár lemezei között átszökő prompt fluoreszcencia kis csúcs formájában látszik a kinetika elején.

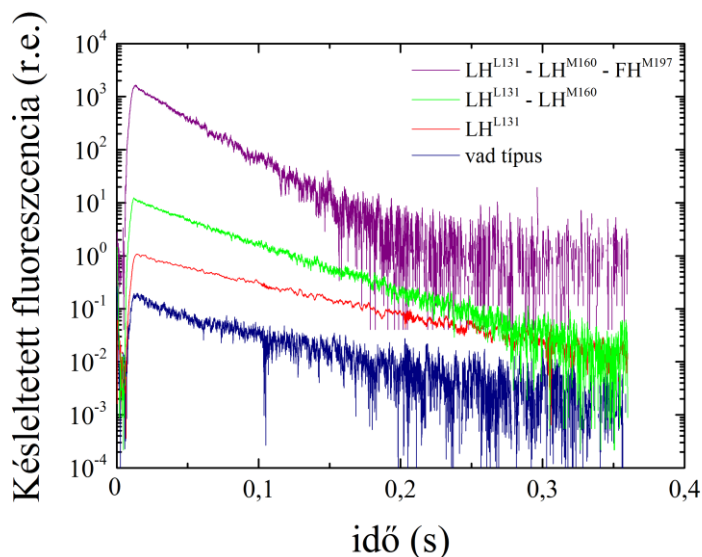
Ez a változás azt jelzi, hogy a hozzáadott hidrogénkötés miatt a  $P/P^+$  középponti redoxpotenciálnak növekednie kell. Ezt a feltevést korábbi elektrokémiai mérések is alátámasztják (Lin és mtsai. 1994; Williams és Allen 2009). Ugyancsak az elektrokémiai



mérésekkel egyező eredményt ad az M202 pozícióban lévő mutáció, ahol a koordináló hidrogénkötés eltávolításával ( $\text{His} \rightarrow \text{Leu}^{\text{M202}}$ , hisztidint leucinra cseréléssel) a DL intenzitása a vad típushoz képest nő. Viszont ezt a növekedést nem tudhatjuk be közvetlenül a hidrogénkötés eltávolításának, hiszen a mutációval nem csak egy hidrogénkötés szűnik meg, hanem azzal egy időben a homodimerből egy Bkl-Bfeo heterodimer jön létre, melynek magasabb a  $\text{P/P}^+$  középponti redoxpotenciálja a vad típuséhoz képest. Ezen mutációk mellett ugyanakkor a dimerhez közeli hisztidin  $\text{His} \rightarrow \text{Phe}^{\text{L168}}$  mutáció, azaz hidrogénkötés eltávolítása (megmarad homodimer), a  $\text{P/P}^+$  középponti redoxpotenciál csökkenését eredményezi a vad típushoz képest (Katiliene és mtsai. 2003).

#### 5.1.2. Többszörös hidrogénkötés létrehozása a donor oldalon.

A dimer körül folytatható a hidrogénkötés-rendszer felépítése további dupla ( $\text{LH}^{\text{L131}} - \text{LH}^{\text{M160}}$ ) illetve tripla ( $\text{LH}^{\text{L131}} - \text{LH}^{\text{M160}} - \text{FH}^{\text{M197}}$ ) mutációk létrehozásával. A konjugált rendszer részét képző karbonil csoportok hidrogénhíd-kötéseinek keresztüli kölcsönhatása jelenti az egyik legközvetlenebb módját annak, hogy a fehérje kölcsönhatásba lépjen a bakterioklorofillal. A tripla mutánsban mind a  $\text{P}_\text{A}$ , mind a  $\text{P}_\text{B}$  2-acetil- és 9-ketocsoportja hidrogénhíd-kötéssel kapcsolódnak a környező fehérjéhez. (5.1. ábra, B panel). A hidrogénkötések számának növekedése növeli a DL intenzitását (5.4. ábra), azaz csökkenti a  $\text{P}^*$  és  $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^-$  állapotok közötti szabadenergia-különbséget.

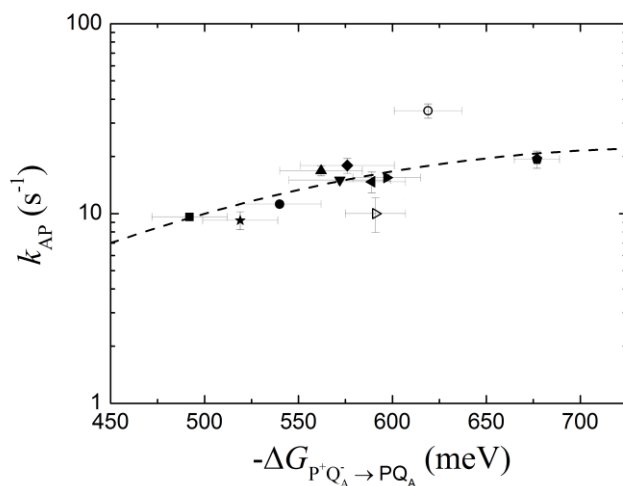


**5.4. ábra.** A donor oldali szimpla ( $\text{LH}^{\text{L131}}$ ), dupla ( $\text{LH}^{\text{L131}} - \text{LH}^{\text{M160}}$ ) és tripla ( $\text{LH}^{\text{L131}} - \text{LH}^{\text{M160}} - \text{FH}^{\text{M197}}$ ) hisztidin mutáns késleltetett fluoreszcenciájának kinetikája logaritmikus ábrázolásban. A mutációk számának növekedésével a DL növekedése figyelhető meg a vad típusú RC-hoz képest. Feltételek: 2  $\mu\text{M}$  RC; 100 mM NaCl; 10 mM Tris; 0,03% LDAO, 120  $\mu\text{M}$  terbutrin, pH 8. A fluoreszcencia megfigyelési hullámhossza  $915 \pm 10$  nm.

További megfigyelésem, hogy az energia növekedés lépcsőzetes: a tripla mutáns körülbelül kétszer akkora növekedést mutat a vad típushoz képest, mint a dupla mutáns. A vizsgált mutáns reakciócentrumokban a hidrogénhíd-kötéssel járó mutációk  $P^*$  és  $P^+Q_A^-$  állapotok közötti szabadenergia-különbség szintje körülbelül 200 mV tartományban változik a vad típusú reakciócentrumhoz képest (lásd **5.1. táblázat**). Korábban már megfigyelték az említett mutánsok elektrokémiai titrálásánál a hidrogénkötések hasonló hatását a konjugált karbonil csoportokra (Lin és mtsai. 1994; Allen és Williams 1995; Williams és Allen 2009). Az új hidrogénkötés pontos elhelyezkedése nem kritikus a DL növekedéséhez. Az összes hidrogénhíd-kötés, ami a bakterioklorofill klorin-vázának C=O csoportjához kapcsolódik a dimer energetikai változását okozza. Hasonló energetikai hatást fejt ki a dimer körüli hidrogénhíd-kötések mintázatának módosítása a perturbáció helyétől függetlenül. Ezek a kísérletek egyértelműen azt mutatják, hogy a P-hez kötődő hidrogénkötés felelős lehet a dimer szabadenergia szintjének változásáért.

### 5.1.3. A késleltetett fluoreszcencia lecsengésének sebességállandója a szabadenergia-változások függvényében.

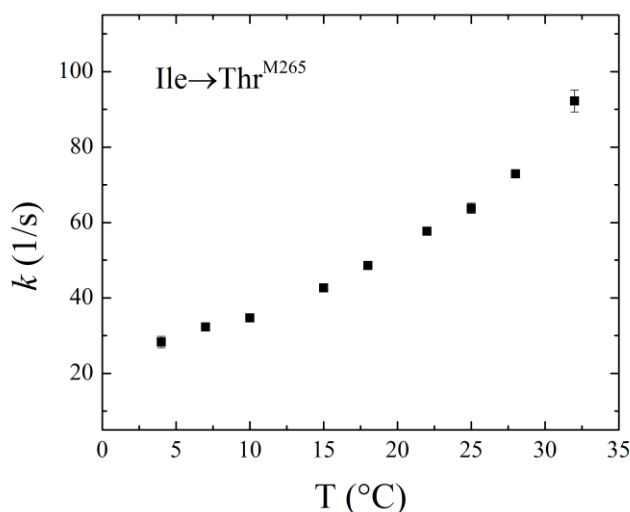
Az **5.5. ábrán** mutatom be a különböző mutánsoknak a  $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$  közvetlen töltésrekombinációból származó sebességi állandóit a – késleltetett fluoreszcencia mérésekből meghatározott - hajtóerő függvényében.



**5.5. ábra.** Különböző mutáns reakciócentrumok  $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$  közvetlen töltésrekombinációjából származó sebességi állandók a hajtóerő függvényében. A sebességi állandókat a megfigyelt sebességi állandók hőmérséklet függéséből határoztam meg **5.1** egyenlet alapján. A szaggatott vonal a pontok Marcus parabolával való illesztésével kaptam, melyből  $k_{AP}$  maximális értékét  $22,6 \pm 3,5 \text{ s}^{-1}$  valamint a reorganizációs energiát  $\lambda = 745 \pm 32 \text{ meV}$ -ban határoztam meg. Az  $IT^{M265}$  és  $LH^{L131}$  -  $HL^{M202}$  mutánsok adatai nem szerepelnek az illesztésben, mivel ezek a mutánsok feltehetően egy másik görbére illeszkednek különböző elektrontranszfer paraméterekkel. Jelölések: ■ vad típus, ★  $HL^{M266}$ , ●  $LH^{L131}$ , ▲  $HL^{M202}$ , ▼  $EL^{M234}$ , ◆  $EH^{M234}$ , ◀  $EA^{M234}$ , ▷  $IT^{M265}$ , ►  $LH^{L131} - LH^{M160}$ , ○  $LH^{L131} - HL^{M202}$  és ●  $LH^{L131} - LH^{M160} - LH^{M197}$ .

A donor oldali mutánsok töltésrekombinációjából származó sebességi állandók nem mutatnak hőmérsékletfüggést, azaz feltételezhető, hogy direkt rekombináció (lásd **2.10. ábra**) valósul meg, akárcsak a natív reakciócentrumban. Bár a késleltetett fluoreszcencia jelentős növekedése ( $\Delta G_{P^+Q_A}$  csökkenése) tapasztalható, a donor oldali mutációk nem befolyásolják a  $\Delta G_{B_{Feo}Q_A}$ -t (**5.2. ábra**). Az Glu<sup>M234</sup> és az Ile<sup>M265</sup> akceptor oldali aminosavak mutációi esetében ugyanakkor a  $\Delta G_{B_{Feo}Q_A}$  kisebb lesz, ezért figyelembe kell venni, hogy a töltésrekombináció jelentős része indirekt útvonalon keresztül történhet.

Az akceptor oldali mutánsok megfigyelt sebességi állandói meredek hőmérsékletfüggést mutatnak például az Ile→Thr<sup>M265</sup> mutáns töltésrekombinációja:  $k_{\text{megf.}}$  5 °C-on 30 s<sup>-1</sup>-ről 90 s<sup>-1</sup>-re emelkedik 30 °C-on (**5.6. ábra**). Ezekben a mutánsokban a direkt rekombináció ( $k_{AP}$ ) sebességi állandóját a  $k_{\text{megf.}}$  sebességi állandókból határoztam meg hőmérsékletfüggésük alapján (**5.1** egyenlet).



**5.6. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC Ile→Thr<sup>M265</sup> mutáns töltésrekombinációjának megfigyelt sebességi állandójának hőmérséklet függő változása. [RC] = 2 μM, TL pufferekben (pH = 8); 120 μM terbutin.

A töltésrekombináció az alap állapotra közvetlen és/vagy közvetett útvonalakon keresztül (termikus aktivációval  $P^+H_A^-$  - állapoton keresztül) történhet (**2.10. ábra**). A megfigyelt sebességi állandó (Xu és Gunner 2000):

$$k_{\text{megf.}} = k_{AP} + k_{HP} \cdot e^{-\frac{\Delta G_{B_{Feo}Q_A}}{k_B T}}, \quad 5.1.$$

ahol  $k_{AP}$  és  $k_{HP}$  a  $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$  és  $P^+H_A^- \rightarrow PH_A$  töltés rekombinációk sebességi állandói. A  $k_{HP}$  sebességi állandó értéke  $7 \cdot 10^7$  s<sup>-1</sup>, mely független a mutációk jellegétől (Woodbury és mtsai. 1986; Xu és Gunner 2000). A  $\Delta G_{B_{Feo}Q_A}$  szabadenergia-különbség az  $P^+H_A^-$  és

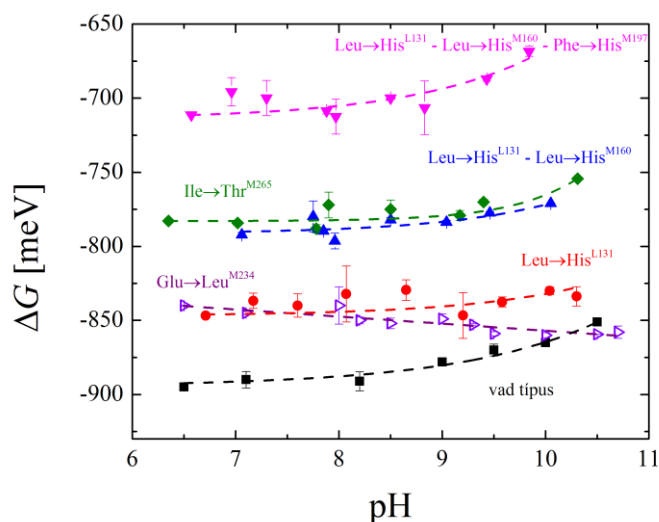
$P^+Q_A^-$  alapállapotok különbsége,  $k_B T$  pedig a Boltzmann kifejezés. A vad típusú RC esetében  $\Delta G_{BfeoQ_A} \approx 470$  meV, továbbá a közvetlen útvonal domináns, ha  $\Delta G_{BfeoQ_A} > 390$  meV vagy, ha a  $P^*$  és  $P^+Q_A^-$  állapotok közötti szabadenergia-különbség ( $\Delta G_{P^*Q_A}$ ) nagyobb mint 800 meV.

Az **5.5. ábrán** megfigyelhető, hogy az  $IT^{M265}$  és az  $LH^{L131} - HL^{M202}$  kivételével az akceptor és a donor oldalakon létrehozott különböző mutációból származó adatok egy (Marcus) parabolán (Marcus és Sutin 1985) fekszenek (**2.9** fejezet), ahol a maximális sebességi állandó  $k_{max} = 22,6 \pm 3,5$  s<sup>-1</sup> és a reorganizációs energia  $\lambda = 745 \pm 32$  meV. Mivel a különböző mutánsok direkt töltésrekombinációiból származó sebességi állandók nem mutatnak nagy változásokat a hajtóerő növelésével, a reorganizációs energiának közel kell lennie a tényleges szabadenergiákhoz. Ez az érték valamivel alacsonyabb, mint a korábban közölt reorganizációs energiák (800-900 meV) (Williams és Allen 2009). Az elektron-elektron (ELDOR) és az elektron-mag (ENDOR) kettős rezonancia spektroszkópiák újabb eredményei azt mutatják, hogy a  $Q_A$  fényindukált redukciója alatt a kötési helyén, változatlan helyzetben marad (Flores és mtsai. 2010). A kinongyűrű olyan orientációban van amely kedvező a fényindukált redukció szempontjából. Ez csökkenti a gyors töltésszétválasztáshoz szükséges reorganizációt. Mivel az  $IT^{M265}$  és az  $LH^{L131} - HL^{M202}$  mutánsok sebességi állandója nem illeszkedik az **5.5. ábrán** látható Marcus parabolára, feltételezhető, hogy ezek a mutációk további változást okoznak (például a reorganizációs energiában), amely befolyásolja a töltésrekombináció sebességét.

A késleltetett fluoreszcencia lecsengésének sebességi állandója megegyezik a töltésszétválasztott állapotok rekombinációs folyamattal való eltűnésének sebesség-állandójával, ami azt bizonyítja, hogy a késleltetett fluoreszcencia szivárgásból származik (Malkin 1977). Összehasonlításképpen, a zöld növények második fotokémiai rendszerétől származó késleltetett fluoreszcencia vagy termolumineszcencia nem mutatja ezt a tulajdonságot, főként a sokkal kisebb ( $\Delta G_{P^*Q_A} \sim 400$ -500 meV) szabadenergia különbség miatt (Cser és Vass 2007).

#### 5.1.4. A $P^*Q_A$ és $P^+Q_A^-$ közötti szabadenergia különbség pH-függése.

A különböző állapotok szabadenergiáit nem csak az aminosav cserével járó mutációk, hanem a közeg pH-jának változása is módosíthatja (**5.7. ábra**). A szabadenergia változása határozott függést mutat a pH-változástól. A hatás ugyan kicsi, de mérhető. Alacsony pH-nál a szabadenergia különbség nagyobb, mint a magasabb pH értékeknél. A  $\Delta G_{P^*Q_A}$  szabadenergia-különbség pH-függése azt mutatja, hogy a töltésszétválasztást a RC fehérje protonálódása/deprotonálódása kíséri. A szabadenergia-változás pH-függése a  $P^* \rightarrow P^+Q_A^-$  átmenet által kiváltott proton felvételhez/felszabaduláshoz kapcsolódik (Maróti 1993). A  $P^+Q_A^-$  dipól stabilizálódása mindkét végen történhet: akár a kinon, akár a dimer oldalon, a protonoknak egyidejű felvételével ill. felszabadulásával.



**5.7. ábra.** A szabadenergia csökkenésének pH-függése a vad típusú és mutáns RC-ban. A  $\Delta G_{P^+Q_A}$  szabadenergia-változást a késleltetett fluoreszcencia intenzitásából határoztam meg (lásd 4.3.1 fejezet). Feltételek: 2  $\mu\text{M}$  RC, 0,03% LDAO, 5 mM puffer (1 mM MES, MOPS, Tris, CHES és CAPS), 100 mM NaCl és 120  $\mu\text{M}$  terbutrin.

A pH-függés meredeksége közel nulla pH 6,5-8,5 között, e fölött a szabadenergia-változás enyhe pH függése figyelhető meg az egyes RC-ok esetében. Ebben a tartományban a meredekségek messze vannak a 60 meV/pH egységtől, amely közvetlenül jellemzi a redox centrum 1  $\text{H}^+$  nettó felvételét/felszabadulását az oxidációja/redukciója után. Sem a  $Q_A/Q_A^-$ , sem a  $P/P^+$  nem vesz részt közvetlenül a protonálódási/deprotonálódási folyamatokban. A vad típusnál megnövekedett instabilitás pH 8 érték felett a  $Q_B$  környékén található savas klaszter következménye lehet (Cheap és mtsai. 2007). A fényindukált proton felvétel a reakciócentrum  $Q_B$  kinon környezetében lévő savas klaszterből 60 meV/pH egység stabilizációs energiának felel meg. A vad típusú RC-ban a  $P^+Q_A^-$  állapot stabilizálódása (pl.  $\Delta\Delta G = \Delta G_{P^+Q_A}(\text{pH } 6) - \Delta G_{P^+Q_A}(\text{pH } 11)$ ) kb. 10 meV/pH egység – összhangban a korábbi megfigyelésekkel (Maróti és Wraight 1988a; McPherson és mtsai. 1988) - megfelel a szubsztöchiometrikus nettó protonkötésnek.

A kinon-oldali mutációk látszólag módosítják a fényindukált protonfelvételt, mely protonfelvétel a  $Q_B$  közelében lévő savas klaszterből történik, melyben a protonálható csoportok közötti kapcsolat antikooperatív, azaz a klaszteren belüli egyik csoport deprotonálódása nem segíti elő, sőt gátolja, a másik csoport deprotonálódását. Ez a klaszter hidrogénhíd-kötések láncolatán keresztül kapcsolódik a  $Q_A$ -hoz a fehérje citoplazmatikus oldalán (Cheap és mtsai. 2007). A  $P^+Q_A^-$  töltésszétválasztott állapot relaxációja és az elektrontranszfer (töltésrekombináció) megkívánja a protonok szétterjedését és a protonok eloszlásának kedvező konfigurációjának létrehozását a hidrogénhíd-kötések hálózatán. Ezt olyan elméleti számítások is alátámasztják, amelyek kimutatták, hogy a  $Q_A^-$  kialakulásának

következtében, a strukturális víz molekulák - és a kapcsolódó hidrogénhid-kötések hálózata - orientációja/pozíciója megváltozik a RC citoplazmatikus oldalán (Alexov és mtsai. 2000; Rabenstein és mtsai. 2000). Megvizsgálva az  $IT^{M265}$  mutáns és a vad típus  $P^+$  és  $P^+Q_A^-$  közötti szabadenergia-különbség pH-függését, azt figyeltem meg, hogy nagyfokú hasonlóságot mutatnak. Ez a hasonlóság azt sugallja, hogy a  $Q_A$  környezetében lévő hidrogénhid hálózat és a savas klaszter nem változik az  $IT^{M265}$  mutációval. Azonban az  $EX^{M234}$  (ahol X = H, L, A és R) mutánsok jelentős hatást gyakorolnak a vas ligandumra és a hidrogénhid-kötések hálózatára, továbbá nem mutatnak stabilizálódást (helyette enyhe destabilizációt) a pH csökkentésével (Cheap és mtsai. 2009).

A disszertációmban vizsgált *Rba. sphaeroides* RC donor oldali mutációi megváltoztatják a dimer hidrogénhid-kötésrendszerét és módosítják a  $P^+Q_A^-$  dipól stabilizációját. A megfigyelés szerint a hidrogénhid-kötések számának növekedésével a destabilizáció sokkal hangsúlyosabb (**5.1. táblázat**), azonban a dimer hidrogénhid-kötésrendszerének változása mérési hibán belül nem módosítja szignifikánsan a stabilizáció pH függését (**5.7. ábra**). Következésképpen a dimerhez kapcsolódó hidrogénhid-kötések nem befolyásolják a  $P^+$  és a környezetében található néhány protonálható aminosav közötti kölcsönhatást, amelyek a dimer oxidációját követően a periplazmatikus oldalon megfigyelt kis protonkibocsátásért felelősek (McPherson és mtsai. 1988; Maróti 1993).

#### 5.1.5. Termodinamikai paraméterek

A bakteriális RC-ban lezajló fényindukált töltésszétválasztás és a későbbi elektrontranszfer reakciók megértése érdekében szükség van a töltésszétválasztás kinetikájának illetve a termodinamikai paraméterek mérésére (LeBard és mtsai. 2008). Ugyan a töltésszétválasztás és a rekombináció kinetikai tulajdonságai viszonylag könnyen mérhetőek, a termodinamikai paraméterek meghatározása lényegesen nehezebb. A töltésszétválasztás termodinamikája rámutat az energiaszintek kezdeti és végállapota közötti különbségre és a reakció hajtóerejére (Gibbs szabadenergia), amely entalpikus és entrópikus komponensekből tevődik össze. A töltésszétválasztásból eredő szabadenergia-változás felosztása entalpikus és entrópikus tagokra a hozzájárulásuknak megfelelő arányában, tele van nehézségekkel. A különböző módszertani megközelítések eredményei meglehetősen ellentmondásosak és vitatottak (Delosme 2005). A mai napig nem teljesen tisztázott a bakteriális RC-ban történő töltésszétválasztást kísérő elektrosztatikus és konformációs események minden aspektusa.

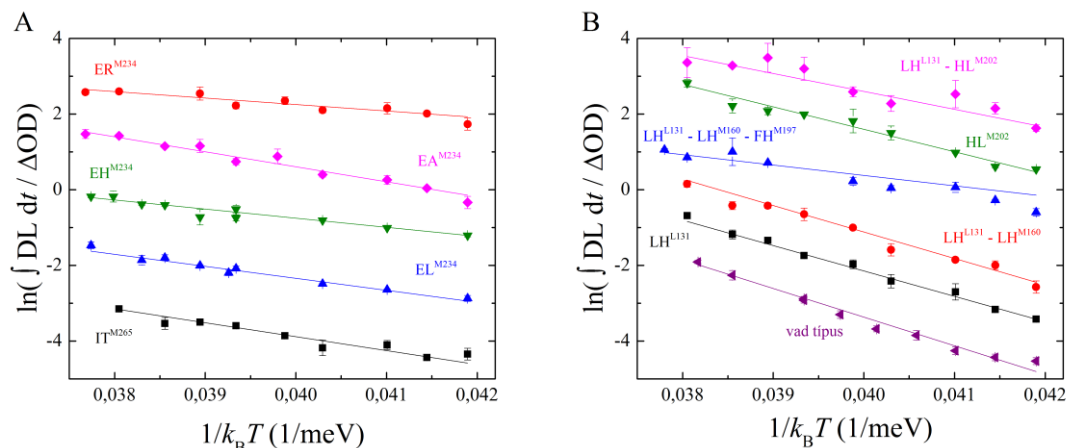
Korábbi kalorimetriás mérések azt mutatták, hogy a töltésszétválasztás nem okoz jelentős entalpia-változást, ezért a nagy entrópia csökkenés ( $T\Delta S = -600$  meV (Arata és Parson 1981c)) betudható annak, hogy a teljes szabadenergia-csökkenés a  $P^+Q_A^-$  töltéspár kialakulására fordítódik (Case és Parson 1971; Callis és mtsai. 1972). Noha egyes

fotoakusztikus (PA - photoacoustic) vizsgálatok nagy entalpia-változást mutatnak és ennek megfelelően az entrópia-változást közel nullában határozták meg (Nitsch és mtsai. 1989; Puchenkov és mtsai. 1995), ugyanakkor mások jóval pozitívabb ((Malkin és Canaani 1994)  $T\Delta S = +420$  meV (Edens és mtsai. 2000)) entrópia-változást is meghatároztak. A  $P^+Q_A^-$  kialakulásának PA-val történő mérései nagy pozitív entrópiát mutattak nemcsak a bakteriális RC-ban, hanem például a *Synechocystis* sp. PCC 6803 cianobaktérium első fotokémiai rendszerében is (Hou és mtsai. 2001b; Hou 2011). Kimutatták továbbá, hogy a *Synechocystis* sp. PCC 6803 PSI-ben az  $A-F_X$ -tól  $F_{A/B}$ -ig tartó lépés entrópiával hajtott (Hou és Mauzerall 2006). Ezzel ellentétben a PSII-ben a  $P_{680}Q_A \rightarrow P_{680}^+Q_A^-$  töltésszétválasztást ( $\Delta G \sim 1100$  meV) kismértékű ( $T\Delta S \sim 100$  meV) negatív entrópia-változás kíséri (Hou és mtsai. 2001a). A PSI (és bakteriális RC) és a PSII közötti entrópia különbség PA méréseken alapuló munkák alapján arra a következtetésre jutottak, hogy látszólag az entrópiának létfontosságú szerepe lehet a fotoszintetikus elektrontranszferben (Hou 2011). Emellett kimutatták, hogy a mesterséges fotoszintetikus rendszerekben az entrópia szabályozza a töltésszétválasztást (Rizzi és mtsai. 2008), valamint a töltésrekombináció hőmérsékletfüggését a bakteriális RC-ban (Xu és Gunner 2000).

Ahhoz, hogy meghatározzam a bakteriális RC-ban a töltésszétválasztásnál létrejött szabadenergia-változás entrópia/entalpia hozzájárulásainak arányát, késleltetett fluoreszcencia módszert alkalmaztam, melynek ugyan megvannak a korlátai (Carithers és Parson 1975; Arata és Parson 1981b; Turzó és mtsai. 2000), de kevésbé eltérő eredmények származnak a DL mérésekből, mint a korábban említett PA módszerből. A DL mérések szerint a vad típusú RC entrópia hozzájárulása a szabadenergia-változáshoz jóval kisebb, mint ahogy az a közelmúltban végzett PA mérésekből látszik (lásd **5.1. táblázat**). Ez a látszólagos eltérés származhat az eljárások különböző időfelbontásából, illetve a két módszer különböző feltevéseiből. A DL módszer egyensúlyi állapotot feltételez a  $P^+Q_A^-$  és a gerjesztett P állapot között a 100 ms időskálán, míg a PA módszer a  $<100$  ns időskálán felszabaduló hőmennyiség mérésén alapszik. Az entalpia az egyensúlyi állandók hőmérséklettől függő változásából (DL - van't Hoff ábrázolás, lásd **5.8. ábra**) vagy kalorimetriás mérésekből (PA) származtatódik, feltételezve a termodinamikai paraméterek (entalpia, hőkapacitás és térfogatváltozás) hőmérséklet-függetlenségét. Ez utóbbi feltevés nem feltétlenül érvényes minden körülmények között, ami okozhatja a megfigyelt eltérést a két módszer között (Xu és Gunner 2000).

A késleltetett fluoreszcencia intenzitásának közvetlen mérésével a  $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$  folyamatot követhetjük. A DL mérésekből a  $P^*$  és a  $P^+Q_A^-$  állapotok közötti szabadenergia-különbséget ( $\Delta G_{P^*Q_A}$ ) határozhatjuk meg, amely entalpia-változás ( $\Delta H_{P^*Q_A}$ ) és entrópia-változás ( $T\Delta S_{P^*Q_A}$ ) kifejezésekből áll ( $\Delta G_{P^*Q_A} = \Delta H_{P^*Q_A} - T\Delta S_{P^*Q_A}$ ). Mivel a DL a  $P^+Q_A^-$  és a  $P^*$  közötti termikus egyensúly szivárgásából származik, ezért a késleltetett fluoreszcencia hőmérsékletfüggésének megfigyelése (van't Hoff plot) önálló módszerként

szolgál a  $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$  átmenet entalpia-változásának ( $\Delta H_{P^*Q_A}$ ) megfigyelésére. Az entalpia-változást a van't Hoff ábrázolásban (5.8. ábra) az egyenes vonal meredeksége adja. E két mennyiségből ( $\Delta G_{P^*Q_A}$  és  $\Delta H_{P^*Q_A}$ ) származtatható a harmadik paraméter, az entrópia-változás ( $\Delta S_{P^*Q_A}$ ) (5.1. táblázat).



**5.8. ábra.** A vad típusú és különböző mutáns RC-ok (akceptor oldali mutánsok – A panel; donor oldali mutánsok – B panel) késleltetett fluoreszcenciája van't Hoff ábrázolásban. A RC koncentrációjával normalizált, integrált DL kinetikák ( $\Delta OD$ : 430 nm-en fényindukált abszorpció változás) határozott hőmérsékletfüggést mutatnak: a Boltzmann reláció szerint a DL intenzitása nagyobb magasabb hőmérsékleten. A meredekség megfelel a  $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$  átmenet entalpia-változásának. A különböző mutánsok mért értékeit az áttekinthetőség kedvéért egymáshoz képest eltolva ábrázoltam.

A vad típusú RC-ban a  $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$  átmenetet elsősorban az entalpia-változás vezérli és az entrópia-változásnak nincs nagy jelentősége (Arata és Parson 1981b). A tendencia alapvetően megmarad a donor oldali mutánsoknál, ahol az entalpikus tag domináns marad, de a hidrogénhid-kötések számának növekedésével az entrópikus kifejezés növekedése figyelhető meg. Az akceptor oldali mutációk minőségi különbségeket mutatnak: már egy mutáció után az entrópia-változás jelentős hajtóereje lehet a  $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$  átmenetnek. Ez a megfigyelés molekuláris átrendeződést jelenthet a vad típusú RC-hoz képest az Ile $\rightarrow$ Thr<sup>M265</sup> és a Glu $\rightarrow$ X<sup>M234</sup> (ahol X = His, Leu, Ala és Arg) mutánsoknál. Ezek a specifikus és tranziens molekuláris konformációk az átmenet (töltésszétválasztás/töltés-rekombináció) létrejöttének előfeltételei a  $Q_A$ -t érintő mutációkban, ami úgy tűnik, hogy a donor oldali mutációknál hiányzik.

A töltésszétválasztással járó külső töltés átrendeződés az energetikai rendszer kis módosulásait okozza. A mutánsok szabadenergia-változása az ionerősség változtatásával a mérési hibán belül kissé megváltozik. Mivel a hatás kicsi, arra a következtetésre juthatunk, hogy a külső töltések újrendeződése csak kis mértékben befolyásolja a megfigyelt termodinamikai paramétereket. Ennek megfelelően a protoneloszlás



(kötés/felszabadulás) kevésbé befolyásolhatja a mutánsokban a termodinamikai változásokat, mint a konformációs flexibilitás.

**5.1. táblázat.** *Rba. sphaeroides* vad típusú és mutáns RC-ok  $P^* \rightarrow P^+Q_A^-$  töltésszétválasztott állapotnak megfelelő termodinamikai paraméterek (szabadenergia-változás ( $\Delta G_{P^*A}^0$ ), entalpia-változás ( $\Delta H_{P^*A}^0$ ) és entrópia-változás ( $T\Delta S_{P^*A}^0$ ) szobahőmérsékleten) 0 és 100 mM ionerősségű vizes oldatban, pH 8-nál.

Termodinamikai paraméterek		$\Delta G_{P^*A}^0$	$\Delta H_{P^*A}^0$	$T\Delta S_{P^*A}^0$	$\Delta G_{P^*A}^0$	$\Delta H_{P^*A}^0$	$T\Delta S_{P^*A}^0$
Ionerősség [mM]		0			100		
vad típus	Ø	$-898 \pm 20$	$-745 \pm 25$	$153 \pm 45$	$-890 \pm 21$	$-765 \pm 20$	$125 \pm 41$
	LH <sup>L131</sup>	$-850 \pm 22$	$-674 \pm 24$	$176 \pm 46$	$-835 \pm 20$	$-693 \pm 21$	$142 \pm 41$
	LH <sup>L131</sup> - LH <sup>M160</sup>	$-793 \pm 18$	$-639 \pm 23$	$154 \pm 41$	$-775 \pm 21$	$-666 \pm 38$	$109 \pm 59$
	Donor oldali mutánsok						
	LH <sup>L131</sup> - LH <sup>M160</sup> - FH <sup>M197</sup>	$-713 \pm 12$	$-342 \pm 25$	$371 \pm 37$	$-698 \pm 10$	$-384 \pm 32$	$314 \pm 42$
	HL <sup>M202</sup>	$-828 \pm 22$	$-600 \pm 25$	$228 \pm 47$	$-816 \pm 21$	$-620 \pm 35$	$196 \pm 54$
Akceptor oldali mutánsok	HL <sup>M202</sup> - LH <sup>L131</sup>	$-771 \pm 18$	$-437 \pm 36$	$334 \pm 52$	$-750 \pm 17$	$-450 \pm 61$	$300 \pm 78$
	EH <sup>M234</sup>	$-814 \pm 25$	$-253 \pm 28$	$561 \pm 53$	$-801 \pm 21$	$-243 \pm 25$	$558 \pm 26$
	EL <sup>M234</sup>	$-818 \pm 27$	$-492 \pm 60$	$326 \pm 87$	$-805 \pm 21$	$-324 \pm 22$	$481 \pm 43$
	EA <sup>M234</sup>	$-801 \pm 18$	$-426 \pm 26$	$386 \pm 44$	$-788 \pm 21$	$-415 \pm 28$	$362 \pm 49$
	ER <sup>M234</sup>	$-783 \pm 30$	$-227 \pm 25$	$556 \pm 55$	$-766 \pm 21$	$-185 \pm 26$	$581 \pm 47$
	IT <sup>M265</sup>	$-799 \pm 16$	$-369 \pm 34$	$430 \pm 50$	$-784 \pm 21$	$-316 \pm 33$	$468 \pm 54$

A vizsgált mutáns RC-ok az elektrontranszfer megváltozott termodinamikáját mutatták. A donor és akceptor oldalon létrehozott pontmutációk hatással voltak a töltésszétválasztás szabadenergia-változására, és növelték az entrópia hozzájárulását. Olyannyira, hogy a donor oldali tripla mutánsban és néhány akceptor oldali mutánsban (EA<sup>M234</sup> és EL<sup>M234</sup>) az entalpia és entrópia szabadenergiához viszonyított hozzájárulása közel azonos volt, míg az EH<sup>M234</sup>, ER<sup>M234</sup> és IT<sup>M265</sup> akceptor oldali mutáns RC-ban az entrópia vált dominánssá. A töltésszétválasztás során a viszonylag magas entrópia-változás az akceptor és/vagy a donor oldalon lévő mikroállapotok számának növekedésére hívja fel a figyelmet. Az M265 helyen lévő aránylag nagyobb méretű izoleucin aminosav helyettesítése egy kisebb treonin aminosavval lehetővé teszi, hogy több konformációs állapot alakuljon ki a vad típusú RC-hoz képest. Mindemellett feltehetően a treonin poláros oldalláncai hidrogénhid-kötéssel egy specifikus konformációt képesek stabilizálni. A helyettesített treonin hidroxil csoportja a közelében lévő M261 treonin aminosav karbonil csoportjával hidrogénhid-kötést alakíthat ki és ezzel az M259-M262 aminosav csoport (N<sup>M259</sup>, A<sup>M260</sup>, T<sup>M261</sup>, M<sup>M262</sup>)

peptidvázát meghúzhatja/eltolhatja. Ennek következménye az  $A^{M260}$  helyzetének megváltozása, mely molekuladinamikai szimulációk alapján hidrogénhid-kötéstávolságon belül helyezkedik el a  $Q_A$  karbonil csoportjához képest (**5.1. ábra**, C panel), mely a mutáció következtében felszakadhat. Hasonlóan az  $IT^{M265}$  mutáns RC-hoz az  $EX^{M234}$  (ahol  $X = H, L, A$  és  $R$ ) mutáció is megváltoztatta a hidrogénhid-kötések hálózatát. Az  $EX^{M234}$  mutáció következtében megváltozott vas ligandum hatással van a  $Q_A$ -ra, továbbá az  $EX^{M234}$  mutáns a  $Q_A$  helyen növelte a vad típushoz képest a lehetséges konformációs állapotok számát. Az akceptor oldali mutánsok entrópia hozzájárulásának megfigyelt növekedése összhangban van a hidrogénhid-kötés hálózatának fellazulásával. Ezek a megfigyelések összhangban vannak a neutronszórással (NS – neutron scattering) (Sacquin-Mora és mtsai. 2007), a röntgenabszorpciós finomszerkezet spektroszkópiával (XAFS - X-ray absorption fine structure) (Veronesi és mtsai. 2008) és a Mössbauer-spektroszkópiával (MS - Mössbauer spectroscopy) (Halas és mtsai. 2012) végzett mérésekkel, azaz, hogy a vad típusú RC Fe-ligandum merev, amit specifikus pont mutációk lazítani tudnak.

A vizsgált mutánsokban a konformációs flexibilitáson kívül a fehérje citoplazmatikus oldalán lévő poláros oldalláncok és a protoneloszlás is szerepet játszhat az entrópia növekedésében, ha ezek eltérnek a töltésszétválasztott és alapállapotban. A mutáció által okozott enyhe térbeli/elektrosztatikus átrendeződés következtében néhány negatív töltésű felületi csoport orientációja megváltozik, amely növelheti a töltésszétválasztás entrópiáját. Ugyanakkor a megfigyelt termodinamikai paramétereket, beleértve az entrópiát, az oldat külső ionerőssége csak kis mértékben befolyásolta (**5.1. táblázat**).

#### 5.1.6. Kölcsönhatások változása a mutáns reakciócentrumokban

A disszertációban szereplő összes mutáns nagymértékben csökkentette a  $P^*$  és  $P^+Q_A^-$  közötti szabadenergia-különbségét. A mutációk egyike sem jár jelentős strukturális változásokkal, azért ezekben a mutánsokban a megfigyelt energetikai változások a kofaktorok ( $P$  és  $Q_A$ ) és a fehérje környezete közötti kölcsönhatások enyhe módosulását eredményezik, beleértve a RC periplazmikus oldalán a dimerhez kötődő hidrogénhid-kötések és a citoplazmikus oldalán lévő hidrogénhid-kötések hálózatában bekövetkező változásokat.

A hidrogénkötések konjugált karbonil csoportokra, valamint azoknak a dimer középponti redoxpotenciáljára gyakorolt hatása jól dokumentált (Williams és Allen 2009). A vad típusban a  $P/P^+$  középponti redoxpotenciál pH 8-nál ~500 mV (Maróti és Wraight 1988a). A dimerhez kötődő hidrogénhid-kötés hozzáadásával a középponti redoxpotenciál 60-120 mV-ot emelkedik, míg a hidrogénhid-kötés elvételével kb. 80 mV-tal csökken (Lin és mtsai. 1994; Nagarajan és mtsai. 1993). A hidrogénhid-kötések változtatásával járó mutánsok késleltetett fluoreszcencia mérései alátámasztják ezeket az eredményeket. Egyetlen hidrogénhid-kötés (a dimer egy konjugált karbonil csoportjához) hozzáadásával okozott szabadenergia-változás tovább fokozható a hidrogénhid-kötések számának

növelésével, melynek hatására a késleltetett fluoreszcenciának mind a sebessége, mind az amplitúdója (területe) növekszik (**5.3. ábra** és **5.4. ábra**). Bár a késleltetett fluoreszcencia (**5.1. táblázat**) alapján meghatározott szabadenergia-különbségek csökkenése nem olyan nagy, mint a redox titrálással kapott adatoknál (Lin és mtsai. 1994), a tendencia jól felismerhető. Az eltérés a két mérés különböző feltételeinek tulajdonítható. Míg a redox egyensúlyt a dimer kémiai oxidációjával érik el, a késleltetett fluoreszcencia módszer a  $Q_A$  redox változásait is tartalmazza. A fehérjekörnyezet dimerrel való kölcsönhatása szabályozza a RC-ban a szabadenergia-különbséget. A hozzáadott hidrogénhid-kötések csökkentik a szabadenergia-különbséget és az abszorbeált foton fotokémiai hasznosításának hatásfokát. A dimer hidrogénhid-kötések hálózatának szisztematikus megváltoztatásával a  $P/P^+$  középponti redoxpotenciált lényegesen meg lehet emelni, hogy erősen oxidáló reakciócentrumokat hozzunk létre (Lin és mtsai. 1994). Az immár erősen oxidáló reakciócentrumokban a tirozin megfelelő pozíciókba helyezésével analógia mutatható ki a második fotokémiai rendszer redoxaktív tirozinjával (Kálmán és mtsai. 2004). Ezek a nagymértékben oxidáló RC-ok képesek a mangán(II) oxidálására, de csak másodrendű diffúzió-vezérelt folyamatként (Kálmán és mtsai. 2003; Thielges és mtsai. 2005; Kalman és mtsai. 2011).

A  $Q_A$  környezetében kialakított mutációk - például az  $Ile \rightarrow Thr^{M265}$  - számos következménnyel járhatnak, hiszen a  $Q_A$  energetikáját komplex kölcsönhatások határozzák meg a környező aminosavakkal (Wraight és Gunner 2009). A szerkezeti adatok alapján a  $His^{M219}$  és az  $Ala^{M260}$  hidrogénhid-kötéseket képez a  $Q_A$  kinon O4 (2,87 Å) és az O1 (2,82 Å) karboniljaival (**5.1. ábra**, C panel). A  $Trp^{M252}$  és az  $Ile^{M265}$  a kinongyűrű ellentétes oldalain vele van der Waals-kölcsönhatásban állnak. Az M265 izoleucin mutációja kisebb, poláris aminosavra, például treoninra vagy szerinre, jelentős redox változásokhoz vezet (Rinyu és mtsai. 2004). A töltésrekombináció sebességi állandójából mért különbségek azt mutatják, hogy a mutációk a  $Q_A$  középponti redoxpotenciálját 85-100 mV-tal csökkentik (Takahashi és mtsai. 2001; Wells és mtsai. 2003). Hasonló eredményt kaptam (~100 mV a treonin esetében) késleltetett fluoreszcencia mérésekkel (lásd a **5.1. táblázat**). A  $P^+Q_A^-$ ,  $P^*$ -hoz viszonyított szabadenergia szintjének változását számos tényező okozhatja, de ezen tényezők hozzájárulása még nem tisztázott. A mutáció elektrosztatikusan befolyásolhatja a fehérje-kinon kölcsönhatásokat, vagy megváltoztathatja a van der Waals-kölcsönhatásokat. A peptid gerincének kinonoktól való elmozdulása növelheti az O1 karbonil és az  $Ala^{M260}$  peptid NH hidrogénkötési távolságát ~0,1 Å értékkel. Ezenkívül az aminosavak méretbeli különbsége (van der Waals kontaktus) és a treonin által behozott hidroxilcsoport is hozzájárulhat a megfigyelt eltolódás kialakulásához. A kinon metoxicsoportjai feltehetően csekély szerepet játszhatnak az energetikai változásokban, hiszen, ha a natív ubikinont helyettesítjük antrakinonnal, amelyben nincsenek metoxicsoportok, hasonló energetikai hatásokat kaphatunk (Wells és mtsai. 2003). Ugyan az újabb pulsed-EPR mérések további részleteket szolgáltatnak a  $Q_A$  környezetében kialakított mutációkról, végleges

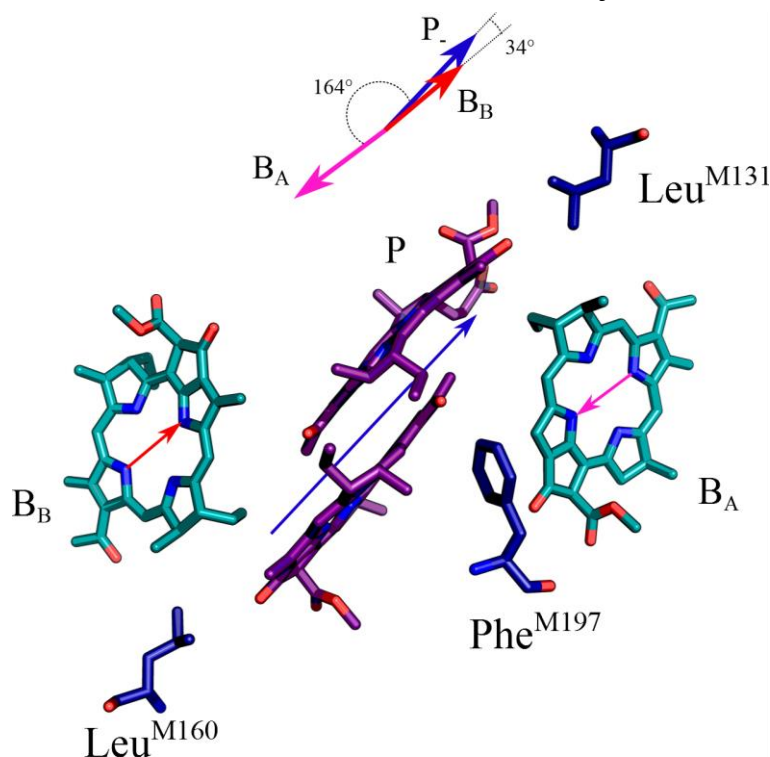
következtetést nem tudtak levonni (Martin 2011). Míg a nitrogén hiperfinom-csatolási paraméterek közel azonosak voltak az His<sup>M219</sup> és a Q<sub>A</sub> szemikinin között, a kvadrupól paraméterek jelentős változása volt megfigyelhető. Bár a kötőhely szerkezetére csak elhanyagolható hatást gyakorol a mutáció, de ez a hatás mégis elegendő lehet ahhoz, hogy az elektromos potenciál és/vagy a térerősség gradiens hozzájárulása lényeges legyen az elektrosztatikus kölcsönhatáshoz és a megfigyelt szabadenergia-változásához.

Az M234 glutaminsav két kötést alakít ki a vas atommal, továbbá egy-egy kötést négy hisztidinnel (His<sup>L190</sup>, His<sup>L230</sup>, His<sup>M219</sup> és His<sup>M266</sup>) (**5.1. ábra**). Az L190 és az M219 hisztidin szimmetrikusan kötődik a Fe atomhoz, valamint hidrogénhíd-kötéssel a Q<sub>A</sub>-hoz és Q<sub>B</sub>-hez. A Q<sub>A</sub>-His<sup>M219</sup>-Fe-His<sup>L230</sup>-Q<sub>B</sub> "lánc" teremti meg a szerkezeti és energetikai kapcsolatot a két kinon között (Cheap és mtsai. 2007). A Glu<sup>M234</sup> központi pozíciója miatt, amely a két kinon között helyezkedik el és a Fe atomhoz kötődik, kihatással van a Q<sub>A</sub> energetikájára. A disszertációban ezt négy különböző Glu→X<sup>M234</sup> mutánssal (X = His, Leu, Ala és Arg) vizsgáltam. Például a hely-specifikus EH<sup>M234</sup> mutációval egy ötödik hisztidint adhatunk a Fe ligandumhoz vagy az ER<sup>M234</sup> mutációval a savas aminosavat cseréltünk le egy bázikus aminosavra. Az EL<sup>M234</sup> mutációval egy olyan nagyobb méretű, nem poláros aminosavat adhatunk a ligandumhoz, amely képtelen kölcsönhatásokat kialakítani a Fe-atommal és/vagy nem teszi lehetővé vízmolekulákkal töltött üreg kialakulását. A vizsgált összes akceptor oldali mutáns megváltoztatta a Q<sub>A</sub> hidrogénkötés hálózatát (Cheap és mtsai. 2009) és jelentős változást okozott a primer kinon késleltetett fluoreszcencia által mutatott energetikájában (lásd az **5.1. táblázat**).

## 5.2. Mutáns és vad típusú *Rba. sphaeroides* reakciócentrum fluoreszcencia indukciója és anizotrópiája

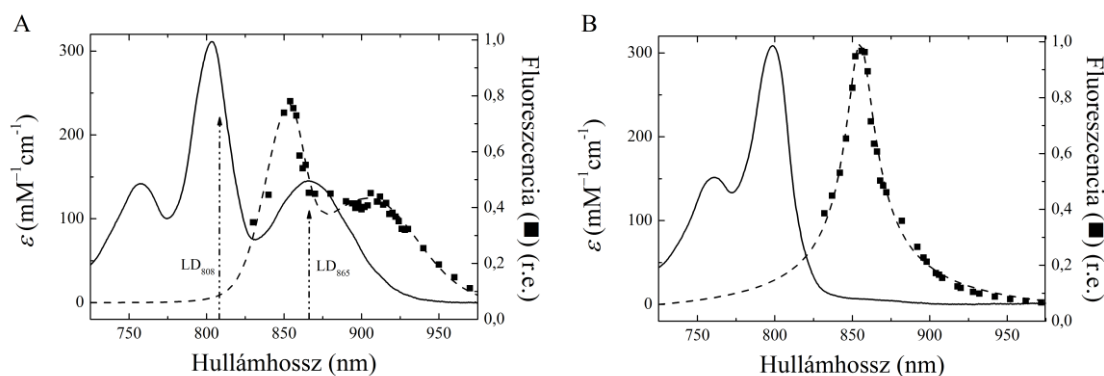
Bemutattam, hogy a *Rba. sphaeroides* bíbor fotoszintetikus baktérium reakciócentrumában a helyspecifikus mutáció (5.9. ábra) módosítja a dimer energetikáját (Lin és mtsai. 1994; Williams és Allen 2009) és destabilizálja a  $P^+Q_A^-$  primer töltéspárt (Onidas és mtsai. 2013) (lásd 5.1 fejezet). Mindezek következtében megváltozik a kölcsönhatás (csatoltság) a monomer (B) és a dimer (P) Bkl között. Annak érdekében, hogy jobban megértsem a B és P közötti fehérjén belüli energiatranszfert, *Rba. sphaeroides* vad típusú és tripla mutánsból (Leu $\rightarrow$ His<sup>L131</sup> - Leu $\rightarrow$ His<sup>M160</sup> - Phe $\rightarrow$ His<sup>M197</sup>) izolált RC-on (kvázi) steady-state spektroszkópia (fluoreszcencia indukció és fluoreszcencia anizotrópia) méréseket végeztem a bakterioklorofill szelektív gerjesztésével.

Az 5.9. ábra a dimer és a két monomer bakterioklorofill elrendezését mutatja, valamint azok átmeneti dipóljait a gerjesztett- és az alapállapot között. A dipólok irányultságukban eltérnek, amely jelentősen meghatározza az orientáció-függő fehérjén belüli energiatranszfert, továbbá a kromofórok fluoreszcenciájának anizotrópiáját.



**5.9. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC dimer (P) és monomer (B<sub>A</sub> és B<sub>B</sub>) bakterioklorofillok fitil-oldalláncaik nélkül, valamint három aminosav, amelyek a vad típusú RC-ban hisztidinre lettek cserélve. (PDB struktúra 3I4D, felbontás 2,01 Å). A nyilak a monomer bakterioklorofillok Q<sub>y</sub> átmeneti dipóljainak vetületét és a dimer alacsonyabb gerjesztési állapotát (P<sub>-</sub>) mutatják (Jonas és munkatársai 1996). A B<sub>A</sub> és a B<sub>B</sub> átmeneti dipóljai 164° és 34° szögben állnak a dimerhez tartozó átmeneti dipólhoz képest.

Mivel a kofaktorokat könnyen jellemezhetjük és azonosíthatjuk a közeli infravörös abszorpció és fluoreszcencia spektrumok specifikus sávjaival (lásd **2.5.1** fejezet), ezért a bakteriális RC fluoreszcenciája szelektíven gerjeszthető olyan lézerdiódákkal, amelyek hullámhosszai a kromofórok abszorpció sávjaiba esnek. 808 nm (infravörös) hullámhosszú lézerdióda alkalmazásával a vad típusú RC-ban mind a B, mind a dimer magasabb exciton állapotai közvetlenül gerjeszthetők (**2.9. ábra**). Ilyen gerjesztésnél két jól megkülönböztethető fluoreszcencia sáv jön létre 850 és 910 nm-nél, amelyek a  $^1B^*$ -ről és a  $^1P_-$ -ről (a dimer alacsonyabb exciton állapotáról) az alapállapotra történő sugárzásos átmeneteknek felelnek meg (**5.10. ábra**, A panel). Abban az esetben, ha a RC-ot kémiai úton oxidáljuk a gerjesztést megelőzően ferricianid segítségével, a dimer sáv eltűnik (**5.10. ábra**, B panel).



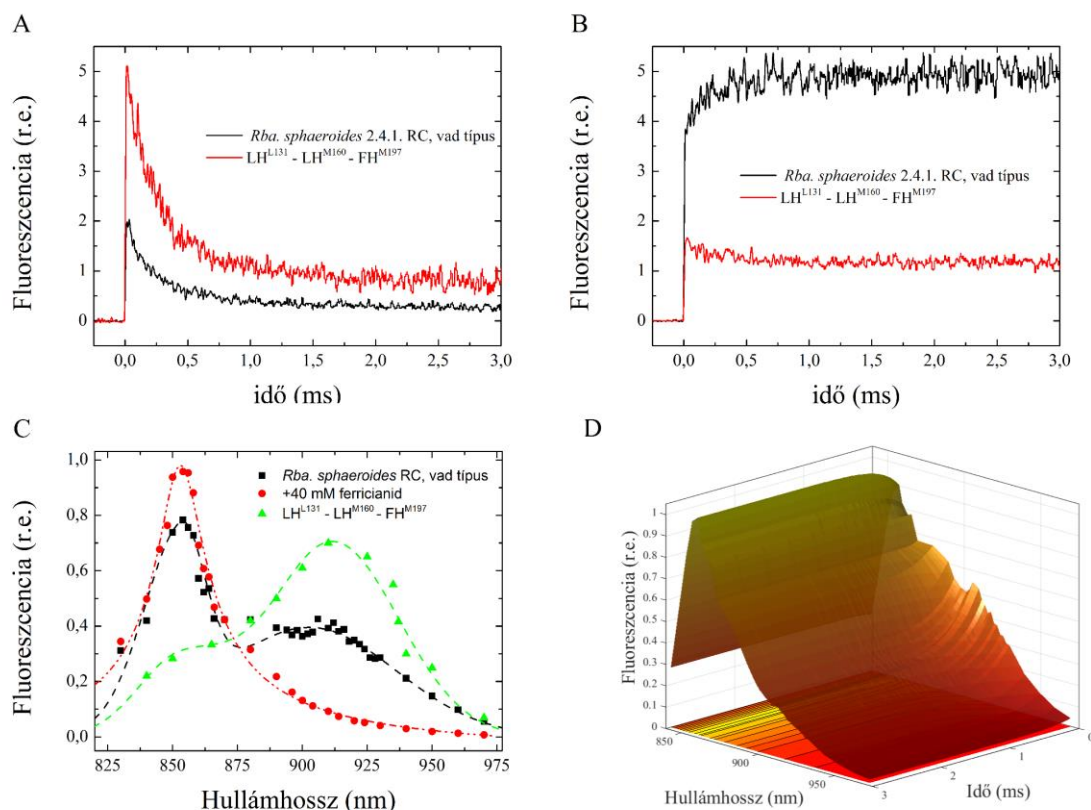
**5.10. ábra.** *Rba. sphaeroides* RC sötétadaptált (A) és kémiaileg oxidált (B) közeli infravörös abszorpció és fluoreszcencia spektruma szobahőmérsékleten. A dimer abszorpció és fluoreszcencia spektruma a RC kémiai oxidálását követően eltűnik. Feltételek: 1-10  $\mu$ M RC; 0,03 % LDAO; 10 mM Tris puffer; pH 8 (bal oldal) és +40 mM kálium ferricianid (jobb oldali ábra)

### 5.2.1. Mutáns és vad típusú RC fluoreszcencia indukciója

A dimer fokozatos fénygerjesztéssel is oxidálható. A lézerdiódával történő gerjesztés során a  $P \rightarrow P^+$  átmenetet a 910 nm-nél lévő dimer fluoreszcencia sáv területének csökkenése jelzi (**5.11. ábra**, A panel), amely a gerjeszthető P-k fogyásának eredménye. Ehhez hasonló karakterisztikus változások figyelhetők meg intakt sejtekben is a bakterioklorofillok fluoreszcencia sávjainál a sötét  $\rightarrow$  fény átmenet során (fluoreszcencia indukció) (Clayton 1966; Osváth és mtsai. 1996), melyet széleskörű érdeklődés övez (Koblizek és mtsai. 2005; Kocsis és mtsai. 2010; Asztalos és mtsai. 2012; Kis és mtsai. 2014). A fluoreszcencia hatásfok csökkenésének sebességi állandóját a lézerdióda intenzitásával szabályozhatjuk. A dimer fotooxidációját követően megmaradt alacsony fluoreszcencia jel az izolált RC szennyezettségének tulajdonítható.

Ha az emissziót nem 910 nm-en, hanem 850 nm-en detektáljuk, az indukció kinetikája figyelemreméltó változásokat mutat. Ezen a hullámhosszon a B hozzájárulása a

meghatározó és ez alakítja ki a RC megfigyelt fluoreszcenciáját. A kezdeti emelkedést követően a fluoreszcencia igen magas szinten éri el a maximumát. A 910 nm-nél és 850 nm-nél megfigyelhető fluoreszcencia kinetikák ellentétes alakja, de megegyező esési és emelkedési ideje egyértelmű bizonyítéka a  $^1B^*$ -ról a dimérre történő elektron gerjesztési energiáttranszfernek. A vad típusú RC fluoreszcencia indukciójának spektrális és kinetikai változásai közötti általános és szemléletes kapcsolatot az **5.11. ábra** D panelje mutatja (kvázi) 3D-s ábrázolásban.



**5.11. ábra.** *Rba. sphaeroides* vad típusú és tripla mutáns (Leu→His<sup>L131</sup> - Leu→His<sup>M160</sup> - Phe→His<sup>M197</sup>) RC fluoreszcencia indukció spektrális és kinetikai változásai 808 nm-es hullámhosszú lézerdíóda gerjesztéssel. A fluoreszcencia indukció 910 nm-en (A panel) és 850 nm-en (B panel) felvett kinetikája, a vad típusú (fekete) és tripla mutáns (vörös) RC-ok esetében. C panel: A vad típusú (fekete pontok) és a mutáns (zöld pontok) RC fluoreszcencia spektruma, ahol a dimer redukált állapotban van valamint a RC fluoreszcencia spektruma a dimer kémiai oxidált állapotában (piros pontok). A vad típusú RC fluoreszcencia spektrumának és kinetikájának 3D ábrázolása (D panel).

A dimer és Bkl közötti aminosavak tripla mutációja nem változtatja meg a RC közeli infravörös abszorpciós spektrumát, de jelentősen módosítja a fluoreszcencia spektrumát és indukciós kinetikáját. Míg a 850 nm-nél levő Bkl fluoreszcencia határfok drámaian csökken, addig a 910 nm-nél megfigyelhető dimer fluoreszcencia határfoka kétszeresére nő. A töltésszétválasztáshoz szükséges fényhasznosítás sebességi állandóját, amely a 910

nm-nél mérhető fluoreszcencia indukció relaxációs állandójaként mérhető, a mutáció nem módosítja. Mindazonáltal a 850 nm-en detektált kinetikák jelentősen megváltoznak (**5.11. ábra**, B panel).

A RC fluoreszcencia hatásfokának és anizotrópiájának az indukció alatt megfigyelt spektrális és időbeli változásait a két kromofór (P és B) energiaszint diagramja alapján tárgyalom (**2.9. ábra**). A 800 nm-es abszorpció sáv gerjesztésével két jól kivehető fluoreszcencia sáv jelenik meg 850 nm-nél és 910 nm-nél, amelyek a  $^1P_-^*$  és  $^1P_+^*$  állapotokról alapállapotra történő átmeneteinek tulajdoníthatók. A dimer fluoreszcenciájának kvantumhatásfoka igen alacsony,  $4 \cdot 10^{-4}$  (Zankel és mtsai. 1968), amely főként a fotokémia (töltésszétválasztás) nagy sebességi állandójának köszönhető. Hasonlóan alacsony értékek várhatóak a B fluoreszcenciájánál, mert 1) a dimer ( $^1P_+$ ) 810 nm-hez közeli abszorpciója felelős a B 800 nm-nél levő abszorpciójának közel egynegyedéért és 2) a két fluoreszcencia sáv fluoreszcencia intenzitása ugyanabba a nagyságrendbe esik a vad típusú RC-ban. Habár a  $^1B^*$ -ről  $^1P_-^*$ -ra a  $^1P_+^*$ -n keresztül történő energiatranszferének pontos sebességi állandója vitatott (Jonas és mtsai. 1996; Stanley és mtsai. 1996; Arnett és mtsai. 1999), legalább tízszer nagyobb kell lennie a töltés szétválasztás sebességi állandójánál. Ahhoz, hogy nagyjából hasonló fluoreszcencia kvantum hatásfokot kapjunk a B-re és P-re, a B-nek legalább 10-szer nagyobb sugárzási sebességi állandót kell feltételeznünk P-hez képest a vad típusú RC-ban. A fehérjén belüli kémiai környezet és energetikai csatolás is számíthat ennél a különbségnél.

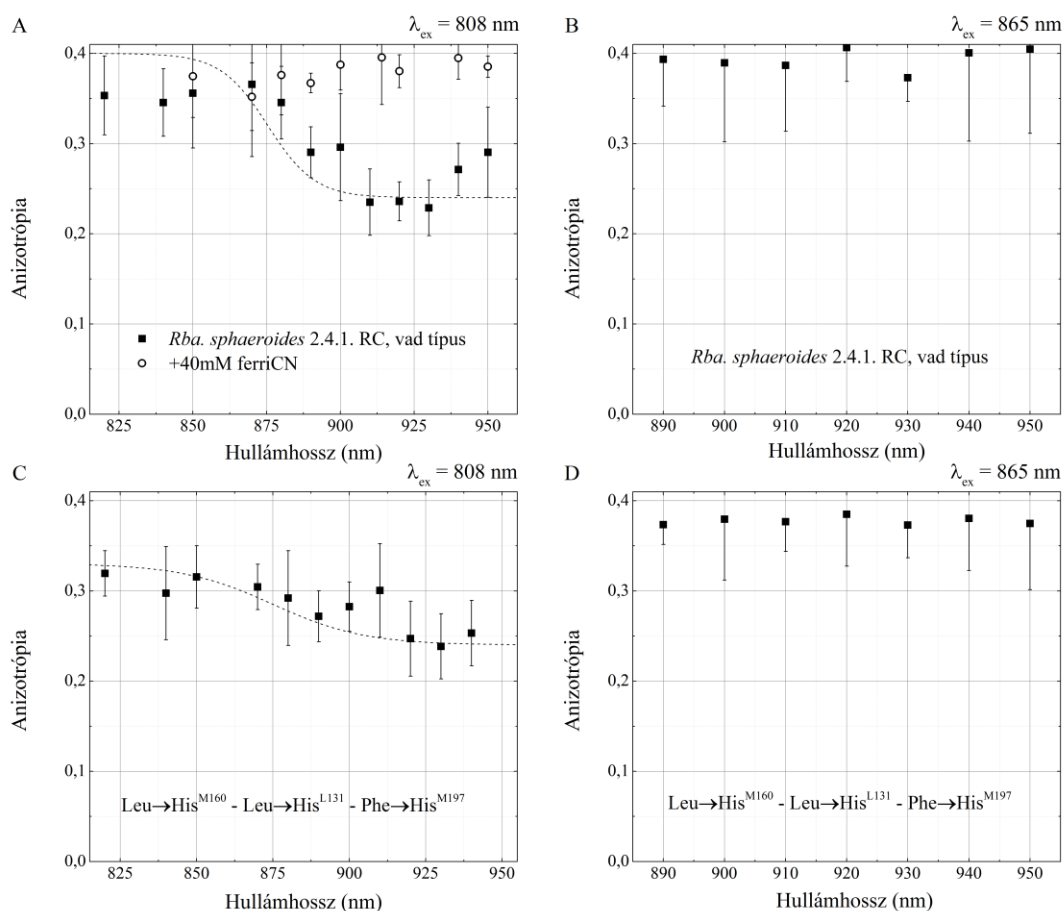
Érdekes felfedezés volt, hogy a B fluoreszcencia hatásfoka nem változott jelentősen a dimer oxidációjával, mert csak egy kis növekedés volt detektálható. Ha oxidáljuk a P-t (kémiai úton vagy folyamatos fénnel), nem történik energiatranszfer  $^1B^*$ -ről  $^1P_+^*$ -re, azaz a B fluoreszcenciájának sokkal nagyobb hatásfoka várható. Mindazonáltal ez nem következik be, valószínűleg egy másik deaktiváló (veszteséges) folyamat jelenléte miatt, amelynek hasonló a sebességi állandója, mint a  $^1B^* \rightarrow ^1P_+^*$  energiatranszferé. Mivel a  $^1B^*$  és  $^1P_+^{ox}$  (az oxidált dimer magasabb exciton szintje) közel izoelektromos állapotban vannak, és egymáshoz közel helyezkednek el, ezért erős elektromos kötés és ennek köszönhetően nagy transzfer sebesség várható, amely a megfigyelt alacsony szinten tartja a B fluoreszcencia hatásfokát.

### 5.2.2. Mutáns és vad típusú RC fluoreszcencia anizotrópiája

A 865 nm-es sáv direkt gerjesztésével elért dimer fluoreszcencia anizotrópiája mind a vad típusú, mind a mutáns RC-ban magas (nagyon közeli a +0.4 elméleti maximumhoz) és nem mutat hullámhosszfüggést (**5.12. ábra**, B és D panel). Hasonlóan magas és konstans fluoreszcencia anizotrópia figyelhető meg amikor a dimert kémiai oxidáljuk ferricianiddal (**5.12. ábra**, A panel). Az anizotrópia spektrum megváltozik amikor a dimer alacsonyabb exciton szintjét nem közvetlenül gerjesztjük. A Bkl fluoreszcenciájának



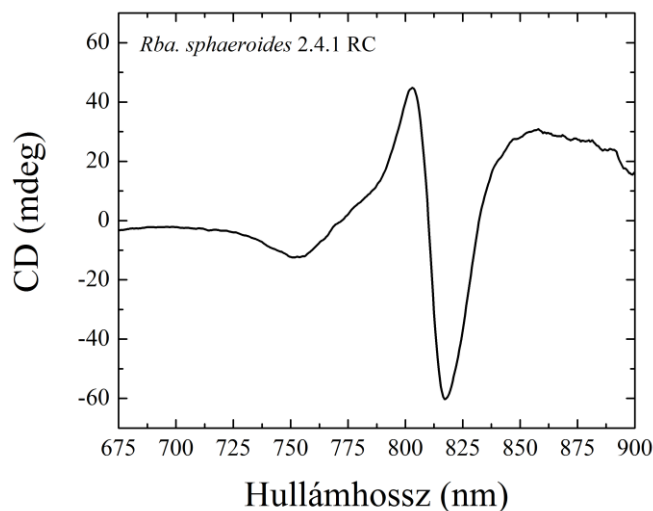
anizotrópiája keveredni fog a dimer direkt és nem direkt gerjesztésével kapottal. A  $^1B^*$ -ről a  $^1P_-$ -re történő gerjesztési energiatranszfer depolarizálja a nem közvetlenül gerjesztett dimer fluoreszcenciát. Az anizotrópia összegződés törvénye szerint a megfigyelt anizotrópia, a komponensek frakcionális fluoreszcencia intenzitásával súlyozott anizotrópiájának összege lesz. A fluoreszcencia anizotrópia számított spektruma mind vad típusú, mind mutáns RC esetén egy simított lépcsős függvényt mutat a hosszabb hullámhosszak felé lejtő véggel (5.12. ábra, A és C panel). A Bkl és a dimer  $Q_y$  átmeneteinek szelektív gerjesztése, 850 nm alatt, magas szinten tartja az anizotrópiát. Más a helyzet amikor más kofaktorok és átmenetek egyidejűleg gerjesztődnek, ahogy azt (Ebrey és Clayton 1969) közölték.



**5.12. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 vad típusú (A és B panel) és mutáns (LH<sup>L131</sup> – LH<sup>M160</sup> – FH<sup>M197</sup>) reakciócentrum (C és D panel) fluoreszcencia anizotrópia spektruma. Gerjesztés hullámhossza: 808 nm-es és 865 nm-es lézerdióddával. A 808 nm-es gerjesztés során a fluoreszcencia  $B^*$  és  $P_-$  eredetű (lásd 2.9. ábra), ezért a megfigyelt anizotrópia az egyes komponensek anizotrópiáinak összege a fluoreszcencia spektrumok Gauss-felbontásából meghatározott fluoreszcencia intenzitással súlyozva (5.11. ábra). A számított anizotrópiák (A és C paneleken lévő szaggatott vonalak) a mért pontok hibahatárán belülre esnek.

A dimer alacsonyabb exciton szintjének ( $P_-$ ) 865 nm-es hullámhosszú fénnel való gerjesztésével a mért fluoreszcencia anizotrópia nagyon közel van az elméleti maximum

(+0,4) értékhez a felvett fluoreszcencia spektrum teljes spektrális tartományában. Ez a megfigyelés egyetlen (vagy kettő eltérő, de párhuzamos) átmenetet jelez és nem egy pár degenerált átmenetét. A 865 nm-es abszorpciós sávval egybevágó egyetlen CD sáv is ezt a következtetést igazolja (**5.13. ábra**).



**5.13. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 sejtéből izolált RC CD spektruma. Kondíciók: 3  $\mu$ M RC TL pufferben: 0,03 % LDAO, 10 mM Tris, pH 8; az optikai fénypút 1 cm; 3 mérés átlaga.

Hasonlóan, a határértékhez közeli fluoreszcencia anizotrópiát figyeltem meg a 808 nm-en történő gerjesztéssel, amikor a dimer oxidálva volt. Következésképpen, a monomerekus bakterioklorofill (B) abszorpciós és emissziós dipólus momentumainak (közel) párhuzamosnak kellene lennie. Ha a dimer nincs oxidálva, a P és a B is emittál fluoreszcenciát és a kapott anizotrópia a komponensek megfelelő fluoreszcencia intenzitásával súlyozott anizotrópiáinak összegével lesz egyenlő. A B fluoreszcenciájának anizotrópiája  $r = r_0 = +0,4$  a direkt gerjesztés miatt. A dimer fluoreszcenciája a  $^1P_-^*$  állapotból származik, amely betölthető a  $^1P_+^*$ -ből (anizotrópia  $r = -0,2$ , mivel a  $^1P_+$  nagy szöget zár be ( $\sim 90^\circ$ ) a  $^1P_-$ -el) vagy a  $^1B_A^*$  és  $^1B_B^*$ -ből energiatranszferrel.

$$r = r_0 \cdot \left\{ \left( \frac{3 \cdot \cos^2 \alpha_{PB_A} - 1}{2} \right) + \left( \frac{3 \cdot \cos^2 \alpha_{PB_B} - 1}{2} \right) \right\}, \quad 5.2.$$

ahol a  $\alpha_{PB_A}$  és  $\alpha_{PB_B}$  megfelel a  $P_-$  és  $B_A$  illetve a  $P_-$  és  $B_B$  átmeneti dipólok közötti szögeknek (lásd **5.9. ábra**). A dimer fluoreszcencia anizotrópiájának igen magas mért értéke akkor magyarázható, ha a  $^1B^*$ -ről egy jelentős mértékű energiatranszfer közvetlenül célozza meg a  $^1P_-^*$  állapotot. Számos állapot között ( $^1B^*$ ,  $^1P_+^*$ ,  $^1P_-^*$  és  $P^+H^-$ ), számos lépésből álló (energiatranszfer és belső konverzió kombinációja), különböző kinetikai modell vehető számításba lehetőségként (Jonas és mtsai. 1996; Arnett és mtsai. 1999). Az

egyres komponensek anizotrópiáinak összege alapján számított fluoreszcencia anizotrópia hullámhosszfüggése elfogadható egyezést mutat a kísérlettel.

A dimerben levő  $P_A$  és  $P_B$  2-acetil és 9-keto csoportjai hidrogén-kötéssel kapcsolódnak a környező fehérjékhez. A  $LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}$  mutáció módosítja a dimer hidrogénkötés mintázatát, ahogy azt az 5.1 fejezetben részletesebben tárgyaltam. A hidrogénkötések számának növekedése a mutánsban kb 200 meV-tal növeli a dimer középponti redoxpotenciálját, a késleltetett fluoreszcencia intenzitását és 200 meV-tal, pH 8-on destabilizálja a  $P^+Q_A^-$  töltéspárt. Mindazonáltal kísérleteink azt mutatták, hogy a dimer prompt fluoreszcencia tulajdonságait (a spektrumot, az átmeneti dipólusok orientációját és erősségét, a Stokes-shift nagyságát) a mutáció nem módosította jelentősen. Másrésről a monomer bakterioklorofill fluoreszcencia hatásfokának jelentős csökkenését tapasztaltam. A fluoreszcencia hatásfok csökkenésének oka lehet a  $^1P$ -re történő elektron gerjesztési energiatranszfer sebességének növekedése vagy a  $^1B^*$  sugárzás belső sebességi állandójának csökkenése a vad típusú RC-hoz képest. A P és B közötti aminosavak mutációja hatással lehet a kromofórok közötti kötésekre, amely a monomer Bkl fluoreszcencia tulajdonságainak és a dimerre történő gerjesztési energiatranszfer változását eredményezi.

### 5.3. $\text{Hg}^{2+}$ ion indukált fotokémiai folyamatok gátlása bakteriális reakciócentrumban

A fehérjékhez kötött fémek számos fontos biológiai reakcióban képesek részt venni, ezért a nehézfém-ionok RC-hoz történő kötődését gyakran alkalmazzák aminosav származékok és különböző mechanizmusok azonosítására (Yruela és mtsai. 1993; Gerencsér és Maróti 2001; Utschig és Thurnauer 2004; Utschig és mtsai. 2005; Kalman és mtsai. 2011).

A higany egy globálisan előforduló szennyező anyag, mely nagyon káros hatásokat fejt ki a fototrófokra (baktériumok és algák) és a növényekre egyaránt, amit számos közelmúltban megjelent tanulmány is hangsúlyoz. A higany(II) ( $\text{Hg}^{2+}$ ) stresszhatását leírták az agro-ökoszisztémára (Zhao és mtsai. 2014) és a fototrófokra (Asztalos és mtsai. 2012; Deng és mtsai. 2013; Kis és mtsai. 2015; Kis és mtsai. 2017), és azt is, miként hatnak a fototrófok a Hg ciklusra (azaz a Hg redox állapotának megváltozására, a Hg felhalmozódására, a lehetséges metilációra) (Gregoire és Poulain 2014). A  $\text{Hg}^{2+}$ , mint a fotoszintetikus baktériumok számára az egyik legmérgezőbb anyag (Giotta és mtsai. 2006), elsősorban a RC fehérjét támadja (Asztalos és mtsai. 2012; Asztalos és mtsai. 2010). Összehasonlítva a  $\text{Hg}^{2+}$  átmeneti fémiont a többi nehézfémrel megállapíthatjuk, hogy sokkal toxikusabb. Ez látszik, ha összevetjük néhány vízdékony só LD50 értékét -  $\text{HgCl}_2$  (orális, patkány): 3,7  $\mu\text{M/kg}$ ;  $\text{CdCl}_2$  (orális, patkány): 473  $\mu\text{M/kg}$ ;  $\text{Pb}(\text{OAc})_2$  (orális, kutya): 914  $\mu\text{M/kg}$ ;  $\text{ZnCl}_2$  (orális, patkány): 2381  $\mu\text{M/kg}$  (Rubino 2015).

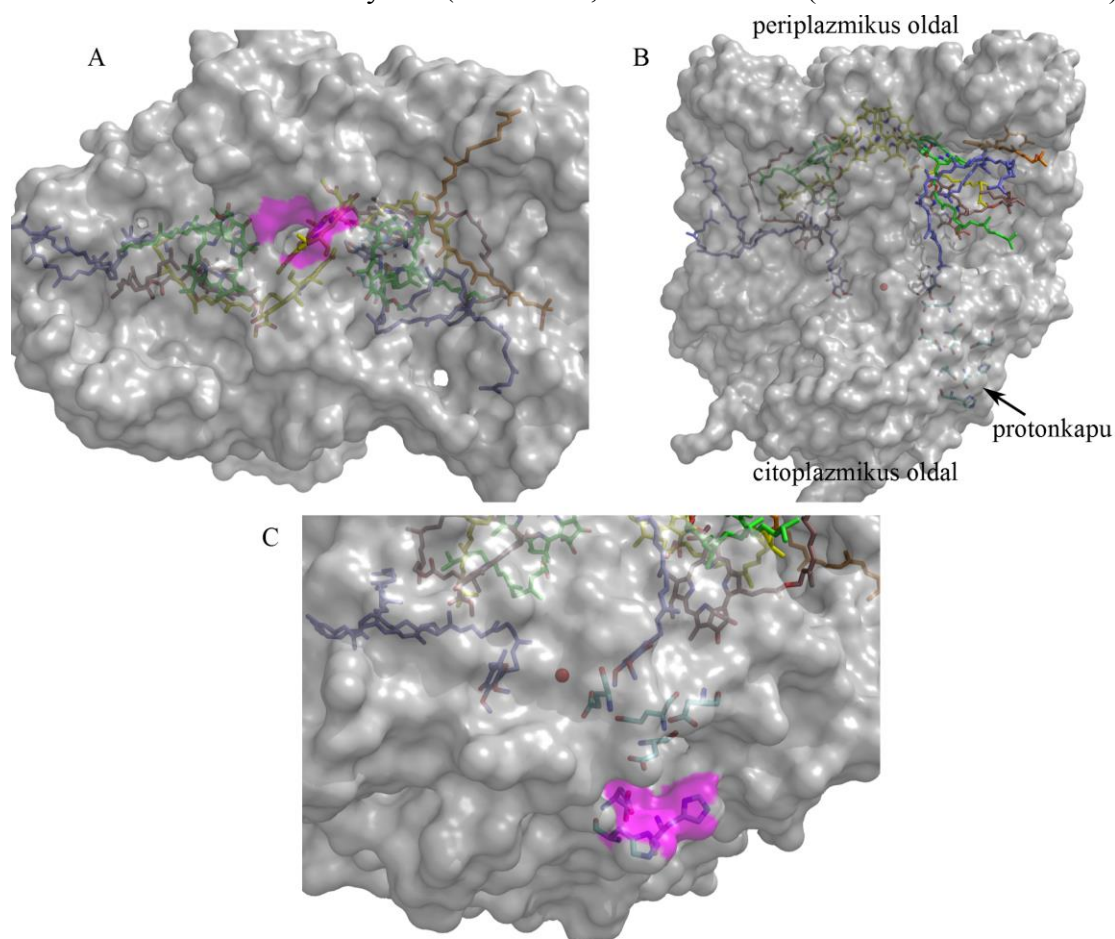
Az átmeneti fémionok ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  stb.) drasztikus hatást gyakorolnak a bakteriális RC redoxfolyamataira. A  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  átmeneti fémionok elektron- és protontranszferre gyakorolt hatását (Utschig és mtsai. 1998; Paddock és mtsai. 1999; Axelrod és mtsai. 2000; Utschig és mtsai. 2001) behatóan tanulmányozták, szemben a  $\text{Hg}^{2+}$  átmeneti fémionnal, melynek hatásmechanizmusáról a bakteriális RC-ban nem készült átfogó tanulmány.

A különböző  $\text{Hg}^{2+}$  ion által indukált hatások feltárása és elkülönítése nagy kihívást jelent. A RC-ban a  $\text{Hg}^{2+}$  ionnak számos nagy affinitású kötőhelye van, melyek az elektrontranszport lánc különböző részeit gátolják mielőtt a RC fotokémiája teljesen le nem áll. A higany(II)-nak a RC-hoz való kötése a fehérje jellegzetes szerkezeti és funkcionális változásait idézi elő, ideértve a RC pigmentjeit (elsősorban a Bkl-dimert) és az elektrontranszportot mind a donor, mind az akceptor oldalon. A  $\text{Hg}^{2+}$  ion támadásának legérzékenyebb célpontja a másodlagos kinon kötőhely és az elsődleges interkinon elektrontranszfer gátlása, amelyek bizonyítottan a legelső jelei a higanyszennyezésnek (Asztalos és mtsai. 2010).

Ezeket a megfigyeléseket felbuzdulva olyan vizsgálatokat végeztem, amelyek a higanykötés lehetséges helyeit és következményeit célozták meg *Rba. sphaeroides* 2.4.1 fotoszintetikus bíorbaktérium RC-ban. Mindemellett remélem, hogy az ebben a fejezetben

bemutatott kutatás új betekintést nyújt a vizes élőhelyek higanyszennyezésének korai kimutatására és molekuláris mechanizmusának kutatására.

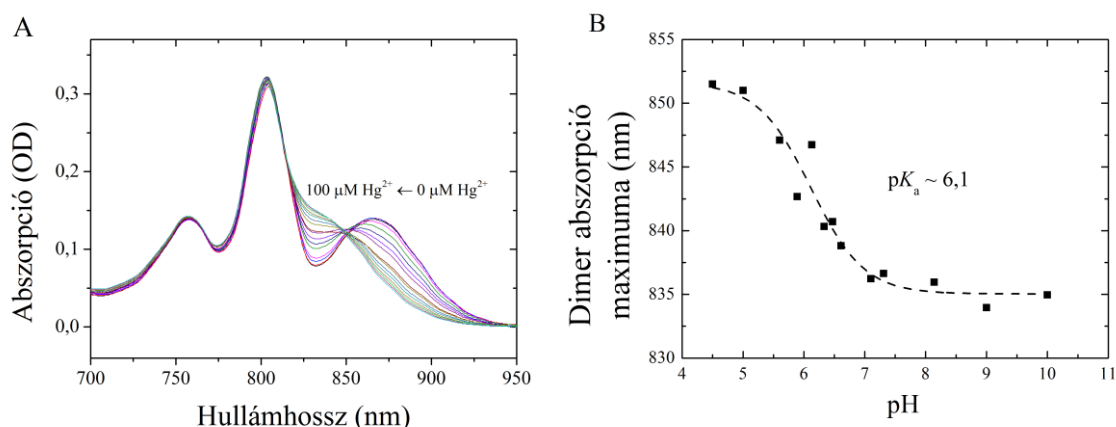
A  $\text{Hg}^{2+}$  ionok (*Rba. sphaeroides* bíorbaktériumból) izolált RC-hoz nagyszámban, főleg nem specifikus helyekre kötődnek. A kötőhelyek számára és azok erősségére vonatkozó kötéstanulmányt Kis Mariann végezte, mely módszerről a doktori dolgozatában részletesen olvashatnak, ill. az ide vonatkozó főbb eredményeket az [3]-ban mutatjuk be. A kötéstanulmányban nagyszámú (több száz) kis affinitású, valamint kisszámú nagy affinitású kötőhelyet azonosítottunk. A  $\text{Hg}^{2+}$  ion 5-50  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ /1  $\mu\text{M}$  RC koncentráció tartományban rendhagyó hatást gyakorol a RC jól meghatározott folyamataira, melyeket alább részletezek. Ezen hatásokat kiváltó specifikus kötőhelyek azonosítása érdekében LIGSITE<sup>csc</sup> webszervert (Huang és Schroeder 2006) használtam figyelembe véve a fehérje elektrosztatikus potenciálfelületét, a cisztein ill. metionin aminosavak helyeit, és a később részletezett mérési eredményeket (**5.14. ábra**, valamint videó (elektronikus verzióban)).



**5.14. ábra.** *Rba. sphaeroides* RC fehérje felszíni reprezentációja a feltételezett specifikus kötőhelyekkel. (A) A citokróm dokkolási helye felüli nézet (periplazmikus oldal), (B) RC oldalnézeti képe és (C) a protonkapu felüli nézet (citoplazmikus oldal). A  $\text{Hg}^{2+}$  lehetséges kötőhelyeit magenta színnel jelöltem. További jelölések: Bkl dimer (sárga); Bkl monomer (zöld); Bfeo (barna); Kar (narancssárga); Fe (piros);  $\text{Q}_\text{A}$  és  $\text{Q}_\text{B}$  (kék); protontranszferben résztvevő aminosavak (cián). Megjelenítéshez PyMol-szoftvert használtam; PDB: 3I4D.

## 5.3.1. Donor oldali hatások

A RC közeli infravörös tartományban lévő 865 nm-nél lévő abszorpció csúcs (az elsődleges elektrondonor) a Bkl dimer P Q<sub>y</sub> kis energiájú átmenetének felel meg (lásd 2.5.1 fejezet). Ez az abszorpció sáv rendkívül érzékeny a P környezetében lévő különböző perturbációkra, amelyek befolyásolják a dimer elektronikus szerkezetét és a speciális dimert alkotó P<sub>A</sub> és P<sub>B</sub> összekapcsolódását. Megfigyeltem, hogy a RC abszorpció spektrumának dimer sávja (865 nm) a higany(II) kezelés hatására (~100 [Hg<sup>2+</sup>]/[RC]) 30 nm-rel eltolódik a kék tartomány felé (835 nm-re), az abszorpció maximumának csökkenése nélkül (5.15. ábra).



**5.15. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC dimer steady-state abszorpció sávjának kékeltolódása a Hg<sup>2+</sup> koncentráció növelésének hatására (A); 100 [Hg<sup>2+</sup>]/[RC] hozzáadása után megfigyelt kékeltolódás mértéke különböző pH-n (dimer abszorpció sávjának csúcs helyét Gauss-görbékkel való illesztéssel határoztam meg) (B). Feltételek: 1 μM RC TL-pufferben, HgCl<sub>2</sub> 0-100 μM-ig titrálva (A); 1 μM RC hozzáadott 100 μM Hg<sup>2+</sup>-al, a RC 1-1 mM (Mes, Mops, Tris, Caps) puffert és 0,03 % LDAO-t tartalmazó oldatban.

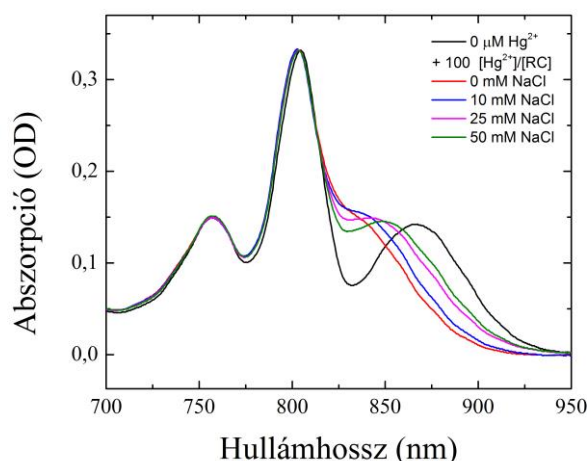
Míg a monomer Bkl (802 nm) és a Bfeo (760 nm-en) abszorpció sávjainak pozíciói és amplitúdói változatlanok maradnak, a dimer sáv eltolódása jól felismerhető izoszbesztikus pontot mutat. Ez a 865 nm és 835 nm hullámhosszon elnyelő két komponens egymásba alakulásával kialakított egyensúlyt jelzi. Ugyanakkor a dimer abszorpció sávjának higany(II) által indukált eltolódása visszafordítható, ill. gátolható a pH csökkentésével, amelyet pK<sub>a</sub> 6,1 érték jellemez. Ez a megfigyelés egy olyan savas protonálható csoport protonálódását/deprotonálódását jelzi, amely a dimer környezetében van, és ott elektrosztatikus hatásokat fejtve ki védi a higany(II) kötődéstől.

Hasonló, 865 nm-ről 845-850 nm-ig terjedő kékeltolódásokat figyeltek meg a RC dehidratációjakor polivinil-alkohol (PVA) fóliában vagy üveges trehalóz-mátrixokban, mely a dimer szerkezetében történő dehidratáció által indukált reorganizációkkal magyarázhatók (Malferrari és mtsai. 2015). Ilyen hatásokat figyeltek meg a detergens típusának és koncentrációjának változtatása következtében is. A pozitív töltésű detergens (cetil-trimetil-ammónium-bromid, CTAB) a Q<sub>y</sub> sáv kékeltolódását indukálja az LDAO

oldott *Rba. sphaeroides* RC-ban, amely eltolódás anionos felületaktív dezoxikolát adagolásával visszafordítható (Müh és mtsai. 1997). Ezenkívül a dimer  $Q_y$  sávjának helyzetét a P közelében kialakított pontmutációk is befolyásolják. A *Rba. sphaeroides* RC-ban kialakított két mutációval, a  $\text{His}^{\text{L173}}$  és  $\text{His}^{\text{M202}}$  - a két Bkl P központi  $\text{Mg}^{2+}$  ionjával koordináló - hisztidin aminosavak leucinra történő változtatásával Bkl/Bfeo heterodimereket kaptak, és a  $Q_y$  sáv 850 nm-re tolódását figyelték meg (Müh és mtsai. 1998). A várakozásokkal ellentétben az  $\text{Ile} \rightarrow \text{His}^{\text{L177}}$  -  $\text{His} \rightarrow \text{Leu}^{\text{L173}}$  dupla mutációval nem alakult ki Bkl/Bfeo heterodimer RC, de a dimer 865 nm-es abszorpció sávjának 46 nm-es kékeltolódását okozta (Vasilieva és mtsai. 2012). A megfigyelt kékeltolódások a mutációt követően bizonyos fokú korrelációt mutatnak a hidrogénkötések növekedésével (Allen és Williams 1995; Deshmukh és mtsai. 2011). Általánosságban a  $P_B$ -hez történő hidrogénkötés(ek) kialakítása kékeltolódást, míg ugyanez a  $P_A$ -hoz vöröseltolódást eredményez a dimer 865 nm-es sávjában. Ugyanakkor a hidrogénkötések számának mutációval 2-ről 3-ra vagy 3-ról 4-re történő növelése során a megfigyelt 865 nm-es dimer sáv eltolódása elhanyagolhatóvá válik (Deshmukh 2013).

Hasonló mértékű kékeltolódást figyeltem meg a kezeletlen RC monomer és dimer Bkl-ok egyensúlyi abszorpció sávjai között a RC-hoz 100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  hozzáadását követően egy jól definiált izoszbesztikus ponttal jellemezve (**5.15. ábra**). A fentiekben felsorolt különböző körülmények között előforduló kékeltolódások közös eredetre vezethetők vissza, azaz a  $\text{Hg}^{2+}$  ion által indukált kékeltolódás a  $\text{Hg}^{2+}$  specifikus kötődését jelzi a donor oldalon. A  $\text{Hg}^{2+}$  ion, hasonlóan, mint a fentiekben bemutatott dimer környezetében kialakított mutációk is, megváltoztathatja a dimernek a fehérje környezettel való kapcsolatát, melynek következtében a dimer makroszerkezete is megváltozhat. A  $\text{Hg}^{2+}$  ion hozzáadását követően megfigyelt izoszbesztikus pont bizonyítja a spektrális régióban abszorbeáló két (és csak kettő) komponens jelenlétét és egyensúlyát, valamint a megfigyelhető mennyiségű köztes állapotok hiányát a kezeletlen és a  $\text{Hg}^{2+}$  ionnal telített RC-ok között. Ez az izoszbesztikus pont a dimer abszorpció sávjának kék spektrális eltolódásából származik, melynek nagysága 30 nm, és  $\sim 50 [\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  érték jellemez.

Megfigyeltem, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  által indukált kékeltolódás fokozatosan csökkenthető (és akár meg is szüntethető) az oldat ionerősségének növelésével (**5.16. ábra**). Ez az árnyékoló hatás erős bizonyítéka a  $\text{Hg}^{2+}$  ionok pozitív töltése és a dimer konjugált  $\pi$  elektron rendszere közötti kölcsönhatás elektrosztatikus természetére.



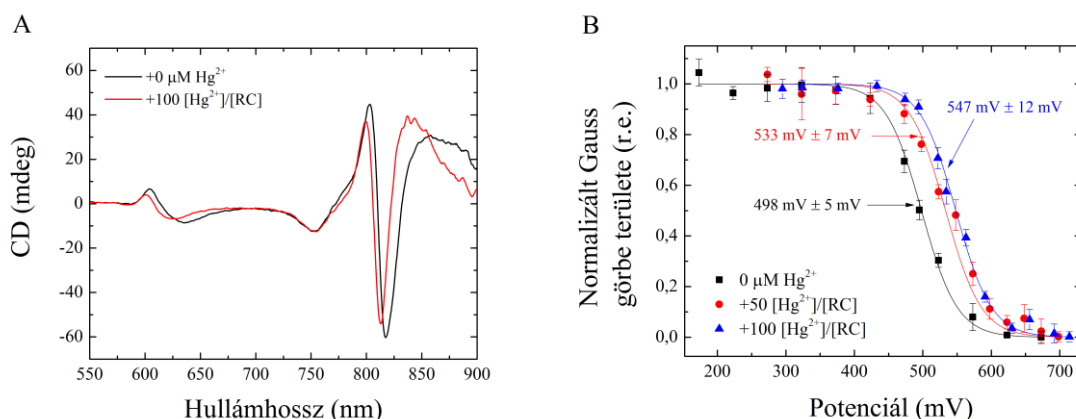
**5.16. ábra.** *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC dimer steady-state abszorpció sávjának különböző ionerősség mellett megfigyelt kéeltolódása 100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  hozzáadása után. Feltételek: 1,1  $\mu\text{M}$  RC TL-pufferben hozzáadott 110  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ -al valamint 0 mM, 10 mM, 25 mM és 50 mM NaCl.

Összehasonlítva a dimer abszorpció sávját a Bkl monomer abszorpció sávjával, nem tapasztaltam eltolódást a  $\text{Hg}^{2+}$  kezelés hatására, ami egyértelmű jele annak, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  kötésének helye közelebb helyezkedik el a P-hez, mint a monomer Bkl-hoz (vagy azokhoz az atomokhoz, amelyek meghatározzák a  $\pi$  elektronok eloszlását).

A higany(II) kezelés hatására a dimer sáv kéeltolódása a RC CD spektrumában is megfigyelhető (**5.17. ábra**, A panel), amely a Bkl energetikai változásait jelzi. Ezt a megfigyelést tovább erősíti a spektroelektrokémiai mérésekből kapott  $\text{Hg}^{2+}$  ion által kiváltott középponti redoxpotenciál emelkedése (**5.17. ábra**, B panel). A CD spektrum változása a  $\text{Hg}^{2+}$  kötésének következtében összhangban van a dimer energetikai perturbációjával, ahol a karakterisztikus CD sávok – keskeny, negatív sáv 810 nm-nél és egy széles pozitív sáv 860 nm-nél (Zabelin és mtsai. 2009) – nyilvánvalóan módosulnak, ugyanakkor az látszik, hogy a P megőrzi dimer jellegét.

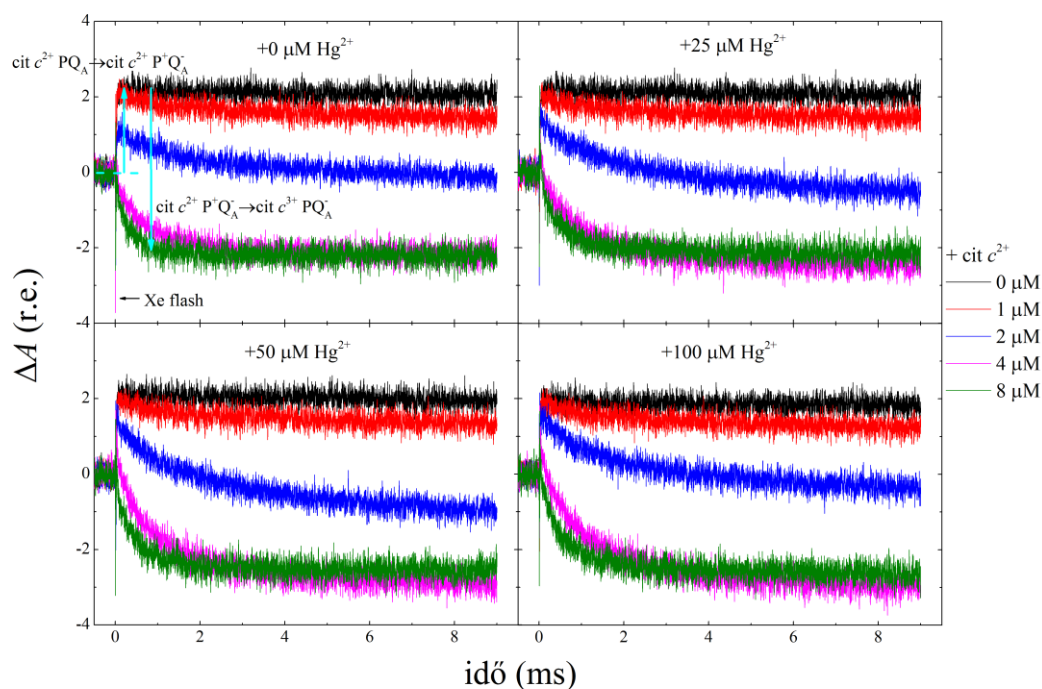
Az elektrokémiai redox titrálás után a kezeletlen RC-ra  $E_m \sim 500$  mV adódott. A RC 50  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$ -mal való kezelése után a RC P/P<sup>+</sup> középponti redoxpotenciálja  $E_m \sim 535$  mV, valamint 100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$ -mal való kezelés után  $E_m \sim 545$  mV adódott. A dimerhez közel kötött  $\text{Hg}^{2+}$  ion elektrosztatikus hatása következtében  $E_m$   $47 \pm 12$  mV-tal emelkedett.





**5.17. ábra.** Különböző spektroszkópai módszerekkel vizsgált *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC dimer energetikájának  $\text{Hg}^{2+}$  ion által indukált megváltozása. (A) A kezeletlen RC (fekete) és 100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  hozzáadása után (piros) mért steady state CD-spektrum. Feltételek: 3  $\mu\text{M}$  RC TL-pufferben  $\pm 100$   $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$ . (B) Kezeletlen RC (fekete), valamint 50  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  (piros) és 100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  (kék) hozzáadását követő elektrokémiai redox-titrálás. A redoxitrálás során meghatározott pontokat – a RC dimer ( $\text{P} \leftrightarrow \text{P}^+$  átmenet során megváltozó) abszorpció sávjának Gauss-görbével való illesztéséből származtattam és – egykomponensű Nernst-egyenlettel illesztettem (a kapott középponti redoxpotenciálok:  $\sim 500$  mV (kezeletlen),  $\sim 535$  mV (+50  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$ ) és  $\sim 545$  mV (+100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$ ). Feltételek: 75  $\mu\text{M}$  RC TL-pufferben, 1 mM bipiridil, 150  $\mu\text{M}$  ferricianid.

A RC alapvető feladata a negatív és pozitív töltések szétválasztása és a fehérjén kívülre juttatása. Ennek egyik formája a periplazmikus oldalon kötődő citokróm oxidálása, amelynek során a dimeren keletkező pozitív töltés ( $\text{P}^+$ ) távozik a RC-ból. Ahogy azt fentebb bemutattam, a  $\text{Hg}^{2+}$  ion kötődése a donor oldalon a dimer szerkezeti és energetikai változásait okozza. Mivel az elsődleges fotokémiai folyamat rendkívül ellenállóan mutatkozik a  $\text{Hg}^{2+}$  ion károsító hatásaival szemben (a töltésszétválasztás még telítési  $\text{Hg}^{2+}$  koncentrációnál is megfigyelhető), a fényindukált optikai mérések alkalmazhatók a  $\text{Hg}^{2+}$  által kiváltott hatások (károsodások) követésére. Ezért annak eldöntésére, hogy a szerkezeti és energetikai változás kiterjed-e a citokróm kötőhelyére is, fényindukált abszorpcióváltozás méréseket végeztem *Rba. sphaeroides* RC-on. A  $\text{P}^+$ -nak cit  $c^{2+}$  általi redukálódását 865 nm-es hullámhossznál, a cit  $c^{2+}$ -nak  $\text{P}^+$  általi oxidációját pedig 550 nm-es hullámhosszaknál követtem nyomon. A méréseim alapján a  $\text{P}/\text{P}^+$  és cit  $c^{2+}/\text{cit } c^{3+}$  kinetikája nagyon hasonlít a kezeletlen és a higannyal kezelt RC-okban (5.18. ábra).



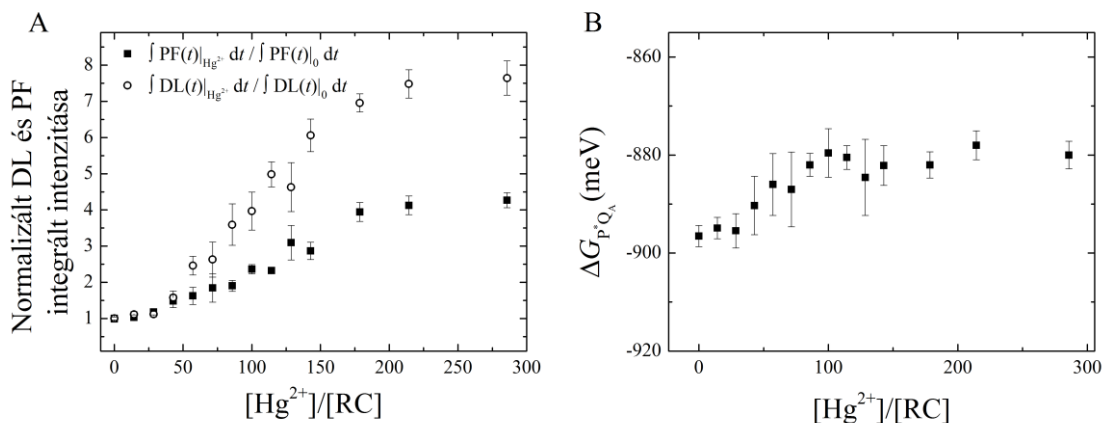
**5.18. ábra.** Citokróm fotooxidációja különböző  $\text{Hg}^{2+}$  ion koncentráció mellett *Rba. sphaeroides* baktériumban. Feltételek: 1  $\mu\text{M}$  RC TL pufferben, 0, 25, 50 és 100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$ , valamint 0-8  $\mu\text{M}$  cit  $c^{2+}$ .

A flash pillanatában a RC-hoz kötött cit  $c^{2+}$  az oxidált dimert gyorsan ( $<10 \mu\text{s}$ -os időállandóval) visszaredukálja. Ha azonban a cit  $c^{2+}$  nem kötődik a RC-hoz a flash pillanatában, akkor egy lassabb fázist (néhány ms-os időállandóval) figyelhetünk meg, amely megfelel a diffúzió-vezérelt  $\text{P}^+$  redukciójának. Mivel a különböző  $\text{Hg}^{2+}$  és cit  $c^{2+}/\text{RC}$  koncentrációk mellett megfigyelt kinetikák nagyon hasonló viselkedést mutattak a  $\text{Hg}^{2+}$  ion jelenlétében és hiányában, megállapítható, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  nem módosítja a redukált cit  $c^{2+}$  kötési tulajdonságait.

### 5.3.2. Akceptor oldali hatások

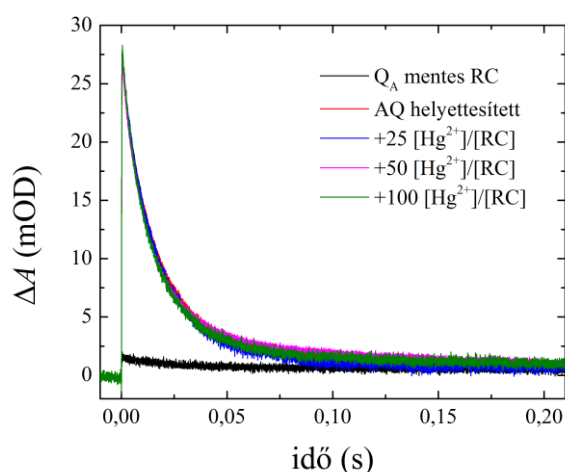
A  $\text{Hg}^{2+}$  ion által okozott, a primer akceptor kinon energetikájában bekövetkező változásokat a dimer által emittált késleltetett fluoreszcencia mérésekkel közvetlenül nyomon lehet követni, hiszen a fényindukált késleltetett fluoreszcencia  $\text{P}^*$ -nak a  $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^-$  töltésszétválasztott állapotából származó termikus repopulációjából származik. Azaz a donor ( $\text{P}^*/\text{P}^+$ ) és/vagy akceptor oldal ( $\text{Q}_\text{A}/\text{Q}_\text{A}^-$ ) bármely, a  $\text{Hg}^{2+}$  ion hatására bekövetkező energetikai változása befolyásolja a DL intenzitását (Onidas és mtsai. 2013). A  $\text{Hg}^{2+}$  ion RC-hoz való titrálása során megfigyeltem a késleltetett fluoreszcencia és vele egyidejűleg a prompt fluoreszcencia szignifikáns emelkedését (5.19. ábra, A panel). Ezekből a  $\text{P}^*$  és a  $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^-$  között lévő szabadenergia-különbség ( $\Delta G_{\text{P}^*\text{Q}_\text{A}^-}$ , 4.3.1 fejezet) kis változására lehet

következtetni (5.19. ábra, B panel), mely gyenge akceptor oldali energetikai változásokra utal.



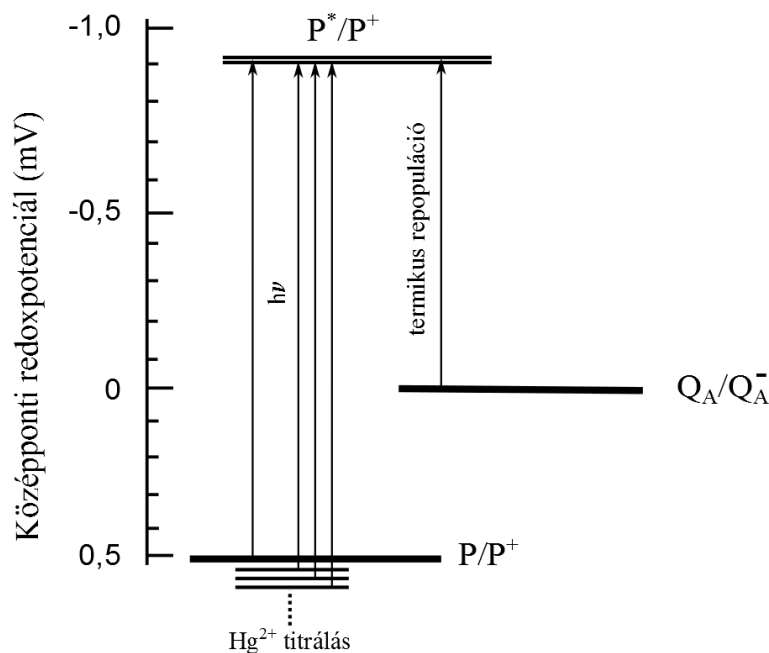
**5.19. ábra.** Normalizált késleltetett- és prompt fluoreszcencia integrált intenzitása (A) és a  $\text{P}^*$  és  $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^-$  állapotok közötti szabadenergia-különbség változása a  $\text{Hg}^{2+}$  ion koncentráció növekedésével (B) *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC-ban. Feltételek: 1  $\mu\text{M}$  RC TL pufferben, 60  $\mu\text{M}$  terbutrin.

Hasonlóan a  $\text{P}^*/\text{P}^+$  szabadenergia szintjéhez, a  $\text{Q}_\text{A}/\text{Q}_\text{A}^-$  energiaszintje sem érzékeny a  $\text{Hg}^{2+}$ -ra. Ezt fényindukált töltésrekombinációval ellenőriztem, ahol a natív ubikinont (UQ) antrakinonnal (AQ) helyettesítettem. Az alacsony középponti redoxpotenciálú antrakinonnal betöltött  $\text{Q}_\text{A}$  kötőhely esetében a  $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^- \rightarrow \text{PQ}_\text{A}$  töltésrekombináció közvetett (indirekt) úton – a bakteriofeofitin redukálásán ( $\text{P}^+\text{Bfeo}^-$ -on) keresztül – megy végbe, mely ezáltal egy nagyon érzékeny eszköz a kinon szabadenergia szintjében bekövetkező változások követésére. Ugyanakkor a  $\text{Hg}^{2+}$  nem (vagy csak alig) befolyásolja a töltésrekombináció kinetikáját, azaz a  $\text{Q}_\text{A}$  energetikáját (5.20. ábra).



**5.20. ábra.**  $\text{Hg}^{2+}$  titrálása során megfigyelt fényindukált abszorpcióváltozás antrakinonnal helyettesített *Rba. sphaeroides* RC-ban egyszeri telítési fényimpulzussal való gerjesztés után 430 nm-nél. Feltételek: 1  $\mu\text{M}$  RC TL-puffer-ben, 20  $\mu\text{M}$  AQ.

Mivel a késleltetett fluoreszcencia mérésekkel kapott szabadenergia-változás, azaz a  $P^*/P^+$  és a  $Q_A/Q_A^-$  állapotok közti energiakülönbség változása kicsi és a  $P/P^+$  redox titrálással kapott középponti redoxpotenciál növekedése  $\sim 47$  meV – mely a várakozásoknak megfelel, hiszen a  $P/P^+$  és a  $P^*/P^+$  energiaszintje közötti különbségnek körülbelül 49 meV-tal kell nőnie a megfigyelt 30 nm-es kékeltolódás miatt –, megállapítható, hogy a  $Hg^{2+}$  ion a donor oldalra sokkal erőteljesebb energetikai módosító hatással van, mint az akceptor oldalra (5.21. ábra).

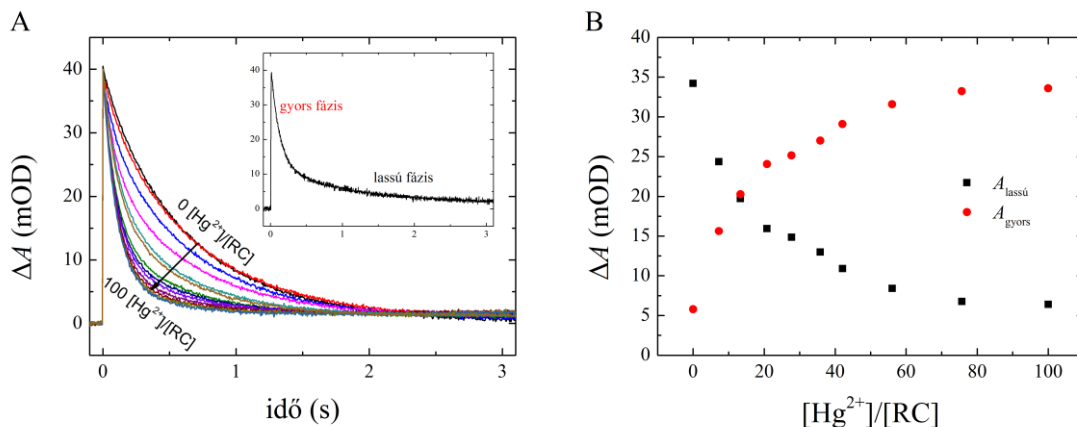


**5.21. ábra.** A kofaktorok középponti redoxpotenciálja higany(II) kezelés hatására. Míg a késleltetett fluoreszcencia vizsgálatok alapján a  $P^*$  és a  $P^+Q_A^-$  állapotok közti energiakülönbség változása kicsi, addig a spektroelektrokémiai mérések alapján a  $P/P^+$  középponti redoxpotenciálja szignifikánsan növekszik a higany(II) titrálás során. Mindemellett a  $Q_A/Q_A^-$  középponti redoxpotenciál változása elhanyagolható a higany(II) titrálás során, mely megállapítást antrakinonnal helyettesített RC-on végzett fényindukált abszorpcióváltozás mérések igazolnak.

*A  $Hg^{2+}$  ionnak a töltésrekombinációra és a kinonok közötti elektrontranszferre gyakorolt hatása*

A  $Hg^{2+}$  ion felgyorsítja a megfigyelt fényindukált  $P^+(Q_AQ_B)^- \rightarrow PQ_AQ_B$  töltésrekombinációt, amelyet 430 nm-es hullámhosszon fényindukált abszorpcióváltozással követtem nyomon. A pillanatszerű (flash) és telítési megvilágítás után megfigyelt kinetika felbontható egy lassú és egy gyors fázisra (5.22. ábra, A panel belső ábra), ahol a gyors komponens időállandója  $\sim 120$  ms és  $\sim 15\%$  relatív amplitúdójú, amely megfelel azoknak a RC-oknak, melyekben nincs  $Q_B$  aktivitás. Azaz míg a gyors komponens a  $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$  primer akceptorhoz tartozó töltésrekombinációból, addig a lassú

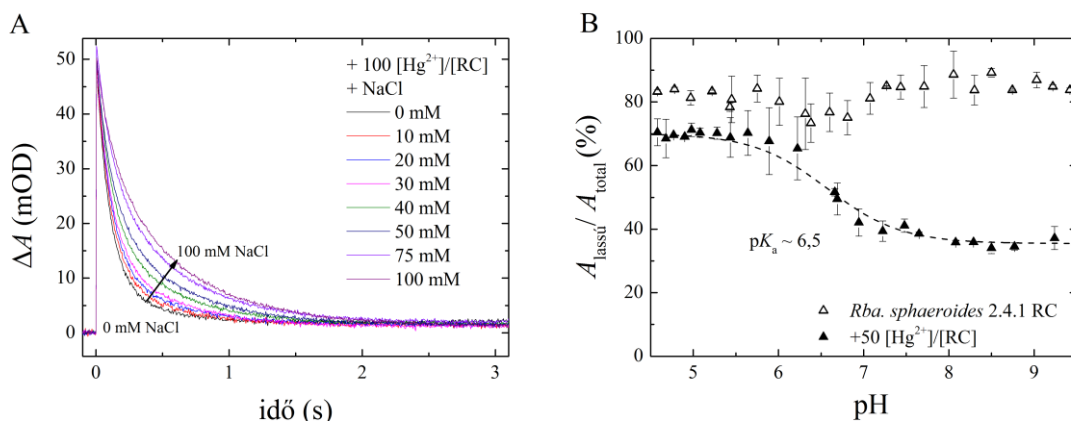
komponens a kinon komplexben lévő  $\text{Q}_\text{A}$  és  $\text{Q}_\text{B}$  közötti elektron megoszlásából ered ( $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}^- \rightarrow \text{PQ}_\text{A}\text{Q}_\text{B}$ ) (lásd 2.5.2 fejezet). A  $\text{Hg}^{2+}$  ion koncentráció növelése során a RC töltésrekombinációjának gyors fázisához tartozó amplitúdója fokozatosan nő, míg a lassú fázishoz tartozó amplitúdó fokozatosan csökken, mindez anélkül, hogy a kinetika teljes amplitúdója csökkenne (5.22. ábra, B panel).



**5.22. ábra.**  $\text{P}^+(\text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B})^- \rightarrow \text{PQ}_\text{B}$  töltésrekombináció kinetikájának változása (A) és a kinetika gyors és lassú amplitúdójának változása (B)  $\text{Hg}^{2+}$  kezelés hatására *Rba. sphaeroides* RC-ban. Feltételek: fényindukált abszorpcióváltozást 430 nm-en követtem, 1,5  $\mu\text{M}$  RC TL-pufferben; 0-100  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  (A) és 1,5  $\mu\text{M}$  RC-ben 1-1 mM MES, MOPS, Tris, CHES és CAPS puffer; 50  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  (B).

Mivel a  $\text{Q}_\text{B}$ -től származó töltésrekombináció közvetett útvonalon –  $\text{Q}_\text{A}$ -n keresztül – történik, és a kinetikák sebességi állandói közel állandóak a kezelés alatt, a megfigyelt  $\text{Hg}^{2+}$  hatás annak következménye, hogy az elektronnak  $\text{Q}_\text{A}$ -ról  $\text{Q}_\text{B}$ -re jutása az akceptor-kinon komplexben fokozatosan gátlódik. Ha a higany(II) koncentrációja nem elég nagy ahhoz, hogy az összes reakciócentrumot telítse, akkor kétfázisú kinetikát kapunk. A kevert kinetika különböző fázisai a  $\text{Hg}^{2+}$  iont kötött, ill. nem kötött RC-oknak feleltethetőek meg. Telítési koncentrációt (pH 8-nál)  $\sim 100 [\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  sztöchiometria esetén értem el. Ebben az esetben a töltésrekombináció gyors komponense dominál ( $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^- \rightarrow \text{PQ}_\text{A}$  primer akceptorhoz tartozó töltésrekombináció az uralkodó), mely a  $\text{Q}_\text{B}$  aktivitás gátlását jelzi.

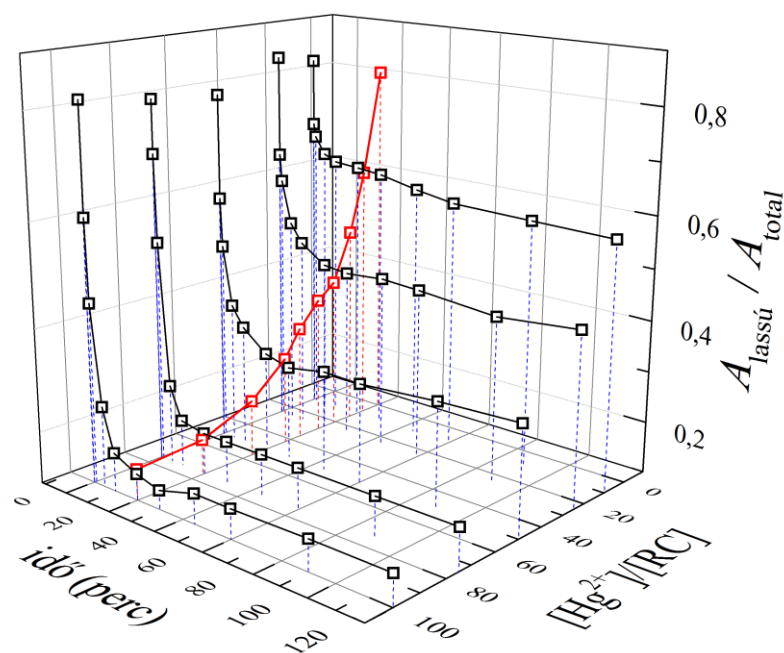
A higany(II)-nak a  $\text{Q}_\text{B}$ -ről irányuló töltésrekombinációra gyakorolt hatása reverzibilis, magas ionerősség mellett az effektus visszafordítható, ill. gátlható (5.23. ábra, A panel). Ezek az eredmények egyértelműen jelzik, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  ion gátolja a  $\text{Q}_\text{B}$  aktivitást. Megfigyeltem továbbá, hogy az inhibíció pH függő (5.23. ábra, B panel):  $\text{pK}_\text{a} \sim 6,5$  értékkel a  $\text{Q}_\text{B}$  környékén lévő protonálható csoportok befolyásolják a  $\text{Hg}^{2+}$  hatását, protonált formájuk megvédi a  $\text{Q}_\text{B}$  aktivitását a  $\text{Hg}^{2+}$  káros hatásától.



**5.23. ábra.** (A)  $P^+(Q_A Q_B)^- \rightarrow PQ_B$  töltésrekombináció kinetikájának változása különböző ionerősség mellett és (B) a fényindukált-töltésrekombináció kinetikájának lassú és gyors komponensre bontását ( $A_{\text{total}} = A_{\text{lassú}} + A_{\text{gyors}}$ ) követően a  $Q_B$  funkciójával összefüggő lassú összetevő pH függése  $Hg^{2+}$ -kezelés hatására *Rba. sphaeroides* RC-ban. Feltételek: (A) fényindukált abszorpcióváltozást 430 nm-en követtem, 2  $\mu M$  RC TL-pufferben; 0-100  $[Hg^{2+}]/[RC]$  és (B) 1,5  $\mu M$  RC-ben 1-1 mM MES, MOPS, Tris, CHES és CAPS puffer; 50  $[Hg^{2+}]/[RC]$ .

#### *A $Hg^{2+}$ ionnak a töltésrekombinációra gyakorolt időfüggő hatása*

A  $Hg^{2+}$  ion nem azonnal fejti ki hatását, hanem egy kis időre van szüksége ahhoz, hogy elfoglalja a  $Q_B$  közelében lévő kötőhelyet, és gátló szerepe érvényesülhessen (5.24. ábra). Így a töltésrekombinációra gyakorolt higanyhatás nem csak a koncentrációtól, hanem a kezelés idejétől is függ. A komplex függést a visszreakció lassú komponense amplitúdójának csökkenésével érzékeltetem (kvázi)háromdimenziós ábrázolásban. Szobahőmérsékleten 10-20 perccel a higany(II) kezelés után beáll az egyensúlyi állapot. A megfigyelt időfüggő hatás a  $Hg^{2+}$  ionnal kezelt RC-okban hasonló, mint a korábban megfigyelt tripszinnel kezelt RC-ok esetében (Brzezinski és Andreasson 1995). A tripszin elsősorban az arginin és lizin aminosavaknál hasítja a fehérjét, és módosítja funkcióját időfüggő módon. A tripszin által kiváltott időfüggő folyamatban a töltésrekombináció sebességének változása figyelhető meg, ahol a  $Q_A^- \rightarrow Q_B$  elektrontranszfer gátlódik, majd végül a töltésszétválasztás is megszűnik. Az általam vizsgált  $Hg^{2+}$  koncentráció tartományban a  $Hg^{2+}$  a töltésszétválasztás folyamatát nem gátolja, szemben az interkinon elektrontranszferrel, melyet körülbelül 20  $[Hg^{2+}]/[RC]$  koncentráció jellemez.



**5.24. ábra.** A  $\text{Hg}^{2+}$  hatásának koncentráció és időbeli függésének 3D demonstrálása a töltésrekombináció lassú komponensének változása kapcsán. A fényindukált-töltésrekombináció kinetikáját lassú és gyors komponensre bontottam ( $A_{\text{total}} = A_{\text{lassú}} + A_{\text{gyors}}$ ), amelyben a  $Q_B$  funkciójával összefüggő lassú összetevő különös érzékenységet mutatott a  $\text{Hg}^{2+}$ -kezelésre. A lassú komponens amplitúdójának frakciói a  $\text{Hg}^{2+}$  koncentrációnak (rögzített időben, piros vonal) és az idő függvényében (rögzített  $\text{Hg}^{2+}$  koncentráció, fekete vonal).

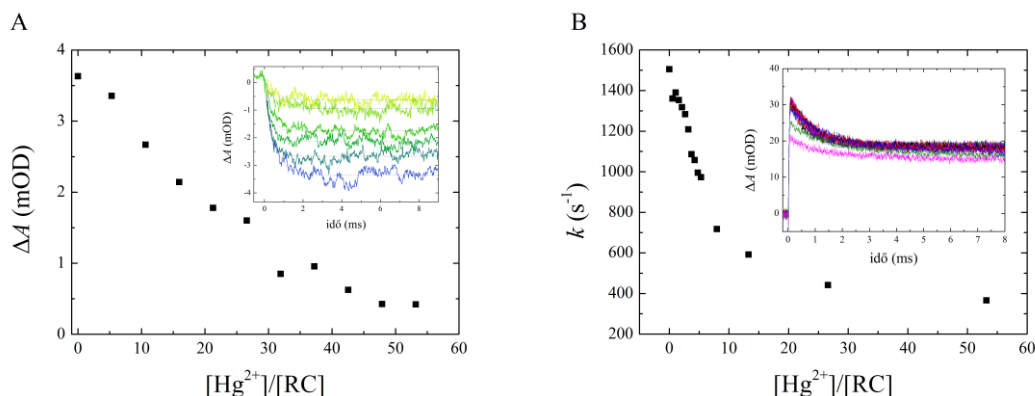
#### *A $\text{Hg}^{2+}$ ionnak az elektrontranszferre gyakorolt hatása*

A nehézfémek RC fehérjéhez való kötésének hatása az elektron/protontranszfer kinetikájának új szerkezeti és funkcionális részleteire világíthat rá (Utschig és Thurnauer 2004). Utschig és munkatársai kimutatták, hogy a  $\text{Zn}^{2+}$  nagy affinitással kötődött a RC-hoz, és befolyásolta az első interkinon elektrontranszfer ( $Q_A^- \rightarrow Q_B$ ) sebességét, amelyet a fehérje megváltozott dinamikájával magyaráztak (Utschig és mtsai. 1998; Utschig és mtsai. 2005). A  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Ni}^{2+}$  nehézfémek nagy affinitással kötődnek a H-alegységben található protonkapuba ( $\text{His}^{\text{H126}}$ ,  $\text{His}^{\text{H128}}$  és  $\text{Asp}^{\text{H124}}$ , lásd **2.5.2** fejezet), ezzel gátolják a proton felvételét, ami a protontranszfer sebességének drámai ( $> 10^2$ -szeres) csökkenéséhez vezet (Paddock és mtsai. 1999; Axelrod és mtsai. 2000; Gerencsér és Maróti 2001). Hasonló megfigyelést tettem a második elektrontranszfer kinetikájának megfigyelésekor a higany(II) kezelés során, ahol a sebességi állandó drámai csökkenését tapasztaltam, mely az 5  $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  koncentráció körüli tartományban következik be (**5.25. ábra**). A protonkapuhoz kötődő  $\text{Hg}^{2+}$  ion nem befolyásolja az interkinon elektrontranszfert. Ezért



egy további erős  $\text{Hg}^{2+}$  kötőhelynek kell lennie, amely drasztikusan befolyásolja a  $\text{Q}_\text{A}$ -tól  $\text{Q}_\text{B}$ -ig történő elektrontranszfer.

A  $\text{Cu}^{2+}$  ion két különböző helyen kötődik a bakteriális RC-hoz, az ebből következő gátló hatásokat azonosították (Utschig és mtsai. 1998; Yruela és mtsai. 1993). Yruela és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a  $\text{Cu}^{2+}$  a fotoszintetikus RC-ban káros hatással volt a Bfeo és a  $\text{Q}_\text{A}$  közötti fotoszintetikus elektrontranszportra. Véleményük szerint a fémion a Bfeo és a  $\text{Q}_\text{A}$  között elhelyezkedő  $\text{His}^{\text{M217}}$ ,  $\text{Thr}^{\text{M220}}$ ,  $\text{Trp}^{\text{M250}}$  és  $\text{Glu}^{\text{L104}}$  aminosavakhoz kötődhet oly módon, hogy megzavarja a domén helyi konformációját. Utschig és munkatársai azonban megfigyelték, hogy a  $\text{Q}_\text{A}^- \rightarrow \text{Q}_\text{B}$  elektrontranszfer lelassult  $\text{Cu}^{2+}$  jelenlétében. Értelmezésük szerint a réz négy hisztidin-csoporthoz ( $\text{His}^{\text{H68}}$ ,  $\text{His}^{\text{H126}}$ ,  $\text{His}^{\text{H128}}$  és  $\text{His}^{\text{L211}}$ ) kötődhet, amely a  $\text{Q}_\text{B}$ -kötő zseb alatt helyezkedik el, és mind a RC protonkapuja, mind az elektrontranszferhez kapcsolt fehérje mozgások helyszíne. Más fémionok, mint például a Mn, bár alacsony affinitással kötődik az RC-hoz (a disszociációs állandó nagyobb, mint  $100 \mu\text{M}$ ), mégis képes arra a bakteriális RC-ban, hogy a PSII mangánkomplexeire emlékeztető hatást fejtsen ki (Thielges és mtsai. 2005; Kalman és mtsai. 2011).



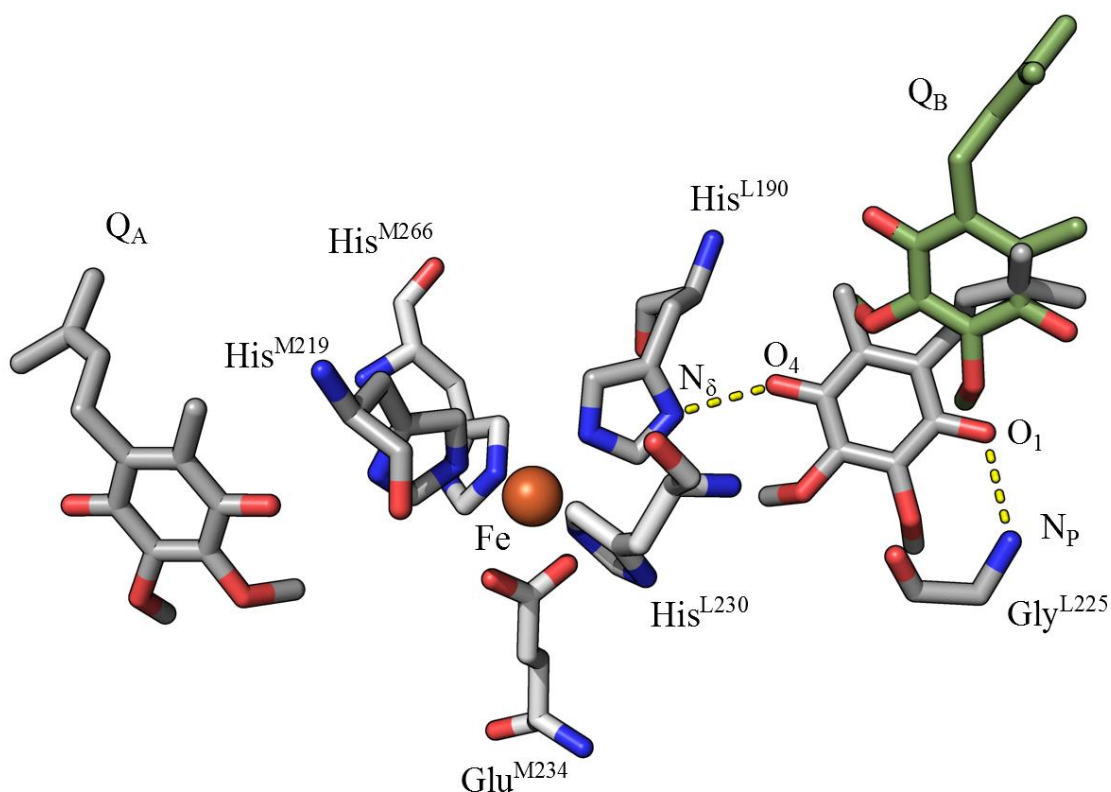
**5.25. ábra.** (A) A  $\text{Q}_\text{A}^-\text{Q}_\text{B} \rightarrow \text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}^-$  interkinon elektrontranszfer amplitúdójának higany által kiváltott csökkenése és (B) a  $\text{Q}_\text{A}^-\text{Q}_\text{B}^- \rightarrow \text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}\text{H}_2$  második interkinon elektrontranszfer sebességi állandójának csökkenése. Ábrákon belül: (A) fényindukált abszorpcióváltozás kinetikája 398 nm-en és (B) 450 nm-en az első (A) és a második (B) fényerjesztést követően. Feltételek:  $1 \mu\text{M}$  RC TL pufferben (A)  $+20 \mu\text{M}$  cit c (B).

Megfigyelttem, hogy a másodlagos kinon érzékenységehez képest az elsődleges kinon és a donor oldal sokkal ellenállóbb a  $\text{Hg}^{2+}$  ionnal szemben. Az első elektrontranszfer amplitúdója körülbelül  $20 [\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$  sztöchiometriával csökken a felére, ami egybeesik a töltésrekombinációval kapott értékkel, mely magában foglalja a károsodás közös eredetét. Továbbá a második elektrontranszfer sebességének csökkenése mellett az amplitúdója is csökken, ami az első elektrontranszfer amplitúdójának csökkenésével együtt azt jelzi, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$  ion kötött RC frakcióiban nem jut el az elektron a  $\text{Q}_\text{B}$ -re.

A fény által kiváltott elektrontranszfer folyamat során a P-től  $\text{Q}_\text{A}$ -ig, majd végül  $\text{Q}_\text{B}$ -re jut az elektron, a másodlagos kinon kötőhelyén elfoglalt pozíciójától függően. Mivel az



interkinon elektrontranszfer sebessége jóval ( $\sim 10^3$ -szor) kisebb, mint amit a Marcus-elmélet alapján várnánk ( $\sim 10^6 \text{ s}^{-1}$ ), a fehérje konformációs kapuzásának kell vezérelnie a  $Q_A^- \rightarrow Q_B$  elektrontranszfert (Graige és mtsai. 1996). Kristálystruktúrák alapján a  $Q_B$  kinonnak két különböző konformációját azonosították a kötőhelyén: a nemhem  $Fe^{2+}$ -tól távolabb lévő, disztális konfiguráció, amely a  $Q_A^- \rightarrow Q_B$  elektrontranszfer szempontjából inaktív és a proximális konfiguráció, amelyhez aktív elektrontranszfer kapcsolódik (Stowell és mtsai. 1997; Koepke és mtsai. 2007). A  $Q_A$  és a  $Q_B$  közötti elektrontranszfer csak úgy mehet végbe, ha a  $Q_B$  kinon kötőzsebében a disztális helyzetéből a proximális helyzetbe kerül (konformációs kapu, 5.26. ábra).



**5.26. ábra.** Az akceptor oldal  $Q_A$ ,  $Q_B$  és a vas ligandum szerkezeti ábrája, valamint a  $Q_B$  elmozdulása a kötőhelyén (PDB: 1AIG és 1AIJ). A  $Q_B$  disztális pozícióban zölddel, proximális pozícióban szürkével jelölve. A  $Q_B$  proximális pozíciójában a vele hidrogénkötést kialakító aminosavak  $His^{L190}$  és  $Gly^{L225}$ .

Ezt a folyamatot felfoghatjuk egy konformáció vezérelt kapuzó mechanizmusnak. Ebben a folyamatban a  $Q_B$  5 Å-mel mozdul el a proximális pozíciójából a disztális pozíciójaig az izoprenoid láncsal együtt (Paddock és mtsai. 2006). A  $Q_B$  a kötőzsebben potenciálisan négy aminosavval ( $His^{L190}$ ,  $Ser^{L223}$ ,  $Ile^{L224}$  és  $Gly^{L225}$ ) alakíthat ki hidrogénkötést, ezek közül a  $Q_B$  proximális konformációjában az  $O_4$  karboniljával erős hidrogénkötést alakít ki a vas ligandum  $His^{L190}$  ben lévő  $N_\delta$ -val, ill. az  $O_1$  a  $Gly^{L225}$   $N_p$ -vel (Paddock és mtsai. 2007; Wraight és Gunner 2009; Taguchi és mtsai. 2014). Ezek a kötések a  $Q_B$  proximális

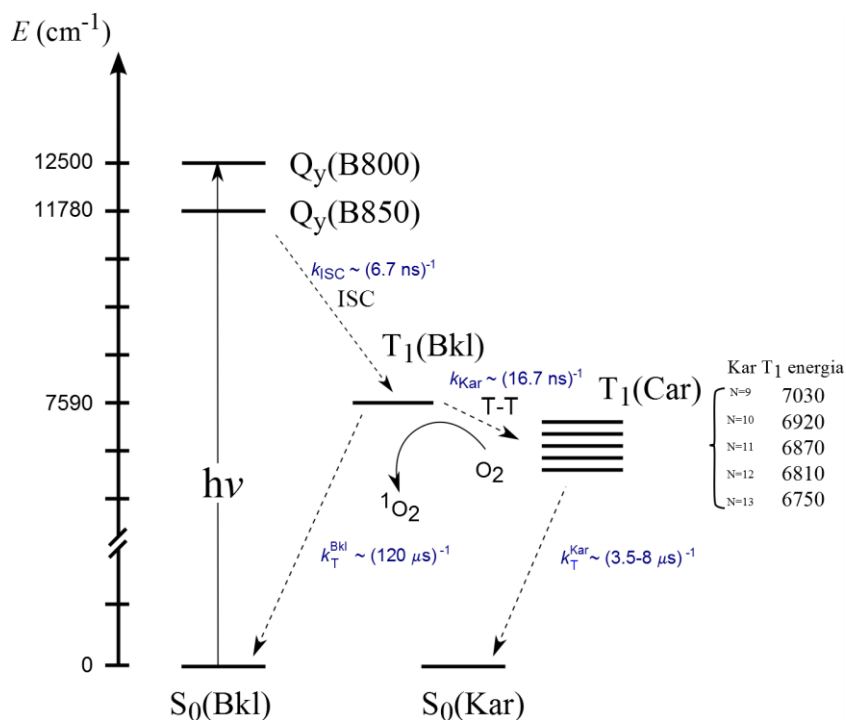
helyzetéből disztális pozícióba mozdulásakor felszakadnak, és ellehetetlenítik ezáltal a  $Q_A^- \rightarrow Q_B$  elektrontranszfert. A  $Q_B$  kötőzsebben kialakult kisebb változás is a  $Q_B$  aktivitás elvesztését eredményezi. A  $Hg^{2+}$  kezelés során a  $Q_B$  pozíciója és hidrogénkötés hálózata feltehetően megváltozik, és ezzel gátolja a  $Q_A^- \rightarrow Q_B$  elektrontranszfert. A folyamat körülbelül 20  $[Hg^{2+}]/[RC]$  környezetében következik be.

A bemutatott kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy 1) a  $Hg^{2+}$  ionnak a citoplazmikus oldalon a protonkapuhoz a legnagyobb affinitása ( $K \sim 0,2 \text{ } (\mu M)^{-1}$ ), melynek eredményeképp gátolja a protonfelvételt; 2) a másodlagos kinonhoz közeli kötőhelyhez kisebb affinitással ( $K \sim 0,05 \text{ } (\mu M)^{-1}$ ) kötődik, és a kinonok közti elektrontranszfert gátolja feltehetően a  $Q_B$  konformációs állapotának megváltoztatásával; 3) a  $Hg^{2+}$  ion a periplazmikus oldalon a Bkl dimerhez közel kötődik, ahol enyhe energetikai változásokat okoz, melynek eredményeképp a dimer vörös abszorpció sávjának 30 nm-el való kékeltolódását és redox középponti potenciáljának emelkedését okozza, és ez a hatás nem befolyásolja a citokróm dokkolását. A  $Hg^{2+}$  ionok ezekhez a helyekhez reverzibilisen, viszonylag nagy kötési állandóval kötődnek megváltoztatva az elektrosztatikát, a hidrogénkötések szerkezetét, és a fehérje konformációját. E fejezetben megkíséréltem azonosítani a  $Hg^{2+}$  által indukált hatásokat, mely végső soron a fotokémiai folyamat megszűnéséhez vezet. Remélem, hogy ezek a vizsgálatok elősegítik a  $Hg^{2+}$  toxicitás mechanizmusának molekuláris szinten való megértését a bakteriális reakciócentrum fehérjében.

#### 5.4. Erős fény elleni védelem intakt fotoszintetizáló bíborbaktériumokban

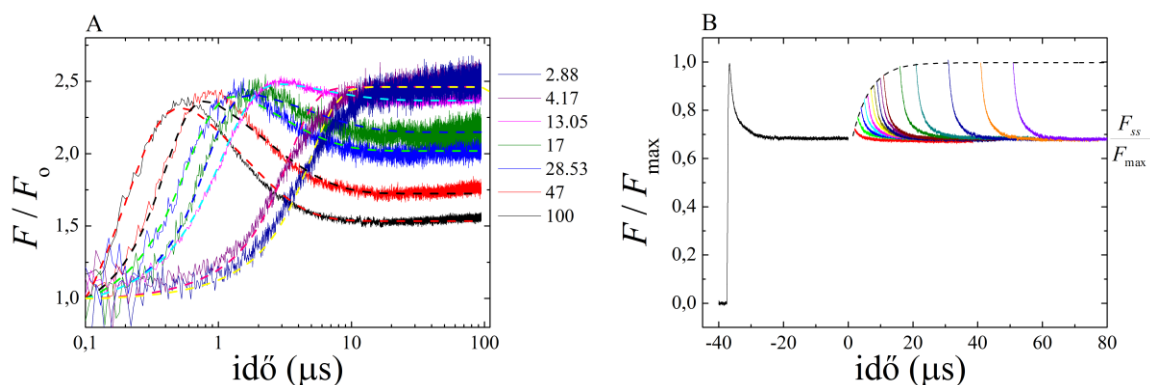
Míg az erős fény elleni védelemben kulcsszerepet játszó triplett állapotú karotinoidok ( $^3\text{Kar}$ ) termelődésének és felhasználásának mechanizmusait alaposan felderítették RC-ban (itt a Bkl dimertől ( $^3\text{P}$ ) származik), addig a hasonló kérdéseknek ehhez hasonló mélységű megválaszolása az LH komplexekben és membránokban (itt  $^3\text{Kar}$  az antenna  $^3\text{Bkl}$ -ból keletkezik triplett energiatranszferrel) még várat magára. Ezen túlmenően, intakt sejtekben a  $^3\text{Kar}$  kinetikai vizsgálatairól is csak néhány publikációt ismerünk. Noha a triplett energia átadása általánosságban jól ismert, a folyamatban résztvevő pigmentek és válasz-folyamatok azonosítása máig sem tisztázott. Hasonlóan nem kellően feltártak és megértettek a gerjesztett triplett állapotú Kar-oknak és/vagy Bkl-oknak a környezetükkel kialakított dinamikus kölcsönhatás részletei. Annak ellenére, hogy régóta ismert a természetes Kar triplett állapotok biológiai jelentőségű védelme a szingulett oxigén oxidációjával szemben, az egész sejtekben megvalósuló védekező mechanizmus leírása hézagos, és a jelenleg rendelkezésre álló információk leginkább a modell (vagy izolált) rendszerekre vonatkoznak. Ebben a fejezetben arra törekszem, hogy intakt sejtekben a  $^3\text{Kar}$  funkcióját különböző körülmények között nyomon kövessem, és ezzel megpróbáljam pótolni a fent említett ismeretbeli hiányosságokat.

A munkámban különböző fotoszintetikus baktériumtörzsek sejtszuszpenzióit gerjesztettem intenzív lézer fénnel, és a kibocsájtott Bkl fluoreszcencia kinetikáját (indukcióját) figyeltem meg (lásd. **4.3.2** fejezet). A gerjesztő lézer fény intenzitását kalibrált szűrőkkel csökkentettem. A vizsgálati módszerünk az eredmények kiértékelésében mind spektrális, mind kinetikai egyszerűsítést is jelentett. A 808 nm hullámhosszúságú vörös lézerfénnel kizárólagosan csak a Bkl (és a Kar nem) volt gerjeszthető, és az időben téglalap alakú gerjesztő profil a Bkl fluoreszcencia kioltók időbeli változásait közvetlenül szolgáltatott. Így a Kar tripletek kizárólag a viszonylag lassú Bkl triplett - Kar triplett cserefolyamatokon keresztül keletkezhetnek (**5.27. ábra**), és a kialakulásuk kinetikája közvetlenül követhető volt a Bkl fluoreszcencia kioltásával.



**5.27. ábra.** Intakt fotoszintetizáló bíborbaktérium LH2 antenna komplexében a triplett bakterioklorofillok ( $T_1(\text{Bkl})$ ) és a triplett össz-transz karotinoidok ( $T_1(\text{Kar})$ ) energiaszintjei az LH2-ben lévő  $N = 9-13$  konjugált kettős kötések számával. A gerjesztett Bkl triplettek a szingulett Bkl energiaszintjein ( $Q_y$  (B800) és  $Q_y$  (B850)) keresztül keletkeznek, spinváltó átmenettel (ISC) és karotinoidokon keresztül triplett-triplett (T-T) energiáttranszferrel ( $k_{\text{Kar}}$  sebességi állandóval) vagy az  $S_0(\text{Bkl})$  alapállapotba irányuló spontán relaxációval ( $k_T^{\text{Bkl}}$  sebességi állandóval) fogynak el. A  $T_1(\text{Kar})$  spontán relaxációs sebességi állandóját  $k_T^{\text{Kar}}$  jelöli. A karotinoidok  $T_1(\text{Kar})$  energiaszintjeit a konjugációs hosszuk ( $N$ ) határozza meg. Az LH2 antenna komplexben:  $N = 9$  (neurosporene),  $N = 10$  (spheroidene) és  $N = 11$  (lycopene + rhodopsin) fordulnak elő, rendre a *Rba. sphaeroides* G1C, *Rba. sphaeroides* 2.4.1, és *Rsp. molischianum* sejtekben (Rondonuwu és mtsai. 2004).

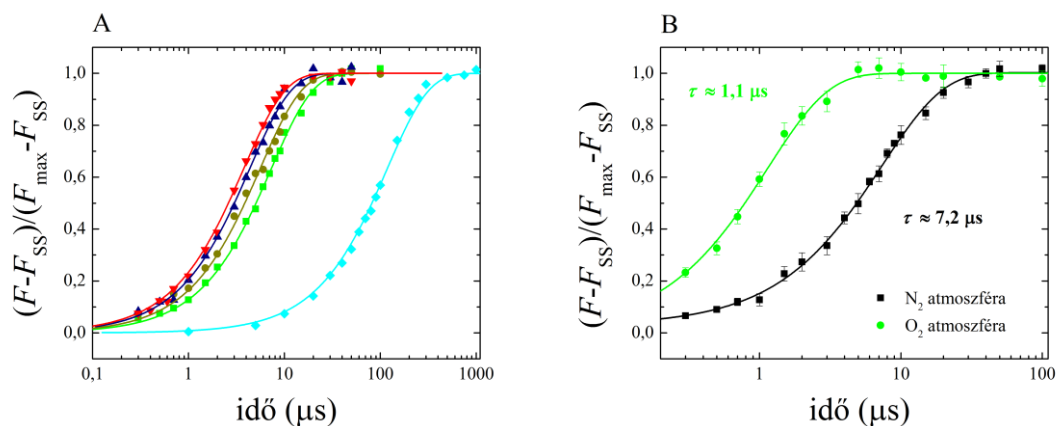
Az egységugrás sötét-fény átmenetet a Bkl fluoreszcencia intenzitása,  $F$  (pontosabban hatásfoka) jellegzetes késleltetéssel követi (ezt indukciónak nevezzük): az  $F_0$  (sötét) szintről indulva (nyitott RC) emelkedik (ehhez viszonyítva számítjuk a relatív fluoreszcencia hatásfokot ( $F/F_0$ )), majd néhány  $\mu\text{s}$ -on belül maximális értékét ( $F_{\text{max}}$ -ot) éri el. Az **5.28. ábrán** a *Rba. sphaeroides* egész sejt fluoreszcencia indukciója látható, amelyet különböző intenzitású lézerténnyel gerjesztettünk. A fluoreszcencia indukció kinetikájában megfigyelhető kezdeti emelkedés egészen addig tart, amíg az összes nyitott RC be nem záródik ( $F_{\text{max}}$ ). Az ezt követő csökkenés a bakterioklorofill triplett ( $^3\text{Bkl}$ ), ill. karotinoid triplett ( $^3\text{Kar}$ ) kioltók megjelenésének köszönhető. Minél nagyobb a gerjesztés intenzitása, annál gyorsabb a fotokémiai emelkedés (sebessége  $I$  ( $1/\mu\text{s}$ )) és annál erőteljesebb a triplett keltés (**5.28. ábra** (A) panel).



**5.28. ábra.** A Bkl fluoreszcencia hatások emelkedésének kinetikája *Rba. sphaeroides* 2.4.1 egész sejten egyszeri fénygerjesztés (A) és kettős gerjesztés (B) alatt. (A) panel: a fluoreszcencia indukciókat különböző intenzitású lézerfényrel gerjesztettük (a lézerintenzitás százalékos mértékét az A és B ábra között tüntettem fel). (B) panel: kettős lézerfényrel történő gerjesztés, az első 40  $\mu\text{s}$  időtartamú gerjesztést egy második – azonos intenzitású – gerjesztés követ. A két gerjesztés között változó időtartamú sötét (gerjesztés nélküli) időt hagyva a triplett kioltók fogyása figyelhető meg. A fluoreszcencia szintek maximális fluoreszcencia szintre ( $F_{\text{max}}$ ) normalizáltak. Az  $F_{\text{ss}}$  a fluoreszcencia egyensúlyi állapotát (steady state) jelöli a legnagyobb fényintenzitás mellett. A szaggatott görbéket az 5.3 - 5.6 egyenletben leírt excitonok vándorlás- és ütközés-modelljéből nemlineáris illesztési eljárással származtattam, melyből a szövegben megadott numerikus paraméterek adódtak.

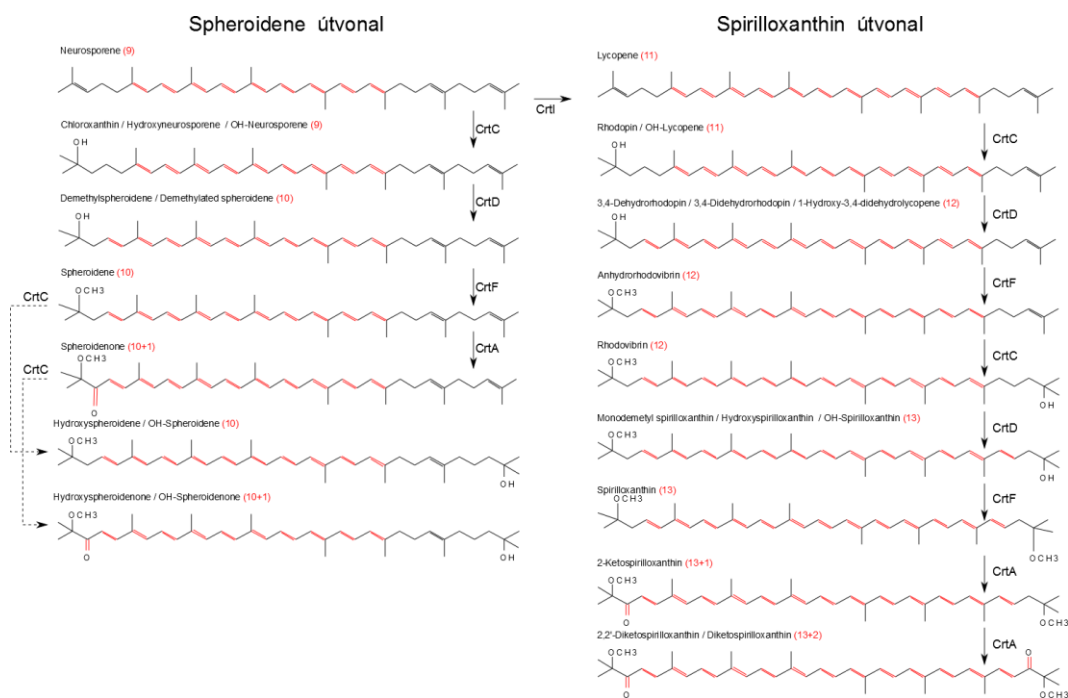
A méréseim során alkalmazott legnagyobb gerjesztési fényintenzitás mellett a Bkl változó fluoreszcencia ( $F_{\text{max}}-F_0$ ) körülbelül 50% -át a triplettek kioltották. A gerjesztés alatt kialakult egyensúlyi állapothoz ( $F_{\text{ss}}$ ) tartozó  $^3\text{Kar}$  a gerjesztés megszűnése után „sötétben”  $k_D$  karakterisztikus sebesség állandóval tűnik el (5.29. ábra). Az első fénygerjesztés bezárja a nyitott RC-okat (megszünteti a fotokémiai folyamatot), és mialatt néhány  $\mu\text{s}$  alatt karotinoid tripletteket is kelt. Ezt tükrözi a Bkl fluoreszcencia kezdeti növekedése (fotokémia), majd fokozatos csökkenése (a Kar triplettek általi kioltás) a gerjesztés intenzitásával meghatározott stacionárius szintre. Az első fénygerjesztést az egyensúlyi állapot elérése után ( $\sim 40 \mu\text{s}$ ) megszüntettem, és ennek következtében a kialakult karotinoid triplettek sötétben  $k_D$  sebesség állandó értékkel eltűnnek. Ezt a folyamatot nyomon lehet követni egy második - az elsővel azonos intenzitású - gerjesztő fényel. A megfigyelt második gerjesztő fény által kiváltott kezdeti fluoreszcencia szint a két gerjesztés közötti sötét szünettől függ. A második gerjesztés kezdeti fluoreszcencia szintjének változása a késleltetés függvényében (szaggatott vonal 5.28. ábra B panel) egy monoexponenciális függvénnyel illeszthető, amely a triplett állapot relaxációjának sebességi állandóját ( $k_D$ ) mutatja. Ezzel a kettős fénygerjesztés kísérlettel meghatároztam különböző baktérium törzsek  $k_D$  értékeit, melyeket az 5.3. táblázat soroltam fel. Továbbá, amint az várható volt, a triplett állapotának élettartama ( $1/k_D$ ) rendkívül érzékeny volt a mintát tartalmazó oldat

oldott oxigéntartalmára: az oxigén gyorsította a Kar triplett állapotának relaxációját, méréseim alapján körülbelül 7-es faktossal (5.29. ábra, B panel).



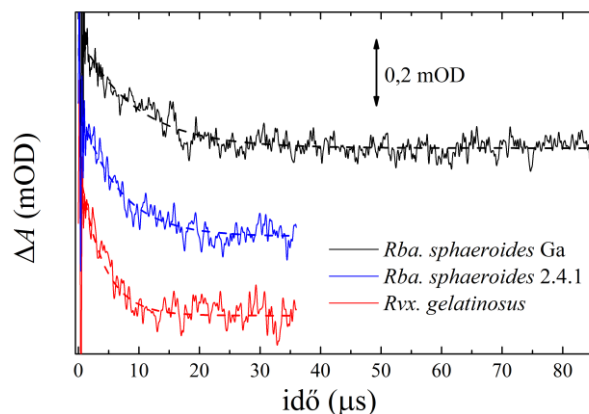
**5.29. ábra.** (A) Különböző baktérium törzsek triplett állapotainak normalizált fluoreszcencia kinetikája (életideje):  $\blacktriangledown$  *Thio. roseopersicina* (3,7  $\mu s$ ),  $\blacktriangle$  *Rvx. gelatinosus* (4,4  $\mu s$ ),  $\bullet$  *Rba. sphaeroides* 2.4.1 (5,8  $\mu s$ ) és  $\blacksquare$  *Rba. sphaeroides* Ga (7,2  $\mu s$ ) (5.3. táblázat), mely törzsek rendre spirilloxanthin ( $N = 13$ ), spheroidenone ( $N = 11$ ), spheroidene ( $N = 10$ ), neurosporene ( $N = 9$ ) karotinoidokat tartalmaznak ill.  $\blacklozenge$  *Rba. sphaeroides* R-26 (120  $\mu s$ ) mely karotinoidmentes törzs. (B) *Rba. sphaeroides* Ga triplett állapotának normalizált sötét relaxációja anaerob körülmények között és oxigén telítettség alatt.

A karotinoidok gerjesztett állapotának dinamikáját és energetikáját széles skálán lehet vizsgálni a konjugációs kötések hosszának megválasztásával ( $N = N_{C=C} + N_{C=O}$  szám a konjugált kettős kötések száma) az  $N = 9-15$  tartományban. Az általam vizsgált anoxikus bíborbaktériumok spheroidene, spirilloxanthin vagy mindkét karotinoid szintézis útvonalon képesek karotinoidjaik előállítására (5.30. ábra). A *Rba. sphaeroides* spheroidene útvonalon, a *Rsp. rubrum* spirilloxanthin útvonalon, míg a *Rvx. gelatinosus* mind a spheroidene, mind a spirilloxanthin útvonalon szintetizálja karotinoidjait. (Takaichi 1999; Koyama és mtsai. 2007; Chi és mtsai. 2015). A karotinoidok összetétele adott törzsben a nevelési körülményektől is függ. Például a *Rvx. gelatinosus* rövid láncú karotinoidokat termel anaerob körülmények között, de hosszú láncú (mono- és di-keto) karotinoidokat szemiaerob körülmények között. A vizsgált bakteriális törzseket és nevelési körülményeket az 5.3. táblázat foglaltam össze.



**5.30. ábra.** Spheroidene és spirilloxanthin útvonalak karotinoid bioszintézise. A molekulák kromofórját alkotó konjugált kettős kötések hosszát és számát (zárójelben) piros színnel tüntettem föl.

A fluoreszcencia kioltási kísérletekből jól látszik a triplét élettartam függése a bakteriális törzsek karotinoid összetételétől, amit közvetlenül fényindukált abszorpcióváltozással is meghatároztam (**5.31. ábra**). Ugyanakkor a fluoreszcencia kioltási mérésekkel a karotinoid élettartam jobb időbeli felbontását tudtam elérni, mint a fényindukált abszorpcióváltozással.

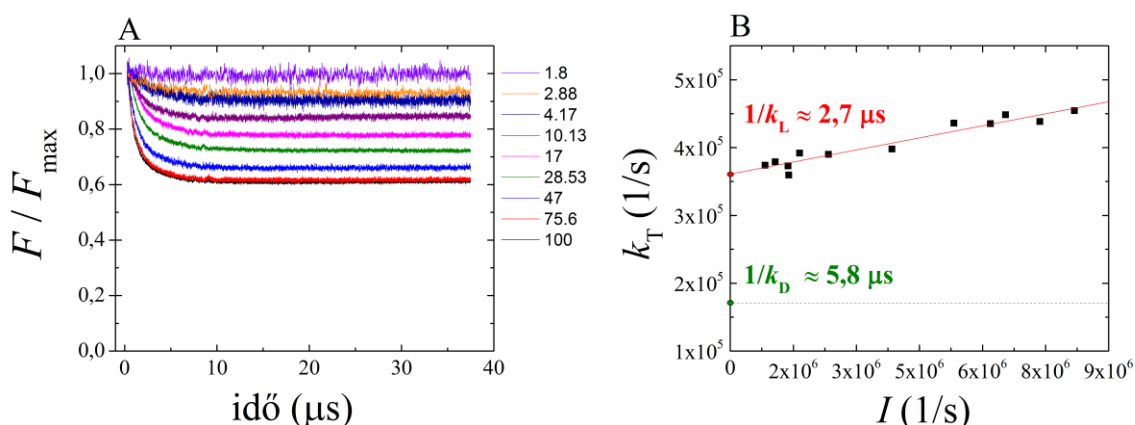


**5.31. ábra.** Karotinoid triplét tranziens abszorpció változások ( $\Delta A$ ) a lézergyjlesztés után, szobahőmérsékleten. A lecsengési görbéket 520 nm-en (*Rba. sphaeroides* Ga), 540 nm-en (*Rba. sphaeroides* 2.4.1) és 580 nm-en (*Rvx. Gelatinosus*) rögzítettem anaerob körülmények között<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> A görbék egymáshoz képest eltolva szerepelnek a könnyebb áttekinthetőség kedvéért.



A karotinoid triplett lecsengését folyamatos gerjesztés alatt egy  $k_D$ -tól különböző  $k_L$  sebességi állandó határozza meg, amely nem sötétben, hanem folyamatos megvilágítás mellett írja le a  $^3\text{Kar}$  relaxációját. Ezt a  $k_L$  sebességi állandót kettős gerjesztéssel határoztam meg, ahol a második gerjesztő lézertényt (5.32. ábra, A panel) azután indítottam el, miután az első bezárta a RC-ot (5.28. ábra, A panel). Hasonlóan a „sötétben” meghatározott  $k_D$  sebességi állandóhoz, ebben a kísérletben is a két gerjesztő impulzus fényintenzitása megegyezik. A két gerjesztő fény közötti sötét késleltetést úgy választottam meg, hogy elég hosszú legyen ahhoz, hogy a karotinoid tripletek visszakerüljenek alapállapotba (5.29. ábra, A panel), de ne legyen túl hosszú ahhoz, hogy újra ki tudjon nyitni a RC. Ez a feltétel, blokkolt interkinon elektron-transzfer mellett – terbutrin hozzáadásával – és a sötétben mért  $^3\text{Kar}$  relaxációs sebességi állandó ismeretében, 40  $\mu\text{s}$ -os sötét intervallum esetén teljesül. A különböző gerjesztő fényintenzitás esetén a  $k_L$  értékeket a fluoreszcencia lecsengési görbék monoxponenciális illesztésével nyertük (5.32. ábra, A panel).

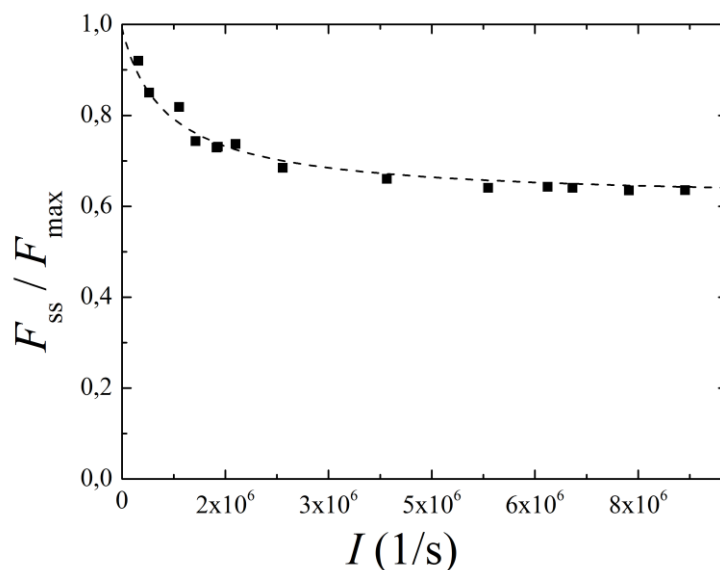


**5.32. ábra.** Fényadaptált viszonyok között (gátolt fotokémia) megfigyelt *Rba. sphaeroides* Bkl fluoreszcencia kioltása különböző fényintenzitásnál (a lézertenzitás százalékos mértéke az A és B ábra között látható). A panel: a Bkl fluoreszcencia 40  $\mu\text{s}$ -ig tartó gerjesztés alatt egyensúlyi állapotba kerül. B panel: a fluoreszcencia lecsengésének sebességi állandói „fényben” (lásd az A táblázatot) a sötétadaptált mintában mért fotokémiai sebességi állandó (gerjesztő lézer fényintenzitásának) függvényében. Az illesztett egyenes meredeksége megfelel a triplett képződés hatékonyságának, tengelymetszete ( $k_L$ ) eltér a sötétben mért karotinoid triplett relaxáció sebességétől ( $k_D$ ).

A sötétben meghatározott  $k_D$  sebességi állandóval ellentétben,  $k_L$  lineárisan függ a fényintenzitástól (5.32. ábra, B panel). Megfigyeltem, hogy a  $k_L$  az  $I$  (fotokémiai sebességállandó) függvényében számos bakteriális törzs esetén különbözik  $k_D$ -tól, ami a kioltási paraméterek változására utal a sötét-fény átmenet során. A fluoreszcencia kioltás egyensúlyi állapota a gerjesztő fényintenzitásától függ, de szignifikánsan eltér a linearitástól a vizsgálatban használt intenzitás tartományban (5.33. ábra). Ez jól leírható a *szingulett és triplett excitonok vándorlás- és ütközés-elméletével* (lásd 5.4.1 fejezet),



amelyben kísérleti adatokat jól közelíthetjük a Bkl fluoreszcencia karotinoid triplett általi kioltásának stacionárius megoldásával.



**5.33. ábra.** Bkl fluoreszcencia kioltás fényintenzitás függése. A Bkl fluoreszcencia folyamatos gerjesztés alatt kialakult egyensúlyi állapota ( $F_{ss}$ ) a sötétadaptált mintában mért fotokémiai sebességi állandó (gerjesztő lézer fényintenzitásának) függvényében, valamint azok **5.11** egyenlettel való illesztése.

#### 5.4.1. Szingulett és triplett excitonok vándorlás- és ütközés-elmélete az antennában

A mérések (**5.28. ábra**, A panel) azt mutatják, hogy a Bkl fluoreszcencia hatásfokát két egymással versengő fluoreszcencia kioltó szabályozza: a nyitott RC és a karotinoid tripletek. Továbbá az **5.35. ábrán** látható mérésből az következik, hogy a karotinoid tripletek a RC-ok bezárásával párhuzamosan keletkeznek, és nem a fotokémia lezárulása után. A fluoreszcencia indukcióban megfigyelt változások és az antenna szerkezetével és működésével való kapcsolatának megértése érdekében egy egyszerű fenomenológiai modellt (tó-modellt) használok a baktériumok antennájában lévő szingulett és triplett excitonok kinetikájának leírására. Az antennában lévő Bkl pigment molekulák által elnyelt fényenergia ( $I$  intenzitás) következtében szingulett excitonok  $Bkl^*$  ( $\varepsilon_S$ ) képződnek, amelyek szabadon bejárhatják a fotoszintetikus egységet (PSU-t), és közben kioltókkal (fotokémiai – nyitott RC; és (Bkl vagy Kar) triplett állapotok) találkoznak:

$$\frac{d}{dt} \varepsilon_S = I - k_{loss} \cdot \varepsilon_S - k_p \cdot \frac{1 - \chi_{RC}}{1 - p \cdot \chi_{RC}} \cdot \varepsilon_S - k_{tr} \cdot \chi_{Kar} \cdot \varepsilon_S, \quad 5.3.$$

ahol a  $k_{loss} = k_{fl} + k_{ISC} + k_{h\ddot{o}}$  (lásd **5.27. ábra**) a szingulett excitonok spontán dezaktivációval történő fogyásának sebességállandói (fluoreszcencia, (spin)rendszerek közötti átmenet és

hőfejlődés), valamint  $k_p$  és  $k_{tr}$  a fotokémiai átalakítás és a karotinoid triplett kioltással történő fogyásának sebességi állandói. Itt  $\chi_{RC}$  és  $\chi_{Kar}$  a zárt RC-ok és a karotinoidok triplett formáinak frakciói. Figyelembe kell venni, hogy az  $(1 - \chi_{RC})$  arányú nyitott RC abszorpció hatáskeresztmetszete az energetikai kooperativitás miatt nem állandó, hanem  $1/(1 - p \cdot \chi_{RC})$  tényezővel formálódik (de Rivoyre és mtsai. 2010). A triplett excitonok ( $\varepsilon_T$ ) a szingulett excitonok által  $k_{ISC}$  sebességi állandóval képződnek, és a triplett-triplett energiának a  ${}^3B_{kl}$ -ról a  ${}^3K_{ar}$ -ra történő átadásával tűnnek el  $k_{Kar}$  sebességi állandójával:

$$\frac{d}{dt} \varepsilon_T = k_{ISC} \cdot \varepsilon_S - k_{Kar} \cdot \varepsilon_T \quad 5.4.$$

Mivel a karotinoid a  $B_{kl}^*$ -on keresztül gerjesztődik és nem közvetlenül, a  ${}^3K_{ar}$  állapotának populációja kizárólag a  ${}^3B_{kl}$ -ból származó triplett-triplett energiaátadás eredménye. Így, a karotinoid gerjesztés  ${}^1K_{ar}^* \rightarrow {}^3K_{ar} + {}^3K_{ar}$  szingulett-triplett físsiója (Gradinaru és mtsai. 2001; Klenina és mtsai. 2013; Klenina és mtsai. 2014) kizárt. A  ${}^3K_{ar}$  állapot időbeli változását a  ${}^3B_{kl}$  termelése és spontán bomlása határozza meg  $k_{Kar}$  és  $k_T$  sebességi állandókkal:

$$\frac{d}{dt} \chi_{Kar} = k_{Kar} \cdot \varepsilon_T - k_T \cdot \chi_{Kar} \quad 5.5.$$

A szingulett és triplett excitonok ütközési vesztesége nem szerepel a (5.4) és (5.5) egyenletben, mert a szingulett excitonokat ( $\varepsilon_S$ ) a tripletekkel való találkozás kioltja anélkül, hogy a triplett koncentrációját megváltoztatná: szingulett  $\rightarrow$  triplett fúzió ( $B_{kl}^* + {}^3B_{kl} \rightarrow B_{kl} + {}^3B_{kl}$  vagy  $B_{kl}^* + {}^3K_{ar} \rightarrow B_{kl} + {}^3K_{ar}$ ) (Mauzerall 1976). A nyitott állapotú RC időbeli változását (csökkenését) a fotokémiai folyamat (excitonnal való ütközés) határozza meg:

$$\frac{d}{dt} (1 - \chi_{RC}) = -k_p \cdot \frac{1 - \chi_{RC}}{1 - p \cdot \chi_{RC}} \cdot \varepsilon_S \quad 5.6.$$

A fenti négy (5.3; 5.4; 5.5; 5.6) differenciálegyenlet (numerikus) megoldást ad a négy ismeretlen mennyiség időfüggésére:  $\varepsilon_S$ ,  $\varepsilon_T$ ,  $\chi_{Kar}$  és  $\chi_{RC}$ . Ezek után a megfigyelt  $B_{kl}$  fluoreszcencia hatásfoka:

$$\Phi = \frac{k_{fl} \cdot \varepsilon_S}{I} \quad 5.7.$$

Vezessük be a kezdeti, a maximális és (1-re normált) változó fluoreszcencia hatásfokot:

$$\Phi_V = \frac{\Phi - \Phi_0}{\Phi_M - \Phi_0}; \Phi_M = \frac{k_{fl}}{k_{loss}}; \Phi_0 = \frac{k_{fl}}{k_{loss} + k_p} \quad 5.8.$$

azaz

$$\Phi_V = \frac{\frac{\varepsilon_S}{I} - \frac{1}{k_{loss} + k_p}}{\frac{1}{k_{loss}} - \frac{1}{k_{loss} + k_p}} \quad 5.9.$$

**5.2. táblázat.** Leosztott fényintenzitással gerjesztett fluoreszcencia indukciós kinetikák illesztésénél kapott paraméterkészlet (*Rba. sphaeroides* 2.4.1, **5.28. ábra**):

%	$p$	$\tau_T$ (s)	$\tau_{loss}$ (s)	$\tau_{tr}$ (s)	$\tau_{fl}$ (s)	$\tau_{Kar}$ (s)	$\tau_{ISC}$ (s)	$\tau_P$ (s)
100	0,15	1,95E-06	3,27E-11	1,25E-11	9,89E-10	6,70E-09	1,67E-08	5,98E-11
47	0,15	4,08E-06	4,62E-11	1,61E-11	1,00E-09	6,70E-09	1,67E-08	4,15E-11
28,53	0,15	3,83E-06	3,81E-11	1,81E-11	9,58E-10	6,71E-09	1,64E-08	4,73E-11
17	0,15	6,31E-06	4,50E-11	2,89E-11	1,01E-09	6,70E-09	1,69E-08	3,23E-11
13,05	0,15	6,17E-06	3,87E-11	1,65E-11	9,56E-10	6,72E-09	1,67E-08	2,68E-11
4,17	0,15	7,94E-07	5,80E-11	1,70E-11	1,00E-09	6,70E-09	1,64E-08	4,10E-11
2,88	0,15	1,19E-06	5,80E-11	1,70E-11	1,00E-09	6,75E-09	1,67E-08	4,10E-11

azaz  $p = 0,15$ ;  $k_T = 1/(3,47 \mu s \pm 2,1 \mu s)$ ;  $k_{loss} = 1/(48 ps \pm 18 ps)$ ;  $k_{tr} = 1/(18 ps \pm 5 ps)$ ;  $k_{fl} = 1/(1 ns \pm 0,2 ns)$ ;  $k_{Kar} = 1/(6,7 ns \pm 17 ps)$ ;  $k_{ISC} = 1/(16,7 ns \pm 0,2 ns)$ ;  $k_P = 1/(41 ps \pm 10 ps)$ . Ezen a széles idő (intenzitás) tartományon a mért és a számított kinetikai paraméterek kellően jó egyezést mutatnak. Azaz az *excitonok vándorlás- és ütközés-elmélete* megfelelő közelítés a fotoszintetikus baktériumok intakt sejtjeiben a karotinoid tripletek generálásának és relaxációjának alapvető folyamatainak megértéséhez. Ezekből az adatokból a Bkl fluoreszcencia maximális hatásfoka:  $\Phi_{max} = k_{fl}/k_{loss} = 4,8\%$ , és a kezdeti (állandó) fluoreszcencia hatásfoka  $\Phi_0 = k_{fl}/(k_{loss} + k_p) = 2,1\%$ .

A fényindukált karotinoid tripletek kinetikája és stacionárius szintje az **5.3 - 5.6** egyenletek által leírt modellből származtatható, továbbá az **5.5** egyenlet szerint a karotinoid tripletek egyensúlyi szintjét, fotokémiai kioltás hiányában, állandó gerjesztés alatt a következő sebességi állandóval határozzuk meg:

$$k_T = k_L + \frac{k_{ISC} \cdot k_{tr} \cdot I}{k_{loss}^2} \quad 5.10.$$

Ugyanez a sebességi állandó jellemzi a  $\varepsilon_S$ ,  $\varepsilon_T$  esését az  $\frac{I}{k_{loss}}$  és a  $\frac{k_{ISC} \cdot I}{k_{loss} \cdot k_{Kar}}$  kezdeti értékeiből. A  $k_T$  mért értékei lineárisan növekednek a fényintenzitással, amint az **5.32. ábra B** panelén látható. A fényintenzitás-függő  $k_T$  meredeksége nem a karotinoid tripllett képződésének ( $\frac{k_{ISC}}{k_{loss}}$ ) hatásfokát jellemzi, hanem a karotinoid tripllett védőmechanizmus hatékonyságaként értelmezhető: minél meredekebb a lineáris  $k_T$  vs.  $I$  függvény, annál hatékonyabb a karotinoid tripllett fényvédő mechanizmusa. Ezért a meredekség nagysága alapján lehetőség nyílik a különböző bakteriális törzsekben lévő karotinoid triplletteket a fényvédelemben betöltött szerepük alapján osztályozni (**5.2. táblázat**).

A fotokémiai kioltást követően megfigyelt tripllett állapotú karotinoidok időbeli lecsengésének időállandói az **5.34. ábra B** paneljén látható módon különböznek a vizsgált törzsekben. Karotinoid jelenlétében a relaxáció viszonylag rövid, de jól mérhető, viszont karotinoid nélkül (*Rba. sphaeroides* R26) a  $^3\text{Bkl}$  élettartama nagy és hosszabb ideig kitett a tripllett oxigénmolekulák káros hatásának. Ennek következtében a  $\tau_T$  lecsengési idő megfelelően jellemzi a fotoszintetikus apparátus sebezhetőségét a fényindukált károsító hatásokkal szemben.

Az **5.10.** egyenlettel leírt egyenes meredekségén kívül a tengelymetszet is hasznos információul szolgál. Megfigyelhető, hogy a  $k_L$  (tengelymetszet -  $k_T$  kezdeti) értéke jelentősen különbözik a  $k_D$ -tól a vizsgált bakteriális törzsek esetében (**5.3. táblázat**). A kísérleti meghatározás módja szerint a sebességi állandókat "fénybeli" és "sötétbeli" állandóknak nevezhetjük. A vizsgált törzsek esetben  $k_L$  értéke nagyobb vagy egyenlő a  $k_D$ -vel. Ezért azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az **5.10** lineáris függvény meredeksége a sötét-fény átmenet során csökken. A meredekség megváltozásának fizikai értelmet is adhatunk, amennyiben azt az antennarendszerben a Bkl-Kar fehérje-pigment komplexnek az erős „fényviszonyokhoz” (a szingulett és tripllett excitonok megjelenéséhez) való alkalmazkodásának tulajdonítjuk. Az átmenet a fényerjesztés megkezdése után egy kis intenzitás tartományon belül történik. Bár az egyenes meredeksége és tengelymetszete (vagyis a  $k_L$  és  $k_D$  közötti különbség) nagy pontossággal meghatározható, a meredekség csökkenését alacsony fényintenzitás mellett nehéz mérni. Körülbelül egy nagyságrenddel csökkenhet a meredekség ebben a szűk tartományban, ami azt jelzi, hogy a karotinoid tripllettnek körülbelül tízszer nagyobb a fényvédő szerepe fényben, mint a sötétben.

A Bkl fluoreszcencia karotinoid tripllett általi kioltásának stacionárius megoldása adott  $I$  fényintenzitás mellett kifejezhető:

$$\Phi = \Phi_M \cdot \frac{\sqrt{1 + \frac{4I}{I_{crit} + I}} - 1}{\frac{2I}{I_{crit} + I}} \quad 5.11.$$

ahol

$$I_{\text{crit}} = \frac{k_{\text{loss}}^2 \cdot k_L}{2 \cdot k_{\text{ISC}} \cdot k_{\text{tr}}} \quad 5.12.$$

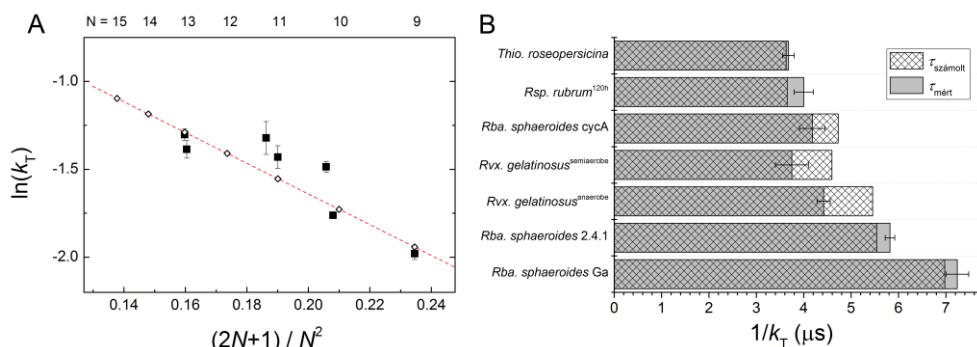
$I_{\text{crit}}$  az a (fluoreszcenciának a karotinoid tripllett általi kioltásának szempontjából) kritikus fényintenzitás, amelynél a fluoreszcencia hatásfok a maximális (kioltás nélküli) fluoreszcencia hatásfok ( $\sqrt{3}-1 =$ ) 73%-ára esik (27% kioltódik). A kísérleteinkben ezt a kioltási értéket el tudjuk érni (ill. meg tudjuk közelíteni) a legnagyobb fényintenzitásoknál, így az **5.11** egyenlettel megadott függvény legkisebb négyzetek módszerével illesztve a mért pontokat, az  $I_{\text{crit}}$  értéket megbízhatóan meg tudjuk adni az egyes törzseknél (**5.2. táblázat**).

A kritikus fényintenzitás a karotinoid tripllett védő szerepének hatékonyságával függ össze: fordítottan arányos a képződés sebességi állandójával  $\frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{loss}}^2}$ , a  $k_{\text{tr}}$  kioltás másodrendű sebességi állandójával és a karotinoid tripllett  $1/k_T (= \tau_T)$  élettartamával. Minél nagyobbak ezek a mennyiségek, annál kisebb fényintenzitás szükséges a Bkl fluoreszcencia kioltásához.

#### 5.4.2. *Különböző lánchosszúságú konjugált kettős kötéseket tartalmazó karotinoidok tripllett állapotának lecsengési sebessége egész sejtekben*

A sötét intervallummal megszakított kettős gerjesztés módszere lehetővé teszi a karotinoid tripllettek sötétben mérhető élettartamának pontos meghatározását különböző bakteriális törzsekben. Mivel a baktériumok különféle karotinoidokat, és változó összetételben tartalmaznak, ezért a megfigyelt karotinoid tripllett relaxáció sebességi állandója a különböző törzsekben a megfelelő karotinoid frakcióval súlyozott sebességi állandók összege:  $k_T = \sum_N k_{T,N} \cdot Kar_N$ , ahol  $\sum_N Kar_N = 1$  és  $N$  a karotinoid konjugált kettős kötéseinek számát jelöli. Ha figyelembe vesszük a különböző törzsek karotinoid tartalmát (**5.3. táblázat**) és a megfigyelt relaxációs sebességekre lineáris egyenletrendszert írunk fel, akkor kiszámíthatjuk a különböző lánchosszúságú karotinoidok sötétre vonatkozó tripllett életidejét. A  $\ln(k_T) - t (2N+1)/N^2$  függvényében ábrázolva a pontok egy egyenesre esnek (**5.34. ábra**, A panel). Tekintettel a törzsek mért tripllett élettartamának és karotinoid tartalmának bizonytalanságára, a különböző bakteriális törzsekben a tripllettek számított és mért életidejei kellően jó egyezést mutattak (**5.34. ábra**, B panel). Ugyanakkor kicsi, de szisztematikus eltérés látható *Rvx. gelatinosus* esetében, melynek okát még nem sikerült feltárnom. A származtatott Kar tripllett élettartam csökken, ha  $N$  növekszik (**5.34. ábra**, A panel), ami összhangban van a tripllett és a szingulett alapállapotok közötti energiakülönbség csökkenésével. Összehasonlítva irodalmi adatokkal, ebben a reprezentációban is lineáris összefüggés figyelhető meg, ugyanúgy, mint karotinoid tripllett állapotainál szerves oldószerben, illetve izolált LH antenna komplexekben (Kakitani és

mtsai. 2007a), vagy karotinoidok szingulett gerjesztett állapotainál izolált LH2-ben (Niedzwiedzki és mtsai. 2015).



**5.34. ábra.** Különböző számú ( $N$ ) konjugált kettős kötést tartalmazó karotinoidok triplett relaxációs sebességi állandói ( $k_T$ ) intakt fotoszintetikus baktériumban. A panel: különböző lánc hosszúságú karotinoid triplett sebességi állandók természetes alapú logaritmus (◇) (melyeket a B panelen felsorolt különböző törzsek karotinoid triplettjeinek relaxációs idejéből és karotinoid összetételéből alkotott lineáris egyenletrendszerből származtattam), valamint a Kar triplett sebességi állandóinak logaritmus a különböző törzsekben található különböző lánc hosszúságú karotinoidok súlyozott átlagának függvényében (■). B panel: A mért és számított karotinoid triplett relaxációs sebességi állandóinak összehasonlítása különböző törzsekben.

A különböző fotoszintetikus baktériumokban előforduló karotinoid triplettek (sötét) élettartamát -  $1/k_D$  - a Bkl fluoreszcencia-kioltás kísérletekben *in vivo* határoztam meg és bontottam komponensekre, amelyeket a különböző lánc hosszúságú konjugált kettős kötések tartalmazó karotinoidokhoz rendeltem. A megfigyelt élettartam csökkent (vagyis a triplett dezaktiválás sebességi állandója ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) nőtt), amikor a konjugált kettős kötések száma megnövekedett (**5.34. ábra**). A rövidebb konjugált láncú karotinoidok hosszabb élettartamot mutattak, mint a hosszabb konjugált láncokkal rendelkező karotinoidok. Ez összhangban van a  $T_1$  és  $S_0$  állapotok vibrációs átfedéséből eredő energiakülönbség törvénnyel (energy-gap law), amely szerint a sugárzás nélküli relaxációs sebesség a vibráció indukált elektronikus csatolás ( $C$ ) és a Franck-Condon faktor függvénye (Englman és Jortner 1970). A gyenge csatolás határesetben a két adiabatikus potenciálfelület relatív elmozdulása kicsi:

$$k_T = \frac{2\pi}{\hbar} C^2 \frac{e^{-\frac{\delta^2}{2}}}{\sqrt{2\pi \cdot \Delta E \cdot \hbar \omega_M}} e^{-\gamma \frac{\Delta E}{\hbar \omega_M}}, \quad 5.13.$$

ahol  $\Delta E$  a  $T_1$  és  $S_0$  állapotok közötti energiakülönbség,  $\omega_M$  a rendszerben rendelkezésre álló maximális, meghatározó vibrációs frekvencia,  $\delta$  az átmenet során a

potenciálminimum elmozdulása a normál koordináta mentén és  $\gamma$  molekuláris paraméterekkel kifejezve:  $\gamma = \ln \frac{2 \cdot \Delta E}{\delta^2 \cdot \hbar \omega_M} - 1$ , ( $\gamma > 0$ ).

A legkisebb energiájú betöltetlen molekulapálya (LUMO) és a legnagyobb energiájú betöltött molekulapálya (HOMO) közötti energiakülönbség kiszámítható a  $\pi$ -elektronok delokalizációjával a teljes lineáris lánc mentén:

$$\Delta E = \frac{h^2}{8mL^2} (N_{\text{LUMO}}^2 - N_{\text{HOMO}}^2), \quad 5.14.$$

ahol  $L = n \cdot l$ , a lánc hossza ( $l \sim 2,88 \text{ \AA}$  a kettős C=C és az egyetlen C-C kötésből álló elemi egység hossza),  $h$  a Planck állandó,  $m$  az elektron tömege,  $N_{\text{LUMO}} = N + 1$  és  $N_{\text{HOMO}} = N$ . Behelyettesítve az 5.13 egyenletbe az 5.14 egyenletet és elhanyagolhatónak tekintve  $-\ln \sqrt{\Delta E}$  változását,  $\ln(k_T)$  és  $\frac{2N+1}{N^2}$  között lineáris összefüggést kapunk, ahogy azt az 5.34. ábra is mutatja. Az egyenes meredekségét  $-\frac{\gamma}{\hbar \omega_M} \cdot \frac{h^2}{8ml^2}$ , a tengelymetszetét  $\ln(C)$  és  $-\delta^2$  határozza meg. Minél hosszabb a lánc, annál kisebb az energiakülönbség a  $T_1$  és  $S_0$  között, és annál nagyobb a triplett relaxáció sebessége.

Az 5.13 egyenlet alapján,  $k_T$ -nek a karotinoidok szénhidrogénláncának hosszától való függését elsősorban  $\omega_M$  határozza meg: minél nagyobb  $\omega_M$ , annál nagyobb a sugárzásmentes relaxáció sebessége. A sugárzásmentes relaxáció elsődleges mechanizmusa a gerjesztett állapot energiájának környezetbe történő kibocsátása a molekulán belüli kötések rezgése révén. Ez a molekulában lezajló multifonon emisszió a legnagyobb  $\omega_M$  rezgéseknél a leghatékonyabb, és ekkor van szükség a legkevesebb kvantumra ahhoz, hogy egy bizonyos mennyiségű energiát szállítani lehessen. Ami az aromás szénhidrogéneket illeti, ez gyakran a C-H kötés-nyújtás, amelynek vibrációs energiája  $\hbar \omega_M \approx 3000 \text{ cm}^{-1}$  ( $= 6 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ ). Az valószínűsíthető, hogy ez a kötés-nyújtás elősegíti a fotoszintetikus baktériumokban a gerjesztett triplett állapotú karotinoidok sugárzásmentes relaxációját. Különböző szénhidrogének esetében a  $\gamma$  molekuláris tényező értékeit 1,31-0,50 tartományban határozták meg (Englman és Jortner 1970). Így  $\frac{h^2}{8ml^2} = 7,3 \cdot 10^{-19} \text{ J}$  figyelembe vételével a 5.34. ábra A paneljén az egyenes meredekségének -16 és -6 között kell lennie és valóban, az általam kapott meredekség: -8,7, amely érték a várakozásokkal összhangban áll.

Oldatban (benzolban) mért karotinoidok (9-13 konjugált kettős kötésig terjedő tartományában) triplett relaxációs sebessége hasonló ábrázolás esetén is közel azonos meredekséggel lineáris függést mutat, de a mért sebességi állandók az alacsonyabb értékek felé tolódnak. Mivel a meredekség főként a  $\gamma$  molekuláris paraméter függvénye, ezért a közel megegyező meredekség azt jelzi, hogy a karotinoidok környezete nagyon hasonló a

fotoszintetikus apparátusban és a szerves oldószerben. Ugyanakkor a karotinoidok  $T_1$  állapot energiái a baktériumok természetes környezetében lényegesen eltérnek az oldatban lévőhöz viszonyítva. Ezenkívül még további kis különbségek is megfigyelhetők az izolált RC-LH1 komplex és az LH1 és LH2 komplexek között (Kakitani és mtsai. 2007a). Az **5.13** egyenlet alapján, az eltolódás (az illesztett egyenes alacsonyabb tengelymetszete) a különböző elektronikus (spin-pálya) csatolásnak (C) és/vagy az átmenetben érintett két állapot potenciális energiafelület-minimumainak ( $\delta$ ) elmozdulásának tulajdonítható.

A karotinoid triplett energiaszintjének enyhe csökkenése (a konjugált kettős kötések számának növekedése) a  $^3\text{Kar}$  védelemi hatékonyságának növekedését okozza, ami a  $^3\text{Bkl}$  és a  $^3\text{Kar}$  közötti energiakülönbség kis növekedésének is köszönhető. Ez a  $^3\text{Bkl}$ - $^3\text{Kar}$  triplett-triplett energiatranszfer a ns-os időtartományba esik (4,8 ns-tól 16 ns-ig *Allochrodatum vinosum* LH2 antennában (Magdaong 2015), 2,0 ns (Rondonuwu és mtsai. 2004) és 16,7 ns (Kosumi és mtsai. 2016)), ahol a gerjesztési energia átadását vegyértékelektron-csere kíséri (Dexter mechanizmus, lásd a **2.7** fejezetet és (Koyama és Kakitani 2006)). Mivel az elektrontranszfer (kicserélődés) sebessége exponenciálisan függ a kezdeti és a végső állapotok közötti szabadenergia-különbségtől (Marcus-elmélet), ezért a  $^3\text{Bkl}$  kioltásának sebessége egyre növekszik a karotinoid konjugált kettős kötéseinek növekvő számával. Másfelől, a  $^3\text{Bkl}$  állapotának élettartama legalább tízszer nagyobb az antenna komplexekben ( $\sim 80 \pm 5$   $\mu\text{s}$  *Rba. sphaeroides* R-26.1 törzs B850-es komplexben (Farhoosh és mtsai. 1994);  $\sim 100$   $\mu\text{s}$  a Bkl *a* oldatban (Niedzwiedzki és Blankenship 2010)) vagy akár a RC-okban ( $\sim 13$   $\mu\text{s}$  karotinoid mentes *Rba. sphaeroides* R26 törzsben (Mandal és mtsai. 2017)), mint a  $^3\text{Kar}$  élettartama. Így növekvő  $N$ -nel a Bkl triplett  $\rightarrow$  Kar triplett annihiláció révén egyre kevesebb idő áll rendelkezésre a  $^3\text{Bkl}$  kioltására, ami növekvő mennyiségű gerjesztett szingulett állapotú Bkl ( $Q_y$ )  $\rightarrow$  eredményez. Ezáltal a  $^3\text{Kar}$  fénygyűjtő funkciót is betölt a fényvédő funkciója mellett (Slouf és mtsai. 2012).

A karotinoidoknak az antennában és a RC-ban megfigyelt szerkezete és fényvédő szerepe közötti szoros kapcsolat a konfigurációk természetes szelekcióján (*cisz* vagy *transz*) és a Kar-ok konjugált kettős kötéseinek hosszán alapszik (Kakitani és mtsai. 2007b; Koyama és mtsai. 2007). Az LH2-ben a rövidebb konjugált lánc hosszúságú össz-*transz* konfigurációban lévő Kar-ok a fénygyűjtő funkciót töltik be, míg a RC-ban a 15-*cisz* konfigurációban lévő hosszabb konjugált láncú Kar-ok elsősorban a fényvédő funkciót látják el. Véleményem szerint a Kar-ok fényvédő szerepe nem korlátozódik csupán a RC-ra, hanem nagyon hatékony védelmet nyújtanak az antennában is. Nagy fényintenzitás mellett a RC hosszabb ideig (tartósan) zárt állapotban van, és mivel a zárt RC „sekély csapdát” jelent az excitonok számára, ezért azonnal visszatérnek az antennába, ahol elsősorban a karotinoidok gondoskodnak arról, hogy kioltódjanak, még mielőtt káros hatást fejtenének ki. Így a karotinoidokat nem lehet kizárólag a szerkezetük (konfiguráció és lánc hossz) és a fotoszintetikus apparátusban betöltött fényvédő/fénygyűjtő funkciójuk közötti kapcsolat alapján besorolni. Hasonló következtetések vonhatók le Bautista és



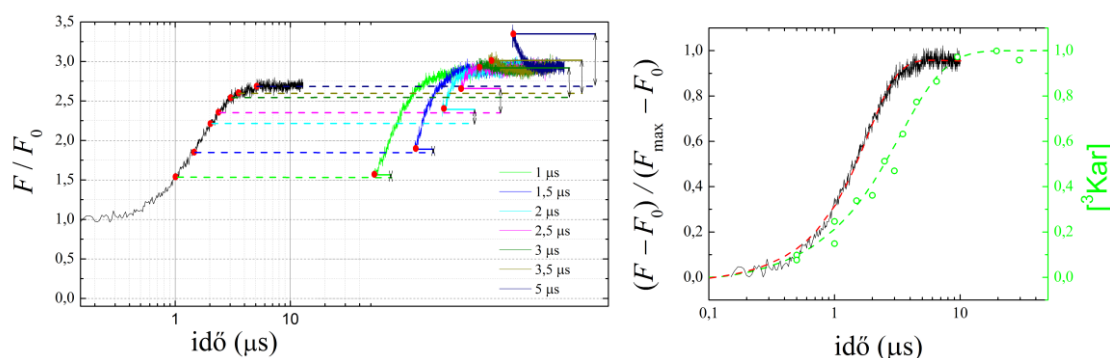
munkatársai (Bautista és mtsai. 1998) tanulmányából, melyben megállapították, hogy a spektroszkópiai tulajdonságok és a gerjesztett-állapot dinamikája nem különbözött a *Rba. sphaeroides* R26.1 (RC-ban helyreállított Kar, kötött 15-*cisz*-spheroidene-el) RC-a és a *Rba. sphaeroides* 2.4.1 (RC-ban nem kötött 15-*cisz*-spheroidene-el) RC-a között, valamint, hogy a spheroidene *cisz*-izomer konformációját a *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC-ban elsősorban az RC fehérje szerkezete határozza meg.

Az intakt sejteken bemutatott eredményeim alátámasztják az energiakülönbség törvényt, a szerves oldószerekben (Mathis és Kleo 1973; Bensasson és mtsai. 1976) és izolált fotoszintetikus komplexekben mért korábbi eredményeket (Koyama és Fujii 1999). Vizsgálataim újdonságát az adta, hogy intakt egész sejteken sikerült meghatározni a triplett karotinoidokra, azok konjugált lánchosszának széles skáláján a  $\ln(k_T)$  és  $\frac{2N+1}{N^2}$  közötti lineáris összefüggést, valamint a karotinoid dinamikájának szerepét (rugalmasság, csavarás, stb.) a triplett állapot sugárzásmentes dezaktiválódásában.

#### 5.4.3. A fotokémiai és a karotinoid triplett kioltók párhuzamos keletkezése

A karotinoid triplettek fényvédő hatása akkor válik kifejezetté és látványossá, amikor a fotokémia már befejeződik, és az erős fényben generált Bkl tripletteket ki kell oltani. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a karotinoid triplettek csak azután képződnek, miután a RC bezárul. Ez formálisan azt jelenti, hogy a két fényreakció (a Q-t redukáló primér fotokémiai folyamat és a fényindukált karotinoid triplett képződése) egymással párhuzamosan és nem sorosan kötve játszódik le. A soros modell szerint a gerjesztési energia a nyitott RC-ban kizárólagosan a töltésszétválasztáshoz használandó fel és nem a karotinoid triplettek által védett Bkl triplett kialakulásához. Ezzel ellentétben az **5.28. ábrán** bemutatott adatok azt jelzik, hogy a fotokémiai emelkedés során karotinoid triplettek is képződnek, és a párhuzamos modellel összhangban versengenek az elsődleges fotokémiával.

Kísérletileg a következő módon támasztottam alá ezt a feltételezést: a fluoreszcencia indukció mérésénél a gerjesztést a felfutó szakaszban, különböző helyeken szakítottam meg, és azonos sötét intervallum választása mellett egy második gerjesztéssel folytattam. A fluoreszcencia emelkedés fotokémiai jellege miatt a fluoreszcenciának ugyanazon a szinten kellene folytatódnia, mint ahol az első gerjesztést követően megszűnt. Ez gyenge gerjesztésnél figyelhető meg, amikor a nyitott RC az egyetlen fluoreszcencia kioltó. Ezzel szemben erős gerjesztésnél a fluoreszcencia magasabb szinten kezdődik, mint az első gerjesztés megszűnésekor, mely különbség nagyobb lesz a fluoreszcencia indukció későbbi szakaszaiban (**5.35. ábra**). Ez világos jele annak, hogy egy másik fluoreszcencia kioltó is jelen van a fluoreszcencia indukció során. A karotinoid triplett képződése a fotokémiai emelkedéshez képest időben eltolt, ami azt mutatja, hogy a két fény által kiváltott kioltási folyamat versenyképes, és a karotinoid triplett kialakulásának sebessége kisebb, mint a RC bezáródása.



**5.35. ábra.** Fotokémiai és karotinoid triplett képződési folyamatok versengése. Bal oldal: A  $^3\text{Kar}$  relatív mennyiségét egy kiválasztott időpillanatban a második gerjesztés kezdetén a fluoreszcencia kezdeti növekedéséből határoztam meg egy kettős fényimpulzusos kísérletben. A két fényimpulzus közötti sötét várakozás 40  $\mu\text{s}$  volt, a fénygerjesztés intenzitását a maximális lézerefény intenzitásnak 10%-ára állítottam be, és az interkinon elektron transzfert terbutrinnal gátoltam. Jobboldal: Normalizált Bkl fluoreszcencia (indukció) és a karotinoid triplett ( $^3\text{Kar}$ ) képződésének (triplett kioltás) egyidejű mérése *Rba. sphaeroides* 2.4.1 egész sejtben. Mindkét kinetika telítésbe megy, valamint egymáshoz képest időbeli eltolódás figyelhető meg.

#### 5.4.4. Fényvédelem: sötét-fény konformáció kapcsolás a triplett disszipáció növeléséhez az antennában

A megfigyelésem szerint a karotinoid triplett disszipáció sebessége „fényben” nagyobb, mint „sötétben” ( $k_L > k_D$ ), ami a fényvédelem fokozott hatékonyságát szolgálja, és egyértelműen összhangban van a baktérium élettani igényével.

A fotoszintetikus egység szerveződése is a fényvédő funkciót segíti. A PSU-t jellemezhetjük olyan tartályként, amelyben a gerjesztési energia többé-kevésbé egyenletesen oszlik el az egész rendszerben, különösebben nem kitüntetve a RC-ot. A különböző Bkl aggregátumok közötti előre és visszafelé irányuló transzfersebesség nagyon hasonló. A RC-ról az LH1-re történő visszaáramlás még gyorsabb, mint az LH1  $\rightarrow$  RC előremenő transzfer (Damjanovic és mtsai. 2000). Az a gerjesztési energia, amely egy RC-ban nem használódik fel az elektrontranszfer indukálásához, visszakerül az LH1 és az LH2 antenna komplexekre, ahol vagy átkerülnek egy másik RC-ba, vagy disszipálódnak. Az algákkal és magasabb rendű növényekkel szemben a bíbor fotoszintetizáló baktériumok fénygyűjtő komplexeiben túlnyomó többségében a triplett állapot főként (ha nem teljesen) a karotinoidokon lokalizálódik (és nem a Bkl molekulán) (Angerhofer és mtsai. 1995; Maxime és van Grondelle 2012). A triplett állapotnak ez a lokalizálása a viszonylag lassú triplett-triplett transzferhez kapcsolódik a Bkl és a karotinoid molekulák között. A karotinoidok hatékonyan disszipálják triplett gerjesztési energiájukat, és ezzel a baktériumok védelmének szerves részét képezik.

**5.3. táblázat.** A kutatásom során használt törzsek listája a karotinoid összetételükkel együtt (Takaichi 1999; Koyama és mtsai. 2007; Chi és mtsai. 2015), valamint a fontosabb általam meghatározott mennyiségek (triplett élettartam, kritikus fényintenzitás és a tripllett termelődés hatékonysága (lásd **5.32. ábra**, B panel)).

Törzsek	Karotinoid <sup>konjugált</sup> lánc hossz (%) - össz. tartalom	Megfigyelt tripllett élettartam		$I_{krit}$ ( $\mu\text{s}^{-1}$ )	$\Delta k_T / \Delta I$
		$\tau_D$ ( $\mu\text{s}$ )	$\tau_L$ ( $\mu\text{s}$ )		
<i>Rba. sphaeroides</i> Ga	neurosporene <sup>9</sup> (48%); chloroxanthin <sup>9</sup> (37%); 3,4-dihydrospheroidene <sup>9</sup> (14%)	$7,24 \pm 0,24$	$7,3 \pm 0,3$	2,1	0,02
<i>Rba. sphaeroides</i> 2.4.1	spheroidene <sup>10</sup> (90%); spheroidenone <sup>11</sup> (10%)	$5,82 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$	1,8	0,012
<i>Rba. sphaeroides</i> cycA	spheroidenone <sup>11</sup> & OH-spheroidenone <sup>11</sup> (100%)	$4,18 \pm 0,27$	$2,7 \pm 0,35$	1,3	0,02
<i>Rvx. gelatinosus</i> (anaerobic)	spheroidene <sup>10</sup> (36%); OH-spheroidene <sup>10</sup> (52%); OH-spheroidenone <sup>11</sup> (6%); spirilloxanthin <sup>13</sup> (6%)	$4,42 \pm 0,14$	$2,8 \pm 0,3$	1,6	0,019
<i>Rvx. gelatinosus</i> (semi-aerobic)	spheroidene <sup>10</sup> (1%); OH-spheroidene <sup>10</sup> (3%); spheroidenone <sup>11</sup> (11%); OH-spheroidenone <sup>11</sup> (73%); 2-keto-spirilloxanthin <sup>14</sup> (3%); 2,2' diketo-spirilloxanthin <sup>15</sup> (10%)	$3,75 \pm 0,35$	$2,3 \pm 0,5$	1,1	0,08
<i>Rsp. rubrum</i> (120 h)	rhodovibrin <sup>12</sup> & anhydorrhodovibrin <sup>12</sup> (5%); spirilloxanthin <sup>13</sup> (95%)	$4,0 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,4$	1,7	0,19
<i>Thio. roseopersicina</i>	spirilloxanthin <sup>13</sup> (100%)	$3,68 \pm 0,12$	N/A	N/A	N/A

A két különböző „sötétben” ( $1/k_D$ ) és „fényben” ( $1/k_L$ ) mért karotinoid tripllett élettartam bevezetését érdemes összevetni azon korábbi tanulmányokkal, amelyekben a spheroidene két (többszörös) konfigurációját tárgyalják a *Rba sphaeroides* 2.4.1 RC alap állapotában (Wirtz és mtsai. 2007) és a gerjesztett tripllett állapotában (Kolaczowski 1989; Kakitani és mtsai. 2006). Ezen túlmenően a <sup>3</sup>Kar EPR spektrumának szokatlan időbeli változásait figyelték meg a különböző pigment-fehérje komplexekben (Klenina és mtsai. 2013). Megállapították, hogy a RC (8,5  $\mu\text{s}$  LH2 vs. 3,5  $\mu\text{s}$  RC) esetében gyorsabban zajlik le az alapállapotba történő relaxáció. Mindezen hatások (szerkezeti változások, heterogén lecsengési mintázat stb.) bizonyos baktériumtörzsekben adott mérési körülmények között hozzájárulhatnak a karotinoid tripllett élettartamában a sötét- és fény-állapotokban megfigyelt különbséghez. Ugyanakkor annak a lehetőségét tartom valószínűbbnek, hogy az excitonok jelenlétéhez alkalmazkodva a Bkl-Kar fehérje komplexben csekély strukturális módosulás következik be az antennának „fényhez szokott” állapotában.

A natív fotoszintetikus rendszerekben a tripllett exciton kialakulásáról már több publikáció is megjelent. Kloroszómákban kimutatták a hosszú élettartamú Bkl tripllett állapotokat, mely állapotokat az oxigén nem oltotta ki (Kim 2007). A B850-es 18 Bkl pigment között a csatolás elég nagy ahhoz, hogy jelentős gerjesztési energia delokalizációt okozzon (Alden és mtsai. 1997), de a B800 sávban lévő 9 Bkl sokkal távolabb helyezkedik el egymástól, és ezért lokálisabb gerjesztési energiát mutat. A növényi fénygyűjtő komplexekben a tripllett hullámfüggvény a karotinoidok és a szomszédos klorofilok között

oszlik meg. Ugyanez nem igaz a bíborbaktériumokban, ahol a triplett gyakorlatilag teljesen a karotinoid molekulán helyezkedik el (Gall és mtsai. 2011). Egy olyan molekuláris mechanizmus, amely a szomszédos pigmenteken keresztül terjesztené a triplett hullámfüggvény lokalizációját, felgyorsítaná a Kar triplett állapotok relaxációját és növelné a Bkl molekulák fényvédő hatékonyságát. A karotinoid triplett állapot kialakulása oldatban olyan konformáció változásokkal vagy fényindukált konformáció kapcsolóval történik, amely a kölcsönhatásba lépő pigmenteket közelebb hozza egymáshoz annyira, hogy az a molekuláris mechanizmusnak alkalmas legyen. Hasonló fényindukált konformáció kapcsolóról számoltak be a közelmúltban molekuláspektroszkópiás (single-molecule spectroscopy) mérések alapján (Gall és mtsai. 2015).

Vizsgálatom alátámasztja azt a következtetést, hogy az intakt sejtekben a karotinoid triplett élettideje és fényvédő funkciója nem csak a karotinoid triplett energiáitól és szerkezetétől függ (konjugált lánc hossz, konfiguráció, elektroncsatoltság), hanem a relaxáció dinamikus szabályozásától is. Ez utóbbi mechanizmus mélyebb feltárása még várat magára.

## 6. Összefoglalás

A fotoszintetizáló bíorbaktériumok kitűnő modellként szolgálnak a fényindukált szerkezeti változások, elektron- és protontranszfer, elektrosztatikai folyamatok, valamint az olyan károsító hatások elleni védelem tanulmányozására, mint a magas fényintenzitás és a nehézfémion-szennyezés. A vizsgálataimat intakt fotoszintetikus bíorbaktériumokkal, illetve izolált reakciócentrum fehérjével és ezeknek megfelelő helyein kialakított mutánsaival végeztem.

### *Energetikai változások mutáns *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumban*

A töltésszétválasztás szabadenergia szintje jelentősen módosul kulcsfontosságú helyeken lévő aminosavak mutációjával mind a reakciócentrum (RC) donor, mind pedig az akceptor oldalán. Ennek bizonyítására a RC fehérje célzott helyein aminosav mutációkat hoztunk létre. A dimer késleltetett fluoreszcenciájának kinetikáját különböző mutáns reakciócentrumokon vizsgáltam, mely módszer bizonyítottan megfelelő és érzékeny eljárás a bakteriális fotoszintézis kinetikai és termodinamikai jellemzőinek tanulmányozásához. Egy hidrogénkötés létrehozásával, a Leu→His<sup>L131</sup> mutációval (röviden: LH<sup>L131</sup>) a DL intenzitása jelentősen megnő a vad típusú RC-ban mért értékhez képest. Megfigyeltem, hogy valamennyi kiválasztott mutáns esetében (LH<sup>L131</sup>; HL<sup>M202</sup>; LH<sup>L131</sup> - LH<sup>M160</sup>; LH<sup>L131</sup> - HL<sup>M202</sup>; LH<sup>L131</sup> - LH<sup>M160</sup> - FH<sup>M197</sup>; IT<sup>M265</sup>; EH<sup>M234</sup>; EL<sup>M234</sup>; EA<sup>M234</sup>; ER<sup>M234</sup>) mind a késleltetett fluoreszcencia amplitúdója (területe), mind a sebességállandója nőtt a vad típusú RC-hoz képest. Az energia növekedés a donor oldali mutációk esetében – a hidrogén kötések növekedésével – lépcsőzetes: a tripla mutáns körülbelül kétszer akkora növekedést mutat a vad típusú RC-hoz képest, mint a dupla mutáns. A vizsgált mutáns reakciócentrumokban a hidrogénhíd-kötéssel járó mutációk P<sup>\*</sup> és P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> állapotok közötti szabadenergia-különbség szintje körülbelül 200 mV tartományban változik a vad típusú reakciócentrumhoz képest.

A vad típusú RC-ban a P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> → P<sup>\*</sup> átmenetet elsősorban az entalpia-változás vezérli és az entrópia-változásnak nincs nagy jelentősége (Arata és Parson 1981b). A tendencia alapvetően megmarad a donor oldali mutánsoknál, ahol az entalpikus tag domináns marad, de a hidrogénhíd-kötések számának növekedésével az entrópikus kifejezés növekedése figyelhető meg. Az akceptor oldali mutációk minőségi különbségeket mutatnak: már egy mutáció után az entrópia-változás jelentős hajtóereje lehet a P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> → P<sup>\*</sup> átmenetnek. Ez a megfigyelés molekuláris átrendeződést jelenthet a vad típusú RC-hoz képest az IT<sup>M265</sup> és a EX<sup>M234</sup> (ahol, X = H, L, A és R) mutációinál. Ezek a specifikus és tranzienst molekuláris konformációk az átmenet (töltésszétválasztás/töltés-rekombináció) létrejöttének előfeltételei a Q<sub>A</sub>-t érintő mutációkban, ami úgy tűnik, hogy a donor oldali mutációknál hiányzik.

A vizsgált donor ill. akceptor oldali mutációk egyike sem jár jelentős strukturális változásokkal, ezért ezekben a mutánsokban a megfigyelt energetikai változások a kofaktorok (P és Q<sub>A</sub>) és a fehérje környezete közötti kölcsönhatások enyhe módosulását eredményezik, beleértve a RC periplazmikus oldalán a dimerhez kötődő hidrogénhid-kötések és a citoplazmikus oldalán lévő hidrogénhid-kötések hálózatában bekövetkező változásokat.

*Mutáns és vad típusú Rba. sphaeroides reakciócentrum fluoreszcencia indukciója és anizotrópiája*

Láttuk, hogy a *Rba. sphaeroides* bíbor fotoszintetikus baktérium reakciócentrumában a helyspecifikus mutáció módosítja a dimer energetikáját, és képes destabilizálni a P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> primer töltéspárt. Mindezek következtében megváltozik a kölcsönhatás (csatoltság) a monomer (B) és a dimer (P) Bkl között. A Bkl dimer és Bkl monomer közötti energiatranszfer jobb megértéséhez a Bkl prompt fluoreszcencia hatásfokát, anizotrópiáját és indukcióját vizsgáltam a dimer és monomer szelektív gerjesztésével. A speciális pár exciton jellege miatt a Q<sub>y</sub> sáv két lehetséges állapota, P<sub>+</sub> (810 nm, mely átfedésben van a monomer Bkl-al (800 nm)) és P<sub>-</sub> (865 nm). A 800 nm-es abszorpció sáv (P<sub>+</sub> és B) direkt gerjesztésével két jól kivehető fluoreszcencia sáv jelenik meg 850 nm-nél és 910 nm-nél, amelyek a <sup>1</sup>P<sub>-</sub><sup>\*</sup> és <sup>1</sup>B<sup>\*</sup> állapotokról alapállapotra történő átmeneteinek tulajdoníthatóak. Ezeken a hullámhosszakon megfigyelt fluoreszcencia indukció kinetikája figyelemreméltó változásokat mutat. A 910 nm-nél és 850 nm-nél megfigyelhető fluoreszcencia kinetikák ellentétes alakja, de megegyező esési és emelkedési ideje egyértelmű bizonyítéka a <sup>1</sup>B<sup>\*</sup>-ról a dimérre történő elektrongerjesztési energiatranszfernek.

A dimer környezetében kialakított (általunk használt legmagasabb számú) hármas mutáció (LH<sup>L131</sup> - LH<sup>M160</sup> - FH<sup>M197</sup>) nem változtatja meg a RC közeli infravörös abszorpció spektrumát, de jelentősen módosítja a fluoreszcencia spektrumát és indukciós kinetikáját. Míg a 850 nm-nél levő Bkl fluoreszcencia hatásfoka drámaian csökken, addig a 910 nm-nél megfigyelhető dimer fluoreszcencia hatásfoka kétszeresére nő. A töltésszétválasztáshoz szükséges fényhasznosítás sebességi állandóját a mutáció nem módosítja. Mindazonáltal a 850 nm-en detektált kinetikák jelentősen megváltoznak.

A 865 nm-es sáv direkt gerjesztésével elért dimer fluoreszcencia anizotrópiája mind a vad típusú, mind a mutáns RC-ban magas (nagyon közeli a +0,4 elméleti maximumhoz) és nem mutat hullámhosszfüggést. A B és P<sub>-</sub> gerjesztése 808 nm-es lézerdíódával a megfigyelt hullámhossztartományon a fluoreszcencia hullámhosszfüggő depolarizációját eredményezi 0,35-ről 0,24-re a vad típus esetében és 0,3-ről 0,24-re a tripla mutáns esetében. Összességében a kísérleteink azt mutatták, hogy a dimer prompt fluoreszcencia tulajdonságait – a spektrumot, az átmeneti dipólusok orientációját és erősségét, a Stokes-eltolódás nagyságát – a mutáció nem (vagy csak alig) módosította. Másrésről a monomer bakterioklorofill fluoreszcencia hatásfokának jelentős csökkenését tapasztaltam.

*Hg<sup>2+</sup> ion indukált fotokémiai folyamatok gátlása Rba. sphaeroides reakciócentrumban*

A fotoszintetizáló baktériumoknak élőhelyükön számos kihívással, stressz hatással (pl.: magas fényintenzitás, nehézfémionok jelenléte) szembesülnek. Az átmeneti fémionok (Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> stb.) drasztikus hatást gyakorolnak a bakteriális RC redoxfolyamataira, és közülük is a két vegyértékű higany-ion különösen kártékony. A különböző Hg<sup>2+</sup> ion által indukált hatások feltárása és elkülönítése nagy kihívást jelent, mégis általános célként tűztem ki a bakteriális RC fehérjéhez kötött Hg<sup>2+</sup> ion által előidézett szerkezeti és funkcionális változások tanulmányozását, és specifikus támadási helyeinek feltérképezését. Vizsgálataim során *Rba. sphaeroides* bíborbaktériumból izolált RC-hoz telítési koncentrációig Hg<sup>2+</sup> iont ( $\sim 10^3$  [Hg<sup>2+</sup>]/[RC]) adtam és a fotokémiai aktivitás idő- és koncentrációfüggő csökkenését figyeltem meg. Kísérleti eredmények alapján megállapítottam, hogy a Hg<sup>2+</sup> ionnak a citoplazmikus oldalon a protonkapuhoz a legnagyobb affinitása ( $K \sim 0,2$  (μM)<sup>-1</sup>), melynek eredményeképp gátolja a protonfelvételt. Megfigyeltem, hogy a másodlagos kinonhoz közeli kötőhelyhez kisebb affinitással ( $K \sim 0,05$  (μM)<sup>-1</sup>) kötődik a Hg<sup>2+</sup> ion, és a kinonok közti elektrontranszfert gátolja feltehetően a Q<sub>B</sub> konformációs állapotának megváltoztatásával. A Hg<sup>2+</sup> ion egy másik specifikus támadási helyét azonosítottam a periplazmikus oldalon, ahol a Hg<sup>2+</sup> feltehetően a Bkl dimerhez közel kötődik, és ott enyhe energetikai változásokat okoz, melynek eredményeképp a dimer vörös abszorpció sávjának 30 nm-el való kékeltozódását és redox középponti potenciáljának  $\sim 45$  mV-tal való emelkedését okozza. A Hg<sup>2+</sup> ionnak a dimerhez közeli kötődése nem befolyásolja a citokróm (cit) c dokkolását vagy a redukált cit c<sup>2+</sup>-ről való elektrontranszfert P<sup>+</sup>-ra. A Hg<sup>2+</sup> ezekhez a helyekhez reverzibilisen, viszonylag nagy kötési állandóval kötődik megváltoztatva az elektrosztatikát, a hidrogénkötések szerkezetét, és a fehérje konformációját (fehérjerészek dinamikáját) mely végső soron a fotokémiai folyamat megszűnéséhez vezet.

*Erős fény elleni védelem intakt fotoszintetizáló bíborbaktériumokban*

A nehézfémion-szennyezés mellett az erős fényintenzitás is a gyakori környezeti (stressz)hatások közé tartozik. A fotoszintetizáló baktériumok figyelemre méltó hatékonysággal és gyorsasággal védik és működtetik az energiaátalakító rendszerüket. Ennek igen fontos része a fény intenzitásának növelésével arányos módon keletkező bakterioklorofill triplett (<sup>3</sup>Bkl) állapotok kezelése, amely elengedhetetlen a fotoszintetikus organizmusok túléléséhez. A Bkl triplett állapot energiája ugyanis könnyedén átadódik a triplett állapotú molekuláris oxigénnek (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), és szingulett gerjesztett állapotú oxigént (<sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, erős oxidálószer) állít elő. Ennek megakadályozására számos mechanizmus működik, amelyekben kiemelt szerepet játszanak a karotinoid festékek. Kísérleteimben a fényindukált karotinoid tripletek (<sup>3</sup>Kar) keletkezését és élettartamát a bakterioklorofill (Bkl) fluoreszcencia megfigyelésével vizsgáltam különböző fotoszintetikus baktériumokban, köztük *Rvx. gelatinosus* (anaerob és szemianaerob), *Rsp. rubrum*, *Thio*.

*roseopersicina*, *Rba. sphaeroides* 2.4.1 valamint karotinoid és citokróm módosított mutánsokkal: *Rba. sphaeroides* Ga, R-26 és *cycA*. Vizsgálataim során megfigyeltem a Bkl fluoreszcencia intenzitás  $^3\text{Kar}$  általi kioltását a fotokémiai emelkedés alatt és nem csak azt követően, mely arra enged következtetni, hogy a reakciócentrumban (RC) a töltésszétválasztás és a karotinoid triplett keletkezése nem egymást követő, hanem párhuzamos folyamat. Ezzel a megfigyeléssel és azzal, hogy a  $^3\text{Kar}$  fotoprotektív funkciója nem korlátozódik kizárólag csak a RC-ra, egy olyan modellt dolgoztunk ki, mely modellben a karotinoidok a Bkl pigmentek által meghatározott pigmentrendszerben (antenna-rendszerben) oszlanak el.

A kísérleteim során meghatároztam a karotinoid tripletek élettartamát különböző bakteriális törzsekben. Mivel a baktériumok különféle karotinoidokat, és változó összetételben tartalmaznak, ezért a megfigyelt karotinoid triplett relaxáció sebességi állandója a különböző törzsekben a megfelelő karotinoid frakcióval súlyozott sebességi állandók összege. Figyelembe véve a különböző törzsek karotinoid tartalmát és a megfigyelt relaxációs sebességekre lineáris egyenletrendszert felírva, a mérési adatokból kiszámítottam a különböző lánchosszúságú karotinoidok triplett életidejét.

Fénygerjesztés alatt mért  $^3\text{Kar}$  élettartama lényegesen rövidebb (1-2  $\mu\text{s}$ ), mint a fény-indukció után (sötétben) mért  $^3\text{Kar}$  élettartama (2-10  $\mu\text{s}$ ). Ez az eltérő viselkedés a  $^3\text{Kar}$  dinamikájának fontosságát mutatja a relaxáció előtt, továbbá a fényvédelem fokozott hatékonyságát szolgálja, mely egyértelműen összhangban van a baktérium élettani igényével. Az eredményeket nemcsak a  $^3\text{Kar}$  energiaszintjei, hanem a Kar gerjesztett triplett állapotában lévő különböző alsóbb szintek közötti átmenetek kinetikájának szempontjából is tárgyaltam.



## 7. Summary

The photosynthetic purple bacteria are excellent models for studying light-induced structural changes, electron- and proton transfer, electrostatic processes and protection against damaging effects such as high light intensity and heavy metal contamination. My studies were carried out using intact and mutant photosynthetic purple bacteria and isolated reaction center protein.

### *Free energy changes in mutant reaction center of Rhodobacter sphaeroides*

The free energy level of charge separation is significantly altered by the mutation of amino acids at key sites both on the donor and acceptor sides of the reaction center (RC). For demonstration, amino acid mutations were specifically targeted at different sites of the RC protein. The kinetic properties of the delayed fluorescence of the dimer of different mutants were studied. The methods has proved to be a suitable and sensitive procedure to determine the kinetic and thermodynamic characteristics of bacterial photosynthesis. By creating a hydrogen bond with the Leu  $\rightarrow$  His<sup>L131</sup> mutation (briefly LH<sup>L131</sup>), the intensity of DL is significantly increased compared to the wild-type RC. It was observed that both the amplitude (area) and the rate constant of the delayed fluorescence were increased for all selected mutants (LH<sup>L131</sup>; HL<sup>M202</sup>; LH<sup>L131</sup> - LH<sup>M160</sup>; LH<sup>L131</sup> - HL<sup>M202</sup>; LH<sup>L131</sup> - LH<sup>M160</sup> - FH<sup>M197</sup>; IT<sup>M265</sup>; EH<sup>M234</sup>; EL<sup>M234</sup>; EA<sup>M234</sup>; ER<sup>M234</sup>) compared to the wild type RC. The increase of the number of hydrogen bonds increases the intensity of the DL and the increase is stepwise: the triple mutant shows about twice as large increase as the double mutant relative to that of the wild type. The free energy levels of these hydrogen bond mutations span about 200 meV range.

In wild type RC, the  $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$  transition is primarily driven by enthalpy change and the entropic change has not much significance (Arata and Parson 1981b). The tendency is basically preserved in the donor side mutants where the enthalpic term remains dominant with slightly larger contribution of the entropic term upon increase of the number of hydrogen bonds. The acceptor side mutations show qualitative differences: the entropy change may become a significant driving force in the  $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$  transition even after single mutation. This observation could imply molecular rearrangements in the IT<sup>M265</sup> and in the series of EX<sup>M234</sup> (where X = H, L, A and R) mutants relative to that in wild type RC. These specific and transient molecular conformations are prerequisites of the transition (charge separation/recombination) in  $Q_A$  related mutations and seem to be absent in the donor side mutations.

As none of the mutations are accompanied by major structural changes, the observed energetic changes are attributed to slight modifications of the interactions between the cofactors (P and  $Q_A$ ) and the protein environment including the hydrogen bonds to P on the

periplasmic side and the extended hydrogen bond network on the cytoplasmic side of the RC.

*Induction and anisotropy of fluorescence of mutant and wild type reaction center from photosynthetic bacteria Rhodobacter sphaeroides*

As describe above, the mutation affects the energetics of the dimer, and the primary charge pair  $P^+Q_A^-$  is destabilized. The interaction between the BChl monomer (B) and the BChl dimer (P) should also change. To understand the energy transfer between the BChl dimer and BChl monomer deeper, the yield, the anisotropy and the induction of the prompt fluorescence of BChl were investigated by selective excitation of the dimer and the monomer. Using diode laser emitting at 808 nm, both B and the upper exciton state ( $P_+$ ) of the dimer in wild-type RC can be directly excited resulting in two well-defined fluorescence bands at 850 and 910 nm corresponding to radiative transitions from  $^1B^*$  and from  $^1P_-$  (the lower exciton state of the dimer) to the ground state, respectively. The kinetics of fluorescence induction observed at these wavelengths show remarkable changes. The opposite shapes of fluorescence kinetics with identical fall and rise times at 910 and 850 nm, respectively, serve as clear cut evidence for the electronic excitation energy transfer from  $^1B^*$  to the dimer.

The triple ( $LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}$ ) mutation of the amino acids close to the dimer does not change the near-IR absorption spectrum of the RC, but modifies the spectrum and the induction kinetics of the fluorescence significantly. While the yield of the B fluorescence at 850 nm decreases dramatically, the yield of the dimer fluorescence at 910 nm increases by a factor of two. The rate constant of light utilization for charge separation measured as the decay constant of the fluorescence induction at 910 nm is not modified upon mutation. However, the kinetics detected at 850 nm become significantly different.

The anisotropy of the fluorescence excited at 865 nm ( $P_-$ ) was very close to the limiting value (0.4) across the whole spectral range. The excitation of both B and  $P_-$  at 808 nm resulted in wavelength-dependent depolarization of the fluorescence from 0.35 to 0.24 in the wild type and from 0.30 to 0.24 in the reaction center of triple mutant. Our experiments indicated, however, that the major (prompt) fluorescence properties of the dimer – the spectrum, the orientation and strength of transition dipoles, the magnitude of the Stokes-shift – were hardly modified by the mutation. On the other hand, a significant drop of the yield of fluorescence related to the monomeric bacteriochlorophyll was experienced.

*Hg<sup>2+</sup> induced inhibition of photochemistry in the reaction center of Rba. sphaeroides*

Photosynthetic bacteria in their habitat are faced with a number of challenges, stress effects (e.g. high light intensity and presence of heavy metal ions). Heavy metal ions ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  etc.) have drastic effects on the redox processes of bacterial RC, among them the

bivalent mercury ion is particularly malignant. The decomposition of the various  $\text{Hg}^{2+}$ -induced effects into well-defined processes is a great challenge. My general aim was to study structural and functional changes of bacterial RC protein induced by  $\text{Hg}^{2+}$  ion and to map the specific binding sites. Isolated RCs from *Rba. sphaeroides* were exposed to  $\text{Hg}^{2+}$  ions up to saturation concentration ( $\sim 10^3$  [ $\text{Hg}^{2+}$ ]/[RC]) and the gradual time and concentration-dependent loss of the photochemical activity was monitored. The proton gate at the cytoplasmic site had the highest affinity for  $\text{Hg}^{2+}$  binding ( $K \sim 0.2$  ( $\mu\text{M}$ )<sup>-1</sup>) and blocked the proton uptake. Reduced affinity ( $K \sim 0.05$  ( $\mu\text{M}$ )<sup>-1</sup>) was measured for the  $\text{Hg}^{2+}$  binding site close to the secondary quinone that resulted in inhibition of the interquinone electron transfer. A similar affinity was observed close to the bacteriochlorophyll dimer causing slight energetic changes as evidenced by a  $\sim 30$  nm blue shift of the red absorption band, and a  $\sim 45$  meV increase in the redox midpoint potential. The  $\text{Hg}^{2+}$  ion does not modify the docking of the reduced cyt *c* to the RC nor the electron transfer from cyt  $c^{2+}$  to  $\text{P}^+$ . Bound to these sites reversibly, the  $\text{Hg}^{2+}$  ions can destroy hydrogen bond structures, inhibit protein dynamics, block conformational gating mechanisms and modify electrostatic profiles essential for electron and proton transfer.

#### *Photoprotection in intact cells of photosynthetic purple bacteria*

In addition to heavy metal ion contamination, strong light intensity also belongs to common environmental (stress) effects. The photosynthetic bacteria protect and operate their energy conversion system with remarkable efficiency and speed. An important part of this is the treatment of bacteriochlorophyll triplet ( $^3\text{BChl}$ ) proportional to the intensity of light intensity, which is essential for the survival of photosynthetic organisms. The energy of the BChl triplet state easily transmits to triplet oxygen  $^3\text{O}_2$  creating excited singlet oxygen  $^1\text{O}_2$  which is highly damaging to many cell constituents. To prevent the formation of the very reactive singlet oxygen, many mechanisms work in which carotenoid chromophores play a prominent role. The generation and lifetime of flash-induced carotenoid triplets ( $^3\text{Car}$ ) have been studied by observation of the quenching of bacteriochlorophyll (BChl) fluorescence in different strains of photosynthetic bacteria including *Rvx. gelatinosus* (anaerobic and semianaerobic), *Rsp. rubrum*, *Thio. roseopersicina*, *Rba. sphaeroides* 2.4.1 and carotenoid and cytochrome deficient mutants *Rba. sphaeroides* Ga, R-26 and *cycA*, respectively. The  $^3\text{Car}$  quenching is observed during and not exclusively after the photochemical rise of the fluorescence yield of BChl indicating that the charge separation in the reaction center (RC) and the carotenoid triplet formation are not consecutive but parallel processes. The photoprotective function of  $^3\text{Car}$  is not limited to the RC only and can be described by a model in which the carotenoids are distributed in the lake of the BChl pigments.

By measuring the quenching of BChl fluorescence, the carotenoid triplet lifetimes were determined in different bacterial strains. The observed lifetime of  $^3\text{Car}$  in intact cells

is the weighted average of the lifetimes of the carotenoids with various numbers of conjugated double bonds in the bacterial strain.

The lifetime of  $^3\text{Car}$  measured in the light is significantly shorter (1-2  $\mu\text{s}$ ) than that measured in the dark (2-10  $\mu\text{s}$ ). The difference reveals the importance of the dynamics of  $^3\text{Car}$  before relaxation and serves to enhance the effectiveness of light protection which is clearly consistent with the bacterial physiological need. The results are discussed not only in terms of energy levels of the  $^3\text{Car}$  but also in terms of the kinetics of transitions among different sublevels in the excited triplet state of the carotenoid.

---

## 8. Közlemények

### 8.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- [1] Onidas D., **Sipka G.**, Asztalos E., Maróti P. (2013) Mutational control of bioenergetics of bacterial reaction center probed by delayed fluorescence, *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 1827 1191-1199. IF=4,932; Biophysics D1
- [2] **Sipka G.**, Maróti P. (2016) Induction and anisotropy of fluorescence of reaction center from photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Photosynth. Res.*, 127 61-68. IF=3,864, Plant Science Q1
- [3] **Sipka G.**, Kis M., Maróti P. (2017) Emergence of mercury(II)-induced inhibition of photochemistry in the reaction center of photosynthetic bacteria, *Photosynth. Res.*, IF(2016)= 3,864, Plant Science Q1, *submitted*
- [4] **Sipka G.**, Kis M., Smart J., Maróti P. (2017) Fluorescence induction of photosynthetic bacteria, *Photosynthetica*. IF(2016)=1,507, Plant Science Q2, *in press*
- [5] **Sipka G.**, Maróti P. (2017) Photoprotection in intact cells of photosynthetic bacteria: quenching of bacteriochlorophyll fluorescence by carotenoid triplets, *Photosynth. Res.*, IF(2016)= 3,864, Plant Science Q1, *in press*

### 8.2. Egyéb közlemények

- 1. Kis M., **Sipka G.**, Maróti P. (2017) Stoichiometry and kinetics of mercury uptake by photosynthetic bacteria, *Photosynth. Res.* 132:(2) pp. 197-209. Plant Science Q1
- 2. Kis M., **Sipka G.**, Ayaydin F., Maróti P., (2017) The biophysics of a critical phenomenon: colonization and sedimentation of the photosynthetic *bacteria Rubrivivax gelatinosus*. *European Biophys. J.* doi:10.1007/s00249-017-1236-4
- 3. Asztalos E., **Sipka G.**, Maróti P. (2015) Fluorescence relaxation in intact cells of photosynthetic bacteria: donor and acceptor side limitations of reopening of the reaction center, *Photosynth. Res.*, 124 31-44. IF=4,122; Plant Science Q1
- 4. Kis M., **Sipka G.**, Asztalos E., Rázga Zs., Maróti P. (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses, *J. Photochem. Photobiol., Biology*, 151 110-117. IF=3,035; Biophysics Q2
- 5. Kis M., Asztalos E., **Sipka G.**, Maróti P. (2014) Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells, *Photosynth Res*, 122 261-273. IF=3,502; Plant Science Q1
- 6. Maróti P., Asztalos E., **Sipka G.** (2013) Fluorescence Assays for Photosynthetic Capacity of Bacteria, *Biophys. J.*, 104 545a-545a. IF=3,632; Biophysics Q1
- 7. 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.*, 112 129-140. IF=4,122; Plant Science Q1

---

## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Maróti Péter egyetemi tanárnak, hogy önálló tudományos munkára ösztönzött, valamint az iránymutatást és a sok segítséget, amit doktori disszertációm elkészítéséhez nyújtott.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Bari Ferencnek, az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy a Biofizika Tanszéken végezhessem a doktori disszertációm megírásához szükséges munkámat.

Köszönettel tartozom a Biofizika Tanszék többi dolgozójának is, különösen Dr. Kis Mariannak és Laskayné Tóth Juditnak, hogy munkájukkal és barátságukkal gördülékenyebbé tették számomra a munkát. Szeretnék külön köszönetet mondani Dr. Magyar Melindának barátságáért és mindazért a szakmai segítségért, amivel a disszertációm megírásához hozzájárult.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Garab Győzőnek (MTA SZBK Növénybiológiai Intézet), a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért, rendkívül értékes tanácsaiért és támogatásáért. Köszönettel tartozom a Fotoszintetikus Membrán Csoport valamennyi munkatársának.

Az anyagi támogatásért köszönöm az OTKA-K 67850, GINOP-2.3.2-15-2016-00001, OTKA-K 112688, Photosynthesis – Life from Light – Foundation, EFOP-3.6.2-16-2017-00001 pályázatoknak.

Végül, de nem utolsósorban azoknak mondok köszönetet, akik számomra a legfontosabbak. Köszönöm szeretett családomnak, hogy tanulmányaim során mindvégig támogattak és hittek bennem, hogy mindvégig jó úton tartottak és nehéz időkben is mellettem álltak, így segítve azzá lennem, aki most vagyok. Köszönöm feleségemnek, aki hajlandó volt sok esetben tolerálni a kutatómunka kiszámíthatatlan időbeosztását, hogy mindvégig támogatott, nélküle e dolgozat nem jött volna létre.

## 10. Irodalomjegyzék

- Adelroth P, Paddock ML, Sagle LB, Feher G, Okamura MY (2000) Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Both protons associated with reduction of  $Q_B$  to  $Q_BH_2$  share a common entry point. *P Natl Acad Sci USA* 97 (24):13086-13091. [doi:10.1073/pnas.230439597](https://doi.org/10.1073/pnas.230439597)
- Adir N, Axelrod HL, Beroza P, Isaacson RA, Rongey SH, Okamura MY, Feher G (1996) Co-crystallization and characterization of the photosynthetic reaction center cytochrome  $c_2$  complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 35 (8):2535-2547. [doi:10.1021/Bi9522054](https://doi.org/10.1021/Bi9522054)
- Alden RG, Johnson E, Nagarajan V, Parson WW, Law CJ, Cogdell RG (1997) Calculations of spectroscopic properties of the LH2 bacteriochlorophyll - Protein antenna complex from *Rhodopseudomonas acidophila*. *J Phys Chem B* 101 (23):4667-4680. [doi:10.1021/Jp970005r](https://doi.org/10.1021/Jp970005r)
- Alexov E, Miksovskaja J, Baciou L, Schiffer M, Hanson DK, Sebban P, Gunner MR (2000) Modeling the effects of mutations on the free energy of the first electron transfer from  $Q_A^-$  to  $Q_B$  in photosynthetic reaction centers. *Biochem* 39 (20):5940-5952. [doi:10.1021/Bi9929498](https://doi.org/10.1021/Bi9929498)
- Allen JP, Artz K, Lin X, Williams JC, Ivancich A, Albouy D, Mattioli TA, Fetsch A, Kuhn M, Lubitz W (1996) Effects of hydrogen bonding to a bacteriochlorophyll-bacteriopheophytin dimer in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 35 (21):6612-6619. [doi:10.1021/Bi9528311](https://doi.org/10.1021/Bi9528311)
- Allen JP, Feher G, Yeates TO, Komiya H, Rees DC (1988) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: protein-cofactor (quinones and  $Fe^{2+}$ ) interactions. *P Natl Acad Sci USA* 85 (22):8487-8491. [doi:10.1073/pnas.85.22.8487](https://doi.org/10.1073/pnas.85.22.8487)
- Allen JP, Williams JC (1995) Relationship between the oxidation potential of the bacteriochlorophyll dimer and electron transfer in photosynthetic reaction centers. *J Bioenerg Biomembr* 27 (3):275-283. [doi:10.1007/Bf02110097](https://doi.org/10.1007/Bf02110097)
- Angerhofer A, Bornhauser F, Gall A, Cogdell RJ (1995) Optical and Optically Detected Magnetic-Resonance Investigation on Purple Photosynthetic Bacterial Antenna Complexes. *Chem Phys* 194 (2-3):259-274. [doi:10.1016/0301-0104\(95\)00022-G](https://doi.org/10.1016/0301-0104(95)00022-G)
- Arata H, Parson WW (1981a) Delayed fluorescence from *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers - Enthalpy and free-energy changes accompanying electron-transfer from P870 to quinones. *Biochim Biophys Acta* 638 (2):201-209. [doi:10.1016/0005-2728\(81\)90228-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90228-0)
- Arata H, Parson WW (1981b) Delayed fluorescence from *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers - Enthalpy and free-energy changes accompanying electron transfer from P-870 to quinones. *Biochim Biophys Acta* 638 (2):201-209. [doi:10.1016/0005-2728\(81\)90228-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90228-0)
- Arata H, Parson WW (1981c) Enthalpy and volume changes accompanying electron transfer from P-870 to quinones in *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers. *Biochim Biophys Acta* 636 (1):70-81. [doi:10.1016/0005-2728\(81\)90077-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90077-3)
- Arnett DC, Moser CC, Dutton PL, Scherer NF (1999) The first events in photosynthesis: Electronic coupling and energy transfer dynamics in the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Phys Chem B* 103 (11):2014-2032. [doi:10.1021/Jp984464j](https://doi.org/10.1021/Jp984464j)
- Arnold W, Thompson J (1956) Delayed light production by blue-green algae, red algae, and purple bacteria. *J Gen Physiol* 39 (3):311-318. [doi:10.1085/jgp.39.3.311](https://doi.org/10.1085/jgp.39.3.311)

- 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 (9):1218-1223. [doi:10.1039/c0pp00040j](https://doi.org/10.1039/c0pp00040j)
- 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. [doi:10.1007/s11120-012-9749-2](https://doi.org/10.1007/s11120-012-9749-2)
- Axelrod HL, Abresch EC, Paddock ML, Okamura MY, Feher G (2000) Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  in bacterial reaction centers. *P Natl Acad Sci USA* 97 (4):1542-1547. [doi:10.1073/pnas.97.4.1542](https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1542)
- Bautista JA, Chynwat V, Cua A, Jansen FJ, Lugtenburg J, Gosztola D, Wasielewski MR, Frank HA (1998) The spectroscopic and photochemical properties of locked-15,15'-cis-spheroidene in solution and incorporated into the reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1. *Photosynth Res* 55 (1):49-65. [doi:10.1023/A:1005955425420](https://doi.org/10.1023/A:1005955425420)
- Becker&Hickl-GmbH (2001) MSA-200, MSA-300, MSA-1000 Ultrafast Photon Counters / Multiscalers. Operating Manuals. Becker & Hickl GmbH, Berlin, Germany
- Benkovic SJ, Hammes GG, Hammes-Schiffer S (2008) Free-energy landscape of enzyme catalysis. *Biochem* 47 (11):3317-3321. [doi:10.1021/bi800049z](https://doi.org/10.1021/bi800049z)
- Bensasson R, Land EJ, Maudinas B (1976) Triplet-States of Carotenoids from Photosynthetic Bacteria Studied by Nanosecond Ultraviolet and Electron Pulse Irradiation. *Photochem Photobiol* 23 (3):189-193. [doi:10.1111/j.1751-1097.1976.tb07240.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1976.tb07240.x)
- Blankenship RE (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 1st edn. Wiley-Blackwell. [doi:10.1002/9780470758472](https://doi.org/10.1002/9780470758472)
- Blankenship RE (2014) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 2nd edn. Wiley-Blackwell,
- Borland CF, Cogdell RJ, Land EJ, Truscott TG (1989) Bacteriochlorophyll Alpha-Triplet State and Its Interactions with Bacterial Carotenoids and Oxygen. *J Photoch Photobio B* 3 (2):237-245. [doi:10.1016/1011-1344\(89\)80065-X](https://doi.org/10.1016/1011-1344(89)80065-X)
- Breton J, Geacintov NE, Swenberg CE (1979) Quenching of Fluorescence by Triplet Excited-States in Chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 548 (3):616-635. [doi:10.1016/0005-2728\(79\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(79)90069-0)
- Bryant DA, Costas AM, Maresca JA, Chew AG, Klatt CG, Bateson MM, Tallon LJ, Hostetler J, Nelson WC, Heidelberg JF, Ward DM (2007) *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic Acidobacterium. *Science* 317 (5837):523-526. [doi:10.1126/science.1143236](https://doi.org/10.1126/science.1143236)
- Brzezinski P, Andreasson LE (1995) Trypsin treatment of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* in the dark and under illumination: protein structural changes follow charge separation. *Biochem* 34 (22):7498-7506. [doi:10.1021/bi00022a025](https://doi.org/10.1021/bi00022a025)
- Callis JB, Parson WW, Gouterman M (1972) Fast changes of enthalpy and volume on flash excitation of *Chromatium chromatophores*. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 267 (2):348-362. [doi:10.1016/0005-2728\(72\)90122-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(72)90122-3)
- Carithers RP, Parson WW (1975) Delayed fluorescence from *Rhodospseudomonas viridis* following single flashes. *Biochim Biophys Acta* 387 (2):194-211. [doi:10.1016/0005-2728\(75\)90103-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90103-6)
- Case GD, Parson WW (1971) Thermodynamics of the primary and secondary photochemical reactions in *Chromatium*. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 253 (1):187-202. [doi:10.1016/0005-2728\(71\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(71)90244-1)



- Cheap H, Bernad S, Derrien V, Gerencser L, Tandori J, de Oliveira P, Hanson DK, Peter M, Sebban P (2009) M234Glu is a component of the proton sponge in the reaction center from photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1787 (12):1505-1515. [doi:10.1016/j.bbabbio.2009.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.07.004)
- Cheap H, Tandori J, Derrien V, Benoit M, de Oliveira P, Koepke J, Lavergne J, Maróti P, Sebban P (2007) Evidence for delocalized anticooperative flash induced proton binding as revealed by mutants at the M266His iron ligand in bacterial reaction centers. *Biochem* 46 (15):4510-4521. [doi:10.1021/bi602416s](https://doi.org/10.1021/bi602416s)
- Chen L, Holten D, Bocian DF, Kirmaier C (2004) Effects of hydrogen bonding and structure of the accessory bacteriochlorophylls on charge separation in *Rb. capsulatus* reaction center. *J Phys Chem B* 108 (29):10457-10464. [doi:10.1021/jp049939n](https://doi.org/10.1021/jp049939n)
- Chi SC, Mothersole DJ, Dilbeck P, Niedzwiedzki DM, Zhang H, Qian P, Vasilev C, Grayson KJ, Jackson PJ, Martin EC, Li Y, Holten D, Hunter CN (2015) Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1847 (2):189-201. [doi:10.1016/j.bbabbio.2014.10.004](https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2014.10.004)
- Claes H, Nakayama TOM (1959) Das photooxydative Ausbleichen von Chlorophyll in vitro in Gegenwart von Carotin mit verschiedenen Chromophoren Gruppen. *Z Naturforsch* 14b:746-747
- Clayton RK (1965) Characteristics of fluorescence and delayed light emission from green photosynthetic bacteria and algae. *J Gen Physiol* 48:633-646. [doi:10.1085/jgp.48.4.633](https://doi.org/10.1085/jgp.48.4.633)
- Clayton RK (1966) Relations between photochemistry and fluorescence in cells and extracts of photosynthetic bacteria. *Photochem Photobiol* 5 (10):807-821. [doi:10.1111/j.1751-1097.1966.tb05776.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1966.tb05776.x)
- Clayton RK, Clayton BJ (1981) B850 pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides* - extinction coefficients, circular-dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll. *P Natl Acad Sci-Biol* 78 (9):5583-5587. [doi:10.1073/pnas.78.9.5583](https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5583)
- Cogdell RJ (1978) Carotenoids in Photosynthesis. *Philos T Roy Soc B* 284 (1002):569-579. [doi:10.1098/rstb.1978.0090](https://doi.org/10.1098/rstb.1978.0090)
- Cogdell RJ, Frank HA (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta* 895 (2):63-79. [doi:10.1016/S0304-4173\(87\)80008-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4173(87)80008-3)
- Cogdell RJ, Gardiner AT, Roszak AW, Law CJ, Southall J, Isaacs NW (2004) Rings, ellipses and horseshoes: how purple bacteria harvest solar energy. *Photosynth Res* 81 (3):207-214. [doi:10.1023/B:PRES.0000036883.56959.a9](https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000036883.56959.a9)
- Cogdell RJ, Howard TD, Bittl R, Schlodder E, Geisenheimer I, Lubitz W (2000) How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *Philos T Roy Soc B* 355 (1402):1345-1349. [doi:10.1098/rstb.2000.0696](https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0696)
- Cser K, Vass I (2007) Radiative and non-radiative charge recombination pathways in Photosystem II studied by thermoluminescence and chlorophyll fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Biochim Biophys Acta* 1767 (3):233-243. [doi:10.1016/j.bbabbio.2007.01.022](https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.01.022)
- Damjanovic A, Ritz T, Schulten K (2000) Excitation energy trapping by the reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Quantum Chem* 77 (1):139-151. [doi:10.1002/\(Sici\)1097-461x\(2000\)77:1<139::Aid-Qua13>3.0.Co;2-S](https://doi.org/10.1002/(Sici)1097-461x(2000)77:1<139::Aid-Qua13>3.0.Co;2-S)
- Daviso E, Prakash S, Alia A, Gast P, Neugebauer J, Jeschke G, Matysik J (2009) The electronic structure of the primary electron donor of reaction centers of purple

- bacteria at atomic resolution as observed by photo-CIDNP C-13 NMR. *P Natl Acad Sci USA* 106 (52):22281-22286. [doi:10.1073/pnas.0908608106](https://doi.org/10.1073/pnas.0908608106)
- de Rivoyre M, Ginet N, Bouyer P, Lavergne J (2010) Excitation transfer connectivity in different purple bacteria: a theoretical and experimental study. *Biochim Biophys Acta* 1797 (11):1780-1794. [doi:10.1016/j.bbambio.2010.07.011](https://doi.org/10.1016/j.bbambio.2010.07.011)
- Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H (1984) X-ray structure-analysis of a membrane-protein complex - electron-density map at 3Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* 180 (2):385-398. [doi:10.1016/S0022-2836\(84\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(84)80011-X)
- Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* 318 (6047):618-624. [doi:10.1038/318618a0](https://doi.org/10.1038/318618a0)
- DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System *DeLano Scientific*. Palo Alto, CA, USA
- Delosme R (2005) On some aspects of photosynthesis revealed by photoacoustic studies: a critical evaluation. In: Govindjee, Beatty JT, Gest H, Allen JP (eds) *Discoveries in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 20. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 651-663. [doi:10.1007/1-4020-3324-9\\_58](https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9_58)
- Deng C, Zhang D, Pan X, Chang F, Wang S (2013) Toxic effects of mercury on PSI and PSII activities, membrane potential and transthylakoid proton gradient in *Microsorium pteropus*. *J Photochem Photobiol B* 127:1-7. [doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.07.012)
- Deshmukh SS (2013) Molecular assignment of light-induced structural changes using site-directed mutant reaction centers. Concordia University, Montreal, Quebec, Canada, (Ph. D.),
- Deshmukh SS, Williams JC, Allen JP, Kálmán L (2011) Light-induced conformational changes in photosynthetic reaction centers: redox-regulated proton pathway near the dimer. *Biochem* 50 (16):3321-3331. [doi:10.1021/bi200169y](https://doi.org/10.1021/bi200169y)
- Dominguez PN, Himmelstoss M, Michelmann J, Lehner FT, Gardiner AT, Cogdell RJ, Zinth W (2014) Primary reactions in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* - Time constants of the initial electron transfer. *Chem Phys Lett* 601:103-109. [doi:10.1016/j.cplett.2014.03.085](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.03.085)
- Drews G, Golecki JR (1995) Structure, Molecular Organization, and Biosynthesis of Membranes of Purple Bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, vol 2. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Kluwer Academic Publishers, pp 231-257. [doi:10.1007/0-306-47954-0\\_12](https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_12)
- Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD (eds) (2012) *Photosynthesis - Plastid biology, energy conversion and carbon assimilation. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 34. Springer, Netherlands. [doi:10.1007/978-94-007-1579-0](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1579-0)
- Ebrey TG, Clayton RK (1969) Polarization of fluorescence from bacterio-chlorophyll in castor oil, in chromatophores and as P870 in photosynthetic reaction centers. *Photochem Photobiol* 10 (2):109-117. [doi:10.1111/j.1751-1097.1969.tb07227.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1969.tb07227.x)
- Edens GJ, Gunner MR, Xu Q, Mauzerall D (2000) The enthalpy and entropy of reaction for formation of P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> from excited reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Am Chem Soc* 122 (7):1479-1485. [doi:10.1021/Ja991791b](https://doi.org/10.1021/Ja991791b)
- Englman R, Jortner J (1970) The energy gap law for radiationless transitions in large molecules. *Mol Phys* 18 (2):145-164. [doi:10.1080/00268977000100171](https://doi.org/10.1080/00268977000100171)
- Farhoosh R, Chynwat V, Gebhard R, Lugtenburg J, Frank HA (1994) Triplet Energy-Transfer between Bacteriochlorophyll and Carotenoids in B850 Light-Harvesting

- Complexes of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1. Photosynth Res 42 (2):157-166. [doi:10.1007/Bf02187126](https://doi.org/10.1007/Bf02187126)
- Farhoosh R, Chynwat V, Gebhard R, Lugtenburg J, Frank HA (1997) Triplet energy transfer between the primary donor and carotenoids in *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1 reaction centers incorporated with spheroidene analogs having different extents of pi-electron conjugation. Photochem Photobiol 66 (1):97-104. [doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb03144.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03144.x)
- FASTComTech-GmbH Model P7882, PCI-based, 350 MHz Dual Input Multiscaler/TOF/Photon Counter. Operating Manuals. FASTComTech GmbH, Oberhaching, Germany
- Filus Z, Laczkó G, Wraight CA, Maróti P (2004) Delayed fluorescence from the photosynthetic reaction center measured by electronic gating of the photomultiplier. Biopolymers 74 (1-2):92-95. [doi:10.1002/bip.20051](https://doi.org/10.1002/bip.20051)
- Flores M, Savitsky A, Paddock ML, Abresch EC, Dubinskii AA, Okamura MY, Lubitz W, Mobius K (2010) Electron–nuclear and electron–electron double resonance spectroscopies show that the primary quinone acceptor Q<sub>A</sub> in reaction centers from photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* remains in the same orientation upon light-induced reduction. J Phys Chem B 114 (50):16894-16901. [doi:10.1021/jp107051r](https://doi.org/10.1021/jp107051r)
- Foote CS, Denny RW (1968) Chemistry of Singlet Oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -Carotene. J Am Chem Soc 90:6233-6235. [doi:10.1021/ja01024a061](https://doi.org/10.1021/ja01024a061)
- Formaggio E, Cinque G, Bassi R (2001) Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. J Mol Biol 314 (5):1157-1166. [doi:10.1006/jmbi.2000.5179](https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.5179)
- Fraser NJ, Hashimoto H, Cogdell RJ (2001) Carotenoids and bacterial photosynthesis: The story so far ... Photosynth Res 70 (3):249-256. [doi:10.1023/A:1014715114520](https://doi.org/10.1023/A:1014715114520)
- Frauenfelder H, Chen G, Berendzen J, Fenimore PW, Jansson H, McMahon BH, Stroe IR, Swenson J, Young RD (2009) A unified model of protein dynamics. P Natl Acad Sci USA 106 (13):5129-5134. [doi:10.1073/pnas.0900336106](https://doi.org/10.1073/pnas.0900336106)
- Freer A, Prince S, Sauer K, Papiz M, HawthornthwaiteLawless A, McDermott G, Cogdell R, Isaacs NW (1996) Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. Structure 4 (4):449-462. [doi:10.1016/S0969-2126\(96\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00050-0)
- Gall A, Berera R, Alexandre MT, Pascal AA, Bordes L, Mendes-Pinto MM, Andrianambinintsoa S, Stoitchkova KV, Marin A, Valkunas L, Horton P, Kennis JT, van Grondelle R, Ruban A, Robert B (2011) Molecular adaptation of photoprotection: triplet states in light-harvesting proteins. Biophys J 101 (4):934-942. [doi:10.1016/j.bpj.2011.05.057](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.057)
- Gall A, Iliaia C, Kruger TP, Novoderezhkin VI, Robert B, van Grondelle R (2015) Conformational switching in a light-harvesting protein as followed by single-molecule spectroscopy. Biophys J 108 (11):2713-2720. [doi:10.1016/j.bpj.2015.04.017](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.017)
- Gerencsér L, Maróti P (2001) Retardation of proton transfer caused by binding of the transition metal ion to the bacterial reaction center is due to pK<sub>a</sub> shifts of key protonatable residues. Biochem 40 (6):1850-1860. [doi:10.1021/bi0021636](https://doi.org/10.1021/bi0021636)
- Giotta L, Agostiano A, Italiano F, Milano F, Trotta M (2006) Heavy metal ion influence on the photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. Chemosphere 62 (9):1490-1499. [doi:10.1016/j.chemosphere.2005.06.014](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.014)

- Glaeser J, Klug G (2005) Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiol-Sgm* 151:1927-1938. [doi:10.1099/mic.0.27789-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.27789-0)
- Goedheer JC (1963) A cooperation of two pigment systems and respiration in photosynthetic luminescence. *Biochim Biophys Acta* 66:61-71. [doi:10.1016/0006-3002\(63\)91167-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91167-3)
- Gouterman M, Wagnière GH (1963) Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. *J Mol Spectrosc* 11 (1-6):108-127. [doi:10.1016/0022-2852\(63\)90011-0](https://doi.org/10.1016/0022-2852(63)90011-0)
- Govindjee, Beatty JT, Gest H, Allen JP (eds) (2005) Discoveries in Photosynthesis. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 20. Springer, Netherlands. [doi:10.1007/1-4020-3324-9](https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9)
- Gradinaru CC, Kennis JTM, Papagiannakis E, van Stokkum IHM, Cogdell RJ, Fleming GR, Niederman RA, van Grondelle R (2001) An unusual pathway of excitation energy deactivation in carotenoids: Singlet-to-triplet conversion on an ultrafast timescale in a photosynthetic antenna. *P Natl Acad Sci USA* 98 (5):2364-2369. [doi:10.1073/pnas.051501298](https://doi.org/10.1073/pnas.051501298)
- Graige MS, Paddock ML, Bruce JM, Feher G, Okamura MY (1996) Mechanism of proton-coupled electron transfer for quinone Q<sub>B</sub> reduction in reaction centers of *Rb sphaeroides*. *J Am Chem Soc* 118 (38):9005-9016. [doi:10.1021/Ja960056m](https://doi.org/10.1021/Ja960056m)
- Grayson KJ, Faries KM, Huang X, Qian P, Dilbeck P, Martin EC, Hitchcock A, Vasilev C, Yuen JM, Niedzwiedzki DM, Leggett GJ, Holten D, Kirmaier C, Hunter CN (2017) Augmenting light coverage for photosynthesis through YFP-enhanced charge separation at the *Rhodobacter sphaeroides* reaction centre. *Nat Commun* 8. [doi:10.1038/Ncomms13972](https://doi.org/10.1038/Ncomms13972)
- Gregoire DS, Poulain AJ (2014) A little bit of light goes a long way: the role of phototrophs on mercury cycling. *Metallomics* 6 (3):396-407. [doi:10.1039/c3mt00312d](https://doi.org/10.1039/c3mt00312d)
- Griffiths M, Sistrom WR, Cohenbazire G, Stanier RY, Calvin M (1955) Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature* 176 (4495):1211-1215. [doi:10.1038/1761211a0](https://doi.org/10.1038/1761211a0)
- Guo Z, Woodbury NW, Pan J, Lin S (2012) Protein Dielectric Environment Modulates the Electron-Transfer Pathway in Photosynthetic Reaction Centers. *Biophys J* 103 (9):1979-1988. [doi:10.1016/j.bpj.2012.09.027](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.09.027)
- Halas A, Orzechowska A, Derrien V, Chumakov AI, Sebban P, Fiedor J, Lipinska M, Zajac M, Slezak T, Strzalka K, Matlak K, Korecki J, Fiedor L, Burda K (2012) The dynamics of the non-heme iron in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 1817 (12):2095-2102. [doi:10.1016/j.bbabi.2012.08.003](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.08.003)
- Hashimoto H, Fujii R, Yanagi K, Kusumoto T, Gardiner AT, Cogdell RJ, Roszak AW, Issacs NW, Pendon Z, Niedzwiedski D, Frank HA (2006) Structures and functions of carotenoids bound to reaction centers from purple photosynthetic bacteria. *Pure Appl Chem* 78 (8):1505-1518. [doi:10.1351/pac200678081505](https://doi.org/10.1351/pac200678081505)
- Hess S, Chachisvilis M, Timpmann K, Jones MR, Fowler GJS, Hunter CN, Sundstrom V (1995) Temporally and spectrally resolved subpicosecond energy transfer within the peripheral antenna complex (LH2) and from LH2 to the core antenna complex in photosynthetic purple bacteria. *P Natl Acad Sci USA* 92 (26):12333-12337. [doi:10.1073/pnas.92.26.12333](https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.12333)
- Hou HJM, Mauzerall D (2006) The A-F<sub>x</sub> to F<sub>A/B</sub> step in *Synechocystis* 6803 photosystem I is entropy driven. *J Am Chem Soc* 128 (5):1580-1586. [doi:10.1021/ja054870y](https://doi.org/10.1021/ja054870y)



- Hou JM (2011) Enthalpy, entropy, and volume changes of electron transfer reactions in photosynthetic proteins. In: Tadashi M (ed) Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science. InTech, pp 93-110. [doi:10.5772/13147](https://doi.org/10.5772/13147)
- Hou JM, Boichenko VA, Diner BA, Mauzerall D (2001a) Thermodynamics of electron transfer in oxygenic photosynthetic reaction centers: Volume change, enthalpy, and entropy of electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II core complexes. *Biochem* 40 (24):7117-7125. [doi:10.1021/bi010373s](https://doi.org/10.1021/bi010373s)
- Hou JM, Boichenko VA, Wang YC, Chitnis PR, Mauzerall D (2001b) Thermodynamics of electron transfer in oxygenic photosynthetic reaction centers: A pulsed photoacoustic study of electron transfer in photosystem I reveals a similarity to bacterial reaction centers in both volume change and entropy. *Biochem* 40 (24):7109-7116. [doi:10.1021/Bi0103720](https://doi.org/10.1021/Bi0103720)
- Huang B, Schroeder M (2006) LIGSITE<sup>csc</sup>: predicting ligand binding sites using the Connolly surface and degree of conservation. *BMC Struct Biol* 6:19. [doi:10.1186/1472-6807-6-19](https://doi.org/10.1186/1472-6807-6-19)
- Imhoff JF (2006a) The Chromatiaceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. 3th edn. Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp 846-873
- Imhoff JF (2006b) The Family Ectothiorhodospiraceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. 3th edn. Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp 874-886. [doi:10.1007/0-387-30746-X\\_32](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_32)
- Imhoff JF (2006c) The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. 3th edn. Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp 41-64. [doi:10.1007/0-387-30745-1\\_2](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_2)
- Imhoff JF (2006d) The Phototrophic Beta-Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. 3th edn. Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp 593-601. [doi:10.1007/0-387-30745-1\\_25](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_25)
- Imhoff JF (2014) The Family *Chlorobiaceae*. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds) The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea. 4th edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 501-514. [doi:10.1007/978-3-642-38954-2\\_142](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_142)
- Jonas DM, Lang MJ, Nagasawa Y, Joo T, Fleming GR (1996) Pump-probe polarization anisotropy study of femtosecond energy transfer within the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* R26. *J Phys Chem-Us* 100 (30):12660-12673. [doi:10.1021/jp960708t](https://doi.org/10.1021/jp960708t)
- Kakitani Y, Akahane J, Ishii H, Sogabe H, Nagae H, Koyama Y (2007a) Conjugation-length dependence of the T1 lifetimes of carotenoids free in solution and incorporated into the LH2, LH1, RC, and RC-LH1 complexes: possible mechanisms of triplet-energy dissipation. *Biochem* 46 (8):2181-2197. [doi:10.1021/bi062237z](https://doi.org/10.1021/bi062237z)
- Kakitani Y, Fujii R, Hayakawa Y, Kurahashi M, Koyama Y, Harada J, Shimada K (2007b) Selective binding of carotenoids with a shorter conjugated chain to the LH2 antenna complex and those with a longer conjugated chain to the reaction center from *Rubrivivax gelatinosus*. *Biochem* 46 (24):7302-7313. [doi:10.1021/bi602485x](https://doi.org/10.1021/bi602485x)
- Kakitani Y, Fujii R, Koyama Y, Nagae H, Walker L, Salter B, Angerhofer A (2006) Triplet-state conformational changes in 15-cis-spheroidene bound to the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 as revealed by time-resolved EPR

- spectroscopy: Strengthened hypothetical mechanism of triplet-energy dissipation. *Biochem* 45 (7):2053-2062. [doi:10.1021/bi0511538](https://doi.org/10.1021/bi0511538)
- Kakitani Y, Hou A, Miyasako Y, Koyama Y, Nagae H (2010) Rates of the initial two steps of electron transfer in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* as determined by singular-value decomposition followed by global fitting. *Chem Phys Lett* 492 (1-3):142-149. [doi:10.1016/j.cplett.2010.03.071](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.03.071)
- Kálmán L, LoBrutto R, Allen JP, Williams JC (2003) Manganese oxidation by modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 42 (37):11016-11022. [doi:10.1021/bi034747o](https://doi.org/10.1021/bi034747o)
- Kálmán L, Narvaez AJ, LoBrutto R, Williams JC, Allen JP (2004) Dependence of tyrosine oxidation in highly oxidizing bacterial reaction centers on pH and free-energy differences. *Biochem* 43 (40):12905-12912. [doi:10.1021/bi0362727](https://doi.org/10.1021/bi0362727)
- Kalman L, Williams JC, Allen JP (2011) Energetics for oxidation of a bound manganese cofactor in modified bacterial reaction centers. *Biochem* 50 (16):3310-3320. [doi:10.1021/bi1017478](https://doi.org/10.1021/bi1017478)
- Katiliene Z, Katilius E, Woodbury NW (2003) Energy trapping and detrapping in reaction center mutants from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys J* 84 (5):3240-3251. [doi:10.1016/S0006-3495\(03\)70048-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70048-4)
- Kim H (2007) Discovery of novel photoprotection mechanisms in photosynthesis using optical spectroscopy and biosensor development. Purdue University, (Ph.D.),
- Kirmaier C, Holten D, Bylina EJ, Youvan DC (1988) Electron transfer in a genetically modified bacterial reaction center containing a heterodimer. *P Natl Acad Sci USA* 85 (20):7562-7566. [doi:10.1073/pnas.85.20.7562](https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7562)
- Kis M, Asztalos E, Sipka G, Maróti P (2014) Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells. *Photosynth Res* 122 (3):261-273. [doi:10.1007/s11120-014-0026-4](https://doi.org/10.1007/s11120-014-0026-4)
- Kis M, Sipka G, Asztalos E, Rázga Z, Maróti P (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses. *J Photochem Photobiol B* 151:110-117. [doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.07.017](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.017)
- Kis M, Sipka G, Maróti P (2017) Stoichiometry and kinetics of mercury uptake by photosynthetic bacteria. *Photosynth Res* 132 (2):197-209. [doi:10.1007/s11120-017-0357-z](https://doi.org/10.1007/s11120-017-0357-z)
- Kleinfeld D, Okamura MY, Fcher G (1985) Electron transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. II. Free energy and kinetic relations between the acceptor states  $Q_A^-$   $Q_B^-$  and  $QAQ_B^{2-}$ . *Biochim Biophys Acta* 809 (3):291-310. [doi:10.1016/0005-2728\(85\)90179-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(85)90179-3)
- Kleinfeld D, Okamura MY, Feher G (1984) Electron-transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Determination of the charge recombination pathway of  $D^+QAQ_B^-$  and free-energy and kinetic relations between  $Q_A^-Q_B^-$  and  $QAQ_B^-$ . *Biochim Biophys Acta* 766 (1):126-140. [doi:10.1016/0005-2728\(84\)90224-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90224-X)
- Klenina IB, Makhneva ZK, Moskalenko AA, Gudkov ND, Bolshakov MA, Pavlova EA, Proskuryakov II (2014) Singlet-triplet fission of carotenoid excitation in light-harvesting LH2 complexes of purple phototrophic bacteria. *Biochem-Moscow* 79 (3):235-241. [doi:10.1134/S0006297914030092](https://doi.org/10.1134/S0006297914030092)
- Klenina IB, Makhneva ZK, Moskalenko AA, Kuz'min AN, Proskuriakov, II (2013) Singlet-triplet excitation fission in light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria and in isolated carotenoids. *Biofizika* 58 (1):54-63. [doi:10.1134/S0006350913010077](https://doi.org/10.1134/S0006350913010077)

- Knapp EW, Fischer SF, Zinth W, Sander M, Kaiser W, Deisenhofer J, Michel H (1985) Analysis of optical spectra from single crystals of *Rhodopseudomonas viridis* reaction centers. P Natl Acad Sci USA 82 (24):8463-8467. [doi:10.1073/pnas.82.24.8463](https://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8463)
- Kobayashi M, Ohashi S, Iwamoto K, Shiraiwa Y, Kato Y, Watanabe T (2007) Redox potential of chlorophyll *d* in vitro. Biochim Biophys Acta 1767 (6):596-602. [doi:10.1016/j.bbabi.2007.02.015](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.02.015)
- Koblizek M, Shih JD, Breitbart SI, Ratcliffe EC, Kolber ZS, Hunter CN, Niederman RA (2005) Sequential assembly of photosynthetic units in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by fast repetition rate analysis of variable bacteriochlorophyll a fluorescence. Biochim Biophys Acta 1706 (3):220-231. [doi:10.1016/j.bbabi.2004.11.004](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.11.004)
- Kocsis P, Asztalos E, Gingl Z, Maróti P (2010) Kinetic bacteriochlorophyll fluorometer. Photosynth Res 105 (1):73-82. [doi:10.1007/s11120-010-9556-6](https://doi.org/10.1007/s11120-010-9556-6)
- Koepke J, Hu XC, Muenke C, Schulten K, Michel H (1996) The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*. Structure 4 (5):581-597. [doi:10.1016/S0969-2126\(96\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00063-9)
- Koepke J, Krammer EM, Klingenberg AR, Sebban P, Ullmann GM, Fritzsche G (2007) pH modulates the quinone position in the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* in the neutral and charge separated states. J Mol Biol 371 (2):396-409. [doi:10.1016/j.jmb.2007.04.082](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.082)
- Kolaczowski SV (1989) On the mechanism of triplet energy transfer from the triplet primary donor to spheroidene in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. . Brown University, Providence, Rhode Island, (Ph.D.),
- Kosumi D, Horibe T, Sugisaki M, Cogdell RJ, Hashimoto H (2016) Photoprotection mechanism of light-harvesting antenna complex from purple bacteria. J Phys Chem B 120 (5):951-956. [doi:10.1021/acs.jpcc.6b00121](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00121)
- Koyama Y (1991) New trends in photobiology: Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems. J Photoch Photobio B 9 (3-4):265-280. [doi:10.1016/1011-1344\(91\)80165-E](https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80165-E)
- Koyama Y, Fujii R (1999) *Cis-Trans* Carotenoids in Photosynthesis: Configurations, Excited-State Properties and Physiological Functions. In: Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell RJ (eds) The Photochemistry of Carotenoids. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 8. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 161-188. [doi:10.1007/0-306-48209-6\\_9](https://doi.org/10.1007/0-306-48209-6_9)
- Koyama Y, Kakitani Y (2006) Mechanisms of Carotenoid-to-Bacteriochlorophyll Energy Transfer in the Light Harvesting Antenna Complexes 1 and 2: Dependence on the Conjugation Length of Carotenoids. In: Grimm B, Porra RJ, Rüdiger W, Scheer H (eds) Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 25. Springer Netherlands, pp 431-443. [doi:10.1007/1-4020-4516-6\\_30](https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_30)
- Koyama Y, Kakitani Y, Watanabe Y (2007) Photophysical Properties and Light-Harvesting and Photoprotective Functions of Carotenoids in Bacterial Photosynthesis: Structural Selections. In: Renger G (ed) Primary Processes of Photosynthesis, Part 1: Principles and Apparatus, vol 8. pp 151-201. [doi:10.1039/9781847558152-00151](https://doi.org/10.1039/9781847558152-00151)
- Lang HP, Hunter CN (1994) The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in *Rhodobacter sphaeroides*. Biochem J 298:197-205. [doi:10.1042/bj2980197](https://doi.org/10.1042/bj2980197)

- LeBard DN, Kapko V, Matyushov DV (2008) Energetics and kinetics of primary charge separation in bacterial photosynthesis. *J Phys Chem B* 112 (33):10322-10342. [doi:10.1021/jp8016503](https://doi.org/10.1021/jp8016503)
- Li J, Gilroy D, Tiede DM, Gunner MR (1998) Kinetic phases in the electron transfer from  $P^+Q_A^-Q_B^-$  to  $P^+Q_AQ_B^-$  and the associated processes in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers. *Biochem* 37 (9):2818-2829. [doi:10.1021/bi971699x](https://doi.org/10.1021/bi971699x)
- Lin X, Murchison HA, Nagarajan V, Parson WW, Allen JP, Williams JC (1994) Specific alteration of the oxidation potential of the electron-donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *P Natl Acad Sci USA* 91 (22):10265-10269. [doi:10.1073/pnas.91.22.10265](https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10265)
- Madigan MT, Ormerod JG (1995) Taxonomy, Physiology and Ecology of Heliobacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 17-30. [doi:10.1007/0-306-47954-0\\_2](https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_2)
- Magdaong NCM (2015) Spectroscopy and Photophysics of Carotenoids in Solution and in Light-harvesting Pigment-Protein Complexes. University of Connecticut, (Ph.D.),
- Malferrari M, Turina P, Francia F, Mezzetti A, Leibl W, Venturoli G (2015) Dehydration affects the electronic structure of the primary electron donor in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence from visible-NIR and light-induced difference FTIR spectroscopy. *Photochem Photobiol Sci* 14 (2):238-251. [doi:10.1039/c4pp00245h](https://doi.org/10.1039/c4pp00245h)
- Malkin S (1977) Delayed Luminescence. In: Trebst A, Avron M (eds) *Photosynthesis I - Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation*. Encyclopedia of Plant Physiology, vol 5. Springer Berlin, pp 473-491. [doi:10.1007/978-3-642-66505-9\\_35](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66505-9_35)
- Malkin S, Canaani O (1994) The use and characteristics of the photoacoustic method in the study of photosynthesis. *Annu Rev Plant Phys* 45:493-526. [doi:10.1146/annurev.pp.45.060194.002425](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.002425)
- Mandal S, Carey AM, Locsin J, Gao BR, Williams JC, Allen JP, Lin S, Woodbury NW (2017) Mechanism of triplet energy transfer in photosynthetic bacterial reaction centers. *The journal of physical chemistry B*. [doi:10.1021/acs.jpcb.7b03373](https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b03373)
- Marcus RA (1963) Free energy of nonequilibrium polarization systems. III. Statistical mechanics of homogeneous and electrode systems. *The Journal of Chemical Physics* 39 (7):1734-1740. [doi:10.1063/1.1734522](https://doi.org/10.1063/1.1734522)
- Marcus RA, Sutin N (1985) *Electron Transfers in Chemistry and Biology*. *Biochim Biophys Acta* 811 (3):265-322. [doi:10.1016/0304-4173\(85\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0304-4173(85)90014-X)
- Maróti P (1993) Flash-induced proton transfer in photosynthetic bacteria. *Photosynth Res* 37 (1):1-17. [doi:10.1007/Bf02185435](https://doi.org/10.1007/Bf02185435)
- Maróti P, Asztalos E, Sipka G (2013) Fluorescence Assays for Photosynthetic Capacity of Bacteria. *Biophys J* 104 (2):545a-545a. [doi:10.1016/j.bpj.2012.11.3017](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3017)
- Maróti P, Trotta M (2012) Artificial photosynthetic systems. In: Griesbeck A, Oelgemöller M, Ghetti F (eds) *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*. 3rd edn. CRC Press pp 1289–1324. [doi:10.1201/b12252-56](https://doi.org/10.1201/b12252-56)
- Maróti P, Wraight CA (1988a) Flash-induced  $H^+$  binding by bacterial photosynthetic reaction centers - comparison of spectrophotometric and conductimetric methods. *Biochim Biophys Acta* 934 (3):314-328. [doi:10.1016/0005-2728\(88\)90091-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90091-6)
- Maróti P, Wraight CA (1988b) Flash-induced  $H^+$  binding by bacterial photosynthetic reaction centers - influences of the redox states of the acceptor quinones and primary donor. *Biochim Biophys Acta* 934 (3):329-347. [doi:10.1016/0005-2728\(88\)90092-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90092-8)



- Maróti P, Wraight CA (1990) Kinetic correlation between  $H^+$ -Binding, semiquinone disappearance and quinol formation in reaction centers of *Rb. sphaeroides*. In: Baltscheffsky M (ed) Current Research in Photosynthesis. Springer, Dordrecht, pp 165-168. [doi:10.1007/978-94-009-0511-5\\_35](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0511-5_35)
- Maróti P, Wraight CA (1997) Kinetics of  $H^+$  ion binding by the  $P^+Q_A^-$  state of bacterial photosynthetic reaction centers: Rate limitation within the protein. *Biophys J* 73 (1):367-381. [doi:10.1016/S0006-3495\(97\)78077-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78077-9)
- Martin EW (2011) The binding pockets of  $Q_A$  and  $Q_B$  in the photosynthetic reaction center of *Rba. sphaeroides* probed by pulsed EPR. University of Illinois, Urbana-Champaign, USA, (Ph.D.), <http://hdl.handle.net/2142/24256>
- Mathis P, Kleo J (1973) The triplet state of  $\beta$ -carotene and of analog polyenes of different length. *Photochem Photobiol* 18:343-346. [doi:10.1111/j.1751-1097.1973.tb06431.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1973.tb06431.x)
- Mauzerall D (1976) Multiple excitations in photosynthetic systems. *Biophys J* 16 (1):87-91. [doi:10.1016/S0006-3495\(76\)85665-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85665-2)
- Maxime A, van Grondelle R (2012) Time-Resolved FTIR Difference Spectroscopy Reveals the Structure and Dynamics of Carotenoid and Chlorophyll Triplets in Photosynthetic Light-Harvesting Complexes. In: Prof. Theophile T (ed) Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences. InTech. [doi:10.5772/36178](https://doi.org/10.5772/36178)
- McPherson PH, Nagarajan V, Parson WW, Okamura MY, Feher G (1990) pH dependence of the free energy gap between  $DQ_A$  and  $D^+Q_A^-$  determined from delayed fluorescence in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Biochim Biophys Acta* 1019 (1):91-94. [doi:10.1016/0005-2728\(90\)90128-Q](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90128-Q)
- McPherson PH, Okamura MY, Feher G (1988) Light-induced proton uptake by photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter-sphaeroides* R-26 .1. Protonation of the one-electron states  $D^+Q_A^-$ ,  $DQ_A^-$ ,  $D^+Q_AQ_B^-$ , and  $DQ_AQ_B^-$ . *Biochim Biophys Acta* 934 (3):348-368. [doi:10.1016/0005-2728\(88\)90093-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90093-X)
- McPherson PH, Schonfeld M, Paddock ML, Okamura MY, Feher G (1994) Protonation and free-energy changes associated with formation of  $Q_BH_2$  in native and Glu-L212-Gln mutant reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 33 (5):1181-1193. [doi:10.1021/Bi00171a018](https://doi.org/10.1021/Bi00171a018)
- Michel-Beyerle ME, Plato M, Deisenhofer J, Michel H, Bixon M, Jortner J (1988) Unidirectionality of Charge Separation in Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria. *Biochim Biophys Acta* 932 (1):52-70. [doi:10.1016/0005-2728\(88\)90139-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90139-9)
- Michel H (1982) Three-dimensional crystals of a membrane protein complex. The photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* 158 (3):567-572. [doi:10.1016/0022-2836\(82\)90216-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90216-9)
- Mitchell P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 41 (3):445-502. [doi:10.1111/j.1469-185X.1966.tb01501.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1966.tb01501.x)
- Monger TG, Cogdell RJ, Parson WW (1976) Triplet states of bacteriochlorophyll and carotenoids in chromatophores of photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta* 449 (1):136-153. [doi:10.1016/0005-2728\(76\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90013-X)
- Monger TG, Parson WW (1977) Singlet-triplet fusion in *Rhodospseudomonas sphaeroides* chromatophores - probe of organization of photosynthetic apparatus. *Biochim Biophys Acta* 460 (3):393-407. [doi:10.1016/0005-2728\(77\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90080-9)
- Moser CC, Keske JM, Warncke K, Farid RS, Dutton PL (1992) Nature of biological electron transfer. *Nature* 355 (6363):796-802. [doi:10.1038/355796a0](https://doi.org/10.1038/355796a0)

- Murchison HA, Alden RG, Allen JP, Peloquin JM, Taguchi AK, Woodbury NW, Williams JC (1993) Mutations designed to modify the environment of the primary electron donor of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*: phenylalanine to leucine at L167 and histidine to phenylalanine at L168. *Biochem* 32 (13):3498-3505. [doi:10.1021/bi00064a038](https://doi.org/10.1021/bi00064a038)
- Müh F, Rautter J, Lubitz W (1997) Two distinct conformations of the primary electron donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* revealed by ENDOR/TRIPLE-spectroscopy. *Biochem* 36 (14):4155-4162. [doi:10.1021/bi962859s](https://doi.org/10.1021/bi962859s)
- Müh F, Schulz C, Schlodder E, Jones MR, Rautter J, Kuhn M, Lubitz W (1998) Effects of zwitterionic detergents on the electronic structure of the primary donor and the charge recombination kinetics of P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> in native and mutant reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth Res* 55 (2-3):199–205. [doi:10.1023/A:1005960003482](https://doi.org/10.1023/A:1005960003482)
- Nagarajan V, Parson WW, Davis D, Schenck CC (1993) Kinetics and free-energy gaps of electron-transfer reactions in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochem* 32 (46):12324-12336. [doi:10.1021/Bi00097a008](https://doi.org/10.1021/Bi00097a008)
- Niederman RA (2017) Photosynthesis in the Purple Bacteria. In: Hallenbeck PC (ed) *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics*. Springer International Publishing, Cham, pp 193-224. [doi:10.1007/978-3-319-51365-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51365-2_6)
- Niedzwiedzki DM, Blankenship RE (2010) Singlet and triplet excited state properties of natural chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Photosynth Res* 106 (3):227-238. [doi:10.1007/s11120-010-9598-9](https://doi.org/10.1007/s11120-010-9598-9)
- Niedzwiedzki DM, Dilbeck PL, Tang Q, Mothersole DJ, Martin EC, Bocian DF, Holten D, Hunter CN (2015) Functional characteristics of spirilloxanthin and keto-bearing Analogues in light-harvesting LH2 complexes from *Rhodobacter sphaeroides* with a genetically modified carotenoid synthesis pathway. *Biochim Biophys Acta* 1847 (6-7):640-655. [doi:10.1016/j.bbabi.2015.04.001](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.04.001)
- Nitsch C, Schatz GH, Braslavsky SE (1989) Laser-induced optoacoustic calorimetry of primary processes in cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 975 (1):88-95. [doi:10.1016/S0005-2728\(89\)80205-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80205-1)
- Niwa S, Yu LJ, Takeda K, Hirano Y, Kawakami T, Wang-Otomo ZY, Miki K (2014) Structure of the LH1-RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 angstrom. *Nature* 508 (7495):228-232. [doi:10.1038/nature13197](https://doi.org/10.1038/nature13197)
- Nyitrai P, Solti Á (2013) Fotoszintézis. In: Fodor F (ed) *A növényi anyagcsere élettana*. vol 3. Eötvös Loránd Tudományegyetem. [doi:http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/ANovenyiAnyagcsere/](http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/ANovenyiAnyagcsere/)
- Okamura MY, Paddock ML, Graige MS, Feher G (2000) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. *Biochim Biophys Acta* 1458 (1):148-163. [doi:10.1016/S0005-2728\(00\)00065-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00065-7)
- Olsen JD, Sturgis JN, Westerhuis WH, Fowler GJ, Hunter CN, Robert B (1997) Site-directed modification of the ligands to the bacteriochlorophylls of the light-harvesting LH1 and LH2 complexes of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 36 (41):12625-12632. [doi:10.1021/bi9710481](https://doi.org/10.1021/bi9710481)
- Olsen JD, Tucker JD, Timney JA, Qian P, Vassilev C, Hunter CN (2008) The organization of LH2 complexes in membranes from *Rhodobacter sphaeroides*. *The Journal of biological chemistry* 283 (45):30772-30779. [doi:10.1074/jbc.M804824200](https://doi.org/10.1074/jbc.M804824200)

- Onidas D, Sipka G, Asztalos E, Maróti P (2013) Mutational control of bioenergetics of bacterial reaction center probed by delayed fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 1827 (10):1191-1199. [doi:10.1016/j.bbabi.2013.05.002](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.05.002)
- Ortega JM, Mathis P, Williams JC, Allen JP (1996) Temperature dependence of the reorganization energy for charge recombination in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 35 (11):3354-3361. [doi:10.1021/Bi952882y](https://doi.org/10.1021/Bi952882y)
- Osváth S, Laczkó G, Sebban P, Maróti P (1996) Electron transfer in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus* monitored by fluorescence of the bacteriochlorophyll dimer. *Photosynth Res* 47 (1):41-49. [doi:10.1007/Bf00017752](https://doi.org/10.1007/Bf00017752)
- Paddock ML, Flores M, Isaacson R, Chang C, Abresch EC, Okamura MY (2007) ENDOR spectroscopy reveals light induced movement of the H-bond from Ser-L223 upon forming the semiquinone ( $Q_B^{\cdot-}$ ) in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 46 (28):8234-8243. [doi:10.1021/bi7005256](https://doi.org/10.1021/bi7005256)
- Paddock ML, Flores M, Isaacson R, Chang C, Abresch EC, Selvaduray P, Okamura MY (2006) Trapped conformational states of semiquinone  $D^{+*}Q_B^{\cdot-}$  formed by B-branch electron transfer at low temperature in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochem* 45 (47):14032-14042. [doi:10.1021/bi060854h](https://doi.org/10.1021/bi060854h)
- Paddock ML, Graige MS, Feher G, Okamura MY (1999) Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: inhibition of proton transfer by binding of  $Zn^{2+}$  or  $Cd^{2+}$ . *P Natl Acad Sci USA* 96 (11):6183-6188. [doi:10.1073/pnas.96.11.6183](https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6183)
- Pan J, Lin S, Allen JP, Williams JC, Frank HA, Woodbury NW (2011) Carotenoid excited-state properties in photosynthetic purple bacterial reaction centers: effects of the protein environment. *J Phys Chem B* 115 (21):7058-7068. [doi:10.1021/jp200077e](https://doi.org/10.1021/jp200077e)
- Papiz MZ, Prince SM, Howard T, Cogdell RJ, Isaacs NW (2003) The structure and thermal motion of the B800-850 LH2 complex from *Rps.acidophila* at 2.0Å resolution and 100K: new structural features and functionally relevant motions. *J Mol Biol* 326 (5):1523-1538. [doi:10.1016/S0022-2836\(03\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00024-X)
- Parson WW, Warshel A (2009) Mechanism of Charge Separation in Purple Bacterial Reaction Centers. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 28. Springer, Dordrecht, pp 355-377. [doi:10.1007/978-1-4020-8815-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_19)
- Pierson BK, Castenholz RW (1995) Taxonomy and Physiology of Filamentous Anoxygenic Phototrophs. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 31-47. [doi:10.1007/0-306-47954-0\\_3](https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_3)
- Puchenkov OV, Kopf Z, Malkin S (1995) Photoacoustic diagnostics of laser-induced processes in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 1231 (2):197-212. [doi:10.1016/0005-2728\(95\)00078-W](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00078-W)
- Qian P, Papiz MZ, Jackson PJ, Brindley AA, Ng IW, Olsen JD, Dickman MJ, Bullough PA, Hunter CN (2013) Three-dimensional structure of the *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1-PufX complex: dimerization and quinone channels promoted by PufX. *Biochem* 52 (43):7575-7585. [doi:10.1021/bi4011946](https://doi.org/10.1021/bi4011946)
- Rabenstein B, Ullmann GM, Knapp EW (2000) Electron transfer between the quinones in the photosynthetic reaction center and its coupling to conformational changes. *Biochem* 39 (34):10487-10496. [doi:10.1021/bi000413c](https://doi.org/10.1021/bi000413c)
- Ranck J, Ruiz T, Pehau-Arnaudet G, Arnoux B, Reiss-Husson F (2001) Two-dimensional structure of the native light-harvesting complex LH2 from *Rubrivivax gelatinosus*

- and of a truncated form. *Biochim Biophys Acta* 1506 (1):67-78. [doi:10.1016/S0005-2728\(01\)00185-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00185-2)
- Rinyu L, Martin EW, Takahashi E, Maróti P, Wraight CA (2004) Modulation of the free energy of the primary quinone acceptor (Q<sub>A</sub>) in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: contributions from the protein and protein-lipid(cardiolipin) interactions. *Biochim Biophys Acta* 1655 (1-3):93-101. [doi:10.1016/j.bbabi.2003.07.012](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.07.012)
- Rizzi AC, van Gestel M, Liddell PA, Palacios RE, Moore GF, Kodis G, Moore AL, Moore TA, Gust D, Braslavsky SE (2008) Entropic changes control the charge separation process in triads mimicking photosynthetic charge separation. *J Phys Chem A* 112 (18):4215-4223. [doi:10.1021/jp712008b](https://doi.org/10.1021/jp712008b)
- Rondonuwu FS, Taguchi T, Fujii R, Yokoyama K, Koyama Y, Watanabe Y (2004) The energies and kinetics of triplet carotenoids in the LH2 antenna complexes as determined by phosphorescence spectroscopy. *Chem Phys Lett* 384 (4-6):364-371. [doi:10.1016/j.cplett.2003.12.024](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.12.024)
- Roszak AW, Howard TD, Southall J, Gardiner AT, Law CJ, Isaacs NW, Cogdell RJ (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*. *Science* 302 (5652):1969-1972. [doi:10.1126/science.1088892](https://doi.org/10.1126/science.1088892)
- Rubino FM (2015) Toxicity of Glutathione-Binding Metals: A Review of Targets and Mechanisms. *Toxics* 3 (1):20-62. [doi:10.3390/toxics3010020](https://doi.org/10.3390/toxics3010020)
- Sacquin-Mora S, Sebban P, Derrien V, Frick B, Lavery R, Alba-Simionesco C (2007) Probing the flexibility of the bacterial reaction center: The wild-type protein is more rigid than two site-specific mutants. *Biochem* 46 (51):14960-14968. [doi:10.1021/bi7004416](https://doi.org/10.1021/bi7004416)
- Schenck CC, Blankenship RE, Parson WW (1982) Radical-pair decay kinetics, triplet yields and delayed fluorescence from bacterial reaction centers. *Biochim Biophys Acta* 680 (1):44-59. [doi:10.1016/0005-2728\(82\)90315-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(82)90315-2)
- Schmid R, Labahn A (2000) Temperature and free energy dependence of the direct charge recombination rate from the secondary quinone in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Phys Chem B* 104 (13):2928-2936. [doi:10.1021/Jp9939118](https://doi.org/10.1021/Jp9939118)
- Schmidt K (1978) Biosynthesis of carotenoids. In: Clayton RK, R. SW (eds) *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press, New York, pp 729-750
- Scholes GD (2003) Long-range resonance energy transfer in molecular systems. *Annu Rev Phys Chem* 54:57-87. [doi:10.1146/annurev.physchem.54.011002.103746](https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103746)
- Sener M, Strumpfer J, Hsin J, Chandler D, Scheuring S, Hunter CN, Schulten K (2011) Förster energy transfer theory as reflected in the structures of photosynthetic light-harvesting systems. *Chemphyschem* 12 (3):518-531. [doi:10.1002/cphc.201000944](https://doi.org/10.1002/cphc.201000944)
- Shinkarev VP, Wraight CA (1993) Electron and proton transfer in the acceptor quinone complex of reaction centers of phototrophic bacteria. In: Deisenhofer J, Norris JR (eds) *Photosynthetic Reaction Center*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp 193-255. [doi:10.1016/B978-0-12-208661-8.50013-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-208661-8.50013-9)
- Sipka G, Maróti P (2016) Induction and anisotropy of fluorescence of reaction center from photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth Res* 127 (1):61-68. [doi:10.1007/s11120-015-0096-y](https://doi.org/10.1007/s11120-015-0096-y)
- Siström WR (1960) A requirement for sodium in the growth of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol* 22:778-785. [doi:10.1099/00221287-22-3-778](https://doi.org/10.1099/00221287-22-3-778)
- Slouf V, Chabera P, Olsen JD, Martin EC, Qian P, Hunter CN, Polivka T (2012) Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependent



- alteration of carotenoid excited-state properties. P Natl Acad Sci USA 109 (22):8570-8575. [doi:10.1073/pnas.1201413109](https://doi.org/10.1073/pnas.1201413109)
- Spitz JA, Derrien V, Sebban P (2005) Specific triazine resistance in bacterial reaction centers induced by a single mutation in the Q<sub>A</sub> protein pocket. Biochem 44 (4):1338-1343. [doi:10.1021/bi048701m](https://doi.org/10.1021/bi048701m)
- Stanley RJ, King B, Boxer SG (1996) Excited state energy transfer pathways in photosynthetic reaction centers .1. Structural symmetry effects. J Phys Chem-Us 100 (29):12052-12059. [doi:10.1021/Jp9614916](https://doi.org/10.1021/Jp9614916)
- Stocker JW, Taguchi AK, Murchison HA, Woodbury NW, Boxer SG (1992) Spectroscopic and redox properties of sym1 and (M)F195H: *Rhodobacter capsulatus* reaction center symmetry mutants which affect the initial electron donor. Biochem 31 (42):10356-10362. [doi:10.1021/bi00157a025](https://doi.org/10.1021/bi00157a025)
- Stowell MH, McPhillips TM, Rees DC, Soltis SM, Abresch E, Feher G (1997) Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: implications for mechanism of electron-proton transfer. Science 276 (5313):812-816. [doi:10.1126/science.276.5313.812](https://doi.org/10.1126/science.276.5313.812)
- Strehler BL, Arnold W (1951) Light production by green plants. J Gen Physiol 34 (6):809-820. [doi:10.1085/jgp.34.6.809](https://doi.org/10.1085/jgp.34.6.809)
- Swingley WD, Blankenship RE, Raymond J (2009) Evolutionary relationships among purple photosynthetic bacteria and the origin of proteobacterial photosynthetic systems. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT (eds) The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 28. Springer Science, pp 17–29. [doi:10.1007/978-1-4020-8815-5](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5)
- Taguchi AT, O'Malley PJ, Wraight CA, Dikanov SA (2014) Nuclear hyperfine and quadrupole tensor characterization of the nitrogen hydrogen bond donors to the semiquinone of the Q<sub>B</sub> site in bacterial reaction centers: a combined X- and S-band <sup>14,15</sup>N ESEEM and DFT study. J Phys Chem B 118 (6):1501-1509. [doi:10.1021/jp411023k](https://doi.org/10.1021/jp411023k)
- Takahashi E, Wells TA, Wraight CA (2001) Protein control of the redox potential of the primary quinone acceptor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochem 40 (4):1020-1028. [doi:10.1021/bi001055g](https://doi.org/10.1021/bi001055g)
- Takaichi S (1999) Carotenoids and Carotenogenesis in Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell RJ (eds) The Photochemistry of Carotenoids. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 8. Springer Netherlands, pp 39-69. [doi:10.1007/0-306-48209-6\\_3](https://doi.org/10.1007/0-306-48209-6_3)
- Tank M, Bryant DA (2015) *Chloracidobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov.: an anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium. Int J Syst Evol Microbiol 65 (5):1426-1430. [doi:10.1099/ijs.0.000113](https://doi.org/10.1099/ijs.0.000113)
- Thielges M, Uyeda G, Camara-Artigas A, Kalman L, Williams JC, Allen JP (2005) Design of a redox-linked active metal site: Manganese bound to bacterial reaction centers at a site resembling that of photosystem II. Biochem 44 (20):7389-7394. [doi:10.1021/bi050377n](https://doi.org/10.1021/bi050377n)
- Townley HE, Sessions RB, Clarke AR, Dafforn TR, Griffiths WT (2001) Protochlorophyllide oxidoreductase: A homology model examined by site-directed mutagenesis. Proteins 44 (3):329-335. [doi:10.1002/Prot.1098](https://doi.org/10.1002/Prot.1098)
- Turzó K, Laczkó G, Filus Z, Maróti P (2000) Quinone-dependent delayed fluorescence from the reaction center of photosynthetic bacteria. Biophys J 79 (1):14-25. [doi:10.1016/S0006-3495\(00\)76270-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76270-9)

- Utschig LM, Ohigashi Y, Thurnauer MC, Tiede DM (1998) A new metal-binding site in photosynthetic bacterial reaction centers that modulates  $Q_A$  to  $Q_B$  electron transfer. *Biochem* 37 (23):8278-8281. [doi:10.1021/Bi980395n](https://doi.org/10.1021/Bi980395n)
- Utschig LM, Poluektov O, Schlesselman SL, Thurnauer MC, Tiede DM (2001)  $Cu^{2+}$  site in photosynthetic bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, and *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochem* 40 (20):6132-6141. [doi:10.1021/bi0029191](https://doi.org/10.1021/bi0029191)
- Utschig LM, Thurnauer NC (2004) Metal ion modulated electron transfer in photosynthetic proteins. *Acc Chem Res* 37 (7):439-447. [doi:10.1021/ar020197v](https://doi.org/10.1021/ar020197v)
- Utschig LM, Thurnauer MC, Tiede DM, Poluektov OG (2005) Low-temperature interquinone electron transfer in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* and *Blastochloris viridis*: Characterization of  $Q_B^-$  states by high-frequency electron paramagnetic resonance (EPR) and electron-nuclear double resonance (ENDOR). *Biochem* 44 (43):14131-14142. [doi:10.1021/bi051060q](https://doi.org/10.1021/bi051060q)
- van Grondelle R, Duysens LN (1980) On the quenching of the fluorescence yield in photosynthetic systems. *Plant Physiol* 65 (4):751-754. [doi:10.1104/pp.65.4.751](https://doi.org/10.1104/pp.65.4.751)
- Vasilieva LG, Fufina TY, Gabdulkhakov AG, Leonova MM, Khatypov RA, Shuvalov VA (2012) The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of  $P_A$  and  $B_B$  bacteriochlorophylls. *Biochim Biophys Acta* 1817 (8):1407-1417. [doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.008](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.008)
- Veronesi G, Giachini L, Francia F, Mallardi A, Palazzo G, Boscherini F, Venturoli G (2008) The  $Fe^{2+}$  site of photosynthetic reaction centers probed by multiple scattering x-ray absorption fine structure spectroscopy: Improving structure resolution in dry matrices. *Biophys J* 95 (2):814-822. [doi:10.1529/biophysj.108.132654](https://doi.org/10.1529/biophysj.108.132654)
- Walz T, Jamieson SJ, Bowers CM, Bullough PA, Hunter CN (1998) Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Å, LH1 and RC-LH1 at 25 Å. *J Mol Biol* 282 (4):833-845. [doi:10.1006/jmbi.1998.2050](https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2050)
- Wang L, Goodey NM, Benkovic SJ, Kohen A (2006) Coordinated effects of distal mutations on environmentally coupled tunneling in dihydrofolate reductase. *P Natl Acad Sci USA* 103 (43):15753-15758. [doi:10.1073/pnas.0606976103](https://doi.org/10.1073/pnas.0606976103)
- Wells TA, Takahashi E, Wraight CA (2003) Primary quinone ( $Q_A$ ) binding site of bacterial photosynthetic reaction centers: Mutations at residue M265 probed by FTIR spectroscopy. *Biochem* 42 (14):4064-4074. [doi:10.1021/bi026958j](https://doi.org/10.1021/bi026958j)
- Williams JC, Alden RG, Murchison HA, Peloquin JM, Woodbury NW, Allen JP (1992) Effects of mutations near the bacteriochlorophylls in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 31 (45):11029-11037. [doi:10.1021/bi00160a012](https://doi.org/10.1021/bi00160a012)
- Williams JC, Allen JP (2009) Directed modification of reaction centers from purple bacteria. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp 337-353. [doi:10.1007/978-1-4020-8815-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_18)
- Williams JC, Steiner LA, Feher G, Simon MI (1984) Primary structure of the L subunit of the reaction center from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *P Natl Acad Sci USA* 81 (23):7303-7307. [doi:10.1073/pnas.81.23.7303](https://doi.org/10.1073/pnas.81.23.7303)
- Wirtz AC, van Hemert MC, Lugtenburg J, Frank HA, Groenen EJ (2007) Two stereoisomers of spheroidene in the *Rhodobacter sphaeroides* R26 reaction center: a DFT analysis of resonance Raman spectra. *Biophys J* 93 (3):981-991. [doi:10.1529/biophysj.106.103473](https://doi.org/10.1529/biophysj.106.103473)

- Woodbury NW, Becker M, Middendorf D, Parson WW (1985) Picosecond kinetics of the initial photochemical electron-transfer reaction in bacterial photosynthetic reaction centers. *Biochem* 24 (26):7516-7521. [doi:10.1021/Bi00347a002](https://doi.org/10.1021/Bi00347a002)
- Woodbury NW, Parson WW, Gunner MR, Prince RC, Dutton PL (1986) Radical-pair energetics and decay mechanisms in reaction centers containing anthraquinones, naphthoquinones or benzoquinones in place of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta* 851 (1):6-22. [doi:10.1016/0005-2728\(86\)90243-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90243-4)
- Woodbury NW, Peloquin JM, Alden RG, Lin XM, Lin S, Taguchi AKW, Williams JC, Allen JP (1994) Relationship between thermodynamics and mechanism during photoinduced charge separation in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem* 33 (26):8101-8112. [doi:10.1021/Bi00192a015](https://doi.org/10.1021/Bi00192a015)
- Woodbury NWT, Parson WW (1984) Nanosecond fluorescence from Isolated photosynthetic reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 767 (2):345-361. [doi:10.1016/0005-2728\(84\)90205-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90205-6)
- Wraight CA (2004) Proton and electron transfer in the acceptor quinone complex of photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Front Biosci-Landmark* 9:309-337. [doi:10.2741/1236](https://doi.org/10.2741/1236)
- Wraight CA (2006) Chance and design - Proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins. *Biochim Biophys Acta* 1757 (8):886-912. [doi:10.1016/j.bbabi.2006.06.017](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.017)
- Wraight CA, Clayton RK (1974) The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophyll photooxidation in reaction centres of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 333 (2):246-260. [doi:10.1016/0005-2728\(74\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(74)90009-7)
- Wraight CA, Gunner MR (2009) The acceptor quinones of purple photosynthetic bacteria — Structure and spectroscopy. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 28. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 379-405. [doi:10.1007/978-1-4020-8815-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_20)
- Xu Q, Gunner MR (2000) Temperature dependence of the free energy, enthalpy, and entropy of  $P^+Q_A^-$  charge recombination in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers. *J Phys Chem B* 104 (33):8035-8043. [doi:10.1021/jp000543v](https://doi.org/10.1021/jp000543v)
- Yruela I, Alfonso M, Dezarate IO, Montoya G, Picorel R (1993) Precise location of the Cu(II)-inhibitory binding site in higher plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by light-induced absorption changes. *J Biol Chem* 268 (3):1684-1689
- Zabelin AA, Fufina TY, Vasilieva LG, Shkuropatova VA, Zvereva MG, Shkuropatov AY, Shuvalov VA (2009) Mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H with strongly bound bacteriochlorophyll *a*: Structural properties and pigment-protein interactions. *Biochem-Moscow* 74 (1):68-74. [doi:10.1134/S0006297909010106](https://doi.org/10.1134/S0006297909010106)
- Zankel KL, Reed DW, Clayton RK (1968) Fluorescence and photochemical quenching in photosynthetic reaction centers. *P Natl Acad Sci USA* 61 (4):1243-1249
- Zannoni D, Schoepp-Cothenet B, Hosler J (2009) Respiration and respiratory complexes. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) *The Purple Phototrophic Bacteria*. vol 28. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp 537-561. [doi:10.1007/978-1-4020-8815-5\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_27)
- Zhao HB, Song WY, Han GD, Shao HB, Zhang SW (2014) Dynamic change of wheat eco-physiology and implications for establishing high-efficient stable agro-ecosystems under Hg stress. *Ecol Eng* 70:50-55. [doi:10.1016/j.ecoleng.2014.04.022](https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.04.022)

Zhu JY, van Stokkum IHM, Paparelli L, Jones MR, Groot ML (2013) Early bacteriopheophytin reduction in charge separation in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. Biophys J 104 (11):2493-2502.  
[doi:10.1016/j.bpj.2013.04.026](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.04.026)