Fotoszintetizáló baktériumok fluoreszcenciájának indukciója és relaxációja

Ph.D. értekezés

Asztalos Emese

Témavezető: Dr. Maróti Péter

Fizika Doktori Iskola

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet
SZTE TTIK

2014

Szeged

Tartalom

Tartalom 2
Rövidítések 4
1. Bevezetés 5
1.1 Bíborbaktériumok 5
1.2 A bíborbaktériumok fotoszintetikus apparátusa 6
1.3 Bíborbaktériumok fluoreszcenciája 9
1.4 Nehézfémek és fotoszintetikus baktériumok 12
2 Célkitűzések 15
3 Anyagok és módszerek 16
3.1 Sejt tenyészetek és vegyi anyagok 16
3.2 Biokémiai szeparálási eljárások 17
3.3 Abszorpció mérés 17
3.4 Fluoreszcencia mérés 19
3.5. Elektrokémiai mérés 21
4. Eredmények és megvitatásuk 23
4.1. A bakterioklorofill fluoriméter és felhasználása 23
Bakterioklorofill fluoriméter működésének ismertetése 23
Példák a bakterioklorofill fluoriméter felhasználására 27
4.2. Fluoreszcencia indukció 28
Fény és termikus reakciók a fotoszintézis korai szakaszában 28
Rövid élettartamú kioltók hatása a fluoreszcencia indukcióra 35
A PSU-k közötti csatolás 44
4.3 Fluoreszcencia sötétrelaxáció 54
A sejteket tartalmazó oldat redoxpotenciáljának változtatása 55
A donor hiánya és helyettesítése 57
A pool-ok redox állapotának hatása a fluoreszcencia relaxáció kinetikájára 59
Interkinon elektrontranszfer 63
Hőmérsékletfüggés 65
A RC zárt állapotainak relatív fluoreszcencia hatásfokai 66

A fluoreszcencia relaxációt meghatározó folyamatok összefoglalása 67

4.4 A fotoszintetikus reakciócentrum szerepe a ciklikus elektrontranszportban 73

4.5 Hg^{2+} hatása *Rba. sphaeroides* sejtekre 83

Összefoglalás 102

Summary 107

Köszönetnyilvánítás 112

Irodalomjegyzék 113

Rövidítések

A	abszorpció
AFM	atomierő mikroszkóp
APD	lavina fotodióda
AQ	antrakinon
ATP	adenozin trifoszfát
BChl	bakterioklorofill
BPhe	bakteriofeofitin
Car	karotenoid
Chl	klorofill
cit bc_1	citokróm bc_1 komplex
cit c_2	citokrom c_2
D1, D2	II. fotokémiai rendszer reakciócentrumának alegységei
DL	késleltetett lumineszcencia
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
F_0	a „sötét” fluoreszcencia szinje
F_{max}	a fluoreszcencia maximális szintje
F_v	a fluoreszcencia indukció változó része
LDAO	lauryldimethylamine-oxide
LH	bíborbaktériumok fénybegyűjtő komplexe
P_{680}	a II. fotokémiai rendszer elsődleges donora
P_{870}	bíborbaktériumok elsődleges donora
PS	fotoszisztéma
PSU	fotoszintetikus egység
Q_A, Q_B	elsődleges és másodlagos kinon akceptor
Rba.	*Rhodobacter*
RC	reakciócentrum
Rsp.	*Rhodospirillum*
Rvx.	*Rubrivivax*
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol
UQ_{10}	ubikinon 10

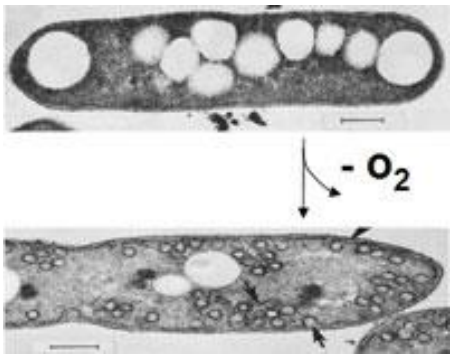
1. Bevezetés

1.1 Bíborbaktériumok

A bíborbaktériumok nem oxigéntermelő fototróf mikroorganizmusok, amik rendkívül változatos anyagcsere utakat képesek fenntartani (Drews and Imhoff, 1991; Imhoff, 1995). Képesek növekedni fotoautotróf, fotoheterotróf és fermentatív módon, valamint aerob és anaerob légzés útján. A bíborbaktériumok széles körben elterjedtek a természetben, és főleg anaerob vizes környezetben (pl szennyvízben) fordulnak elő.

Kedvelt alanyai a szerkezeti és spekroszkópiai vizsgálatoknak, így segítségükkel mára nagy ismeretanyag áll rendelkezésre a fotoszintetikus élőlények energiaelnyeléséről és az elsődleges elektrontranszfer lépésekről. Majdnem minden faj bakterioklorofill *a*-t tartalmaz, csak néhányban van helyette bakterioklorofill *b*. A bíborbaktériumokat két csoportja osztják: kén és nem-kén baktériumokra aszerint, hogy képesek-e kén vegyületeket feldolgozni (Brune, 1995). Minden bíborbaktérium a Calvin-ciklust használja CO_2 megkötésre (Tabita, 1995).

Nevük sok képviselőjük színéből ered, ami a bakterioklorofill és karotenoid pigmentek keveredésének köszönhető. Ilyen például a *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodospirillum rubrum*. Vannak törzsek, amik nevükkel ellentétben nem pirosak: például a *Rhodopseudomonas* (újabban *Blastochloris*) *viridis* zöld színű.

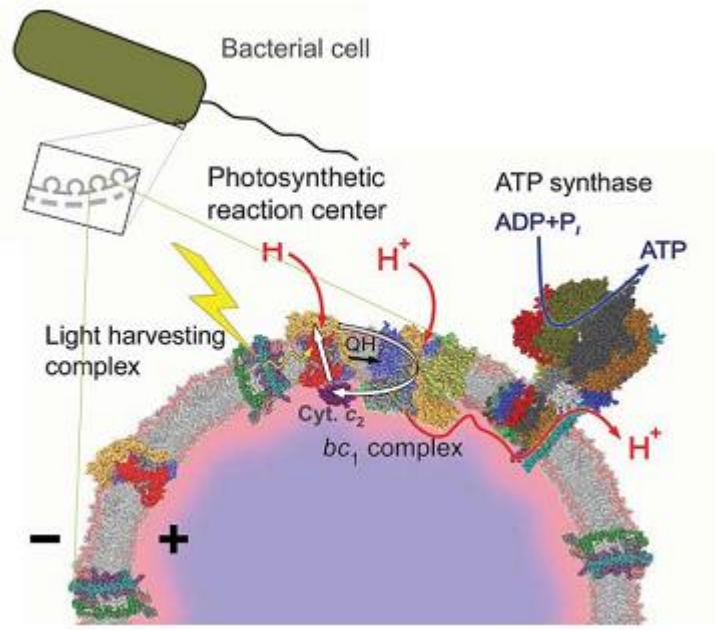


1.1. ábra *Rhodobacter sphaeroides* sejtek anaerob környezetben (bal oldal). Az aerob- anaerob állapot közti különbség (jobb oldal). (JGI Genome portal)

A bíborbaktériumok többsége fakultatív fototróf és a fotoszintézishez szükséges gének expresszióját az oxigén mennyisége szabályozza: aerob légzésről anoxigenikus fotoszintézisre váltanak ~3% alatti oxigén koncentrációnál (Kiley és Kaplan 1988), ezzel párhuzamosan megfigyelhető a sejtmembrán betűrődése (**1.1.** ábra jobb oldala). A mi laboratóriumunkban használt törzsek is ilyenek, ezért fotoheterotróf módon neveljük őket: fényen, levegőtől elzárva, szerves szénforrás mellett.

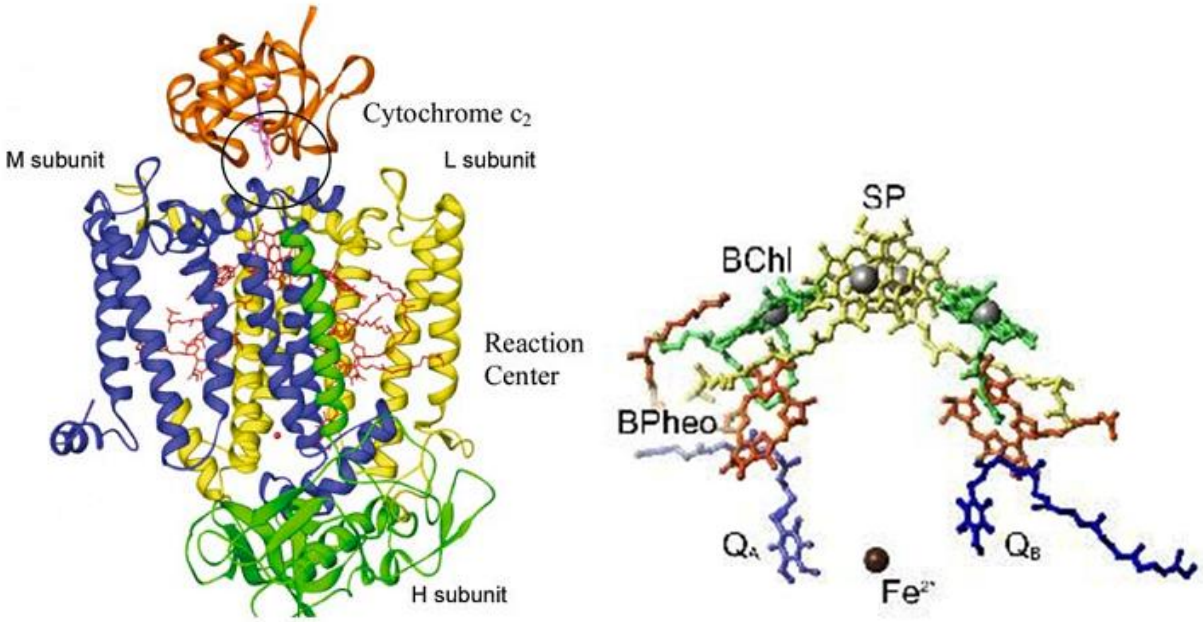
1.2 A bíborbaktériumok fotoszintetikus apparátusa

A bíborbaktériumok citoplazmikus membránrendszere tartalmazza a fényenergiát elektrokémiai energiává alakító fotoszintetikus apparátust (Wraight 2004; Niederman 2006; Tucker et al. 2010). A fénybegyűjtő antenna rendszerek (LH) nyelik el a fotonokat, és vezetik el a gerjesztési energiát a reakciócentrum (RC) fehérjékhez, ahol a töltésszétválasztás és számos elektron-átadási lépés történik (**1.2**. ábra).



1.2. ábra Bíborbaktériumok intracitoplazmikus membránjának keresztmetszeti képe (Mulkidjanian 2007).

A *Rba. sphaeroides* RC kofaktorai és fehérjeszerkezete kétoldali szimmetriát mutatnak. Az L és M homológ alegységekből álló heterodimerhez kötődik az összes aktív kofaktor: négy bakterioklorofill (BChl), két bakteriofeofitin (BPhe), két kinon (Q) és egy nem-hem vasatom (Fe) (1.3. ábra). Bár a kofaktorok két szimmetrikus ágat alkotnak, az elektrontranszfer az elsődleges donorról, P-ről a másodlagos akceptorra, Q_B-re kizárólag a $BChl_A$, $BPhe_A$ és Q_A alkotta A (aktív) ágon át történhet. A strukturális és összetételbeli szimmetria funkcionális aszimmetriával áll szemben. Míg a két kinon kémiailag azonos (t.i. mindkettő ubikinon), tulajdonságaik nagyon különbözőek: Q_A szorosan kötött, egy-elektronos redox-ágens, ezzel szemben Q_B reverzibilisen (lazán) kötődik a Q_B kötőhelyre, és két-elektron kémiában vesz részt.

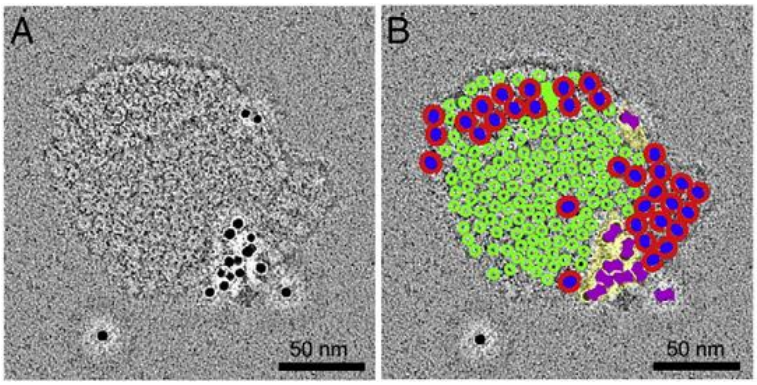


1.3. ábra *Rba. sphaeroides* RC fehérje H, M és L alegységei a donor oldalon dokkoló cit c_2 másodlagos elektron akceptorral (bal oldal) és a szerkezetből kiemelt kofaktorok (jobb oldal). SP: speciális bakterioklorofill-dimér, amely fotooxidációra képes.

A H alegység az egyetlen membránon keresztüli hélix-ével a teljes fehérjét stabilizálja. A citoplazmikus oldalán gazdag vízmolekulákban, és segíti az elektrontranszporthoz kapcsolt protonfelvételt. A gyors kezdeti elektrontranszport lépések a donor és az akceptor oldalon kinetikai módon csökkentik a fény-indukált töltéspár veszteségét eredményező (két-három nagyságrenddel lassabb) rekombináció jelentőségét. A töltés stabilizáció eredménye a RC-ban egy kétszeresen redukált QH_2 és két, egyszeresen oxidált cit c^{3+}, amik elhagyják a RC-ot a membrán ill. a vizes, periplazmikus oldal felé. A leváló redox vegyületek mozgékony elektron hordozókként működnek a két óriás membránfehérje, a RC és a citokróm bc_1 között.

A komplexek membránbeli szerveződését és működését a legkülönbözőbb szerkezeti, spektroszkópiai, biokémiai és fizikai kémiai módszerekkel vizsgálták az utóbbi években (Bahatyrova és mtsi. 2004; Sener és mtsi. 2007, 2009; Cartron és mtsi. 2014). A komplexek (LHI és LHII antenna, RC és cit bc_1) közti optimális fényelnyeléshez, az elektron gerjesztési energia hatékony átadásához és a nagy sebességű ciklikus elektrontranszporthoz az össze-tevők kompakt szerveződése szükséges (Comayras és mtsi. 2005; Lavergne és mtsi. 2009). Joliot és munkatársai (1989) az elektrontranszportlánc kulcs összetevőinek szupramolekuláris elrendeződését vetették fel *Rba. sphaeroides* R-26 baktériumban. Feltételezésük szerint a szuperkomplex két (dimerikus) RC-ot, egy cit c_2-t és egy cit bc_1-et tartalmaz. Valóban számos biokémiai és atomi-erő mikroszkópos (AFM) vizsgálat mutatta ki a szuperkomplex dimerikus

voltát (Francia és mtsi. 1999). *Rba sphaeroides* Ga sejtekben nem minden RC alkot dimerikus struktúrát (Vermeglio és mtsi. 1993). Az intracitoplazmikus membránban (ICM) lévő RC-ok (~80%) alkotnak szuperkomplexet, míg a citoplazmikus membránban (CM) lévők a légzési lánccal osztoznak a cit c_2-n (~7 cit c_2/RC) és a cit bc_1-en (Vermeglio and Joliot 2014). Néhány csoport vitathatónak tartja a szuperkomplex elképzelést (Crofts és mtsi. 1998) és a cit bc_1 elhelyezkedését (Sturgis és Niederman 2009), mivel nagy felbontású AFM-es vizsgálatokkal nem mutattak ki cit bc_1-et azokban a membrán régiókban, ahol a core komplexek vannak (Scheuring és mtsi. 2009), míg mások igen (Cartron és mtsi. 2014, 1.4. ábra). Így a fotoszintetikus komplexek topológiája, és ezzel kapcsolódásuk mértéke körüli probléma még távolról sem tekinthető megoldottnak.



1.4. ábra Cartron és mtsi. (2014) által bemutatott, negatívan festett kromatofóra membrán darabok elektronmikroszkópos képe. A: Arany szemcsékkel jelölt cit bc_1 komplexek. B: LH2 komplexek (zöld), RC-LH1-PufX komplexek (piros/kék) és cit bc_1 komplexek (lila) egymáshoz viszonyított helyzete a membránban.

A komplexek membránbeli szerveződése és a töltések RC-ból való elszállításának sebessége határozza meg a fotokémiailag zárt RC újra-nyitásának idejét, ami a folyamatos fénynek kitett fotoszintetikus apparátus energia hasznosítása szempontjából alapvető fontosságú paraméter. A RC gyorsabb újra-nyitása az egész rendszer gyorsabb átfordulását teszi lehetővé. A RC gerjesztés számára zárva marad mindaddig, míg a töltések el nem tűnnek az oxidált BChl dimerről (P^+) és a redukált elsődleges kinonról (Q_A^-). A zöld növények második fotokémiai rendszerében (PSII) P^+ vissza-redukciója sokkal gyorsabb, mint a kinonok közötti (interkinon) elektrontranszfer ($Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$), így a PSII RC újra-nyitásának kinetikája a kinon akceptor komplexről történő elektron-elszállítást követi (Bukhov et al. 2001; Cser and Vass 2007). A bakteriális rendszerekben a helyzet sokkal bonyolultabb. P^+ elektron donorai (redukált citokrómok) lehetnek a RC-hoz kötöttek egy külön alegységet alkotva (pl. *Bla. viridis* és *Rvx. gelatinosus)*, a RC egy disztális vagy proximális helyén kötöttek (pl. *Rba. sphaeroides*)

és/vagy csak diffúzió útján elérhetők (pl. *Rsp. rubrum*). Továbbá a változó RC/cit c_2 arány kitolhatja P^+ vissza-redukciójának kinetikáját (P^+cit $c_2^{2+} \rightarrow$ P cit c_2^{3+}) a mikroszekundumos időtartományból a milliszekundumos tartományba, ami az interkinon elektrontranszferrel eshet egybe. Elég biztos ismereteink vannak *Rba. sphaeroides*-ből izolált RC-ban zajló interkinon elektrontranszferről (Okamura és mtsi. 2000; Wraight és Gunner 2009): a konformáció által határolt első elektrontranszfer ($Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$) több mint egy nagyságrenddel gyorsabb a proton-aktivált második elektrontranszfernél, $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_BH_2$ (~ 10^3 s^{-1}, pH 8). Nem biztos, hogy ez intakt sejtekre vagy más törzsekre is igaz, mert *Rba. capsulatus* kromatofóra membránban úgy találták, hogy az első és második elektrontranszfer lényegében egyező kinetikai tulajdonságokkal bír, mindkettő a 100 µs-os tartományban játszódik le, beleértve a protonációs lépéseket is (Lavergne mtsi. 1999). Nagy kihívás megtalálni azokat az alkalmas körülményeket (idő intervallum, a gerjesztés hossza és intenzitása, a RC redox állapota, a baktériumtörzs, stb.) amelyek mellett intakt sejtekben a zárt RC újra-nyitásának sebességét meg lehet határozni.

1.3 Bíborbaktériumok fluoreszcenciája

Az antenna BChl pigmentek fluoreszcencia emisszióját a RC redox állapota és a fotoszintetikus egység szerveződése határozza meg. A nyitott vagy zárt állapotú RC alacsony és magas BChl fluoreszcencia szinttel jellemezhető (Vredenberg és Duysens 1963; van Grondelle 1985), átmenetük a változó fluoreszcencia megfigyelésével követhető. Clayton (1966) egy sor sejten bemutatta, hogy Vredenberg és Duysens (1963) megfigyelése a fluoreszcencia hatásfok és a RC dimer oxidációja közötti kapcsolatról *Rsp. rubrum*-on aerob körülményekre vonatkozik, valamint anaerobiozisban a fluoreszcencia hatásfokot az elektron akceptor oldali események irányítják. Rivoyre és mtsi. (2010) fluoreszcencia relaxációt mértek blokkolt RC-on a flash gerjesztés utáni szekundumos időtartományban és vizsgálták a fotoszintetikus egységek közötti energetikai csatolást. Kocsis és mtsi. (2010) bemutatták, de nem elemezték a különböző baktérium törzsek változatos lecsengési kinetikáit, amiket egy impulzus-üzemű lézerdiódákon alapuló fluoriméterrel mértek. *Rba. sphaeroides* sejtek fotoszintetikus membránja karakterisztikus fluoreszcencia változásokat mutat fejlődése különböző szakaszaiban (Asztalos és mtsi. 2010a), az ICM kifakítása és zöldítése alatt (Kis és mtsi. 2014), és higanykezelés hatására (Asztalos és mtsi. 2010b, 2012). Kolber és mtsi. (1998) bevezették a „fast repetition” fluorimétert, ahol az egyszeri és többszöri átfordulást biztosító gerjesztést LED-ből származó szubmikroszekundumos (nem gerjesztő hatású) flash-ek

sorozata adja. A fluoreszcencia lecsengését kizárólag Q_A^- újra-oxidációjának tulajdonították (Kolber et al. 1998), ami a tengeri ökoszisztéma vizsgálatakor igaz lehet (Falkowski et al. 2004; Hohmann-Mariott és Blankenship 2007), de megkérdőjelezhető a *Rba. sphaeroides* membránfejlődése kapcsán (Koblizek et al. 2005).

A csekély számú korábbi munka jelzi ennek a területnek a fontosságát, de a teljes megértéstől még nagyon távol vagyunk. A disszertációban bemutatjuk, hogy a fluoreszcencia relaxáció kinetikája más-más arcot mutat a gerjesztés hosszától és intenzitásától, valamint Q_A^- oxidációja és P^+ újra-redukciója közötti versengéstől függően. Ebben a tanulmányban felfedjük a különböző baktériumtörzsek BChl fluoreszcencia relaxációjának természetét. A fluoreszcencia mérést kombináljuk a dimér egyensúlyi redox titrálásával, lézerdióda által gerjesztett abszorpcióváltozás méréssel és modellszámítással. Megmutatjuk, hogy a BChl fluoreszcenciájának sötétrelaxációja eredményesen használható a RC irányította elektron-transzfer jellemzésére különböző baktérium törzsekben változatos fény és redox állapotok között.

A fotoszintetikus egységek közötti kapcsolat

A fotoszintetikus fényhasznosítás a földi élet keletkezésének és fenntartásának alapvető folyamata. A fotoszintetizáló szervezetek a napfényenergiát hatékonyan képesek elnyelni, és egymásba kapcsolódó biofizikai-biokémiai folyamatokon keresztül más szabadenergia-formává átalakítani, amely vagy redox kémiai potenciál, vagy ion- (proton) elektrokémiai potenciál vagy foszforilációs potenciál lehet. Ezeket a szervezet már közvetlenül felhasználhatja az élettevékenységgel együtt járó energiaigény fedezésére, ill. ha erre nincs szükség, akkor a későbbi felhasználást célzó tárolásra.

A fotoszintetikus szervezetek jellemző pigmentje a klorofill (baktériumokban a bakterio-klorofill), amelynek fluoreszcenciája igen jól és egyszerűen mérhető. A klorofill fluoreszcenciája diagnosztikus jellegű a fotoszintetikus tevékenységre nézve, mert belőle a fotoszintetikus aktivitás kiolvasható. Különösen értékes információval szolgál a megvilágítást követően a kezdeti fluoreszcencia hatásfokának változása (a fluoreszcencia indukció, más elnevezéssel az ú.n. Kautsky-effektus), amely több mint 80 éve szolgál a legelemibb és a legjellegzetesebb fotoszintetikus tulajdonságok megfigyelésére. Így vált a klorofill fluoreszcencia indukció mérése a fotoszintézis kutatás rutin módszerévé annak köszönhetően, hogy a kinetikából származó paraméterek közvetlenül felhasználhatók a fotoszintetikus aktivitás meghatározására (Papageorgiou és Govindjee, 2004).

Az egyik alapvető jellemző az emelkedés kezdeti görbülete, amiből a fotoszintetikus egységek közötti kölcsönhatás kiszámítható. A legelemibb, tovább már a funkcióvesztés veszélye nélkül nem bontható fotoszintetikus egységek reakciócentrum fehérjéből (RC) és az ezt körülvevő belső és külső fénybegyűjtő rendszerből (LH1 és LH2) állnak. A fotoszintetikus egységek közötti kapcsolatot általában a p paraméter ($0 \leq p \leq 1$) megadásával jelölik, ami annak a valószínűségét jelöli, hogy egy zárt fotoszintetikus egység által elnyelt exciton (delokalizált elektron-gerjesztési energia) meglátogat egy szomszédos (nyitott vagy zárt) fotoszintetikus egységet (Joliot és Joliot, 1964). Ha $p = 1$, akkor az exciton szabadon végiglátogathatja a fotoszintetikus egységeket mindaddig, míg fotokémiailag nem hasznosul egy üres fotoszintetikus egységben vagy ki nem sugárzódik fluoreszcencia foton formájában. Az exciton számára nincs terjedelmi korlát, a teljes pigmentrendszer a rendelkezésére áll. Az ilyen feltételekkel rendelkező rendszert tó- vagy mátrix-rendszernek nevezik, mivel ha a tóba követ dobunk, akkor a hullámok a tó tetszőleges pontját elérhetik. A másik véglethez a $p = 0$ feltétel tartozik. Ebben az esetben a fotoszintetikus egységek egymástól tökéletesen elszigeteltek, az excitonok nem tehetnek látogatást a szomszédos egységeknél.

A fluoreszcencia indukció kezdetének alakja információval szolgálhat a kölcsönhatás nagyságának mértékére. A tó-modell esetén a kinetika jellegzetes késleltetett kezdést, ú.n. szigmoidális alakot mutat. Ennek az a kvalitatív oka, hogy több exciton között kölcsönhatás (kooperáció) van, ami a kinetika kezdetét S alakúra domborítja. Ezzel szemben az egymástól elszigetelt egységek esetén a kinetika egyszerű exponenciális függvény szerint változik, mivel semmiféle kooperáció nem alakul ki az excitonok között. Az indukció alakjából azonban nem egyszerű a fotoszintetikus egységek közötti kapcsolat mértékére következtetni, mert az exponenciális és szigmoidális emelkedés között nincs nagy különbség (Kolber és mtsi., 1998). Emiatt óvatosan kell eljárnunk a kölcsönhatás valódi mértékének meghatározásában (Trissl, 1996).

A fénybegyűjtő rendszerek szerveződése, kiterjedése és kölcsönhatásuk mértéke a fotoszintetizáló organizmustól és a fiziológiai körülményektől függ; a baktériumok fotokémiai rendszerei a növényekéinél kompaktabbak, zártabbak. Egyes megközelítésekben a baktériumok fénybegyűjtő rendszereire úgy tekintenek, mint egy tó-típusú rendszerre, amiben az exciton minden fotoszintetikus egységet meglátogathat. Valójában az exciton vándorlási területe kissé jobban korlátozott, azaz nem terjed ki valamennyi fotoszintetikus egységre (Grondelle és Duysens, 1980; Kingma és mts, 1983).

Az utóbbi időkben számos publikáció megkérdőjelezte a mért fluoreszcencia indukció görbék egyszerű értelmezésének elméleti hátterét (Lavergne és Trissl, 1995) vagy egyenesen

elutasították a szigmoid emelkedés általános magyarázatát (Vredenberg, 2008). Noha szerintünk nem kell eldobnunk a klorofill fluorométereinket, és elvetni az egyszerűen alkalmazható módszereket a (bakterio)klorofill fluoreszcencia indukció magyarázatára (Holtzwarth, 1993), ezek a publikációk figyelmeztetnek bennünket a fluoreszcencia indukció görbék formális és elméleti háttér nélküli elemzéseinek veszélyeire.

Ebben a munkában a fluoreszcencia indukciós görbe szigmoidális emelkedésének eredetét vizsgáljuk fotoszintetizáló baktériumoksejtekben jól meghatározott kísérleti körülmények között téglalap alakú gerjesztéssel (Maróti és Lavorel, 1979; Maróti, 2008). Megmutatjuk, hogy a változó fluoreszcencia és a komplementer terület dupla reciprokos ábrázolása lehetőséget ad *p* értékének közvetlen meghatározására. A fotoszintetikus egységek csatolására a korábban kapott értékeknél (Kingma és mtsi., 1983; Lavergne és Trissl, 1995) alacsonyabb értéket kaptunk, amely, ellentétben zöld növények kloroplasztiszainál tapasztaltakkal (Vredenberg, 2008), a gerjesztő fény intenzitásától független maradt.

1.4 Nehézfémek és fotoszintetikus baktériumok

A nehézfém-ionoknak az élőlényekre gyakorolt hatását élénk érdeklődés övezi, mivel ezek az anyagok széles körben elterjedtek az emberi tevékenység és a természetes folyamatok következtében. Különösen érdekesek az olyan rendkívül mérgező fémek, mint a króm, arzén, higany vagy kadmium, amelyek vizes oldatai erősen befolyásolják az anyagcserét és súlyos betegségeket okozhatnak emberekben (Barregard és mtsi., 2010.). A fotoszintetikus élőlények is nagy figyelmet kapnak (Borsetti és mtsi. 2009.), a fémekkel és egyéb mérgező anyagokkal szennyezett területek bioremediációjában történő felhasználhatóságuknak köszönhetően (Malik, 2004.)

Prokariótákon gyakran vizsgálták a nehézfémek mikroorganizmusokra gyakorolt hatását (A. Malik,2004., S. Silver, 1996.), fotoszintetikus baktériumok esetében pedig a fotoszintetikus apparátusra kifejtett hatás vizsgálandó. Azt találták, hogy attól függően, hogy milyen fémionnak van kitéve a baktérium, a bakterioklorofill és hem bioszintézis útvonalak lehetnek érintettek (A. Agostiano és mtsi., 2009., A. Buccolieri és mtsi. 2006.). Ennél fogva nagyon értékes egy megfizethető, megbízható, érzékeny és gyors módszer nehézfém-ion szennyezés fotoszintetikus baktériumok fotoszintetikus apparátusára gyakorolt hatásának azonnali kimutatására. Célul tűztük ki, hogy széles időtartományban tanulmányozzuk a károsodás kinetikáját, kezdve a leggyorsabb, másodperces léptékkel. A káros hatás megnyilvánul a BChl fluoreszcencia indukcióban (konstans és változó rész és ezek aránya, valamint a fél-

emelkedési idő), így ezt a módszert használjuk a nehézfém-ion szennyezettség korai kimutatására.

A higany gyakori előfordulása a környezetben mára globális problémává nőtt. A higany kibocsátás kétharmada különböző biogeokémiai folyamatokból származik, egyharmada pedig emberi tevékenységekből (Patra és Sharma, 2000). Mivel a higany nem tűnik el biológiai úton, elterjedése az ökoszisztémában és az anyagcsere útvonalakat károsító hatása miatt súlyos biokémiai és fiziológiai károsodásokat okozhat (Panda és Panda 2009; Barregard és mtsi. 2010). Egészséget veszélyeztető volta miatt a higany hatásait kiterjedten vizsgálták már állatokban és emberekben egyaránt (Clifton 2007). A fotoszintetizáló élőlényekre kevesebb figyelmet fordítottak, bár potenciális felhasználhatóságuk bioremediációs célokra kétségtelen (Malik 2004; Patra és mtsi. 2004; Cain és mtsi. 2008; Borsetti és mtsi. 2009; Deng és Jia 2011).

A higany növények és algák fotoszintézisére gyakorolt mérgező hatásának felderítésére és megértésére számos tanulmány született (Kamp-Nielsen 1971; Gotsis-Skretas 1991; Boucher és Carpentier 1999; Mishra és Dubey 2005; Antal et al. 2009). A higany növelte a fotoszintetikus pigmentek számát (klorofillok és karotenoidok) a rövid ideig tartó kitettség alatt, de hosszabb távon csökkentette (Murthy és mtsi. 1995). A Hg^{2+} ionok érintették a fotoszintézis fény és sötét reakcióit is, valamint erősen gátolták a fotoszintetikus elektrontranszport láncot, a PSII volt a legérzékenyebb célpont. Az akceptor oldalon a gátlás a Q_A és Q_B közti elektron átadásnál jelentkezhet és/vagy a zárt (Q_A^-) RC-ok számának növelésében (Kukarskikh és mtsi. 2003). A donor oldali gátlás a klorid ionok (az oxigén termelő komplex, OEC kofaktora) kötődésének akadályozásában és a 33 kDa-os fehérje eltávolításában az OEC-ről nyilvánult meg (Bernier és Carpentier1995). EPR spektroszkópiával kimutatták, hogy a $HgCl_2$ kiszabadítja a Mn^{2+} ionokat az OEC mangán csoportjából és csökkenti a Z^+/D^+ intermedierek (PSII D_1 és D_2 alegységein lévő Tyr_Z és Tyr_D) $II_{lassú}$ és $II_{nagyon\ gyors}$ jeleit (Sersen és mtsi.1998). Kimutatták, hogy a higany közvetlenül reagál plasztocianinnal, helyettesíti a rezet (Kimimura és Kotoh1972) és PSI RC-al, amit oxidál a sötétben (Sersen és mtsi.1998).

A higany erős reakcióképessége magyarázható azzal, hogy szervesanyag-fém komplexeket képez a fotoszintetikus fehérjék aminosavjaival, a C=O, C-N, C-S és C-SH csoportokhoz való nagy affinitása miatt. Sokan ezt gondolják a Hg^{2+} fotoszintetikus apparátust gátló lehetséges mechanizmusának (Bernier és Carpentier1995).

Szép számmal készültek tanulmányok, de kevesebb részlettel és magyarázattal, a higanyion fotoszintetikus baktériumokra gyakorolt hatásáról. *Rba. sphaeroides* (Giotta és mtsi. 2006; Asztalos és mtsi. 2010) vagy *Rhodopseudomonas capsulata* (Jeffries és Butler 1975)

tenyészetben hosszú ideig tartó higanykezelés hatására a lag fázis kitolódása és a növekedési ütem lassulása volt tapasztalható. 2-4 µM (*Rba. sphaeroides* vad típus) és 20-30 µM (karotenoidmentes R-26.1 törzs) EC_{50} („félhalálos”) dózisokat állapítottak meg. Nagy kobalt koncentráció (5 mM) mellett nevelt *Rba. sphaeroides* R-26.1 sejtek intracelluláris membránjainak proteomikai analízise kimutatta a fotoszintetikus apparátus fehérjéi mennyiségének relatív változását, a fénybegyűjtő komplexek csökkenését, és a csupasz RC-ok koncentrációjának növekedését, ezzel párhuzamosan kemoorganotrófiához kapcsolódó enzimek túltermelődését (Italiano és mtsi. 2011). Ezeket a jelenségeket lehetséges bakteriális adaptációnak tartják a kevésbé hatékony fotoszintézis miatt kieső energia pótlására. Mivel kevés ismeret áll rendelkezésre a higany bakteriális fotoszintetikus apparátusra gyakorolt hatásáról, ez a munka célul tűzi ki a higanyion közvetlen hatásainak vizsgálatát a bakteriális fotoszintézis kezdeti folyamataira és a ciklikus elektrontranszportban, valamint a fénybegyűjtő rendszerben okozott károk felderítésére. A kísérletekhez nem-invazív (optikai) módszereket használunk intakt sejteken, így közvetlen következtetéseket vonhatunk le élő rendszerekre.

Az alapkutatáson túl, ez a tanulmány hozzájárulhat környezetünk megóvására irányuló alkalmazásokhoz. Bizonyított, hogy a fotoszintetikus baktériumok ígéretes jelöltek bioremediációra (Deng és Jia 2011), és szivacsként szívják magukba a nehézfémeket (Italiano és mtsi. 2009) beleértve az emberi tevékenység miatt főleg vizekben felhalmozódó higanyt. A Hg^{2+} fotoszintetikus apparátusra gyakorolt hatásának felderítésével a magunk szerény eszközeivel hozzájárulhatunk a higanyszennyezés elleni hatékonyabb küzdelemhez.

2 Célkitűzések

- Építsünk olyan bakteriofluorométert, amellyel megmérhetjük, és tanulmányozhatjuk a fotoszintetikus baktériumok fluoreszcencia indukcióját a legkülönbözőbb baktérium-törzseken, jól definiált körülmények között, széles időtartományban és különböző módszerek alkalmazásával: folyamatos, téglalap alakú gerjesztés alatt, vagy flash sorozattal! Az időtartomány szubmikroszekundumostól egészen a szekundumos tartományokig terjed. A flash sorozattal való mérésnek az az előnye a folyamatos gerjesztéshez képest, hogy az egyedi rövid flash-ek által kiváltott fluoreszcencia változás érzéketlen a háttér esetleges fluktuációjára.
- Találjunk magyarázatot az előző pontban leírt módokon meghatározott fluoreszcencia indukció kinetikai fázisainak eredetére!
- Vizsgáljuk meg alaposan a BChl fluoreszcencia hatásfokának sötétbeli relaxációját különböző baktériumoknál, és találjunk magyarázatot a széles időtartományú (nem mono-, hanem elnyújtott exponenciális függvénnyel jellemezhető) lecsengésre! Derítsük ki, hogy milyen elektrontranszfer reakciók határozhatják meg a fluoreszcencia megfigyelt relaxációját, és az egyes baktérium törzsekben melyek a sebesség-meghatározó lépések!
- Nézzük meg, hogy a fluoreszcencia-jellemzők felhasználhatók-e a mikroorganizmusokban (baktériumokban) bekövetkező fiziológiai változások kimutatására! Tanulmányozzuk a nehézfémionoknak a fotoszintetikus apparátusra gyakorolt roncsoló hatását, és találjuk meg a fotoszintetikus apparátus azon helyét (helyeit), amely(ek) a legérzékenyebb(ek) (legsebezhetőbb(ek)) a Hg^{2+} ionnal szemben! Keressük annak lehetőségét, hogy a fluoreszcencia jellemzők mérésével hogyan lehetne a fémionszennyeződést a roncsolás minél korábbi stádiumában kimutatni! Kutassuk fel egy alkalmas biomonitoring és később ebből kifejleszthető remediációs rendszer kialakításának lehetőségét, amellyel hatékony eszköz kerülhet a környezetvédelem szolgálatába!

3 Anyagok és módszerek

3.1 Sejt tenyészetek és vegyi anyagok

A bíbor nem-kén fotoszintetikus baktériumokat Siström-féle tápoldatban (Sistrom, 1960) neveljük, mely K-szukcinátot tartalmaz elektron forrásként. A fotoszintetikus növekedésre képes törzsek (*Rba. sphaeroides, Rsp. rubrum, Rvx. gelatinosus*) tenyészeteit teljesen feltöltött üvegedényekben tartjuk (csiszoltdugós kémcső vagy nagyobb, csavaros tetejű Duran üveg) anaerob környezetben, 40 W-os wolframszálas izzók fénye mellett. A megvilágítás erőssége körülbelül 13 W/m^2 az üvegek felszínén. A *Rvx. gelatinosus* törzset Prof. Dr. A. Vermeglio-tól kaptuk (CEA Laboratoire de Bioenergétique Cellulaire, Saint-Paul-lez-Durance, France). A fotoszintetikus növekedésre képtelen, citokróm c_2 mentes *Rba. sphaeroides* CYCA I törzset (Dr. Donohue ajándéka, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin USA) rázóasztalon (1 Hz), sötétben, Erlenmeyer lombikokban neveljük ugyanabban a tápoldatban kanamycin és spectinomycin antibiotikumokkal kiegészítve, szemi-anaerob környezetben.

A sejteket a növekedésük stacioner fázisában használjuk fel, és a mérések előtt nitrogénnel 15 percig buborékoltatjuk. A minták optikai sűrűségét (denzitását) alacsonyan tartjuk (OD (808 nm) < 0.1), hogy elkerüljük a másodlagos hatásokat (fényszórást, a BChl fluoreszcencia re-abszorpcióját, a másodlagos fluoreszcenciát, stb.).

Redukált TMPD –t (*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine, E_m~270 mV) vagy ferrocént (E_m~420 mV) használtunk elektrondonorként, amikor a természetes donor (cit c_2) hiányzott (CYCA I), vagy kis mennyiségben állt rendelkezésre. Ezek az anyagok hatékony donorok, és meggátolják P^+Q_A vagy $P^+Q_A^-$ állapotok felhalmozódását inenzív vagy hosszú gerjesztés alatt. Az ubikinon pool-t és a RC akceptor oldalát a sötétadaptált, nitrogénnel buborékoltatott sejtekhez 20 mM-ig növekvő mennyiségben hozzáadott Na-ditionittal redukáltuk. A kísérleteket, ahol nincs külön feltüntetve, szobahőmérséklete (293 K-en) végeztük.

A felhasznált pH pufferek: MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid), CHES (2-[N-Cyclohexylamino]ethanesulfonic acid), CAPS (3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid), MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid), Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol).

Redoxmediátorok: DQ (duroquinone), PES (phenazine ethosulphate), PMS (phenazine methosulphate), piocianin, etil-piocianin.

3.2 Biokémiai szeparálási eljárások

Kromatofóra preparálása

A baktériumsejteket EDTA tartalmú pufferban szuszpendáljuk fel, majd ultrahangos szonikálással feltörjük. A feltört sejteket 4000 rpm-el 20 percig, centrifugáljuk. A felülúszót 60 percig ultracentrifugáljuk (Sorval Ultra Pro 80) 4°C-on. A kromatoforát magában foglaló üledéket minimális mennyiségű pufferben (TRIS, NaCl, EDTA, pH 8) óvatosan felszuszpendáljuk, de kihagyjuk a szürke, kemény központi magot, amely sejtfal- és szervetlen anyag maradványokat tartalmazza. Ilyen állapotban a kromatofora a későbbi felhasználás céljaira befagyasztható, később a reakciócentrum izoláláshoz fehasználható.

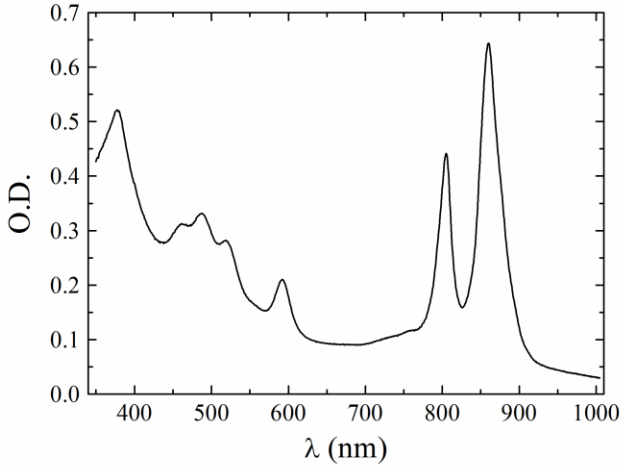
Reakciócenrtrum fehérje izolálása

A reakciócentrumot a kromatofora membránfrakcióból LDAO ionikus detergenssel oldjuk ki, amit szobahőmérsékleten, állandó keverés mellett adunk az oldathoz. 30 perces inkubáció után 120 perces ultracentrifugálás következik. Az üledékben lévő reakciócentrum fehérje tisztítását több lépcsős ammónium-szulfátos kicsapással végezzük, majd ezután további tisztítás következik anion-cserélő kromatográfiával. Végül a magas só- és detergens koncentrációt dialízissel (TRIS, LDAO, EDTA, pH 8,0) csökkentjük.

3.3 Abszorpció mérés

Állandósult (steady-state) abszorpció

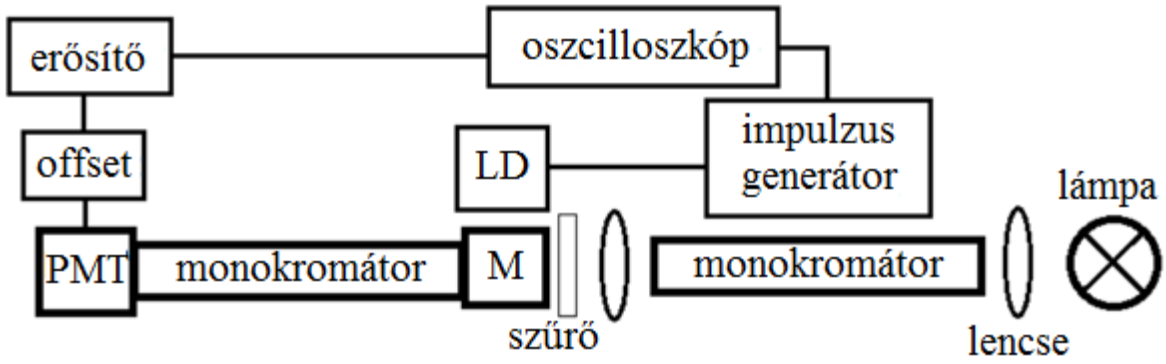
A baktériumtenyészetek abszorpciós spektrumát Unicam UV4 vagy Helios γ spektrofotométerrel mértük. A Unicam készülék előnye, hogy nagy optikai denzitású és szóró mintákat is lehet vele mérni, így egész sejtekhez ideális, a spektrum kék vége is jól látható, de detektora csak 900 nm-ig használható. A sejtek spektrumának vörös végét a Helios készülékkel tudjuk pontosan mérni. A két berendezéssel felvett spektrumok kombinációja látható a 3.1. ábra



3.1. ábra *Rvx. gelatinosus* sejtek abszorpciós spektruma.

Fény-indukált abszorpcióváltozás

A sejteket 15 percig anaerob környezetben sötétadaptáltuk a mérések előtt. A Xe flash (3 µs széles impulzusok) vagy lézerdióda (Roithner LaserTechnik LD808-2-TO3, 808 nm, 2 W, változtatható flash hossz, téglalap alak) által kiváltott abszorpcióváltozás kinetikáját házilag épített spektrofotométerrel (Maróti and Wraight 1988) detektáltuk (3.2. ábra).



3.2. ábra A fényindukált abszorpcióváltozás mérésére használt elrendezés. LD: lézeridóda, PMT: fotoelektron sokszorozó, M: mintatartó.

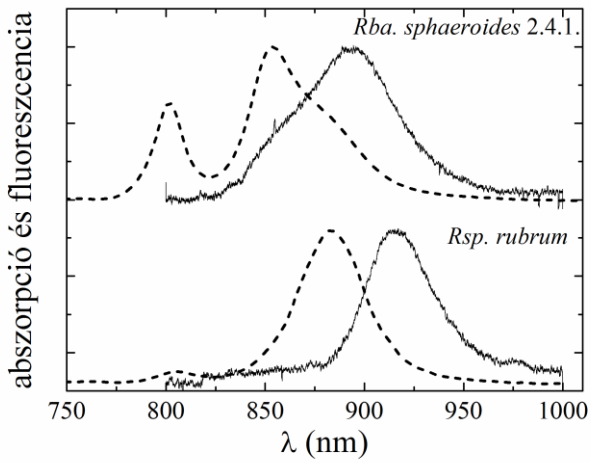
A mérőfényt 60 W (elektromos) teljesítményű volframszálas autóizzó adja, és Jobin Yvon monokromátorokkal választjuk ki a megfelelő hullámhosszat. Egy-egy monokromátor van a minta előtt és után. A detektor egy Hamamtsu R928 típusú fotoelektron sokszorozó. Intakt sejtek esetében az oxidát dimert (P^+) 798 nm-en mértük (Bina et al. 2009; Rivoyre et al. 2010). Repetitív mérésekkor átfolyós küvettát használtunk az elektrontranszportban gátolt sejtekhez, amikor hosszú élettartamú zárt RC-ok keletkeznek.

A zárt RC kinyitását kettős flash kísérletekkel követtük: a telítési első flash (Xe) bezárja a RC-ot, és az időben egyre távolabb vitt második telítési flash által keltett abszorpció-változásnak az elsőhöz viszonyított amplitúdója mutatja a RC újra-nyitásának kinetikáját.

3.4 Fluoreszcencia mérés

Fluoreszcencia spektrum

A fluoreszcencia spektrumok felvételéhez Perkin Elmer MPF 4 spektrofluorimétert használtunk, a saját detektora helyett vörös érzékeny PIN fotodiódával (10DI UDT Sensors Inc.) végeztük a megfigyelést. A 3.3. ábra két bíborbaktérium fluoreszcencia spektrumát mutatja abszorpciós spektrumaikkal összevetve a Stokes-eltolódásokat jól láthatóvá téve.



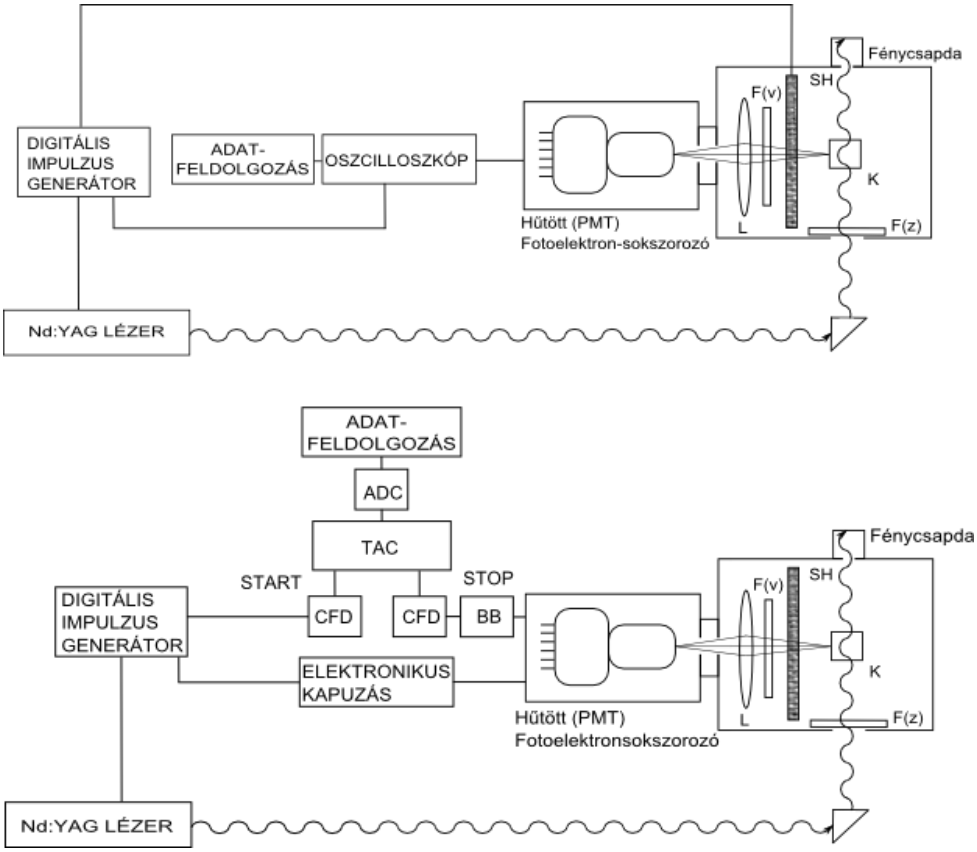
3.3. ábra Bíborbaktériumok abszorpciós (szaggatott vonal) és fluoreszcencia spektruma (folytonos vonal).

Késleltetett fluoreszcencia

A baktériumsejteket frekvenciakettőzött és Q-kapcsolt Nd:YAG lézerrel gerjesztjük (Quantel YG 781-10, 532 nm hullámhossz, 20 mJ energia és 5 ns szélesség), a késleltetett fluoreszcenciát fotoelektronsokszorozóval detektáljuk (Hamamatsu R3310-03). A PMT a jobb jel/zaj viszony érdekében hűtött, valamint az intenzív prompt fluoreszcenciától elektronikusan vezérelt mechanikai fényzárral (Uniblitz VS25) vagy elektronikus kapuzással védjük. Az utóbbi esetben a feszültség osztó láncban három dinóda feszültsége a szomszédjai fölé van emelve, így a PMT erősítése 6 nagyságrenddel csökken egy rövid időre (400 ns), míg tart a lézergerjesztés, ill. a BChl intenzív prompt fluoreszcenciája le nem cseng. A késleltetett fluoresz-

cenciát fotonszámláló kártyával mérjük az MCDWIN program (MCA-3/P7882 Fast ComTec) segítségével.

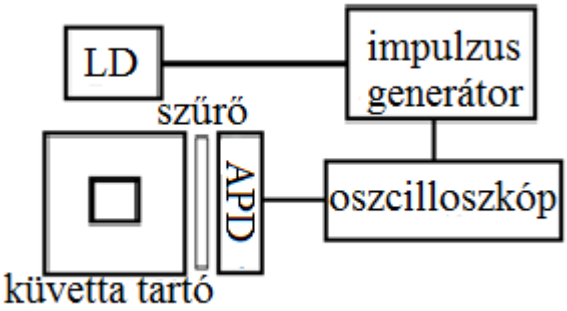
A 3.4. ábra mutatja a DL mérésekhez használt elrendezéseket.



3.4. ábra A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia méréséhez használt optikai mérőberendezés blokksémája. Jelölések: L – bikonvex optikai lencse, SH – mechanikus fényzár, K – kvarc küvetta, F(v) – vörös felüláteresztő szűrő, F(z) – zöld sáváteresztő szűrő (az ábra Sipka Gábortól származik).

Fluoreszcencia indukció

A fluoreszcencia indukciót téglalap alakú lézer flash alatt mértük. A megvilágításhoz 808 nm hullámhosszú lézer diódát használtunk (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W), ez a hullámhossz éppen eltalálja az LH2 antenna 800 nm-es abszorpciós sávját, így optimális gerjesztést biztosít. A megfigyelést a gerjesztés irányára merőlegesen elhelyezett lavina fotodiódával (APD; model 394-70-72-581; Advanced Photonix, Inc., USA) végeztük. A detektort 850 nm felett áteresztő szűrővel (Schott RG-850) védtük a szórt lézerfénytől. Az elrendezést a 3.5. ábra mutatja.



3.5. ábra A fluoreszcencia indukció mérésére használt elrendezés. LD: lézer dióda, APD: lavina fotodióda

Fluoreszcencia indukció mérésére ezen az elrendezésen kívül a fluoriméterünkkel is lehetőség van, ezt a következő pontban részletezzük.

Fluoreszcencia relaxáció

A fluoreszcencia relaxáció mérésére egy saját, házilag épített készüléket használunk (Kocsis és mtsi., 2010), ami a „pump and probe" módszer szerint működik. Két flash sorozatot mér a készülék: az első csak tapogató fényfelvillanásokból (flash) áll, ezzel határozzuk meg az F_0 szintet, a második sorozat gerjesztő flash-el kezdődik, és ezt követik a tapogató flash-ek. A gerjesztő flash alatt a reakciócentrumok bizonyos hányada bezáródik, így a tapogató flash sorozat alatt magas fluoreszcencia szintet mérünk. A fluoreszcencia a reakciócentrumok kinyitása következtében lecseng a gerjesztés nélkül mért szintre.

A flash-eket ugyanolyan lézerdiódák biztosítják, mint amikrt a fluoreszcencia indukció méréséhez használunk (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W). A készülék számítógép-ről vezérelhető, és az áramellátása is az USB kábelen keresztül történik.

A fluoriméter működését és felhasználását bővebben részletezem a 4.1. fejezetben.

3.5. Elektrokémiai mérés

A P és a citokróm c_2 pool titrálását a kinetikai (abszorpció) spektrofotométerünkben végeztük a házilag készített redox küvettánkban (Maróti and Wraight 1988). A platina munkaelektróda és az Ag/AgCl (3 M KCl) referencia elektróda pontosan illik az 1x1 cm-es küvettába, aminek tartalmát kevertetjük. Egy tipikus minta a következő mediátorokat tartalmazta: 4 μM phenazine ethosulphate, 4 μM phenazine methosulphate, 40 μM TMPD, 40 μM 2,6-dichloro-phenolindophenol, 20 μM 1,2-naphtoquinone, 20 μM 1,4-naphtoquinone, 20 μM 2,5-di-hydroxy-*p*-benzoquinone és 20 μM anthraquinone sulphonate. Az adott potenciálon oxidált P

és cit c_2 relatív mennyiségét a 798 nm-en és 551 nm-en (versus 570 nm) mért flash indukált abszorpcióváltozás amplitúdójából határoztuk meg. Redukáló irányú titrálásnál frissen készített Na-ditionit oldatot adtunk a mintához, oxidatív titrálásnál pedig K-ferricianid oldatot. Minden mérés előtt legalább 5 percig vártunk, míg a minta alkalmazkodott az aktuális redox-potenciálhoz.

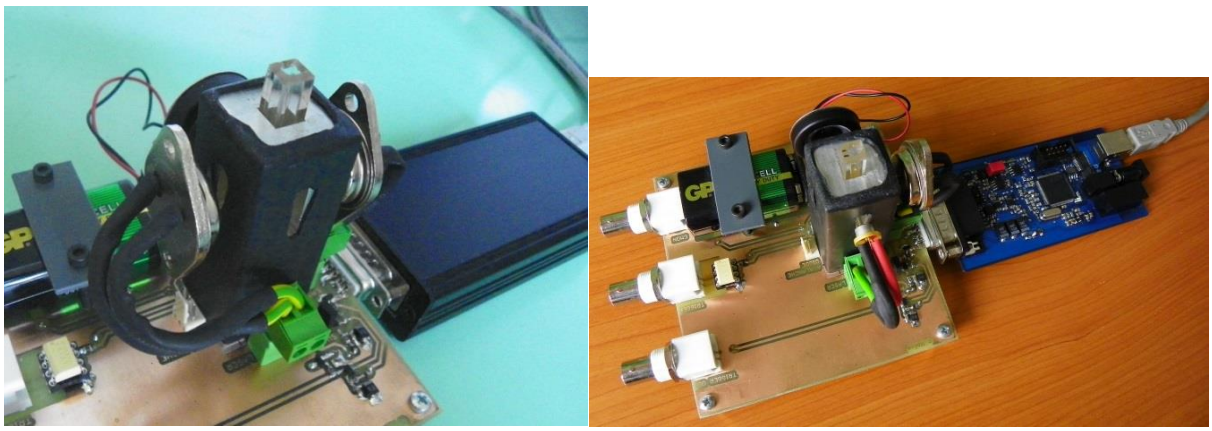
4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. A bakterioklorofill fluoriméter és felhasználása

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

Bakterioklorofill fluoriméter működésének ismertetése

Az általunk épített bakterioklorofill fluoriméter egy hordozható készülék, mely fotoszintetikus baktériumsejtek tulajdonságainak meghatározására alkalmas flash indukált változások mérésével. A készülékkel követhetjük a reakciócentrum dimernek a gerjesztő flash utáni abszorpcióváltozását, a bakterioklorofill fluoreszcencia lecsengését (relaxációt) és flash alatti emelkedését (indukciót). A készülék előnye, hogy ez a három módszer egyetlen elrendezésbe integrált. A gerjesztő (808 nm) és a tapogató (785 nm az abszorpcióváltozáshoz és 808 nm a fluoreszcenciához) flash-eket is lézer diódák szolgáltatják.

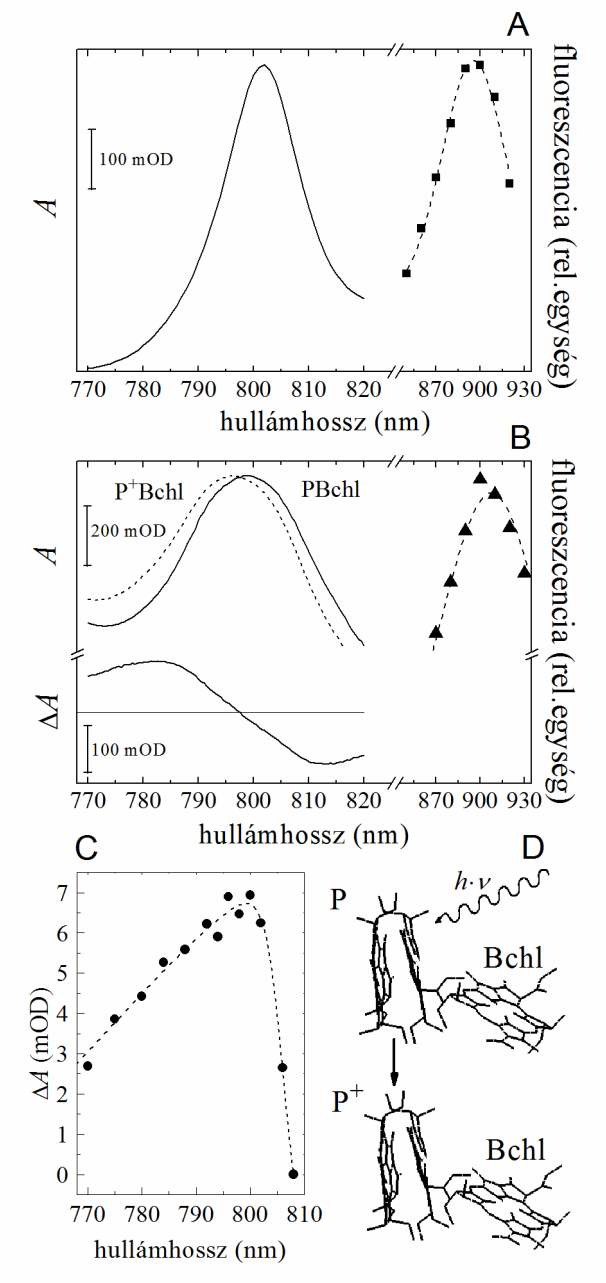


4.1. ábra Bakterioklorofill fluoriméter. Középen látható a küvettatartó a 3*3 mm-es küvettával, két oldalán a gerjesztő és a tapogató lézer diódával (baloldal). A gerjesztésre merőleges irányból történik a megfigyelés lavina fotodiódával, amit RG850 felül áteresztő szűrővel védünk a lézer diódák szórt fényétől (a szűrő és a lavina dióda az egyszerűbb áttekinthetőség miatt nem szerepel a képen). Abszorpcióváltozás mérés módban (jobboldal) a monitoring lézer diódát a detektorral szembe helyezzük, ilyenkor PIN fotodiódát használunk a megfigyeléshez, amit a fluoreszcenciától a lézerdióda hullámhosszán (785 nm) átengedő interferenciás szűrővel védünk.

A kompakt elrendezésnek köszönhető a kis mintatérfogat (200 µl), a gyors időbeli feloldás (5 µs), az érzékenység (16 bit), stabilitás és a biológiai mintából származó jel reprodukálhatósága. A készülék számos területen használható, mint például: különböző baktériumtörzsek és mutánsok fotoszintetikus apparátusának felépítése és redox állapotának

vizsgálata, nehézfém ionoknak a baktériumok fotoszintetikus kapacitására gyakorolt romboló hatásának kimutatása, a baktériumok lehetséges felhasználása nehézfém szennyezések kimutatására vizes környezetben és a veszélyes anyagok eltávolítására (bioremediáció). A készülék kompakt felépítése és széleskörű felhasználhatóságának köszönhetően alkalmas szabadtéri mérésekhez vagy nagyobb mérőrendszerekbe való beépítésre.

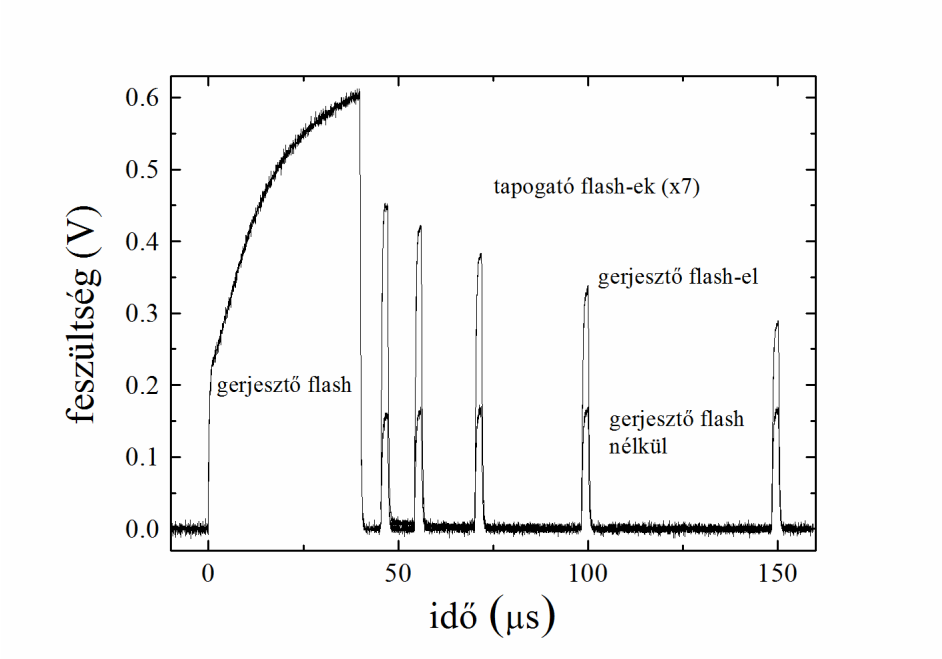
A készülék optikai tervezésekor azt tartottuk szem előtt, hogy a baktériumsejtek, membránfrakciók (kromatofórák) és reakciócentrum fehérjék fény-indukált spektroszkópiai (abszorpció és fluoreszcencia) tulajdonságait magas jel/zaj viszonnyal mérhessük (4.2. ábra). A *Rba. sphaeroides* elektrontranszportját különösen hatékonyan lehet gerjeszteni, mert az alkalmazott lézerdiódák hullámhosszai (808 nm és 785 nm, 4.2. ábra, A) a perifériás antenna (LH2) széles, 800 nm-es abszorpciós sávjába esnek. Emiatt viszonylag intenzív fluoreszcencia jeleket mérhetünk mind indukcióban, mind relaxációban még élő sejteken is. Intakt sejtekben a fényindukált abszorpcióváltozás erősen aszimmetrikus sávja 800 nm körül figyelhető meg (4.2. ábra, C), eredete a RC- ban lévő BChl monomer elnyelésének elektrokróm eltolódására vezethető vissza, amit a dimer fényindukált oxidációja okoz (4.2. ábra, D). A jelenség szépen bemutatható izolált reakciócentrumon a dimer (P) kémiai oxidációjával (4.2. ábra, B). Itt biokémiai eljárások sorozatával a RC fehérjét kinyertük (izoláltuk) a sejtből (természetes közegéből), és detergens oldatban van. P oxidációja a BChl abszorpciós sávjának enyhe (~ 2 nm), szimmetrikus elektrokróm kék eltolódását eredményezi. A RC fluoreszcencia spektruma (4.2. ábra, B, jobboldalt) hasonló az intakt sejtekben lévő antenna BChl- okéhoz.



4.2. ábra Intakt sejtek (A), izolált reakciócentrum (B) és intakt sejtekben lévő RC (C) abszorpció és fluoreszcencia sávjai és a megfigyelt fényindukált abszorpció-változásért felelős pigmentek elrendeződése (D). Csak a lézer diódák hullámhosszának (785 nm és 808 nm) közelében lévő abszorpciós sávokat ábrázoltuk. A: *Rba. sphaeroides* sejtek perifériás antennája B800 BChl- fehérje komplexének steady- state abszorpciós (baloldal) és fluoreszcencia (jobboldal) spektruma. B: Izolált RC BChl monomerének abszorpciós spektruma a dimer redukált (P, folytonos vonal) és ferricianiddal oxidált (P^+, szaggatott vonal) állapotában (baloldal, felül), és a kettő különbsége (baloldal, alul). A RC fluoreszcencia spektruma (jobboldal). C: Intakt sejtekben lévő RC fényindukált abszorpció-változásának spektruma. D: A RC- ban lévő dimer (P) és monomer BChl szerkezeti képe. A monomer BChl abszorpciós sávja elektrokróm eltolódást szenved a dimer fényindukált oxidációja ($P \rightarrow P^+$) miatt.

A készülék a szokásos „pump- and- probe” módszert használja a kibocsátott fluoreszcencia vagy a sejtek transzmisszió változásának meghatározásához (4.3. ábra). A mintát különböző hosszúságú, erős gerjesztő fényfelvillanással (flash-sel) világítjuk meg, ezzel fotofizikai és fotokémiai reakciókat indítunk el, majd ezek lecsengését gyenge tapogató flash sorozattal követjük nyomon. A flash-eket nagyenergiájú lézer diódák adják (Roithner Laser Technik LD808 vagy LD785, 808 nm és 785 nm hullámhosszal, 2 W teljesítmény). A gerjesztő flash intenzitásának és hosszának (10 µs – 1 ms) változtatásával a baktérium fotoszintetikus apparátusát különböző állapotokba hozhatjuk, amiket a tapogató flash-ek alatti fluoreszcencia (*F*) vagy abszorpcióváltozás (ΔA) megfigyelésével tudunk kimutatni. A gerjesztő flash téglalap alakját kihasználva, a fluoreszcencia indukció közvetlenül mérhető a gerjesztés alatt, a

relaxáció pedig utána a sötétben. A készülék fluoreszcencia indukció és relaxáció, valamint abszorpcióváltozás mérésre alkalmas.



4.3. ábra A detektor közvetlen kimenete (feszültség) fluoreszcencia (indukció és relaxáció) vagy átmenő fény (abszorpcióváltozás) méréskor intakt baktériumsejteken. Fluoreszcencia módban a nagy intenzitású gerjesztő flash (itt 40 μs hosszú) a fluoreszcencia hatásfok növekedést okozza (indukció), ennek lecsengését tapogatjuk le a sötétben gyenge (nem gerjesztő), 2 μs széles tapogató flash-ek sorozatával (relaxáció). A jobb szemléltetés érdekében a tapogató flash- ek által keltett fluoreszcenciát 7-el felszoroztam. Abszorpció módban a detektor kimenetén a minta transzmisszióját látjuk.

Mivel a „sötét" fluoreszcencia emelkedése sokkal gyorsabb, mint a változó fluoreszcencia fotokémiai emelkedése, így a sötét fluoreszcencia szintje (F_0) egyértelmű töréspontként látszik a kinetikában. A relatív fluoreszcencia hatásfokot ehhez a szinthez viszonyítva számítjuk (F/F_0). A tapogató flash- ek kis intenzitásúak (10- 100 mW) és rövidek (2- 5 μs), annak érdekében, hogy gerjesztő hatásuk elhanyagolható legyen (ezt ellenőrizzük az F vagy ΔA jel gerjesztő flash-el vagy anélkül mért változásának összehasonlításával). A szomszédos flash-ek közötti legkisebb időtartam 4 μs lehet. A tapogató flash sorozatban a flash- ek száma és az egymást követő flash- ek közti szünet hossza változtatható mértani sor szerint: a legkisebb szünet (a gerjesztő flash és az első tapogató flash között), a legnagyobb szünet (az utolsó két flash között) és a flash-ek száma határozza meg a mértani sort. A jel/ zaj viszony növelése érdekében a tapogató flash- ek alatti jelet integrálja a készülék.

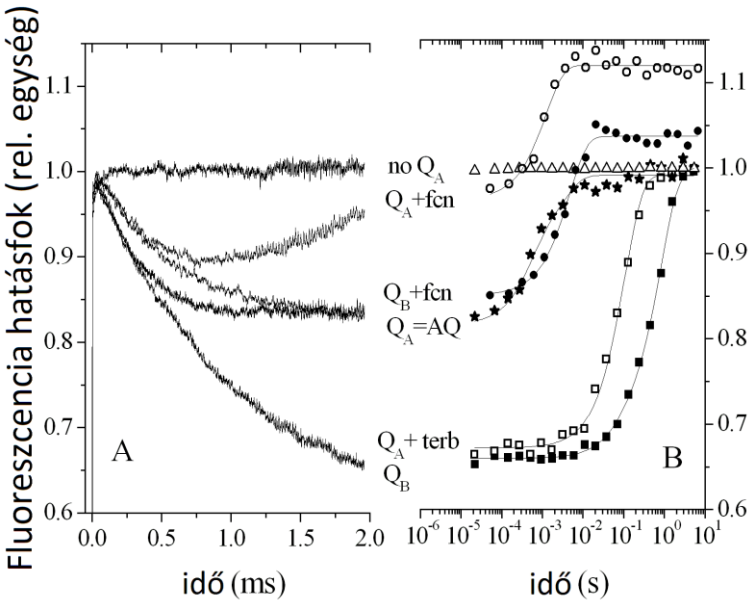
A készülék optikai és mechanikai felépítése egyszerű és kompakt (4.1. ábra). A lézer dióda emissziós profilja homogén megvilágítást biztosít a 3x3x15 mm^3 térfogatú hasáb alakú

küvettában. Amennyiben a minta optikai denzitását a gerjesztő hullámhosszon alacsonyan tartjuk (OD < 0.1), elkerülhetők a másodlagos hatások (szórás, a BChl fluoreszcencia re-abszorpciója, másodlagos fluoreszcencia). A fluoreszcencia méréshez lavina fotodiódát (Advanced Photonix, Inc., model 394-70-72-581), a ΔA méréshez pedig PIN fotodiódát (10DI UDT Sensors Inc.) használunk, mindkettő a közeli infravörös tartományban érzékeny. A megfigyelés iránya (detektor) merőleges a gerjesztő lézer nyalábra és párhuzamos (transzmisszió változás) vagy merőleges (fluoreszcencia mérés) a tapogató flash- ek irányára. A fotodiódát 850 nm felett áteresztő szűrővel védjük a szórt gerjesztő fénytől (RG-850, fluoreszcencia), vagy interferenciás szűrővel (IF 783) a BChl fluoreszcenciától és a szórt gerjesztéstől. Az interferenciás szűrőt úgy választottuk, hogy középpontja jól egyezzen a tapogató lézerdióda hullámhosszával (abszorpcióváltozás mérés). Az utóbbi esetben (abszorpció mérési mód) a lézer dióda közvetlenül a detektorba világít, így a fényintenzitás csökkentése különösen fontos, a detektor telítődésének elkerülése miatt.

Példák a bakterioklorofill fluoriméter felhasználására

Az intakt sejteken való felhasználásra a 4.3. fejezetben láthatunk példákat, az ott bemutatott eredményeket mind ezzel a fluoriméterrel mértük.

A fluoriméter felhasználható izolált RC fehérje vizsgálatára is. RC-on a sejtekével ellentétes irányú fluoreszcencia indukció látható (4.4. ábra). Téglalap alakú gerjesztés alatt a fluoresz-cencia hatásfok nem növekszik, hanem csökken (4.4. ábra, A), majd sötétben visszatér a kezdeti szintre (4.4. ábra, B).



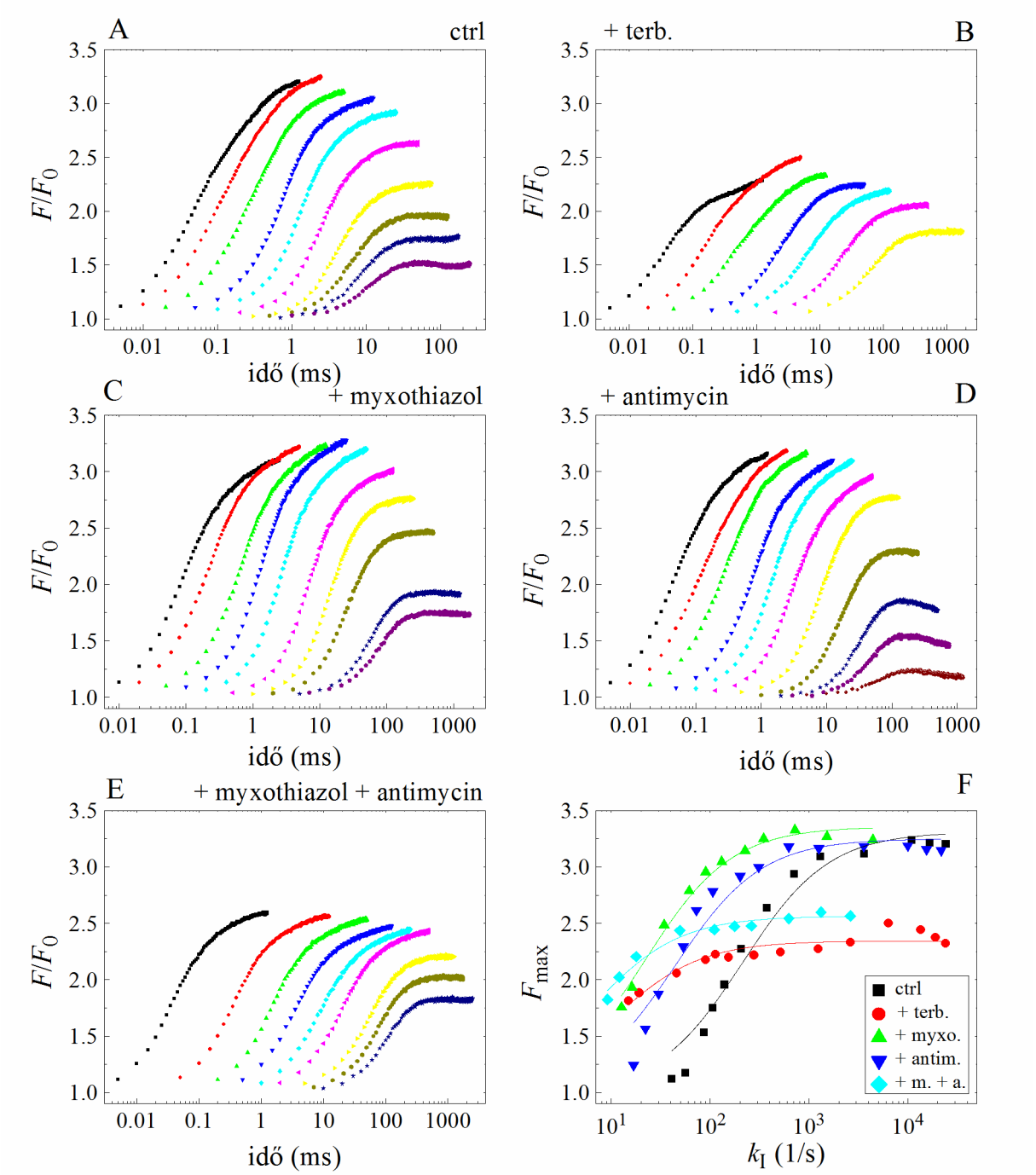
4.4. ábra *Rba. sphaeroides*-ből izolált RC-ok fluoreszcencia inukciója (A) és relaxációja (B). A fluoreszcencia a kezdeti szintre normált. A RC-okat a következő kezeléseknek vetettük alá: kinonmentesítés (no Q_A, Δ), Q_A helyettesítése 2-metil-antrakinonnal (Q_A = AQ, ★), Q_B helyreállítása a natív UQ_{10}-el (Q_B, ■), az interkinon elektrontranszfer blokkolása 120 µM terbutrinnal (Q_A + terb, □) és 50 µM ferrocén hozzáadása aktív (Q_B + fcn, ●) vagy blokkolt (Q_A + fcn, ○) interkinon elektrontranszfer mellett. A Q_A és Q_B aktív RC-ok fluoreszcencia indukciója megegyezik. Körülmények: 0.03 % LDAO, 10 mM Tris, 5 µM RC, pH 7.8.

A relaxáció amplitúdója és sebessége nagyon érzékeny a fehérje elektron akceptoraira és donoraira. Minél gyorsabb a relaxáció, annál kisebb az amplitúdója. Ez akkor mutatkozik meg, amikor az interkinon elektrontranszfert blokkoljuk (terbutrin hozzáadásával), vagy amikor a natív kinont (UQ_{10}) a Q_A helyen lecseréljük az alacsony potenciálú 2-metil-antra-kinonra, vagy amikor külső donor (ferrocén) visszaredukálja az oxidált dimert (P^+).

4.2. Fluoreszcencia indukció

Fény és termikus reakciók a fotoszintézis korai szakaszában

Az általunk alacsonynak nevezett fényintenzitású gerjesztéssel már ahhoz a fiziológiás állapothoz közelítünk, amelyben a sejtek természetes közegükben működhetnek. Ehhez a fluoreszcencia indukciót flash sorozattal vettük fel (250 db 3 µs széles flash), a kitöltési tényező csökkentésével érhető el az idő-átlagban vett gerjesztő fényintenzitás csökkenése.



4.5. ábra *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejtek fluoreszcencia indukciója különböző fényintenzitásokon és kezelésekkel. A: kezeletlen tenyészet, B: + 120 µM terbutrin, C: + 5 µM myxothiazol, D: + 10 µM antimycin, E: + 5 µM myxotiazol és 10 µM antimycin. F: Az F_{max} értékek a fotokémiai sebesség függvényében.

A fényintenzitás csökkenésével a fotokémiai sebességállandó, k_I csökkenése mellett F_{max} is egyre kisebb. F_{max} csökkenését az összes itt alkalmazott kezelés lassítja. A 4.5. ábra F panelén lévő pontokat az

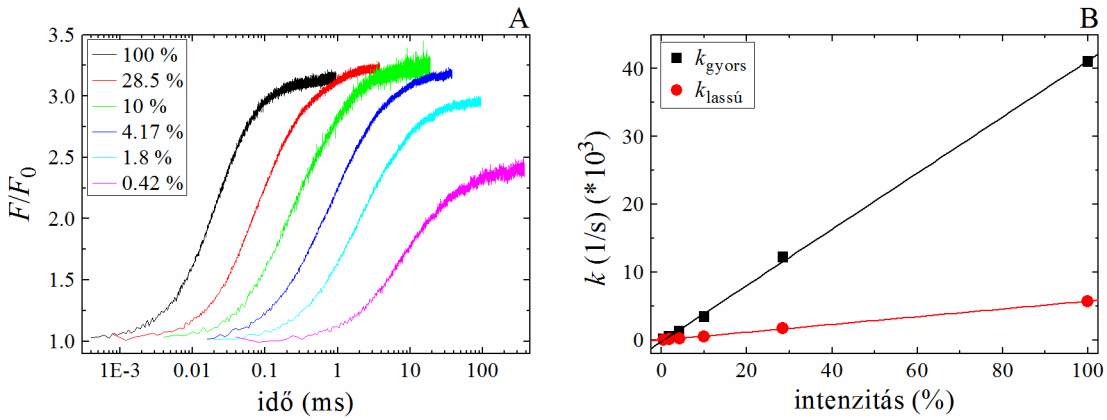
$y = F_{max} - (F_{max} - 1) * (\frac{k_e}{x+k_e})$ összefüggés alapján illesztettem, amely egy olyan egyensúlyi minimum-modellből származtatható, amelyben a fotokémiai gerjesztés sebessége és a ciklikus elektrontranszfer sebessége (sebességállandója k_e) megegyezik. A fénygerjesztéssel ugyanis emelkedik, az elektrontranszporttal pedig csökken a mért fluoreszcencia maximális értéke (F_{max}). Az illesztéssel nyert paramétereket a 4.1 táblázat tartalmazza.

	F_{max}	t_e (ms)
kezeletlen	3.3	4.7
+ terbutrin	2.34	92
+ myxothiazol	3.35	22.6
+ antimycin	3.25	45
+ myxothiazol + antimycin	2.56	150

4.1. táblázat A 4.5. ábra F panelén lévő pontokra illesztett görbék paraméterei.

A ciklikus elektrontranszfer sebességállandójából származtatható $t_e = 1/k_e$ transzfer-félidő az elektronoknak a két komplex (RC és cit bc_1) közötti átlagos áthaladási idejét jelenti, amely fontos jellemzője a baktérium fotoszintetizáló képességének: csökkenése biztos jele annak, hogy a baktérium nem képes (vagy nem akarja) a teljes, rendelkezésre álló kapacitását kihasználni.

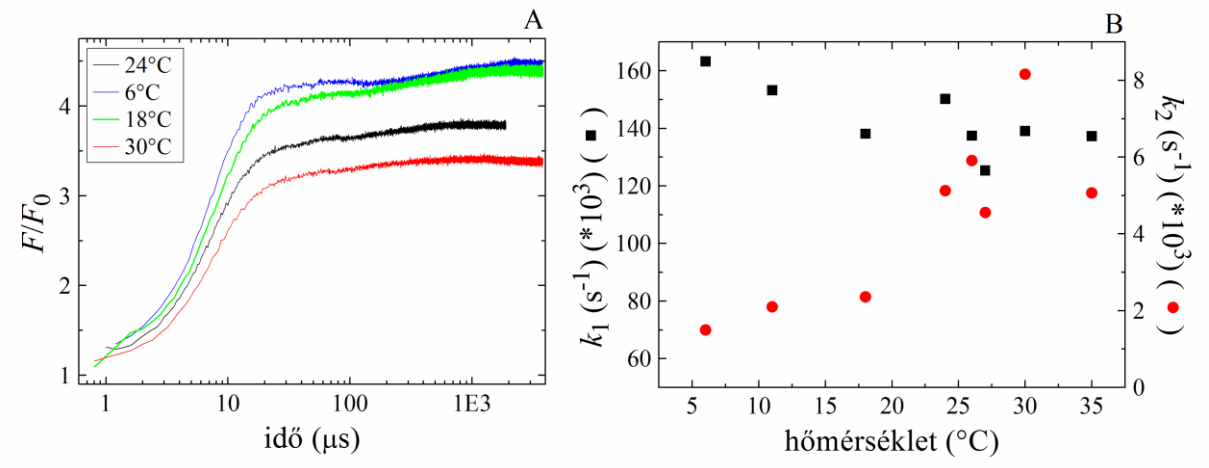
A fluoreszcencia indukcióban két fázist figyelhetünk meg. Az első a fotokémiai fázis, ezalatt $P^+Q_A^-$ keletkezik.



4.6. ábra A fluoreszcencia indukció fényintenzitás függése *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejteken (A) téglalap lakú gerjesztés alatt. Az indukciók gyors és lassú fázisainak sebességállandói a gerjesztő fényintenzitás függvényében (B).

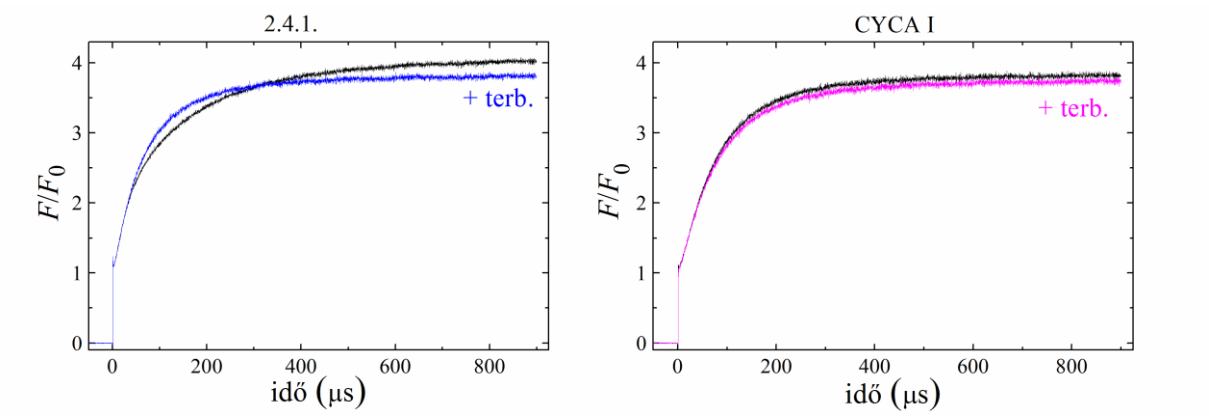
Megvizsgáltuk az indukció fényintenzitástól való függését és azt kaptuk, hogy mindkét fázisnak van fényintenzitás függése, de különböző mértékben (4.6. ábra). A gyorsabb, vagyis

a fotokémiai fázis, az elvárásainknak megfelelően erősen függ a gerjesztés intenzitásától, míg a lassú (termikus) fázisnak csak kis fényintenzitás-függését tapasztaltuk. A lassú fázis sebességállandója általában körülbelül tizede a fotokémiai fázisának.



4.7. ábra Hőmérsékletfüggés *Rba. sphaeroides* sejtek fluoreszcencia indukcióján (A). A gyors (k_1) és lassú (k_2) fázis sebesség állandóinak hőmérsékletfüggése (B).

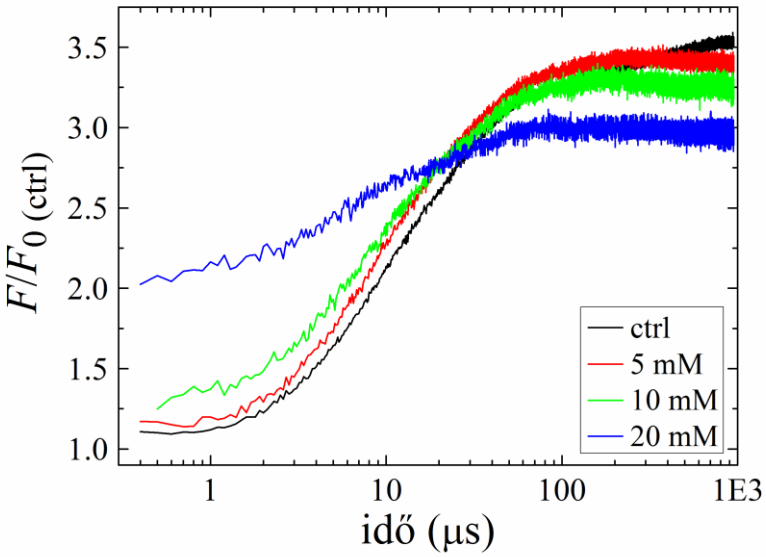
A fluoreszcencia indukció függ a hőmérséklettől. A két fázis sebességállandóik eltérő hőmérsékletfüggése miatt jobban elkülönül alacsony hőmérsékleten, míg magas hőmérsékleten alig (4.6. ábra, A). A sebességállandókat ábrázolva látható, hogy a fotokémiai fázisé csekély mértékben változik, míg a termikus fázisé nagy hőmérsékletfüggést mutat.



4.8. ábra Terbutrin hatása *Rba. sphaeroides* 2.4.1. (balra) és CYCA I (jobbra) sejtek fluoreszcencia indukciójára.

Az interkinon elektrontranszfert ($Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$) blokkoló terbutrin *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejtekben csökkenti a fluoreszcencia indukció második (lassú) fázisát. A cit c_2 mentes CYCA I sejteken az indukció lassú fázisa eleve kisebb, mint vad típusban és ezen a terbutrin nem változtat (4.8. ábra).

A sejtekhez Na-ditionit oldatot adva kiredukálhatjuk a kinonokat, ezzel lezárva a RC akceptor oldalát (4.9. ábra).



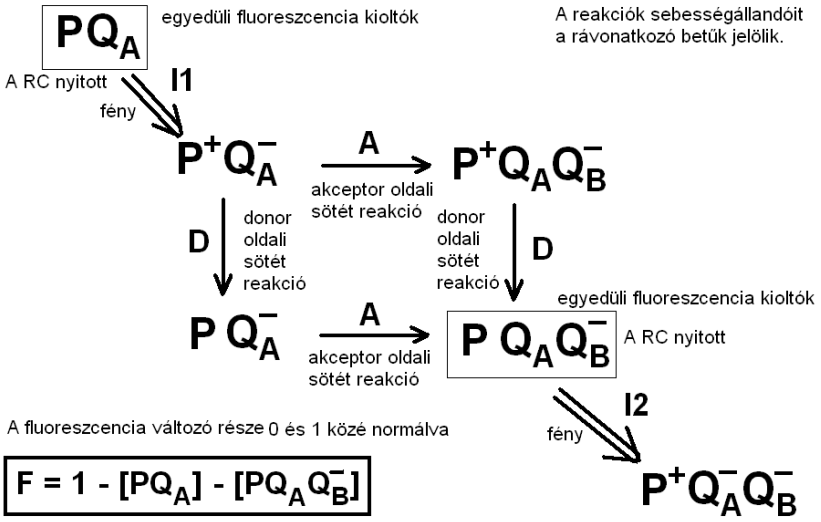
4.9. ábra Na-ditionit titrálása *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejteken. A fluoreszcencia indukciókat a kezeletlen minta F_0 értékére normáltuk.

Kis koncentrációban a ditionit még csak a második emelkedő fázis amplitúdóját csökkenti, az F_0 szintet nem befolyásolja. A nagyobb koncentrációk viszont a második fázis és ezzel F_{max} csökkentése mellett már az F_0 szintet is emelik, így csökkentve (egyre inkább összenyomva) a változó fluoreszcenciát.

A fluoreszcencia indukció (fotokémiai és termikus) fázisai

A fenti kísérletek egyértelműen mutatták, hogy a fluoreszcencia indukció (triviálisnak vehető) fotokémiai emelkedésén túl további lassabb és sokkal kisebb amplitúdójú emelkedéssel is számolnunk kell. Ezen fázis eredetének felderítése igazi kihívás, amelyet az alábbi minimum-modellben gondolkozva igyekeztünk megoldani (4.10. ábra). Megjegyezzük, hogy hasonló problémakör a zöld növények fotoszintézis kutatóit is erősen foglalkoztatja, és jelenleg lényegében még mindig csak a kísérleti adatok és az (egymással sokszor ellentmondó) elképzelések mennyiségi felhalmozásának állapotában vannak (Schansker és mtsi 2011, Stirbet and Govindjee 2012, Stirbet 2013, Laisk és Oja 2013). A végső, mindenkit megnyugtató leírás még várat magára (ott is). Az általunk alkalmazott modell figyelembe veszi, hogy nem csupán egyszeres, hanem (a kimenetet visszacsatolva akár) többszörös foton-találat is lehetséges a hosszabb megvilágítás alatt a baktérium RC-ban. Feltételezzük ugyan-

akkor, hogy a megvilágítás nem olyan hosszú (< 1 ms), hogy a ciklikus elektrontranszport lényegesen befolyásolni tudja a RC körül, a fénygerjesztés alatt kialakuló redox-viszonyokat.



4.10. ábra A RC redox állapotai fénygerjesztés után

A megadott időtartományon belül (< 1 ms) ugyanaz a RC maximum 2-szer gerjeszthető, mert a másodlagos donor (redukált citokróm c_2) és kinon akceptor (Q_B) kapacitása ill. kinetikája véges, és két töltésszétválasztásra korlátozott. Az első gerjesztés (*I*1) kellően gyors lehet (a fényintenzitástól függ), a második fénygerjesztés (*I*2) azonban már vélhetően lassabb, mert az első által keltett töltések a donor ill. az akceptor oldalakon gátolják az újabb töltéspár létrejöttét, azaz rájuk nézve a veszteségi töltésrekombináció nagyobb valószínűségű, mint az első töltéspárra. Ez abban nyilvánulhat meg, hogy a második fényreakció sebességállandója kisebb, mint az elsőé: $I2 < I1$.

1) A fluoreszcencia hatásfoka nem lineáris, hanem (az egységek közötti energetikai csatolás miatt) hiperbólikus függvénye a fluoreszcencia kioltók koncentrációjának!

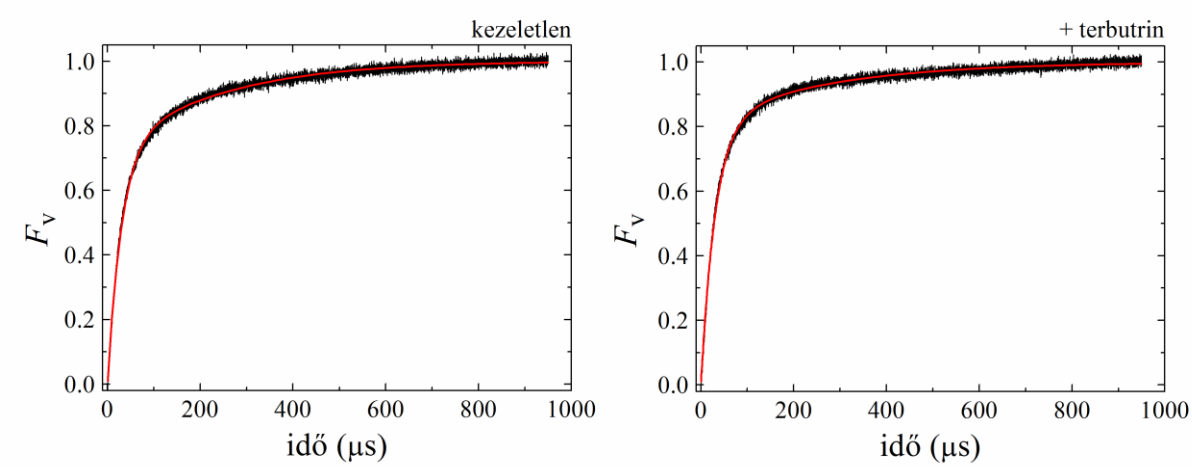
2) A kétféle (kötött ill. laza) citokróm c_2 miatt a donor oldalon P^+ redukciójához vezető reakció heterogén (gyors ill. lassú), és emiatt a fenti reakcióséma is heterogén (legalább két részre bontható a donor oldali reakció sebességi állandója szerint).

A megfigyelt fluoreszcencia intenzitásának (helyesebben hatásfokának) időbeli változását kiszámíthatjuk az egymásba kapcsolt reakciók alapján annak feltételezésével, hogy a nyitott RC teljesen elnyeli (fotokémiailag hasznosítja) a gerjesztő fotont (azaz fluoreszcenciát nem fog kiváltani), míg a zárt RC-ot ért fotontalálat fluoreszcencia formájában vész el. Ha 1-re normáljuk a megfigyelt fluoreszcencia változó részét, akkor a két nyitott állapotú RC fluoreszcenciája 0 lesz, míg a zárt centrumok mindegyike maximálisan, azaz 1 relatív

hatásfokkal fluoreszkál. Az egyes redox-állapotok koncentrációi határozzák meg a megfigyelt fluoreszcencia intenzitásának változását (a súlyfaktorok 0 ill. 1 nyitott ill. zárt centrumok esetén).

A felírt reakcióséma alapján az egyes állapotok koncentrációinak időbeli változása egzakt módon (analitikus formában) kiszámítható. A kezdőfeltétel: [PQ] = 1 a t = 0 időpillanatban (ill. ekkor valamennyi más forma eltűnik). A részletek ismertetése nélkül:

$$F = 1 - \exp(-I1 \cdot t) - \frac{A \cdot D \cdot I1}{(A + D - I1)(I2 - I1)} \cdot \left(\frac{1}{D - I1} + \frac{1}{A - I1} \right) \cdot \left(\exp(-I1 \cdot t) - \exp(-I2 \cdot t) \right) - \frac{I1 \cdot (A + D)}{(A + D - I1) \cdot (I2 - A - D)} \cdot \left(\exp(-(A + D) \cdot t) - \exp(-I2 \cdot t) \right) - \frac{I1 \cdot D}{(I1 - D) \cdot (I2 - D)} \cdot \left(\exp(-D \cdot t) - \exp(-I2 \cdot t) \right) - \frac{I1 \cdot A}{(I1 - A) \cdot (I2 - A)} \cdot \left(\exp(-A \cdot t) - \exp(-I2 \cdot t) \right) \quad (4.1)$$



4.11. ábra *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejtek fluoreszcencia indukciója. A kezeletlen (bal oldal) és terbutrinnal kezelt (jobb oldal) sejtek indukcióihoz a (4.1) egyenlet alapján számolt görbéket illesztettük.

Az illesztett görbe paramétereit a 4.2. Táblázat tartalmazza.

	I1 (s^{-1})	I2 (s^{-1})	A (s^{-1})	D (s^{-1})
kezeletlen	$2.32 \cdot 10^4$	$2.27 \cdot 10^4$	$5.55 \cdot 10^4$	$4.47 \cdot 10^3$
+ terbutrin	$2.56 \cdot 10^4$	$2.68 \cdot 10^4$	$4.95 \cdot 10^4$	$3.71 \cdot 10^3$

4.2. Táblázat A fluoreszcencia indukciókhoz a (4.1) egyenlet alapján illesztett görbék paraméterei.

A fluoreszcencia indukció lassú fázisának tulajdonságait az alábbiakban foglalhatjuk össze:

· A lassú fázis többszörös töltésszétválasztás eredménye, mert

1) a terbutryn számottevően csökkenti a lassú fázis amplitúdóját (4.8. ábra),

2) a citokrómmentes CYCA I még kisebb lassú fázist ad (ha egyáltalán ad, 4.8. ábra),

3) redukálószerrel (~10 mM Na-dithionit, amely a kinon poolt és Q_B-t feltételezhetően redukálja) a lassú fázis amplitúdója csökkenthető (4.9. ábra).

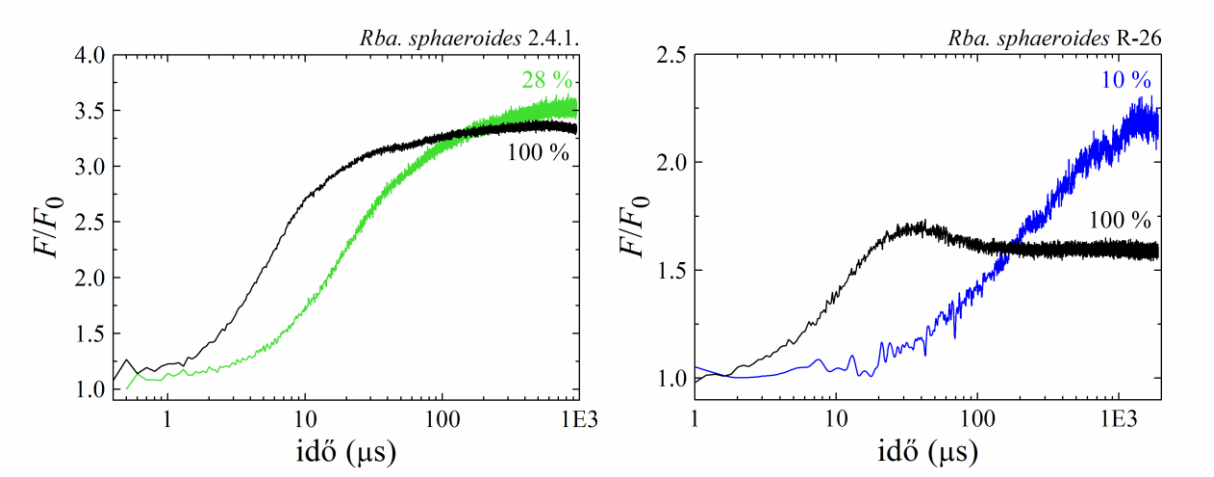
· A lassú fázisban a termikus és fény-reakciók keverednek.

· A fotokémiai és a termikus fázis félemelkedési idejeinek aránya nem nagyon érzékeny a fényintenzitásra; kb. egy nagyságrend van közöttük (a fényintenzitástól függetlenül).

· A fotokémiai és a lassú fázis az emelkedési sebességek szerint alacsonyabb hőmérsékleten (~ 5 ^{o}C) jobban elkülönül, mint magasabb hőmérsékleten (~35 ^{o}C), mert a termikus része hőmérséklet-függő (a fotokémiai fázis természetesen nem) (4.7. ábra).

Rövid élettartamú kioltók hatása a fluoreszcencia indukcióra

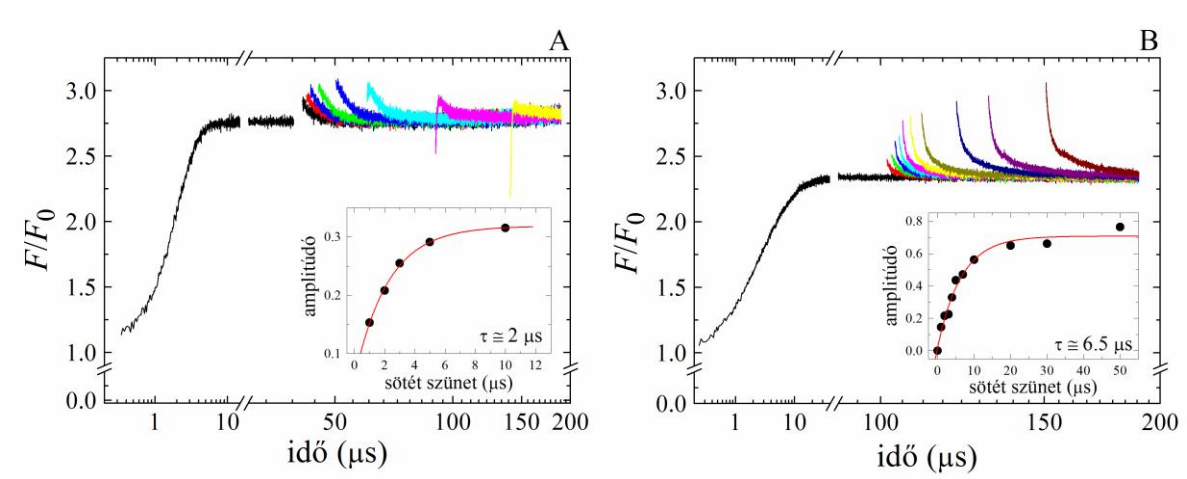
A gerjesztő fényintenzitást (jóval a fiziológiai szint fölé) növelve, azaz nagyon intenzív fénygerjesztést alkalmazva a fluoreszcencia változó részének csökkenése figyelhető meg, amit F_{max} csökkenése okoz, míg F_0 értéke (érthetően, hiszen ez a sötétben mért szintnek felel meg) változatlan marad.



4.12. ábra *Rba. sphaeroides* 2.4.1. (balra) és R-26 (jobbra) sejtek különböző fényintenzitásokon felvett fluoreszcencia indukciói.

A 4.12. ábrán látható kísérletekben a gerjesztő fényintenzitást kalibrált szürke szűrőkkel gyengítettük. Jól megfigyelhető, hogy a fluoreszcencia nagyobb (100%) fényintenzitással gerjesztve lényegesen alacsonyabb szintet ér el, mint a szürke szűrővel leosztott gerjesztés (28% vagy 10%) során. A jelenséget úgy értelmezhetjük, hogy a nagy fényintenzitású gerjesztés alatt fluoreszcencia kioltók keletkeznek, amelyek csökkentik a megfigyelt fluoreszcencia hatásfokát, és egyben megváltoztatják az indukció kinetikáját is. A kioltás mértéke R-26 karotenoidmentes törzsben sokkal nagyobb (~ 30%), mint a vad típusú 2.4.1.

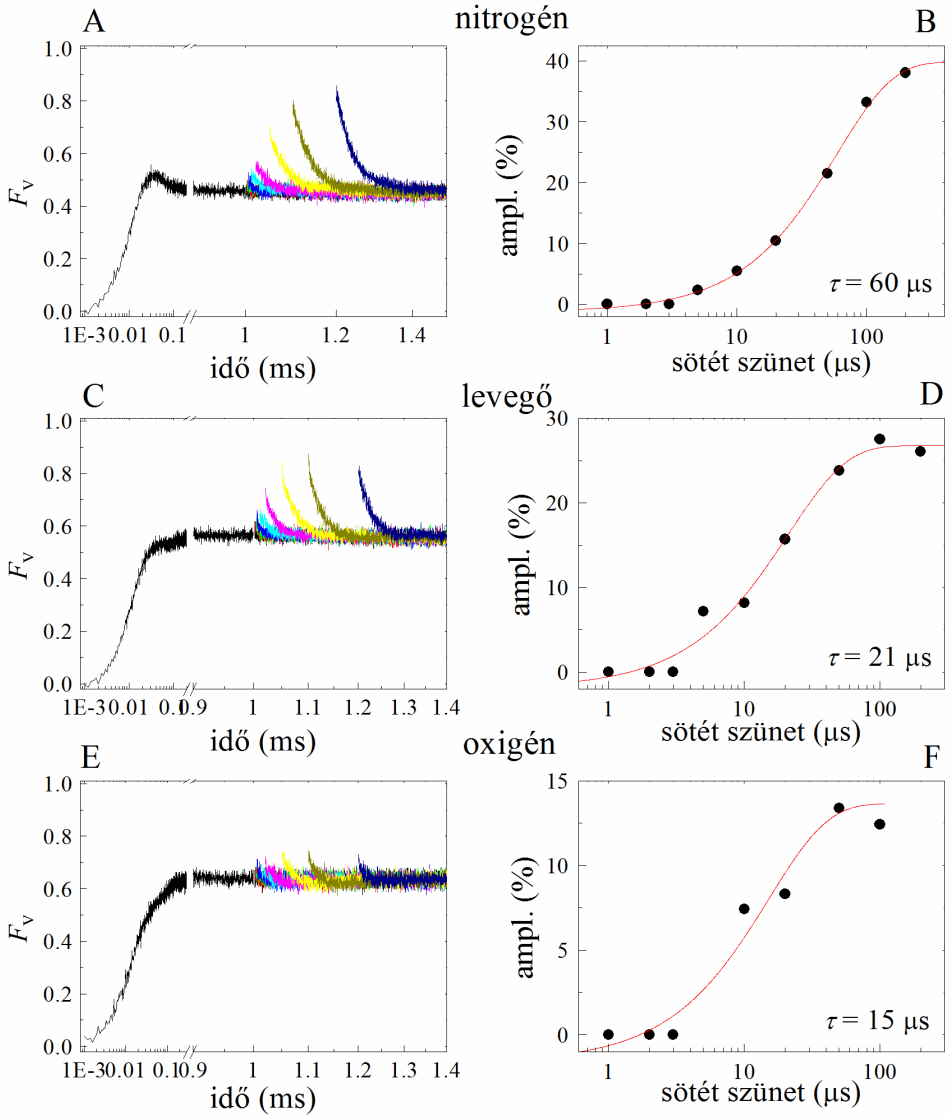
törzsben (~ 5%). Konkrétabban, a fluoreszcencia kioltását (F_{max} csökkenését) a fénnyel létrehozott karotenoid vagy bakterioklorofill triplettek okozhatják, ezek élettartamának meghatározására két-flash kísérleteket végeztünk. A két-flash kísérlet során a mintát két téglalap alakú lézer flash-el világítjuk meg: az első alatt egy szokásos fluoreszcencia indukciót látunk, a másodikat egyre hosszabb sötét szakasz után adjuk és ez alatt a fluoreszcencia magasabb szintről indulva (mint ahol az első flash után abbamaradt az indukció) egy csökkenő (pipa) alakot ír le. A sötétben a kioltó elbomlik, így minél hosszabb sötét szünetet hagyunk a két flash között, ez a pipa annál nagyobb amplitúdójú lesz.



4.13. ábra Két flash kísérlet *Rba. sphaeroides* 2.4.1. (A) és CYCA I (B) tenyészeten nitrogén atmoszférában. Az első flash hossza 40 µs (A) vagy 100 µs (B). A kis ábrákon a pipák amplitúdóit ábrázoltuk a sötét szünet függvényében.

A pipák növekedését a triplett sötétbeli eltűnése okozza, így az amplitúdók növekedését ábrázolva a sötét szünet függvényében megkapjuk a triplett élettartamát. Ez a 2.4.1. tenyészetben ~2 µs-nak, CYCA I-ben pedig ~6.5 µs-nak adódott. A két törzs más karotenoid pigmentet tartalmaz: vad típusban sphaeroidene a fő karotenoid, CYCA I-ben pedig sphaeroidenon. Ez magyarázhatja az eltérő triplett élettartamokat. A második flash alatt újra nagy fényintenzitással gerjesztjük a mintát, így újra triplettek képződnek, emiatt alakul ki ez a pipa alak. A 4.13. ábra A panelén láthatjuk, hogy 2.4.1. sejtekben 10 µs sötét szünet után a fluoreszcencia kezdeti szintje már alacsonyabban van, 50 µs után már az első flash végéhez képest alacsonyabb szintről induló emelkedést látunk. CYCA I esetében nem figyelhető meg ez a jelenség a vizsgált tartományban. A magyarázat egyszerű: a 2.4.1. sejtekben jelenlévő cit c_2 kinyitja a RC-okat, ezért csökken a fluoreszcencia szintje, CYCA I sejtekben a RC sokáig zárva marad (a donor oldalról), így a fluoreszcencia szintje magas.

Megvizsgáltuk, hogy a kettős flash kísérletekkel megállapított triplett élettartamoknak van-e atmoszféra függése. Karotenoid pigmenteket tartalmazó *Rba. sphaeroides* sejtekben nem tudtunk kimutatni atmoszféra-függést, a kapott élettartamok megegyeztek nitrogén és oxigén atmoszférában. A karotenoidmentes *Rba. sphaeroides* R-26 törzsben viszont ki tudtuk mérni a BChl triplettek atmoszféra-függését, ezt foglalja össze a 4.14. ábra.



4.14. ábra Két flash kísérlet *Rba. sphaeroides* R-26 tenyészeten nitrogén, levegő és oxigén atmoszférában. A fluoreszcencia indukciós görbék (A,C,E) a nitrogénben, 10 %-ra leosztott gerjesztő fényintenzitáson mért indukció változó részére normáltak 0 és 1 közé. B, D és F: a második flash-re kapott pipák amplitúdói a nitrogénben, 10 %-ra leosztott gerjesztő fényintenzitáson mért indukció változó részéhez képest, %-ban kifejezve.

A karotenoidok védő hatása nélkül az R-26 törzsben BChl triplettek keletkeznek az alkalmazott intenzív gerjesztés alatt. Kettős flash kísérletekből megállapítottuk a BChl triplett élettartamát nitrogén, levegő és oxigén atmoszférában, amire 60 µs-ot, 21 µs-ot és 15 µs-ot

kaptunk. A BChl triplettek élettartama hosszabb, mint a karotenoid tripletteké és fluoreszcenciát kioltó hatásuk is nagyobb.

A kísérleti eredményeket a kvalitatív értelmezésen túl egyszerűsített modellek keretében próbáljuk meg kvantitatív formában értelmezni.

A fotokémiát és a triplet képződést magában foglaló <u>soros</u> folyamat sémája:

$$Q_AS \xrightarrow{I_a} Q_A^-S \xrightarrow{I_b} \xleftarrow[k_T]{} Q_A^-T$$

Itt a fotokémia I_a fotokémiai sebességállandóval gerjeszthető, miközben a fluoreszcencia kioltó (pl. karotenoid) szinglett (S) állapotban marad. Mihelyt a RC betöltődik (Q_A redukálódik), az újabb, I_b (< I_a) sebességállandójú fotokémiai folyamat a kioltót triplett állapotúvá teszi. A triplett spontán (k_T sebességállandóval) visszazuhanhat szinglett állapotba.

A fluoreszcencia normált változó része 0 és 1 között változik. Az egyes RC állapotokhoz ezen két határ közé (a határokat is beleértve) eső hatásfok-értékeket tulajdonítunk:

QS: nyitott PSU, fluoreszcencia hatásfoka: 0, nem látogathat meg más PSU-t

Q^-S: zárt PSU, fluoreszcencia hatásfok: 1, más PSU meglátogatásának valószínűsége: p

Q^-T: zárt PSU, fluoreszcencia hatásfok: α, más PSU meglátogatásának valószínűsége: $\alpha \cdot p$

A fenti séma alapján felírható kinetikai egyenletek:

$$\frac{d[QS]}{dt} = -I_a \cdot \frac{[QS]}{X} \tag{4.2}$$

$$\frac{d[Q^-S]}{dt} = I_a \cdot \frac{[QS]}{X} - I_b \cdot (1-p) \cdot \frac{[Q^-S]}{X} + k_T \cdot [Q^-T] \tag{4.3}$$

$$[QS] + [Q^-S] + [Q^-T] = 1 \tag{4.4}$$

$$X = 1 - p \cdot \{[Q^-S] + \alpha \cdot [Q^-T]\} \tag{4.5}$$

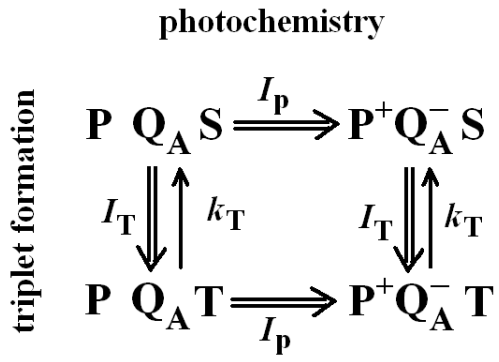
Itt X annak a valószínűsége, hogy az exciton sem energia transzfer (p) sem pedig fluoreszcencia ($[Q^-S] + \alpha \cdot [Q^-T]$) révén nem fog a PSU-ból távozni (azaz fotokémiára „kötelezett”). X azt fejezi ki, hogy mennyire emelkedik az abszorpció hatáskeresztmetszete a PSU-k közötti csatolás (konnektivitás) következtében, vagyis a fotokémiai reakciók I_a és I_b kezdeti sebességállandóit mennyire tudja megnövelni.

A megfigyelhető változó fluoreszcencia [0,1] hatásfoka így fejezhető ki:

$$F = (1-p) \cdot \frac{[Q^-S] + \alpha \cdot [Q^-T]}{X} \tag{4.6}$$

A megszakított gerjesztés eredményei arra utalnak, hogy a karotenoid triplet elég hamar kialakulhat, hamarabb, vagy legalábbis vele versengve, mint a fotokémia.

A párhuzamos modellben a fotokémia és a triplet-képződés egymással párhuzamosan alakul.



4.15. ábra A triplett-képződés párhuzamos modellje.

Négy PSU állapot különböztethető meg:

QS: (fotokémiailag) nyitott PSU, fluoreszcencia hatásfoka: 1, nem látogathat meg más PSU-t.

QT: (fotokémiailag) nyitott PSU, fluoreszcencia hatásfoka: α_1 (<1), nem látogathat meg más PSU-t.

Q^-S: zárt PSU, fluoreszcencia hatásfok: α_{max}, más PSU meglátogatásának valószínűsége: p

Q^-T: zárt PSU, fluoreszcencia hatásfok: α_2, más PSU meglátogatásának valószínűsége: $\alpha_2 \cdot p$

Megőrzendő a két modell jelölései közti formális azonosságot, az $I_p = I_a$ és $I_T = I_b$ (át)jelölést célszerű bevezetni. Ekkor a kinetikai egyenletek így alakulnak:

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{QS}]}{\mathrm{d}t} = -(I_a + I_b) \cdot \frac{[\mathrm{QS}]}{X} \tag{4.7}$$

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{Q^-S}]}{\mathrm{d}t} = I_a \cdot \frac{[\mathrm{QS}]}{X} - I_\mathrm{b} \cdot (1-p) \cdot \frac{[\mathrm{Q^-S}]}{X} + k_\mathrm{T} \cdot [\mathrm{Q^-T}] \tag{4.8}$$

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{QT}]}{\mathrm{d}t} = I_b \cdot \frac{[\mathrm{QS}]}{X} - k_\mathrm{T} \cdot [\mathrm{QT}] - I_a \cdot \frac{[\mathrm{QT}]}{X} \tag{4.9}$$

$$[\mathrm{QS}] + [\mathrm{QT}] + [\mathrm{Q^-S}] + [\mathrm{Q^-T}] = 1 \tag{4.10}$$

$$X = 1 - p \cdot \left\{ [\mathrm{Q^-S}] + \alpha_2 \cdot [\mathrm{Q^-T}] \right\} \tag{4.11}$$

A fluoreszcencia változó részét a Stern-Volmer kifejezésből származtatjuk:

$$F_0/F = 1 + k_\mathrm{Q}\, \tau_0 \cdot [QS] + k_\mathrm{T} \cdot \tau_0 \cdot [Q^-T], \tag{4.12}$$

ahol figyelembe vettük, hogy a fluoreszcencia hatásfok csökkenését két különböző kioltó okozza.

Az egyenletrendszer numerikusan MathCad-del kiintegrálható még annak figyelembevételével is, hogy p nem szükségképpen állandó, hanem a nyitott RC-ok aktuális koncentrációjának ([QS] = q) függvénye: $p = p(q)$. Ezt a függést vagy analitikus közelítésben vagy mátrix alakban célszerű megadni.

Ha $p = 0$, akkor az egyenletek analitikus alakban is megoldhatók:

$$F_{\mathrm{v}}(t) = \left[\mathrm{Q}^{-}\mathrm{S}\right](t) = \frac{I_a - k_T}{I_a - I_b - k_T} \cdot (e^{-(I_b + k_T)\cdot t} - e^{-I_a \cdot t}) + \frac{k_T}{I_b + k_T} \cdot (1 - e^{-(I_b + k_T)\cdot t}) . \quad (4.13)$$

Egyszerűsítő közelítésben: I_a a fotokémiai emelkedés időállandójából, k_T a fluoreszcencia sötétbeli emelkedésének kinetikájából, míg I_b a sötétbeli emelkedés nagyságából (amplitúdójából) határozható meg.

A stacionárius fluoreszcencia szint is zárt alakban megadható:

$$F_{\mathrm{v}}(t \to \infty) = \frac{k_T}{I_b + k_T} \quad (4.14)$$

vagyis I_a-tól függetlenül csak az I_b/k_T aránytól függ. Ha I_b (k_T-hez képest) kicsi, a triplett kioltás is kicsi.

A modellekből származtatható görbék visszaadják a kísérleteinkben megfigyelt fluoreszcencia kinetikákat (lásd példaként a 4.12. ábrán bemutatott fluoreszcencia indukciót és a modellek alapján szimulált görbéket *Rba. sphaeroides* R-26 sejtek esetén). A fluoreszcencia kioltása sajnos nem olyan nagy a vad (2.4.1) törzs esetén, hogy a szimuláció alapján különbséget tudjunk tenni a soros és párhuzamos modellek között.

A fluoreszcencia indukcióra vonatkozó szerteágazó fenti megállapításainkat rendszerezhetjük, és a következőkben foglalhatjuk össze.

Rba. sphaeroides egész sejtjeinek fluoreszcencia indukciója összetett kinetikájú, és az 1 μs- 1 s időtartományban az alábbi fázisokat különböztethetjük meg:

1) Fotokémiai fázis (STF, „single turnover flash”) – zöld növénybeli analógia alapján: O-J fázis.

Az emelkedési idő a fényintenzitással fordítottan arányos, ezért széles időtartományban (akár 3 nagyságrendben) változhat. A reciprocitási törvény érvényes. Kis és nagy fényintenzitásoknál az egyéb fázisok átlapolják, ezért zavartalanul csak az 1 ms körüli időtartományban jelenik meg. Nagy fényintenzitásoknál védőmechanizmusok lépnek fel (karotenoid vagy

bakterioklorofill triplett és nem –fotokémiai kioltás), kis fényintenzitásoknál a RC-hoz irányuló donor- és akceptor oldali (általában fiziológiai eredetű) elektron-transzfer, amely a RC-ot kinyitni igyekszik.

A fotokémiai reakció nem monofázikus, hanem van egy lassú komponense is, amelynek 10-20% a részesedése (lásd fentebb). Ennek eredete többféle lehet: i) MTF, „multiple turnover flash", ii) heterogén antenna és iii) a keletkező membránpotenciál által kiváltott (konformáció-) változás.

2) Többszörös átfordulás (MTF, „multi turnover flash")

Ehhez a RC többszöri (legalább kétszeri) átfordulása szükséges, amelynek feltétele, hogy mind az akceptor, mind a donor oldalról termikus redox-reakciók révén a töltések elszállítódjanak, és egy új töltésszétválasztás jöhessen létre. Ilyen módon a lassú emelkedő fázis termikus reakciókkal kombinált fényreakció, amelynek során az akceptor oldal (Q_B és a kinon pool) teljesen redukálódhat, miközben a RC zárt marad. Ebben a redox állapotban mérhetjük a maximális fluoreszcenciát.

A zöld növények klorofill fluoreszcencia indukciójának vizsgálatakor is hasonló feltevéssel éltek. A $Q_A^-Q_B^-$ redukált akceptor-állapot magasabb fluoreszcencia szintű, mint a $Q_A^-Q_B$ állapot, és minél jobban redukált az elektrontranszportlánc (Q_B ill. a pool kinonok), annál magasabb a fluoreszcencia-szint. Erre annak a megfigyelésnek a magyarázatára volt szükség, hogy egyszeri és rövid megvilágítással (STF – single turnover flash) a fluoreszcencia legmagasabb szintjét nem lehet elérni (kivéve, ha DCMU blokkolja az akceptor oldali elektrontranszportláncot), hanem hosszabb megvilágításra, többszöri átfordulásra (MTF – multiple turnover flashes) van szükség.

Növényeknél a fluoreszcencia OJIP emelkedésében az I szintet egyenesen a kinon pool redukáltsági mértékének veszik (Tóth Szilvia doktori dolgozata, 2006). Baktériumoknál és a mi nagy fénygerjesztésünknél az analógia nagyon behatárolt, mert itt az emelkedés második (IP) fázisa igen gyors, sokkal gyorsabb lehet, mint magának a kinolnak a képződése (második elektron transzfer + protonfelvétel) és leválása Q_B-ről a pool irányába. Az igaz, hogy mind terbutrin hozzáadása (kinon oldali gátlás), mind CYCA I alkalmazása (donor oldali gátlás) számottevően csökkenti a második fázis amplitúdóját. Emiatt ezt a fázist alapvetően az MTF számlájára lehet írni.

A fluoreszcencia relaxációban közvetlenül a gerjesztő flash megszünte utáni relaxáció (0-tól 40 μs időtartományban) annak a kifejeződése, hogyan „nyílik ki" gyorsan mindkét oldalon a zárt RC. Ha hosszú a gerjesztő flash (vagyis többszöri átfordulás is felléphet) vagy nem eléggé sötétre adaptált a minta, akkor a másodlagos elektron akceptorok (Q_B, és UQ pool) és

donorok (cit bc_1 komplex) csak lassan képesek a RC-t kinyitni. Ennek következtében a fluoreszcencia relaxáció fő komponense néhány ms-nál van, amely időnél már a második interkinon elektron transzfer ($Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$) lejátszódhat, és az oxidált cit bc_1 komplex is diffúzióval redukálódhat, azaz képes lesz P^+-t visszaredukálni. Minél rövidebb a flash, annál kifejezettebb a fluoreszcencia állapotnak a kezdeti (gyors) esése. Ebből kifejezhetjük az első elektronnak a kinonok közti ($Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$) sebességét, ha ismerjük más, független (pl. abszorpcióváltozás) mérésből a P^+ lecsengését.

3) Antenna heterogenitás.

A RC-okhoz közvetlenül törzs (core) fénybegyűjtő komplex, közvetve perifériális antennarendszer kapcsolódik a hatékonyabb fénybegyűjtést szolgálva. Az antenna komplexek mérete (akár egy membránon belül is) nagyon különböző lehet. A zöld növények analógiájára, nevezzük el a nagy antennához csatolt RC-okat α-centrumoknak, a kis antennához csatolt RC-okat pedig β-centrumoknak. A nagyobb antennaméret miatt az α-centrumokban gyorsabb, míg a β-centrumokban lassabb a fénybegyűjtés. A fluoreszcencia indukció komplementer területének formális exponenciális felbontása alapján a zöld növényekben már régóta bevezetett és alkalmazott módszer (akár 3 komponensre is felbontják, pl. Tóth Szilvia doktori disszertációja, 2006), de ott az elválasztás időtartománya lényegesen nagyobb (lassúbb); a β-centrumokban a fénybegyűjtés az alkalmazott fényintenzitásoknál 1 s nagyságrendű, míg az általunk vizsgált körülmények között baktériumokban néhány száz μs.

Ennek bevezetésére azért van szükség, mert terbutrin alkalmazása esetén is látunk némi emelkedést a fotokémiai fázis után. Az indukció gyors fázisa teljesen fotokémiai, a lassú fázis részben fotokémiai, részben termikus tulajdonságú. Mivel a megvilágítás kikapcsolása, majd egy sötét szakasz után újra gerjesztve a fluoreszcencia gyakorlatilag ugyanarról a szintről folytatódik, mint amelyet az előző megvilágítás kikapcsolásakor elért (a triplettek vizsgálata kivétel ebből a szempontból), ezért megállapíthatjuk, hogy a termikus reakciók vagy sokkal gyorsabbak vagy sokkal lassabbak, mint a fényreakciók.

4) Fluoreszcencia (triplett) kioltók lépnek fel nagy fényintenzitásnál.

Mérési körülményeinknél az erős fény 1 W fényteljesítménynél, 3 mm x 10 mm felület (küvetta) megvilágítása esetén (808 nm hullámhossznál) 200 ezer mikroeinstein/m^2/s értéket vesz fel! A leggyorsabb fluoreszcencia indukciót ($t_{½}$ ~ 10 μs) BChl és/vagy karotenoid triplettek keletkezése lapolhatja át. A soros modell szerint, a triplettek a Q_A^-[S] RC állapotból fényreakcióval keletkeznek (Q_A^-[S] → Q_A^-[T]), élettartamuk oxigén-függő, levegőben (karotenoid triplett esetén) 2 μs körüli érték. Fluoreszcencia kioltók, relatív hatékonyságuk

görbeillesztésből határozható meg (a fluoreszcencia hatásfok skálán $Q_A = 0$ és $Q_A^-[S] = 1$). Elképzelhető, hogy noha sokkal lassabban keletkeznek, mint a fotokémiai (P^+ vagy Q_A^-) kioltók ($I_b < I_a$), de legalább (akár 5-10-szer) annyira hatékonyak. Zöld növényeknél (pl. algáknál) uralkodó ez a kioltási típus, de baktériumokban (úgy látszik) kevéssé, de itt is kimutatható:

· a gerjesztő fény intenzitásától függő és kioltást mutató fluoreszcencia indukció görbesereg (nagyon) kicsit függ a külső atmoszférától (oxigén vs. nitrogén),

· kettős flash kísérletben a 2. flash tranzienssel („pipá”-val) kezdődik, ami ugyan igen gyorsan (2-3 μs) lecseng a 2. flash kezdetén, nincs számottevő atmoszféra-függése karotenoid tartalmú baktériumtörzsekben, de még nagyon hosszú (> 20 μs) sötétszakasz után is számottevő nagyságú marad. A „pipa” magasságának időbeli (a sötétszakasz hosszának) növelésével mért kinetika sebességállandója k_{trip}, ~ $(2\text{-}8\ \mu s)^{-1}$, míg a (második flash-sel) kialakuló triplett keletkezésének sebességállandója $k_{trip} + k_{fény}$, ~ $(2\text{-}3\ \mu s)^{-1}$, azaz nagyobb, mint a sötétbeli leépülés sebességállandója, k_{trip}, és természetesen fényintenzitás-függő.

· a kis fényintenzitású (tapogató) flash-ekkel mért fluoreszcencia relaxáció a legkisebb (~ 1 μs) időtartományban sem mutat (határozott) tranziens emelkedést, ami a (kezdődő sötétben) eltűnő karotenoid triplett kioltók következménye lenne.

R-26 karotenoidmentes mutánsban és vad típusú baktériumban nem ugyanaz a kioltás kinetikája. R-26-ban BChl triplett keletkezik (a RC-ban és/vagy az antennában), amelynek 60-70 μs az élettartama N_2-ben, és ez lecsökken ~15 μs-ra oxigén atmoszférában. Vad (2.4.1) típusban a BChl triplett karotenoid tripletté alakul át (ns alatt), amelynek azonban lényegesen rövidebb az élettartama, atmoszféra-függését ezidáig nem sikerült kimutatnunk, atmoszféra-függetlennek tűnik. Lehtséges, hogy a karotenoid triplett energiaszintje az oxigéné alatt van.

5) Konformáció-változást tükröző fázis

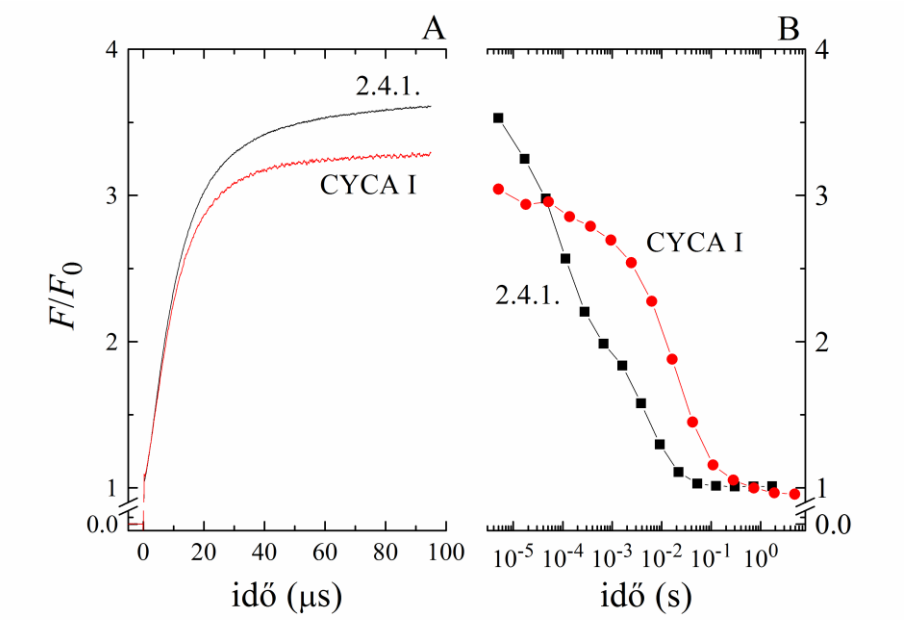
Schansker és mtsi. (2011) vetették fel ezt az elképzelést PSII esetén a klorofill fluoreszcencia OJIP indukciójára. A fluoreszcencia kioltását okozó konformációváltozást a) bezárt RC-ban b) erős fénygerjesztés hozhatja létre, amely feltételek persze a triplett-kioltók képződésének is kedveznek. Emiatt nehéz (talán lehetetlen) a szétválasztásuk. Esetleg nincs is szükség a konformáció-változás feltételezésére, mert a triplett kioltók önmagukban is elegendőek a jelenségek leírására.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy több effektus együttes hatásaként állhat elő a fluoreszcencia indukcióban megfigyelt polifázikus emelkedés.

A PSU-k közötti csatolás

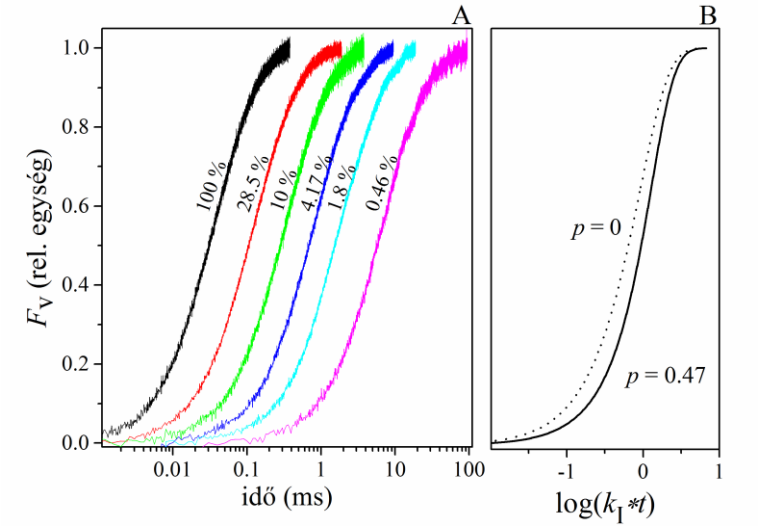
A bakterioklorofill fluoreszcencia indukciója sokkal nagyobb (esetünkben μs) idő-tartományban következik be, mint a gerjesztési energia vándorlása az antennában és elnyelése a RC-ban (típikusan fs időskála). Ennek ellenére az energiavándorlás következményei nyomot hagynak a fluoreszcencia indukción, és így diagnosztikus értékűek lehetnek a sokkal gyorsabb folyamatokra nézve. A bakterioklorofill fluoreszcencia F_0-ról F_{max}-ra emelkedő (indukció) ill. csökkenő (relaxáció) fázisát, a változó fluoreszcenciát $F(t)$-t (4.16. ábra) célszerű a határokat figyelembe véve normálni:

$$F_v(t) = \frac{F_{max} - F(t)}{F_{max} - F_0} \tag{4.15}$$



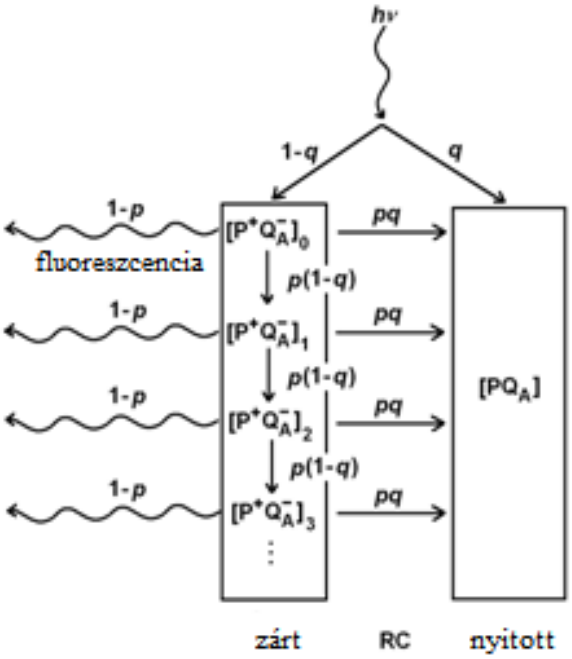
4.16. ábra A fluoreszcencia indukciója (λ> 850 nm) téglalap alakú lézerdióda gerjesztés (λ> 808 nm) alatt (A) és az ennek kikapcsolása után mért relaxáció sötétben (B) *Rhodobacter sphaeroides* vad típusú és citokróm c_2 hiányos mutáns sejtekben. A fluoreszcenciát a konstans részhez viszonyítottuk (indukció) ill. a gerjesztéssel és a nélkül felvett 2 μs széles tapogató impulzusokkal mért fluoreszcencia arányát vettük fel (relaxáció).

Az oxidált reakciócentrum természetes elektrondonorának hiánya miatt a citokróm c_2 mentes mutánsnál a fénygerjesztés hatására keletkezett P^+ visszaredukciója lassú (> 10 ms), emiatt a megfigyelt indukció telítésbe megy 100 μs alatt, ami a nyitott reakciócentrum (PQ_A) fény-indukált bezáródásának ($P^+Q_A^-$) a következménye. A gerjesztő fény intenzitása és a foto-kémiai sebességállandó közötti reciprok összefüggés fennállása nagy időskálán az egyedi (fotokémiai) fluoreszcencia kioltó ($[PQ_A]$= q) létezését feltételezi (4.17. ábra).



4.17. ábra Mutáns sejtek normált változó fluoreszcenciája (F_v) szürke szűrőkkel leosztott téglalap alakú gerjesztés alatt (a) és a (4.16) és (4.17) egyenletből p= 0 és 0.47 értékekre kiszámítva (b).

A fluoreszcencia indukció kinetikáját az eredeti Joliot-elmélet szerint írjuk le, amely szerint az excitonok mozgása korlátozott a fotoszintetikus egységek között (Joliot és Joliot, 1964). Ha egy exciton zárt reakciócentrumú fotoszintetikus egységhez érkezik (ez az összes RC-nak (1- q) hányada), akkor vagy egy szomszédos fotoszintetikus egységet látogat meg p valószínűséggel, vagy kisugárzódik (pl. fluoreszcencia foton formájában, 4.18. ábra).



4.18. ábra Beeső foton elnyelése ($h\nu$) nyitott (q) vagy zárt (1-q) RC által. Zárt RC- ot tartalmazó fotoszintetikus egységtől az excitonok meglátogathatnak egy szomszédos (nyitott vagy zárt) fotoszintetikus egységet p valószínűséggel vagy kisugárzódhatnak fluoreszcencia formájában (1-p).

A megfigyelt változó fluoreszcencia megadható $p(1\text{-}p)$ hányados végtelen mértani sorozatának összegeként:

$$F_{\mathrm{v}} = \frac{(1-p)(1-q)}{1-p(1-q)} \tag{4.16}$$

A pigment ágy által elnyelt foton (közvetlenül vagy közvetve) töltésszétválasztást idéz elő ($1\text{-}F_{\mathrm{v}}$) valószínűséggel, a nyitott RC- ok eltűnésének (fotokémia) kinetikai egyenlete:

$$-\frac{dq}{dt} = k_{\mathrm{I}} \cdot (1 - F_{\mathrm{v}}), \tag{4.17}$$

ahol k_{I} a fotokémiai sebességállandó. A (4.16) és (4.17) egyenletből a fluoreszcencia indukció kinetikája kiszámítható (4.17. ábra, B). Mivel a csatolás p értéke nem befolyásolja látványosan a fluoreszcencia indukciós görbe alakját, ezért egy alkalmasabb (és érzékenyebb) módszert kell alkalmaznunk p meghatározására.

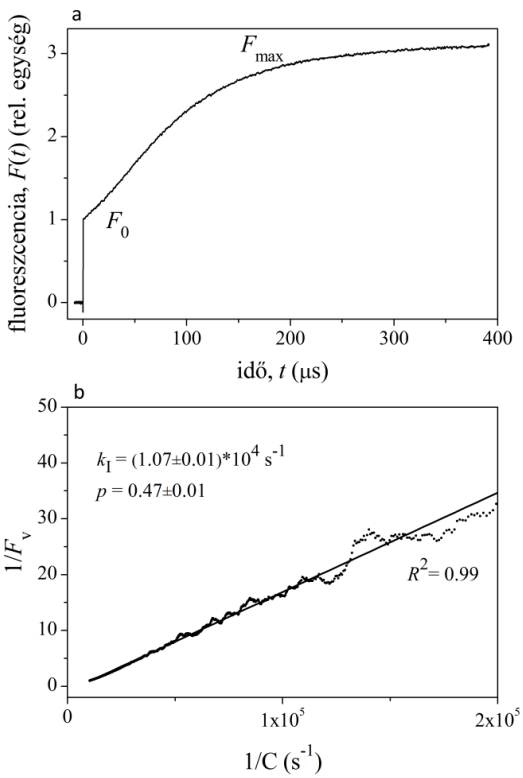
Fejezzük ki $q(t)$- t a (4.16) és (4.17) egyenletből:

$$(q =)\frac{1 - F_{\mathrm{v}}(t)}{1 + \frac{p}{1-p} F_{\mathrm{v}}(t)} = 1 - k_{\mathrm{I}} \cdot \int_0^t (1 - F_{\mathrm{v}}(\tau))d\tau \quad . \tag{4.18}$$

A (4.18) egyenlet jobb oldala a (4.17) egyenlet integrált alakja, ahol $q(t= 0) = 1$ a kezdeti feltétel, és a fluoreszcencia indukció (kiegészítő) komplementer területével fejezzük ki: $C(t) = \int[1\text{-}F_{\mathrm{v}}(\tau)]\mathrm{d}\tau$. Átrendezés után lineáris összefüggést kapunk a normált változó fluoreszcencia, $F_{\mathrm{v}}(t)$ reciproka és az indukciós görbe feletti komplementer terület reciproka között:

$$\frac{1}{F_{\mathrm{v}}(t)} = \frac{1}{k_{\mathrm{I}}(1-p)} \cdot \frac{1}{\int_0^t (1 - F_{\mathrm{v}}(\tau))\,\mathrm{d}\tau} - \frac{p}{1-p} \,. \tag{4.19}$$

A pontokra illesztett egyenes meredekségéből és tengelymetszetéből meghatározható a fotokémiai sebességállandó k_{I} és a csatolás mértéke, p. Minél nagyobb a tengelymetszet, annál nagyobb a p, a fotokémiai egységek közti csatolás. Az egyenes meredeksége fordítottan arányos a fotokémiai sebességállandóval. A 4.19. ábrán látható a (4.19) egyenlet szerint linearizált fluoreszcencia indukció.



4.19. ábra Citokróm c_2 mentes mutáns sejtek fluoreszcencia indukciója négyszög alakú gerjesztés alatt (a) és a változó fluoreszcencia (F_v) valamint a komplementer terület (C) dupla reciprokos ábrázolása.

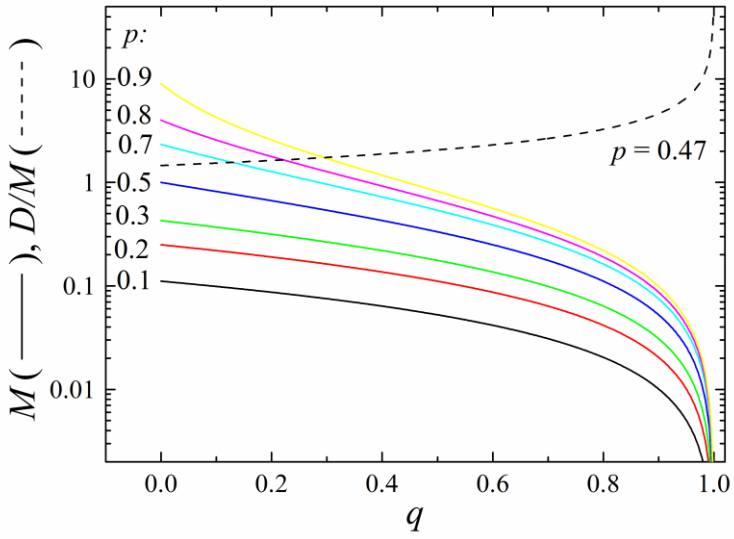
A 10^4 mérési pont jól illeszkedik az egyenesre (korrelációs együttható R^2= 0.99), amiből k_I = $1{,}07 \cdot 10^4$ és p = 0,47 adódik a fotokémiai sebességállandóra és a csatolási paraméterre.

Az excitonoknak a 4.18. ábra látható véletlenszerűen bejárható útvonalai alapján kiszámítható a fotokémiai egységek között megtett lépések száma (s) mielőtt az exciton vagy kisugárzódik, vagy elnyelődik egy nyitott RC-ban és fotokémiailag hasznosul:

$$P_s = [(1-p)(1-q)+q]\cdot[p(1-q)]^s \qquad s = 0,1,2,3,... \tag{4.20}$$

P_s véletlen változó, $P_s \geq 0$ és $\Sigma P_s = 1$. Az átlagos lépésszám (M) és a standard deviáció (D) meghatározható:

$$M = \sum_{s=0}^{\infty} s \cdot P_s\,, \quad D^2 = \sum_{s=0}^{\infty} s^2 \cdot P_s - \left(\sum_{s=0}^{\infty} s \cdot P_s\right)^2 \tag{4.21a-b}$$



4.20. ábra Az excitonok fotoszintetikus egységek között megtett átlagos lépésszáma (*M*), a nyitott RC-ok frakciója (*q*) és a kapcsoltság 7. egyenletből számolt *p* értékéből számítva. Az átlagtól való eltérést (*D*/*M*) *p*= 0.47 értékre kiszámítva ábrázoltuk. A függőleges tengely logaritmikus léptékű.

Az átlagos lépésszám (*M*) *p*-től és *q*-tól függ és széles tartományt ölel fel (4.20. ábra). *M*, meghatározott *p* értéknél, *q* = 0 -nál (amikor nincs elérhető fotokémiai csapda) a legnagyobb és *q* = 1 -nél (minden fotokémiai csapda nyitott) eltűnik (*M* = 0). Az átlagos lépésszám akkor haladja meg az 1- et, ha *p* > 0,5 (*q*= 0 esetében). Ez alatt az excitonok nem vándorolnak a fotoszintetikus egységek között, ott maradnak, ahol elnyelődtek. A fotoszintetikus egységek közötti mobilitás hirtelen megugrik, amikor *p* 1- hez közelít.

Az átlag standard hibája nagy, és összemérhető az átlag értékével: az átlagtól való eltérés (*D*/*M*) mindig nagyobb, mint 1. Mivel az átlagos lépésszám szórása nagy, ezért az átlagos lépésszám bizonytalansága is jelentős.

A korábbi munkákban viszonylag nagy *p* értékekről számoltak be *Rhodospirillum rubrum* egész sejtek (*p* = 0,5-0,7, Kingma és mtsi., 1983; Lavergne és Trissl, 1995; Koblízek és mtsi., 2005) és kromatofórák esetén (*p* = 0,61-0,63, Trissl, 1996), ezt a baktériumot tartják a mátrix-típusú fénybegyűjtő rendszer példájának (van Grondelle és Duysens, 1980). A 4.20. ábrán látható *p* értékekhez tartozó viszonylag kis lépésszámokból arra következtetünk, hogy a fotoszintetikus egységek inkább elkülönültek a pigment ágyban, mint teljesen összekapcsoltak. Mi még kisebb értéket kaptunk a csatolásra (*p* = 0,47) a citokróm c_2 mentes *Rhodobacter sphaeroides* sejtekben, pedig a fluoreszcencia indukciós görbe csekély, de felismerhető szigmoid emelkedést mutat (4.19. ábra). Hasonló excitonikus kölcsönhatás mérhető a fotoszintetikus egységek között a zöld növények tilakoid membránjaiban (Joliot és

Joliot, 1964). Más tanulmányokban is találtak hasonlóan alacsony *p* értékeket vad típusú *Rba. sphaeroides* (0,23, Koblízek és mtsi., 2005), *Rps. viridis* (0,40, Trissl, 1996) és *Rba. capsulatus* (0,49, Trissl, 1996) sejtek esetében. Bár az excitonok átadása a fotoszintetikus egységeken belül nagyon gyors és hatékony, a fotoszintetikus egységek között nagyon korlátozott.

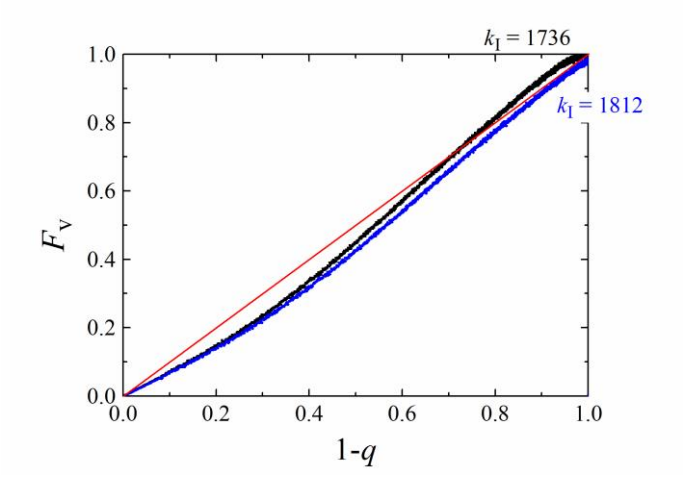
A legtöbb bakteriális fénybegyűjtő rendszerben az excitonok kiterjedt vándorlása a fotoszintetikus egységek között ritka esemény. Fentebb egy közvetlen módszert mutattunk be a csatolás mértékének meghatározására a fluoreszcencia indukciós görbe linearizálásával olyan esetre, amikor a fotokémia az egyetlen fluoreszcencia kioltó a rendszerben. A módszer egyszerű és hatékony az indukciós görbe matematikai illesztésén alapuló eljárásához képest, ahol a sok változó nehezen megjósolhatóan viselkedik.

A Joliot „p" konnektivitási paraméter formális q-függése baktériumokban

A fluoreszcencia indukció az 1 ms körüli időtartományban általában két, jól elkülönülő fázisból áll. Az ilyen típusú vizsgálathoz elhanyagolható nagyságú lassú fázissal rendelkező fluoreszcencia indukciók használhatók, pl. CYCA I tenyészet + terbutrin, mert a $P^+Q_A^-$ töltésszeparációt követő esetleges redox-események (amelyek pl. a második fázist hozhatják be) nem fognak ebbe az időtartományba esni. Típikusan egyenes menti emelkedés után (ez a konnektivitás látható jele) viszonylag gyorsan befejeződik az indukció. Noha a kinetika összetett, de nem tűnik feltűnően biexponenciálisnak.

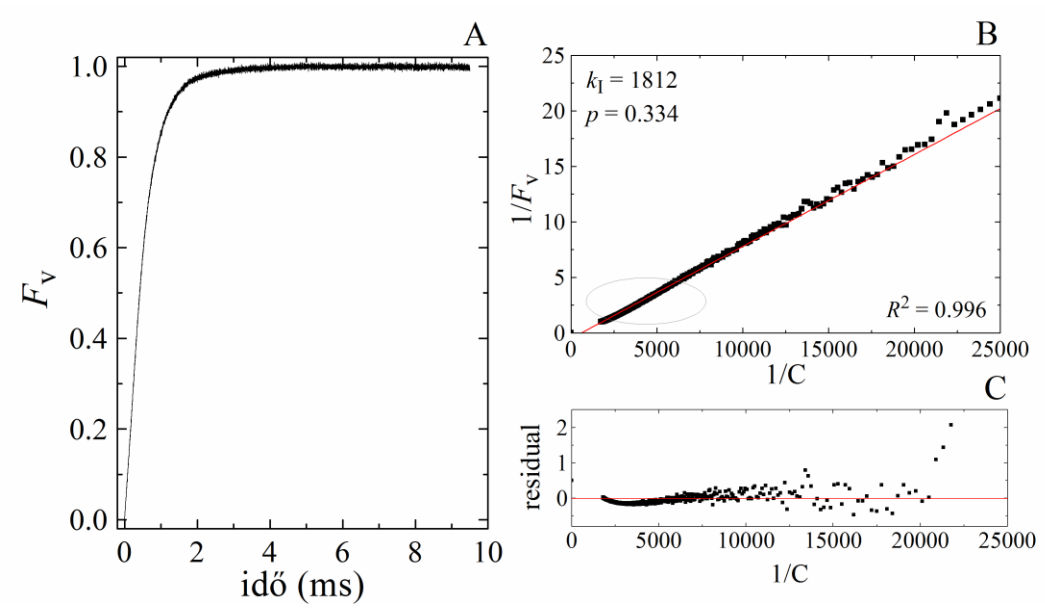
Az eddig alkalmazott legsikeresebb modellek is nyilvánvalóan hiányosaknak bizonyultak: a fotoszintetikus egységek közötti energiaátadás lehetőségét figyelembe vevő Joliot (később Lavergne-Trissl) modell is szisztematikus eltérést mutatott a mért kinetikáktól, nem lehetett egyetlen *p* (a Lavergene-Trissl modellben *J*) érték megadásával csak a zajszinten belül futó elméleti görbét illeszteni a fluoreszcencia indukcióhoz. Ennek több egyéb, más reprezentációbeli megnyilvánulása is van:

1) az F_v vs. 1-*q* reprezentáció nem ad mindig alulról nézve szimmetrikus domború görbét, hanem lehet (különösen nagy F_v esetén) homorú szakasza is (4.21. ábra).



4.21. ábra Terbutrinnal kezelt CYCA I sejtek változó fluoreszcenciája 1-q függvényében, két különböző k_I-re kiszámítva.

2) A változó fluoreszcencia és a komplementer terület duplareciprokos ábrázolásai (4.22. ábra) a teljes értékkészleten szigorúan nem adnak egyenest, hanem attól szisztematikus eltérés mutatkozik.



4.22. ábra Terbutrinnal kezelt CYCA I sejtek változó fluoreszcenciája (0-1 közé normálva) (A), dupla reciprokos ábrázolásban (B) és a dupla reciprokos ábrázolás szisztematikus eltérése az egyenestől (C).

A Joliot-modell alapfeltevése, hogy a zárt centrumot talált exciton $p \cdot q$ valószínűséggel képes nyitott centrumot találni. Ez elméletileg is csak akkor helyes, ha az energiatranszfer valószínűsége (p) nem távolság-függő. Ha viszont függő (márpedig ez általában igaz lehet), akkor más lesz az energiaátadás valószínűsége, ha ugyanannyi nyitott RC (azaz q) közelebb vagy távolabb van a kiválasztott zárt RC-hoz. Ezt formálisan úgy vehetjük figyelembe, ha p aktuális értékét q-tól tesszük függővé: $p = p(q)$. Általában csökkenő q-val p is csökkenni fog.

A RC-ok belső rendezettsége is oka lehet p-nek q-tól való függésére: ha a RC-ok „fürtök”-be rendeződnek, akkor a közeli nyitott centrumok könnyebben elérhetők energiatranszferrel, mint később, amikor már csak távolabbi nyitott RC-ok maradnak a zárt RC-ból elszabaduló excitonok számára. Az energiatranszfer távolság-függéséből, valamint a RC-oknak klaszterekbe rendeződéséből következően alapos okunk van tehát annak feltételezésére, hogy p-t q-függőnek tételezzük fel. (Ez a Lavergene-Trissl elméletben az ott bevezetett k_{con} konverziós sebességállandó q-függését jelenti.)

A Joliot-elméletből (Maróti és Asztalos, 2012) kifejezhetjük p-t akár az idő (t), akár a nyitott RC koncentráció (q) függvényében, és kísérleti alapon megvizsgálhatjuk, vajon állandó-e a gerjesztési folyamat során.

Az alap kinetikai (fénygerjesztésből származó) egyenlet, amely formálisan is felírható azzal, hogy a nyitott (q) centrumok gerjesztési hatáskeresztmetszete nem állandó, hanem fokozatosan növekszik a zárt centrumok számának növelésével, azaz a konnektivitás következtében:

$$-\frac{dq}{dt} = I \cdot \Phi_{photo}(q=1) \cdot \frac{q}{1-p(1-q)} = k_I \cdot \frac{q}{1-p(1-q)}, \tag{4.22}$$

ahol $k_{\mathrm{I}} = I \cdot \Phi_{\mathrm{photo}}(q = 1)$ a (kezdeti) fotokémiai sebességállandó. Ha bevezetjük a (0 és 1 között) normált változó fluoreszcenciát:

$$F_{\mathrm{v}} = \frac{(1-p)(1-q)}{1-p(1-q)}, \tag{4.23}$$

akkor ezt a mennyiséget a kinetikai egyenletbe is bevezethetjük a q változó helyett:

$$-\frac{dq}{dt} = k_{\mathrm{I}} \cdot (1-F_{\mathrm{v}}). \tag{4.24}$$

Integráljuk mindkét oldalt $t = 0$ és ∞ között [$q(t=0) = 1$, $C(t=0)=0$ és $q(t=\infty) = 0$]:

$$k_I = \frac{1}{C(t \to \infty)}, \tag{4.25}$$

ahol C-vel jelöltük a fluoreszcencia indukció görbe feletti (komplementer) területét:

$$C(t) = \int_0^t (1-F_{\mathrm{v}}(\tau))\,\mathrm{d}\tau. \tag{4.26}$$

q kifejezhető egyrészt a fluoreszcencia változó részének segítségével (lásd a (2) egyenletet), másrészt a fluoreszcencia komplementer területének segítségével (a (3) egyenlet mindkét oldalának integrálásával):

$$(q=)\frac{1-F_{\mathrm{v}}(t)}{1+\frac{p}{1-p}F_{\mathrm{v}}(t)}=1-k_{\mathrm{I}}\cdot\int_0^t(1-F_{\mathrm{v}}(\tau))d\tau\,. \tag{4.27}$$

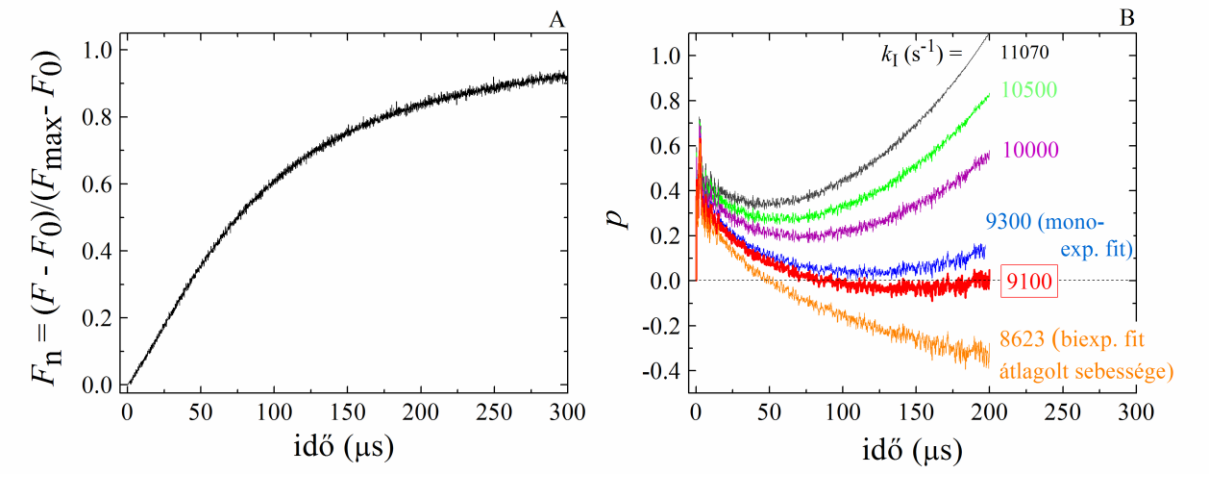
Két irányba indulhatunk el: 1) p értékét állandónak tételezzük fel, ekkor $1/F_{\mathrm{v}}(t)$ lineáris összefüggésben áll $1/C(t)$-vel, azaz dupla reciprok ábrázolásban egyenest kell kapnunk (lásd a kínai cikkünket). Mivel ez nem áll fenn, mert szisztematikus eltérést kapunk az egyenestől, ezért fel kell tételeznünk, hogy 2) p nem állandó, hanem a PSU-k betöltöttségétől függ. Célszerű p –t a fluoreszcencia (ill. komplementer területe) segítségével kifejezni a (4.27) egyenletből:

$$p(t)=\frac{1-\frac{F_{\mathrm{v}}(t)}{k_{\mathrm{I}}\cdot C(t)}}{1-F_{\mathrm{v}}(t)}\,. \tag{4.28}$$

Ha (4.25) alatti értékét beírjuk, akkor a jobb oldalon csupa 1-re normált és dimenziótlan mennyiségek állnak: a változó fluoreszcencia és komplementer területe:

$$p(t)=\frac{1-\frac{F_{\mathrm{v}}(t)}{C(t)/C(t\to\infty)}}{1-F_{\mathrm{v}}(t)}\,. \tag{4.29}$$

A p értékének 0 és 1 közé kell esnie (a határokat is beleértve). A fotokémiai sebességállandó, k_{I} nem szabadon futó paraméter, hanem értéke jól meghatározott (4.25. egyenlet).



4.23. ábra CYCA I sejtek változó fluoreszcenciája (A) és néhány k_I értékkel kiszámított p paraméter (B).

A 4.23. ábra B panelén a (4.28) egyenlet alapján kiszámított p értékek láthatók, p érzékenyen függ k_I-től.

Speciális eset: ha a PSU-k egymástól teljesen függetlenek, akkor a fluoreszcencia indukció tisztán exponenciális: $F_v = 1\text{-}\exp(-k_I \cdot t)$, hasonlóan a komplementer terület is: $C(t) = (1\text{-}\exp(-k_I \cdot t))/k_I$, és ezzel $p(t) = 0$ adódik bármely időpillanatban (bármely mértékű bezártság esetén). Tehát a biexponenciális felbontással ez a vizsgálat (ill. a (4.28) egyenlet) nem tud mit kezdeni, hiszen az (akár mono- akár bi-)exponenciális kinetikájú indukció inherens módon a $p = 0$ feltételt elégít ki, így önellentmondás $p(q)$ függést keresni! Ez azért is fontos, mert k_I-t általában exponenciális felbontásból nyerhetjük.

A fluoreszcencia indukcióból, mint modell-független adatokból származtatott p görbék monoton csökkenő tendenciát adnak csökkenő q-val (növekvő idővel). Karakterisztikus értéknek a $q = 1$ kezdeti értékhez rendelhető p értéket tekinthetjük. Az ilyen q-függést mutató energiatranszfer valószínűség bevezetésével az indukciós kinetikák szisztematikus hibától mentesen írhatók le.

Kvalitatív értelmezés

1) Ha a PSU-k folytonos betöltése során a monoton csökkenő q (ill. növekvő q^-) térbeli eloszlása mindvégig véletlen (egyenletes) marad, akkor p is mindvégig állandó értéket vesz fel. Erre az esetre vonatkozik az eredeti Joliot-elmélet.

A szomszédos PSU látogatásának valószínűsége $p \cdot q$ (q-val egyenesen arányos) marad, és mindvégig megmarad a gömbszimmetrikus, egyenletes eloszlás.

2) Ha q csökkenése során a centrumok eloszlása eltér az egyenletes eloszlástól, akkor ezt formálisan úgy lehet tekinteni, mintha a p paraméter q-függő lenne.

Mi lehet a szimmetria (t.i. az egyenletes eloszlást) sértő hatás? Maga a szomszédos és csak a közvetlenül szomszédos centrumok látogatásának lehetősége.

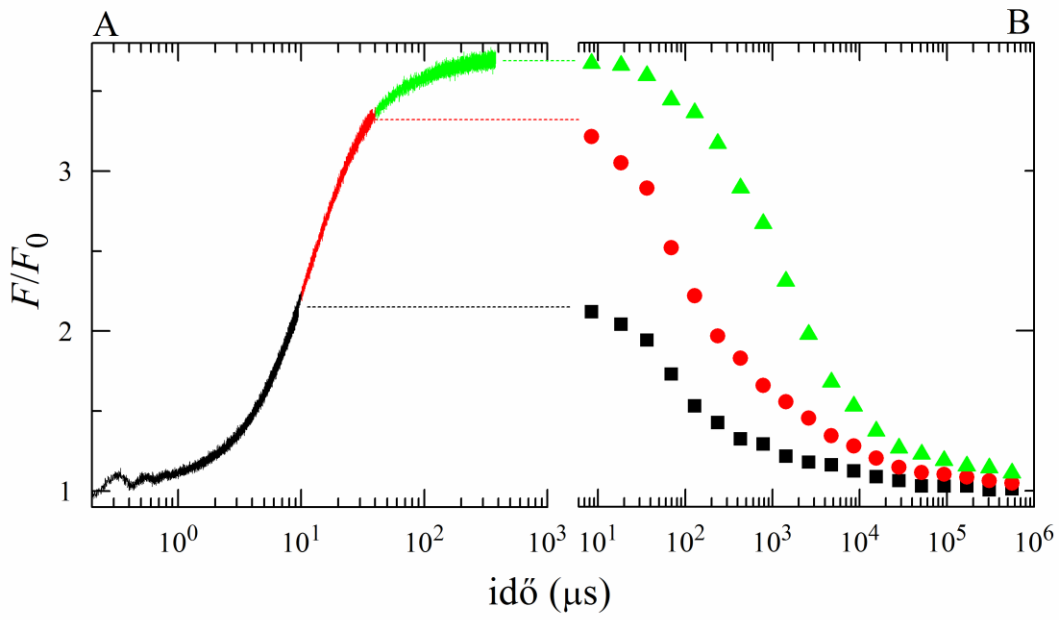
Megmutatható (Maróti és Asztalos, 2012), hogy ha p nem túl nagy (baktériumoknál $p \approx 0.5$), akkor átlagosan < 1 lépés történik nyitott PSU keresésére, ha már zárt PSU gerjesztődik újra. Emiatt zárt centrumok szigetei, csomósodási helyei jönnek létre, ami nyilvánvalóan megtöri az egyenletes térbeli eloszlás kezdeti koncepcióját.

Minden zárt PSU potenciális csomósodási hely, azaz körülötte a véletlennél nagyobb valószínűséggel kezdenek hasonlóan zárt centrumok kialakulni, éppen a PSU-k közötti energia transzfer lehetőségének megengedésével. Emiatt a q centrumok száma nem csupán kevesebb lesz a gerjesztési folyamat alatt (ezt a tényt veszi figyelembe a q-val egyenesen arányos faktor a valószínűségben), hanem átlagosan távolabb is kerülnek a csomósodott zárt PSU-któl, azaz p is csökkenni fog. Más szóval, nem csupán a zárt PSU-k csomósodnak, hanem ebből következően a még nyitott PSU-k is, ami egészen nyilvánvalóvá teszi a PSU-k egyenletes eloszlásának megtörését a folyamatos gerjesztés alatt.

A lényeg: a kezdeti zárt PSU-k a korlátozott (csak a közvetlen szomszédokra kiterjedő) energia transzfer révén csomósodási magokat képeznek, és elterjedésük során a kezdeti egyenletes eloszlás nem marad fenn: szigetek alakulnak ki, amelyek fokozatosan kiterjednek, és végül beborítják a PSU-k számára rendelkezésre álló teljes teret, azaz minden PSU zárt állapotba kerül (betöltődik).

4.3 Fluoreszcencia sötétrelaxáció

A fénnyel gerjesztett bakterioklorofill fluoreszcencia a gerjesztés kikapcsolása után összetett kinetikával cseng le, ami a zárt RC-ok kinyitásának időbeli változását tükrözi. A fluoreszcencia relaxációt a donor és akceptor oldali reakciók együttesen határozzák meg, ezek felderítésére a donor – és/ vagy akceptor oldalt érintő kísérleteket végeztünk. A donor oldalt befolyásoló kezelések és kísérletek különböző törzseken: redox titrálás (oxidatív irányban), és külső elektron donorok alkalmazása a) CYCA I cit c_2 mentes törzsön, b) csak kevés cit c_2-t tartalmazó kromatofórán (ICM preparátumon) valamint c) lassú cit c_2-vel rendelkező *Rhodospirillum rubrum törzsön*. Az akceptor oldalon inhibítorokkal (Q_B helyre kötődő elektrontranszport blokkolókkal), Na-ditionit redukálószerrel és a pH változtatásával idézhetünk elő változásokat. A hőmérséklet változtatása és a cit bc_1 blokkolók a donor- és az akceptor oldalt egyaránt (nem specifikusan) érintik.

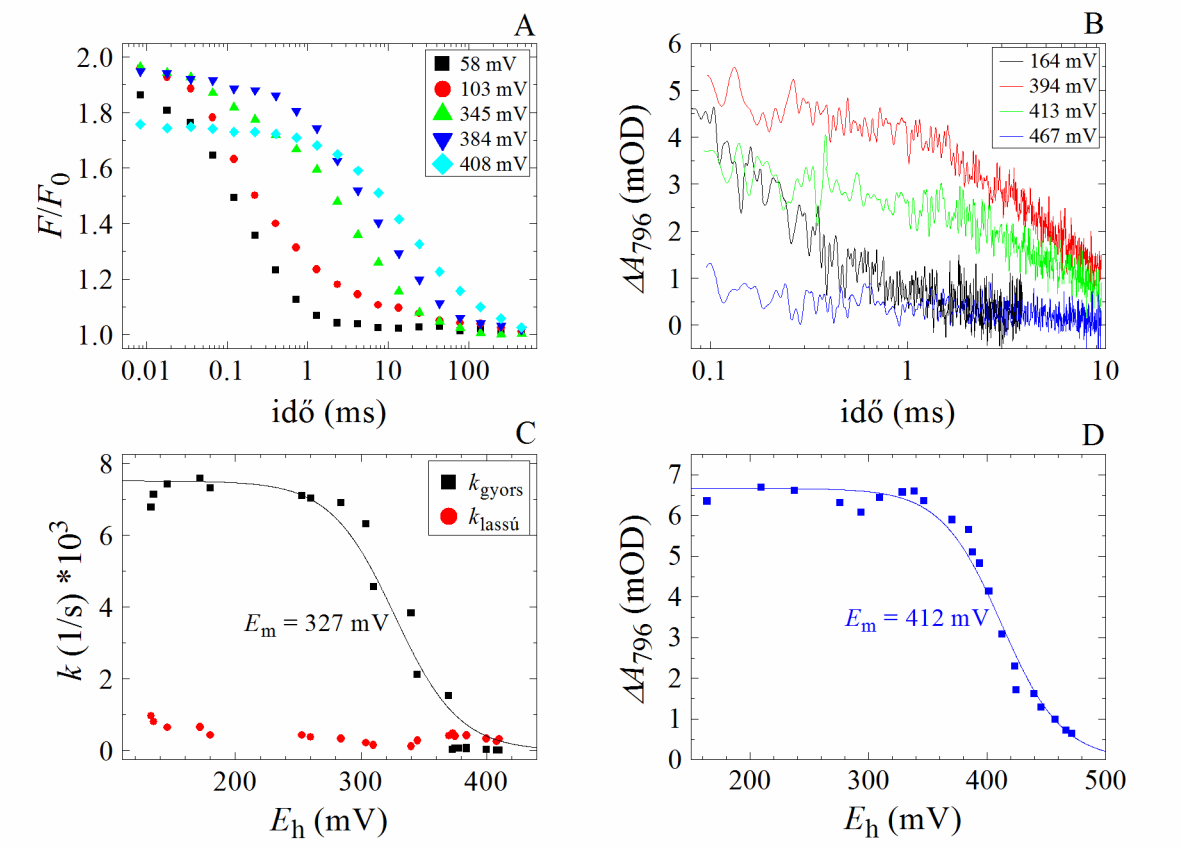


4.24. ábra *Rba. sphaeroides* sejtek fluoreszcencia indukciója és relaxációja különböző hosszúságú gerjesztés alatt és után.

A 4.24. ábrán egy tipikus fluoreszcencia indukció látható (A panel), melyet különböző időpontokban megszakítva a fluoreszcencia sötétrelaxációja követ (B panel). Minél hosszabb a gerjesztő flash, annál lassabb a relxáció.

A sejteket tartalmazó oldat redoxpotenciáljának változtatása

A flash-indukált változások *Rba. sphaeroides* sejtekben érzékenyek az aktuális redoxpotenciálra, amit a BChl fluoreszcencia relaxáció és a 798 nm-en mért abszorpcióváltozás redox titrálásával mutatunk be (4.25.ábra). A redox változások reverzibilisek a 150-450 mV tartományban. A RC-ban lévő dimér és természetes elektron donora, a citokróm c_2 a két fő redox ágens, amik meghatározhatják a fény-indukált változások redox természetét ebben a baktériumban és ebben a redox tartományban. Az aktuális redoxpotenciál növekedésével a 798 nm-es abszorpcióváltozás amplitúdója csökken, élettartama pedig növekszik, P és donora, cit c_2^{2+} sötétbeli oxidációjának növekvő mértékét jelezve. Az amplitúdó redox titrálására egy-elektronos Nernst görbét illesztve $E_{m,P}$ = 436 mV középponti potenciált kapunk, ami sokkal alacsonyabb, mint amit izolált RC-on mértek korábban (495 mV pH 8-on, Maróti and Wraight, 1988).



4.25.ábra Fluoreszcencia relaxáció (A) és flash-indukált abszorpcióváltozás (B) *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejteken különböző redox potenciálokon. A fluoreszcencia relaxáció gyors és lassú fázisainak időállandói (C) és a 796 nm-en mért abszorpcióváltozás (P^+) amplitúdója (D) a redoxpotenciál függvényében. A redox titráláshoz alkalmazott mediátorok: ferro- és ferriCN (2 mM); TMPD, DAD, DQ (20 µM); PES, PMS (1 µM); piocianin, etil-piocianin (2 µM). A mérést pH7-nél végeztük, oxidáló irányba K-ferricianid hozzáadásával haladtunk, redukáló irányba pedig Na-ditionittal. Gerjesztés: 1 A, 200 µs a fluoreszcencia relaxáció vagy Xe-flash az abszorpcióváltozás mérésnél.

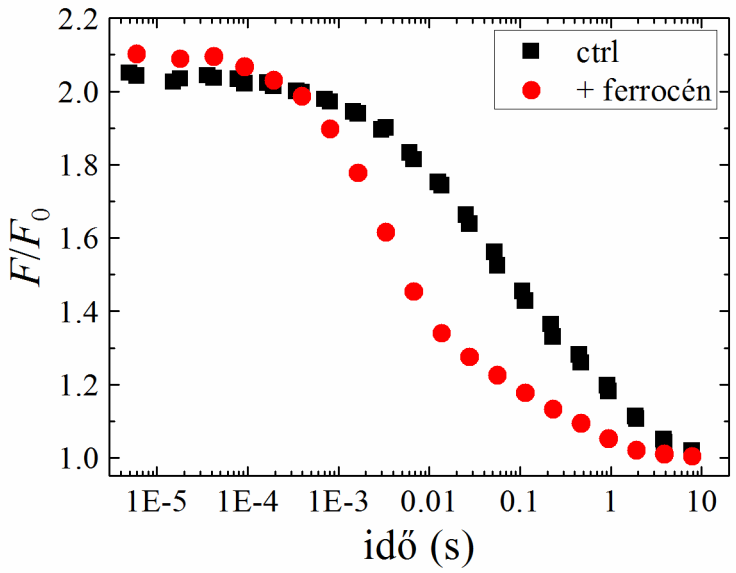
A fluoreszcencia relaxáció redox titrálása szintén a két redox centrum részvételét mutatja. A mért kinetikák összetettek, több komponens jelenlétére engednek következtetni. Hosszabb időtartományba tolódnak és az amplitúdók is csökkennek az aktuális redoxpotenciál növelésével, ami a fény-indukált P^+-ra történő elektron átadás lassulását és P sötétbeli oxidációját jelzi. A legnagyobb alkalmazott redoxpotenciálon (E_h = 408 mV) az összes cyct c_2 (és P kb. 20%-a) oxidált a sötétben és lassú, másodrendű reakciók (pl. töltés rekombináció) tüntetik el a fény-indukált P^+-t. Ennek megfelelően a kinetikák felbontása P^+ redukált cit c_2 (gyors) és másodrendű reakció (lassú) általi redukálásnak felel meg. A megfigyelhető sebességállandó $k_{obs} = k_c[\text{cit } c_2^{2+}] + k_s$. Pszeudó-elsőrendű kinetikát feltételezve P^+ és cit c_2^{2+} között, a gyors komponens sebességállandójának ($k_f = k_c[\text{cit } c_2^{2+}]$) cit c_2^{2+} aktuális, flash előtti mennyiségétől kell függenie. k_f redox titrálása illeszthető egy-elektronos Nernst görbével,

$E_{m,cit}$ = 327 mV középponti potenciállal. A lassú komponens sebességállandója (k_s) nem mutat E_h függést a vizsgált redoxpotenciál tartományban.

A donor hiánya és helyettesítése

Kromatofóra

A sejtekből izolált intracitoplazmikus membrán frakción mért relaxáció lassabb az intakt sejteken mérhetőnél felgyorsítható külsőleg hozzáadott elektron donorral (ferrocénnel).



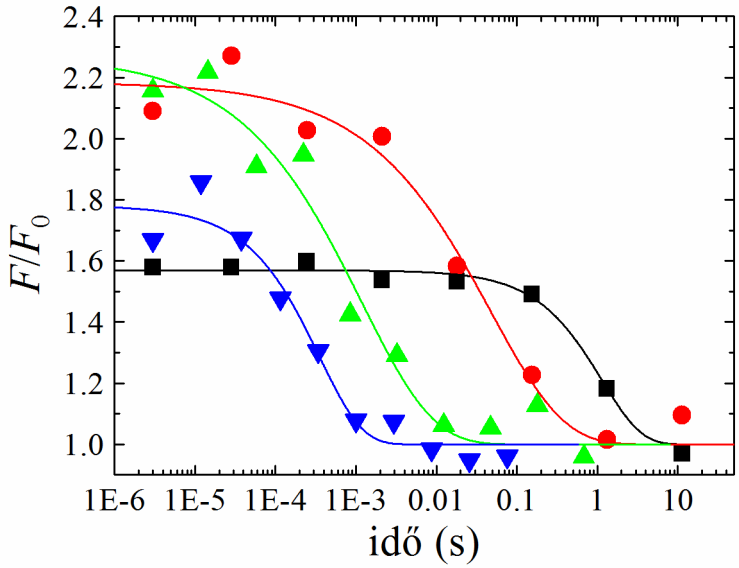
4.26. ábra *Rba. sphaeroides* Ga sejtekből izolált kromatofóra fluoreszcencia relaxációja. A minta tartalmazott 10 mM Tris puffer és 100 mM NaCl-ot. 100 µM ferrocén-t adtunk a mintához. A gerjesztés 200 µs-os lézer flash volt.

Ennek értelmezéséül az szolgál, hogy a kromatofóra preparáció során a vízoldékony cit c_2 nagy része elveszik, így a RC természetes donor nélkül marad. Egyéb, az oldatban/sejtben szükségszerűen jelen levő (közelebbről nem azonosítható) elektron donorok fogják P^+ visszaredukálását elvégezni. A kiegészítő (járulékos) donorok lassabb, és kissé összetett fluoreszcencia relaxációt eredményeznek (az „átlagos” lecsengési idő τ = 170 ms). Ferrocén, mint külső elektron donor hozzáadása gyorsítja a relaxációt (τ = 90 ms), mert gyorsabban képes az oxidált dimért visszaredukálni, mint a járulékos donorok (4.26. ábra).

CYCA I törzs

A cit c_2 mentes CYCA I sejteken mérhető fluoreszcencia relaxáció a kromatofórákéhoz hasonlóan lassan cseng le, és szintén felgyorsítható hozzáadott (külső) elektron donorral.

Ilyen alkalmas donor a TMPD vagy a ferrocén, amelyek képesek az élő sejtbe hatolva lényegesen (akár két nagyságrenddel is) felgyorsítani P^+ visszaredukálását.



4.27. ábra Fluoreszcencia relaxáció CYCA I sejteken. Kezeletlen (■), + 0.5 mM TMPD (●), + 2 mM TMPD (▲), + 5 mM TMPD (▼). Gerjesztés: 40 µs-os lézer flash.

CYCA I sejtek fluoreszcencia relaxációját a TMPD lényegesen felgyorsítja (4.27. ábra). A kinetikákhoz illesztett nyújtott (stretched) exponenciális függvény paramétereit a 4.3 táblázatban foglaltuk össze.

[TMPD] (mM)	A	τ	α
0	0.57	1.6 s	0.88
0.5	1.18	473 ms	0.48
2	1.27	1 ms	0.48
5	0.78	352 µs	0.82

4.3. táblázat A 4.27. ábra látható kinetikákhoz illesztett stretched exponential függvények paraméterei.

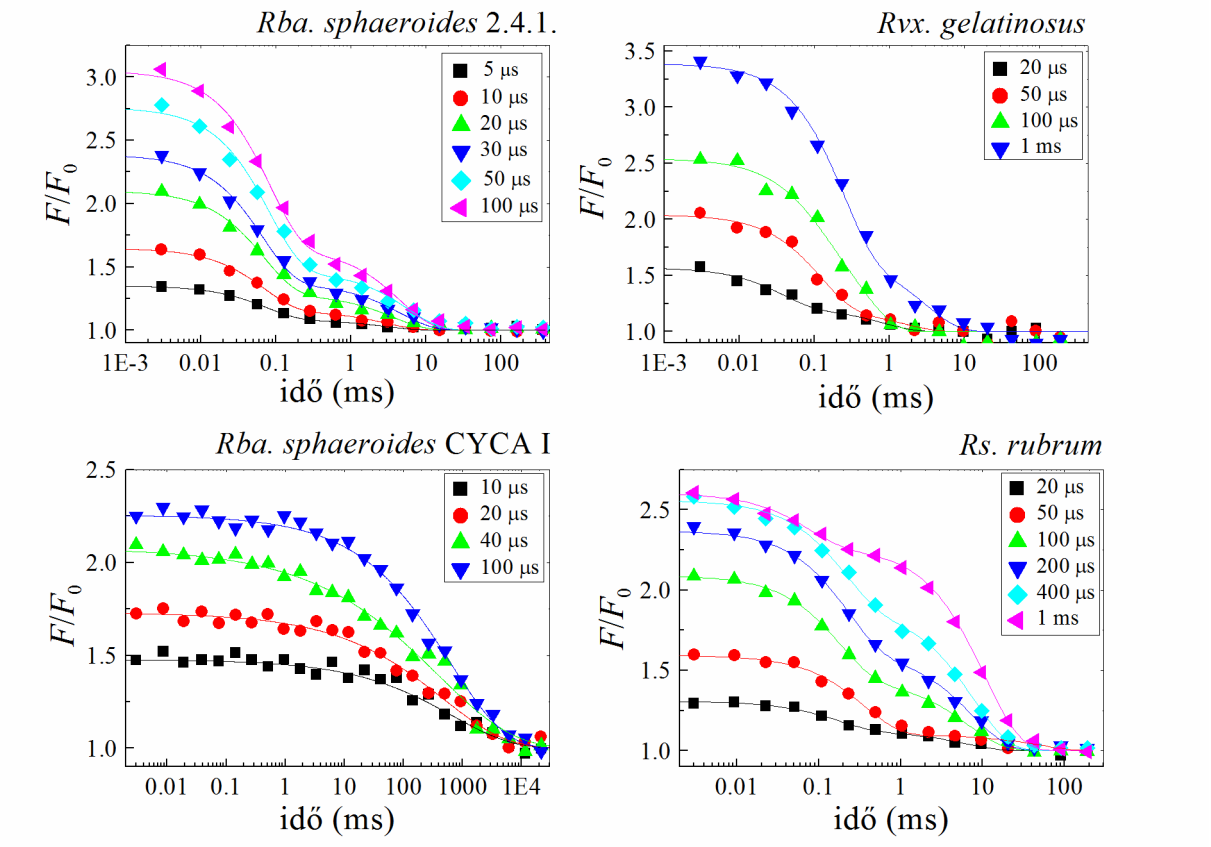
A TMPD nem csak a lecsengés időállandójára volt hatással, hanem a fluoreszcencia változó részét is megnövelte. Elképzelhető, hogy a kezeletlen tenyészetben a RC-ok egy része sötétben is oxidált állapotban van és ezeket a TMPD visszaredukálja, így növelve a változó részt.

A pool-ok redox állapotának hatása a fluoreszcencia relaxáció kinetikájára

A RC sötétben való kinyitásának kinetikája közvetlenül P^+ vissza-redukciójának és Q_A^- vissza-oxidációjának sebességállandójától függ. A sebességállandókat, bár érzékenyek a későbbi elektrontranszfer lépésekre, a kinon és cit c_2 pool-ok redox állapota határozza meg. Ez az indirekt hatás számos módon bemutatható.

A gerjesztő flash hosszának hatása

A fluoriméteren tetszőlegesen állítható a gerjesztő lézer flash hossza, ezzel befolyásolhatjuk, hogy milyen redukáltsági, ill. oxidáltsági fokig juthasson el a fotoszintetikus apparátus akceptor (elsősorban a kinonok), ill. donor oldala. Noha ezek ciklusba szervezett elektrontranszport-lánccal vannak összekötve, kinetikai (és egyéb, pl. sztöchiometriai) korlátok szabják meg a redox oldalak kapacitását. Minél hosszabb a gerjesztés, annál jobban „kimerül" a donor és az akceptor oldal.

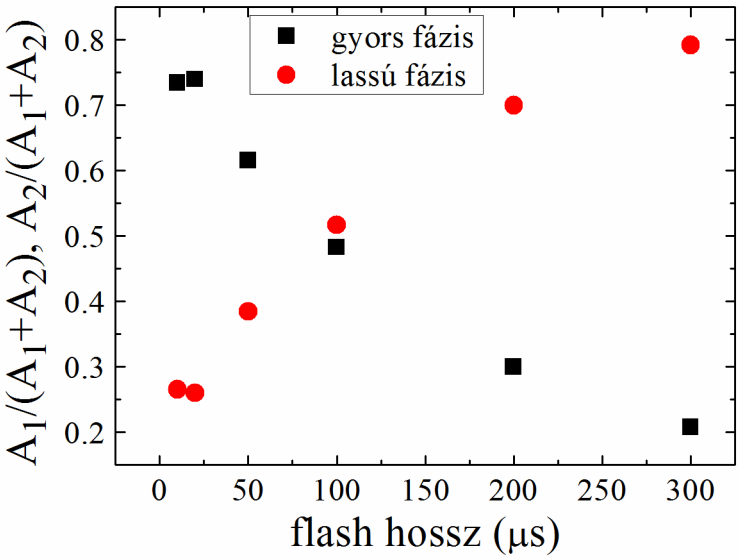


4.28. ábra Fluoreszcencia relaxáció különböző baktérium törzseken, különböző hosszúságú gerjesztő flash-ek után.

A 4.28. ábrán négy különböző baktériumtörzs fluoreszcencia relaxációja látható. A gerjesztő flash hosszát növelve a fluoreszcencia relaxáció magasabbról indul és lassabbá válik. A CYCA I törzs nem tartalmaz természetes donort (cit c_2), relaxációja a flash hosszától

függetlenül lassú ($\tau \approx 1$ s), csak a kezdeti szint emelkedése figyelhető meg. Az olyan baktériumban, ahol leginkább az akceptor oldali reakciók határozzák meg a fluorezscencia relaxációt (*Rvx. gelatinosus*), egy nagyságrenddel lassabb lecsengést tapasztaltunk a flash hossz 20 µs-ról 1 ms-ra növelésekor. *Rba. sphaeroides* és *Rsp. rubrum*, ahol az újra-nyitást főleg a donor oldali reakciók limitálják, a lassulás jobban kifejezett és a kinetikákban fokozatosan megjelenik egy lassú komponens. A fluoreszcencia relaxációs görbékből következtethetünk a donor és aceptor oldal kapacitására.

A bemutatott törzsek közt lényeges különbség, hogy donor oldalaik eltérőek: *Rba. sphaeroides* sejtekben egy RC-LH1 dimerhez tartozik egy cit c_2, ami lehet szorosan kötött, vagy távoli helyzetben. A CYCA I törzsben nincs cit c_2, így a P^+ gyors donor nélkül marad. *Rvx. gelatinosus* RC-ai kötött citokróm alegységet tartalmaznak, így P^+ visszaredukálása kellően gyors lehet. *Rs. rubrum*ban monomerikus RC-LH1 komplexek vannak, a cit c_2 pedig nem kötődik szorosan, mint *spaeroides*ben. A donorral rendelkező törzsek (*Rba. sphaeroides, Rvx. gelatinosus, Rs. rubrum*) relaxációja két komponensre bontható és jól közelíthető biexponenciális függvénnyel, a CYCA I törzsé pedig „stretched exponential" függvénnyel.



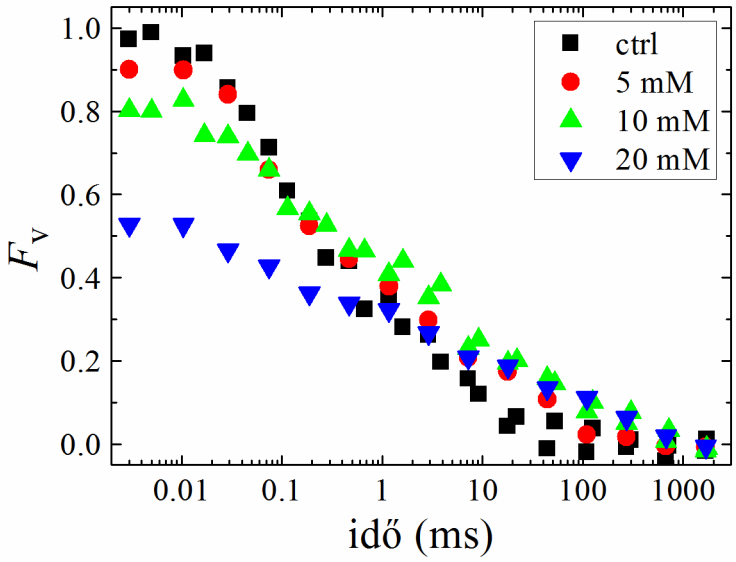
4.29. ábra A fluoreszcencia relaxáció gyors és a lassú fázisának amplitúdó arányai a gerjesztő flash hosszának függvényében *Rba. sphaeroides* 2.4.1. tenyészetben. Gyors fázis (A_1) (■) és lassú fázis (A_2) (●) aránya a teljes változó részhez (A_1+A_2) képest.

A relaxáció két fázisának amplitúdó aránya változik a flash-hossz függvényében. A flash hosszának növekedésével növekszik a lassú fázis aránya a gyors fázis rovására (4.29. ábra).

A relaxáció 1 ms-nál gyorsabb részéért a gerjesztés bekapcsolása előtt is jelenlévő redukált citokrómok felelősek, míg 1 ms után már a cit bc_1 komplex által visszaredukált citokrómok is beléphetnek. *Rba. sphaeroidesben* egy RC dimérre csak egy cit c_2 jut, így mindenképp szükség van a cit bc_1 általi visszaredukcióra. A flash hosszának növelésével növekszik a zárt centrumok száma, és elfogynak a redukált citokrómok. Ezután az oxidált citokrómok a periplazmikus térben diffúzióval jutnak el a cit bc_1 komplexhez majd a redukció után vissza a RC-hoz, így a maradék P^+ visszaredukálását már a diffúzió is limitálni fogja. Ez nyilvánulhat meg a relaxáció 1 ms utáni szakaszán.

Redukálás Na-ditionittal

A sejtekhez redukálószert adva (Na-ditionit) a RC akceptor oldalát blokkolhatjuk.

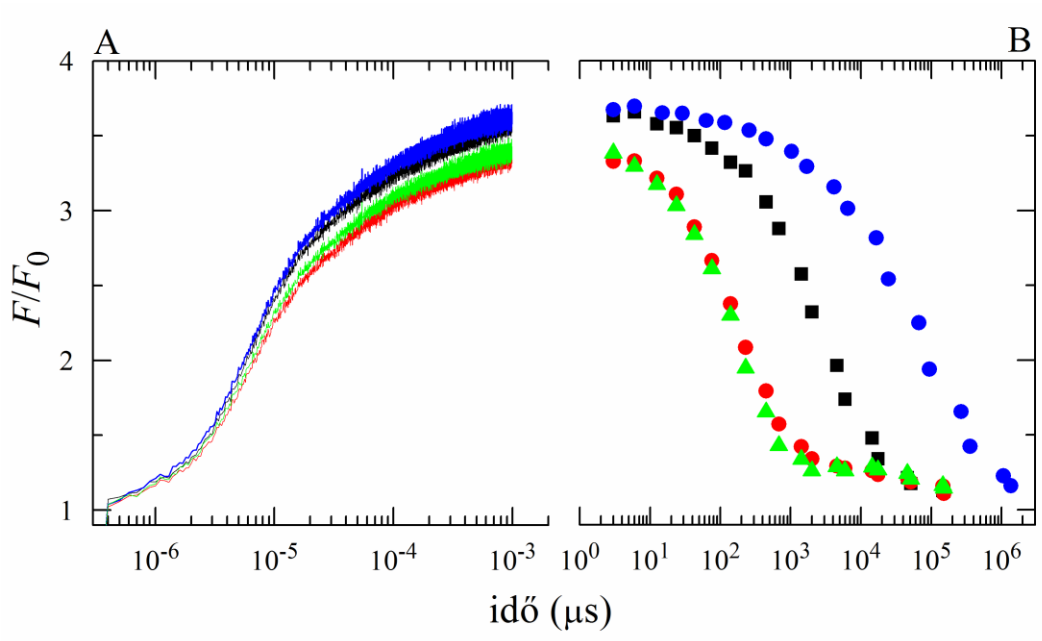


4.30. ábra *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejtek fluoreszcencia relaxációja Na-ditionit jelenlétében. A kezeletlen tenyészethez (■) Na-ditionit oldatát adtuk 5 mM (●), 10 mM (▲) és 20 mM (▼) mennyiségben. Gerjesztés hossza: 100 µs. A fluoreszcencia változó része 0 és 1 közé normált, 1 = 1.7 a kezeletlen tenyészeten.

A Na-ditionit redukálja a sejtekben lévő kinonokat, ezzel gátolja az elektronok kijutását a RC-ból. A fluoreszcencia relaxáció összetettebbé válik a lassú komponens feltűnő növekedése miatt. Nagy Na-ditionit feleslegben (20 mM) a kezdeti szint lecsökken, és a kinetika ellaposodik, ez várható, ha kiredukáljuk a kinon pool-t, Q_B-t és részben Q_A-t (4.30. ábra). Az akceptor oldal kiredukálása a fotoaktív RC-ok számával együtt a változó fluoreszcenciát és a fluoreszcencia relaxáció sebességét is csökkenti.

Citokróm bc_1 blokkolók hatása

A RC körüli ciklikus elektrontranszport fontos állomása a cit bc_1 komplex, ez teremt kapcsolatot a membránban mozgó kinonok és a vízoldékony citokrómok között. Leegyszerűsítve a RC-tól érkező redukált kinonokat oxidálja és a citokrómokat redukálja. Gátlásával így a donor és az akceptor oldalra is hatunk.



4.31. ábra Fluoreszcencia indukció (A) és relaxáció (B) 1 ms hosszú gerjesztő flash után *Rba. sphaeroides* 2.4.1. tenyészeten (–, ■), 1 mM TMPD (–, ●), 10 µM myxothiazol (–,●) és 1 mM TMPD + 10 µM myxothiazol (–, ▲) jelenlétében.

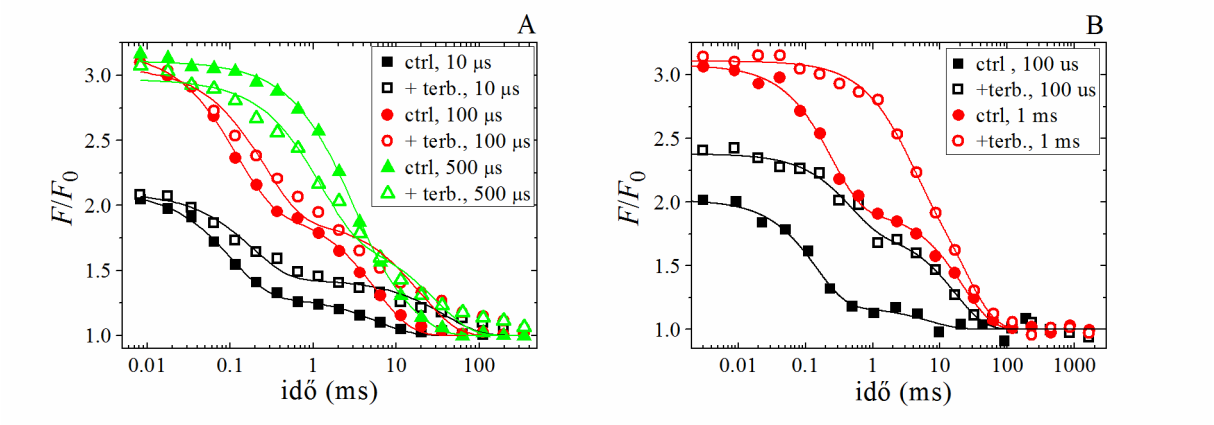
Az alkalmazott gerjesztés elég hosszú volt, így a kezeletlen tenyészeten mérhető relaxáció 5 ms-os időállandóval cseng le, amit TMPD-vel 235 µs-ra gyorsíthatunk fel. Myxothiazol jelenlétében a relaxáció 100 ms-ra lassul (4.31. ábra).

A myxothiazol a Q_o helyre kötődik a cit bc_1 komplexen, megakadályozza az elektrontranszfert a Rieske vas-kén fehérjére, így gátolja a komplex működését. Mivel a kinon pool mérete sokkal nagyobb, mint a redukált cit c_2-é, ezért a gátlás a donor oldalon jelentkezik. A TMPD elektron donorként helyettesíti a cit c_2^{2+}-t, így gyorsítva meg a relaxációt. Myxothiazol és TMPD együttes jelenlétekor a relaxáció gyors marad, mert a feleslegben lévő TMPD biztosítja az elektronokat P^+ vissza-redukálásához, így elfedi a gátolt cit bc_1 komplex hatását.

Fontos megfigyelés, hogy ezekben az intakt sejtekben a fluoreszcencia relaxáció sokkal érzékenyebbnek bizonyult a donor oldali elektrontranszfer reakciók módosítására, mint a fluoreszcencia indukció.

Interkinon elektrontranszfer

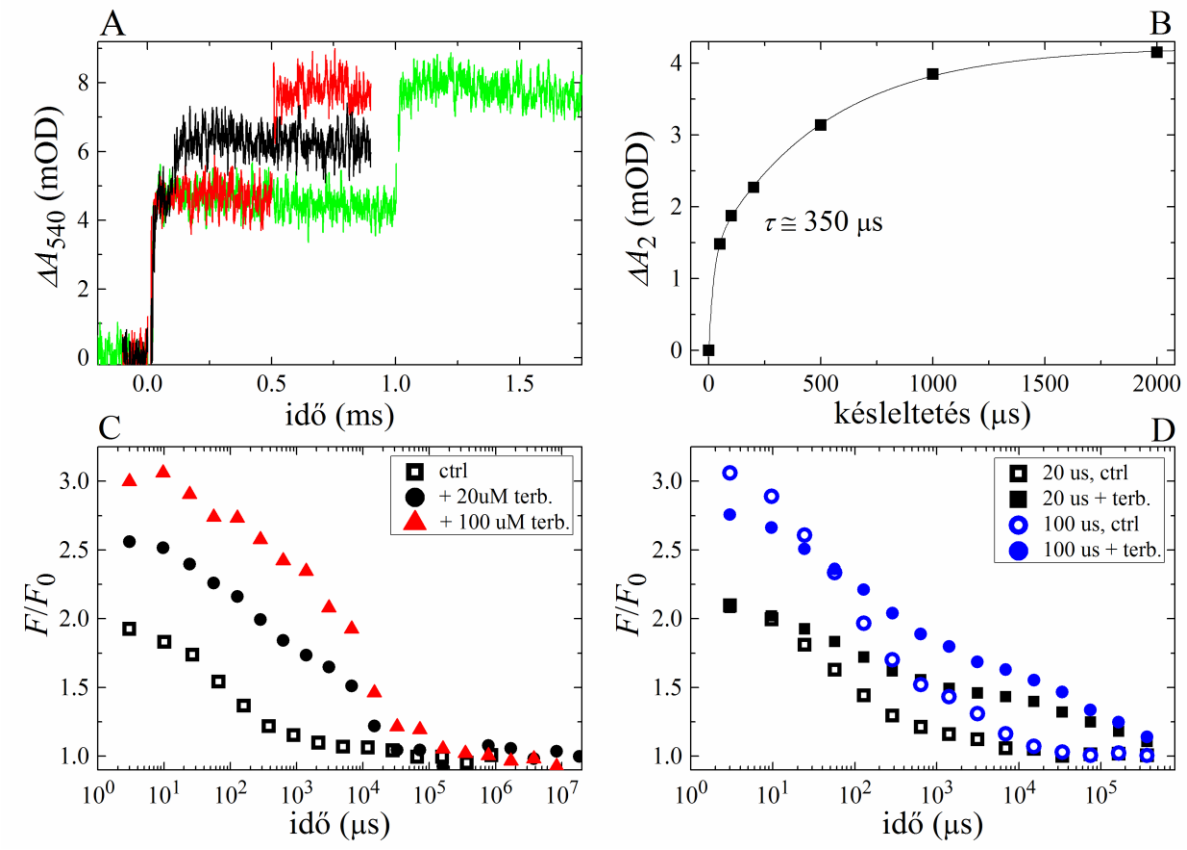
Az akceptor oldali reakciók módosításának, (irányított) befolyásolásának legkézenfekvőbb módja a jól ismert Q_B oldali inhibitorok (terbutryn, o-phenantrolin, atrazin, stigmatellin, stb.) alkalmazása. Míg ezek bizonyítottan nagy hatékonysággal gátolják a kinonok közti elektron transzfert kromatofórán és izolált RC-ban, élő sejteken végzett fluoreszcencia relaxáció méréseink szerint hatásuk csak igen korlátozottnak mutatkozott.



4.32. ábra Fluoreszcencia relaxáció *Rba. sphaeroides* 2.4.1. (A) és *Rvx. gelatinosus* (B) sejteken különböző hosszúságú lézer flash-ek után és terbutrin kezeléssel. Teli szimbólumok: kezeletlen, üres szimbólumok: + 120 µM terbutrin. A: Gerjesztő flash hossza 10 µs (■, □), 100 µs (●, ○) és 500 µs (▲, △). B: Gerjesztő flash hossza 100 µs (■, □) és 1 ms (●, ○).

A 4.32. ábra terbutrinnak a Q_A- Q_B közti elektronátadásra gyakorolt hatása látható két különböző törzs esetén. Mivel a fluoreszcencia terbutrin jelenlétében is lecseng néhány 100 ms-on belül, ebből arra következtethetünk, hogy a terbutrin gátlása csak részleges, azaz vagy csak időlegesen képes kiszorítani a kinonokat a Q_B kötőhelyről, vagy beköt ugyan stabilan, de a redukált Q_A-t egy külső (Q_B-től különböző) oxidáns oxidálni képes, azaz az elektronok „kiszivárognak" A terbutrin fluoreszcencia relaxáció lassító hatása különböző az eltérő sebességű donorral rendelkező törzsekben: nagyobb különbséget tapasztalunk a gyors donorral rendelkező *Rvx. gelatinosus*ban, mint a nála lassabb *Rba. sphaeroides*ben.

A RC-hoz kötött citokróm alegységnek köszönhetően *Rvx. gelatinosus* sejtekben a zárt RC-ok újra-nyitását csak az interkinon elektrontranszfer sebessége határolhatja. A kinyitás időtartamának meghatározására a sejteket két, egymástól változó időbeli távolságban adott, telítési Xe-flash-el világítottuk meg és mértük az elektrokróm abszorpcióváltozást 540 nm-en (4.33. ábra, A). A második flash utáni abszorpcióváltozás amplitúdója szünet függvényében emelkedő kinetikát mutat 350 µs-os élettartammal (4.33. ábra, B). Ezt az értéket tekintjük az elektronátadás sebességének Q_A^--ról Q_B-re *Rvx. gelatinosus* sejtekben.

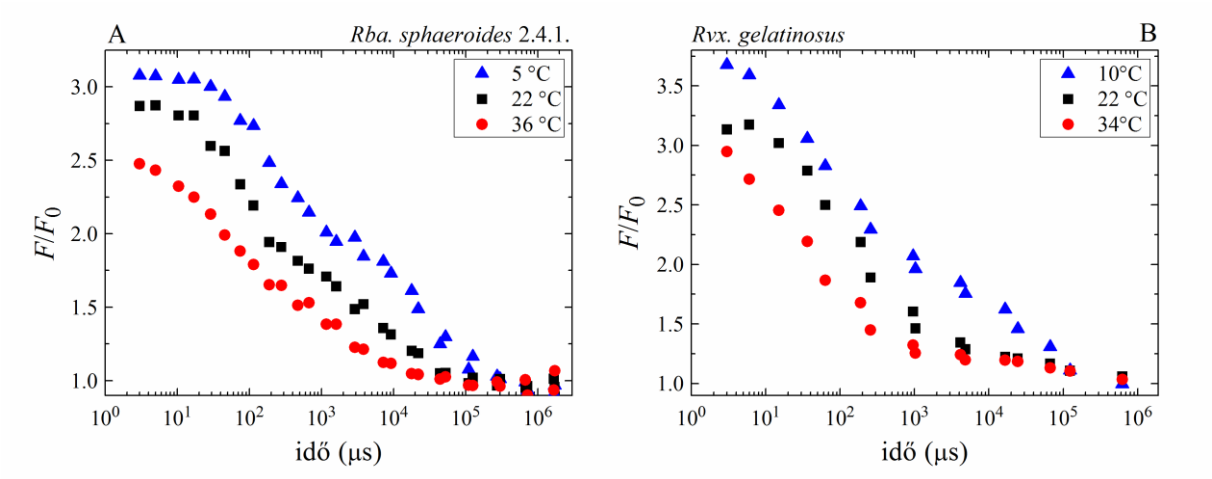


4.33. ábra Flash indukált abszorpcióváltozás és fluoreszcencia relaxáció. A: Abszorpcióváltozás kettős flash kísérletben *Rvx. gelatinosus* sejteken, B: az A panelen lévő kettős flash kísérlet kiértékelése, C: *Rvx. gelatinosus* sejtek fluoreszcencia relaxációja 100 µs-os flash után terbutrinnel, D: *Rba. sphaeroides* sejtek fluoreszcencia relaxációja 20 és 100 µs-os flash után, 200 µM terbutrin jelenlétében.

Terbutrin hozzáadására a relaxáció összetett kinetikája lelassul. A gyors komponenst kevésbé érinti az inhibítor, a lassú komponens arányát viszon nagyon megnöveli *Rba. sphaeroides*-ben (4.33. ábra, D), de még jobban *Rvx. gelatinosus*-ban (4.33. ábra, C). Hasonló változásokat figyeltünk meg a kinetikában más interkinon elektrontranszfer blokkolókkal is: o-fenatrolinnal, stigmatellinnel vagy atrazinnal. A lassú fázis növekedésének okát keresve számításba kell vennünk, hogy *Rba. sphaeroides* sejtekben a fluoreszcencia relaxáció sebbesség meghatározó lépése nem az interkinon elektrontranszfer, hanem nagyobbrészt P^+ redukálása és a P^+ cit c_2 általi vissza-redukálásának gyors fázisához tartozó relatív fluoreszcencia hatásfok kétszer akkora, mint a PQ_A^- vissza-oxidációjának lassú fázisához tartozóé. A kinetikák azt mutatják, hogy intakt sejtekben a terbutrin Q_B helyen tartózkodásának ideje korlátozott a pool kinonokkal való versengés miatt.

Hőmérsékletfüggés

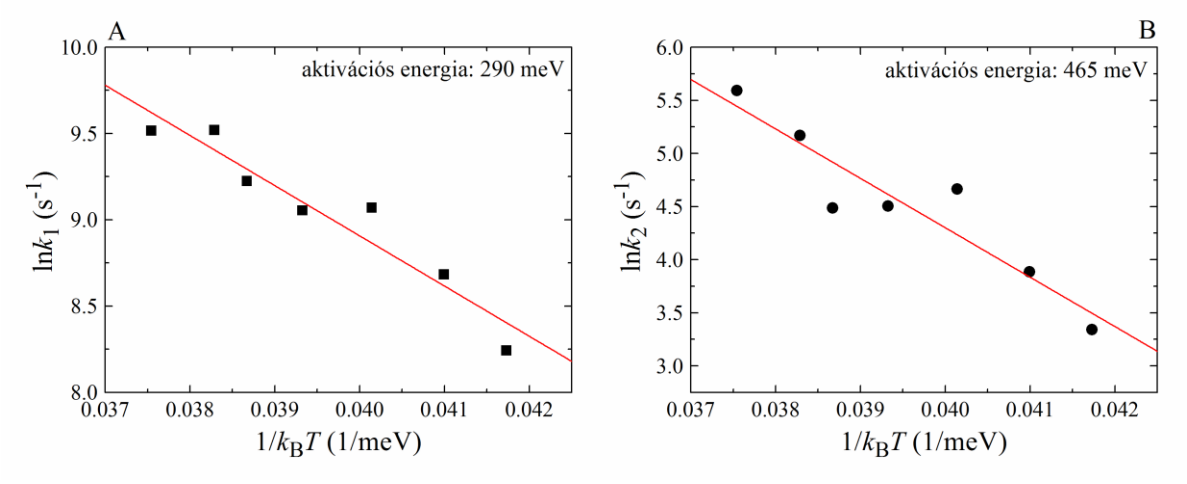
A reakciócentrum körüli ciklikus elektrontranszportban részt vevő mobilis töltéshordozók mozgásának sebessége függ a hőmérséklettől, ezért megvizsgáltuk a fluoreszcencia relaxáció hőmérséklet függését.



4.34. ábra A fluoreszcencia relaxáció hőmérséklet függése *Rba. sphaeroides* 2.4.1. (A) és *Rvx. gelatinosus* (B) tenyészeten. Gerjesztés: 800 mA, 50 µs (A) vagy 1 A, 100 µs (B).

A BChl fluoreszcencia relatív hatásfokának csökkenése *Rba. sphaeroides* és *Rvx. gelatinosus* sejtekben nagy változásokat mutat a fiziológiás hőmérsékleti tartományban (4.34. ábra). 1 ms-os gerjesztés után a *Rba. sphaeroides* sejtek relatív fluoreszcencia hatásfokának kezdeti szintje lényegesen magasabb alacsony hőmérsékleten (5°C), mint magason (36°C): F_{max}/F_0 = 3.1 és 2.5, a különbség 30 %-os. A hőmérséklet növelésével a kinetikák kiterjedtek maradnak (multifázikusak), de a rövidebb időtartományra (egy nagyságrenddel) tolódnak: a látszólagos fél-idő körülbelül 1 ms 5°C-on és 100 µs 36 °C-on. A változás reverzibilis. Hasonló hőmérséklet függés figyelhető meg *Rvx. gelatinosus*-on.

A fluoreszcencia relaxáció két exponenciálisra bontható és ez a bifázikusság jobban kifejeződik alacsony hőmérsékleten, mert a két komponens eltérő mértékben függ a hőmérséklettől.



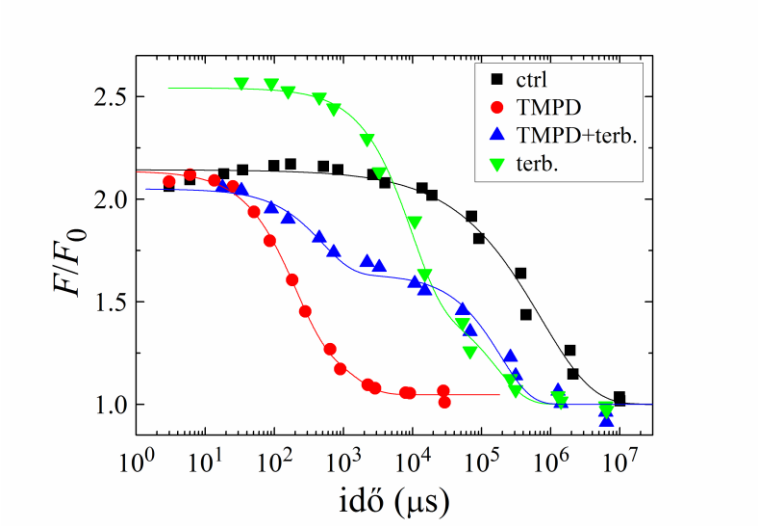
4.35. ábra A fluoreszcencia relaxáció gyors és lassú fázisa időállandóinak hőmérséklet függése *Rba.sphaeroides* 2.4.1. sejtekben (Arrhenius ábrázolás).

A relaxáció kinetikák két exponenciálisra bontása után az Arrhenius ábrázolásból meghatározhatók az aktivációs entalpiák: 28 kJ/mol és 45 kJ/mol adódik a gyors és a lassú komponensre. A lassú fázis sokkal érzékenyebb a hőmérséklet változtatására, mint a gyors fázis (4.35. ábra).

A RC zárt állapotainak relatív fluoreszcencia hatásfokai

Mivel a BChl fluoreszcencia és a fotokémia komplementer folyamatok, a fluoreszcencia relaxáció a zárt (relatív fluoreszcencia hatásfoka 1) $P^+Q_A^-$ állapotú RC PQ_A, nyitott (relatív hatásfoka 0) állapotba történő átalakulását mutatja. A relaxáció nem csak a nyitott/zárt RC-ok koncentráció arányának változását, hanem a köztes állapotú (részlegesen zárt P^+Q_A és PQ_A^-) RC-ok fluoreszcencia hatásfokát is tartalmazza. Bár az antennában lévő excitonokat ezek közül egyik RC sem tudja fotokémiailag elnyelni, de a BChl fluoreszcenciát kiolthatják. Kingma és mtsi. (1983) szerint a PQ_A^- állapot fluoreszcencia hatásfoka 60%-a P^+Q_A állapoténak *Rsp. rubrum* sejtekben. Vitatott, hogy a PQ_A^- állapotban történő exciton veszteség (pl. triplett képződés miatt) magasabb, mint a P^+Q_A állapotban P^+ kioltó hatása miatti veszteség.

A fotokémiailag zárt állapotokhoz tartozó fluoreszcencia hatásfokok megállapításához a citokróm c_2 mentes *Rba. sphaeroides* CYCA I törzset használtuk, a RC-on áthaladó elektrontranszfert külső donorral (redukált TMPD) és az interkinon elektrontranszfert blokkoló terbutrinnal kontrolláltuk (4.36. ábra).



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

Kezeletlen sejtekben P^+ megfelelő elektrondonorának hiányában a fluoreszcencia lassan cseng le, a P^+Q_A állapot élettartama 700 ms körüli. Terbutrin hozzáadása a sejtekhez növeli a fluoreszcencia hatásfokot és 70 ms élettartamúra gyorsítja a fluoreszcencia relaxációt. Hasonlóan, de nagyobb mértékben gyorsítható a fluoreszcencia relaxáció, 0.43 ms élettartamra a sejtekhez adott külső elektron donorral (redukált TMPD). A két kinetika között egy élég nagy rés látható. A RC PQ_A^- állapotban tartása terbutrin és TMPD egyidejű alkalmazásával lehetséges. Ez a kinetika két lépésben esik, ami azt mutatja, hogy a PQ_A^- redox állapotú RC fluoreszcencia hatásfoka körülbelül fele a P^+Q_A állapothoz tartozóénak.

A fluoreszcencia relaxációt meghatározó folyamatok összefoglalása

Az általunk végzett kísérletek arra irányultak, hogy felderítsük a BChl fluoreszcencia relaxáció összetett jelenségét. A fluoreszcencia hatásfoka monoton csökkenést mutatott minden vizsgált baktériumtörzsön és nem tapasztaltunk sötétbeli emelkedést (vagyis a RC újra-záródását), mint ahogy mások korábban közölték (Kolber és mtsi. 1998; Falkowski és mtsi. 2004; Koblizek és mtsi. 2005). A lecsengés kinetikája információval szolgál a zárt RC-okat kinyitó folyamatokról, akár a donor oldalról, akár az akceptor oldalról vagy mindkettőről legyen zárt a RC. A donor oldal kinyitását közvetlenül a citokrómok redox állapota és térbeli elhelyezkedése irányítja (< 1 ms hosszú gerjesztés esetén), indirekt módon pedig a ciklikus elektrontranszport sebessége (hosszú, 1 ms feletti gerjesztés). Míg a CYCA I (mobilis cit c_2 mentes) és a *Rvx. gelatinosus* (RC-hoz kötött citokróm alegység) két extrém eset, addig a *Rba. sphaeroides* és *Rsp. rubrum* a köztes állapotot képviselik mobilis cit c_2-vel rendelkeznek, ami

vagy kötődik a RC proximális helyéhez, vagy nem. Az akceptor oldal kinyitása a kinonok redox állapotától és a másodlagos kinon kötőhelyen (Q_B) valamint a pool-ban való elérhetőségüktől függ. Általában sokkal gyorsabb gyorsabban nyit ki, mint a donor oldal, hacsak nincs a RC-on citokróm alegység (*Rvx. gelatinosus*) vagy proximális helyen kötődő cit c_2 (*Rba. sphaeroides*). A részlegesen nyitott RC-ok (P^+Q_A és PQ_A^-) relatív fluoreszcencia hatásfokai között megfigyelt különbség bonyolulttá teszi a kinetikák kiértékelését. A diszkusszióban az intakt *Rba. sphaeroides, Rsp. rubrum* and *Rvx. gelatinosus* sejtek fluoreszcencia relaxációját meghatározó donor és akceptor oldali elektrontranszfer reakciók kinetikájára és energetikájára fogunk koncentrálni.

P^+ visza-redukciója játssza a főszerepet Rba. sphaeroides és Rsp. rubrum sejtek fluoreszcencia relaxációjában

A natív RC-ban gyors elektrontranszfer zajlik le a donor és akceptor oldalon egyaránt, az elnyelt fényenergia töltés rekombináció általi elveszésének megelőzésének érdekében. Ha az elektrontranszfer utak blokkoltak (pl. cit c_2-mentes mutáns (CYCA I) vagy a kinon pool Na-ditionittal redukált), a késleltetett fluoreszcencia növekedése jól jelzi a veszteséges töltés rekombinációt (Asztalos and Maróti, 2009, 4.4. fejezet). *Rba. sphaeroides* natív sejtekben a zárt RC-ok újra-nyitásának kinetikáját a P^+ redukció és az interkinon elektrontranszfer határozza meg.

Izolált *Rba. sphaeroides* RC-ban az első interkinon elektrontranszfer konformáció által kapuzott és sokkal gyorsabb (1-100 μs), mint a proton aktivált második elektron transzfer (~ 1 ms pH 8-on (Wraight 2004; Wraight and Gunner 2009)). *Rba. capsulatus* kromatofóra membránjában Lavergne és mtsi. (1999) azt tapaztalták, hogy az első és a második elektron transzfer egyező kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik és mindkettő a $(100\ \mu s)^{-1}$ időtartományban van, beleértve a kapcsolódó protonációs reakciókat is. A RC akceptor oldalán történő kinon átfordulásra kapott leggyorsabb érték kb. 1.6 ms (Comayras et al. 2005).

Telítési flash-t követő P^+ újra-redukciójában *Rba. sphaeroides* sejtekben legalább három fázis figyelhető meg, mint korábbi tanulmányokban kimutatták izolált fehérjéken (Drepper és mtsi. 1997; Tetreault és mtsi. 2001) vagy izolált kromatofórán (Overfield és mtsi. 1979) és intakt sejteken (Bina és mtsi. 2009). A P^+ redukció kinetika multifázikussága magyarázható a proximális-disztális kötődés modellel (Moser és Dutton, 1988; Gerencsér és mtsi. 1999; Larson és Wraight, 2000) vagy az egyetlen cit c_2 megoszlásával egy két RC és egy cit bc_1 alkotta szuperkomplexben (Joliot és mtsi. 1989; Lavergne és mtsi. 2009). Az ultragyors fázist

(~ 1 µs) mi nem tudjuk feloldani, de megpróbáltuk megbecsülni a részvételét kettős flash gerjesztéssel: a teljes amplitúdóból 20-30 % a részesedése. Ez a komponens olyan RC-okhoz tartozik, ahol a cit c_2 a proximális helyen kötődik. A második fázis a 20- 200 µs idő-tartományban van és nagyobb amplitúdóval rendelkezik. Eredete bizonytalan, lehetséges, hogy a RC disztális helyén kötődő, vagy más kötőhelyekről érkező (pl. cit bc_1) cit c_2-től származik. Néhány tulajdonsága miatt elsőrendűnek tűnik (koncentráció független sebesség), mások miatt egyszerű diffúziónak (viszkozitástól függő sebesség). A harmadik fázis (100 µs-ms) kötött cit c_2-t nem tartalmazó és/vagy a cit bc_1-et érintő reakciókat (a cit c_2 ingázása a komlexek között) foglal magába a RC: cit c_2 sztöhiometria miatt (a RC feleslegben van a cit c_2-höz képest). Egy nem telítési flash alkalmazása elnyomhatja ezt a komponenst (Asztalos és mtsi. 2012). A lassú fázis kinetikája a bc_1 komplexen játszódó kulcs redox reakciókra világít rá. Az ubikinol flash indukált kettéágazó oxidációja a citokróm bc_1 komplexen a hem b_h redukciójához vezet 1.5- 2 ms múlva, a citokróm c_1 ubikinol általi újra-redukciójához, membránpotenciál keletkezéséhez és 10- 20 ms alatt proton leadáshoz a kromatofóra belső oldalára (Mulkidjanian 2005). P^+ vissza-redukálásának lassú fázisa nagymértékben gátolható cit bc_1 blokkolókkal.

Szoros kapcsolatot találtunk a RC donor oldalának redox titrálása és a fluoreszcencia relaxáció között, ami alátámasztja a P^+ lecsengés meghatározó szerepét, mint sebesség meghatározó lépés a RC-ok újra- nyitásában *Rba. sphaeroides*-ben. A mért középponti redoxpotenciál 327 mV a cit c_2^{3+}/cit c_2^{2+} redox párra natív sejtekben, jól egyezik a korábbi adatokkal. 345 mV középponti potenciált kaptak *Rba. sphaeroides* kromatofórában (Meinhardt és Crofts, 1982) és oldatban (Pettigrew és mtsi. 1975; Prince és Bashford 1979). Ugyan ezt az értéket használta Lin és mtsi. (1994) és Venturoli és mtsi. (1998). Kissé eltérő értéket, 355 mV-ot kaptak szabad cit c_2- re *Rba. sphaeroides*-ből, oldatban pH8-on (Drepper és mtsi. 1997). A RC és a cit c_2 keresztkötése érintette a hem redox tulajdonságait, 370 mV középponti potenciált eredményezett pH7.5 és 9.5 közötti tartományban (Drepper és mtsi., 1997).

A gerjesztés időtartamát változtatva szisztematikusan módosíthatjuk az átfordulások számát és így a fénytelítettség mértékét. Nagy lézerdióda intenzitásnál a fluoreszcencia indukció fél-emelkedési ideje 10 µs körüli, ez két nagyságrenddel alacsonyabb, mint a cit c_2 áthaladási ideje a citokróm bc_1 komplex és a RC között. A változó fluoreszcencia hatásfokának gyors és lassú komponense a flash időtartamától függően változik, ennek vizsgálatából a membrán relatív kicsi cit c_2 tartalmára következtetünk (vagy a cit c_2:RC arány kicsi). Ez összhangban van más funkcionális és szerkezeti vizsgálatok eredményeivel, amik alapján kevés mobilis cit

c_2-t és cit bc_1 komplexet feltételeznek ([cit c_2]/[RC]~0.5 és [cit bc_1]/[RC]~0.5) anaerob környezetben, fotoszintetikusan nevelt *Rba. sphaeroides*-ben (Cartron és mtsi. 2014). Citokrómokból sokkal kevesebb van, mint ubikinonokból, amik nagy feleslegben állnak rendelkezésre (tipikusan [UQ]/[RC]~20-30), így a RC donor oldalának redox kapacitása behatároltabb, mint az akceptor oldalé. A pontos arányok függnek a baktériumtörzstől és a nevelési körülményektől (fény intenzitás, oxigén tartalom, stb.).

Rba. sphaeeroides-el ellentétben, *Rsp. rubrum* nem tartalmaz a RC-hoz szorosan kötődő cit c_2-t. A *Rba. sphaeeroides* cit c_2-n megtalálható a pozitívan töltött Arg32 oldallánc, de *Rsp. rubrum*-ban nem. Így nincs lehetőség a RC-on lévő negatívan töltött oldalláncokkal való elektrosztatikus kölcsönhatásra, *Rsp. rubrum*-ban a cit c_2 affinitása a RC-hoz kisebb (Paddock et al. 2005). Ennek megfelelően P^+ vissza-redukálása *Rsp. rubrumban* lassabb, mint *Rba. sphaeroides*-ben és sokkal lassabb, mint az interkinon elektrontranszfer. A RC donor oldalának lassabb kinyitása miatt a fluoreszcencia hatásfok egy hosszabb lag fázis után kezd el csökkenni. Ebben a törzsben a fluoreszcencia hatásfokot kizárólag a P^+ irányítja. A változó fluoreszcencia hatásfoka és az oxidált donor koncentrációja közötti kapcsolatot jól demonstrálja a szimultán, téglalap alakú lézerdióda gerjesztés alatt és után végzett abszorpcióváltozás (798 nm) valamint a fluoreszcencia indukció és relaxáció mérés. A szoros összefüggés széles időskálán is megmarad. Hasonló eredmény látható a citokróm mentes *Rba. sphaeroides* CYCA I törzs esetében is. Az abszorpcióváltozás és a fluoreszcencia kinetika közötti rés a membránban lévő fotoszintetikus egységek közötti kapcsoltság mértékének maghatározására alkalmazható (Lavergne és Trissl 1995; Rivoyre és mtsi. 2010; Maróti és mtsi. 2013).

Közvetlen és közvetett bizonyítékok támasztják alá, hogy a fluoreszcencia relaxáció kinetikája a P^+ vissza-redukcióját tükrözi ezekben a törzsekben és az akceptor oldalnak csak kis szerepe van. Ez ellentmondásban van a zöld növényeken megfigyelhető klorofill fluoreszcencia sötétrelaxáció magyarázatával, ahol az oxidált klorofill dimer (P_{680}^+) vissza-redukciója a másodlagos donor (tirozin 161 a PSII D_1 alegységén) által sokkal gyorsabb (> $(1\ \mu s)^{-1}$) mint bármilyen elektrontranszfer reakció az akceptor oldalon. P_{680}^+ vissza-redukciója tehető felelőssé a RC újra-nyitásában (Cser and Vass 2007). A korábbi, bakteriális rendszereken végzett fluoreszcencia relaxáció vizsgálatokat hasonlóan magyarázták. A relaxáció összetett kinetikáit a RC akceptor oldaláról történő elektron elszállítással jellemezték (Kolber et al. 1998). Ezt a nézetet használta fel Koblizek és mtsi.(2005), amikor fotoszintetikus apparátus fejlődését vizsgálták aerobból anaerob környezetbe való átmenet alatt, de Kis és mtsi. (2014) nem.

A fluoreszcencia relaxáció akceptor oldali limitációja Rvx. gelatinosus-ban

Mivel a citokróm alegység biztosítja P^+ nagyon gyors vissza-redukálását a RC-ot ért egy vagy két foton találat után, az akceptor oldali elektrontranszfer fogja határolni a RC újra-nyitását rövid gerjesztés alatt. Két flash kísérletet alkalmazva megbecsültük a $Q_A^- \rightarrow Q_B$ elektrontranszfer sebességet, ami $(350\ \mu s)^{-1}$. Hosszabb gerjesztés után, amikor a RC többször átfordul, a donor oldali reakciók sebessége kisebb lesz, összemérhető az akceptor oldali reakciókéval és hozzájárul a sebesség korlátozásához.

Az akceptor oldali limitáció létét támogatja a fluoreszcencia relaxáció sebességének akceptor oldali gátlószerekre való érzékenysége. A terbutrin, ez a jól ismert interkinon elektrontranszfer blokkoló sokkal nagyobb mértékben lassítja a relaxációt *Rvx. gelatinosus,* mint *Rba. sphaeroides* sejtekben.

Izolált RC-okban az inhibítotrok (terbitrin, stigmatellin, atrazin és o-fenantrolin) gátolják az interkinon elektrontranszfert, oly módon, hogy versengenek az ubikinonokkal a Q_B kötőhelyért. A mi fluoreszcenciás vizsgálataink bemutatják, hogy ezek az anyagok intakt sejtekben kevésbé hatékony gátlószerei az interkinon elektrontranszfernek. A baktériumsejtek szaporodását gátolják folyamatos megvilágításban nevelt tenyészetben. Egy ésszerű magyarázat a megfigyeléseinkre, hogy az alkalmazott körülmények között (nitrogén atmoszféra, hosszú sötét adaptáció) a sejtekben részlegesen redukált állapotban vannak, és a RC Q_B helyén szemikonon, Q_B^- ül. Mivel ennek nagy az affinitása a RC-hoz (izolált RC-ban UQ_{10}^- kötési állandója tízszer nagyobb, mint UQ-é, Wraight 2004), az inhibítor sötétben való bekötése akadályozott. Az inhibítornak akkor van esélye bekötődni a Q_B helyre, ha egy szemikinon másodjára is redukálódik és elhagyja a RC-ot. Mindemellett, hosszabb gerjesztés alatt a kinon pool redukáltabbá válik és az inhibítor QH_2-vel való versengése kedvezőtlenné válik. Továbbá, a Q_B helyen lévő kinol diszproporcionálódhat ($Q_AQH_2 \leftrightarrow Q_A^-Q_BH^- + H^+$), melynek eredménye egy szorosan kötődő szemikinon (Maróti és Wraight 2008).

A fluoreszcencia relaxáció sebesség meghatározó lépéseinek aktivációs akadályai

A BChl fluoreszcencia hatásfoka és sebessége is mutatott hőmérsékletfüggést a kísérleteinkben. A fluoreszcencia hatásfokban megfigyelt változás magyarázható azzal, hogy a hőmérséklet változásával módosul a lipid membránban lévő (magas fluoreszcencia hatásfokú) BChl molekulák kitettsége a vizes oldathoz (alacsony fluoreszcencia hatásfok). Ezt az elképzelést algák és zöld növények kapcsán vezették be, ahol jól is működik (Murata és Fork 1975). A relaxáció látszólagos sebessége hőmérséklet-függésének magyarázata már nem tűnik ilyen egyszerűnek. Nem egyszerűen egy diffúzió által szabályozott folyamatot jelent,

hanem egy jelentős aktivációs gáttal rendelkező reakciót, ami 28 kJ/mol a gyors (~200 µs) és 45 kJ/mol a lassú fázisra (~2 ms). Mivel a RC akceptor és donor oldalán zajló kinon redukáló és citokróm oxidáló reakciók különböző aktivációs entalpiával rendelkeznek, a hőmérséklet-függés alapján talán szétválaszthatók a kinetikákban a domináns reakciók.

Az izolált RC kinon akceptor komplexében zajló elektron transzfer reakciók lelassulnak a hőmérséklet csökkentésével, vagyis nagy aktivációs entalpiával rendelkeznek. Magas, ~ 60 kJ/mol, aktivációs entalpiát mértek az első elektrontranszferre ($Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$, Mancino és mtsi. 1984; Gopta és mtsi. 1997) és a második protonfelvételre ($Q_AQ_BH^- \rightarrow Q_AQ_BH_2$, Gopta és mtsi. 1998) is. Az interkinon elektrontranszfer egy kapuzott reakció, ahol nem maga az elektron átadása, hanem a kinon helyzete (proximális vagy disztális a Fe^{2+}-hoz képest) vagy a fehérje konformációja (a protonációt is beleértve) a sebesség meghatározó lépés (Graige és mtsi. 1998; Mulkidjanian 2005; Wraight és Gunner 2009). Az ubikinon redukció magas aktivációs gátja úgy tűnik ezekhez a reakciókhoz köthető, hogy megelőzze a potenciálisan veszteséges visszafelé irányuló interkinon elektrontranszfert. Hasonlóan a RC-ban lévő kinon redukcióhoz, az ubikinol cit bc_1 komplexen történő elágazó oxidációja is nagy aktivációs energiával rendelkezik (Hong és mtsi. 1999).

Az akceptor oldallal ellentétben, a donor oldali, P^+ cit c_2^{2+} általi vissza-redukálásához köthető reakciók lényegesen kisebb aktiváció entalpiával rendelkeznek. 11.7 kJ/mol és 8.0 kJ/mol értékeket állapítottak meg a nagyon gyors (1 µs-nál kisebb fél-életidő) és gyors (60 µs-os fél-életidő) P^+ vissza-redukcióra *Rba. sphaeroides* izolált RC-aihoz kovalensen kötött cit c_2-vel (Drepper és mtsi. 1997). Még kisebb aktivációs energiákról számoltak be *Bla. viridis*-ben, ami RC-hoz kötött tetrahem citokróm alegységet tartalmaz: 6.9 kJ/mol, 3.8 kJ/mol és 4.3 kJ/mol értékeket kaptak, amikor egy, két vagy három hem volt redukált (Mathis és mtsi. 1994). Intakt *Rba. sphaeroides* sejtekben, P^+ nagyobb részének redukcióját lazán kötött cit c_2 végzi el 100 µs (gyors) és 2-10 ms körüli (lassú) fél-életidővel, kis aktivációs energiával. Azt figyeltük meg, hogy a fluoreszcencia relaxáció domináns, 100-200 µs fél-életidejű gyors fázisának aktivációs energiája eléggé kicsi (28 kJ/monl). A nagyobb aktivációs energiával rendelkező (45 kJ/mol) 2-5 ms fél-életidejű lassú komponens az akceptor oldal és a cit bc_1 komplex közreműködését jelzi, amik nagyobb aktivációs entalpiával jellemezhetők. Megfigyeléseink szerint a fluoreszcencia relaxáció lassú komponense érzékenyebb terbutrinre, a flash hosszára és cit bc_1 blokkolókra, mint a gyors komponens.

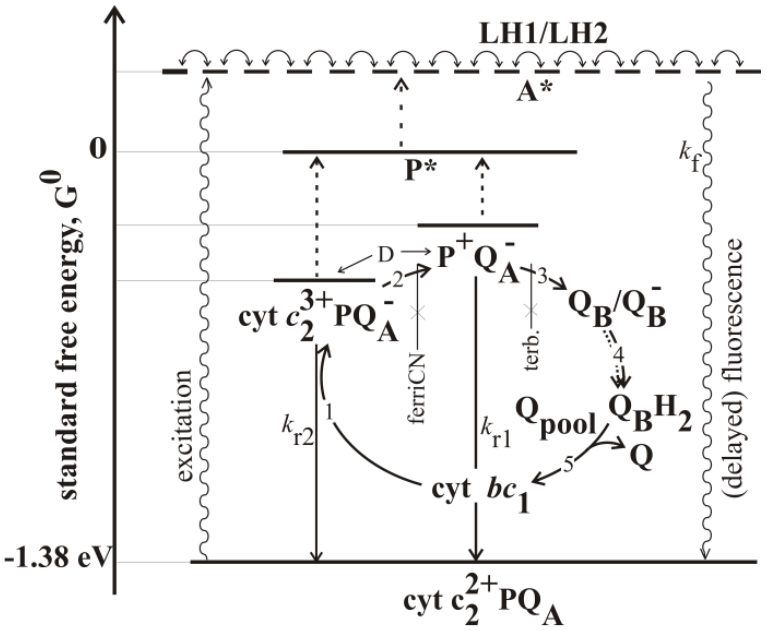
Eredményeinkből arra következtetünk, hogy *Rba. sphaeroides* sejtek rövid gerjesztés utáni (< 100 µs, egyszeres átforduláshoz közeli) fluoreszcencia relaxációjának kinetikáját

legnagyobb részben a donor oldali elektrontranszfer reakciók irányítják és az akceptor oldal részvétele csak hosszabb megvilágítás (többszörös átfordulás) esetén számottevő.

4.4 A fotoszintetikus reakciócentrum szerepe a ciklikus elektrontranszportban

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

A reakciócentrum körüli előrefelé és visszafelé haladó elektrontranszport folyamatokat *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejteken in vivo vizsgáltuk flash- indukált késleltetett fluoreszcencia (DL), prompt fluoreszcencia (indukció) és abszorpcióváltozás segítségével.



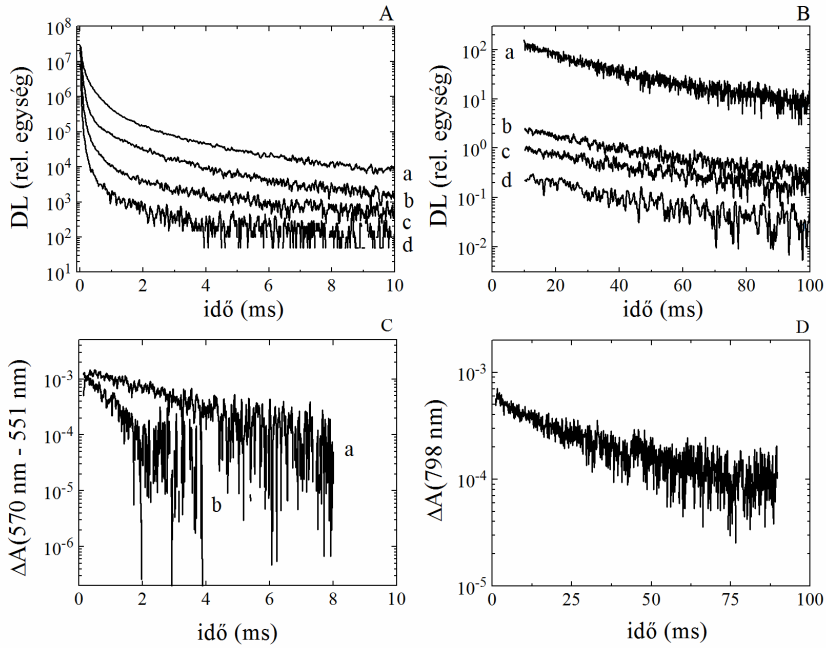
4.37. ábra A RC redox állapotainak sematikus ábrázolása szabadenergia skálán, a ciklikus elektrontranszport 5 lépésével *Rba. sphaeroides* sejtekben. Az 1. és 4. reakció határozza meg a fényindukált töltések RC- ból való elszállításának sebességét a donor és akceptor oldalról. A ferricianid és a terbutrin blokkolja a 2. és 3. lépést. Külső elektron donor (D) visszaredukálhatja a P^+-t és/vagy a cit c_2^{3+}- t. Töltésrekombinációval a $P^+Q_A^-$ és cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ állapotokból (k_{r1} és k_{r2} időállandóval) termális re-populációval P^* és A^* keletkezhet (szaggatott nyilak), ami késleltetett fluoreszcenciához vezet.

Fiziológiás körülmények között intakt sejtekben a RC-ból egy rövid flash hatására keletkezett töltések gyors folyamatoknak köszönhetően elszállítódnak és az elraktározott szabadenergia később energiaigényes reakciók fenntartásához használható. Az visszafelé haladó reakcióknak általában csak kis szerepe van ($k_{r1} << k_2$ vagy k_3 és $k_{r2} << k_1$) (4.37. ábra). Azonban jelentősek

lehetnek, amikor a töltések elszállítása akadozik és/vagy a komponensek szabadenergia szintjeit módosítja a sejtek redoxpotenciálja, kora vagy különböző kémiai kezelések (pl. gátló szerek). A DL mérése kiváló eszköz a visszafelé haladó reakciók nyomon követésére, vele párhuzamosan prompt fluoreszcencia és flash indukált abszorpcióváltozás méréseket is végeztünk a töltésrekombináció szerepének tanulmányozására.

Intakt sejtek flash gerjesztés utáni DL jelének lecsengése összetett kinetikájú, de itt csak a leglassabb komponensel foglalkozunk. Jellemzően a DL 1-10 ms- os időtartományban cseng le (4.38. ábra, A), kinetikai egyezést mutat az oxidált cit c_2 lecsengésével (visszaredukciójával), amit az 551 nm és 570 nm-en mért abszorpcióváltozások különbségével követtünk (4.38. ábra, C). A P^+/P redox változás és a cit c_2 oxidáció sokkal gyorsabb (nem ábrázolt). 10 mM Na-ditionit hozzáadása után a DL intenzitása körülbelül egy nagyságrendet emelkedik, valószínűleg a kinon pool és a Q_B redukálódása miatt (4.38. ábra, A). Ellenben, külső elektron donor hozzáadása (redukált TMPD vagy DAD) a sejtekhez csökkenti a DL intenzitását a kinetika számottevő módosítása nélkül (nem ábrázolt). TMPD kezelés után az oxidált cit c_2 lecsengése felgyorsul, de az amplitúdó változatlan marad (4.38. ábra, C). Ez a hatás a cit c_2^{3+} TMPD általi közvetlen redukciójának tulajdonítható. Mindezekre alapozva kimondható, hogy a megfigyelt DL fő prekurzora a cit$c_2^{3+}PQ_A^-$ redox állapot.

Ha a (flash indukált) P^+ cit c_2^{2+} általi redukciója gátolt ferricianid jelenléte miatt vagy a kinonok közti ($Q_A^- \rightarrow Q_B$) elektrontranszport terbutrinnal blokkolt (vagy stigmatellinnel, nem ábrázolt), hosszú élettartamú DL mérhető a 10- 100 ms időtartományban (4.38. ábra, B). Ebben az időtartományban átfed a fotoelektronsokszorozót védő kétfajta technika működési tartománya. Az egyik a detektor elektronikus kapuzása, a másik pedig mechanikai fényzár használata. Mindkét módszerrel hasonló monoexponenciális lecsengéseket kapunk, csekély pH függéssel. A DL lecsengése együtt halad a 798 nm-en mért abszorpcióváltozással (ami a P^+/P redox változásra jellemző). Ilyen feltételek mellett a DL prekurzora a RC $P^+Q_A^-$ redox állapota.



4.38. ábra DL lecsengés egész sejtekben, különböző feltételek mellett (A, B) és összehasonlításuk a cit c_2^{3+} / cit c_2^{2+} (C) és P^+ / P (D) redox átmenet okozta abszorpióváltozások kinetikájával, egyszeri gerjesztő flash után. Mérési körülmények: (A) elektronikusan kapuzott fotoelektronsokszorozó, DL fotonszámlálás, 100 mérés átlaga, 1 Hz flash repetíció, 10 mM Na- ditionit (a), 10 mM Na- ditionit és 1 mM TMPD (b), kezeletlen (c) és 500 µM TMPD (d). (B) 120 µM terbutrin és 250 µM K-ferricianid. A detektort elektronikus kapuzással védtük (a), vagy mechanikus fényzárral (b, pH 8.82; c, pH 7.06; d, pH 4.77). (C) 16 mérés átlaga, kezeletlen (a) és 1 mM TMPD (b). A kinetikák monoexponenciális felbontása: sebességek: $(2.9\ \mathrm{ms})^{-1}$ (a), $(0.81\ \mathrm{ms})^{-1}$ (b) és amplitúdók: 0.62 mOD (a), 0.7 mOD (b). (D) 16 mérés átlaga, pH 7.06, sebesség $(24\ \mathrm{ms})^{-1}$, amplitúdó 0.48 mOD.

Miután azonosítottuk a DL két prekurzorát és a töltés rekombináció útvonalait, megvizsgálhatjuk ezek termodinamikai tulajdonságait és pH függésüket. A $P^+Q_A^-$ redox állapot szabadenergia szintje különböző pH értékeken meghatározható, ha az integrált DL, $\int F_d(t)dt$- t viszonyítjuk az azonos körülmények közt mért $\int F_p(t)dt$ prompt fluoreszcenciával, ahogy először Arata és Parson (1981) alkalmazta izolált RC- okon:

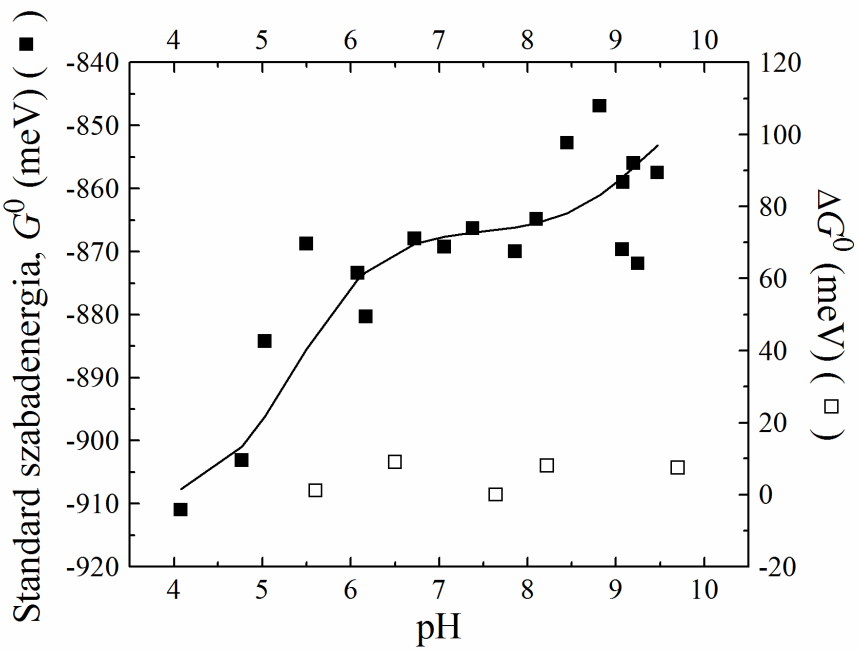
$$\frac{\int_0^\infty F_\mathrm{d}(t)\mathrm{d}t}{\int_0^\infty F_\mathrm{p}(t)\mathrm{d}t} = \frac{k_\mathrm{f\varphi p}}{k_\mathrm{d\varphi f}} \exp\frac{G^0_{\mathrm{A^*Q}}}{k_\mathrm{B}T} \tag{4.30}$$

Ahol k_BT a Boltzmann faktor (25 meV szobahőmérsékleten), $\int F_d(t)dt$ és $\int F_p(t)dt$ a késleltetett és a prompt fluoreszcencia integrált értéke. Ugyanazon a mintán lettek lemérve azonos optikai és elektronikai (1 MΩ anód ellenállás, 10 kHz szűrés és 100 szoros erősítés) feltételek mellett, egyedül a gerjesztő fényintenzitás nem volt azonos. A gerjesztő lézerfényt kalibrált szürke szűrőkkel ($1\cdot10^{-9}$) osztottuk le, hogy a prompt fluoreszcencia a DL- el azonos nagyságú

legyen. A DL lecsengés integráljának kiszámításához exponenciális illesztést használtunk: $\int F_d(t)dt = A_0/k_d$, ahol A_0 az amplitúdó a $t = 0$ pillanatban és k_d (= k_{r1}, 4.37. ábra) a DL $P^+Q_A^-$ prekurzor állapota lecsengésének időállandója (k_d = 25 s^{-1} pH 7.8- nál). A késleltetett és prompt fluoreszcencia integrált értékeinek aránya $4.9 \cdot 10^{-6}$ pH 7.8- nál. A (4.30) egyenlet jobb oldalán, k_f, az antenna bakteriokorofillok fluoreszcenciájának időállandója, a fluoreszcencia spektrum integrálásából származtatható ($k_f = 8 \cdot 10^8$ s^{-1}, Arata és Nishimura, 1983). A $P^+Q_A^-$ keletkezésének (fotokémiai csapdázás) kvantum hatásfokát egységnyinek vettük (φ = 1, Wraight és Clayton, 1973), és φ_f, a prompt fluoreszcencia hatásfoka a Rodamin B festék ismert fluoreszcencia hatásfokából (0.97) határozható meg ($\varphi_f = 5 \cdot 10^{-3}$, (Marói és Wraight, 2008; Arata és Nishimura, 1983; Borisov és Godik, 1972; van Grondelle, 1985). Ezekkel az értékekkel az 1. egyenet alapján G^0_{A*Q} = -870 meV pH 7.8 –on.

Sajnos ez a módszer nem alkalmazható a cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ állapotból származó DL-re. Az intakt sejtekben gyorsan lecseng a DL (gyorsabban, mint hogy kinyitna a mechanikai fényzár), így elektronikus kapuzással kell mérni, ami a mi elrendezésünkben nem elég gyors (10 MHz) a prompt fluoreszcencia detektálásához. Ezért a cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ prekurzor állapot szabadenergiájának csak a változását (ΔG^0) és nem az abszolút értékét számítjuk ki a pH függvényében:

$$\Delta G^0\big(G^0(\mathrm{pH}_2) - G^0(\mathrm{pH}_1)\big) = k_\mathrm{B}T \cdot ln\frac{\int F_d(t)\mathrm{d}t(\mathrm{pH}_2)}{\int F_d(t)\mathrm{d}t(\mathrm{pH}_1)} \qquad (4.31)$$



4.39. ábra A^* és $P^+Q_A^-$ közötti szabadenergia rés, G^0 függése a külső pH- tól, a prompt és a késleltetett fluoreszcencia integrált értékeinek arányából határoztuk meg (■, baloldali függőleges tengely). Az integrált DL-t normalizáltuk a P/P^+ flash indukált abszorpcióváltozás amplitúdójára. A 3. egyenlet alapján illesztettük meg az adatokat (folytonos vonal): G_H^0 = - 910 meV, pK_1 = 5.0, pK_1' = 5.75, pK_2 = 9.1, pK_2' = 9.5. A mérési feltételek ugyanazok, mint a 4.38. ábra B (b- d) és D panelén. A^* és cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ közötti szabadenergia, a DL integrált értékének logaritmusából számított ΔG^0 különbség külső pH- tól való függése (□, jobboldali függőleges tengely). A feltételek azonosak a **4.38.** ábraán, az A (c) és C (a) paneleken.

A ΔG^0 értékek a 4.39. ábra láthatók, a külső pH függvényében, mert a sejten belüli pH- t nem tudtuk mérni. A belső és a külső pH eltérhet egymástól a sejtmembrán H^+ permeabilitásától és a sejten belüli puffer kapacitástól függően. Míg a cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ → cit $c_2^{2+}PQ_A$ töltés rekombinációból származó DL intenzitása teljesen pH független, a $P^+Q_A^-$ → PQ_A töltés rekombinációból származó DL intenzitása csekély pH függést mutat a savas és lúgos tartományokban. A kapott G^0 (pH) értékek formálisan két Henderson- Hasselbalch görbe összegével közelíthetők, ami kifejezi a RC fehérjén lévő protonálható csoportok kölcsönhatását a $P^+Q_A^-$ dipóllal:

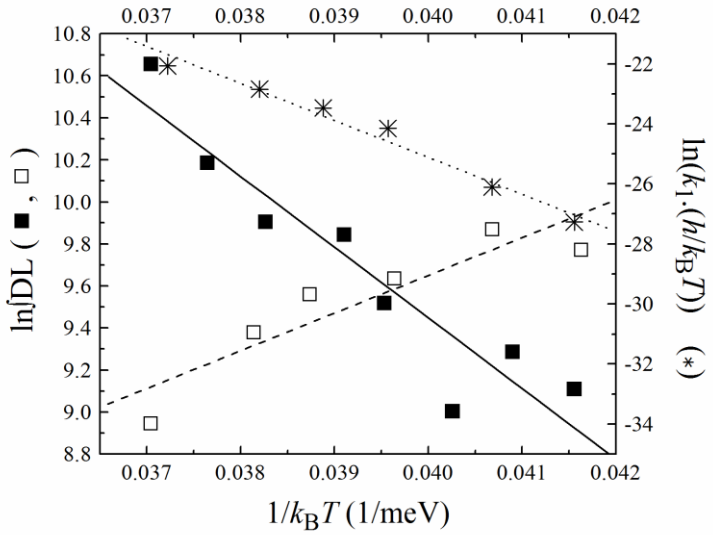
$$G^0(\mathrm{pH}) = G_\mathrm{H}^0 + k_\mathrm{B}T \cdot \sum_{\mathrm{i}=1}^{2} \ln \frac{1+10^{\mathrm{pH}-\mathrm{p}K_\mathrm{i}'}}{1+10^{\mathrm{pH}-\mathrm{p}K_\mathrm{i}}} \tag{4.32}$$

Ahol G_H^0 a szabadenergia nagyon alacsony pH- n (ahol minden protonálható csoport protonált) , pK_i' és pK_i az i-edik csoport pK- ja P- n és Q_A- n töltéssel vagy a nélkül.

Az entalpiaváltozás és az entrópikus tag meghatározása is hozzátartozik a töltés rekombináció teljes termodinamikai leírásához. Az entalpiaváltozás t az integrált DL logaritmusának inverz hőmérsékletfüggésére illesztett egyenes meredekségéből lehet meghatározni (van't Hoff ábrázolás, 4.40. ábra). A $P^+Q_A^-$ redox állapotból származó DL esetében a meredekség negatív és az entalpiaváltozás ΔH^0 = 340 meV, pH 7.8 –on. Meglepődésünkre a cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ redox állapot által meghatározott van't Hoff ábrázoláson pozitív meredekségű egyenest kaptunk, amiből ΔH^0 = -180 meV- nak adódott! A prekurzor eltűnésének fő útja itt az oxidált cit c_2 visszaredukálása a cit bc_1 komplex által, megmértük ennek folyatnak k_1 sebességállandójának hőmérséklet függését és az Eyring egyenlet szerint analizáltuk:

$$k_1 = \kappa \cdot \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right) \tag{4.33}$$

Itt κ transzmissziós együttható, h a Planck állandó és ΔG^* az aktivációs szabadenergia: $\Delta G^* = \Delta H^* - T \cdot \Delta S^*$, ahol ΔH^* és $\cdot \Delta S^*$ az aktivációs entalpia és entrópia. Mivel κ ismeretlen (általában 1- nek veszik), a meghatározást ΔH^* -ra korlátozzuk. Az Eyring ábrázolás negatív meredekségű egyenest ad, amiből ΔH^* = 1200 meV.



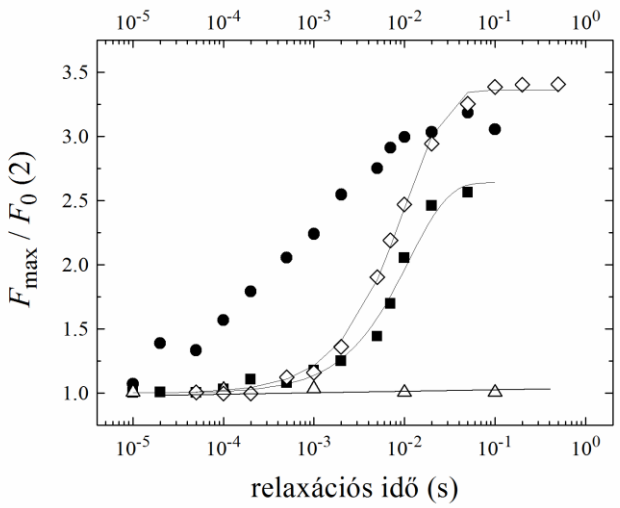
4.40. ábra A két különböző prekurzortól származó integrált DL hőmérséklet fügése, $P^+Q_A^-$ (■) és cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ (□) (van't Hoff ábrázolás, baloldali függőleges tengely). A cit c_2^{3+} visszaredukálás sebességének hőmérsékletfüggése (∗) (Eyring ábrázolás, jobboldali függőleges tengely). Mérési körülmények: 120 µM terbutrin és 2 mM K- ferricianid, ΔH^0 = 340 meV (■), 120 µM terbutrin, ΔH^0 = -180 meV (□) és ΔH^0 = 1200 meV (∗).

A DL a RC- ban lévő töltéspároktól származik, így minél nagyobb a dipólok koncentrációja, annál nagyobb a DL intenzitása. Ha a töltések elvándorolnak a donor vagy akceptor oldal felé,

a DL prekurzor állapota eltűnik. Így a DL a töltések RC- ból való elszállítását méri. Újabb oldalról közelíthetünk a problémához, ha megnézzük a BChl prompt fluoreszcenciájának relaxációját F_{max}- ról F_0 szintre telítési Nd: YAG lézer flash, vagy lézer dióda gerjesztés után (4.41. ábra). A fotoelektronsokszorozót elektronikusan kapuztuk, hogy védjük a gerjesztés alatti intenzív BChl fluoreszcenciától. A zárt RC ($P^+Q_A^-$) kinyitása összetett kinetikát mutat, ami érzékeny a gerjesztő flash hosszára, a RC redox állapotára és inhibítorokra. A legegyszerűbb modellben a töltéseket elszállító reakciók egyszerűek, a donor és akceptor oldalról történő elszállítás sebességállandói k_D és k_A, a kinyitás kinetikája analitikusan kiszámítható:

$$[\mathrm{PQ}](t) = 1 + \exp(-(k_\mathrm{A} + k_\mathrm{D}) \cdot t) - \exp\big(-(k_\mathrm{A}\mathrm{t}) + \exp(-k_\mathrm{D} t)\big) \qquad (4.34)$$

Ha a kinyitás kinetikája meredek, a (4.34) egyenlet jó közelítéssel ad ésszerű kA és kD sebességállandókat. A (4.34) egyenlet akkor is hasznos, ha az egyik oldalon blokkolt az elszállítás. A terbutrin blokkolja az elektrontranszportot a RC akceptor oldalán (kA<< kD), a (4.34) egyenlet szerint a RC zárva marad t << 1/kA időintervallumban, ami egyezik a kísérleti eredménnyel (4.41. ábra). Azonban, a kinetikák időben elnyújtottak, több nagyságrendet ölelnek fel, így a töltések elszállításának kinetikáját monoexponenciálisnak feltételezni nem helytálló.



4.41. ábra A fluoreszcencia helyreállásának kinetikája flash gerjesztés után, különböző körülmények közt. Az első flash, legyen az nagyon rövid (Nd: YAG lézer, 5 ns, ●,■) vagy hosszabb (lézer dióda, 1 ms, ◊,Δ), a sejtek fluoreszcenciáját a kezdeti F_0 szintről F_{max} szintig emeli. Az első flash után egy második (lézer dióda) flash- t adunk időben eltolva az elsőhöz képest, hogy letapogassuk a fluoreszcencia indukció kezdeti fluoreszcencia szintjét (F_0(2)). Az 5. egyenletet használtuk az adatok illesztéséhez (■, ◊, folytonos vonalak): k_D = 88 s^{-1}, k_A = 6.3·10^4 s^{-1} (■) és k_D = 1.6·10^3 s^{-1}, k_A = 88 s^{-1}

(◊). Mérési körülmények: Az első flash Nd: YAG lézer és az aktuális redoxpotenciál a külső oldatban 54 mV (●) és 390 mV (■); mindkét flash lézer diódától származik, kezeletlen sejtek (◊), + 120 µM terbutrin (Δ).

A DL az antenna bakterioklorofillok termális repopulációjából származik a $P^+Q_A^-$ vagy a cyt $c_2^{3+}PQ_A^-$ prekurzor állapotból P^* -on keresztül, a visszafelé irányuló reakciókat kísérő entalpiaváltozást van't Hoff ábrázolást használva határoztuk meg (4.40. ábra). ΔH_{A*Q} = 340 meV (pH 7.8) a $P^+Q_A^- \leftrightarrow A^*$ folyamatra, ami jelentősen kisebb az izolált RC- on mért értéknél (840 meV, Turzó és mtsi., 2000). A szabadenergia változása egész sejtekben ΔG^0_{A*Q} = 870 meV, így az entrópiaváltozás ($-T\cdot\Delta S^0$ = 530 meV) hozzájárulása nagyobb, mint az entalpiaváltozásé, szobahőmérsékleten. Míg a P^* $P^+Q_A^-$ - ból történő repopulációja izolált RC- ban entalpiaváltozás által hajtott, addig egész sejtekben az entropikus tag jelentősebbé (de nem dominánssá) válik. Hasonlóan, a gerjesztési energia entrópiája növekszik a RC- ból az antennába szökéskor, az entrópia növekedése a töltésszétválasztásban/ rekombinációban jelentősebbé válik egész sejtekben, mint izolált RC- okban. A cyt $c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow$ cyt $c_2^{2+}PQ_A$ átmenet entalpiaváltozásának meghatározása a megfigyelt DL- ből nem olyan egyszerű, mint a $P^+Q_A^- \leftrightarrow PQ_A$ reakciónál. A nehézséget a prekurzor élettartamának hőmérsékletfüggése okozza: a (4.30) egyenletben nem csak a Boltzmann tag, hanem k_D (= k_1+ k_{r2}) is hőmérsékletfüggő. (A $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció (k_D = k_{r1}) hőmérsékletfüggése nagyon enyhe, az elektronátadás alagút effektussal történő mivolta miatt). Ezt egyértelműen demonstrálja a cyt c_2^{3+} vissza-redukció sebességállandójának meredek hőmérsékletfüggése. Magasabb hőmérsékleten P* repopulációja növekszik a Boltzmann tag miatt, de csökken a prekurzor rövidebb élettartamának köszönhetően. A két ellentétes hatást figyelembe véve, 1020 meV entalpiaváltozás becsülhető a cyt $c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow$ cyt $c_2^{2+}PQ_A$ reakcióra, ami jelentősen eltér a másik, $P^+Q_A^- \leftrightarrow PQ_A$ töltésszétválasztás/ töltésrekombináció reakcióétól.

A szabadenergia rés gyenge pH függése

A^* (vagy P^*) és $P^+Q_A^-$ közti szabadenergia rés csak enyhe pH függést mutatott egész sejtekben (4.39. ábra). Ezzel a megfigyeléssel egyezően, gyenge pH függést találtak DL mérés alapján meghatározott $P^+Q_A^-$ szabadenergia szintjében kromatofórákban (Marói és Wraight, 2008) és RC- ban (Turzó és mtsi., 2000; McPherson és mtsi., 1990). Ez a megfigyelé éles ellentétben van a korábbi, különböző baktériumtörzsek kromatofóra membránjain mért egyensúlyi redox potenciometria eredményeivel (Parson, 1978; Prince és Dutton, 1978; Prince, 1978). A Q_A/Q_A^- középponti redoxpotenciálja *Rba. sphaeroides*ben erős pH függést mutatott -60 mV/ pH egység meredekséggel, egészen pK_a'= 9.8- ig, ami azt jelzi, hogy az elsődleges

kinon redukciója protononként egy elektron felvételével járt (Prince és Dutton, 1976, 1978). A DL méréseket mi intakt *Rba. sphaeroides* sejteken végeztük, ez támogatja azt a nézetet, hogy a Q_A potenciometrikus redox titrálásokból kapott középponti potenciáljának erős pH függése egy műtermék, a Q pool-al a Q_B-n keresztüli redox kiegyenlítődésből származik, mint ahogy már korábban is felvetették (Marói és Wraight, 2008; Wraight, 2004).

Az A^* és $P^+Q_A^-$ közötti szabadenergia rés kicsi, de határozott pH függése a kinon kötőhely körüli flash indukált protonációs lépésekre utal. A kinonnal kölcsönható protonálható aminosavak talán a töltésszétválasztásra ($P^+Q_A^-$) reagálva (Bohr) protonokat vesznek föl és hozzájárulnak a töltéspár energetikai stabilizációjához (Maróti és Wraight, 1988). Elvileg ez megmagyarázza a megfigyelésünket, miszerint nagyobb a szabadenergia rés a savas, mint a lúgos pH tartományban. Miután az szabadenergia rés enyhe pH függését formálisan ((4.32) egyenlet) illesztettük két Henderson- Hasselbalch típusú görbe összegével nagyon kis p*K* eltolódást kaptunk a savas ($pK_1' - pK_1 = 0.75$) és bázikus ($pK_2' - pK_2 = 0.4$) csoportokra, ami jelzi, hogy a protonálható csoportok gyenge kölcsönhatásban állnak a Q_A- n és P- n lévő flash indukált töltésekkel. A cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ ↔ cit $c_2^{2+}PQ_A$ reakció szabadenergia rés teljesen pH független mivoltát figyeltük meg, ami P^+ részvételére utal. A korábbi munkák eltérő eredményeket és tendenciákat mutatnak. A DL intenzitás egyszerű pH függését mutatta ki *Rhodopseudomonas viridis* kromatofórán Carithers és Parson (1975). Ellentétes eredményt publikált *Rba. sphaeroides* kromatofórát használva Arata és Nishimura (1983), valószínűleg a DL különböző kinetikai komponenseinek nem megfelelő feloldása miatt. Újabb tanulmányok a sokrétű savas aminosav oldalláncok együttes viselkedése mellett érvelnek, ami erősen antikooperatív protonációt eredményez (Cheap és mtsi., 2007). A RC citoplazmikus oldalán elterül egy interaktív proton csoport (proton szivacs) és talán ez a hosszú távú kölcsönhatás magyarázza a RC töltésszétválasztott állapotában megfigyelt proton felvétel pH függését (Pilotelle-Bunner és mtsi., 2009).

A töltések RC- ból való elszállításának kinetikai korlátai

A késleltetett és prompt fluoreszcencia közti kapcsolat nem csak a prekurzorok szabadenergia szintjeinek, hanem a RC- ból való töltés elszállítások kinetikájának meghatározására is alkalmas. A két módszerrel különböző szemszögből, de átfogó képet kaphatunk a töltés szállításról. Mindkettő egy töltés dipól jelenléte miatt keletkezik, majd eltűnik, miközben a dipól elveszik. Míg a prompt fluoreszcencia szintje alacsony nyitott (PQ_A) és magas zárt ($P^+Q_A^-$) RC- ok jelenlétében, a DL intenzitása nagy a rövid dipólok és kisebb a hosszabb

dipólok esetében. Ezeket az egyszerű tulajdonságokat felhasználva érthetjük meg a flash hossz, valamint a kémiai és elektrokémiai módosításokkal kapott eredményeinket.

Mivel a cit c_2 P^+ általi oxidációja gyors a kezeletlen sejtekben (10^4- 10^5 s^{-1}, Maróti és Wraight, 1988), a RC újranyitásának sebességét elsősorban az akceptor oldal befolyásolja 4.41. ábra). A megfigyelt kiterjedt relaxáció jelzi, hogy a Q_A^- visszaoxidálása több lépésben történik, ami a Q_B kötő hely részleges betöltöttségéből (félig (Q^-) vagy akár teljesen redukált (QH_2) kinonnal) származhat. Hasonló, több fázisos fluoreszcencia lecsengésről számoltak be zöld növények II. fotokémiai rendszerén (Kolber és mtsi., 1998) és fotoszintetikus baktériumokon (Koblizek, 2005). Az összetett kinetika a szuperkomplex szerkezetének lenyomata lehet. Nemrég igazolták, hogy Q_A^- gyors oxidációjához, anaerob környezetben szükség van az elektrontranszport komponesek szuperkomplexbe rendeződésére (Joliot és mtsi., 2005). Továbbá, a módosult redox egyensúly miatt, ami a redukált elemek felé tolódott, a szuperkomplexben lévő kölcsönhatások elfedhetik a kinon akceptor oldal klasszikus kételektronos kapuját.

A ferricianid magas redoxpotenciált és az összetevők redoxpotenciáljának egyszerűbb eloszlását biztosítja. A fluoreszcencia relaxáció összetett kinetikája leegyszerűsödik. A ferricianid lelassítja donor oldali reakciót: cit $c_2^{2+}P^+ \rightarrow$ cit $c_2^{3+}P$, k_D = 88 s^{-1}- re a cit c_2^{2+} oxidálásával, de az akceptor oldali reakciót gyorsnak hagyja: $k_A = 6.3 \cdot 10^4$ s^{-1} a redukált kinonok oxidálása miatt.

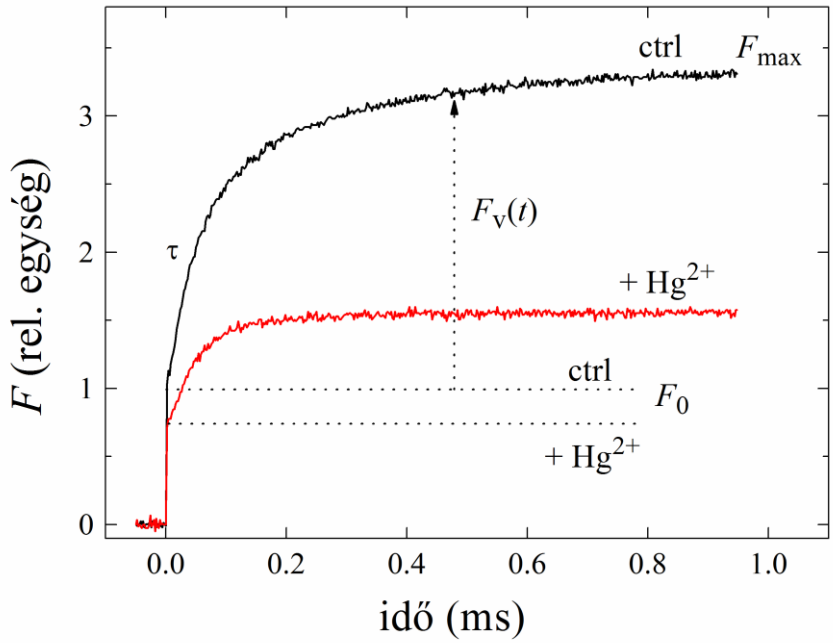
Hasonlóan nagy változások tapasztalhatók, amikor a lézer gerjesztés időtartamát 5 ns- ról 1 ms- ra növeljük. Az 1 ms- os gerjesztés alatt a RC- ok többször átfordulnak (körülbelül 5-10 szer), ahogy a fluoreszcencia indukciós görbe félemelkedési idejéből látjuk. Ilyen körülmények között, az akceptor oldalon felgyülemlenek a redukált összetevők és viszonylag lassú elszállítást kapunk: k_A = 95 s^{-1}. Az elektrontranszport szűk keresztmetszete a diffúzió által korlátozot Q/QH_2 kicserélődés a Q_B kötőhely és a Q_{pool} között. A donor oldali reakcióra is hatással van (lelassítja) a töltések felhalmozódása és a diffúzió által irányított cit $c_2^{3+} \rightarrow$ cit bc_1 reakció lehet a korlátozó (4.38. ábra, C). A sebességállandó nagyobb lett, mint az akceptor oldalé: $k_D = 1.6 \cdot 10^6$ s^{-1}.

Összegzés

A késleltetett fluoreszcencia prompt fluoreszcenciával és abszorpcióváltozás méréssel kombinálva lehetőséget nyújt két egymással versengő elsődleges reakció termodimaikai és kinetikai meghatározására: töltésszétválasztás a RC- ban és elektron áramlás a RC- ból. Ezeket a folyamatokat nem membránfrakcióban vagy izolált RC fehérjéken vizsgáltuk, hanem

élő baktériumtenyészetekben. A DL két prekurzor állapotát azonosítottuk (cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ és $P^+Q_A^-$), melyek élettartamát a cit bc_1 komplex (cit c_2^{3+} → cit c_2^{2+}) és a töltésrekombináció ($P^+Q_A^-$ → PQ_A) határozza meg. Ezek a visszafelé irányuló reakciók a fényenergia hasznosítás szempontjából veszteséget jelentenek, mértéküket redox anyagok, gátlószerek alkalmazásával és a megvilágítás hosszának megválasztásával szabályozzuk. Az eredmények alapját képezhetik egy a fotoszintetikus baktériumok fényhasznosítását figyelő biomonitoring rendszer építésének.

4.5 Hg^{2+} hatása *Rba. sphaeroides* sejtekre



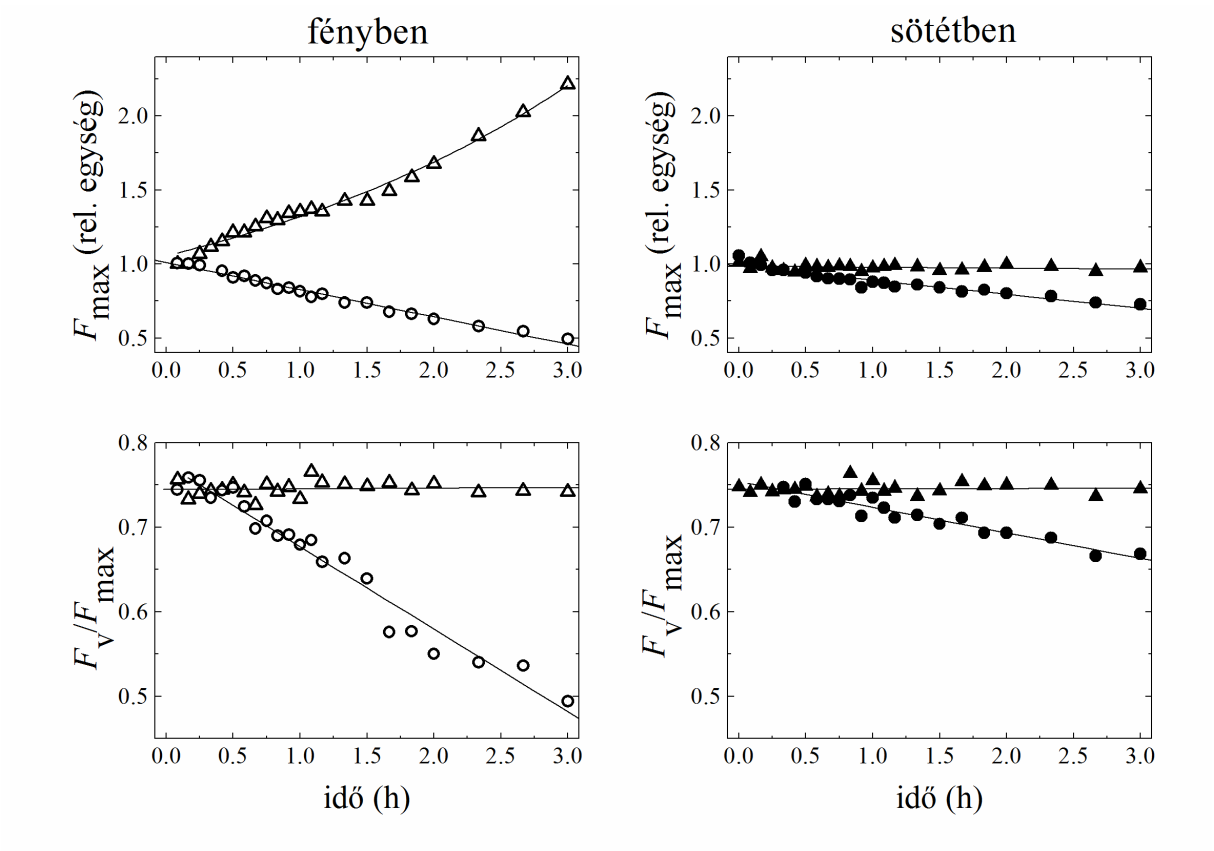
4.42. ábra Hg^{2+} hatása *Rba. sphaeroides* 2.4.1 baktériumsejtek fluoreszcencia indukciójára. Fluoreszcencia indukció fényen tartott, kezeletlen (ctrl) és 2 órás higanykezelésnek kitett sejteken (+Hg^{2+}).

A 4.42. ábrán látható egy tipikus fluoreszcencia indukciós görbe (ctrl). Jól elkülöníthető rajta két rész: egy éles emelkedés, ami a konstans vagy sötét fluoreszcenciát mutatja (F_0), majd egy lassabban emelkedő fázis, az időben változó fluoreszcencia (F_v) következik. A két fázis összege adja a teljes (maximum) fluoreszcenciát az emelkedés végén ($F_{max} = F_0 + F_v$). Az F_0, kezdeti szint azoknak az antenna bakterioklorofilloknak (vagy más pigment molekuláknak) a prompt emissziójából származik, amelyek gerjesztett állapotát nem konvertálja töltésszétválasztott állapotba egy reakció centrum. Ezek a bakterioklorofillok energetikailag

nem csatoltak a fénybegyűjtő rendszerhez, így nem kapcsolódnak reakció centrumhoz. Másrészről F_v, a változó rész a csatolt antenna molekuláktól származik, így az F_{max}/F_0 arány megmutatja, hogy mennyire hatékonyan csapdázza az elnyelt fotonokat a fotokémia (Bina és mtsi. 2009, Trissl 1996). Az indukció felemelkedési ideje F_0-ból F_{max}-ba az antenna abszorpciós hatáskeresztmetszetével és a reakciócentrum körüli elektrontranszfer reakciókkal függ össze (Asztalos és Maróti 2009, Koblízek és mtsi. 2005). A fluoreszcencia indukción nagy változásokat figyelhetünk meg Hg^{2+} hatására: F_{max} és F_0 is csökken, a görbe gyorsabban éri el a maximumot (4.42. ábra). A Hg^{2+} hozzáadása után nagyon rövid időn belül megfigyelhető az indukciós görbe félemelkedési idejének csökkenése, a 4.44. ábra látható, hogy ez a prompt hatás 20 s-os félidővel lezajlik. Az F_{max}, F_0 és F_v csökkenése hosszabb időskálán alakul ki, mértékét befolyásolja a tenyészet kora, valamint hogy fényben vagy sötétben tartjuk-e a tenyészetet (4.43. ábra és 4.45. ábra).

A maximum és a változó fluoreszcencia érzékeny indikátora a higany jelenlétének a sejtekben.

A magas higany koncentráció gátolja a fotoszintetikus növekedést. Hogy lássuk, a maximum (F_{max}) és a változó (F_v/F_{max}) fluoreszcencia szintje megbízható és érzékeny indikátora-e ennek a káros hatásnak, a növekedés korai exponenciális fázisában lévő sejteket higannyal kezeltünk. A higany kezelt és a kezeletlen (kontrol) mintát kétfelé osztottuk, az egyik pár maradt fényen, a másikat sötétbe helyeztük. A fluoreszcencia indukció mérését 3 perccel a higanykezelés után kezdtük. Az eredményeket a 4.43. ábra összegzi.

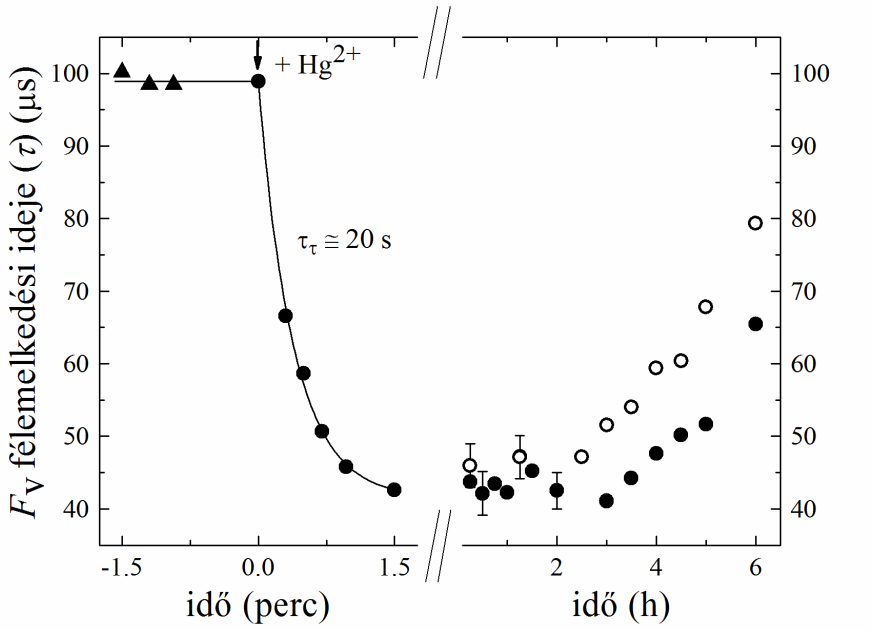


4.43. ábra Változások a maximum (F_{max}) és a változó fluoreszcenciában (F_v) *Rba. sphaeroides* 2.4.1. korai exponenciális fázisban lévő tenyészeteiben 26 µM Hg^{2+} hatása. ▲ kezeletlen, ● Hg^{2+} kezelt tenyészet, üres szimbólumok: fényben tartott, kitöltött szimbólumok: sötétben tartott tenyészet.

A kontrol tenyészet fotoszintetikusan növekedhetett, így F_{max} növekedése a sejtszám növekedésével függ össze, míg a Hg^{2+} kezelt minta ellentétes irányt mutat, F_{max} meredeken csökken. F_v/F_{max} állandó marad a kontrol tenyészetnél, a sejtek fotoszintetikus apparátusának változatlan fotonhasznosítását mutatva, a Hg^{2+} kezelt mintánál ez is csökken.

A sötétben tartott sejtek nem tudnak fotoszintetikusan növekedni, így a kontrol minta F_{max} értéke állandó, mert nem képződött több fotoszintetikus pigment, F_v/F_{max} is állandó, mert a fotoszintetikus apparátus hatáskeresztmetszete változatlan maradt a kísérlet ideje alatt. Ráadásul a két paraméter csökkenése a sötétben tartott Hg kezelt mintában sokkal kisebb mértékű, mint a fényen tartottban. A higany erősebb gátló hatást fejt ki növekvő tenyészetekben.

A változó fluoreszcencia félemelkedési ideje és a Hg^{2+}-kezelés

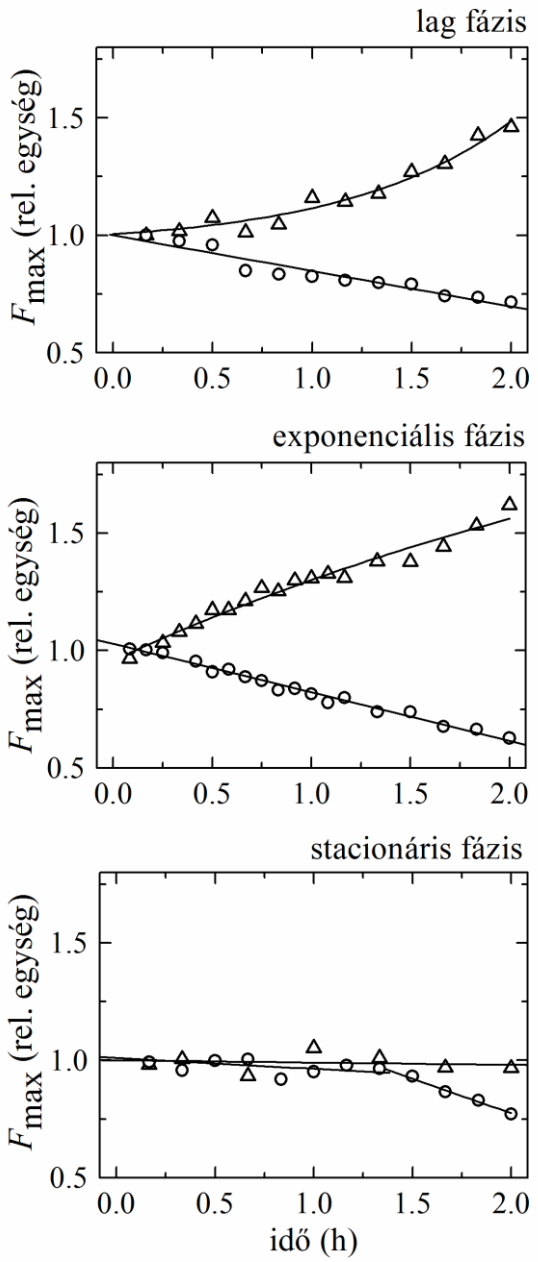


4.44. ábra A változó fluoreszcencia félemelkedési idejének változása 26 µM Hg^{2+} hatására *Rba. sphaeroides* 2.4.1. stacioner fázisban lévő sejttenyészetben. A higany hozzáadása sötétben történt (nyíl). A gyors esést (bal oldal) lassú és részleges emelkedés követ sötétben (●) vagy fényben (○) (jobb oldal).

Rba. sphaeroides 2.4.1 sejtek változó fluoreszcenciájának félemelkedési idejében történő azonnali és másodlagos változást mutatja be a 4.44. ábra. Fotoszintetikusan növekvő sejteket sötétadaptáció után higannyal kezeltünk (a nyíl mutatja), majd sötétben tartottuk. Ahogy a 4.42. ábra látható, F_{max} csökken és a változó fluoreszcencia fokozatosan elhanyagolhatóvá válik higany kezelés hatására. F_v csökkenése mellett a félemelkedési ideje is csökken, ami körülbelül 20 másodperces félidővel lezajlik és két perc után áll be egy állandó értékre (4.44. ábra, bal oldal). Ez a jelenség talán a higany fotoszintetikus apparátusra gyakorolt azonnali hatását tükrözi. Sokkal hosszabb időskálán (órák), F_v átlagos félemelkedési ideje újra növekszik, valószínűleg a higany másodlagos hatásai miatt (4.44. ábra, jobb oldal). Ez a hosszabb időskálán megfigyelhető viselkedés felgyorsul, ha a higany kezelt mintát fényben tatjuk.

A növekedés különböző fázisaiban lévő sejtek kezelése higannyal

A 4.45. ábrán a növekedési görbe különböző szakaszaiban lévő tenyészeteket kezeltünk higannyal, majd követtük a fluoreszcencia indukcióban bekövetkező változásokat.

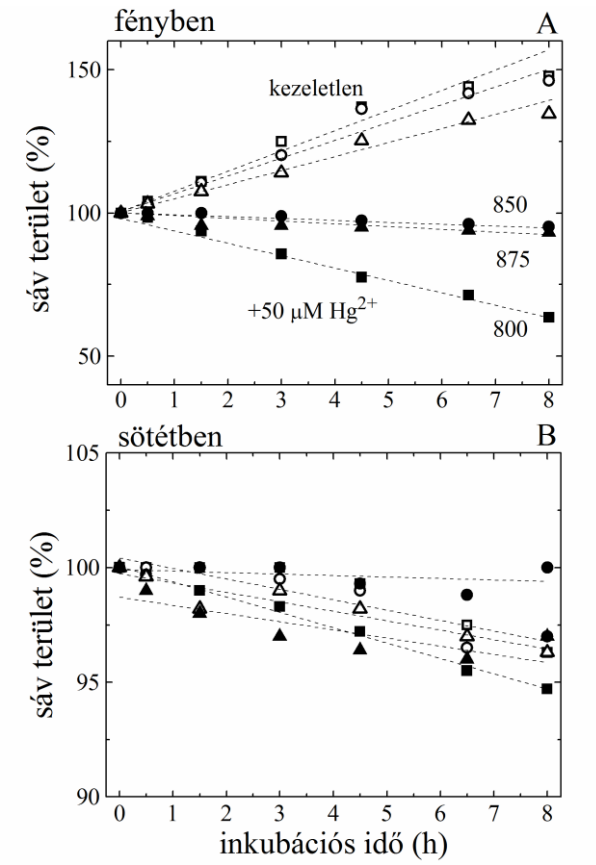


4.45. ábra Hg^{2+} hatása *Rba. sphaeroides* 2.4.1. különböző korú tenyészeteinek fluoreszcencia maximumára. Δ: kezeletlen tenyészet, ○: +26 μM Hg^{2+}(a t=0 pillanatban). Az F_{max} értékek a kiindulási értékre normáltak.

A baktériumok higany érzékenysége függ a sejtek korától. A lag vagy exponenciális fázisban lévő sejtek nagyon sérülékenyek, a higanykezelés nagy esést okoz F_{max} szintjében 1-2 óra alatt (4.45. ábra fölső és középső panel). Ellenben az idősebb sejtek a késő stacioner fázisban sokkal ellenállóbbnak tűnnek a higannyal szemben, ugyanabban az időtartományban nem sokkal térnek el a kezeletlen sejtektől (4.45. ábra, alsó panel).

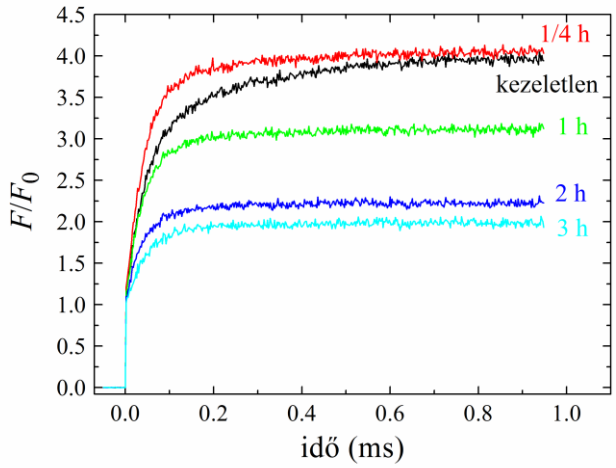
A Hg^{2+} kezelés a fluoreszcencia indukció paramétereire gyakorolt hatását kiegészítendő, további steady-state és kinetikai módszerekkel vizsgáltuk a külsőleg hozzáadott higanyionok *Rba. sphaeroides* sejtek fotoszintetikus apparátusára kifejtett hatását.

A baktériumsejtek steady-state abszorpciós spektrumának vörös vége három fő csúcsot tartalmaz: 800 és 850 nm középpontokkal a perifériás antenna bakterioklorofill- fehérje komplexeit tükrözi, a 875 nm-es csúcsot a core-komplex (RC + LH1) bakterioklorofilljai adják. A pigmentek oszcillátor erőssége az abszorpciós sávjuk nagyságával jellemezhető. Higanykezelés alatt, hosszabb időskálán a sávok területének csökkenése figyelhető meg (4.46. ábra), a középponti hullámhossz számottevő eltolódása nélkül. A fényen tartott, Hg^{2+} kezelt és kezeletlen tenyészetek sáv területei közötti látványos különbség (> 50 %, 8 óra inkubáció után, 4.46. ábra, A) oka, hogy a kezeletlen tenyészetben a sejtek növekedtek, míg higannyal nem. Az oszcillátor erősség csökkenése nem egyenletes: a 800 nm-es sáv nagyobb csökkenést szenved el, mint a másik kettő. A higanykezelés alatti megvilágítás gyorsítja a higany általi roncsolást, de a változások iránya azonos a sötétben megfigyelhetőkkel.



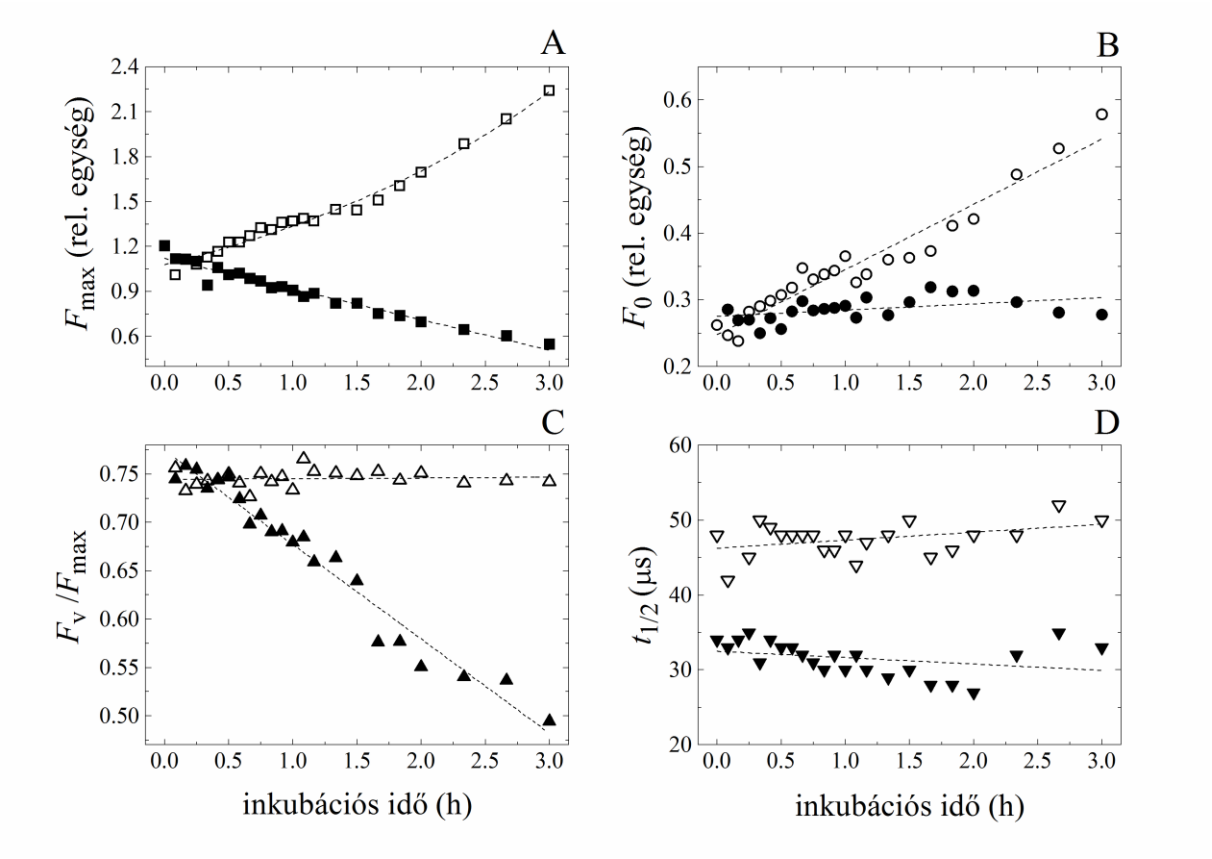
4.46. ábra *Rba. sphaeroides* 2.4.1. sejtek abszorpciós sávjainak változása 50 μM Hg^{2+} jelenlétében, fényen (A) és sötétben (B) tartott tenyészetekben. A spektrumok vörös részét három Lorencz komponensre bontottuk fel, 800, 850 és 875 nm-es csúcsokkal. □ kezeletlen B800, ■ + Hg^{2+} B800, ○ kezeletlen B850, ● + Hg^{2+} B850, Δ kezeletlen B875, ▲ + Hg^{2+} B875. A B800 csökken a legjobban Hg^{2+} hatására, fényen.

A bakterioklorofill fluoreszcencia indukció a milliszekundumos időtartományban azokat a fotofizikai folyamatokat tükrözi, amik során a nyitott RC a gerjesztési energia elnyelésének hatására bezáródik (4.47. ábra). Három paramétert határozhatunk meg: a fluoreszcencia kezdeti (F_0) és maximum szintjét (F_{max}), valamint a félemelkedési időt ($t_{1/2}$). (A fluoreszcencia növekedése összetett kinetikát mutat, így a félemelkedési idő bevezetése nem igényli a görbe modell- függő felbontását).



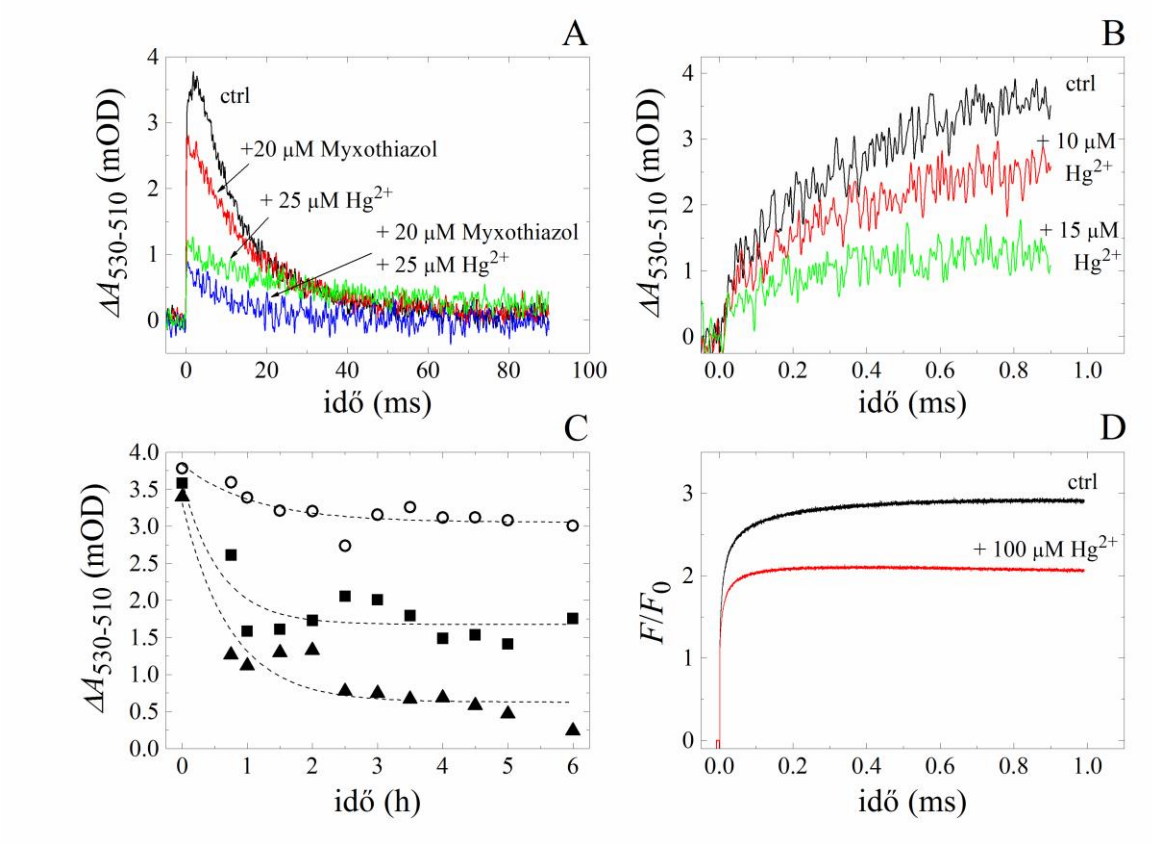
4.47. ábra Fényben tartott sejtek fluoreszcencia indukció kinetikájában bekövetkező változások 26 μM Hg^{2+} jelenlétében, különböző hosszúságú inkubációs után. A fluoreszcenciát téglalap alakú lézer dióda gerjesztés (2W, 808 nm) alatt mértük. Az aktuális fluoreszcencia intenzitás (F) a kezdeti fluoreszcenciához (F_0) viszonyított.

A 4.48. ábrán látható a higanykezelés hatása a fényben tartott tenyészet fluoreszcencia paramétereire. A kezeletlen tenyészetben F_0 és F_{max} emelkedése a sejtosztódásnak köszönhető. A higanykezelt tenyészetekben általános tendencia az F_{max} csökkenése, míg az F_0 nem mutat lényeges változást a kísérlet alatt. A változó fluoreszcencia (F_v= F_{max}- F_0) aránya a maximum fluoreszcenciához képest (F_v/F_{max}) általánosan elfogadott nézet szerint a baktérium fotoszintetikus kapacitásának mértékét jelenti. Nagy esést mutat (0.75- ről 0.5- re) 3 órás kezelés alatt (4.48. ábra, C). A félemelkedési idő ($t_{1/2}$) nem mutat jelentős változást a kezelés alatt, azonban már a Hg^{2+} hozzáadásakor lecsökken (4.44. ábra bal oldala, 4.48. ábra, D).



4.48. ábra A fluoreszcencia indukció paramétereiben történő változás kezeletlen (üres szimbólumok) és 26 µM Hg^{2+} (kitöltött szimbólumok) jelenlétében. A higany hozzáadása azonnal blokkolja sejtosztódást, csökkenti F_{max} (A), F_v/F_{max} (C) és $t_{1/2}$ (D) értékét, F_0-t állandó szinten tartja (B).

A fluoreszcencia indukciót kiegészítő módszer a vele párhuzamosan mért abszorpcióváltozás. A karotenoidok 530 -510 nm-nél mérhető elektrokróm válasza kiváló indikátora a fotoszintetikus membránok energetizációjának, egyszeri (4.49. ábra, A) vagy többszöri (4.49. ábra, B) RC átfordulás után, nem csak algák (Bailleul és mtsi. 2010), hanem baktériumok esetében is.

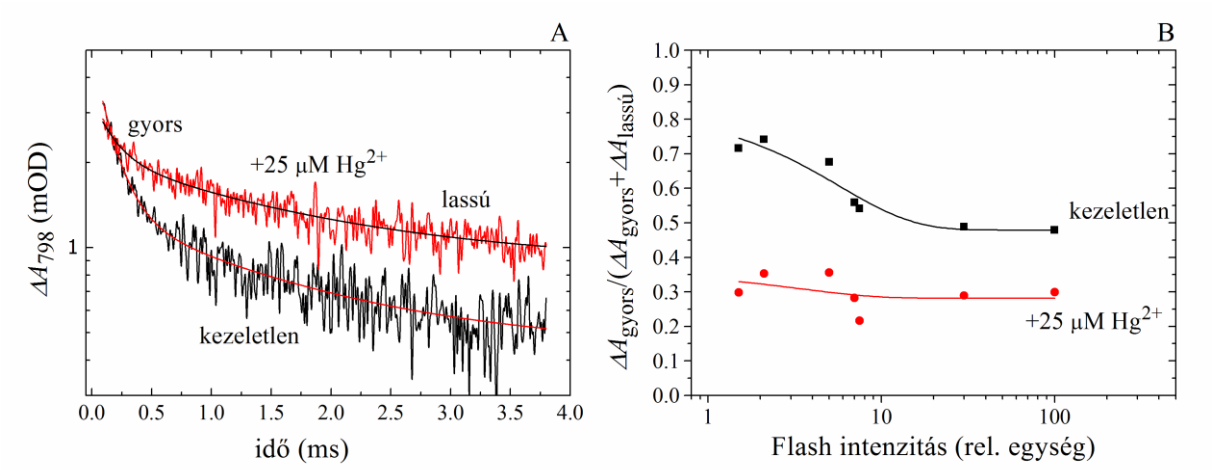


4.49. ábra Karotenoid elektrokróm válasz 530 nm-nél mért (versus 510 nm) abszorpcióváltozás alapján, egyszeri telítési flash után (A) és folyamatos lézerdióda gerjesztés alatt (B), higanykezeléssel (1 óra inkubáció) és *cit* bc_1 gátlóval (myxothiazol). Az összehasonlításhoz (B) ábrázoltuk a fluoreszcencia indukció is (D), nagy különbségek vannak a felemelkedésekben: az elektrokróm emelkedés telítődéséhez többszöri átfordulás szükséges. Az elektrokróm jel nagysága (B) érzékenyen függ a Hg^{2+} koncentrációtól és az inkubációs időtől (C).

Az elektrokróm jel emelkedése (4.49. ábra, B) sokkal lassabb, mint a fluoreszcencia indukcióé (4.49. ábra, D), azonos körülmények közt mérve, többszöri átfordulásokkal, bár tartalmaz egy kicsi, de gyors kezdeti emelkedést a RC-ok bezáródásának megfelelően. Az elektrokróm jelben tükröződik a membrán épségében és/vagy a ciklikus elektrontranszportban higanykezelés hatására keletkezett károsodás mértéke. A membrán energetizáció szintje nagyban függ a higany koncentrációtól, így érzékeny indikátora a higanyszennyezésnek (4.49. ábra, C). Még 5 μM Hg^{2+} is károsodást okoz, az elektrontranszfer blokkolásán keresztül gátolja a membrán feltöltődését. Az elektrokróm jel egyszeri telítési flash utáni lecsengését nem módosítja jelentősen a higanykezelés (4.49. ábra, A).

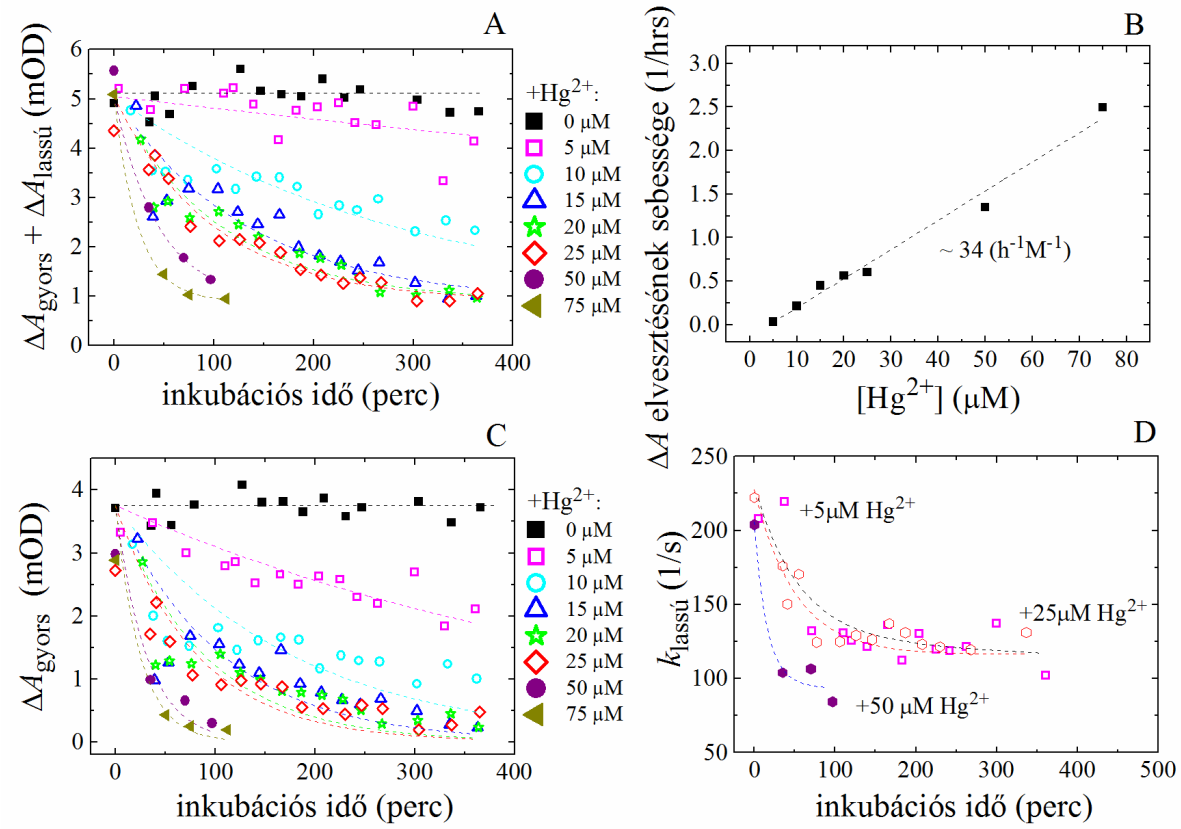
Az elektrontranszfer reakciók sebességében történő változások felderítéséhez abszorpció és fluoreszcencia flash eljárásokat alkalmaztunk. A dimer oxidációját és későbbi, citokróm (cit) c_2 általi újraredukálódását flash-indukált abszorpcióváltozással detektáljuk, 798 nm-en (4.50.

ábra). A visszaredukálódás gyors és lassú komponense a RC-hoz közeli (bekötődött) és egy távoli cit c_2-nek tulajdonítható. Leírtak egy további, nagyon gyors (10- 20 µs) P^+ általi cit c_2 oxidációt (Joliot és mtsi. 1989) amit egy, a RC proximális oldalához szorosan kötődő cit c_2-vel magyaráztak. Kémiailag oxidálva a cit c_2-t nem tapasztalunk növekedést a P^+ amplitúdóban (nem ábrázolt), ebből arra következtetünk, hogy az itt használt egész sejtekben ez a nagyon gyors fázis kis amplitúdójú, elhanyagolható. A higanykezelés hatására a P^+ redukció gyors komponense fokozatosan átalakul lassúvá, a lassú komponens pedig eltűnik (4.51. ábra). A P^+ amplitúdó csökkenését az inkubációs idő függvényében egy-egy higany koncentrációnál exponenciális függvényekkel illesztettük, az időállandókat ábrázolva a higany koncentráció függvényében, egyenest kapunk. Ez bizonyítja, hogy a tapasztalt P^+ veszteség csak a Hg^{2+} kezeléstől származik és 34 $h^{-1}M^{-1}$ bimolekuláris sebességállandó határozható meg. Gyenge flash-eket használva, a P^+ - redukált cit c_2 sztöhiometriai felesleg csökkenthető, ennek megfelelően a lassú komponens elnyomható (4.50. ábra, B). Ez a megfigyelés annak lehet a következménye, hogy megváltozott a komponensek aránya (van elég redukált cit c_2, ami redukálja a kevés P^+-t), vagy a fotoszintetikus apparátus szerveződésével hozható összefüggésbe, mint a RC-cit c_2 szuperkomplex (Lavergne és mtsi. 2009) vagy a heterogenitás (Crofts és mtsi. 1998). Amikor a sejteket higannyal kezeljük, a P^+ redukció gyors komponense kisebb lesz és független a flash intenzitásától. A higany csökkenti a P^+ felesleget a redukált cit c_2-höz képest, és talán van némi hatása a fehérjék strukturális elrendeződésére.



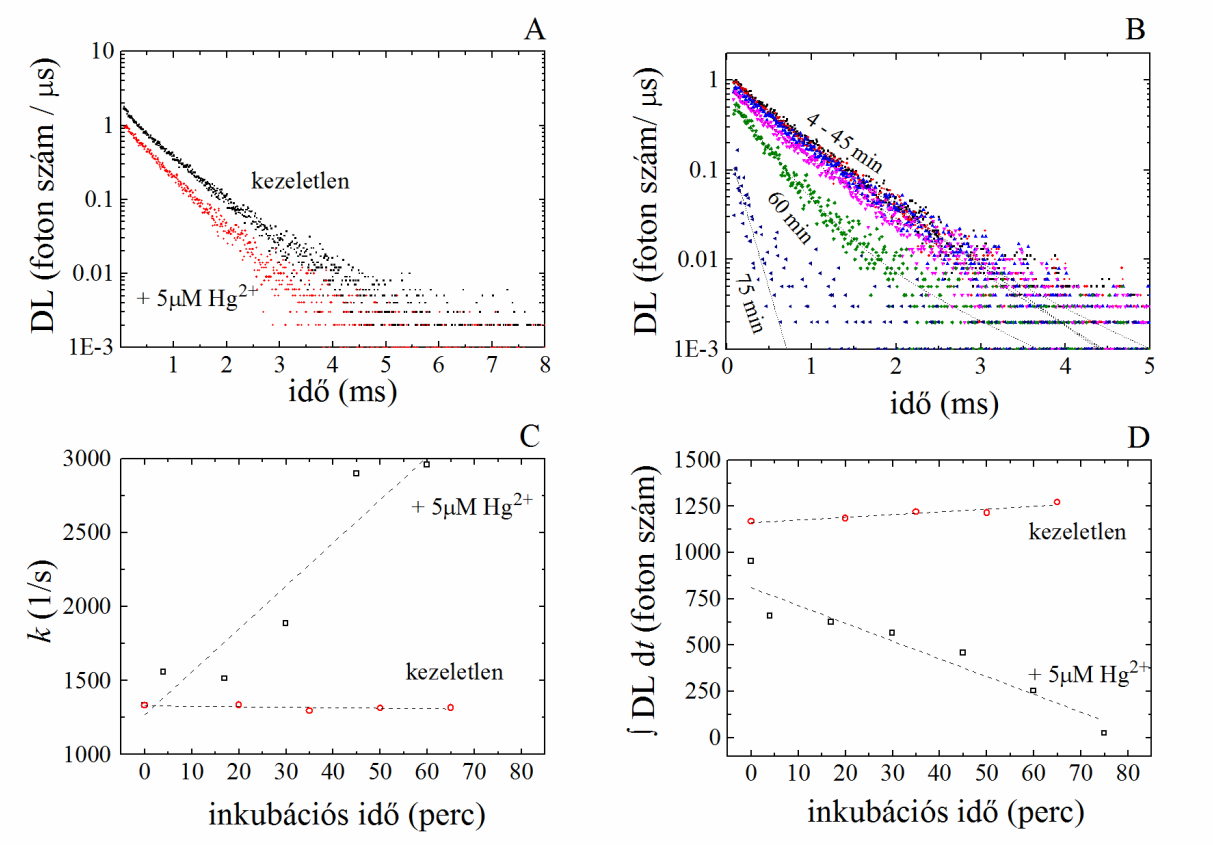
4.50. ábra A bakterioklorofill dimer (P) flash-indukált abszorpcióváltozása és visszaredukálódása *Rba. sphaeroides* sejtekben (A) és a P^+ visszaredukálódás gyors fázisának aránya szürke szűrőkkel leosztott Xe-flash gerjesztés után (B), higanykezelt (30 perc inkubáció) és kezeletlen tenyészeteken, 798 nm-en mérve. A görbéket gyors és lassú fázisokra bontottuk föl, a következő amplitúdókkal és sebességállandókkal: ΔA_{gyors}= 3.43 mOD, k_{gyors}= (200 µs)$^{-1}$, $\Delta A_{lassú}$= 1.1 mOD, $k_{lassú}$= (4.66 ms)$^{-1}$ a

kezeletlen sejtekre és ΔA_{gyors}= 1.71 mOD, k_{gyors}= (200 µs)$^{-1}$ $\Delta A_{lassú}$= 1.84 mOD, $k_{lassú}$= (5.68ms)$^{-1}$ a higanykezelt sejtekre. A higanykezelt sejteknél az amplitúdók aránya függetlenné válik a flash intenzitásától.



4.51. ábra Flash-indukált P^+ abszorpcióváltozás visszaredukciójának analízise higanykezelt sejteken, a Hg^{2+} koncentráció (5-75 µM) és az inkubációs idő (0-6 óra) függvényében. Az amplitúdó időbeli csökkenése különböző higany koncentrációkon (A). Az A panelen lévő görbék monoexponenciális illesztéseiből származó időállandók a higany koncentráció függvényében (B). A gyors komponens amplitúdójának csökkenése különböző higany koncentrációkon az inkubációs idő függvényében (C) meredekebb, mint a teljes amplitúdó (A). A lassú komponens időállandójának csökkenése különböző higany szinteken (D).

A RC bakterioklorofill dimer késleltetett fluoreszcenciája (DL) a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot szabadenergia szintjének és élettartamának meghatározására használható (Turzó és mtsi. 2000). A higany hozzáadása után az amplitúdó hirtelen csökkenése figyelhető meg, míg a kinetika nem módosul jelentősen (4.52. ábra). A higany prompt hatása nem oldható fel kinetikailag. Hosszabb időskálán (a higany késői hatásai) mind az amplitúdó, mind a lecsengés sebességállandója módosul. Az amplitúdó fokozatosan csökken, a lecsengés időállandója pedig növekszik.

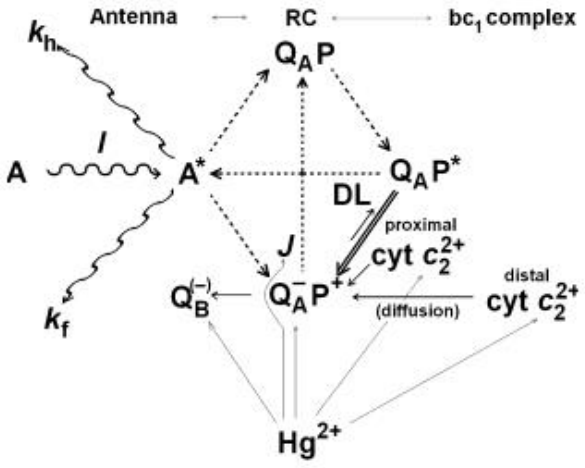


4.52. ábra Higany ionok hatása intakt sejtek flash-indukált késleltetett fluoreszcenciájára. 5 µM Hg^{2+} a DL azonnali csökkenését okozza (A). A higany késői hatása az amplitúdó további csökkenését okozza, emellett gyorsítja a lecsengést (B). Ez utóbbi látható az inkubációs idő függvényében a C panelen. Ez a két komponens határozza meg a DL görbe alatti területét, kombinált hatásuk a DL intenzitás inkubációs időtől való éles függésében mutatkozik meg (D).

Ezt a tendenciát jól demonstrálják a DL területének (intenzitásának) különböző reprezentációi (∫DL d*t* az inkubációs idő és ∫DL d*t* a Hg^{2+} koncentráció függvényében). A higany inkubáció hatására a DL kisebb és gyorsabb lesz, ez legalább két lépésben történik.

A higanyion által okozott jelenségeket az intakt baktériumokban lejátszódó ismert elsődleges folyamatok keretében tárgyaljuk meg. A fény elnyelését és fotokémiai hasznosítását *Rba. sphaeroides* fotoszintetikus baktériumban a 4.53. ábra foglalja össze. A fényt egy antenna pigment (A) nyeli el, ami így gerjesztett állapotba kerül (A*) és a gerjesztési energia egy nyitott RC –hoz (Q_AP) vándorol. A fotokémia más kioltó folyamatokkal verseng A*-ért, mint a fluoreszcencia és egyéb veszteség folyamatok. A gerjesztési energia azon része, ami zárt RC-hoz szállítódik, a *J*-vel jellemzett egységek közti konnektivitásnak köszönhetően átirányítódik egy nyitott RC-hoz, ahol fotokémiailag hasznosulhat. A töltés szétválasztott állapotból egy sor elektrontranszfer reakció indul a RC donor és akceptor oldalán. Az oxidált dimert visszaredukálhatja egy közeli (kötődött) vagy egy távoli (nem kötődött) redukált cit c_2.

A redukált elsődleges kinont a másodlagos kinon oxidálja. $Q_A^-P^+$ töltéspár extrém kis hányada rekombinálódhat, repopulálódhat a gerjesztett dimer és az antenna, DL-t mérhetünk.



4.53. ábra A fényenergia továbbítása és az elsődleges elektrontranszport folyamatok *Rba. sphaeroides* fotoszintetikus baktériumban és a higanyion lehetséges támadási pontjai (a vékony nyilakkal jelölve). Az egyik antenna bakterioklorofill (A) fény által (*I*) gerjesztett állapotba kerül. A* eltűnhet fluoreszcencia kisugárzás formájában (k_f időállandóval), veszteség folyamatok által (k_h) és elvándorolhat a gerjesztési energia (szaggatott nyilak) nyitott (PQ_A) vagy zárt ($P^+Q_A^-$) RC-okhoz. A zárt RC-ok által csapdázott excitonok átirányítódhatnak (és hasznosulhatnak) nyitott RC-okhoz (*J* a fotoszintetikus egységek közötti konnektivitási együttható). A gerjesztett dimer (P*) töltéspárt hoz létre (dupla nyíl), amit elektron transzport folyamatokban emésztenek fel a RC donor oldalán lévő cit c_2 molekulák és az akceptor oldalon lévő oxidált (Q_B) vagy részlegesen redukált (Q_B^-) másodlagos kinon. A töltéspár nagyon kis része repopulálódik P*, majd A* állapotba, ami késleltetett fluoreszcencia (DL) kisugárzás formájában tűnik el.

Telítési flash-t követően a P^+ visszaredukciója két fázisra bontható. A gyors fázis a 20-200 µs-os időtartományban talán egy a RC disztális oldalához kötődő, vagy más kötőhelyekről érkező (pl. bc_1) redukált cit c_2-től származik. A lassú fázis (200 µs- 20 ms) a cit c_2 diffúzió kontrollált RC és bc1 komplexek közötti ingázását foglalja magába. Izolált RC- cit c_2 rendszerben egy harmadik, sokkal gyorsabb (~ 1µs) komponenst is megfigyeltek 30- 40 % amplitúdóval, ezt a RC proximális oldalához kötődő cit *c*- nek tulajdonítható (Mathis 1994). Kimutatták, hogy a proximális kötőhely betöltöttsége és a cit *c*- függő elektrontranszfer reakciók sebessége nagyon érzékeny az oldat ionerősségére (Overfield és Wraight 1986, Gerencsér és mtsi. 1999). Intakt *Rba. sphaeroides* sejtekben a nagyon gyors fázis nem látható a kísérleteinkben, valószínűleg az intracitoplazmikus membrán körüli nem elhanyagolható ionerősség miatt.

Összegzés

Nehézfémek kimutatására irányuló módszer lehet a (bakterio)klorofill fluoreszcencia indukció (konstans és változó rész nagysága és aránya, valamint a félemelkedési idő) mérése. Ennek bemutatására sejttenyészeteket kezeltünk higannyal: 26 μM $HgCl_2$-ot adtunk különböző növekedési fázisban lévő tenyészetekhez, majd bizonyos időközönként megmértük a fényen vagy sötétben tartott tenyészetek fluoreszcencia indukcióját. Az itt használt Hg^{2+} koncentráció teljes mértékben gátolja a sejtek növekedését (Giotta és mtsi., 2006).

A higany széleskörű elterjedése a természetben egészségügyi kockázatot jelent, mert ez az ion könnyen bejuthat az emberi táplálékláncba. Ez számos tanulmány készítését ösztönözte, amik a higany hatását vizsgálták eukariótákra és prokariótákra. A higany általánosságban eléggé mérgező és ennek mértéke függ az adott élőlénytől, EC_{50} értéke változatos: 60-80 μM egér makrofágokra (Kim és Sharma, 2004), 0.1 μM *Paracentrotus lividus* tengeri sünre (Fernandez és Beiras, 2001) és még ennél is kisebb értéket (0.025 μM) közöltek *Meretrix meretrix* lárvájának embriogenezisére (Wang és mts, 2009). Ehhez hasonlóan, számos szerző kimutatta a higany erős káros hatását a fotoszintézisre (Clijsters és Assche 1985, Gadallah 1994, Lars 1971, Lu 2000, Murthy és Mohanty 1993, Patra és Sharma 2000). *Sesbania drummondii* magoncok esetében 0.7 mM EC_{50} értéket találtak, míg rizs magoncokra egy nagyságrenddel kisebbet (Du és mtsi., 2005). Boening (2000) átfogó leírást közölt a higany mikroorganizmusokra gyakorolt hatásáról. A közelmúltban Borsetti és mtsi. (2009) foglalták össze fémek hatásait fotoszintetikus baktériumokra, a higanyt Giotta és mtsi. (2006) vizsgálták meg közelebbről a karotenoid mentes *Rba. sphaeroides* R-26.1 mutánson. Ez a törzs (Cogdell és Thomber 1980, Rafferty és mtsi. 1979) a karotenoidmentesség miatt nem éli túl oxigén és fény együttes jelenlétét. Másrészről, kisebb és robusztusabb fotoszintetikus apparátusa van, emiatt ellenállóbb higannyal szemben: 20-30 μM EC_{50} értéke van szemben a vad típusú *Rba. sphaeroides* 2.4.1. törzs 2-4 μM értékével.

A Hg^{2+} hatása a fotoszintetikus apparátusra erősen összefügg az aminosavak C=O, C-N, C-S és C-SH csoportjaival való kölcsönhatásával. Sersen és mtsi. (Šeršeň és mtsi., 1998) kimutatták, hogy higanykezelt spenót kloroplasztiszok 685 nm-en mért fluoreszcencia emissziója a kezeletlen mintáénak 30%-ára esett. Ez az antenna pigmenteket ért erős káros hatást jelez. Továbbá, a fotoszintetikus apparátust is hátrányosan érinti a higanykezelés, mint azt mutatja a PSII tirozinjaitól származó Z^+/D^+ EPR jel eltűnése (Šeršeň és mtsi.1998).

Rba. sphaeroides 2.4.1. fotoszintetikus baktériumban F_0, F_{max} és F_v/F_{max} egyidejű csökkenése (4.42. ábra) kettős károsító hatást jelez, az antenna bakterioklorofill pigmentek és az

elsődleges donort alkotó bakterioklorofill dimer részéről. Továbbá, a változó fluoreszcencia F_v emelkedésének időállandójában bekövetkezett változás a higany fotoszintetikus apparátusra különített hatásait mutatja (4.44. ábra). A prompt hatás csökkenti a fluoreszcencia indukció fél-emelkedési idejét. Ennek megértéséhez észben kell tartanunk, hogy a fél-emelkedési idő F_0-ról F_{max}-ra összetett (nem monoexponenciális) kinetikát követ (4.42. ábra), amint a fény hajtotta töltés szétválasztás ($PQ_AQ_B \rightarrow P^+Q_A^-Q_B$) a töltések donor oldali ($P^+ \rightarrow P$) és akceptor oldali ($Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$) eltűnésével versenyez, ami megakadályozza $P^+Q_A^-$, a RC legmagasabb fluoreszcencia hatásfokú formájának gyors keletkezését. Amint (számos átfordulás után) ezek az elektrontranszfer reakciók megállnak (pl. a pool-ok kimerülése miatt), a fluoreszcencia eléri a maximumát. A prompt hatás, a változó fluoreszcencia fél-emelkedési idejének csökkenése az indukció lassú fázisának eltűnésétől származik, ami pedig a RC folyamatos átfordulásának akadályozását jelzi. Így a Hg^{2+} elsődleges hatása, úgy tűnik a RC akceptor és/vagy donor oldalát érinti.

A Hg^{2+} másodlagos hatása hosszabb időskálán (órák) érvényesül: tönkreteszi a BChl pigmenteket és csökkenti a csatolást az antennában, így csökkenti az abszorpciós keresztmetszetet és a foton elnyelés sebességét. A higanynak kitett baktériumok hamarabb vesztik el BChl pigmentjeiket, mint a csatolást az antennában. Ezek nem párhuzamosan tűnnek el. Eredményeink szerint a pigmentek közti kölcsönhatás ép maradhat az antennában lévő pigmentek számának csökkenése ellenére is. Ezen kívül a higany súlyosan gátolja az antenna szerveződését és az elektrontranszfert a sejtekben, hatása függ a sejtek korától (4.45. ábra) és anyagcsere folyamatok (fény hajtotta) segítik (4.43. ábra). A Hg^{2+} ion a növekedés exponenciális fázisában lévő, fényre kitett sejtekre fejti ki a legnagyobb gátló hatást. Sokkal kisebb (ha van egyáltalán) hatást figyeltünk meg öreg sejteken (a késő stacioner fázisból), sötétben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a higanyion nem passzív módon jut be a sejtekbe és a kromatofóra membránba, hanem aktív transzport által, amit anyagcsere folyamatok segítenek. A Hg^{2+} ionok ko-transzporttal léphetnek át a membránon, vagy más ionok csatornáit használva.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a higanynak hasonló hatásai vannak *Rba. sphaeroides* fotoszintetikus apparátusára, mint amiket megfigyeltek növényeken és algákon. Továbbá, a higanyion fotoszintetikus baktériumokkal való kölcsönhatásának megértése hozzájárulhat más ártalmas nehézfém hatásának molekuláris részletekben való felderítéséhez és hozzásegíthet a szennyezés korai, érzékeny kimutatására kidolgozandó módszerekhez.

A Hg^{2+} hatása a fénybegyűjtésre és a fluoreszcencia indukcióra

Megfigyeltük, hogy hosszú (8 óra) ideig tartó higanykezelés (50 μM) alatt a 800 nm-es abszorpciós sáv szenvedett csökkenést (~45 % fényben, ~ 5 % sötétben), míg a 850 nm-es sáv nem (< 5 %) (4.46. ábra). Ez a két csúcs a perifériális antenna komplexhez tartozik, ahol arányuk állandó. A tény, hogy csak a 800 nm-es sáv csökken higanykezelés alatt, fényben, azt jelzi, hogy az αβ heterodimerek (8-9 db) alkotta gyűrű, amiben minden egység három bakterioklorofillt és egy karotenoidot köt, strukturális és funkcionális változásokon megy keresztül. A 800 nm-es bakterioklorofill- fehérje komplex-re hat a higany hosszú inkubáció alatt.

Az egyik leglenyűgözőbb megfigyelés a fluoreszcencia indukció három (F_0, F_{max}, $t_{1/2}$) alapvető paraméterének a higany inkubáció korai szakaszban történő nagymértékű változása, míg a sejtek abszorpciójában nincs változás ebben az időtartományban (4.46. ábra). Bár, a fluoreszcencia indukció jellemzőinek változása összetett viselkedést mutat a higany koncentráció és a kezelés időtartamának hatására, a maximum fluoreszcencia (F_{max}) és a félemelkedési idő ($t_{1/2}$) csökkenése általánosan megfigyelhető. A fénybegyűjtés reakciók sémájának alapján (4.53. ábra) fél- kvantitatív módon leírható a higany hatása, feltételezve, hogy a higany közvetlenül hat a fotokémiailag aktív (nyitott) RC-ok koncentrációjára, és a fotoszintetikus egységek közötti konnektivitásra (J). Bizonyítjuk, hogy a higanyionok bejutnak a sejtekbe és az intracitoplazmikus membrán közelében összetett módon csökkentik ezeket a mennyiségeket.

A fluoreszcencia hatásfokok:

$$(F_0 \propto)\ \Phi = \frac{k_f}{k_f + k_h + k_o \cdot [RC]} \tag{4.35}$$

a kezdeti állapotban (amikor minden RC nyitott, $[RC]_o = [RC]$), és

$$(F_{max} \propto)\ \Phi_{max} = \frac{k_f}{k_f + k_h + k_c \cdot [RC]} \tag{4.36}$$

a végső állapotban (amikor minden RC zárt, $[RC]_c = [RC]$). k_f és k_h az antennában fluoreszcencia vagy más, nem sugárzásos folyamatban (pl. hő) elvesző fotonok sebesség állandója. Ha a fotokémiai csapda nagyon hatékony, akkor $k_o \cdot [RC] >> k_f + k_h$. Mivel az Fmax/F0 arány 4 körüli (4.47. ábra), $k_c \approx k_o/4$, vagyis a zárt RC foton csapdázásának sebessége egy negyede a nyitott reakciócentruménak.

A higany intakt sejtek fluoreszcencia indukciójára gyakorolt legfigyelemreméltóbb hatása az F_{max} jelentős csökkentése, míg az F_0 változatlan marad (4.48. ábra, A, B). A kezdeti

fluoreszcencia a higanykezelés alatt két ellentétes hatásnak van kitéve. Egyik oldalról a sejtek fluoreszcenciája (F_0- is beleértve) általánosan csökken a B800 abszorpciós sáv csökkenése miatt (4.46. ábra), a méréseink során kizárólag ezt a sávot gerjesztjük a lézer diódával (808 nm). Bár a B800 sáv az LH2 része és kevéssé járul hozzá a megfigyelt fluoreszcencia kibocsátáshoz, az általa elnyelt energia a fluoreszcencia kibocsátó LH1- hez továbbítódik. A másik oldalról, a higanykezelés hatásra a fotoaktív RC-ok koncentrációjának csökkenése emeli az F_0-t ((4.35) egyenlet). A két hatás talán azonos nagyságú, ezért nem látunk jelentős változást F_0- ban (legalábbis F_{max}-hoz képest) higanykezelés alatt.

F_{max} higanyionok hatására végbemenő sokkal nagyobb változásának magyarázatához figyelembe kell venni, hogy bármilyen módosulás az antennában (pl. k_h növekedése) F_{max}-ot sokkal nagyobb mértékben érinti, mint F_0-t ((4.35) és (4.36) egyenlet alapján). A megfigyelt változás még így is túl nagy ahhoz, hogy egyedül azzal a mechanizmussal magyarázzuk, mint az F_0-t. F_{max} csökkenése nagymértékben a higany RC-ra kifejtett hatásából származhat. Egy lehetőség, hogy a higany megnöveli a zárt RC-ok csapdázásának sebességét (k_c). További opció, hogy a Hg^{2+} ion károsítja RC akceptor oldalát, lelassítja az redukált elsődleges kinon visszaoxidálását (4.53. ábra). Következésképpen, a RC-ok egy része a PQ_A^- állapotban ragad, ami kevésbé jó fluoreszcencia kioltó, mint a $P^+Q_A^-$ állapotban zárt RC. Az F_{max} csökkenése a RC- LH1 komplex higany általi módosulását tükrözi.

A flureszcencia indukció félemelkedési idejében tapasztalt csökkenést (4.47. ábra 4.48. ábra, D és 4.49. ábra) a kapcsolt fotoszintetikus egységek modell (Lavergne és Trissl 1995) segítségével magyarázzuk

$$t_{1/2} = \frac{\frac{\ln(2+J)}{1+J} + \frac{J}{2+J}}{k_I} \tag{4.37}$$

ahol k_I a fotokémiai sebességállandó, ami a fényintenzitástól függ (I), az antenna abszorpciós hatáskeresztmetszete (σ) és a nyitott RC- ok fotokémiai hatásfoka (Φ_p)

$$k_I = I \cdot \sigma \cdot \Phi_p = I \cdot \sigma \cdot \frac{k_o \cdot [RC]}{k_f + k_h + k_o \cdot [RC]} \tag{4.38}$$

A fluoreszcencia indukció félemelkedési ideje jellemzi az összes tényezőt, ami hozzájárul a gerjesztési energia fotokémiai hasznosításához, beleértve a fotoszintetikus egységek közötti konnektivitási együtthatót (J) is, ami azt határozza meg, hogy mennyivel növelik a zárt RC-ok az abszorpciós keresztmetszetet a gerjesztés nyitott RC felé továbbításával. A $t_{1/2}$ csökkenése higanykezelés hatására a konnektivitás és a fotoaktív RC-ok koncentrációjában történő módosulásnak tulajdonítható ((4.37) és (4.38) egyenlet).

$t_{1/2}$ J- függése szigorúan monoton: a konnektivitás csökkenésével a félemelkedési idő is csökken. *Rba. sphaeroides* sejtekben $J \approx 1$ értékről számoltak be (Rivoyre és mtsi. 2010, Maróti és Asztalos 2012), a (4.37) egyenletből $t_{1/2} \approx 0.9/k_I$ következik. Amennyiben a higanykezelés elválasztja egymástól az egységeket, $J = 0$ és $t_{1/2} = 0.69/k_I$ adódik, ami 25 %-os esést jelentene a félemelkedési időben. Ettől jelentősen kisebb csökkenést tapasztaltunk (~10 %), így arra következtetünk, hogy a higany csökkenti, de nem szünteti meg az egységek közti konnektivitást. *Rba. sphaeroides* sejtekben a konnektivitás főleg az RC-LH1 dimerek közt jelentkezik (Rivoyre és mtsi. 2010). Így bármilyen higany indukálta módosulás, ami csökkenti a RC- ok dimerizációját, csökkenteni fogja a konnektivitást is.

A baktériumokban a fotokémiai csapda hatékony ($k_o \cdot [RC] >> k_f + k_h$) és így fotokémiai sebességállandó (k_I) csak I- től és σ- tól függ, [RC]- tól nem ((4.38) egyenlet). Ez azt jelenti, hogy a félemelkedési idő független a fotoaktív RC-ok mennyiségétől ((4.37) egyenlet). A higanykezelt mintákban az analízis összetettebb. Különböző vizsgálati módszerekkel is tapasztaltuk a fotoaktív RC mennyiség csökkenését. Amennyiben az aktív RC- ok károsodása a Hg^{2+} kezelés hatására olyan mértékű lenne, hogy $k_o \cdot [RC] << k_f + k_h$, akkor a (4.37) egyenletnek megfelelően $t_{1/2}$ egyenesen arányos lesz a RC koncentrációval, azaz a fluoreszcencia indukció félemelkedési ideje párhuzamosan csökkenne a fotoaktív RC- ok mennyiségével.

A Hg^{2+} hatása az elektrontranszportra

Elég hosszú inkubációs idő és elég nagy higany koncentráció gátolja a sejtosztódást és a baktériumok fotoszintetikus kapacitásának elvesztéséhez vezet. Eredményeink részben felfedik a higany és a fotoszintetikus apparátus kölcsönhatását és a végül a fotoszintézis gátlásához vezető alapvető mechanizmusokat. Az antenna rendszer kevésbé bizonyult érzékenynek a nehézfém szennyezésre, mint az elsődleges töltéspárt létrehozó redox rendszer a RC-ban. A higanyion közvetlenül befolyásolja az akceptor és donor oldali reakciókat is.

A P^+ visszaredukció kinetikája amplitúdóban és sebességben is csökkenést mutatott higanykezelés hatására (4.50. ábra és 4.51. ábra). Ez a cit c_2^{2+} eltérő P^+ általi oxidációjával függhet össze. Mivel a gyors fázis eltűnését a lassú fázis sebességének csökkenése követi, arra következtethetünk, hogy a kötött cit c_2^{2+} jobban ki van téve a Hg^{2+} általi oxidációnak, mint a RC-hoz nem kötődött cit c_2^{2+}. A higany eltolja a cit c_2^{2+}/ cit c_2^{3+} redox pár egyensúlyát, a redukált frakció csökken. A P^+ visszaredukálásnak lassú komponense diffúzió által szabályozott, a megfigyelt sebességet csökkenti a higanyszennyezés.

A DL mérés, amiből a $P^+Q_A^-$ töltéspár mennyiségére, valamint a P^* és a $P^+Q_A^-$ közötti szabadenergia rés nagyságára lehet következtetni (Maróti és Wraight 2008), információt adhat az akceptor oldali elektrontranszport folyamatokról, amennyiben a P^+ visszaredukálódásának kinetikáját figyelembe vesszük. Higany hozzáadása után veszítünk a DL amplitúdójából, a jel lecsengése gyorsabb lesz (4.52. ábra). Az aktív RC-ok mennyiségének csökkenése és a Q_A/Q_A^- pár középponti potenciáljának emelkedése (növekedés a P^* $P^+Q_A^-$ közti szabadenergia résben) okozhatja a DL amplitúdó csökkenését. A lecsengés gyorsulása inkább Q_A^- Q_B^- vagy akár Hg^{2+} általi gyors visszaoxidálásának következménye, mint P^+ visszaredukálódásának. Q_A^- élettartamát a higanykezelés biztosan csökkenti.

A karotenoidok elektrokróm abszorpcióváltozásának (amit a fotoszintetikus membrán energetizációja határoz meg) mérése különösen érzékeny módszer a higanyszennyezés kimutatására, mivel a membrán feltöltődését a higany hozzáadása gátolja (4.49. ábra B, C). Az 530 nm hullámhosszon mérhető karotenoid abszorpcióváltozás kinetikáját meghatározó komplexeken kívül a RC bizonyult fogékonyabbnak a higany ionra. Az elektrokróm jelet meghatározó két komlex különválasztható bc_1 gátlók használatával (4.49. ábra, A). Higany jelenlétében a jel drámai mértékben csökkent, a RC- on keresztüli elektrontranszport több ponton történő gátlása miatt. Bár ez a következmény önmagában gátolja a bc_1 komplex működését, a kisebb elektrokróm jel egy nem elhanyagolható része érzékeny maradt a bc_1 gátlóra. E szerint a bc_1 komplex nagyobb stabilitással rendelkezik, kevésbé érzékeny a higanyszennyezésre, mint a RC.

A Hg^{2+} felvételét gyorsítják a baktérium anyagcsere folyamatai

A fotoszintézis gátlása külsőleg adott higanyionok hatására sokkal kifejezettebb fényen nevelt tenyészetekben, mint sötétben tartottakon (4.43. ábra 4.48. ábra). Ez a megfigyelés egyezik azzal az általános képpel, ahogy a mikroorganizmusok kezelik a nehézfém stresszt aktív és passzív transzportfolyamatokat alkalmazva. A Hg^{2+} ionokat megkötődnek a sejt felszínén nem- specifikus, gyors és anyagcserétől független módon (bioszorpció), de a sejtfal hatékony gátat képez, meggátolja a passzív bejutást így a fotoszintetikus apparátusra kifejtett káros hatásokat. A kevésbé hatékony passzív út mellett a higanyion aktív módon, anyagcsere folyamatokkal kölcsönhatva is bejuthat a sejtbe. Bár nincsenek higany specifikus csatornák a baktériumokban, a Hg^{2+} képes más ionok csatornáival kölcsönhatni (Giotta és mtsi. 2006; Italiano és mtsi. 2009, 2011). Ezen az aktív úton, a működő, növekvő baktériumsejtek anyagcseréjével hatékonyan növelhető a higany bioakkumuláció (Munoz és Guieysse 2006).

A transzport mechanizmusok kapacitása és sebessége nagyon eltérő, így a higanyion káros hatásai széles koncentráció és időskálán találhatók, azonnali és késői hatásokat is tartalmaz.

Összefoglalás

A fény elnyelésével gerjesztett állapotba került festékmolekulák fotonok emissziójával térhetnek vissza alapállapotukban. A kibocsátást fluoreszcenciának nevezzük, ha az átmenet szinglet állapotok között zajlik. A (bakterio)klorofill festékeknek köszönhetően fotoszintetizáló szervezetek (zöld növények és baktériumok) is képesek fluoreszcencia kisugárzására, amit elterjedten használnak az élő szervezetek fotoszintetizáló képességének megállapítására. Általánosságban kijelenthetjük, hogy a zöld növények esetén a fluoreszcencia indukció jól körüljárt, vizsgálatára gazdag eszközpark készült és mindennapi alkalmazása széleskörűen elterjedt. Ezzel párhuzamosan a baktériumok fluoreszcencia indukcióját leíró irodalom sokkal szegényesebb, akárcsak vizsgálati eszközparkja és a pusztán a fluoreszcencia indukciót leíró kevés elmélet is ellentmondásos.

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

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

A következő kutatási célokat tűztük ki:

Fotoszintetikus baktériumok fluoreszcencia indukcióját meghatározott törzseken, jól meghatározott körülmények között, széles időtartományban vegyük föl. Az időtartomány szubmikroszekundumostól egészen a szekundumos tartományokig terjed. A fluoreszcencia indukció fázisainak eredetére magyarázatot találjunk. Ha már ezeket megnyugtatóan tudjuk magyarázni, akkor fiziológiai vizsgálatokra, a baktériumok fotoszintetikus kapacitásának meghatározására használjuk fel, például nehézfémek hatásának kimutatására. Valamint megvizsgáljuk a fluoreszcencia relaxáció hátterét bakteriális rendszerekben.

A vizsgálatokhoz felhasználtunk abszorpció („steady-state” és flash-indukált abszorpcióváltozás) és fluoreszcencia (indukció és relaxáció, késleltetett fluoreszcencia) méréseken alapuló módszereket. A kísérletek döntő többségét intakt baktériumsejteken végeztük.

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

A megvalósított bakterioklorofill fluoriméter egy olyan hordozható készülék, mely flash indukált fluoreszcencia-változások mérésével alkalmas fotoszintetizáló baktériumsejtek elektrontranszfer tulajdonságainak meghatározására. A készülékkel követhetjük a gerjesztő flash utáni reakciócentrum dimer abszorpcióváltozását, a bakterioklorofill fluoreszcencia lecsengését (relaxáció) és flash alatti emelkedését (indukció). A készülék előnye, hogy ez a három módszer egyetlen elrendezésbe integrált. A gerjesztő (808 nm) és a tapogató (785 nm az abszorpció-változáshoz és 808 nm a fluoreszcenciához) flash-eket is lézer diódák szolgáltatják.

A kompakt elrendezésnek köszönhető a mintatérfogat kicsiny (200 µl), a készülék nagy időfelbontású (5 µs), érzékeny (16 bit), és a biológiai mintából származó jel stabil és jól reprodukálható. A készülék a szokásos „pump- and- probe" módszert használja a kibocsátott fluoreszcencia vagy a sejtek transzmisszió változásának meghatározásához. A minta gerjesztését különböző hosszúságú, erős flash biztosítja, ezzel fotofizikai és fotokémiai reakciókat indítunk el, majd ezek lecsengését gyenge tapogató flash sorozattal követjük nyomon. A gerjesztő flash intenzitásának és hosszának (10 µs – 1 ms) változtatásával a baktérium fotoszintetikus apparátusát különböző állapotokba hozhatjuk, amiket a tapogató fényfelvillanások (flash) alatti fluoreszcencia (F) vagy abszorpcióváltozás (ΔA) megfigyelésével tudunk kimutatni. A gerjesztő flash téglalap alakját kihasználva, a fluoreszcencia indukció közvetlenül mérhető a gerjesztés alatt, a relaxáció pedig utána, a sötétben. A készülék fluoreszcencia indukció és relaxáció, valamint abszorpcióváltozás mérésre alkalmas.

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

Fiziológiás körülmények között intakt sejtekben a RC-ból egy rövid flash hatására keletkezett töltések a gyors előre irányuló, és a 2-3 nagyságrenddel lassabb visszafelé irányuló elektron transzfer reakcióknak köszönhetően stabilizálódnak, és az elraktározott szabadenergia később energiaigényes reakciók fenntartásához használható. A késleltetett fluoreszcencia mérése kiváló eszköz a visszafelé haladó reakciók nyomon követésére.

Intakt sejtekben a DL az antenna bakterioklorofillok termális repopulációjából származik a $P^+Q_A^-$ vagy a cit $c_2^{3+}PQ_A^-$ prekurzor állapotból P^* -on keresztül. A visszafelé irányuló

reakciókat kísérő entalpiaváltozást van't Hoff ábrázolást használva határoztuk meg: ΔH_{P*Q} = 340 meV (pH 7.8) a $P^+Q_A^- \leftrightarrow P^*$ folyamatra. A szabadenergia változása egész sejtekben szobahőmérsékleten ΔG^0_{P*Q} = 870 meV, így az entrópiaváltozás ($-T\cdot\Delta S^0$ = 530 meV) hozzájárulása nagyobb, mint az entalpiaváltozásé. A cit $c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow$ cit $c_2^{2+}PQ_A$ reakcióra 1020 meV entalpiaváltozás becsülhető.

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

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

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

Az egyes fázisok kinetikai elkülönülés szerint az alábbi csoportokba oszthatók.

Ha viszonylag kis gerjesztő fényintenzitást használunk, akkor fotokémiai fázis fog dominálni, ez azt a folyamatot tükrözi, amelynek során sötét állapotú (nyitott) RC zárt állapotba kerül ($P^+Q_A^-$). Minél kisebb a gerjesztő fényintenzitás, a fluoreszcencia annál kisebb szintre tud felemelkedni, a donor oldali elektrontranszfer versenyez vele, és ez a versenyzés annál inkább a cit c_2 oxidáció irányába mozdítja el a folyamatot, minél lassabb a fotokémiai emelkedés. Ez a kioltás a fotokémiai kioltás témakörében magyarázható, így nincs szükség egy további fluoreszcencia kioltó feltételezésére. A fluoreszcencia indukció mérése a lassú időtartományban lehetőséget ad a látszólagos fotokémiai kioltás mérésére, ami összefüggésbe hozható a fotoszintetikus kapacitással, hogy milyen sebességgel halad az elektrontranszfer ebben a rendszerben. Az elektrontranszfer gyorsabb vagy lassabb, annak megfelelően fog a fluoreszcencia alacsonyabb, vagy magasabb szintet elérni, így lehetőséget nyújt a fiziológiás viselkedés meghatározására.

Egyre nagyobb fényintenzitáson, egyre rövidebb időn belül történik meg a RC betöltése. A fluoreszcencia indukció felemelkedése tolódik a rövidebb időtartományokba Itt a nagyobb fényintenzitásoknál valódi fluoreszcencia kioltók léphetnek föl: triplettek keletkeznek. A tiplet kioltás karotenoid (Car) vagy bakterioklorofill (BChl) triplettektől származik, melyek akkor keletkeznek, amikor a RC már bezáródott. Élettartamuk körülbelül 2-10 μs (Car) és 60 μs (BChl).

A kísérleteinkhez használt baktériumtörzsek mindegyikénél kétfázisú emelkedést figyeltünk meg a fluoreszcenciában. Mindkét fázis függ a gerjesztő fény intenzitásától. A második fázis amplitúdója az interkinon elektrontranszfert blokkoló terbutrin hatására csökken, ebből arra következtetünk, hogy ennek a fázisnak a megjelenéséhez a RC átfordulására, többszöri foton találatra van szükség. Ezt alátámasztja, hogy a CYCA I törzsnél, ahol a cit c_2 hiány miatt a megfigyelt időtartományban csak egy találat (egy töltésszétválasztás) lehetséges, a második fázis amplitúdója szintén sokkal kisebb. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy a fluoreszcencia a maximális szintjét, bármilyen erős vagy hosszú a gerjesztő flash, csak akkor érheti el, ha a RC donor és akceptor oldalról is zárt, valamint az ubikinon pool is redukált, vagyis valódi F_{max} szintet $P^+Q_A^-Q^-$ állapotban kapunk. Terbutrin hatására a RC PQ_A^-, a cit c_2 hiány miatt P^+Q_A állapotban reked, a fotokémiai emelkedés után mégis marad egy további emelkedő fázis, aminek már sokkal kisebb az amplitúdója és nem köthető fotokémiához. Ennek megjelenését magyarázhatjuk a fotoszintetikus egységek közötti csatolással (konnektivitás), ami azt jelenti, hogy a gerjesztési energia egy zárt RC- tól átadódik egy nyitott RC- nak. Ez a jelenség felel a fluoreszcencia indukció exponenciális emelkedéstől való eltéréséért. A fluoreszcencia az elején enyhe lag fázissal (CYCA I sejtek) vagy egyenessel (2.4.1. vad típus) indul, majd a végén tovább emelkedik, mint ami az exponenciális emelkedésből következne.

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

Baktériumoknál a relaxáció kinetikáját mindazon reakciók összessége adja, melyek a RC- ot kinyitják. Ezek donor és akceptor oldali reakciók. Megfigyeltük, hogy hosszabb gerjesztés után a relaxáció kinetikája 10- 100 ms-os lecsengést mutat, rövid, vagy pillanatszerű gerjesztés után viszont gyorsabbá és összetettebbé válik. A pool kinonok és pool citokrómok redox állapotának stabilizációja, vagyis a pool kinonok redukciója és a pool citokrómok oxidációja határozza meg a kinetikát. CYCA I törzsben a relaxáció 100 ms- 1 s körüli, ezt a

gerjesztés hossza nem befolyásolja. *Rsp. rubrum* relaxációja 10 ms körüli időállandóval cseng le (ez a törzs csak lassú cit c_2-t tartalmaz) és a terbutrin nem módosítja jelentősen a relaxációt. Ilyen feltételek mellett a donor oldal a meghatározó. *Rba. sphaeroides* gyors és kevésbé gyors citokrómokat is tartalmaz, itt a donor oldal domináns hatása mellett már láthatunk akceptor oldali hatást is. Valódi akceptor oldali limitációra egy másik baktériumtörzs, a *Rvx. gelatinosus* szolgáltat példát: ez a törzs a RC-hoz kötött citokróm alegységgel rendelkezik, így P^+ vissza-redukálása gyors. Az interkinon elektrontranszfer sebességére $(350\ \mu s)^{-1}$-ot mértünk elektrokróm abszorpcióváltozással (ΔA_{530}) végzett kettős-flash kísérletből. A *Rba. sphaeroides* sejteken végzett redox titrálásokból a cit c_2^{2+}/cit c_2^{3+} középponti potenciáljára 347 mV-ot, a P/P^+ redox középponti potenciáljára 412 mV-ot kaptunk.

A Hg^{2+} ionok erősebb roncsoló hatást fejtenek ki fényen tartott és a növekedés exponenciális fázisában lévő *Rba. sphaeroides* sejtekre, mint a sötétben tartott és a stacioner fázisban lévőkére. A Hg^{2+} ionok elsődlegesen a RC fehérje károsításával fejtik ki növekedés gátló hatásukat.

A fotoszintetikus baktériumok a vizsgált nehézfémek közül Hg^{2+} jelenlétére a legérzékenyebbek, már néhány μM koncentráció is gátolja a sejtek növekedését, míg más nehézfémek (Co^{2+}, MoO_4^{2-}, CrO_4^{2-}) csak mM-os mennyiségben. A higany hatását fluoreszcencia indukció mérésével követtük, ami nagyon érzékeny módszernek bizonyult, így biomonitoring rendszer alapja lehet.

Azonnali hatásként megfigyeltük, hogy a fluoreszcencia indukció félemelkedési ideje a higanyionok hozzáadása után ($t_{1/2}$ ~20 s) körülbelül a felére csökken, és ez az állapot csak órák múlva kezd el helyreállni. A fluoreszcencia kezdeti (F_0) értéke változatlan marad, mivel a sejtek nem osztódnak, emellett új pigmenteket sem termelnek. A maximum fluoreszcencia (F_{max}) folyamatosan csökken, így a változó fluoreszcencia (F_v, F_{max}-F_0) is. A higanykezelt sejtek fotoszintetikus kapacitása, amire az F_v/F_{max} hányadosból következtetünk, csökken a megfigyelés alatt, míg a kezeletlen sejteké változatlan marad. Az F_{max} szintjére kifejtett csökkentő hatás attól is függ, hogy milyen növekedési fázisban lévő tenyészeten végezzük a kezelést és a továbbiakban fényben vagy sötétben tartjuk-e a megfigyelt sejteket. A fiatal, osztódásban lévő tenyészetek sokkal érzékenyebbek a higanyra, valamint nagyobb hatás tapasztalható fényben, mint sötétben. A fluoreszcencia indukcióból és azt kiegészítő mérési módszerekkel kapott eredményekből arra következtetünk, hogy a Hg^{2+} a RC donor és akceptor oldalán kifejtett hatásaival csökkenti a fotoaktív RC- ok mennyiségét és a fotoszintetikus egységek közötti konnektivitást.

Summary

Pigment molecules excited by photon absorption can return to their ground state by photon emission. The emission is called fluorescence, if the transition occurs between singlet states. Thanks to the (bacterio)chlorophyll pigments, photosynthetic organisms (green plants, algae and bacteria) are able to emit fluorescence, which is widely used to determine the photosynthetic capacity of living organisms. Since the early nineties, numerous devices have been constructed to measure fluorescence induction of higher plants and algae (e.g. PAM), and sophisticated theories have been published to connect the measured data with actual photosynthetic processes. On the other hand, the literature related to the bacterial fluorescence induction is poor, not many measuring devices are available and the theories used to understand the data are taken formally from the field of higher plants. The specificity of the bacterial system is usually not taken into account.

The fluorescence induction monitored during a dark → light transition is followed by relaxation of the fluorescence yield to the initial dark level after turning off the exciting light. Similarly as the fluorescence induction, the kinetics of relaxation is also sensitive to the several key electron transfer processes in early stage of photosynthesis, thus it can be utilized as a diagnostic tool of the photosynthetic capacity of the organism.

According to our observations, not only the acceptor side and its redox states, but also the donor side reactions can contribute to determinate the rate of opening of the RC, i. e. the decay kinetics of the fluorescence yield. Additionally, in some strains (e.g. *Rsp. rubrum*) the limitation can come entirely from the donor side.

Although the kinetic behavior of bacterial fluorescence seems simpler, than that of algae or higher plants, much less results and interpretation on this field have been published so far. With the aim to make contribution to this research, we think the construction of a bacteriochlorophyll fluorometer would have priority to obtain reliable fluorescence data. Based on these experimental results, comparative studies can be carried out on fluorescence kinetics of different bacterial strains under various conditions and treatments of the bacteria. Then coherent kinetic models can be elaborated to understand the connection between induction/relaxation of fluorescence and energy/electron transfer processes in/around the RC.

Most of the measurements were carried out on intact bacterial cells. We used absorption (steady-state and flash-induced absorption change) and fluorescence (induction and relaxation, delayed fluorescence) methods.

A new bacteriochlorofill fluorometer was constructed: it is portable due to its compact design, cheap, easy to handle, computer controlled and suitable for measuring fluorescence of intact bacterial cells.

The constructed bacteriochlorophyll fluorometer is a portable device for determining properties of photosynthetic bacteria by measuring flash-induced changes. We can monitor the induction and relaxation of bacteriochlorophyll fluorescence during and after the excitation laser flash, respectively and the absorption change due to the oxidized dimer after a flash. The advantage of this device is that all three optical assays are integrated into one setup. Exciting (808 nm) and monitoring (785 nm for absorption change and 808 nm for fluorescence) flashes are produced by high power laser diodes. The low sample volume (200 µl), the fast time resolution (5 µs) and sensibility (16 bit), stability and reproducibility of the signal from biological sample are attributed to the compact design.

The well-known pump-and-probe method is used. A strong flash with variable duration induces photochemical and photophysical reactions in the sample and the kinetics of relaxation (decay) is monitored by a series of weak and short flashes. Changes of the actinic flash intensity and/or duration (10 µs – 1 ms) will affect the (redox) state of the photosynthetic apparatus characterized by the actual levels of the yield of fluorescence (*F*) and absorption change (ΔA) of the bacterium measured by the series of weak testing flashes.

Two precursor states of delayed fluorescence were identified (cyt $c_2^{3+}PQ_A^-$ és $P^+Q_A^-$) in *Rba. sphaeroides* intact cells, whose lifetimes are controlled by the cyt bc_1 complex (cyt $c_2^{3+} \rightarrow$ cyt c_2^{2+}) and charge recombination.

Under physiological conditions in intact cells, the flash induced charges in the RC are stabilized due to the fast forward and the much (2-3 order of magnitude) slower backward electron transfer reactions. The stored free-energy can be used later by energy consuming reactions. Measuring delayed fluorescence is an excellent tool for measuring backward reactions. In addition, we carried out prompt fluorescence and flash-induced absorption change measurements to study the role of charge recombination.

In intact cells, DL comes from thermal repopulation of antenna bacteriochlorophylls from the $P^+Q_A^-$ or cyt $c_2^{3+}PQ_A^-$ precursor states through P*. The enthalpy change accompanying the backward reactions was determined using van't Hoff plot: ΔH_{P*Q} = 340 meV (pH 7.8) for the $P^+QA^- \leftrightarrow P^*$ reaction. The free-energy change in intact cells at room temperature is ΔG^0_{P*Q} = 870 meV, so the contribution of entropy change ($-T \cdot \Delta S^0$ = 530 meV) is bigger than the enthalpy change. For the cyt $c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow$ cyt $c_2^{2+}PQ_A$ reaction, 1020 meV enthalpy change can be rated.

The free-energy gap between P* and $P^+Q_A^-$ has minor but, definite pH dependence, that refers to flash-induced protonation steps around the quinone binding site. Since we fitted the moderate pH dependence of the free-energy gap with the sum of two Henderson-Hasselbalch curves, very small p*K* shift was obtained for the acidic ($pK_1' - pK_1 = 0.75$) and alkaline ($pK_2' - pK_2 = 0.4$) groups, which indicates that the protonatable groups are in weak interaction with flash-induced charges on Q_A^- and P^+. The pH independence of the free-energy gap of the cyt $c_2^{3+}PQ_A^- \leftrightarrow$ cyt $c2^{2+}PQ_A$ reaction was observed, which refers to the participation of P^+.

Back reactions result in delayed fluorescence and are waste processes with respect to light energy utilization. Their contribution is controlled by addition of redox chemicals and inhibitors and by modification of the duration of the excitation. Our results can be the basis of a monitoring system for studying the light utilization of photosynthetic bacteria.

The fluorescence induction of photosynthetic bacteria is multiphasic: it is determined by photochemistry, connectivity between the photosynthetic units (PSU), formation of triplet states, donor and acceptor side electron transfer reactions and cyclic electron transfer.

The phases can be divided according to their kinetics into the following groups:

If the excitation light intensity is relatively small, the photochemical phase will dominate. This process reflects the closure of the RC ($PQ_A \rightarrow P^+Q_A^-$). Moving towards slower time scales (smaller exciting light intensities), the electron transfer reaction will have more time to transport the charges from the RC, therefore larger fraction of the RC will be open and the level of fluorescence will drop. The smaller is the excitation intensity, the smaller will be the level of fluorescence. The donor side electron transfer as part of the cyclic electron transfer competes with the photochemistry. Measuring fluorescence induction in the slow time scale, allows us to determine the quasi-photochemical quenching, which can be related to the photochemical capacity and to the rate of cyclic electron transfer in this system. The yield of fluorescence will reach lower or higher values depending on whether the cyclic electron transfer through the complexes is faster or slower, thus it provides assay to monitor the physiological conditions of the cells.

By increasing the excitation intensity, closing of the RC takes place in shorter time. The rise of fluorescence kinetics shifts towards shorter time scale. In the range of very high excitation light intensities, fluorescence quenchers (mainly triplets) appear. Triplet quenching can originate from carotenoid (Car) or bacteriochlorophyll (BChl) triplets, when the RC is already closed. Their lifetime is about 2-10 μs (Car) and 60 μs (BChl) depending on the strain of the bacterium.

In all bacterial cultures we used, the rise of the fluorescence induction is biphasic. Both phases depend on the excitation light intensity. Terbutryn, the potent inhibitor of the interquinone electron transfer, reduces the amplitude of the second phase. This suggests that the occurrence of this phase needs multiple turnovers of the RC, i.e. multiple photon hits. In CYCA I strain, where only one photon hit (one charge separation) is possible in the observed time range because of the lack of cyt c_2, the amplitude of second phase is much smaller than that of the first phase. From these observations, we conclude that no matter on how intense or long is the excitation, the maximum level of fluorescence can be reached, if the RC is closed from the donor and acceptor sides simultaneously, and the ubiquinone pool is also reduced. The $P^+Q_A^-QH_{2,\ pool}$ state gives the true F_{max} level. Although the RC is trapped in PQ_A^- (wt) or $P^+Q_A^-$ (in CYCA I) states in the presence of terbutryn, another additional rise still remains in the kinetics after the photochemical phase, which smaller in amplitude and could not be linked to photochemistry. This phase can be qualitatively explained by connectivity between PSUs, that includes the excitation energy migration from closed RC to an open RC. This phenomenon is responsible for the deviation of the fluorescence induction from strictly exponential rise. Fluorescence starts with lag phase (CYCA I cells) or straight line (2.4.1. wild time) and thereafter rises monotonously to F_{max} similarly as an exponential rise.

The kinetics of fluorescence relaxation is limited by donor and/or acceptor side reactions in the different strains: *Rvx. gelatinosus* is acceptor side limited, *Rsp. rubrum* is donor side limited and *Rba. sphaeroides* is limited by both sides but the donor side is dominant.

In bacteria, the kinetics of fluorescence relaxation is complex and the role of re-reduction of the oxidized dimer is not negligible.Tthe kinetics of relaxation reflects the contribution of all donor and acceptor side reactions that opens the RC.Δ

We observed, that after longer excitation, the half time of fluorescence relaxation amounted 10- 100 ms, and after a short flash it became shorter and the kinetics more complex. The kinetics is determined by the redox states of pool quinones and pool cytochromes. In the strain CYCA I, the relaxation half time is about 100 ms- 1 s, and the duration of excitation does not modify this value. Terbutryn does not have large impact on relaxation. Therefore, the donor side is dominant under these conditions and strain. For acceptor side limitation, another strain, *Rvx. gelatinosus* provides an example: here, the RC has a cytochrome subunit, so the re-reduction of P^+ is fast. We determined the interquinone electron transfer rate $(350\ \mu s)^{-1}$ based on double-flash experiment of electrochromic absorption change (ΔA_{530}), which correlates with the fluorescence relaxation in this strain. From redox titration of whole

Rhodobacter sphaeroides cells we obtained redox midpoint potential values of 347 mV for cyt c_2^{2+}/cyt c_2^{3+} and 412 mV redox midpoint potential for P/P^+.

Hg^{2+} ions have larger destructive effects on *Rba. sphaeroides* cells in the exponential phase of growth and kept in the light, than cells kept in the dark and in the stationary phase. Hg^{2+} ions primarily impair the RC protein, which results in the inhibition of growth of *Rba. sphaeroides* cells.

The photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* is most sensitive to Hg^{2+} ions out of the investigated heavy metals ion. The mercury ions added in very low (~ 1-10 μM) concentration to the bacterium culture inhibit the cell growth, while other heavy metal ions (Co^{2+}, MoO_4^{2-} and CrO_4^{2-}) need much higher (1-10 mM) concentration to evoke similar effects. Hg^{2+} -ions inhibit cell proliferation completely for a definite period of time of growth (lag phase of growth), but later (after this lag phase), the cells start to grow at a rate close to that of the untreated culture. During the lag phase, the cells manage to make the mercury ions harmless by physical segregation, chelation, or chemical modifications. The effect of Hg^{2+} was monitored by fluorescence induction, which proved to be a very sensitive tool, so it could be the base of a biomonitoring system.

According to our experiences, the Hg^{2+} ion is very harmful to the photosynthetic apparatus particularly to the RC. The RC protein is among the primary targets of Hg^{2+} destruction. The rise time of fluorescence induction is halved as immediate effect of addition of Hg^{2+} ($t_{1/2}$ ~ 20 s) and recovering this condition will starts only hours later. Other parameters of fluorescence induction are also modified during mercury treatment. The initial value of the fluorescence (F_0) remains constant, because cells are not dividing, and not producing new pigments. The maximum fluorescence (F_{max}) is continuously decreasing together with the variable fluorescence ($F_v = F_{max} - F_0$). The photosynthetic capacity of Hg^{2+} treated cells measured by the F_v/F_{max} ratio is monotonously decreasing during the mercury exposure, while that of the untreated cells remains constant. The rate and magnitude of decrease of the F_{max} level depend on the physiological state (phase of growth) of the culture and on the light/dark condition of the incubation with Hg^{2+}. Young and prolifering cultures are more sensitive to Hg^{2+} exposure than old cultures in the stationary phase of growth. Additionally, the destruction effect is more pronounced in the light than in the dark. Based on the results obtained from fluorescence induction and supplementary methods, we conclude that Hg^{2+} ions is cell cultures decrease the number of photoactive RCs by eliminating the connectivity between PSUs and by blocking the donor and acceptor side electron transfer reactions.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm dr. Maróti Péter egyetemi tanárnak, hogy lelkiismeretesen ellátta témavezetői feladatait és önálló tudományos munkára ösztönzött, valamint az iránymutatást és a sok segítséget, amit doktori disszertációm elkészítéséhez nyújtott.
Köszönettel tartozom a Biofizika Tanszék többi dolgozójának is, különösen Sipka Gábornak, aki áldozatos munkával elkészítette a modellszámításokat.
Végül köszönöm szeretett családomnak, hogy támogattak és elviselték hiányomat, míg ez a munka készült.
Az anyagi támogatásért köszönet a TÁMOP 4.2.2.A-11/1KONV-2012-0060, TÁMOP 4.2.2.B and COST (CM1306) pályázatoknak.

Irodalomjegyzék

Antal TK, Graevskaia EE, Matorin DN, Volgusheva AA, Osipov VA, Krendeleeva TE, Rubin AB (2009) Study of the effect of methylmercury and copper ions on primary photosynthesis processes in the green algae *Chlamydomonas moevusiiusing* the parameters of kinetic curves of the variable of chlorophyll fluorescence. *Biofizika* 54 (4):681–687

Arata H, Nishimura M (1983) Free energy change accompanying electron transfer from P870 to quinone in *Rhodopseudomonas sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta.* 725**:** 394–401.

Arata H, Parson WW (1981) Enthalpy and volume changes accompanying electron transfer from P-870 to quinones in *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta.* 636: 70–81

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

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

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

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

Bahatyrova S, Frese RN, Siebert CA, Olsen JD, van der Werf KO, van Grondelle R, Niederman RA, Bullough PA, Otto C, Hunter CN (2004) The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature* 430:1058-1062

Bailleul B, Cardol P, Breyton C, Finazzi G (2010) Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis. *Photosynth Res.* 106(1–2):179–189

Barregard L, Fabricius-Lagging E, Lundh T, Mo¨lne J, Wallin M, Olausson M, Modigh C, Sallsten G (2010) Cadmium, mercury, and lead in kidney cortex of living kidney donors: impact of different exposure sources. *Environ Res* 110:47–54

Bernier M, Carpentier R (1995) The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett* 360:251–254

Bina D, Litvin R és Vacha F (2009) Kinetics of in vivo bacteriochlorophyll fluorescence yield and the state of photosynthetic apparatus of purple bacteria, *Photosynth. Res.* 99: 115–125

Boening D. W. (2000) Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review, *Chemosphere* 40, 1335–1351.

Borisov AY, Godik VI (1972) Energy transfer to the reaction centers in bacterial photosynthesis. II. Bacteriochlorophyll fluorescence lifetimes and quantum yields for some purple bacteria, *J. Bioenerg. Biomembr*. 3: 515–523

Borsetti F, Martelli P L, Casadio R és Zannoni D (2009) Metals and Metalloids in Photosynthetic Bacteria: Interactions, Resistance and Putative Homeostasis Revealed by Genome Analysis, The Purple Phototrophic Bacteria 655-689

Boucher N, Carpentier R (1999) Hg^{2+}, Cu^{2+}, and Pb^{2+}-induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: a study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosynth Res* 59:167–174

Brune, D. C. (1995) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In:*Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (eds R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 847–870Tabita, 1995

Buccolieri A, Italiano F, Dell'Atti A, Buccolieri G, Giotta L, Agostiano A, Milano F és Trotta M (2006) Testing the photosynthetic bacterium Rhodobacter sphaeroides as heavy metal removal tool., *Ann Chim –Rome*. 96: 195-204

Cain A, Vannela R, Woo LK (2008) Cyanobacteria as a biosorbent for mercuric ion. *Bioresour Technol* 99:6578–6586

Carithers R.P, Parson WW (1975) Delayed fluorescence from *Rhodopseudomonas viridis* following single flashes, *Biochim. Biophys. Acta*. 387**:** 194–211

Carithers RP, Parson WW (1976) Delayed fluorescence from *Rhodopseudomonas sphaeroides* following single flashes, *Biochim. Biophys. Acta*. 440**:** 215–232

Cartron ML, Olsen JD, Sener M, Jackson PJ, Brindley AA, Qian P, Dickman MJ, Leggett GJ, Schulten K, Hunter CN (2014) Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 1837(10):1769-1780

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, *Biochemistry*. 46: 4510–4521

Clayton RK (1966) Relations between photochemistry and fluorescence in cells and extracts of photosynthetic bacteria. Photochem Photobiol 5:807-821

Clifton JC (2007) Mercury exposure and public health. *Pediatr Clin North Am* 54(2):237–269

Clijsters H. and Assche F. (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals, *Photosynth. Res.*, ,7, 31–40.

Cogdell R. J. and Thomber J. P. (1980) Light-harvesting pigment—protein complexes of purple photosynthetic bacteria, *FEBS Lett*. 122

Comayras F, Jungas C, Lavergne J (2005) Functional consequences of the organization of the photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides*: I. Quinone domains and excitation energy transfer in chromatophores and reaction center antenna complexes. *J Biol Chem* 280:11203-11213

Crofts A, Guergova-Kuras M, Hong S (1998) Chromatophore heterogeneity explains phenomena seen in Rhodobacter sphaeroides previously attributed to supercomplexes. *Photosynth Res.* 55: 357–362

Deng X, Jia P (2011) Construction and characterization of a photosynthetic bacterium genetically engineered for Hg^{2+} uptake. *Bioresour Technol* 102:3083–3088

Drepper F, Dorlet P, Mathis P (1997) Cross-linked Electron Transfer Complex between Citochrome c_2 and the Photosynthetic Reaction Center of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 36:1418-1427

Drepper F, Dorlet P, Mathis P (1997) Cross-linked Electron Transfer Complex between Citochrome c_2 and the Photosynthetic Reaction Center of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 36:1418-1427

Drews, G. and Imhoff, J. F. (1991) Phototrophic purple bacteria. In:V*ariations in Autotrophic Life* (eds J. M. Shively and L. L. Barton), Academic Press, London, pp. 51–97

Du X., Zhu Y. G, Liu W. J. and Zhao X. S. (2005) Uptake of mercury (Hg) by seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture and interactions with arsenate uptake, *Environ. Exp. Bot*. 54, 1–7.

Falkowski PG, Koblizek M, Gorbunov M, Kolber Z (2004) Development and application of variable chlorophyll fluorescence technique in marine ecosystems. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) Chlorophyll *a* fluorescence: signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration, 19th edn. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 757-778

Fernandez N. and Beiras R. (2001) Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin, *Ecotoxicology*, 10, 263–271

Francia F, Wang JM, Venturoli G, Melandri BA, Rigaud JL, Barz WP, Oesterhelt D (1999) The reaction center-LH1 antenna complex of *Rhodobacter sphaeroides* contains one PufX molecule which is involved in dimerization of this complex. *Biochemistry* 38:6834-6845

Gadallah M. (1994) Interactive effect of heavy metals and temperature on the growth, and chlorophyll, saccharides and soluble nitrogen contents in *Phaseolus* plants, *Biol. Plant*. 36, 373–382.

Gerencsér L, Laczkó G, Maróti P (1999) Unbinding of oxidized citochrome c from photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* is the bottleneck of fast turnover. *Biochemistry.* 38(51): 16866–16875

Giotta L, Agostiano A, Italiano F, Milano F, Trotta M (2006) Heavy metal ion influence on the photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere* 62:1490–1499

Gopta OA, Bloch DA, Cherepanov DA, Mulkidjanian AY(1997) Temperature dependence of the electrogenic reaction in the Q_B site of the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center: the $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ transition. *FEBS Lett* 412:490–494

Gopta OA, Cherepanov DA, Semenov AY, Mulkidjanian AY, Bloch DA (1998) Effect of temperature and surface potential on the electrogenic proton uptake in the Q_B site of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center: $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_BH_2$ transition. *Photosynth Res* 55:309–316

Gotsis-Skretas O (1991) Effects of mercury on cell population, chlorophyll a and rates of photosynthesis and excretion of Dunaliella minutalerche. *Toxicol Environ Chem* 33:261–275

Graige MS, Feher G, Okamura MY (1998) Conformational gating of the electron transfer reaction $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ in bacterial reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* determined by a driving force assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11679-11684

Hohmann-Mariott MF, Blankenship RE (2007) Variable fluorescence in green sulfur bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1767:106-113

Hong SJ, Ugulava N, Guergova-Kuras M, Crofts AR (1999) The energy landscape for ubihydroquinone oxidation at the Q_O site of the bc_1 complex in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* 274:33931–33944

Italiano F, Buccolieri A, Giotta L, Agostiano A, Valli L, Milano F, Trotta M (2009) Response of the carotenoidless mutant *Rhodobacter sphaeroides* growing cells to cobalt and nickel exposure. *Int Biodeterior Biodegradation.* 63: 948–957

Italiano F, D'Amici GM, Rinalducci S, De Leo F, Zolla L, Gallerani R, Trotta M, Ceci LR (2011) The photosynthetic membrane proteome of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1 exposed to cobalt. *Res Microbiol.* 162(5): 520–527

Jeffries TW, Butler RG (1975) Growth inhibition of *Rhodopseudomonas capsulata* by methylmercury acetate. *Appl Microbiol* 30(1):156–158

Joliot és Joliot, (1964) Études cinétique de la reaction photochimique libérant l'oxygéne au cours de la photosynthése. CR Acad Sci Paris 258: 4622-4625.

Joliot P, Joliot A, Vermeglio A (2005) Fast oxidation of the primary electron acceptor under anaerobic conditions requires the organization of the photosynthetic chain of *Rhodobacter sphaeroides* in supercomplexes, *Biochim. Biophys. Acta*. 1706: 204–214

Joliot P, Vermeglio A, Joliot A (1989) Evidence for supercomplex between reaction centers, citochrome c_2 and citochrome bc_1 complex in *Rhodobacter sphaeroides* whole cells. *Biochim Biophys Acta* 975:336-345

Kamp-Nielsen L (1971) The effect of deleterious concentrations of mercury on the photosynthesis and growth of Chlorella pyrenoidosa. *Physiol Plant* 24(3):556–561

Kiley PJ, Kaplan S (1988) Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol Rev* 52(1):50–69

Kim S. H. and Sharma R. P. (2004) Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling, *Toxicol. Appl.Pharmacol.*, 196, 47–57.

Kimimura M, Kotoh S (1972) Studies on electron transport associated with photosystem II functional site of plastocyanin: inhibitory effects of $HgCl_2$ on electron transport and plastocyanin in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 283:279–292

Kingma H, Duysens LNM and Van Grondelle R (1983) Magnetic field stimulated luminescence and a matrix model for energy transfer. A new method for determining the redox state of the first quinone acceptor in the reaction center of whole cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 725:434–443.

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* DOI 10.1007/s11120-014-0026-4

Koblízek M, Shih J D, Breitbart S I, Ratcliffe E C, Kolber Z S, Hunter C. N és Niederman R A (2005) Sequential assembly of photosynthetic units inRhodobacter sphaeroidesas revealed by fast repetition rate analysis of variable bacteriochlorophyll a fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg*. 1706**:** 220–231

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

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

Kukarskikh GL, Graevskaia EE, Krendeleva TE, Timofeedv KN, Rubin AB (2003) Effect of methylmercury on primary photosynthesis processes in green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. Biofizika 48(5):853–859

Laisk A, Oja V (2013) Thermal phase and excitonic connctivity in fluorescence induction. Photosynth Res 117:431-448.

Lars K.-N. (1971) The Effect of Deleterious Concentrations of Mercury on the Photosynthesis and Growth of *Chlorella pyrenoidosa*, *Physiol. Plant.* 24, 556–561.

Larson JW, Wraight CA (2000) Preferential binding of equine ferricitochrome *c* to the bacterial photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 39:14822-14830

Lavergne J, Trissl H-W (1995) Theory of Fluorescence Induction in Photosystem II: Derivation of Analytical Expressions in a Model Including Exciton-Radical-Pair Equilibrium and Restricted Energy Transfer Between Photosynthetic Units. *Biophys J.* 68: 2474–2492

Lavergne J, Vermeglio A, Joliot P (2009) Functional Coupling Between Reaction Centers and Citochrome bc_1 Complexes. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) Advances in Photosynthesis and Respiration: *The Purple Phototrophic Bacteria*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 509-536

Lavorel J (1975) Luminescence, in: Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of Photosynthesis*, Academic Press New York, 225–320

Lin X, Williams JC, Allen JP, Mathis P (1994) Relationship between rate and free energy difference for electron transfer from citochrome c_2 to the reaction center in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 33:13517–13523

Lu C. M., Chau C. W. and Zhang J. H. (2000) Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium,*S. platensis* assessment by chlorophyll fluorescence analysis, *Chemosphere* 41, 191–196.

Malik A (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int* 30:261–278

Mancino LJ, Dean DP, Blankenship RE (1984) Kinetics and thermodynamics of the $P870^+Q_A^-$ → $P870^+Q_B^-$ reaction in isolated reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 764:46-54

Marói P, Wraight CA (2008) The redox midpoint potential of the primary quinone of reaction centers in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides* is pH independent. *Eur Biophys J*. 37: 1207–1217

Maróti P, Asztalos E (2012) Calculation of connectivity of photosynthetic units in intact cells of Rhodobacter sphaeroides. Congming L (ed) Photosynthesis: research for food, fuel and future—15th international conference on photosynthesis, Symposium 02-01. Zhejiang University Press, Springer-Verlag GmbH, 27–31

Maróti P, Asztalos E, Sipka G (2013) Fluorescence Assay for Photosynthetic Capacity of Bacteria. *Biophys J* 104(2):545a.

Maróti P, Wraight CA (1988) Flash-induced H^+ binding by bacterial photosynthetic reaction centers: comparison of spectrometric and conductometric methods, *Biochim. Biophys. Acta*. 934: 314–328

Mathis P (1994) Electron transfer between citochrome c_2 and the isolated reaction center of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta.* 1187: 177–180

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**:** 91–94

Meinhardt SW, Crofts AR (1982) Kinetic and thermodynamic resolution of citochrome c_1 and citochrome c_2 from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *FEBS Lett* 149:223–227

Mishra S, Dubey RS (2005) Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants, Chapter 44. In: Pessarakli M (ed) Handbook of photosynthesis, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton

Moser CC, Dutton PL (1988) Citochrome *c* and c_2 binding dynamics and electron transfer with photosynthetic reaction center protein and other integral membrane redox proteins. *Biochemistry* 27(7):2450-2461

Mulkidjanian AY (2005) Ubiquinol oxidation in the citochrome bc_1 complex: Reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim Biophys Acta* 1709:5–34

Mulkidjanian AY (2007) Proton translocation by the citochrome bc_1complexes of phototrophic bacteria: introducing the activated Q-cycle. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6: 19-34

Munoz R, Guieysse B (2006) Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res*. 40: 2799–2815

Murata N, Fork DC (1975) Temperature Dependence of Chlorophyll a Fluorescence in relation to the Physical Phase of Membrane Lipids in Algae and Higher Plants. *Plant Physiol* 56:791-796

Murthy S. and Mohanty P. (1993) Mercury ions inhibit photosynthetic electron transport at multiple sites in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301, *J. Biosci*. 18, 355–360.

Murthy SDS, Mohanty N, Mohanty P (1995) Prolonged incubation of mercury alters energy transfer and chlorophyll (Chl) a protein complexes in Synechococcus 6301: changes in Chl a absorption and emission characteristics and loss of the F695 emission band. *Biometals* 8:237–242

Okamura MY, Paddock ML, Graige MS, Feher G (2000) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. *Biochim Biophys Acta* 1458:148-163

Osváth Sz, 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**:** 41–49

Overfield RE, Wraight CA (1986) Photooxidation of mitochondrial citochrome c by isolated bacterial reaction centers: evidence for tight-binding and diffusional pathways. *Photosynth Res.* 9: 167–179

Overfield RE, Wraight CA, deVault D (1979) Microsecond photooxidation kinetics of citochrome c_2 from *Rhodopseudomonas sphaeroides*: In vivo and solution studies. *FEBS Lett* 105:137-142

Paddock ML, Weber KH, Chang C, Okamura MY (2005) Interactions between citochrome c_2 and the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*: The cation-π interaction. *Biochemistry* 44:9619-9625

Panda S, Panda S (2009) Effect of mercury ion on the stability of the lipid-protein complex of isolated chloroplasts. *Indian J Biochem Biophys* 46:405–408

Papageorgiou G and Govindjee (eds) (2004) Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. *Advances in photosynthesis and respiration*. Springer, Dordrecht, The Netherlands

Parson WW (1978) Quinones as secondary electron acceptors, RK Clayton, WR Sistrom (Eds.), The Photosynthetic Bacteria, Plenum, New York. 455–469.

Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environ Exp Bot 52:199–223

Patra M. and Sharma A. (2000) Mercury toxicity in plants, *Bot. Rev*. 66, 379–422.

Pettigrew GW, Meyer TE, Bartsch RG, Kamen MD (1975) pH dependence of the oxidation-reduction potential of citochrome c_2. *Biochim Biophys Acta* 430:197–208

Pilotelle-Bunner A, Beaunier P, Tandori J, Maróti P, Clarke R.J, Sebban P (2009) The local electric field within phospholipid membranes modulates the charge transfer reactions in reaction centres. *Biochim. Biophys Acta.* 1787: 1039-1049

Pisani F, Italiano F, de Leo F, Gallerani R, Rinalducci S, Zolla L, Agostiano A, Ceci LR és Trotta M (2009), Soluble proteome investigation of cobalt effect on the carotenoidless mutant of *Rhodobacter sphaeroides*, *Journal of Applied Microbiology*. 106: 338-349.

Prince RC (1978) The reaction center and associated citochromes of *Thiocapsa pfennigii*: their thermodynamic and spectroscopic properties, and their possible location within the photosynthetic membrane, *Biochim. Biophys. Acta*. 501**:** 195–207

Prince RC, Bashford CL (1979) Equilibrium and kinetic measurements of the redox potentials of citochromes c_2 in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 547:447– 454

Prince RC, Dutton PL (1976) The primary acceptor of bacterial photosynthesis; its operating midpoint potential? *Arch. Biochim. Biophys*. 172: 329–334

Prince RC, Dutton PL (1978) Protonation and the reducing potential of the primary electron acceptor, in: R.K. Clayton, W.R. Sistrom (Eds.), *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York. 439–453

Rafferty C., Bolt J., Sauer K. and Clayton R. (1979) Photooxidation of antenna bacteriochlorophyll in chromatophores from carotenoidless mutant *Rhodopseudomonas sphaeroides* and the attendant loss of dimeric exciton interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4429–4432.

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: 1780–1794

Schansker G, Tóth Sz, Kovács L, Holzwarth AR, Garab Gy (2011) Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyllafluorescence rise. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1807: 1032–1043

Sener MK, Schulten K (2009) From atomic-level structure to supramolecular organization in the photosynthetic unit of purple bacteria. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) Advances in Photosynthesis and Respiration: *The Purple Phototrophic Bacteria*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 275-294

Šeršeň F, Králová K. and Bumbálová A (1998) Action of Mercury on the Photosynthetic Apparatus of Spinach Chloroplasts, *Photosynthetica* 35, 551–559

Silver S (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions - a review, *Gene*, 179: 9-19.

Siström WR (1960) A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas spheroides*, *J Gen Microbiol*, 22: 778–785

Stirbet A, Govindjee (2012) Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth Res* 113:15-61

Stirbet A (2013) Excitonic connectivity between photosystem II units: what is it, and how to measure it? *Photosynth Res* 116:189-214

Sturgis JN, Niederman RA (2009) Organization and Assembly of Light-Harvesting Complexes in the Purple Bacterial Membrane. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M, Beatty JT (eds) Advances in Photosynthesis and Respiration: T*he Purple Phototrophic Bacteria*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 253-273

Tabita, F. R. (1995) The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO_2 fixation in purple bacteria. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (eds R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 885–914

Tetreault M, Rongey SH, Feher G, Okamura MY (2001) Interaction between citochrome c_2 and the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*; Effects of charge-modifying mutations on binding and electron transfer. *Biochemistry* 40:8452-8462

Tóth Sz Z (2006) Analysis and application of the fast Chl *a* Fluorescence (OJIP) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. Doctoral thesis.

Trissl H.-W (1996) Antenna organization in purple bacteria investigated by means of fluorescence induction curves, *Photosynth. Res.* 47**:** 175–185

Turzó K, Laczkó G, Filus Z, Maróti P (2000) Quinone-dependent delayed fluorescence from reaction center of photosynthetic bacteria. *Biophys J.* 79(1): 14–25

Van Grondelle R (1985) Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems, *Biochim. Biophys. Acta.* 811: 147–195

Van Grondelle R and Duysens LNM (1980) On the Quenching of the Fluorescence Yield in Photosynthetic Systems, *Plant Physiol* 65:751-754.

Venturoli G, Drepper F, Williams JC, Allen JP, Lin X, Mathis P (1998) Effects of Temperature and $\Delta G°$ on Electron Transfer from Citochrome c_2 to the Photosynthetic Reaction Center of the Purple Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys J* 74:3226 – 3240

Vermeglio A, Joliot P (2014) Modulation of the redox state of quinones by light in *Rhodobacter sphaeroides* under anaerobic conditions. *Photosynth Res* 120:237–246

Vermeglio A, Joliot P, Joliot A (1993) The rate of citochrome c_2 photooxidation reflects the subcellular distribution of reaction centers in *Rhodobacter sphaeroides* Ga cells. *Biochim Biophys Acta* 1183:352-360

Vredenberg WJ, Duysens LNM (1963) Transfer of energy from bacteriochlorophyll to a reaction center during bacterial photosynthesis. *Nature* 197:355-357

Wang Q., Liu B., Yang H., Wang X. and Lin Z. (2009) Toxicityof lead, cadmium and mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Meretrix meretrix* larvae, *Ecotoxicology*, 18, 829–837

Wraight CA (2004) Is the midpoint potential of Q_A in bacterial reaction centers pH dependent or independent? Abstracts of the biophysical society 48th annual meeting, MD, Baltimore

Wraight CA, Clayton RK (1973) The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophyll photooxidation in reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta.* 333 :246–260

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) Advances in Photosynthesis and Respiration: *The Purple Phototrophic Bacteria*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 379-405