B 3479

Ph.D. disszertáció

Töltésszétválasztás és fotociklus fotoszintetikus reakciócentrumokban

OSVÁTH SZABOLCS

Témavezető: Dr. Maróti Péter
egyetemi tanár

József Attila Tudományegyetem, Szeged
1997

"Mintha egy falevelet kergettem volna, amelyet egyre csak elfújt előlem a szél. Amikor éppen utólértem, a következő utca sarkára sodródott, úgyhogy már nem is láttam, és újra keresnem kellett."

Hans Erich Nossack

"PS I love you."

The Beatles

TARTALOMJEGYZÉK

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A fotoszintetikus energiaátalakítás 6

1.2. Fotoszintetikus membránok szerveződése 7

1.3. A Mitchell–féle kemiozmotikus elmélet 11

1.4. Transzmembrán töltésszétválasztás 12

1.5. Töltésszétválasztás és szerkezet kapcsolata bíborbaktériumok reakciócentrumában 15

1.6. A bíborbaktériumok reakciócentrumának kinonredukciós fotociklusa 21

2. CÉLKITŰZÉS 26

3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1. A baktériumok tenyésztése 27

3.2. Kromatofóra preparálás 28

3.3. Reakciócentrum izolálás 29

3.4. A másodlagos kinon eltávolítása 31

3.5. Vegyszerek előkészítése 32

3.6. Kloroplasztisz izolálás 33

3.7. A kloroplasztisz irányítása 34

3.8. A fotofeszültség mérése 36

3.9. Fluoreszcencia– és abszorpcióváltozás egyidejű mérése 37

3.10. A fluoreszcencia emissziós spektruma 39

3.11. A 915 nm hullámhossznál megfigyelt fluoreszcencia gerjesztési spektruma 40

3.12. Citokróm átfordulás nagy intenzitású folytonos fényben 41

4. EREDMÉNYEK

4.1. A transzmembrán töltésszétválasztás fénygradiens detektálása 43

4.2. Fényindukált fluoreszcencia változások izolált reakciócentrumban 45

4.3. Izolált reakciócentrum fluoreszcencia spektruma 47

4.4. Izolált reakciócentrum fluoreszcenciájának eredete 49

4.5. A 915 nm hullámhossznál mérhető fluoreszcencia gerjesztési spektruma 52

4.6. A reakciócentrum többszöri átfordulása 54

4.7. Citokróm fotooxidáció 56

4.8. A donor és akceptor készlet kimerülése 58

4.9. Stacionárius citokróm c fotooxidáció 60

4.10. A citokróm c fotooxidáció tranziens fázisa 62

4.11. Citokróm c donálás a savas tartományban 64

4.12. A citokróm c fotooxidáció pH függése 66

5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. A klorofill dimer fluoreszcenciájának függése a reakciócentrum redox állapotától 69

5.2. A fotociklus kinetikai modellje 71

5.3. A fotociklus sebességmeghatározó lépései 74

6. ÖSSZEFOGLALÁS 76

7. FÜGGELÉK 79

8. IRODALOM 81

9. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK 92

10. A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK 93

11. SUMMARY 95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

PS1, PS2	első illetve második fotokémiai rendszer
RC	reakciócentrum
Cit c	lószívből izolált citokróm c
Cit c_2	bíborbakteriális citokróm c_2
UQ_{10}	ubikinon – 50
UQ_6	ubikinon – 30
UQ	ubikinon; 2,3 – dietoxi – 5 metil – 6 izoprenil benzokinon
P vagy D	bakterioklorofill dimer
Bkl	bakterioklorofill
Bfeo	bakteriofeofitin
$NADP^+$	nikotinsavamid – adenin – dinukleotid – foszfát
Fd	ferredoxin
FNR	ferredoxin NADP reduktáz
PC	plasztocianin
H, M, L	a reakciócentrum fehérje alegységei
EDTA	etilén – diamin – tetraecetsav
BSA	marha szérum albumin
DEAE sephacel	dietil – aminoetil sephacel
LDAO	N,N – dimetil – dodecilamid – N – oxid
TX – 100	Triton X – 100 (alkil – fenil – polietilénglikol)
Tris	trisz(hidroxi – metil) – amino – metán
Ches	2 – (N – ciklohexilamino)etánszulfonsav
Pipes	1,4 – piperazin – dietánsulfonsav
Mes	4 – morfolin – etánszulfonsav

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A fotoszintetikus energiaátalakítás

Fotoszintézisnek nevezzük a biológiai reakcióláncok azon típusát, amelyben a szintézishez szükséges energiát a fotokémiai reakciók során stabilizált fényenergia szolgáltatja. Kiindulási anyagai szervetlen vegyületek, termékei az egész élővilág táplálékláncának kiindulását és elsődleges fedezetét nyújtó szerves anyagok (Häder és Tevini, 1987):

$$CO_2 + 2\ H_2A \text{ ----> } [CH_2O] + H_2O + 2\ A$$

Az "A" hidrogén donor természete szerint a fotoszintézist végző növények két nagy csoportba oszthatók. Míg a fotoszintetizáló baktériumok egy része szerves vagy redukált ként tartalmazó vegyületeket oxidál, az oxigénfejlesztő növények képesek a vízről elektronokat elvonni, a folyamat melléktermékeként pedig oxigén szabadul fel. Az ilyen szervezetekben, így a cianobaktériumokban és magasabb rendű zöldnövényekben az "A" hidrogén donor az oxigén (Pierson és Olson, 1987; Cramer és mtsi, 1991).

A fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatait hagyományosan két csoportba sorolják: a fényenergia felvétele és kémiai energiává alakítása, valamint felhasználása a sötét reakciókban (Junge, 1977). Az elnyelt foton energiája átmenetileg különböző módokon tárolódhat, például: gerjesztési energiaként, redox potenciálként, elektrokémiai grádiensként, foszforilációs potenciálként (ATP), vagy más nagy energiájú vegyületekben. Ezek mind a szabadentalpia (Gibbs féle szabadenergia) különböző megjelenési formái. A növény a fényből nyert energiát egyre stabilabb formákban tárolja, a foton

elnyelésétől az élettani folyamatok működtetéséig tizenhat – tizenhét nagyságrendet hidalva át időben (Cramer és Knaff, 1990).

Noha az energiaátalakítás részletei fajról fajra változnak, magas fokú a szerkezeti és funkcionális hasonlóság. A fényből származó energia felvétele és kémiai energiává alakítása membránhoz kötött folyamat, amelyet több pigment–fehérje komplex együttese katalizál (Cramer és mtsi, 1991; Maróti, 1993; Lancaster és Michel, 1996a). A fotszintézis következő, tisztán biokémiai reakciólánca a Calvin ciklus, amelyben a növény szerves vegyületeket szintetizál (Basham, 1979).

1.2. Fotoszintetikus membránok szerveződése

A fényhasznosítás első lépéseit végző fotoszintetikus apparátus bíborbaktériumokban a sejtet határoló membrán kromatofórának nevezett részeiben található (Dutton, 1986). Az oxigén termelő növények fotoszintetikus apparátusa ezzel szemben lipoprotein alapanyagú lapos, zárt membránzsákocskákban helyezkedik el. Ezek a tilakoidoknak nevezett membránvezikulumok vagy szabadon vannak a citoplazmában, mint például a cianobaktériumokban, vagy pedig – az eukarióta sejtekben – sejtszervecskékben, a kloroplasztiszokban találhatók (Staehelin, 1986). Egy kloroplasztiszban körülbelül ezer tilakoid membrán van. A zöldnövényekben ezek egy része szorosan összekapcsolódva egymás mellé tömörödik az ú.n. gránumot alkotva, amiket a kloroplasztisz belső vizes fázisának kitett sztrómatilakoidok kötnek össze (Staehelin, 1986; Stys, 1995). Az így létrejövő tilakoidrendszer membránjai nagyjából párhuzamosan futnak a kloroplasztisz hossztengelyével (Sybesma, 1989).

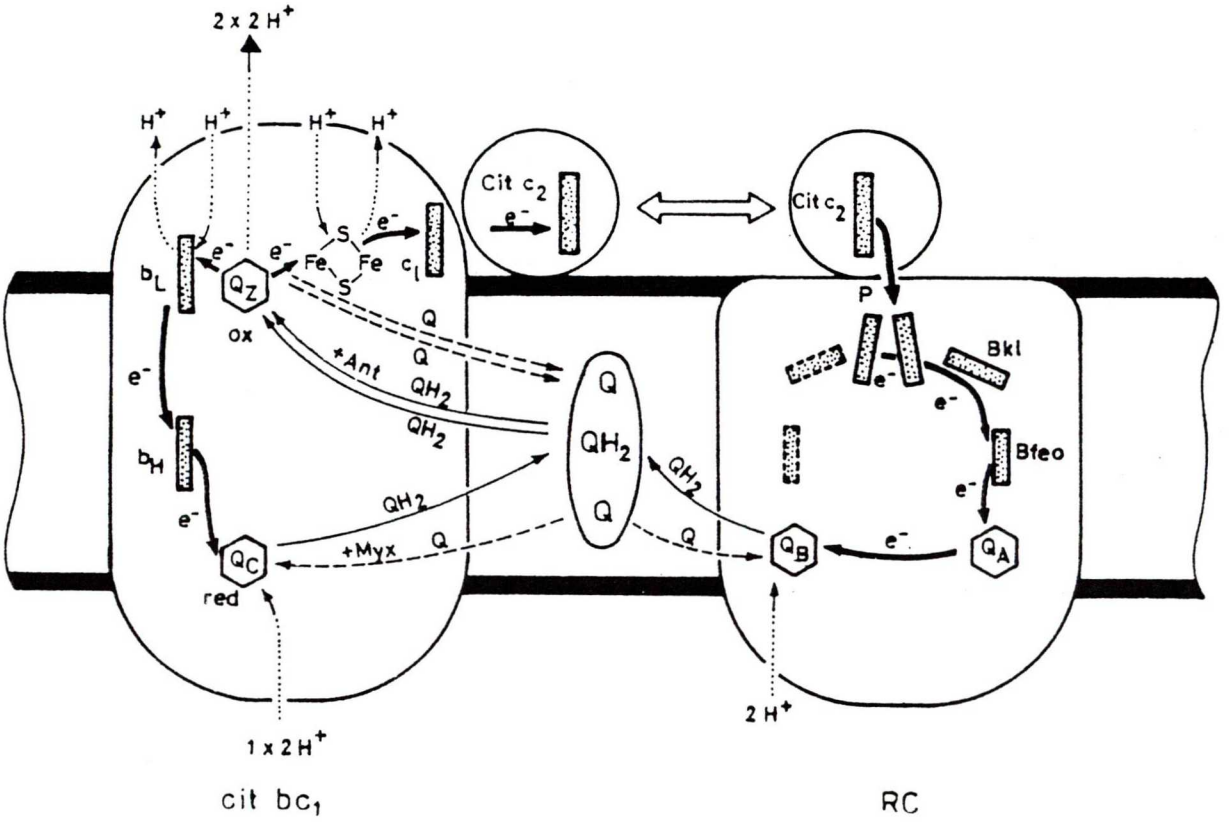
A fényenergia kémiai energiává alakításának első lépését egy speciális pigment–protein komplex, az ú.n. fotoszintetikus reakciócentrum (RC) végzi (Clayton, 1980, Prince és Youvan, 1987). Annak alapfeltétele, hogy a fény energiája a

fotoszintézis során hasznosuljon az, hogy a fény a reakciócentrumban, vagy az őt körülvevő antenna pigment–fehérje komplexekben nyelődjön el. A fotoszintetikus membránok klorofill pigmentjeinek túlnyomó többsége az antenna rendszer része. *Rhodobacter sphaeroides* R–26 mutánsban például a Bkl/RC arány 31.5±3.2 (Francke és Amesz, 1995). Az antennarendszer egyik leglényegesebb feladata a reakciócentrum felé irányuló hatékony energiatranszfer létrehozása (Ort, 1994). A gerjesztési energia a pigmentek közt rezonancia–energiatranszferrel adódik tovább, sztochasztikus energiavándorlást hozva létre az antennarendszerben. Az energiavándorlásnak a pigmentek orientációja és a gerjesztési energiáik közti apró különbségek szabnak irányt (Thornber és Barber, 1979). A gerjesztés továbbadása a mind kisebb gerjesztési energiájú pigmentek irányába megy végbe. Az egymást követő kis energiaveszteségek csökkentik a visszareakció valószínűségét és a gerjesztési energia körülbelül 10^{-11} s alatt a reakciócentrumhoz vándorol (Zuber és Brunisholz, 1991). Itt történik meg az elsődleges fotokémiai reakció: a gerjesztési energia ellentett előjelű töltések szétválasztására fordítódik (Golbeck, 1993). A töltésszétválasztás hatásfoka (különösen a baktériumokban) igen nagy, ezért a fotokémiával versengő veszteségi reakciók (fluoreszcencia, vagy hőként történő disszipáció) csak kis valószínűséggel következnek be (Wraight és Clayton, 1974; Clayton, 1980).

A töltésszétválasztás egymást követő redox lépések során stabilizálódik. A fény által elindított elektrontranszferhez protolitikus reakciók kapcsolódnak, amelyek a membránon keresztül elektrokémiai potenciál gradienst építenek fel (Crofts és Wraight, 1983; Cramer és Knaff, 1990; Graige és mtsi, 1996). A fotoszintetikus proton– és elektrontranszportban több membránba ágyazott és vízoldékony pigment–fehérje komplex vesz részt (Dutton, 1986; Mathis és Rutherford, 1987; Scherer, 1990).

A bíborbaktériumok elektrontranszportja ciklikus, így a fotoszintézis során keletkező transzmembrán elektrokémiai potenciál különbséget az elektrontranszporthoz kapcsolódó proton pumpálás hozza létre. A fény által elindított elektron áram és a

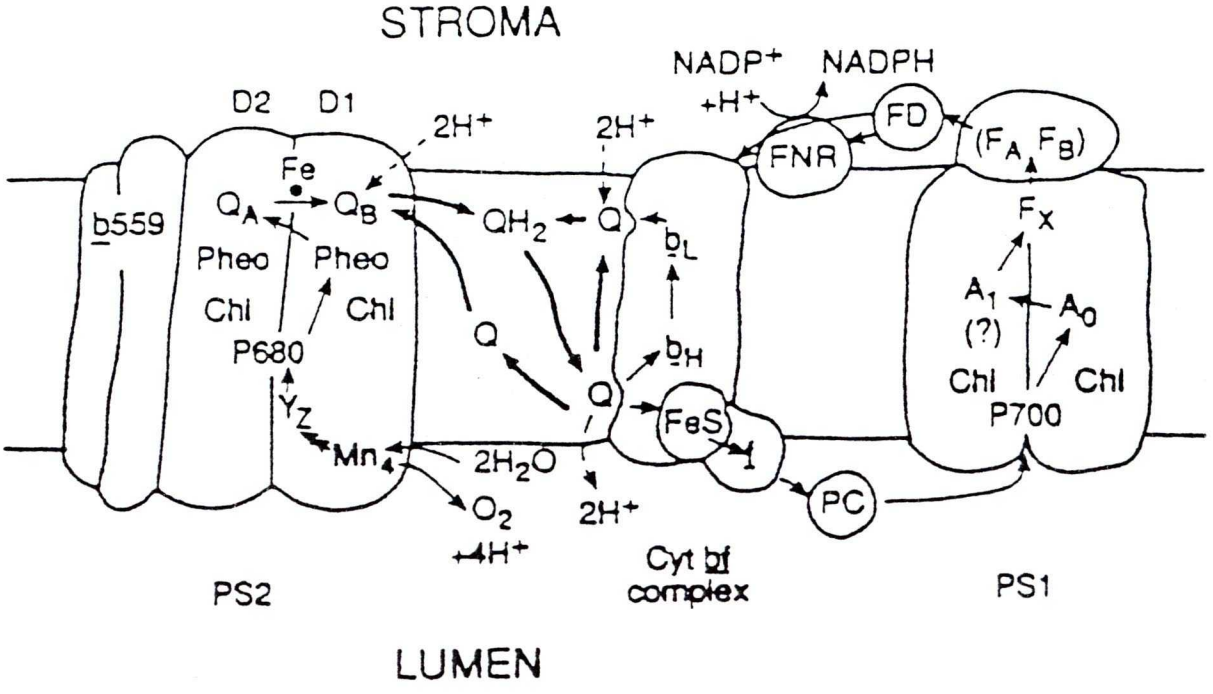
protontranszport közti csatolás a reakciócentrum és az ú.n. citokróm bc_1 oxidoreduktáz együttműködéseként jön létre. A két membránba ágyazott fehérje között a töltéseket a lipid fázisban oldott kinon molekulák és a vízoldékony citokróm c_2 hem tartalmú fehérje komplexek szállítják (Maróti, 1993). Az elektrontranszport ciklust és a hozzá kötődő proton leadás és felvétel lépéseit az 1.1. ábra szemlélteti.



1.1. ábra Összefoglaló modell a bíborbaktériumok elektron– és proton–transzportjára, valamint a köztük levő kapcsolatra. A redox ágensek: a két membránba ágyazott fehérje (reakciócentrum (RC) és a citokróm bc_1 oxidoreduktáz (bc_1)) és az ezeket a hidrofób fázisban összekötő kinon raktár és a periplazmikus oldalon a vízoldékony citokróm c_2 (cit c_2). A bíborbaktériumokban a fény ciklusba záródó elektrontranszport láncot (e^-) és proton pumpát működtet, amelyek hatására elektrokémiai potenciál gradiens épül ki a membrán két oldalán (Maróti, 1990).

A zöldnövényekben a lineáris elektrontranszporthoz ellentett irányú proton szállítás kapcsolódik (lásd 1.2. ábra). A membrán két oldala közti elektrokémiai potenciál különbség felépítéséhez így mind a két töltéstranszport hozzájárul. A víztől kiinduló lineáris elektrontranszport lánc végső elektronakceptora a $NADP^+$. A víz oxidálása és a $NADP^+$ redukálása közti nagy redoxpotenciál különbséget két egymással sorba kötött fotokémiai rendszer hidalja át (Albertsson, 1995). Ily módon egyetlen elektron

átszállításához a vízről a $NADP^+$-ra két foton gerjesztési energiája szükséges (Murphy, 1986; Cramer és Knaff, 1990). A két fotokémiai rendszer mind szerkezetileg, mind funkcionálisan különbözik.



1.2. ábra Az oxigéntermelő növények fotoszintetikus apparátusának szerveződése. Az elektrontranszport lánccal sorba kapcsolt két fotokémiai (PS1, PS2) rendszer között helyezkedik el az ugyancsak membránba ágyazott citokróm b_6f komplex (cit bf). A lineáris elektrontranszporthoz kapcsolódó ellentett irányú protontranszfer a tilakoid két oldala között elektrokémiai potenciál különbséget épít fel. A PS2 és a citokróm b/f komplex között az elektronokat a membrán-oldott plasztokinon raktár, a citokróm b/f és a PS1 között a vízoldékony plasztocianin közvetíti. Az elektrontranszport lánc végső elektron donorja a víz, akceptorja a $NADP^+$, melynek redukálása a ferredoxin (Fd) és ferredoxin-$NADP^+$-reduktáz (FNR) komplexek közvetítésével történik (Fleischman, 1995).

A vízbontásból származó elektronokat a kettes fotokémiai rendszer (PS2) egy plasztokinon raktár redukciójára használja (Rögner és mtsi, 1996). Az elektrontranszport láncban a két fotokémiai rendszer között helyezkedik el a citokróm b_6f fehérje, amely a protonpumpálásban játszik fontos szerepet. A redukált plasztokinon készlet olyan oxidációját katalizálja, amelyben a protonok leadása irányított. A plasztokinol oxidálásából származó elektronokat egy rezet tartalmazó vízoldékony fehérje, a plasztocianin (PC) szállítja a $NADP^+$ redukálását végző első fotokémiai rendszerhez (PS1) (Cramer és mtsi, 1991; Tsiotis és mtsi, 1993; Drepper és mtsi, 1996).

1.3. A Mitchell–féle kemiozmotikus elmélet

Az ATP szintézis és a fotoszintetikus elektrontranszport kapcsolatának magyarázatára a legjobban alátámasztott elmélet a Mitchell–féle kemiozmotikus elmélet (Mitchell, 1961, 1966). Ezen elmélet szerint az élő sejtek energiaátalakító folyamataiban a külső forrásból származó energia nem tud közvetlenül a szervezet számára hasznos munka végzésére fordítódni. Három olyan energia tárolási mód létezik, amely a bioszintézisekben közvetlen felhasználást tesz lehetővé. Ezek az ATP nagy energiájú kötéseiben, valamint a transzmembrán H^+ és a Na^+ ion elektrokémiai potenciál különbségekben (H^+ ill. Na^+ motoros erő) tárolt energia. Minden élő rendszer legalább kettőt használ ezek közül: egy vízoldékony (ATP) és egy membránhoz kötött (H^+ vagy Na^+ motoros erő) tárolási módot. A sejt az összes folyamatainak energia igényét ki tudja elégíteni mindaddig, míg ezek közül legalább egy rendelkezésére áll (Skulachev, 1994).

A Mitchell–féle kemiozmotikus elmélet jól magyarázza az egész sejtben, mitokondriumban és fotoszintetikus membránban lejátszódó folyamatokat. A fotoszintézis során a fény energiája nem közvetlenül használódik fel a növényi bioszintézisben. A fotoszintetikus apparátust tartalmazó zárt szigetelő membrán vizes fázisokat választ el egymástól, vagyis a különböző ionok számára potenciálgátat jelent. Így fenn tudja tartani azt a transzmembrán elektrokémiai potenciál gradienst, amit a fény által hajtott vektoriális elektron– és protontranszport hoz létre. Ezt használja fel a növény ATP szintézisre (Cramer és Knaff, 1990). Az ADP foszforilációjakor fellépő szabadentalpia növekedés (Nicholls és Ferguson, 1992):

$$\Delta G_p = \Delta G^0 + RT \cdot \ln \frac{[ATP]}{[ADP]\,[P_i]}$$

A protonok mozgatása következtében létrejövő szabadentalpia változás:

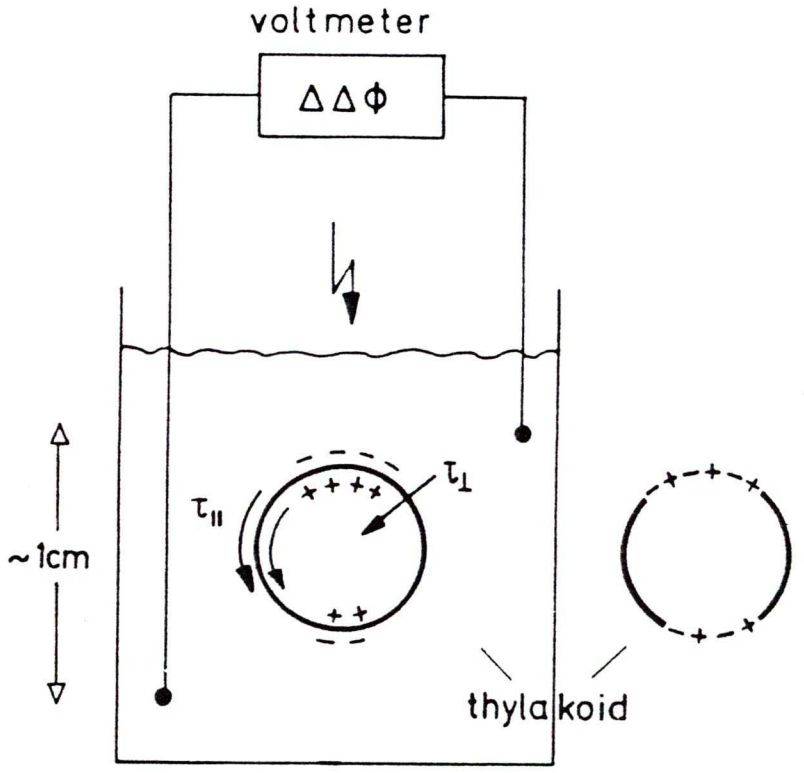
$$\Delta G_H = RT.\ln\frac{[H^+_{DON}]}{[H^+_{AKC}]} + F(\phi_{DON} - \phi_{AKC})$$

Ahol R az egyetemes gázállandó; F a Faraday féle szám; T az abszolút hőmérséklet; Φ az elektromos potenciál; ΔG^0 a standard szabadentalpia, amely függ a pH–tól, Mg^{++} koncentrációtól, ionos összetételtől és hőmérséklettől. A DON (AKC) index a membrán azon oldalának megjelölésére szolgál amely H^+ donorként (H^+ akceptorként) szerepel az energiaátalakítási folyamatokban. Az elektrokémiai potenciál különbség proton áramot tart fent egy speciális membránfehérjén, az ATP–szintetázon keresztül, ami az áthaladó protonok energiáját ATP szintézisre használja fel (Blumenfeld, 1978).

1.4. Transzmembrán töltésszétválasztás

A fényindukált transzmembrán töltésszétválasztás következtében a fotoszintetikus membrán két oldala között 1 – 100 mV elektromos potenciálkülönbség jön létre. Ez makroszkópikus feszültségként direkt módon is érzékelhető. Irányított fotoszintetikus membránt vagy foszfolipid membránba ágyazott reakciócentrumot tartalmazó mintában a fényindukált töltésszétválasztásból származó dipólusok elektromos potenciálja makroszkópikus elektródákkal mérhető feszültséggé összegződik (Schönfeld és mtsi, 1979; Packham és mtsi, 1980; Kaminskaya és mtsi, 1986). A fotoszintetikus töltésszétválasztás a reakciócentrumban végbemenő legnagyobb fényindukált töltéselmozdulás, de hosszabb időskálán a fehérje relaxációjához és a másodlagos kinon akceptor protonációjához tartozó töltésmozgások is megfigyelhetők (Kaminskaya és mtsi, 1986; Shinkarev és mtsi, 1993). A reakciócentrumon belüli elektrontranszfer által keltett feszültség méréséből a bakteriális reakciócentrum

kofaktorainak a membránhoz viszonyított helyzetére következtettek akkor, amikor a röntgendiffrakcióból származó atomi részletességű háromdimenziós szerkezetmodell még nem állt rendelkezésre (Trissl, 1983; Gopher és mtsi, 1985). A különböző mutánsokban lejátszódó töltésmozgásokat vizsgálva a fehérjekörnyezet és a kofaktorok kölcsönhatásáról, valamint a fehérjében végbemenő redox lépések energetikájáról nyertek értékes információt (Brzezinski és mtsi, 1992; Shinkarev és mtsi, 1993).



1.3. ábra A nemtelítési gerjesztő impulzus által indukált fénygradiens feszültség létrejötte zárt fotoszintetikus membránokban (Witt, 1979).

Zárt membránvezikulumokban és egész sejtekben a töltésszétválasztás elektromos detektálása egy másik úton is lehetséges az ú.n. fénygradiens módszerrel (1.3. ábra). Gerjesztő fényfelvillanás hatására a zárt membránok fényforráshoz közelebbi (felső) részét több fény éri, mint a távolabbit (alsó), amelyet leárnyékol. Nemtelítési fényimpulzust alkalmazva a membránok felső részén több töltésszétválasztás keletkezik, mint a fényforrástól távolabb levőben. A reakciócentrum a fotoszintetikus membránban irányítottan helyezkedik el, így a létrejövő aszimmetrikus töltésszétválasztás következtében több dipólus mutat a felső membránokban történt töltésszétválasztással

azonos irányba, mint azzal ellentétesbe. Ez a hatás a minta fényindukált elektromos polarizációjaként jelentkezik (Witt és Zickler, 1973; Fowler és Kok, 1974), lehetővé téve a fotoszintézis gyors töltésmozgásainak tanulmányozását (Leibl és mtsi, 1992a).

A módszer előnye, hogy segítségével a töltésszétválasztással járó elektromos töltésmozgások ép fotoszintetikus membránokon is vizsgálhatók (Leibl és mtsi, 1992a). A fénygradiens jel körülbelül 10 μs alatt lecseng, a transzmembrán elektromos tér lecsengési ideje azonban négy nagyságrenddel hosszabb (Witt, 1979). Míg a transzmembrán elektromos tér a membrán kis vezetőképessége miatt lassan tűnik el, addig a membrán azonos oldalán lévő töltések mozgása a vizes fázis jó vezetőképessége miatt a fénygradiens jelet nagyságrendekkel rövidebb idő alatt kiegyenlíti (Fowler és Kok, 1974).

A fénygradiens jelenség fenti értelmezésének ellentmond, hogy a jel polaritása és kinetikája a gerjesztő fény hullámhosszának függvényében változik (Gräber és Trissl, 1981; Meszéna és DeVault, 1989), valamint nagysága függ a gerjesztő fény polarizáltságától és a membránok rendezettségétől (Becker és mtsi, 1978). A fotofeszültség felfutási ideje (Trissl és mtsi, 1982; Leibl és mtsi, 1992a) és az, hogy a jel függ az akceptor komplex redox állapotától, valamint gátlószerek jelenlététől (Gräber és Trissl, 1981; Leibl és mtsi, 1992a) arra utal, hogy mindkét polaritású jel a fotoszintetikus töltésszétválasztás eredménye. Az ozmotikusan felfújt kloroplasztiszokon végzett mérések eredményei szerint a fotofeszültséget a tilakoidok geometriai tulajdonságai is befolyásolják (Gräber és Trissl, 1981). A kloroplasztisz méretei a látható fény hullámhosszával összemérhetőek. A hullámhosszfüggés magyarázatára kidolgozott hullámoptikai elmélet a tilakoid membránokban lejátszódó fényvisszaverődésre és interferenciára épül (Leibl és mtsi, 1992b; Pallotin és mtsi, 1993; Dobek és mtsi, 1994).

1.5. Töltésszétválasztás és szerkezet kapcsolata a bíborbaktériumok reakciócentrumában

A zöldnövények és baktériumok fotoszintetikus reakciócentrumai a szerkezetük és a működésük alapján két nagy csoportba oszthatók. Az ú.n. PS2 típusú reakciócentrumok akceptor komplexében (ide tartoznak a kén és nem–kén bíborbaktériumok, a zöld nem–kén baktériumok, valamint az oxigént termelő növények második fotokémiai rendszerének reakciócentruma) egy rögzített és egy mobilis kinon molekula található (Mathis és Rutherford, 1987; McPherson és mtsi, 1990a). A PS1 típusúaknál (így a zöld kén–baktériumok, a heliobaktériumok és a magasabb rendű zöldnövényi első fotokémiai rendszer esetén) az akceptor szerepét egy vas–kén komplex tölti be (Amesz, 1991; Blankenship, 1992; Krauss és mtsi, 1993).

Habár az utóbbi időben sikerült elektronmikroszkóppal tanulmányozható két dimenziós kristályokat nyerni PS2–ből (Marr és mtsi, 1996; Nakazato és mtsi, 1996), a térszerkezet nagy feloldású vizsgálatát lehetővé tevő három dimenziós kristályok nem állnak rendelkezésre. A bíborbakteriális reakciócentrum a szerkezeti és működési hasonlósága folytán modellként szolgálhat a bonyolultabb zöldnövényi PS2 működésének megértéséhez (Michel és Deisenhofer, 1988; Sinning, 1992; Takahashi és Wraight, 1994; Sobolev és Edelman, 1995; Rögner és mtsi, 1996).

A PS2 típusú reakciócentrumok szerkezetének feltárása felé az elmúlt évek legnagyobb lépése a bíborbakteriális reakciócentrum fehérje kristályosítása és röntgendiffrakciós vizsgálata volt. Az integrális membránfehérjék közül elsőként a *Rhodopseudomonas viridis*ből izolált reakciócentrum térszerkezetét sikerült atomi feloldással megállapítani. A kristályosítás sikerének kulcsa olyan kis amfifil molekulájú oldószer használata volt, amely ki tudta tölteni a fehérjék hidrofób tartományai közti

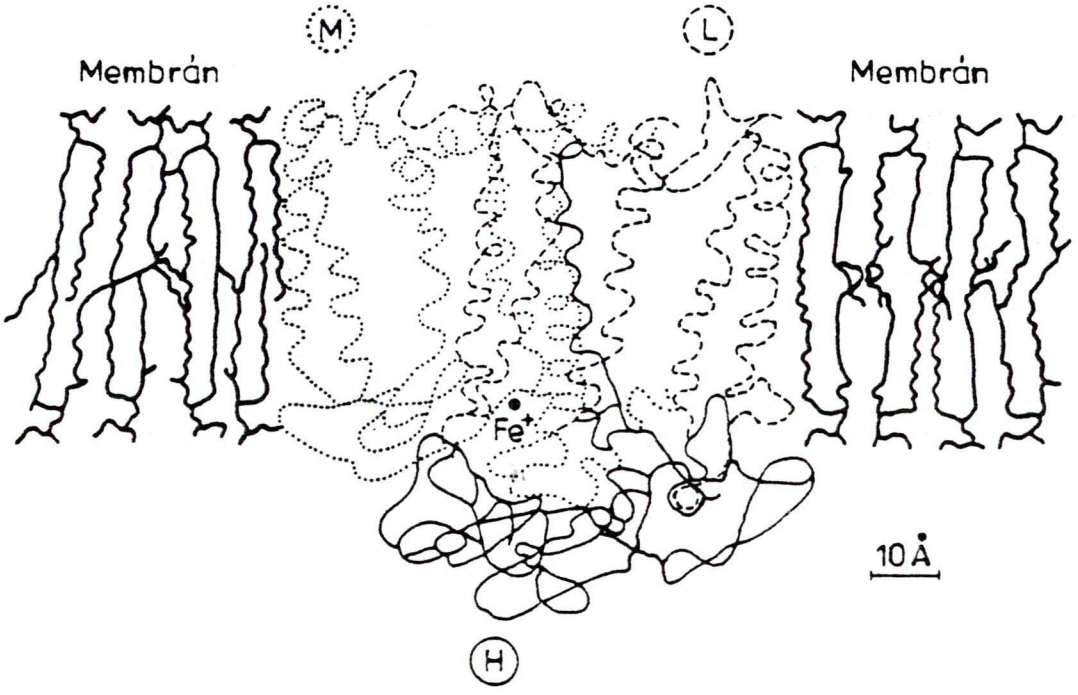
teret (Deisenhofer és mtsi, 1984; Deisenhofer és Michel, 1989). Ma több bíborbaktérium törzs reakciócentrumának szerkezete – így a *Rhodopseudomonas viridis* (Deisenhofer és mtsi, 1985a, 1985b, 1995; Lancaster és Michel, 1996b) és az általunk tanulmányozott *Rhodobacter sphaeroides* R–26 és 2.4.1. (Chang és mtsi, 1986; Allen és mtsi, 1986, 1988; Yeates és mtsi, 1988; Ermler és mtsi, 1994a) atomi részletekig, 2–3 Å feloldással ismert. A már feltárt reakciócentrum szerkezetek kiindulási pontját képezik a PS2 (Sobolev és Edelman, 1995) és más, eddig még nem kristályosított PS2 típusú reakciócentrum fehérjék szerkezetének modellezéséhez (Michel és Deisenhofer, 1988; Sinning, 1992). Ilyen számítások alapján részletes információ áll rendelkezésre például a vizsgálódásainknak ugyancsak tárgyát képező *Rhodobacter capsulatus* reakciócentrum térszerkezetéről (Foloppe és mtsi, 1995).

A *Rhodobacter sphaeroides*ből és *Rhodobacter capsulatus*ból izolált reakciócentrum három fehérjealegységből és a hozzá kapcsolódó kofaktorokból áll. A kofaktorok: egy bakterioklorofill–a dimer (P), két bakterioklorofill–a monomer (Bkl), két bakteriofeofitin (Bfeo), két ubikinon–50 (UQ_{10}), egy nem–hem típusú magas spinű Fe^{2+} és baktériumtörzstől függően egy karotin (Gunner, 1991). Ezek a pigment molekulák nem–kovalensen kötődnek a fehérjéhez (Prince, 1990; Ermler és mtsi, 1994b).

A három polipeptid alegységet L, M és H–val jelölik az angol elnevezésük (light, middle és heavy) kezdőbetűi után. Ez a molekulatömeg szerinti felosztás az SDS poliakrilamid géllel végzett kísérletekből megállapított elektroforetikus mobilitásuk alapján történt (Feher, 1971; Clayton és Haselkorn, 1972). A jelölés azonban félrevezető, mert a későbbi szekvenciaanalízis igazolta, hogy a H alegység a legkisebb. H: 27.4 kD, L: 31.3 kD, M: 34.3 kD (Williams és mtsi, 1984). A H alegység elektroforetikus mobilitásának csökkenése nem a fehérje nagy molekulatömegének tulajdonítható, hanem annak, hogy kevésbé hidrofób, mint a másik két alegység.

Az L és az M polipeptidek 180°–os forgási szimmetriát és nagyfokú homológiát mutatnak: az aminosavak közel 70%–a apoláros, és öt–öt hosszú hidrofób láncot

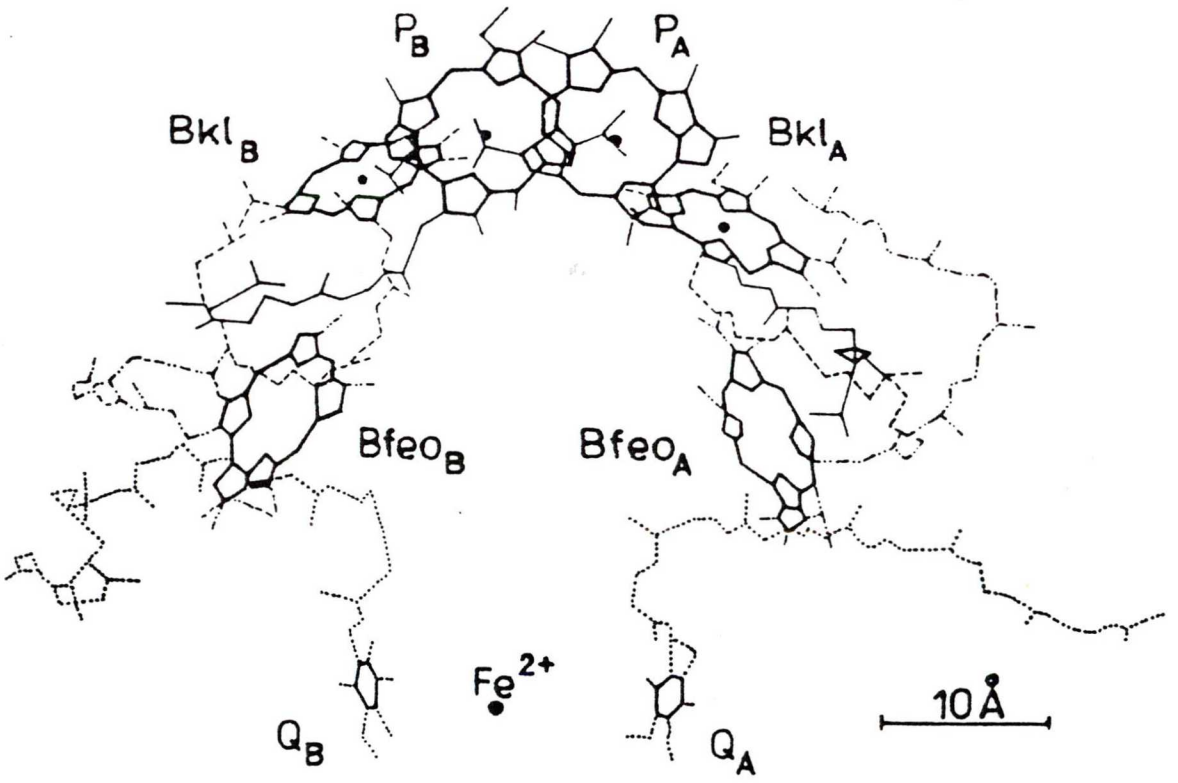
(α–hélixet) képeznek a membránon keresztül (1.4. ábra). Ezek közül 2–2 különösen szorosan kapcsolódik egymáshoz egy hengeres magot alkotva. A szerkezetet a vas atom stabilizálja oly módon, hogy ligandot képez e négy hélix egy–egy hisztidin csoportjával (Ermler és mtsi, 1994a). A H alegység víznek kitett része globuláris szerkezetű, csak egy transzmembrán α–hélixe van és szorosan kapcsolódik az LM komplex citoplazmikus oldalához (Feher és mtsi, 1989).



1.4. ábra A bíborbakteriális (*Rhodobacter sphaeroides*) fotoszintetikus reakciócentrum polipeptid láncának vázlata, és alegységeinek (L, M, H) elhelyezkedése a membránban (Maróti, 1990).

A fehérje prosztetikus csoportjai valamennyien az LM komplex hengeres hidrofób magjában helyezkednek el két, megközelítőleg tükörszimmetrikus A–val illetve B–vel jelölt ágban (1.5. ábra). A fehérje rögzíti a kofaktorokat és megfelelő környezet biztosításával befolyásolja azok fizikai–kémiai tulajdonságát. Nem passzív alanya a fénygerjesztés hatására végbemenő redox változásoknak, hanem (konformáció változásokkal, valamint a kofaktor–fehérje elektrosztatikus kölcsönhatások révén) elősegíti azok lejátszódását (Wraight, 1979; Brzezinski és mtsi, 1992; Brzezinski és Andréasson, 1995). Mindezek eredményeképp a fénygerjesztés által kiváltott elektrontranszfer kvantumhatásfoka 1–hez közeli (Wraight és Clayton, 1974).

Izolált bíborbaktériális reakciócentrum klorofill dimerjét gerjesztve, a töltésszétválasztás mellett veszteségi folyamatok is fellépnek. Így például a gerjesztett dimer a közeli infravörös spektrumtartományban (910 nm körötti széles sávban) fluoreszkál (Zankel és mtsi, 1968; Clayton, 1977; Stadnichuk és Lukashev, 1982). A dimer fluoreszcenciájának kvantumhatásfoka igen alacsony ($\approx 4.10^{-4}$) összevetve a kromatofóra antenna-pigmentjeinek fluoreszcencia hatásfokával ($2.10^{-2}-1.10^{-1}$) (Clayton, 1977, 1980). A dimer fotooxidálásával eltűnik a fluoreszkáló pigment és a fluoreszcencia hatásfoka alacsony marad függetlenül a reakciócentrum további redox változásaitól (Clayton, 1966).



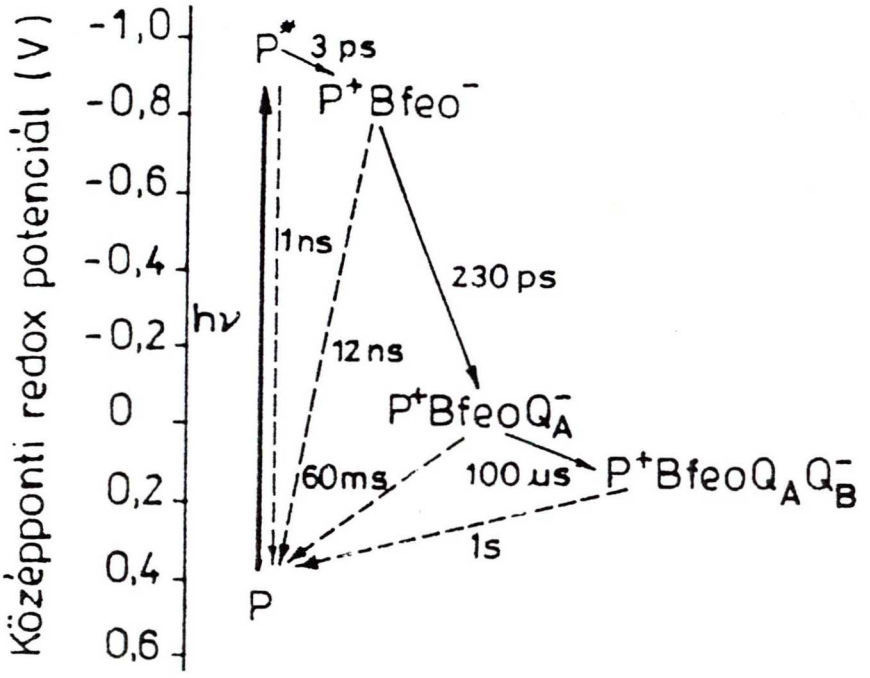
1.5. ábra A bíborbakteriális (*Rhodobacter sphaeroides*) fotoszintetikus reakciócentrum kofaktorainak szimmetrikus elrendeződése az aktív (A) és inaktív (B) ág mentén. Jelölések: P (bakterioklorofill dimer), Bkl (bakterioklorofill monomer, Bfeo (bakteriofeofitin), Q (ubikinon) (Maróti, 1990).

A dimert (P) alkotó bakterioklorofill mint elsődleges elektrondonor vesz részt a redox folyamatban (Feher, 1992). A fényindukált elektrontranszfer a fehérje és a kofaktorok látszólagos szimmetriája ellenére csak az A ág mentén történik (Kirmaier és mtsi, 1985). Ennek egyik kísérleti bizonyítéka, hogy a B ág bakterioklorofilljának

feofitinné redukálása, vagy eltávolítása sem vezet a fotokémiai hatásfok csökkenéséhez (Maróti és mtsi, 1985). Ennek az az oka, hogy a reakciócentrum látszólagos szimmetriája többszörösen is sérül. Így *Rhodobacter sphaeroides* esetén a dimer egyik tetrapiroll gyűrűje kevésbé sík, mint a másik, és más a két központi Mg atom koordinációja is; a bakterioklorofill és a bakteriofeofitin közti távolság 1,5 Å–nel kisebb az A ágban. Ugyancsak sérül a fehérje töltött csoportjainak és a kofaktorok fitil és izoprenoid láncának szimmetriája (Feher és mtsi, 1989; Lancaster és mtsi, 1996). Habár *Rhodobacter sphaeriodes*ben és *Rhodobacter capsulatus*ban mindkét ágban ubikinon–50 foglal helyet, a különböző fehérjekörnyezet következtében redox tulajdonságaik és működésük eltérő. Ellentétben az A ág kinon molekulájával (Q_A), amely fiziológiás körülmények közt csak egyszeresen redukálódik, a Q_B képes kétszeres redukcióra (Okamura és mtsi, 1982). A fehérjével való kölcsönhatás következménye az is, hogy az egyszeresen redukált kinon (szemikinon) nagyságrendekkel stabilabb a fehérjekörnyezetében mint oldatban (Crofts és Wraight, 1983). A Q_A erősen kötött a reakciócentrumhoz, csak drasztikus eljárással távolítható el (Okamura és mtsi, 1975; Liu és mtsi, 1991). Ezzel szemben a Q_B csak lazán kötődik a fehérjéhez, könnyen leválasztható és inhibitorral helyettesíthető (Shinkarev és Wraight, 1993). A Q_B fotoszintézisben betöltött szerepének elengedhetetlen feltétele a dihidrokinon disszociáció és a kinon bekötődés a Q_B zsebbe (McPherson és mtsi, 1990a; Maróti, 1993; Okamura és Feher, 1992, 1995). A kinon akceptorokat körülvevő fehérjekörnyezet aszimmetriájának fontosságát mutatja az is, hogy a két kinon környezetének genetikai manipulációval történő szimmetrizálása a fotoszintetikus aktivitás elvesztésével jár (Taguchi és mtsi, 1996). A reakciócentrum–fehérjének a kinon akceptorok redox és kötődési tulajdonságaira gyakorolt hatása miatt a "kinon akceptor" helyett találóbb a "kinon akceptor komplex" szóhasználat (Wraight, 1979).

A bakterioklorofill dimer pillanatszerű gerjesztése ($P \rightarrow P^*$) után az első tisztán elkülöníthető redox–pár a P^+Bfeo^- (1.6. ábra) körülbelül 3 ps alatt képződik (Gunner, 1991; Holzwarth és Müller, 1996). A monomer bakterioklorofillnak a dimer

és a bakteriofeofitin közti elektron átadás elősegítésében van fontos szerepe. Valószínű, hogy a monomer bakterioklorofill maga is részt vesz az elektrontranszferben és redukálódik (Holzapfel és mtsi, 1989, 1990; Arlt és mtsi, 1993; Holzwarth és Müller, 1996), ez azonban még vitatott (Kirmaier és Holten, 1991, 1993; Woodbury és mtsi, 1994).



1.6. ábra A bíborbaakteriális (*Rhodobacter sphaeroides*) reakciócentrumbeli elektrontranszport kinetikája és energetikája (a protonáció feltüntetése nélkül). Mind az előre irányuló (folytonos vonal) mind a visszareakciók (szaggatott vonal) életidejei fel vannak tüntetve (Maróti, 1990).

A kialakult töltéspár stabilizációjának legfontosabb lépése a Q_A elsődleges kinon akceptor redukciója. A $Bfeo^-Q_A \rightarrow BfeoQ_A^-$ elektrontranszfer félideje körülbelül 200 ps, és a P^+Bfeo^- keletkezéséhez hasonlóan nem igényel termikus gerjesztést (Prince, 1990; Gunner, 1991). Az elektronnak alagút–effektussal való átadását olyan áthidaló molekulák segíthetik, amelyek megnövelik a donor és az akceptor elektronfelhőinek átlapolását. *Rhodobacter sphaeroides*ben ilyen szerepet tölt be például a Trp M252, amely mind a Q_A–val, mind a bakteriofeofitinnel Van der Waals kölcsönhatásban áll (Stilz és mtsi, 1994). Habár a Q_A–nak a $Bfeo^-$ általi redukcióját további elektrontranszfer lépések

követik, itt a legnagyobb a redox potenciál csökkenése, ami a töltésszétválasztást gyakorlatilag irreverzibilissé teszi. Míg a P^+Bfeo^- élettartama 12 ns, addig a $P^+Q_A^-$ állapoté 60–100 ms (Gunner, 1991; Sebban és mtsi, 1995), vagyis a töltéspár rekombinációjának valószínűsége több mint 6 nagyságrenddel csökkent. A stabil $P^+Q_A^-$ töltésszátválasztás ára a gerjesztési energia mintegy 60–70%–ának elvesztése (Feher és mtsi, 1989; McPherson és mtsi, 1990b; Puchenkov és mtsi, 1995). Az elektron 20–200 μs alatti transzfere a Q_A^-–ról a másodlagos kinon akceptorra (Vermeglio és Clayton, 1977; Wraight, 1979) a szétválasztott töltéspár további stabilizációját eredményezi; a rekombináció félideje körülbelül 1 s–ra nő (Maróti, 1990; Baciou és mtsi, 1993; Labahn és mtsi, 1994).

A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektron transzfer termikus gerjesztést igényel és viszonylag nagy egyensúlyi állandó (10–20) jellemzi (Kleinfeld és mtsi, 1984a; Maróti és mtsi, 1994). Az elektron stabilizálásában a másodlagos kinon akceptoron lényeges szerepet játszik a másodlagos kinont kötő zseb aminosavjainak protonálódása (Graige és mtsi, 1996; Lancaster és mtsi, 1996). A Q_A redukálása már kiváltja a Q_B zseb részleges szubsztöchiometrikus (0.2–0.4 H^+/Q_A^-) protonációját (Okamura és Feher, 1992; Kálmán és Maróti, 1994; Maróti és mtsi, 1995). A $Q_A^- \rightarrow Q_B$ elektrontranszfer után a magasabb (0.2–0.8 H^+/Q_B^-) proton felvétel eredményeként a szétválasztott töltéspár energiája tovább csökken (Sebban és mtsi, 1995; Lancaster és mtsi, 1996). Így semleges pH–n mintegy 60 meV–al alacsonyabb a $P^+Q_B^-$ energiája mint a $P^+Q_A^-$ állapotban volt (Maróti és mtsi, 1995; Sebban és mtsi, 1995).

1.6. A bíborbaktériumok reakciócentrumának kinonredukciós fotociklusa

A *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium reakciócentruma jól alkalmazható a kinonredukciós fotociklus tanulmányozására, mivel ismert a térszerkezete (Chang és

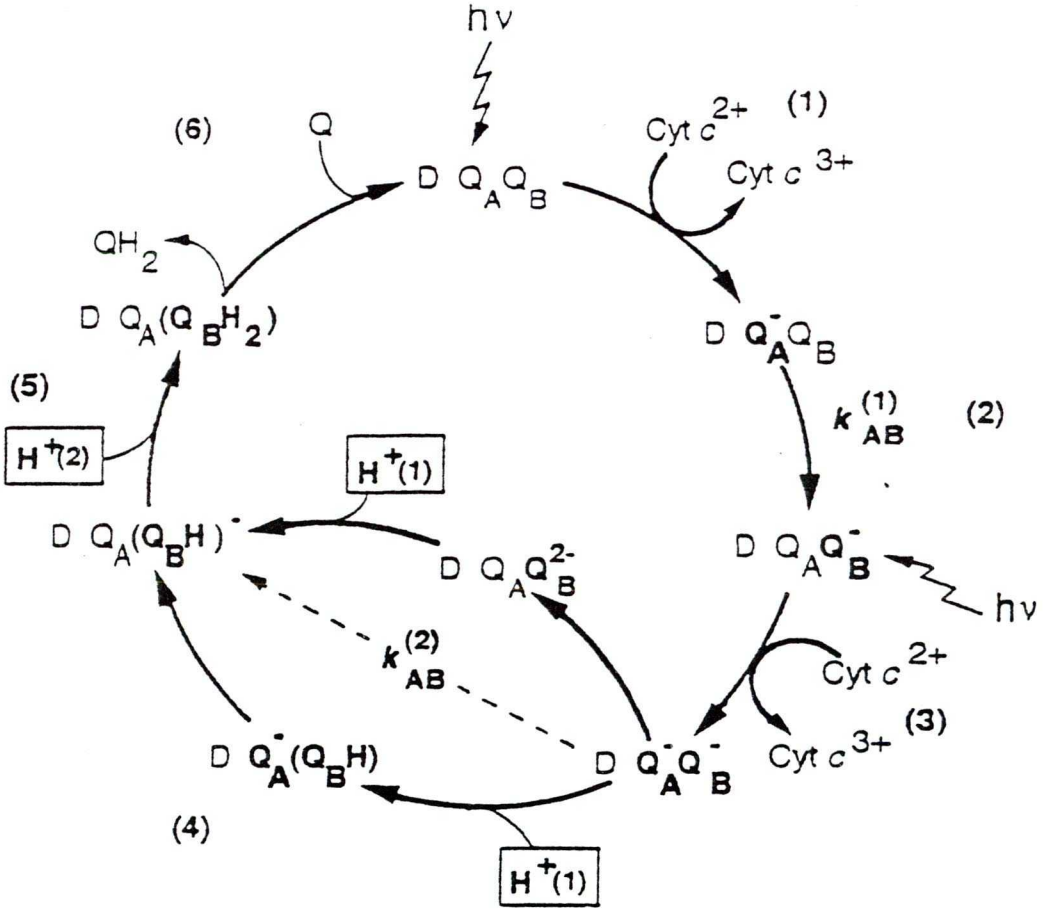
mtsi, 1986; Allen és mtsi, 1986, 1988; Arnoux és mtsi, 1990; Ermler és mtsi, 1994a), az oxigén termelő növényeknél egyszerűbb elektron– és protontranszportját már alaposan tanulmányozták (Crofts és Wraight, 1983; Feher és mtsi, 1989; Kálmán és Maróti, 1994) és sokféle jól definiált mutáns áll rendelkezésre (Paddock és mtsi, 1988; Takahashi és mtsi, 1989; Tandori és mtsi, 1995).

A bíborbakteriális reakciócentrumon belül zajló elektrontranszfer mind a reduktív mind az oxidatív végén kapcsolódik a fotoszintézis és a légzés elektrontranszportjához (Scherer, 1990). A reakciócentrum fehérjét izolálva a fotoszintetikus membránból megszűnik a fotoszintetikus és légzési elektrontranszporttal való kölcsönhatás, és a fehérje fizikai–kémiai környezete kontrollálható. Habár több mutáns baktérium törzs reakciócentruma instabil a membránból való izolálás után, az általunk tanulmányozott *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* törzsekből preparált reakciócentrum stabil, és elterjedten használt a bakteriális reakciócentrum szerkezeti és működési sajátságainak vizsgálatára. A reakciócentrum vizsgálata antennamentes mutánsokon azt mutatja, hogy *in vivo* és a detergensben szolubilizált reakciócentrumban a töltésszétválasztás folyamata gyakorlatilag megegyezik. Ily módon az izolált reakciócentrum vizsgálatából az egész sejtben zajló folyamatokra következtethetünk (Schmidt és mtsi, 1993; Beekman és mtsi, 1995).

A reakciócentrum fotociklusának (1.7. ábra) ismételt fényimpulzus gerjesztéssel indukált legfontosabb lépéseit a citokróm c donor fotooxidációjához kapcsolódó abszorpcióváltozás mérésével már behatóan tanulmányozták (Overfield és Wraight, 1980; Venturoli és mtsi, 1990; McPherson és mtsi, 1990a, 1993, 1994; Okamura és Feher, 1992, 1995).

In vivo a fényindukált töltésszétválasztás során keletkező P^+–t egy gyors citokróm c_2 donor redukálja (Mathis, 1994; Fleishman, 1995; Jenney és mtsi, 1996). Izolált reakciócentrumon folytatott kisérleteknél a cit c_2 mesterségesen hozzáadott vízoldékony citokróm c–vel pótolható. A P^+ citokróm általi redukciója többfázisú.

A reakciócentrum fehérjéhez kötődő redukált citokróm (Tiede és mtsi, 1993; Venturoli és mtsi, 1993; Adir és mtsi, 1996) gyorsan ($\approx$ 1 μs) visszaredukálja a P^+ egy részét. A következő lassabb fázisban azon reakciócentrumok oxidált dimerje redukálódik, amelyekhez korábban nem kapcsolódott citokróm (Lin és mtsi, 1994; Wang és mtsi, 1994). A citokróm c a két fehérje közötti elektrosztatikus kölcsönhatás által irányított módon diffundál a reakciócentrumhoz körülbelül 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ bimolekuláris sebességállandóval (Tiede és mtsi, 1993). A P^+ csak azután redukálódik, hogy a citokróm a reakciócentrumhoz kapcsolódott (Mathis, 1994).



1.7. ábra A kinonredukciós fotociklus vázlata. A fényindukált töltésszétválasztást a P^+ gyors visszaredukciója követi. A két kinon közötti elektrontranszfer után a második fénygerjesztés a Q_B kétszeres redukciójához vezet. Ez két protont felvéve dihidrokinont alkot és kiválik a Q_B zsebből, helyét egy kinon molekulának adva át. A reakciócentrum a fotociklus egyszeri körbefutása alatt egy kinont redukál és két citokróm molekulát oxidál (Feher és Okamura, 1995).

A reakciócentrum a citokrómról származó elektronokat egy membrán-oldott kinon raktár redukálására használja fel (Maróti, 1993; Okamura és Feher, 1995).

A fénygerjesztés hatására a reakciócentrumban elektron továbbítódik a kinon akceptor komplex felé, és redukálja a kinon raktárból a Q_B helyre bekötött kinon molekulákat. A P^+ visszaredukálását követően a szétválasztott töltéspár annyira távol kerül egymástól, hogy a töltésrekombináció valószínűsége elhanyagolható. A Q_B zsebben keletkezett szemikinon körülbelül 10^5–szer erősebben kötődik a fehérjéhez mint a kinon, amely körülbelül egy nagyságrenddel erősebben kötődik, mint a dihidrokinon. A $PQ_AQ_B^-$ élettartama több másodperc is lehet (Wraight és Shopes, 1989; McPherson és mtsi, 1990b; Shinkarev és Wraight, 1993). Ebben az állapotban a reakciócentrum újabb töltésszétválasztásra képes, és fénygerjesztés hatására a fotokémiailag inaktív $P^+Q_A^-Q_B^-$ állapotba kerül (Wraight, 1981; Okamura és Feher, 1995). A P^+–t a citokróm c raktár redukálja; a két kinon közti második elektrontranszfer és a vele csatolt protontranszfer pedig a Q_B zsebben $(Q_BH)^-$ állapotú kétszeresen redukált kinont hoz létre (Kleinfeld és mtsi, 1985; Graige és mtsi, 1996). Ez a citoplazmikus vizes fázisból még egy protont felvéve dihidrokinont képez (Okamura és Feher, 1995). A protonoknak a Q_B zseb belsejében elhelyezkedő kinonhoz való továbbításában kulcsfontosságú szerepe van a fehérje protonálható aminosavjainak (Takahashi és mtsi, 1992; Takahashi és Wraight, 1990, 1992, 1996; Hienerwaldel és mtsi, 1995; Paddock és mtsi, 1994, 1995) és a fehérje szerkezetébe beépülő víz molekuláknak (Hanson és mtsi, 1992; Ermler és mtsi, 1994b; Baciou és Michel, 1995; Lancaster és Michel, 1996a). A vad típusú reakciócentrumban a második proton felvétele nagyon gyors, így a $Q_A(Q_BH)^-$ állapot nem halmozódik fel. Néhány (főleg az L212 glutaminsavat érintő) mutánsban a második protontranszfer lelassul és újabb foton gerjesztés a $Q_A^-(Q_BH)^-$ forma kialakulásához vezet, amely a második proton felvételével lassan $Q_A^-Q_BH_2$ állapotba jut (Takahashi és Wraight, 1992; 1996; Maróti és mtsi, 1994; Paddock és mtsi, 1994). A Q_B helyen keletkezett dihidrokinon kiválik a Q_B zsebből, helyét a kinon raktár más kinon molekulájának adva át (McPherson és mtsi, 1990a). A reakciócentrum így egy kinonredukciós fotociklus befutása után visszakerült a kiindulási állapotba (Okamura és Feher, 1995).

A reakciócentrum a fotociklus alatt egy kinon molekula dihidrokinonná redukálása közben két citokróm molekulát oxidál. Kihasználva a citokróm c redukált (cit^{2+}) és oxidált (cit^{3+}) formáinak abszorpciója közti különbséget, a citokróm redox állapotának változásai jól mérhetőek (Van Gelder és Slater, 1962; Okamura és Feher 1995). Ebből következtetni lehet a reakciócentrumon áthaladó elektronáramra. A módszert elterjedten használják mutáns reakciócentrumok fotoszintetikus aktivitásának vizsgálatára (Beroza és mtsi, 1992; Rongey és mtsi, 1993; Okamura és Feher, 1992, 1995).

2. CÉLKITŰZÉS

Izolált bíborbakteriális reakciócentrumok fotociklusának általánosan elfogadott modellje egymás utáni telítési fényfelvillanásokkal végzett kísérleteken alapul. Ezek a dihidroknon→kinon és a cit^{3+}→cit^{2+} kicserélődést csak kvalitatívan tárgyalják (Paddock és mtsi, 1988, 1994, Graige és mtsi, 1996).

Célom az volt, hogy a donor és akceptor készlet nagyságának változtatásával és folytonos gerjesztő fény alkalmazásával az *in vivo* állapothoz hasonló körülmények között tanulmányozzam a bíborbakteriális reakciócentrum fotociklusát. A munka során felmerülő legfontosabb kérdések:

Hogyan függ a *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* bíborbaktériumokból izolált reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka a kofaktorok redox állapotától?

Milyen eltérés tapasztalható a két bíborbaktérium törzs reakciócentrumának fluoreszcencia emissziós és gerjesztési spektrumában?

Milyen pigmentektől származik az izolált reakciócentrum fluoreszcenciája és melyek a fotoszintézis szempontjából fontos kioltók?

Milyen modell alkalmazható a reakciócentrumban folytonos fényben, donor és akceptor jelenlétében végbemenő redox folyamatok leírására?

Milyen gyors a reakciócentrum donor és akceptor molekuláinak kicserélődése, melyek a fotociklus sebességmeghatározó lépései, és hogyan függnek a pH–tól?

Milyen egyszerű – mutánsok összehasonlítására rutinszerűen használható – eljárások léteznek a reakciócentrum sebességmeghatározó lépéseinek és átfordulási sebességének jellemzésére?

3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1. A baktériumok tenyésztése

A vizsgálatok nagy részét *Rhodobacter sphaeriodes* és *Rhodobacter capsulatus* bíborbaktériumokból izolált reakciócentrumon végeztem. A *Rhodobacter sphaeroides* R–26 mutánsból hiányoznak a látható tartományban erősen elnyelő karotenoidok, így a kis abszorpcióváltozások mérését nem zavarja a más törzsekben fellépő karotenoid háttérabszorpció (Yeates és mtsi, 1988).

A *Rhodobacter sphaeriodes* R–26 törzset szúrt tenyészetekben szobahőmérsékleten, gyenge ($< 10\ \mu Em^{-2}s^{-1}$) megvilágítás mellett 1.5% agar–agar gélen (benne 0.5% élesztőkivonat és 0.3% kazaminosav) tartottuk. A baktériumokat fototróp módon Siström tápoldatban neveltük, ahol egyedüli szénforrásuk a szukcinát volt. A tenyészetet friss tápoldattal steril körülmények között 24 óránként tízszeresére hígítottuk. Átoltás után 5–8 órát sötétben tartottuk a tenyészetet. Ez alatt az idő alatt a baktériumok légzése felhasználta a tápoldatban oldott oxigén nagy részét, így a megvilágítás megkezdésekor a tápoldat gyakorlatilag oxigénmentes volt. Erre azért volt szükség, mert a gerjesztett klorofill molekulák az R–26 törzsben – a karotenoidok védelme hiányában – a tápoldatban oldott oxigén roncsoló hatásának fokozottan ki vannak téve. A körülbelül 300 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ megvilágítást 60 W–os wolframszálas izzókkal biztosítottuk, amelyek vörösben gazdag fénye a klorofillok fő abszorpciós sávjában erős gerjesztést szolgáltat. A szuszpenzió hőmérsékletét 28–32 °C–on stabilizáltuk. Négy–öt napi állandó fényen történő tenyésztés után a növekedés késői logaritmikus szakaszában lecentrifugáltuk a sejteket és preparálásig –25 °C hőmérsékleten befagyasztva tároltuk.

3.2. Kromatofóra preparálás

A kromatofóra és a reakciócentrum preparálás során a 20000 x g vagy annál kisebb gyrosulású centrifugálást Sorvall RC-5 típusú centrifugán SS34-es rotorral, az ultracentrifugálást (200000 x g) Backman L7-65 ultracentrifugán TI60-as rotorral végeztük.

A reakciócentrum preparálás kiindulópontját jelentő kromatofórát 80 – 100 g vizes tömegű lecentrifugált és mosott bíborbaktérium sejtből készítettük az alábbiak szerint.

A sejteket feltörés előtt pufferrel (100 mM NaCl, 10 mM Tris/KOH pH: 8.0) átmostuk, 8000 x g gyorsulással 10 percig centrifugáltuk, majd ugyanilyen pufferben újraszuszpendáltuk. A kromatofóra és a reakciócentrum preparálás valamint a reakciócentrum tisztítás és ultraszűrés összes lépése 4 °C hőmérsékleten történt, kivéve ahol másképp van feltüntetve.

A felszuszpendált baktériumsejteket hidraulikus sajtóval (French press) 140 MPa nyomáson 3 – 4 ml/perc sebességgel feltörtük. Előzetesen a szuszpenzióhoz adott 1 mg/ml mennyiségű DN-áz a DNS szálak feldarabolásával megkönnyítette a megfelelő kifolyási sebesség beállítását, tökéletesebb feltörést téve lehetővé. A feltárt sejtszuszpenzióhoz azonnal 20 mM EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav) adtunk azon proteázok aktivitásának csökkentésére, amelyek működéséhez (a feltörés során nagy mennyiségben keletkező) kétértékű kationok kellenek.

A feltört sejteket a sejtmaradványok és még feltöretlen sejtek eltávolítása érdekében 20000 x g gyorsulással 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót 200000 x g gyorsulással 90 percig ultracentrifugáltuk. A kromatofórát tartalmazó üledéket minimális mennyiségű pufferben (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/KOH pH: 8.0)

ecsettel felszuszpendáltuk, de kihagytuk a szürke, kemény központi magot, amely sejtfal és szervetlen anyag maradványokat tartalmazott.

Az így nyert kromatofóra a későbbi felhasználásig befagyasztható, és −25 °C hőmérsékleten tárolható.

3.3. Reakciócentrum izolálás

A reakciócentrum fehérjét a kromatofóra membránokból LDAO (N,N−dimetil−dodecilamin−N−oxid) ionikus detergenssel oldottuk ki.

Az előbbiek szerint elkészített kromatofóra 860 nm hullámhosszon mért optikai denzitását pufferrel 50−re hígítottuk. Szobahőmérsékleten, sötétben és állandó keverés mellett 30%−os törzsoldatból LDAO−t csepegtettünk a kromatofóra szuszpenzióhoz 0.45% végső koncentrációig. 20 μM EDTA hozzáadása után 30 percig inkubáltuk, majd 200000 x g gyorsulással 120 percig ultracentrifugáltuk. A kioldott reakciócentrumok 90%−a a kékes−barna színű felülúszóban maradt. A kitermelés hatékonyságát a spektrum alapján ($\epsilon_{800\ nm}$ = 288 $mM^{-1}cm^{-1}$; Straley és mtsi, 1973), vagy pedig a reakciócentrum klorofill dimer fényindukált abszorpcióváltozásából ($\Delta\epsilon_{860\ nm}$ = 120 $mM^{-1}cm^{-1}$, Maróti és mtsi, 1985) ellenőriztük. A preparálás hatékonysága kielégítő, ha legalább 3 μmól reakciócentrumot termelt ki 80−100 g vizes tömegű baktériumból. Ha a kioldás hatékonysága nem elegendő, az üledéken meg lehet ismételni az LDAO−val feltárás műveletét.

A reakciócentrum tisztítását frakcionált ammónium szulfátos kicsapással és anioncserélő kromatográfiával végeztük.

Először újabb LDAO hozzáadással a detergens koncentrációt 1%−ra növeltük, mert ilyen körülmények között a kicsapás során a felszínen úszó lepedék stabilabb volt. A reakciócentrum oldathoz apránként szilárd ammónium−szulfátot adtunk (0.27 g/ml),

miközben NaOH csepegtetéssel a pH értékét stabilan tartottuk (pH: 8.0). A kicsapódott és az ammónium–szulfátos oldatnál kisebb sűrűségű reakciócentrum 10 percig tartó 8000 x g gyorsulású centrifugálás után vízoldékony hártyaként az oldat tetejére emelkedett. Ezt 0.3% LDAO, 10 mM Tris/KOH pH: 8.0 pufferben felszuszpendáltuk. A másodszori kicsapás 0.25 g/ml ammónium–szulfáttal történt. A megfelelő koncentrációt a szuszpenzióval egyenlő térfogatú AS puffer (0.5 g/ml ammónium–szulfát, 0.3% LDAO, 10 mM Tris/KOH pH: 8.0) hozzáadásával értük el. A felül úszó hártya újraszuszpendálása után alacsonyabb sókoncentráció (0.12 mg/ml ammónium–szulfát) mellett a reakciócentrumtól különböző fehérjéket csaptuk ki (szürkészöld színű üledék). A 10000 x g gyorsulással 10 perc alatt elválasztott felülúszót tovább tisztítottuk AS puffer lassú csepegtetésével további szennyeződést csapva ki. A lassú AS puffer hozzáadást addig végeztük, míg az oldat enyhén fátyolossá vált a kicsapódás jeleként. Ez körülbelül 0.13 – 0.15 g/ml koncentrációnál következett be. A 10 perc (8000 x g) centrifugálás után nyert felülúszóból a reakciócentrumot további AS puffer hozzáadással (0.25 g/ml koncentrációig) kicsaptuk. Az újraszuszpendálás után nyert reakciócentrum tisztaságát a 280 és 800 nm hullámhosszaknál mért abszorpciók arányából állapítottuk meg. A tiszta reakciócentrumban ez az arány 1.22. Ha az A_{280}/A_{800} arány 1.8 alatt volt a tisztítást oszlopkromatográfiás úton folytattuk. Szükség esetén az ammónium–szulfátos kicsapás utolsó két lépését megismételtük.

A frakcionált ammónium–szulfátos kicsapás után rögtön helyreállítottuk a reakciócentrum kinon–aktivitását öt–tízszeres sztöchiometrikus mennyiségű 30% Triton X–100–ban szuszpendált ubikinon–50 (UQ_{10}) hozzáadásával. A só eltávolítása érdekében TL pufferben (0.1% LDAO, 20 μM EDTA, 10 mM Tris/KOH pH: 8.0) 4 °C hőmérsékleten 12 órát dializáltuk, és a dializáló oldatot többször cseréltük.

Ezzel párhuzamosan előkészítettük a 40 – 50 ml térfogatú anion cserélő (DEAE Sephacel, Sigma) oszlopot. Miután 1 M–os NaCl oldattal lemostuk a korábbi kromatografálásból visszamaradt szennyeződéseket, több liter TL pufferrel való

átmosással egyensúlyba hoztuk. A TL puffert addig folyattuk át az oszlopanyagon, amíg az oldat pH-ja nem változott az oszlopon való átfolyás alatt. Ezután a dializált reakciócentrumot felrétegeztük az oszlop tetejére. A szennyezéseket 60 mM NaCl-ot tartalmazó TL pufferrel távolítottuk el, addig csorgatva át az oldatot (tipikusan 0.5 – 2 l), amíg az eluátum tiszta nem volt. A reakciócentrum ez alatt lassan lefelé csúszott. A tisztított reakciócentrum nagy részét TL pufferben oldott 150 mM NaCl segítségével választottuk le az oszlopról. A fő sáv lecsöpögése után a maradék kevésbé tiszta reakciócentrumot 400 mM NaCl (TL pufferben) oldattal mostuk le. A frakciókat tisztaság szerint csoportosítva ultraszűréssel töményítettük 70 – 120 μM koncentrációig.

Mivel a betöltetlen (üres) másodlagos kinonkötőhely még 4 °C hőmérsékleten is gyorsan roncsolódik, a preparátumhoz ötszörös sztöchiometrikus mennyiségű Triton X-100-ban szuszpendált UQ_{10}-et adtunk. A magas só és detergens koncentrációt a reakciócentrumnak 0.03% LDAO, 20 μM EDTA, 10 mM Tris/KOH pH: 8.0 pufferben való dializálásával csökkentettük, majd a reakciócentrumot -25 °C-on befagyasztva tároltuk.

A *Rhodobacter capsulatus* reakciócentrumot Dr. Piere Sebbantól kaptuk a Balaton program keretében.

3.4. A másodlagos kinon eltávolítása

A másodlagos kinon titrálását UQ_6-tal végeztük. A kinon készlet homogenitása érdekében a titrálás előtt a reakciócentrumból oszlopkromatográfiás úton eltávolítottuk a natív (UQ_{10}) másodlagos kinont.

A DEAE Sephacel (Sigma) oszlopanyagot felhasználás előtt 1 M-os NaCl oldattal átmostuk, majd TL pufferrel egyensúlyba hoztuk. Ezután TL pufferrel készített 1 mg/ml marha szérumalbumin (BSA) oldatban 27 °C hőmérsékleten 60 percig inkubáltuk.

A felesleges BSA–t 200 ml 500 mM–os NaCl (TL pufferben) oldatot átcsorgatva távolítottuk el. A NaCl–ot 500 ml TL pufferrel mostuk le az oszlopról. Az ily módon előkészített anyagot felhasználásig 4 °C–on tároltuk.

Az előbbiek szerint előkészített oszlopanyagot azonos térfogatú 30 – 35 μM–os reakciócentrummal (TL pufferben) öntöttük össze. A reakciócentrum 4 °C–on 10 perc óvatos kavargatás után hozzákötődött az oszlopanyaghoz. Az oszlopot ezután készítettük el három rétegből oly módon, hogy két körülbelül 1 cm vastag BSA–val előkezelt oszlopanyag közzé rétegeztük a reakciócentrumot is tartalmazó oszlopanyagot. A másodlagos kinont 150 – 200 ml pufferrel (3% LDAO, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH: 8.0), de legfeljebb 60 percig, sötétben, 27 °C–on átmosva távolítottuk el. A detergens koncentrációt ismét 0.1%–ra csökkentettük 150 ml TL puffert 4 °C hőmérsékleten átcsorgatva az oszlopon. A reakciócentrumot 300 mM NaCl, 0.025% LDAO, 10 mM Tris pH: 8.0 pufferrel választottuk le az oszlopról. A másodlagos kinon eltávolításának hatékonyságát citokróm átfordulás mérésével ellenőriztük. 1 μM reakciócentrumot tartalmazó mintát megvilágítva 1.1 – 1.4 μM citokróm c fotooxidálódott, ami 5 – 20%–os kinonbetöltöttségnek felel meg (Okamura és mtsi, 1982). A NaCl koncentrációját ultraszűréssel csökkentettük, majd a mintát további felhasználásig –25 °C hőmérsékleten befagyasztva tároltuk.

3.5. Vegyszerek előkészítése

A mérések során a reakciócentrum preparátumhoz a vegyszereket vagy vizes, vagy alkoholos oldat formájában adtuk, mindvégig ügyelve, hogy az alkohol koncentrációja 2% alatt maradjon.

A másodlagos kinon–aktivitás helyreállítására ubikinon–30–t (UQ_6, Sigma) vagy ubikinon–50–t (UQ_{10}, Sigma) használtunk. Az UQ_6–ot 10 mM–os –25 °C–n tárolt

alkoholos törzsoldatból adtuk a mintához. Az UQ_{10} a rossz oldhatósága miatt nem vihető be a mintába μM–os mennyiségben alkoholos oldatból. Ezért a 60 mM–os törzsoldat elkészítésekor a UQ_{10}–et 30% Triton X–100–ban szuszpendáltuk ultrahangos kezeléssel és felhasználásig –25 °C hőmérsékleten tároltuk.

A másodlagos kinon–aktivitás gátlására használt terbutrint –25 °C–on tárolt 10 mM–os alkoholos törzsoldatból adtunk a mintához.

Az oxidált klorofill dimer elektron donorjaként vagy ferrocént (dikloropentadienil–vas) (Sigma) vagy marha szívből kivont citokróm c–t (Sigma) használtunk. A ferrocént egy –25 °C–on tárolt 50 mM–os alkoholos törzsoldatból vittük a mintába. A vízoldékony citokróm c–ből és 2.5 ml frissen preparált, 65 mM töménységben aszkorbinsavat tartalmazó tris–pufferből (10 mM Tris/KOH pH: 8.0) 6.5 mM–os oldatot készítettünk. Az így redukált citokróm c–t tartalmazó oldatot a felesleges aszkorbinsavtól Pharma Biotech PD–10 (Sephadex G–25 M anyagot tartalmazó) oszlopon választottuk szét. Először az oszlopanyagot 25 ml tris–pufferrel egyensúlyba hoztuk, majd rátöltöttük a citokrómot tartalmazó oldatot. A citokrómot miután az oldat beleszaladt az oszlopba tris–pufferrel hoztunk le. Az így nyert, körülbelül 5.5 mM koncentrációjú redukált citokrómot a további felhasználásig nitrogén atmoszféra alatt lefagyasztottuk és –25 °C–n tároltuk.

3.6. Kloroplasztisz izolálás

A nem–telítési fényimpulzus által indukált fotofeszültség méréseket borsólevelekből (*Pisum sativum*) az alábbi eljárás szerint izolált intakt kloroplasztiszon végeztem.

Két hetes, üvegházban nevelt borsó leveleit egy mixerbe tettük, homogenizáló (0.35 M szorbit, 0.2 mM $MgCl_2$, 20 mM tricin / KOH pH: 7.8.) pufferrel felöntöttük,

hogy ellepje, majd 5 s-ig aprítottuk. Ezután 20 μm-es szűrőn átszűrtük. A centrifugálást Sorvall RC-5 típusú centrifugán, SS34-es rotorral végeztük. Centrifugacsövekbe szétöntve 1 percig 500 x g-vel eltávolítottuk a törmeléket, a felülúszót 2000 x g-vel 1 percig centrifugáltuk. Az üledéket mosó (0.35 M szorbit, 1 mM tricin / KOH pH: 7.8.) pufferben ecsettel felszuszpendáltuk és ismét 2000 x g-vel 1 percig centrifugáltuk. Az így nyert üledéket szuszpendáló pufferben (0.35 M szorbit, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 20 mM tricin / KOH pH: 7.8.) a kellő töménységűre szuszpendáltuk és felhasználásig jégen tároltuk.

Az izolált kloroplasztisz pigmenttartalmának meghatározása Arnon módszerével történt (Arnon, 1949): 10 ml 80%-os acetonba 100 μl preparátumot adva az aceton kioldotta a membránból a pigmenteket és kicsapta a feherjéket, az utóbbiak öt perc centrifugálás után leülepedtek a centrifugacső aljára. Ezután a felülúszó abszorpcióját három hullámhosszon megmérve a klorofilltartalom az alábbi módon határozható meg:

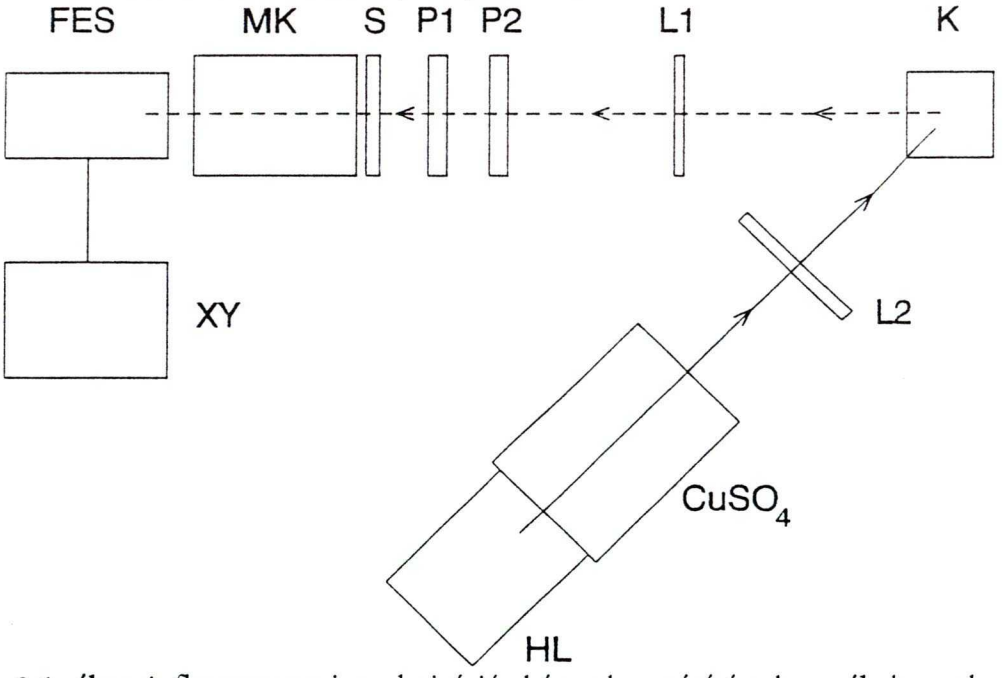
$$Kl(a+b) = 0.802\ A_{664-720} + 2.02\ A_{646-720}\ (mg/ml).$$

Ahol $A_{664-720}$ a 664 nm és a 720 nm, $A_{646-720}$ pedig a 646 nm és a 720 nm hullámhosszaknál (1 cm-s küvettában) mért abszorpciók különbsége. A méréseket 100 μg/ml klorofilltartalmú mintán végeztem.

3.7. A kloroplasztisz irányítása

A kloroplasztiszok irányítására 1.2 T mágneses teret, a membránok immobilizására VII típusú Sigma poliagaróz gélt használtam. A poliagaróz gél 98% szuszpendáló puffer és 2% agarózzal készült, amelyet kavargatva addig melegítettem, míg teljesen átlátszó oldattá vált. Ezt az oldatot 28°C alá hűtve kialakul a poliagaróz és a gél megköt. A kloroplasztiszt 38°C hőmérsékletű agarózhoz adtam.

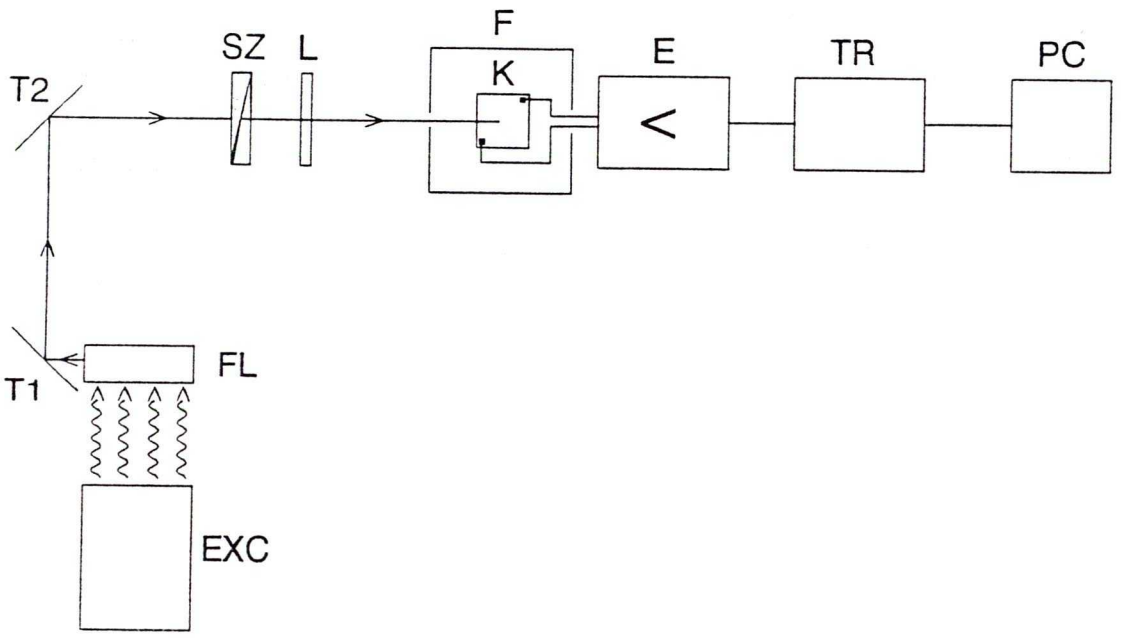
Az irányítás hatékonyságát a fluoreszcencia polarizáció hányados mérésével ellenőriztem (Garab és Breton, 1976). A mintát higanylámpa gerjesztette (18.2 V / 6.2 – 5.5 A) 25 cm hőszűrőként használt $CuSO_4$ oldaton keresztül. Annak érdekében, hogy minél kevesebb gerjesztő fény szóródjon a fotoelektronsokszorozóba (HAMAMATSU R–3310–03), a 3.1. ábrán látható módon a megfigyelés oldala felől ferdén világítottam meg. A fluoreszcenciát 685 nm hullámhossznál figyeltem meg, két polarizátoron keresztül engedve a monokromátorba (ZEISS SPM2), hogy kiküszöböljem a rácsnak a fény polarizációs irányától függő hatását. Az ábrán P1 jelű polarizátort két egymásra merőleges helyzet között lehetett váltogatni. A kettő közt 45° alatt helyezkedett el a P2 polarizátor úgy, hogy polarizálatlan flureszcencia mellett P1 mindkét helyzetében a monokromátorba jutó fény intenzitása azonos legyen. Ehhez a polarizálatlan fényt kloroplasztiszból acetonban kioldott klorofill oldat fluoreszcenciája szolgáltatta. A polarizálatlan gerjesztő fényben rendezetlenül elhelyezkedő oldott klorofill molekulák fluoreszcenciája is polarizálatlan.



3.1. ábra A fluoreszcencia polarizációs hányados mérésére használt berendezés vázlata. A mintára (K) ferdén beeső gerjesztő fényt egy higanylápma (HL) $CuSO_4$ oldaton ($CuSO_4$) átvezetett és fókuszált (L2, lencse) fénye szolgáltatta. A fluoreszcens fényt kondenzor lencse (L1) képezte le egy ZEISS 287342 monokromátor (MK) bemenő résére a P1 forgatható és P2 rögzített helyzetű polarizátoron valamint egy Schott RG 665 vörös szűrőn (S) keresztül. A fluoreszcencia jeleket egy fotoelektronsokszorozó (FES) detektálta és K210 típusú xy íróval (XY) rögzítette.

3.8. A fotofeszültség mérése

A fénygradiens elektromos jel mérésére használt berendezés vázlata az 3.2. ábrán látható.



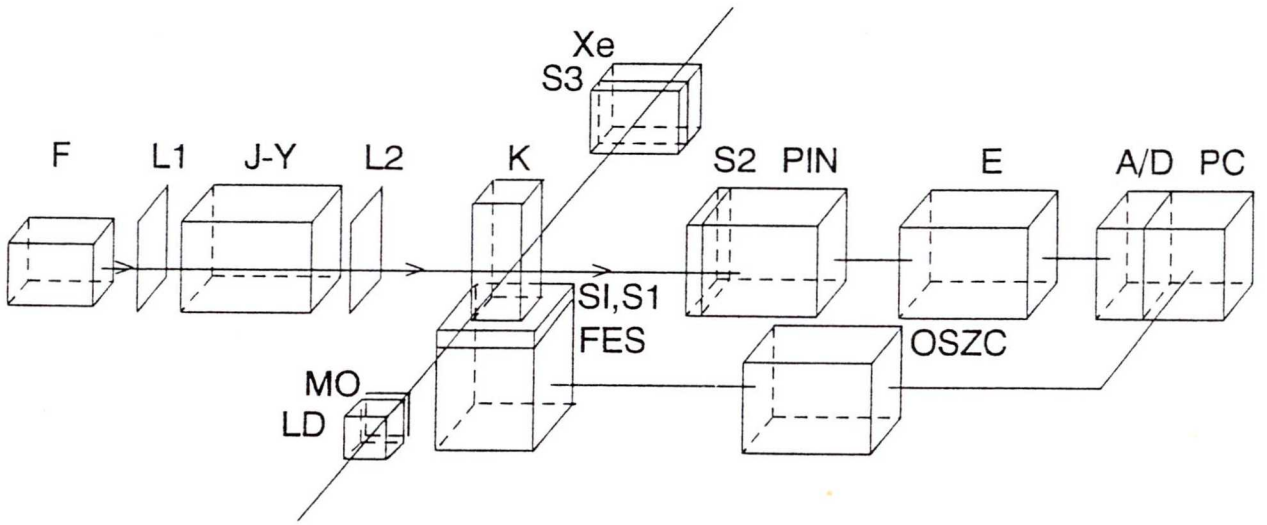
3.2. ábra A fotofeszültségek mérésére használt berendezés vázlata. Az excimer lézerrel (EXC) gerjesztett festéklézerből (FL) származó fényimpulzusok intenzitását egy változtatható transzmissziójú szürke szűrő (SZ) úgy gyengítette, hogy a keletkező fotofeszültségek amplitúdója maximális legyen. A T1, T2 tükrök és az L kondenzor lencse a gerjesztő lézerimpulzus terelésére szolgálnak. A mintát tartalmazó küvettát (K) egy Faraday kalitka (F) árnyékolta a lézerből jövő elektromos zavar jobb kiszűrése érdekében. A küvetta két átellenes oldala közt fellépő fotofeszültségeket platina elektródok (■) detektálták. Erősítés (E) után a jeleket Thurlby tranziens rekorder (TR) digitalizálta és számítógép (PC) rögzítette.

A vizes fázis minél kisebb vezetőképességének megőrzése érdekében a kloroplasztiszokat csak 0.4 M szorbitot tartalmazó oldatban szuszpendáltam. A mintát excimer lézerrel pumpált Rodamin 6G festéklézer gerjesztette 580 nm hullámhossznál. A kloroplasztiszokat érő körülbelül 0.7 – 1 mJ energiájú gerjesztő impulzus 1 cm^2 felületen oszlott el. Szürke szűrővel a gerjesztő lézerimpulzus intenzitását úgy gyengítettem, hogy a fotoelektromos jel maximális legyen. A mintát az elektromos zaj minél jobb kiszűrése érdekében egy rézdoboz vette körül és egy BNC csatlakozással a

platina elektródok közvetlenül az erősítőhöz kapcsolódtak. A mérési adatokat IBM kompatibilis számítógép rögzítette Thurlby DSA524 digitalizáló egységen keresztül.

3.9. Fluoreszcencia– és abszorpcióváltozás egyidejű mérése

A fluoreszcencia és az abszorpcióváltozás egyidejű mérésére alkalmas házi készítésű berendezés vázlata az 3.3. ábrán látható.



3.3. ábra A fluoreszcencia és abszorpcióváltozás egyidejű mérésére használt berendezés vázlata. Az abszorpcióváltozás mérésére egysugaras abszorpcióméró szolgált. A mérőfény (F, fényforrás) detektálása leképezés (L1, L2 lencsék) és monokromálás (J–Y, Jobin–Yvon H20 IR monokromátor) után Schott RG 695 szűrőn (S2) át egy PIN fotodióda (PIN, UDT Sensors, Inc. PIN# 10DI) segítségével történt. A fotodióda jelét erősítés (E) és digitalizálás (A/D, PCL 818HG analóg/digitális konverter kártya) után IBM kompatibilis számítógép (PC) rögzítette. A fluoreszcenciát a küvetta alja felől egy infravörös érzékeny fotoelektronsokszorozó (FES, HAMAMATSU R–3310–03) detektálta és HITACHI VC–6025 oszcilloszkóp (OSZC) digitalizálta. A fotoelektronsokszorozót egy 915 nm hullámhossznál átengedő interferencia szűrő (SI) és egy Schott RG 850 vágó szűrő (S1) védte. A mintát tartalmazó 1 cm x 1 cm keresztmetszetű kvarcküvetta (K) két egymással átellenes oldalról volt gerjeszthető xenon villanólámpával (Xe, EG&G FX–200) egy Corning 4–96 sávszűrőn keresztül (S3), és egy mikroszkóp objektívvel leképezett (MO) lézerdióda (LD, Laser Diode, Inc. LCW–100) folytonos gerjesztő fényével.

A fényfelvillanás és a folytonos megvilágítás okozta abszorpcióváltozást egysugaras abszorpcióváltozás–mérővel vizsgáltam. A mérőfényt egy stabilizált

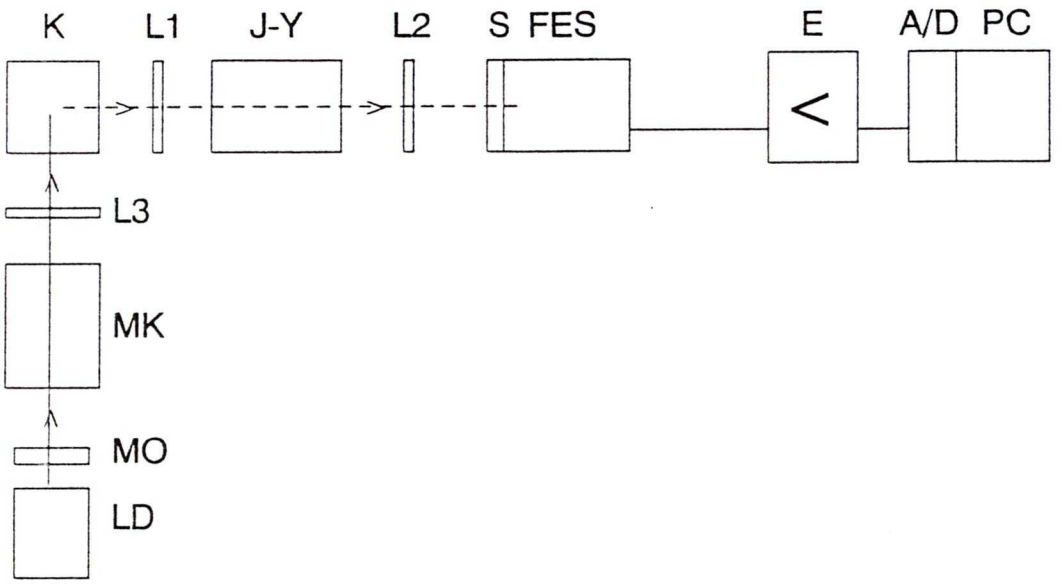
áramforrásról táplált halogén autóizzó szolgáltatta. Az izzólámpa fényét kondenzor lencse fókuszálta egy holografikus rácsos monokromátor (Jobin–Yvon H20 IR, sávsélesség 4 nm) belépő résére, a kilépő rést pedig egy másik lencse a mintát tartalmazó küvettán keresztül egy PIN (UDT Sensors, Inc. PIN# 10DI típusú) fotodióda aktív felületére képezte le. A mérőfény érzékelhető fotokémiai aktivitást még nem váltott ki, de intenzitása kellően nagy volt ahhoz, hogy a dimer abszorpcióváltozása 860 nm hullámhossznál kis zajjal legyen mérhető. A fényfelvillanás előtti stacionárius állapotban a fotodióda áram–feszültség konvertere 200 mV feszültséggel volt kiegyenlítve, így a számítógépbe épített analóg/digitális átalakítóba (PCL 818HG) csak a gerjesztés által kiváltott, majd felerősített tranziens jel került. A flash gerjesztés Xe villanólámpa 6 μs hosszú impulzusaival (EG&G FX–200) a folytonos fényű gerjesztés egy 810 nm hullámhossznál működő 500 mW fényteljesítményű lézerdiódával (Laser Diode, Inc. LCW–100) történt. A lézerdióda által szolgáltatott gerjesztés ($\approx$100 ns be és kikapcsolási idő) a tanulmányozott jelenségek időskáláján téglalap időprofilúnak tekinthető. A lézerdióda divergens fényét homogenizálás után egy mikroszkóp objektív az 1 cm x 1 cm keresztmetszetű kvarcküvetta 1 cm magasságú részére képezte. A fotodiódát Schott RG 850 típusú optikai szűrő védte a szórt gerjesztő fénytől.

A fluoreszcens fény detektálása a küvetta alja felől, leképezés nélkül történt, egy infravörös érzékeny HAMAMATSU R–3310–03 fotoelektronsokszorozóval, amelyet egy Corning 850 nm–es vörös vágó szűrő és egy 915 nm–es interferencia szűrő védett a beszóródó gerjesztő fénytől. A fluoreszencia jeleket egy HITACHI VC–6025 tároló oszcilloszkóp digitalizálta. A lézerdióda fényének homogenizálása és a minta egyenletes megvilágítása kulcsfontosságú volt a fluoreszcencia indukció kinetikájának mérésénél. A lézerdióda nem csak a reakciócentrum redox változásait idézi elő, hanem egyben gerjeszti a detektált fluoreszcenciát is. Ezert inhomogén megvilágítás esetén a nagyobb intenzitással megvilágított térfogat (gyorsabb redox változás) nagyobb súllyal szerepel a detektált fluoreszcencia jelben, ami a kinetika látszólagos gyorsulásához vezet.

Mind az abszorpció, mind a fluoreszcencia mérések kiértékelése IBM kompatibilis számítógép segítségével történt.

3.10. A fluoreszcencia emissziós spektruma

A reakciócentrum mintából származó floureszcencia emissziós spektrumának mérése a 3.4. ábrán látható házi építésű fluoriméterrel történt.



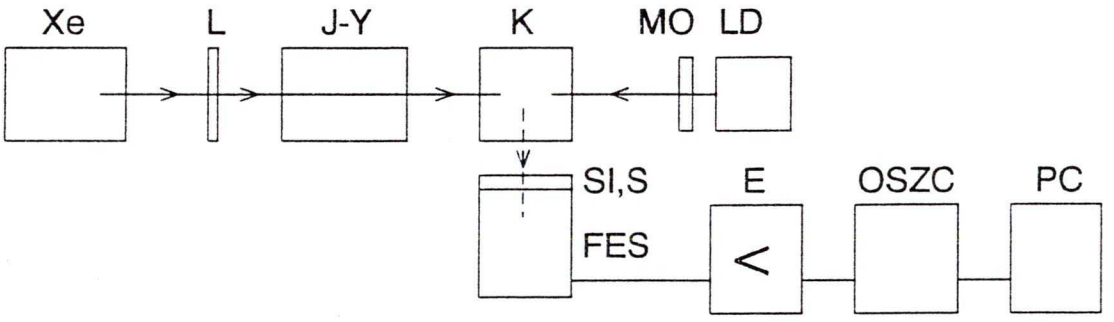
3.4. ábra A reakciócentrum preparátum fluoreszcencia spektrumának mérésére szolgáló házi építésű műszer vázlata. Az 1 cm x 1 cm keresztmetszetű kvarcküvettában lévő mintát (K) lézerdióda (LD, Laser Diode, Inc. LCW–100) gerjesztette egy monokromátoron (MK, ZEISS SPM2) keresztül leképezve (L3, lencse; MO, mikroszkóp objektív). A fluoreszcens fényt az L1, L2 lencsékel egy Jobin–Yvon H20 IR monokromátoron (J–Y) és egy Schott RG 850 (S) szűrőn keresztül egy infravörös érzékeny fotoelektronsokszorozó (FES, HAMAMATSU R–3310–03) detektálta. A jeleket erősítés (E, házi készítésű erősítő) és digitalizálás (A/D, PCL 818HG analóg/digitális konverter kártya) után IBM kompatibilis számítógép (PC) olvasta be és tárolta.

A lézerdióda (Laser Diode, Inc. LCW–100) 810 nm hullámhosszú gerjesztő nyalábja – a fényszórásból származó hiba kiküszöbölése érdekében – egy monokromátoron (ZEISS SPM2) átbocsátva esett a mintára. A lézerdióda fényét mikroszkóp objektív képezte le a monokromátor bemenő résére. A fluoreszcens fényt egy holografikus rácsos monokromátoron keresztül (Jobin–Yvon H20 IR, sávszélesség

4 nm) HAMAMATSU R-3310-03 típusú infravörös érzékeny fotoelektronsokszorozó detektálta. A fluorométer érzékenységének hullámhosszfüggését egy 2850 K szín-hőmérsékletű fekete test (Osram volfram lámpa) sugárzási spektrumát felvéve állapítottam meg. A jeleket erősítés után PCL 818HG kártya digitalizálta. IBM kompatibilis számítógéppel 0.1 Hz ismétlési frekvenciával 64 mérést átlagoltam a kiértékelés előtt.

3.11. A 915 nm hullámhossznál megfigyelt fluoreszcencia gerjesztési spektruma

A 915 nm hullámhossznál mérhető fluoreszcencia gerjesztési spektrumának meghatározása házi készítésű flash flourométerrel történt (3.5. ábra).



3.5. ábra A 915 nm hullámhossznál mérhető fluoreszcencia gerjesztési spektrumának mérésére épített flash fluorométer vázlata. A tesztelő impulzusokat egy xenon villanólámpa (Xe, EG&G FX-200) szolgáltatta, amelyet egy kondenzor lencse (L) egy holografikus rácsos monokromátoron át (J-Y, Jobin-Yvon H20 IR) a mintát tartalmazó 1 cm x 1 cm keresztmetszetű kvarcküvettára (K) képezett. A klorofill dimer P^+ redox állapotát mikroszkóp objektívvel (MO) párhuzamosított intenzív lézerdióda (LD, Laser Diode, Inc. LCW-100) megvilágítás állította be. A fluoreszcens fényt HAMAMATSU R-3310-03 fotoelektronsokszorozó (FES) detektálta egy 915 nm-es interferencia (SI) és egy Schott RG 850 üvegszűrőn (S) keresztül. A tesztelő flash-ek által kiváltott fluoreszcencia impulzusokat erősítés (E) után HITACHI VC-6025 oszcilloszkóp (OSZC) digitalizálta és IBM kompatibilis számítógép (PC) rögzítette.

A Xe flash lámpából (EG&G FX-200) származó 10 μs félértékszélességű fluoreszcencia-tesztelő fényimpulzusok intenzitása a monokromátor (Jobin-Yvon

H20 IR, 4 nm sávszélesség) után elég alacsony volt ahhoz, hogy 0.5 Hz ismétlési frekvencia mellett elhanyagolható aktinikus gerjesztő hatást fejtsen ki. A tesztelő fényimpulzus intenzitása ±5%-ot ingadozott,ezért hatásának kiküszöbölésére 64 impulzus összegéből állapítottam meg a fluoreszcencia átlagos intenzitását. A fluoreszcencia impulzusokból származó jeleket HITACHI VC-6025 oszcilloszkóp digitalizálta és átlagolta. A reakciócentrum P^+ állapotát egy 810 nm hullámhosszú, 500 mW fényteljesítményű lézerdióda (Laser Diode, Inc. LCW-100) gerjesztése hozta létre, amely a tesztelő impulzus előtt 1 ms-mal kapcsolt ki. A lézerdióda ki illetve bekapcsolásának ideje körülbelül 100 ns volt. A klorofill dimer redox állapotának ily módon történő beállításával sikerült elkerülni a kémiai oxidálás közben fellépő még tisztázatlan effektusokat (Clayton, 1977). A gerjesztési spektrumot korrigáltam a Xe villanólámpa intenzitásának, a monokromátor transzmissziójának és a detektor érzékenységének hullámhosszfüggésére.

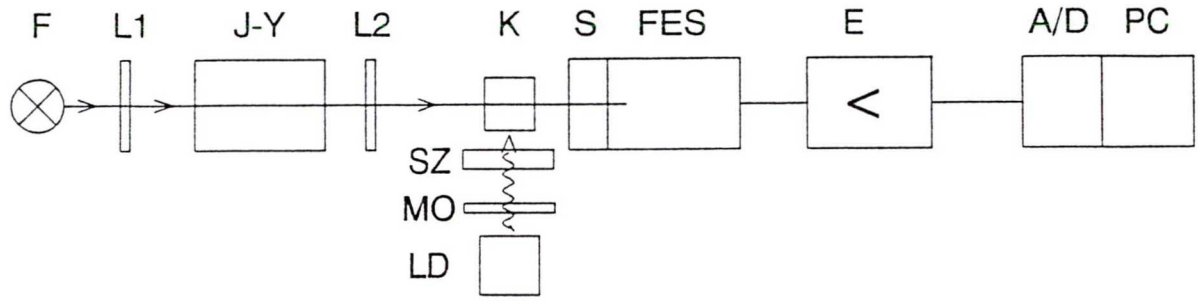
3.12. Citokróm átfordulás nagy intenzitású folytonos fényben

A kinonredukciós ciklus sebességmeghatározó lépéseinek tanulmányozásához használt házi készítésű egysugaras abszorpcióváltozásmérő berendezés vázlata a 3.6. ábrán látható.

A mérések során kulcsfontosságú nagy gerjesztő fényintenzitások elérése érdekében a lézerdióda (Laser Diode, Inc. LCW-100) 810 nm hullámhosszú, 500 mW teljesítményű fényét 3 mm x 3 mm kereszmetszetű kvarcküvettára fókuszáltam. Szükség esetén a gerjesztő fényt a lézerdióda és a mintát tartalmazó küvetta közé helyezett ismert áteresztőképességű szürke szűrőkkel gyengítettem.

A mérőfényt egy stabilizált áramforrásról táplált halogén autóizzó szolgáltatta. Az izzólámpa fényét kondenzor lencse fókuszálta egy holografikus rácsos

monokromátor (Jobin–Yvon H20 VIS, 4 nm sávszélesség) belépő résére, míg a kilépő rést egy másik lencse a küvettán keresztül a fotoelektronsokszorozó (EMI 9558) katód felületére képezte. A detektort Corning 4–96 típusú felül vágó szűrő védte. A mérőfény érzékelhető fotokémiai aktivitást nem váltott ki. A fényfelvillanás előtti stacionárius állapotban a fotoelektronsokszorozó áram–feszültség konvertere 200 mV feszültséggel volt kiegyenlítve, így a számítógépbe épített analóg/digitális átalakítóba (PCL 818HG) csak a gerjesztés által kiváltott, majd felerősített tranziens jel került.



3.6. ábra A nagy gerjesztő fényintenzitásoknál megfigyelt citokróm abszorpció változás mérésére használt házi építésű egysugaras abszorpciómérő vázlata. A lézerdióda (LD, Laser Diode, Inc. LCW–100) fényét mikroszkóp objektív (MO) képezte le egy 3 mm x 3 mm keresztmetszetű kvarcküvettára (K). A gerjesztő intenzitást a minta és a lézerdióda közé helyezett ismert transzmissziójú szürke szűrőkkel (SZ) lehetett gyengíteni. A mérőfényt egy monokromált (J–Y, Jobin–Yvon H20 VIS) és leképezett (L1, L2 lencsék) halogén autóizzó (F) szolgáltatta; és egy Corning 4–96 sávszűrővel (S) védett EMI 9558 fotoelektronsokszorozó (FES) detektálta. A jeleket erősítés (E) után egy számítógépbe (PC) épített PCL 818 HG típusú A/D konverter (A/D) digitalizálta.

A fotooxidált citokróm c mennyiségét az 550 nm hullámhossznál mért abszorpcióváltozásból számoltam ki a redukált és oxidált forma abszorpciós együtthatóinak különbségét ($\epsilon_{RED} - \epsilon_{OX}$ = 21,1 ± 0,4 $mM^{-1}cm^{-1}$) felhasználva (Van Gelder és Slater, 1962).

4. EREDMÉNYEK

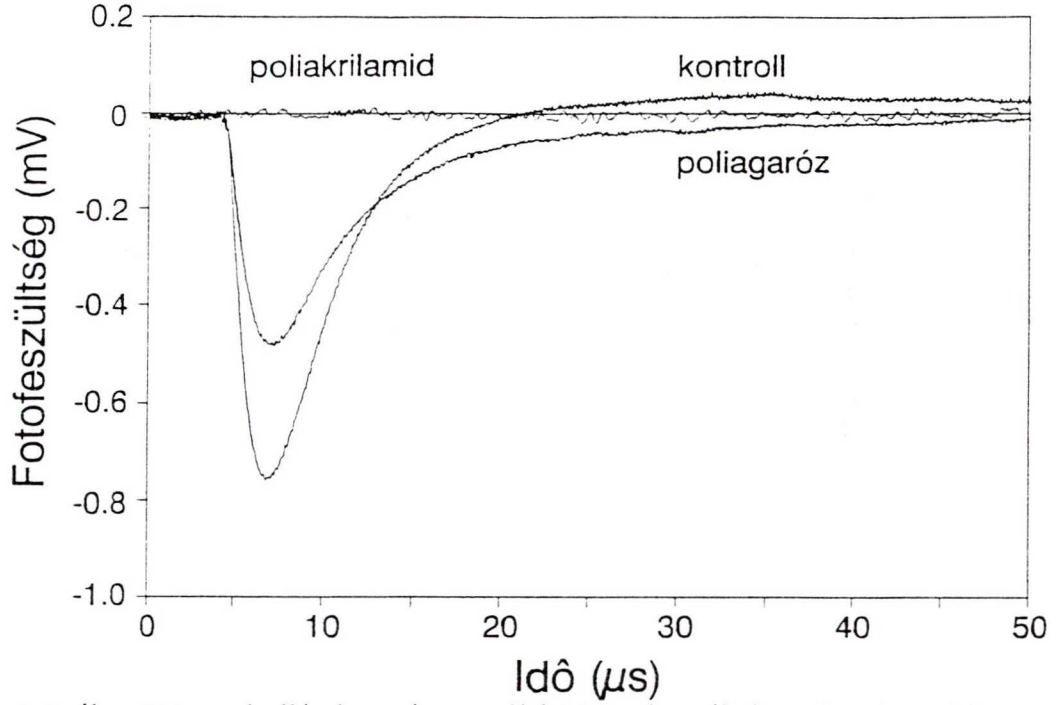
4.1. A transzmembrán töltésszétválasztás fénygradiens detektálása

Zárt membránvezikulumokban és egész sejtekben a transzmembrán töltésszétválasztás elektromos detektálása az ú.n. fénygradiens módszerrel lehetséges. A membránokban létrejövő abszorpció, fényvisszaverődés és interferencia jelenségek a vezikulumok aszimmetrikus megvilágítását okozzák, ami nemtelítési gerjesztő impulzust alkalmazva aszimmetrikus töltésszétválasztásra vezet (Leibl és mtsi, 1992b; Pallotin és mtsi, 1993; Dobek és mtsi, 1994). A reakciócentrum a fotoszintetikus membránban irányítottan helyezkedik el, így a létrejövő aszimmetrikus töltésszétválasztás következtében a membránok polarizálódnak. A mintában jelen lévő nagy számú membránvezikulum elektromos polarizáltsága makroszkópikus elektródákkal is mérhető feszültséggé összegződik (Witt és Zickler, 1973; Fowler és Kok, 1974).

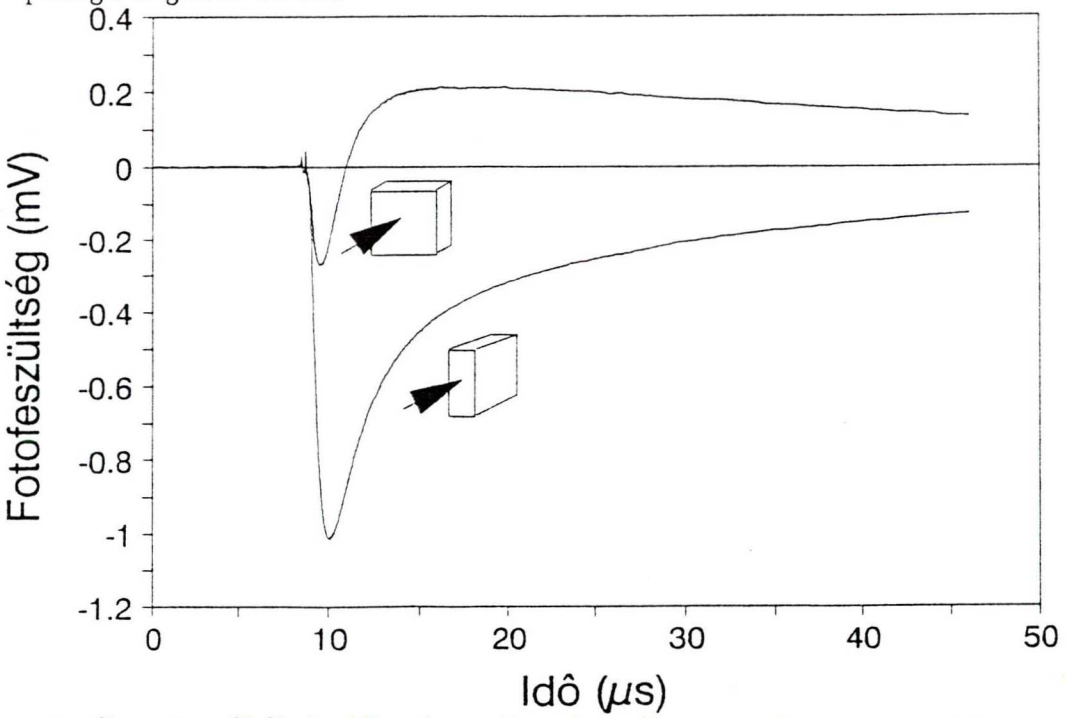
A 4.1. ábrán borsó (*Pisum sativum*) levelekből izolált rendezetlenül különböző gélekbe ágyazott tilakoid membránokon mért fénygradiens feszültség látható. A biológiai makromolekulák és sejtszervecskék immobilizálására elterjedten használt poliakrilamid gélben nem sikerült fénygradiens elektromos jelet detektálni. A poliagaróz azonban a fotoelektromos feszültséget kevésbé befolyásolta, az amplitúdót csak mintegy 30%-kal csökkentette.

A poliagaróz gélbe ágyazott, mágneses térben rendezett tilakoid membránokon mérhető fotofeszültség erős orientáció-függést mutatott (4.2. ábra). Az 580 nm hullámhosszú nemtelítési fényimpulzus által indukált feszültség nagyobb a kloroplasztisz tilakoid membránok lapjával párhuzamosan, mint az arra merőlegesen beeső gerjesztés

esetén. Megfigyelhető, hogy a fotoelektromos jel lecsengése több fázisú, a membránok rendezése alkalmas egy pozitív és egy negatív jel szétválasztására. Rendezetlen mintán 580 nm hullámhosszú gerjesztő fényt használva a negatív fázis dominál.



4.1. ábra 580 nm hullámhosszú nemtelítési impulzus által rendezetlen tilakoid membránokon indukált fénygradiens elektromos jel. A fotoszintetikus membránok 0.4 M szorbitban (kontroll), 0.4 M szorbitot, 15% (m/v) akrilamidot, 0.5% (m/v) N,N'biszakrilamidot, 0.03% (v/v) N,N,N',N'-tetrametiléndiamint és 0.05% (m/v) amóniumperszulfátot tartalmazó poliakrilamid gélben, vagy 0.4 M szorbitot és 2% agarózt tartalmazó poliagaróz gélben voltak.



4.2. ábra Borsóból izolált, és poliagaróz gélben rendezetten csapdázott kloroplasztisz tilakoid membránokon 580 nm hullámhosszú nemtelítési fényimpulzus által indukált elektromos jel orientáció függése. A fény beesése a rendezett membránok síkjával párhuzamos, vagy arra merőleges volt.

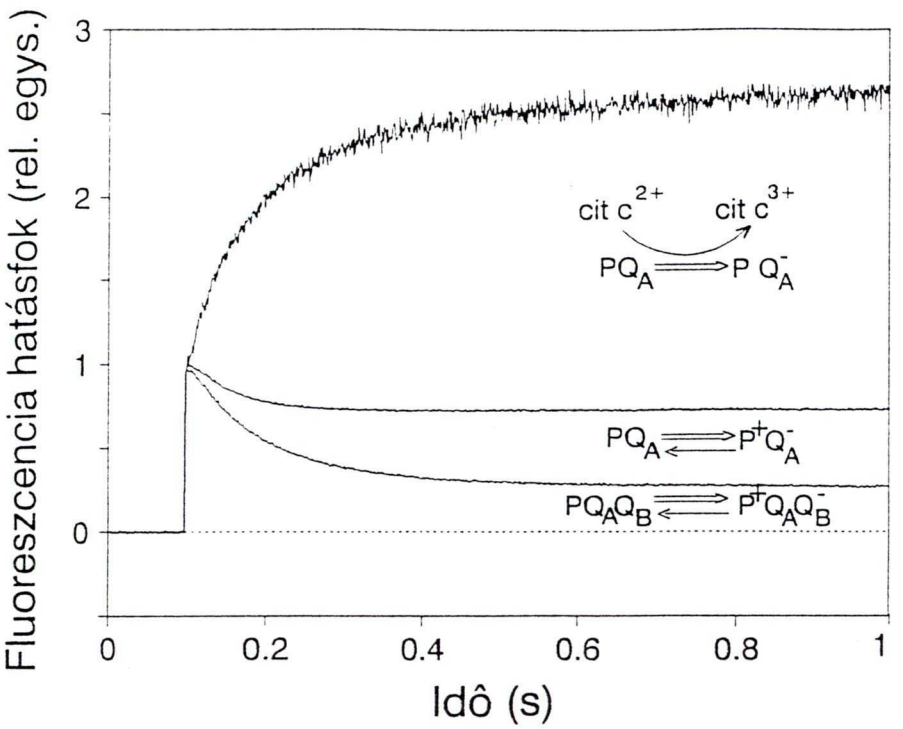
A fénygradiens feszültség mérését eredményesen alkalmazták a fotoszintézis gyors töltésmozgásainak vizsgálatára. Hátránya azonban, hogy – amint azt a fenti mérések is bizonyítják – erősen függ a fotoszintetikus membránok geometriájától. Nem alkalmazható továbbá a módszer a donor és akceptor oldali lassabb redox lépések és a citokróm^{3+}/citokróm^{2+} valamint a dihidrokinon/kinon kicserélődés tanulmányozására.

Mind a fotoszintetikus membránok geometriájának szerepe, mind a légzési elektrontranszporttal való kölcsönhatás kiküszöbölhető, ha a reakciócentrumot detergens micellákban izoláljuk. Az így nyert fehérje preparátumban a fotociklus során végbemenő redox változások a kofaktorok abszorpciójának (Kleinfeld és mtsi, 1984b; McPherson és mtsi, 1994; Arlt és mtsi, 1996) és fluoreszcenciájának (Clayton, 1972; Arata és Parson, 1981; Schenck és mtsi; 1981; McPherson és mtsi, 1990b) mérésével a fénygradiens feszültség élettartamánál lényegesen hosszabb időskálán is nyomon követhetők.

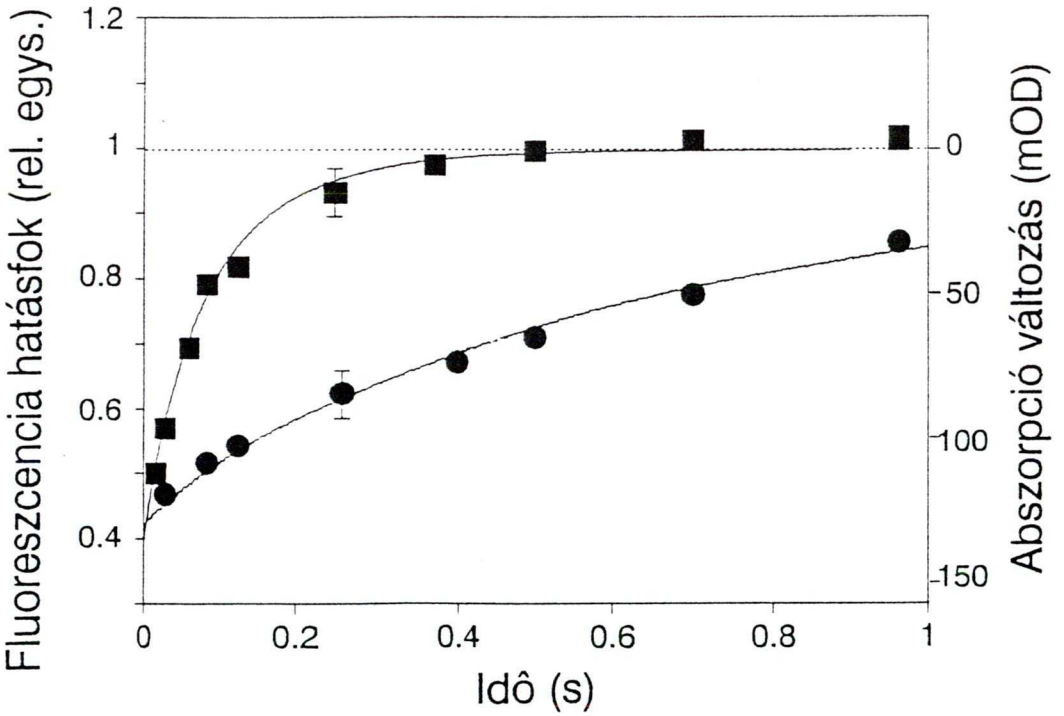
4.2. Fényindukált fluoreszcencia változások izolált reakciócentrumban

Bíborbaktériumból izolált reakciócentrum klorofill dimerje a közeli infravörösben (910 nm körül) széles sávban fluoreszkál (Zankel és mtsi, 1968; Clayton, 1977; Stadnichuk és Lukashev, 1982).

A dimer fluoreszcencia hatásfoka függ a reakciócentrum kofaktorainak redox állapotától. A reakciócentrum fluoreszcencia változásait folytonos és telítési impulzus megvilágítás hatására a 4.3. és 4.4. ábra szemlélteti. Ezen változások a fényindukált töltésszétválasztás stabilizációjára és/vagy rekombinációjára vezető akceptor és donor oldali reakciók eredményei, és olyan exponenciálissal illeszthetőek, amelyek időállandója előállítható a fotokémiai és a termikus reakciók sebességállandóinak összegeként.



4.3. ábra *Rhodobacter sphaeroides* izolált reakciócentrumában 810 nm-es folytonos megvilágítás által kiváltott redox változások nyomon követése a 915 nm hullámhossznál mért fluoreszcenciával. Körülmények: 1 μM RC, 0.03% TX-100, 5 mM Tris, pH 8 és 1 UQ/RC (középső), 40 UQ/RC (alsó) illetve 20 μM citokróm c (felső görbe).



4.4. ábra *Rhodobacter sphaeroides* izolált fotoszintetikus reakciócentrumában telítési fényimpulzus által indukált fluoreszcencia és abszorpció változások. Az abszorpció (folytonos vonal) mérés 865 nm hullámhossznál, a fluoreszcencia hatásfok megállapítása gyenge, 1 ms időtartamú lézerdióda (810 nm) impulzusokkal gerjesztve 915 nm-nél történt. Körülmények: 1 μM RC, 0.03% TX-100, 5 mM Tris, pH 8.0 és 1 ( ), vagy 40 (●) UQ/RC.

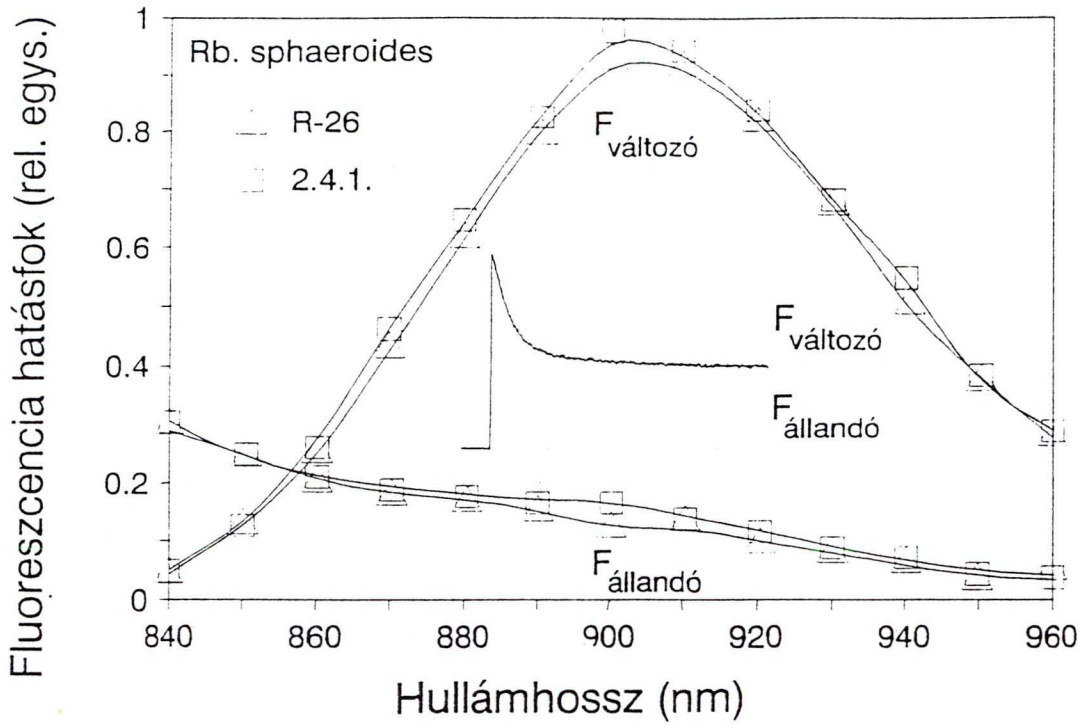
Külső elektron donor hiányában a fényreakció és a rekombináció sebességétől függő egyensúly áll be $k_{mért} = k_I + k_{PA(B)}$ reakcióállandóval (4.3. ábra). A lecsengés sebességálladója ($k_{mért}$) 19.0 s^{-1} a Q_B aktivitást nem mutató, és 10.5 s^{-1} a helyreállított Q_B aktivitású reakciócentrumon. Ez azzal magyarázható, hogy a helyreállított Q_B aktivitású fehérjében egy nagyságrenddel lassabb a töltésrekombináció (k_{PA} = 10.8 s^{-1}, k_{PB} = 1.4 s^{-1}). Gyors elektron donor (ló szívből izolált citokróm c) jelenlétében a fluoreszcencia szint megvilágítás hatására $k_{mért} = k_I$ időállandóval nőtt. A nagy citokróm c készlet (20 μM) és alacsony ionerősség (5 mM) a fotooxidált dimer visszaredukcióját a töltésrekombinációnál nagyságrendekkel gyorsabbra állította be.

A $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció kinetikáját telítési fényfelvillanás után mind az abszorpció, mind a fluoreszcencia változásain keresztül nyomon lehet követni (4.4. ábra). A 865 nm hullámhossznál mért abszorpcióval és a 915 nm-nél tesztelő impulzusokkal monitorált fluoreszcenciával egyidejűleg detektált kinetikák mérési hibán belül megegyeznek.

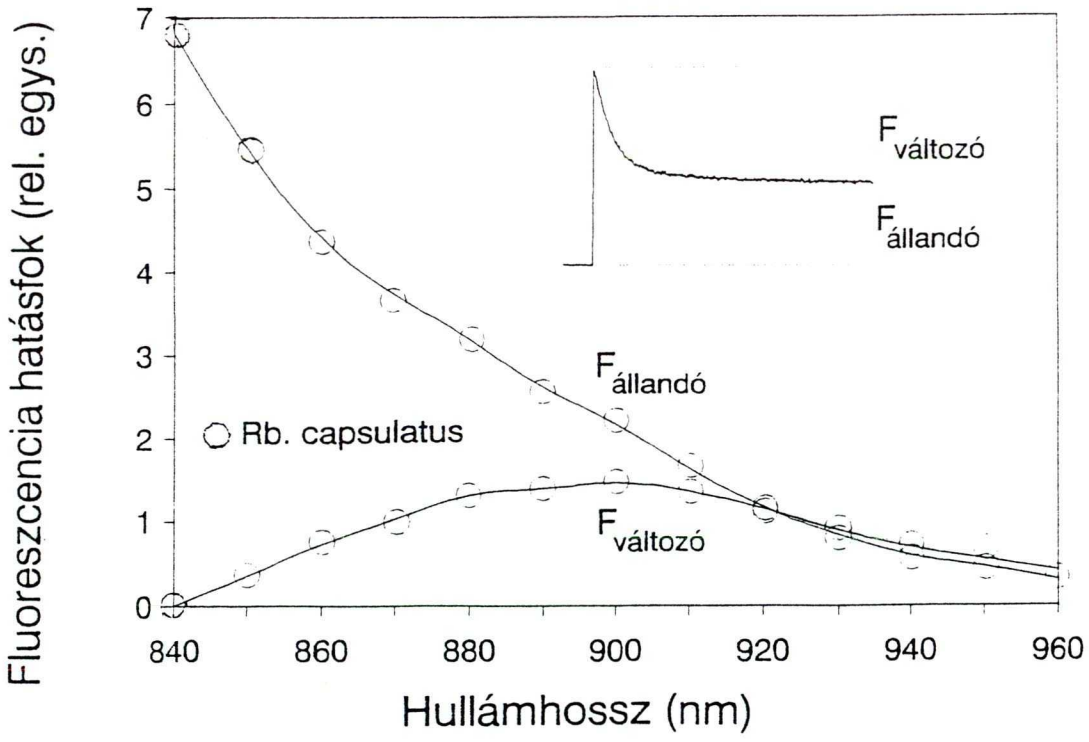
4.3. Izolált reakciócentrum fluoreszcencia spektruma

Az izolált reakciócentrumból származó fluoreszcencia folytonos megvilágítással két összetevőre bontható: egy megvilágítástól függő változó és egy attól független állandó részre.

Mind a *Rhodobacter sphaeroides* (4.5. ábra), mind a *Rhodobacter capsulatus* (4.6. ábra) változó fluoreszcenciája 900 nm körüli széles maximummal rendelkezik. Az állandó rész a hullámhossz növekedésével monoton csökken. Míg a változó fluoreszcencia nagysága a *Rhodobacter sphaeriodes* és *Rhodobacter capsulatus* reakciócentrum esetén jó egyezést mutatott, addig az állandó rész egy nagyságrenddel nagyobb volt a *Rhodobacter capsulatus* mintán (4.5. és 4.6. ábra).



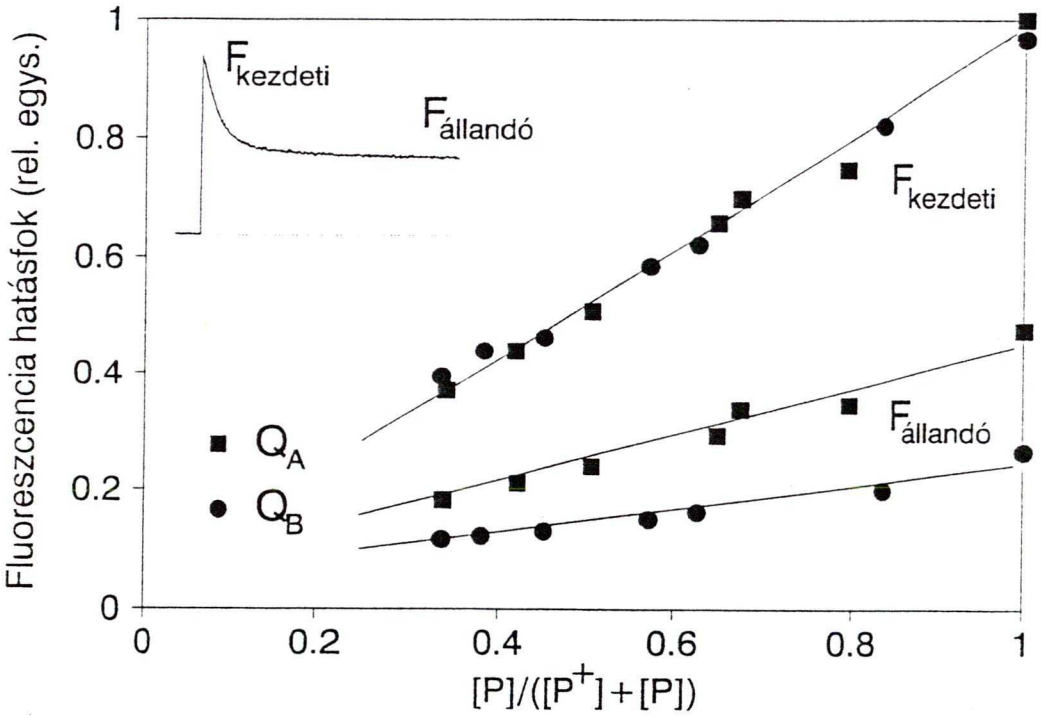
4.5. ábra *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. és R–26 fotoszintetikus reakciócentrum intenzív lézerdióda (810 nm) gerjesztéssel mért állandó és változó fluoreszcenciájának emissziós spektruma 4 nm sávszélességű monokromátoron keresztül detektálva. Körülmények: 2.0 μM RC, 50 mM NaCl, 0.03% TX–100, 100 μM terbutrin, 10 mM Tris, pH 8.0.



4.6. ábra *Rhodobacter capsulatus* fotoszintetikus reakciócentrum intenzív lézerdióda (810 nm) gerjesztéssel mért állandó és változó fluoreszcenciájának emissziós spektruma 4 nm sávszélességű monokromátoron keresztül detektálva. A *Rhodobacter sphaeroides* 900 nm–nél mért változó fluoreszcenciáját tekintettem egységnyinek. A körülmények megegyeznek a 4.5. ábrán feltüntetettel.

4.4. Izolált reakciócentrum fluoreszcenciájának eredete

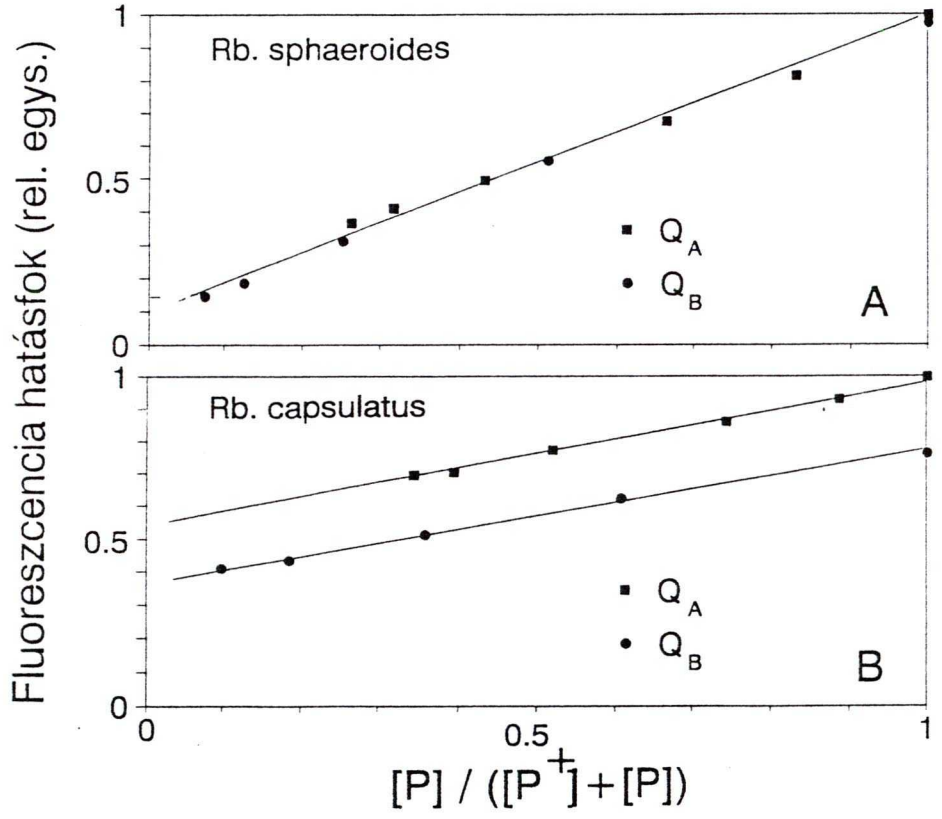
A bíborbakteriális reakciócentrum klorofill dimerjének megfigyelt fluoreszcencia hatásfokát a kofaktorok különböző redox állapotaiban a klorofill dimer és a Q_A fluoreszcencia kioltó koncentrációja határozzák meg (4.7., 4.8., 4.9. és 4.10. ábra). A megvilágítás hatására 915 nm-nél mérhető fluoreszcencia csökkenés a P fotooxidációjának és ezzel együtt a nem fluoreszkáló P^+ felhalmozódásának a következménye.



4.7. ábra A 915 nm hullámhossznál mért fluoreszcencia állandó és változó részének redox titrálása. A káliumferricianiddal ($K_3Fe(CN)_6$) oxidált dimer arányának megállapítása 865 nm hullámhossznál telítési fényimpulzus által indukált abszorpció változásból történt. A fluoreszcenciát a nem oxidált RC fluoreszcenciájával normáltam. Körülmények: 1 μM RC, 50 mM NaCl, 0.03% TX-100, 10 mM Tris, pH 8.0 és 1 UQ/RC (Q_A) vagy 50 UQ/RC (Q_B).

A dimer oxidált állapota (P^+) egyrészt kémiai úton (4.7. ábra), másrészt nagy gerjesztő fényintenzitással (4.8. ábra) is fenntartható. A 915 nm hullámhossznál mérhető fluoreszcencia intenzitást a P állapotban lévő reakciócentrumok arányának függvényében

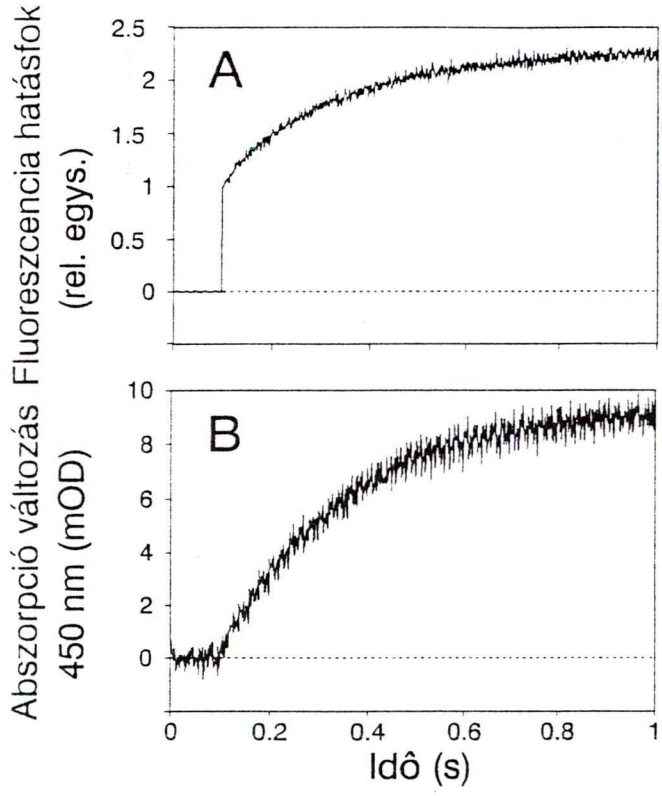
feltüntetve lineáris függést kaptam (4.7. és 4.8. ábra). A még alapállapotban (P) lévő klorofill dimer arányát az összes reakciócentrum koncentrációhoz képest a 865 nm hullámhossznál mért abszorpcióváltozásból határoztam meg. A fluoreszcencia hatásfokának a P koncentrációjától való függésének meredeksége a változó fluoreszcencia nagyságát, míg a függőleges tengellyel a metszet az igazi (P – ből származó fluoreszcenciát már nem tartalmazó) állandó részt adja. Ez jelentősen eltér a különböző baktérium törzsekben (körülbelül 0.1 x $F_{változó}$ *Rhodobacter sphaeroides*ben és 1.0 x $F_{változó}$ *Rhodobacter capsulatus*ban).



4.8. ábra A 915 nm hullámhossznál mért fluoreszcencia stacionárius értékének "fénytitrálása" *Rhodobacter sphaeroides* (A) és *Rhodobacter capsulatus* (B) reakciócentrumon helyreállított (Q_B) és helyreállítatlan (Q_A) Q_B aktivitású mintán. A lézerdióda (810 nm) gerjesztő fényének intenzitását kalibrált szürke szűrők különböző mértékben gyengítették. A nem fotooxidált dimer arányának megállapítása 865 nm hullámhossznál telítési fényimpulzus által indukált abszorpcióváltozásból történt. A fluoreszcenciát a nem fotooxidálat RC fluoreszcenciájával normáltam. A körülmények megegyeznek a 4.7. ábrán feltüntetettel.

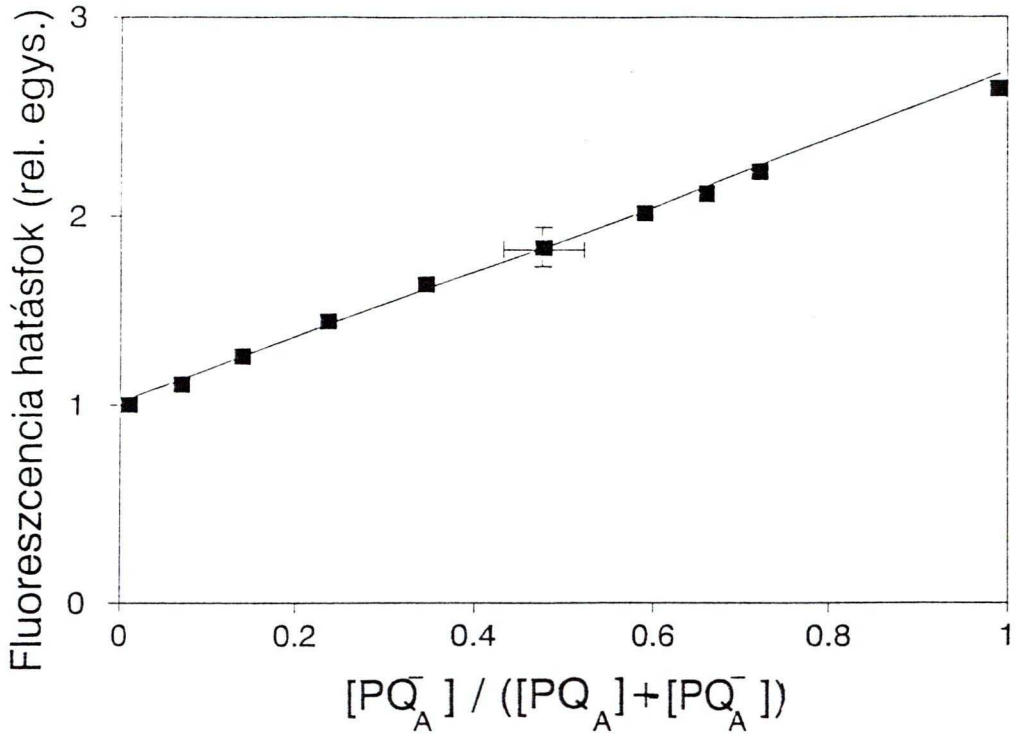
A reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka függ a hozzáadott kinon mennyiségétől: magasabb a fluoreszcencia hhatásfoka a kinont sztöchiometriai arányban tartalmazó reakciócentrumban, mint a kinont feleslegben tartalmazó mintán.

A jelenséget jól lehet szemléltetni a *Rhodobacter capsulatus*ból preparált mintán, ahol az állandó fluoreszcencia hatásfoka sokkal nagyobb, mint a *Rhodobacter sphaeroides* esetén (4.8. ábra, B). A Q_B aktivitás helyreállítására a preparátumban a reakciócentrum fehérjénél több mint egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban jelen lévő kinon raktár az állandó fluoreszcenciát kioltja. A plasztokinon hasonló klorofill–fluoreszcencia kioltó hatásáról már korábban beszámoltak zöld növényeknél (Vernotte és mtsi, 1979).



4.9. ábra A 915 nm hullámhossznál mért fluoreszcencia (A) és a donor jelenlétében 450 nm–nél mért szemikinon felhalmozódás (B) *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumon. A 810 nm–es folytonos gerjesztés által kiváltott fluoreszcenciát az alapállapotú fehérje (PQ_A) fluoreszcenciájával normáltam. Körülmények: 1.8 μM RC, 50 mM NaCl, 0.03% TX–100, 10 mM Tris, pH 8.0, 60 μM terbutrin és 200 μM ferrocén.

A dimerből származó fluoreszcencia és a Q_A kioltó koncentrációja közti kapcsolat megállapításához 450 nm hullámhossznál az abszorpcióváltozást nyomonkövetve megmértem a szemikinon (Q_A^-) felhalmozódását. Ezt összevetettem a vele egyidejűleg 915 nm–nél mért fluoreszcencia változásával (4.9. ábra). A reakciócentrumból származó fluoreszcencia és a Q_A kioltó eltünése (Q_A^- megjelenése) között lineáris függést kaptam (4.10. ábra).

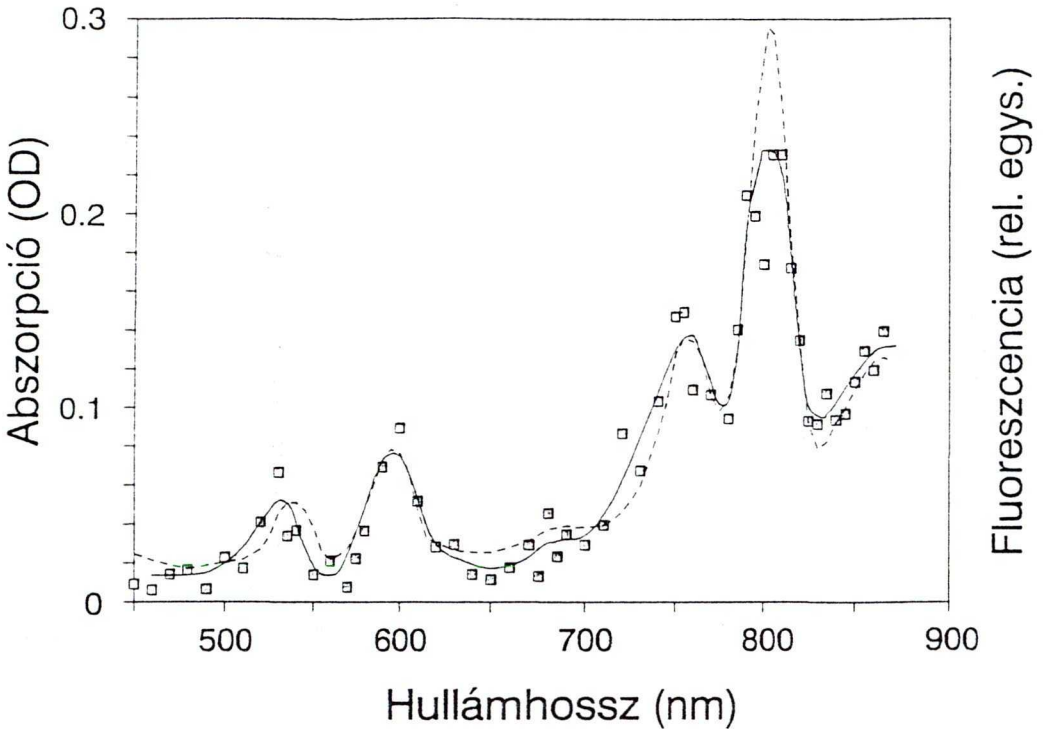


4.10. ábra A 915 nm hullámhossznál mért fluoreszcencia és a donor jelenlétében 450 nm–nél abszorpció mérésből megállapított szemikinon felhalmozódás közti összefüggés *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumon. A 810 nm–es folytonos gerjesztés által kiváltott fluoreszcenciát az alapállapotú fehérje (PQ_A) fluoreszcenciájával normáltam. A körülmények megegyeznek a 4.9. ábrán feltüntetettel.

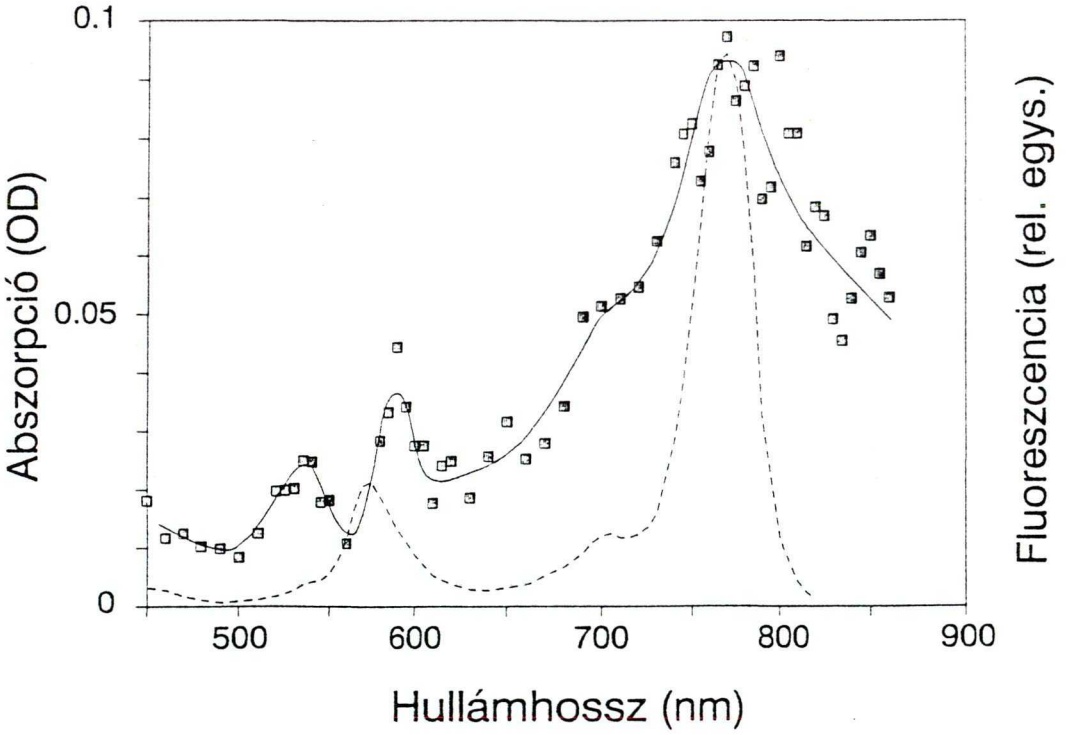
A dimert külső elektron donor (citokróm c) hozzáadásával redukált (P) állapotban tartva, a reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka nőtt a Q_A^- koncentráció növekedésével, és a Q_A teljes kiredukálásáig körülbelül 2.7 szeresére emelkedett.

4.5. A 915 nm hullámhossznál mérhető fluoreszcencia gerjesztési spektruma

A 4.11. és 4.12. ábrán *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktériumból izolált reakciócentrum mintán szobahőmérsékleten mérhető fluoreszcencia–gerjesztési és abszorpciós spektrumok láthatóak. A fluoreszcencia állandó részének gerjesztési spektrumát intenzív megvilágítással $P^+Q_A^-$ állapotban tartott reakciócentrumon mértem meg, a változó részét a PQ_A és $P^+Q_A^-$ állapotok gerjesztési spektrumából származtattam.



4.11. ábra *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrum 915 nm hullámhossznál mért változó fluoreszcencia–gerjesztési (folytonos vonal) és abszorpciós (szaggatott vonal) spektruma. A két spektrumot a bakterioklorofill Q_x sávjára normáltam. Körülmények: 1.0 μM RC, 50 mM NaCl, 0.03% TX–100, 10 mM Tris, pH 8.0.



4.12. ábra *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrum preparátumon 915 nm hullámhossznál mért állandó fluoreszcencia–gerjesztési (folytonos vonal) és szolubilizált bakterioklorofill–a (Clayton, 1980) abszorpciós (szaggatott vonal) spektruma. A két spektrumot a bakterioklorofill Q_y sávjával normáltam. A körülmények megegyeznek a 4.11. ábrán feltüntetettel.

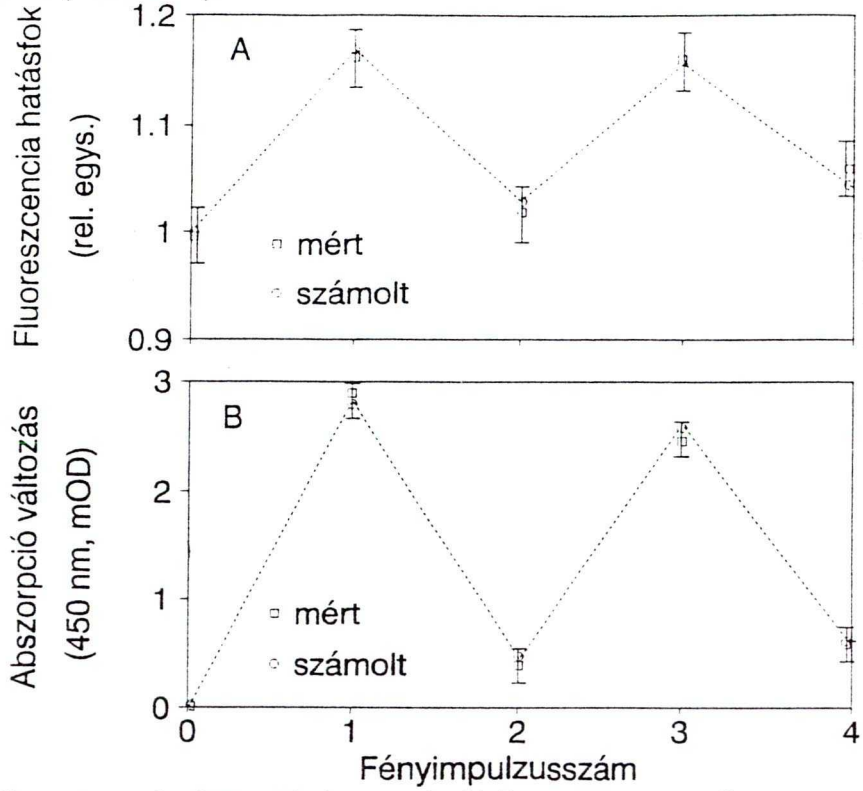
A változó fluoreszcencia gerjesztési spektruma jó egyezésben volt a reakciócentrum abszorpciós spektrumával (4.11. ábra). A közeli infravörös sávokban tapasztalható kisebb eltérés valószínűleg a fluoriméter viszonylag nagy sávszélességének (4 nm) tudható be. Látható, hogy a két bakteriofeofitin (535 nm körüli Q_x és 760 nm körüli Q_y sáv) és a két bakterioklorofill (590 nm körötti Q_x és 800 nm körötti Q_y sáv) a dimer fluoreszcenciáját gyakorlatilag a dimer direkt gerjesztésével (865 nm körüli csúcs) azonos hatékonysággal hozza létre. A klorin kofaktoroktól a dimerhez irányuló, közel 100% hatásfokú energiatranszfer jó egyezésben van a mély hőmérsékletű femtoszekundumos spektroszkópiával nyert eredményekkel (Breton és mtsi, 1988).

A 915 nm–nél mért állandó fluoreszcencia gerjesztési spektrumának 770 nm körül volt széles maximuma és 535 nm, 575 nm valamint 700 nm hullámhosszaknál három kisebb sávja (4.12. ábra). Ezek a csúcsok hozzávetőleg megfelelnek a bakterioklorofill–a oldatban (éter) mért $Q_y(0,0)$, $Q_x(0,1)$, $Q_x(0,0)$ és $Q_y(0,1)$ átmeneteihez tartozó abszorpciónak (Clayton, 1980). A reakciócentrum bakterioklorofill monomer (800 nm) és a dimer (865 nm) abszorpciós sávjai nem jelentek meg a spektrumban. Ez arra utal, hogy a 915 nm hullámhossznál mérhető fluoreszcencia állandó része a fehérjéhez nem kötődő bakterioklorofill vagy bakteriofeofitin pigmentekből ered.

4.6. A reakciócentrum többszöri átfordulása

Az elektron eloszlását a reakciócentrum kinon akceptor komplexében nyomon lehet követni a klorofill dimer fluoreszcenciájának mérésével. A klorofill dimer redukált állapotát elektron donor segítségével fenntartva, a $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ elektrontranszfer a 915 nm–nél mért fluoreszcencia csökkenését eredményezi, a visszareakció pedig a növekedését. Ferrocén donor jelenlétében egymás utáni telítési fényimpulzusok hatására a fluoreszcencia hatásfok oszcillációja figyelhető meg. Ezen oszcilláció és a 450 nm

hullámhossznál mérhető kinon/szemikinon abszorpció változás egyidejű detektálása azt mutatta, hogy a fluoreszcencia szint változása a szemikinon képződéssel és eltűnéssel összhangban áll (4.13. ábra).



4.13. ábra Ferrocén (200 μM) donor jelenlétében 915 nm–es fluoreszcenciával és a 450 nm–es abszorpcióval detektált szemikinon oszcilláció *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumon. A Q_A részleges redukciója által megnövelt fluoreszcencia hatásfokot a PQ_A állapotú fehérje fluoreszcencia hatásfokával normáltam. A számolt értékeket α = 0.09 elektronegyensúlyi állandóval nyertem. Körülmények: 1.3 μM RC, 50 mM NaCl, 0.03% TX–100, 10 mM Tris, pH 8.0, 50 μM UQ_6.

Az első fényimpulzus után szemikinon keletkezik és stabilizálódik a két kinon közti elektrontranszfer és a kinon zseb szubsztöchiometrikus protonációja révén. Az elektron megoszlását a két kinon közötti elektroneloszlási állandó adja meg:

$$\alpha = \frac{[Q_A^- Q_B]}{[Q_A^- Q_B] + [Q_A Q_B^-]}$$

A P^+ külső donor általi redukciója után a második fénygerjesztés hatására töltésszétválasztás és dihidrokinon képződés mehet végbe azon reakciócentrumokban, amelyekben az elektron az első flash után a Q_B–n volt. Az egymás utáni gerjesztő fényimpulzusok a szemikinon koncentrációjának csillapodó oszcillációját eredményezik (Kleinfeld és mtsi, 1984b):

$$[Q_AQ_B]_m = [Q_AQ_B^-]_{m-1}$$

$$[Q_A^-Q_B]_m = \alpha\,([Q_AQ_B]_{m-1} + [Q_A^-Q_B]_{m-1})$$

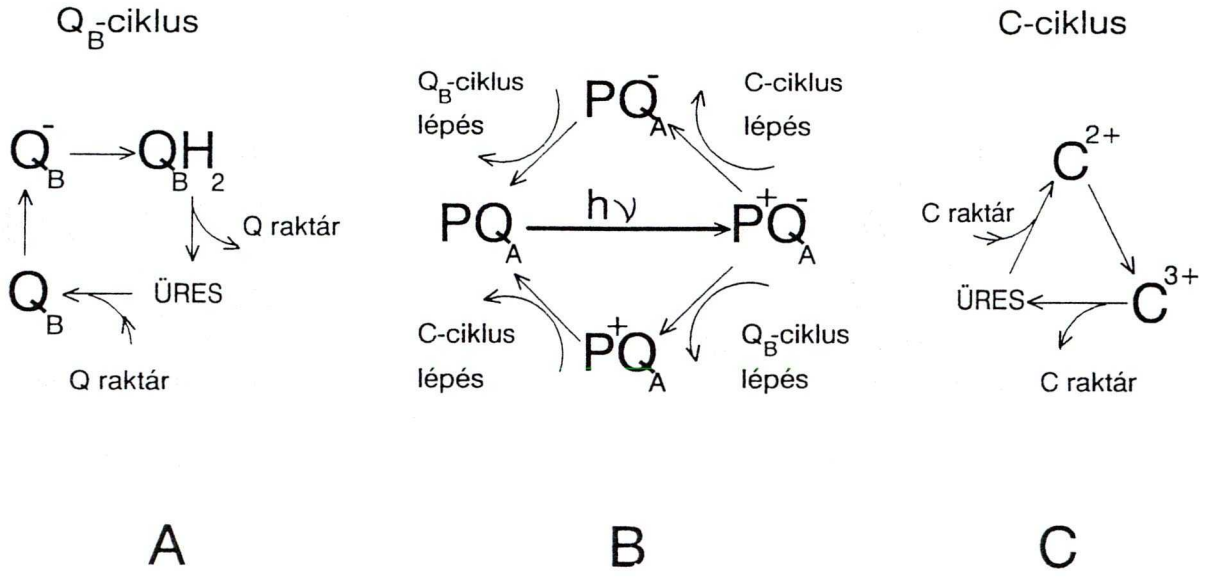
$$[Q_AQ_B^-]_m = (1-\alpha)\,([Q_AQ_B]_{m-1} + [Q_A^-Q_B]_{m-1})$$

Az m alsó index az m. fényimpulzus utáni állapotot jelenti. A sötétadaptált állapotban (m = 0) minden reakciócentrum PQ_AQ_B állapotban van. A fenti rekurzív képletek alapján a pH 8-on egyidejűleg detektált fluoreszcencia és abszorpció oszcillációk illesztése α = 0.09 értéket szolgáltatott az elektron Q_A és Q_B közötti megoszlására. A fényimpulzusok hatására bekövetkező oszcilláció a Q_A teljes kiredukálásához tartozó fluoreszcencia változásnál jóval kisebb volt, ami arra utal, hogy a PQ_B^- állapotban a fluoreszcencia hatásfok alacsonyabb, mint a PQ_A^--ban. A 915 nm-es fluoreszcencia és a 450 nm-es abszorpció méréséből nyert szemikinon oszcillációk illesztéséből arra lehetett következtetni, hogy a reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka a mérési hibán belül független a Q_B redox állapotától.

4.7. Citkróm fotooxidáció

A bíborbakteriális reakciócentrumban donor jelenlétében végbemenő redox változások a dimer-fluoreszcencia és a szemikinon-abszorpció mérésével nyomon követhetők. Hátrányuk azonban a dimer kis fluoreszcencia hatásfoka illetve a szemikinon és kinon extinkciója közötti viszonylag kis különbség (Kleinfeld és mtsi, 1985). A kofaktorok abszorpciójának mérésénél további hátrányt jelent, hogy csak olyan redox festékek használatát engedi meg, amelyben a redukált és oxidált formák abszorpciója megegyezik a vizsgálni kívánt hullámhossz

tartományban (pl. ferrocén). A reakciócentrum többszöri átfordulásának tanulmányozására kiváló módszer a citokróm fotooxidációjának mérése (Okamura és Feher, 1995).



4.14. ábra A bíborbakteriális reakciócentrum fotociklusának sémája. A fehérje immobilis kofaktorainak redox változásaihoz (B) a donor (C) és akceptor (A) oldali mobilis kofaktorok redox ciklusa társul. A Q_A és a citokróm c egy–elektron kémiát követnek, míg a Q_B két–elektron kapuként működik. Míg a Q_B^- szorosan kötődik a fehérjéhez, a kinon és dihidrokinon, valamint a redukált és oxidált citokróm c a kinon illetve citokróm készlet molekuláival kicserélődhet. A fény által létrehozott ($h\nu$) töltésszétválasztott állapot ($P^+Q_A^-$) a donor és akceptor raktárak redox állapota és kinetikai paraméterei által befolyásolt módon tér vissza az alapállapotába (PQ_A).

Az izolált reakciócentrumon belüli fényindukált töltésszétválasztást és annak stabilizálódását a donor illetve akceptor oldal termikus aktivációjú folyamataiban citokróm donor jelenlétében a 4.14. ábra szemlélteti. A donor és akceptor oldal sztöchiometriája eltérő: egyetlen kinon molekula dihidrokinonná redukálásához két citokróm fotooxidációja társul. A reakciócentrum elektrontranszportjának (4.14. ábra, B) működéséhez az akceptor (4.14. ábra, A) és a donor (4.14. ábra, C) oldal állandó átfordulása szükséges, amelynek során a dihidrokinon illetve oxidált citokróm (C^{3+}) leválik a reakciócentrumról és helyét kinon illetve redukált citokróm (C^{2+}) molekulának adja át. Töltésszétválasztás csak az olyan reakciócentrumban mehet végbe, amelyben

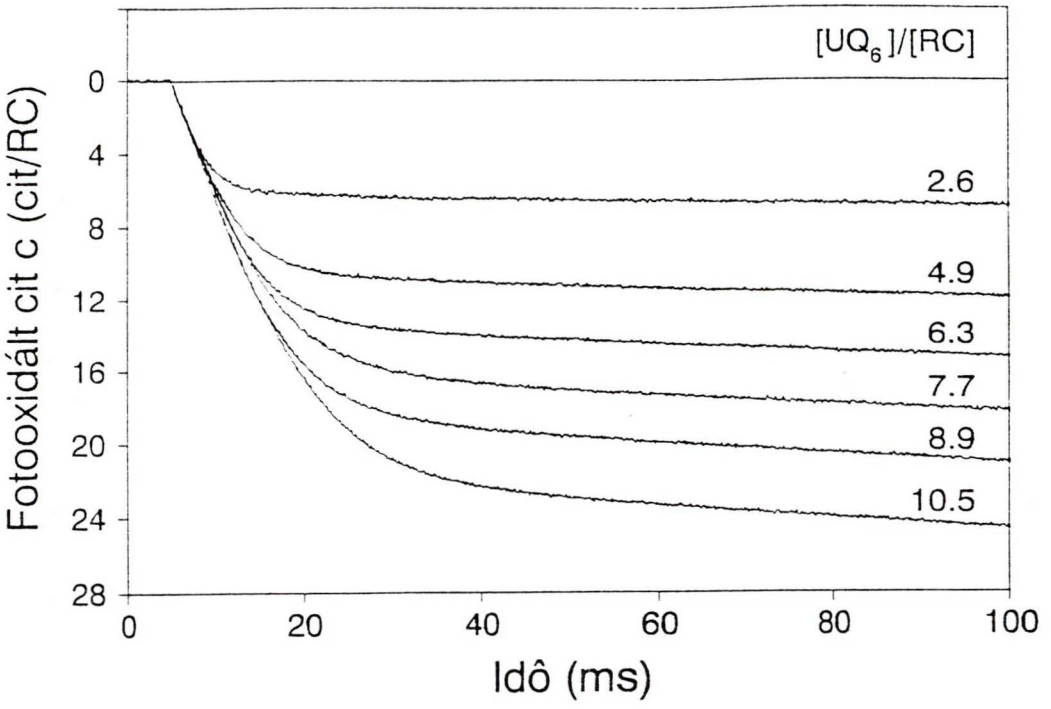
mind a klorofill dimer, mind az elsődleges kinon akceptor alapállapotban van (PQ_A). Az, hogy a reakciócentrumban milyen kinetikával és milyen redox állapotokon keresztül megy az elektrontranszport, a donor és az akceptor készlet nagyságától és kinetikai viselkedésétől függ.

4.8. A donor és akceptor készlet kimerülése

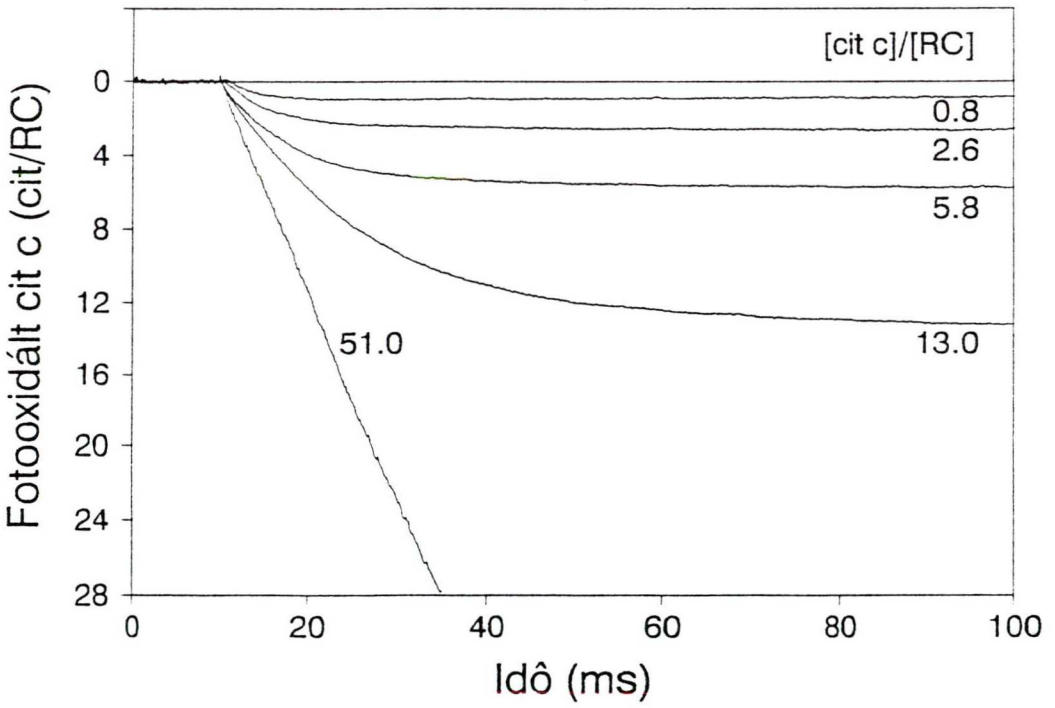
A folytonos gerjesztés mellett megfigyelhető citokróm fotooxidáció sebessége ($k_{cit} = d[C^{3+}]/dt$) erősen függ a donor és akceptor raktár redox állapotától és nagyságától.

Nagy donor koncentráció jelenlétében (200 μM citokróm c) a fotooxidációnak a kinon készlet méretétől való függését a 4.15. ábra mutatja. A görbék kezdeti meredeksége azonos, de csökken a kinon készlet fogyásával és a kinon készlet kimerülésekor konstans értékre áll be. Az átmeneti szakasz rövid. Mindezek arra utalnak, hogy a semleges pH tartományban a citokróm c fotooxidáció sebességét a reakciócentrumon belüli fényindukált elektrontranszfer határozza meg még alacsony kinon koncentráció vagy túlnyomórészt redukált kinon készlet esetén is.

A fotooxidált citokróm mennyisége a kinon raktár kimerülése után is fokozatosan nőtt. Ez a folyamat nagyságrendekkel lassabb az általam vizsgált változásoknál, sebességét a citokróm jel 0.4 és 0.5 s közötti meredekségéből határoztam meg $k_{OX} = 1.9\ s^{-1}$; valószínű oka az, hogy a dihidrokinon lassú, nem citokróm általi visszaoxidációjának eredményeképpen keletkező kinon molekulák ismételten részt vesznek a fotokémiai ciklusban. Vízoldékony UQ_0 esetén megfigyelhető a dihidrokinon citokróm^{3+} általi visszaoxidációja, de ez csak a méréseimnél nagyságrendekkel nagyobb időskálán lép fel (Van Rotterdam és mtsi, 1995). A hidrofób micellába beépülő UQ_6 esetén a donor és akceptor készlet közti redox kölcsönhatás még kisebb, így hatása a 100 ms alatt lezajló folyamatokra elhanyagolható.



4.15. ábra Intenzív lézerdióda (810 nm) gerjesztéssel indukált citokróm c fotooxidáció kinetikája izolált *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumban különböző nagyságú kinon (UQ_6) raktárak jelenlétében. A donor készlet redox állapotát 550 nm hullámhossznál mért abszorpcióváltozásból állapítottam meg. Körülmények: 0.9 μM RC, 0.03% TX-100, 200 μM citokróm c, 5 mM Tris, pH 7.5 és $k_I = 2.2.10^3\ s^{-1}$.

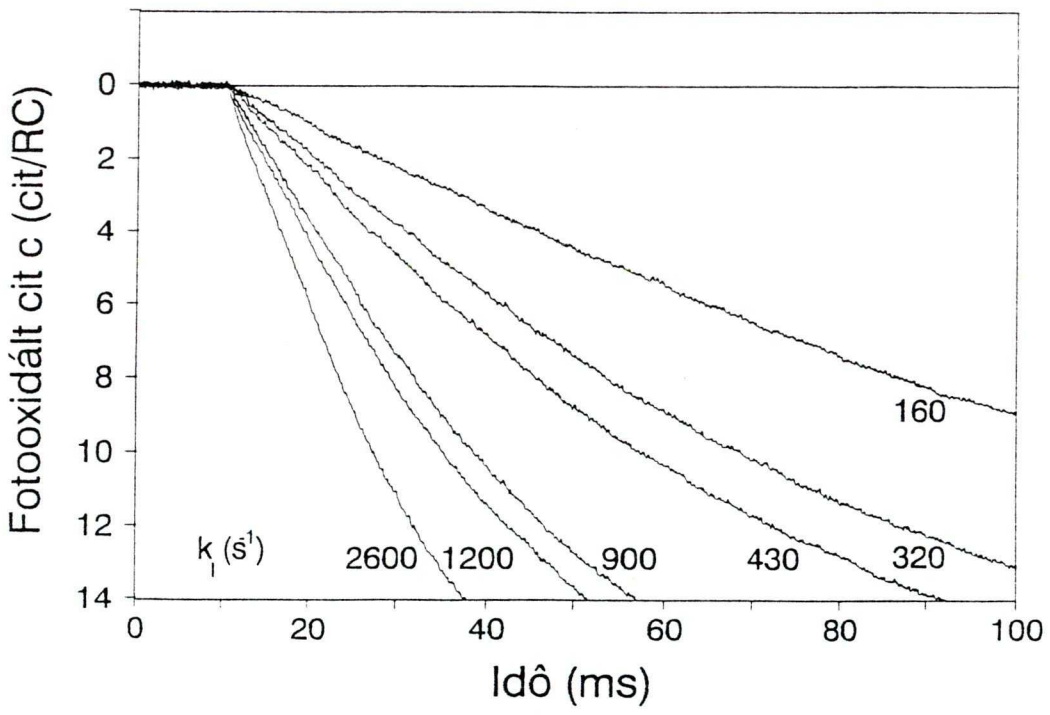


4.16. ábra Intenzív lézerdióda (810 nm) gerjesztéssel indukált citokróm c fotooxidáció kinetikája izolált *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumban különböző nagyságú citokróm raktárak jelenlétében. A donor készlet redox állapotát 550 nm hullámhossznál mért abszorpcióváltozásból állapítottam meg. Körülmények: 0.9 μM RC, 0.03% TX-100, 50 μM UQ_6, 5 mM Tris, pH 7.5 és $k_I = 2.2.10^3\ s^{-1}$.

Az előzőhöz hasonló módon megvizsgáltam a citokróm c készlet kimerülésének hatását a fotooxidációs kinetikákra, nagy kinon koncentráció (50 μM UQ_6) jelenlétében (4.16. ábra). A kinon titrálásnál tapasztalttal ellentétben, a citokróm fotooxidáció kezdeti meredeksége nőtt a donor készlet növelésével. A görbék telítődése a citokróm készlet kimerülésekor következik be. A fentiek alapján a semleges pH tartományban (pH 7.5) és kis koncentrációknál a fotociklus egyik sebesség meghatározó lépése a citokróm c kicserélődés a donor oldalon.

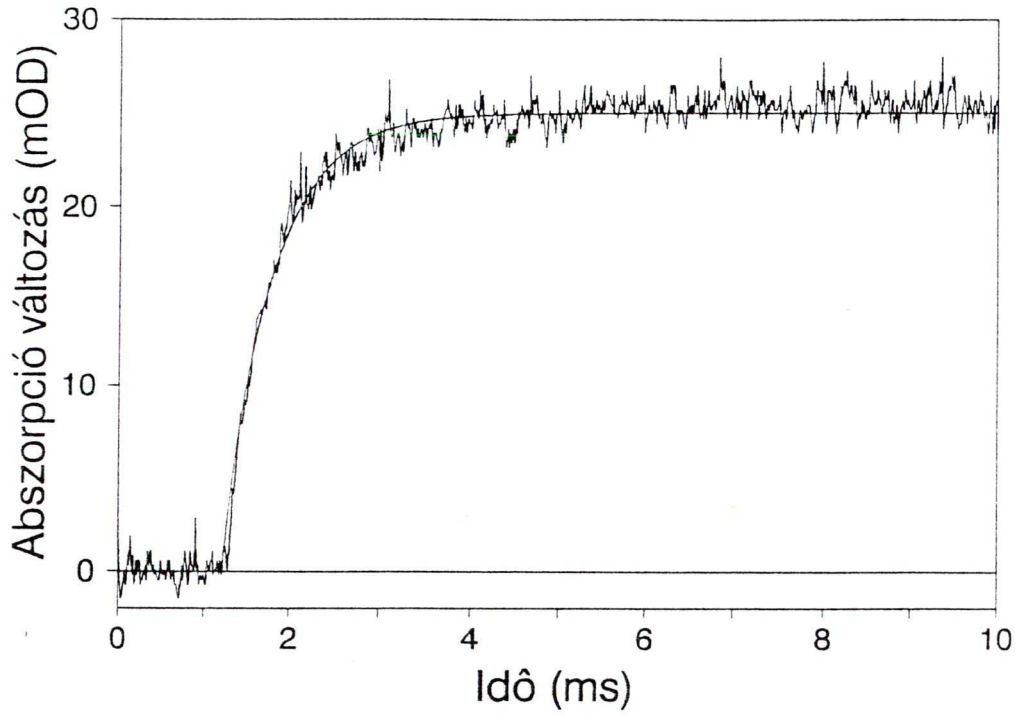
4.9. Stacionárius citokróm c fotooxidáció

Nagy kinon és citokróm c készlet jelenlétében megmértem a citokróm fotooxidácó függését a gerjesztő fény intenzitásától (4.17. ábra).



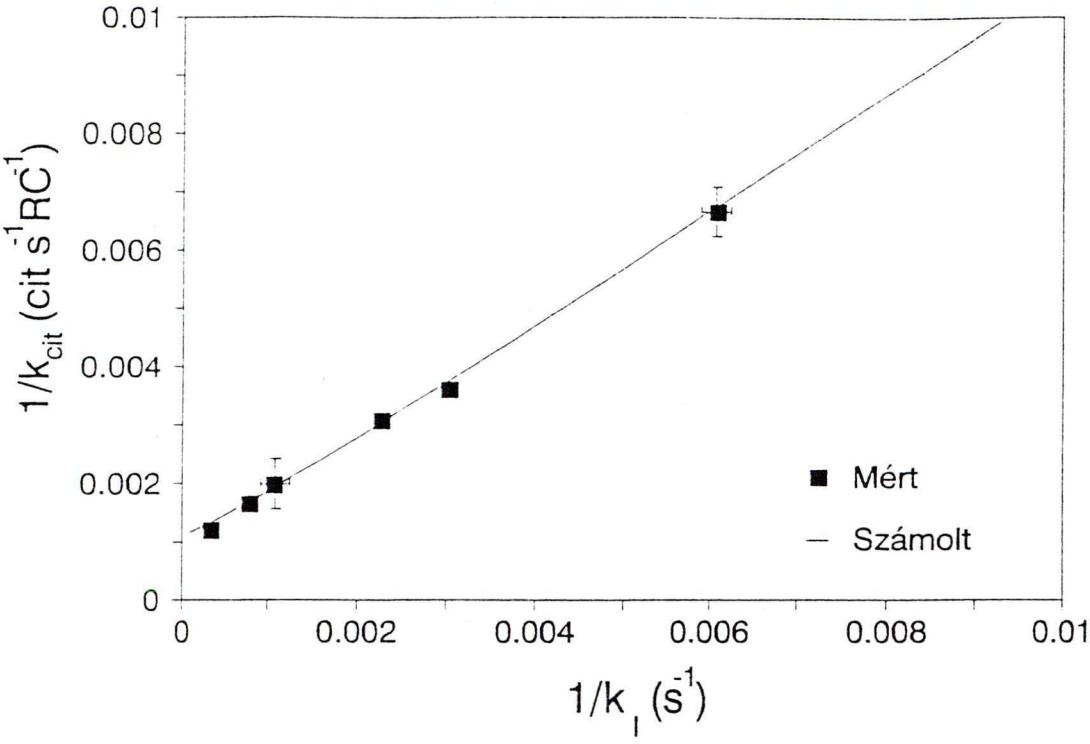
4.17. ábra Folytonos gerjesztéssel *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumban indukált citokróm c fotooxidáció függése a gerjesztő fény intenzitásától. A különböző intenzitású gerjesztéseket ismert transzmissziójú szürke szűrőkkel állítottam be. A donor készlet redox állapotát 550 nm hullámhossznál mért abszorpcióváltozásból határoztam meg. Körülmények: 1.5 μM RC, 0.03% TX–100, 25 μM UQ_6, 100 μM citokróm c, 5 mM Tris, pH 7.5.

A gerjesztés erőssége az indukált fotokémia sebességének megadásával (k_I) definiált (4.14. ábra). Meghatározásához a donor hiányában észlelhető $PQ_A \rightarrow P^+Q_A^-$ fotokémiai reakció sebességi állandóját állapítottam meg. Maximális fényintenzitás mellett a fotokémiai változás nagyságrendekkel gyorsabb a visszareakciónál, így a 430 nm hullámhossznál mért abszorpcióváltozás exponenciális illesztéséből k_I megállapítható (4.18. ábra). Az alacsonyabb intenzitású gerjesztéseket szürke szűrővel állítottam elő; k_I-t pedig a szűrő transzmissziójának ismeretében számoltam ki.



4.18. ábra A maximális fotokémiai gerjesztés megállapítása *Rhodobacter sphaeriodes* reakciócentrum bakteriokloro fill dimerjének monoexponenciális illesztéssel meghatározott fotooxidációs ($PQ \rightarrow P^+Q_A^-$) sebességéből történt. Az ábrán a 430 nm–nél mért kinetika és a τ = 530 μs időállandóval nyert exponenciális lecsengés látható. A körülmények megegyeznek a 4.17. ábráéval.

A citokróm c fotooxidáció sebessége erősen intenzitásfüggő. Mivel az előbbiekben tárgyalt telítődési jelenségek miatt 8–10 átfordulás után csökken a meredeksége, a stacionárius átfordulási sebességek megállapításánál a görbéken az 5. és 7. citokróm fotooxidációja közti szakaszt vettem figyelembe, ahol sem a kezdeti tranziens, sem a telítődés nem játszik lényeges szerepet. A stacionárius átfordulási sebességnek a fényintenzitástól való függését dupla reciprok (k_{cit}^{-1} vs. k_I^{-1}) ábrázolásban tüntetve fel, hozzávetőleg egyenest ad (4.19. ábra).



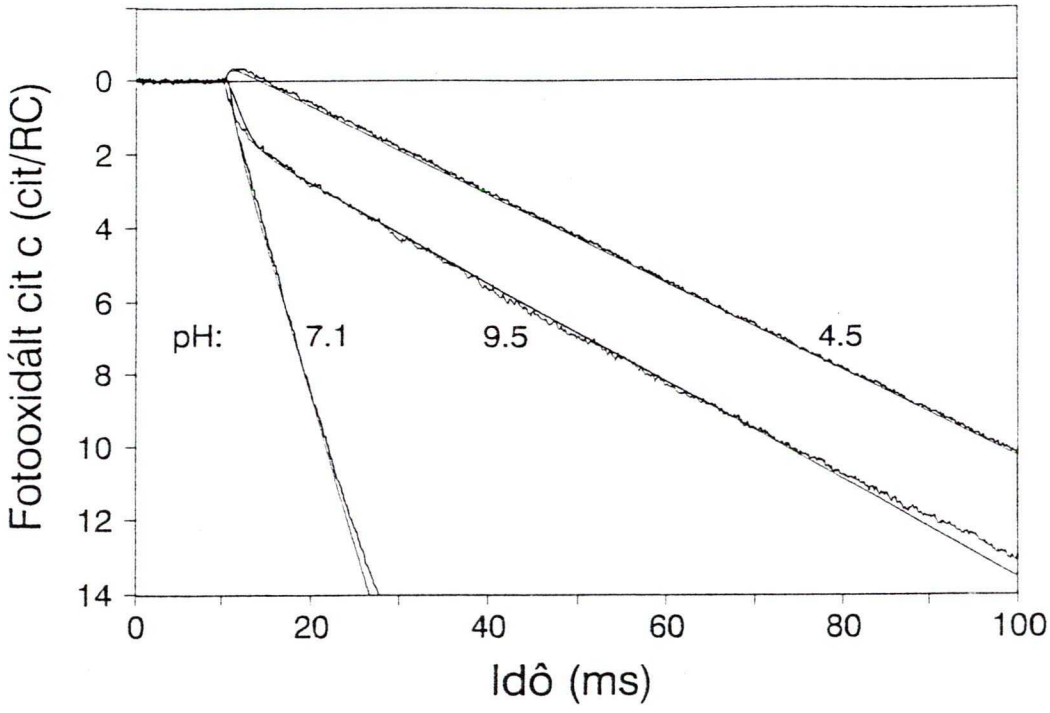
4.19. ábra A fényintenzitástól független maximális átfordulási sebesség megállapítása *Rhodobacter sphaeriodes* izolált reakciócentrumában a fotokémiai gerjesztés és az átfordulási sebesség duplareciprok ábrázolásával. A mérési adatokat (■) a 4.17. ábrán bemutatott görbék meredekségéből származtattam. A folytonos vonal a fotociklus 5.1. ábrán bemutatott modelljéből a Függelékben leírt differenciálegyenletek segítségével $k_{AB}^{(1)} = 5.5.10^3\ s^{-1}$, $k_{AB}^{(2)} = 10^3\ s^{-1}$, $k_C = 2.10^3\ s^{-1}$ és $k_Q = 950\ s^{-1}$ paraméterekkel számolt fényintenzitás függés.

Az egyenes k_{cit}^{-1} tengellyel vett metszete a reakciócentrum fotociklusának fényintenzitástól független jellemzőjét szolgáltatja, a végtelen nagy fényintenzitásokra extrapolált maximális átfordulási sebességet. Látható, hogy a mutánsok jellemzésére elterjedten használt fényintenzitások esetén ($k_I \approx 500\ s^{-1}$) a citokróm c fotooxidáció a vad típusban még erősen fényintenzitás limitált a semleges pH tartományban.

4.10. A citokróm c fotooxidáció tranziens fázisa

A nagy donor és akceptor készlet jelenlétében mérhető citokróm c fotooxidáció az egyenestől nem csak a telítődési fázisban tér el, hanem közvetlenül a gerjesztő fény bekapcsolása után is (4.20. ábra). A megvilágítást megelőző sötétadaptáció során ugyanis

a reakciócentrum donor és akceptor kötőhelyei betöltődnek az egyensúlyi állandónak megfelelő arányban. A görbe kezdeti szakasza már bekötött donor és akceptor molekulákkal rendelkező, PQ_A állapotú (sötétadaptált) reakciócentrum fotokémiai folyamatait tükrözi. Ez eltér az intenzív folytonos gerjesztés stacionárius fázisa alatt kialakult dinamikus egyensúlytól, amelyben a donor és akceptor oldali kicserélődés meghatározó szerepet játszhat.



4.20. ábra A citokróm c folytonos fényben történő fotooxidációs kinetikájának pH függése *Rhodobacter sphaeriodes* reakciócentrumban. A síma folytonos vonal az 5.1. ábrán bemutatott modellből a Függelékben leírt differenciálegyenletek segítségével k_C = 145 s^{-1} és k_Q = 2.000 s^{-1} (pH 4.5); k_C = 4.000 s^{-1} és k_Q = 950 s^{-1} (pH 7.1) illetve k_C = 1.100 s^{-1} és k_Q = 1.000 s^{-1} (pH 9.5) paraméterekkel nyert szimulácó erredménye. A pH 4.5–nél jelentkező kezdeti fázis illesztéséhez a P/P^+ redox változáshoz tartozó extinktció változásra 12 $mM^{-1}cm^{-1}$–t vettem 550 nm hullámhossznál (Maróti et al., 1985). Körülmények: k_I = $2.2.10^3$ s^{-1}, 1.2 μM RC, 0.03% TX–100, 25 μM UQ_6, 100 μM citokróm c, és 5 mM puffer (szukcinát, Tris, vagy Ches).

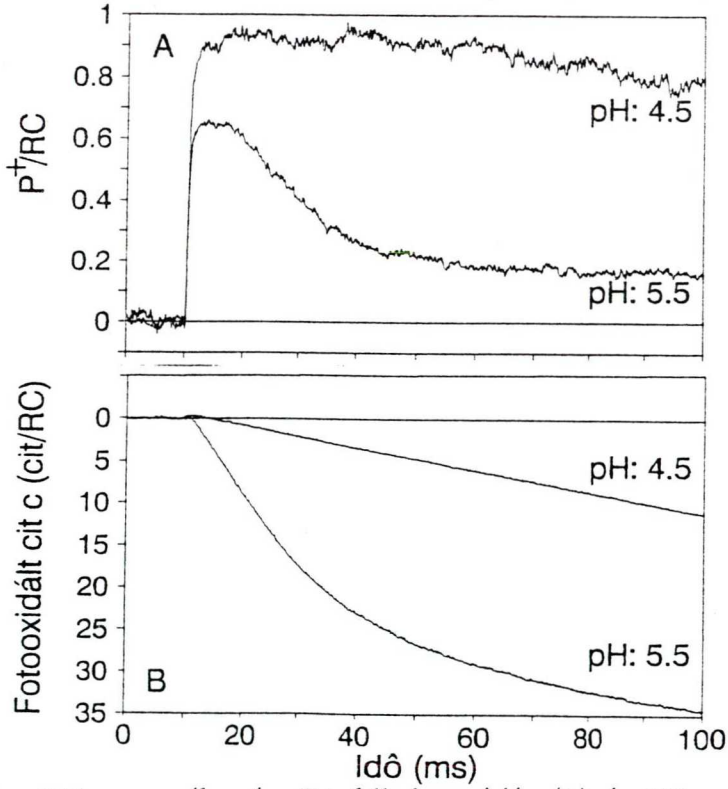
A kezdeti tranziens a legjobban a lúgos pH tartományban figyelhető meg (4.20. ábra). Az első körülbelül 1.5 citokróm c gyors fotooxidációját egy lassabb stacionárius rész követi. A töréspont azzal magyazázható, hogy magas pH–n a két kinon közti elektron egyensúly a Q_A felé tolódik. A kötött citokróm c és kinon molekuláknak köszönhetően az első elektron a fényintenzitás által meghatározott sebességgel érkezik a kinon akceptor komplexbe. A további fotooxidáció már lassabb folyamat, amelyben

a $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ elektrontranszfer a sebesség–meghatározó.

A skála savas végén az abszorpció jel kis kezdeti növekedését stacionárius citokróm fotooxidáció követi körülbelül 5 ms késéssel pH 4.5–nél (4.20. ábra). Ez a kezdeti növekedés azonban nem a citokróm c koncentrációjában bekövetkező változásokat tükrözi, hanem a P/P^+ redox átmenethez tartozó abszorpció változás 550 nm hullámhossznál mérhető járuléka.

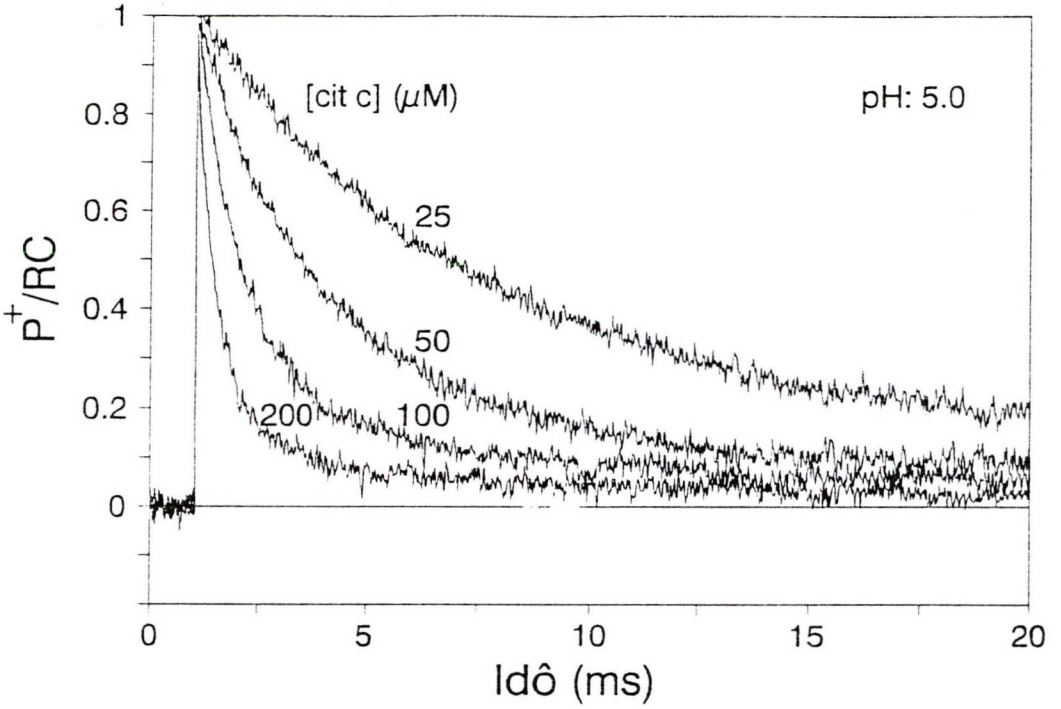
4.11. Citokróm c donálás a savas tartományban

Nagy citokróm c raktár jelenlétében, intenzív folytonos gerjesztés mellett 860 nm hullámhossznál, ahol a citokróm elnyelése nem zavaró, abszorpció változás segítségével nyomon követtem a P^+ koncentráció időbeli változását. Ezt összevetettem az 550 nm–nél mért citokróm fotooxidáció kinetikájával (4.21. ábra).



4.21. ábra 865 nm–nél mért P^+ felhalmozódás (A) és 550 nm–nél mért citokróm c fotooxidáció kinetikájának (B) összevetése alacsony pH–n *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumában folytonos gerjesztés (810 nm) alatt. Körülmények: k_I = 2.2.10^3 s^{-1}, 1.1 μM RC, 0.03% TX–100, 25 μM UQ_6, 100 μM citokróm c és 5 mM Mes (pH 5.5) vagy 5 mM szukcinát (pH 4.5).

A savas tartományban az oxidált dimer nagy mértékben felhalmozódott a stacionárius átfordulás alatt. Ez arra utal, hogy a citokróm c kicserélődés jelentősen meglassul pH 6 alatt. A P^+ koncentrációja gyorsan csökken, ha a kinon készlet kezd kimerülni, mivel az akceptor oldal meglassulása miatt a donor oldalon több P^+ visszaredukálása válik lehetővé. Így a citokróm fotooxidáció sebességének lényeges változása előtt a P^+ fogyása már jelzi a kinon készlet kimerülését.

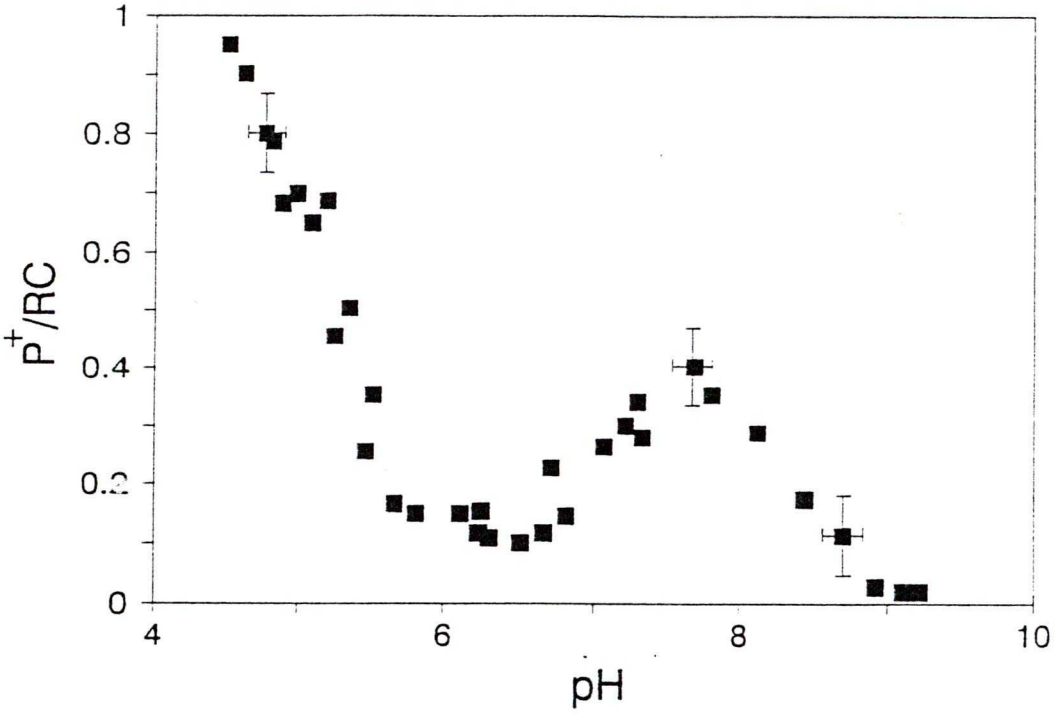


4.22. ábra Rövid telítési gerjesztő impulzussal fotooxidált dimer (P^+) citokróm c általi visszaredukciója alacsony pH-n *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumban. A P^+ eltűnését különböző citokróm c koncentrációk jelenlétében, 865 nm hullámhossznál mértem. Körülmények: 1.2 μM RC, 0.03% TX-100, 25 μM UQ_6 és 5 mM szukcinát.

A citokróm és a fotooxidált dimer közötti elektrontranszfert alacsony pH-n a minta telítési fényimpulzus gerjesztése mellett tanulmányoztam. A P^+ visszaredukció két-három nagyságrenddel lassabb volt pH 5.0-n, mint a semleges tartományban (4.22. ábra). Ebből arra lehet következtetni, hogy még nagy citokróm-koncentrációk (200 μM) jelenlétében is a bimolekuláris (ütközési) folyamat dominál a kötött citokróm c-reakciócentrum komplexen belüli elektron transzferrel szemben. A 4.22. ábrán látható mérésekből nyert bimolekuláris sebességállandó: $4.4 \pm 0.5 \times 10^6\ M^{-1}s^{-1}$. A monomolekuláris tag hiánya arra utal, hogy a ló szívből izolált citokróm c reakciócentrumhoz kötődésének a sebessége savas pH-n erőteljesen lecsökken.

4.12. A citokróm c fotooxidáció pH függése

A citokróm c jelentősen lelassult donálása miatt alacsony pH-n a P^+ állapot felhalmozódik (4.21. ábra). A stacionárius szakaszban felgyűlt fotooxidált dimer mennyisége pH 6 alatt meredeken nő. Keletkezése – kisebb mennyiségben – pH 7.5 körül is tapasztalható (4.23. ábra).



4.23. ábra A stacionárius P^+ felhalmozódás pH függése folytonos megvilágítás és 100 μM citokróm c jelenlétében *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumban. Körülmények: 1.1 μM RC, 0.03% TX-100, 25 μM UQ_6 és 5 mM szukcinát, Pipes, Tris vagy Ches a pH függvényében.

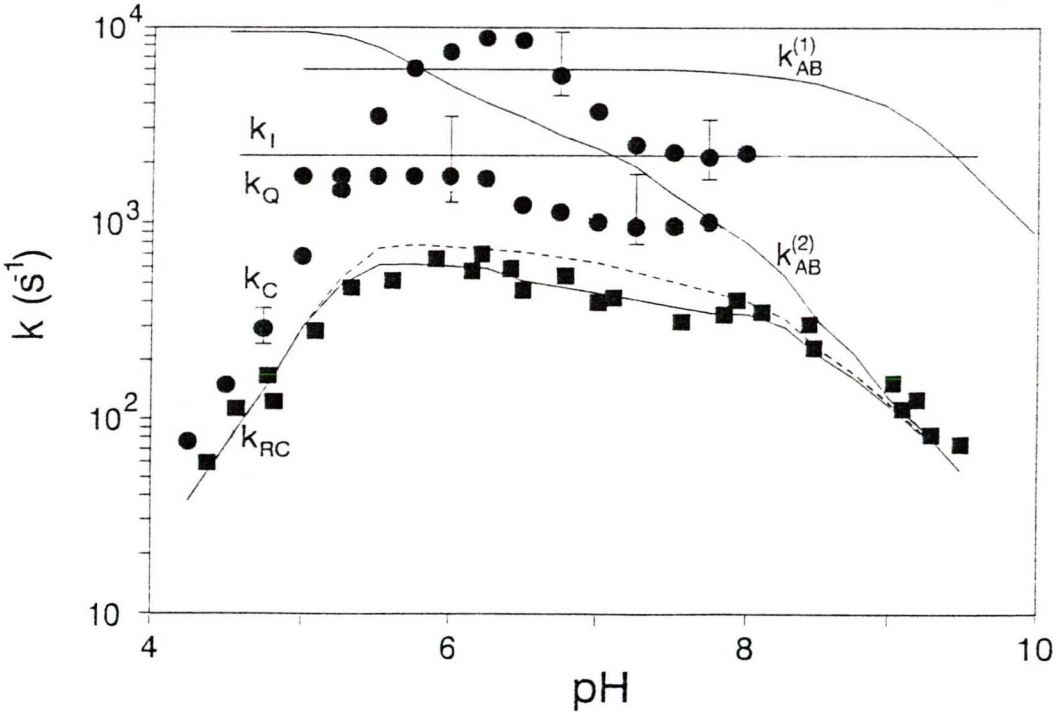
A stacionárius citokróm c fotooxidáció alatt P^+ állapotban fölhalmozott reakciócentrumok arányából a citokróm kicserélődés sebessége a donor oldalon egyszerűen kiszámítható:

$$k_C = 2 \cdot \frac{[RC]}{[P^+]} \cdot k_{RC}$$

Ahol k_{RC} a reakciócentrum átfordulási sebessége a stacionárius szakaszon. Mivel a teljes fotociklus befutása egy kinon redukcióját és két citokróm c oxidációját jelenti, k_{RC} a fotooxidáció sebességéből az alábbiak alapján számítható ki:

$$k_{RC} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\frac{d[C^{3+}]}{dt}}{[RC]}$$

A 4.23. ábra eredményeiből a fenti egyenleteket felhasználva kiszámoltam a donor kicserélődésének sebességét a reakciócentrum citokróm c kötőhelyén. Az így nyert citokróm kicserélődési sebesség (k_C), a fotokémiai gerjesztés (k_I), a két kinon közötti első elektron ($k_{AB}^{(1)}$) és első – proton – csatolt második elektron ($k_{AB}^{(2)}$) transzfer sebességek pH függését a 4.24. ábra szemlélteti. A reakciócentrumon belüli elektrontranszfer sebességeket az irodalomból vettem (Kleinfeld és mtsi, 1984a; Paddock és mtsi, 1994).



4.24. ábra A *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrum stacionárius átfordulása, a fotokémiai gerjesztés (k_I), a kinon akceptor komplexen belüli elektrontranszfer ($k_{AB}^{(1)}$, $k_{AB}^{(2)}$), valamint a citokróm c (k_C) és kinon (k_Q) kicserélődés sebességének pH függése. A citokróm kicserélődés sebességét a 4.23. ábra adataiból határoztam meg (●). A dihidrokinon/kinon kicserélődés (○) sebessége a mérések (■) modell – illesztéséből adódott. Ehhez az 5.1. ábrán bemutatott sémára épülő modellt használtam, amelynek differenciálegyenletrendszere a Függelékben látható. A fotociklus pH függését nagyon nagy kinonkicserélődési sebességekkel ($k_Q \rightarrow \infty$) levezetve a modellből a szaggatott vonallal ábrázolt görbe mutatja. A két kinon közti elektrontranszfer sebességeket ($k_{AB}^{(1)}$, $k_{AB}^{(2)}$) az irodalomból vettem (Kleinfeld és mtsi, 1984a; Paddock és mtsi, 1994).

Nagy gerjesztő intenzitások esetén (k_I = 2.2 x 10^3 s^{-1}), a reakciócentrum stacionárius átfordulási sebessége erős pH függést mutatott (4.24. ábra): széles maximuma van (k_{RC} = 600 s^{-1}) pH 6, valamint egy platója (k_{RC} = 400 s^{-1}) pH 8 körül; a pH skála két széle fele pedig gyorsan csökken. A semleges pH tartománytól távolodva a reakciócentrum stacionárius átfordulásának sebessége meredekebben csökken a savas, mint a lúgos tartományban.

5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. A klorofill dimer fluoreszcenciájának függése a reakciócentrum redox állapotától

A 865 nm–nél mért abszorpció és a 915 nm hullámhossznál mért fluoreszcencia változások kinetikai egyezése (4.4. ábra) és a különböző titrálások eredménye (4.7. és 4.8. ábra) alapján arra következtettem, hogy a változó fluoreszcencia a reakciócentrum klorofill dimerjének tulajdonítható, az állandó rész pedig olyan bakterioklorofill származékoknak, amelyek a fotokémiában nem vesznek részt. Ezen "szennyező" pigmentek abszorpciója nagyon alacsony, a reakciócentrum preparátum spektrumát nem befolyásolják lényegesen. A fluoreszcencia hatásfokuk azonban a dimer hatásfokánál sokkal nagyobb. Ez különösen nagy háttér fluoreszcencia keletkezéséhez vezet *Rhodobacter capsulatus* esetén (4.5. 4.6. és 4.8. ábra).

A bakterioklorofill monomer 915 nm–nél mérhető fluoreszcencia hatásfoka a reakciócentrum redox állapotától függetlenül alacsony, még a direkt gerjesztés esetén is. A reakciócentrum alapállapotában a monomer fluoreszcenciáját kioltja a bakterioklorofill dimerre történő nagy hatásfokú energiatranszfer. A dimer oxidálása nem idéz elő jelentős floureszcencia növekedést, ami arra utal, hogy elektrosztatikus kölcsönhatás révén a P^+ is fluoreszcencia kioltóként hat a gerjesztett bakterioklorofill monomerre. A bakteriofeofitin fluoreszcenciája csökkenthető az abszorpciós maximumától távol (810 nm) gerjesztve.

A reakciócentrum 915 nm–nél mért fluoreszcencia hatásfokának változása leírható a P fluoreszkáló pigment és a szomszédságában elhelyezkedő kioltó (Q_A) koncentrációjának változásával (4.4. – 4.10. ábra). Izolált reakciócentrumot

folytonos fénnyel megvilágítva a kezdeti PQ_A helyett a 915 nm-nél nem fluoreszkáló $P^+Q_A^-$ állapot halmozódik fel. Másrészről gyors elektron donor jelenlétében a megvilágítás hatására a PQ_A állapotnál magasabb fluoreszcencia szintű PQ_A^- állapot keletkezik a klorofill dimer fluoreszcenciáját fotokémiai úton kioltó Q_A eltünésével.

RC redox állapot / Törzs	$P\,Q_A$	P^+	$P\,Q_A^-$
Rb. sphaeroides R-26 , 2.4.1.	1	0.2 ± 0.1	2.7 ± 0.2
Rb. capsulatus	2.6 ± 0.2 $1.9 \pm 0.2^*$	1.7 ± 0.2 $1.0 \pm 0.2^*$	3.4 ± 0.2

5.1. táblázat A *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. és R-26, valamint *Rhodobacter capsulatus* baktérium törzsekből izolált reakciócentrum relatív fluoreszcencia hatásfokai a kofaktorok különböző redox állapotában. A kívülről nagy mennyiségben (40 μM) hozzáadott UQ_6 (*) az állandó fluoreszcencia kioltójaként lépett fel. Körülmények: 1 μM RC, 50 mM NaCl, 0.03% TX-100, 10 mM Tris és pH 8.0.

A *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* bíborbaktériumokból izolált reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka eltér. Ennek oka a fluoreszcencia heterogén eredetében keresendő: a kofaktorok redox állapotára érzéketlen háttér és a változó rész öszegeként áll elő. Habár a két baktériumtörzs reakciócentrumának változó fluoreszcenciája a mérési hibán belül megegyezett, a *Rhodobacter capsulatus* magasabb háttér fluoreszcenciája eredményeképp a változó és állandó rész aránya eltérő. A *Rhodobacter sphaeroides*ből és *Rhodobacter capsulatus*ból preparált reakciócentrum 915 nm hullámhosszanál mért relatív fluoreszcencia hatásfokai a kofaktorok különböző

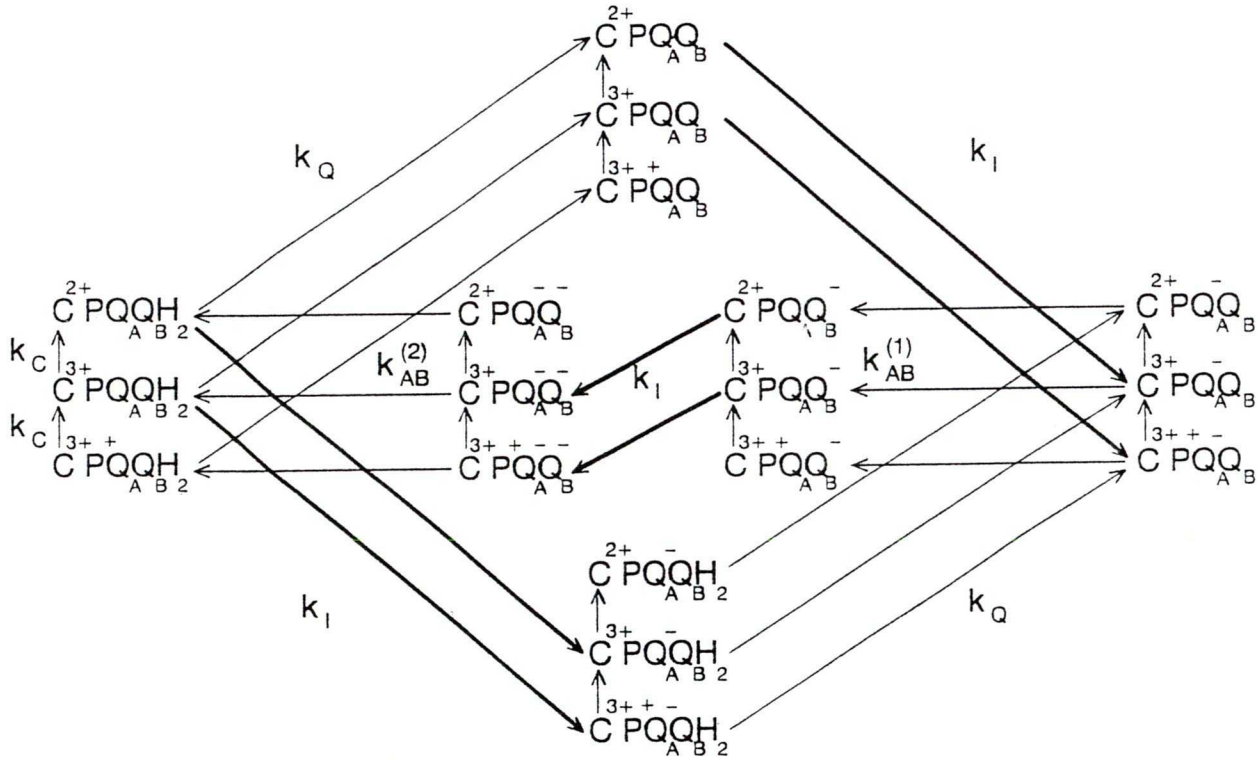
redox állapotában az 5.1. táblázatban láthatók. Érdekes, hogy a *Rhodobacter sphaeroides* vad típusú (2.4.1.) és a karotinmentes (R – 26) mutánsának mérési hibán belül megegyezik a fluoreszcencia hatáfoka, habár a karotin molekula a klorofill dimerhez közel helyzkedik el a reakciócentrum inaktív ágában.

A reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka a Q_B kötőhely állapotától (üres Q_B zseb, Q_B, Q_B^-) független (4.3., 4.4. és 4.13. ábra). A nagy mennyiségben jelen lévő kinon azonban kioltóként hat az állandó fluoreszcenciára, 50 μM UQ_6 jelenlétében a kioltás mintegy 30%–os (4.8. ábra, B). Méréseim arra utalnak, hogy az oxigént termelő zöld növények klorofill fluoreszcenciájához hasonlóan (Vernotte és mtsi, 1979; Krause és Weis, 1991) az egymással versengő fluoreszcencián és fényindukált töltésszétválasztáson kívül a gerjesztett klorofill pigmentek dezaktivációjának más, sugárzás nélküli útjai is vannak.

5.2. A fotociklus kinetikai modellje

Külső elektron donor és akceptor jelenléte, valamint folytonos gerjesztés alkalmazása a reakciócentrum számára az *in vivo* – hoz jobban hasonlító körülményeket teremt. Amint az a 4.14. ábrán is látható, a fotociklus folytonos működéséhez a donor és akceptor molekulák állandó bekötése és leválása szükséges. A reakciócentrum fehérje citokróm kötő része három féle állapotban lehet: üres, valamint kötött C^{2+} vagy C^{3+} molekulákkal betöltött (4.14. ábra, C). Hasonlóan a Q_B kötőhely négy lehetséges állapota: üres Q_B zseb és Q_B, Q_B^- vagy Q_BH_2 molekulákkal betöltött (4.14. ábra, A). Mivel a szemikinon kötődése igen stabil, a kinonredukciós ciklus átfordulását a kinon és dihidrokinon kompetitív ki – be kötése fogja meghatározni. Mivel a reakciócentrum nem mobilis kofaktorai a fotociklus során négy lehetséges redox állapotban lehetnek stabilan (4.14. ábra), a reakciócentrum és donor illetve akceptor kötőhelyeinek összes

lehetséges állapota: 3 x 4 x 4 = 48. A fotociklus szempontjából azonban az üres és a dihidrokinont tartalmazó Q_B zseb, valamint az üres és oxidált donor molekulát (C^{3+}) tartalmazó citokróm kötőhely azonos. A még megmaradó (2 x 3 x 4 = 24) állapotok száma tovább csökkenthető, figyelembe véve, hogy a már kialakult citokróm–reakciócentrum komplexben a redukált donor és az oxidált dimer közti elektrontranszfer igen gyors (Overfield és Wraight, 1980; Tiede és mtsi, 1993; Venturoli és mtsi, 1993; Mathis, 1994). A hat $C^{2+}P^{+}$ rövid életű tranziens állapot kiiktatása után a fennmaradó tizennyolc állapot egymásba alakulását a reakciócentrum fotociklusa során a 5.1. ábra szemlélteti.



5.1. ábra A mérések kiértékelésére és a kinetikák szimulációjára (4.19., 4.20. és 4.24. ábra) használt fotociklusmodell vázlata. A modellt a 4.14. ábrán látható általánosabb séma egyszerüsítéséből nyertem (részletek a szövegben).

Az egyes állapotok közti átmenet során fényindukált töltésszétválasztás (k_I), kinon akceptor komplexen belüli elektron és vele csatolt proton transzfer ($k_{AB}^{(1)}$, $k_{AB}^{(2)}$), citokróm^{3+}/citokróm^{2+} kicserélődés (k_C), vagy dihidrokinon/kinon kicserélődés (k_Q) megy végbe. Ezen sémában a dihidrokinon/kinon kicserélődés a Q_BH_2 képződés utolsó

lépését jelentő második proton transzfert, a $C^{3+}P^{+}$ állapotban bekövetkező citokróm kicserélődés pedig a P^{+} gyors visszaredukcióját is tartalmazza.

A reakciócentrum különböző redox állapotainak időbeli változását leíró differenciálegyenlet rendszert a Függelék tartalmazza. Minthogy a citokróm oxidációjával járó lépések a $C^{2+}PQ_A..$ állapotokban bekövetkező fénygerjesztés, valamint a $C^{3+}P^{+}..$ állapotokban végbemenő citokróm kicserélődés, a fotooxidáció sebessége:

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}] = (\Sigma[C^{2+}PQ_A..]).k_I + (\Sigma[C^{3+}P^{+}..]).k_C$$

Az összegzést a $C^{2+}PQ_A..$ forma esetében a Q_B zseb, $C^{3+}P^{+}..$ forma esetében a kinon akceptor komplex minden lehetséges állapotára ki kell terjeszteni, ami három illetve hat tagot jelent a fenti egyenlet jobb oldalán. Nagy citokróm c és kinon készlet jelenlétében a donor és akceptor oldali kicserélődés sebessége időtől független, és a visszareakciónál sokkal gyorsabb, így az elhanyagolható. Ha a donor vagy akceptor raktárak közül bármelyik kezd kimerülni, az időtől éppen magán a fotocikluson keresztül függő sebességi állandók miatt a folyamatot leíró differenciálegyenlet csatolttá válik; a donor és akceptor oldali kicserélődés visszareakcióinak megnövekedett sebessége miatt pedig további tagokkal bővül. Ennek elkerülésére a mérések során nagy citokróm c és kinon raktárakat állítottam be.

A citokróm fotooxidációs mérések eredményeinek szimulálását a Függelékben látható egyenletek numerikus integrálásával nyertem (4.19., 4.20. és 4.24. ábra). Az ábraszövegekben és a 4.24. ábrán feltüntetett paramétereket használva a számolások és mérések eredménye jól egyezett. A modell nem ad szigorúan lineáris függést a stacionárius citokróm fotooxidáció és a fényintenzitás dupla reciprok ábrázolására, de az egyenestől való eltérés csekély (4.19. ábra). Ez lehetővé teszi a fényintenzitástól független átfordulási sebesség lineáris interpolációval történő meghatározását a függőleges tengelymetszetből (k_{cit} = 890 s^{-1} pH 7.8–nál), ami támpontul szolgálhat a vad típusú és mutáns reakciócentrumok fotociklusának összehasonlításánál.

5.3. A fotociklus sebességmeghatározó lépései

A reakciócentrum átfordulási sebességét a fotociklus leglassabb lépései határozzák meg. A semleges pH tartományban, a mutánsok karakterizálására általában használt gerjesztés mellett a citokróm fotooxidációja fényintenzitás limitált. Az eddigieknél nagyobb fényintenzitást alkalmazva, a fotokémiai gerjesztés a termikus lépések sebességével összmérhetővé vált. Ez lehetővé tette a reakciócentrum átfordulás sebességmeghatározó lépéseinek tisztázását (4.24. ábra).

Az alkalikus tartományban (pH > 8) a reakciócentrum stacionárius átfordulásának sebessége gyorsan csökken a pH növelésével (4.24. ábra). A lassúbb stacionárius fázis körülbelül 1.5 citokróm c gyors fotooxidációja után áll be (4.20. ábra). A jelenségért a reakciócentrumon belüli proton–csatolt elektrontranszfer sebességek csökkenése tehető felelőssé. Habár magas pH–n a két kinon közti első elektrontranszfer ($k_{AB}^{(1)}$) lelassul a GluL212 deprotonációja következtében, lényegesen gyorsabb marad mint $k_{AB}^{(2)}$ (4.24. ábra). A második proton felvétele a lúgos tartományban, pK = 8.5 fölött, szintén lelassul (McPherson és mtsi, 1993, 1994). Méréseim azonban azt támasztják alá, hogy sem az első elektron sem a második proton transzfer nem játszik lényeges szerepet a stacionárius átfordulás sebességének meghatározásában. A 4.24. ábrán látható, hogy a reakciócentrum átfordulási sebessége az első protonnal csatolt második elektron átadásának sebességével ($k_{AB}^{(2)}$) egyező módon csökkent a pH növelésével, vagyis magas pH–n ez a sebességmeghatározó lépés.

A reakciócentrum átfordulási sebessége a semleges pH tartományban a legnagyobb. Az elektron– és protontranszfer lépések gyorsabbak, mint a lézerdióda gerjesztette fotokémiai reakció, ezért az átfordulási sebességet a fényintenzitás és a dihidrokinon/kinon kicserélődés határozza meg. Nagyobb fényintenzitások alkalmazása

a kinonkicserélődés sebességmeghatározó szerepét jobban kiemelné, de az általam létrehozott körülmények között is becslés tehető a nagyságára a 4.24. ábra adatait különböző kinon kicserélődési sebességekkel illesztve. A dihidrokinon/kinon kicserélődés enyhén pH függőnek adódott és pH 6 körött nagyobb volt, mint 2.000 s^{-1}. Velthuys (1982) azt tapasztalta, hogy a zöld növények második fotokémiai rendszerében a kinon kicserélődés gyorsabb, mint 100 s^{-1}. Okamura és Feher (1995) a bíborbakteriális reakciócentrum kinonkicserélődési sebességét 1000 s^{-1}-re becsülte.

A savas tartományban (pH < 6) a citokróm c kicserélődés a sebesség-meghatározó. Az alacsony pH-n végzett mérések eredménye a citokróm c és a reakciócentrum elektrosztatikus kötődése alapján értelmezhető. A citokróm c donálási sebességének meredek csökkenését tapasztaltam pH 6 alatt (4.20., 4.21., 4.22. és 4.24. ábra). Ez a reakciócentrum izoelektromos pontja (pI_{RC} = 6.1) közelében, a citokróm c izoelektromos pontjától ($pI_{cit\ c}$ = 10.1) távol van (Prince és mtsi, 1974). A donor kicserélődése az oxidált citokróm c leválásának és redukált citokróm c bekötésének egymásutánját jelenti. A két lépés sebességét a reakciócentrum és citokróm c elektrosztatikus vonzása vagy taszítása ellentétesen módosítja. A citokróm-reakciócentrum komplex amúgy is gyors (Venturoli és mtsi, 1990) disszociációjának további gyorsulása azonban nem befolyásolja oly lényegesen a donor kicserélődéshez szükséges időt, mint a citokróm c bekötésének lelassulása. Az emlős állatokból származó citokróm c-vel ellentétben, a bíbor baktériumokban *in vivo* fellelhető citokróm c_2 izoelektromos pontja alacsony (pI_{cit} = 5.5; Bartsch, 1971). Mivel ez közel esik a reakciócentrum pI pontjához, a két fehérje össztöltése minden pH-n azonos előjelű, ami érthetővé teszi a Prince és munkatársai (1974) által kapott pH-független citokróm c_2 donálási sebességet.

6. ÖSSZEFOLGLALÁS

☺ A biológiai minták immobilizálására elterjedten használt poliakrilamid a kloroplasztiszokon végzett elektromos mérésekre nem alkalmas, helyette poliagaróz gél használható. Borsóból (*Pisum sativum*) izolált, poliagaróz gélben irányított és immobilizált kloroplasztiszokban keletkező fotofeszültség erős oirentáció – függést mutat. Irányított tilakoid membránokon az 580 nm hullámhosszú nemtelítési lézerimpulzus által indukált fotofeszültség a membránok orientációjától függően egy negatív és egy pozitív komponensre bomlik (1).

☺ Az azonos redox állapotban lévő *Rhodobacter sphaeroides* R–26 és 2.4.1 reakciócentrumok fluoreszcencia hatásfoka a mérési hibán belül azonos. Ugyancsak megegyezik a *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* reakciócentrum fluoreszcenciájának változó része. A változó és állandó rész aránya a magasabb háttérfluoreszcencia miatt azonban kisebb a *Rhodobacter capsulatus* esetén (2, 4).

☺ A tanulmányozott bíborbakteriális reakciócentrumok fluoreszcencia hatásfoka nem függ a Q_B redox állapotától. A relatív hatásfokok megállapításánál a *Rhodobacter sphaeroides* PQ_A állapotban mért fluoreszcenciáját tekintettem egységnyinek. Így a *Rhodobacter capsulatus* relatív fluoreszcencia hatásfoka PQ_A állapotban 2.6 ± 0.2 (alacsony kinon koncentráció) és 1.9 ± 0.2 (40μM UQ_6) érték között változik a kinon koncentrációtól függően. A fotokémiai kioltás hiányában ennél magasabb a fluoreszcencia hatásfok a PQ_A^- redox állapotban (*Rhodobacter sphaeroides* 2.7 ± 0.2; *Rhodobacter capsulatus* 3.4 ± 0.2) (2, 4).

☺ P^+ állapotban a reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka a kinon akceptor komplex redox állapotától függetlenül alacsony: *Rhodobacter sphaeroides* relatív fluoreszcencia hatásfoka 0.2 ± 0.1, míg *Rhodobacter capsulatus* esetén 1.7 ± 0.2 (alacsony kinon koncentráció) és 1.0 ± 0.2 (40μM) UQ_6 értékek között változik a kinon koncentrációtól függően (4).

☺ *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* bíborbaktériumokból izolált reakciócentrum P^+ állapotában a fluoreszcencia gerjesztési spektruma a mintában még jelen lévő klorofillszármazékokra utalt, amelyek a fotoszintetikus folyamatokban nem vesznek részt. Ezekre a kívülről hozzáadott nagy mennyiségű (40 μM) UQ_6 fluoreszcencia kioltóként hat. A reakciócentrum redox állapotától függő (változó) fluoreszcencia gerjesztési spektruma jól megegyezik a reakciócentrum abszorpciós spektrumával (4).

☺ A *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* bíborbaktériumok fotoszintetikus reakciócentrumának fluoreszcencia változásai (mind folytonos gerjesztés, mind telítési fényimpulzussorozat esetén) értelmezhetőek a megállapított hatásfokok és a két kinon közti elektronegyensúlyi állandó ismeretében (2, 4).

☺ Új fotociklus modellt dolgoztam ki a bíborbaktériumok reakciócentrumában az *in vivo*–hoz hasonló körülmények között (folytonos fényben elektron donor (citokróm c) és akceptor (UQ_6) készlet jelenlétében) lejátszódó redox folyamatok értelmezésére (3, 5).

☺ *Rhodobacter sphaeroides* R–26 reakciócentrumban folytonos gerjesztés alatt a citokróm c fotooxidáció erős pH függést mutat. Ebből megállapítható a fotociklus sebességmeghatározó lépéseinek pH függése. A (ló szívből izolált) citokróm c

kicserélődés nagymértékű lassulása a pH < 6 tartományban (k_C = 15 ± 3 s^{-1}, pH: 4.5; k_C > 5000 s^{-1}, pH: 6.5) a citokróm átfordulás drasztikus csökkenését okozza. Semleges (6 < pH < 8) pH–kon a sebességmeghatározó a fotokémiai lépés, valamint a dihidrokinon/kinon kicserélődés (k_Q = 900 – 2000 s^{-1}, pH: 7.0). A lúgos tartományban (pH > 8) a sebességmeghatározó lépés a fehérjén belüli proton – csatolt második elektron transzfer (3, 5, 6).

☺ A modell alapján az átfordulás stacionárius szakaszának pH függéséből meghatároztam a dihidrokinon/kinon (k_Q) és citokróm^{3+}/citokróm^{2+} (k_C) kicserélődés sebességi állandóit. Az így nyert paraméterekkel számolt kinetikák és a citokróm c fotooxidáció kezdeti tranziens fázisának pH függése jó egyezést mutatnak (5).

☺ Az irodalomban használt fényintenzitásoknál a *Rhodobacter sphaeroides* R–26 reakciócentrum fotociklusában a fényindukált lépés a sebességmeghatározó a semleges pH tartományban. A fotociklus töltésmozgásainak jellemzésére egy jobb, a fényintenzitástól független leírást ad az átfordulási sebesség nagy fényintenzitásokra extrapolált határértéke, ami az átfordulási sebesség fényintenzitás függésének dupla reciprok ábrázolásában lineáris interpolációval tehető meg. A fényintenzitás reciprokában a nem lineáris tagok ugyanis elhanyagolhatóak a lineáris tag mellett (5, 6).

7. FÜGGELÉK

A fotooxidáció kinetikájának modellezéséhez alkalmazott differenciálegyenlet–rendszer:

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}P^{+}Q_AQH_2] = -(k_C+k_Q)\,[C^{3+}P^{+}Q_AQH_2] + k_{AB}^{(2)}\,[C^{3+}P^{+}Q_A^{-}Q^{-}]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}PQ_AQH_2] = k_C[C^{3+}P^{+}Q_AQH_2] - (k_C+k_Q+k_I)\,[C^{3+}PQ_AQH_2] + k_{AB}^{(2)}\,[C^{3+}PQ_A^{-}Q^{-}]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{2+}PQ_AQH_2] = k_C[C^{3+}PQ_AQH_2] - (k_Q+k_I)\,[C^{2+}PQ_AQH_2] + k_{AB}^{(2)}\,[C^{2+}PQ_A^{-}Q^{-}]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}P^{+}Q_A^{-}QH_2] = k_I[C^{3+}PQ_AQH_2] - (k_C+k_Q)\,[C^{3+}P^{+}Q_A^{-}QH_2]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}PQ_A^{-}QH_2] = k_I[C^{2+}PQ_AQH_2] + k_C[C^{3+}P^{+}Q_A^{-}QH_2] - (k_C+k_Q)\,[C^{3+}PQ_A^{-}QH_2]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{2+}PQ_A^{-}QH_2] = k_C[C^{3+}PQ_A^{-}QH_2] - k_Q[C^{2+}PQ_A^{-}QH_2]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}P^{+}Q_AQ] = k_Q[C^{3+}P^{+}Q_AQH_2] - k_C[C^{3+}P^{+}Q_AQ]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}PQ_AQ] = k_Q[C^{3+}PQ_AQH_2] + k_C[C^{3+}P^{+}Q_AQ] - (k_I+k_C)\,[C^{3+}PQ_AQ]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{2+}PQ_AQ] = k_Q[C^{2+}PQ_AQH_2] + k_C[C^{3+}PQ_AQ] - k_I[C^{2+}PQ_AQ]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}P^{+}Q_A^{-}Q] = k_Q[C^{3+}P^{+}Q_A^{-}QH_2] + k_I[C^{3+}PQ_AQ] - (k_C+k_{AB}^{(1)})\,[C^{3+}P^{+}Q_A^{-}Q]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}PQ_A^-Q] = k_Q[C^{3+}PQ_A^-QH_2] + k_I[C^{2+}PQ_AQ] + k_C[C^{3+}P^+Q_A^-Q] - (k_C + k_{AB}^{(1)})[C^{3+}PQ_A^-Q]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{2+}PQ_A^-Q] = k_Q[C^{2+}PQ_A^-QH_2] + k_C[C^{3+}PQ_A^-Q] - k_{AB}^{(1)}[C^{2+}PQ_A^-Q]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}P^+Q_AQ^-] = k_{AB}^{(1)}[C^{3+}P^+Q_A^-Q] - k_C[C^{3+}P^+Q_AQ^-]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}PQ_AQ^-] = k_{AB}^{(1)}[C^{3+}PQ_A^-Q] + k_C[C^{3+}P^+Q_AQ^-] - (k_C + k_I)[C^{3+}PQ_AQ^-]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{2+}PQ_AQ^-] = k_{AB}^{(1)}[C^{2+}PQ_A^-Q] + k_C[C^{3+}PQ_AQ^-] - k_I[C^{2+}PQ_AQ^-]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}P^+Q_A^-Q^-] = k_I[C^{3+}PQ_AQ^-] - (k_C + k_{AB}^{(2)})[C^{3+}P^+Q_A^-Q^-]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{3+}PQ_A^-Q^-] = k_I[C^{2+}PQ_AQ^-] + k_C[C^{3+}P^+Q_A^-Q^-] - (k_C + k_{AB}^{(2)})[C^{3+}PQ_A^-Q^-]$$

$$\frac{d}{dt}[C^{2+}PQ_A^-Q^-] = k_C[C^{3+}PQ_A^-Q^-] - k_{AB}^{(2)}[C^{2+}PQ_A^-Q^-]$$

A fenti egyenleteket időfüggetlen sebességállandókkal (nagy donor és akceptor készlet), numerikus integrációval oldottam meg.

8. IRODALOM

Adir, N., H.L. Axelrod, P. Beroza, R.A. Isaacson, S.H. Rongey, M.Y. Okamura és G. Feher (1996) Co-cristallization and characterization of the photosynthetic reaction center-cytochrome c_2 complex from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry 35: 2535-2547

Albertsson, P.A. (1995) The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane – A model for the domain organization. Photosynth. Res. 46: 141-149

Allen, J.P., G. Feher, D.C. Rees, J. Deisenhofer, H. Michel és R. Huber (1986) Stuctural homology of reaction centers from *Rb. sphaeroides* and *Rp. viridis* as determined by X-ray diffraction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8589-8593

Allen, J.P., G. Feher, T.O. Yeates, H. Komiya és D.C. Rees (1988) Stucture of the reaction center from *Rb. sphaeroides* R-26: Protein-cofactor (quinones and Fe^{2+}) interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8487-8491

Amesz, J. (1991) Green photosynthetic bacteria and heliobacteria Variations in Autotrophic Life Academic Press, Inc.: 99-119

Arata, H. és W.W Parson (1981) Delayed flurescence from *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers. Enthalpy and free energy changes accompanying electron transfer from P-870 to quinones. Biochim. Biophys Acta 638: 201-209

Arlt, T., S. Schmidt, W. Kaiser, C. Lauterwasser, M. Meyer, H. Scheer és W. Zinth (1993) The accessory bacteriochlorophyll: a real electron carrier in primary photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11757-11761

Arlt, T., B. Dohse, S. Schmidt, J. Wachtveitl, E. Laussermair, W Zinth és D. Oesterhelt (1996) Electron transfer dynamics of *Rhodopseudomonas viridis* reaction centers with a modified binding site for the accessory bacterichlorophyll. Biochemistry 35: 9235-9244

Arnoux, B., A. Ducruix, C. Astier, M. Picaud, M. Roth és F. Reiss-Husson (1990) Towards the understanding of the function of *Rhodobacter sphaeroides* Y wild type reaction center – Gene cloning, protein and detergent structures in the 3-dimensional crystals. Biochimie 72: 525-530

Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Plant Physiol. 24: 1-15

Baciou, L., E.J. Bylina és P. Sebban (1993) Study of wild type and genetically modified reaction centers from *Rhodobacter capsulatus*: Structural comparison with *Rhodopseudomonas viridis* and *Rhodobacter sphaeroides*. Biophys J. 65: 652-660

Baciou. L. és H. Michel (1995) Interrumption of the water chain in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* reduces the rates of the proton uptake and of the second electron transfer to Q_B. Biochemistry 34: 7967-7972

Bartsch, R.G. (1971) Cytochromes: Bacterial *in* Methods in Enzimology. (szerk. A. San Pietro) Academic Press, New York. 23A: 344-363

Basham, J.A. (1979) The reductive pentose phosphate cycle and its regulation. *in* Photosynthesis II. (szerk. M. Gibbs és E. Latzko) Springer–Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 9–30

Becker, J.F., N.E. Geacintov és C.E. Swenberg (1978) Photovoltages in suspensions of magnetically oriented chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 503: 545–554

Beekman, L.M.P., R.W. Visschers, R. Monshouwer, M. Heer–Dawson, T.A. Mattioli, P. McGlynn, C.N. Hunter, B. Robert, H.M. Van Stokkum, R. Van Grondelle és M.R. Jones (1995) Time resolved and steady–state spectroscopic analysis of membrane–bound reaction centers fom *Rhodobacter sphaeroides*: Comparisons with detergent–solubilised complexes. Biochemistry 34: 14712–14721

Beroza, P., D.R. Fredkin, M.Y. Okamura és G. Feher (1992) Proton transfer pathways in the reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*: A computational study. *in* The Photosynthetic Reaction Center II. (szerk. J. Breton és A. Verméglio) Plenum Press, New York: 363–374

Blankenship, R.E. (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. Photosynth. Res. 33: 91–111

Blumenfeld, L.A. (1978) The physical aspects of energy transduction in biological systems. Quart. Rev. Biophys. 11: 251–308

Breton, J., J.–L. Martin, G.R. Fleming és J.–C. Lambry (1988) Low temperature femtosecond spectroscopy of the initial step of electron transfer in reaction centers from photosynthetic purple bacteria. Biochemistry 27: 8276–8284

Brzezinski P., M.Y. Okamura és G. Feher (1992) Stuctural changes following the formation of $D^+Q_A^-$ in bacterial reaction centers: measurement of light–induced electrogenic events in RCs incorporated in a phospholipid monolayer. *in* The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II (szerk. J. Breton és A. Verméglio) Plenum Press, New York: 321 – 330

Brzezinski, P. és L.–E. Andréasson (1995) Trypsin treatment of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* in the dark and under illumination: Protein structural changes follow charge separation. Biohemistry 34: 7498–7506

Chang, C.–H., D. Tiede, U. Smith, J. Norris és M. Schiffer (1986) Structure of *Rb. sphaeroides* R–26 reaction center. FEBS Lett. 205: 82–86

Clayton, R.K. (1966) Relations between photochemistry and fluorescence in cells and extracts of photosynthetic bacteria. Photochem. Photobiol. 5: 807–821

Clayton, R.K. (1972) Physical mechanisms in photosynthesis: Past elucidation and current problems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 44–49

Clayton, R.K. és R. Haselkorn (1972) Protein components of bacterial photosynthetic membranes. J. Mol. Biol. 68: 97–105

Clayton, R.K. (1977) Fluorescence of photosynthetic reaction centers at low temperatures. *in* Photosynthetic Organelles: Structure and Function (szerk. S. Miyachi, S. Katoh, Y. Fujita és K. Shibata) Special Issue Photosynthetic Organelles Plant Cell Physiol. No. 3: 87–96

Clayton, R.K. (1980) Photosynthesis: Phisical mechanisms and chemical patterns. Cambridge University Press, Cambridge

Cramer, W.A. és D.B. Knaff (1990) Energy transduction in biological membranes. A textbook of bioenergetics. Springer–Verlag, New York, Inc.

Cramer, W.A., P.N. Furbacher, A. Szczepaniak és G.-S. Tae (1991) Electron transport between photosystem II and photosystem I. Curr. Top. Bioenerg. 16: 179-222

Crofts, A.R. és C.A. Wraight (1983) The electrochemical domain of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 726: 149-185

Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber és H. Michel (1984) X-ray struture analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodopseudomonas viridis*. J. Mol. Biol. 180: 385-398

Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber és H. Michel (1985a) Structure of the protein subunits in the photosynthetic center of *Rhodopseudomonas viridis* at 3 Å resolution. Nature 318: 618-624

Deisenhofer, J., H. Michel és R. Huber (1985b) The structural basis of photosynthetic light reactions in bacteria. Trends Biochem. Sci. 10: 243-248

Deisenhofer, J. és H. Michel (1989) The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. The EMBO J. 8 (8): 2149-2170

Deisenhofer, J., O. Epp, J. Sinning és H. Michel (1995) crystallographic refinement at 2,3 Å resolution and refined model of the photosynthetycreaction center from *Rhodopseudomonas viridis*. J. Mol. Biol. 246: 429-457

Dobek, A., G. Pallotin, J. Gapinski, J. Breton, W. Leibl és H.-W. Trissl (1994) Amplitude and polarity of the light gradient photovoltage from chloroplasts. J. Theor. Biol 170: 129-143

Drepper, F., M. Hippler, W. Nitschke és W. Haehnel (1996) Binding dinamics and electron transfer between plastocyanin and photosystem I. Biohemistry 35: 1282-1295

Dutton, P.L. (1986) Energy transduction in anoxigenic photosynthesis. *in* Photosynthesis III. (szerk. L.A. Staehelin és C.J. Arntzen) Sprinnger-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 197-237

Ermler, U., H. Michel és M. Schiffer (1994a) Structure and function of the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* J. Bioenerg. Biomembr. 26: 5-15

Ermler, U., G. Fritsch, S.K. Buchanan és H. Michel (1994b) Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactor interactions. Structure 2: 925-936

Feher, G. (1971) Some chemical and physical properties of a bacterial reaction center particle and its primary photochemical reactants. Photochem. Photobiol. 14: 373-387

Feher, G., J.P. Allen, M.Y. Okamura és D.C.Rees (1989) Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centers. Nature 339: 111-116

Feher, G. (1992) The Bruker Lecture: Identification and characterization of the primary donor in bacterial photosynthesis: a chronological account of an EPR/ENDOR investigation. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2: 1861-1874

Fleischman, D. (1995) Photosynthesis *in* Cell Physiol Source Book Academic Press, Inc.: 682-696

Foloppe, N., M. Ferrand, J. Breton és J.C. Smith (1995) Structural model of the photosynthetic reaction centrer of *Rhodobacter capsulatus*. Proteins: Stucture, Function, Genetics 22: 226-244

Fowler, C.F. és B. Kok (1974) Direct observation of light-induced electric field in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 357: 308-318

Francke, C. és J. Amesz (1995) The sise of the photosynthetic unit in purple bacteria. Photosynth. Res. 46: 347-352

Garab Gy.I. és J. Breton (1976) Polarized light spectroscopy on oriented spinach chloroplasts. Fluorescence emission at low temperatures. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71: 1095-1102

Golbeck, J.H. (1993) Shared thematic elements in photochemical reaction centers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1642-1646

Gopher, A., Y. Blatt, M. Schönfeld, M.Y. Okamura, G. Feher és M. Montal (1985) The effect of an applied electric field on the charge recombination kinetics in reaction centers reconstituted in planar lipid bilayers. Biophys. J. 48: 311-320

Graige, M. S., M. L. Paddock, J. M. Bruce, G. Feher és M. Y. Okamura (1996) Mechanism of proton-coupled electron transfer for quinone (Q_B) reduction in reaction centers of *Rb. Sphaeroides*. J. Am. Chem. Soc. 118: 9005-9016.

Gräber, P. és H.-W. Trissl (1981) On the rise time and polarity of the photovoltage generated by light gradients in chloroplast suspension. FEBS Lett. 123: 95-99

Gunner, M.R. (1991) The reaction center protein from purple bacteria: Structure and function. Curr. Top. Bioenerg. 16.: 319-367

Hanson, D.K., L. Baciou, D.M. Tiede, S.L. Nance, M. Schiffer és P. Sebban (1992) In bacterial reaction centers proton can diffuse to the secondary quinone by alternative pathvays. Biochim. Biophys. Acta 1102: 260-265

Häder, D.-P. és M. Tevini (1987) General photobiology. Pergamon Press, Oxford

Hienerwaldel, R., S. Grzybek, C. Fogel, W. Kreutz, M.Y. Okamura, M.L. Paddock, J. Breton, E. Nabedryk és W. Mäntele (1995) Protonation of Glu L212 following Q_B^-formation in the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*: Evidence from time-resolved infrared spectroscopy. Biochemistry 34, 2832-2843

Holzapfel, W., U. Finkele, W. Kaiser, D. Oesterhelt, H. Scheer, H.U. Stilz és W. Zinth (1989) Observation of bacteriochlorophyll anion radical during the primary charge separation in reaction center. Chem. Phys. Lett. 160: 1-7

Holzapfel, W., U. Finkele, W. Kaiser, D. Oesterhelt, H. Scheer, H.U. Stilz és W. Zinth (1990) Initial electron-transfer in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5168-5172

Holzwarth, A.R. és M.G. Müller (1996) Energetics and kinetics of radical pairs in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. A femtosecond transient absorption study. Biochemistry 35: 11820-11831

Jenney Jr, F.E., R.C. Prince és F.Daldal (1996) The membrane-bound cytochrome c_y of *Rhodobacter capsulatus* can serve as an electron donor to the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta 1273: 159-164

Junge, W. (1977) Physical aspects of light harvesting, electron transport and electrochemical potential generation in photosynthesis of green plants. *in* Photosynthesis I. (szerk. A. Trebst és M. Avron) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 59-93

Kaminskaya, O.P., L.A. Drachev, A.A. Konstantinov, A.Yu. Semenov és V.P. Skulachev (1986) Electogenic reduction of the secondary quinone acceptor in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. Rapid kinetics measurements. FEBS Lett. 202: 224–228

Kálmán, L. és P. Maróti (1994) Stabilization of reduced primary quinone by proton uptake in reaction centers of *Rhodobacter sphaeriodes*. Biochemistry 33: 9237–9244

Kirmaier, C., D. Holten és W.W. Parson (1985) Picosecond–photodichroism studies of the transient states in *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers at 5K. Effects of electron transfer on the six bacteriochlorin pigments. Biochim. Biophys. Acta 810: 49–61

Kirmaier, C. és D. Holten (1991) An assessment of the mechanism of initial electron transfer in bacterial reaction centers. Biochemistry 30: 609–613

Kirmaier, C. és D. Holten (1993) Electron transfer and charge recombination reactions in wild–type and mutant bacterial reaction centers. *in* The Photosynthetic Reaction Center, II. kötet (szerk. J. Deisenhofer és J.R. Norris) Academic Press, San Diego: 49–70

Kleinfeld, D, M.Y. Okamura és G. Feher (1984a) Electron transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Determination of the charge recombination pathway of $D^+Q_AQ_B^-$ and free energy and kinetic relations between Q_A^- Q_B^- and $Q_AQ_B^{2-}$. Biochim. Biophys. Acta 766: 126–140

Kleinfeld, D, E.C. Abresch, M.Y. Okamura és G. Feher (1984b) Damping oscillations in the semiquinone absorption in reaction centers after successive flashes. Biochim. Biophys Acta 756: 406–409

Kleinfeld, D, M.Y. Okamura és G. Feher (1985) Electron transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. II Free energy and kinetic relations between the acceptor states $Q_A^-Q_B^-$ and $Q_AQ_B^{2-}$. Biochim. Biophys. Acta 890: 291–310

Krause, G.H. és E. Weis (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 42: 313–349

Krauss, N., W. Hinrichs, I. Witt, P. Fromme, W. Pritzkow, Z. Dauter, C. Betzel, K.S. Wilson, H.T. Witt és W. Saenger (1993) Three–dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Å resolution. Nature 361: 326–331

Labahn, A., M.L. Paddock, P.H. McPherson, M.Y. Okamura és G. Feher (1994) Direct charge recombination from $D^+Q_AQ_B^-$ to DQ_AQ_B in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. J. Phys. Chem. 98 (13): 3417–3423

Lancaster, C.R.D és H. Michel (1996a) Three–dimensional structures of photosynthetic reaction centers. Photosynth. Res. 48: 65–74

Lancaster, C.R.D és H. Michel (1996b) New insights into the X–ray structure of the reaction center from *Rhodopseudomonas viridis*. *in* Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria. Structure and Dinamics. International Workshop Feldafing III (szerk. M.E. Michel–Beyerle) Springer Verlag, Berlin: 23–35

Lancaster, C.R.D, H. Michel, B. Honich és M.R. Gunner (1996) Calculated coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic reaction center of *Rhodopseudomonas viridis*. Biohys. J. 70: 2469–2492

Leibl, W., I. Sinning, G. Ewald, H. Michel és J. Breton (1992a) Initial characterization of the proton transfer pathway to Q_B in *Rhodopseudomonas viridis*: electron transfer kinetics in herbicide–resistant mutants. *in* The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II (szerk. J.

Breton és A. Verméglio) Plenum Press, New York: 389–394

Leibl, W., G. Pallotin, A. Dobek, J. Gapinski, J. Breton és H.–W. Trissl (1992b) Theory on the wavelength–dependent polarity of the light–gradient photovoltage. *in* Research in Photosynthesis. I. kötet (szerk. N. Murata) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 633–636

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

Liu, B.–L., L.–H. Yang és A. Hoff (1991) On the depletion and reconstitution of both Q_A and metal in reaction centers of the photosynthetic bacterium *Rb. sphaeroides* R–26. Photosynth. Res. 28: 51–58

Maróti, P., Ch. Kirmaier, C.A. Wraight, D. Holten és R.M. Pearlstein (1985) Photochemistry and electron transfer in borohydrate–treated photosynthetic reaction centers. Biochim. Biophys. Acta 810: 132–139

Maróti, P. (1990) Fény által kiváltott elektron–, proton– és konformáció–mozgások a fotoszintikus baktériumok reakciócentrumában. Bot. Közlem. 77: 183–197

Maróti, P. (1993) Flash induced proton transfer in photosynthetic bacteria. Photosynth. Res. 37: 1–17

Maróti, P., D.K. Hanson, L. Baciou, M. Schiffer és P. Sebban (1994) Proton conduction within the reaction centers of *Rhodobacter capsulatus*: The electrostatic role of the protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5617–5621

Maróti, P, D.K. Hanson, M. Schiffer és P. Sebban (1995) Long–range electrostatic interaction in the bacterial photosynthetic reaction centre. Nature Struct. Biol. 2: 1057–1059

Marr, K.M., D.N. Mastronarde és M.K. Lyon (1996) Two–dimensional crystals of photosystem II: Biochemical caracterization, cryoelectronic microscopy and localization of the D1 and Cytochrome b559 polypeptides. J. Cell Biol. 132: 823–833

Mathis, P és A.W. Rutherford (1987) The primary reactions of photosystem I and II of algae and higher plants. *in* Photosynthesis (szerk. J. Amesz) Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 63–96

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

McPherson, P.H., M.Y. Okamura és G. Feher (1990a) Electron transfer from the reaction center of *Rb. sphaeroides* to the quinone pool: doubly reduced Q_B leaves the reaction center. Biocim. Biophys. Acta 1016: 289–292

McPherson, P.H., V. Nagarajan, W.W. Parson, M.Y. Okamura és G. Feher (1990b) pH–dependence of the free energy gap between DQ_A and DQ_A^- determined from delayed fluorescence in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R–26. Biochim. Biophys. Acta 1019: 91–94

McPherson, P.H., M.Y. Okamura és G. Feher (1993) Light–induced proton uptake by photosynthetic reaction centers from *Rhobobacter sphaeroides* R–26.1. II. Protonation of the state $DQ_AQ_B^{2-}$. Biochim. Biophys. Acta 1144: 309–324

McPherson, P.H., M. Schönfeld, M.L. Paddock, M.Y. Okamura és G. Feher (1994) Protonation and free energy changes associated with formation of Q_BH_2 in native and Glu–L212→Gln

mutant reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry 33: 1181–1193

Meszéna, G. és D. DeVault (1989) Investigation of the polarity of the photoinduced electric signal of chloroplast suspensions. Photosynth. Res. 22: 115–122

Michel, H. és J. Deisenhofer (1988) Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. Biochemistry 27: 1–7

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi–osmotic type of mechanism. Nature 191: 144–148

Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. 41: 445–502

Murphy, D.J. (1986) The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. Biochim. Biophys. Acta 864: 33–94

Nakazato, K., C. Toyoshima, I. Enami és Y. Inoue (1996) Two–dimensional crystalization and cryo–electron microscopy of photosystem II. J. Mol. Biol. 257: 225–232

Nicholls, D.G. és S.J. Ferguson (1992) Bioenergetics 2., Academic Press Ltd.

Okamura, M.Y., R.A. Isaacson és G. Feher (1975) Primary acceptor in bacterial photosynthesis: Obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3491–3495

Okamura, M.Y., R.J. Debus, D. Kleinfeld és G. Feher (1982) Quinone binding sites in reaction centers from photosynthetic bacteria. *in* Function of quinones in energy conserving systems (szerk. B.L. Trumpower) Academic Press, Inc.: 299–317

Okamura, M.Y. és G. Feher (1992) Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria. Annu. Rev. Biochem. 61: 861–896

Okamura M.Y. és G. Feher (1995) Proton–coupled electron transfer reactions of Q_B in reaction centers from photosynthetic bacteria. *in* Advances in Photosynthesis, 2. kötet (szerk. R.E. Blankenship, M.T. Madigan és C.E. Bauer) Kluwer Academic Publishers: 577–593

Ort, D.R. (1994) Photosynthesis. *in* Encyclopedia of agricultural science. 3. kötet, Academic Press, Inc.: 187–195

Overfield, R. E. és C. A. Wraight (1980) Oxydation of cytochromes c and c_2 by bacterial photosynthetic reaction centers in phospholipid vesicles. 1. Studies with neutral membranes. Biochemistry. 19: 3322–3327.

Packham, N.K., C. Packham, P. Mueller, D.M. Tiede és P.L. Dutton (1980) Reconstitution de photochemically active reaction centers in planar phospholipid membranes. Light–induced electrical currents under voltage–clamped conditions. FEBS Lett. 110: 101–106

Paddock, M.L., S.H. Rongey, E.C. Abresh, G. Feher és M.Y. Okamura (1988) Reaction centers from three herbicide–resistant mutants of *Rhodobacter sphaeriodes* 2.4.1.: Sequence analysis and preliminary characterization. Photosynth. Res. 17: 75–96

Paddock, M.L., S.H. Rongey, P.H. McPherson, A.Juth, G.Feher és M.Y. Okamura (1994) Pathway of proton transfer in bacterial reaction centers: Role of aspartate–L213 in proton transfers associated with reduction of quinone to dihydroquine. Biochemistry 33: 734–745

Paddock, M.L., G. Feher és M.Y. Okamura (1995) Pathway of proton transfer in bacterial

reaction centers: Further investigations on the role of Ser–L223 studied by site–directed mutaganesis. Biochemistry 34: 15742–15750

Pallotin, G., A. Dobek, J. Breton, W. Leibl és H.–W. Trissl (1993) Why does the light–gradient photovoltage from photosynthetic organelles show a wavelength–dependant polarity? Biophys. J. 65: 379–385

Pierson, B.K. és J.M. Olson (1987) Photosynthetic bacteria. *in* Photosynthesis (szerk. J. Amesz) Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 21–42

Prince, R.C., R.J. Codgell és A.R. Crofts (1974) The photooxidation of horse heart cytochrome c and native citochrome c_2 by reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides* R_{26}. Biochim. Biophys. Acta 374: 1–13

Prince, R.C. és D.C. Youvan (1987) Isolation and spectroscopic properties of photochemical reaction centers from *Rhodobacter capsulatus*. Biochim. Biophys. Acta 890: 286–291

Prince, R.C. (1990) Bacterial photosynthesis: From photons to Δp. *in* The Bacteria, XII. kötet Academic Press, Inc.: 111–149

Puchenkov, O.V., Z. Kopf és S. Malkin (1995) Photoacoustic diagnostics of laser–induced processes in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta 1231: 197–212

Rongey, S.H., M.L. Paddock, G. Feher és M.Y. Okamura (1993) Pathway of proton transfer in bacterial reaction centers: Second–site mutation Asn–M44→Asp restores electron and proton transfer in reaction centers from the photosynthetically deficient Asp–L213→Asn mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1325–1329

Rögner, M., E.J. Boekema és J. Barber (1996) How does photosystem 2 split Water? The structural basis of efficient energy conversion. Trends Bichem. Sci. 21: 44–49

Schenck, C.C., W.W. Parson, D. Holten és M. Windsor (1981) Transient states in reaction centers containing reduced bacteriopheophytin. Biochim. Biophys. Acta 635: 383–392

Scherer, S. (1990) Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? Trends In Biochem. Sci. 15: 458–462

Schmidt, S., T. Arlt, P. Hamm, C. Lauterwasser, U. Finkele, G. Drews és W. Zinth (1993) Time–resolved spectroscopy of the primary photosynthetic processes of membrane–bound reaction centers from an antenna–deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. Biochim. Biophys. Acta 1144: 385–390

Schönfeld, M., M. Montal és G. Feher (1979) Functional reconstitution of photosynthetic reaction centers in planar lipid bilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6351–6355

Sebban, P, P. Maróti és D.K. Hanson (1995) Electron and proton transfer to the quinones in bacterial photosynthetic reaction centers: Insight from combined approaches of molecular genetics and biophysics. Biochimie 77: 677–694

Shinkarev, V.P. és C.A. Wraight (1993) Electron and proton transfer in the acceptor quinone complex of reaction centers of photosynthetic bacteria. *in* The Photosynthetic Reaction Center, 1. kötet (szerk. J. Deisenhofer és J.R. Norris) Academic Press, Inc.: 193–255

Shinkarev, V.P., E. Takahashi és C.A. Wraight (1993) Flash–induced electric potential generation in wild type and L212 EQ mutant chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides*: Q_BH_2 is not released from L212 EQ mutant reaction center. Biochim. Biophys. Acta 1142: 214–216

Sinning, I. (1992) Herbicide binding in the bacterial photosynthetic reaction center. Trends In Biol. Sci. 17: 150–154

Skulachev, V.P. (1994) Chemiosmotic concept of the membrane bioenergetics: What is already clear and what is still for elucidation? J. Bioenerg. Biomembr. 26: 589–597

Sobolev, V. és M. Edelman (1995) Modeling the quinone–B binding site of the photosystem–II reaction center using notions of complementary and contact–surface between atoms. Proteins: Structure, Function, and Genetics 21: 214–225

Stadnichuk, I.N. és E.P. Lukashev (1982) Structure of the absorption and fluorescence spectra and molecular organization of bacteriochlorophyll in the reaction centers os *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Mol. Biol. (Russ) 16: 991–996

Staehelin, L.A. (1986) Chloroplast ultrastructure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. *in* Photosynthesis III. (szerk. L.A. Staehelin és C.J. Arntzen) Spriynnger–Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 197–237

Stilz, H.U., U. Fikele, W. Holzapfel, C. Lauterwasser, W. Zinth és D. Oesterhelt (1994) Influence of M sumunit Thr222 and Trp252 on quinone binding and electron transfer in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. Eur. J. Biochem. 223, 233–242

Straley, S.C., W.W. Parson, D.C. Mauzerall és R.K. Clayton (1973) Pigment content and molar extinction coefficients of photochemical reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeriodes*. Biochim. Biophys. Acta 305: 597–609

Stys, D. (1995) Stacking and separation of photosystem I and photosystem II in plant thylakoid membranes: A physico–chemical view. Physiol. Plant. 95: 651–657

Sybesma, C. (1989) Biophisics. An introduction. Kluwer Academic Publishers, Dordrech, Boston, London

Taguchi, A.K.W., J.E. Eastman, D.M. Gallo, E. Sheagley, W. Xiao és N.W. Woodbury (1996) Asymmetry requirements in the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter capsulatus*. Biochemistry 35: 3175–3186

Takahashi, E., P. Maróti és C.A. Wraight (1989) Site–directed mutagenesis of *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers: the role of Tyr–L222. *in* Current research in photosynthesis. (szerk. M. Baltscheffsky) Kluwer Academic Publishers, Dordrech: 169–172

Takahashi, E. és C.A. Wraight (1990) A crucial role for Asp^{L213} in the proton transfer pathway to the secondary quinone of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta 1020: 107–111

Takahashi, E. és C.A. Wraight (1992) Proton and electron transfer in the acceptor quinone complex of *Rhodobacter sphaerioides* reaction centers characterization of site–directed mutants of the two ionizable residues, Glu^{L212} and Asp^{L213}, in the $Q_B$binding site. Biochemistry 31: 855–866

Takahashi, E., P. Maróti és C.A. Wraight (1992) Coupled proton and electron transfer pathways in the acceptor quinone complex of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *in* Electron and Proton Transfer in Chemitry and Biology (szerk. A. Müller, H. Ratajczak, W. Junge és E. Dieman)

Takahashi, E. és C.A. Wraight (1994) Molecular genetic manipulation and caracterization of mutant photosynthetic reaction centers from purple nonsulphur bacteria. Adv. Mol. Cell Biol. 10: 197–251

Takahashi, E. és C.A. Wraight (1996) Potentiation of proton transfer functions by electrostatic interactions in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2640–2645

Tandori, J., L. Nagy, Á. Puskás, M. Droppa, G. Horváth és P. Maróti (1995) The $Ile^{L229} \rightarrow$ Met mutation impairs the quinone binding to the Q_B–pocket in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynth. Res. 45: 125–146

Thornber, J.P. és J. Barber (1979) Photosynthetic pigments and models for their organization in vivo. *in* Photosynthesis in relation to model systems. (szerk. J. Barber) Springer–Verlag, Berlin, Heidelberg, New–York, Tokyo: 27–70

Tiede, D.M., A.–C. Vashishta és M.R. Gunner (1993) Electron–transfer kinetics and electrostatic properties of the *Rhodobacter sphaeroides* rection center and soluble c–cytochromes. Biochemistry 32: 4515–4531

Trissl, H.–W., U. Kunze és W. Junge (1982) Extremely fast photoelectric signals from suspensions of broken chloroplasts and isolated chromatophores. Biochim. Biophys. Acta 682: 364–377

Trissl, H.–W. (1983) Spatial correlation between primary redox components in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides* measured by two electrical methods in the nanosecond range. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7173–7177

Tsiotis, G., W. Nitschke, W. Haase és H. Michel (1993) Purification and crystallysation of photosystem I complex from a phycobilisome–less mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7002. Photosynth. Res. 35: 285–297

Van Gelder, B.F. és E.C. Slater (1962) The extinction coefficient of cytochrome c. Biochim. Biophys. Acta 58: 593–595

Van Rotterdam, B.J., W. Crielaard, H.V. Westerhoff és K.J. Hellingwerf (1995) Control over electron flow through the *Rhodobacter sphaeriodes* reaction centre. *in* Photosynthesis: From Light to Biosphere I. kötet, Kluwer Academic Publishers. Netherlands: 707–710

Velthuys, B.R. (1982) The function of plastoquinone in electron transfer. *in* Function of Quinones in Energy Conserving Systems (szerk. B.L. Trumpower) Academic Press, Inc.: 401–408

Venturoli, G., B. A. Melandri, N. Gabellini és D. Oesterhelt (1990) Kinetics of photosynthetic electron transfer in artificial vesicles reconstituted with purified complexes from *Rhodobacter capsulatus* I. The interaction of cytochrome c_2 with the reaction center. Eur. J. Biochem. 189: 105–112.

Venturoli, G., A. Mallardi és P. Mathis (1993) Electron transfer from cytochrome c_2 to the primary donor of *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. A temperature dependence study. Biochemistry. 32: 13245–13253.

Vermeglio, C.A. és R.K. Clayton (1977) Kinetics of electron transfer between the primary and the secondary electron acceptor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta 461: 159–165

Vernotte, C.E., A.–L. Etienne és J.–M. Briantais (1979) Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. Biochim. Biophys. Acta 545: 519–527

Wang, S., X. Li, J.C. Williams, J.P. Allen és P. Mathis (1994) Interaction between cytochrome c_2 and reaction centers from purple bacteria. Biochemistry 33: 8306–8312

Williams, J.C., L.A. Steiner, G. Feher és M.T Simon (1984) Primary structure of the L subunit of the reaction center from *Rhodopseudomonas sphaeroides* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7303–7307

Witt, H.T. (1979) Energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. The central role of the electric field. Biochim. Biophys. Acta 505: 355–427

Witt, H.T. és A. Zickler (1973) Electric evidence for the field indicating absorption change in bioenergetic membranes. FEBS Lett. 37: 307–310

Woodbury, N.W., J.M. Peloquin, R.G. Alden, X. Lin, S. Lin, A.K.W. Taguchi, I.C. Williams és J.P. Allen (1994) Relationship between thermodinamics and mechanism during photoinduced charge separation in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry 33: 8101–8112

Wraight, C.A. és R.K. Clayton (1974) The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophill in reaction centers. Biochim. Biophys. Acta 333: 246–260

Wraight, C.A. (1979) Electron acceptors of bacterial photosynthetic reaction centers. II H^+ binding coupled to secondary electron transfer in the quinone acceptor complex. Biochim. Biophys. Acta 548: 309–327

Wraight, C.A. (1981) Oxidation–reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: Evidence for a new model of herbicide activity. Israel J. Chem. 21: 348–354

Wraight, C.A. és R.J. Shopes (1989) Quinone binding and herbicide activity in the acceptor quinone complex of baceterial reaction centers. *in* Techniques and New Developments in Photosynthesis Research. (szerk. J. Barber és R. Malkin) Plenum Publishing Coorporation: 183–191

Yeates, T.O., H. Komiya, A. Chirino, D.C. Rees, J.P. Allen és G. Feher (1988) Structure of the reaction center from *Rb. sphaeroides* R–26 and 2.4.1.: protein cofactor (bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and carotenoid) interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7993–7997

Zankel, K.L., D.W. Reed és R.K. Clayton (1968) Fluorescence and photochemical quenching in photosynthetic reaction centers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61: 1243–1249

Zuber, H és R.A. Brunisholz (1991) Structure and function of antenna polypeptides and chlorophyll–protein complexes: Principles and variability. *in* Chlorophylls (szerk. H. Scheer) CRC Press, Boca Raton, Florida: 627–703

9. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

1 Osváth, Sz., G. Meszéna, V. Barzda és G. Garab (1994) Trapping magnetically oriented chloroplast thylakoid membranes in gels for electric measurements. Journal of Photochem. Photobiol. B: Biology 26: 287–292

2 Osváth, Sz., G. Laczkó, P. Sebban és P. Maróti (1995) Induction of fluorescence in isolated reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynthesis: From light to biosphere Vol.I (szerk. P.Mathis) Kluwer Academic Publishers: 795–798

3 Maróti, P., Sz. Osváth, Cs. Tápai, D. K. Hanson és P. Sebban (1995) From photons to protons in the photocycle of bacterial reaction centers. Photosynthesis: From light to biosphere Vol.I (szerk. P.Mathis) Kluwer Academic Publishers: 419–424

4 Osváth, Sz., G. Laczkó, P. Sebban és P. Maróti (1996) Electron transfer in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus* monitored by fluorescence of the bacteriochlorophyll dimer. Photosynthesis Research 47: 41–49

5 Osváth, Sz. és P. Maróti: Coupling of cytochrome and quinon turnovers in photocycle of reaction center from photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Biophys. J. (közlésre elfogadva)

6 Maróti, P., Sz. Osváth és Cs. Tápai (1996) Proton–coupled electron transfer to Q_B in Reaction centers of photosynthetic bacteria. Proceedings of the 12th International Congress on Photobiology, Bécs 1996 (12 oldal)

10. A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Osváth, Sz. és G. Garab (1992) Embedding of chloroplast thylakoid membranes in polyacrylamide and agarose gels for spectropolarimetric and electric measurements. Proceedings of the 7th International Conference for Physics Students, Liszabon: 216–218

Meszéna, G., Sz. Osváth és G. Garab (1993) Orientation Dependence of the Light Gradient Photovoltaic Signal in Chloroplast Thylakoid Membranes. 11th International Biophysics Congress, Budapest: E1.54

Osváth, Sz., G. Laczkó, P. Sebban és P. Maróti (1994) Electron transfer in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus* monitored by fluorescence of the bacteriochlorophyll dimer. European Research Conference on "Biophysics of Photosynthesis", York

Tandori, J., L. Nagy, Sz. Osváth és P. Maróti (1995) Proton uptake and free energy changes associated with reduction of Q_B in Ile L229→Met mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynthesis: From light to biosphere Vol.I (szerk. P.Mathis) Kluwer Academic Publishers: 539–541

Osváth, Sz., G. Laczkó, P. Sebban és P. Maróti (1995) Induction of fluorescence in isolated reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. 10th International Photosynthesis Congress, Montpellier: P–3–4–102

Osváth Sz., G. Laczkó és P. Maróti (1995) Elektron transzport és fluoreszcencia kapcsolata fotoszintetizáló bíborbaktériumok reakciócentrumában. XXV. Membrán–transzport konferencia, Sümeg pp: 39

11. SUMMARY

The primary photochemical events of photosynthesis occur in specially organized membrane–bound pigment–protein complexes. There the energy of photons is used for charge separation in reaction center (RC) proteins. The subsequent stabilization of the charge separated state leads to transmembrane electron and/or proton transfer, which build up a transmembrane electrochemical potential difference used for ATP synthesis by ATPase. The reaction centers from non–sulphur purple bacteria are widely used for structural and functional studies of the primary events of photosynthesis as their crystal structure is known for several strains with high spatial resolution and the electron and proton transfers in these reaction centers are relatively simple as compared to those in higher plants.

The source of the light–induced electron flow through the reaction center is a reduced cytochrome and the drain is a quinone molecule. The stoichiometry of their reduction/oxidation is different: while the cytochrome is oxidized by release of one electron, the quinone attached to the reaction center (secondary quinone, Q_B) is reduced by uptake of two electrons. Under continuous illumination the function of the electron transfer (the turnover of the reaction center) should involve continuous turnover of both the cytochromes at the donor side and the quinones at the acceptor side of the reaction center: the oxidized donor and the dihydroquinone, QH_2 are released from the protein and replaced by reduced cytochrome and quinone from their pools, respectively.

The photon absorbed by the bacteriochlorophyll dimer (P) initiates charge separation with a quantum yield of near unity. P transfers its electron in about 200 ps to the first stable electron acceptor (Q_A) through monomeric bacteriochlorophyll and

bacteriopheophytin. The primary quinone is oxidized in 20...200 μs (depending on the species) by the secondary quinone (Q_B). If P^+ is re-reduced by an electron donor before charge recombination but after interquinone electron transfer, the reaction center will be ready for additional charge separation. The second excitation of the reaction center results in the photochemically inactive $Q_A^-Q_B^-$ state. The transfer of the second electron to the secondary quinone acceptor ($k^{(2)}_{AB}$) is reversibly coupled to the uptake of the first proton and results in $Q_A(Q_BH)^-$ state. The uptake of the second proton finally forms dihydroquinone, Q_BH_2.

Upon excitation, the dimer in the reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* emits fluorescence in the near infrared spectral range (peak around 910 nm). The quantum yield of dimer fluorescence is very low (4.10^{-4}) as compared to that of light-harvesting Bchl measured in chromatophores or whole cells (2.10^{-2} to 1.10^{-1} depending on the strain).

Spectral and kinetic characteristics of fluorescence from isolated reaction centers of photosynthetic purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus* were measured at room temperature under rectangular shape of excitation at 810 nm. The kinetics of fluorescence at 915 nm reflected redox changes due to light and dark reactions in the donor and acceptor quinone complex of the reaction center as identified by absorption changes at 865 nm (bacteriochlorophyll dimer) and 450 nm (quinones) measured simultaneously with the fluorescence. Based on redox titration and gradual bleaching of the dimer, the yield of fluorescence from reaction centers could be separated into a time-dependent (originating from the dimer) and a constant part (coming from contaminating pigment (detached bacteriochlorin)). The origin was also confirmed by the corresponding excitation spectra of the 915 nm fluorescence. The ratio of yields of constant fluorescence over variable fluorescence was much smaller in *Rhodobacter sphaeroides* (.15 $\pm$ .1) than in *Rhodobacter capsulatus* (1.2 $\pm$ .3). Since the variable parts of the fluorescence were similar in the two strains of bacteria, the

difference was attributed to the increased constant part of fluorescence in *Rhodobacter capsulatus.* It was shown that the changes in fluorescence yield reflected the disappearance of the dimer and the quenching by the oxidized primary quinone. The oscillatory behavior of the fluorescence yield under saturating flashes in the presence of ferrocene donor is in accordance with the formation and disappearance of semiquinone and electron equilibrium between primary and secondary quinone. Analysis of the semiquinone oscillations detected via fluorescence and absorbance changes indicate that the redox changes of the secondary quinone did not have any influence on the fluorescence yield. Excess quinone in the solution, however, quenched the constant part of the fluorescence. The fluorescence of the dimer can be used as an effective tool in studies of redox reactions in reaction centers, an alternative to the measurements of absorption kinetics.

Kinetic model of photocycle including both quinone (Q_6) reduction at the secondary quinone binding site and (mammalian) cytochrome c oxidation at the cytochrome docking site of isolated reaction centers from photosynthetic purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* was elaborated and tested by cytochrome photo-oxidation under strong continuous illumination. The typical rate of photochemical excitation by a laser diode at 810 nm was 2.200 s^{-1} and the rates of stationary turnover of the reaction center (one half of that of cytochrome photo-oxidation) were 600 ± 70 s^{-1} at pH 6 and 400 ± 50 s^{-1} at pH 8. The cytochrome c turnover showed strong pH-dependence indicating the contribution of different rate-limiting processes.

Light intensity, quinone and cytochrome exchange (availability) and (conformation coupled) first and (proton coupled) second electron transfer can account for bottle-necks in the turnover. In not extreme pH range and under usual light intensities, the intensity of the illumination is the rate limiting step in cytochrome photo-oxidation. The rate of photochemistry could be increased to high values where they are already comparable to (and sometimes exceed) the rates of other thermal

reactions of the reaction center. This opened the stage for separation of rate liming steps in the turnover of the reaction center. The pH-dependence of the rate of processes makes the distinction more straightforward.

In the alkaline pH range (pH > 8), the rate of reaction center turnover decreased dramatically. The initial rapid cytochrome photo-oxidation was followed by relatively slow cytochrome turnover at high pH. Proton transfers and protonation-dependent electron transfer reactions can be made responsible for the decrease. The transfer of the first proton coupled second electron from Q_A^- to Q_B^- is the rate limiting step in the photocycle above pH 8 under high light excitation.

In the neutral pH range (6 < pH < 8), the highest turnover rates were observed. As the rates of all electron and proton transfer steps are larger than that of light excitation, the light intensity and the quinone exchange can be made responsible for the limitation of the cycling rate of the reaction center. Fitting the pH dependence of the observed rate constants with the model indicated that the dihydroquinone/quinone exchange is slightly pH-dependent, and faster than about $k_Q = 2.000\ s^{-1}$ at pH 6.

In the acidic pH range (pH < 6), the exchange of the cytochrome c will determine the cycling of the reaction center. Several crystallographic and binding studies together with our low pH measurements supported the electrostatic nature of interactions that stabilize the cytochrome/RC complex. The dramatic changes in the rate of cytochrome c turnover was observed below pH 6, close to the reported isoelectric point (pI) of 6.1 for isolated reaction centers and far from 10.1, the pI for cytochrome c. This steep decrease in the rate constant of the cytochrome exchange could be attributed to unfavorably changed electrostatic interaction between reduced cytochrome c and reaction center.

The results obtained from numerical integration of the differential equations describing the model showed good agreement with the experimental data. The minimal model with 18 redox states of the reaction center can account for the separation of the

initial and stationary phases of the cytochrome photo–oxidation at alkaline pH range and for the about 5 ms delay at low pH. It does not yield a strict linear relationship between reciprocal functions of rates of cytochrome turnover and light reaction (k_{cyt}^{-1} vs. k_I^{-1}) but the deviation from the straight line in this representation is not significant. The value of vertical interception will not be dependent on light intensity and offers the inverse value of maximal rate of cytochrome c photo–oxidation of the reaction center which is characteristic on the internal thermal reactions including donor/acceptor exchanges (k_{cyt} = 890 s^{-1} at pH 7.8).

In spite of the long isoprenoid chain and the densely packed Q_B region, the rate of quinone exchange is unexpectedly high and hardly limiting in turnover of the reaction center. Although the cytochrome can donate the flash oxidized dimer rapidly, the exchange for reduced cytochrome can be much slower and may limit the photocycle of the reaction center under stationary excitation. Quantitative comparison of the cycling rates of different reaction centers is worth doing only if the same step is the bottle–neck under otherwise identical conditions. In routine screening of mutants, care should be exercised because light intensity and one of the electron or proton transfer steps are usually the rate limiting processes in turnover of wild type and mutant reaction centers, respectively.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Maróti Péternek, a biol. tud. doktorának a támogatásért, amellyel disszertációm elkészítését lehetővé tette.

Köszönetet nyilvánítok Dr. Garab Győzőnek, a biol. tud. doktorának a laborjában végzett munkám során nyújtott segítségét.

Hálás vagyok Dr. Váró Györgynek, a biol. tud. doktorának a munkám iránti érdeklődéséért és hasznos tanácsaiért.

Köszönöm a tanszék minden tagjának a munkám támogatását, Dunai Péternének külön is köszönöm a segítséget, Tandori Júliának, Kálmán Lászlónak és Dr. Nagy Lászlónak, a biol. tud. kandidátusának a beszélgetéseket és szakmai vitákat.

Megköszönöm családomnak a türelmet és a légkört, amellyel tanulmányaimat és munkámat ösztönözte.