

Ph. D. disszertáció

Nanoszkopikus környezet hatása a fotoszintetikus reakciócentrum működésére

Dorogi Márta

Témavezető: Dr. Nagy László, egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem
Orvosi Fizikai és Biofizikai Intézet

Szeged, 2008

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A fotoszintézis lényege és jelentősége.....	7
2.2. A fotoszintetikus reakciócentrum szerkezete és működése	9
2.2.1. Egyszeri töltésszétválasztás.....	11
2.2.2. A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ elektrontranszfer jellemzői.....	13
2.2.3. Többszöri töltésszétválasztás.....	15
2.2.4. A membránkörnyezet hatása a töltésszétválasztásra.....	17
2.3. A szén nanocsövek és a biológiai anyagok.....	22
2.3.1. A szén nanocsövek szerkezete és tulajdonságai.....	22
2.3.2. A szén nanocsövek és a biológiai anyagok közötti kölcsonhatás.....	23
3. Célkitűzések	25
4. Anyagok és módszerek	27
4.1. Mintaelőkészítés, preparatív eljárások.....	27
4.1.1. A baktériumtörzs jellemzése.....	27
4.1.2. Az R-26 baktériumtörzs tenyésztése.....	27
4.1.3. Reakciócentrumok preparálása.....	28
4.1.4. Lipoproteid rendszerek preparálása.....	29
4.2. Vizsgálatok optikai módszerei.....	31
4.2.1. „Steady state” abszorpciómérések.....	31
4.2.2. Abszorpcióváltozás kinetikai mérése.....	31
4.2.2.1. Az abszorpcióváltozás mérése a ms-s –os tartományban	31
4.2.2.2. Az abszorpcióváltozás mérése a μ s-s -os tartományban..	33
4.2.2.3. Abszorpcióváltozás adatainak kiértékelése.....	34
4.2.3. Fluoreszcencia vizsgálatok.....	35
4.3. RC/szén nanocső kompozit előállítása.....	36
4.3.1. A felhasznált szén nanocső minták jellemzése.....	36
4.3.2. SWNT/RC komplex preparálása	37

5. Eredmények és megvitatásuk	39
5.1. A vezikulák minőségi vizsgálata.....	39
5.2. A lipidkörnyezet hatása a reakciócentrumon belüli elektrontranszportra.....	41
5.2.1. Egyszeres töltésszétválasztás.....	41
5.2.1.1. $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektron transzfer kinetikája és Energetikája.....	41
5.2.1.2. Anionos lipidek (PG és CL), hatásai PC mátrixban.....	47
5.2.2. Többszörös töltésszétválasztás.....	49
5.2.2.1. $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$ elektrontranszport.....	49
5.2.2.2. Az elektrontranszfer többszörös gerjesztés után (A szemikininon keletkezésének és eltűnésének bináris oszcillációja.)	53
5.2.3. Inhibitorok hatása lipid környezetben.....	55
5.3. A töltéssztabilizálódás termodinamikai jellemzése.....	60
5.4. Fényindukált transzmembrán pH-változások fotoszintetikus reakciócentrum/lipoproteid vezikulákban.....	67
5.4.1. A piranin spektroszkópiai jellemzése.....	68
5.4.2. A lipoproteid vezikulák protonáteresztőképessége.....	73
5.4.3. A proteoliposzóma áteresztőképessége, RC jelenlétébe.....	77
5.5. A fotoszintetikus RC és szén nanocsövek közötti kölcsönhatás...	79
5.5.1. A szén nanocső környezet hatása a RC-on belüli töltéssztabilizálódásra.....	79
5.5.2. A szén nanocsövek és a RC-ok közötti redox kölcsönhatás...	85
6. Összegzés	88
7. Közlemények	91
8. Köszönetnyilvánítás	93
9. Irodalomjegyzék	94
Összefoglaló	101
Summary	122

Rövidítések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
BChl	bakterioklorofill monomer
BPheo	bakteriofeofitin monomer
Ch	Na-kolát-puffer (5mM KCl, 5mM K-foszfát, 1mM piranin, pH 6.8 + 4% nátrium kolát)
CL	kardiolipin
Col	koleszterin
DMPC	1,2-Dimiristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholine
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholine
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3- Phosphatidylcholine
ΔG	Gibbs-féle szabadenergia-változás
ΔH	entalpia-változás
ΔS	entrópia-változás
Fe^{2+}	vas II. ion (nem-hemtípusú vas)
FTIR	Fourier transzformált infravörös
k_{AP}	a $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^- \rightarrow \text{PQ}_\text{A}$ töltésrekombináció sebességi állandója
k_{BP}	a $\text{P}^+\text{Q}_\text{B}^- \rightarrow \text{PQ}_\text{B}$ töltésrekombináció sebességi állandója
K_{AB}	kinonok közötti első elektrontranszfer egyensúlyi állandója
LDAO	N,N-dimetil-dodecylamin-N-oxid, Lauraldimetilamin-N-oxid
L,M,H	a bakteriális reakciócentrum fehérje alegységei (light, middle, heavy)
OG	oktilglikozid
PC	foszfatidilkolin
PE	foszfatidiletanolamin
PG	foszfatidilglicerol
PI	foszfatidilinozitol
PSI	a növények és cianobaktériumok első fotokémiai rendszere
PSII	a növények és cianobaktériumok második fotokémiai rendszere
Q_A	elsődleges vagy primer kinon, első stabil elektron akceptor
Q_B	másodlagos vagy szekunder kinon, másodlagos elektron akceptor

QH ₂	dihidro-kinon, kinol
UQ ₁₀	ubikinon-10, 2,3-dimetoxi-5-metil-6-kaizoprenol- <i>p</i> -benzokinon
<i>Rb.</i>	<i>Rhodobacter</i>
RC	fotoszintetikus reakciócentrum fehérje
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NT	szén nanocső
SWNT	egyfalú szén nanocső
SWNT/RC	bio-nanokompozit
MWNT	többsfalú szén nanocső
SP, P, P ⁺ , P [*]	alapállapotú, oxidált, gerjesztett bakterioklorofill dimer, elsődleges, vagy primer donor
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol
TX-100	Triton X-100, oktil-fenol-polietilén-glikol-éter

1. Bevezetés

A fotoszintézis során az autotróf élőlények: növények és egyes baktériumok; a Nap fényenergiájának segítségével szerves vegyületeket, és oxigént állítanak elő. A fény begyűjtését, majd átadását a fotoszintetikus reakciócentrumok nagy részénél klorofillmolekulák végzik.

Mivel a fotoszintéziskor lejátszódó fényenergia átalakítása kémiai potenciállá egyike a természetben megtalálható alapvető folyamatoknak, a folyamat intenzív kutatás tárgya napjainkban is. Az utóbbi húsz év technikai fejlődése ((opto)elektronika, számítástechnika, molekuláris biológia, stb.) különös fellendülést hozott a részletek kutatásában.

Az intenzív kutatásoknak köszönhetően, egészen alapos ismeretanyag gyűlt össze a töltésszétválasztásról és -stabilizálódásról, amelyek az izolált reakciócentrum-fehérjében (RC) is lejátszódnak. A bakteriális RC kristályosításáért 1988-ban (Michel, Deisenhofer, Huber) és 1993-ban a nagytávolságú elektrontranszfer elméletéért (Marcus) kaptak Nobel-díjat. Nagymennyiségű adat elsősorban izolált rendszerekről, detergensbe ágyazott reakciócentrumok működéséről áll rendelkezésünkre. Kevésbé ismert azonban a fehérje szerkezete és funkciója a membránban, különösen *in vivo*, és az, hogy miként indukálja a fény a redox reakciókat a csatolt proton átadási folyamatokkal, amelyek jelentősek a membrán energizálásában.

Mindezek mellett a kutatásokban különleges figyelmet kap az elképzelés, miszerint biológiai anyagok, például fehérjék hatékony komponensei lehetnek olyan rendszereknek, melyekben a különleges tulajdonsággal bíró szervetlen anyagok (pl. szén nanocsövek - NT) is részt vesznek. Kézenfekvő tehát a két rendszerből egy újfajta, ún. bio-nanokompozit előállítása, mely sikeresen ötvözné mindkét anyag értékes tulajdonságait. A RC előnyös tulajdonságai között kell megemlítenünk azt, hogy benne a fénnel való gerjesztés hatására közel 100% hatékonysággal töltésszétválasztás történik. Különös figyelmet kaphat az, hogy jellemző fényelnyelése a közeli infravörös tartományban van. A szén nanocsövek különleges elektromos vezetési sajátságokkal rendelkeznek. Az

egyfalú szén nanocsövekben a félvezető és fémes vezetési tulajdonságok keverednek, míg a többfalú szén csövek fémes vezetők. Vannak irodalmi adatok arra is, hogy a szén nanocsövek redoxreakciókat katalizáló enzimekkel redox-kapcsolatban lehetnek (pl. glükózoxidázsal). Különös lehetőség adódik arra, hogy a RC-ban létrejövő fényindukált elektrontranszport és a szén nanocsövek redoxtulajdonságait összekapcsoljuk.

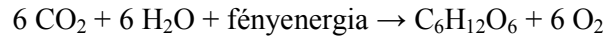
A NT közülük is elsősorban az egyfalú szén nanocsövek (SWNT) egydimenziós elektromos és struktúrális adottságaik miatt számos felhasználási lehetőséget kínálnak, pl. a nanoelektronikában (diódákban, tranzistoroknál, logikai kapuknál, és memória kártyáknál). A különleges figyelem megalapozott, mert: az SWNT hatására a biológiai anyag (pl. fehérje) szerkezetében és működésében specifikus változások következhetnek be. Az így nyert komplex egyedi elektromos tulajdonságai miatt alkalmas lehet különböző specifikus feladatok megoldására, pl. energiaátalakításra és energia tárolására.

A fotoszintetikus RC/lipoproteid és a RC/karbon nanocső komplexek érdekes és meglepő összehasonlításra adhatnak alapot. Mindkét rendszer a nanoszkópikus mérettartományba tartozik, amely ezzel együtt különleges tulajdonságokat is okoz ezekben a rendszerekben. Ebből a szempontból nem elhanyagolhatóak a rövidtávú, közvetlen kölcsönhatások (pl. a RC közvetlen környezetében levő lipidek, vagy a RC-szén nanocső kölcsönhatások), de a rendszer egészére kiterjedő a tulajdonságai sem. Példának említhetjük azt, hogy a szén nanocső/RC kapcsolat következtében az egész komplex elektromos tulajdonsága megváltozhat, mint ahogyan a RC/zárt vezikuláris rendszere is. Dolgozatomban e két rendszer előnyös tulajdonságait is megpróbálom kihasználni.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A fotoszintézis lényege és jelentősége

A fotoszintézis az egyetlen folyamat a természetben, amely során nagyobb mennyiségű napenergia tárolódik. Ez az alapvető energiaátalakítási folyamat, amely lehetővé teszi a fotoszintetizáló baktériumok és növények növekedését és szaporodását, amennyiben rendelkezésre áll a kellő mennyiségű széndioxid (CO_2), víz (H_2O) és ezekhez képest csekélyebb mennyiségben bizonyos ásványi anyagok. A növények által termelt szerves anyagok jelentik a primer táplálék- és energiaforrást az összes fotoszintézisre nem képes heterotróf szervezet számára is. Joggal állíthatjuk, hogy a fotoszintézis a legtöbb földi életfolyamat és biológiai energiatermelés alapvető forrása. A legáltalánosabb definíció szerint a halobaktériumok energiaátalakító folyamata is fotoszintézisnek tekinthető, hiszen a napfény energiája alakul át ezekben a szervezetekben is kémiai energiává. Igaz a halobaktériumokban a fényenergiaátalakítást retinálfehérjék (bakteriorhodopszinok) végzik, és a gerjesztést követően elektrontranszport nélkül jön létre az ATP szintézis energetikai feltételét jelentő transzmembrán protongradiens. Az összes fosszilis tüzelő- és nyersanyag (kő- és barnaszén, kőolaj, földgáz) korábbi korok biomasszájából, tehát végső soron a fotoszintézisből származik. Az egyszerű, energiaszegény anyagokból komplexebb, energiában gazdag anyagok épülnek fel. A folyamat bonyolult redoxlépések sorozata, amihez az energiát a napfény biztosítja. Ennek működéséhez olyan anyagra van szükség, amely képes elnyelni a fénykvantumokat, az elnyelt energiát más molekuláknak átadni, majd visszatérni az alapállapotba, hogy újabb fotonokat nyelhessen el. Ezt a bonyolult feladatot egy speciálisan szerveződött pigment-protein rendszer látja el, aminek legjellemzőbb vegyületei a klorofillmolekulák. Öt különböző klorofilltípus van (a, b, c, d és f), amelyek csak kevésbé térnek el kémiai struktúrájukban. Az a és b típus a legfontosabb, mivel ezek fordulnak elő a magasabb rendű növényekben és a zöld algákban. A fotoszintézis reakciójának mérlegegyenlete a következő:



A fényenergia felhasználásával a CO_2 -ból és a H_2O -ból glükóz és oxigén szintetizálódik.

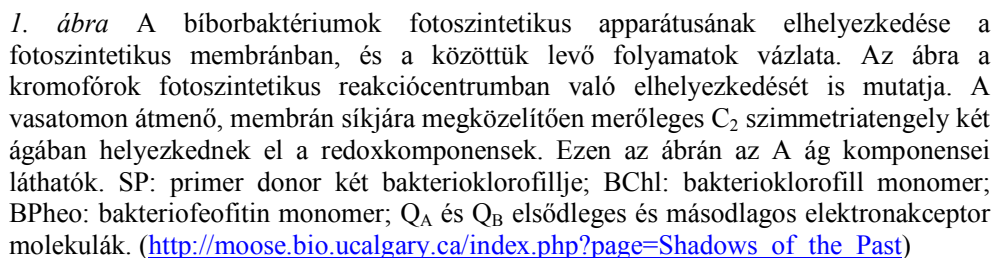
A fényszakasz működtetéséhez folyamatos megvilágítás szükséges. A fotonok energiáját csak könnyen gerjeszthető vegyületekkel lehet felfogni, abszorbeálni. Ez a szerepe a speciálisan szerveződött pigment-protein rendszernek. Ezen folyamatban, növényekben és cianobaktériumokban két egymástól jól elkülöníthető fotokémiai rendszer (PSI és PSII) vesz részt. A PSII-höz kapcsolódó komplex egyedülálló módon képes a víz fényindukált elbontására protonokká és molekuláris oxigénné, miközben redukáló elemek láncolatán keresztül az energia egy része proton elektrokémiai potenciál formájában raktározódik. Ez a potenciál az adenosin-trifoszfát (ATP) szintézisének energiaforrásul szolgál. Az energia másik hányada átkerül a PSI-re, ahol újabb foton abszorpciója révén válik a folyamat teljessé a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADP^+) redukcióját eredményezve. A sötétszakasz működtetését a fényszakasz végtermékei biztosítják. A sötétszakasz lényegében a szén-dioxid megkötését és redukcióját végzi, ehhez kell az ATP és a redukált NADP^+ .

2.2. A fotoszintetikus reakciócentrum szerkezete és működése

Baktériumokban a fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai lényegesen egyszerűbbek, mint növényekben. Amíg növényekben két fotokémiai reakciócentrum működik, addig baktériumokban csak egy. A bíborbaktériumok RC-a a növények PSII fotokémiai rendszerével mutat nagymértékű hasonlóságot.

A fotoszintetikus RC intracitoplazmatikus membránrendszerbe (ún. kromatoforákba) ágyazott pigment-protein komplex, amely fehérje-alegységekből és redox-tulajdonságokkal rendelkező kofaktorokból áll (1. ábra). A bíborbaktériumok reakciócentruma három alegységből áll, amelyeket angol elnevezésük alapján (light, middle, heavy) az L, M és H betűkkel jelölünk. Nevüket az elektroforetikus mozgékonyaságuk alapján történő molekulatömeg meghatározási módszer, az SDS gélelektroforézis eredményei alapján kapták. Az elnevezés azonban félrevezető, mert a DNS-szekvencia alapján, deduktív módon kikövetkeztetett aminosavsorrendből meghatározott molekulatömegek alapján kiderült, hogy valójában a H-alegység épül fel a legkevesebb aminosavból, tehát ez a legkisebb molekulatömegű. A félreértést az okozta, hogy ez az alegység a legkevésbé hidrofób, így az SDS-gélen a legkisebb mozgékonyaságot, és ennek megfelelően a legnagyobb molekulatömeget mutatta. A hiba ellenére az elnevezést az irodalomban megtartották és máig is ezt használják.

A RC-ba ágyazódott L- és az M-polipeptidek 180° -os forgási szimmetriát és nagyfokú homológiát mutatnak. Az aminosavak közel 70%-a apoláris, és öt-öt hidrofób láncot (α -hélixet) képeznek a membránon keresztül. A H-alegységnek csak egy transzmembrán hélice van, többi része szorosan kapcsolódik az LM-komplexhez a citoplazmatikus oldal felől.



- négy bakterioklorofill (BChl)
- két bakteriofeofitin (BPheo)
- elsődleges kinon (Q_A)
- másodlagos kinon (Q_B)
- nem-hemtípusú vas (Fe^{2+}).

A kofaktorok két, a bakterioklorofill dimeren és a Fe^{2+} -on átmenő, a membránra merőleges síkra vonatkoztatott, megközelítőleg tükörszimmetrikus ágat (A és B) alkotnak. Ezek közül azonban csak az A-ág aktív. A B-ág mentén természetes körülmények között nem játszódik le elektrontranszfer, biológiai jelentőségéről nincs tudomásunk. Az elektrokémiából ismert, hogy a kinonok

„kételektron kémiaiával” rendelkeznek, vagyis két elektronnal redukálhatók, és a kettős redukció után két proton felvételére képesek. A kinonok jól definiált középponti redoxpotenciállal rendelkeznek (olyannyira, hogy az elektrokémiában a kinon/hidrokinon elektródot a redoxpotenciál meghatározások szabványaként is szokás alkalmazni), középponti potenciáljuk azonban erősen függ a környezet polarizálhatóságától (dielektromos állandójától) és protonálhatóságától (az oldószer protikus vagy aprotikus voltától). Mivel környezetük erősen különbözik, a Q_A és Q_B redox- és kötési tulajdonságai jelentősen eltérnek. A Q_A a fehérje erősen hidrofób környezetében található, normál körülmények között egy elektronnal redukálható, a RC-hoz erősen kötődik, és onnan csak nehezen választható le. A Q_B környezetében sok a vízmolekula, a protonálható aminosavak gyűrűként veszik körbe a pK-juknak megfelelően. Redukciójához két elektron szükséges (két H^+ felvétele mellett), majd az így képződött dihidro-kinol (QH_2) a RC-ről leválik, helyébe újabb (oxidált) kinon kerül a membrán kinon-raktárából (Feher és mtsai., 1989; Paddock és mtsai., 1994).

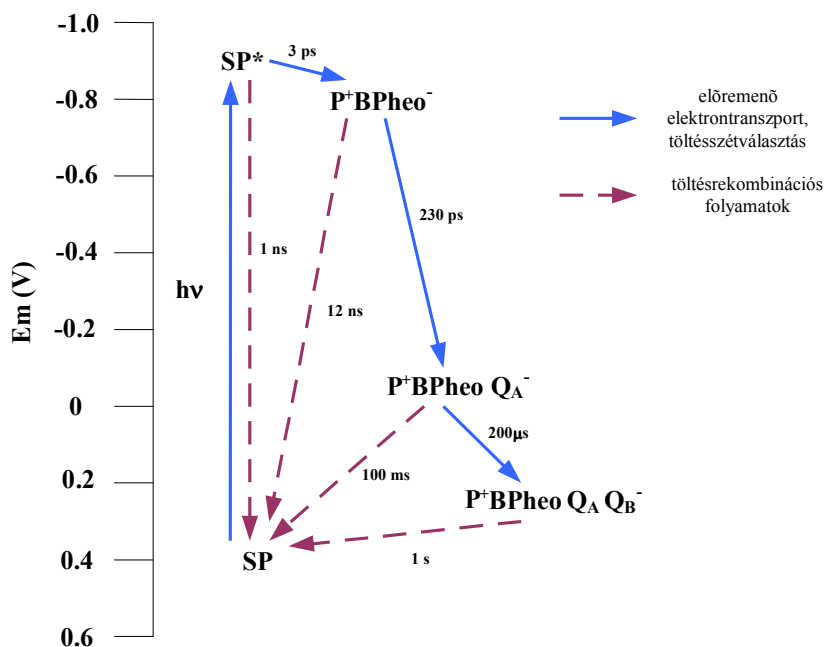
2.2.1. Egyszeri töltésszétválasztás

Fény hatására a RC-ban töltésszétválasztás indul meg. Másodlagos donor távollétében újabb gerjesztés hiányában az elektron a Q_B^- -ről visszatér a SP^+ -ra. Ezt nevezzük egyszeri töltésszétválasztásnak.

A fotoszintetikus RC-ban az elnyelt foton hatására az SP gerjesztett állapotba jut ($PQ_AQ_B \Rightarrow P^*Q_AQ_B$), majd oxidálódik és az elektronszám az alacsonyabb energiájú Q_A -ra ($P^*Q_AQ_B \Rightarrow P^+Q_A^-Q_B$), végül a másodlagos kinonra, Q_B -re ($P^+Q_A^-Q_B \Rightarrow P^+Q_AQ_B^-$) kerül. Izolált RC-okban - az izolálási körülmények miatt - egyéb donor rendszerint nincs jelen, így a keletkezett töltéspár rekombinációja figyelhető meg.

Rhodobacter (Rb.) sphaeroides R-26 törzs esetén a $P^+Q_A^-$ töltéspár élettartama kb. $\tau \approx 100$ ms, szemben a $P^+(Q_AQ_B)^-$ $\tau \approx 1$ s-os élettartamával. A Q_B -ről a P^+ -ra az elektron kb. 95%-os valószínűséggel a Q_A -n keresztül kerül

vissza (indirekt út), a fennmaradó 5%-ban közvetlen töltésrekombináció történik. A folyamatot a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra A töltésszétválasztás folyamatának vázlata a *Rb. sphaeroides*-ből izolált RC-ban gerjesztés után. A kék folytonos nyilak az előremenő töltés szétválasztást, a lila szaggatott nyilak a visszairányú töltésrekombinációs folyamatokat szemléltetik. A függőleges tengelyen az elektrontranszfer egyes komponenseinek a normál hidrogénelektrodhoz viszonyított középponti potenciáljait mutatjuk be. A szám adatok a reakciók élettartamait mutatják.

2.2.2. A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer jellemzői

A RC gerjesztése után az elektron a BPheo-en keresztül mintegy 200 ps alatt a Q_A -ra, majd kb. 200 μ s alatt a Q_B -re kerül, ezzel megtörténik a szétválasztott töltések stabilizálódása. Korábbi elképzelések szerint (Paddock és mtsai., 1991) ez az elektrontranszport egyetlen lépésben történik és egyetlen, 150-200 μ s körüli kinetikai komponenssel írható le (az egyszerűség kedvéért ezt az értéket mutatom a 2. ábrán is). Azt is kimutatták, hogy ezt az elektrontranszportot mind a hőmérséklet, mind a pH befolyásolja, ellentétben a $PQ_A \rightarrow P^+Q_A^-$ elektrontranszporttal. Mivel a másodlagos kinon energiaszintje mintegy 60 mV-tal alacsonyabb az elsődleges kinonénál, azt gondolták, hogy ez a szabadenergiakülönbség lehet a folyamat hajtóereje. Újabb eredmények szerint azonban világosnak tűnik, hogy a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer legalább két kinetikai komponensből áll (Tiede és mtsai., 1996; Graige és mtsai., 1998). Vannak adatok arra vonatkozóan is, hogy a Q_A^- helyen más kinonokkal (menakinonnal; a *Rhodopseudomonas viridis* nevű baktériumban természetes kinon a Q_A helyen) helyettesített RC esetén ez az elektrontranszport lépés három komponensből is állhat (Li és mtsai., 1997). A két jellemző kinetikai összetevő közül az egyik a már korábban is megismert 150-200 μ s-os komponens, amelynek jellemzői valóban a fent leírtak. Kiderült azonban, hogy létezik egy gyorsabb, néhány tíz mikroszekundumos kinetikai komponens, amely a pH-val és a hőmérséklettel alig változik (Tiede és mtsai., 1996). Kinonhelyettesítési mérések azt is igazolták, hogy ez a komponens a Q_A és a Q_B közötti szabadenergiakülönbségtől is független (Graige és mtsai., 1998). Okamura és munkatársai ezen eredmények alapján alkották meg a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfernek azt a modelljét, amely szerint ez a folyamat a RC konformációs mozgásai (ezzel együtt a Q_B jellegzetes „befordulása”) által limitált („conformation gated mechanism”, (Graige és mtsai., 1998).

E modell szerint a gyors, néhány tíz mikroszekundumos komponens a fehérjén belüli, ún. „intrinsic” (vagy tényleges) elektrontranszport, amely valóban független a hőmérséklettől és a pH-tól. A második, néhány száz mikroszekundumos komponens megjelenését a Q_A -ra érkező töltés indukálja. A

redukált Q_A olyan hosszú távú töltésmozdulást indukál a kinonakceptor komplex közvetlen környezetében, amely a hidrogénkötések átrendeződéséhez vezet, ezáltal a fehérje konformációja is megváltozik („elektrosztatikus domino”, (Sebban és mtsai., 1995). Ez a konformációs mozgás szükséges ahhoz, hogy a másodlagos kinon, Q_B , az elektron fogadására alkalmas ún. proximális, azaz a vasatomhoz közeli pozícióban rögzüljön, ami feltétele az elektrontranszportnak. Legújabb eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a fehérje konformációs mozgásainak egyik kulcslépése a Q_B^{2-} protonációjában fontos szerepet játszó Glu^{L212} aminosav protonációja (Mezzetti és mtsai., 2002).

Újabban Remy és munkatársai Fourier transzformált infravörös (FTIR) spektroszkópiás mérések alapján megkérdőjelezik, hogy a másodlagos kinonnak ez az erőteljes mozgása lenne a sebességmeghatározó tényező (Remy és Gerwert, 2003). Szerintük a nagyon gyors (12 μs és 150 μs) komponensek a fehérjén belüli protonációs út elején levő két hisztidin aminosavak (Hys^{L126} és Hys^{L128}) protonációjával kapcsolatosak, míg a lassú (az ő mérési körülményeik között 1.1 ms komponens) a Q_B környezetében levő Glu^{L212} és Asp^{L210} aminosavak protonációja miatt van. Egy nagyon fontos megállapításuk szerint a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszport nem egyetlen lépésben történik (mint azt a korábbi modellek állítják), hanem egy intermedieren keresztül, és szerintük ez a Hys^{L190} , Hys^{L219} és Glu^{M234} valamint a Fe^{2+} -ionból álló klaszter lenne. A megállapításuk furcsa módon, nem váltott ki komolyabb érdeklődést az irodalomban. Egyre érdekesebb adatok gyűlnek azonban a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszportról, és a konformációs mozgás limitáló szerepéről (ami dogmaként íródott be az irodalomba az elmúlt években). Breton és munkatársai FTIR spektroszkópiai mérésekkel azt találták, hogy az elektrontranszport gyakorlatilag független attól, hogy a Q_B kinon proximális, vagy disztális helyzetben van-e (Breton és mtsai., 2004).

Legújabb krisztallográfiai (Baxter és mtsai., 2004; Baxter és mtsai., 2005b) és FTIR mérések (Breton és mtsai., 2004; Breton, 2007) nem mutattak ki nagy kinonmozgásokat az elektrontranszfer során (Koepke és mtsai., 2007) találtak ugyan kristályszerkezetet, amelyben a másodlagos kinon az eddigiekhez hasonlóan proximális illetve disztális pozícióban volt, de a szerkezet azt

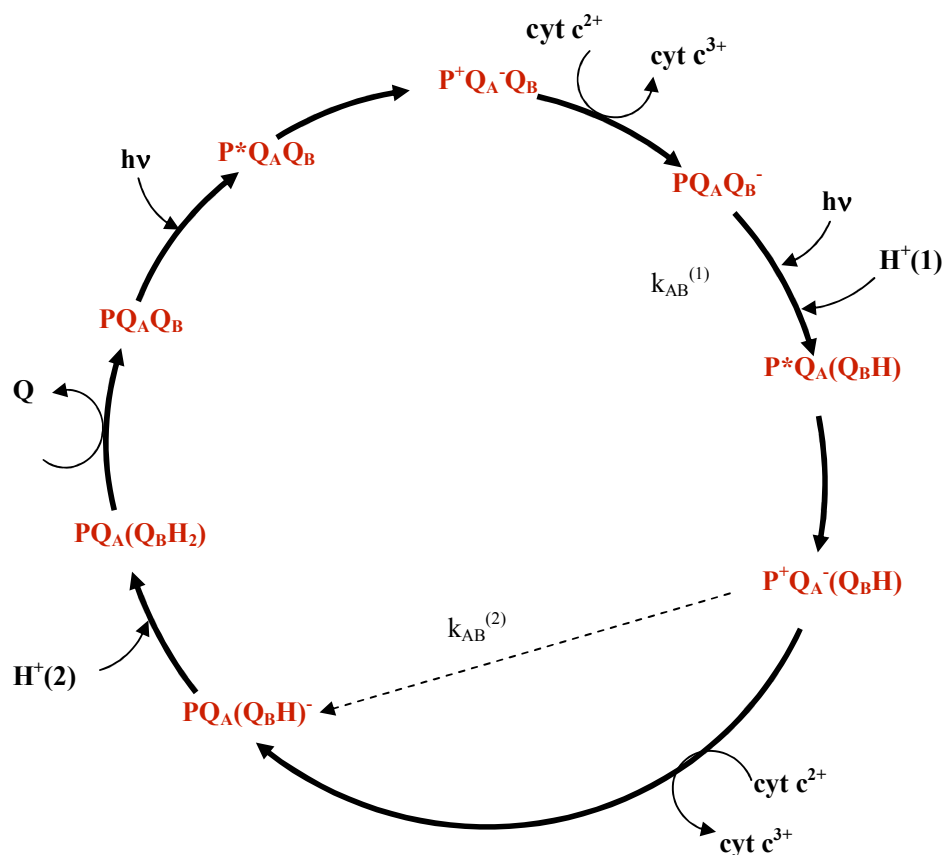
valószínűsíti, hogy a kinonnak a disztálisból proximálisba való átmenete során nincs szükség a korábban elképzelt izoprénlánc körüli 180°-os elfordulásra. A szerkezeti mozgások kimutatására igen érzékeny technika, a tranziens grating mérése sem mutatott ki jelentős struktúrális mozgásokat a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszport során (Ohmori és mtsai., 2008). Ezek alapján észszerűnek látszik az a feltételezés, hogy még ha lehetséges is jelentősebb kinonmozgás az elektrontranszport során, az nem feltétlenül jár együtt jelentős konformációváltozásokkal (Baxter és mtsai., 2005a).

A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer paramétereit meghatározhatjuk közvetlenül a kinon $\rightarrow$ szemikinin átalakulás nyomonkövetésével, a redoxátmenet miatt bekövetkező abszorpcióváltozás mérésével 397 vagy 402 nm-nél. Ez azonban nem könnyű feladat, mert az extinkciós koefficiens igen kicsi, így a jel/zaj viszony is nagyon kicsi, a minta fényszórása viszont igen nagy a látható tartomány legelején. Praktikusabb a BPheo abszorpciójában, a kinonokon megjelenő töltés miatt bekövetkező elektrokróm eltolódás mérése a 750-770 nm közelében (Tiede és mtsai., 1996). Mivel ez az elektrokróm eltolódás más a Q_A^- és a Q_B^- állapotokban, a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer kinetikája mérhető. Mi is ezt a megoldást választottuk.

2.2.3. Többszöri töltésszétválasztás

Fiziológiás körülmények között a töltésrekombináció valószínűsége nagyon kicsi, mert az egyszeri fényfelvillanás hatására képződő töltéspárt ($P^+Q_A^-$) egy másodlagos donör (pl. citokróm c^{2+}) még a töltésrekombináció bekövetkezése előtt redukálja, így a reakciócentrumban fény hatására újabb töltésszétválasztás történhet (Kleinfeld és mtsai., 1985). (A folyamatot *in vitro* is modellezhetjük a rendszerhez adott külső elektrondonorral.) Az oxidált dimer visszaredukálása után a reakciócentrum újabb töltésszétválasztásra válik alkalmassá. A második fényfelvillanás már heterogén reakciócentrumot ér ($Q_A^-Q_B$ és $Q_AQ_B^-$ állapotok) és csak azokban következik be újabb töltésszétválasztás, amelyekben Q_A oxidált állapotban van, mert a Q_A csak egy elektron fogadására képes. A második fényfelvillanást követően, két elektron

felvétele után, a másodlagos kinon a vizes fázisból két protont köt meg és dihidro-kinon (kinol, QH_2) keletkezik. Mivel a Q és QH_2 lazábban kötődik a reakciócentrumhoz, mint a szemikín (Q_B⁻, egyszerűen redukált kinon), így a keletkezett kinol leválik a RC-ról és helyébe új oxidált kinon (Q) kötődik (3. ábra).



3. ábra A fotoszintetikus reakciócentrumban végbemenő folyamatok sorozatos fényimpulzusokkal történő gerjesztéskor. Az ábrán feltüntettem az elektrontranszfer útját, a protontranszport, a $\text{cyt } c^{2+}$ oxidációjának, és a kinoncsereinek a lehetőségeit. Q , Q_A , Q_B , oxidált, Q_A^- , Q_B^- redukált, $(\text{Q}_\text{B}\text{H})^-$, $(\text{Q}_\text{B}\text{H}_2)$, QH_2 protonált kinonformák; $\text{cyt } c^{2+}$ redukált, $\text{cyt } c^{3+}$ oxidált citokrómformák; P elsődleges donor; $\text{H}^+(1)$ valamint $\text{H}^+(2)$ első és második proton.

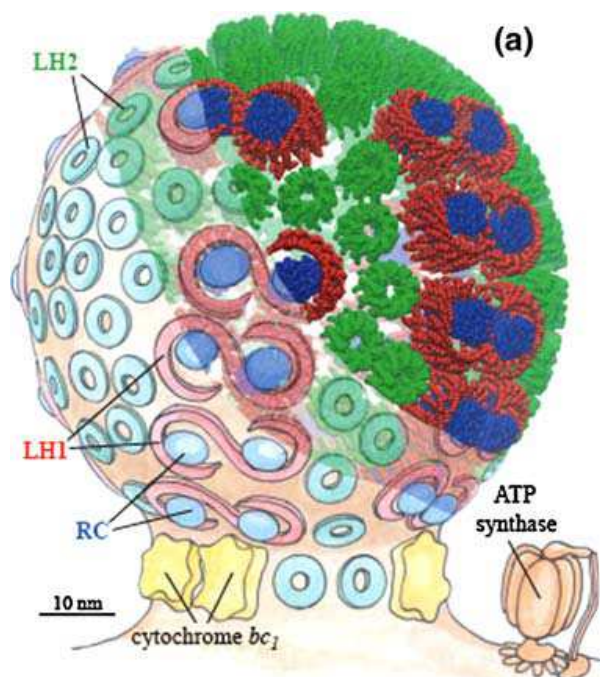
2.2.4. A membránkörnyezet hatása a töltésszétválasztásra

Az előző pontban említett kinetikai adatok LDAO (lauraldimetilamin-N-oxid)-micellákba ágyazott fotoszintetikus reakciócentrumok elektrontranszportsajátságait jellemzik. ^{14}C -gyel jelölt detergensekkel (Feher és Okamura, 1978) és strukturális adatokkal (Deisenhofer és Michel, 1989) igazolható volt, hogy a RC körül viszonylag keskeny (kb. 3 nm) hidrofób zóna alakul ki, amely néhány száz detergens- vagy lipidmolekulával való kölcsönhatást tesz lehetővé. Ezek a kölcsönhatások a kofaktorokra különböző hatásokkal lehetnek. A primer donor a periplazmatikus felszínhez közelebb, a pigment-protein komplex belsejében helyezkedik el. A Q_A , az intracitoplazmatikus felszínhez ugyan közelebb van, ám meglehetősen jól beágyazva egy apoláris, a H-alegység által védett környezetbe (Feher és mtsai., 1989; Deisenhofer és Michel, 1989). A $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^-$ töltésrekombináció sebessége detergensben és foszfatidilkolin (PC) lipidben nem mutatott lényeges eltérést. A Q_B , ezzel szemben közelebb van a citoplazmatikus felszínhez. A környezetében számos ionizálható, protonációra/deprotonációra képes aminosav oldallánc van (Kalman és Maroti, 1994), így a Q_B redoxpotenciálja nagyon érzékenyen változik a környezeti hatásokra, és az esetleges lipidösszetétel változásaira is. A Q_B redukciója (mind az első, mind a második elektronnal) protonok felvételével jár együtt, amelyben fontos szerepet játszanak a környezetében lévő protonálható aminosav oldalláncok.

Természetesen a fő célunk az, hogy megértsük, milyen a RC szerkezete és hogyan működik az élő membránban. Az élő membrán összetettsége (ld. 4. ábra) azonban nagyon megnehezíti annak az eldöntését, hogy milyen komponensek, milyen hatások befolyásolják a RC-szerkezetet és működést.

Igen nagy fontosságúak azok a vizsgálatok, amelyek mesterséges - de az élő lipidkörnyezetben is megtalálható lipidekből összeállított - lipidmembránban történtek, mert ezekben a RC strukturális és funkcionális paraméterei közelebb vannak az *in vivo* körülmények között mértékhez (lásd pl. (Maroti, 1991; Nagy és mtsai., 1999; Palazzo és mtsai., 2000)). Például a $\text{P}^+\text{Q}_\text{B}^-$ töltéspár élettartama hosszabb, a Q_B -oldal betöltöttsége magasabb, a K_AB , a kinonok közötti első

elektrontranszfer egyensúlyi állandója ($K_{AB} = [Q_A Q_B^-]/[Q_A^- Q_B]$) nagyobb. A folyamat ΔG_{AB}^0 stabilizációs energiája abszolút értékben nagyobb (negatívabb) az *in vivo* membránban, így mesterséges lipidmembránban is (Nagy és mtsai., 1999).



4. ábra A modell a *Rb. sphaeroides* in situ kromatofora felszínét mutatja. (Sturgis és Niederman, 2008)

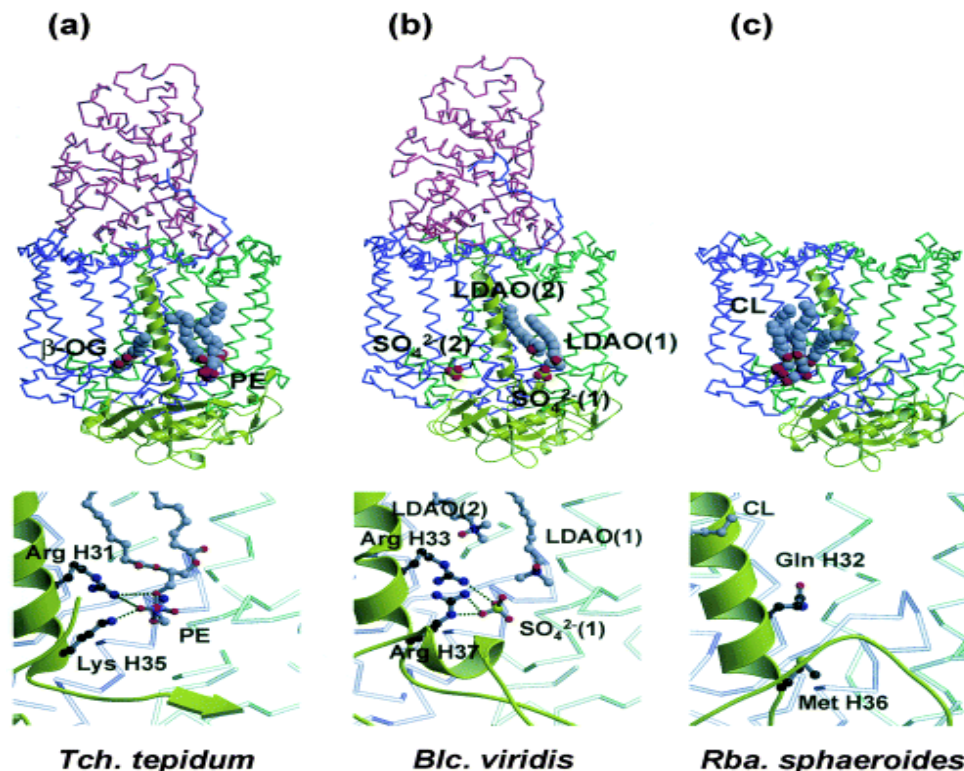
A membránkörnyezetnek a töltéssztabilizálódásra gyakorolt hatása összetett. A lipidkörnyezet nem csak strukturális mátrix a RC számára, hanem aktív szerepe is van.

- a) A fotoszintetikus membránban a fehérjék szerkezeti flexibilitása, az aminosavoldalláncok mozgási szabadsági foka, nagyobb, mint detergensben (Nagy és mtsai., 1999).
- b) A biológiai, így a fotoszintetikus membránok is, jellemző módon reagálnak a környezet különböző (stressz)paramétereinek megváltozásaira, külső és belső jelzésekre (szignálokra). Ez többek között azt is jelenti, hogy a sejt a membrán

összetételét jellemző módon képes megváltoztatni úgy, hogy a lipid kettősréteg stabilitása megmaradjon. Ezt a különböző lipidkomponensek (kettősréteget képző és kettősréteget nem képző lipidek) szükségesnek megfelelő módon történő megváltoztatásával éri el (Batterton és Van Baalen, 1971).

- c) Vannak a fotoszintetikus membránnak olyan komponensei, amelyek szorosan hozzátartozó részei a redoxátmeneteknek. A legnyilvánvalóbb példa erre az ubikinon (UQ) (növényekben a plasztokinon), amely része a RC kinonciklusának.
- d) Egyre több bizonyíték van arra, hogy olyan molekulák is kötődnek a RC-hoz amelyek nem vesznek részt tranziensen a redoxreakciókban, de azok kinetikáját, energetikáját befolyásolják (Lancaster és Michel, 1997). LDAO detergensmolekulákat és SO_4^{2-} -ionokat találtak a *Rps. viridis* reakciócentrum kristályokhoz kapcsolódva (McAuley és mtsai., 1999; Wakeham és mtsai., 2001; Camara-Artigas és mtsai., 2002). Kardiolipint (CL) (Nogi és mtsai., 2000), valamint foszfatidiletanolamint (PE) (Fathir és mtsai., 2001) találtak a baktériumok RC-ból készült kristályaiban (5. ábra). A foszfatidilglicerolnak (PG) a növények második fotokémiai rendszere D1 proteinjéhez való specifikus kötődését írták le (Kruse és Schmid, 1995), valamint az *in vivo* specifikus funkcióját mutatták ki (Hagio és mtsai., 2000; Sato és mtsai., 2000; Gombos és mtsai., 2002).
- e) A fotoszintetikus elektrontranszportnak a paraméterei és a membránlipidek közötti kapcsolatot különböző stressz körülmények esetén is kimutatták (Aro és mtsai., 1993).

A különböző foszfolipidek (1,2-Dimyriszoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DPPC), 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (POPC), szójabab, vagy tojássárgája lecitin) széles körben használtak a biológiai membránok funkciójának és szerkezetének modellezésénél. A PC és a PG jelentős mennyiségben megtalálható a fotoszintetikus baktériumok membránjaiban (Nagy és mtsai., 1999), a CL-nek specifikus jelentősége is lehet a fotoszinte



5. ábra A *Thermochromatium* (korábban *Chromatium*) *tepidum* (a), *Blastochloris* (korábban *Rhodopseudomonas* (*Rps*)) *viridis* (b) és a *Rhodobacter sphaeroides* (c) RC-ának összehasonlítása a kristályszerkezetük alapján. Az egyes RC-hoz kapcsolódó nem redoxaktív, de az elektrontranszport tulajdonságait módosító kofaktorokat is feltüntettük (Fathir és mtsai., 2001).

tikus apparátus működésében. Mivel a CL két foszfatidilglicerol-molekulából áll, szerepének kiderítésében jelentősége lehet annak a megfigyelésnek, hogy mutáns cianobaktériumokban a PG az elektronnak a Q_B -n történő stabilizálódását befolyásolhatja (Gombos és mtsai., 2002;Hagio és mtsai., 2000).

A POPC speciális figyelmet kaphat, mert fiziológiai hőmérsékleten folyékony fázisba vihető (fázisátmenete -2.6 ± 2.1 °C). Ugyanakkor az általunk alkalmazott rendszer fázissajátságait nehéz megjósolni az elég nagy mennyiségben jelenlevő koleszterin, ubikinon és RC miatt. A (Thewalt és mtsai., 1992b) által POPC/Chol rendszerre bemutatott fázisdiagram alapján azonban azt valószínűsíthetjük, hogy az általunk vizsgált rendszerben a gél és a folyadékkristályos fázisok keveredése fordulhat elő.

A membrán protonáteresztő képessége sok tényezőtől függ. Függhet a membrán fizikai/kémiai paramétereitől (pl. fluiditásától), mikroszerkezetétől (éppen melyik fázisban található, milyen kompartmentek lehetnek benne), fehérjetartalomtól, és egyéb molekulafajták (pl. szabad zsírsavak, koleszterin) jelenlététől (Lande és mtsai., 1995; Deamer és Nichols, 1989; Krishnamoorthy és Krishnamoorthy, 2001). A koleszterinek kitüntetett szerepe van a protonáteresztőképesség befolyásolásában (Lande és mtsai., 1995; Gensure és mtsai., 2006). A koleszterin jelenléte csökkenti a proton áteresztőképességet, de egy bizonyos koncentráció fölött, feltehetően a koleszterin domének megjelenése miatt az ugrásszerűen megnő.

A fehérjék jelenléte is növelheti a proton áteresztőképességet. Ennek valószínű oka az, hogy nő a membrán heterogenitása, megváltozik a doménszerkezete, környezetükben megváltozik a mikrostruktúra (Barlic és mtsai., 2004; Riegler és Mohwald, 1986).

A kutatások egyik fő célja az lehet, hogy meghatározzuk, milyen tényezők hogyan befolyásolják a transzmembrán protongradiens, protonmozgató erő (*proton motive force, pmf*) kialakulását, fennmaradását, illetve annak megszűnését (lecsengését). A feladat azonban nem könnyű, nagyon sok tényező figyelembe vételét, sok kalibrálást igényel. Figyelembe kell venni a rendszer pufferkapacitását, az egyes komponenseknek a protonaktivitásra gyakorolt hatását (például a H^+ aktivitási koefficiense, $f_H^+ = 0.33 \pm 0.03\%$ Triton X-100 mellett, viszont csak $f_H^+ = 0.12 \pm 0.04\%$ dodecilmaltozid mellett (Kalman és mtsai., 1997), amely változik a pH-val is). Az általunk használt puffer kapacitása a számunkra érdekes semleges pH-tartomány körül nem sokat változik, ezért ha az abszolút érték meghatározása nem is olyan könnyű, viszonylag jó közelítés adható a változások mértékéről.

A RC-on belüli elektrontranszportot a lipoproteid rendszerben rövid és hosszútávú kölcsönhatások befolyásolják. A rövidtávú kölcsönhatások közé a RC fehérje és a membránalkotók (foszfolipidek, koleszterol, kinon) közötti közvetlen kölcsönhatások tartoznak. Fontos, hogy a közvetlen kapcsolatok mellett a lipoproteid rendszer (liposzóma) egésze, nevezzük nanoszkópikus környezetnek, is hatással lehet a működésre. Megváltozhat pl. pH, az

elektrosztatikus környezet (dielektromos állandó). Érdekes észrevenni, hogy a RC/liposzóma vezikulák jellemzően kb. 100 nm átmérőjűek. Ez az átmérő a látható fény hullámhosszához kb. a negyed része, vagy annál is kisebb, vagyis az elektromágneses tér az oszcillációja során egynegyed periódust (vagy még kevesebbet) ír le a liposzómán való áthaladása során.

Adódik a lehetőség a RC szerkezeti és működési sajátosságainak más nanoszkópikus rendszerekben való vizsgálatára is. A következő fejezetben ennek lehetőségét mutatom be.

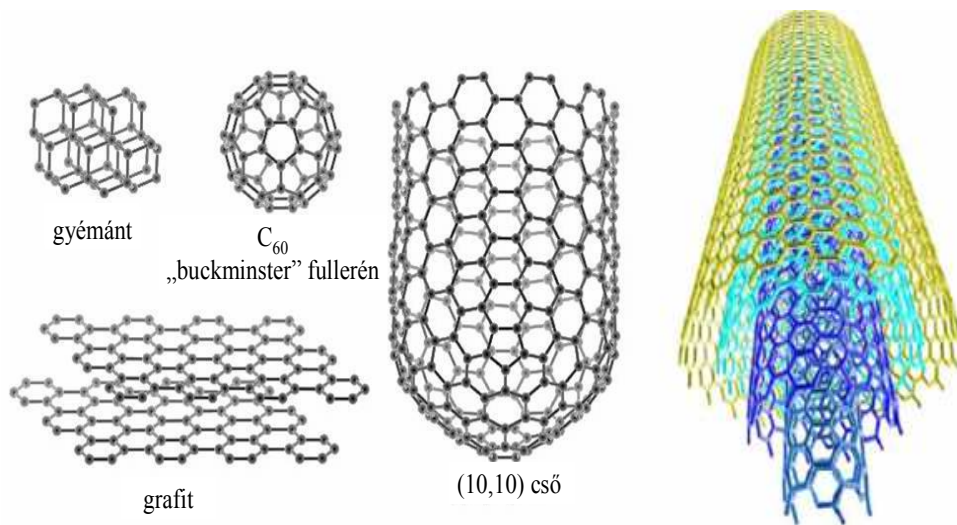
2.3. A szén nanocsövek és biológiai anyagok

2.3.1. A szén nanocsövek szerkezete és tulajdonságai

A szén korábban ismert két allotróp módosulata mellett (grafit és gyémánt) 1985-ben a fulleréneket fedezték fel (Kroto és mtsai., 1985), 1991-ben a többfalú szén nanocsöveket (multi-walled carbon nanotubes: MWNT, (Iijima, 1991)), majd két évvel később a fullerénekből közvetlenül származtatható egyfalú szén nanocsöveket (single-walled carbon nanotubes: SWNT (Gallagher és mtsai., 1993)).

Az egyfalú szén nanocsövek hat szénatomot tartalmazó gyűrűk hálózataiból épülnek fel úgy, hogy szerkezetüket egy hengerré tekert grafit sík képezi és a végeket félfullerének zárják le (6. ábra). A csövégek 6-6 darab öt szénatomos gyűrűt tartalmaznak a görbület miatt. A grafit sík feltekeredési módjától függően beszélhetünk karosszék, cikk-cakk és királis szén nanocsövekről aszerint, hogy a királis szög milyen értéket ($\Theta=30^\circ$, $\Theta=0^\circ$ és $0^\circ<\Theta<30^\circ$ az előbbi felsorolásnak megfelelően) vesz fel. A többfalú szén nanocsövek szerkezetére a feltekert grafit síkokból álló koncentrikus hengerpalástok jellemzők (Collins és mtsai., 2001).

A szén nanocsövek (NT) igen előnyös fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek alapján számos technológiai alkalmazás lehetőségét kínálják fel. Ezek általánosságban két nagy csoportra oszthatók. Az első csoportba a makroszkópikus, leginkább mechanikai, tulajdonságok kihasználását sorolhatjuk (pl.



6. ábra A szén allotróp módosulatai: gyémánt, grafit, fullerén, egyfalú és többfalú szén nanocső

a szénszálak helyettesítését). Erre azért van mód, mert a szén nanocsövek nagy mechanikai szilárdsággal rendelkeznek. A másik csoport a rohamosan fejlődő nanotechnológiában való egyéb alkalmazások, a szén nanocsövek különleges elektromos, optikai, mágneses, téremissziós sajátosságainak felhasználásával.

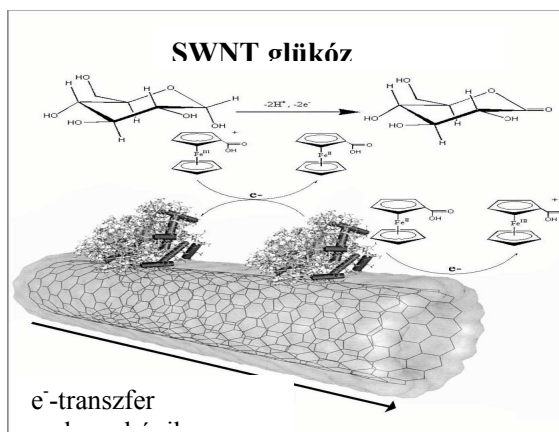
2.3.2. A szén nanocsövek és a biológiai anyagok közötti kölcsönhatás

A szén nanocsövek megfelelő fizikai paramétereiknek köszönhetően kompozit anyagok előállítására is igen alkalmasak. Mind az egyfalú, mind a többfalú NT-ből különböző polimerekkel vagy szervesetlen vegyületekkel kombinálva hozzák létre a kompozitokat. Ezeket az anyagokat igen széles körben használják fel: a NT-vel megerősített, fém-mátrixú kompozitoknak egyedülálló mechanikai tulajdonságaik vannak; a NT-et templátként alkalmazzák

szervetlen nanoszerkezetek előállítására; ezen kívül felmerült annak lehetősége, hogy a NT-et elektromos egységként elemekben és szenzorokban is kompozit anyagként felhasználják.

Az előzőekben felsorolt alkalmazási területek mellett speciálisabb felhasználást jelent a NT-k kompozitjainak előállítása biológiai anyagokkal, amelyre a NT-k optimális fizikai tulajdonságain kívül megfelelő elektronszerkezete miatt van lehetőség.

Kisméretű proteinek NT felülethez való kötődésével bioelektrokémiai reakciók katalizálhatók (Britto és mtsai., 1996; Davis és mtsai., 1997), 7. ábra). Ezen kívül a nagymértékben rendezett szén nanocsövek immobilizációs mátrixként, vagy mediátorként alkalmazhatók harmadik generációs amperometriás bioszenzor készülékek kifejlesztésénél (Sotiropoulou és Chaniotakis, 2002). A NT-k egydimenziós elektronszerkezete alkalmas lehet a heterogén elektron transzfer reakciók tanulmányozására (pl. amikor különleges biomolekulák képesek elektronikus kommunikációra a határfelületen). Már vannak eredményes kísérletek, melyekben redox aktív fehérjék prosztetikus csoportja és a NT-k felülete közötti elektrontranszfert tudtak kimutatni (Davis és mtsai., 2003). A vizsgálatok azt mutatták, hogy a fehérje szerkezetét és funkcióját nagymértékben befolyásolja a nanocső környezet. A szójabab peroxidáz aktivitásának 30%-a, az α -kimotripszin aktivitásának csupán 1%-a marad meg, ha ezek a proteinek az SWNT-höz kötődnek (Karajanagi és mtsai., 2004).



7. ábra Egyfalú szén nanocső felhasználásával készített amperometriás glükóz bioszenzor működésének elvi vázlata ((Davis és mtsai., 1997) alapján)

3. Célkitűzések

Lipid kettősréteg szerepének meghatározása

- 1) A fotoszintetikus RC foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-glicerol (PG) és PC+ kardiolipin (CL) lipidekből készített liposzómákba ültetése, és annak a megmutatása, hogy
 - a.) az így készített rendszerek nagy valószínűséggel lipid kettősrétegből álló zárt vezikulák;
 - b.) bennük a RC orientációja valószínűleg véletlenszerű.
- 2) A RC másodlagos kinonaktivitásának meghatározása PC és PG liposzómákban (a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció lassú komponensének az amplitudója alapján).
- 3) A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ előremenő elektrontranszport detergensben mért, irodalomból ismert paramétereinek (gyors- és lassúfázis részaránya, időállandói) meghatározása mind a PC, mind a PG rendszerben.
- 4) Az anionikus lipidek RC-hoz való specifikus kötődési helyeinek meghatározása.
- 5) A többszörös gerjesztés során a RC többszörös átfordulásának jellemzése különböző membránkörnyezetekben.

A töltésstabilizálódás energetikája lipidekben

- 6) A $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció lassú komponensének kinetikájából a Q_A és Q_B közötti szabadenergiakülönbségek meghatározása PC és PG liposzómákban
- 7) A K_{AB} hőmérsékletfüggéséből a Q_A/Q_B állapotok közötti standard szabadentalpiakülönbségek és a két állapot közötti entrópiakülönbség kiszámítása.

Transzmembrán protongradiens

- 8) Fluoreszkáló jelzőmolekula (piranin) liposzómába való beépítésével a transzmembrán protongradiens kiépülésének, és fennmaradásának kimutatása, kinetikájának meghatározása.

A fotoszintetikus RC és egyfalú szén nanocsövek kapcsolata

- 9) A fotoszintetikus reakciócentrumok egyfalú szén nanocsövekhez kapcsolása és az így kapott bio-nanokompozit (SWNT/RC) anyag fő spektroszkópiai tulajdonságainak meghatározása.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Mintaelőkészítés, preparatív eljárások

4.1.1. A baktériumtörzs jellemzése

Vizsgálataimhoz a *Rb. sphaeroides* R-26 törzset használtam. Az R-26 törzs karotinoidmentes, az abszorpciós spektrumából hiányoznak a karotinoidok sávjai, ezért folyadékkultúrájának színe jellemzően kék (a vad típusú tenyészet színe vöröses/barnás). Mivel normális körülmények között a karotinoidok védene a fotooxidációval szemben, e törzs sejtjei fotoheterotróf nevelési körülmények között érhetően érzékenyek a tápoldat oxigénkoncentrációjára (lásd „Az R-26 baktériumtörzs tenyésztése” fejezet).

4.1.2. Az R-26 baktériumtörzs tenyésztése

A folyadékkultúrákhoz az 1,5%-os agaron nőtt masszív szűrt tenyészetekből vettünk mintákat a 10-15 cm³ szukcinát-tartalmú Siström-tápoldatot tartalmazó, jól zárható, kémcsövekbe. A továbbtenyésztéshez 200-250 cm³, majd 1000 cm³-es üvegeket használtunk. Minden egyes átvétel után 4-6 órára sötétbe tartottuk a sejteket, hogy az oldatban levő oxigént a sejtek a légzésükhöz felhasználják. Erre azért van szükség, mert a tápoldatban maradt kismennyiségű oxigén a sejtek egy részét elpusztítja, ezzel is lassítva a tenyészet növekedését. A sötétperiódus után a tenyészeteket fényre tettük a fotoheterotróf nevelési körülmények biztosítására. A megvilágítás 40 W teljesítményű wolfram izzószálas lámpákkal történt, amelyeket kb. 20 cm-re helyeztünk el a tenyészetektől. Az izzólámpák által termelt hő egyúttal biztosította az optimális, kb. 30 °C hőmérséklet is. 4-5 napig állandó fényben történő tenyésztés után a sejteket lecentrifugálva (6000 x g, 20 perc), majd mosópufferrel (10mM TRIS;

100mM NaCl) mosva a felhasználásig -20 - -25 °C-on lefagyasztva tároltuk (Nagy és mtsai., 1991). Literenként kb. 8 gramm baktériumtömeget tudunk összegyűjteni.

4.1.3. Reakciócentrumok prepalálása

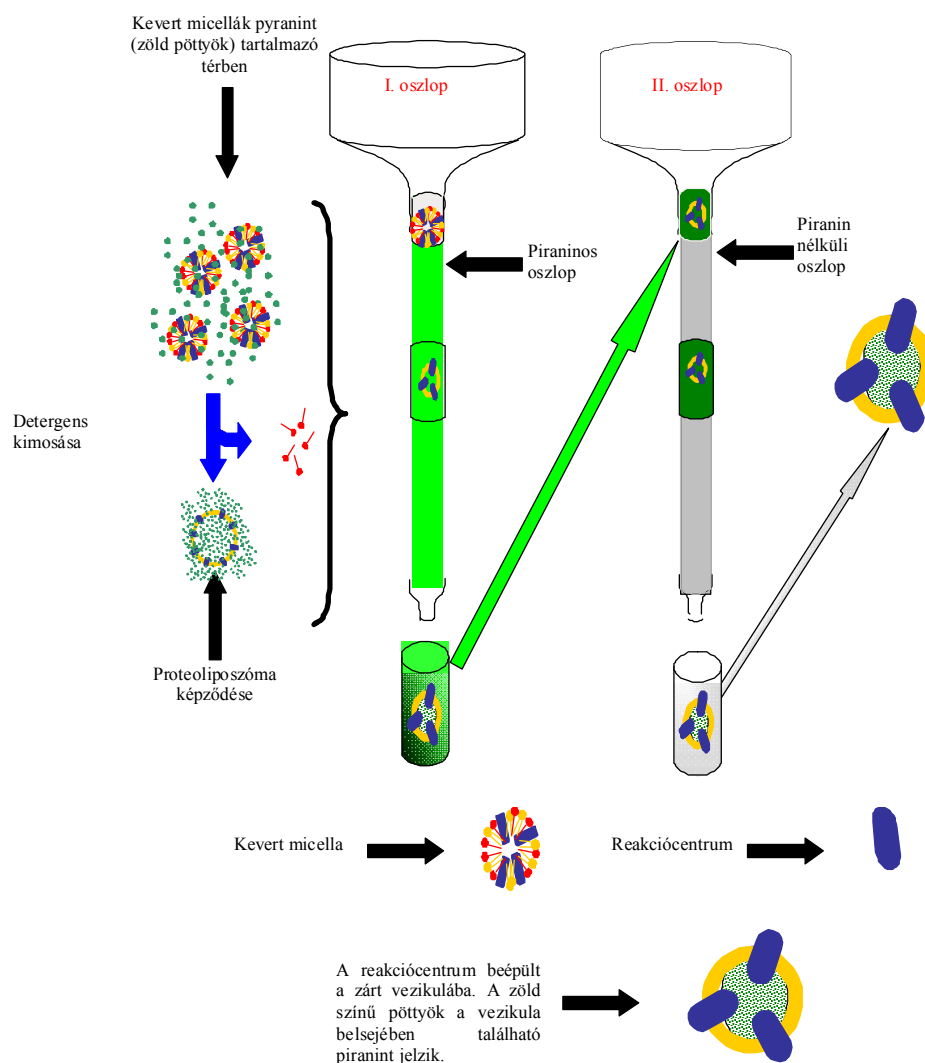
A RC-ok preparálásához nagyobb mennyiségű sejtre van szükség. Kb. 100 g vizes tömegű fagyasztott sejtéből indultunk ki, amelyeket a befagyasztás előtt többször átmostunk TRIS-pufferrel (10 mM TRIS; 100 mM NaCl; pH 8,0). Hígítás után ultrahanggal feltörtük a sejteket. Az ultrahangos feltáráshoz SONOPLUS Ultrasonic homogenizer-t használtunk (Bandelin, Németország). Egy speciálisan a sejteltáráshoz tervezett, jégbe állított üvegedényben a készülék TT 13 titánfejét használva, 1 órán át közel 100% (kb. 70 W) teljesítménnyel impulzus üzemmódot használva (5 impulzus/periódus) ultrahangoztuk a sejteket. A számunkra szükségtelen sejtmaradványokat (sejtfal, feltörtetlen sejtek) centrifugálással távolítottuk el (kb. 40000 x g, 10 perc), majd a felülúszót ultracentrifugáltuk (240000 x g, 90 perc). Az üledékben kapott kromatofórákat finom ecsettel felszuszpendáltuk és 0,45% LDAO detergenst tartalmazó TRIS-pufferrel kioldottuk a fehérjéket, amit újabb ultracentrifugálással választottunk el a nem szolubilizált részekről. A felülúszóból a RC-ot frakcionált ammónium-szulfátos kicsapással, majd DEAE Sephacell anioncserélő oszlopkromatográfiával tisztítottuk. Az oszlopkromatográfia előtt a mintát dializálással sómentesítettük. A kromatográfia során szedett frakciókból azokat tartottuk meg, amelyekben az OD_{280nm}/OD_{800nm} arány 1,2-1,5 között volt. A koncentráció és a tisztaság megállapítása után UQ₁₀ hozzáadásával a Q_B-aktivitást 90% felettire állítottuk be. Az ilyen módon izolált RC-at -20 °C-on tároltuk.

4.1.4. Lipoproteid rendszerek preparálása

A már tisztított RC-okat PC, illetve PG alapú vezikulákba helyeztem. PC/PG, foszfatidilinozitol (PI), UQ₁₀ (2,3-dimetoxi-5-methyl-6-dekaizoprenol-*p*-benzokinon) és koleszterin (Col) megfelelő mennyiségű és koncentrációjú kloroformos oldatait kevertem össze. A mennyiségi arányok megállapítását hosszú kísérletezés előzte meg (lásd „Eredmények” fejezetben), míg sikerült egy olyan leírást megadni, amely az elvárásainknak megfelelő tulajdonságokkal rendelkező liposzómát eredményezett. A keverés után az oldószert nitrogénárammal távolítottam el úgy, hogy az összetevők az Eppendorf-cső falára vékony filmet alkotva száradjanak fel. Beszáritás után a csöveket 20 percre vákuumba helyeztem, így a maradék oldószert is eltávolíthattam. Ilyen állapotban a minta akár 1-2 hétig lefagyaszttva tárolható (Ollivon és mtsai., 2000a; Trotta és mtsai., 2002).

Ezek után a csövekbe 500 µl Na-kolát-puffert (Ch) (5 mM KCl, 5 mM K-foszfát, 1 mM piranin, pH: 6,8, + 4% nátrium-kolát) mértem és 3*7 percig folyamatos ultrahanggal kezeltem ügyelve arra, hogy a közeg hőmérséklete ne emelkedjen szobahőmérséklet fölé. Az így elkészített Ch/lipid alapú kevert micellákhoz adtam a fotoszintetikus reakciócentrum LDAO detergenses oldatát, majd vortex-szel egy percig intenzíven kevertettem. A kevert micellákat tartalmazó mintát először 5 mM foszfátot, 5 mM KCl-ot és 1 mM piranint tartalmazó pufferrel (pH: 6,8) ekvilibrált Sephadex G-50 molekulaszűrőre vittem, és ugyanezzel a pufferrel eluáltam. Az elúció során a RC-ot tartalmazó oldat gyakorlatilag egyetlen frakcióban volt összegyűjthető, csak egy-két elő és utófrakció tartalmazott még RC-ot, ám csak igen kicsiny koncentrációban. Az összegyűjtött frakcióban a RC már zárt vezikulákba épült be, de a vezikulák mindkét oldalán levő térben (mind a vezikulák belsejében, mind pedig azon kívül) megtalálható a piranin jelzőmolekula a kiindulási koncentráció szerint. A főfrakciót újabb kromatográfiás eljárásnak vettem alá, mely az elsőtől csupán abban különbözött, hogy a puffer nem tartalmazott piranint. Ez az eljárás biztosította azt, hogy az oszlopon való áthaladás után a külső térben levő piranintól megszabadulhassunk. Ebben az esetben is jól el tudtunk különíteni egy

központi frakciót, melyben a számunkra fontos RC/lipid együttesek nagyobbik része került. (Trotta és mtsai., 2002; Nagy és mtsai., 2004). A kísérleti elrendezést a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra: A RC/liposzóma zárt vezikulák elkészítésének, és a piranin jelzőmolekulának a vezikulák belsejébe építésének vázlata. Sárga vonal a lipid kettősréteget, a kék pálcikák a RC-ot, a zöld pontok pedig a piraninmolekulákat jelölik.

4.2. Vizsgálatok optikai módszerei

4.2.1. "Steady state" abszorpciómérések

A RC szuszpenzió és RC/lipoproteid rendszerek abszorpciós spektrumát UNICAM spectrometer UV4 típusú spektrofotométerrel határoztam meg. A fényszórás minimumra csökkentése érdekében a spektrofotométer közeli mintahelyzetét használtam. Mivel a spektrumot igen széles hullámhossztartományban kellett meghatározni az UV tartománytól a közeli IR-ig, a mérésekhez kvarcküvetát használtam.

A RC tisztaságát az OD_{280nm}/OD_{800nm} arány meghatározásával jellemeztük (lásd a „Reakciócentrumok preparálása” fejezetet), a koncentrációt az $\epsilon_{800} = 280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ alapján határoztuk meg.

A liposzóma keletkezését a 650 nm-nél mért fényszórás meghatározásával ellenőriztük. Ezt a hullámhosszt azért választottuk, mert itt a RC-nak alig van fényelnyelése.

4.2.2. Abszorpcióváltozás kinetikai mérése

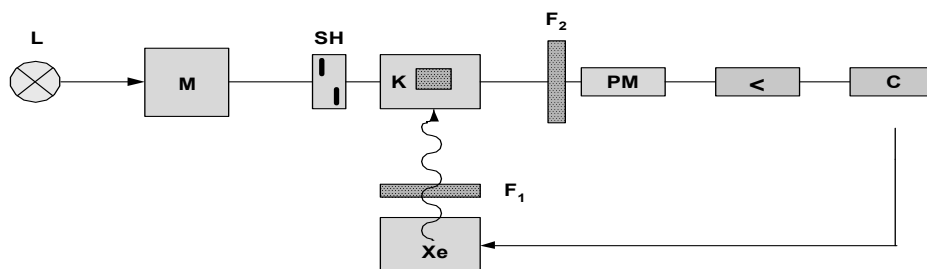
4.2.2.1. Az abszorpcióváltozás mérése a ms–s -os tartományban

A RC-ok fényfelvillanás által gerjesztett abszorpcióváltozását (megválasztott hullámhosszokon) házilag összeállított egysugaras spektrofotométerrel mértem (9. ábra, (Tandori és mtsai., 1995). A nem gerjesztő hatású mérőfényt egy stabilizált tápegységgel táplált 50 W-os, 12 V-os autóizzó (L) szolgáltatta, amelyet egy monokromátor (M, Jobin Yvon) belépő részére fókuszáltunk, a kilépő fényt pedig egy fényzáron (SH) át a küvetatartóban (K) levő mintára élesítettük. A mintán áthaladó fényt egy fotoelektron-sokszorozó (PM, Hamamatsu R928) fotokatódjára képeztük le. A telítési gerjesztést egy xenonvillanólámpa (Xe, EG&G FX200, $t_{1/2}=8.5 \text{ } \mu\text{s}$) biztosította, amelyből a fény

egy, csak a 750 nm feletti sugarakat átengedő, keresztezett optikai szűrőn (F_1) át érte el a mintát. A megmaradt vörös sáv elegendő volt a telítési gerjesztéshez. A fotokatód elé széles sávú kék keresztező szűrőt tettünk, hogy védje a PM-t az erős gerjesztő fényimpulzussal szemben (F_2). A fényfelvillanás előtti stacionárius állapot kiegyenlítésére 200 mV kiegyenlítő (offset-) feszültséget kapcsoltunk a fotokatódra, amit a mérőfény hatására a munkaellenálláson (10–100 k Ω) fellépő feszültséggel a flash előtt kiegyenlítettünk. Így a számítógépbe épített A/D konverterbe csak a gerjesztés által kiváltott, majd felerősített jel kerül. A mérési folyamat vezérlését és az adatok gyűjtését egy IBM PC/386 AT számítógéppel végeztük.

Az első gerjesztés hatására létrejövő töltésstabilizálódást a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció nyomonkövetésével vizsgáltuk 430 nm-nél, ahol az impulzusgerjesztés után keletkező P^+ visszaredukálódását mértük. A második töltés stabilizációjának vizsgálata során 450 nm-nél mértük a fényindukált abszorpcióváltozást, ahol a gerjesztés után keletkező szemikinon keletkezését, illetve második gerjesztés után az eltűnését követhetjük nyomon (Nagy és mtsai., 1999).

Ugyanilyen elrendezés mellett mértem 700 – 800 nm tartományban a Q_A/Q_A^- és Q_B/Q_B^- differenciaspektrumokat, feleslegben alkalmazott (>40 μ M) ferrocén jelenlétében (a ferrocén a gerjesztés után keletkező P^+ donorja, alkalmazása megakadályozza a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombinációt). A Q_A^- spektrumot terbutrin jelenlétében mértük, mert ez a gátlószer blokkolja a Q_B - oldalt. Az említett hullámhossztartományban 10 nm-enként pontonként megmértem a kinetikákat és meghatároztam az exponenciális lecsengések amplitúdóját. A számított amplitúdókat tekintettem a fény-sötét abszorpcióváltozásnak.



9. ábra A fényindukált abszorpcióváltozást mérő készülék blokkdiagramja. L: 50 W-os, 12 V-os autóizzó; M: monokromátor; SH: fényzár; K: küvettatartó; PM: fotoelektron-sokszorozó; Xe: xenonvillanólámpa a nagyfeszültségű tápegységével; F₁; F₂: optikai szűrők; C: számítógép.

4.2.2.2. Az abszorpcióváltozás mérése a μ s-os tartományban

Az LDAO detergensmicellákba és PC, illetve PG liposzómákba ágyazott RC-ok $Q_A^+Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszferének kinetikáját a BPheo abszorpciója elektrokróm eltolódásának mérésével határoztuk meg, 771 nm-nél (Tiede és mtsai., 1996). A méréseket az SZBK Biofizikai Intézetében Dr. Váró György laboratóriumában végeztük, az általa összeállított abszorpciókinetikai berendezéssel (Lakatos és mtsai., 2002). Az egysugaras abszorpciómérő berendezésben a mérőfényt egy 250 W-os halogénlámpa szolgáltatta. A szükséges hullámhosszt 771 nm-es interferenciaszűrővel választottuk ki, a lámpa infravörös sugarait hőszűrővel szűrtük ki. A RC-ot a primer donor (SP) Q_y sávjánál, 597 nm-nél gerjesztettük Nd:Yag lézerrel (532 nm) pumpált Rhodamine 6G festéklézerrel. A gerjesztő fényimpulzus hossza 8 ns volt. A fotoelektron-sokszorozó jelét áram/feszültség konverzió után számítógépbe ültetett tranziens rekorderkártyával rögzítettük 200 ns/pont konverziós sebességgel. Kiszámoltuk az abszorpcióváltozásokat, és széles időablakban, 10^{-6} – 10 s intervallumban, mintegy hét nagyságrendet átfogva, logaritmikus időskálán ábrázoltuk.

4.2.2.3. Abszorpcióváltozás adatainak kiértékelése

A gerjesztésindukált abszorpcióváltozás rutinszerűen használható a töltésszétválasztás kinetikájának spektrofotometriás vizsgálatainál (Tandori és mtsai., 1995; Tandori és mtsai., 1991; Lakatos és mtsai., 2002). A P/P^+ BChl dimer elsődleges elektrondonor és a Q/Q^- akceptor komplex kinonjai redoxállapotairól általában a 430, 450, 603, 860 nm-nél mért abszorpcióváltozás kinetikái, illetve a BPheo 771 nm-nél mért elektrokróm eltolódásának a kinetikája tájékoztat (Nagy és mtsai., 1999; Tandori és mtsai., 1995; Tiede és mtsai., 1996).

A vizsgált reakciók többsége elsőrendű folyamatként kezelhető, így exponenciális függvényvel írható le. A kinetikák általában több fázist is tartalmaznak (több exponenciális összegeként kezelhetők):

$$A_t = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad (1)$$

ahol A_t az amplitúdó időfüggése, A_i az i -edik komponens amplitúdója a $t = 0$ időpontban, k_i pedig, a sebességi állandója.

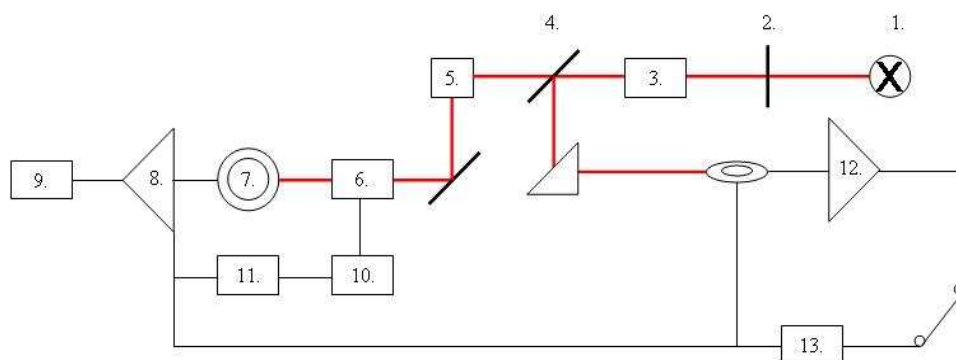
A kinetikai paraméterekből a $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ elektrontranszport ΔG^0 szabadenergiaváltozása, azaz a töltés stabilizációs energiája is kiszámolható. A folyamat $K_{AB} = [Q_A Q_B^-] / [Q_A^- Q_B]$ egyensúlyi állandója a mért k_{AP} és k_{BP} időállandókból kiszámolható: $K_{AB} = k_{AP} / k_{BP} - 1$. Az egyensúlyi állandó ismeretében pedig: $\Delta G_{AB}^0 = -k_B \cdot T \ln K_{AB}$, ahol k_B a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet (Wright és Stein, 1980; Kleinfeld és mtsai., 1985).

A szemikinon keletkezésének és eltűnésének bináris oszcillációja lényegében két paraméterrel a K_e elektronegyensúlyi ($K_e = [Q_A Q_B^-] / [Q_A^- Q_B]$) és K_q kinonegyensúlyi állandóval ($K_q = [Q_A Q_B] / [Q_A \dots] = [Q_A^- Q_B] / [Q_A^- \dots]$) kielégítően leírható (Tandori és mtsai., 1991; Nagy és mtsai., 1999; Halmschlager és mtsai., 2002). Itt $[Q_A \dots]$ és $[Q_A^- \dots]$ azt a RC-populációt jelenti, amelyben a másodlagos kinon kötőhelye aktív maradt, de az a gerjesztés időpontjában időlegesen üres.

A Q_B oldali kinon kötési egyensúlyi állandó, $K_q = [Q_A Q_B]/[Q_{A...}] = [Q_A^- Q_B]/[Q_{A^-}...]$, a RC gerjesztés utáni 450 nm-nél mért szemikinin jel oszcillációjából határozható meg (Nagy és mtsai., 1999; Tandori és mtsai., 1991; Halmschlager és mtsai., 2002). Itt a $[Q_{A...}]$ és $[Q_{A^-}...]$ kifejezi az elsődleges kinon redukált és oxidált koncentrációját a RC-ban.

4.2.3. Fluoreszcencia vizsgálatok

A liposzómák belsejébe kötött piranin fluoreszcenciájának vizsgálatához Perkin-Elmer MPF-44A típusú, Hitachi gyártmányú fluoreszcencia spektrofotométert használtam. A készülék blokkdiagrammja a 10. ábrán látható.



10. ábra A Perkin-Elmer MPF-44A típusú fluoreszcencia spektrofotométer blokkdiagramja. Jelölések: 1: XE-lámpa, 2: fényszaggató, 3: gerjesztési monokromátor, 4: nyalábosztó, 5: minta, 6: emissziós monokromátor, 7: fotomultiplier, 8: erősítő, 9: regisztráló, 10: potenciométer, 11: függvénygenerátor, 12: referenciaerősítő, 13: nagyfeszültségű tápegység. Piros vonallal a fény útját jelöltem.

A gerjesztést 470 nm-rel végeztük, a fluoreszcenciát az emissziós maximumnál (510 nm-nél) figyeltük meg. A minta keverésére speciális, keverővel ellátott mintatartót készítettünk, amely biztosította a külső megvilágítás követelményeit is és a minta reagensekkel való kezelhetőségét is. A folyamatos megvilágítás céljából egy diavetítő-izzó fényét száloptikán keresztül a készülékbe helyezett küvettára vezettük. Az izzó és a száloptika közé helyezett hőszűrő üveg védte a mintát a káros infravörös sugaraktól. A hőszűrő üveg mellé

vörös szűrőt helyeztünk, amelynek a transzmissziója a megfigyelés hullámhosszán (510 nm) elhanyagolható volt. Ez az elrendezés a megfigyelési oldalon levő monokromátorral együtt minimálisra csökkentette a szórt fénynek a fotoelektron-sokszorozóba való jutásának a lehetőségét.

A fotoelektron-sokszorozó jelét megfelelő kompenzáció és erősítés után digitális tárolóoszilloszkópba (HITACHI VC-6025), és a mérés után IBM számítógépbe vittük át tárolás és további feldolgozás céljából. Ezzel kiküszöböltük a készülék eredeti analóg rekorderét, az adatfeldolgozás pontosabbá és gyorsabbá tétele érdekében. A valódi fluoreszcenciasepektrumok meghatározása a reabszorpcióra való korrigálással történt, a korrekciós paramétereket korábban a készülékhez elkészített táblázatból vettem.

4.3. RC/szén nanocső kompozit előállítása

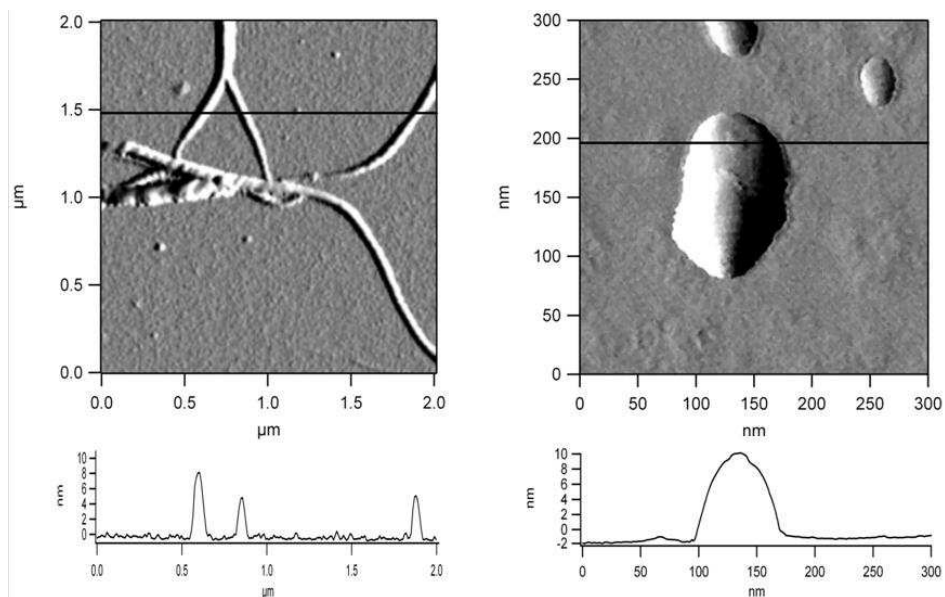
4.3.1. A felhasznált szén nanocső minták jellemzése

Az egyfalú szén nanocsöveket Mikó Csilla tisztította Forró László laboratóriumában (Institute of Physics of Complex Matter, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Svájc). A kereskedelmi forgalomban is kapható (Carbon Nanotechnologies Incorporated Company) nagynyomású szénmonoxid atmoszférában készült (HiPco) szén nanocsövek tisztítása nedves oxidációs módszerrel történt, a következők szerint: 100 mg nyers HiPco SWNT-t oxidáltunk 60 ml 30%-os H_2O_2 -ben, és 110 ml 22%-os HCl elegyével. Az oldatot keverés mellett 70 °C, 9 órán át folyamatos reflux alatt tartottuk. Ezt követően szobahőmérsékletűre hűtöttük, majd az SWNT-ket leszűrtük és mostuk desztillált vízzel 7-es pH eléréséig. Végül 120 °C-on, 30 percig szárítottuk. A tisztított SWNT-k hozama 90%, amit transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) határoztunk meg. A csövek átlagos átmérője 1-5 nm.

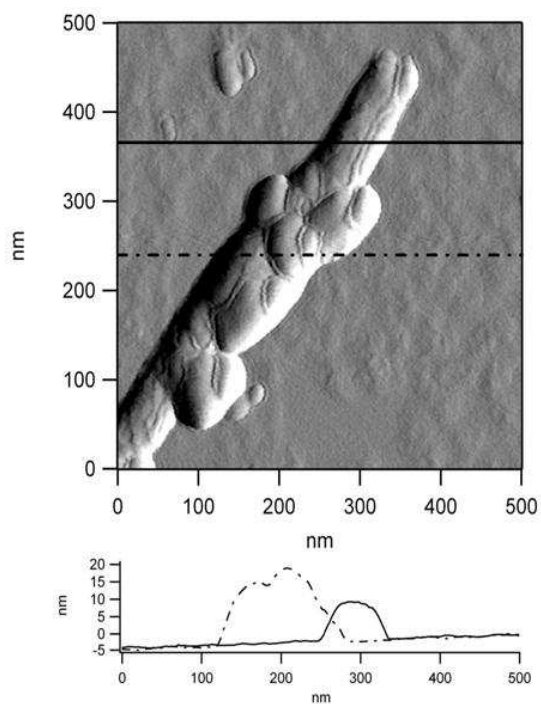
4.3.2. SWNT/RC komplex preparálása

500 μ l fotoszintetikus RC-hoz 25 μ l SWNT-t adtunk valamint 3 μ l kinont (UQ-10-et 60 mM UQ-10 30%-os TX-100 törzsoldatból), 10 ± 3 mg RC/mg SWNT tömegarányban. Ezt követően a detergens eltávolítása érdekében 3 napig dializáltuk 10 mM TRIS és 100 mM NaCl pufferben. A mintát naponta rövid és óvatos ultrahangozásnak vetettük alá a homogenizálás érdekében (vízfürdőben ELMA Transsonic 310 típusú ultrahangozó készülékkel). A dialízis befejezése után a mintához 1 ml, az előzővel megegyező összetételű puffert adtunk, majd ultracentrifugáltuk (4 °C, 10 perc, 20000 g). Ezután a felülúszót leöntöttük, a csapadékhoz pedig 1 ml desztillált vizet adtunk és az előbbi körülményeknek megfelelően ultracentrifugáltuk. A felülúszót ismét eltávolítottuk, a csapadékhoz 200 μ l desztillált vizet adtunk, majd ultrahangoztuk az előzővel megegyező paraméterek mellett. Ezek után néhány cseppet N₂-áramban üveglapra szárítottunk. A minta egy részét szobahőmérsékleten, a másik részét hűtőszekrényben 4 °C-on tartottuk. Mértük az egyensúlyi abszorpciós spektrumokat, a minta aktivitását a fényindukált abszorpcióváltozás mérésével jellemeztük.

A RC/SWNT kötődést az ultracentrifugálás üledékéke és felülúszója steady state abszorpciós spektrumának és gerjesztésindukált abszorpcióváltozásának összehasonlításával ellenőriztük. A kapcsolódás kimutatható volt atomerőmikroszkópos (AFM) vizsgálattal is. A 11. ábra az egyfalú karboncsövek és a RC, a 12 ábra az egyfalú karboncső/RC komplexek AFM képeit mutatják (Dorogi és mtsai., 2006).



11. ábra Az egyfalú karboncsövek (baloldal) és a RC (jobboldal) AFM-képei és a vonalmenti magasságprofilok. A felvételek AC mód-ban történtek, a letapogatás frekvenciája: 2 vonal/s. A RC magassága: 9 ± 1 nm (jobb oldal), SWNT magasság: 2-4 nm (bal oldal).



12. ábra Az egyfalú karboncső/RC komplex AFM képe és a vonalmenti magasságprofilok A felvétel AC mód-ban készült, a letapogatási frekvencia: 2 vonal/s. , a SWNT/RC komplex magassága: 12-15 nm.

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1. A vezikulák minőségi vizsgálata

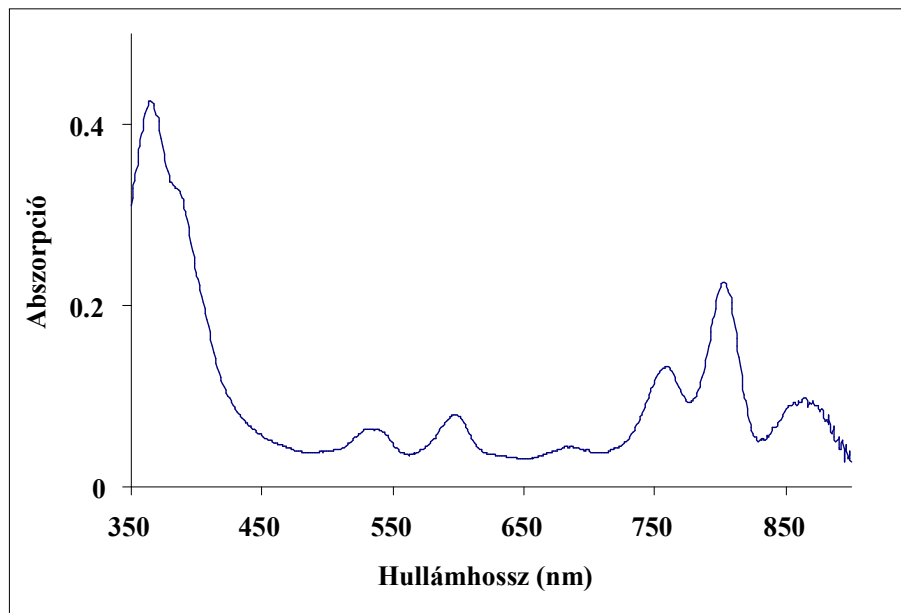
A 13. ábrán a *Rb. sphaeroides* R-26 karotinoidmentes törzséből izolált fotoszintetikus RC-ok alapállapotú "steady state" abszorpciós spektruma látható. A spektrumok felvételére több okból is szükség volt. A preparálás során rutinszerűen a tisztaság megállapítására, a RC koncentrációjának a meghatározására, illetve a RC-nak a liposzómába való beépülésének az ellenőrzésére használtuk őket.

A 13. ábrán látható spektrum jellemző csúcsai:

- 360 nm: $S_0 - S_n$ átmenetek (amelyet Soret-sávnak nevezünk);
- 530 nm: Bakteriofeofitinek abszorpciója;
- 600 nm: Bakterioklorofill fényelnyelése;
- 760 nm Bakteriofeofitin fényelnyelése;
- 802 nm: Bakterioklorofill monomer fényelnyelése;
- 860 nm: Bakterioklorofill primer donor fényelnyelése.

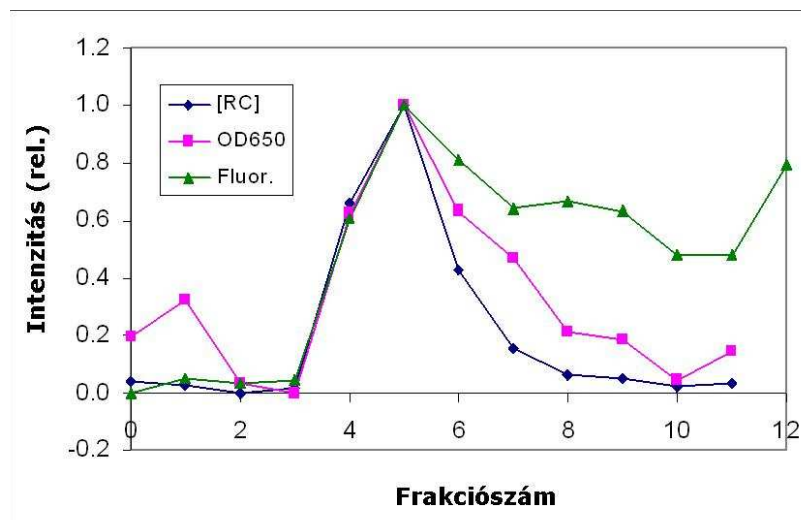
A liposzómába való beépülést a 800 nm-es abszorpció nyomonkövetésével ellenőriztük. A RC-koncentrációt az $\varepsilon_{800} = 280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ alapján határoztuk meg. A gerjesztés hatására a 860 és 600 nm-nél levő csúcsok eltűnnek („bleaching”), de jellemző változás történik 430 nm-nél is. Ezek a hullámhosszak alkalmasak arra, hogy a töltésszétválasztás kinetikáját nyomon kövessük.

A kísérlet beállítása során, kezdetben, szükséges volt annak ellenőrzése, hogy mennyire homogén a liposzóma mérettartománya, tartalmazza-e a RC-ot és a piranin jelzőmolekulát. A későbbiek során, a rutinméréseknél ezt a lépést már elhagyhattuk. A liposzóma keletkezését a 650 nm-nél mért fényszórás meghatározásával ellenőriztük. Ezt a hullámhosszt azért választottuk, mert itt a RC-nak alig van fényelnyelése.



13. ábra A *Rb. sphaeroides* R-26 törzsből izolált fotoszintetikus reakciócentrum abszorpciós spektruma. [RC]: 0.8 μ M; puffer: 10 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH: 8.0.

A RC-ot a 800 nm-es abszorpciójának, a piranint pedig az 510 nm-nél mért fluoreszcenciájának a nyomonkövetésével ellenőriztük. Minden egyes frakció 0.5 ml volt és mértük az említett paramétereket. Az eredményt a 14. ábrán foglaltuk össze. A rutinszerű preparálásoknál a reakciócentrum/liposzóma frakció szemmel láthatóan elvált és a 14. ábra tapasztalatai alapján 0.5-0.7 ml-es, gyakorlatilag egyetlen frakcióban volt összegyűjthető. A szabad piranin a molekulaszűrő oszlopról a liposzómánál később, több frakcióban összegyűjtve szedhető le. A koncentráció helyes megválasztásával (5 μ M-nál kisebb piraninkoncentráció) a liposzóma frakció gyakorlatilag teljesen elválasztható.



14. ábra A molekulaszűrő oszlopkromatográfia elúciós profilja a RC abszorpciója, az oldat fényszórása és a fluoreszcenciája szerint. Igen nagy (50 μM -nál nagyobb) piraninkoncentráció alkalmazásakor mért elúciós profil látható, egyetlen kromatográfia esetén. A kísérleti körülményeket a szövegben írtuk le (lásd „Anyagok és módszerek” fejezet).

5.2. A lipidkörnyezet hatása a reakciócentrumon belüli elektrontranszportra

5.2.1. Egyszeres töltésszétválasztás

5.2.1.1. $\text{Q}_\text{A}^-\text{Q}_\text{B} \rightarrow \text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}^-$ elektron transzfer kinetikája és energetikája

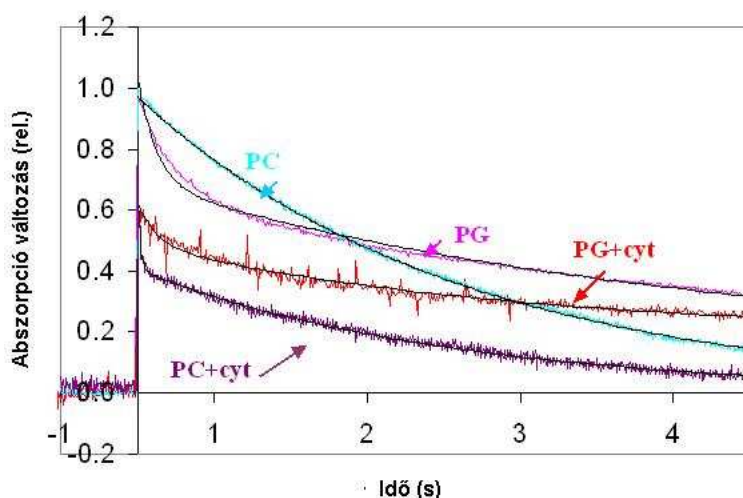
A RC a baktériumok intracitoplazmatikus membránrendszerében irányítottan helyezkedik el. Ez azt jelenti, hogy a primer donor az extracitoplazmatikus felszín felé, a kinon-akceptor rendszer az intracitoplazmatikus felszín felé tekint. A folyamatos töltésszétválasztást az extracitoplazmatikus térben levő vízőldékony c_2 típusú citokróm biztosítja. Ez az orientáció szükséges ahhoz, hogy a reakciócentrum a citokróm bc komplex-szel

együtt transzmembrán protongradienst hozzon létre a folyamatos működés során (vö. 1. ábra).

A mesterséges lipidmembránba azonban a RC véletlenszerű irányítottsággal épül be. Ez a random orientáció nem teszi lehetővé protongradiens kiépülését, tehát valamilyen módon egyirányúvá kell tennünk az elektrontranszportot. Ennek egy lehetséges módja az, hogy a már elkészített liposzómákhoz citokrómot adunk. Mivel a citokróm számára a membrán nem átjárható, csak azokkal a RC-okkal reagál, amelyek megfelelő irányba néznek, vagyis a primer donorjuk a külső felszín felé fordul.

Ellenőrizhető ez a tény a fényindukált abszorpcióváltozás mérésével. A 15. ábra azt mutatja, hogy citokróm jelenlétében a gerjesztés után keletkező oxidált primer donor (P^+) gyorsan redukálódik (a citokróm redukálja), és ezt követi egy lassú (másodperces időtartományba eső) töltésrekombinálódás. A töltésrekombinálódás komponense a citokróm nélküli minta kb. felét teszi ki mind a PC, mind a PG rendszerben. Jellemzően a PC-ban ez kb. 40 %, a PG-ban 60 %. A biexponenciális analízis adatait az 1. táblázatban mutatom be.

Mindegyik kinetikai görbében megtalálható egy kb. 120 ms-os komponens, ami az LDAO detergensmicellákban is jelentkezik. Ez a komponens a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció folyamatával azonosítható, és csak nagyon kevésbé változik a kísérleti körülményekkel. A lassú komponens, ami az LDAO detergensben 0.8 – 1 s körüli érték szokott lenni, a foszfatidil liposzómákban 2.05 – 3.6 s között mutatkozott. PG-ban mértük a hosszabb élettartamokat. Mivel a lassú komponens gyakorlatilag a $P^+Q_AQ_B^- \rightarrow PQ_AQ_B$ töltésrekombináció eredménye, a hosszabb élettartam mindenképpen stabilabb töltésszeválasztott állapotot jelent. Sőt, a PG alapú liposzómák esetén, mindkét mintában, csak egy konstans bevezetésével sikerült maradék nélkül a görbék analízise. Nagyon valószínű, hogy azért, mert ezekben a mintákban egy hosszú élettartamú szemikínonforma keletkezik, ami a mi időskálánkon konstansként jelentkezik.



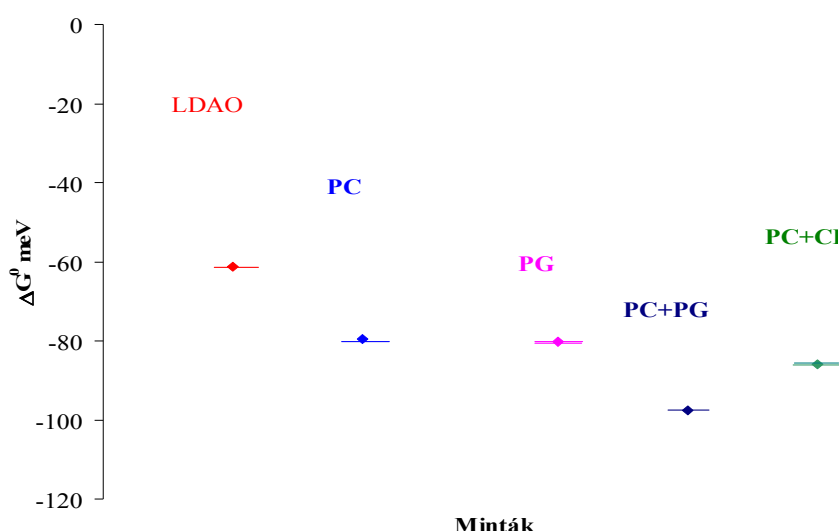
15. ábra A PC és PG liposzómákba beépített fotoszintetikus RC fényindukált abszorpcióváltozása citokróm jelenlétében és nélküle. A folytonos vonallal kihúzott görbéket a 1. táblázatban összefoglalt kinetikai paraméterek alapján számoltuk. Mérési körülmények: puffer: 10 mM foszfátpuffer, 5 mM KCl, pH: 6.8; [RC]: 3 μ M; hullámhossz: 430 nm.

	A_{BP}^0 (%)	k_{BP} (s^{-1})	A_{AP}^0 (%)	k_{AP} (s^{-1})	$\Delta G_{QA-QB \rightarrow QAQB}^0$ (meV)
LDAO	93,1	0,8	6,9	10,0	-62
PC	98,0	0,4	2,0	8,3	-77
PC+cyt	40,3	0,5	1,1	8,3	
PG	71,0	0,1	29,0	4,0	-89
PG+cyt	41,6	0,1	21,0	3,7	

1. táblázat: A *Rb.sp.* R-26-ből izolált RC-ok 603 nm-nél mért fényindukált abszorpcióváltozásának kinetikai paraméterei az LDAO detergens, PC és PG liposzóma rendszerekben. (15. ábra). A_{AP}^0 és A_{BP}^0 abszorpció változás jelének gyors és lassú fázisának relatív kiinduló amplitúdói. k_{AP} és k_{BP} az indexben megadott fázishoz tartozó sebességi állandó. $\Delta G_{QA-QB \rightarrow QAQB}^0$ kiszámolásának módja megtalálható az „Anyagok és módszerek” fejezetben.

Jól látható, hogy a töltésstabilizálódás a lipid/RC-ben mindenképpen nagyobb, mint a detergensben. A PG-ban jelentős stabilizálódás érhető el, igen közeli az *in vivo* rendszerben mérhető kb. -95 meV-os energiaszinthez (Nagy és mtsai., 1999). Terbutrin hozzáadásával minden esetben a gyors komponens részesedése jelentősen megnő, citokróm hozzáadásával pedig a detergensben mért jelnek a PC-ben és PG-ben kb. 50 %-át tapasztalhatjuk.

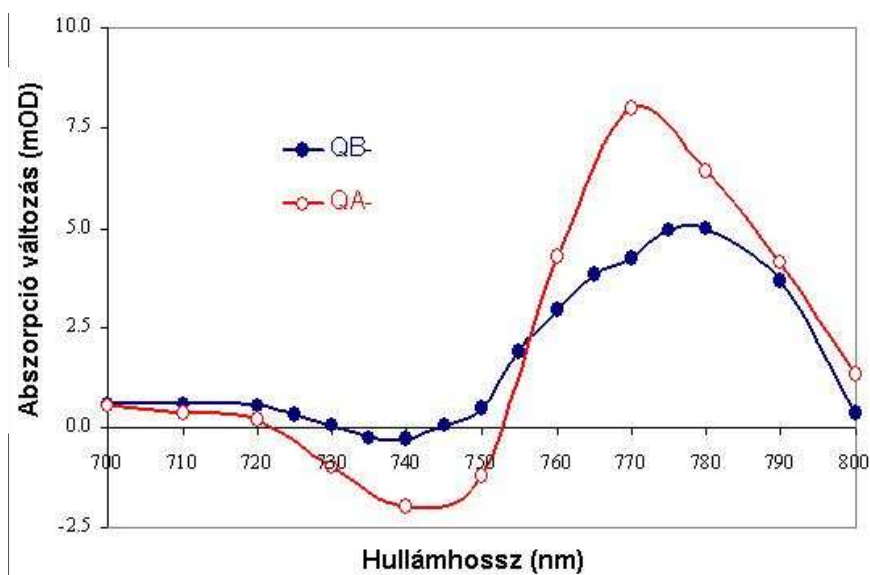
A különböző rendszerekben meghatározott ΔG_{AB}^0 értékeket a 16. ábrán foglaljuk össze. Méréseink szerint mindegyik vezikuláris rendszerben magasabb a Q_B^- középponti potenciálja (nagyobb a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszport szabadenergiaváltozása), mint az LDAO detergensben. Az irodalomban, a CL különleges szerepét írták le (Rinyu és mtsai., 2004), de vizsgálataink szerint PC/PG kevert lipidekből álló vezikulákban nagyobb a töltésstabilizálódás mértéke, mint akár a PC/CL vezikulákban is. Az előbbi rendszerben ez az érték gyakorlatilag megegyezik az *in vivo* membránban mért stabilizációs energiával.



16. ábra A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszport ΔG_{AB}^0 szabadenergiaváltozása az LDAO detergens és különböző vezikuláris rendszerekben (a jelölés szerint). A ΔG_{AB}^0 szabadenergiakülönbséget a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció paramétereiből számoltuk, az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint.

A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer vizsgálatának egyik lehetséges módja a BPheo abszorpció elektrokróm eltolódásának vizsgálata a közeli infravörös tartományban. Itt a RC jellegzetes abszorpcióváltozást mutat attól függően, hogy a töltéspár a primer, vagy a szekunder kinonon csapdázódik. Ezt a Q_B/Q_B^- illetve Q_A/Q_A^- differenciaspektrumot mutatjuk be a 17. ábrán. A mérési körülményeket az „Anyagok és módszerek” részben mutatom be. Az ábrán megfigyelhető egyrészt az, hogy a Q_B/Q_B^- izoszbesztikus pontja a Q_A/Q_A^- -hez képest a nagyobb energiák (kék tartomány) felé tolódik el, másrészt, az

abszorpcióváltozás mértéke a Q_B/Q_B^- esetén kisebb. Ha tehát az elektron a $Q_A^-Q_B$ rendszerről a $Q_AQ_B^-$ rendszerre kerül, jól mérhető abszorpcióváltozást tapasztalhatunk. Mi a 771 nm-nél mérhető abszorpciós maximumot választottuk a kísérleteinkben.



17. ábra A PC liposzómába ágyazott RC Q_B/Q_B^- és Q_A/Q_A^- abszorpciójának differenciaspektruma a közeli infravörös tartományban. Mérési körülmények: puffer: 10 mM foszfátpuffer, 5 mM KCl, pH: 6.8; [RC]: 3 μ M; [ferrocén]: 100 μ M; a Q_A^- méréséhez 400 μ M terbutrint adtunk a mintához.

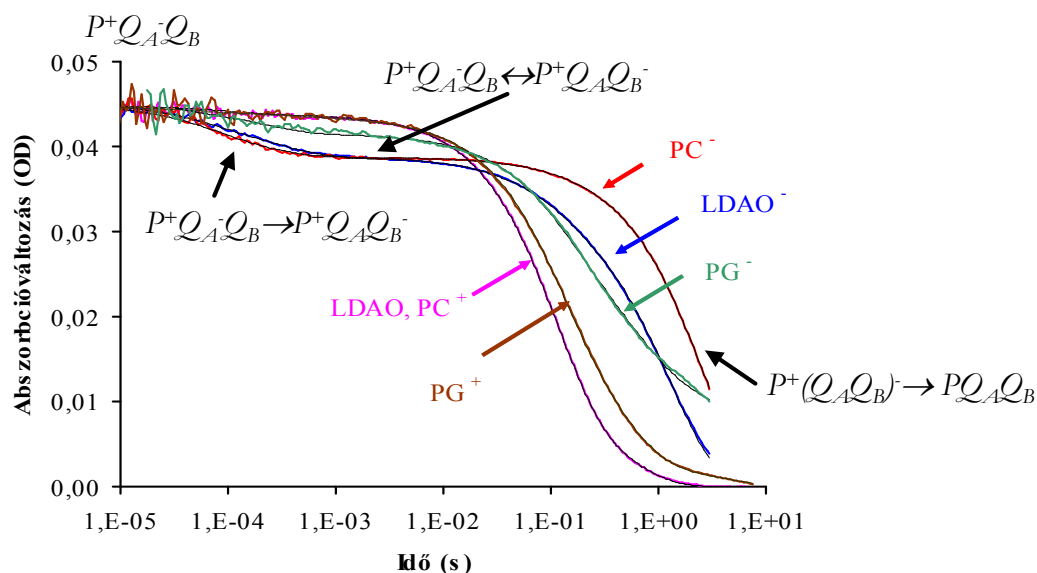
A 18. ábrán a fotoszintetikus RC 771 nm-nél mért fényindukált abszorpcióváltozását mutatjuk be a BPheo abszorpciójának elektrokróm eltolódása alapján. A RC-okat LDAO detergensmicellákba illetve PC és PG liposzómákba ültettük be. Az időskála hat nagyságrendet ölel fel.

A 18. ábra alapján ebben a hat nagyságrendet felölelő időskálában ($10^{-5} \rightarrow 10$ s) az abszorpcióváltozás kinetikai görbéi két fő fázisból, egy gyors és egy lassú fázisból állnak. A gyorsabb fázis a szubmikroszekundumtól a néhány száz mikroszekundumig, a lassabb a néhány tíz milliszekundumtól a néhány szekundumig tartó szakasz. Mindkét fázis további gyors és lassú tartományra osztható. A szubmilliszekundumos szakasz a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ előremenő elektrontranszportra, míg a milliszekundum/szekundumos tartomány a $P^+(Q_AQ_B)^- \rightarrow PQ_AQ_B$ töltésrekombinációra jellemző.

A 18. ábra az LDAO detergensmicellába, PC és PG vezikulákba ágyazott RC-ok abszorpcióváltozását tartalmazza terbutrin (a Q_B oldal kompetitív gátlószere) jelenlétében (+) és anélkül (-). A négy komponensnek megfelelően exponenciális illesztéseket végeztem, melynek kiszámolása megtalálható az „Anyagok és módszerek” fejezetben. Az illesztett görbékét a folytonos vonal jelzi.

$$N(t) = N_{AB(1)} \cdot e^{-k_{AB(1)}t} + N_{AB(2)} \cdot e^{-k_{AB(2)}t} + N_{AP} \cdot e^{-k_{AP}t} + N_{BP} \cdot e^{-k_{BP}t} \quad (2)$$

Itt $N_{AB(1)}$ és $N_{AB(2)}$ az előremenő elektrontranszport komponenseihez tartozó abszorpcióváltozás amplitúdói a $t = 0$ időpontban, $k_{AB(1)}$ és $k_{AB(2)}$ ugyanezen komponensek sebességi állandói. N_{AP} és N_{BP} a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ és $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltésrekombinációs folyamatokhoz rendelhető abszorpcióváltozás-komponensek amplitúdói, k_{AP} és k_{BP} ugyanezek sebességi állandói.



18. ábra LDAO detergensbe, PC illetve PG liposzómába ültetett RC-ok 771 nm-nél mért fényindukált abszorpcióváltozása. A Q_B kötőhely blokkolása érdekében az LDAO és a PC mintákhoz 100 μ M, a PG mintához 400 μ M terbutrint adtunk („+”: kezelt, „-”: kezeletlen). A folytonos vonallal meghúzott görbékét a 2-es táblázatban összefoglalt paraméterek alapján számoltuk. Gerjesztés: 597 nm; Puffer: 10 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH: 8,0 (LDAO) és 5 mM foszfát, 5 mM KCl, pH: 6,8 (PC,PG).

Az exponenciális illesztés paramétereit a 2. táblázatban foglaltam össze. Megállapíthatjuk, hogy a leggyorsabb, az intrinsic elektrontranszfer komponens sebessége nem különbözik lényegesen a detergens és lipid rendszerekben (a 2. táblázat első és második oszlopa). A bemutatott sebességi állandók 60 μ s körüli időállandókat jelentenek. Nagyobb a változás a fehérje konformációs mozgásaiban. Az LDAO detergensben mérhető reakciósebességhez képest (a 2. táblázat harmadik és negyedik oszlopa) a PC vezikulákban nőtt, míg a PG vezikulákban jelentősen csökkent a reakciósebesség.

A négy oszlop a töltésrekombinációra jellemző paramétereket mutatja. A $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ rekombináció sebessége lényegében nem változott, ha a RC-ot az LDAO detergens helyett PC liposzómába ágyasztuk ($k_{AP} = 9.3 \text{ s}^{-1}$, ami 107 ms körüli időállandónak felel meg). A PG liposzómában ez a töltésrekombináció sokkal lassabb, $k_{AP} = 4.9 \text{ s}^{-1}$, ez megfelel kb. 200 ms időállandónak). A másodlagos kinonról történő $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltésrekombinációs folyamatok mind a PC, mind a PG vezikulákban jelentősen lassultak. A detergensben tipikusnak mondható kb. 1,3 s-ról 2,6 s-ra nőtt PC-ban, és 4 s fölé PG-ban. (Megjegyzem, hogy PG-ban a leglassabb komponens valójában még ennél is lassabbnak adódik, az általunk alkalmazott időablakban nem láttuk a lecsengési kinetikák végét, így az exponenciális bontás itt pontatlanabb.)

A 18. ábrán az is látszik, hogy a Q_B -oldalt blokkoló herbiciddel, terbutrinnal, a detergensben és PC liposzómában gyakorlatilag teljesen gátolni tudtuk az elektrontranszportot, míg PG-ban még igen magas koncentrációban is maradt jelentős Q_B -aktivitás.

5.2.1.2. Anionos lipidek (PG és CL) hatásai PC mátrixban

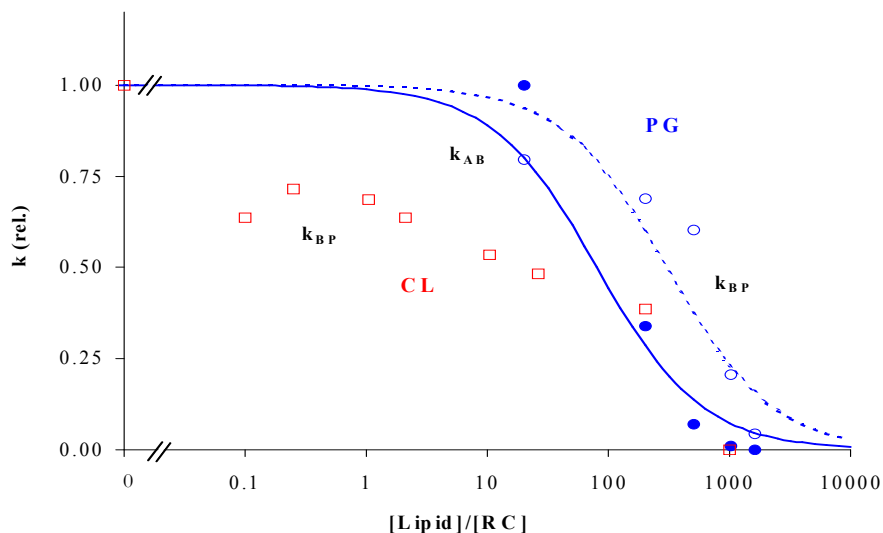
Detergens micellákban ágyazott reakciócentrumokban az elsődleges kinon energetikáját a hozzáadott PC nem változtatja meg, míg a CL növeli a Q_A/Q_A^- rendszer középponti potenciálját (az *in vivo* rendszerben mérhető irányába tolja el, (Rinyu és mtsai., 2004). Kíváncsiak voltunk arra, hogy PC vezikulákba ágyazott RC esetén milyen hatással van a vezikulákhoz adott PG (és CL) az interkinon elektrontranszport és a töltésrekombináció kinetikájára.

	$P^+(Q_A^-Q_B^-) \rightarrow P^+(Q_AQ_B^-)_1$		$P^+(Q_A^-Q_B^-) \rightarrow P^+(Q_AQ_B^-)_2$		$P^+(Q_A^-Q_B^-) \rightarrow P(Q_AQ_B^{2-})$		$P^+(Q_A^-Q_B^-) \rightarrow P(Q_AQ_B)^{2-}$	
	A (%)	$k_{AB}(1)$ (s ⁻¹)	A (%)	$k_{AB}(2)$ (s ⁻¹)	A (%)	k_{AP} (s ⁻¹)	A (%)	k_{BP} (s ⁻¹)
LDAO	5.7	16800	8.4	3100	11.9	9.3	73.9	0.77
PC	7.6	15500	6.2	4100	1.7	9.3	84.4	0.39
PG	6.0	16700	3.4	710	41.4	4.9	49.2	0.26

2. táblázat A 771 nm-él mért abszorpcióváltozás illesztési paramétereinek összefoglalása. A számolásokat a 15. ábrán bemutatott mért értékekre a fent ismertetett multiexponenciális modellt feltételezve végeztük. A(%) az adott komponens amplitúdóját jelenti a teljes jel maximumának százalékában, $k_{AB}(1)$, $k_{AB}(2)$, k_{AP} és k_{BP} az egyes komponensek sebességi állandói.

Ez azért is fontos információ, mert az *in vivo* membrán igen jelentős mennyiségben tartalmaz PC-t és PG-t. CL-et csak kisebb mennyiségben, de ennek a lipidnek a szerepe igazoltan igen jelentős. A 19. ábrán a PC intakt vezikulákba ágyazott RC-ok $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^-$ előremenő elektrontranszportjának, valamint a $P^+(Q_AQ_B)^- \rightarrow PQ_AQ_B$ töltésrekombináció sebességi állandóját láthatjuk növekvő PG és CL koncentráció esetén.

A titrálási görbék Michaelis-Menten típusú kinetikával többé-kevésbé jól leírhatók. Érdekes, hogy ugyanazon lipidféleség, a PG esetében más más koncentrációk alkalmazásával érhető el a kezdeti reakciósebesség fele. Úgy tűnik, hogy a töltésrekombináció ugyanolyan mértékű lassulásához nagyobb PG koncentráció szükséges a lipidvezikulában, mint az interkinon elektrontranszferhez. Az előbbi esetben kb. 300 PG/RC, míg az utóbbi esetben kb. 80 PG/RC arány esetén lehet a kezdeti reakciósebességet a felére csökkenteni. Az eltérő koncentrációviszonyok egy lehetséges magyarázata az lehet, hogy a töltésrekombináció mérésekor látszólagos elektronegyensúlyi állandót mérünk K_{AB}^{app} , hiszen a lassú kinon egyensúly miatt a kinonkicserélődés kinetikáját is hozzámérjük a töltésrekombináció kinetikájához. A nagyobb PG koncentráció feltehetően a kinonkicserélődés kinetikáját is befolyásolja.



19. ábra A fotoszintetikus RC-ok interkinon elektrontranszferjének k_{AB} (telt kör szimbólum) valamint töltésrekombinációjának k_{BP} (üres szimbólum) kinetikája a PG és a CL függvényében PC mátrixban. A sebességi állandókat a PC vezikulákban mérhető sebességi állandókhoz normáltuk, azokat egységnek tekintve. Folyamatos és szaggatott vonallal a Michaelis-Menten egyenlet alapján illesztett görbék láthatók.

Bár a dolgozatomnak nem a CL a fő témája, megjegyzem, hogy végeztünk méréseket CL-el is. A titrálási görbe sokkal összetettebb. Úgy tűnik, hogy van egy kezdeti, nagyon erős kötődés a CL és a RC között, és egy nagyobb koncentrációhoz tartozó gyengébb kötődés. A jelenség további vizsgálatokat igényel.

5.2.2. Többszörös töltésszétválasztás

5.2.2.1. $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$ elektrontranszport

In vivo membránban a gerjesztés után a RC-ot egy másodlagos donor redukálja, így az alkalmassá válik újabb fotonnal egy újabb töltésszétválasztásra. De csak azok a RC-ok reagálnak az újabb gerjesztés után amelyekben az elsődleges kinon, Q_A , oxidált állapotban van, mert a Q_A csak egyetlen elektron fogadására képes. Az első gerjesztés után redukált Q_A az elektronját a Q_B -re

továbbítja, majd a második gerjesztés után szintén, így kétszeresen redukált Q_B keletkezik (Q_B^{2-}), ami két proton megkötése után (Q_BH_2) leválik a RC-ról. *In vivo* rendszerben a másodlagos donor valamilyen citokrómmolekula, *in vitro* is lehet citokróm, de egyéb mesterséges donorféleségek is ismertek.

Ha mesterséges donor jelenlétében a RC abszorpcióváltozását 450 nm-nél második gerjesztés után vizsgáljuk, akkor nyomon követhetjük az elektronnak a redukált Q_A -ról a már redukált Q_B -re kerülését ($Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$, második elektrontranszport). Erre azért van lehetőség, mert az egyszeresen redukáltkinonnak (szemikinonnak) ezen a hullámhosszon jellemző abszorpciója van, míg a kétszeresen redukált kinonnak (dihidrokinon, vagy kinol) nincs.

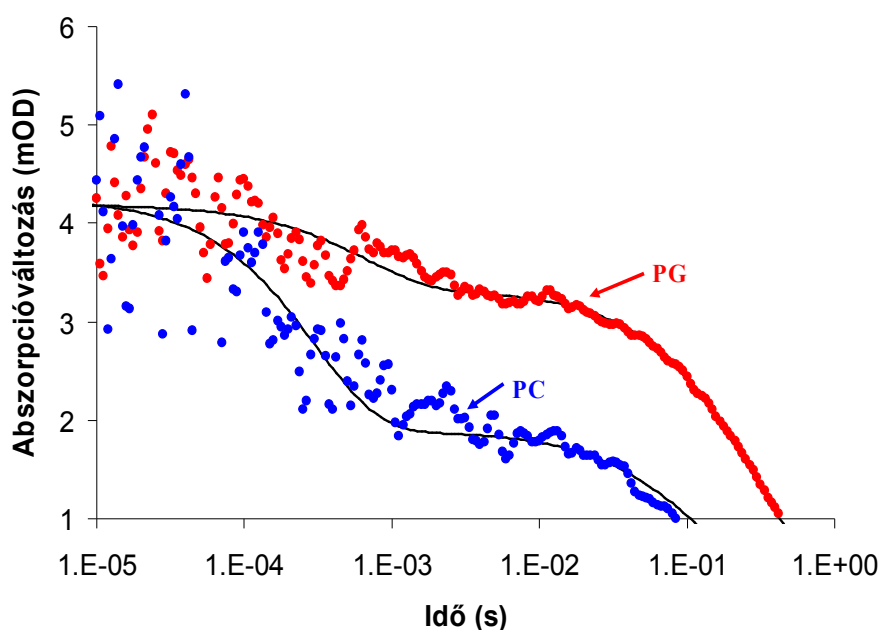
A 20. ábrán a PC és PG vezikulákba ágyazott RC-ok fényindukált abszorpcióváltozását mutatjuk be citokróm donor jelenlétében a második gerjesztés után. A második impulzus 1 s-mal az első után érkezett. Láthatjuk, hogy az abszorpcióváltozás a mOD nagyságrendbe esik. Mind a PG, mind a PC vezikulák esetében összetett az abszorpcióváltozás kinetikája. Van egy gyorsabb szubmilliszekundumos változás, és egy lassabb, szekundum körüli változás. Mivel a citokróm az általunk is alkalmazott alacsony ionerősségű mintában mikroszekundumos időállandóval redukálja a primer donort, az ebbe az időtartamba eső komponenst csak egy gyors abszorpciónövekedésként látjuk az ábrán. A szubmilliszekundumos gyors komponens felel meg a $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$ elektrontranszportnak. A szekundum körüli lassabb komponens valójában a már fentebb leírt $P^+(Q_AQ_B)^- \rightarrow PQ_AQ_B$ töltésrekombináció eredménye. Ezt a komponenst azért látjuk, mert a RC-ok vezikulába való beépülése teljesen véletlenszerű. Kb. 50%-uk fordul az extravezikuláris tér felé, és 50%-uk ellentétes irányultságú. Mivel a citokróm nem jut át a membránon, a RC-oknak csak a fele reagál ezzel a donorról. Azokban a RC-okban, amelyekben a citokróm redukálta a primer donort a gerjesztés után láthatjuk a szubmikroszekundumos fázisú második elektrontranszfert, a többiben a töltésrekombináció P^+ jelét látjuk. Jól egyezik ezzel az elképzeléssel a mi megfigyelésünk is, hiszen a RC-ok nagyjából a fele mutatja a P^+ jelet (20. ábra).

A PG-ban a folyamat bonyolultabb. A P^+ jel nagyobbak adódik, kb. 80%. Ez vagy azt jelenti, hogy más a RC-ok orientációja ebben a vezikulában

(kevesebb RC néz az extravezikuláris tér felé), vagy a RC-ok citokróm-hoz való hozzáférhetősége változott meg a detergenshez, vagy a vezikulához képest.

A második elektrontranszfer sebessége mindkét lipidben nagyobb a detergensben mérthez képest. LDAO-ban 740 s^{-1} , PC-ben 3300 s^{-1} , PG-ben 1500 s^{-1} -nek adódott.

Láthatjuk, hogy PC-ban nagyobb a második elektrontraszport sebessége (jól egyezik ez az irodalomban látható értékekkel, (Nagy és mtsai., 1999; Taly és mtsai., 2002)). PG-ban is nagyjából megkétszereződött a reakciósebesség, de messze nem éri el a PC-ban mérhető értéket. Érdeemes megjegyezni, hogy a második elektrontranszfer sebessége az *in vivo* membránból kivont lipidekből készített vezikulákban 1250 s^{-1} , ami inkább a PG-ben mért értékhez van közelebb (Nagy és mtsai., 1999). Ennek lehetősége nem elhanyagolható, hiszen a PG pozitív, a PC negatív töltésű lipid.



20. ábra A PC és PG vezikulákba ágyazott RC-ok fény indukált abszorpcióváltozása citokróm donor jelenlétében a második gerjesztés után. A mérési körülmények megegyeznek a 15. ábra szövegében leírtakkal, kivéve: $40\text{ }\mu\text{M}$ citokrómot adtunk a mintához; a mérés hullámhossza: 450 nm volt.

5.2.2.2. Az elektrontranszfer többszörös gerjesztés után (A szemikininon keletkezésének és eltűnésének bináris oszcillációja)

A RC töltésrekombinációs kinetikájának vizsgálatából arra következtethetünk, hogy a PG jelentősen befolyásolja a kinonegyensúly kinetikáját és egyensúlyát. A kötött/nemkötött kinon arány vizsgálatára a szemikininon keletkezésének és eltűnésének mérését választottam ismétlődő gerjesztés után, másodlagos donor jelenlétében. Összehasonlításképpen bemutatom az LDAO detergensben és a sejtekből kivont összes lipidből készült vezikuláris rendszerben mért adatokat is, amelyeket az irodalomból (Nagy és mtsai., 1999) vettünk.

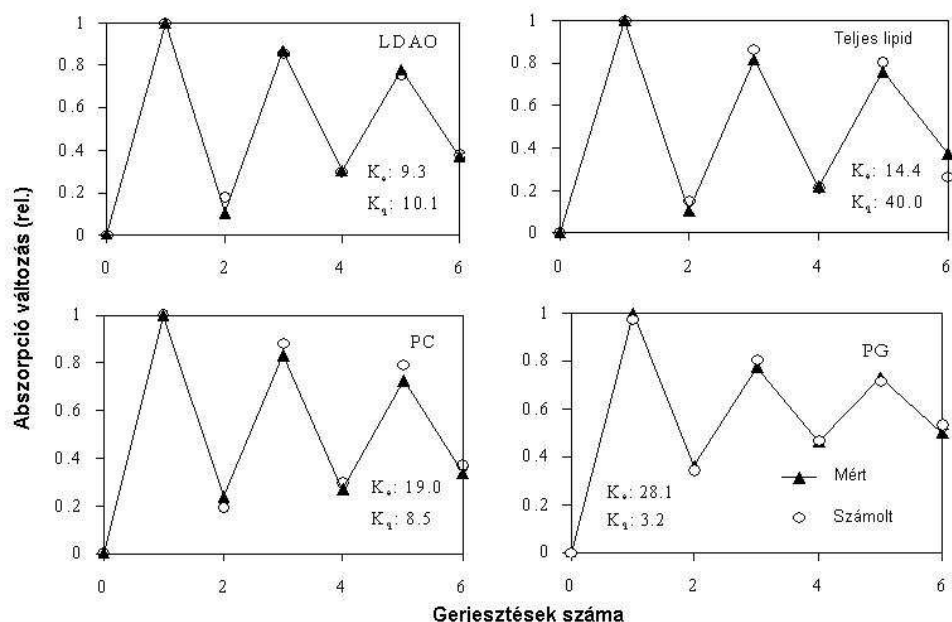
A 21. ábra azt mutatja, hogy az LDAO-ban, a sejtekből kivont összes lipidben, valamint a PC-ban az oszcilláció csillapodása kisebb a PG-ban mérthez képest. A PG-ban nem csak az oszcilláció csillapodása nagyobb, hanem az egyensúlyi szint is valamivel magasabb, mint az első gerjesztés után mérhető amplitúdó fele.

A szemikininon keletkezésének és eltűnésének bináris oszcillációja lényegében két paraméterrel a K_e elektronegyensúlyi ($K_e = [Q_A Q_B^-] / [Q_A^- Q_B]$) és K_q kinonegyensúlyi állandóval ($K_q = [Q_A Q_B] / [Q_A \dots] = [Q_A^- Q_B] / [Q_A^- \dots]$) kielégítően leírható (Tandori és mtsai., 1991; Nagy és mtsai., 1999; Halmschlager és mtsai., 2002). Itt $[Q_A \dots]$ és $[Q_A^- \dots]$ azt a RC-populációt jelenti, amelyben a másodlagos kinon kötőhelye aktív maradt, de az a gerjesztés időpontjában időlegesen üres.

A K_e és K_q egyensúlyi állandók felhasználásával a keletkező szemikininon koncentrációja az „m”-edik fényimpulzus után kiszámolható, így az oszcilláció maga jól modellezhető (Tandori és mtsai., 1991; Halmschlager és mtsai., 2002). A 21. ábra a mért (telt szimbólumok) és a számított (üres szimbólumok) értékeket is bemutatja.

Az oszcillációk analízise azt mutatja, hogy a K_e elektronegyensúlyi állandó mindegyik esetben igen nagy. Igaz a K_e az LDAO $\rightarrow$ összes lipid $\rightarrow$ PC $\rightarrow$ PG irányba növekszik, a csillapodás mértéke mégsem magyarázható az elektronegyensúly megváltozásával (mert az már az LDAO detergensben is igen nagyra mondható. A K_q változása nem mutatja ezt a tendenciát, de igen

kicsinek mutatkozik a PG-ban. Ez azt mutatja, hogy a $K_q = [Q_A Q_B]/[Q_A \dots] = [Q_A^- Q_B]/[Q_A^- \dots]$ egyenlet szerint a Q_B -t tartalmazó reakciócentrumok aránya a PG-ban igen kicsi. Ez igen érdekes, ha meggondoljuk, hogy a töltérekombináció élettartama igen nagy. Feltételezhető azonban, hogy a lassú kinonegyensúly miatt hosszú élettartamú szemikinsonformák keletkeznek, többek között valószínűleg a Q_A^- is.



21. ábra A PC-ből, PG-ből és a kromatoforákból kivont összes lipidből készített liposzómákba és LDAO detergensmicellákba ágyazott RC-ok 450 nm-nél mért abszorpcióváltozása sorozatos-gerjesztés után. Az abszorpcióváltozás bináris oszcillációja a szemikinsonok keletkezésével/eltűnésével magyarázható. Az elektron és kinon egyensúlyi állandókat, K_e és K_q , valamint a Q_B^- -inaktív RC-ok (Q_A^-) arányát is feltüntettük. Mérési körülmények: megegyezőek a 18. ábra szövegében leírtakkal LDAO micellákra és liposzómákra nézve. Gerjesztési frekvencia: 1 Hz LDAO és PC esetén, 0,2 Hz PG esetében. Mindegyik rendszerhez másodlagos donorként 100 μ M ferrocént adtunk. Az összes lipidre és az LDAO mintákra vonatkozó adatokat az irodalomból vettük (Nagy és mtsai., 1999).

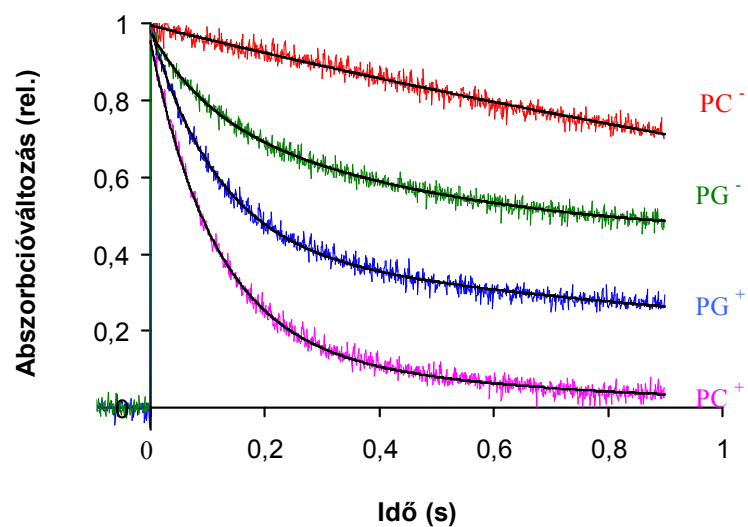
5.2.3. Inhibítorok hatása lipid környezetben

Jól ismert, hogy bizonyos vegyületek a másodlagos kinonnal kompetícióban lehetnek a RC Q_B -kötőhelyéért. Ezek a gátlószerek redoxaktivitást nem mutatnak, ezért a Q_B -helyre kötődve gátolják az elektrontranszportot. A mezőgazdaságban sokáig alkalmazták e vegyületeket gyomirtószerekként. A legismertebbek, és bakteriális rendszerekben is hatékonyak a triazinvegyületek, közöttük is az atrazin és a terbutrin. Megjegyzem, hogy ma már Magyarországon (és az Európai Unióban is) ezek a vegyületek tiltólistán vannak, feltehetően onkogén hatásúak, de az Egyesült Államokban és Kínában igen népszerűek még.

A terbutrin I_{50} -értéke (vagyis az a koncentráció, amely 50 %-os gátlást okoz) $2\text{ }\mu\text{M}$ körül van, ami azt jelenti, hogy kb. $50\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ koncentrációban az elektrontranszportnak majdnem 100 %-os gátlását lehet előidézni vele. Ilyen koncentrációban alkalmazva gyakorlatilag teljes gátlást okoz a PC vezikulákban is. Érdekes, hogy PG-vezikulákban még jóval nagyobb koncentrációban sem gátolja teljesen az elektrontranszportot. A 22. ábrán bemutatott abszorpcióváltozásokat PC esetében $100\text{ }\mu\text{M}$, PG esetében $400\text{ }\mu\text{M}$ terbutrin jelenlétében mértük. Vizes oldatban a terbutrin oldhatóságának felső határa $400\text{ }\mu\text{M}$. Azt hogy ennek a csökkent gátlásnak mi lehet az oka jelenleg nem tudjuk. További vizsgálat tárgyát képezheti, hogy ez egyszerűen csak oldhatósági kérdés, a vizes és lipidfázis közötti megoszlás kérdése, vagy a RC-szerkezet PG környezetbeni megváltozásának tulajdonítható.

A 3. táblázatban összefoglaltuk az egyes komponensekhez (LDAO detergens, PC és PG vezikuláris rendszer) tartozó, 603 nm -nél mért kinetikai paramétereket. Ebben az időtartományban csak a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ és $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltésrekombinációs folyamatokhoz rendelhető abszorpcióváltozás-komponensek láthatók, amelyek lényegében megegyeznek a 15. ábrán bemutatottakkal.

Kristályszerkezeti adatok igazolják, hogy a fotoszintetikus RC-hoz különböző nem redoxaktív kofaktorok így lipidek is kapcsolódnak (McAuley és mtsai., 1999; Wakeham és mtsai., 2001; Camara-Artigas és mtsai., 2002).

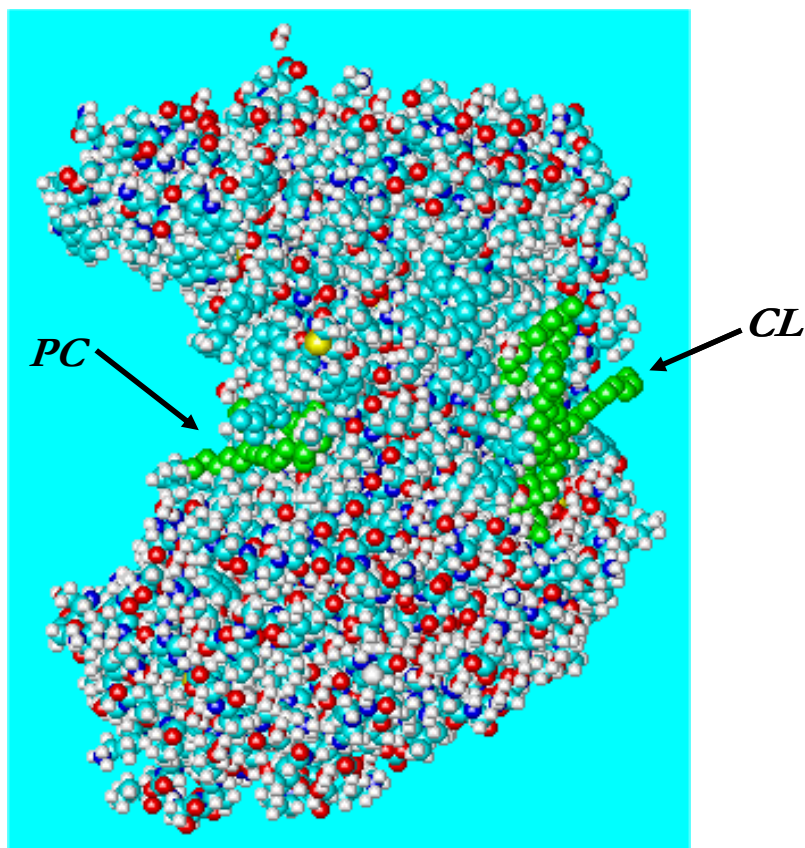


22. ábra *Rb. sphaeroides* R-26-ból nyert, PC és PG vezikulákba ágyazott RC-ok fény indukált abszorpcióváltozása 603 nm-nél, terbutrin jelenlétében (+), illetve anélkül (-). A folyamatos vonalak a számolt görbéket mutatják. A mérési feltételek megegyeznek a 18. ábra szövegében leírtakkal, kivéve: a PC illetve PG liposzómákhoz 100 μ M illetve 400 μ M terbutrint adtunk. 603-nm-nél a primer donor redoxállapotát figyelhetjük meg. Mivel ezen a hullámhosszon a RC extinkciós együtthatója negatív, a görbéket a jobb áttekinthetőség miatt ellentétes előjellel ábrázoltam.

	$N_1^0(\%)$	k_{BP}	$N_2^0(\%)$	k_{AP}	ΔG^0 (meV)
LDAO	93.1	0.90	6.9	10.0	-60.2
LDAO+terb	5.0	0.90	95.0	10.0	
PC	98.0	0.38	2.0	8.3	-76.9
PC+cyt.	40.3	0.49	1.1	8.3	
PC+terb.	12.1	1.33	83.4	8.3	
PG	71.0	0.13	29.0	4.0	-88.5
PG+cyt.	41.6	0.12	21.0	3.7	
PG+terb.	30.0	0.12	66.0	6.25	

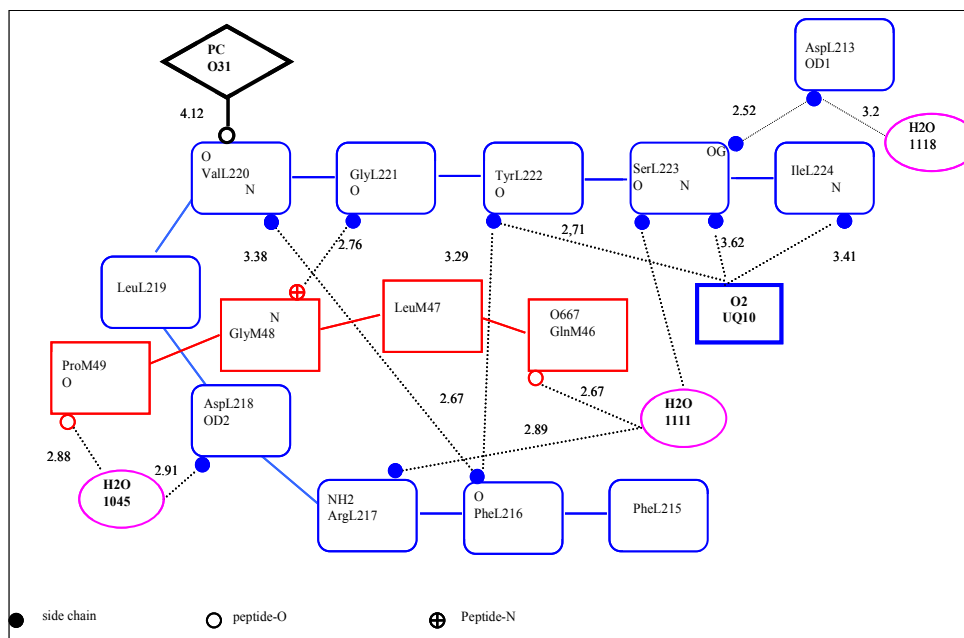
3. táblázat A *Rb. sphaeroides* R-26-ból izolált RC-ok 603 nm-nél mért fényindukált abszorpcióváltozásának kinetikai paraméterei az LDAO detergens, PC és PG liposzóma rendszerekben. Feltüntettem a kinetikai paraméterekből számolt töltésszabályozási energiaértékeket is.

A 23. ábrán az általam is vizsgált PC és CL helyzetét mutatom be a kristályszerkezeti adatok alapján. A PG-ra vonatkozóan nincsenek kristályszerkezeti adatok, de a funkcionális vizsgálatok alapján valószínűsíthetjük, hogy a RC kinonakceptor komplexéhez közel helyezkedhet el. Kötődése a CL kötődéséhez hasonló módon történhet. Foszfátcsoportjai a RC pozitív potenciálú felszíneihez kötődhetnek, míg az apoláros szénhidrogénlánc a membrán apoláros régiójába merül. Kísérleti tény, hogy az izolált reakciócentrumhoz adott CL megváltoztatja mind a Q_A , mind pedig a Q_B középponti redoxpotenciálját. Ez pedig vagy azzal magyarázható, hogy a CL kötőhelye a preparálás után nem telített (vagyis maradnak szabad kötőhelyek), vagy azzal, hogy egyéb, a kristályszerkezetben nem látható, ezért feltehetően gyengébb (vagy nem olyan jól definiált) kötőhelyei is léteznek. A PG esetében hasonló jelenségekre gondolhatunk, igaz a kristályszerkezetekben eddig még nem mutatták ki. A 23. ábrán az is látható, hogy a CL és a PC a RC nagyjából ellentétes oldalain található, egymástól elég távol, a felszínhez kötődve.



23. ábra A PC és a CL helyzete a *Rb. sphaeroides* R-26 RC-ában a kristályszerkezeti kép alapján. Ebben az ábrázolásban a különböző színek jelentése a következő: fehér - hidrogén, világoskék – szén, piros – oxigén, sötétkék – nitrogén. Zöld színnel a PC- és CL-molekulákat jelöltem. Az ábrát HyperChem 7.0 programmal készítettük a brookhaveni Protein Data Bank-ból (www.rcsb.org) letöltött fájl alapján. A fájl kódja: (1M3X).

A PC környezetének lehetséges kölcsönhatásait mutatom be a 24. ábrán. Az ábra a fehérje Q_B -környezetének hidrogénkötésrendszerét mutatja be vázlatosan. Kékkel az L-alegység D (transzmembrán) és a membránnal párhuzamos hélicei közötti, pirossal az M-alegység N-terminusához közeli nem-hélix szekvenciáját mutatom be. A hélixek közötti kölcsönhatások között a H-kötések gyakorlatilag nem jöhetnek számításba, annál fontosabbak viszont a nem-helikális szakaszok esetében. Ezek a szakaszok azonban igen érzékenyek a környezeti tényezők megváltozására. A kiterjedt hidrogénkötésrendszer pedig azt eredményezi, hogy a rendszer bármely pontján bekövetkező változás hatására az egész hidrogénkötésrendszer megváltozik. Mivel a hidrogénkötésrendszer a Q_B -t és a Q_A -t is egységes kinonakceptor komplex-szé formálja (a környező aminosavakkal együtt), akár a Q_A , akár a Q_B környezetében történik változás, az kihat a másik rendszerre is.



24. ábra A Q_B-oldal és a PC körüli aminosavak közötti kölcsönhatások lehetséges rendszere a *Rb. sphaeroides* R-26 RC-ában. Pirossal az L-, késsel az M-alegység megfelelő szekvenciáját jelöltem. Folytonos vonallal a kovalens (peptid-) kötések, szaggatott vonallal a hidrogénkötéseket mutatom be. Az ábrát HyperChem 7.0 programmal készítettük a PDB 1M3X fájl alapján.

A PC kötődésére vonatkozóan rendelkezésünkre állnak kristályszerkezeti adatok (PDB, www.rcsb.org, 1M3X), így a kölcsönhatások rendszere viszonylag jól jellemezhető. A PC igen közel helyezkedik el az L-alegység L220-as pozícióban levő valinhoz, amely része lehet az itt említett kiterjedt hidrogénkötésrendszernek. A PG esetében nincsenek ilyen adataink, de a spektroszkópai adatok alapján valószínűsíthető, hogy az is a kinonakceptor komplex közelében kötődhet a RC felszínéhez.

5.3. A töltéssztabilizálódás termodinamikai jellemzése

A kinonállapotok közötti standard szabadentalpiakülönbségek meghatározhatók az egyensúlyi állandó hőmérséklet függésének van't Hoff típusú ábrázolása meredekségéből:

$$\frac{d(\ln K_{AB})}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (3)$$

Az interkinon elektrontranszportoz tartozó aktivációs termodinamikai paraméterek meghatározhatók az Eyring egyenletből:

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{\kappa \cdot R}{h} + \frac{\Delta S^\#}{R} - \frac{\Delta H^\#}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (4)$$

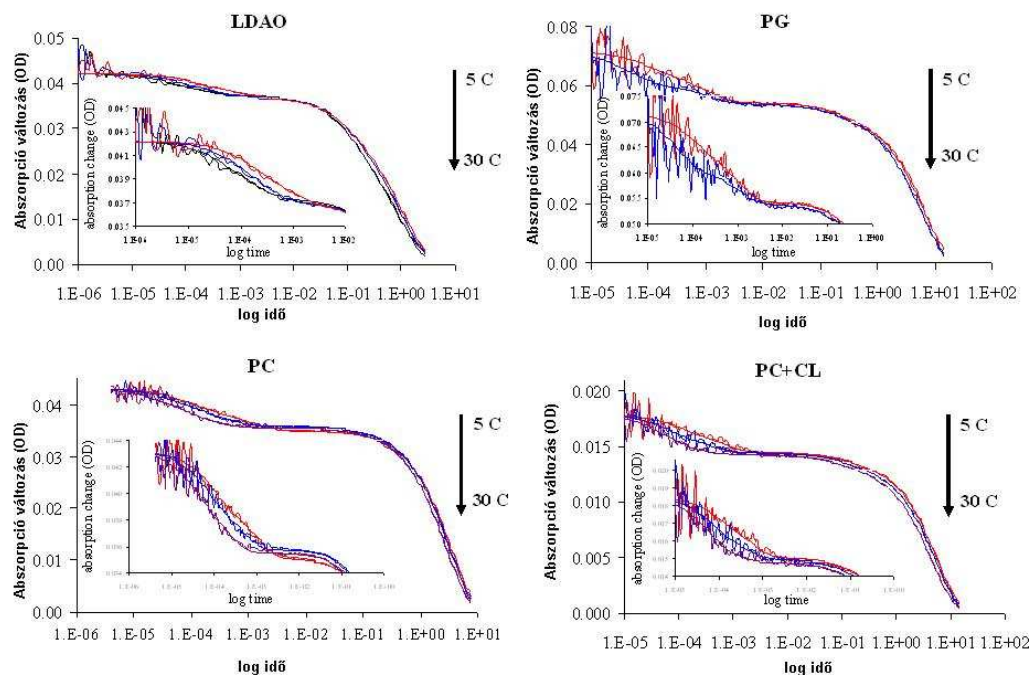
ahol a k a meghatározott sebességi állandó, κ az átviteli együttható (a mi esetünkben általában egynek tekintjük (Mancino és mtsai., 1984)), h a Planck állandó, R az egyetemes gázállandó és $\Delta H^\#$ és $\Delta S^\#$ az aktivációs entalpia és entrópia változások. $\Delta H^\#$ kiszámolható a meredekségből, a $\Delta S^\#$ meghatározható a mért adatokra legjobban illeszkedő egyenesből.

A 25. ábra az LDAO detergensbe, PC, PG valamint PC/CL (1:1 molarány) liposzómába ágyazott *Rb. sphaeroides* RC-ok 771 nm-en mért abszorpcióváltozását mutatja a hőmérséklet függvényében. Ezen a hullámhosszon a BPheo abszorpcióváltozásának elektrokróm eltolódását mérhetjük, amit a kromofór fehérjekörnyezetében bekövetkező töltéskompensáló proteinrelaxációs folyamatok okoznak (Tiede és mtsai., 1996). Az időablak nagyon széles (6 nagyságrend), így mind az előremenő $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer (illetve a hozzákapcsolódó relaxációs folyamatok), mind pedig a $P^+(Q_AQ_B)^- \rightarrow PQ_AQ_B$ töltésszinkronizáció követhető egyetlen, logaritmikus időskálán. Mindegyik görbe két jól elkülöníthető kinetikai komponensre bontható. Az első szakasz a milliszekundumnál gyorsabb tartomány, az előremenő $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektron transzferrel, a lassabb, 100 ms illetve

szekundumos tartomány a $P^+(Q_A Q_B)^- \rightarrow P Q_A Q_B$ töltésrekombinációval hozható kapcsolatba.

Az előremenő elektrontranszfer amplitúdója mindegyik minta esetében független volt a hőmérséklettől, a kísérleti hibák határain belül maradt. Ez azt jelzi, hogy a membránkörnyezet nem változtatja meg sem a Q_A/Q_A^- sem a Q_B/Q_B^- redoxkomponensek extinkciós koefficiensét egyik hőmérsékleten sem. Egyúttal azt is mutatja, hogy az előremenő $P^+ Q_A^- Q_B \rightarrow P^+ Q_A Q_B^-$ elektrontranszfer gyakorlatilag teljes mértékben végbemegy mindegyik mintában, mindegyik hőmérsékleten. Más szóval a Q_A^- teljes mennyisége oxidálódik a fehérjekörnyezettől függetlenül.

Mind az előremenő elektrontranszfer, mind pedig a töltésrekombináció sebessége növekedett a hőmérséklet növekedésével, mindegyik mintában. A $P^+ Q_A^- Q_B \rightarrow P Q_A Q_B$ töltésrekombináció LDAO detergensben jól modellezhető volt, ha a sebességi állandót konstans (8 s^{-1}) értéken tartottuk. Ugyanez a PC esetében minimális hőmérsékletfüggést mutatott, megállapításaink szerint azonban nem ment túl a kísérleti hibák határain (szintén 8 s^{-1}). Nagyobb volt a változás a PG illetve PC/CL mintában. PG-ben az $5 \text{ }^\circ\text{C}$ -on mért $4,3 \text{ s}^{-1}$ -ről $6,6 \text{ s}^{-1}$ -ra nőtt a sebessége szobahőmérsékleten. A PC-t és CL-t 1:1 arányban tartalmazó proteoliposzómákban a $P^+ Q_A^- Q_B \rightarrow P Q_A Q_B$ töltésrekombináció sebessége lényegében a PC-ben mért értékhez hasonló nagyságú és hőmérsékletfüggésű volt. Megjegyzendő, hogy a PG/RC rendszerek optikai tulajdonságai sokkal rosszabbak voltak, mint a többi rendszeréi. Különösen a szubmilliszekundumos tartományban volt kicsi a jel/zaj viszony.



25. ábra Detergensbe, PC, CL hozzáadásával preparált PC, illetve PG liposzómába ágyazott *Rb. sphaeroides* RC-ok abszorpcióváltozása 771 nm-en a hőmérséklet függvényében. A vékony vonalak a legjobb illesztést szemléltetik (a megfelelő kinetikai paramétereket ld. 4. táblázat). Mérési körülmények: 3 μ M RC, 10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0.01% LDAO, pH 8.0 (LDAO) és 5 mM foszfát, 5 mM KCl, pH 6.8 (PC és PG liposzómák).

LDAO				
T (K)	$k_{AB(1)_{gyors}} (s^{-1})$	$k_{AB(1)_{lassu}} (s^{-1})$	$k_{AP} (s^{-1})$	$k_{BP} (s^{-1})$
278	25974	5155		0,991
283	9881	3883		0,968
288	13605	3187		0,924
293	7692	2448		0,873
298	10753	2404		0,880
303	6369	1031		0,836
308	6807	792		0,789
313				

PC				
T (K)	$k_{AB(1)_{gyors}} (s^{-1})$	$k_{AB(1)_{lassu}} (s^{-1})$	$k_{AP} (s^{-1})$	$k_{BP} (s^{-1})$
278	11198	1031		0,301
283	13394	1714		0,316
288	16369	2584		0,327
293	18900	3427		0,346
298	22573	4398		0,367
303	32446	6289		0,390
308		10684		0,429
313		13245		0,466

PC+CL				
T (K)	$k_{AB(1)_{gyors}} (s^{-1})$	$k_{AB(1)_{lassu}} (s^{-1})$	$k_{AP} (s^{-1})$	$k_{BP} (s^{-1})$
278	12534	1703	7,95	0,183
283	14281	1844	8,26	0,186
288	15358	2361	8,33	0,196
293	16730	3256	8,36	0,201
298	17845	3557	8,62	0,213
303	20312	4308	8,93	0,226
308	24436	4390	9,71	0,252
313	22852	4504	10.0	0,269

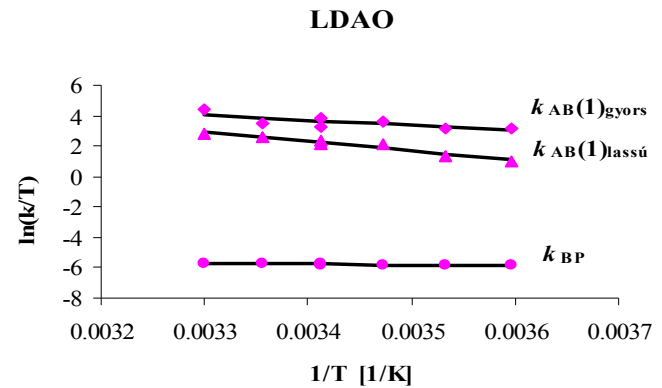
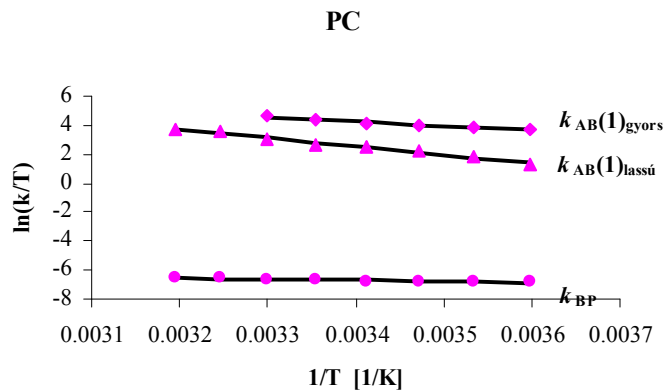
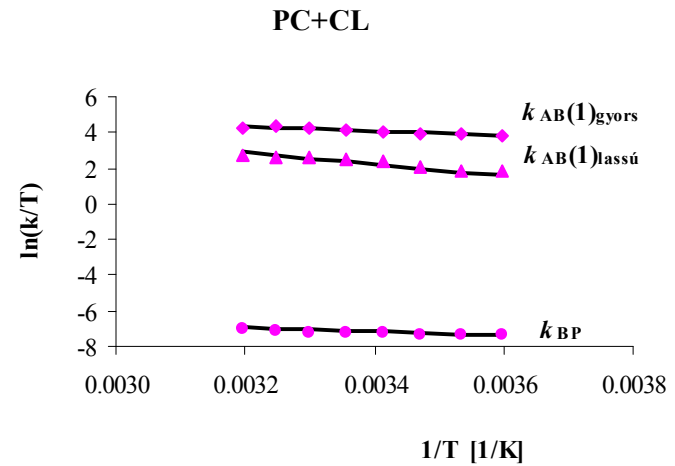
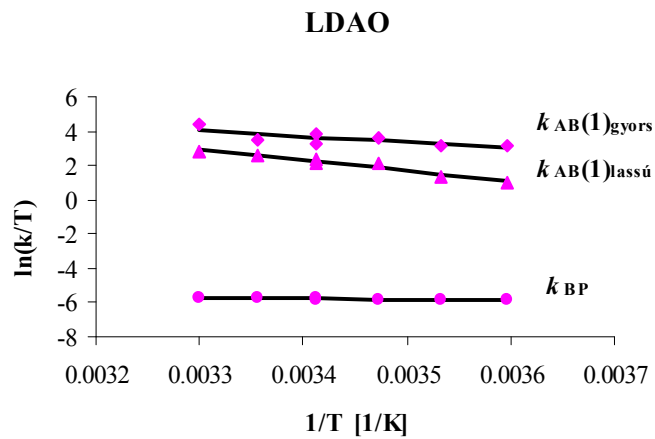
PG				
T (K)	$k_{AB(1)_{gyors}} (s^{-1})$	$k_{AB(1)_{lassu}} (s^{-1})$	$k_{AP} (s^{-1})$	$k_{BP} (s^{-1})$
278	10870	1000	4,36	0,162
283	11364	913	4,48	0,163
288	12346	919	4,64	0,166
293	11227	934	5,10	0,168
298	12821	942	5,35	0,181
303	21612	944	5,62	0,184
308	22226	862	5,78	0,223
313	22222	950	6,58	0,272

4. táblázat A *Rb. sphaeroides* R-26 törzséből izolált RC egyes elektrontranszfer lépéseinek sebességi állandói különböző hőmérsékleteken LDAO detergens, illetve PC, PG, PC:CL (1:1) liposzómában. Az egyes elektrontranszfer-lépéseket a megfelelő sebességi állandójukkal jelöltem. A multiexponenciális analíziseket a Table Curve (Jandel Scientific) programmal végeztem.

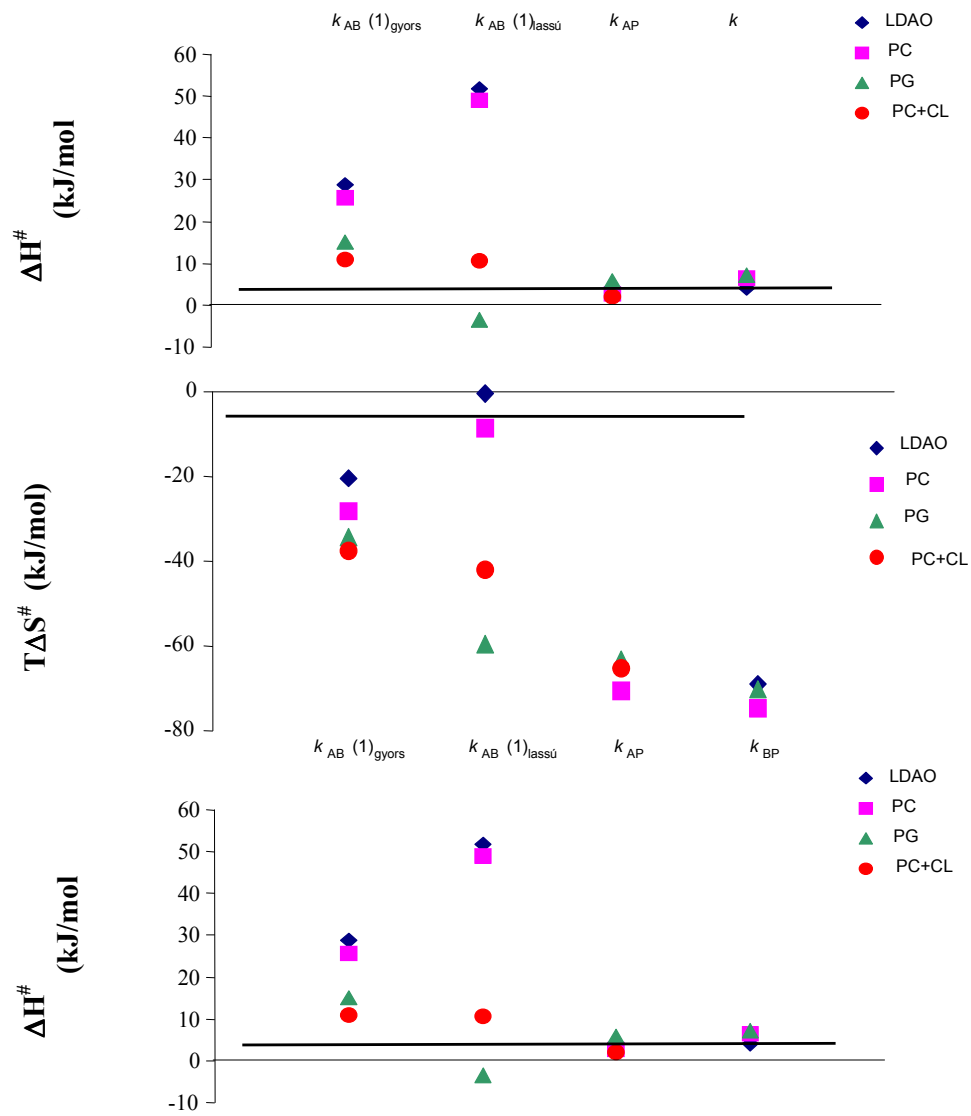
A 25. ábrán bemutatott mérési eredmények kiértékelése során (ld 5. táblázat) meghatározható az egyes komponensek időállandóinak (és az ezekből származtatható sebességi állandóknak: $k_{AB}(1)_{\text{gyors}}$, $k_{AB}(1)_{\text{lassú}}$, k_{AP} , k_{BP}) hőmérsékletfüggése és ábrázolhatóak az $\ln(k/T)$ értékek az $1/T$ függvényében (26. ábra). Ebben az ún. Eyring-féle ábrázolásban kiszámolhatjuk az egyes elektrontranszfer-lépések aktiválási szabadentalpia-értékeit, valamint azok entalpia- illetve entrópiáhozjárulásait. Más szóval, meghatározhatjuk azt, hogy az egyes folyamatokat a szabadentalpia, vagy az entrópia megváltozása irányítja-e. A legtöbb esetben a hőmérsékletfüggés egyetlen egyenes komponenssel volt leírható.

A $\Delta H^\ddagger$, $T\Delta S^\ddagger$ és $\Delta G^\ddagger$ paramétereket a 27. ábra mutatja az általunk vizsgált és kiszámolt értékeket (5. táblázat) különböző rendszerekben. Az ábrákon a vízszintes vonal a szobahőmérsékletnek megfelelő 2,5 kJ/mol energiaszintet jelenti. Amennyiben a kapott energiaérték ettől az értéktől jelentősen eltér, az a folyamat jelentős aktiválási energiát igényel, tehát ez a folyamat lesz a sebességmeghatározó lépés. Az LDAO és PC rendszerben a $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektron transzfer mindkét komponensének szabadentalpiaváltozása méréseink szerint jelentősen eltér az R^*T értéktől, tehát ez entalpia által meghatározott folyamat. Ez a folyamat a késleltetett lumineszcencia mérések alapján ugyancsak entalpia által vezérelt folyamatnak mutatkozott. Mivel az LDAO és PC esetén a $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow PQ_AQ_B$ töltésrekombináció nem változott lényegesen a hőmérséklettel, így erre a komponensre nem határoztunk meg termodinamikai paramétereket. PG esetén azonban jelentősebb hőmérsékletfüggés volt tapasztalható, amelyből az adódott, hogy a folyamat nagyobb entrópiáhozjárulással rendelkezik. Általában megállapíthatjuk, hogy az LDAO és PC kivételével mindegyik rendszerben jóval nagyobb az entrópiaváltozás, mint a szabadentalpia megváltozása.

Érdekes, hogy az aktiválási szabadentalpia ($\Delta G^\ddagger$) mindegyik rendszerben ugyanakkora, vagyis független a fehérjekörnyezettől.



26. ábra LDAO detergensbe, PC, PG valamint PC/CL (1:1 mólarány) liposzómába ágyazott *Rb. sphaeroides* RC-ok 771nm-nél mért abszorpcióváltozásának sebességi állandói különböző hőmérsékleten (Eyring-ábrázolás). A méréspontokat a 25. ábra mérésgörbéi alapján, a kihúzott egyeneseket az Eyring-model alapján (lásd szövegben) számoltam.



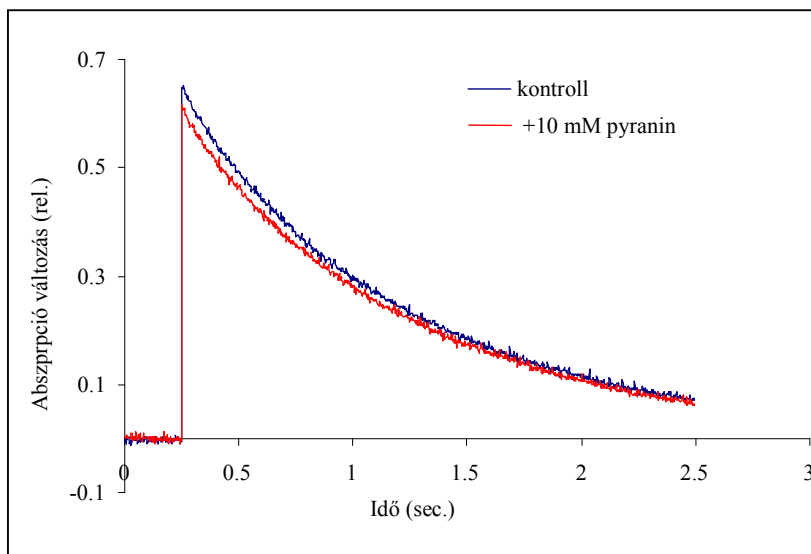
27. ábra A *Rb. sphaeroides* R-26 törzséből izolált RC egyes elektrontranszfer lépéseinek aktiválási entalpia (fent), entrópia (középen) és szabadentalpia (lent) értékei LDAO detergens, illetve PC, PG, PC:CL (1:1) liposzómákban. Az egyes elektrontranszfer lépéseket sebességi állandójukkal jelöltem. A vastag vonal az R^*T (szobahőmérsékletnek megfelelő 2,5 kJ/mol) aktiválási energiát jelöli mindhárom ábrán (lásd. 5. táblázat).

	LDAO	PC	PG	PC+CL
$\Delta H^\#(k_{AB}(1)_{\text{gyors}})$ (kJ/mol)	28.7	25.634	14.9	11.0
$\Delta H^\#(k_{AB}(1)_{\text{lassú}})$ (kJ/mol)	51.9	49.15	-3.4	27.4
$\Delta H^\#(k_{AP})$ (kJ/mol)			5.7	2.1
$\Delta H^\#(k_{BP})$ (kJ/mol)	3.9	6.417	7.0	8.968
$T\Delta S^\#(k_{AB}(1)_{\text{gyors}})$ (kJ/mol)	-20.6	-28.0	-34.1	-37.6
$T\Delta S^\#(k_{AB}(1)_{\text{lassú}})$ (kJ/mol)	-0.6	-8.5	-59.5	-42.00
$T\Delta S^\#(k_{AP})$ (kJ/mol)			-63.1	-65.48
$T\Delta S^\#(k_{BP})$ (kJ/mol)	-69.2	-74.7	-70.0	-67.86
$\Delta G^\#(k_{AB}(1)_{\text{gyors}})$ (kJ/mol)	49.3	53.7	49.0	48.6
$\Delta G^\#(k_{AB}(1)_{\text{lassú}})$ (kJ/mol)	52.5	57.6	56.1	53
$\Delta G^\#(k_{AP})$ (kJ/mol)			68.8	67.6
$\Delta G^\#(k_{BP})$ (kJ/mol)	73.1	81.1	77.0	76.5

5. táblázat A *Rb. sphaeroides* R-26 törzséből izolált RC egyes elektrontranszfer lépéseinek aktiválási entalpia ($\Delta H^\#$), entrópia ($T\Delta S^\#$) és szabadentalpia ($\Delta G^\#$) értékei LDAO detergens, illetve PC, PG, PC:CL (1:1) liposzómákban. Az egyes elektrontranszfer-lépéseket a megfelelő sebességi állandójukkal jelöltem. A paramétereket az abszorpciókinetikai vizsgálatokból származó adatok (5. táblázat) exponenciális analízisét követő Eyring-féle ábrázolás útján kaptuk.

5.4. Fényindukált transzmembrán pH-változások fotoszintetikus reakciócentrum/lipoproteid vezikulákban

Szükséges volt annak ellenőrzése, hogy a pH-változás kimutatásához használni kívánt jelzőmolekula befolyásolja-e a RC-on belüli töltésszétválasztást. Ebből a célból ellenőriztük a RC fényindukált abszorpcióváltozását 430 nm-nél piranin jelenlétében. Mint azt a 28. ábra mutatja, a piranin a pH-méréseknél alkalmazottnál jóval nagyobb koncentrációban is csak kis mértékben befolyásolja az elektrontranszportot. Tehát ez a jelzőmolekula ebből a szempontból megfelel a céljainknak. További méréseinknél mindössze 50 μM koncentrációban használtuk a piranint, így az elektrontranszportra gyakorolt hatásától gyakorlatilag nem kell tartanunk.



28. ábra A fotoszintetikus RC fényindukált abszorpcióváltozása piranin nélkül és jelenlétében LDAO detergensmicellákban. Mérési körülmények: mint a 15. ábránál; hullámhossz: 430 nm. A piranin koncentrációja 10 mM volt.

5.4.1. A piranin spektroszkópai jellemzése

A piranin pH indikátor festék (sav-bázis indikátor), ionos alakja más szerkezetű, mint a nem disszociált alakja. Ezt mutatják az abszorpciós spektrumon jól látható csúcsok 405 és 454 nm-nél (29. ábra). A pH növekedésével a 405 nm-nél látható csúcs abszorpciója csökken, míg a 454 nm-nél mérhető csúcs értéke növekszik. 417 nm-nél az abszorpcióváltozásnak izoszbosztikus pontja van.

Ha az abszorpciós maximumokhoz tartozó

$$\frac{E_{mért} - E_{HA}}{E_{A^-} - E_{HA}} \quad (5)$$

értékeket (450 nm-nél), illetve az

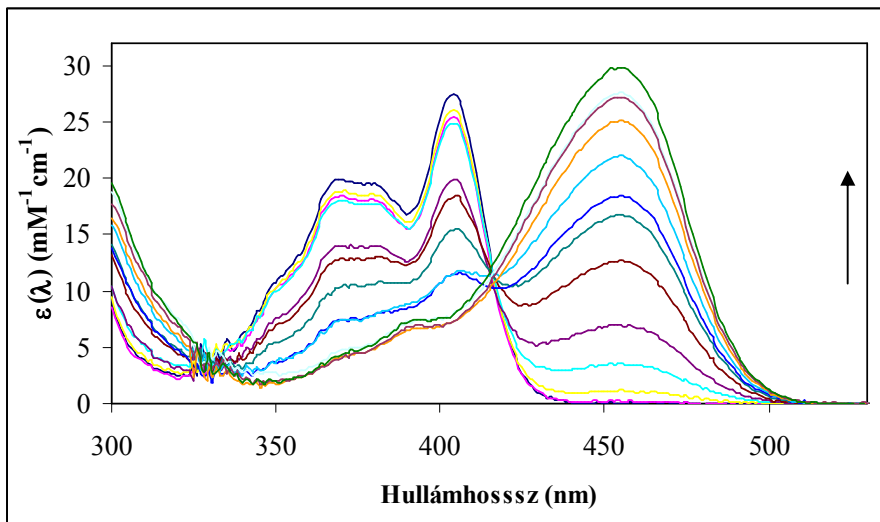
$$1 - \frac{E_{mért} - E_{HA}}{E_{A^-} - E_{HA}} \quad (6)$$

értékeket (405 nm-nél) ábrázoljuk a pH függvényében, akkor jellegzetes, a Henderson-Hasselbach modellre jól illeszkedő lefutású görbéket kapunk (30. ábra). A méréspontokra a Henderson-Hasselbach egyenletet (lásd később) illesztve meghatározhatjuk a festék indikátorexponensét (pK átcsapási pontját).

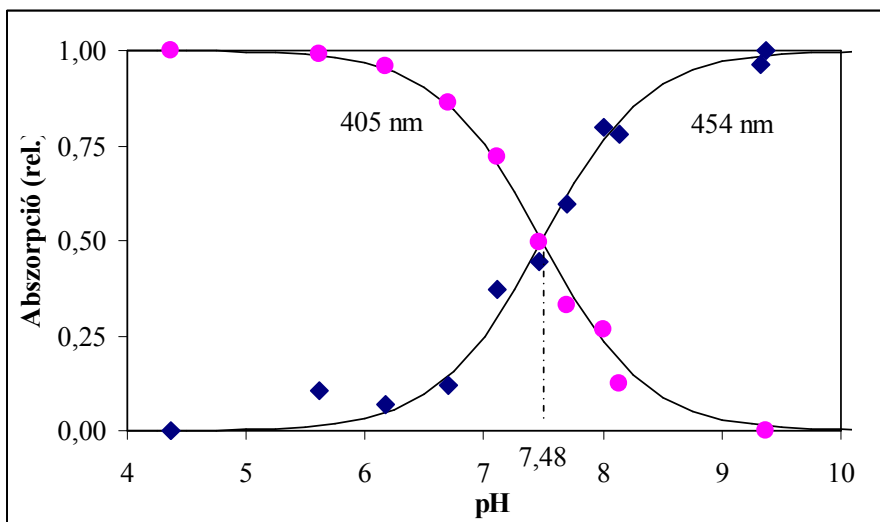
Az indikátor átcsapási pontja az a pont, amelynél a disszociált és disszociálatlan alakja egyenlő koncentrációban van jelen. Ábrázoltuk a két abszorpciós csúcs pH függését, aminek segítségével a pK, azaz a disszociációs állandó negatív logaritmusát meghatározhatjuk. Ha az indikátor gyenge sav, a disszociációs egyensúlyra és a K disszociációs állandóra a következők írhatók fel:



$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (8)$$



29. ábra: Piranin abszorpciós spektrumának pH-függése a spektrum látható tartományában. A nyíl a pH növekedésének irányát jelöli.



30. ábra A piranin vizes, pufferelt közegben, 454 és 405 nm-nél mért relatív abszorpciója a pH függvényében. Az abszorpciót az $(E_{\text{mért}} - E_{\text{HA}})/(E_{\text{A}^-} - E_{\text{HA}})$ (454 nm-nél) és az $1 - (E_{\text{mért}} - E_{\text{HA}})/(E_{\text{A}^-} - E_{\text{HA}})$ (405 nm-nél) összefüggés alapján normáltuk. $E_{\text{mért}}$: az aktuális abszorpció az adott pH-n; E_{HA} : a teljesen protonált (savas) forma abszorpciója alacsony pH-n; E_{A^-} : a teljesen deprotonált (bázikus forma) abszorpciója magas pH-n.

$$\frac{E_{m\acute{e}rt} - E_{HA}}{E_{A^-} - E_{HA}} = \frac{A^-}{([A^-] + [HA])} \quad (9)$$

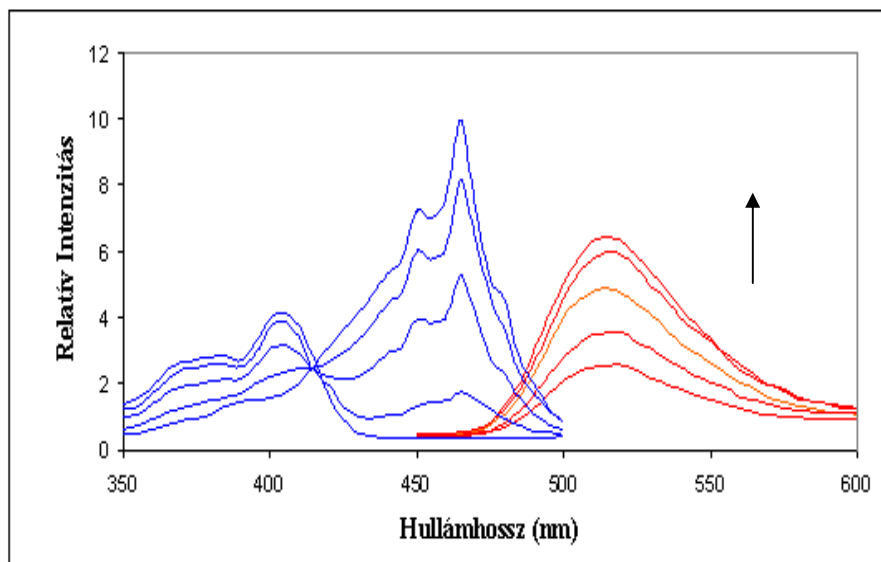
Ha a (8) egyenlet negatív logaritmusát vesszük és átrendezzük, megkapjuk a Henderson-Hasselbach egyenletet.

$$-\log[H^+] = -\log K - \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (10)$$

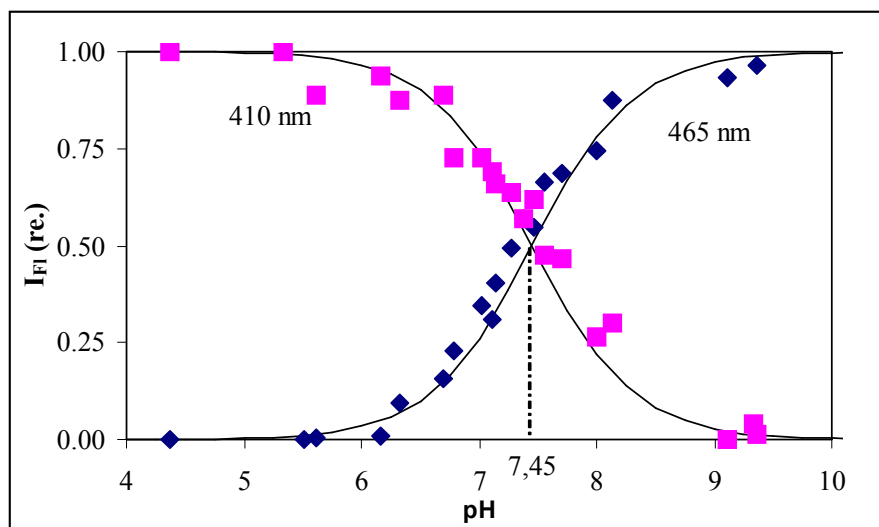
$$pH = pK - \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (11)$$

Mivel az átcsapási pontban a savas és bázikus forma koncentrációja azonos az ekkor mérhető pH a pK-t adja. Ez ábránkról leolvasható: pK=7,48

Irodalmi adatok szerint a piranin sokkal érzékenyebben meghatározható a fluoreszcencia mérésével, mivel fluoreszcenciahatásfoka igen nagy. Mivel távolabbi célunk az, hogy meghatározzuk biológiai rendszerekben az intermedier anyagcsere következtében bekövetkező pH-változást, felvettük a piranin emissziós és gerjesztési fluoreszcenciaspektrumát különböző pH-értékeken. A 31. ábra egy ilyen mérés eredményét mutatja. A pH növekedésével, tehát az oldat lúgosodásával, az 510 nm-nél mérhető emisszió növekszik, ha a gerjesztést 465 nm-nél végezzük. A gerjesztési színekben tehát a 465 nm-nél a pH növekedésével növekvő fluoreszcenciaintenzitást, 410 nm-nél csökkenő intenzitást láthatunk. Mint ahogyan azt az abszorpciós színek kiértékelésénél is tettük, itt is ábráztuk a jellegzetes csúcsok normált intenzitását a pH függvényében (32. ábra). Ebben az ábrázolásmódban is meghatározhatjuk a pK értéket, amely igen jó közelítéssel az abszorpcióváltozásból meghatározottal volt egyenlő. Ebben a vizsgálatban pH=7,45-nek adódott.

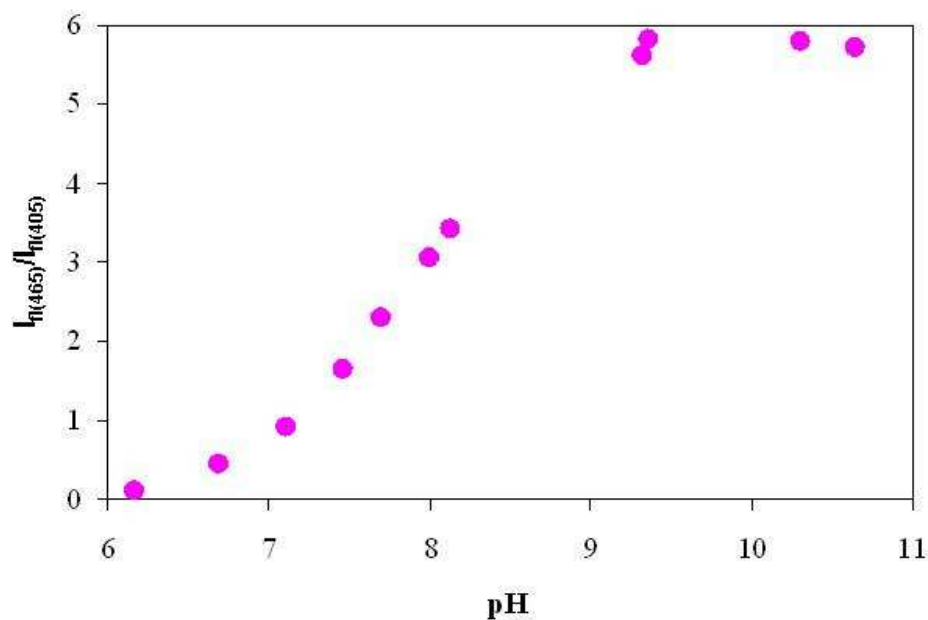


31. ábra A piranin vizes pufferes oldatának fluoreszcencia gerjesztési (baloldali görbék) és emissziós spektrumainak (jobboldali görbék) pH-tól való függése. A méréseket az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint végeztük. A nyíl a pH növekedésének az irányát mutatja.



32. ábra A piranin vizes, pufferelt közegben, 465 és 410 nm-nél mért relatív gerjesztési fluoreszcenciaintenzitása a pH függvényében. A fluoreszcenciaintenzitásokat az $(E_{\text{mért}} - E_{\text{HA}})/(E_{\text{A}^-} - E_{\text{HA}})$ (465 nm-nél) és az $1 - (E_{\text{mért}} - E_{\text{HA}})/(E_{\text{A}^-} - E_{\text{HA}})$ (410 nm-nél) összefüggés alapján normáltam. $E_{\text{mért}}$: az aktuális fluoreszcenciaintenzitás az adott pH-n; E_{HA} : a teljesen protonált (savas) forma fluoreszcenciaintenzitása alacsony pH-n; E_{A^-} : a teljesen deprotonált (bázikus forma) fluoreszcenciaintenzitása magas pH-n. A fluoreszcenciát 510 nm-nél mértem.

Adott koncentráció és adott pH esetén maguk az intenzitásértékek informatívak lehetnek, de a biológiai rendszerben a pH változását jobban nyomon követhetjük a 410 és 465 nm-nél levő gerjesztési maximumok arányának változásával. Az adott rendszerben ugyanis nem tudjuk, hogy a fluoreszcenciaintenzitás változása egyedül a protonkoncentráció megváltozása miatt történt-e. A pH két hullámhosszon egyidőben történő nyomonkövetése a fluoreszcencia pH-val való antiparalell változása miatt csábító lehetőség. Steady state mérések esetében, amikor a spektrumok felvétele lehetséges, ez a módszer alkalmazható. Készítettünk is kalibrációt a pH meghatározására, a 465/410 nm csúcsarány „belső sztenderdként” való alkalmazására (33. ábra). Kinetikai méréseknél azonban két tényező is nehezíti a vizsgálatot. Az egyik az, hogy ezeken a hullámhosszakon spektrális átfedések vannak a feofitinek, a citokróm és egyéb RC-ban található kofaktorok Soret-sávjai között. Ezek közül a citokróm különösen jelentős, hiszen ennek abszorpciója változik a fotociklus során. A másik ok egyszerű technikai. Az általunk is használt Perkin-Elmer spektrofluorimeterrel nem lehet két hullámhosszon egyszerre gerjesztést alkalmazni.



33. ábra A piranin 465 és 410 nm-nél gerjesztésnél mért fluoreszcenciájának aránya vizes, pufferelt közegben. A fluoreszcenciaintenzitásokat a 32 ábrán bemutatott gerjesztési spektrumokból vettem.

5.4.2. A lipoproteid vezikulák protonáteresztő-képessége

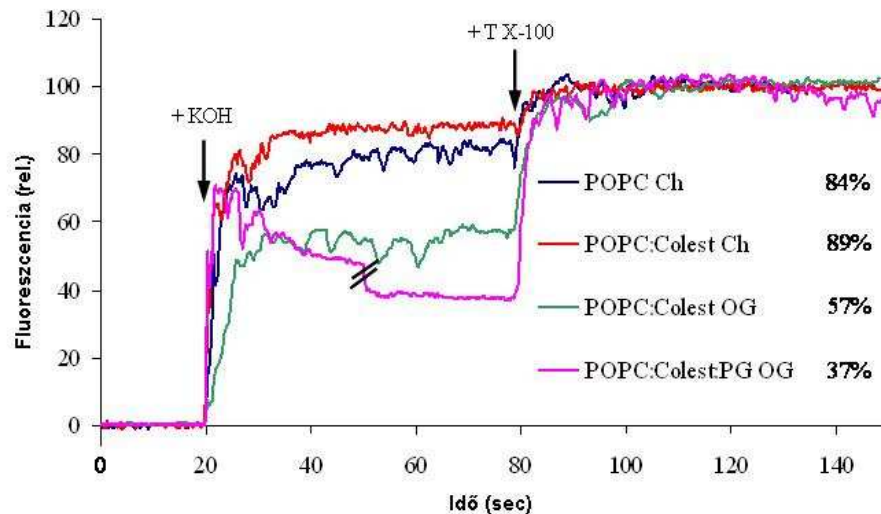
Kísérleteink fő célja az volt, hogy megmérjük a liposzómba ágyazott RC fotokémiája által létrehozott transzmembrán pH-gradiens kiépülésének kinetikáját, becslést adjunk annak nagyságára, és ha lehetőség van rá, meghatározzuk a protonmozgató erő (pmf) egyes komponenseinek részarányát.

Ehhez először a RC nélküli liposzómák protonáteresztőképességét kellett megvizsgálnunk. Elképzeléseink és korábbi tapasztalataink szerint egy telített, illetve telítetlen zsírsavláncot is tartalmazó lipid áll legközelebb az *in vivo* membránhoz, ezért kísérleteinkhez a 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin-t (POPC) választottuk.

Korábbi tapasztalatunk az volt, hogy a liposzóma frakció minősége függött attól, hogy milyen detergensféleséget használtunk a lipid feloldásakor, a liposzómapreparálás során így kétféle detergenssel is próbálkoztunk: nátrium-

koláttal (Ch) és oktilglükóziddal (OG). Azt is tapasztaltuk (amint irodalmi adatok alapján várható volt), hogy a piranin a negatív töltései révén erősen kötődik a PC liposzóma pozitív felületi töltéseihez. Ennek elkerülésére PC:Col:PG = 5:1:1 tömegarányban kevert koleszterinnel (Col) és PG-lal együtt szárítottuk az eppendorf cső falára a lipidfrakciót. Irodalmi adatok vannak arra is, hogy a koleszterin csökkenti a protonvezetőképességet, ezért a későbbiekben ezt a vegyületet is hozzáadtuk a frakcióhoz. A pH-ugrást KOH hozzáadásával érték el, a liposzóma integritását a mérés végén hozzáadott detergenssel, TX-100-zal ellenőriztük. A KOH koncentrációját célszerűen úgy választottuk meg, hogy a kezdeti pH=7.2, egy pH-egységet változzon. Így a pH-változás a piranin pK-ja (pK=7.4) körüli nagyjából lineáris tartományban történt.

Eredményeinket a 34. ábra szemlélteti. KOH hozzáadására a piranin fluoreszcenciája hirtelen növekedett, majd egy tranziens fázison át egyensúlyi állapotot ért el. A kezdeti fluoreszcencianövekedés kis részben származhat a még mindig a felszínhez kötött piranintól, valamint attól, hogy a hozzáadott OH⁻ ionok hatására protonok szabadultak ki a liposzóma belső teréből (és/vagy az OH⁻ ionok diffundáltak befelé). Ez a diffúzió az egyszerű PC-liposzómák esetében volt a legnagyobb. Col minden esetben növelte a liposzómák protonokkal szembeni záródását. Várakozásunknak megfelelően az OG-dal készített liposzómák mutattak nagyobb zártságot, ezért a következőkben ezzel a detergenssel készítettük a liposzómát. Az egyensúlyban adott TX-100 tovább növelte a fluoreszcenciát, ami arra utalt, hogy a TX-100 hozzáadása előtti állapotban a piranin a zárt liposzómák belsejében jelezte a pH-változást, amit a detergens szétroncsolt.

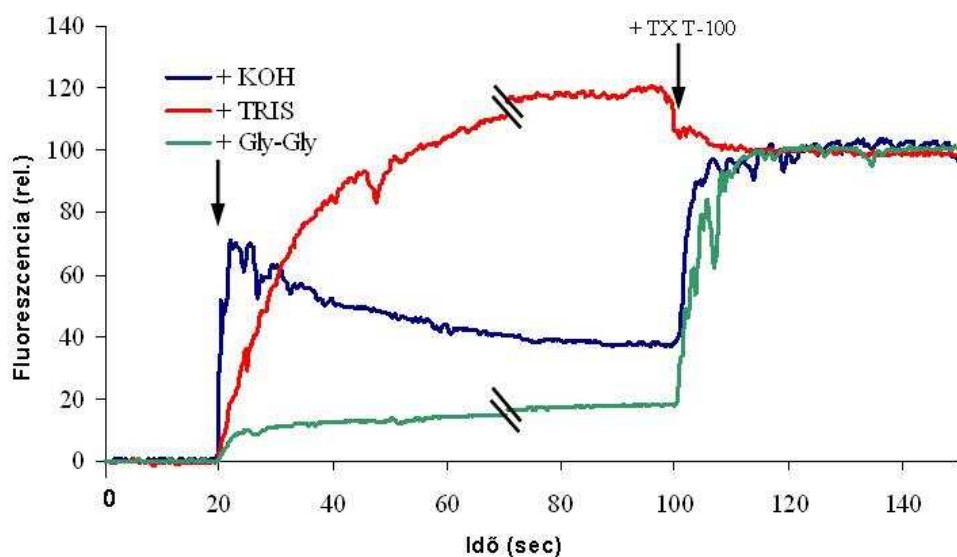


34. ábra A POPC, PG, és Col alapú Ch vagy OG detergensben oldott liposzómákba zárt piranin fluoreszcenciájának időbeli lefutása. A KOH hozzáadását a külső térben 1 pH egységnyi ugrás a TX-100 hozzáadását a liposzómák szétesése követi. A függőleges tengelyen a piranin maximális fluoreszcencia értékére kalibrált számértékeket látjuk. λ_{exc} : 465 nm, λ_{em} : 510 nm.

A pH-változást három különböző bázisféleséggel indukáltuk. A legkézenfekvőbb a KOH volt, de alkalmaztuk a glicilglicint (gly-gly) is, amely egy nagy negatív töltésű ionra disszociál, amely nem jut át a membránon, illetve a Tris-HCl-lel, ami számára a membrán széles pH-tartományban szabadon átjárható. A mennyiségeket minden esetben úgy választottuk meg, hogy a külsőtartományban a pH 1 egységet változzon. A liposzómán belüli pH megváltozása jól látható (35. ábra): KOH hozzáadásával a piranin fluoreszcenciája, tehát a liposzómán belüli pH gyorsan követte a külső pH megváltozását. Gly-gly hozzáadásával a belső pH csak alig emelkedett. Tris-HCl hozzáadásával a pH meghatározott, jól mérhető kinetikával növekszik, valószínűleg a Tris membránon való átjutásának megfelelően. A KOH vagy gly-gly hozzáadása után a transzmembrán proton gradiens felépül, amelyet meg lehet szüntetni TX-100 hozzáadásával, a liposzóma frakció szétbontásával.

Nehezebb megmagyarázni azt, hogy miért van hatással a protonáteresztőképességre az, hogy milyen detergenssel készült a liposzóma. Miért volna különbség a liposzóma permeabilitásában, ha más detergenst

használunk? A membrán alegyszerkezete azonban, különösen magasabb Col koncentráció esetén, függhet attól, hogy milyen detergenssel történt a liposzóma készítése. Az is elképzelhető, hogy detergens-molekulák maradnak a liposzómában, és azok akár nagyon csekély mennyiségben is növelhetik a permeabilitást.



35. ábra A piranin fluoreszcenciájának időbeli lefutása POPC/Col/PG (5:1:1) liposzómákban, amelyek OG detergenssel lettek szolubilizálva. KOH, TRIS (pK:8.1) vagy gly-gly (pK:3.4) (1 M, pH:8.0) és TX-100 (0.1%) hozzáadása után a bezárt piranin pH változása és a liposzómák szétesése látható. λ_{exc} : 465 nm, λ_{em} : 510 nm.

5.4.3. A proteoliposzóma áteresztőképessége RC jelenlétében

Alkalmas rendszerben a zárt lipoproteid vezikulákba épített RC fotociklusával ki lehet építeni a transzmembrán protongradienst. A fotociklushoz biztosítani kell a megfelelő donor-akceptor rendszert. Donorként cyt c_2 -t, akceptorként pedig decil-kinont használtunk. A fotociklus fennmaradásához, a redoxegyensúly megtartásához $K_4[Fe(CN)_6]$ -t adtunk a rendszerhez, ami visszaredukálta a keletkezett oxidált citokrómot, így az újra alkalmas lett a fotociklusban való részvételre. Ezekben a kísérletekben foszfatidil-inozitolt (PI) használtunk a PG helyett, ami szintén negatív töltésű lipid, így a PG-t helyettesítheti.

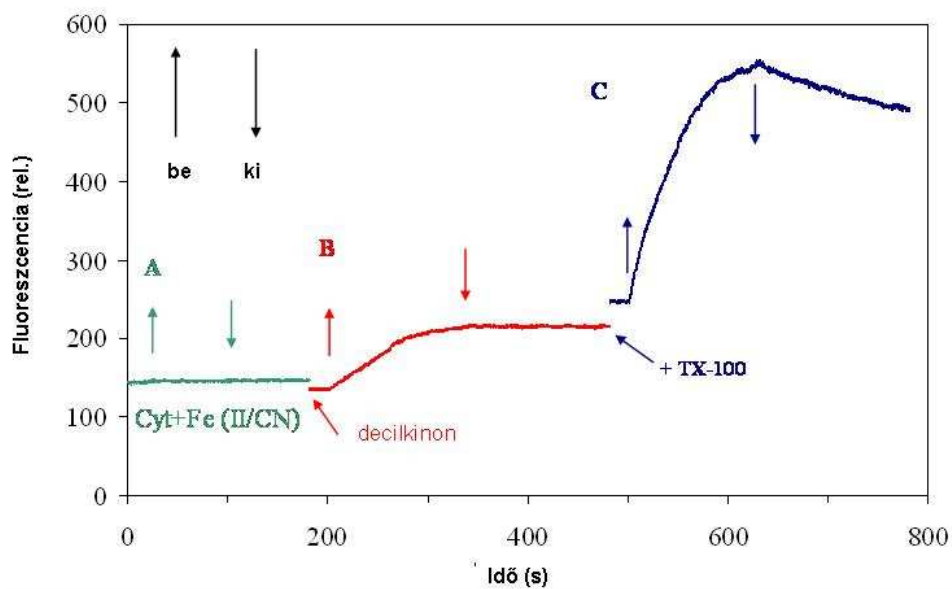
Eredményeinket a 36. ábra szemlélteti. Az ábrán a nyilak a fény be- illetve kikapcsolásának az időpontját mutatják. Látható, hogy a fotociklust követő pH-változás csak akkor következik be, ha a fotociklus záródik, decil-kinon hozzáadásával. Maximális pH-növekedés azonban csak akkor érhető el, ha a liposzómát szétroncsoljuk, és gyakorlatilag kompartmentek nélküli szuszpenzióban mérjük a fluoreszcenciaváltozást.

Összegezve, megállapíthatjuk, hogy sikerült fényindukált pH-változást kimutatnunk a RC proteoliposzómarendszer fotociklusa során.

Ennek optimális feltételei közé tartoznak:

- a) a palmitoil-, illetve oleilcsoportok fontosak lehetnek a membrán megfelelő fizikai/kémiai állapotának, mikroviszkozitásának fenntartásához;
- b) a koleszterin is fontos a fizikai/kémiai állapot meghatározásában, nagy mértékben befolyásolhatja a víztartalmat, a protonáteresztőképességet;
- c) a piranin membránfelszínhez való kötődését meg kell akadályozni anionikus lipid (PG vagy PI) hozzáadásával;

d) a lipid szolubilizálásához célszerűbb oktilglükózid detergenst használni, mint koleszterint.



36.ábra A piranin fluoreszcenciájának időbeli lefutása látható POPC/koleszterin/PG (5:5:1 molekula arány) liposzómákban, amelyek OG detergenssel lettek szolubilizálva, majd RC (0.2 μM) hozzáadása következett. "A" részben: 2 μM cyt c^{2+} és 1.5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ hozzáadásával elindult a fotociklus. "B" részben: 100 μM decylquinone-t, a "C" részben: TX-100 adtunk a mintához. λ_{exc} : 465 nm, λ_{em} : 510 nm. A nyilak a folytonos fény be (on) és kikapcsolását (off) jelzik.

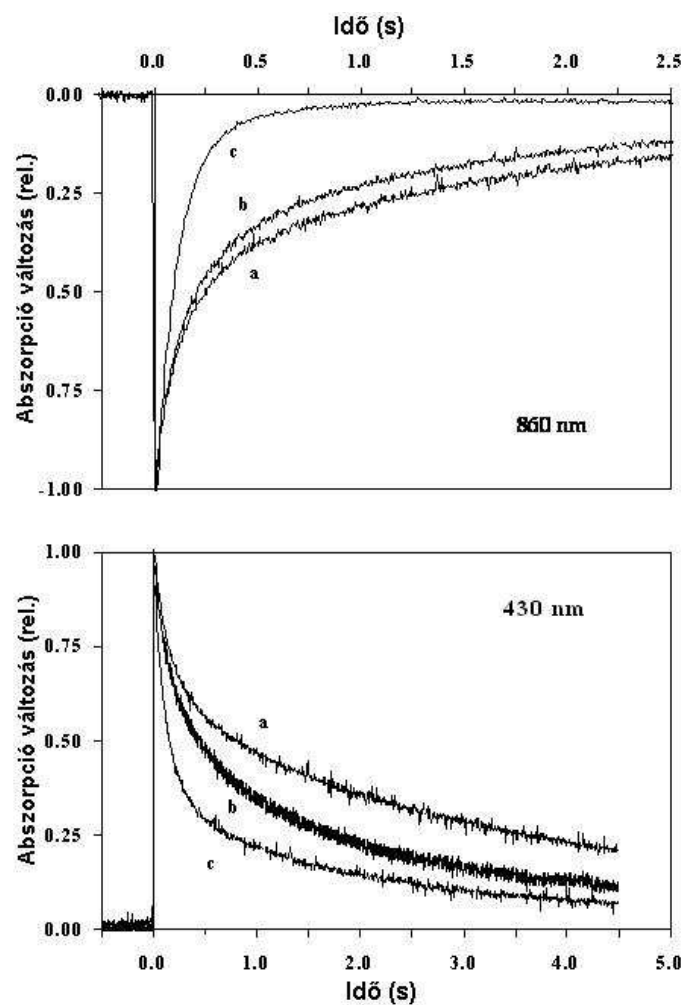
5.5. A fotoszintetikus RC és szén nanocsövek közötti kölcsönhatás

5.5.1. A szén nanocső környezet hatása a RC-on belüli töltésstabilizálódásra

Mintegy 30 éve ismert, hogy ha a fotoszintetikus RC-ot üveglapra szárítjuk, akár detergenst is tartalmazó filmmel együtt (Clayton, 1978), vagy trehalóz gélben (Palazzo és mtsai., 2000), hasonlóképpen a szuszpenzióban levő mintához fotokémiai aktivitást mérhetünk, amit a fényindukált abszorpcióváltozás is mutat. Fényindukált abszorpcióváltozást akkor is mérhetünk, ha a RC-fehérjét az egyfalú szén nanocsővel (SWNT-vel) együtt szárítjuk az üveglapra. Az egyetlen telítési fényimpulzus után mért abszorpcióváltozás mind 430, mind 860 nm-nél jellegzetes, kétfázisú kinetikát mutat. A 37. ábra felső részén látható a RC abszorpcióváltozás kinetikája 860 nm-nél egyszeri telítési fény hatására LDAO szuszpenzióban, detergensevel és detergens nélkül üveglapra szárított mintákon. A mérési adatokat exponenciális illesztéssel analizáltuk (lásd „Anyagok és módszerek” fejezetben).

860 nm-nél a (BChl)₂ elsődleges elektron donor redox állapota látható. Az LDAO detergens oldatban a gyors komponens időállandója $k_{AP} = 8,3 \text{ s}^{-1}$, a lassú komponensé $k_{BP} = 0,87 \text{ s}^{-1}$, amely a teljes lecsengés kb. 95 %-a jelezve a lassú töltésrekombinációt a P^+ és Q_B^- között. Üveglapra szárítás után detergens jelenlétében, a lassú komponens részaránya jelentős mértékben (10% alá) csökkent, és a sebességi állandója is növekedett ($1,15 \text{ s}^{-1}$ -re). Ha a detergenst kidializáltuk leszárítás előtt, a gyors fázis 36%-át tette ki a teljes amplitúdónak, és a csökkenő lassú fázis sebességi állandója a detergens nélküli $k_{BP} = 0,87 \text{ s}^{-1}$ értékről detergensbeni $k_{BP} = 0,44 \text{ s}^{-1}$ értékre változott. Amikor a RC-kat SWNT-hez kötöttük és üveglapra szárítottuk, a minta aktivitása néhány hétig megmaradt. Közvetlenül a preparálás után a lassú komponens értéke $k_{BP}=0,37 \text{ s}^{-1}$, mintegy 50%-a a teljes jelnek (6. táblázat). Érdekes azt megfigyelni, hogy a detergens nélküli leszárított RC töltésrekombinációjának kinetikája ($k_{BP}=0,44 \text{ s}^{-1}$)

nem különbözik lényegesen a nanocsöves mintáétól ($k_{BP} = 0.37 \text{ s}^{-1}$) de az utóbbi mintában a lassú komponens részaránya mintegy 20%-kal kisebb. Hasonló kinetikát figyelhetünk meg 430 nm-en (37. ábra, alsó panel). Tehát a lassú komponens részaránya a leszárítás után drasztikusan lecsökkent (30%-ra). Ez a komponens teljesen eltűnt 24 órás várakozás után. A NT-vel együtt leszárított RC-ok lassú fázisának időállandója gyakorlatilag nem változott egy hét alatt ($k_{BP} = 0.23 \text{ s}^{-1}$) és a részarányuk is alig változott (60 %-ról 52 %-ra).



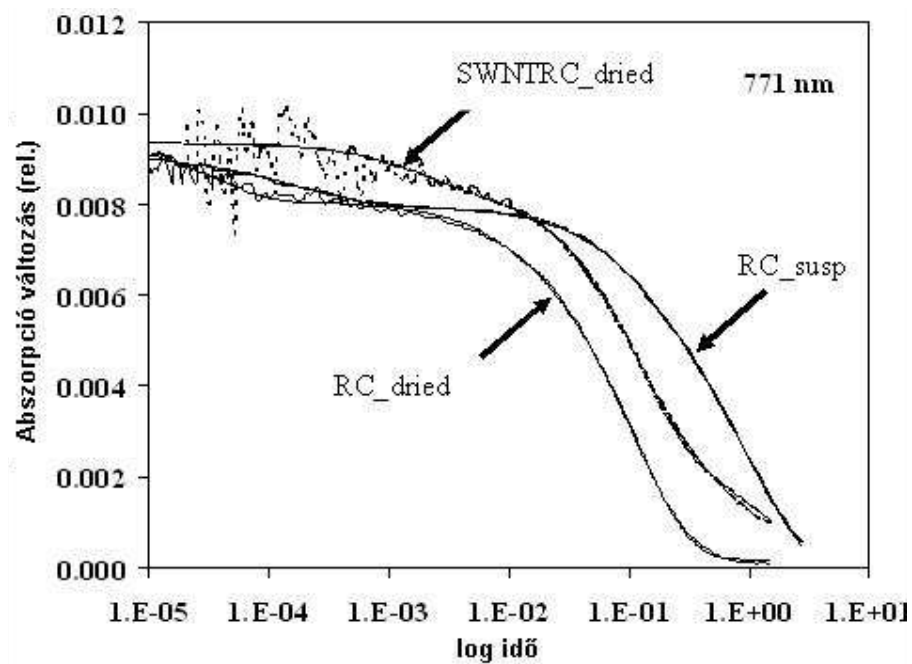
37. ábra *Rb. sphaeroides* R-26 RC-ok fény indukált abszorpcióváltozása 430 nm-nél (alul) és 860 nm-nél (felül) különböző körülmények között. (a) RC LDAO detergens micellákban; (b) RC detergens nélkül boroszilikát üveglapra szárítva közvetlenül a leülepedés után; (c) RC LDAO detergenssel boroszilikát üveglapra szárítva közvetlenül leülepedés után. A kinetikai paramétereket a 6. táblázatban tüntettem fel.

	860 nm				430 nm			
	$A_1(\%)$	$k_{BP}(s^{-1})$	$A_2(\text{rel.})$	$k_{AP}(s^{-1})$	$A_1(\%)$	$k_{BP}(s^{-1})$	$A_2(\%)$	$k_{AP}(s^{-1})$
RC_susp	95.0	0.87	5.0	8.30	87.0	0.67	13.0	8.3
RC_driedLDAO_0_day	8.0	1.15	92.0	9.66	34.0	0.39	66.0	8.3
RC_driedLDAO_1_day	-	-	-	-	3.0	0.52	97.0	8.3
RC_driedNodet_0_day	64.0	0.44	36.0	8.00	51.0	0.41	49.0	8.00
SWNTRC_0_day	43.0	0.37	57.0	6.13	59.0	0.23	41.0	4.7
SWNTRC_1_week	33.0	0.37	67.0	5.57	52.0	0.23	48.0	4.6

6. táblázat A 860 és 430 nm-en mért abszorpcióváltozás kinetikájának (37. ábra) paraméterei. $A_1(\%)$ és $A_2(\%)$ a lassú és a gyors komponensek relatív amplitúdói, k_{BP} és k_{AP} pedig az időállandói. Jelölések: *RC_susp* - RC-ok LDAO detergens szuszpenzióban; *RC_driedLDAO_0 day* és *RC_driedLDAO_1 day* - boroszilikát üveglapra szárított RC detergensben a szárítás után azonnal (0_day) és egy nap múlva (1_day); *RC_driedNodet_0 day* – az üveglapra szárított RC-ok detergens nélkül a szárítás után azonnal; *SWNTRC_0 day* és *SWNTRC_1 week* – a szén nanocső/RC kompozitok üveglapra szárítva azonnal és egy hét múlva mérve.

A pozitív és/vagy negatív töltések megjelenése az aminosavdallancok közötti hidrogénkötések, a fehérjén belüli elektrosztatikus hálózat átrendeződését eredményezi. A gyors töltésmozgásokat a lassabb protein relaxációk követik. Ezek a töltésmozgások láthatók a fehérje relaxációs kinetikákban, a 771 nm-en mért abszorpcióváltozásnál. Az abszorpcióváltozás jól nyomon követhető a 38. ábrán is látható szemilogaritmikus ábrázolásban. Ezen a hullámhosszon a BPheo elektrokróm abszorpcióeltolódását lehet látni (Tiede és mtsai., 1996). Mivel a logaritmikus időskála több nagyságrendet fog át, a $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektron transzfert kísérő gyors fázist, és a $P^+(Q_AQ_B)^- \rightarrow PQ_AQ_B$ töltés rekombinációt jelentő lassú fázist is nyomon követhetjük egyetlen ábrán. A kinetikai paraméterek (amplitudók és sebességi állandók) a multiexponenciális jel felbontásából kinyerhetők. Ennek összegzése látható a 7. táblázatban. A mintavételezési idő általában mikroszekundum körüli volt, ami lehetővé tette a néhány tíz mikroszekundumos leggyorsabb komponens felbontását is. A szén nanocsőhöz kötött RC vizsgálatoknál a görbéket csak kb. 100 μ s-tól tudtuk felbontani az erős fényszórás miatt. Az LDAO detergensben levő RC-ok jelében a gyorsabb fázis sebességi állandója $k_{AB(1)fast} = 13\,500\text{ s}^{-1}$ volt, lassú komponens $k_{AB(1)slow} = 3300\text{ s}^{-1}$ amely értékek jól összehasonlíthatóak az irodalmi adatokkal, (Nagy és mtsai., 2004; Tiede és mtsai., 1996). Ha a RC-ok üveglapra vannak szárítva, a gyors komponens időállandója kb. kétszerese a detergensben mértének, $k_{AB(1)fast} = 26300\text{ s}^{-1}$ (v.ö. $k_{AB(1)fast} = 13\,500\text{ s}^{-1}$ a detergensben), míg a lassú komponensé jelentősen lecsökken, $k_{AB(1)slow} = 75\text{ s}^{-1}$ (v.ö. $k_{AB(1)slow} = 3300\text{ s}^{-1}$ a detergensben, 6. táblázat).

A SWNT/RC leszárított mintában a nagyon gyors komponenst nem tudtuk feloldani a fényszórás miatti kicsi jel/zaj viszony miatt. A lassú komponens időállandója $k_{AB(1)slow} = 530\text{ s}^{-1}$ -nak adódott, ami kisebb, mint a detergensbeni RC-on mérté, de jelentősen nagyobb a szárított RC-énál.



38. ábra Boroszilikát üveglap felületére leszártott *Rb. sphaeroides* R-26 RC-ok abszorpcióváltozása egyszeri telítési lézerfény után 771 nm-en. Jelölések: *RC_susp* – RC LDAO detergens szuszpenzióban; *RC_dried* és *SWNTRC_dried* – RC és SWNT/RC kompozit üveglapra szárítva.

771 nm	$P^+(Q_A Q_B)^- \rightarrow$ $P(Q_A Q_B)$		$P^+ Q_A^- \rightarrow P Q_A$		$(Q_A^- Q_B \rightarrow$ $Q_A Q_B^-)_2$		$(Q_A^- Q_B \rightarrow$ $Q_A Q_B^-)_1$	
	A_1	k_{BP}	A_2	k_{AP}	A_3	$k_{AB(1)_{slow}}$	A_4	$k_{AB(1)_{fast}}$
	(rel.)	(s ⁻¹)	(rel.)	(s ⁻¹)	(rel.)	(s ⁻¹)	(rel.)	(s ⁻¹)
RC_susp	0.64	0.92	0.20	8.0	0.06	3300	0.10	13500
RC_dried	0.004	0.91	0.75	8.3	0.106	75	0.14	26300
SWNTRC	0.28	0.625	0.62	8.3	0.10	530	n. r.	

n. r. = nem meghatározott

7. táblázat A 771 nm-en mért abszorpcióváltozás kinetikájának (38. ábra) paraméterei. Jelölések: *RC_susp* – RC LDAO detergens szuszpenzióban; *RC_dried* és *SWNTRC* – RC és SWNT/RC kompozit üveglapra szárítva.

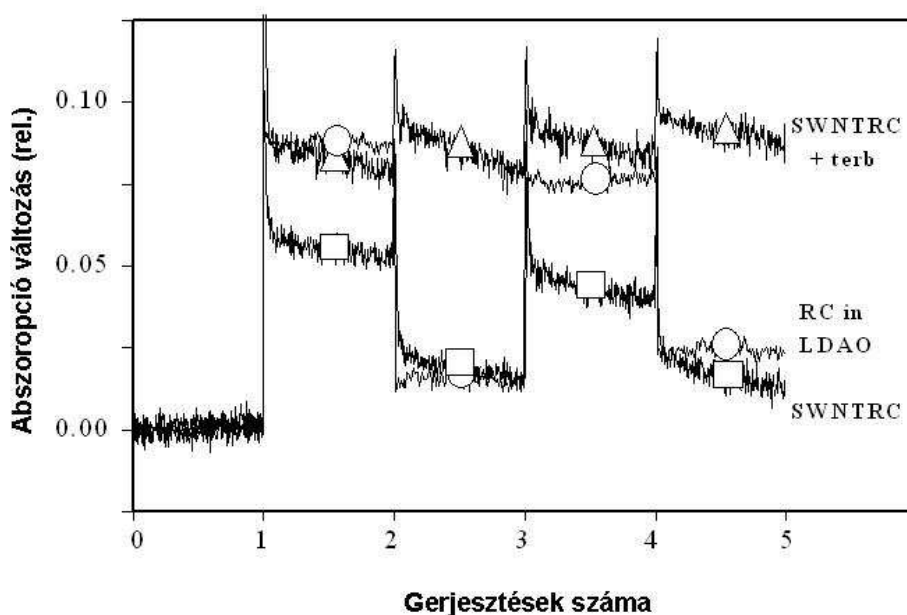
5.5.2. A szén nanocsövek és a RC-ok közötti redox kölcsönhatás

Az egyszeri telítési fénygerjesztés után másodlagos donor jelenléte nélkül a P^+ redoxállapotát követhetjük az idő függvényében. Másodlagos donor (pl. ferrocén vagy citokróim) jelenlétében 450 nm-nél sorozatos telítési gerjesztések után az abszorpció jellegzetes bináris oszcillációját láthatjuk. Ennek a magyarázata az, hogy míg az elsődleges kinon (Q_A) egy elektronnal képes redukálódni, a másodlagos kinon (Q_B) kettővel. A másodlagos donor jelenlétében egyszeresen redukált szemikinin (Q_B^-) keletkezik, amelynek abszorpciója van 450 nm-nél. Második gerjesztésre az ezen a hullámhosszon nem abszorbeáló kétszeresen redukált és két protonnal protonált $Q_B H_2$ forma keletkezik. Minden páratlan gerjesztéskor a szemikinin, páros számú gerjesztéskor pedig a kétszeresen redukált kinon keletkezik.

A 39. ábra a RC LDAO detergensben és az SWNT/RC kompozit újranedvesített mintájának abszorpcióváltozását mutatja másodlagos donor

(ferrocén) jelenlétében sorozatos gerjesztések után. A detergens oldatban az oszcilláció csak kis mértékű csillapodást mutat, míg a NT-höz kapcsolt minta oszcillációja gyakorlatilag pár ciklus után megszűnik. Ez arra utal, hogy ebben a mintában a kinonátfordulás (a másodlagos kinon leválása és RC-hoz való kötődése) csak kis mértékben lehetséges, ami a várakozásoknak teljesen meg is felel.

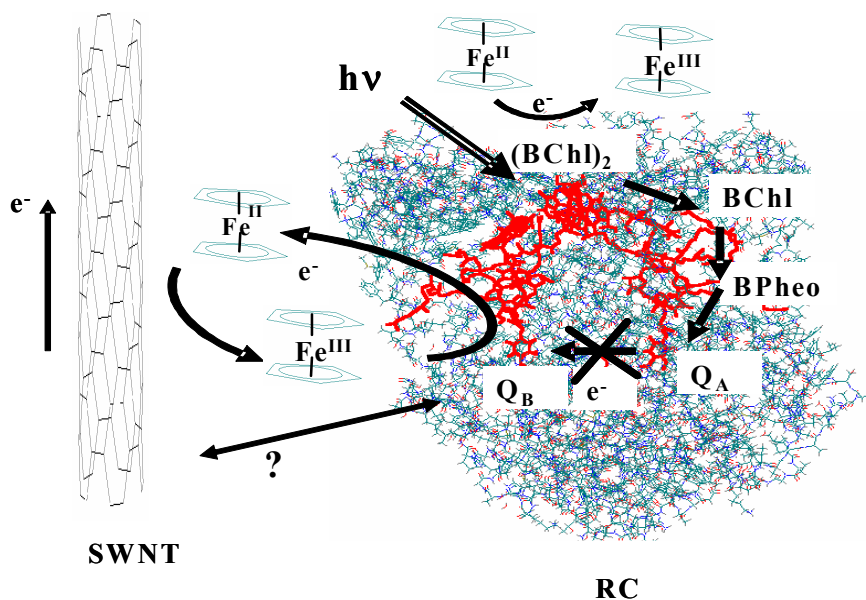
Érdekes a hatása a terbutrinnak. Már az első gerjesztésnél is egy megnövekedett amplitúdót láthatunk. Ez valószínűleg arra utal, hogy a terbutrin, a Q_B oldal kompetitív inhibítora, gátolja az elektrontranszportot a NT felé, ami a Q_A^- szemikinon (ugyancsak abszorbeáló) forma koncentrációját növeli.



39. ábra *Rb. sphaeroides* R-26 RC-nak 450 nm-nél mért abszorpcióváltozása sorozatos telítési gerjesztések után LDAO detergensszuszpenzióban és NT-hoz kapcsolva. Az SWNT/RC komplexet az üveglapnak a pufferoldatba való mártásával újranedvesített állapotában mértük. Ha szükséges volt, 100 μ M terbutrint adtunk a reakcióelegyhez. Mérési körülmények: 10 mM TRIS, pH:8.00, 100 mM NaCl, 100 μ M ferrocén. A flash ismétlődések ideje 0,5 Hz volt. $\circ$: RC in LDAO, $\square$: SWNTRC, Δ : SWNTRC + terb

Kísérleteinkben elsőként láttunk közvetlen bizonyítékot arra, hogy az SWNT-k a RC fehérjék specifikus helyéhez funkcionálisan kötődhetnek, amelynek egy lehetséges vázlatát a 40. ábra mutatja. A NT-hez való kapcsolódás hatására a fotoszintetikus RC-ban a fény indukált töltéspár stabilizációja

következik be. A NT-nek a RC-hoz való kapcsolódása növeli a $P^+Q_B^-$ állapot élettartamát, valószínűleg a pozitív (az oxidált primer elektron donor, P^+) és a negatív (szemikinon formák, Q_A^- és Q_B^- , a redukált primer és szekunder kinon) töltések felhalmozódásának következtében. A gerjesztés után a proteinen belüli direkt töltésmozgásokat a fehérjeszerkezet lassabb reorganizációja követi. A P^+Q^- állapot megnövekedett élettartama a $P^+Q_A^- \leftrightarrow P^+Q_B^-$ csoportok közötti nagyobb szabad energia különbséget jelentheti. A stabil RC/NT bio-nanokompozit különböző gyakorlati felhasználások lehetőségét kínálja, például a mikroelektronikában, az analitikában, képalkotó rendszerekben, vagy az energia átalakításában és tárolásában.



40. ábra A RC kofaktorok elrendeződésének, a közöttük levő elektrontranszportnak, valamint a SWNT és RC közötti lehetséges kölcsönhatásnak a vázlata. A terbutrin (elektrontranszport inhibítor, herbicid) gátolja a Q_A és Q_B közötti elektron transzportot (az ábrán „X”-el jelölve).

6. Összegzés

Lipid kettősréteg szerepe

- 1) A RC-ot PC, PG és PC+CL lipidekből készített liposzómákba beültettük, és megmutattuk, hogy
 - a) az így készített vezikulák nagy valószínűséggel lipid kettősrétegből álló zárt vezikulák;
 - b) bennük a RC orientáció véletlenszerű.
- 2) A RC másodlagos kinonaktivitása (a P^+Q^- - PQ töltésrekombináció lassú komponensének az amplitúdója alapján értelmezve) a PC liposzómában nagyobb (84.4 %) az LDAO detergenshez (73.9 %) képest, PG liposzómában azonban kb 50%. Ez utóbbi valószínűleg a Q_B kötőhely hozzáférhetőségének csökkenésével magyarázható.
- 3) Megmértük és meghatároztuk a Q_A^- - Q_B előremenő elektrontranszport irodalomból (detergensben) ismert mindkét komponensét mind a PC, mind a PG rendszerben.
 - a) A gyorsfázisnak sem a részaránya (amplitúdója), sem az időállandója nem különbözött a liposzóma rendszerekben, jelezve, hogy az intrinsic elektrontranszfer valószínűleg hasonló mechanizmus alapján történik.
 - b) A lassú fázisban viszont lényeges különbség mutatkozott. A pozitív fejcsoportú PC-ban a sebességi állandó növekedett (gyorsabb elektrontranszport), a negatív töltésű PG-ban csökkent (lassabb elektrontranszport) az LDAO-hoz képest.
- 4) A negatív töltésű PG-ban a terbutrin csak részlegesen gátolja a Q_B oldal aktivitását.
- 5) Az anionikus lipidek specifikusan tudnak kötődni a RC-hoz.
 - a) A PG kötődése jól közelíthető Michaelis-Menten kinetikával, jelezvén, hogy feltehetően egy specifikus kötőhely lehet (vagy ha több van, azok kötési erőssége nem különbözik lényegesen).
 - b) A CL kötődése az alacsony koncentrációknál eltér a Michaelis-Menten kinetikától. Alacsony koncentrációnál igen erős (akár szubsztóchiometrikus) kötődés figyelhető meg.
- 6) PC liposzómában nem csak az első elektrontranszfer sebességi állandója növekedett, hanem a másodiké ($k_{AB}(2)$) is a detergenshez képest. Érdekes módon, a PG liposzómában is nőtt ez a sebességi állandó (az első elektrontranszferé jelentősen csökkent ebben a rendszerben).
- 7) A többszörös gerjesztés során a RC többszörös átfordulását a K_{AB} (elektronegyensúlyi) és K_q kinonegyensúlyi állandó szabja meg. A

membránkörnyezetben úgy tűnik, hogy a K_q a meghatározó tényező, ami igen kicsi a PG liposzómákban.

A töltésstabilizálódás energetikája lipidekben

- 8) A P^+Q^- - PQ töltésrekombináció lassú komponensének kinetikájából meghatároztam a Q_A és Q_B közötti szabadenergiakülönbséget PC és PG liposzómákban (-62, -77, -89 mV LDAO, PC és PG rendszerekben rendre). Ez a tendencia az in vivo állapothoz való közeledést jelenti, jelezvén, hogy ezek a lipidek fontos szerepet töltenek be a RC-n belüli töltésstabilizálódásban az élő szervezetben.
- 9) A K_{AB} hőmérsékletfüggéséből kiszámítottam a Q_A/Q_B állapotok közötti standard szabadentalpiakülönbségeket és a két állapot közötti entrópiakülönbséget a már ismert ΔG_{AB} felhasználásával.
 - a) A folyamatokat lényegében az entalpiaváltozás vezérli,
 - b) a ΔH -t lényegesen a CL csökkentette,
 - c) az entrópia hozzájárulás mindegyik lipidben kisebb volt a detergenshez képest, de csak a detergensben volt nagyobb a termikus szintnél ($k \cdot T = 25$ mV/mol).

Transzmembrán protongrádiens

- 10) Sikerült fluoreszkáló jelzőmolekulát (piranint) beépíteni liposzómába,
- a) az így elkészített lipoproteid vezikulák hosszú ideig stabilak maradtak szobahőmérsékleten is,
 - b) protonáteresztőképességük kb. 15-25%-ban sokáig megmaradt, ami további kalibrációk után alkalmas lehet arra, hogy membránpotenciált számolhassunk, illetve annak komponenseit szétválasszuk.

A fotoszintetikus RC és egyfalú szén nanocsövek kapcsolata

- 11) Sikerült a fotoszintetikus reakciócentrumokat egyfalú szén nanocsövekhez kapcsolni és az így kapott bio-nanokompozit (SWNT/RC) anyag fő spektroszkópiai tulajdonságait meghatározni;
- a) Ez a kapcsolat a fehérjén belüli elektrontranszportot jellemzően módosítja, a fénygerjesztés által kiváltott pozitív és negatív töltések felhalmozódását eredményezi.
 - b) A fehérjén belüli töltésmozgást követő relaxációs folyamatokra is hatással van.
 - c) A SWNT és a RC között a fénnel való gerjesztés után redoxkölcsonhatás lehetséges. Ez a jelenség különböző gyakorlati alkalmazások modellje lehet.

7. Közlemények

a) A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- 1) Francesco Milano, Márta Dorogi, Kornélia Szabéniyi, László Nagy, Péter Maróti, György Váró, Livia Giotta, Angela Agostiano and Massimo Trotta (2007) *Enthalpy/entropy driven activation of the first interquinone electron transfer in bacterial photosynthetic reaction centers embedded in vesicles of physiologically important phospholipids*, Bioelectrochemistry, 70, 1, 18-22 IF: 1.558
- 2) Márta Dorogi, Zoltán Bálint, Csilla Mikó, Klára Hernádi, László Forró, György Váró and László Nagy (2006) *Stabilization effect of single-walled carbon nanotubes on the functioning of photosynthetic reaction centers*, Journal of Physical. Chemistry. B , 110, 43, 21473-21479 IF: 4.033
- 3) Márta Dorogi, Francesco Milano, Kornélia Szabéniyi, György Váró, Livia Giotta, Massimo Trotta, Angela Agostiano, Péter Maróti, László Nagy (2005) *Reaction centers in lipids*, Acta Biologica Szegediensis, 49(1-2), 195-197
- 4) László Nagy, Francesco Milano, Márta Dorogi, Massimo Trotta, Gábor Laczkó, Kornélia Szabéniyi, György Váró, Angela Agostiano and Péter Maróti (2004) *Protein/lipid interaction in bacterial photosynthetic reaction center: The role of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in charge stabilization*, Biochemistry, 43, 40, 12913-12923 IF: 4.224
- 5) Márta Dorogi, Francesco Milano, Massimo Trotta, Angela Agostiano, György Váró, Péter Maróti and László Nagy, (2002) *Connection of charge stabilization with proton translocation in photosynthetic reaction center/liposome membranes*, XIXth IUPAC Symposium on Photochemistry – Budapest, P51, 187-188.
- 6) Francesco Milano, Massimo Trotta, Márta Dorogi, Béla Fischer, Livia Giotta, Angela Agostiano, Péter Maróti, László Kálmán, and László Nagy, (2008) *Measuring light generated transmembrane proton gradient in photosynthetic reaction center/artificial lipid vesicles (in prep.)*

b) Egyéb kölemények

- 1) Hiroko Ohmori, László Nagy, Márta Dorogi and Masahide Terazima (2008) *Charge stabilization in reaction center protein investigated by optical heterodyne detected transient grating spectroscopy*, accepted to Eur. Biophys. J. with Biophys. Lett., 37, Pages: 1167-1174 IF: 1.857
- 2) László Nagy, Márta Dorogi, Hiroko Ohmori, Masahide Terazima and Smuel Malkin (2005) *Photoacoustic and thermal grating investigations of charge stabilization in reaction center protein*, Proceedings of Forum Acusticum, Budapest, 2005, 790

c) Oktatási anyag:

- 1) Dorogi Márta, Szabényi Kornélia, Nagy László (2004) Abszorpciós kinetikai mérések alkalmazása a fotoszintetikus reakciócentrumban végbemenő elektrontranszport-folyamatok jellemzésére, <http://fotoszintezis.szbk.u-szeged.hu/fototan/fototan.htm>

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Nagy László egyetemi docensnek, témavezetőmnek a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségét, rendkívül értékes tanácsait és türelmét. Köszönök mindent, amit közös munkáink során tőle megtanulhattam, elleshettem, és köszönöm a sok tartalmas szakmai beszélgetést. Hálás vagyok azért, hogy látott bennem lehetőséget, felkarolt, és megtanította nekem az alapokat, és annál még sokkal többet.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Maróti Péter egyetemi tanárnak, a biológia tudományok doktorának, hogy a tanszékén dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Váró Györgynek az SZBK Biofizikai Intézet tudományos főmunkatársának segítségét, a 771 nm-es mérések elkészítésében.

Köszönöm Dr. Bálint Zoltánnak a Graz-i Orvostudományi Egyetem Orvosi Alapkutatói Központ tudományos munkatársának a sok tanácsot, biztatást, és az AFM-es képek elkészítését.

Köszönetemet fejezem ki Massimo Trotta-nak és Francesco Milano-nak, a University of Bari, Department of Chemistry, munkatársainak azért, hogy laboratóriumukban dolgozhattam.

Köszönöm Szebényi Kornéliának, hogy szegedi éve alatt érdeklődött munkám iránt.

Hálás vagyok továbbá Dunai Péternének, aki körültekintően elrendezte az adminisztrációval kapcsolatos ügyeim az egyetemen töltött évek alatt.

Köszönöm Laskayné Tóth Judit laboránsoknak, hogy laboránsi munkaköre lelkiismeretes és odaadó ellátásával gördülékennyé tette a munkát számomra.

Külön köszönettel tartozom Dr. Vass Imrének az SZBK Növénybiológiai Intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette, hogy dolgozatomat intézetében befejezhettem, és segítségével folytathatom kutatói pályámat az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében.

Szeretném kifejezni köszönetemet Szüleimnek, akiknek önfeláldozó segítsége nélkül nem juthattam volna el idáig.

Férjemnek tartozom még köszönettel, hogy mindvégig mellettem állt, és tanácsaival segítségemre volt a dolgozat elkészítésében.

9. Irodalomjegyzék

- Allen, J. P., G. Feher, T. O. Yeates, H. Komiya, and C. D. Rees. 1987. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 84:6162-6166.
- Aro, E. M., I. Virgin, and B. Andersson. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143:113-134.
- Barlic, A., I. Gutierrez-Aguirre, J. M. M. Caaveiro, A. Cruz, M. B. Ruiz-Arguello, J. Perez-Gil, and J. M. Gonzalez-Manas. 2004. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. *Journal of Biological Chemistry* 279:34209-34216.
- Batterton, J. C. and C. Van Baalen. 1971. Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration. *Archives of Microbiology* 76:151-165.
- Baxter, R. H. G., N. Ponomarenko, V. Srajer, R. Pahl, K. Moffat, and J. R. Norris. 2004. Time-resolved crystallographic studies of light-induced structural changes in the photosynthetic reaction center. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:5982-5987.
- Baxter, R. H. G., B. L. Seagle, N. Ponomarenko, and J. R. Norris. 2005b. Cryogenic structure of the photosynthetic reaction center of *Blastochloris viridis* in the light and dark. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61:605-612.
- Baxter, R. H. G., B. L. Seagle, N. Ponomarenko, and J. R. Norris. 2005a. Cryogenic structure of the photosynthetic reaction center of *Blastochloris viridis* in the light and dark. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61:605-612.
- Breton, J. 2007. Steady-state FTIR spectra of the photoreduction of Q(A) and Q(B) in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers provide evidence against the presence of a proposed transient electron acceptor X between the two quinones. *Biochemistry* 46:4459-4465.
- Breton, J., M. C. Wakeham, P. K. Fyfe, M. R. Jones, and E. Navedryk. 2004. Characterization of the bonding interactions of Q_B upon photoreduction via A-branch or B-branch electron transfer in mutant reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1656:127-138.

- Britto, P. J., K. S. V. Santhanam, and P. M. Ajayan. 1996. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41:121-125.
- Camara-Artigas, A., D. Brune, and J. P. Allen. 2002. Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 99:11055-11060.
- Clayton, R. K. 1978. Effects of dehydration on reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* 504:255-264.
- Collins, P. C., M. S. Arnold, and P. Avouris. 2001. Engineering carbon nanotubes and nanotube circuits using electrical breakdown. *Science* 292:706-709.
- Davis, J. J., K. S. Coleman, B. R. Ayamian, C. B. Bagshaw, and M. L. H. Green. 2003. Chemical and biochemical sensing with modified single walled carbon nanotubes. *Chemistry-A European Journal* 9:3732-3739.
- Davis, J. J., R. J. Coles, and H. A. O. Hill. 1997. Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 440:279-282.
- Deamer, D. W. and J. W. Nichols. 1989. Proton flux Mechanisms in model and biological-membranes. *Journal of Membrane Biology* 107:91-103.
- Deisenhofer, J. and H. Michel. 1989. The Photosynthetic Reaction Center from the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Science* 245:1463-1473.
- Dorogi, M., Z. Balint, Cs. Miko, B. Vilenó, M. Milas, K. Hernadi, L. Forró, Gy. Varó, and L. Nagy. 2006. Stabilization Effect of Single-Walled Carbon Nanotubes on the Functioning of Photosynthetic Reaction Centers. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 110:21473-21479.
- Fathir, I., T. Mori, T. Nogi, M. Kobayashi, K. Miki, and T. Nozawa. 2001. Structure of the H subunit of the photosynthetic reaction center from the thermophilic purple sulfur bacterium, *Thermochromatium tepidum* Implications for the specific binding of the lipid molecule to the membrane protein complex. *European Journal of Biochemistry* 268:2652-2657.
- Feher, G., J. P. Allen, M. Y. Okamura, and C. D. Rees. 1989. Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres. *Nature* 111-116.
- Feher, G. and M. Y. Okamura. 1978. Chemical composition and properties of reaction centers. *The photosynthetic bacteria, Plenum, New York* 349-386.

- Gallagher, M. J., D. Chen, B. P. Jacobsen, D. Sarid, L. D. Lamb, F. A. Tinker, J. Jiao, D. R. Huffman, S. Seraphin, and D. Zhou. 1993. Characterization of Carbon Nanotubes by Scanning Probe Microscopy. *Surface Science* 281:L335-L340.
- Gensure, R. H., M. L. Zeidel, and W. G. Hill. 2006. Lipid raft components cholesterol and sphingomyelin increase H^+/OH^- permeability of phosphatidylcholine membranes. *Biochemical Journal* 398:485-495.
- Gombos, Z., Zs. Varkonyi, M. Hagio, M. Iwaki, L. Kovacs, K. Masamoto, S. Itoh, and H. Wada. 2002. Phosphatidylglycerol Requirement for the Function of Electron Acceptor Plastoquinone Q_B in the Photosystem II Reaction Center. *Biochemistry* 41:3796-3802.
- Graige, M. S., G. Feher, and M. Y. Okamura. 1998. Conformational gating of the electron transfer reaction $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ in bacterial reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* determined by a driving force assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 95:11679-11684.
- Hagio, M., Z. Gombos, Zs. Varkonyi, K. Masamoto, N. Sato, M. Tsuzuki, and H. Wada. 2000. Direct Evidence for Requirement of Phosphatidylglycerol in Photosystem II of Photosynthesis. *Plant Physiology* 124:795-804.
- Halmschlager, A., M. Trotta, J. Tandori, L. Rinyu, I. Pfeiffer, and L. Nagy. 2002. A mathematical model for quinone-herbicide competition in the reaction centres of *Rhodobacter sphaeroides*. *Functional Plant Biology* 29:443-449.
- Iijima, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354:56-58.
- Kalman, L., T. Gajda, P. Sebban, and P. Maroti. 1997. pH-Metric Study of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria in Micellar Solutions: Protonatable Groups Equilibrate with the Aqueous Bulk Phase. *Biochemistry* 36:4489-4496.
- Kalman, L. and P. Maroti. 1994. Stabilization of Reduced Primary Quinone by Proton Uptake in Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 33:9237-9244.
- Karajanagi, S. S., D. Y. Kim, R. S. Kane, and J. S. Dordick. 2004. Enzyme-nanotube conjugates as functional nanomaterials. *Abstracts of Papers American Chemical Society* 227:U890.
- Kleinfeld, D., M. Y. Okamura, and G. Feher. 1985. Electron transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. II. Free energy and kinetic relations between the acceptor states Q_A Q_{off} and $Q_AQ_B^{2-}$. *Biochimica et Biophysica Acta* 809:291-310.

- Koepke, J., E. M. Krammer, A. R. Klingen, P. Sebban, G. M. Ullmann, and G. Fritzsche. 2007. pH modulates the quinone position in the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* in the neutral and charge separated states. *Journal of Molecular Biology* 371:396-409.
- Krishnamoorthy, I. and G. Krishnamoorthy. 2001. Probing the link between proton transport and water content in lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B* 105:1484-1488.
- Kroto, H. W., J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, and R. E. Smalley. 1985. C-60 - Buckminsterfullerene. *Nature* 318:162-163.
- Kruse, O. and G. H. Schmid. 1995. The role of phosphatidylglycerol as a functional effector and membrane anchor of the D1-core peptide from photosystem-II particles of the cyanobacterium *oscillatoria-chalybea*. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 50:380-390.
- Lakatos, M., G. Groma, C. Ganea, J. K. Lanyi, and Gy. Varo. 2002. Characterization of the Azide-Dependent Bacteriorhodopsin-Like Photocycle of *Salinarum* Halorhodopsin. *Biophysical Journal* 82:1687-1695.
- Lancaster, C. R. D. and H. Michel. 1997. The coupling of light-induced electron transfer and proton uptake as derived from crystal structures of reaction centres from *Rhodospseudomonas viridis* modified at the binding site of the secondary quinone, Q(B). *Structure* 5:1339-1359.
- Lande, M. B., J. M. Donovan, and M. L. Zeidel. 1995. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *Journal of General Physiology* 106:67-84.
- Li, J., D. Gilroy, D. M. Tiede, and M. Gunner. 1997. Kinetic Phases in the Electron Transfer from $P^+Q_A^-Q_B^-$ to $P^+Q_AQ_B^-$ and the Associated Processes in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 Reaction Centers. *Biochemistry* 37:2818-2829.
- Mancino, L. J., D. P. Dean, and R. E. Blankenship. 1984. Kinetics and thermodynamics of the $P_{870}^+Q_A^- \rightarrow P_{870}^+Q_B^-$ reaction in isolated reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* 764:46-54.
- Maroti, P. 1991. Electron transfer and proton uptake of photosynthetic bacterial reaction centres reconstituted in phospholipid vesicles. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 8:263-277.
- McAuley, K. E., P. K. Fyfe, J. P. Ridge, N. W. Isaacs, R. J. Cogdell, and M. R. Jones. 1999. Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 96:14706-14711.

- Mezzetti, A., E. Navedryk, J. Breton, M. Y. Okamura, M. L. Paddock, G. Giacometti, and W. Leibl. 2002. Rapid-scan Fourier transform infrared spectroscopy shows coupling of GLu-L212 protonation and electron transfer to Q_B in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1553:320-330.
- Nagy, L., E. Fodor, J. Tandori, L. Rinyu, and T. Farkas. 1999. Lipids affect the charge stabilization in wild-type and mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Australian Journal of Plant Physiology* 26:465-473.
- Nagy, L., F. Milano, M. Dorogi, A. Agostiano, G. Laczko, K. Szebenyi, Gy. Varo, M. Trotta, and P. Maroti. 2004. Protein/Lipid Interaction in the Bacterial Photosynthetic Reaction Center: Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol Modify the Free Energy Levels of the Quinones. *Biochemistry* 43:12913-12923.
- Nagy, L., A. Puskas, J. Tandori, M. Droppa, and G. Horvath. 1991. Effect of DCMU on photosynthetic purple bacteria. *Photosynthetica* 25:167-171.
- Nogi, T., I. Fathir, M. Kobayashi, T. Nozawa, and K. Miki. 2000. Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: Thermostability and electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 97:13561-13566.
- Ohmori, H., L. Nagy, M. Dorogi, and M. Terazima. 2008. Charge stabilization in reaction center protein investigated by optical heterodyne detected transient grating spectroscopy. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 37:1167-1174.
- Ollivon, M., S. Lesieur, C. Grabielle-Madelmont, and M. Paternostre. 2000. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1508:34-50.
- Paddock, M. L., G. Feher, and M. Y. Okamura. 1991. Reaction centers from three herbicide resistant mutants of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Kinetics of electron transfer reactions. *Photosynthesis Research* 27:109-119.
- Paddock, M. L., S. H. Rongey, P. H. McPherson, A. Juth, G. Feher, and 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 Dihydroquinone. *Biochemistry* 33:734-745.
- Palazzo, G., A. Mallardi, M. Giustini, D. Berti, and G. Venturoli. 2000. Cumulant Analysis of Charge Recombination Kinetics in Bacterial Reaction Centers Reconstituted into Lipid Vesicles. *Biophysical Journal* 79:1171-1179.

- Remy, A. and K. Gerwert. 2003. Coupling of light-induced electron transfer to proton uptake in photosynthesis. *Nature Structural Biology* 10:673-644.
- Riegler, J. and H. Mohwald. 1986. Elastic interactions of photosynthetic reaction center proteins affecting phase-transitions and protein distributions. *Biophysical Journal* 49:1111-1118.
- Rinyu, L., E. W. Martin, E. Takahashi, P. Maroti, and C. A. Wraight. 2004. Modulation of the free energy of the primary quinone acceptor (Q_A) in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: contributions from the protein and protein-lipid(cardiolipin) interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1655:93-101.
- Sato, N., M. Hagio, H. Wada, and M. Tsuzuki. 2000. Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 97:10655-10660.
- Sebban, P., P. Maroti, M. Schiffer, and D. K. Hanson. 1995. Electrostatic Dominoes: Long Distance Propagation of Mutational Effects in Photosynthetic Reaction Centers of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* 34:8390-8397.
- Sotiropoulou, S. and N. A. Chaniotakis. 2002. Carbon nanotube array-based biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375:103-105.
- Sturgis, N. J. and A. R. Niederman. 2008. Atomic force microscopy reveals multiple patterns of antenna organization in purple bacteria: implications for energy transduction mechanisms and membrane modeling. *Photosynthesis Research* 95:269-278.
- Taly, A., L. Baciou, and P. Sebban. 2002. The DMPC lipid phase transition influences differently the first and the second electron transfer reactions in bacterial reaction centers. *FEBS Letters* 532:91-96.
- Tandori, J., L. Nagy, and P. Maroti. 1991. Semiquinone oscillation as a probe of quinone herbicide binding in bacterial reaction centers. *Photosynthetica* 25:159-166.
- Tandori, J., L. Nagy, A. Puskas, M. Droppa, G. Horvath, and P. Maroti. 1995. The IleL229 -> Met mutation impairs the quinone binding to the QB-pocket in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis Research* 45:135-146.
- Thewalt, J., N. Kitson, C. Araujo, A. Mackay, and M. Bloom. 1992. Models of Stratum-Corneum Intercellular Membranes - the Sphingolipid Headgroup Is A Determinant of Phase-Behavior in Mixed Lipid Dispersions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188:1247-1252.

- Tiede, D. M., J. Vazquez, J. Cordova, and P. A. Marone. 1996. Time-resolved electrochromism associated with the formation of quinone anions in the *Rhodobacter sphaeroides* R26 reaction center. *Biochemistry* 35:10763-10775.
- Trotta, M., F. Milano, L. Nagy, and A. Agostiano. 2002. Response of membrane protein to the environment: the case of photosynthetic Reaction Centre. *Materials Science & Engineering C-Biometric and Supramolecular Systems* 22:263-267.
- Wakeham, M. C., R. B. Sessions, M. R. Jones, and P. K. Fyfe. 2001. Is There a Conserved Interaction between Cardiolipin and the Type II Bacterial Reaction Center? *Biophysical Journal* 80:1395-1405.
- Wraight, C. A. and R. R. Stein. 1980. Redox equilibrium in the acceptor quinone complex of isolated reaction centers and the mode of action of *O*-phenanthroline. *FEBS Letters* 113:73-77.

Összefoglaló

1. Bevezetés

A fotoszintézis során az autotróf élőlények: növények és egyes baktériumok; a Nap fényenergiájának segítségével szerves vegyületeket, és oxigént állítanak elő. A fény begyűjtését, majd átadását a fotoszintetikus reakciócentrumok nagy részénél klorofillmolekulák végzik. Mivel a fotoszintéziskor lejátszódó fényenergia átalakítása kémiai potenciállá egyike a természetben megtalálható alapvető folyamatoknak, a folyamat intenzív kutatás tárgya napjainkban is. Az utóbbi húsz év technikai fejlődése ((opto)elektronika, számítástechnika, molekuláris biológia, stb.) különös fellendülést hozott a részletek kutatásában.

Az intenzív kutatásoknak köszönhetően alapos ismeretanyag gyűlt össze a töltésszétválasztásról és -stabilizálódásról, amelyek az izolált reakciócentrum-fehérjében (RC) is lejátszódnak. A bakteriális RC kristályosításáért 1988-ban (Michel, Deisenhofer, Huber), a nagytávolságú elektrontranszfer elméletéért 1993-ban (Marcus) kaptak Nobel-díjat. Nagymennyiségű adat elsősorban izolált rendszerekről, detergensbe ágyazott RC-ok működéséről áll rendelkezésünkre. Kevésbé ismert azonban a fehérje szerkezete és funkciója a membránban, különösen *in vivo*, és az, hogy miként indukálja a fény a redox reakciókat a csatolt proton átadási folyamatokkal, amelyek jelentősek a membrán energizálásában.

Mindezek mellett különleges figyelmet kap újabban az az elképzelés, hogy biológiai anyagok, például fehérjék hatékony komponensei lehetnek olyan rendszereknek, melyekben a különleges tulajdonsággal bíró szerves anyagok (pl. szén nanocsövek) is részt vesznek. Kézenfekvő tehát a két rendszerből egy újfajta, ún. bio-nanokompozit előállítás, mely sikeresen ötvözné mindkét anyag értékes tulajdonságait. A RC előnyös tulajdonságai között kell megemlítenünk azt, hogy benne a fénnel való gerjesztés hatására közel 100% hatékonysággal töltésszétválasztás történik, és azt, hogy jellemző fényelnyelése a közeli infravörös tartományban van. A szén nanocsövek kivételes elektromos vezetési sajátosságokkal rendelkeznek. Az egyfalú szén nanocsövekben a félvezető és fém

vezetési tulajdonságok keverednek, míg a többfalú szén csövek fémek vezetői. Vannak irodalmi adatok arra is, hogy a szén nanocsövek redoxreakciókat katalizáló enzimekkel redox-kapcsolatban lehetnek (pl. glükózoxidázzal). Rendkívüli lehetőség adódik arra, hogy a RC-ban létrejövő fényindukált elektrontranszport és a szén nanocsövek redoxtulajdonságait összekapcsoljuk.

A szénnanocsövek, közülük is elsősorban az egyfalú szén nanocsövek (SWNT) egydimenziós elektromos és strukturális adottságaik miatt számos felhasználási lehetőséget kínálnak, pl. a nanoelektronikában. A figyelem megalapozott, mert: az SWNT hatására a biológiai anyag (pl. fehérje) szerkezetében és működésében specifikus változások következhetnek be. Az így nyert komplex egyedi elektromos tulajdonságai miatt alkalmas lehet különböző specifikus feladatok megoldására, pl. energiaátalakításra és energia tárolására.

A RC/lipoproteid és a RC/szénnanocső komplexek érdekes és meglepő összehasonlításra adhatnak alapot. Mindkét rendszer a nanoszkópikus mérettartományba tartozik, amely ezzel együtt különleges tulajdonságokat is kölcsönöz ezeknek a rendszereknek. Ebből a szempontból nem elhanyagolhatóak a rövidtávú, közvetlen kölcsönhatások (pl. a RC kapcsolata a közvetlen környezetében levő lipidekkel, vagy a RC-szénnanocső kölcsönhatások), de a rendszer egészére kiterjedő a tulajdonságai sem. Példának említhetjük azt, hogy a szén nanocső/RC kapcsolat következtében az egész komplex elektromos tulajdonsága megváltozhat, mint ahogyan a RC/zárt vezikuláris rendszeré is. Dolgozatomban a két rendszer előnyös tulajdonságait is megpróbálom kihasználni.

2. Irodalmi áttekintés

A fotoszintézis az egyetlen folyamat a természetben, amely során nagyobb mennyiségű napenergia tárolódik. Ez az alapvető energiaátalakítási folyamat teszi lehetővé a fotoszintetizáló baktériumok és növények növekedését és szaporodását, amennyiben rendelkezésre áll a kellő mennyiségű széndioxid, víz és ezekhez képest csekélyebb mennyiségben bizonyos ásványi anyagok.

Baktériumokban a fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai lényegesen egyszerűbbek, mint növényekben. Amíg növényekben két fotokémiai

reakciócentrum működik, addig baktériumokban csak egy. A bíborbaktériumok RC-a a növények PSII fotokémiai rendszerével mutat nagymértékű hasonlóságot. A fotoszintetikus RC intracitoplazmatikus membránrendszerbe (ún. kromatoforákba) ágyazott pigment-protein komplex, amely fehérje-alegységekből és redox-tulajdonságokkal rendelkező kofaktorokból áll. A “fehérjevázhoz” nem-fehérjetermészetű redoxaktív pigmentmolekulák, ún. kofaktorok is kapcsolódnak: négy bakterioklorofill (BChl), két bakteriofeofitin (BPheo), elsődleges kinon (Q_A), másodlagos kinon (Q_B), nem-hem típusú vas (Fe^{2+}).

A négy BChl közül a két legközelebbi dimert alkot (SP), és mint elsődleges elektrondonor vesz részt a redox-folyamatokban, a másik kettő pedig monomerként helyezkedik el az elektrontranszport láncban. Részletesebb áttekintésként lásd pl. (Allen és mtsai., 1987) publikációt.

A kofaktorok két, a bakterioklorofill dimeren és a Fe^{2+} -on átmenő, a membránra merőleges síkra vonatkoztatott, megközelítőleg tükörszimmetrikus ágat (A és B) alkotnak. Ezek közül azonban csak az A-ág aktív. A kinonok két elektronnal redukálhatók, és a kettős redukció után két proton felvételére képesek. Jól definiált középponti redoxpotenciállal rendelkeznek, középponti potenciáljuk azonban erősen függ a környezet polarizálhatóságától (dielektromos állandójától) és protonálhatóságától (az oldószer protikus vagy aprotikus voltától). Mivel környezetük erősen különbözik, a Q_A és Q_B redox- és kötési tulajdonságai jelentősen eltérnek. A Q_A a fehérje erősen hidrofób környezetében található, egy elektronnal redukálható, a RC-hoz erősen kötődik, és onnan csak nehezen választható le. A Q_B környezetében sok a vízmolekula, a protonálható aminosavak gyűrűként veszik körbe a pK-juknak megfelelően. Redukciójához két elektron szükséges (két H^+ felvétele mellett), majd az így képződött dihidrokinol (QH_2) a RC-ről leválik, helyébe újabb (oxidált) kinon kerül a membrán kinon-raktárából (Feher és mtsai., 1989; Paddock és mtsai., 1994).

^{14}C -gyel jelölt detergenssekkel (Feher és Okamura, 1978) és strukturális adatokkal (Deisenhofer és Michel, 1989) igazolható volt, hogy a RC körül viszonylag keskeny (kb. 3 nm) hidrofób zóna alakul ki, amely néhány száz detergens- vagy lipidmolekulával való kölcsönhatást tesz lehetővé. Ezek a kölcsönhatások a kofaktorokra különböző hatásokkal lehetnek. A primer donor a periplaz-

matikus felszínhez közelebb, a pigment-protein komplex belsejében helyezkedik el. A Q_A , az intracitoplazmatikus felszínhez ugyan közelebb van, ám meglehetősen jól beágyazva egy apoláris, a H-alegység által védett környezetbe (Feher és mtsai., 1989; Deisenhofer és Michel, 1989). A Q_B ezzel szemben közelebb van a citoplazmatikus felszínhez. A környezetében számos ionizálható, protonációra/deprotonációra képes aminosav oldallánc van (Kalman és Maroti, 1994), így a redoxpotenciálja nagyon érzékenyen változik a környezeti hatásokra, és az esetleges lipidösszetétel változásaira is. A Q_B redukciója (mind az első, mind a második elektronnal) protonok felvételével jár együtt, amelyben fontos szerepet játszanak a környezetében lévő protonálható aminosav oldalláncok.

Természetesen a fő célunk az, hogy megértsük, milyen a RC szerkezete és hogyan működik az élő membránban. Az élő membrán összetettsége azonban nagyon megnehezíti annak az eldöntését, hogy milyen komponensek, milyen hatások befolyásolják a RC-szerkezetét és működését.

A különböző foszfolipidek (1,2-Dimyrisztoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DPPC), 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (POPC), szójabab, vagy tojássárgája lecitin) széles körben használtak a biológiai membránok funkciójának és szerkezetének modellezésénél. A foszfatidilkolin (PC) és a foszfatidilglicerol (PG) jelentős mennyiségben megtalálható a fotoszintetikus baktériumok membránjaiban (Nagy és mtsai., 1999), a kardiolidnek (CL) specifikus jelentősége is lehet a fotoszintetikus apparátus működésében. Mivel a CL két foszfatidilglicerol-molekulából áll, szerepének kiderítésében jelentősége lehet annak a megfigyelésnek, hogy cianobaktériumokban a PG az elektronnak a Q_B -n történő stabilizálódását befolyásolhatja (Gombos és mtsai., 2002; Hagio és mtsai., 2000).

A POPC speciális figyelmet kaphat, mert fiziológiai hőmérsékleten folyékony fázisba vihető (fázisátmeneti hőmérséklete -2.6 ± 2.1 °C). Ugyanakkor az általunk alkalmazott rendszer fázissajátságait nehéz megjósolni az elég nagy mennyiségben jelenlevő koleszterin, ubikinon és RC miatt. A (Thewalt és mtsai., 1992a) által POPC/Chol rendszerre bemutatott fázisdiagram alapján azonban valószínűsíthetjük, hogy az általunk vizsgált rendszerben a gél és a folyadékkristályos fázisok keveredése fordulhat elő.

A membrán protonátersztő képessége függhet a membrán fizikai/kémiai paramétereitől (pl. fluiditásától), mikroszerkezetétől (éppen melyik fázisban található, milyen kompartmentek lehetnek benne), fehérjetartalomtól, és egyéb molekulafajták (pl. szabad zsírsavak, koleszterin) jelenlététől (Lande és mtsai., 1995; Deamer és Nichols, 1989; Krishnamoorthy és Krishnamoorthy, 2001). A koleszterinek kitüntetett szerepe van a protonátersztőképesség befolyásolásában (Lande és mtsai., 1995; Gensure és mtsai., 2006). A koleszterin jelenléte csökkenti a protonátersztőképességet, de egy bizonyos koncentráció fölött, feltehetően a koleszterin domének megjelenése miatt az ugrásszerűen megnő. A fehérjék jelenléte is növelheti a protonátersztőképességet. Ennek valószínű oka az, hogy jelenlétükben nő a membrán heterogenitása, megváltozik a doménszerkezete, környezetükben megváltozik a mikrostruktúra (Barlic és mtsai., 2004; Riegler és Mohwald, 1986).

A lipid környezetén kívül egyéb nanostruktúrák is befolyásolhatják a RC működését. Mit is jelenthet a szén nanocső környezet?

Mind az egyfalú, mind a többfalú szénnanocsővekből különböző polimerekkel vagy szervesetlen vegyületekkel kombinálva kompozitok hozhatók létre. Ezeket az anyagokat igen széles körben használják fel: a szénnanocsővekkel megerősített, fém-mátrixú kompozitoknak egyedülálló mechanikai tulajdonságai vannak; templátként alkalmazzák szervesetlen nanoszerkezetek előállítására; ezen kívül felmerült annak lehetősége, hogy a nanocsőveket elektromos egységként elemekben és szenzorokban is kompozit anyagként felhasználják.

Az előzőekben felsorolt alkalmazási területek mellett speciálisabb felhasználást jelent a szénnanocsővek kompozitjainak előállítása biológiai anyagokkal, amelyre azok optimális fizikai tulajdonságain kívül megfelelő elektronszerkezete miatt van lehetőség.

Kisméretű proteinek nanocső-felülethez való kötődésével bioelektrokémiai reakciók katalizálhatók (Britto és mtsai., 1996; Davis és mtsai., 1997), 7. ábra). A nagymértékben rendezett szén nanocsővek immobilizációs mátrixként, vagy mediátorként alkalmazhatók harmadik generációs amperometriás bioszenzor készülékek kifejlesztésénél (Sotiropoulou és Chaniotakis, 2002). A szénnanocsővek egydimenziós elektronszerkezete alkalmas lehet a heterogén

elektron transzfer reakciók tanulmányozására (pl. amikor különleges biomolekulák képesek elektronikus kommunikációra a határfelületen). Már vannak eredményes kísérletek, melyekben redox aktív fehérjék prosztetikus csoportja és a nanocsövek felülete közötti elektrontranszfert tudtak kimutatni (Davis és mtsai., 2003). A vizsgálatok azt mutatták, hogy a fehérje szerkezetét és funkcióját nagymértékben befolyásolja a nanocső környezet. A szójabab peroxidáz aktivitásának 30%-a, az α-kimotripszin aktivitásának csupán 1%-a marad meg, ha ezek a proteinek az SWNT-höz kötődnek (Karajanagi és mtsai., 2004).

3. Célkitűzések

Lipid kettősréteg szerepének meghatározása

- 1) A fotoszintetikus RC foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-glicerol (PG) és PC + kardiolipin (CL) lipidekből készített liposzómákba ültetése, és annak a megmutatása, hogy
 - a) az így készített rendszerek nagy valószínűséggel lipid kettősrétegből álló zárt vezikulák;
 - b) bennük a RC orientációja valószínűleg véletlenszerű.
- 2) A RC másodlagos kinonaktivitásának meghatározása PC és PG liposzómákban (a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció lassú komponensének az amplitúdója alapján).
- 3) A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ előremenő elektrontranszport detergensben mért, irodalomból ismert paramétereinek (gyors- és lassúfázis részaránya, időállandói) meghatározása mind a PC, mind a PG rendszerben.
- 4) Az anionikus lipidek RC-hoz való specifikus kötődési helyeinek meghatározása.
- 5) A többszörös gerjesztés során a RC többszörös átfordulásának jellemzése különböző membránkörnyezetekben.

A töltésstabilizálódás energetikája lipidekben

- 6) A $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltésrekombináció lassú komponensének kinetikájából a Q_A és Q_B közötti szabadenergiakülönbségek meghatározása PC és PG liposzómákban
- 7) A K_{AB} hőmérsékletfüggéséből a Q_A/Q_B állapotok közötti standard szabadentalpiakülönbségek és a két állapot közötti entrópiakülönbség kiszámítása.

Transzmembrán protongradiens

- 8) Fluoreszkáló jelzőmolekula (piranin) liposzómába való beépítésével a transzmembrán protongradiens kiépülésének, és fennmaradásának kimutatása, kinetikájának meghatározása.

A fotoszintetikus RC és egyfalú szén nanocsövek kapcsolata

- 9) A fotoszintetikus reakciócentrumok egyfalú szén nanocsövekhez kapcsolása és az így kapott bio-nanokompozit (SWNT/RC) anyag fő spektroszkópai tulajdonságainak meghatározása.

4. Anyagok és módszerek

RC fehérje tisztítása

Rhodobacter sphaeroides R-26 karotinoidmentes törzs, reakciócentrumának izolálásánál és tisztításánál standard fehérje-tisztítási módszereket alkalmaztam: a sejteket ultrahanggal törtem fel, a membrán-fragmentumokat (kromatoforát) ultracentrifugálással nyertem, végül a RC-ot LDAO detergenssel oldottam ki, és ammónium-szulfátos kicsapással, valamint DEAE-Sephacell ioncserélő oszlopkromatográfiával tisztítottam.

Lipoproteid rendszerek preparálása

A tisztított RC-okat PC, illetve PG alapú vezikulákba helyeztem. PC/PG, foszfatidilinozitol (PI), UQ₁₀ (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaisoprenol-*p*-benzoquinone) és koleszterin megfelelő mennyiségű és koncentrációjú kloroformos oldatait kevertem össze. A keverés után lipideket nitrogénárammal Eppendorf-cső falára szárítottam. (Ollivon és mtsai., 2000b; Trotta és mtsai., 2002).

Ezek után a csövekbe 500 µl Na-kolát-puffert (Ch) (5 mM KCl, 5 mM K-foszfát, 1 mM piranin, pH:6.8, + 4% nátrium-kolát) mértem és 3*7 percig folyamatos ultrahanggal kezeltem. Az így elkészített Ch/lipid alapú kevert micellákhoz adtam a fotoszintetikus reakciócentrum LDAO detergenses oldatát, majd vortex-szel egy percig intenzíven kevertettem. A kevert micellákat tartalmazó mintát először 5 mM foszfátot, 5 mM KCl-ot és 1 mM piranint tartalmazó pufferrel (pH: 6.8) ekvibrált Sephadex G-50 molekulaszűrőre vittem, és ugyanezzel a pufferrel eluáltam. Az összegyűjtött frakcióban a RC már zárt vezikulákba épült be, de a vezikulák mindkét oldalán levő térben (mind a vezikulák belsejében mind pedig azon kívül) megtalálható a piranin jelzőmolekula a kiindulási koncentráció szerint. A főfrakciót újabb kromatográfiás eljárásnak

vettem alá, mely az elsőtől csupán abban különbözött, hogy a puffer nem tartalmazott piranint. Ebben az esetben is jól el tudtuk különíteni egy központi frakciót, melyben a számunkra fontos RC/lipid együttesek nagyobbik része került. (Trotta és mtsai., 2002; Nagy és mtsai., 2004).

Fényindukált abszorpcióváltozás mérése:

A minták aktív RC-koncentrációját és a töltésrekombináció kinetikáját abszorpcióváltozás alapján határoztam meg, házikészítésű egysugaras spektrofotométerrel. A flash-indukált abszorpcióváltozás az egyszeri töltésszétválasztás kinetikájának spektrofotometriás vizsgálatainál rutinszerűen használható (Tandori és mtsai., 1995; Tandori és mtsai., 1991; Lakatos és mtsai., 2002). A P/P⁺ BChl dimer elsődleges elektrondonor és a Q/Q⁻ akceptor komplex kinonjai redoxállapotairól általában a 430, 450, 603, 860 nm-nél mért abszorpcióváltozás kinetikái, illetve a BPheo 771 nm-nél mért elektrokróm eltolódásának a kinetikája tájékoztat (Nagy és mtsai., 1999; Tandori és mtsai., 1995; Tiede és mtsai., 1996)

Abszorpcióváltozás adatainak kiértékelése

A vizsgált reakciók többsége elsőrendű folyamatként kezelhető, így exponenciális függvénnyel írható le. A kinetikák általában több fázist is tartalmaznak (több exponenciális összegeként kezelhetők):

$$A_t = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-k_i \cdot t}$$

ahol A_t az amplitúdó időfüggése, A_i az i -edik komponens amplitúdója a $t = 0$ időpontban, k_i pedig, a sebességi állandója.

A kinetikai paraméterekből a $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ elektrontranszport ΔG^0 szabadenergiaváltozása, azaz a töltés stabilizációs energiája is kiszámolható. A folyamat $K_{AB} = [Q_A Q_B^-] / [Q_A^- Q_B]$ egyensúlyi állandója a mért k_{AP} és k_{BP} időállandókból kiszámolható: $K_{AB} = k_{AP} / k_{BP} - 1$. Az egyensúlyi állandó ismeretében pedig: $\Delta G_{AB}^0 = -k_B \cdot T \cdot \ln K_{AB}$, ahol k_B a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet (Wraight és Stein, 1980; Kleinfeld és mtsai., 1985).

A szemikinin keletkezésének és eltűnésének bináris oszcillációja lényegében két paraméterrel a K_e elektronegyensúlyi ($K_e = [Q_A Q_B^-] / [Q_A^- Q_B]$) és K_q kinonegyensúlyi állandóval ($K_q = [Q_A Q_B] / [Q_A \dots] = [Q_A^- Q_B] / [Q_A^- \dots]$) kielégítően leírható (Tandori és mtsai., 1991; Nagy és mtsai., 1999; Halmschlager és mtsai., 2002). Itt $[Q_A \dots]$ és $[Q_A^- \dots]$ azt a RC-populációt jelenti, amelyben a másodlagos kinon kötőhelye aktív maradt, de az a gerjesztés időpontjában időlegesen üres.

A Q_B oldali kinon kötési egyensúlyi állandó, $K_q = [Q_A Q_B] / [Q_A \dots] = [Q_A^- Q_B] / [Q_A^- \dots]$, a RC gerjesztés utáni 450 nm-nél mért szemikinin jel oszcillációjából határozható meg (Nagy és mtsai., 1999; Tandori és mtsai., 1991; Halmschlager és mtsai., 2002). Itt a $[Q_A \dots]$ és $[Q_A^- \dots]$ kifejezi az elsődleges kinon redukált és oxidált koncentrációját a RC-ban.

Fluoreszcencia vizsgálatok

A liposzómák belsejébe kötött piranin fluoreszcenciájának vizsgálatához Perkin-Elmer MPF-44A típusú spektrofluorimétert használtam.

A gerjesztést 470 nm-rel végeztük, a fluoreszcenciát az emissziós maximumnál. 510 nm-nél figyeltük meg. A fotomultiplier jelét megfelelő kompenzáció és erősítés után digitális oszcilloszkópba (HITACHI VC-6025), és a mérés után IBM számítógépbe vittük át tárolás és további feldolgozás céljából.

RC/karbon nanocső kompozit előállítás

Az egyfalú szénnanocsöveket Mikó Csilla tisztította Forró László laboratóriumában (Institute of Physics of Complex Matter, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Svájc) és tőle szereztük be.

500 μ l fotoszintetikus RC-hoz 25 μ l SWNT-t adtunk és kb. 3 μ l kinont (UQ10-et). 10 ± 3 mg RC/mg SWNT tömegarányban. Ezt követően 3 napig dializáltuk 10 mM TRISZ és 100 mM NaCl pufferben. A mintát naponta rövid és óvatos ultrahangozásnak vetettük alá (vízfürdőben, ELMA Transsonic 310 típusú ultrahangozó készülékkel). A dialízis befejezése után a mintához 1 ml, az előzővel megegyező összetételű puffert adtunk, majd ultracentrifugáltuk (4 °C, 10 perc, 20000 g). Ezután a felülúszót leöntöttük, a csapadékhoz pedig 1 ml desztillált vizet adtunk és az előbbi körülményeknek megfelelően

ultracentrifugáltuk. A felülúszót ismét eltávolítottuk, a csapadékhoz 200 μ l desztillált vizet adtunk, majd ultrahangoztuk az előzővel megegyező paraméterek mellett. Ezek után néhány cseppet N_2 -áramban üveglapra szárítottunk. A minta egy részét szobahőmérsékleten, a másik részét hűtőszekrényben 4 $^{\circ}C$ -on tartottuk. Mértük az egyensúlyi abszorpciós spektrumokat, a minta aktivitását a fényindukált abszorpcióváltozás mérésével jellemeztük.

4. Új tudományos eredmények

Lipid kettősréteg szerepe

- 1) A RC-ot PC, PG és PC+CL lipidekből készített liposzómákba beültettük, és megmutattuk, hogy
 - a) az így készített vezikulák nagy valószínűséggel lipid kettősrétegből álló zárt vezikulák;
 - b) bennük a RC orientáció véletlenszerű.
- 2) A RC másodlagos kinonaktivitása (a P^+Q^- - PQ töltésrekombináció lassú komponensének az amplitúdója alapján értelmezve) a PC liposzómában nagyobb (84.4 %) az LDAO detergenshez (73.9 %) képest, PG liposzómában azonban kb 50%. Ez utóbbi valószínűleg a Q_B kötőhely hozzáférhetőségének csökkenésével magyarázható.
- 3) Megmértük és meghatároztuk a Q_A^- - Q_B előremenő elektrontranszport irodalomból (detergensben) ismert mindkét komponensét mind a PC, mind a PG rendszerben.
 - a) A gyorsfázisnak sem a részaránya (amplitúdója), sem az időállandója nem különbözött a liposzóma rendszerekben, jelezve, hogy az intrinsic elektrontranszfer valószínűleg hasonló mechanizmus alapján történik.
 - b) A lassú fázisban viszont lényeges különbség mutatkozott. A pozitív fejcsoportú PC-ban a sebességi állandó növekedett (gyorsabb elektrontranszport), a negatív töltésű PG-ban csökkent (lassabb elektrontranszport) az LDAO-hoz képest.
- 4) A negatív töltésű PG-ban a terbutrin csak részlegesen gátolja a Q_B oldal aktivitását.
- 5) Az anionikus lipidek specifikusan tudnak kötődni a RC-hoz.
 - a) A PG kötődése jól közelíthető Michaelis-Menten kinetikával, jelezvén, hogy feltehetően egy specifikus kötőhely lehet (vagy ha több van, azok kötési erőssége nem különbözik lényegesen).
 - b) A CL kötődése az alacsony koncentrációknál eltér a Michaelis-Menten kinetikától. Alacsony koncentrációnál igen erős (akár szubsztóchiometrikus) kötődés figyelhető meg.
- 6) PC liposzómában nem csak az első elektrontranszfer sebességi állandója növekedett, hanem a másodiké ($k_{AB}(2)$) is a detergenshez képest. Érdekes módon, a PG liposzómában is nőtt ez a sebességi állandó (az első elektrontranszferé jelentősen csökkent ebben a rendszerben).
- 7) A többszörös gerjesztés során a RC többszörös átfordulását a K_{AB} (elektronegyensúlyi) és K_q kinonegyensúlyi állandó szabja meg. A membránkörnyezetben úgy tűnik, hogy a K_q a meghatározó tényező, ami igen kicsi a PG liposzómákban.

A töltésstabilizálódás energetikája lipidekben

- 8) A P^+Q^- - PQ töltésrekombináció lassú komponensének kinetikájából meghatároztam a Q_A és Q_B közötti szabadenergiakülönbséget PC és PG liposzómákban (-62, -77, -89 mV LDAO, PC és PG rendszerekben rendre). Ez a tendencia az in vivo állapothoz való közeledést jelenti, jelezvén, hogy ezek a lipidek fontos szerepet töltenek be a RC-n belüli töltésstabilizálódásban az élő szervezetben.
- 9) A K_{AB} hőmérsékletfüggéséből kiszámítottam a Q_A/Q_B állapotok közötti standard szabadentalpiakülönbségeket és a két állapot közötti entrópiakülönbséget a már ismert ΔG_{AB} felhasználásával.
- a) A folyamatokat lényegében az entalpiaváltozás vezérli,
 - b) a ΔH -t lényegesen a CL csökkentette,
 - c) az entrópia hozzájárulás mindegyik lipidben kisebb volt a detergenshez képest, de csak a detergensben volt nagyobb a termikus szintnél ($k \cdot T = 25$ mV/mol).

Transzmembrán protongrádiens

- 10) Sikerült fluoreszkáló jelzőmolekulát (piranint) beépíteni liposzómába,
- a) az így elkészített lipoproteid vezikulák hosszú ideig stabilak maradtak szobahőmérsékleten is,
 - b) protonáteresztőképességük kb. 15-25%-ban sokáig megmaradt, ami további kalibrációk után alkalmas lehet arra, hogy membránpotenciált számolhassunk, illetve annak komponenseit szétválasszuk.

A fotoszintetikus RC és egyfalú szén nanocsövek kapcsolata

- 11) Sikerült a fotoszintetikus reakciócentrumokat egyfalú szén nanocsövekhez kapcsolni és az így kapott bio-nanokompozit (SWNT/RC) anyag fő spektroszkópai tulajdonságait meghatározni;
- a) Ez a kapcsolat a fehérjén belüli elektrontranszportot jellemzően módosítja, a fénygerjesztés által kiváltott pozitív és negatív töltések felhalmozódását eredményezi.
 - b) A fehérjén belüli töltésmozgást követő relaxációs folyamatokra is hatással van.
 - c) A SWNT és a RC között a fénnel való gerjesztés után redoxkölcönhatás lehetséges. Ez a jelenség különböző gyakorlati alkalmazások modellje lehet.

5. Közlemények

a) A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- 1) Francesco Milano, Márta Dorogi, Kornélia Szebényi, László Nagy, Péter Maróti, György Váró, Livia Giotta, Angela Agostiano and Massimo Trotta (2007) *Enthalpy/entropy driven activation of the first interquinone electron transfer in bacterial photosynthetic reaction centers embedded in vesicles of physiologically important phospholipids*, Bioelectrochemistry, 70, 1, 18-22 IF: 1.558
- 2) Márta Dorogi, Zoltán Bálint, Csilla Mikó, Klára Hernádi, László Forró, György Váró and László Nagy (2006) *Stabilization effect of single-walled carbon nanotubes on the functioning of photosynthetic reaction centers*, Journal of Physical. Chemistry. B , 110, 43, 21473-21479 IF: 4.033
- 3) Márta Dorogi, Francesco Milano, Kornelia Szebényi, György Váró, Livia Giotta, Massimo Trotta, Angela Agostiano, Péter Maróti, László Nagy (2005) *Reaction centers in lipids*, Acta Biologica Szegediensis, 49(1-2), 195-197
- 4) László Nagy, Francesco Milano, Márta Dorogi, Massimo Trotta, Gábor Laczkó, Kornélia Szebényi, György Váró, Angela Agostiano and Péter Maróti (2004) *Protein/lipid interaction in bacterial photosynthetic reaction center: The role of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in charge stabilization*, Biochemistry, 43, 40, 12913-12923 IF: 4.224
- 5) Márta Dorogi, Francesco Milano, Massimo Trotta, Angela Agostiano, György Váró, Péter Maróti and László Nagy, (2002) *Connection of charge stabilization with proton translocation in photosynthetic reaction center/liposome membranes*, XIXth IUPAC Symposium on Photochemistry – Budapest, P51, 187-188.
- 6) Francesco Milano, Massimo Trotta, Márta Dorogi, Béla Fischer, Livia Giotta, Angela Agostiano, Péter Maróti, László Kálmán, and László Nagy, (2008) *Measuring light generated transmembrane proton gradient in photosynthetic reaction center/artificial lipid vesicles (in preparation)*

b) Egyéb kölemények

- 1) Hiroko Ohmori, László Nagy, Márta Dorogi and Masahide Terazima (2008) Charge stabilization in reaction center protein investigated by optical heterodyne detected transient grating spectroscopy, accepted to Eur. Biophys. J. with Biophys. Lett., 37, Pages: 1167-1174 IF: 1.857
- 2) László Nagy, Márta Dorogi, Hiroko Ohmori, Masahide Terazima and Smuel Malkin (2005) Photoacoustic and thermal grating investigations of charge stabilization in reaction center protein, Proceedings of Forum Acusticum, Budapest, 2005, 790

c) Oktatási anyag:

- 1) Dorogi Márta, Szebényi Kornélia, Nagy László (2004) Abszorpciós kinetikai mérések alkalmazása a fotoszintetikus reakciócentrumban végbemenő elektrontranszport-folyamatok jellemzésére, <http://fotoszintezis.szbk.u-szeged.hu/fototan/fototan.htm>

6. Irodalomjegyzék

- Allen, J. P., G. Feher, T. O. Yeates, H. Komiya, and C. D. Rees. 1987. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 84:6162-6166.
- Aro, E. M., I. Virgin, and B. Andersson. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143:113-134.
- Barlic, A., I. Gutierrez-Aguirre, J. M. M. Caaveiro, A. Cruz, M. B. Ruiz-Arguello, J. Perez-Gil, and J. M. Gonzalez-Manas. 2004. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. *Journal of Biological Chemistry* 279:34209-34216.
- Batterton, J. C. and C. Van Baalen. 1971. Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration. *Archives of Microbiology* 76:151-165.
- Baxter, R. H. G., N. Ponomarenko, V. Srajer, R. Pahl, K. Moffat, and J. R. Norris. 2004. Time-resolved crystallographic studies of light-induced structural changes in the photosynthetic reaction center. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:5982-5987.
- Baxter, R. H. G., B. L. Seagle, N. Ponomarenko, and J. R. Norris. 2005a. Cryogenic structure of the photosynthetic reaction center of *Blastochloris viridis* in the light and dark. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61:605-612.
- Baxter, R. H. G., B. L. Seagle, N. Ponomarenko, and J. R. Norris. 2005b. Cryogenic structure of the photosynthetic reaction center of *Blastochloris viridis* in the light and dark. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61:605-612.
- Breton, J. 2007. Steady-state FTIR spectra of the photoreduction of Q(A) and Q(B) in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers provide evidence against the presence of a proposed transient electron acceptor X between the two quinones. *Biochemistry* 46:4459-4465.
- Breton, J., M. C. Wakeham, P. K. Fyfe, M. R. Jones, and E. Navedryk. 2004. Characterization of the bonding interactions of Q_B upon photoreduction via A-branch or B-branch electron transfer in mutant reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1656:127-138.

- Britto, P. J., K. S. V. Santhanam, and P. M. Ajayan. 1996. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41:121-125.
- Camara-Artigas, A., D. Brune, and J. P. Allen. 2002. Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 99:11055-11060.
- Clayton, R. K. 1978. Effects of dehydration on reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* 504:255-264.
- Collins, P. C., M. S. Arnold, and P. Avouris. 2001. Engineering carbon nanotubes and nanotube circuits using electrical breakdown. *Science* 292:706-709.
- Davis, J. J., K. S. Coleman, B. R. Ayamian, C. B. Bagshaw, and M. L. H. Green. 2003. Chemical and biochemical sensing with modified single walled carbon nanotubes. *Chemistry-A European Journal* 9:3732-3739.
- Davis, J. J., R. J. Coles, and H. A. O. Hill. 1997. Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 440:279-282.
- Deamer, D. W. and J. W. Nichols. 1989. Proton flux Mechanisms in model and biological-membranes. *Journal of Membrane Biology* 107:91-103.
- Deisenhofer, J. and H. Michel. 1989. The Photosynthetic Reaction Center from the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Science* 245:1463-1473.
- Dorogi, M., Z. Balint, Cs. Miko, B. Vilenó, M. Milas, K. Hernadi, L. Forró, Gy. Varó, and L. Nagy. 2006. Stabilization Effect of Single-Walled Carbon Nanotubes on the Functioning of Photosynthetic Reaction Centers. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 110:21473-21479.
- Fathir, I., T. Mori, T. Nogi, M. Kobayashi, K. Miki, and T. Nozawa. 2001. Structure of the H subunit of the photosynthetic reaction center from the thermophilic purple sulfur bacterium, *Thermochromatium tepidum* Implications for the specific binding of the lipid molecule to the membrane protein complex. *European Journal of Biochemistry* 268:2652-2657.
- Feher, G., J. P. Allen, M. Y. Okamura, and C. D. Rees. 1989. Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres. *Nature* 111-116.
- Feher, G. and M. Y. Okamura. 1978. Chemical composition and properties of reaction centers. *The photosynthetic bacteria, Plenum, New York* 349-386.

- Gallagher, M. J., D. Chen, B. P. Jacobsen, D. Sarid, L. D. Lamb, F. A. Tinker, J. Jiao, D. R. Huffman, S. Seraphin, and D. Zhou. 1993. Characterization of Carbon Nanotubes by Scanning Probe Microscopy. *Surface Science* 281:L335-L340.
- Gensure, R. H., M. L. Zeidel, and W. G. Hill. 2006. Lipid raft components cholesterol and sphingomyelin increase H^+/OH^- permeability of phosphatidylcholine membranes. *Biochemical Journal* 398:485-495.
- Gombos, Z., Zs. Varkonyi, M. Hagio, M. Iwaki, L. Kovacs, K. Masamoto, S. Itoh, and H. Wada. 2002. Phosphatidylglycerol Requirement for the Function of Electron Acceptor Plastoquinone Q_B in the Photosystem II Reaction Center. *Biochemistry* 41:3796-3802.
- Graige, M. S., G. Feher, and M. Y. Okamura. 1998. Conformational gating of the electron transfer reaction $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ in bacterial reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* determined by a driving force assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 95:11679-11684.
- Hagio, M., Z. Gombos, Zs. Varkonyi, K. Masamoto, N. Sato, M. Tsuzuki, and H. Wada. 2000. Direct Evidence for Requirement of Phosphatidylglycerol in Photosystem II of Photosynthesis. *Plant Physiology* 124:795-804.
- Halmschlager, A., M. Trotta, J. Tandori, L. Rinyu, I. Pfeiffer, and L. Nagy. 2002. A mathematical model for quinone-herbicide competition in the reaction centres of *Rhodobacter sphaeroides*. *Functional Plant Biology* 29:443-449.
- Iijima, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354:56-58.
- Kalman, L., T. Gajda, P. Sebban, and P. Maroti. 1997. pH-Metric Study of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria in Micellar Solutions: Protonatable Groups Equilibrate with the Aqueous Bulk Phase. *Biochemistry* 36:4489-4496.
- Kalman, L. and P. Maroti. 1994. Stabilization of Reduced Primary Quinone by Proton Uptake in Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 33:9237-9244.
- Karajanagi, S. S., D. Y. Kim, R. S. Kane, and J. S. Dordick. 2004. Enzyme-nanotube conjugates as functional nanomaterials. *Abstracts of Papers American Chemical Society* 227:U890.
- Kleinfeld, D., M. Y. Okamura, and G. Feher. 1985. Electron transfer in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. II. Free energy and kinetic relations between the acceptor states Q_A Qff and $Q_AQ_B^{2-}$. *Biochimica et Biophysica Acta* 809:291-310.

- Koepke, J., E. M. Krammer, A. R. Klingen, P. Sebban, G. M. Ullmann, and G. Fritzsche. 2007. pH modulates the quinone position in the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* in the neutral and charge separated states. *Journal of Molecular Biology* 371:396-409.
- Krishnamoorthy, I. and G. Krishnamoorthy. 2001. Probing the link between proton transport and water content in lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B* 105:1484-1488.
- Kroto, H. W., J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, and R. E. Smalley. 1985. C-60 - Buckminsterfullerene. *Nature* 318:162-163.
- Kruse, O. and G. H. Schmid. 1995. The role of phosphatidylglycerol as a functional effector and membrane anchor of the D1-core peptide from photosystem-II particles of the cyanobacterium *oscillatoria-chalybea*. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 50:380-390.
- Lakatos, M., G. Groma, C. Ganea, J. K. Lanyi, and Gy. Varo. 2002. Characterization of the Azide-Dependent Bacteriorhodopsin-Like Photocycle of *Salinarum* Halorhodopsin. *Biophysical Journal* 82:1687-1695.
- Lancaster, C. R. D. and H. Michel. 1997. The coupling of light-induced electron transfer and proton uptake as derived from crystal structures of reaction centres from *Rhodospseudomonas viridis* modified at the binding site of the secondary quinone, Q(B). *Structure* 5:1339-1359.
- Lande, M. B., J. M. Donovan, and M. L. Zeidel. 1995. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *Journal of General Physiology* 106:67-84.
- Li, J., D. Gilroy, D. M. Tiede, and M. Gunner. 1997. Kinetic Phases in the Electron Transfer from $P^+Q_A^-Q_B$ to $P^+Q_AQ_B^-$ and the Associated Processes in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 Reaction Centers. *Biochemistry* 37:2818-2829.
- Mancino, L. J., D. P. Dean, and R. E. Blankenship. 1984. Kinetics and thermodynamics of the $P_{870}^+Q_A^- \rightarrow P_{870}^+Q_B^-$ reaction in isolated reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta* 764:46-54.
- Maroti, P. 1991. Electron transfer and proton uptake of photosynthetic bacterial reaction centres reconstituted in phospholipid vesicles. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 8:263-277.
- McAuley, K. E., P. K. Fyfe, J. P. Ridge, N. W. Isaacs, R. J. Cogdell, and M. R. Jones. 1999. Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 96:14706-14711.

- Mezzetti, A., E. Navedryk, J. Breton, M. Y. Okamura, M. L. Paddock, G. Giacometti, and W. Leibl. 2002. Rapid-scan Fourier transform infrared spectroscopy shows coupling of GLu-L212 protonation and electron transfer to Q_B in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1553:320-330.
- Nagy, L., E. Fodor, J. Tandori, L. Rinyu, and T. Farkas. 1999. Lipids affect the charge stabilization in wild-type and mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Australian Journal of Plant Physiology* 26:465-473.
- Nagy, L., F. Milano, M. Dorogi, A. Agostiano, G. Laczko, K. Szebenyi, Gy. Varo, M. Trotta, and P. Maroti. 2004. Protein/Lipid Interaction in the Bacterial Photosynthetic Reaction Center: Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol Modify the Free Energy Levels of the Quinones. *Biochemistry* 43:12913-12923.
- Nagy, L., A. Puskas, J. Tandori, M. Droppa, and G. Horvath. 1991. Effect of DCMU on photosynthetic purple bacteria. *Photosynthetica* 25:167-171.
- Nogi, T., I. Fathir, M. Kobayashi, T. Nozawa, and K. Miki. 2000. Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: Thermostability and electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 97:13561-13566.
- Ohmori, H., L. Nagy, M. Dorogi, and M. Terazima. 2008. Charge stabilization in reaction center protein investigated by optical heterodyne detected transient grating spectroscopy. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 37:1167-1174.
- Ollivon, M., S. Lesieur, C. Grabielle-Madelmont, and M. Paternostre. 2000b. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1508:34-50.
- Ollivon, M., S. Lesieur, C. Grabielle-Madelmont, and M. Paternostre. 2000a. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1508:34-50.
- Paddock, M. L., G. Feher, and M. Y. Okamura. 1991. Reaction centers from three herbicide resistant mutants of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Kinetics of electron transfer reactions. *Photosynthesis Research* 27:109-119.
- Paddock, M. L., S. H. Rongey, P. H. McPherson, A. Juth, G. Feher, and 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 Dihydroquinone. *Biochemistry* 33:734-745.

- Palazzo, G., A. Mallardi, M. Giustini, D. Berti, and G. Venturoli. 2000. Cumulant Analysis of Charge Recombination Kinetics in Bacterial Reaction Centers Reconstituted into Lipid Vesicles. *Biophysical Journal* 79:1171-1179.
- Remy, A. and K. Gerwert. 2003. Coupling of light-induced electron transfer to proton uptake in photosynthesis. *Nature Structural Biology* 10:673-644.
- Riegler, J. and H. Mohwald. 1986. Elastic interactions of photosynthetic reaction center proteins affecting phase-transitions and protein distributions. *Biophysical Journal* 49:1111-1118.
- Rinyu, L., E. W. Martin, E. Takahashi, P. Maroti, and C. A. Wraight. 2004. Modulation of the free energy of the primary quinone acceptor (Q_A) in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: contributions from the protein and protein-lipid(cardiolipin) interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1655:93-101.
- Sato, N., M. Hagio, H. Wada, and M. Tsuzuki. 2000. Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 97:10655-10660.
- Sebban, P., P. Maroti, M. Schiffer, and D. K. Hanson. 1995. Electrostatic Dominoes: Long Distance Propagation of Mutational Effects in Photosynthetic Reaction Centers of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* 34:8390-8397.
- Sotiropoulou, S. and N. A. Chaniotakis. 2002. Carbon nanotube array-based biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375:103-105.
- Sturgis, N. J. and A. R. Niederman. 2008. Atomic force microscopy reveals multiple patterns of antenna organization in purple bacteria: implications for energy transduction mechanisms and membrane modeling. *Photosynthesis Research* 95:269-278.
- Taly, A., L. Baciou, and P. Sebban. 2002. The DMPC lipid phase transition influences differently the first and the second electron transfer reactions in bacterial reaction centers. *FEBS Letters* 532:91-96.
- Tandori, J., L. Nagy, and P. Maroti. 1991. Semiquinone oscillation as a probe of quinone herbicide binding in bacterial reaction centers. *Photosynthetica* 25:159-166.
- Tandori, J., L. Nagy, A. Puskas, M. Droppa, G. Horvath, and P. Maroti. 1995. The IleL229 -> Met mutation impairs the quinone binding to the QB-pocket in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis Research* 45:135-146.

- Thewalt, J., N. Kitson, C. Araujo, A. Mackay, and M. Bloom. 1992b. Models of Stratum-Corneum Intercellular Membranes - the Sphingolipid Headgroup Is A Determinant of Phase-Behavior in Mixed Lipid Dispersions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188:1247-1252.
- Thewalt, J., N. Kitson, C. Araujo, A. Mackay, and M. Bloom. 1992a. Models of Stratum-Corneum Intercellular Membranes - the Sphingolipid Headgroup Is A Determinant of Phase-Behavior in Mixed Lipid Dispersions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188:1247-1252.
- Tiede, D. M., J. Vazquez, J. Cordova, and P. A. Marone. 1996. Time-resolved electrochromism associated with the formation of quinone anions in the Rhodobacter sphaeroides R26 reaction center. *Biochemistry* 35:10763-10775.
- Trotta, M., F. Milano, L. Nagy, and A. Agostiano. 2002. Response of membrane protein to the environment: the case of photosynthetic Reaction Centre. *Materials Science & Engineering C-Biometric and Supramolecular Systems* 22:263-267.
- Wakeham, M. C., R. B. Sessions, M. R. Jones, and P. K. Fyfe. 2001. Is There a Conserved Interaction between Cardiolipin and the Type II Bacterial Reaction Center? *Biophysical Journal* 80:1395-1405.
- Wraight, C. A. and R. R. Stein. 1980. Redox equilibrium in the acceptor quinone complex of isolated reaction centers and the mode of action of O-phenanthroline. *FEBS Letters* 113:73-77.

Summary

Summary

Introduction

Thanks to the structural (crystallography, Nobel prize to Michel, Deisenhofer, Huber) and functional (theory, Nobel prize to Marcus) results together with the works of molecular biology, computer- and electro- techniques, a wealth of information made a relatively clear picture about the kinetics, energetics and stabilization of electron transport within the bacterial photosynthetic reaction center (RC) (see e.g. Sebban *et al.*, 1995; Wraight, 2004). However, several important questions can still be addressed. The physical parameters of the electron transport essentially depend on the type of the RC and environmental factors. From this point of view, the membrane environment is of special interest.

The kinetics and thermodynamics of the electron transfer reactions in RCs are mainly studied in detergents, and the basic processes are already known. However, there are more and more pieces of evidences that these parameters have different features in artificial and/or *in vivo* membranes. The reaction center of *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* consists of three polypeptides, known as L, M and H subunits. The electron transfer after light excitation is initiated by the primary donor bacteriochlorophyll dimer, (P, BChl₂) followed by transient reduction of bacteriochlorophyll monomer (BChl) and bacteriopheophytine (BPheo). Consequently, the electron is trapped by the primary, Q_A, and the secondary quinone, Q_B electron acceptor. Absorbing of one photon in the absence of secondary donor to P⁺ the electron is stabilized in the P⁺Q_AQ_B⁻ state. Depending on the free energy of the Q_B/Q_B⁻ redox couple the charge pair recombines to the ground state PQ_AQ_B with characteristic reaction routes and rates.

If secondary electron donor (e.g. cytochrome *in vivo*, or ferrocene, DAD, TMPD etc. *in vitro*) is present, a second electron can be stabilized on the secondary quinone by accepting two protons in the state of PQ_AQ_BH₂. The doubly reduced and protonated quinone then leaves the RC and is replaced by a

fully oxidized quinone, Q, from the membrane pool. This cycle can be repeated until one of the reaction components, the donor or the quinone acceptor, is exhausted. The function of the quinone acceptor complex of the RCs depends both on the redox and binding properties of the quinone molecules (Nagy *et al.*, 2004). If the quinones are bound to the reaction center, their redox properties are determined by the environment and the chemical identity of the molecule. In this work I offer direct evidence for the role of characteristic native phospholipids - phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), and cardiolipin (CL) - of the membrane in charge stabilization in RC.

The one-dimensional structural and electronic properties of carbon nanotubes have made them suitable candidates for the promotion of heterogeneous electron transfer studies, in which delicate biomolecules “communicate” with the interface of electric circuits. There are convincing pieces of evidences that nanotubes are very efficient components in devices based on biomatter. For example, bioelectrochemical reactions can be driven by attaching small proteins to the surface of carbon nanotubes (Davis *et al.*, 1997; Britto *et al.*, 1996). Well-controlled aligned carbon nanotubes can be applied as immobilization matrices and as mediators for the development of third-generation amperometric biosensor devices (Sotiropoulou and Chaniotakis, 2002). It was found that the protein structure and function were highly influenced by the nanoscale environment. Thirty percent of the activity of the soybean peroxidase and only 1% of the activity of the R-chymotrypsin remained if these proteins were bound to single-walled carbon nanotubes (SWNT) (Karajanagi *et al.*, 2004). The present work is the first to show experiments carried out with photosynthetic RC pigment protein complex, the well-known redox-active enzyme in which light energy initiates a chain of intraprotein electron transport reactions attached to SWNT.

Aims

Determining the role of the lipid bilayer

- 1) Building RCs into liposomes prepared from PC, PG and PC+CL lipids and showing that the liposomes are probably closed bilayer vesicles and the orientation of the RCs are probably random.
- 2) Determining the secondary quinone activity in PC and PG liposomes in terms of the $P^+Q^- \rightarrow PQ$ charge recombination.
- 3) Determining the parameters of components of the $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ forward electron transport in PC and PG liposomes.
- 4) Characterizing the binding properties of the anionic lipids (PG and CL) to the RC.

Characterizing the energetics of charge stabilization in lipids

- 5) Determining the free energy difference between the Q_A and Q_B populations in RCs reconstituted in different lipids.
- 6) Characterising the thermodynamic requirements (enthalpy and entropy contribution) of the $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ forward electron transport in PC and PG liposomes.

Determining the transmembrane proton gradient

- 7) Incorporating fluorescent dye, pyranine, into the internal compartment of the liposomes and characterising the light induced proton gradient across the lipoprotein bilayer.

Connection RCs to SWNTs

- 11) Preparing SWNT/RC bionanocomposite material and determining the spectral characteristics of this complex.

Materials and methods

Cell cultivation and RC preparations:

Carotenoidless *Rb. sphaeroides* R-26 cells were grown photoheterotrophically under anaerobic conditions in medium supplemented with potassium succinate. Chromatophores and RCs were prepared as described earlier (Tandori *et al.*, 1995). RCs were solubilized by LDAO (*N,N*-dimethyldodecylamine *N*-oxide; Fluka) and purified by ammonium sulfate precipitation followed by DEAE-Sephacel (Sigma) anion-exchange chromatography. The fractions of OD₂₈₀/OD₈₀₃ ratio between 1.27 and 1.50 were collected and used for further experiments.

Proteoliposome preparation:

RC-proteoliposomes were prepared by gel filtration micelle-to-vesicle transition technique. Calculated amount of phospholipid (POPC, Cholesterol, PG, PI) is solved in chloroform and dried on the wall of conical tube under nitrogen stream forming a thin film. The film is dissolved with 0.5 ml of Na-cholate (1.4% solution) or OG (4%) in phosphate buffer (10 μ M KPi, 10 mM KCl, 150 μ M pyranine, pH 7.2). The solution is sonicated in order to form mixed phospholipid/detergent micelles. Small volume of the RC solution is added and is vigorously shaken to allow the phospholipid/protein/ detergent micelles formation than loaded on Sephadex G-50 column, previously equilibrated with phosphate buffer (10 μ M KPi, 10 mM KCl, 150 μ M pyranine, pH 7.2). The fraction containing the liposomes was collected and loaded on a second column equilibrated with pyranine free K-phosphate buffer (10 μ M KPi, 10 mM KCl, pH 7.2) in order to remove the external pyranine (Trotta *et al.*, 2002).

Fluorescence measurements:

Pyranine is a water-soluble fluorescent dye which is very sensitive to pH in the interval close to the $pK_a = 7.2$ of the ionization of the hydroxyl group of the molecule in aqueous solution. The ratio between the excitation peaks at 404 and 456 nm can be calibrated and used as an internal pH-indicator regardless the

absolute value of the emission peak, allowing to estimate the initial and final pH values in the liposome. The steady state fluorescence excitation spectra were measured by a Perkin Elmer MPF-44A spectrofluorimeter, which was supplied with a home made sample holder assuring continuous stirring during pH adjustment.

Kinetic absorption spectrophotometry:

Excitation-induced absorption changes were measured routinely by a single-beam kinetic spectrophotometer of local design (Tandori *et al.* 1995; Lakatos *et al.* 2002). The P/P^+ and Q/Q^- redox changes of the primary bacteriochlorophyll dimer and the quinones at the acceptor complex (Nagy *et al.*, 1999; Tandori *et al.*, 1995) and the electrochromic response of the absorption of bacteriopheophytins to the $Q_A^-Q_B$ and $Q_AQ_B^-$ states (Tiede *et al.*, 1996) were detected at 603, 450, and 771 nm, respectively. The apparent one-electron equilibrium constant in the quinone acceptor complex, $K_{AB} = [Q_AQ_B^-]/[Q_A^-Q_B]$, was determined from the rate constants of the fast (k_f) and slow (k_s) components of the $P^+(Q_AQ_B)^- \rightarrow PQ_AQ_B$ charge recombination in the dark: $K_{AB} = k_f/k_s - 1$. The free energy gap between $Q_A^-Q_B$ and $Q_AQ_B^-$ states is $\Delta G_{AB}^0 = -k_B T \ln K_{AB}$, where k_B and T are the Boltzmann constant and the absolute temperature, respectively (Wraight and Stein, 1980; Kleinfeld *et al.*, 1985). The quinone binding equilibrium constant of the Q_B site, $K_q = [Q_AQ_B]/[Q_A...] = [Q_A^-Q_B]/[Q_A^-...]$, was obtained from the model of the oscillation pattern of the semiquinone signal measured at 450 nm upon subsequent flash excitation of the RC (Nagy *et al.*, 1999; Halmschlager *et al.*, 2002). Here $[Q_A...]$ and $[Q_A^-...]$ denote the concentrations of the RC in oxidized and reduced states of the primary quinone, respectively. These species are able to bind quinone to the temporarily empty Q_B site.

Binding RC to SWNT:

Commercially available SWNTs, produced by a high-pressure CO process (HiPco), have been purchased from Carbon Nanotechnologies Incorporated Company and were purified by wet oxidation technique in the

laboratory of László Forró (Institute of Physics of Complex Matter, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland). In order to bind RCs to SWNTs purified RCs were incubated with the suspension of SWNT and subjected to intensive dialysis against distilled water for three days. The RC concentration was kept as high as possible, routinely 80-100 μM . The mass to mass ratio was routinely 10 ± 3 mg RC/mg SWNT. After the dialysis the sample was sedimented by ultracentrifuge ($100,000 \times g$, 20 min, SORVALL ULTRA Pro, A-1256 rotor) and the precipitate was suspended in distilled water by sonication for 10-20 seconds. Few drops of sample was dried onto a glass surface under N_2 stream then the optical characteristics were measured.

Data evaluation:

The standard free energy difference of the quinones, ΔG_{AB}^0 was determined from the apparent one-electron equilibrium constant, K_{AB} , in the quinone acceptor complex. The standard enthalpy difference of the quinone states were determined from the slope of the van't Hoff plot of the temperature dependence of the equilibrium constant: $d(\ln K_{AB})/dT = \Delta H^0/RT^2$. The thermodynamic parameters of activation related to the interquinone ET were determined assuming the transition state theory (Eyring's equation):

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{\kappa \cdot R}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

where k is the observed rate constant, κ is the transmission coefficient (usually equals to 1, Andreasson *et al.*, 2003), h is the Planck constant, R is the universal gas constant and $\Delta H^\ddagger$ and $\Delta S^\ddagger$ are the enthalpy and entropy changes of activation, respectively. $\Delta H^\ddagger$ is calculated from the slope and $\Delta S^\ddagger$ is determined from the intercept of the best-fit of straight lines through the measured data.

New results

The role of the lipid bilayer

- 1) The RCs were built in liposomes prepared from PC, PG and PC+CL lipids, and we have shown that
 - a) the liposomes are probably closed bilayer vesicles;
 - b) the orientation of the RCs are probably random.
- 2) The secondary quinone activity (in terms of the $P^+Q^- \rightarrow PQ$ charge recombination) is larger in PC liposomes (84.4 %) compared to the LDAO detergent (73.9 %), however, this value is only 50 % in PG liposomes. This latter effect can be explained by the accessibility of the Q_B site.
- 3) We determined the components of the $Q_A^- \rightarrow Q_B$ electron transport in PC and PG liposomes.
 - a) There was no difference in the parameters of the fast phases indicating that the mechanism of the intrinsic electron transfer is probably the same in these systems.
 - b) There was large difference in the parameters of the slow components. The rate of the electron transport was facilitated in PC (with positive head group) and reduced in PG (negative head group) compared to the LDAO.
- 4) There was only a limited inhibition of the Q_B site by terbutryn in PG environment.
- 5) The lipids with anionic head groups bound to specific sites of the RC.
 - a) The binding of PG can be well described by Michaelis-Menten kinetics indicating the probably there is only one specific binding site.
 - b) The binding of CL at low concentration does not follow the Michaelis-Menten kinetics.
- 6) The rate of the second electron transfer is also increased both in PC and PG. It is interesting to note that the rate of the first electron transfer is decreased in this latter system.
- 7) The multiple turnover of the RC is determined by the K_{AB} electron equilibrium constant and the K_q quinone equilibrium constant. It seems that

K_q is the determining parameter in the membrane environment and it is the smallest in PG.

The energetics of the charge stabilization in lipids

- 8) By measuring the kinetics of the $P^+Q^- \rightarrow PQ$ charge recombination I have determined the free energy difference between the Q_A and Q_B populations. It was -62, -77, -89 mV in LDAO, PC and PG, respectively.
- 9) By using the temperature dependence of K_{AB} I calculated the enthalpy change of the $Q_A^- \rightarrow Q_B$ electron transport and the entropy contribution to this reaction. I have found that
- a) the forward electron transport is driven by the enthalpy change in lipids;
 - b) the enthalpy change is reduced considerably by CL;
 - c) the entropy contribution was small in every lipids compared to the case of the LDAO detergent. It was larger than thermal level ($k \cdot T = 25$ mV/mol) only in LDAO.

Transmembrane proton gradient

- 10) I managed to incorporate fluorescent dye into the internal compartment of the liposomes.
- a) The liposomes prepared this way were stable for long time also at room temperature.
 - b) The proton conductivity remained at the level of about 15-25%, which can be suitable for calculating the different components of the proton motive force after careful calibration.

Connection of RCs to SWNTs

- 11) We prepared SWNT/RC bionanocomposite material and the spectral characteristics of this complex were determined.

- a) The interaction between RCs and SWNTs modifies the electron transport in the RCs specifically resulting the accumulation of positive and negative charges.
- b) This interaction affects the charge relaxation processes which accompany the electron transport as well.
- c) There is a redox communication between the SWNT and RC after the light excitation, which phenomenon can be a model for several possible practical applications.

References

- Andreasson U, Carlsson T, Andreasson LE (2003) Spectroscopic characterization of a semi-stable, charge-separated state in Cu^{2+} -substituted reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1607**, 45-52.
- Britto PJ, Santhanam KSV, Ajayan PM (1996) Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **41**, 121-125.
- Davis JJ, Coles RJ, Hill HAO (1997) Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **440**, 279-282.
- Halmschlager A, Trotta M, Tandori J, Rinyu L, Pfeiffer I, Nagy L (2002) A mathematical model for quinone-herbicide competition in the reaction centres of *Rhodobacter sphaeroides*. *Functional Plant Biology* **29**, 443-449.
- Kalman L, Gajda T, Sebban P, Maroti P (1997) pH-Metric Study of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria in Micellar Solutions: Protonatable groups equilibrate with the aqueous bulk phase. *Biochemistry* **36**, 4489-4496.
- Karajanagi SS, Kim DY, Kane RS, Dordick JS (2004) Enzyme-nanotube conjugates as functional nanomaterials. *Abstracts of Papers American Chemical Society* **227**, U890.
- Kleinfeld D, Okamura MY, Feher G (1985) Electron transfer in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. II. Free energy and kinetic relations between the acceptor states Q_A Qff and $\text{Q}_\text{A}\text{Q}_\text{B}^{2-}$. *Biochimica et Biophysica Acta* **809**, 291-310.
- Lakatos M, Groma G, Ganea C, Lanyi JK, Varo Gy (2002) Characterization of the azide-dependent bacteriorhodopsin-like photocycle of salinarum halorhodopsin. *Biophysical Journal* **82**, 1687-1695.
- Nagy L, Fodor E, Tandori J, Rinyu L, Farkas T (1999) Lipids affect the charge stabilization in wild-type and mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**, 465-473.
- Nagy L, Milano F, Dorogi M, Agostiano A, Laczko G, Szebenyi K, Varo Gy, Trotta M, Maroti P (2004) Protein/lipid interaction in the bacterial photosynthetic reaction center: phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol

- modify the free energy levels of the quinones. *Biochemistry* **43**, 12913-12923.
- Palazzo G, Mallardi A, Giustini M, Berti D, Venturoli G (2000) Cumulant analysis of charge recombination kinetics in bacterial reaction centers reconstituted into lipid vesicles. *Biophysical Journal* **79**, 1171-1179.
- Sebban P, Maroti P, Schiffer M, Hanson DK (1995) Electrostatic dominoes: long distance propagation of mutational effects in photosynthetic reaction centers of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **34**, 8390-8397.
- Sotiropoulou S, Chaniotakis NA (2002) Carbon nanotube array-based biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375**, 103-105.
- Tandori J, Nagy L, Maroti P (1991) Semiquinone oscillation as a probe of quinone herbicide binding in bacterial reaction centers. *Photosynthetica* **25**, 159-166.
- Tandori J, Nagy L, Puskas A, Droppa M, Horvath G, Maroti P (1995) The IleL229 → Met mutation impairs the quinone binding to the Q_B⁻ pocket in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis Research* **45**, 135-146.
- Tiede DM, Vazquez J, Cordova J, Marone PA (1996) Time-resolved electrochromism associated with the formation of quinone anions in the *Rhodobacter sphaeroides* R26 reaction center. *Biochemistry* **35**, 10763-10775.
- Trotta M, Milano F, Nagy L, Agostiano A (2002) Response of membrane protein to the environment: the case of photosynthetic Reaction Centre. *Materials Science & Engineering C-Biometric and Supramolecular Systems* **22**, 263-267.
- Wraight CA (2004) Is the midpoint redox potential of Q_A in bacterial reaction centers pH dependent or independent? *Biophysical Journal* **86**, 12A.
- Wraight CA, Stein RR (1980) Redox equilibrium in the acceptor quinone complex of isolated reaction centers and the mode of action of *O*-phenanthroline. *FEBS Letters* **113**, 73-77.