

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

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 előállítását, 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 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. glükózoxidázal). 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 struktúrális 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 rendszere is. Dolgozatomban e 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-hemtípusú 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 dihidro-kinol (QH_2) a RC-ról 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 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 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-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 foszfatidilkolin (PC) és a foszfatidilglicerol (PG) jelentős mennyiségben megtalálható a fotoszintetikus baktériumok membránjaiban (Nagy és mtsai., 1999), a kardiopidnek (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., 1992) 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 protonáteresztő 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). A koleszterinek kitüntetett szerepe van a protonáteresztőképesség befolyásolásában (Lande és mtsai., 1995). A koleszterin jelenléte csökkenti a protonáteresztőképességet, de egy bizonyos koncentráció fölött, feltehetően a koleszterin domének megjelenése miatt az ugrásszerűen megnő. A fehérjék jelenléte is növelheti a protonáteresztőképességet. 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 tulajdonságaik 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 nanocsővek 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 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

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., 2000; 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 tudunk 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; 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 tájékoztató (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 $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszport ΔG^0 szabadenergiaváltozása, azaz a töltés stabilizációs energiája is kiszámolható. A folyamat $K_{AB} = [Q_AQ_B^-]/[Q_A^-Q_B]$ egyensúlyi állandója a mért k_{AP} és k_{BP} időállandókból kiszámolható: $K_{AB} = k_{AP}/k_{BP} \cdot I$. 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 ($K_e = [Q_AQ_B^-]/[Q_A^-Q_B]$) és K_q kinonegyensúlyi állandóval ($K_q = [Q_AQ_B]/[Q_A \dots] = [Q_A^-Q_B]/[Q_A^- \dots]$) kielégítően leírható (Nagy és mtsai.,

1999; Halmschlager és mtsai., 2002). Itt $[Q_A...]$ és $[Q_A^-...]$ 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; Halmschlager és mtsai., 2002). Itt a $[Q_A...]$ és $[Q_A^-...]$ 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 szénnanocsőveket 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 °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 szubsztöchiometrikus) 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 töltéssztabilizálásban 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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 *Rhodospseudomonas sphaeroides*. II. Free energy and kinetic relations between the acceptor states Q_A Q_{ff} and Q_AQ_B²⁻. *Biochimica et Biophysica Acta* 809:291-310.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- Sotiropoulou, S. and N. A. Chaniotakis. 2002. Carbon nanotube array-based biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375:103-105.
- 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, A. Puskas, M. Droppa, G. Horvath, and P. Maroti. 1995. The IleL229 $\rightarrow$ Met mutation impairs the quinone binding to the Q_B -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.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy Dorogi Márta téziseit ismerem, az azokban foglalt eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Dr. Nagy László, egyetemi docens.

Dr. Maróti Péter, a biol. tud. doktora

Dr. Laczkó Gábor, egyetemi docens

Dr. Hernádi Klára, egyetemi tanár

Dr. Váró György, tudományos főmunkatárs

Szeged, 2008. október 16.