

Egyetemi doktori (Ph.D.) disszertáció

**A BAKTERIÁLIS REAKCIÓCENTRUM
KÉSLELTETETT FLUORESzcENCIÁJA**

Turzó Kinga

Témavezető: Dr. Maróti Péter egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem, Biofizikai Tanszék

Szeged

2000.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A bakteriális reakciócentrum	8
2.1.1. A reakciócentrum szerkezete	8
2.1.2. A reakciócentrumban végbemenő folyamatok	12
2.2. A reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciája	21
3. CÉLKITŰZÉSEK	24
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
4.1. A baktériumok tenyésztése	26
4.2. A kromatofóra preparálása	27
4.3. A reakciócentrum izolálása és tisztítása	27
4.4. Q_A -szubsztituens reakciócentrumok előállítása	30
4.5. Q_B -mentesített reakciócentrumok előállítása	31
4.6. Az abszorpcióváltozás mérése	31
4.7. A késleltetett- és a prompt fluoreszcencia mérése	33
5. EREDMÉNYEK	36
5.1. Késleltetett fluoreszcencia két tranziens állapotú rendszerben	37
5.1.1. Szabad pigment fluoreszcenciája	37
5.1.2. Fotokémiai folyamathoz kötött pigment fluoreszcenciája	38
5.1.3. A fluoreszcencia lecsengésének sebességi állandói	40
5.1.4. A prompt- és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdóviszonyai	41
5.1.5. Az abszolút szabadenergia-különbség meghatározása	42
5.2. A bakteriális reakciócentrum milliszekundumos késleltetett fluoreszcenciája	43
5.2.1. Késleltetett fluoreszcencia négy tranziens állapotú	

rendszerben	44
5.2.2. A késleltetett fluoreszcencia hőmérsékletfüggése	45
5.3. A nagyon gyors komponens	46
5.4. Gyors komponens: a primér kinonnal kapcsolatos folyamatok	50
5.4.1. Az első stabil töltéspár szabadenergia szintje	50
5.4.2. A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergia-változása protonfelvétel hatására	51
5.4.3. A gyors komponens ionerősség-függése	55
5.4.4. A $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ töltésszétválasztás termodinamikai paraméterei	57
5.4.5. Kinonszármazékok a Q_A -kötőhelyen	58
5.4.6. Összefüggés a szabadenergia szintek és a rekombinációs sebességi állandók között (magas potenciálú kinonok esetén)	60
5.5. Lassú komponens: a másodlagos kinonnal kapcsolatos folyamatok	63
5.5.1. A második stabil töltéspár szabadenergia szintje	63
5.5.2. A $P^+Q_B^-$ állapot szabadenergiájának pH-függése	66
5.5.3. A $P^*Q_B \rightarrow P^+Q_B^-$ töltésszétválasztás termodinamikai jellemzői	67
5.6. Kinon-környéki mutánsok vizsgálata	67
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	72
6.1. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia komponenseinek eredete	72
6.2. A $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ állapot stabilizációja	73
6.3. A primér kinon <i>in situ</i> szabadenergiájának szerepe a $P^+Q_A^-$ töltéspár stabilizációjában	77
6.4. A reakciócentrum elektrosztatikus kölcsönhatásai az oldatban lévő ionokkal	78
6.5. A töltésszétválasztást elősegítő termodinamikai erők	81
7. ÖSSZEFOGLALÁS	83
8. SUMMARY	87
9. IRODALOMJEGYZÉK	92
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	99

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RC	- fotoszintetikus reakciócentrum
Rb.	- <i>Rhodobacter</i>
Rps.	- <i>Rhodopseudomonas</i>
L,M,H	- a bakteriális reakciócentrum fehérje alegységei
P	- bakterioklorofill dimér (elsődleges vagy primér donor)
Bkl	- bakterioklorofill monomer
I	- bakteriofeofitin
Q _A	- elsődleges vagy primér kinon (első stabil elektron akceptor)
Q _B	- másodlagos vagy szekunder kinon (végső elektron akceptor)
UQ ₁₀	- ubikinon 10 (2,3-dimetoxi-5-metil-6 [10-izoprenoid] -1,4-benzokinon)
DQ	- durokinon (2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzokinon)
NQ	- 1,4-naftokinon
MD	- menadion (2-metil-1,4-naftokinon szódium biszulfid)
LDAO	- N,N-dimetil-dodecilamin-N-oxid
TX-100	- Triton X-100 (oktil-fenol-polietylén-glikol-éter)
CAPS	- 3-(ciklohexilamin)-1-propánszulfonsav
CHES	- 2-(N-ciklohexilamin)-etánszulfonsav
MES	- 2-(N-morfolin)-etánszulfonsav
MOPS	- 3-(N-morfolin)-propánszulfonsav
TRIS	- 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol
F _d	- a késleltetett fluoreszcencia intenzitása
ΔOD	- az abszorpcióváltozás amplitúdója
ΔG	- szabadenergia-változás
ΔH	- szabadentalpia-változás
ΔS	- entrópia-változás
pK	- proton-disszociációs állandó negatív logaritmusa
k _{AP}	- a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció sebességi állandója
k _{BP}	- a $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltésrekombináció sebességi állandója

1. BEVEZETÉS

A fotoszintézis a földi élet kulcsfontosságú folyamata, amelynek során a Nap fényenergiája, a szerves anyagok felépítéséhez nagy bőségben, hosszabb ideje rendelkezésre álló egyedüli szabadenergia-forma, az élő szervezetek életműködéséhez szükséges energiává alakul át. A fotoszintetizáló szervezetek (fotoszintetizáló baktériumok, algák, zöld növények) nemcsak önmagukat látják el energiával, hanem az őket fogyasztó szervezeteket is, az utóbbiakkal táplálkozó élőlényeket, és így tovább, vagyis a tápláléklánc egészét. Jelentőségük energiaínséges korunkban az emberiség szempontjából is felbecsülhetetlen, mivel tiszta, folyamatosan regenerálódó energiaforrást jelentenek, és modellként szolgálnak a mesterséges napenergia-hasznosításhoz. A fotoszintézis alapfolyamatait a legegyszerűbb fotoszintetizáló szervezetek, a fotoszintetizáló baktériumok vizsgálatával érthetjük meg a legkönnyebben.

A bīorbaktériumok a fotofizikai és fotokémiai alapfolyamatokat tekintve ugyanúgy végzik fotoszintézisüket, mint azok a hárommilliárd évnél is régebben élt őseik, amelyek elsőként fejlesztették ki a napenergia hasznosításának képességét. Az elnyelt foton energiáját elektrosztatikai illetve elektrokémiai energiává alakítják, amely redoxpotenciálként, különböző ionok elektrokémiai gradienseként, vagy foszforilációs potenciálként raktározódik (ezek mind a Gibbs-szabadenergia különböző megnyilvánulási formái). Az így tárolt energiát használja fel a sejt alapvető folyamatainak működtetéséhez. A bakteriális fotoszintézis folyamatainak megértése nemcsak az alapkutató szempontjából fontos, hanem segít a zöld növények fotoszintézisének, a membrán-fehérjék működésének megértésében és új energiaforrások megalkotásában. A bakteriális reakciócentrum (RC) volt az első olyan integrális membránfehérje, amelynek szerkezetét atomi feloldással meg tudták állapítani (Deisenhofer és Mutsaers, 1985), emiatt a többi membránfehérje modelljévé vált. A bakteriális RC és a zöld növények második fotokémiai rendszere (PSII) között nagyon sok a szerkezeti és működésbeli hasonlatosság (a kofaktorok, ill. az RC L és M alegységei, és a PSII D1 és D2 alegységei között). A PSII-komplex a fény hatására a vizet protonokra és molekuláris oxigénre bontja - szemben a vízbontást nem végző bakteriális reakciócentrummal-, miközben redukáló

ekvivalensek láncolatán keresztül az energia egy része proton elektrokémiai potenciál formájában raktározódik.

A bakteriális RC -ben végbemenő folyamatok közül az elmúlt évtizedekben a fotoszintetikus energiahasznosítás szempontjából kulcsfontosságú elektrontranszportot és protonálódási folyamatokat vizsgálták a legintenzívebben. Kiderült, hogy míg az RC-ben elnyelt majdnem minden foton töltéspárt hoz létre, vagyis a fotokémiai kvantumhatásfok közel 1 (Wraight és Clayton, 1973), addig a fényfelhasználás energiahatásfoka jóval kisebb, mindössze 30-40% -os, mert az energia 60-70% -a elvész az elektronoknak a kofaktorok közötti vándorlása közben (Feher és mtsi, 1989). Az RC tehát nem a lehető leghatékonyabb energiaátalakító, de megismerése segíthet olyan modellek megalkotásában, amelyek az energiahasznosítás szempontjából előnyösebbek az RC-nél.

A legnagyobb szabadenergia-veszteség a primér kinon (Q_A) redukálásához kapcsolódik (ld. 2.4 ábra, 2.1.2. fejezet), ami ugyanakkor azt is jelenti, hogy fiziológiai körülmények között ez a lépés teszi visszafordíthatatlanná a töltésszétválasztást. Igen hamar világossá vált, hogy a fényhasznosítás energiahatásfoka és az elektronvándorlás kinetikája nagymértékben függ a keletkezett stabil töltéspárok energetikai viszonyaitól, ezért az utóbbiak felderítése alapvető fontosságú.

Az elektrontranszportlánc állapotainak energetikai vizsgálatára az egyensúlyi redox titrálás, a fotoakusztikus spektroszkópia, protonációs folyamatok esetén az integrált protonkötés mérése és a késleltetett fluoreszcenciás módszer használható. (Az utóbbival rokon termolumineszcenciás technika is igen hatékonynak bizonyult a zöld növények kutatására, de a bakteriális fotoszintézis területén -valószínűleg detektálási nehézségek miatt- tudomásunk szerint még nem alkalmazták.) A felsorolt alternatívák közül sok szempontból kiemelkedik a késleltetett fluoreszcenciás módszer. A bakterioklorofill dimér késleltetett fluoreszcenciájának lecsengéséből közvetlenül meghatározhatók az elektrontranszportlánc reakcióinak termodinamikai jellemzői. A késleltetett fluoreszcencia a fotoszintetikus elektrontranszport melléktermékeként minden fotoszintetizáló növényben, minden körülmények között fellép. Méréséhez így semmiféle külső beavatkozást nem kell végezni a vizsgált rendszeren, szemben pl. az egyensúlyi redox titrálás módszerével, amelynek alkalmazásához redox festékeket kell adni a mintához, amelyek mindig beavatkozást jelentenek annak működésébe. A késleltetett fluoreszcencia emisszió igen kis hatásfokú, ún. szivárgási folyamat, a belőle származó veszteség a fotoszintézis hatékonyságát csak elhanyagolható mértékben rontja. A

késleltetett fluoreszcencia mérésének további nagy előnye, hogy figyelembe veszi a kialakuló töltéspár tagjai közötti elektrosztatikus kölcsönhatást, amelyre a redox titrálás nem képes. A másik két technikával ellentétben a késleltetett fluoreszcencia mérése kinetikus, vagyis lehetőséget kínál arra, hogy a szabadenergia szinteknek a másik két eljárással is meghatározható stacionárius értékein túlmenően a szabadenergiák gyors változásait is detektálhassuk. Ilyen mérést eddig még nem végeztek, noha az elektrontranszport közben az elektrontranszportlánc állapotainak szabadenergiái a relaxációs folyamatok (pl. fehérje relaxáció) következtében szinte biztosan eltolódnak. A késleltetett fluoreszcencia mérése az alternatív egyensúlyi kísérleteknél sokkal rövidebb időt (néhány perccet) vesz igénybe, így sorozatmérésekre is alkalmas, ami mutánsok vizsgálatánál, vagy biotechnológiai alkalmazásokban nagyon fontos lehet. Fotoszintetizáló baktériumokon végzett késleltetett fluoreszcenciás mérésekről - valószínűsíthetően méréstechnikai problémák miatt- eddig még csak néhány csoport számolt be, de (részben éppen ezért) a kísérleti nehézségek megoldására fordított munka bőségesen megtérülhet, ha érvényesülnek a késleltetett fluoreszcencia mérésének fentebb felsorolt előnyei.

Ezek a megfontolások készítettek bennünket arra, hogy a fotoszintézis elektrontranszport folyamatai energetikájának felderítéséhez bakteriális reakciócentrumok késleltetett fluoreszcenciájának vizsgálatával próbáljunk új ismereteket szerezni.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A bakteriális reakciócentrum

A bíborbaktériumok zsúfolva vannak fotoszintetikus vezikulumokkal, vagyis a sejthártya befűződéseiből keletkezett, kettős lipidréteggel határolt apró, gömbalakú testecskékkel (2.1 ábra). E vezikulumok határhártyájába ágyazódik be az a legkisebb szerkezeti egység, amelyben még létrejöhet a primér fotokémiai reakció, a töltésszétválasztás. Ezt a fehérjékből és pigmentmolekulákból (ún. kofaktorok) felépülő egységet **reakciócentrumnak** (RC) nevezzük. Az RC átnyúlik a határhártyán, sőt annak két oldalán ki is türemkedik, és (pl. protontranszporttal) kapcsolatot teremt a két oldal között.



2.1. ábra. *Rb.sphaeroides* bíborbaktérium keresztmetszete. Nyilakkal jelöltük a fotoszintetikus vezikulumokat, a sejthártya befűződéseiből keletkezett, kettős lipidréteggel határolt, apró, gömbalakú testecskéket.

2.1.1. A reakciócentrum szerkezete

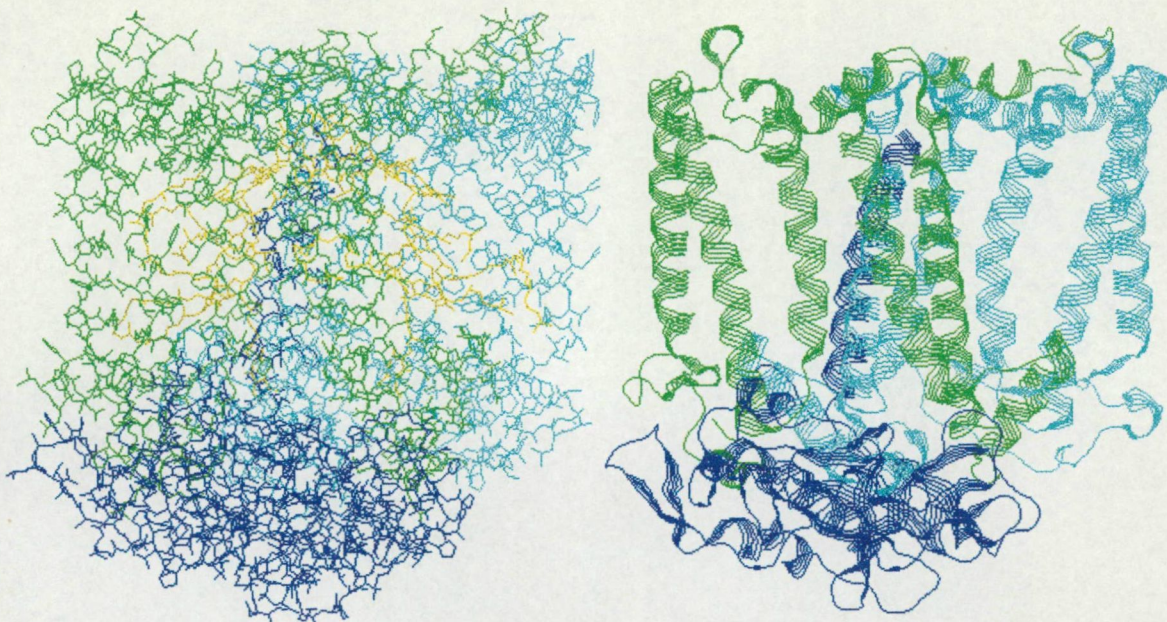
Az RC létezését már 1932-ben feltételezték (Emerson és Arnold, 1932), de spektrális bizonyítékot csak 1952-ben találtak rá (Duysens, 1952). Az 1970-es években

sikerült először izolálni a *Rb. sphaeroides* baktériumból olyan fehérje-komplexet, amely képes volt töltésszétválasztásra (Feher, 1971; Clayton és Wang, 1971). Az elmúlt két évtized során a mind fejlettebb biokémiai, molekuláris genetikai és biofizikai technikák (röntgen-krisztallográfia, EPR, ENDOR, abszorpciós spektroszkópia) lehetővé tették az RC térszerkezetének és működésének felderítését.

H. Michel -nek 1982-ben sikerült *Rps. viridis* RC -ből kristályokat előállítani (Michel, 1982), és az azokon már elvégezhető röntgendiffrakciós vizsgálatok segítségével meghatározták az RC szerkezetét 0,3 majd 0,23 nm -es atomi feloldással (Deisenhofer és mtsi, 1985; Deisenhofer és Michel, 1989; Deisenhofer és mtsi, 1995). A *Rb. sphaeroides* reakciócentrumának szerkezetét 0,28 ill. 0,26 nm -es felbontással derítették fel (Allen és mtsi, 1988; Chang és mtsi, 1991; Ermler és mtsi, 1994). E két RC szerkezete hasonlít egymáshoz, de vannak közöttük lényeges különbségek is: a *Rps. viridis* -ből izolált RC -hez még egy négy hemcsoportot tartalmazó citokróm alegység is kapcsolódik, az *a* típusú bakterioklorofill helyett *b* van benne, és primér kinonja ubikinon helyett menakinon (Yeates és mtsi, 1988; Feher és mtsi, 1989).

Mivel vizsgálataimat *Rb. sphaeroides* 2.4.1. vad típusán és R-26 (karotinoid-mentes) mutánsán végeztem, a továbbiakban e reakciócentrumok szerkezetét fogom ismertetni. A vad típusú RC három fehérje alegységből (L, M, H; 2.2 ábra), és a következő kofaktorokból (2.3 ábra) áll: 4 bakterioklorofill, 2 bakteriofeofitin, 2 kinon, 1 nem-hem típusú vas (Fe^{2+}) és 1 karotinoid molekula. Az R-26 mutánsból hiányzik a karotinoid.

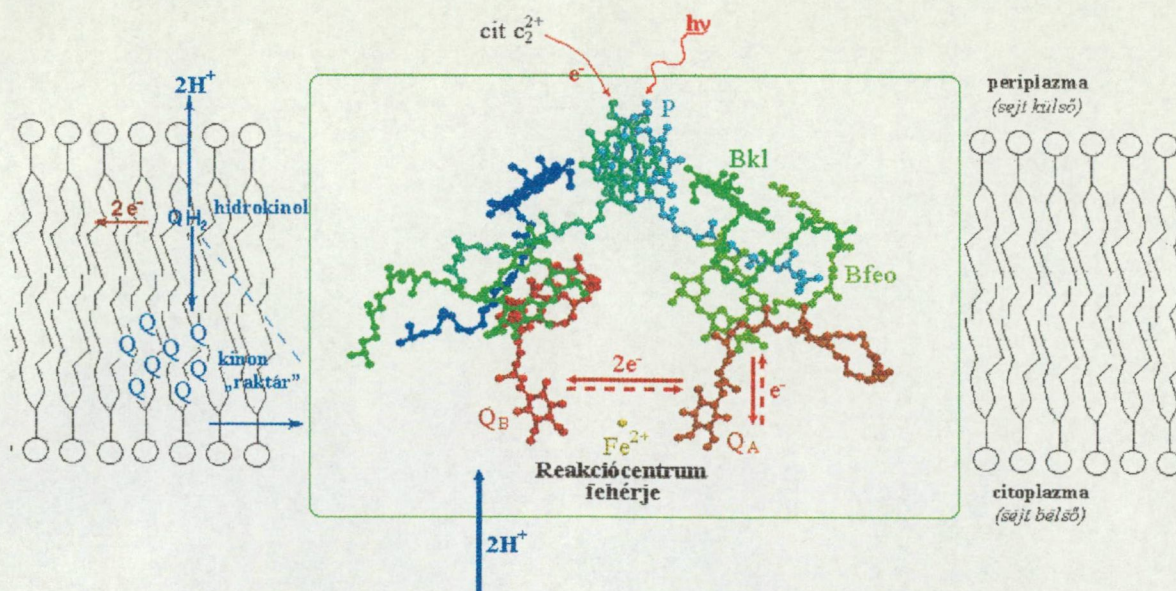
A három fehérje alegységet (2.2 ábra) egymáshoz viszonyított molekulatömegeik alapján L (light), M (middle), és H-val (heavy) jelölik, a korai, SDS poliakrilamid gélelektroforézis kísérletek alapján. Bár az RC aminosav-sorrendjének meghatározásakor kiderült, hogy a molekulatömeg szerinti sorrend éppen fordított (a H, M, L alegységek móltömegei rendre: 27,4 kD, 31,3 kD, és 34,3 kD (Williams és mtsi, 1984), ezeket az elnevezéseket mégis megtartották. Az L és az M polipeptid 25-35% -os szekvenciális homológiát mutat, az aminosavjaik 70% -a apoláros és 5-5 hosszú transzmembrán α -hélixből állnak (Michel és mtsi, 1986; Williams és mtsi, 1986). E hélixek közül 2-2 szorosan kapcsolódik egymáshoz, és 4 nm átmérőjű, 7 nm hosszúságú hengeres magot alkot. Az LM komplex nagyon stabil, mivel a 4 hélix egy-egy hisztidin csoportja, valamint egy glutaminsav ligandumot képez a nem-hem típusú vas(II) ionnal (Allen és mtsi, 1988). A komplex fontos jellegzetessége, hogy 180°-os forgási szimmetriát mutat a



2.2. ábra. A *Rb. sphaeroides* bíorbaktérium reakciócentrumának szerkezete. Az ábra a brookhaveni Protein Databankból származik. A H alegységet kék, az L alegységet világoskék, az M alegységet zöld, a kofaktorokat pedig (a baloldali ábrán) sárga színnel jelöltük. A jobboldali ábrán az RC 11 α -hélixét láthatjuk.

membránra merőleges, a diméren és a vas ionon keresztülművő szimmetriatengelyre nézve (Feher és mtsi, 1989). A H alegység laza, globuláris szerkezetű, és csak egy transzmembrán hélice van. Az LM komplex citoplazmikus oldalához kötődik, és a két kinon-kötőhelyet sapkaként fedi be. Valószínűsíthető, hogy stabilizálja az RC szerkezetét, mert ha eltávolítják, akkor a két kinon közötti elektrontranszfer gátlódik (Debus és mtsi, 1985). Az RC periplazmikus oldala a másodlagos elektrondonorként működő, globuláris szerkezetű, vízdékony citokróm c_2 dokkolóhelye.

A kofaktorok (2.3 ábra) az LM komplex hidrofób magjában, két, az A ill. a B jelű ág mentén helyezkednek el, és az LM komplexhez hasonlóan tükörszimmetriát mutatnak a vasatomon és a diméren átmenő, a membránra merőleges síkra nézve (Komiya és mtsi, 1988). A négy bakterioklorofill közül kettő (P_A és P_B) van der Waals-kölcsönhatásban van, és átlapoló elektronfelhőkkel dimért alkotva képezik a P primér donort. A másik két bakterioklorofill (a monomér Bkl_A és Bkl_B) a bakteriofeofitinek (I_A és I_B ; a bakteriofeofitin hasonlít a bakterioklorofillhoz, csak tetrapirrol-gyűrűjében Mg^{2+}



2.3. ábra. A kofaktorok elhelyezkedése az RC -ben. Folytonos (piros) nyilakkal az előreirányuló, szaggatott (piros) nyilakkal a töltésrekombináció útvonalát jelöltem. Az irányított protonmozgás útját vastag (kék) nyilak jelölik.

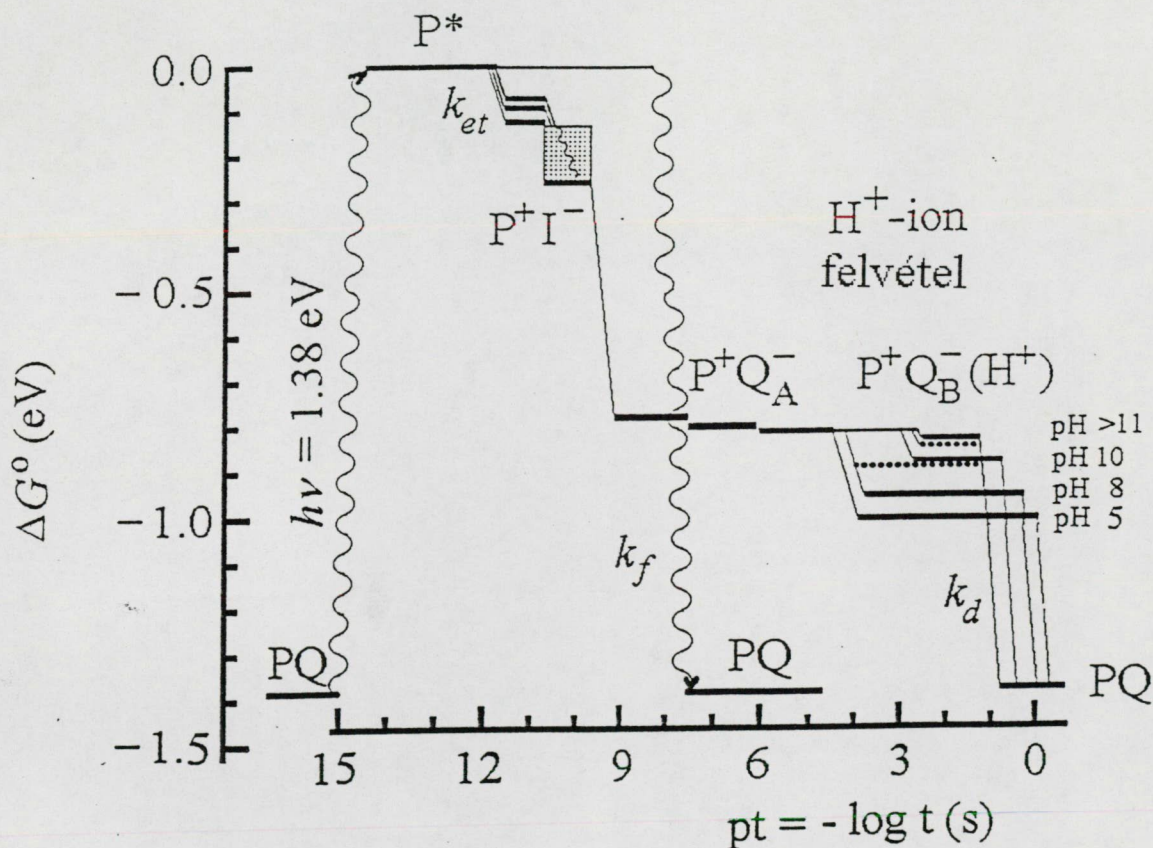
helyett két proton van) és a P dimér között helyezkedik el. Az A ágban lévő Q_A kinon molekula az elsődleges elektronakceptor, míg B ágbeli megfelelője, a Q_B kinon a másodlagos elektronakceptor szerepét tölti be. Mindkét kinonmolekula izoprenoid láncsal rendelkezik, és *Rb. sphaeroides* -ben kémiai szempontból azonosak (ubikinon-10). A vasion a hidrofób tartomány citoplazmikus oldalán, a két kinonmolekula között helyezkedik el. A vad típusú RC -ben a karotinoid molekula van der Waals-kötést létesít a Bkl_B -vel, így megbontja a szerkezeti szimmetriát. A primér elektrondonor tripllett állapotának kioltásával ez a karotinoid molekula hatékonyan megvédi az RC -t a roncsoló fotooxidációtól (Lancaster és mtsi, 1995).

A látszólagos szerkezeti szimmetria ellenére az A és B ág funkcionális aszimmetriát mutat: fiziológiás körülmények között az elektrontranszfer az A ág mentén legalább húszszor nagyobb hatékonysággal megy végbe, mint a B ágban (Michel-Beyerle és mtsi, 1988). Ennek oka az, hogy az LM komplex és a kofaktorok szimmetriája nem tökéletes: a dimér egyik tetrapirrol-gyűrűje kevésbé sík, mint a másik, a dimér átlapolódása nagyobb az A ág menti bakterioklorofill monomerrel, mint a B ágban lévővel, az I_A 0,15 nm -rel közelebb van a Bkl_A -hoz, mint az I_B a Bkl_B -hez, a fitil (Bkl és I) és az izoprenoid (kinon) láncok aszimmetrikusak, a poláros aminosavak eloszlása a két

ágban eltérő, és a vasion kb. 0,2 nm -rel közelebb van a Q_B -hez, mint a Q_A -hoz.

2.1.2. A reakciócentrumban végbemenő folyamatok

A fényabszorpció következtében az RC bakterioklorofill dimérje (P) alapállapotából gerjesztett szingulett állapotba kerül (P^*) (P^* felé mutató hullámos vonal a 2.4 ábrán). A két állapot közötti energiakülönbség megegyezik az elnyelt foton energiájával, ez *Rb. sphaeroides* esetén 1380 meV (Straley és mtsi, 1973). A primér donor energialeadással kerülhet vissza alapállapotába, a fotoszintetikus energiahasznosítás szempontjából két csoportra osztható, **energiahasznosító** ill. **vesztési** folyamatok során. Az energiahasznosító folyamatok hatásfoka magas, a velük versenyző vesztési folyamatok viszont kis valószínűséggel következnek be (Clayton, 1980).



2.4. ábra. Az RC -ben végbemenő folyamatok logaritmusos időskálán, és a PQ alapállapot ill. a töltésszétválasztott állapotok (P^+I^- és P^+Q^-) szabadenergia szintjei a gerjesztett dimér energiaszintjéhez képest. A folyamatok részletes tárgyalását ld. a szövegben.

Energiahasznosító folyamatok

A) Elektrontranszfer

Az elektrontranszfer (2.4 ábra, vékony, folytonos vonalak) eredményeképp ellentett előjelű elektromos töltések válnak szét, amelyek a továbbiakban általában nem rekombinálódnak, hanem egymást követő redox lépések során stabilizálódnak.

Az első elektrontranszfer reakció a dimér és a bakteriofeofitin közti töltésszétválasztás. Szükséges hozzá a fotonabszorpció, hogy általa a P primér elektrondonor gerjesztett P^* állapotba kerüljön, mert így középponti redoxpotenciálja, amely alapállapotában a bakteriofeofitint jóval meghaladja, alacsonyabbá válik azénál, és így már redukálni képes a bakteriofeofitint. A P^+I^- redoxpár képződésének kinetikája összetett, időállandói 0,6 -tól 15 ps -ig terjednek, aszerint, milyen hullámhosszon ill. hőmérsékleten végezték a méréseket és kiértékelésükhöz milyen modellfüggvényt feltételeztek (Kirmaier és Holten, 1987; Woodbury és mtsi, 1994). E rendkívül gyors folyamatok fellépése a dimér és a bakteriofeofitin tetrapirrol gyűrűi közti nagy távolság (kb. 1,7 nm) miatt nehezen magyarázható, ezért feltételezték, hogy a bakterioklorofill monomer jelenléte nagymértékben elősegíti az elektron átadását. Abban a kérdésben, hogy a bakterioklorofill monomer valódi vagy virtuális elektronhordozó-e, megoszlanak a vélemények. Bizonyos csoportok (Arlt és mtsi, 1993; Schmidt és mtsi, 1994) a $P^+Bkl_A^-$ állapotot valódi, töltésszétválasztott állapotnak tartják, mivel a femtoszekundumos spektroszkópiai méréseik kimutatták, hogy a monomer kb. 3 ps alatt redukálódik, majd egy még gyorsabb folyamat során (0,9 ps alatt) az elektron átmegy a bakteriofeofitinre. A másik csoport (Kirmaier és Holten, 1991) azt feltételezi, hogy a Bkl_A töltés-átmeneti állapota (virtuális redukciója) megnöveli az elektronfelhők átfedését a gerjesztett dimér és az I_A között, de ő maga nem redukálódik. A gyors elektrontranszfert kvantummechanikai jelenséggel, az ún. szuperkicserélődéssel vagy alagúteffektussal (Marcus és Sutin, 1985; Maróti és Tandori, 1993) magyarázzák. A P^+I^- töltéspár kialakulásával járó szabadenergia csökkenésre a mérési módszertől függően 75...260 meV adódott (Peloquin és mtsi, 1994; Woodbury és Allen, 1995).

A kialakult töltéspár további, egyre lassuló elektronátadási lépésekkel stabilizálódik. A bakteriofeofitin 80...320 ps alatt redukálja a Q_A elsődleges kinon akceptort,

ezzel létrehozza a $P^+Q_A^-$ töltéspárt (Kirmaier és Holten, 1987; Woodbury és Allen, 1995). Az elektron alagúteffektussal megy át a primér kinonra, a peptidváz magrezgéseivel ill. az áthidaló molekulák (pl. az M252-es triptofán) segítségével. A fotont abszorbeáló reakciócentrumok több, mint 98% -a eljut ebbe az állapotba, vagyis a fotoszintézis kvantumhatásfoka majdnem egységnyi. A reakcióval járó szabadenergia változást, a bakterioklorofill dimér milliszekundumos késleltetett fluoreszcenciájából határozták meg: a gerjesztett dimér szintjéhez képest a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiája -860 ± 20 meV (2.4 ábra, Arata és Parson, 1981a). Ez a lépés teszi irreverzibilissé a töltésszétválasztást, mivel itt jön létre a legnagyobb szabadenergia csökkenés; a $P^+Q_A^-$ állapotot ezért az első stabil töltéspárnak is nevezik.

A töltéssztabilizáció a Q_B másodlagos kinon redukciójával folytatódik, amely kb. 100 μ s alatt játszódik le (pH 7,5; Wraight, 1979; Kleinfeld és mtsi, 1984).

Mivel *Rb. sphaeroides*-ben a két kinon kémiai szempontból azonos, a funkcionális különbözőségük oka fehérje-környezetükben keresendő. Környezetük különbözősége alapján már értelmezni lehet a kinonok eltérő viselkedését (Allen és mtsi, 1988). A primér kinon az M alegység erősen hidrofób tartományába van beágyazódva, ráadásul a H alegység elszigeteli a vizes fázistól, ahonnan protont vehetne fel. Erősen kötődik az RC-hez, csak drasztikus eljárással (1-4% LDAO és 1-10 mM o-fenantrolinnal) távolítható el onnan (Okamura és mtsi, 1975; Liu és mtsi, 1991). Fiziológiai körülmények között csak egyszeresen és gyorsan redukálódik (kb. 10^{10} s⁻¹ sebességi állandóval), szemikín alakja pedig rendkívül stabil (a redukció szabadenergia-változása lényegesen pozitívabb a Q_A -kötőhelyen, mint apoláros szerves oldószerekben (Crofts és Wraight, 1983)). A másodlagos kinon közelében ezzel szemben, számos poláros csoport található, ezek elektrosztatikus tere csökkenti le a Q_B^- energiáját. Lazán kötődik az RC-hez, könnyen leválasztható ill. inhibítorral (pl. terbutrinnal) helyettesíthető, kétszeresen és viszonylag lassan redukálódik (kb. 10^3 - 10^4 s⁻¹ sebességi állandóval). A pozitív töltésű vasion elektrosztatikus potenciálja is lecsökkenti a Q_B^- energiaszintjét a Q_A^- -éhoz képest, mivel a Fe^{2+} kb. 0,2 nm -rel közelebb van a Q_B -hez mint a Q_A -hoz. *In vivo* körülmények között, pH 8-nál a Q_B/Q_B^- pár középponti redoxpotenciálja 60 mV-tal pozitívabb, mint a Q_A/Q_A^- páré (Rutherford és Evans, 1980). Ezt a különbséget más mérések is alátámasztják. Arata és Parson (1981a) késleltetett fluoreszcenciás méréseiből a $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ állapotok közötti szabadenergia-

különbségre: 78 ± 8 meV adódott, és összhangban vannak velük a két állapot lecsengésének kinetikáiból kapott eredmények is (Kleinfeld és mtsi, 1984; Maróti és Wraight, 1988b).

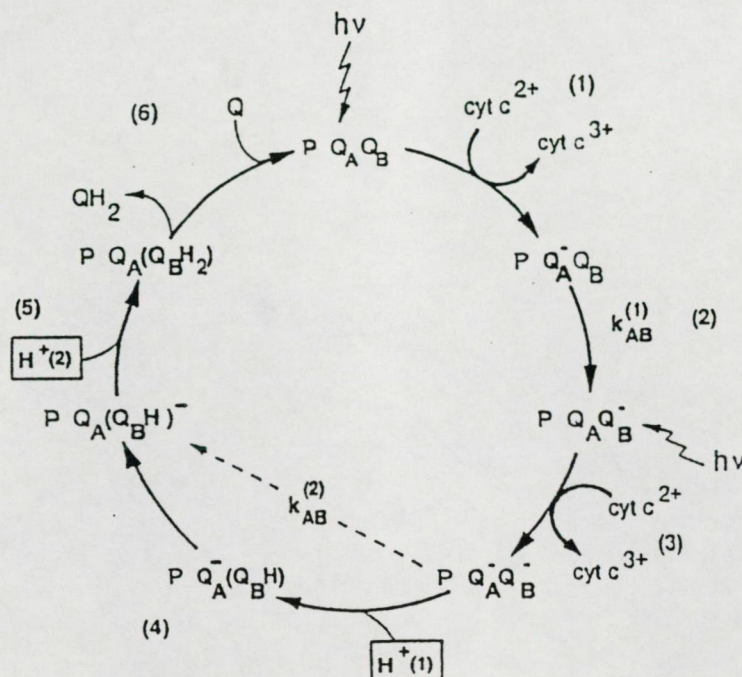
Bár a másodlagos kinonnak a primér kinon általi redukciója szabadenergia csökkenéssel jár, az elektrontranszfer e lépése nem megy végbe spontán, 560 meV (termikus) aktiválási energia szükséges hozzá (Kleinfeld és mtsi, 1984; Mancino és mtsi, 1984). Q_B redukálásához a körülötte lévő dipóloknak át kell rendeződniük, amely a $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ állapotok közötti szabadenergia különbségnél sokkal nagyobb reorganizációs energiát igényel, ezt fedezi a viszonylag nagy aktiválási energia.

Ebből az is kiderül, miért van szükség két kinonra az RC-ben. A Q_A felé irányuló elektrontranszfernek gyorsnak kell lennie, hogy a töltésszétválasztás energiája csapdázódjon, ne következzen be hatékony töltéskeresztösszabályozás. A Marcus elmélet szerint (Marcus és Sutin, 1985; Maróti és Tandori, 1993), az elektrontranszfer sebessége akkor maximális, ha a reorganizációs energia megegyezik a reakció szabadenergia változásával. A másodlagos kinon esetében a protonálódáshoz szükséges poláros aminosavak jelenléte növeli a reorganizációs energiát, ami már az optimálistól való eltávolodást jelent, így ez a kinon jóval lassabban redukálódik, de -minthogy a Q_A gyors redukciója már irreverzibilissé tette a töltésszétválasztást- ez már nem baj. Tehát ahhoz, hogy protontranszfer is létrejöjjön, és az energia is jó hatásfokkal csapdázódjon, az RC-ben két különböző környezetű kinonra van szükség (Okamura és Feher, 1992).

B) Fényindukált protonfelvétel

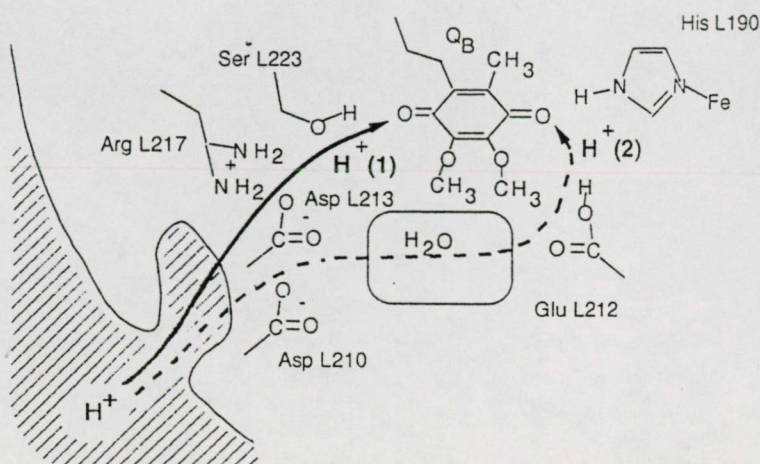
A $P^+Q_B^-$ végső töltéspár elektrosztatikus energiája nem alakítható át direkt módon kémiai energiává, vagyis ATP szintézisére közvetlenül nem használható. A kemiozmotikus elmélet (Mitchell, 1966) szerint ehhez membránon keresztüli protongradiens szükséges. Az "első" elektron a Q_B -ről nem vándorol tovább a B ág mentén, hanem bevárja a "második" foton hatására transzportált elektront, amely már kétszeresen redukálja a Q_B^- másodlagos kinont (innen a "kételektron-kapu" elnevezés). A kétszeresen redukált kinon két proton felvételével kinolt (Q_BH_2) képez, amely lényegesen lazábban kötődik az RC-hez, mint a szemikinon, ezért leválik onnan, és helyét egy másik kinon tölti be a membránban található kinonraktárból (Crofts és Wraight, 1983; McPherson és mtsi, 1990b). Ezzel az RC akceptoroldala visszakerül alapállapotába, és az eddig leírt folyamatok újra lejátszódhatnak. Ez a kinon redukciós ciklusa (2.5 ábra),

mely kb. 1 ms alatt megy végbe (Osváth és Maróti, 1997). Előfeltétele, hogy az oxidált dimér (P^+) képessé váljon újabb foton befogására, ami csak akkor lehetséges, ha a citokróm molekula visszaredukálja (kb. 1 μ s alatt adja át egyik elektronját a dimérnek).



2.5. ábra. A kinon redukciós ciklusa *Rb. sphaeroides* reakciócentrumában.

A kinol képződéséhez szükséges két proton a reakciócentrumon belüli, vízmolekulákból és protonálható aminosavakból (Glu L212, Asp L213, Ser L223 és Glu H173) álló csatornákon keresztül jut el a Q_B -hez (2.6 ábra). Irányított mutánsokon végzett mérésekkel kimutatták, hogy a két proton ($H^+(1)$ és $H^+(2)$) két különböző csatornán jut el a másodlagos kinonhoz (Paddock és mtsi, 1995; Takahaski és Wraight, 1994). A vízmolekulák megszakitás nélkül, hidrogénhíd-kötések láncolatán keresztül kötik össze a fehérje felszínét a másodlagos kinonnal (Ermler és mtsi, 1994; Okamura és Feher, 1995).



2.6. ábra. A proton útja a citoplazmától a Q_B -hez. Az első proton ($H^+(1)$) útját folytonos, a másodikét ($H^+(2)$) szaggatott vonal jelöli.

A protonfelvétel sztöchiometriája

Számos spektroszkópai mérés (Lubitz és mtsi, 1985; Breton és mtsi, 1991) kimutatta, hogy a szemikinsonok (Q_A^- és Q_B^-) anionikus formája képződik az RC-ben, vagyis a szemikinsonok nem protonálódnak közvetlenül. A pH-indikátor festékekkel (Maróti és Wraight, 1988b) és a pH-érzékeny üvegelektóddal végzett mérések (McPherson és mtsi, 1988), ill. a konduktometriás kísérletek (Maróti és Wraight, 1988a) viszont protonfelvételt mutattak ki; a $Q_A \rightarrow Q_A^-$ és $Q_B \rightarrow Q_B^-$ folyamatokhoz kapcsolódó protonálódás sztöchiometriája kisebb, mint $1 H^+/e^-$. Az a tény, hogy a szemikinsonok törtmennyiségű protont kötnek meg, valamint a protonfelvétel pH-függésének alakja arra engedett következtetni, hogy a protonálódás a kinonon megjelenő negatív töltés és a környező ionizálható csoportokkal rendelkező aminosavak közti elektrosztatikus kölcsönhatás eredménye. Ezt a jelenséget -a hemoglobin esetére ismert analógia alapján- az RC Bohr-effektusának nevezik (Wraight, 1979). E csoportok pK értékei a kölcsönhatás mértékétől függően megemelkednek, így a törtmennyiségű H^+ -iont ezek az aminosavak kötik meg az elsődleges- ill. a másodlagos kinonnal való kölcsönhatásukkal arányos mennyiségben (Maróti és Wraight, 1988b; McPherson és mtsi, 1988). Ellentétben a primér kinonnal, a másodlagos kinon -mint fentebb már említettük- maga is képes protonálódni. A folyamat során mért protonfelvétel $2 H^+/2e^-$ sztöchiometriát mutatott ki (McPherson és mtsi, 1993).

Másodlagos elektrondonor (citokróm) hiányában a P^+ nem redukálódik vissza. A $P^+Q_A^-$ állapotban a protonfelvétel kisebb, mint a PQ_A^- állapotban, mivel a P^+ pozitív töltése ellentétes (protonleadó) irányban változtatja meg a környezetében elhelyezkedő protonálható csoportok pK -ját (ez a jelenség a szemikinsonon megjelenő negatív töltés elektrosztatikus hatása révén létrejövő protonkötés fordítottja). A megfigyelhető protonkötés e két hatás eredője (Maróti és Wraight, 1988b; McPherson és mtsi, 1988).

C) Fehérje relaxáció (2.4 ábra, árnyékolt terület).

Számos tanulmány támasztja alá azt a feltételezést, miszerint a töltésszétválasztás során az RC-ben strukturális (konformációs) változások mennek végbe. E fehérjemozgások stabilizálják a kialakult töltéspárt, vagy akár meggátolják a töltésrekombinációt. Nagyon alacsony hőmérsékleten, sötétben befagyasztott RC-ben nincs elektrontranszfer a Q_A és a Q_B között, de ha az RC -t megvilágítás mellett fagyasztották le, akkor sok RC olyan konformációban volt, melyben végbemehetett ez a

folyamat (Kleinfeld és mtsi, 1984). A fehérje relaxáció, amely során a töltésváltásból álló állapotok fokozatosan stabilizálódnak, a gerjesztett dimér lecsengésének (fentebb említett) összetett kinetikáit is magyarázza (Woodbury és Parson, 1984; Peloquin és mtsi, 1994; Woodbury és mtsi, 1994). A Fourier transzformációs infravörös (FTIR) és a rezonancia Raman spektroszkópiai mérések is megerősítik a fehérje relaxáció feltételezését, mivel változásokat mutattak ki a fehérje és a kofaktorok közötti kölcsönhatásban a P^+ és a Q^- keletkezése során (Breton és mtsi, 1991; Nabadryk és mtsi, 1990). A konformációs változások elősegíthetik az RC protonfelvételt is, mert (időlegesen) a felszínre emelhetnek olyan protonálható csoportokat, amelyek addig a fehérje belsejében voltak (Maróti és Wraight, 1997).

D) Töltésstabilizáció a konformációs heterogenitás következtében (2.4 ábra, egymáshoz közeli vastag vonalak).

Az elektrontranszfer első (a dimér és az I közti) lépését jellemző komplex kinetikák hullámhossz- és hőmérsékletfüggése valamint az I és a primér kinon ill. kinonok közötti elektrontranszfer kinetikáiban megfigyelt komponensek (Tiede és mtsi, 1996) értelmezése arra a következtetésre vezetett, hogy a töltésstabilizációban az RC statikus és dinamikus konformációs heterogenitásának is jelentős szerepe van (Woodbury és Allen, 1995). A statikus heterogenitás olyan modellt feltételez, melyben az RC -k heterogén populációjában mindegyik RC -t különböző sebességű elektrontranszfer jellemez (Du és mtsi 1992; Volk és mtsi, 1995), míg a dinamikus heterogenitás-modell a P^* és a P^+I^- állapotok közötti (kis) szabadenergia-különbség időbeli változását feltételezi (Peloquin és mtsi, 1994).

Veszteségi folyamatok

A) Töltésrekombináció (2.4 ábra, vékony vonalak és pontozott vonalak a különböző pH -knál, k_r sebességi állandóval).

A P^+I^- állapotból történő töltésrekombináció időállandóját olyan RC -kben lehet meghatározni, amelyekben a Q_A -hoz irányuló elektrontranszport a Q_A előzetes redukciója, vagy hiánya (kinon-eltávolítás) miatt gátolt. Ez az időállandó szoba-hőmérsékleten 10-20 ns között van (Schenck és mtsi, 1982; Ogrodnik és mtsi, 1982),

attól függően, hogy milyen mintán végezték a kísérletet és hogyan gátolták az elektrontranszferet. E rekombináció három feltételezett úton történhet: az RC -k 90% -a az I^- -ről a P^+ -ra történő elektrontranszferrel rekombinálódik (ez hasonlít az előre irányuló elektrontranszferhez, csak más molekulapályák vesznek részt benne), míg 5-10% -ban a dimér triplett állapotba kerül, és a rekombináció onnan következik be (alacsony hőmérsékleten ez a folyamat dominál). Az RC -k elenyésző mennyisége úgy is rekombinálódhat, hogy a dimér újra gerjesztett állapotba kerül (ez olyan mutánsok esetében a legvalószínűbb, amelyekben a P^* a P^+I^- közötti szabadenergia-különbség kicsiny), és onnan megy vissza alapállapotába (Woodbury és Allen, 1995).

Ha az elektrontranszfer Q_A és Q_B között gátolt (pl. inhibítor jelenlétében), akkor a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot szobahőmérsékleten kb. 100 ms időállandóval rekombinálódik. Alacsony hőmérsékleten (77 K) ez 30 ms -ra gyorsul (Parson, 1987). Nagyon sok tanulmány foglalkozott a folyamattal olyan körülmények között (kinonhelyettesítés, mutánsok), amelyek megváltoztatták a Q_A , vagy a P középponti redoxpotenciálját (Woodbury és mtsi, 1986; Franzen és Boxer, 1993; Lin és mtsi, 1994). Ha a Q_A kötőhelyen ubikinon van, akkor szobahőmérsékleten a rekombináció valószínűleg szuperkicserélődéssel megy végbe, a P^+I^- virtuális állapoton keresztül (Franzen és mtsi, 1993).

In vitro körülmények között, így kísérleteink során is, amikor az RC -ből hiányzik a másodlagos elektrondonor, a vízdékony citokróm, a töltésrekombináció valószínűsége megnövekszik. A $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltésrekombináció lényegesen lassabb folyamat az előzőnél, időállandója pH 8 -nál 1 s, (Kleinfeld és mtsi, 1984), ami meglepő, hiszen a kinonok majdnem azonos távolságra (kb. 3 nm) vannak a dimértől. Valószínű, hogy a másodlagos kinon körüli nagyszámú poláros csoport és/vagy a fehérje belsejében töltésvezetésre alkalmas út hiánya gátolja meg a Q_B -ről történő közvetlen rekombinációt, így az indirekt módon, a Q_A -n keresztül megy végbe (Labahn és mtsi, 1994).

Mint láthatjuk, a töltésrekombinációk 2-3 nagyságrenddel lassabbak, mint a nekik megfelelő, előre irányuló, fotoszintetikus szempontból hasznos elektrontranszferek. Ez teszi lehetővé, hogy a stabilizált, végső töltéspár keletkezésének kvantumhatásfoka majdnem maximális (1), ennek azonban a stabilizáció során jelentős (60-70%-os) energiavesztés az ára (Feher és mtsi, 1989).

B) Hőleadás

A dimér gerjesztési energiáját hő formájában is leadhatja a környezetnek, a rezgési energiaszintek rendszerén keresztül, fokozatosan. A hőleadás mértéke a fotoakusztikus spektroszkópia segítségével detektálható, amely a fotoszintetikus folyamatok vizsgálatának ugyancsak fontos eszköze. A fotoakusztikus technika lehetővé teszi a fényindukált folyamatok során keletkező térfogat- és entalpiaváltozások meghatározását. A gerjesztési energia hőként felszabaduló része szétválasztható a hosszú élettartamú köztes termékekben tárolt részétől, ha a méréseket pl. a víz maximális sűrűségének megfelelő hőmérsékleten (4 °C -on) végzik, mert a fotoakusztikus jeleket ekkor csak a térfogatbeli változások fogják adni (Brumfeld és mtsi, 1999; Edens és mtsi, 1999). Megjegyezzük, hogy a fotoakusztikus spektroszkópia eredményeit ennek ellenére igen nehéz a szisztematikus hibáktól mentesíteni (vö. Arata és Parson, 1981b; Malkin és mtsi, 1994; Puchenkov és mtsi, 1995; Mauzerall és mtsi, 1995 entalpiaváltozásra kapott eredményeit).

C) Fluoreszcencia

A gerjesztett dimér foton kibocsátásával is visszajuthat alapállapotába (sugárzási állandója k_f) (2.4 ábra, a PQ állapot felé mutató hullámos vonal). A bakteriális RC fényemissziója kétféle lehet: prompt- ill. késleltetett fluoreszcencia. Minthogy mindkettő a P^* és P közti átmenetből származik, spektrálisan megkülönböztethetetlenek egymástól. Intenzitásuk és időbeli lecsengésük viszont alapvetően különbözik: míg a prompt fluoreszcencia a gerjesztés után néhány nanoszekundumon belül lecseng, addig a késleltetett fluoreszcencia mindaddig megfigyelhető, amíg a visszreakciók (a $P^+I^- \rightarrow P^*I$, a $P^+Q_A^- \rightarrow P^*Q_A$ és a $P^+Q_B^- \rightarrow P^*Q_B$ folyamat) táplálják (Clayton, 1980), és intenzitása nagyságrendekkel kisebb a prompt fluoreszcenciáénál.

Mivel vizsgálataimban a bakterioklorofill dimér (milliszekundumos) késleltetett fluoreszcenciája központi szerepet játszik, alább külön fejezetben tekintem át annak irodalmi hátterét.

2.2. A reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciája

Noha a fotokémiával versenyző veszteségi folyamatok kis valószínűséggel következnek be (Clayton, 1980), már az 1950-es évek elején világossá vált az ilyen folyamatok vizsgálatának fontossága, köztük a késleltetett fluoreszcenciáé is. A késleltetett fény-emissziót Strehler és Arnold (1951) fedezte fel spenót kloroplasztisban. Hamar kiderült, hogy megvilágítás után a legtöbb vizsgált fotoszintetizáló organizmus percekig fényt bocsát ki. Arnold és Thomson (1955) azt is megfigyelték, hogy a bíborbaktériumok közül a *Rhodospirillum rubrum*, a *Rps. gelatinosa* és a *Rp. palustris* is emittál késleltetett fényt, bár ez sokkal gyengébb, mint az algák és a magasabbrendű növények esetén. 1965-ben Clayton és Bertsch mutánson végzett mérései bebizonyították, hogy csak olyan baktériumok bocsátanak ki késleltetett fluoreszcenciát, amelyekben van működőképes reakciócentrum, az antenna bakterioklorofill jelenléte nem elég. Clayton (1965) *Chloropseudomonas ethylica* zöld baktériumon végzett, részletes késleltetett fluoreszcencia tanulmányában sok hasonlóságot fedezett fel a prompt- és a késleltetett fluoreszcencia között, és felvetette annak lehetőségét is, hogy a prompt fluoreszcencia a késleltetett fluoreszcencia egyik gyors komponense.

Fontos előrelépést jelentettek a *Rps. viridis* kromatofórákon végzett kísérletek (Carithers és Parson, 1975; Fleischman, 1974), amelyek kimutatták, hogy a késleltetett fluoreszcencia a primér töltésszétválasztás fordított folyamatából keletkezik. Sikerük titka az volt, hogy meggátolták a második elektrontranszfert (o-fenantrolinnal), és így jobban megfigyelhették a késleltetett fluoreszcencia jellemzőit.

Az 1980-as években Parson és munkatársai kezdtek el foglalkozni a *Rb. sphaeroides* reakciócentrumában, a P^+I^- és a $P^+Q_A^-$ élettartama alatt a P^* állapotból kibocsátott fényemisszióval, mérték intenzitását, lecsengését, és feltételezve, hogy a P^* és a töltésszétválasztott állapotok között termikus egyensúly áll be, meg is magyarázták eredményeiket (Arata és Parson, 1981a; Schenck és mtsi, 1982; Woodbury és Parson, 1984; Woodbury és mtsi, 1986). A mérések nehéznek bizonyultak, mivel a fluoreszcencia (kvantum)hatásfoka rendkívül kicsi: $4 \cdot 10^{-4}$ (Zankel és mtsi, 1968) viszont nagy előnyük, hogy érzékenyen kimutatják a töltésstabilizáció során kialakuló redoxpárok szabadenergiaszintjeiben (pl. kezelések hatására) bekövetkező változásokat. A prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával pedig

meghatározhatóvá váltak a kialakult stabil töltéspárok abszolút szabadenergia szintjei is (Arata és Parson, 1981a).

Olyan RC -ben, amelyben a primér kinonra történő elektrontranszfer gátolt, a P^*I állapot a gerjesztést követően igen hamar (pár ps alatt) termikus egyensúlyba kerül a P^+I^- töltésszétválasztott állapottal, emiatt az RC -k igen kis hányada állandóan a P^*I állapotban lesz (dinamikus egyensúlyban). Ezek az RC -k bocsátják ki a késleltetett fluoreszcenciát, melynek intenzitásából közvetlenül meghatározható a gerjesztett dimér és az első stabil töltéspár közötti szabadenergia különbség. Woodbury és Parson 1984-ben 160 és 210 meV közötti ΔG értéket közöltek (Woodbury és Parson, 1984). A bizonytalanság oka a mért fluoreszcencia intenzitásának összetett időfüggésében keresendő (legalább három kinetikus komponensű: 3,2; 9,7 és 11 ns -os időállandókkal). Hörber és munkatársai is hasonló értékeket (130-250 meV) kaptak *Rps. viridis* esetében (Hörber és mtsi, 1986), tehát a P^+I^- töltéspár kialakulása nem jár túl nagy energiaveszteséggel.

A második stabil töltéspár ($P^+Q_A^-$) kialakulása viszont jóval nagyobb szabadenergia csökkenést okoz, ezért ennek az állapotnak az energetikája jelentősen befolyásolja a fotokémiai hatásfok értékét, és az elektronvándorlás kinetikáját. A P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia különbséget a P^* állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapotból való termikus repopulációjából származó késleltetett fluoreszcencia intenzitásából határozták meg (az elektronátadást a másodlagos kinonra inhibitorral gátolták): 860 ± 20 meV (Arata és Parson, 1981a; Woodbury és Parson, 1984). Ismerve ezt a szabadenergia értéket megbecsülhetjük azoknak az RC -knek a számát, amelyek késleltetett fluoreszcenciát bocsátanak ki: az $\exp(-\Delta G/k_B T)$ Boltzmann faktornak megfelelően ez nagyon alacsony: a $P^+Q_A^-$ állapotban lévő RC -k kb. 10^{-15} -öd része. Összevetve a P^+I^- és a P^* , illetve a $P^+Q_A^-$ és a P^* állapotok közötti szabadenergia különbséget megállapíthatjuk, hogy az I^- és a Q_A közötti elektrontranszfer okozza a legnagyobb, kb. 670 meV -os energiaveszteséget.

A késleltetett fluoreszcencia intenzitásának hőmérsékletfüggése fontos információkat ad a töltésszétválasztás termodinamikai paramétereiről (Arata és Parson, 1981a; Woodbury és mtsi, 1986). Ilyen mérések alapján határozták meg a primér kinonra történő elektrontranszferrel kapcsolatos entalpia változást: $\Delta H = 750$ meV (Arata és Parson, 1981a).

A gerjesztett dimér (P^*) és a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot közötti szabadenergiát meghatározták olyan reakciócentrumokban is ahol a Q_A kötőhely natív ubikinonját más kinonokra cserélték (Woodbury és mtsi, 1986). Ezek a szubsztituensek megváltoztatták a Q_A/Q_A^- pár középponti redoxpotenciálját. Az ubikinon potenciáljánál magasabb (redukáló) potenciálú szubsztituenst alkalmazva a $P^+Q_A^-$ állapot közelebb kerül a P^* -hoz, megnövelve ezáltal, a P^* állapot termikus repopulációjának valószínűségét, vagyis várhatóan növekedni fog a késleltetett fluoreszcencia intenzitása, amit az eredmények igazoltak is. Az ilyen mérések is alátámasztják a késleltetett fluoreszcencia mérések előnyeit a szabadenergia szintek meghatározásában.

A késleltetett fluoreszcencia módszerének alkalmazása hasznosnak bizonyult olyan esetekben is, amikor két másik mérési módszer eredményei eltértek egymástól, és el kellett dönten, vajon melyik eredmény a helyes. Ilyen volt pl. a direkt protonmérések és az egyensúlyi redox titrálási eredmények közötti eltérés. Izolált RC-ben a Q_A/Q_A^- redoxpár középponti potenciáljának pH-függése a redox-titrálás módszerével (Maróti és Wraight, 1988b) pH 6 és 10 között -60 mV/pH egységnek adódott, míg a PQ_A^- állapot protonfelvételének mérésekor (Maróti és Wraight, 1988b; McPherson és mtsi, 1988) pH-egységenként -20 mV -os meredekséget kaptak. Minthogy a Q_A/Q_A^- redoxpár középponti redoxpotenciáljának értékét (ill. annak pH függését) a redukált primér kinon és a protonálható csoportok közötti ugyanazon kölcsönhatások határozzák meg, mint a PQ_A és a $P^+Q_A^-$ állapotok szabadenergiáinak különbségét, a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának méréséből meghatározható szabadenergia különbség a középponti redoxpotenciált is megadja. A késleltetett fluoreszcenciás módszerrel elvégzett vizsgálatok (McPherson és mtsi, 1990a) eredménye a kísérleti hibahatáron belül megegyezett a direkt protonmérésével, így megerősítette azt. Az eltérés oka, mint később kiderült, a redox titrálás mediálásában, továbbá abban keresendő, hogy a Q_A redukálása a két kísérleti eljárásnál eltérő módszerekkel (kémiai- ill. fotoredukcióval) történt.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A fotoszintetizáló baktériumok reakciócentruma a fotoszintézis kutatásban központi szerepet játszik, a fotoszintetizáló rendszerek modelljéül szolgál, mert ez a legegyszerűbb olyan integrális membránfehérje, amely a fotoszintézis alapfunkcióinak elvégzésére képes, és szerkezete atomi feloldással ismert. Kutatása emiatt Tanszékünkön már régóta folyik, de nem volt lehetőségünk a benne végbemenő elektron- és protontranszport energetikája felderítésének egyik leghatékonyabb eszköze, a késleltetett fluoreszcenciás módszer alkalmazására. Célul tűztük ki tehát, hogy a késleltetett fluoreszcencia mérésére alkalmas berendezést állítunk össze, és megszerezzük az e módszer lehető legtöbb alkalmazási lehetőségének rutinszerű kihasználásához szükséges tapasztalatokat.

A fotoszintézis energiahatásfokát leginkább csökkentő folyamatok (pl. a primér és szekunder kinon redox reakciói) a milliszekundumos tartományban mennek végbe, ezért részletesen jellemezni kívántuk az ezeket tükröző késleltetett fluoreszcencia milliszekundumos kinetikáját, és annak segítségével az egyes állapotok szabadenergiáit.

E tapasztalatok összefoglaló értelmezése céljából olyan általános modell kidolgozása és működésének diszkussziója szükséges, amely mindegyikről számot ad.

Fontosnak tartottuk nyomonkövetni a reakciócentrum egyes állapotaihoz tartozó másik két termodinamikai állapotfüggvény, az entalpia és az entrópia változásait, mert ezek felvilágosítást adhatnak e két állapotfüggvénynek a töltésstabilizációban játszott szerepéről és az RC fehérje szerkezeti átrendeződésének mértékéről a töltésstabilizáció során.

A protonmegkötésnek az egyes töltéspárok stabilizációjában játszott szerepe és az RC fehérje részei közti kölcsönhatások tisztázásában segíthet a késleltetett fluoreszcencia pH-függésének tanulmányozása, s az így kapott adatok összevethetők az egyéb mérések (pl. protonkötés) és a modellszámítások eredményeivel, ezért az ilyen vizsgálatok is célszerűnek látszottak.

Az ionerősség változtatását azért ítéltük fontosnak, mert a késleltetett fluoreszcenciára gyakorolt hatása adalékot szolgáltat a sók és az RC közti elektrosztatikus kölcsönhatás módjainak megértéséhez.

Az RC natív primér kinonjának más kinonra való kicserélése protonációs vizsgálatokra korábban már jól bevált. Ilymódon terveztük vizsgálni, hogyan befolyásolja a Q_A szabadenergiája az első stabil töltéspár stabilizációját. Minthogy a töltésstabilizációt jellemző rekombinációs időállandó rutin abszorpcióváltozás-mérésekkel egyszerűen megadható, igen hasznos lenne meghatározni kapcsolatát a $P^+Q_A^-$ állapot nehezen mérhető szabadenergiájával.

Habár a szimmetriát módosító kinon-környéki mutációk következményeinek késleltetett fluoreszcenciás módszerrel való tanulmányozását nemrég kezdtük el, az eddigi eredményeink bizonyítják, hogy érdemes tovább folytatni a kutatásokat, mert olyan lényeges információkat kaphatunk, amelyek segítségével jobban megérthetjük a két kinon eltérő viselkedését.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálataim nagy részét *Rb. sphaeroides* fotoszintetizáló bíborbaktérium 2.4.1. vad típusú és R-26 karotinoidmentes mutánsán végeztem. A kinon-környéki mutációk vizsgálatához *Rb. capsulatus* baktériumot használtam, melynek reakciócentrumait tisztított állapotban Pierre Sebban csoportjától (CNRS, Centre de Genetique Moleculaire, Gif sur Yvette), lefagyasztva kaptuk.

4.1. A baktériumok tenyésztése

Az agar táptalajba szűrt törzstenyészeteket szobahőmérsékleten, gyenge ($< 10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), állandó megvilágítás mellett, 0,5% élesztő kivonatot és 0,3% kazamínosavat tartalmazó, 1,5% agaron tartottuk, és rendszeresen újraoltottuk. A *Rb. sphaeroides* bíborbaktériumokat fotoheterotróf módon, levegőtől elzárva, Siström-táptoldatban neveltük, amelyben az egyedüli szénforrásuk a szukcinát volt (Cohen-Bazire és mtsi, 1957). A tenyészetet friss tápoldattal 24 óránként steril körülmények között kihígítottuk. Az R-26 mutáns esetében, mivel az nem tartalmaz karotinoidot, a megvilágítás előtt oxigénmentesíteni kellett a friss tápoldatot. Ezt úgy értük el, hogy az átoltást követően a sejteket 5-8 órán keresztül sötétben tartottuk, így a tápoldatban oldott oxigén a sejtlégzés során felhasználódott (Maróti és Wraight, 1988a). A baktériumok növekedéséhez szükséges megvilágítást wolframszálas izzók szolgáltatták, amelyek emissziós maximuma a közeli infravörös tartományba esik, ahol a baktériumok jól abszorbeálódnak. A megvilágítás erősségét a használt izzók teljesítményének és geometriai elrendezésének megválasztásával $90\text{-}100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ értékre állítottuk be (Nagy és mtsi, 1991). A tenyészet túlzott felmelegedését ventilátorokkal akadályoztuk meg, így 29°C körüli állandó hőmérsékletet sikerült beállítani. A tenyésztést egy literes üvegballonokban végeztük. A sejteket növekedésük késői, logaritmusos fázisában 8000 g gyorsulással 10 percig lecentrifugáltuk, majd többszöri, Tris pufferrel (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8) történt átmosás és újbóli centrifugálás után további felhasználásig -20°C -on tároltuk. Az oldatok, illetve a minták pH-ját kalibrált kombinált üveg-elektrodával mértük (Orion, 91-03 típus).

4.2. A kromatofóra preparálása

A reakciócentrum preparálásához kb. 100 g vizes tömegű baktériumból indultunk ki. A sejteket kiolvasztás után Tris-pufferrel átmostuk, kb. 200 ml -re hígítottuk, majd dugattyús hidraulikus présben (French press) 140-150 MPa nyomáson feltörtük. A sajtolást a jó hatásfokú feltörés érdekében általában kétszer végeztük el. A műveleteket 4 °C -on végeztük, és sajtolás közben EDTA -t adtunk a sejtekhez. Az EDTA (10 mM, pH 8), a feltörés alatt bőséggel felszabaduló bivalens fémionokkal kelátokat képez (leköti őket), és mivel a proteázok működéséhez bivalens kationokra van szükség, jelentősen lecsökkenti ezek aktivitását. A feltörtetlen sejteket és a sejtfal darabjait centrifugálással (20000 g, 15 perc, 4 °C) üleptítettük le. A felülúszót 240000 g gyorsulással 90 percig ultracentrifugáltuk. Az üledéket, amely a számunkra értékes kromatofórát tartalmazta, óvatosan, minimális Tris-pufferrel felfuszpendáltuk, elkerülve a szürke magot, amely szervetlen szennyezéseket és sejtfalmaradványokat tartalmazott (a sárgásbarna színű felülúszóból lehet izolálni a vízőldékony citokrom molekulákat; az üledék és a felülúszó közötti, néha megjelenő, világoskék, laza szerkezetű sávban még kb. 10% -nyi kromatofóra maradt). Ilyen állapotban a kromatofóra a későbbi felhasználás céljaira befagyasztható.

4.3. A reakciócentrum izolálása és tisztítása

A fentiek szerint preparált kromatofórát Tris pufferrel kihígítottuk úgy, hogy optikai denzitása 50 ($\lambda = 860 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$) legyen. Az RC -t a kromatofórák membránfrakcióiból LDAO ionikus detergenssel oldottuk ki (az LDAO eltávolítja a foszfolipideket és átveszi a helyüket, majd micellákat alkot az RC -vel). Szobahőmérsékleten, gyenge fényben, állandó keverés mellett annyi 30% -os LDAO oldatot csepegtettünk a kromatofórához, hogy az LDAO végkoncentrációja elérje a 0,55% -ot (az oldat színe kicsit sötétedik), majd 30 percig sötétben kevertettük, és ultracentrifugáltuk (240000 g, 90 perc, 4 °C). A felülúszó tartalmazta az RC -k 90% -át. A feltárás hatékonyságát (az RC koncentrációját) optikai úton a bakterioklorofill monomér 802 nm -es abszorpciócsúcsánál ellenőriztük ($\epsilon = 288 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Straley és mtsi,

1973). Az abszorpciós spektrumokat Unicam UV4-500 spektrofotométerrel vettük fel. A preparálás hatásfoka akkor volt kielégítő, ha 80-100 g vizes tömegű baktériumból kiindulva az RC mennyisége elérte a 0,5 μmol értéket (ha nem, akkor az LDAO -val történő kezelést és az ultracentrifugálást megismételtük).

A továbbiakban az RC -t több lépésből álló ammónium-szulfátos kicsapással tisztítottuk, de előtte az LDAO koncentrációját 0,45% LDAO hozzáadásával 1% -ra emeltük, mert így a (felszínen úszó) kicsapódó lepedék stabilabbnak bizonyult. Első lépésként, lassan keverve és ügyelve a pH 8 -as érték körüli tartására, szilárd ammónium-szulfátot adtunk az oldathoz (0,27 g/ml), majd 8000 g gyorsulással 15 percig centrifugáltuk. A reakciócentrum-fehérje kicsapódott, és vékony hátyát képezett az ammónium-szulfátos oldat tetején. A lepedéket Tris pufferben felfuszpendáltuk, majd egyenlő térfogatú AS-pufferben (10 mM Tris, 0,3% LDAO, 0,5 g/ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,0) ismételtén kicsaptuk (így 0,25 g/ml lett az ammónium-szulfát koncentrációja). Centrifugálás után (8000 g, 10 perc) az ismét a felülúszóban található RC -t TL-pufferben (10 mM Tris, 0,03% LDAO, pH 8,0) ecsettel felfuszpendáltuk. A következő lépésben alacsonyabb sókoncentrációt állítottunk be (0,12 g/ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), hogy a reakciócentrumtól eltérő fehérjék kicsapódjanak, majd megismételtük az előbbi centrifugálást (a felülúszó tartalmazta az RC -t). További fehérjeszennyeződésektől szabadultunk meg úgy, hogy AS-puffer cseppenkénti hozzáadásával az ammónium-szulfát koncentrációját 0,15 g/ml -re növeltük (az oldat ilyenkor enyhén fátymoossá vált), majd a szuszpenziót újra lecentrifugáltuk (8000 g, 10 perc). A felülúszóban az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ koncentrációját ismét 0,25 g/ml -re emeltük, centrifugáltunk (8000 g, 10 perc), és a lepedékben lévő, kicsapódott RC -t minimális mennyiségű TL-pufferben felfuszpendáltuk.

Mindezek után ellenőriztük a preparált RC tisztaságát és a másodlagos kinon aktivitását (kinonkötő képességét).

Az RC tisztaságát az abszorpciós spektrum 280 ill. 800 nm -es csúcsainál mért extinkciók hányadosával jellemeztük. A 280 nm-es csúcs az aromás aminosavakra (Trp, Tyr, Phe) jellemző, míg a 800 nm -es csúcs a bakterioklorofill monomérek (minden RC -ben kettő van belőlük) abszorpciójából adódik. A reakciócentrum tisztának minősíthető, ha hányadosuk nem haladja meg az 1,22 értéket (Clayton és Wang, 1971; Feher, 1971). Ezt olyan reakciócentrumoknál mérték, amelyekből a másodlagos kinon hiányzott (a preparálás során könnyen kimosódik). A kinon UV tartománybeli abszorpciója meg-

növeli a 280 nm -nél mért, a fehérjének tulajdonított csúcsot, ezért a kinonnal helyreállított RC kissé magasabb érték, 1,35 alatt már tisztának tekinthető.

A másodlagos kinon aktivitást az egyetlen fényfelvillanás által kiváltott töltésrekombináció (ld. a 4.6 fejezetet) lassú komponensének a gyorshoz viszonyított aránya adja meg, neutrális pH-nál, ekvivalens mennyiségű natív kinon hozzáadása után (az UQ-10 erősen hidrofób, ezért 30% -os TX-100 -ban oldottuk fel, szonikálás segítségével (McComb, 1990)). Elfogadható kinon aktivitásnak mondható a 90% fölötti helyreállítottság.

Mivel az ammónium-szulfátos kicsapás után az RC tisztaságát jellemző érték általában túl magas, 2 körüli volt, az RC -t anioncserélő kromatográfiával tovább tisztítottuk. Ezt megelőzően a minta sókoncentrációjának csökkentése érdekében 12 órás dialízist (cellulóz membránban, Sigma) alkalmaztunk, TL-puffer + 20 μ M EDTA -ban, 4 °C -on. Ezzel párhuzamosan előkészítettük az anioncserélő oszlopot (DEAE Sephacel, Sigma): 1 M -os NaCl oldattal aktiváltuk, majd kb. 2 liter oszloposó pufferrel (10 mM Tris, 0,1% LDAO, 20 μ M EDTA, pH 8,0) átmostuk addig, amíg az oszlopról lecsöpögő oldat pH -ja meg nem egyezett az oszlopra felvitt puffer pH -jával. Ezt követően a dializált és kihígított RC -t felrétegeztük az oszlopra, és a szennyeződések (főleg antenna maradványokat) az oszlop térfogatának többszörösét kitevő mennyiségű, 60 mM NaCl -ot tartalmazó oszloposó pufferrel kimostuk. Ilyenkor az RC lassan halad lefelé az oszlopon. Az RC -k nagyrészt tartalmazó fő sávot 150 mM NaCl -os oszloposó pufferrel szedtük le az oszlopról, kb. 20, egyenként 5 ml -es frakciót gyűjtve. Ezek a frakciók tartalmazták a legtisztább RC -ket. Az oszlopon maradt, szennyezettebb RC -ket 400 mM -os sókoncentrációval távolítottuk el. A tiszta frakciókat (1,25-1,35) összegyűjtöttük, ultraszűréssel (Whatman 100-as membrán, 0,15-0,20 MPa) kb. 80-100 μ M -os koncentrációra töményítettük, majd 2 UQ-10/RC mennyiségű ubikinon-10 hozzáadásával helyreállítottuk a másodlagos kinon-aktivitását. Erre azért volt szükség, mert az RC másodlagos kinon kötőhelye még 4 °C -on is igen gyorsan roncsolódik, ha üres. A magas sókoncentrációt és detergensmennyiséget dialízissel (10 mM Tris, 0,03% LDAO, 20 μ M EDTA, pH 8,0) csökkentettük. A mérések során zavaró lehet, hogy az LDAO ionos detergens, vagyis van protonálható csoportja. Mivel más detergens használata jelentősen csökkentené a preparálás hatékonyságát, az LDAO -t a preparálást követően célszerű kicserélni, nemionos detergensre, pl. TX-100 -ra. Ezt 24, vagy akár 48 órás dialízissel, és az oldat gyakori

cseréjével értük el. Az így preparált RC -t $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vagy $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A *Rb. capsulatus* baktérium reakciócentrumait a *Rb. sphaeroides*hez hasonlóan kell izolálni és tisztítani, annyi különbséggel, hogy sötétben, anaerob körülmények között RYPE tápoldatban fejlődnek és nincs ammónium-szulfátos kezelés, csak oszlop-kromatografálás.

4.4. Q_A -szubsztituens reakciócentrumok előállítása

Egyes kísérleteinkhez, az RC natív kinonját (UQ-10) attól eltérő szerkezetű és redoxpotenciálú más kinonokkal (MD, DQ) helyettesítettük. A kinon-helyettesítést az Okamura és mtsi (1975), Liu és mtsi (1991), illetve Kálmán és Maróti (1994) által kidolgozott módszer szerint végeztük el. Először el kell távolítani az RC natív kinonját. A DEAE Sephacel ioncserélő gyanta 1M NaCl -t tartalmazó mosópuffer (10 mM Tris, 0,1 % LDAO, 1 mM EDTA, pH 8,0) felhasználásával elvégzett aktiválása után mosópufferrel kimostuk a felesleges sót, majd az oszlopanyagon 1mg/ml BSA -t (borjúból izolált szérumalbumin) tartalmazó mosópuffert folytattunk át $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy órában keresztül. Az ioncserélő gyantához kötődő BSA jelentősen megnöveli a kinonleválasztás hatásfokát. A felesleges BSA -t 0,5 M NaCl -os mosópufferrel, a felesleges sót mosópufferrel távolítottuk el. Az előző fejezetben leírt módszer szerint preparált RC -t $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on összekevertük az ioncserélő gyanta harmadrészevel, majd (a felülúszó abszorpciós spektrumának felvételével) ellenőriztük, hogy az RC kellőképpen bekötött-e. Ha igen, akkor a gyantát szendvics formában a kromatografáló oszlopba töltöttük: egy réteg üres gyantára egy réteg RC -os gyantát tettünk, az oszlop tetejére vékonyabb, üres gyantaréteg került. Az oszlopanyagot kinonmentesítő pufferrel (4,5% LDAO, 10 mM Tris, 1mM EDTA, 5 mM o-fenantrolin, pH 8,0) gyorsan csepegtetve, $26\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten mostuk, közben ellenőriztük a frakciók spektrumát. A magas LDAO koncentráció elősegíti a lényegesen nehezebben hozzáférhető Q_A -kötőhely felnyitását, míg a Q_B -kötőhelyre bekötődő o-fenantrolin megvédi azt a detergens okozta roncsolódástól, illetve kiszorítja onnan a máshonnan kioldódott kinonokat. Az oszlop anyagában maradt felesleges kinont és o-fenantrolint mosópufferrel mostuk ki, majd a kinonmentesített RC -t hoztuk le az oszlopról $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 300 mM NaCl -t tartalmazó mosópufferrel.

A kinonmentesített reakciócentrumok primér kinon-kötőhelyének fotokémiai

aktivitását vízdékony menadionnal (MD, Sigma), vagy abszolút etanolban oldódó durokinonnal (DQ, Sigma) állítottuk helyre. A módszer reverzibilitásának ellenőrzésére natív kinonnal is helyreállítottuk a mintát, ilyenkor nemcsak a Q_A -, hanem a Q_B -kötőhely kinonkötőképességét is sikerült helyreállítani. A kinonokat 10...20 -szoros feleslegben adtuk a mintához, és 12 órán keresztül, 4 °C -on, állandó keverés mellett érték el a legmagasabb fokú bekötődést. A kinonmentesítés és -helyreállítás hatásfokát az egyszeri fényfelvillanást követően 430 nm -nél mérhető töltésrekombináció amplitúdójából határoztam meg (Maróti és Wraight, 1988a). A kinonmentesítés megközelítette a 95% -ot, míg a helyreállítás hatásfoka az MD -vel, ill. DQ -val helyettesített minták esetében 80-90% volt.

4.5. Q_B -mentesített reakciócentrumok előállítása

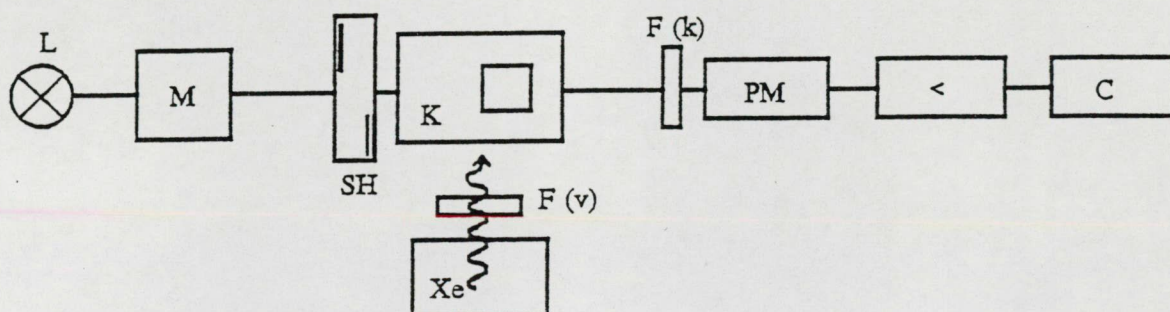
A Q_B oldal kinonmentesítését, az előző fejezetben részletesen leírt módszerhez hasonlóan végeztük, azzal a különbséggel, hogy -mivel csak a másodlagos kinon kötőhelyét akartuk kinonmentesíteni- a kinon kimosásához használt puffer alacsonyabb koncentrációjú LDAO -t tartalmazott (4,5% helyett 3% -ot), és az eljárás végén természetesen nem adtunk kinont a preparátumhoz. Az ilyen mintát egy-kinonos mintának nevezik.

4.6. Az abszorpcióváltozás mérése

Kísérleteim során, gyakran meg kellett határozni a minta aktív reakciócentrum-koncentrációját, ill. a töltéspárok rekombinációs kinetikáját. Ezeket a méréseket az oxidált ill. redukált állapotú primér donor különbségi abszorpciós spektruma 430 nm-nél jelentkező csúcsánál végeztem, házi készítésű, kinetikus, egysugaras spektrofotométerrel (Maróti és Wraight, 1988a), amelynek blokksémája a 4.1 ábrán látható.

A minta telítési optikai gerjesztésére xenon villanólámpát (EG&G FX-200, félideje 6 μ s, a bemenő elektromos energia 2J) használtunk. Mivel az izolált RC esetében antennapigmentek nem segítenek a fény begyűjtésében, a telítési gerjesztést fényvezető plexirúd segítségével kellett biztosítani. A mérőfényt stabilizált áramforrásról táplált halogénizzó (12V, 50W) szolgáltatta, izzószálát lencse képezte le a monokromátor

(Zeiss (Jena) SPM 2) belépő részére. A kilépő (430 nm -es) fényt, amely -alacsony intenzitása miatt- a mintában fotokémiai változást nem tudott kiváltani, a mintatartóban elhelyezett küvettán keresztül a fotoelektronsokszorozó (Hamamatsu R-928) fotokatódjára gyűjtöttük. A fotoelektronsokszorozót keresztezett optikai szűrők védték: a Xe villanó lámpa fénye 750 nm felett átengedő szűrőn (Kodak zselatinszűrő) keresztül jutott a mintára (a megmaradó vörös sáv elegendő volt a telítési gerjesztéshez), míg a fotokatód elé kék sáváteresztő szűrőt (Corning 4-96) tettünk. A fotoelektronsokszorozó anódáramát feszültségjellé alakító áram-feszültség konverter DC kimenőjelét mérőfény nélkül 100 mV -ra állítottuk, majd a mérőfényt bekapcsolva a fotoelektronsokszorozó nagyfeszültségének (erősítésének) változtatásával újra nulláztuk. A felerősített feszültségjelet, Advantech PCL818 analóg/digitális átalakítóval digitalizáltuk, számítógépben átlagoltuk és tároltuk, majd kiértékeljük.



4.1. ábra. A kinetikus, egysugaras spektrofotométer bloksémája. Jelölések: L – mérőfényt szolgáltatató fényforrás, M – monokromátor, SH – fényzár, K – küvettatartó, Xe – villanólámpa, hullámos nyíl – gerjesztő fényfelvillanás, F(k) és F(v) – kék és vörös optikai szűrők, PM – fotoelektronsokszorozó, < – erősítő, C – számítógép.

Az általunk vizsgált stabilizált töltéspárok ($P^+Q_A^-$ és $P^+Q_B^-$) rekombinációja elsőrendű folyamatként kezelhető, így exponenciális függvénnel írható le. Mindkét töltéskeresztreakció összetett is lehet, vagyis több exponenciális lineáris kombinációként kezelhető:

$$[P^+](t) = \sum_i Amp_i \cdot \exp(-k_i t), \quad (4.1)$$

ahol $[P^+](t)$ az oxidált dimér koncentrációja a t időpillanatban, Amp_i az adott komponens amplitúdója, k_i pedig a sebességi állandója. Az illesztést Levenberg-Marquardt típusú nemlineáris legkisebb négyzetes illesztő programmal végeztem, egy vagy két komponens

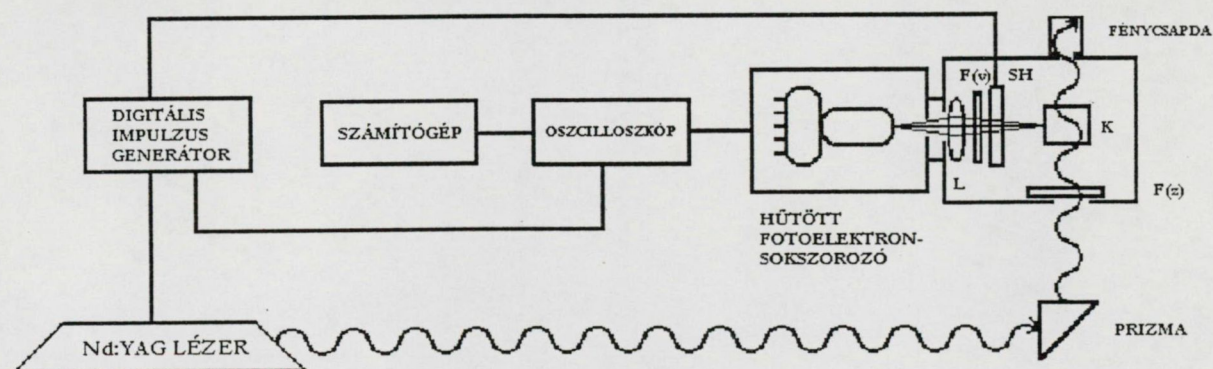
figyelembevételével.

Egy komponenssel illesztettük a kinetikát, ha inhibítorral (általában terbutrin) gátoltuk az elektron továbbjutását a másodlagos kinonra. Ennek hatására a $P^+Q_A^-$ állapotból származó töltésrekombináció valószínűsége megnövekszik, a lecsengés tipikus időállandója 100 ms körüli.

Másodlagos (natív) kinon aktivitással rendelkező RC -kben két komponenszt figyeltünk meg, ami abból származik, hogy a Q_B -kötőhelyek betöltöttsége nem teljes (max. 95%), így az RC populációja heterogén. Vannak csak Q_A -t tartalmazó RC -k is, amelyek rekombinációja (pH 7 -nél) kb. nyolcszor gyorsabb ($k_{AP} = 8,07 \text{ s}^{-1}$), mint a másodlagos kinont is tartalmazó RC -k esetén mérhető érték ($k_{BP} = 1,05 \text{ s}^{-1}$).

4.7. A késleltetett- és a prompt fluoreszcencia mérése

Az RC bakterioklorofill dimérje által emittált milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia kinetikájának felvételére egy speciálisan erre a célra tervezett mérőberendezést építettünk, amelynek bloksémája a 4.2 ábrán látható.



4.2. ábra. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia méréséhez használt berendezés vázlata. Jelölések: L – optikai lencse, SH – fényzár, K – küvetta, F(v) – vörös szűrő, F(z) – zöld szűrő.

A mérési nehézségeket a késleltetett fluoreszcencia rendkívül alacsony intenzitása (kvantumhatásfoka kb. 10^{-9}), kedvezőtlen spektrális elhelyezkedése (az infravörösben, 920 nm körül mérhető) és a gerjesztés alatt a minta által kibocsátott erős prompt fluoreszcencia okozza. A mintát Q-kapcsolt Nd:YAG lézer frekvenciakétszerezett fényimpulzusával (Quantel YG 781-10, hullámhossz 532 nm, energia 100 mJ,

félértékszélesség 5 ns) gerjesztettük. A lézer fényét hosszú (kb. 3 méter) úton vezetjük be a zöld sáváteresztő üvegszűrővel (Schott BG-18) lezárt, és nagyon gondosan sötétített dobozba, hogy a térszög csökkentésével minimalizáljuk a lézer villanólámpáinak szórt fénye által gerjesztett prompt fluoreszcenciát. A lézerfény a mintán való áthaladás után fénycsapdába kerül és elnyelődik. Mindezzel minimumra csökkentettük a külső (háttér)fénynek a dobozba kerülését, az intenzív lézerfénynek a falakon való nemkívánatos reflexióját és az azáltal gerjesztett foszforeszcenciát. Az RC -t tartalmazó mintát egy 1 cm x 1 cm méretű, alacsony fluoreszcenciájú kvarcküvetába (Thermal Syndicate Ltd., "far UV") helyeztük, hőmérsékletét termosztálható küvetatartóval állítottuk be, és K-típusú (NiCr-Ni) termoelemmel (Vermer VE 305K) mértük. A késleltetett fluoreszcenciát a gerjesztő fényre merőlegesen detektáltuk. A mintából származó fluoreszcenciafényt vörös felüáteresztő szűrőn (Schott RG-850) át, bikonvex lencse képezte le az infravörös-érzékeny fotoelektronsokszorozó (Hamamatsu R 3310-03) fotokatódjára. Elektromosan vezérelhető mechanikus fényzár (Uniblitz VS25) védte a fotokatódot a rendkívül intenzív prompt fluoreszcenciától: zárva volt a gerjesztés alatt, de a lézer-felvillanás után kb. 3 ms alatt kinyílt. A szórt lézerfény által az optikai elemekből kiváltott foszforeszcencia minimalizálása céljából az emissziós szűrőt és lencsét a fényzár mögé helyeztük, így a szórt lézerfény nem gerjeszthette azokat. A jel/zaj viszonyt a fotoelektronsokszorozó $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra való hűtésével (így csökkent a sötétárama; Photocool PC 410CE, Products for Research, Inc.), és a mérések átlagolásával növeltük. Általában 256 kinetikát átlagoltunk digitális oszcilloszkóp (Philips PM 3350A) segítségével, 1 Hz -es (olyan reakciócentrumoknál amelyekben hiányzott a másodlagos kinon-aktivitás) vagy 0,24 Hz -es (Q_B -t is tartalmazó minták esetében) ismétlési frekvenciával. Az így kapott jelet számítógépben tároltuk és kiértékeljük. A lézer, a fényzár és az oszcilloszkóp működését egy digitális impulzus-generátor hangolta össze.

Az RC által kibocsátott prompt fluoreszcencia integrált intenzitását ugyanolyan optikai és elektronikai (erősítés, szűrés) körülmények között mértük, mint a késleltetett fluoreszcenciát, csak a gerjesztés energiája volt eltérő: ilyenkor $0,77\text{ mJ} \pm 5\%$ -os volt a késleltetett fluoreszcencia mérésekor (ez az érték a telítési görbe lineáris tartományába esik), illetve $16,2\text{ nJ} \pm 10\%$ a prompt fluoreszcencia detektálásakor; ez utóbbi esetben a fényzár természetesen nyitva volt. A lézer energiáját kalibrált piroelektromos energiamérővel (Molelectron J25) határoztuk meg.

A késleltetett fluoreszcencia lecsengése több exponenciális komponens lineáris kombinációjaként kezelhető, akár csak a töltésrekombinációs kinetika (ld. az előző fejezetet). Az illesztés is ugyanúgy történt, de felhasználtuk (rögzítettük) az abszorpció-változással mért töltésrekombinációs kinetika felbontásából kapott időállandókat, mivel azok szórása kisebb.

5. EREDMÉNYEK

A töltésszétválasztást követően a reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciát bocsát ki, amelynek időtartománya rendkívül széles, a pikoszekundumostól a szekundumosig kb. 10 nagyságrendet ölel fel.

A bakteriális reakciócentrumok késleltetett fluoreszcenciáját a gerjesztett bakterioklorofill dimér (P^*) emittálja. Ez a fluoreszcencia fotokémiai eredetű, mert a primér fotokémiai termékek visszreakcióiból keletkezik, és az RC -k elenyésző hányada bocsátja ki, azaz szivárgásos típusú. Lecsengése több exponenciális komponensre bontható, ami arra utal, hogy a töltéssztabilizációban több tranziens állapot is résztvesz. A leggyorsabb (piko- és nanoszekundumos) komponensek a magas szabadenergiájú állapotok közötti korai reakciókat, az RC -k statikus (Woodbury és Allen, 1995; Ogrodnik és mtsi, 1999), és/vagy dinamikus heterogenitását (ezen állapotok szabadenergiaszintjeinek időfüggő csökkenése fehérje relaxáció következtében; Woodbury és Parson, 1984; Peloquin és mtsi, 1994; Woodbury és mtsi, 1994) tükrözik (ld. még 2.1.2., Energiahasznosító folyamatok, D)). E komponensek vizsgálata túlhaladta lehetőségeinket.

A milliszekundumos és a szekundumos időtartományban -a kinon-akceptor komplex redox állapotától és helyreállítottságától függően- három exponenciális fázist tudunk felbontani a késleltetett fluoreszcencia lecsengésében (pH 8-nál; ld. 5.3 ábra): egy nagyon gyors (1,5 ms), egy gyors (102 ms), és egy lassú (865 ms) komponenst. A gyors és a lassú fázist korábban már más csoportok is megfigyelték (Arata és Parson, 1981a; McPherson és mtsi, 1990), viszont még egyik tanulmányban sem dolgoztak ki olyan egységes modellt, amely megmagyarázná keletkezésüket, megadná lecsengésük sebességállandóit, és lehetővé tenné a prompt fluoreszcenciától való (kinetikai) megkülönböztetésüket. Ezért elsődleges feladatommak tekintettem olyan, több tranziens állapotú modellek kidolgozását, amelyek megfelelő elméleti háttérrel biztosítanak eredményeim értelmezésére. Ezeket a következő két részben (5.1. és 5.2.) ismertetem.

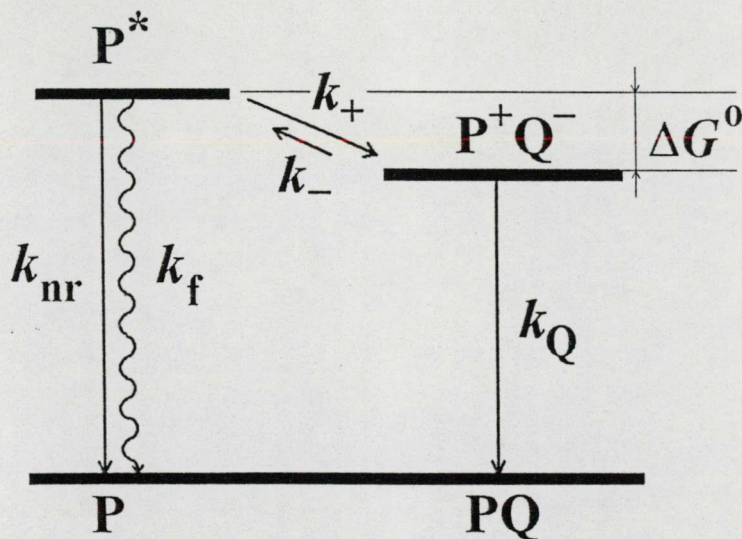
A késleltetett fluoreszcencia kinetikáját ill. a prompt- és a késleltetett fluoreszcencia közötti különbséget először egy olyan egyszerű rendszerben fogjuk leírni, amelyben a gerjesztett pigment energiájának egy része átmenetileg egy töltés-

szétválasztott állapotban (P^+Q^-) tárolódik (5.1. fejezet). A későbbiekben ennek az egyszerű modellnek az eredményeit fogjuk általánosítani, és alkalmazzuk egy több tranziens állapottal rendelkező, bonyolultabb rendszerre, a reakciócentrumra (5.2. fejezet). Mivel a lecsengés minden egyes fázisát az RC -ben végbemenő más és más reakciónak tulajdonítottam, minden komponens külön fejezetben (5.3., 5.4. ill. 5.5.) fogok tárgyalni.

5.1. Késleltetett fluoreszcencia két tranziens állapotú rendszerben

5.1.1. Szabad pigment fluoreszcenciája

A fénygerjesztés hatására a szabad pigment első gerjesztett szingulett állapotába (P^*) kerül. A fluoreszcencia az ebből az állapotból a szingulett alapállapotba (P) való, fotonkibocsátással járó átmenet során keletkezik (5.1 ábra; most $k_+ = k_- = k_Q = 0$).



5.1. ábra. Egyszerű modell a prompt és a késleltetett fluoreszcencia lecsengésének szétválasztására, két tranziens állapottal rendelkező rendszerben (P^* és P^+Q^-), pillanatszerű gerjesztést követően. Az állapotoknak megfelelő szintek egymástól vett távolsága a standard szabadenergia különbségeknek (ΔG^0) feleltethető meg. A sebességállandókat k -val jelöltük.

A fluoreszcencia intenzitása bármely t időpillanatban a gerjesztett dimér $[P^*](t)$ koncentrációjának és a sugárzásos átmenet k_f sebességi állandójának szorzata:

$$F(t) = k_f \cdot [P^*](t) \quad (1)$$

Ezzel a folyamattal párhuzamosan, vele versenyezve sugárzásmentes átmenet is létrejön (sebességi állandója k_{nr}). Ennél az átmenetnél a dimér gerjesztési energiája a rezgési energiaszintek rendszerén keresztül fokozatosan, hő formájában átadódik a környezetnek. Mivel a két folyamat egymástól függetlenül és párhuzamosan megy végbe, a gerjesztett állapot lecsengésének k_p eredő (megfigyelt) sebességi állandója a két részfolyamat sebességi állandóinak összege:

$$k_p = k_f + k_{nr} \quad . \quad (2)$$

Pillanatszerű, telítési gerjesztés után a gerjesztett pigment koncentrációjának időbeli változását a

$$\frac{d[P^*]}{dt} = -k_p \cdot [P^*] \quad (3)$$

elsőrendű differenciálegyenlet írja le, amelynek megoldása

$$[P^*](t) = \exp(-k_p \cdot t) \quad , \quad (4)$$

ha a $t = 0$ időpillanatban a gerjesztett dimér koncentrációját egységnyinek választjuk. A megfigyelt fluoreszcencia lecsengése tehát (ld. az (1) egyenletet) monoexponenciális, a sebességi állandója a sugárzásos és a nemsugárzásos átmenetek sebességi állandóinak összege (ld. a (2) egyenletet), a fluoreszcencia kvantumhatásfoka pedig:

$$\eta_o = \frac{k_f}{k_p} \quad . \quad (5)$$

5.1.2. Fotokémiai folyamathoz kötött pigment fluoreszcenciája

A reakciócentrum dimérje (foto)fizikai/kémiai folyamathoz csatolt, a gerjesztett dimér energiáját -versenyben az említett sugárzásos és nemsugárzásos átmenetekkel- ezzel a folyamattal is elveszítheti (5.1 ábra; $k_+ \neq 0$). Ez az átmenet tehát csapda a

gerjesztési energia számára, amelyből vagy egyáltalán nincs kiút (irreverzibilis folyamat), vagy csak részleges visszatérés lehet (reverzibilis folyamat). Ilyen mechanizmus a fotoszintetikus reakciócentrumban a triplett-képződés és a töltésszétválasztás.

Irreverzibilis folyamat. Ezen átmenet révén P^* lecsengése kiegészül egy újabb, k_+ sebességi állandóval jellemzett folyamattal, anélkül, hogy az elcsatolt gerjesztési energia bármilyen kicsiny hányada vissza tudna kerülni ($k_- = 0$). A szabad pigmentre megadott összefüggések emiatt értelemszerűen bővülnek. Pillanatszerű gerjesztést követően a gerjesztett dimér koncentrációjának időbeli változása:

$$[P^*](t) = \exp(-(k_p + k_+) \cdot t) \quad (6)$$

A megfigyelt fluoreszcencia lecsengése tehát továbbra is monoexponenciális marad, de gyorsabb ($k_{\text{obs}} = k_p + k_+$) lesz, és hatásfoka csökken ($\eta_{\text{prompt}} < \eta_o$):

$$\eta_{\text{prompt}} = \frac{k_f}{k_p + k_+} \quad (7)$$

Reverzibilis folyamat. Lényegesen módosul a fluoreszcencia lecsengése, ha az elcsatolt gerjesztési energia egy része ($k_- \neq 0$ sebességi állandóval jellemzett visszreakcióval) visszakerülhet a dimérre a szabadenergiát átmenetileg tároló (töltésszeparált, P^+Q^-) állapotból. E két átmeneti állapotú rendszer időbeli változására, pillanatszerű gerjesztést követően, az alábbi csatolt differenciálegyenletek (mérlegegyenletek) írhatók fel:

$$\frac{d[P^*]}{dt} = -(k_p + k_+) \cdot [P^*] + k_- \cdot [P^+Q^-] \quad (8)$$

$$\frac{d[P^+Q^-]}{dt} = k_+ \cdot [P^*] - (k_q + k_-) \cdot [P^+Q^-] \quad (9)$$

ahol k_q a töltésrekombináció sebességi állandója, amellyel a P^+Q^- töltésszétválasztott állapot visszakerül a PQ alapállapotba. Ha a (8) és (9) egyenletekből a $[P^+Q^-]$ változót kiküszöböljük, akkor a gerjesztett dimér koncentrációjának időbeli változására

másodrendű differenciálegyenletet kapunk:

$$\frac{d^2[P^*]}{dt^2} + (k_p + k_Q + k_+ + k_-) \cdot \frac{d[P^*]}{dt} + (k_+k_Q + k_Qk_p + k_-k_p) \cdot [P^*] = 0 \quad (10)$$

5.1.3. A fluoreszcencia lecsengésének sebességi állandói

A fluoreszcencia lecsengésének sebességi állandóit a (10) egyenletből származtatható karakterisztikus egyenlet megoldásai adják. Mivel a karakterisztikus egyenlet másodfokú, így két (nem szükségképpen egybeeső) gyököt fogunk kapni. Ha k_+ sokkal nagyobb, mint a reakciósémában előforduló bármely másik sebességállandó, akkor a (10) egyenlet karakterisztikus egyenletének két megoldása az alábbi közelítő alakra egyszerűsödik:

$$k_1 = k_+ + k_- + k_p \quad (11)$$

$$k_2 = k_Q + k_p \cdot \frac{k_-}{k_+} \quad (12)$$

A reverzibilitás (részleges visszatöltés) megengedése tehát kétfázisúvá (biexponenciálissá) tette a fluoreszcencia lecsengését. A gyorsabb komponens sebességállandója (k_1) a gerjesztett állapot (kinetikai) egyensúlya kialakulásának sebességállandóját fejezi ki (ebben meghatározó az előreirányuló reakció sebességállandója (k_+)), a lassabb komponens sebességállandója (k_2) pedig a tranziens szabadenergia-tároló állapot (P^+Q^-) kiürülési sebességállandóját tükrözi. Ez utóbbi folyamat két párhuzamos úton mehet végbe: direkt töltésrekombinációval (sebességi állandója k_Q) és indirekt módon, a P^* állapoton keresztül (sebességi állandója $k_p \cdot k_- / k_+$). A gyors komponens az ún. **prompt** (azonnali) fényemisszió, a lassú pedig a **késleltetett** fluoreszcencia (Malkin, 1977). Láthatjuk tehát, hogy a késleltetett emisszió megjelenése metastabil állapotból való visszatérés lehetőségéhez kötődik.

5.1.4. A prompt- és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdóviszonyai

A gerjesztett dimér koncentrációjának időfüggése a (10) egyenlet általános megoldásaként, a

$$[P^*](t) = A_1 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + A_2 \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad (13)$$

alakban írható fel, ahol A_1 ill. A_2 a prompt- ill. a késleltetett fluoreszcencia amplitúdója. Értéküket a kezdeti feltétel határozza meg: telítési gerjesztés esetén a $t = 0$ időpillanatban valamennyi pigment gerjesztett állapotban van ($[P^*] = 1$), a tranziens P^+Q^- állapot pedig üres ($[P^+Q^-] = 0$). Ezekkel (13) -ből, ill. (8) -ből (a (13) és (14) behelyettesítésével) kapjuk:

$$A_1 + A_2 = 1 \quad (14)$$

$$k_1 \cdot A_1 + k_2 \cdot A_2 = k_+ + k_p \quad (15)$$

A (11) és (12) egyenletek felhasználásával adódik:

$$A_1 = 1 - \frac{k_-}{k_+} \quad (16)$$

és

$$A_2 = \frac{k_-}{k_+} \quad (17)$$

A vissza- ill. az előreirányuló reakciók sebességi állandóinak arányát termikus egyensúly esetén megadhatjuk a P^+Q^- tranziens töltéstároló állapotnak a P^*Q gerjesztett állapotéhoz viszonyított ΔG^0 (< 0) standard szabadenergiájával (hangsúlyozzuk, hogy a szabadenergiák referenciaszintjének ilyen megválasztása miatt a töltésszétválasztott állapotok szabadenergiái mindig negatív előjelűek lesznek!):

$$\frac{k_-}{k_+} = \exp\left(\frac{\Delta G^\circ}{k_B T}\right) \quad , \quad (18)$$

ahol k_B a Boltzmann-állandó és T az abszolút hőmérséklet.

Szobahőmérsékleten $k_B T \cong 25$ meV. A gyakorlatban előforduló esetek döntő többségében $k_- \ll k_+$ (azaz $|\Delta G^\circ| \gg 25$ meV), ezért a prompt fluoreszcencia A_1 amplitúdója mindvégig egységnyinek tekinthető. A késleltetett fluoreszcencia A_2 amplitúdója (a (17) és (18) egyenleteknek megfelelően) a Boltzmann-eloszlás szerint módosul, miközben a P^+Q^- állapot szabadenergia szintje változik a gerjesztett dimér (P^*) szabadenergia szintjéhez képest. A P^* és a P^+Q^- állapotok szabadenergiái közötti különbség 58 meV csökkenésének (ill. emelkedésének) a késleltetett fluoreszcencia amplitúdójában 1 nagyságrendű emelkedés (ill. csökkenés) felel meg, vagyis a késleltetett fluoreszcencia amplitúdója érzékeny indikátora a P^+Q^- állapot szabadenergia szintjében bekövetkező változásoknak (a P^* állapot szabadenergiája *in vivo* körülmények között állandónak tekinthető).

5.1.5. Az abszolút szabadenergia-különbség meghatározása

A késleltetett fluoreszcencia amplitúdóváltozásaiából a fentiek szerint a P^+Q^- állapot szabadenergia szintjének relatív eltolódásaira következtethetünk. Ezen túlmenően, a szabadenergia abszolút értékét is meghatározhatjuk (a P^* szinthez képest), ha arányba állítjuk a prompt- és a késleltetett fluoreszcencia teljes intenzitását (az emittált fotonok teljes számát, azaz az emisszió határfokát):

$$\frac{I_{\text{prompt}}}{I_{\text{delay}}} = \frac{A_1}{A_2} \cdot \frac{k_2}{k_1} \quad (19)$$

(itt A_1/k_1 ill. A_2/k_2 a prompt- ill. a késleltetett fény monoexponenciális lecsengése alatti terület). Ide beírva az amplitúdók ((16) ill. (17) szerinti) és a sebességállandók ((11) ill. (12) alatti) kifejezéseit, k_+ -t bármely más sebességállandónál továbbra is lényegesen nagyobbak feltételezve, figyelembe véve a (18) egyenletet és az ebben a közelítésben is érvényes (7) egyenlet alapján k_+ helyébe k_f/η_{prompt} -ot írva adódik:

$$\frac{I_{\text{prompt}}}{I_{\text{delay}}} = \frac{k_Q \cdot \eta_{\text{prompt}}}{k_f} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ}{k_B T}\right) \quad (20)$$

A kapott összefüggés alapján meghatározható a P^* és a P^+Q^- állapotok közti szabadenergia-különbség a prompt és a késleltetett fluoreszcencia (integrált) intenzitásai arányának mért értékéből (vö. Arata és Parson, 1981a).

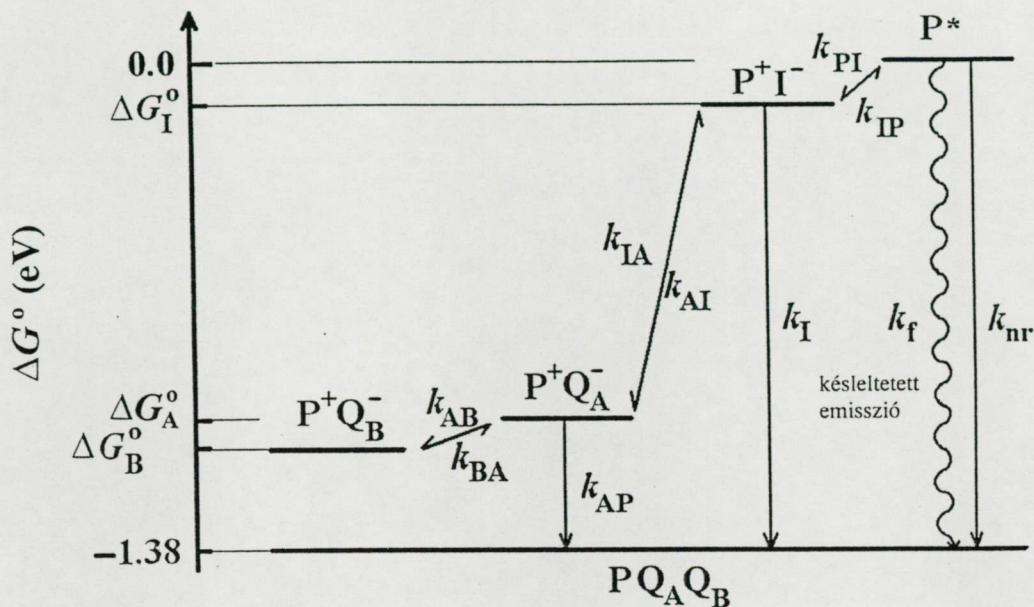
Érdemes megjegyezni, hogy a szabadenergia különbséget sokkal kedvezőbb a prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak arányából meghatározni, mint amplitúdó arányaikból. Míg ugyanis a prompt és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdóinak aránya általában rendkívül nagy szám ($\exp(-\Delta G^\circ/k_B T)$), addig (integrált) intenzitásuk viszonyát sebességállandók aránya lényegesen lecsökkenti (ld. (19)), emiatt ez utóbbi sokkal pontosabban mérhető. Például bakteriális RC esetén, $\Delta G^\circ \approx -900$ meV (Arata és Parson, 1981a; Turzó és mtsi, 1998), $k_Q = 10$ s⁻¹, $k_f = 8 \cdot 10^7$ s⁻¹ (Arata és Parson, 1981a; McPherson és mtsi, 1990a) és $\eta_{\text{prompt}} = 4 \cdot 10^{-4}$ (Zankel és mtsi, 1968; Woodbury és mtsi, 1985), így míg a prompt és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdóinak aránya $4,3 \cdot 10^{15}$, addig intenzitásuk aránya csupán $2,1 \cdot 10^5$.

5.2. A bakteriális reakciócentrum milliszekundumos késleltetett fluoreszcenciája

Pillanatszerű gerjesztést követően az izolált RC fehérje még hosszú ideig bocsát ki (késleltetett) fluoreszcenciát, amelynek milliszekundumos lecsengésében, mint már említettük, több komponens is megfigyelhető a kinon komplex redox állapotától és helyreállítottságától függően (ld. 5.3 ábra). Ez azt jelenti, hogy egyetlen töltéstároló tranziens állapot helyett azok bonyolultabb rendszerével kell számolnunk. Ennek megfelelően az előző fejezetben leírt (egyszerűsített) modellünket két, vagy akár több reakcióval is ki kell bővíteni, így az egzakt megoldás jóval bonyolultabbá válik. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia esetében azonban a bonyolult modellre is találhatunk közelítő megoldást, ha kihasználjuk, hogy a prompt és a késleltetett fluoreszcencia időállandói nagyságrendekkel eltérnek egymástól.

5.2.1. Késleltetett fluoreszcencia négy tranziens állapotú rendszerben

A milliszekundumos-szekundumos időtartományban megfigyelhető gyors és lassú fázisok értelmezésére tekintsünk egy olyan rendszert amelyben három töltéssztabilizáló lépés van, a bakteriofeofitin és a két kinon részvételével (5.2 ábra).



5.2. ábra. Négy tranziens állapottal (P^* , P^+I^- , $P^+Q_A^-$, $P^+Q_B^-$) rendelkező rendszer. A tranziens állapotok energiaszintjeit a gerjesztett dimér nullának vett energiaszintjéhez viszonyítottuk. A sebességállandók megközelítő értékei: $k_{PI} = 3.6 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$, $k_{IA} = 5.0 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ és $k_{AB} = 1.0 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. A $P^+Q_B^-$ állapotból nincs direkt töltésszrekombináció.

A *Rb. sphaeroides* vad típusú RC -je esetében a $P^+Q_B^-$ állapotból való direkt töltésszrekombináció elhanyagolható a $P^+Q_A^-$ állapoton keresztüli indirekt rekombinációhoz képest (Labahn és mtsi, 1994). A négy tranziens állapotra (P^* , P^+I^- , $P^+Q_A^-$ és $P^+Q_B^-$) négy lineáris differenciálegyenletből álló egyenletrendszert írhatunk fel:

$$\frac{d[P^*Q]}{dt} = -(k_f + k_{PI}) \cdot [P^*Q] + k_{IP} \cdot [P^+I^-] \quad (21)$$

$$\frac{d[P^+I^-]}{dt} = k_{PI} \cdot [P^*Q] - (k_I + k_{IP} + k_{IA}) \cdot [P^+I^-] + k_{AI} \cdot [P^+Q_A^-] \quad (22)$$

$$\frac{d[P^+Q_A^-]}{dt} = k_{IA} \cdot [P^+I^-] - (k_{AP} + k_{AI} + k_{AB}) \cdot [P^+Q_A^-] + k_{BA} \cdot [P^+Q_B^-] \quad (23)$$

$$\frac{d[P^+Q_B^-]}{dt} = k_{AB} \cdot [P^+Q_A^-] - k_{BA} \cdot [P^+Q_B^-] \quad (24)$$

Termikus egyensúly esetén az egyenletrendszer általános megoldása négy exponenciális tag összegeként írható fel. A milliszekundumostól a szekundumosig terjedő időtartományban (amikor $t \gg 1/(k_{AB} + k_{BA})$) a lassú komponens fog dominálni, és a másodlagos kinonnal teljesen helyreállított $[RC]_B$ koncentrációjú RC -k késleltetett fluoreszcencia intenzitásának idő- és szabadenergiafüggése a következő (ne feledjük, hogy ΔG_B° , ΔG_A° és $\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ$ negatív értékek):

$$F_B(t) = k_f \cdot [RC]_B \cdot \frac{\exp\left(\frac{\Delta G_B^\circ}{k_B T}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ}{k_B T}\right)} \cdot \exp\left(-k_{AP} \cdot \frac{k_{BA}}{k_{AB} + k_{BA}} \cdot t\right). \quad (25)$$

Olyan RC -k esetében pedig, amelyek nem rendelkeznek Q_B -aktivitással (csak Q_A van bennük):

$$F_A(t) = k_f \cdot [RC]_A \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_A^\circ}{k_B T}\right) \cdot \exp(-k_{AP} \cdot t) \quad (26)$$

E kifejezések alapján fogom a későbbi 5.4.2. fejezetben értelmezni a milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia gyors és lassú komponensét.

5.2.2. A késleltetett fluoreszcencia hőmérsékletfüggése

A $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ töltésszétválasztás termodinamikai jellemzői meghatározhatók a késleltetett fluoreszcencia amplitúdójának hőmérsékletfüggéséből. A (26) egyenlet alapján, figyelembe véve a szabadenergia (ΔG), az entalpia (ΔH), és az entrópia (ΔS) megváltozásai közötti

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (27)$$

összefüggést, rutinszerűen meghatározható a $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ átmenet standard entalpiája. Az ún. van't Hoff féle ábrázolás (a késleltetett fluoreszcencia amplitúdójának ill. intenzitásának logaritmusa az $1/(k_B T)$ függvényében) meredekségéből:

$$\ln \int_0^{\infty} F_A(t) \cdot dt = \frac{\Delta H_A^0}{k_B T} + \text{konst} \quad (28)$$

(Itt kihasználtuk, hogy ha a lecsengés időállandója (k_{AP}) nem változik, akkor az amplitúdót a -pontosabban mérhető- (integrált) intenzitásra cserélhetjük.) A ΔS_A^0 entrópiaváltozást a konstans tartalmazza, így a van't Hoff egyenes tengelymetszetéből (ha k_f ismert) az entrópiaváltozás is meghatározható.

A (25) egyenlet alapján, ha $\exp((\Delta G_B^0 - \Delta G_A^0)/k_B T) \ll 1$ (azaz szobahőmérsékleten a kinonok közti szabadenergia-különbség jóval nagyobb, mint 25 meV), hasonló analízist végezhetünk el a $P^+Q_B^-$ állapot esetén is. Olyan esetekben viszont, amikor a kinonok energiaszintjei közel vannak egymáshoz (pl. magas pH -n, magas potenciálú kinonok, mutánsok esetén), sokkal óvatosabbnak kell lenni a másodlagos kinon P^* -éhoz viszonyított entalpiájának meghatározásakor. Ilyenkor is a (18) egyenlet alapján, de a fenti közelítés nélkül kell eljárunk.

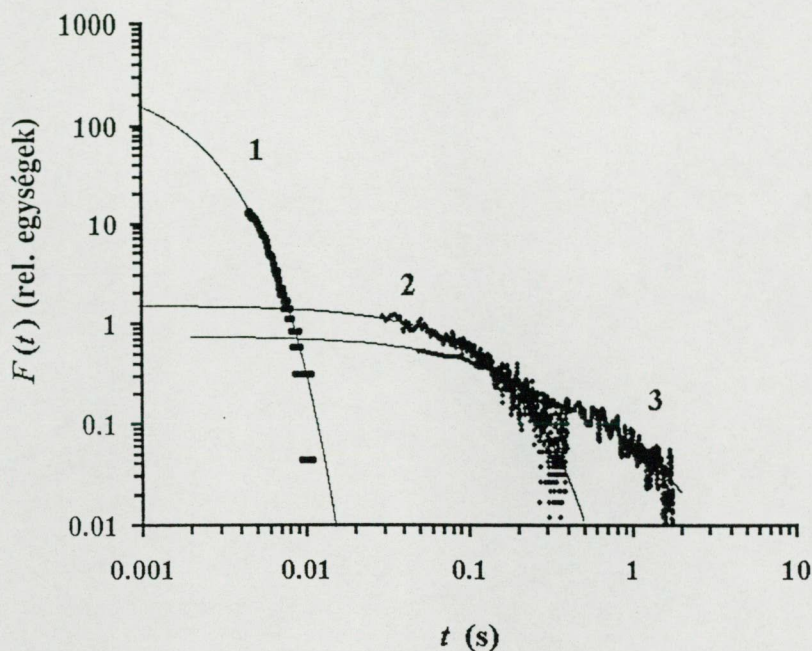
5.3. A nagyon gyors komponens

A milliszekundumos késleltetett fluoreszcenciát a fényzárak nyitási idejének hosszúsága miatt korábban csak a gerjesztés utáni kb. 30 ms holtidő elteltével tudták mérni, (Arata és Parson, 1981a; McPherson és mtsi, 1990a; Turzó és mtsi, 1998). Kihasználva az általunk használt Uniblitz fényzár egy nagyságrenddel kisebb nyitási idejét, egy néhány milliszekundumos, eddig nem észlelt, nagyon gyors komponens is detektálni tudtunk (5.3 ábra, 1 -es görbe).

Korábbi munkákban is megfigyeltek ugyan hasonló, de minthogy a fényzár nyitási ideje is ebbe az időtartományba esett, ezt a komponens mérési műterméknek vélték és kikapuzták (Arata és Parson, 1981a; McPherson és mtsi, 1990a). Eredményeink azonban ennek ellentmondanak, sőt az alábbiakban kísérleti adatokat sorakoztatunk fel annak alátámasztására, hogy ez a fázis az RC által emittált fénytől származik.

A nagyon gyors komponens nem lehet (pl. a lézer által, a felvillanáskor generált) elektronikus műtermék, hiszen a lézer felvillanásának pillanatában, amikor a fényzár

zárva van, nem detektálható jel. Ha késleltetjük a fényzár nyitását a lézergörjesztés pillanatához képest, akkor mindig ugyanannak a lecsengésnek a különböző szakaszait mérjük.



5.3. ábra. A bakteriális RC milliszekundumos késleltetett fluoreszcenciájának kinetikai kettős logaritmikus ábrázolásban. **1** -es görbe: fotokémiai úton redukált Q_A -t tartalmazó RC (pH 7.8); a P^+ -t a következő lézervillanás előtt (ismétlési frekvencia: 2 Hz) külső donorral (10 μ M ferrocén) visszaredukáltuk (ennek a 430 nm -nél mért tranziens abszorpcióváltozásból meghatározott félideje 10 ms volt; a további részleteket ld. a szövegben). **2** -es görbe: oxidált primér kinont tartalmazó, de terbutrinnal gátolt másodlagos kinon-aktivitású (100 μ M, pH 8.0) RC. **3** -as görbe: másodlagos kinon-aktivitással rendelkező RC (60 μ M UQ_{10} , pH 8.2). A fényzár a lézervillanás alatt zárva volt, majd közvetlenül utána (az 1 -es görbe esetén 3 ms – on belül) kinyitott. A folytonos görbéket a mért kinetikákra illesztettük, és egy vagy két exponenciális függvény összegéből számítottuk ki. Az illesztett görbék amplitúdói és időállandói rendre a következők: 1 -es görbe: 310 és 1.46 ms, 2 -es görbe: 1.52 és 102 ms, 3 -as görbe: 0.54 és 115 ms ill. 0.21 és 865 ms. Mérési körülmények: 1.3 μ M RC, 0.03% TX-100, 10 mM Tris és 100 mM NaCl.

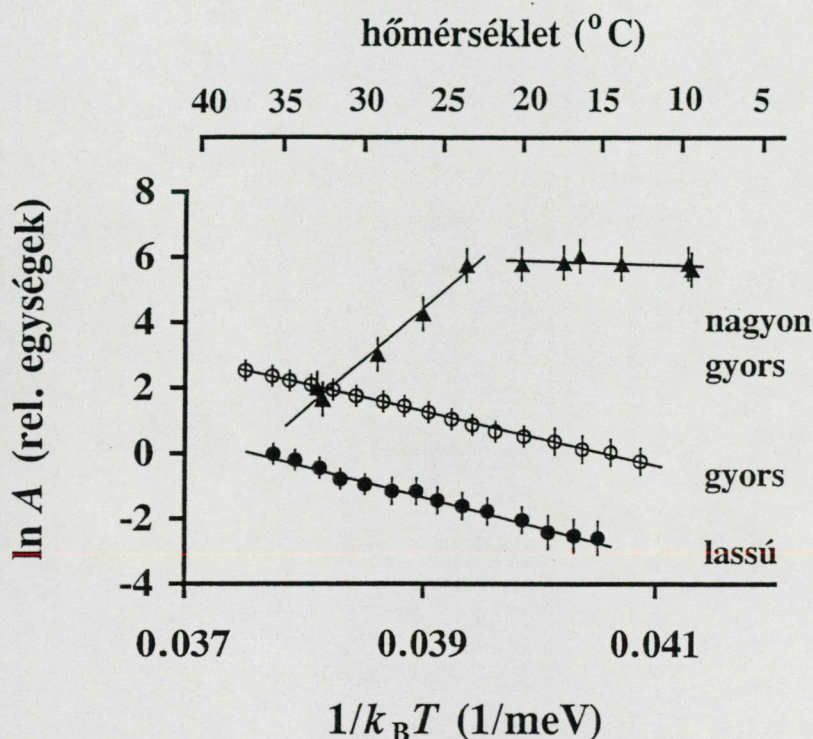
A nagyon gyors komponenst létrehozhatja a (közvetlen vagy szórt) lézervény által gerjesztett optikai és egyéb elemek foszforenciája (esetleg késleltetett fluoreszcenciája) is. Ezt a lehetséges hatást úgy csökkentettük, hogy a kritikus elemeket nagyon gondosan kiválogattuk (pl. alacsony fluoreszcenciájú küvetta), a minta és a fotokatód közötti optikai elemeket (vörös szűrő, lencse) pedig a fényzár mögött helyeztük el, így a lézervény a zárt állapotú fényzár miatt nem éri őket (4.2 ábra). "Vak" minta (RC fehérjét nem tartalmazó oldat) esetén nem kaptunk az RC késleltetett fluoreszcenciájával összemérhető jelet.

További vizsgálataink az emisszió spektrális tulajdonságait érintették. Mivel a késleltetett fluoreszcencia intenzitása még 850 nm felett átengedő szűrő használata esetén is nagyon kicsi, épphogy mérhető, a szűrőnek monokromátorral való helyettesítése nem volt lehetséges. Tudtunk azonban olyan, viszonylag nagy sávszélességű (20 nm), jó áteresztőképességű ($T_{\max} = 67\%$) interferenciás szűrőt használni, amelynek áteresztési maximuma ($\lambda_{\max} = 919$ nm) egybeesett a dimér fluoreszcencia spektrumának maximumával, tehát nem engedte át a fluoreszcenciánál nagyobb hullámhosszú, az üvegszűrőn átjutó esetleges egyéb fényt. Az így mért lecsengés adatai (a komponensek száma, azok relatív amplitúdói és sebességállandói) megegyeztek a felüáteresztő üvegszűrővel kapott értékekkel, vagyis mindegyik komponenst az RC emittálja, hiszen kicsi az esélye, hogy más fluorofór éppen a dimér spektrális tulajdonságaival világítson.

A lézerfelvillanás előtt kémiai ill. fotokémiai úton redukált vagy oxidált RC -vel végzett kísérleteink adták a legmeggyőzőbb bizonyítékot arra, hogy a nagyon gyors komponens nem (elektronikus ill. optikai) műtermék, hanem az RC -ből származik, mégpedig töltésszétválasztással kapcsolatos fényemisszió. Ha a dimért a lézerfelvillanást megelőzően kémiai úton, kálium-ferricianiddal oxidáljuk ($P \rightarrow P^+$), akkor egyáltalán nem figyelhetünk meg késleltetett fluoreszcenciát. Az RC fehérje ebben az állapotában nem képes fotokémiai reakcióra. Ez a kísérlet meggyőzően mutatja, hogy késleltetett fluoreszcencia csak az RC töltésszétválasztott állapotaiból származhat. Amennyiben viszont az RC primér kinonját (Q_A) előzetesen nátrium-ditionittal, kémiai úton redukáljuk, akkor a nagyon gyors komponens amplitúdója lényegesen, kb. egy nagyságrenddel megnövekszik, míg a gyors komponens eltűnik. Hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor a Q_A -t fotokémiai úton, a késleltetett fényt kiváltó lézerfelvillanás előtt, korábbi felvillanásokkal már redukáltuk. Hogy az ily módon elő-redukált primér kinonnak a következő fényfelvillanás (ismétlési frekvencia: 10 Hz) előtti visszaoxidációját megelőzzük, külső elektrondonortadtunk a mintához. Ez redukálja a fotooxidált P^+ primér donort, ezáltal megakadályozza, hogy az a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombinációval a következő felvillanás előtt eltüntesse a Q_A^- -t (5.3 ábra, 1 -es görbe). A ferrocén bizonyult a legalkalmasabbnak erre a feladatra, mert az RC fluoreszcencia spektrumában nem fluoreszkál, és a P^+ -t viszonylag lassan donálja (Maróti és Wraight, 1988b). A kísérleti körülményeket úgy állítottuk be, hogy optimálisan tanulmányozhassuk a késleltetett fluoreszcencia nagyon gyors komponensét eredményező P^+X^- állapotot. Az elektronátadás sebességi állandója (≈ 100 s⁻¹) nagyobb volt, mint a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$

töltésrekombinációé ($\approx 10 \text{ s}^{-1}$), így stabil PQ_A^- redox állapot tudott felhalmozódni, ugyanakkor viszont kisebb volt a $\text{P}^+\text{I}^- \rightarrow \text{PI}$ töltésrekombináció sebességi állandójánál ($k_1 = 6 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$), és a P^+X^- állapot eltűnésének a késleltetett fluoreszcencia nagyon gyors komponense mérésével meghatározott sebességi állandójánál ($\approx 10^3 \text{ s}^{-1}$) is, vagyis ez utóbbi folyamatokat csupán elhanyagolható mértékben akadályozta.

A nagyon gyors komponens amplitúdójának hőmérsékletfüggéséből megpróbáltuk megbecsülni a P^+X^- állapotnak megfelelő szabadenergiaszintet (5.4 ábra).



5.4. ábra. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia különböző komponensei amplitúdójának (A) van't Hoff -féle ábrázolása, a fiziológiai hőmérséklet tartományban. Az egyenesek meredekségeiből meghatározott entalpia változások rendre a következők: -112 meV 22 °C alatt és $+3100 \text{ meV}$ 22 °C felett ($\blacktriangle$, nagyon gyors fázis), -828 meV ($\circ$, gyors fázis), és -932 meV ($\bullet$, lassú fázis). A mérési körülmények azonosak az 5.3 ábránál említettel.

Általában az várható, hogy a magasabb hőmérséklet felé haladva megnövekszik a P^+X^- állapotból a P^* állapotba való termikus repopuláció esélye, ami a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának növekedését eredményezi (ld. a (26) egyenletet és az 5.4 ábrán a gyors és lassú komponens van't Hoff ábrázolásait). Az ábrán viszont jól látható, hogy a nagyon gyors komponensre a fiziológiai hőmérséklet tartományban ($5\text{--}35 \text{ °C}$) nem a szokványos van't Hoff-függést kaptuk. Szobahőmérséklet (22 °C) alatt kis meredekségű (-112 meV) egyenest kaptunk, amely arra utal, hogy a P^+X^- állapot entalpiája közel van

a P^* -éhoz. A 22 °C feletti hőmérséklet tartományban azonban a nagyon gyors komponens drasztikusan lecsökken, így a formális van't Hoff analízis nagy pozitív entalpiaváltozást ad (+3100 meV). A hőmérséklet változásának a nagyon gyors komponens amplitúdójára gyakorolt hatása reverzibilisnek és reprodukálhatónak bizonyult; a komponens lecsengési időállandója nem függött a hőmérséklettől.

A prompt és a késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitásainak összehasonlításával meghatároztuk a nagyon gyors komponens kvantumhatásfokát, értékét pH 8,0 -nál, $6,4 \cdot 10^{-9}$ -nek találtuk. A prompt fluoreszcencia kvantumhatásfokát ehhez $4 \cdot 10^{-4}$ -nek vettük (Zankel és mtsi, 1968), mert ez az érték összhangban van az újabb mérésekkel: $3,2 \cdot 10^{-4}$ (Woodbury és mtsi, 1985), ill. $1,2 \cdot 10^{-4}$ (Nowak és mtsi, 1998).

5.4. Gyors komponens: a primér kinonnal kapcsolatos folyamatok

A $P^+Q_A^-$ állapot szerepét a késleltetett fluoreszcencia gyors komponensének kialakulásában számos vizsgálat támasztja alá (Arata és Parson, 1981a; McPherson és mtsi, 1990a). Amikor a fényfelvillanást megelőzően (kémiaiilag) redukáltuk a primér kinont, ez a komponens eltűnt (5.3 ábra, 1 -es görbe). A gyors komponens kvantumhatásfoka a prompt és a késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitásainak arányából méréseink során pH 8,0 -nál $2,2 \cdot 10^{-9}$ -nek adódott, vagyis kb. 5 nagyságrenddel alacsonyabb, mint a prompt fluoreszcenciáé. A gyors komponens érzékenyen reagál a pufferoldat fizikai-kémiai tulajdonságaira, a primér kinon kémiai természetére (kinon-helyettesítés), és a fehérje környezetre (mutánsok). A továbbiakban külön fejezetekben fogom tárgyalni a pH, a hőmérséklet, az ionerősség és a különböző kinonszármazékok e komponensre gyakorolt hatását.

5.4.1. Az első stabil töltéspár szabadenergia szintje

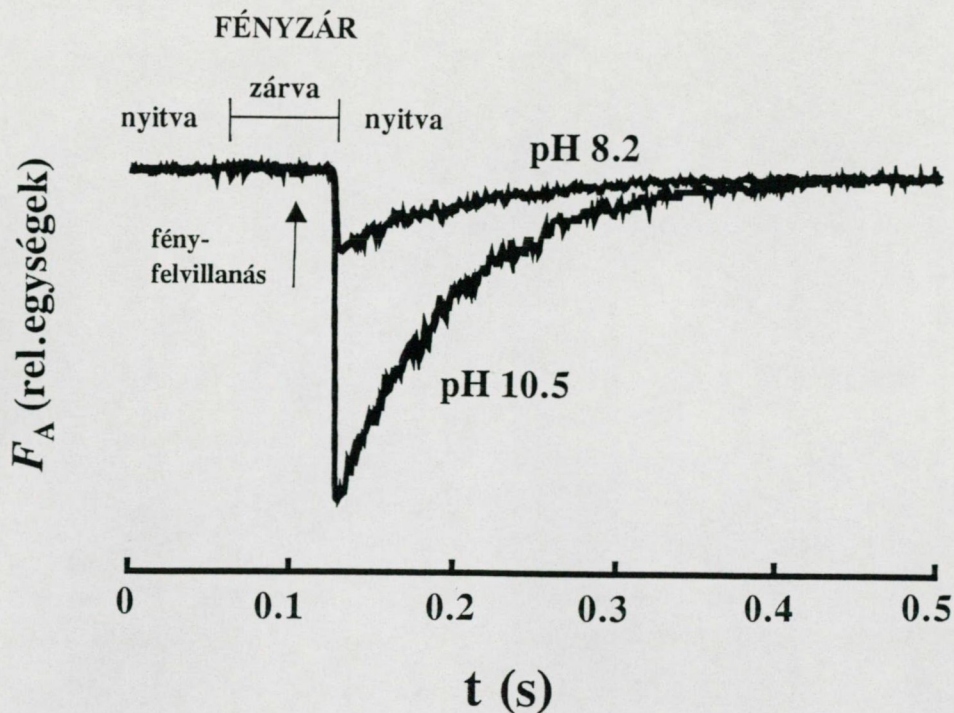
A prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitások arányának ismeretében megtudtuk állapítani a $P^+Q_A^-$ állapot abszolút szabadenergia szintjét a P^* -éhoz képest. A késleltetett fluoreszcencia gyors komponensének amplitúdója sokkal kisebb mint a prompt fluoreszcencia amplitúdója: $A_{\text{delay}}/A_{\text{prompt}} = 2,3 \cdot 10^{-16}$, ami a (20) egyenlet alapján

jelentős szabadenergia csökkenést ad: pH 8,0 -nál $\Delta G_A^\circ = -910 \pm 20 \text{ meV}$ (5.6 ábra). Arata és Parson (1981a) az amplitúdók arányára $4,4 \cdot 10^{-15}$ -t, míg a szabadenergia értékére $-860 \pm 20 \text{ meV}$ -ot kaptak, pH 7,8 -nál. A két eredmény közötti eltérés pontos okát nem tudjuk. Az a lehetséges magyarázat, hogy az RC preparálás során a mintánkban esetleg megjelenő szabad pigmentek miatt túlbecsültük volna a prompt fluoreszcencia intenzitását kizárható, mert a prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitása a gerjesztési energia függvényében a kísérlet hibahatárán belül azonos értéknél telítődött. Ha a minta szabad (vagy funkcionálisan lecsatolódott) pigmenteket tartalmazott volna, amelyek átfordulási sebességállandója ($\approx 1 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$) sokkal gyorsabb az RC fotokémiájánál ($\approx 10 \text{ s}^{-1}$), akkor emissziójuk sokkal nagyobb gerjesztési energiánál telítődött volna, mint a késleltetett fluoreszcencia.

5.4.2. A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergia-változása protonfelvétel hatására

A késleltetett fluoreszcencia kb. 100 ms -os időállandójú gyors komponensét (pH 8,0, 100 mM NaCl) olyan RC -k esetében figyeltük meg (5.3 ábra, 2 -es görbe), amelyekben meggátoltuk a primér kinonról a másodlagos kinonra irányuló elektrontranszfert. A gátlást a másodlagos kinon eltávolításával (ld. 4.5. fejezet, egykinonos minta) értük el, vagy úgy hogy inhibitor (terbutrin) segítségével kiszorítottuk a másodlagos kinont kötőhelyéről.

A gyors komponens időállandója alig függött a pH -tól, pH 6,5 és 11,0 között 126 ms -ról 105 ms -ra csökkent. A késleltetett fluoreszcencia gyors komponensének (integrált) intenzitása viszont a nagyobb pH -k felé haladva erősen növekszik (5.5 ábra), vagyis a protonáció erősen befolyásolja a töltéssztabilizációt. E tapasztalat azzal magyarázható, hogy a nagy protonkoncentrációk (alacsony pH) felé megnövekvő mértékű protonáció stabilizáló hatással van a $P^+Q_A^-$ töltéspárra, azaz szabadenergia- szintjét csökkenti, ami a P^* állapothoz képest növeli a szabadenergia-különbséget. Ezáltal a P^* állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapotból való termikus repopulációja kisebb mértékű, így a késleltetett fluoreszcencia gyengébb lesz (ld. a (26) egyenletet).



5.5. ábra. A késleltetett fluoreszcencia gyors komponensének pH -függése, olyan RC -k esetében, amelyekben terbutrin segítségével meggátoltuk a primér kinonról a másodlagos kinonra irányuló elektrontranszfert. Mérési körülmények: 1,5 μM RC, 5 mM Tris, 0,03 % Triton X-100, 100 mM NaCl, 100 μM terbutrin, és $T = 294 \text{ K}$. A kinetikákat 256 jel átlagolásával kaptuk (az ismétlési frekvencia 1 Hz).

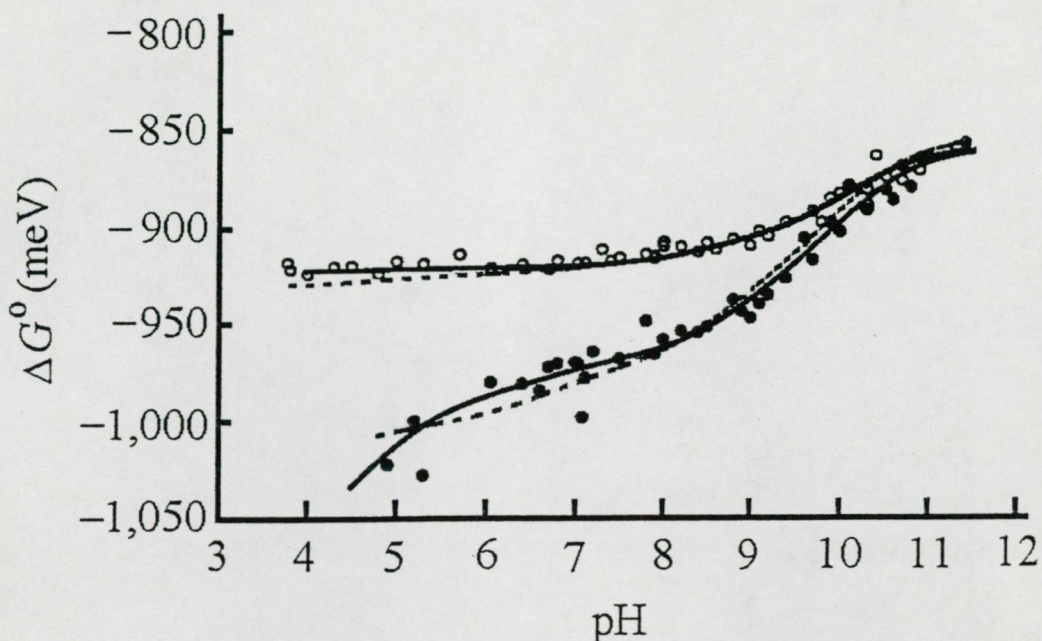
A késleltetett fluoreszcencia intenzitásának idő- és szabadenergia függését kifejező (26) egyenlet amplitúdóra vonatkozó tagjából közvetlenül meghatározható a $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^-$ állapot szabadenergiájának pH-függése. Felírva az egyenletet két különböző pH -ra, megkapjuk a két pH -nak megfelelő állapot közötti szabadenergia-különbséget (a k_f és az RC -k kezdeti koncentrációja ($[\text{RC}_\text{A}]$) -a prompt fluoreszcencia hatásfokának kísérletileg tapasztalt pH -érzékenység (ld. (7) egyenlet), ill. a telítési gerjesztés miatt- független a pH -tól):

$$\Delta G_\text{A}(pH_2) - \Delta G_\text{A}(pH_1) = k_\text{B}T \cdot \ln \left(\frac{F_\text{A}(pH_2)}{F_\text{A}(pH_1)} \right) \quad (29)$$

A késleltetett fluoreszcencia intenzitásokat általában a pH 7 -nél mért késleltetett fluoreszcenciához viszonyítottuk (ezért ezeket a méréseket relatív méréseknek neveztük).

Az 5.6 ábrán látható (üres karikák), hogy ha a pH -t 5-től 11-ig növeljük (vagyis csökkentjük a H^+ -ion koncentrációt), a $\text{P}^+\text{Q}_\text{A}^-$ állapot szabadenergiája 65 meV -tal

közelebb kerül a P^* állapot szabadenergia szintjéhez, egy jellegzetes inflexiós ponttal a lúgos tartományban (100 mM NaCl).



5.6. ábra. A $P^+Q_A^-$ (+terbutrin) (O) és a $P^+Q_B^-$ (●) töltésszétválasztott állapotok (a gerjesztett dimér (P^*) szabadenergia szintjéhez viszonyított) szabadenergiájának pH -függése. A folytonos vonalat a (30) egyenlet alapján számítottuk ki, figyelembe véve, hogy a szemikín négy, egymástól független protonálható csoporttal van elektrosztatikus kölcsönhatásban (a pK értékeket az 1. táblázat tartalmazza, és magas pH -nál $\Delta G^\circ = -858$ meV). A szaggatott vonal az integrált protonkötés alapján kiszámított ΔG° pH -függését jelöli ((39) egyenlet; a jellemző pK -értékeket az irodalomból vettük (Maróti és Wraight, 1988)). Mérési körülmények: 2 μ M RC; 0,03% Triton X-100, 100 mM NaCl, 5 mM puffer a pH-tól függően, $T = 294,3$ K, 100 μ M terbutrin (Q_B -aktivitás hiánya) vagy 100 μ M ubikinon-10 (Q_B -aktív RC).

Az a tény, hogy az oldat protonkoncentrációja befolyásolja a $P^+Q_A^-$ töltéspár szabadenergia szintjét, bizonyítja a fehérje protonálható oldalláncainak szerepét a primér kín fényindukált redox/töltés állapotával való kölcsönhatásban (Maróti és Wraight, 1988a). Emiatt célszerűnek tartottuk összehasonlítani a késleltetett fluoreszcenciás mérésekből kapott szabadenergia pH -függését azokkal a számításokkal, amelyek a szemikín elektrosztatikus kölcsönhatását veszik figyelembe négy, egymástól független, protonálható csoporttal.

A szabadenergia pH -függése kifejezhető a kofaktor (esetünkben Q_A) középponti redoxpotenciáljának pH -függésével is (5.6 ábra, folytonos vonal). A redox-centrum redukálása megnöveli annak negatív töltését, melynek hatására nagyobb lesz a környezetben található sav/bázis csoport protonaffinitása, ill. pK -ja. Ennek megfelelően a

csoport pK -ja kisebb lesz, amikor a kofaktor oxidált állapotban van: $pK_{ox} < pK_{red}$. A kölcsönhatás eredményeképpen a kofaktor középponti redoxpotenciálja -60 mV/pH -egység meredekséggel csökken a pK_{ox} és pK_{red} közötti pH tartományban, és a pH -tól független lesz ezen a tartományon kívül. Amikor a kofaktor oxidációja ill. redukciója több (N) egymástól független sav/bázis csoport protonálódásához kapcsolódik, akkor a középponti redoxpotenciál pH -függése a következő kifejezéssel adható meg:

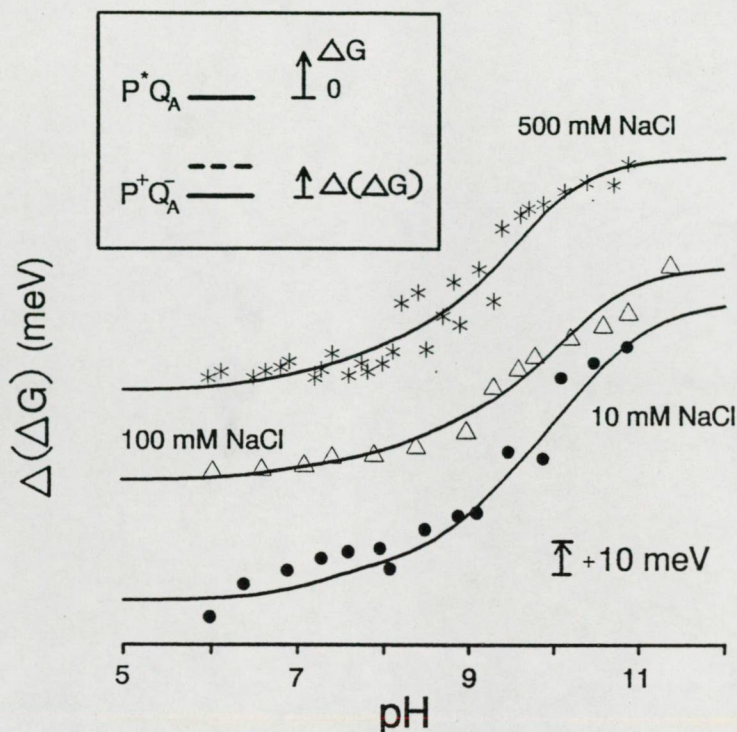
$$E_m = E_\infty + \frac{RT}{nF} \cdot \sum_{i=1}^N \ln \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_i^{red}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_i^{ox}}} \quad , \tag{30}$$

ahol E_∞ a középponti redoxpotenciál értéke nagyon magas pH -n (amikor az összes sav/bázis csoport deprotonált állapotban van), $[H^+]$ a protonkoncentráció, K_i^{red} ill. K_i^{ox} az i -edik sav/bázis csoporthoz való protonkötés disszociációs állandója a kofaktor redukált ill. oxidált állapotában, a kofaktort n elektron redukálja, T az abszolút hőmérséklet, R az egyetemes gázállandó és F a Faraday-állandó. A pK_{ox} és a pK_{red} értékeket, amelyeket a görbe (5.6 ábra, folytonos vonal) formális felbontásával kaptunk, az 1. táblázat tartalmazza. Látható, hogy ez a görbe jól egyezik a késleltetett fluoreszcenciás adatokkal, és a legnagyobb pK változás ($\Delta pK = 0,8$) a legmagasabb pK -val rendelkező csoportnál észlelhető.

csoport	Q=Q _A + terbutrin			Q=Q _B		
	pK _{ox}	pK _{red}	ΔpK	pK _{ox}	pK _{red}	ΔpK
1	4,87	4,90	0,03	3,50	5,30	1,80
2	6,87	6,90	0,03	6,55	6,85	0,30
3	8,35	8,60	0,25	8,30	8,70	0,40
4	9,70	10,50	0,80	9,10	10,60	1,50

1. táblázat. A feltételezett négy protonálható aminosav pK és ΔpK ($= pK_{red} - pK_{ox}$) értékei, az RC PQ (oxidált kinon) és P^+Q^- (redukált kinon) állapotaiban, amelyeket a mérési pontokhoz legjobban illeszkedő görbék ((30) egyenlet) formális felbontásából határoztunk meg.

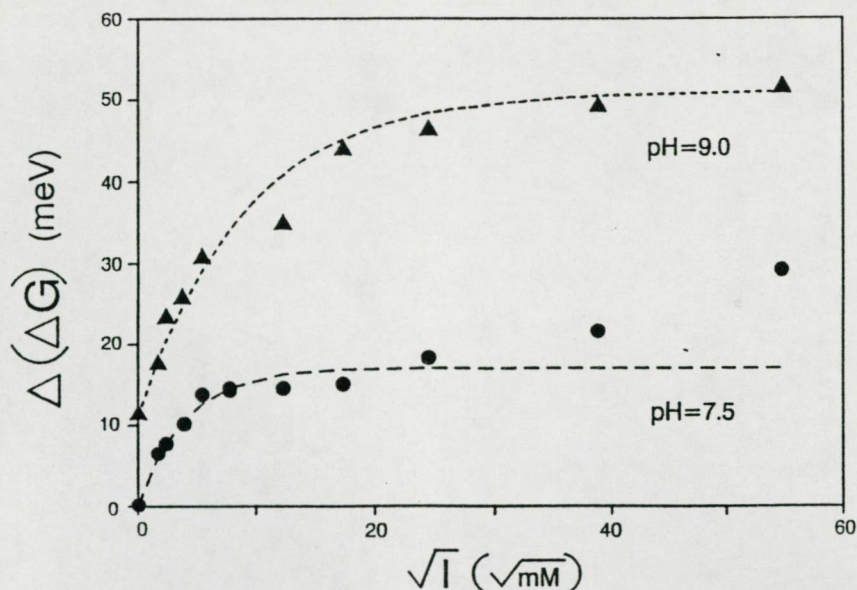
Meghatároztuk a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájának pH -függését 10 mM NaCl és 500 mM NaCl sókoncentráció esetében is (5.7 ábra). Megfigyelhetjük, hogy az ionerősség növelése a görbék alacsonyabb pH -k felé való eltolódását okozza, és lecsökkenti a 6 -os és 10 -es pH között észlelhető szabadenergia-változás mértékét.



5.7. ábra. A $P^+Q_A^-$ töltéssztválasztott állapot, P^*Q_A állapothoz viszonyított szabadenergiájának megváltozása ($\Delta(\Delta G)$) a pH -függvényében, különböző sókoncentrációknál. Folytonos vonallal jelöltük az integrált protonkötésből kapott szabadenergia-változás pH -függését ((39) egyenlet). Az 500 mM és a 10 mM sókoncentrációjú görbéket eltoltuk a 100 mM -hoz képest, rendre: +20 és -20 meV -al (a pK -értékeket az 5. táblázat tartalmazza). A bekeretezett kiegészítő ábra a szabadenergia-változás előjelét mutatja. Mérési körülmények: 2 μ M RC, 0,03 % Triton X-100, 2-5 mM puffer a pH -tól függően, 100 mM NaCl, 100 μ M terbutrin, $T = 295$ K.

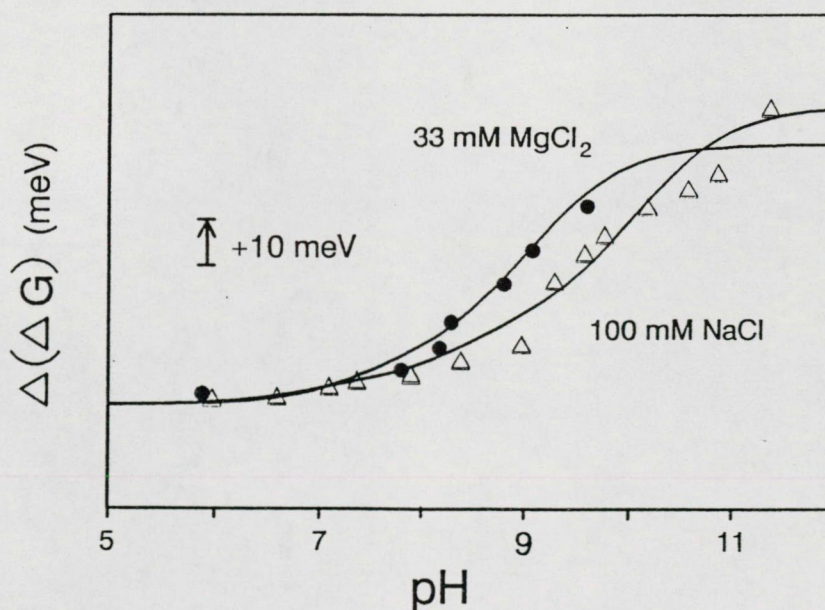
5.4.3. A gyors komponens ionerősség-függése

Magasabb sókoncentrációk felé haladva a késleltetett fluoreszcencia gyors komponensének intenzitása növekszik, vagyis a sók destabilizálják a $P^+Q_A^-$ töltéssztválasztott állapotot (5.8 ábra). Ez a hatás éppen ellentétes a protonkoncentráció növelésekor megfigyelt hatással, hiszen -mint azt az előző fejezetben láttuk- a növekvő H^+ -koncentrációval (kisebb pH), a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának csökkenése járt együtt.



5.8. ábra. A $P^+Q_A^-$ állapot $\Delta(\Delta G)$ -je (a só (CaCl_2) nélkülihez viszonyítva) az ionerősség függvényében, két különböző pH -nál. A szaggatott vonalat a Debye-Hückel modell ((40) egyenlet) alapján illesztettük a mérési pontokra. $\Delta(\Delta G)_{\text{max}} = 17 \text{ meV}$ (pH 7,5) ill. 40 meV (pH 9,0) és $r = 2,4 \text{ nm}$ (pH 7,5) ill. $1,1 \text{ nm}$ (pH 9,0). Mérési körülmények: $2 \mu\text{M}$ RC, 2 mM Mops (pH 7,5) vagy 2 mM Caps (pH 9,0), $0,03\%$ Triton X-100, $100 \mu\text{M}$ terbutrin és $T = 295 \text{ K}$.

Az 5.8 ábrán látható, hogy a szabadenergia-változás növekedése függ a pH -tól és a sóban lévő ion típusától, míg az 5.9 ábra szerint a bivalens kationok (Mg^{2+}) hatása a ΔG pH -függésére nagyobb, mint a monovalens kationoké (Na^+), még akkor is, ha ionerősségeik megegyeznek ($I = 100 \text{ mM}$).

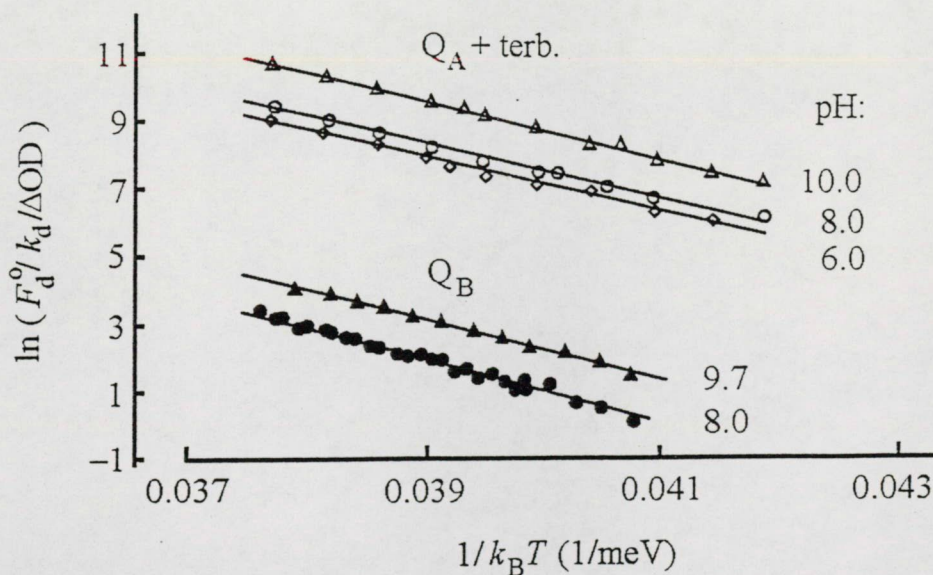


5.9. ábra. A $\Delta(\Delta G)$ pH -függése mono- (Na^+) és bivalens (Mg^{2+}) kationok jelenlétében, azonos ionerősségeknél ($I = 100 \text{ mM}$). Az integrált protonkötésből számított görbét folytonos vonallal jelöltük. A pK -értékeket az 5. táblázat tartalmazza. A mérési körülmények azonosak a 5.8 ábránál leírt körülményekkel.

A bivalens kation jobban lecsökkentette a magas pH -jú protonálható csoportok pK - értékeit, mint a monovalens kation, és a protonfelvételhez kötött teljes szabadenergia változás valamivel kisebb volt a bivalens kationt tartalmazó oldatokban. Ez utóbbi effektus hasonló Maróti és Wraight megfigyeléseihez (Maróti és Wraight, 1997).

5.4.4. A $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ töltésszétválasztás termodinamikai paraméterei

A késleltetett fluoreszcencia amplitúdójának hőmérsékletfüggéséből meghatározhatjuk a $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ töltésszétválasztás fontos termodinamikai jellemzőit, az entalpia és az entrópia változását (5.4 ábra). Az 5.2.2. fejezetben levezetett (28) egyenlet alapján, ha a késleltetett fluoreszcencia amplitúdójának logaritmusát ábrázoljuk az $1/(k_B T)$ függvényében (van't Hoff-féle ábrázolás), egyenest kapunk, amelynek meredeksége a folyamathoz tartozó (hőmérséklettől független) entalpiaváltozást (ΔH_A°) adja meg. Az entrópiaváltozást (ΔS_A°) a (27) egyenlet segítségével határoztuk meg, ismerve a szabadenergia változását (ΔG_A°).



5.10. ábra. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia van't Hoff -féle ábrázolása, a fiziológiás hőmérséklet tartományban (5-35 °C), másodlagos kinon-aktivitás hiányában (üres szimbólumok) és jelenlétében (telt szimbólumok), különböző pH -knál. Az amplitúdó helyett a késleltetett fluoreszcencia lecsengése alatti területet (F_d^0/k_d) vettük, és ezt normáltuk a fotoaktív RC -k koncentrációjával (ez utóbbit a 430 nm -nél mért flash-indukált abszorpcióváltozásból (ΔOD) határoztuk meg). Mérési körülmények: 2 μM RC, 0,03% Triton X-100, 100 mM NaCl, 5mM puffer a pH -tól függően és 100 μM terbutrin (Q_B -aktivitás hiánya) vagy 100 μM ubikinon-10 (Q_B -aktív RC).

A gyors komponens fiziológias hőmérséklettartományban (5–35 °C) felvett van't Hoff-féle ábrázolásából (5.10 ábra) kapott meredekség pH 8 -nál -820 ± 40 meV -nyi entalpiaváltozást adott, amely jellegzetesen nagy érték a primér kinonon történő töltéssztabilizációra, hiszen ezáltal válik irreverzibilissé a fotokémiai átmenet. A pH 6 -nál ill. pH 10 -nél meghatározott entalpiaváltozás: -802 ± 40 meV ill. -861 ± 40 meV. Az ebből adódó entrópiaváltozásokat a 2. táblázat tartalmazza. Látható, hogy az entrópiikus tag alig 5–10% -át teszi ki a szabadenergia változásnak.

termodinamikai paraméterek	Q=Q _A + terbutrin			Q=Q _B	
	pH=6,0	pH=8,0	pH=10,0	pH=8,0	pH=9,7
ΔG° (meV)	-921 ± 20	-910 ± 20	-882 ± 20	-970 ± 20	-904 ± 20
ΔH° (meV)	-802 ± 40	-820 ± 40	-861 ± 40	-920 ± 60	-877 ± 60
ΔS° (meV/K)	$+0,40 \pm 0,13$	$+0,30 \pm 0,13$	$+0,07 \pm 0,13$	$+0,17 \pm 0,21$	$+0,09 \pm 0,21$

2. táblázat. A van't Hoff -féle ábrázolásból meghatározott, a $P^*Q \rightarrow P^+Q^-$ töltésszétválasztáshoz tartozó entalpia- és entrópia változások, másodlagos kinon-aktivitással rendelkező és nem rendelkező RC -k esetében, különböző pH -knál ($T = 294,3$ K).

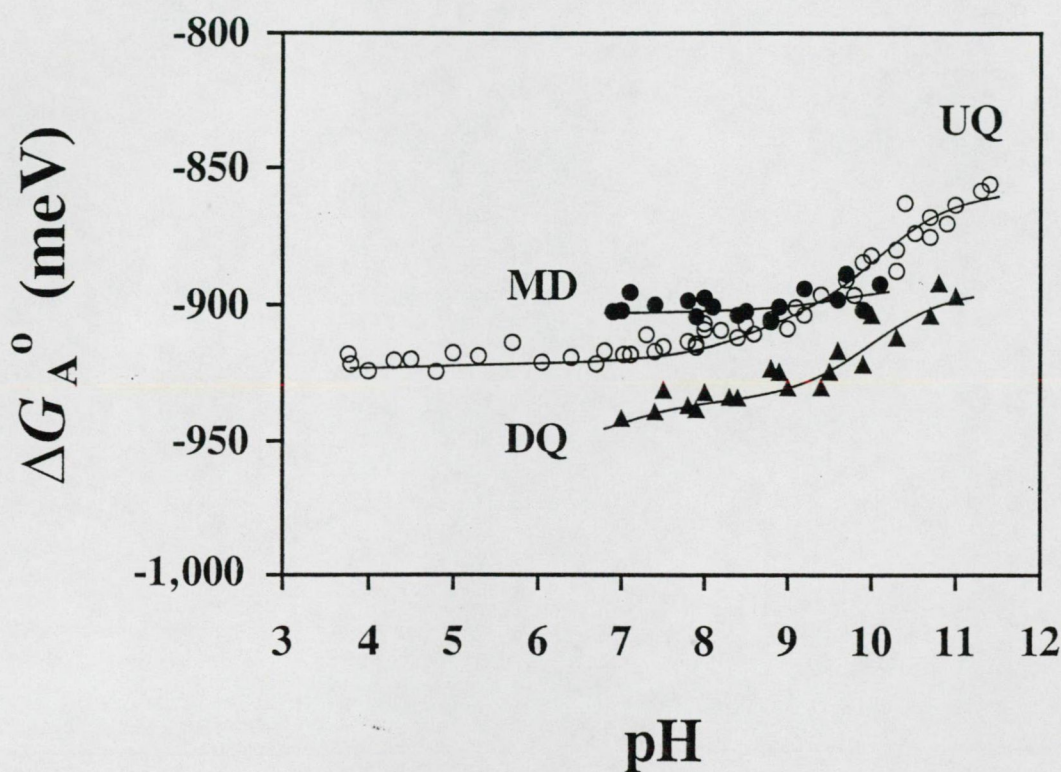
Megemlítem, hogy bár mérési pontjaink nagyon jól illeszthetők egyenessel, mégis a különböző kísérletekből meghatározott entalpia- ill. entrópiaváltozás hibája meglehetősen nagy, ± 40 meV ill. $\pm 0,13$ meV. Kis entrópiaváltozások esetén e bizonytalanság akkora is lehet, hogy még a változás előjelében sem lehetünk biztosak.

5.4.5. Kinonszármazékok a Q_A -kötőhelyen

A natív kinon (ubikinon-10) durokinonnal ill. menadionnal való helyettesítése (az eljárás leírását ld. a 4.4. fejezetben) szignifikánsan megváltoztatta a $P^+Q_A^-$ töltéspár rekombinációjának sebességi állandóját. A rekombinációs időállandókat kinetikus, egysugaras spektrofotométerrel határoztam meg (ld. 4.6. fejezet). Ezt a változást a késleltetett fluoreszcencia lecsengésének időállandójában is észleltem: míg UQ-10 esetében 113 ms -ot mértem, addig MD -vel a primér kinon helyén 131 ms -ot, DQ -val

pedig 478 ms -ot kaptam pH 7 -nél. A $Q_A \rightarrow Q_B$ közötti elektrontranszfert inhibitorral (terbutrin) gátoltam meg, hogy a Q_B -nek megfelelő lassú komponens ne zavarja a mérést.

A prompt és a késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával pH 7 -nél meghatároztuk a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiáját a gerjesztett diméréhez képest: ubikinon-10 -et, menadiont ill. durokinont tartalmazó minták szabadenergiája rendre -918 meV, -902 meV és -942 meV. Az MD -t és DQ -t tartalmazó RC -k késleltetett fluoreszcencia amplitúdójának a natív kinont tartalmazó minta késleltetett fluoreszcencia amplitúdójához viszonyított pH -függéséből meghatároztuk a $P^+Q_A^-$ állapot szabad-energiájának pH -függését is (5.11 ábra, üres körök, telt körök és háromszögek).



5.11. ábra. A prompt- és a késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításából meghatározott $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájának, a gerjesztett dimér (P^*) energiaszintjéhez viszonyított pH -függése. A primér kinon helyén natív kinon (ubikinon-10, UQ (O)) vagy mesterségesen beültetett kinon-analógok (menadion, MD (●) ill. durokinon, DQ (▲)) voltak. A másodlagos kinon helyét terbutrin (100 μ M) foglalta el, amely meggátolta a $Q_A \rightarrow Q_B$ közötti elektrontranszfert. Folytonos vonallal jelöltük a Henderson-Hasselbalch típusú titrálási görbékéből kiszámított integrált protonkötést (a pK és a Δ pK értékeket a 6. táblázat tartalmazza).

A DQ -val való helyettesítés, pH 7 és 11 között 45 meV szabadenergia változást okoz, pH -függése jellegében (pK-eltolódások) hasonlít a natív RC szabadenergia változásához,

de annál kb. 30 meV -tal negatívabb szinten helyezkedik el. Ha MD van a primér kinon helyén, akkor a natív kinont tartalmazó állapot szintjéhez képest nincsen nagy változás, viszont a szabadenergia pH -függése jelentősen eltér a natív mintáétól: a lúgos pH -tartományban alig észlelhető pK eltolódás, a szabadenergia csak 13 meV -ot változik pH 7 és 10 között.

5.4.6. Összefüggés a szabadenergia szintek és a rekombinációs sebességi állandók között (magas potenciálú kinonok esetén)

Már sok tanulmány foglalkozott a kinonok *in situ* szabadenergiája (ΔG_A°) változásának az RC -ben zajló elektrontranszfer tulajdonságaira gyakorolt hatásai vizsgálatával (Gunner és mtsi, 1986; Gunner és Dutton, 1989; McComb és mtsi, 1990; Schelvis és mtsi, 1992). Woodbury és mtsi (1986) a Q_A -kötőhely natív kinonját eltérő redoxpotenciálú kinonokkal helyettesítették, és összehasonlították a minták késleltetett fluoreszcenciáját a natív kinont tartalmazó RC késleltetett fluoreszcenciájával. Gunner és Dutton (1989) empirikus összefüggést állapított meg a kinon natív ubikinonéhoz viszonyított szabadenergiája ($\Delta G_Q^\circ - \Delta G_{UQ}^\circ$) és a töltésrekombináció sebességi állandója (k_{AP}) között, pH 7,3 -nál:

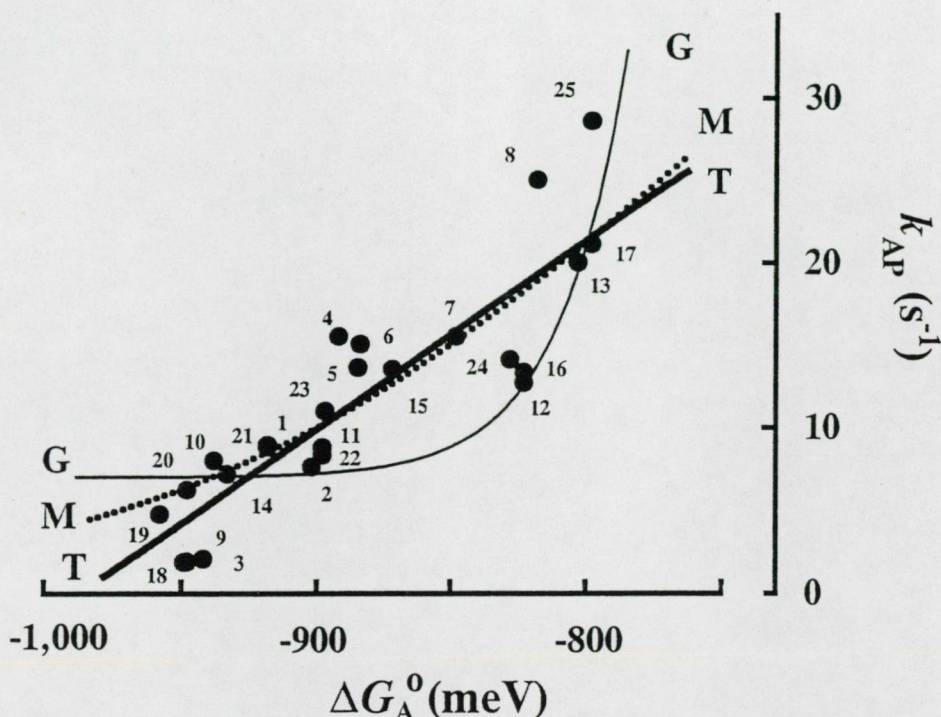
$$\Delta G_Q^\circ - \Delta G_{UQ}^\circ = 56,6 \text{ meV} \cdot \log(k_{AP} (s^{-1}) - 7,0) + 53,1 \text{ meV} \quad . \quad (31)$$

Ezt a kifejezést gyakran használják alacsony potenciálú kinonok relatív *in situ* redox potenciáljának becslésére (Graige és mtsi, 1996; Schmid és Labahn, 1998).

A kinonhelyettesítésekkel kapott saját eredményeink és az ezzel kapcsolatos, nemrég közölt tanulmányok arra készítettek bennünket, hogy mi is megvizsgáljuk a szabadenergia és a töltésrekombináció közötti összefüggést.

A $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ visszreakció, amelyhez aktivációs energia szükséges, kétféleképpen mehet végbe: a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájától függően direkt módon (alagút-effektussal), vagy indirekt úton, a termikusan gerjesztett P^+I^- állapoton keresztül (ld. 5.2 ábra, 5.2.1 fejezet). Woodbury és mtsi (1986) szerint a direkt út a meghatározó, ha $\Delta G_A^\circ < -800 \text{ meV}$. Áttekintettük az irodalomban fellelhető olyan kinonhelyettesített RC -kre vonatkozó adatokat, amelyek e feltételnek eleget tesznek, vagyis a visszreakció

direkt módon zajlik le bennük. A különböző magas potenciálú (benzo- ill. nafto)kinont tartalmazó RC -k töltésrekombinációs sebességi állandóit ábrázoltuk (5.12 ábra; telt, számozott körök) a $P^+Q_A^-$ állapot késleltetett fluoreszcenciás mérésekkel meghatározott szabadenergiájának függvényében, majd három görbét illesztettünk az adatokra. A (G) -vel jelölt görbét a (31) empirikus kifejezés alapján számítottuk ki.



5.12. ábra. A $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció sebességi állandója (k_{AP}) a ΔG_A^0 függvényében, “magas potenciálú” kinonok esetében, pH 7 -nél. **1-3** -as minták (pontok az ábrán): UQ₁₀, MD és DQ (Turzó és mtsi., 2000); **4-8** -as minták: 2-diizoprenil-1,4-NQ (NQ₂), 2-metil-1,4-NQ (MQ₀), 2-tetraizoprenil-1,4-NQ (NQ₄), 2,3,5-trimetil-1,4-NQ (TMNQ) és 2,3,6,7-tetrametil-1,4-NQ (TEMNQ) (Li és mtsi., személyes közlés); **9-13** -as minták: 1,4-benzokinon tetrametil, 1,4-NQ, 1,4-NQ 2,3-dimetil, 1,4-NQ 2,3,5-trimetil és 1,4-NQ 5 metoxi (Gunner és Dutton, 1989); **14-17** -es minták: MQ₀, 2-metil-3-tetraizoprenil-1,4-NQ (MQ₄), TMNQ és TEMNQ (Graige és mtsi., 1996); **18-25** -ös minták: DQ, 6,7-dikloro NQ, 2-metiltio NQ, UQ, 2,3-dimetil NQ, 5-metil NQ, 2,3,5-trimetil NQ és 5-metoxi NQ (Woodbury és mtsi., 1986). A különböző (legfőképpen relatív) mérésekre, G_{UQ}^0 -t -918 meV -nak vettük. Illesztett görbék: **T**: (33) egyenlet (vastag vonallal jelölt egyenes; $\chi_{rel}^2 = 9,90$); **M**: Marcus görbe, (32) egyenlet, (pontosított vonal, $k_{max} = 50 \text{ s}^{-1}$ és $\lambda = 850 \text{ meV}$; $\chi_{rel}^2 = 10,89$); **G**: Gunner kifejezés, (31) egyenlet, (Gunner és Dutton, 1989, vékony vonal; $\chi_{rel}^2 = 20,83$).

Ebben a viszonylag szűk szabadenergia-tartományban, láthatóan nem illeszkedik túl jól a mérési pontokra ($\chi_{rel}^2 = 20,83$), várhatóan inkább alacsony potenciálú kinonok esetében használható. A második, (M) -mel jelölt görbét az alagutazásos elektrontranszferre vonatkozó, általánosan elfogadott Marcus-elmélet alapján határoztuk meg:

$$k_{AP} = k_{\max} \cdot \exp\left(-\frac{(-\Delta G_A^\circ - 1380 \text{ meV} + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad (32)$$

Ez a görbe akkor illeszkedik a legjobban az adatokra ($\chi_{\text{rel}}^2 = 10,89$), ha a maximális sebességi állandó $k_{\max} = 50 \text{ s}^{-1}$, a reorganizációs energia pedig $\lambda = 850 \text{ meV}$. Az ábrázolt szabadenergia- tartomány messze van attól az értéktől (-530 meV), ahol a sebességi állandó eléri a maximumát, ezért a görbe ebben a szabadenergia tartományban kevésbé görbül, így az illesztés nem túl érzékeny a paraméterek változásaira. Az illesztett értékek még így is jól megközelítik a külső elektromos teret használó mérések eredményeit (Feher és mtsi, 1988), és a mutánsok segítségével kapott adatokat (Allen és mtsi, 1998).

Ebben a szabadenergiatartományban mi egyenes (T) illesztését tartottuk a legmegfelelőbbnek, mert egyrészt a pontok erős szóródása miatt nincs alapunk arra, hogy ne a legegyszerűbb, lineáris függvénykapcsolatot feltételezzük, másrészt az optimális illesztésre kapott, a mérési pontok illeszkedését jellemző relatív χ_{rel}^2 érték a T egyenesre kisebb volt ($\chi_{\text{rel}}^2 = 9,90$), mint a Gunner- ill. Marcus-görbék esetén, dacára annak, hogy ez utóbbi függvények bonyolultabbak, mint az általunk feltételezett egyenes:

$$\Delta G_A^\circ = -987 \text{ meV} + 8,77 \text{ meV} \cdot \text{s} \cdot k_{AP} \quad (33)$$

Ezzel magas potenciálú kinonokra elfogadható közelítést nyújtó, új empirikus összefüggést kaptunk a direkt töltésrekombináció sebességi állandója és a primér kinon szabadenergiája között. Ennek segítségével egyszerűen meg lehet becsülni a $P^+Q_A^-$ állapot *in situ* szabadenergiáját a könnyen mérhető rekombinációs időállandókból olyan RC -k esetében, amelyekben a natív kinont magas potenciálú kinonokkal helyettesítettük.

A (33) kifejezés szerint a direkt rekombináció sebességi állandója viszonylag gyengén függ a szabadenergiától. Az alagutazás sebességi állandója minden 60 meV -os szabadenergia-növekedésre csupán $6,8 \text{ s}^{-1}$ -nel növekszik. Ezzel szemben az indirekt rekombináció sebessége szobahőmérsékleten egy nagyságrendnyit emelkedik, ha a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiája 60 meV -tal növekszik.

5.5. Lassú komponens: a másodlagos kinonnal kapcsolatos folyamatok

A másodlagos kinonnal helyreállított reakciócentrumok (kétkinonos RC) késleltetett fluoreszcenciájának lecsengésében egy nagy élettartamú (1 s körüli), kis intenzitású komponens figyelhető meg (Arata és Parson, 1981a), amelynek időállandója a $P^+Q_B^-$ állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapoton keresztüli, indirekt töltésrekombinációval történő kiürülését tükrözi. E lassú komponenszt mi is megfigyeltük (5.3 ábra, 3 -as görbe), időállandójára pH 8,0 -nál 865 ms -ot kaptunk.

A lassú komponens kvantumhatásfoka pH 8,0 -nál a prompt- és a késleltetett fluoreszcencia integrált intenzitásainak arányából méréseink szerint $2,6 \cdot 10^{-9}$, öt nagyságrenddel kisebb a prompt fluoreszcencia kvantumhatásfokánál.

5.5.1. A második stabil töltéspár szabadenergia szintje

A (20) egyenlet alapján közvetlenül (vagyis a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergia szintjének felhasználása nélkül) meghatároztam a $P^+Q_B^-$ és a P^*Q_B szintek szabadenergia különbségét (pH 8,0 -nál), feltételezve, hogy a sugárzásos átmenet sebességi állandója $k_f = 8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ (a Strickler-Berg összefüggés alapján (Strickler és Berg, 1962)), a prompt fluoreszcencia hatásfoka $4 \cdot 10^{-4}$ (Zankel és mtsi, 1968) és a k_Q sebességi állandó $(865 \text{ ms})^{-1}$ (a töltésrekombináció kinetikájából). Ismerve a késleltetett fluoreszcencia lassú komponensének amplitúdóját és időállandóját, ill. a prompt fluoreszcencia intenzitását a szabadenergia különbségre $-970 \pm 20 \text{ meV}$ -ot kaptunk (5.6 ábra).

Ha nem szükséges a $P^+Q_B^-$ állapot szabadenergiáját a P^*Q_B állapotéhoz képest megadni, hanem elegendő e szabadenergia valaminek hatására bekövetkező változásait kiszámítani, akkor egyszerűbb, és egyéb feltételezéseket (ld. pl. a fenti k_f és η_{prompt} értékeket) nem igénylő módszerhez folyamodhatunk.

Mivel a Q_B -aktivitás helyreállítása általában nem tökéletes (max. 95 %) (ld. 4.3. fejezet), a másodlagos kinon aktivitással rendelkező RC -k késleltetett fluoreszcenciájának lecsengése -akárcsak a töltésrekombináció fényindukált abszorpcióváltozásból meghatározható kinetikája- jellegzetesen két komponensű lesz, a kétféle mérés nagyjából ugyanazokat az időállandókat adja. A gyors komponens (100 ms körüli időállandóval) a

Q_B nélküli RC -kből, míg a lassú komponens (1 s körüli időállandóval) másodlagos kinonnal is rendelkező RC -kből adódik.

A gyors és a lassú komponens relatív amplitúdói azonban jelentősen függenek attól, hogy a késleltetett fluoreszcenciás, vagy pedig az abszorpcióváltozásból kapott töltésrekombinációs kinetikák felbontásából kaptuk-e őket. E különös tény magyarázatához bevezetjük a fényindukált abszorpcióváltozás lassú komponensének relatív amplitúdóját:

$$S_{\text{abs}} = \frac{[RC]_B}{[RC]_A + [RC]_B} \quad , \quad (34)$$

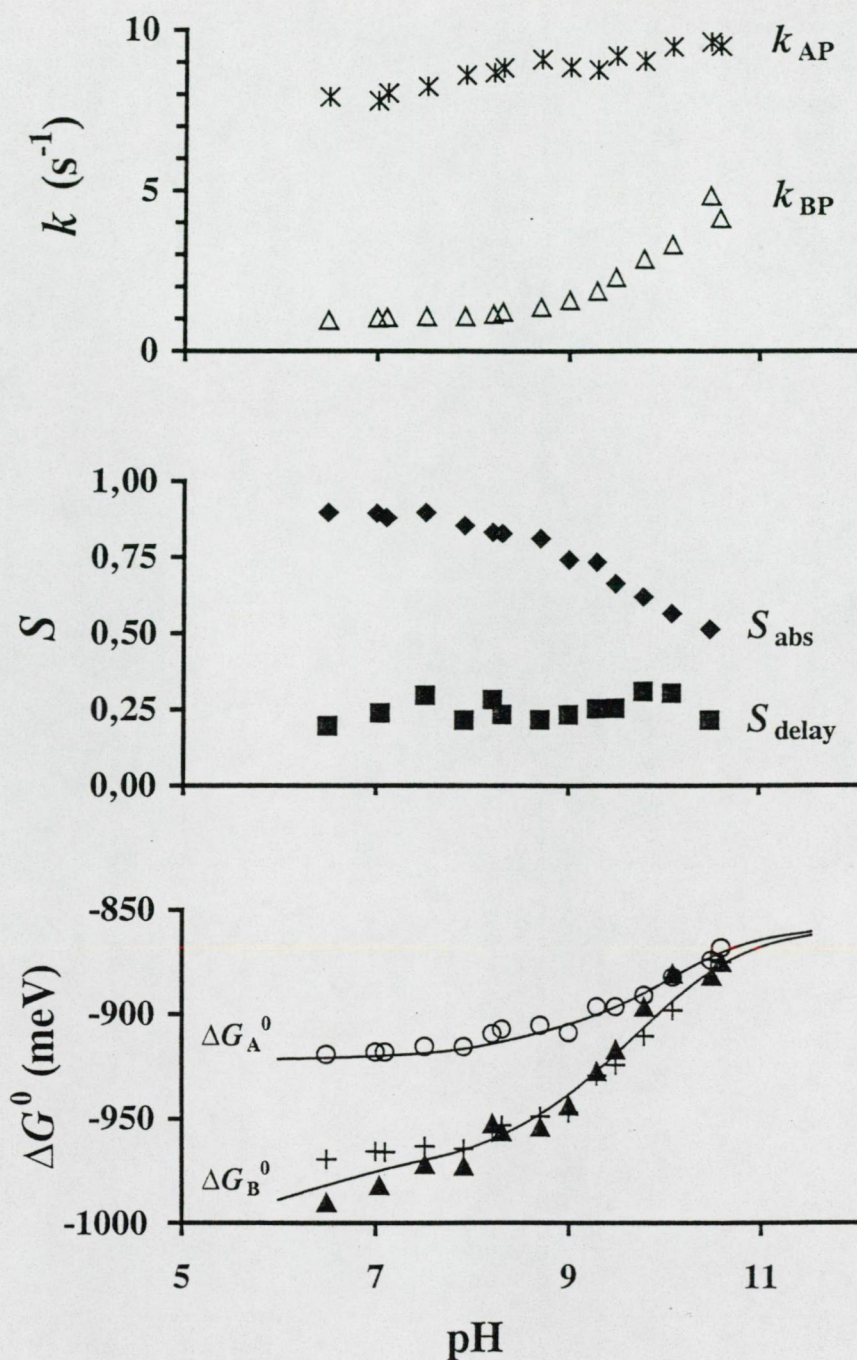
és a késleltetett fluoreszcencia lassú komponensének relatív amplitúdóját:

$$S_{\text{delay}} = \frac{F_B(t=0)}{F_A(t=0) + F_B(t=0)} \quad . \quad (35)$$

Figyelembe véve a (25) és a (26) egyenletet (5.2.1. fejezet), az

$$S_{\text{delay}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{S_{\text{abs}}} - 1 \right) \cdot \left(1 + \exp \left(\frac{\Delta G_A^\circ - \Delta G_B^\circ}{k_B T} \right) \right)} \quad (36)$$

összefüggést kapjuk. Ez azt jelenti, hogy a késleltetett fluoreszcencia módszerével meghatározott lassú komponens részaránya (relatív amplitúdója) kisebb, mint az abszorpciós kinetikában mért megfelelő részarány (5.13 ábra, középen). Látható, hogy míg a Q_A - ill. a Q_B -aktív RC -k hozzájárulása az abszorpciós kinetikához arányos a koncentrációjukkal, addig a késleltetett fluoreszcencia kinetika ezt a Boltzmann-faktorral súlyozza, amely tartalmazza a két töltéstároló állapot közötti szabadenergiakülönbséget. Ennélfogva az aktív Q_B -t is tartalmazó RC -kből származó késleltetett fluoreszcencia (a lassú komponens) amplitúdója e centrumokat számarányuknál kisebb mértékben reprezentálja a csak Q_A -t tartalmazó RC -khez viszonyítva.



5.13. ábra. A $P^+Q_B^-$ állapot szabadenergiájának pH -függése (natív RC -kben), melyet kétféleképpen határoztunk meg: a sebességi állandókból és a késleltetett fluoreszcencia lassú komponensének relatív amplitúdóiból. Az ábra fenti része: a tranziens abszorpcióváltozásból meghatározott töltéssrekombinációs sebességi állandók pH -függése másodlagos kinon-aktivitás hiányában (k_{AP} ($*$)) és másodlagos kinon aktivitással rendelkező RC -k esetében (k_{BP} (Δ)). Ezek a sebességi állandók megegyeznek a késleltetett fluoreszcencia sebességi állandóival, de az előbbi módszerrel sokkal pontosabban meghatározhatók. Középen: a tranziens abszorpcióváltozás lassú komponense relatív amplitúdóinak (S_{abs} ($\blacklozenge$); (34) egyenlet), és a késleltetett fluoreszcencia ugyanazon komponense relatív amplitúdóinak pH -függése (S_{delay} ($\blacksquare$); (35) egyenlet). Az ábra lenti része: a (37) ($+$) és (36) ($\blacktriangle$) egyenletek alapján meghatározott $P^+Q_B^-$ állapot, és a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájának pH -függése ($\circ$) (ld. 5.11 ábra).

5.5.2. A $P^+Q_B^-$ állapot szabadenergiájának pH-függése

A fényindukált abszorpcióváltozás lassú komponensének relatív amplitúdója (S_{abs}) semleges pH -knál nagy ($> 90\%$) volt (5.13 ábra közepén), viszont magasabb pH -knál lecsökkent. Valószínű, hogy a magas pH hátrányos volt a másodlagos kinon aktivitás számára: vagy a látszólagos kinonaffinitás csökkent le, vagy kevesebb kinon jutott el a másodlagos kinonkötőhelyre. A késleltetett fluoreszcencia lassú komponensének relatív amplitúdója (S_{delay}) kb. 25% -os volt, és ebben a tartományban a pH -tól függetlennek bizonyult (5.13 ábra, közepén).

A $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ állapot közötti szabadenergia különbség ($\Delta G_A^o - \Delta G_B^o$) pH -függését a késleltetett fluoreszcencia lassú és gyors komponenseinek amplitúdó-arányaiból határoztam meg a (36) egyenlet segítségével, majd -ismerve a ΔG_A^o pH -függését- megállapítottam a második stabil töltéspár szabadenergiaszintjének pH -függését (a gerjesztett dimér szintjéhez képest) (5.13 ábra, alul, telt háromszögek). A $P^+Q_B^-$ állapot szabadenergiája 175 meV -tal kerül közelebb a P^+Q_B állapot szintjéhez, ha a pH -t 5 -től 11 -ig növeljük, a függvénygörbe két inflexiós ponttal rendelkezik, a lúgos ill. a savas tartományban (ld. még 5.6 ábra).

A $P^+Q_B^-$ állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapotéhoz viszonyított szabadenergia szintjét általában, a fényindukált abszorpcióváltozás méréséből meghatározott lassú (k_{BP}) és gyors (k_{AP}) komponensek sebességi állandóinak arányából szokták megállapítani, a következő összefüggés alapján (Wraight és Stein, 1983; Kleinfeld és mtsi, 1984):

$$\Delta G_B^o = \Delta G_A^o - k_B T \cdot \ln \left(\frac{k_{AP}}{k_{BP}} - 1 \right) \quad (37)$$

Érdemes összehasonlítani a két különböző módszerrel ((36) és (37) egyenletek) kapott szabadenergia különbségeket. A gyors komponens sebességi állandója (k_{AP}), amelyet olyan RC -k töltésrekombinációs kinetikájából határoztuk meg, amelyekből a másodlagos kinont eltávolítottuk (4.5. fejezet), csak enyhe pH-függést mutatott (5.13 ábra fent, csillagok). A lassú fázis sebességállandóját (k_{BP}) a másodlagos kinonnal

rendelkező RC -k biexponenciális töltésrekombinációs kinetikájának felbontásából állapítottuk meg. Ez jelentősen függ a pH -tól: időállandója 1046 ms -tól 242 ms -ig csökken pH 6,5 és 10,6 között (5.13 ábra fent, üres háromszögek), ami összhangban van Kleinfeld és mtsi (1984) eredményeivel.

A sebességi állandók arányából meghatározott ΔG_b° szabadenergiák (5.13 ábra alul, keresztek) jól egyeznek a késleltetett fluoreszcencia amplitúdóiból meghatározott értékekkel (5.13 ábra alul, telt háromszögek).

5.5.3. A $P^*Q_B \rightarrow P^+Q_B^-$ töltésszétválasztás termodinamikai jellemzői

A másodlagos kinon aktivitással rendelkező RC -k késleltetett fluoreszcenciájának lecsengése két komponensű (ld. előző fejezet). Sem a gyors, sem a lassú komponens időállandója nem változik szignifikánsan a hőmérséklettel a fiziológiás hőmérséklet tartományban (5–35 °C), amplitúdóik azonban növekednek magasabb hőmérsékletek felé.

A késleltetett fluoreszcencia lassú komponensének van't Hoff féle ábrázolásából (az amplitúdó logaritmusa az $1/(k_B T)$ függvényében) a (25) egyenletet (5.2.1. fejezet) felhasználva, és figyelembe véve, hogy szobahőmérsékleten a kinonok közti szabadenergiakülönbség nagyobb, mint 25 meV, meghatároztuk a $P^*Q_B \rightarrow P^+Q_B^-$ töltésszétválasztáshoz tartozó entalpia- és entrópia változásokat. A mérési adatok az 5.10 ill. az 5.4 ábrán láthatók. A két különböző pH -n végzett analízisből kapott entalpia-változások: pH 8,0 -nál -920 ± 60 meV, pH 9,7 -nél pedig -877 ± 60 meV. Ezeket az értékeket és az entrópia változásokat a 2. táblázat tartalmazza (5.4.4. fejezet). Észrevehetjük, hogy akárcsak a $P^+Q_A^-$ állapot stabilizációjánál, ebben az esetben is az entalpia változás dominál a szabadenergia változásban, az entrópikus tag igen kicsi (5%).

5.6. Kinon-környéki mutánsok vizsgálata

Intézetek közötti együttműködés (francia-magyar Balaton-program) keretében lehetőségünk nyílt vad típusú és mutáns *Rb. capsulatus* reakciócentrumokat vizsgálni késleltetett fluoreszcenciás módszerrel.

Már az első mutációs vizsgálatokat is e baktérium reakciócentrumán végezték, mert

genetikai szempontból nagyon jól ismert. Nagy előnye, hogy nem-fotoszintetikus módon is képes növekedni aerob és anaerob körülmények között, dimetil-szulfoxidot használva elektron-akceptorként. Ez különösen a mutánsok tenyésztésénél jelent előnyt, mert a baktérium fotoszintetikus RC -jében előidézett, a fotoszintetikus apparátust működőképtelenné tevő mutációs változások ellenére is életképes marad.

A *Rb. capsulatus* RC -jének háromdimenziós szerkezete még nem ismert (nem sikerült még kristályosítani), de azt már tudjuk, hogy hasonlít a *Rb. sphaeroides* RC -jéhez, mivel az L, M és H alegységek rendre 78%, 76% és 64% -os homológiát mutatnak. Mindkét kinonja ubikinon-10, akárcsak az utóbbinak, de vannak közöttük szignifikáns különbségek is, pl. a bakterioklorofill monomerek és a bakteriofeofitinek aszimmetrikusabban helyezkednek el, mint a *Rb. sphaeroides*-ben; az inaktív ágba (M alegység) lévő Bkl és I körüli tartomány szerkezete jobban eltér a másik baktérium ugyanazon tartományától, mint az aktív ágba (L alegység) (Foloppe és mtsi, 1995).

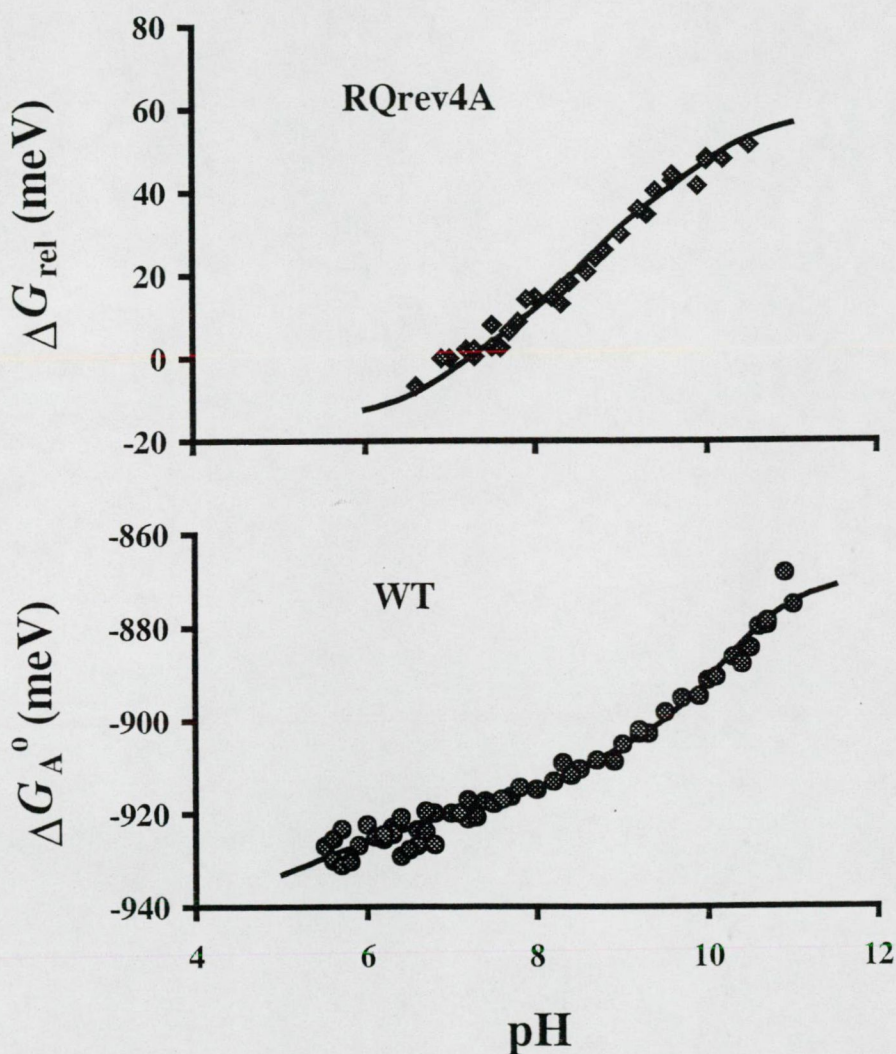
A mutánsokat elsősorban azzal a céllal hozták létre, hogy segítségükkel fényt derítsenek a két kinonkötőhely funkcionális aszimmetriájára. Annak ellenére, hogy a Q_A és a Q_B kötőhelyen a kinonok azonosak (UQ-10), a Q_A^-/Q_A és a Q_B^-/Q_B redoxpárok *in vivo* középponti redoxpotenciál értékei pH 8,0 -nál kb. 65 mV -tal eltérnek egymástól. Ezért olyan helyspecifikus mutánsokat készítettek (3. táblázat), amelyek a szimmetriát módosító csoportokat érintik: a Q_B oldalon a Glu L212 és Asp L213 aminosavakat, míg a Q_A oldalon az Ala M246 és Ala M247 aminosavakat (Hanson és Schiffer, 1998).

RC	Q_A oldal			Q_B oldal				
	M246	M247	M260	L212	L213	L217	M5	M43
vad típus	Ala	Ala	Met	Glu	Asp	Arg	Asn	Asn
RQ	Glu	Asp	Met	Ala	Ala	Arg	Asn	Asn
RQrev4A	Glu	Ala	Met	Glu	Asp	Arg	Asn	Asn

3. táblázat. *Rb. capsulatus* baktérium két fenotípus-revertáns mutánsa. Kövér betűtípussal jelöltük a vad típusban lévőől eltérő aminosavakat.

Az ilyen mutációk némelyike megszünteti az oldalak aszimmetriáját, mások akár meg is fordítják azt, vagyis segítenek abban, hogy jobban megértsük a fehérje-zseb szerepét a funkcionális aszimmetria kialakulásában. A helyspecifikus mutánsok közül egyik sem képes fotoszintetikus növekedésre (fenotípusuk PS^- , pl. az RQ mutáns), de izoláltak olyan mutánsokat is (pl. az általunk is vizsgált RQrev4A), amelyekben visszaállt a fotoszintetikus fenotípus (PS^+). Ezeket a mutánsokat fenotípus-revertánsoknak nevezik.

A késleltetett- és a prompt fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával *Rb. capsulatus* vad típusú RC -ben meghatároztam az első stabil töltéspár energiaszintjét a gerjesztett diméréhez képest: pH 7 -nél -920 ± 20 meV és a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának pH-függéséből megállapítottam a $P^+Q_A^-$ és a P^*Q_A állapotok közötti szabadenergia változását: pH 6 és 11 között 51 meV (5.14 ábra).



5.14. ábra. A $P^+Q_A^-$ és a P^*Q_A állapotok közötti szabadenergia változás pH -függése *Rb. capsulatus* vad típusú (WT) és RQrev4A félrevertáns mutáns reakciócentrumában. A mutáns esetében a pH 7 -nél mért késleltetett fluoreszcencia intenzitást tekintettük referenciának, az abszolút szabadenergia szintet (elegendő minta hiányában) nem tudtuk megállapítani.

A mérési pontokra jól illeszkedő folytonos görbét az integrált protonkötésből számítottam ki ((38) és (39) egyenlet). Négy protonálható csoport jelenlétét feltételeztem, a 4. táblázatba foglalt pK értékekkel. A legnagyobb pK-változás (0,6) a legmagasabb pK -jú csoportnál jelentkezik.

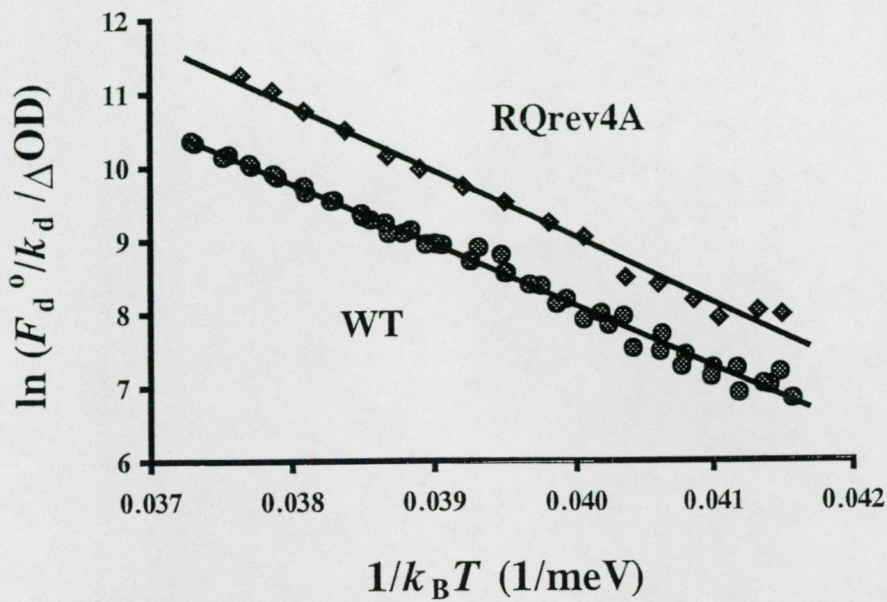
csoport	Vad típus			RQrev4A		
	pK _{ox}	pK _{red}	ΔpK	pK _{ox}	pK _{red}	ΔpK
1	5,10	5,30	0,20	-	-	-
2	6,65	6,80	0,15	6,85	7,20	0,35
3	8,40	8,62	0,22	8,25	8,80	0,55
4	9,90	10,50	0,60	9,80	10,15	0,35

4. táblázat. A protonálható aminosavak pK és ΔpK értékei. Az értékeket a mérési pontokhoz legjobban illeszkedő integrált protonkötés formális felbontásából határoztam meg.

A késleltetett fluoreszcencia van't Hoff-féle ábrázolásából a vad típusú RC entalpia-változására -840 ± 40 meV -ot kaptam (5.15 ábra).

A mutánsok közül az RQrev4A félrevertáns mutánst vizsgáltuk, amelyben a Q_A oldalon lévő Ala M246 aminosavat cserélték ki glutaminsavra (3. táblázat). A mutáns RC -ben a P⁺Q_A⁻ és a P^{*}Q_A állapotok közötti szabadenergia változása pH 7 és 11 között 60 meV (5.14 ábra). Mivel pH 6,3 alatt nincs mérési adatunk (az oldat beopálosodása miatt), három protonálható csoport feltételezése elegendőnek bizonyult az integrált protonkötés kiszámítására, amelyek pK értékei a 4. táblázatban láthatók. A vad típushoz képest megfigyelhető eltérés, mivel a 8,5 körüli pK -val rendelkező csoporthoz tartozik a legnagyobb pK-változás (0,55). A késleltetett fluoreszcencia hőmérsékletfüggése -895 ± 40 meV -nyi entalpiaváltozást adott (5.15 ábra), kb. 55 meV -al többet, mint a vad típusnál. Az RQrev4A mutáns fotoszintetikus növekedésére jellemző kétszereződési idő (5,9 óra) hasonló a vad típuséhoz (5 óra) (Hanson és Schiffer, 1998), és a P⁺H_A⁻Q_A → P⁺H_AQ_A⁻ elektrontranszfer sebességi állandója a vad típusú és az RQ mutáns sebességi állandója között van (P.D. Laible és D.K. Hanson, még nem közölt eredmények). A mi eredményeink is megerősítik azt a megfigyelést, hogy ez a mutáció

nem okoz túl nagy változást az RC működésében. Minthogy azonban a késleltetett fluoreszcencia módszere elég érzékeny ahhoz, hogy kisebb változásokat is kimutasson, érdemes más mutánsokat is vizsgálni vele.



5.15. ábra. A *Rb. capsulatus* vad típusú és RQrev4A mutánsának reakciócentrumában mért késleltetett fluoreszcencia van't Hoff -féle ábrázolása, a fiziológias hőmérséklet tartományban (5-35 °C), pH 8 -nál. Az amplitúdó helyett a késleltetett fluoreszcencia lecsengése alatti területet (F_d^0/k_d) vettük, és ezt normáltuk a fotoaktív RC -k koncentrációjával (ez utóbbit a 430 nm -nél mért flash-indukált abszorpcióváltozásból (ΔOD) határoztuk meg). Mérési körülmények: 1-1,5 μM RC, 0,03% Triton X-100 (vagy 0,05% LDAO), 100 mM NaCl, 5mM Tris és 100 μM terbutrin.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia komponenseinek eredete

A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia lecsengésében három exponenciális fázist különböztettünk meg a kinon-akceptor komplex redox állapotától és helyreállítottságától függően: egy nagyon gyors, egy gyors és egy lassú komponens, pH 8,0 -nál rendre 1,5 ms, 102 ms és 865 ms időállandókkal (ld. 5.3 ábra).

A gyors fázis a redukált primér kinon energetikai ill. kinetikai változásait követi, lecsengésének sebességállandója megegyezik a $P^+Q_A^-$ állapot töltésrekombinációval történő eltűnésének (abszorpcióváltozás-mérésekkel meghatározható) sebességállandójával. A lassú komponens a másodlagos kinon energetikai ill. kinetikai változásait tükrözi, kinetikájának időállandója a $P^+Q_B^-$ állapotnak a $P^+Q_A^-$ állapoton keresztüli, indirekt töltésrekombinációs folyamattal való eltűnésének időállandójával egyezik meg. E kísérleti tapasztalatok alapján a gyors és a lassú komponens eredete tisztázottnak tekinthető, eredményeink összhangban vannak mind az irodalmi adatokkal (Malkin, 1977; Arata és Parson, 1981a; McPherson és mtsi, 1990a), mind pedig a késleltetett fluoreszcencia keletkezésére vonatkozó, az 5.1. és 5.2. fejezetekben részletesen kifejtett elméletünkkel.

A nagyon gyors komponensre az irodalomban tőlünk független adat nem található. E fázis valószínűsíthetően olyan triplett állapotok közötti átalakulásokból származik, amelyek hosszú élettartamúak, a P^* energiaszintjéhez közeli szabadenergia szinten vannak, és a $P^+Q_A^-$ állapottal párhuzamosan képesek a gerjesztett dimérrel termikus egyensúlyba kerülni. Noha a nagyon gyors komponens különleges hőmérsékletfüggése még további vizsgálatokat igényel (ld. az 5.3. fejezetet), sok megfigyelésre magyarázatot tudunk adni az RC -ben végbemenő ismert reakciók alapján (5.2 ábra). A redukált primér kinonnal rendelkező RC -ben ugyan létrejön tranziens töltésszétválasztás a dimér és a bakteriofeofitin között ($P \rightarrow P^* \rightarrow P^+I^-$), de a kinon redukált volta miatt további töltéssztabilizálódás nem lehetséges, így az egyéb reakcióutak, a gyök-pár (radical pair) mechanizmus és a triplett-képződés ($^3(P^+I^-)$ és 3P)

(ld. Volk és mtsi, 1995 összefoglalóját), válnak kedvezményezetté. Ennek oka az, hogy a Q_A elő-redukált állapotában a P^+I^- állapot élettartama lényegesen, 200 ps -ről 15 ns -ra növekszik. A nagyon gyors komponens amplitúdójának ilyenkor tapasztalt erős megnövekedése arra enged következtetni, hogy e fázis forrása, a P^+X^- állapot a P^+I^- tranzien্স állapoton keresztül töltődik fel. Igen valószínűnek tartjuk, hogy a még ismeretlen P^+X^- állapot a fentebb említett triplett állapotokkal hozható kapcsolatba. A dimér-triplett állapot elektromos és mágneses módszerekkel mért élettartama szobahőmérsékleten 54 μ s (Volk és mtsi, 1995), vagyis rövidebb a késleltetett fluoreszcencia általunk mért nagyon gyors komponensénél ($\approx 1,5$ ms). Az eltérés azonban, valószínűleg magyarázható azzal a -szakirodalomban sok oldalról alátámasztott- tapasztalattal, hogy a statikus heterogenitás, és/vagy a relaxációs folyamatok következtében az RC fehérje energetikai szempontból heterogénné válik (Peloquin és mtsi, 1994; Woodbury és Allen, 1995; Volk és mtsi, 1995; Ogrodnik és mtsi, 1999; Turzó és mtsi, 1999). Ezek a hatások és a gyök-pár mechanizmus mellékfolyamatai eredményezhetnek olyan hosszú élettartamú bakterioklorofill triplett állapotokat, amelyeket -alacsony koncentrációjuk és spektrális megkülönböztethetetlen-ségük miatt- rutin abszorpciós technikával nem lehet érzékelni. Az ezekből az állapotokból származó késleltetett fluoreszcencia viszont a kinon-komplexből adódóval összemérhető, vagyis késleltetett fluoreszcenciás technikával könnyen detektálható lehet (a kvantitatív analízist illetően ld. a (36) egyenletet).

6.2. A $P^+Q_A^-$ és a $P^+Q_B^-$ állapot stabilizációja

A késleltetett fluoreszcencia gyors komponensének mérésével felvettük a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájának pH -függését (5.4.2. fejezet; 5.6 ábra, üres karikák). Eredményeink azt mutatják, hogy ha a protonkoncentráció növekszik (a pH csökken), akkor a $P^+Q_A^-$ állapot mind jobban stabilizálódik, a $P^+Q_A^-$ állapot végül 65 meV -tal távolabb kerül a P^* állapot szabadenergia szintjétől. A pH -függésnek egy jellegzetes inflexiós pontja van a lúgos tartományban. Mérési eredményeink helyességét a késleltetett fluoreszcencia intenzitásából kapott adataink, és a $P^+Q_A^-$ állapot flash-indukált protonfelvételének sztöchiometriájából kapott (modellfüggetlen) eredmények összehasonlítása bizonyítja a legjobban, mivel a két módszer eredményei jól egyeznek.

A reakciócentrum fényindukált protonkötésének pH -függését ($\Delta H^+(\text{pH})$) -ahogy azt már a "Fényindukált protonálódás" című részben (2.1.2. fejezet) tárgyaltuk- a redukált kinon és néhány (általában négy) protonálható csoport közötti kölcsönhatással (azok pK° -inak eltolódásával) szokták modellezni. Általános esetben a protonkötés i számú, Henderson-Hasselbalch-típusú összefüggés segítségével számítható ki (Maróti és Wraight, 1988a; McPherson és mtsi, 1988):

$$\Delta H^+ = \sum_{i=1}^N \left(\frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{iQ}^\circ}} - \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{iQ}}} \right) , \quad (38)$$

ahol pK_{iQ}° ill. pK_{iQ} az i -edik csoport pK értékét jelenti a Q_A^- ill. a Q_A állapotokban. A csoportok pK értékei a töltésszétválasztott állapotban nagyobbak.

A P^+Q_A^- állapot szabadenergiájának pH -függése meghatározható a $\text{PQ}_A \rightarrow \text{P}^+\text{Q}_A^-$ folyamathoz kötött protonfelvétel (ΔH^+) integrálásával, mivel a P^+Q_A^- állapot szabadenergiájának változásait a primér kinon környezetében lévő aminosavak protonálódásának tulajdonítják (Okamura és Feher, 1992; McPherson és mtsi, 1988; Beroza és mtsi, 1995):

$$\Delta G^\circ(\text{pH}) - \Delta G^\circ(\text{pH}_0) = k_B T \cdot \ln 10 \cdot \int_{\text{pH}_0}^{\text{pH}} \Delta H^+(\text{pH}') \cdot d\text{pH}' , \quad (39)$$

ahol k_B a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet, és $\Delta G^\circ(\text{pH}_0)$ integrálási konstans, amelyet úgy választottunk meg, hogy a fenti egyenlet alapján kapott görbe (5.6 ábra, szaggatott vonal) pH 8,0 -nál a legjobban illeszkedjen a mérési pontjainkhoz. Esetünkben négy protonálható csoport létezését feltételeztük, vagyis négy Henderson-Hasselbalch-típusú görbe összegével számoltunk. A protonálható csoportok sötétben (pK_{iQ}°) ill. fénygerjesztés után (pK_{iQ}) jellemző pK -értékeit az irodalomból vettük át (Maróti és Wraight, 1988a). Az 5.6 ábrán látható, hogy a két független módszerrel kapott eredmények jól egyeznek. Az alacsony pH -knál megfigyelt pár meV -os eltérés valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a késleltetett fluoreszcencia intenzitása alacsony pH -n nagyon kicsi, ezért kevésbé pontosan határozható meg.

A késleltetett fluoreszcenciás mérésekből és az integrált protonkötés

eredményeiből kapott ilyen görbék analízisét (pK -eltolódás és szabadenergia-változás meghatározása) összevetve az irányított mutánsokon végzett tanulmányokkal, számos olyan protonálható csoportot lehetett azonosítani, amelyek kölcsönhatásban vannak a redukált primér kinonnal (Maróti és mtsi, 1995; Miksovská és mtsi, 1996; Kálmán és mtsi, 1998). A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájának lúgos tartománybeli jelentős változása (pH 8 fölött majdnem 50 meV-nyit változik), és az a tény, hogy a legnagyobb pK -változás ($\Delta pK = 0,8$) a legmagasabb pK -val rendelkező csoportnál észlelhető, arra utal, hogy a Q_B közelében található Glu L212 körüli csoportok protonfelvételének jelentős szerepe van a $P^+Q_A^-$ töltéspár szabadenergiájának változásában. Ez a megfigyelés a Q_A és a Q_B oldalak közötti funkcionális kapcsolatot bizonyítja (Wraight, 1998). Kölcsönhatásuk típusa és útja még nem tisztázott, mivel a köztük lévő távolság (kb. 1,7 nm) túl nagy ahhoz, hogy elektrosztatikus kölcsönhatásról lehessen szó. Feltételezik, hogy a funkcionális kapcsolatot a kinonok közti vas-hisztidin komplex segíti elő.

A szabadenergia pH 7 alatt gyakorlatilag független a pH -tól, ami azt jelenti, hogy a Q_B vagy Q_A körüli többi (savas) csoport érzéketlen a Q_A redox változásaira.

A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiájának pH -függése nemcsak 100 mM NaCl sókoncentráció jelenlétében egyezik meg az integrált protonkötésből kapott eredményekkel, hanem az ionerősség viszonylag széles, 10 -től 500 mM -ig terjedő tartományában mindenütt (5.7 ábra). 10 mM NaCl és 100 mM NaCl sókoncentrációknál a pK_{ox} és a pK_{red} értékek ismeretében (Maróti és Wraight, 1988a) a ΔH^+ integrálásával ((39) egyenlet) a késleltetett fluoreszcencia intenzitásából kapott mérési pontokhoz jól illeszkedő görbék (folytonos vonalak) kaptunk. A fényfelvillanással kiváltott protonfelvétel pH -függését három Henderson-Hasselbalch-típusú görbe összegével ((38) egyenlet) számítottuk ki. 500 mM -os ionerősség esetére az irodalomban nem találtunk pK_{ox} és pK_{red} -re vonatkozó adatot, ezért a késleltetett fluoreszcenciás méréseinkre legjobban illeszkedő értékeket határoztuk meg. E pK -értékeket az 5. táblázat tartalmazza. Az 5.7 ábrán látható, hogy az ionerősség növelése nemcsak a görbék eltolódását okozza az alacsonyabb pH -k felé, hanem a pH 6 és 10 között észlelhető szabadenergia-változás mértékét is lecsökkenti. A nagy sókoncentráció által okozott változásokat a protonálható csoportok csökkenő pK_{ox} és ΔpK ($\equiv pK_{red} - pK_{ox}$) értékeinek tulajdonítottuk.

	10 mM NaCl			100 mM NaCl			500 mM NaCl			33 mM MgCl ₂	
pK_{ox}	7,20	8,90	10,00	6,80	8,35	9,70	6,60	7,80	9,10	7,35	8,65
pK_{red}	7,40	9,50	10,80	6,90	8,60	10,50	6,70	8,05	10,00	7,55	9,45
ΔpK	0,20	0,60	0,80	0,10	0,25	0,80	0,10	0,25	0,90	0,20	0,80

5. táblázat. Az RC három ill. két protonálható aminosavjának pK_{ox} és pK_{red} értékei, különböző sókoncentrációk és sók esetében (a primér kinon helyén natív kinon, míg a másodlagos kinon helyén terbutrin volt). Az értékeket a mérési pontokra legjobban illeszkedő integrált protonkötés ((38) és (39) egyenlet) formális felbontásából határoztam meg.

Az 5.4.2. ill. 5.5.2. fejezetekben tárgyalt eredményeink alapján láthatjuk, hogy a P⁺Q_B⁻ állapot szabadenergiájának változása a pH függvényében (ΔG_B^o) összetettebb (egy helyett két inflexiós pont), és nagyobb (65 meV helyett 175 meV), mint a ΔG_A^o esetén (5.6 ill. 5.13 ábra), ami arra utal, hogy valószínűleg több protonálható csoport reagál a Q_B⁻ keletkezésére, és ezek a másodlagos kinonhoz közelebb helyezkednek el. Ez nem meglepő, hiszen az RC szerkezetéből tudjuk, hogy a Q_B kötőhely közelében több protonálható csoport van, mint a Q_A kötőhely szomszédságában.

A P⁺Q_B⁻ állapot pH függvényében mért szabadenergiáját összehasonlítottuk az integrált protonkötésből ((39) egyenlet) kapott eredményekkel (5.6 ábra, szaggatott vonal), és azokkal a számításokkal, amelyek a szemikinon (Q_B⁻) elektrosztatikus kölcsönhatását veszik figyelembe négy, egymástól független protonálható csoporttal ((30) egyenlet; 5.6 ábra, folytonos vonal). Az integrált protonkötés esetében a pK értékeket Maróti és Wraight (1988a) cikkéből vettük, ezekkel a pH-függés a semleges ill. a lúgos tartományban jól egyezik méréseinkkel. A savas pH -knál mutatkozik némi eltérés, mert itt lecsökken a késleltetett fluoreszcencia intenzitása, emiatt a lassú komponens amplitúdója nem határozható meg pontosan. A középponti redoxpotenciál pH-függésén alapuló illesztés az 1. táblázatba (5.4.2. fejezet) foglalt pK_{ox} és pK_{red} értékeket adta. Nagymértékű pK -eltolódás észlelhető a legalacsonyabb és a legmagasabb pK -jú csoportnál (ΔpK = 1,8 ill. 1,5), és ezek az eltolódások nagyobbak, mint a P⁺Q_A⁻

állapot esetén kapott legnagyobb pK -eltolódás (0,8).

Irányított mutánsokon végzett tanulmányok során számos olyan protonálható aminosavat azonosítottak a Q_B kötőhely közelében, amelyek fontos szerepet játszanak a Q_B^- protonálódásában (Takahashi és Wraight, 1994; Okamura és Feher, 1995; Sebban és mtsi, 1995). A fentebb említett, legalacsonyabb pK -jú csoportot az Asp L213 aminosavval azonosítják, míg a legmagasabb pK -jú csoport a Glu L212. A Q_B közelében más aminosavak is vannak (Asp L210, Asp M17, Asp H124, Asp H170 és Glu H173), amelyek savas csoportosulást (clustert) alkotnak az Asp L213 -al, de ezek kevésbé fontosak a szemikinsonok protonálódásában, amint azt az FTIR mérések is mutatják (Nabedryk és mtsi, 1998).

A két kinon szabadenergiájának pH -függése közötti különbség abból adódik, hogy a fentebb tárgyalt protonálható csoportok szignifikánsan kisebb (dielektromos) távolságra vannak a Q_B^- -től, mint a Q_A^- -től, és/vagy a szemikinsonok más csoportokkal is elektrosztatikus kölcsönhatásban lehetnek (Kálmán és Maróti, 1994; Beroza és mtsi, 1995; Lancaster és mtsi, 1996; Alexov és mtsi, 1997; Rabenstein és mtsi, 1998).

6.3. A primér kinon *in situ* szabadenergiájának szerepe a $P^+Q_A^-$ töltéspár stabilizációjában

Az 5.4.5. fejezetben ismertetett kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a primér kinon *in situ* szabadenergiája (ΔG_A^0) jelentősen befolyásolja a $P^+Q_A^-$ töltéspár stabilizációját (5.11 ábra). Amikor a natív kinont más kinonnal (durokinonnal ill. menadionnal) helyettesítettük, a töltésrekombinációs kinetikából megállapított rekombinációs sebességi állandó (k_{AP}) és a késleltetett fluoreszcencia amplitúdójából meghatározott szabadenergia pH -függése szignifikánsan megváltozott, vagyis a $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiáját befolyásolja a primér kinon szerkezete és redoxpotenciálja.

Az 5.11 ábrán látható, hogy a mérési pontjainkra legjobban illeszkedő görbék (folytonos vonalak) az integrált protonkötésből adódtak ((39) egyenlet), amelyet Henderson-Hasselbalch típusú titrálási görbékből számoltunk ki ((38) egyenlet). A görbék formális felbontásakor 4, 3 ill. 2 protonálható csoport jelenlétét feltételeztük, és a 6. táblázatba foglalt pK -kat ill. pK -eltolódásokat (ΔpK) kaptuk.

	UQ			DQ			MD		
csoport	pK_{ox}	pK_{red}	ΔpK	pK_{ox}	pK_{red}	ΔpK	pK_{ox}	pK_{red}	ΔpK
1	4,87	4,90	0,03	-	-	-	-	-	-
2	6,87	6,90	0,03	6,80	7,10	0,30	-	-	-
3	8,35	8,60	0,25	8,85	8,90	0,05	7,80	7,82	0,02
4	9,70	10,50	0,80	9,70	10,35	0,65	9,60	9,75	0,15

6. táblázat. A feltételezett protonálható aminosavak pK értékei, az RC Q_A -kötőhelyét betöltő kinonok (ubikinon, durokinon és menadion) oxidált (pK_{ox}) és redukált (pK_{red}) állapotaiban. Az értékeket a mérési pontokra legjobban illeszkedő integrált protonkötés ((38) és (39) egyenlet) formális felbontásából határoztam meg.

Megfigyelhetjük, hogy a DQ -val való helyettesítés nem okoz nagy változást a szabadenergia pH-függésének jellegében, de a szabadenergia szint a natív kinonéhoz képest kb. 30 meV -tal alacsonyabb, összhangban azzal, hogy a durokinon középponti redoxpotenciálja kb. 30 mV -tal eltér az ubikinonétól (–20mV ill. –50 mV). A MD -os minták esetében alig észlelhető pK -eltolódást ill. csekély szabadenergia változást kaptunk, ugyanúgy, mint Kálmán és Maróti (1994) proton-felvétel méréseik során.

6.4. A reakciócentrum elektrosztatikus kölcsönhatásai az oldatban lévő ionokkal

A sótitrálás során tett megfigyelésünk, hogy a sókoncentráció növelése destabilizálja a $P^+Q_A^-$ állapotot (5.4.3. fejezet, 5.8 ábra), éppen ellentétes azzal, amit a protonkoncentráció emelésekor tapasztaltunk, minthogy a pH csökkenése stabilizációt eredményezett. Ez igen meglepő, hiszen a H^+ ionoknak és a só-kationoknak (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) várhatóan hasonlóképpen, elektrosztatikus kölcsönhatások révén kellene kompenzálniuk a fényfelvillanás hatására keletkezett (extra) töltéseket, vagyis a töltéspár stabilitását ugyanúgy kellene befolyásolniuk. Az ellentétes hatás magyarázata a kationok specifikus árnyékolási és bekötődési tulajdonságaiban keresendő.

Ionok által okozott árnyékolás

A fényfelvillanás hatására keletkezett töltések kompenzálásában az elektrosztatikus árnyékolás az egyik legfontosabb jelenség. Az oldatban lévő ionok leárnyékolják a Q_A^- -on és a P^+ -on megjelenő töltések kölcsönhatását mind a protonálható csoportokkal, mind pedig a rögzített (negatív) felületi töltésekkel. A két effektus szétválasztása bonyolult feladat, és a jelenséget -szerkezeti koordináták ismeretén alapuló elektrosztatikus számítások hiányában- csak kvalitatív módon tudjuk tárgyalni. A Debye-Hückel elmélet szerint a mobilis ionok árnyékoló hatása az I ionerősséggel arányosan csökkenti az elektrosztatikus potenciált, és független a só minőségétől, mivel teljesen hidratált ellenionok közvetítik (Adam és mtsi, 1988). Feltéve, hogy a kofaktorokon és a protonálható csoportokon lévő ponttöltésekhez a mobilis ionok korlátozás nélkül hozzáférhetnek, az egymástól r távolságban lévő két ponttöltés kölcsönhatásának árnyékolása a mérhető ΔG szabadenergiát a következőképpen változtatja meg:

$$\Delta(\Delta G) = \Delta(\Delta G)_{\max} - \left(1 - \exp \left(- \frac{r \cdot F \cdot \sqrt{2}}{\sqrt{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \cdot R \cdot T} \cdot \sqrt{I} \right) \right) \quad , \quad (40)$$

ahol, F , $\epsilon_0 \cdot \epsilon_r$ és R rendre a Faraday-, a dielektromos-, és az egyetemes gázállandó. $\Delta(\Delta G)_{\max}$ az a lehető legnagyobb elektrosztatikus kölcsönhatási energia, amelyet a mobilis ionok le tudnak árnyékolni. Az összefüggés szerint az árnyékolás alacsony ionerősségeknél lineárisan függ az ionerősség négyzetgyökétől, és magas sókoncentrációknál telítésbe megy. A só hatása különböző pH -knál erősen eltérő (5.8 ábra), amit azzal magyarázunk, hogy a protonálható csoportok és a Q_A^- , ill. a P^+ töltései közti távolság különböző, és/vagy a protonálható csoportok hozzáférhetősége a sók és a vízmolekulák számára eltérő (Shinkarev és mtsi, 1992, 1993). Eszerint a pH 9 -nél működő csoportok jobban ki vannak téve az ionikus árnyékolásnak, mint a pH 7,5 körüliek. A (40) egyenlet r paraméterének kísérleti adatainkhoz való illesztésével az r távolságra pH 9,0 -nál, ill. pH 7,5 -nél kapott 1,1 nm ill. 2,4 nm értékeink, alátámasztják azt a várakozásunkat, hogy a protonálható csoportokra a Q_A és a P egyaránt hatnak. Noha esetünkben a Debye-Hückel elmélet csak közelítésnek tekinthető, így ezek a távolságok csak becslések, arra mégis következtethetünk, hogy a protonálható

csoportok egyike sem helyezkedhet túl közel a kofaktorokon lévő töltésekhez.

A felületi potenciál ionos árnyékolásának hatása a töltéspár energetikájára már kevésbé pontosan jósolható meg. Az ilyen elektrosztatikus kölcsönhatás stabilizálhatja, de akár destabilizálhatja is a töltéspárt, a $P^+Q_A^-$ dipól és a fehérje felületének topológiától függően. Esetünkben a fehérje felületi töltéseinek stabilizálniuk kell a $P^+Q_A^-$ dipólt, mivel $\Delta(\Delta G)$ magasabb ionerősségek felé (vagyis kisebb felületi töltéssűrűségnél, 5.8 ábra) növekszik. Ez az effektus erősebb lesz magas pH -knál, ahol a (negatív) felületi potenciál nagyobb (Shinkarev és mtsi, 1993; Maróti és Wraight, 1997).

Kationok specifikus bekötődése

A kationok specifikus bekötődése is hozzájárulhat a megfigyelt szabadenergia változásokhoz. Míg a protonok több, kis protondisszociációs állandóval ($pK \approx 4-10$) rendelkező protonálható csoporthoz kötődnek, addig az ionkötőhelyek számát és természetét kevésbé ismerjük, és ezek disszociációs állandója sokkal nagyobb kell legyen ($pK \approx 1$, Corazza és mtsi, 1992; Venturoli és mtsi, 1994). Az ionkötés és a lehetséges szerkezeti változások kvalitatív magyarázatot adhatnak a sóknak a töltéspár energetikájára gyakorolt hatására nagy ionerősségeknél. Az ion bekötődése az RC felületén lévő ionkötő csoportokhoz, az RC körüli vízmolekulák reorganizációjával jár (Hofmeister-effektus; Collins és Washabaugh, 1985). Mivel a különösen magas elektrosztatikus potenciálok tartományára korlátozódik, a magas pH -nál és ionerősségnél tapasztalt destabilizáció (5.8 ábra) ill. az egyszerű elektrosztatikai modelltől való eltérés (5.9 ábra) megérthető. Ezek kvantitatív tárgyalása ennek ellenére komoly nehézségbe ütközik, mert az elektrosztatikus egyenleteket (pl. a fenti (40) egyenlet) változó geometria esetére kell alkalmazni a só (és pH) titrálás során. A kétértékű kationoknak a töltéspár szabadenergiájára gyakorolt hatása (5.9 ábra) a kationoknak az RC -hez való specifikus kötődésére utal. Ezt alátámasztja, hogy újabban izolált RC -kben kétértékű fémionok olyan kötőhelyet figyelték meg, amely a primér kinon vas-kötőhelyétől különböző helyen van (Tiede és mtsi, 1997). E jelenség molekuláris magyarázatát nagymértékben elősegítené, ha közvetlen módon (pl. ionszelektív elektródával) lehetne követni az ionkötést.

6.5. A töltésstabilizációt elősegítő termodinamikai erők

A $P^* \rightarrow P^+Q^-$ töltésszétválasztással járó szabadenergia változása megadja ugyan annak a folyamatnak a teljes energetikai leírását, amely a gerjesztett dimér energiájának a töltésszétválasztott állapotba való átalakulásával jár, mégis ajánlatos többet megtudni a töltésstabilizációt meghajtó erőkről. Ezt tettük az 5.4.4. és az 5.5.3. fejezetekben, amikor meghatároztuk az első és a második stabil töltéspár keletkezésével járó entalpia- és entrópiaváltozásokat (ld. 5.4.4 fejezet, 2. táblázat). Méréseink nagy entalpiaváltozásról és mindössze 5-10% -os entrópiaváltozásról tanúskodnak, ami azt bizonyítja, hogy a töltésstabilizálódás nagymértékben entalpiaváltozás által meghajtott folyamat, vagyis a reakciócentrum fehérje a töltésstabilizáció során csak kis relaxációs mozgásokat végez.

Számos tanulmány foglalkozott már e termodinamikai paraméterek vizsgálatával (áttekintésül ld. Turzó és mtsi, 1998; Edens és mtsi, 1999), és a különböző módszerekkel (pl. fotoakusztikus, potenciometrikus és spektroszkópiás mérések) kapott eredmények gyakran erősen eltérnek egymástól. Az eltérések oka sok esetben a baktériumok különbözőségében, az izolálásuk közti különbségekben, vagy akár bizonyos módszerek hiányosságaiban (műtermékek, szisztematikus hibák) keresendő. Ilyen pl. a potenciometrikus mérés, amelynek során az elektrondonort és az akzeptort külön-külön titrálják, így az nem veszi figyelembe a P^+ és Q^- közötti (elektrosztatikus) kölcsönhatást.

A $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ folyamat entalpiaváltozására -440 meV -től -1330 meV -ig terjedő értékeket találhatunk a szakirodalomban a mérési módszertől, a gerjesztési hullámhossztól ill. a baktérium fajtájától függően. A fotoakusztikus spektroszkópia eredményei -eddig még nem teljesen tisztázott okok miatt- jelentősen eltérnek egymástól. Az egyik feltételezés szerint az ilyen méréseket ajánlatos infravörös, pl. 860 nm -es gerjesztéssel végezni, mert ha a gerjesztés a látható hullámhossztartományban, pl. 532 nm -nél történik, akkor a foton energiája jóval nagyobb, mint a P gerjesztéséhez szükséges 1380 meV, így a fölösleges energia (kb. 30%) hővé alakul, ami igen nagy, ezért nehezen korrigálható háttérjelet ad. Ennek ellentmondani látszik az a tény, hogy míg 532 nm -es gerjesztéssel Mauzerall és mtsi (1995) -440 meV entalpiaváltozást kaptak, addig Puchenkov és mtsi (1995) -820 ± 40 meV -ot (ez utóbbi érték megegyezik

az általunk mért értékkel), ill. 860 nm -es gerjesztési hullámhossznál Edens és mtsi (1999) -440 ± 30 meV -ot állapítottak meg. A legnagyobb entalpiaváltozást (-1330 meV) Arata és Parson (1981b) kondenzátormikrofonos mérései adták, viszont ugyanők, késleltetett fluoreszcenciás mérésekkel (Arata és Parson, 1981a) -750 ± 10 meV -ot kaptak.

A bakteriális reakciócentrumokban végbemenő elektrontranszfer vizsgálatánál az entrópiát általában elhanyagolják (Graige és mtsi, 1996). A (27) összefüggés alapján az 5-10% -os entrópiaváltozás csak kis szabadenergiaváltozást okoz (kevesebb, mint 10% -ot) a fiziológiás hőmérséklettartományban, ahol -a van't Hoff analízisnek megfelelően- az entalpiát és az entrópiát konstansnak tekinthetjük. Az entrópiaváltozás (pozitív vagy negatív) az RC -hez kötődő ellenionok átrendeződésének, a protonok a $P^+Q_A^-$ állapot élettartama alatti fényindukált megkötésének és a hélixek ill. hurkok megnövekedett vagy lecsökkent flexibilitásából adódó konformációs entrópia-veszteségek eredményeképp jöhet létre.

Kicsi, de szisztematikus entrópiacsökkenést figyelhetünk meg a $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ töltésszétválasztás során, ha a pH -t 6 -tól 10 -ig növeljük, és egy ennél is kisebb csökkenés mutatkozik a $P^*Q_B \rightarrow P^+Q_B^-$ átmenet eredményeképpen (2. táblázat). Ezzel a csökkenéssel párhuzamosan megnövekszik a fényindukált protonfelvétel sztöchiometriája függetlenül attól, hogy van-e kinon a Q_B -kötőhelyen (Maróti és Wraight, 1988a és 1988b; Maróti és mtsi, 1995; Kálmán és Maróti, 1997; McPherson és mtsi, 1988). A protontranszfer a teljesen rendezetlen külső vizes fázisból, a rendezett, felületi sav/bázis csoportokhoz, majd ezektől a még rendezettebb, jégszerű struktúrájú, hidrogénkötéses belső aminosav oldalláncok rendszeréhez, és az RC strukturális vízmolekuláihoz irányul. Ennélfogva a protonfelvételnek csökkentenie kellene az entrópiát, azonban más folyamatok megváltoztathatják ezt a tendenciát. Általában az entrópia (pH -független) növekedését a konformációs entrópiával magyarázzák, amely abból származik, hogy a töltésszétválasztás által kiváltott fehérjerelaxáció során megváltozik az RC hurkok struktúrája. Késleltetett fluoreszcenciás méréseink arra mutatnak, hogy a fehérje-relaxáció késői fázisában a protonfelvételnek tulajdonítható entrópiacsökkenés a meghatározó effektus az entrópia változásában.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Meghonosítottam a tanszéken a bakteriális reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciájának mérési módszerét. A Q -kapcsolt, frekvenciakétszerezett Nd:YAG lézer impulzusával gerjesztett késleltetett fluoreszcenciát a gerjesztés alatt elektromechanikus fényzárral védett, hűtött infravörös fotoelektronsokszorozó detektálja, és digitális oszcilloszkóp átlagolja. A készülék alkalmas a késleltetett fluoreszcencia kb. 10^{-9} kvantumhatásfokú, kb. 1 ms-tól a szekundumos tartományig terjedő élettartamú komponenseinek mérésére 10 Hz/n ($n = 1, 2, \dots, 99$) alakban felírható tetszőleges ismétlési frekvenciánál, valamint a késleltetett és a prompt fluoreszcencia integrált intenzitásainak összehasonlításával képes az elektrontranszportlánc állapotai szabadenergiáinak abszolút meghatározására is. (I, II, IV)

2. Kétállapotú tranziens rendszer modelljével pillanatszerű gerjesztést követően analitikus formában megadtam a fluoreszcencia időbeli lecsengését. A folyamatban résztvevő minden tranziens állapotnak a késleltetett fluoreszcencia 1-1 komponense felel meg. A fázisok időállandói a tranziens állapotok közötti előre irányuló reakciók időállandóit és a töltéstároló állapotok kiürülési idejét tükrözik. Amplitúdóik a visszreakciók sebességeitől, ezen keresztül az egyes állapotok szabadenergia-szintjeitől függnek. (IV, VII)

3. A milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia lecsengésében három exponenciális fázist találtam; a nagyon gyors, a gyors és a lassú komponens élettartama pH 8 -nál rendre 1,5 ms, 102 ms és 865 ms volt. A nagyon gyors komponens valószínűsíthetően azon triplett állapotok közötti átalakulásokból származik, amelyek hosszú élettartamúak, a P^* -éhoz közeli szabadenergia szinten vannak, és a $P^+Q_A^-$ állapottal párhuzamosan képesek a gerjesztett dimérrel termikus egyensúlyba kerülni. A gyors komponens az elsődleges kinon (Q_A), a lassú pedig a másodlagos kinon (Q_B) energetikai és kinetikai változásait tükrözi. Meghatároztam a késleltetett fluoreszcencia fázisainak kvantumhatásfokait, értékeik pH 8-nál: $6,4 \cdot 10^{-9}$ a nagyon gyors, $2,2 \cdot 10^{-9}$ a gyors, és $2,6 \cdot 10^{-9}$ a lassú komponens esetén; kb. 5 nagyságrenddel alacsonyabbak, mint a prompt

4. A bakterioklorofill dimér késleltetett fluoreszcencia és prompt fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával meghatároztam az első és a második stabil töltéspár energiaszintjét a P^*Q szinthez képest pH 8-nál. A $P^*Q_A^-$ és a P^*Q_A szintek közötti szabadenergia különbséget (másodlagos kinon hiányában) -910 ± 20 meV -nak, míg a $P^*Q_B^-$ és a P^*Q_B szintek szabadenergia különbségét -970 ± 20 meV -nak találtam. (II, VI)

5. Meghatároztam a fentebb említett állapotok közötti szabadenergia különbségek pH-függését. A $P^*Q_A^-$ állapot szabadenergiája -65 meV -ot változik pH 11 és 5 között, egy jellegzetes inflexiós ponttal a lúgos tartományban. Az elsődleges szemikinin és a másodlagos kinon közelében lévő Glu L212 aminosav körüli protonálható csoportok közötti kb. 50 meV -os kölcsönhatási energia a két kinonkötőhely közötti funkcionális kapcsolatot bizonyítja. (I, II, IV)

6. Másodlagos kinon jelenlétében a késleltetett fluoreszcencia lassú és gyors komponenseinek amplitúdóarányából meghatároztam a második stabil töltéspár szabadenergiaszintjének pH-függését a gerjesztett dimér szintjéhez képest: -175 meV -ot változik pH 11 és 5 között, két inflexiós ponttal, a lúgos ill. a savas tartományban. Ezek az amplitúdóarányok kisebbek voltak, mint az abszorpcióváltozásnál kapott megfelelő amplitúdók arányai. (II, V, IV)

7. A szabadenergia pH-függése széles pH tartományban, különböző ionerősségeknél és kinonokkal is jól egyezik az integrált protonkötés alapján kapott eredményekkel, és azokkal a számításokkal, amelyek a szemikinin elektrosztatikus kölcsönhatását veszik figyelembe négy, egymástól független, protonálható csoporttal. (I, II, IV)

8. Az ionerősség növelésével nőtt a késleltetett fluoreszcencia intenzitása, míg a protonálható aminosavak flash előtti és utáni pK-értékei csökkentek, akárcsak fény-indukált ΔpK változásai. Ezt a reakciócentrum és a só között fellépő két meghatározó elektrosztatikus kölcsönhatással, a protonálható csoportok és a felületi töltések közötti

kötésekkel és az árnyékolással magyaráztam. (I, III)

9. A késleltetett fluoreszcencia hőmérsékletfüggéséből meghatároztam a töltésszétválasztásokhoz tartozó entalpia- és entrópiaváltozásokat: pH 8-nál $\Delta H_A = -820 \pm 40$ meV és $\Delta H_B = -920 \pm 60$ meV. Ez az eredmény bizonyítja, hogy a töltéssztabilizálódás nagymértékben az entalpiaváltozás által meghajtott folyamat, és a reakciócentrum-fehérje a töltéssztabilizáció során csak kis relaxációs mozgásokat végez. (I, II)

10. A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiáját befolyásolja a primér kinon szerkezete és redoxpotenciálja. A natív ubikinon-10 más kinonokkal (durokinonnal ill. menadionnal) való helyettesítése szignifikánsan megváltoztatta a töltéspár rekombinációjának sebességi állandóját, vagyis a töltéspár stabilizációjában jelentős szerepe van a primér kinon *in situ* szabadenergiájának. (IV, VI)

11. Empirikus összefüggést találtam a primér kinon *in situ* szabadenergiája (G_A^0) és a töltésszrekombináció sebességi állandója (k_{AP}) között, amely magas potenciálú kinonok (ilyen a natív kinon is) esetén jobb közelítést ad a Gunner-Dutton összefüggésnél, és lehetővé teszi a szabadenergia szintek egyszerű meghatározását a könnyen megmérhető rekombinációs időállandókból. (IV)

12. Meghatároztam a *Rb. capsulatus* vad típusú reakciócentruma első stabil töltéspárjának energiaszintjét a gerjesztett diméréhez képest: -920 ± 20 meV, pH 7 -nél. A $P^+Q_A^-$ állapot szabadenergiája vad típusú RC esetében pH 6 és 11 között 51 meV -ot változott, RQrev4A (félrevertáns) mutáns esetében pedig pH 7 és 11 között 60 meV -ot változott. A vad típusú RC entalpia változására -840 ± 40 meV -ot, míg a mutánsra -895 ± 40 meV -ot kaptam.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

- I. Turzó K., Laczkó G. and Maróti P.: Delayed fluorescence study on $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ charge separation energetics linked to protons and salt in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynth. Res., 55: 235-240, (1998).
- II. Turzó K., Laczkó G. and Maróti P.: Proton binding is part of protein relaxation of flash-excited reaction center from photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Israel Journal of Chemistry, Vol. 39, issues 3-4, 447-455 (1999).
- III. Kálmán L., Turzó K. and Maróti P.: Probing reaction center protonation by electrochromic absorption changes of cofactors in *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynthetica, 28 (2): 185-194 (1993).
- IV. Turzó K., Laczkó G., Filus Z. and Maróti P.: Quinone-dependent delayed fluorescence from reaction center of photosynthetic bacteria. Biophysical Journal, (a bíráló után; javított példány visszaküldve, 2000).
- V. Turzó K., Laczkó G., Filus Z. and Maróti P.: Comparison of energetics of $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ and $P^*Q_B \rightarrow P^+Q_B^-$ charge separation by detection of delayed fluorescence of the bacteriochlorophyll dimer in reaction centers of *Rb. Sphaeroides*. In "Photosynthesis: Mechanisms and Effects" (Ed: G. Garab), Vol. II, 834-840, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998).
- VI. Maróti P., Turzó K., Laczkó G. and Filus Z.: Quinone-dependent energetics of charge separated states of bacterial reaction center. Biophysical Journal, 78(1), 338A (2000).
- VII. Maróti P., Turzó K., Laczkó G. és Filus Z.: Fehérjék késleltetett fluoreszcenciája. In „A lumineszcencia kutatások aktuális kérdései”. Szerk.: Marek N. és Szabó K., Pécs, XXII. kötet, 35-54 oldal (1999).

8. SUMMARY

The reaction center (RC) of purple non-sulfur photosynthetic bacteria *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* is a membrane-bound pigment-protein complex that performs the initial steps of conversion of light energy to chemical energy (Okamura and Feher, 1995). Light absorption by the RC results in the formation of the excited singlet state (P^*) of the primary electron donor P (a bacteriochlorophyll dimer). A particular feature of this excited dimer is the ability to perform charge separation by transferring an electron from P^* to the primary quinone (Q_A) within 200 ps, via a bacteriochlorophyll monomer (Bchl) and a bacteriopheophytin (I). In the absence of the secondary quinone (Q_B), the $P^+Q_A^-$ charge separated state is stable for about 100 ms, the lifetime of the $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ charge recombination. The largest free energy change during the electron transport is associated with the reduction of Q_A accounting primarily for the 30-40% loss in photochemical energy conversion in the RC (Feher et al., 1989). If the secondary quinone is available, then the electron transfer will continue, forming the final $P^+Q_B^-$ charge separated state (in 3-200 μ s), which has a lifetime as large as one second at neutral pH (Fig. 2.4). H^+ -ions from the cytoplasmic side will be bound by protonatable groups of the RC to stabilize the anionic species of the quinones (Q_A^- and Q_B^- ; Maróti and Wraight, 1988a,b; McPherson et al., 1988), or directly by the secondary quinone to completely reduce Q_B to dihydroquinone (Q_BH_2) (McPherson et al., 1990b). The dihydroquinone is then exported from the RC and is replaced by an oxidized quinone from the pool (Fig. 2.3). The electron transfer in the RC of photosynthetic bacteria is unique amongst the electron transfer reactions in biological systems, as this charge separation is extraordinarily fast, stable and its quantum yield is very close to 100% (*i.e.* each photon absorbed by the dimer evokes electron transfer, Wraight and Clayton, 1973). The price for this high specificity and stability of the electron transfer is the relatively large free energy loss in the process: the final $P^+Q_B^-$ state conserves only about one third of the 1.38 eV photon energy in form of standard free energy relative to its ground state (PQ_B).

To understand the early steps of bacterial photosynthesis it is important to know the thermodynamic parameters (free energy, enthalpy and entropy change) of each transient states associated with the reduction of the primary and secondary quinone. These

thermodynamic parameters control the kinetics of the electron transfer and the energy yield of light utilization by the RC.

The energetics of electron transfer states can be monitored by the methods of redox titration, proton uptake and delayed fluorescence. The delayed fluorescence method has many distinct advantages over the first two: being a leakage type process, the delayed emission is an excellent probe of intraprotein electron transfer, as it only monitors but not influences the primary processes (it avoids the use of redox dyes), the free energy levels of the charge separated states relative to that of P^* can directly be determined from the intensity of the delayed fluorescence, the delayed fluorescence of the RC can reveal even slight changes in the thermodynamic parameters (e.g. due to protonation), unlike the redox titration it does take the interaction between P^+ and Q^- into account, this inherently kinetic method can, in principle, allow determination of transient changes in the free energy levels during the electron transport, and finally, a measurement takes as short time as several minutes. In spite of these favourable features, delayed fluorescence has not become a routine method of free energy determination in the millisecond time domain (contrary to that in the pico- and nanosecond ranges; see Ogrodnik et al., 1999 for a recent review) because of technical difficulties (Woodbury et al., 1986): the extremely weak light (with a quantum yield of approx. 10^{-9}) must be measured in the near infrared spectral region following an intense burst of prompt fluorescence emitted during the excitation flash that blinds the photodetector.

Our goal was to apply the powerful technique of delayed fluorescence in the millisecond time range where the states of the acceptor quinones have a major impact on the kinetics.

The delayed light from bacterial RC is emitted by the excited dimer (P^*). It has photochemical origin, resulting from the thermal repopulation of the excited singlet state of the dimer due to the reverse electron transfer from the charge separated (P^+Q^-) states (Arata and Parson, 1981). Its kinetics follows that of the charge recombination (McPherson et al., 1990a).

First we built an apparatus which is able to measure the delayed fluorescence in the millisecond time range following a laser excitation.

To explain the kinetics of the delayed light after a flash excitation and the difference between the prompt and delayed emission a model with two transient states have been provided and analyzed where part of the energy of the excited dimer can transiently be

stored in a single charge separated state (P^+Q^-). The results for this simple case were then generalized and utilized in a more complex system with several transient states like in the bacterial RC.

Three exponential components were observed in the millisecond time range: a fastest, a fast and a slow phase having lifetimes of 1.5 ms, 102 ms and 865 ms, respectively at pH=8.0. The quantum yields of the phases of the delayed fluorescence were about 5 orders of magnitude smaller than those of the prompt fluorescence: $6.4 \cdot 10^{-9}$, $2.2 \cdot 10^{-9}$, and $2.6 \cdot 10^{-9}$ (pH=8.0), respectively. While the latter two phases could be related to transient absorption changes, the fastest one, dominating when the primary quinone was pre-reduced, could not. The fastest component is probably due to a small fraction of long-lived triplet states of the radical pair and/or the dimer. The fast phase could be observed in the absence of secondary quinone activity and was sensitive to pH, temperature and the chemical nature of the primary quinone and it can be attributed to the decay of the $P^+Q_A^-$ state. The slow phase monitors the disappearance of the stabilized electron on the secondary quinone due to the indirect charge recombination with the oxidized dimer through Q_A^- .

The free energy levels of the primary and secondary charge separated states relative to that of the excited dimer were determined from the ratio of the amplitudes (or intensities) of the delayed and prompt fluorescence (Arata and Parson, 1981; Turzó et al., 1999). The standard free energy of the primary stable charge pair relative to that of the excited dimer at pH 8 was found to be -910 ± 20 meV with native ubiquinone as Q_A , in the absence of any secondary quinone, while in the presence of native secondary quinone -970 ± 20 meV was measured.

The standard free energy of $P^+Q_A^-$ showed a -65 meV decrease upon lowering the pH from 11.0 to 5.0 with a single characteristic inflection point in the alkaline pH range. The interaction energy of about 50 meV found between the primary semiquinone and the cluster of protonatable groups around Glu L212 in the vicinity of the secondary quinone provides evidence for a functional linkage between the two quinone binding pockets.

The ratio of the slow and fast components in the delayed fluorescence of quinone-reconstituted RCs was smaller than that in the transient absorption and could be used to determine the pH-dependence of the free energy level of the secondary stable charge pair. In RCs containing active secondary quinone a shift of -175 meV was found between pH 11.0 and 5.0 with two inflection points, one in the acidic and the other in the alkaline pH range.

The pH-dependences of the free energy levels of the primary and secondary charge separated states obtained from fluorescence data agreed well with that determined from the integrated proton uptake (a model-independent method) and with calculations based on interaction of quinones with four key amino acid residues in a wide pH range, at different ionic strengths and upon substitution of the native primary quinone (UQ-10) with different benzoquinones and naphthoquinones (DQ, MD).

Increase of the salt concentration elevated the intensity of delayed fluorescence, *i.e.* destabilized the $P^+Q_A^-$ state and decreased the pK values as well as the pK-change (ΔpK) of the protonatable groups. Just the opposite tendency was found during pH titration. This discrepancy and the dependence of energetics of $P^+Q_A^-$ on the concentration and composition of mobile ions were explained in terms of binding and screening of protonatable groups and surface charges as two dominant modes of electrostatic interaction between the RC and salts.

The enthalpy and entropy parts of the free energy changes associated with the two charge separation processes were determined from van't Hoff analysis of the delayed fluorescence: $\Delta H_A = -820 \pm 40$ meV and $\Delta H_B = -920 \pm 60$ meV, at pH 8.0. The observed entropy cost was low and accounted for not more than 5-10% of the free energy change. It was concluded that the charge stabilization in the RC protein (including proton binding) is a highly enthalpy-driven process and is accompanied by only minor relaxational movements.

The free energy of the primary charge separated state is influenced by the structure and the redox potential of the primary quinone. Upon replacement of the native quinone (ubiquinone-10) with other quinones (duroquinone and menadione) changes in the rate of charge recombination (k_{AP}) were found indicating the significant role of the *in situ* free energy of the primary quinone in the stabilization of the charge pair. The functional differences between the two quinones and between the native and substituted quinones at the Q_A binding site can largely be attributed to the differences in the standard free energy levels (ΔG°) of the quinones.

Based on the measurements of the free energy of the $P^+Q_A^-$ state with several high potential quinones at the Q_A binding pocket and the corresponding rates of direct recombination, an empirical relationship was found between the *in situ* free energy of the primary quinone and the rate of charge recombination (k_{AP}) using a simpler (linear) function

yet providing a better approximation for high potential quinones (like the native one) than the Gunner-Dutton relationship. This has a considerable practical importance in estimation of the free energy levels from the easily available lifetimes of the charge recombination.

The free energy level of the primary charge separated state was determined in RCs of *Rb. capsulatus* wild type (WT) from the ratio of the intensities of the delayed and prompt fluorescence: -920 ± 20 meV, at pH 7.0. The free energy level of the $P^+Q_A^-$ state changed by 51 meV between pH 6.0 and 11.0. In the half revertant mutant RQrev4A the corresponding free energy change was 60 meV between pH 7.0 és 11.0. From the van't Hoff analysis of the delayed fluorescence at pH 8.0 an enthalpy change of: -840 ± 40 meV and -895 ± 40 meV was determined for the WT and RQrev4A, respectively.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Adam, G., Läger, P. és Stark, G. (1988). *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer-Verlag, Berlin, 275-277.
- Alexov, E.G. és Gunner, M.R. (1997). *Biophys. J.* 74: 2075-2093.
- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H. és Rees, D.C. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8487-8491.
- Allen, J.P., Williams, J.C., Graige, M.S., Paddock, M.L., Labahn, A., Feher, G. és Okamura, M.Y. (1998). *Photosynth. Res.* 55: 227-233.
- Arata, H. és Parson, W.W. (1981a). *Biochim. Biophys. Acta*, 638: 201-209.
- Arata, H. és Parson, W.W. (1981b). *Biochim. Biophys. Acta*, 636: 70-81.
- Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H és Zinth, W. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11757-11761.
- Arnold, W. és Thompson, J. (1955). *J. Gen. Physiol.*, 39: 311.
- Beroza, P., Fredkin, D.R., Okamura, M.Y. és Feher G. (1995). *Biophys. J.*, 68: 2233-2250.
- Breton, J., Thibodeau, D.L., Berthomieu, C. Mantele, W., Vermeglio, A és Navedryk, E. (1991). *FEBS Lett.*, 278: 257-260.
- Brumfeld, V., Nagy, L., Kiss, V. és Malkin, S. (1999). *Photochemistry and Photobiology*, 70 (4): 607-615.
- Carithers, R.P. és Parson, W.W. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, 387: 194-211.
- Chang, C.H., El-Kabbani, O., Tiede, D., Norris, J. és Schiffer, M. (1991). *Biochemistry*, 30: 5352-5360.
- Clayton, R.K. (1965). *J. Gen. Physiol.*, 48: 633.
- Clayton, R.K. és Bertsch, W. F. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18: 415.
- Clayton, R.K. és Wang, R.T. (1971). *Methods in Enzymology*, 23: 696-704.
- Clayton, R.K. (1980). *Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Cohen-Bazire, G., Siström, W.R. és Stanier, R.Y. (1957). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49: 25-68.

- Collins, K.D. és Washabaugh, M.W. (1985). *Q. Rev. Biophys.* 18(4): 323-422.
- Corazza, A., Melandri, B.A., Venturoli, G. és Casadio, R. (1992). *Electrified Interfaces in Physics, Chemistry and Biology*, (ed.: Guidelli, R.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 509-532.
- Crofts, A.R. és Wraight, C.A. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, 726: 149-185.
- Debus, R.J., Feher, G. és Okamura, M.Y. (1985). *Biochemistry*, 24: 2488-2500.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, R., Huber, R. és Michel, H. (1985). *Nature*, 318: 618-624.
- Deisenhofer, J. és Michel, H. (1989). *EMBO J.*, 8: 2149-2169.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I. és Michel, H. (1995). *J. Mol. Biol.*, 246: 429-457.
- Du, M.S., Rosenthal, J., Xie, X., DiMagno, T.J., Schmidt, M., Hanson, D.K., Schiffer, M., Norris, J.R. és Fleming, G.R. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8517-8521.
- Duysens, L.N.M. (1952). Ph.D. Thesis, Univ. Utrecht.
- Edens, G.J., Gunner, M.R., Xu, Q. és Mauzerall, D. (1999). *J. Am. Chem. Soc.*,
- Emerson, R. és Arnold, W. (1932). *J. Gen. Physiol.*, 16: 191-205.
- Ermler, U., Fritsch, G., Buchanan, S.K. és Michel, H. (1994). *Structure*, 2: 925-936.
- Feher, G. (1971). *Photochem. Photobiol.*, 14: 373-387.
- Feher, G., Arno, T.R. és Okamura, M.Y. (1988). *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center* (eds.: Breton, J. és Vermeglio). Plenum Press, New York, 271-287.
- Feher, G., Allen, J.P., Okamura, M.Y. és Rees, D.C. (1989). *Nature*, 339: 111-116.
- Fleischman, D.E. (1974). *Photochem. Photobiol.*, 19: 59-68.
- Foloppe, N., Ferrand, M., Breton, J. és Smith, J.C. (1995). *Proteins: Structure, function and genetics*, 22: 226-244.
- Franzen, S. és Boxer, S.G. (1993). *J. Phys. Chem.*, 97: 6304-6318.
- Franzen, S., Goldstein, R.F. és Boxer, S.G. (1993). *J. Phys. Chem.*, 97: 3040-3053.
- Graige, M.S., Paddock, M.L., Bruce, J.M., Feher, G. és Okamura, M.Y. (1996). *J.*

Am. Chem. Soc., 118: 9005-9016.

Gunner, M.R. (1991). *Current Topics in Bioenergetics*, 16: 319-367.

Gunner, M.R., Robertson, D.E. és Dutton, P.L. (1986). *J. Phys. Chem.*, 90: 3783-3795.

Gunner, M.R. és Dutton, P.L. (1989). *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 3400-3412.

Hanson, D.K. és Schiffer, M. (1998). *Photosynth. Res.*, 55: 275-280.

Hörber, J.K.H, Gobel, W., Ogrodnik, A., Michel-Beyerle, M.E. és Cogdell, R.J. (1986). *FEBS Lett.*, 165: 107-110.

Kálmán, L., Turzó, K. és Maróti, P. (1993). *Photosynthetica*, 28 (2): 185-194.

Kálmán, L. és Maróti, P. (1994). *Biochemistry*, 33: 9237-9244.

Kálmán, L. és Maróti, P. (1997). *Biochemistry*, 36: 15269-15276.

Kálmán, L., Sebban, P., Hanson, D.K., Schiffer, M. és Maróti, P. (1998). *Biochim. Biophys. Acta*, 1365: 513-521.

Kirmaier, C. és Holten, D. (1987). *Photosynthesis Res.* 13: 225-260.

Kirmaier, C. és Holten, D. (1991). *Biochemistry*, 30: 609-613.

Kleinfeld, D., Okamura, M.Y. és Feher, G. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, 766: 126-140.

Komiya, H., Yeates, T.O., Rees, D.C., Allen, J.P. és Feher, G. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9012-9016.

Labahn, A., Paddock, M.L., McPherson, P.H., Okamura, M.Y. és Feher, G. (1994). *J. Phys. Chem.*, 98: 3417-3423.

Lancaster, C.R.D., Ermler, U. és Michel, H. (1995). *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (eds.: Blankenship, R.E., Madigan, M.T. és Bauer, C.E.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 503-526.

Lancaster, C.R.D., Michel, H, Honig, B. és Gunner, M.R. (1996). *Biophys. J.* 70: 2469-2492.

Lin, X., Murchison, H.A., Nagarajan, V., Parson, W.W., Allen, J.P. és Williams, J.C. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10265-10269.

Liu, B.L., Yang, L.H. és Hoff, A. (1991). *Photosynth. Res.*, 28: 51-58.

Lubitz, W., Abresch, E.C., Debus, R.J., Isaacson, R.A., Okamura, M.Y és Feher, G.

- (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, 808: 464-469.
- Malkin, S. (1977). Delayed Luminescence. In "Primary Processes of Photosynthesis" (ed.: Barber, J.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 349-431.
- Malkin, S., Churio, M.S., Shochat, S. és Braslavsky, S.E. (1994). *J. Photochem. Photobiol.*, 23B: 79-85.
- Mancino, L.J., Dean, D.P. és Blankenship, R.E. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, 764: 46-54.
- Marcus, R.A. és Sutin, N. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, 811: 265-322.
- Maróti, P. és Wraight, C.A. (1988a). *Biochim. Biophys. Acta*, 934: 314-328.
- Maróti, P. és Wraight, C.A. (1988b). *Biochim. Biophys. Acta*, 934: 329-347.
- Maróti, P. és Tandori, J. (1993). *Fizikai Szemle*, 8: 311-317.
- Maróti, P., Hanson, D.K., Schiffer, M. és Sebban, P. (1995). *Nature-Structural Biology* 2, 12: 1057-1059.
- Maróti, P. és Wraight, C.A. (1997). *Biophys. J.*, 73: 367-381.
- Mauzerall, D., Gunner, M.R. és Zhang, J.W. (1995). *Biophys. J.*, 68: 275-280.
- McComb, J.C., Stein, R.R. és Wraight, C.A. (1990). *Biochim. Biophys. Acta*, 1015: 156-171.
- McPherson, P.H., Okamura, M.Y. és Feher, G. (1988). *Biochim. Biophys. Acta*, 934: 348-368.
- McPherson, P.H., Nagarajan, V., Parson, W.W., Okamura, M.Y. és Feher, G. (1990a). *Biochim. Biophys. Acta*, 1019: 91-94.
- McPherson, P.H., Okamura, M.Y. és Feher, G. (1990b). *Biochim. Biophys. Acta*, 1016: 289-292.
- McPherson, P.H., Okamura, M.Y. és Feher, G. (1993). *Biochim. Biophys. Acta*, 1144: 309-324.
- Michel, H. (1982). *J. Mol. Biol.*, 158: 567-572.
- Michel, H., Weyer, K.A., Gruenberg, H., Dunger, I., Oesterhelt, D. és Lottspeich, F. (1986). *EMBO J*, 5: 1149-1158.
- Michel-Beyerle, M.E., Plato, M., Deisenhofer, J., Michel, H., Bixon, M. és Jortner, J. (1988). *Biochim. Biophys. Acta*, 932: 52-70.

- Miksovská, J., Maróti, P., Tandori, J., Schiffer, M., Hanson, D.K. és Sebban, P. (1996). *Biochemistry*, 35: 15411-15417.
- Mitchell, P. (1966). *Biol. Rev.* 41: 445-502.
- Nabedryk, E., Bagley, K.A., Thibodeau, D.L., Bauscher, M., Mantele, W. és Breton, J. (1990). *FEBS Lett.*, 266: 59-62.
- Nabedryk, E., Breton, J., Okamura, M.Y. és Paddock, M.L. (1998) *Biochemistry*, 37: 14457-14462.
- Nagy, L., Puskás, Á., Tandori, J., Droppa, M. és Horváth, G. (1991). *Photosynthetica*, 25: 167-171.
- Nowak, F.R., Kennis, J.T.M., Franken, E.M., Shkuropatov, A.Ya., Yakovlev, A., Gast, P., Hoff, A.J., Aartsma, T.J. és Shuvalov, V.A. (1998). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (ed.: Garab, G.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 2.: 783-786.
- Ogrodnik, A., Kruger, H.W., Orthuber, H., Haberkorn, R., Michel-Beyerle, M.E. és Scheer, H. (1982). *Biophys. J.*, 39: 91-99.
- Ogrodnik, A., Hartwich, G., Lossau, H. és Michel-Beyerle, M.E. (1999). *Chemical Physics*, 244: 461-478.
- Okamura, M.Y., Isaacson, R.A. és Feher, G. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 3491-3495.
- Okamura, M.Y. és Feher, G. (1992). *Annu. Rev. Biochem.*, 61: 861-896.
- Okamura, M.Y. és Feher, G. (1995). *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (eds.: Blankenship, R.E., Madigan, M.T. és Bauer, C.E.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 577-594.
- Osváth, Sz. és Maróti, P. (1997). *Biophysical Journal*, 73: 972-982.
- Paddock, M.L., Feher, G. és Okamura, M.Y. (1995). *Biochemistry*, 34: 15742-15750.
- Parson, W.W. (1987). *The Bacterial Reaction Center*. In: *Photosynthesis* (ed. Ames, J.), Elsevier, Amsterdam, 43-61.
- Peloquin, J.M., Williams, J.C., Lin, X., Alden, R.G., Murchison, H.A., Taguchi, A.K.W., Allen, J.P. és Woodbury, N.W. (1994). *Biochemistry*, 33: 8089-8100.
- Puchanov, O.V., Kopf, Z. és Malkin, S. (1995). *Biochim. Biophys. Acta*, 1231: 197-212.
- Rabenstein, B., Ullman, G.M. és Knapp, E.W. (1998). *Biochemistry*, 37: 2488-2495.

- Rutherford, A.W. és Evans, M.C.W. (1980). *FEBS Lett.*, 110: 257-261.
- Schelvis, J.P.M., Liu, B.L., Aartsma, T.J. és Hoff, A.J. (1992). *Biochim. Biophys. Acta*, 1102: 229-236.
- Schenck, C.C., Blankenship, R.E. és Parson, W.W. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, 680: 44-59.
- Schmid, R. és Labahn, A. (1998). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (ed.: Garab, G.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol.2, 877- 880.
- Schmidt, S., Arlt, T., Hamm, P., Huber, H., Nagele, T., Wachtveitl, J., Meyer, M., Scheer, H. és Zinth, W. (1994). *Chem. Phys. Lett.* 223: 116-120.
- Sebban, P., Maróti, P., Schiffer, M. és Hanson, D.K. (1995). *Biochemistry*, 34: 8390-8397.
- Shinkarev, V.P., Takahashi, E. és Wraight, C.A. (1992). *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center* (eds: Breton, J. és Verméglio, A.), Plenum Press, New York, Vol.II.: 375-387.
- Shinkarev, V.P. és Wraight, C.A. (1993). *The Photosynthetic Reaction Center* (eds: Deisenhofer, J. és Norris, J.) Academic Press, San Diego, Vol.I.: 193-255.
- Shinkarev, V.P., Drachev, L.A., Mamedov, M.D., Mulkidjanian, A. J., Semenov, A. Yu. és Verkhovsky, M.J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, 1144: 285-294.
- Straley, S.C., Parson, W.W., Mauzerall, D.C. és Clayton, R.K. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, 305: 597-609.
- Strehler, B.L. és Arnold, W. (1951). *J. Gen. Physiol.*, 34: 809.
- Strickler, S.J. és Berg, R.A. (1962). *J. Chem. Phys.* 37: 814-822.
- Takahashi, E. és Wraight, C.A. (1994). *Advances in Molecular and Cell Biology*, JAI Press Inc., Vol. 10: 197-251.
- Tiede, D.M., Vázquez, J., Córdova, J. és Marone, P.A. (1996). *Biochemistry*, 35: 10763-10775.
- Tiede, D., Utschig, L., Thurnauer, M., Zhang, R. és Thiyagarajan, P. (1997). *ESF Workshop*, Cadarache, France.
- Turzó, K., Laczkó, G. és Maróti, P. (1998). *Photosynth. Res.*, 55: 235-240.
- Turzó, K., Laczkó, G. és Maróti, P. (1999). *Isr. J. Chem.*, Vol. 39, issues 3-4: 447-455.
- Turzó, K., Laczkó, G., Filus, Z. és Maróti, P. (2000). *Biophys. J.* (a bíráló után;

javított példány visszaküldve).

- Yeates, T.O., Komiya, H., Chirino, A., Rees, D.C., Allen, J.P. és Feher, G. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7993-7997.
- Venturoli, G., Corazza, A., Casadio, R. és Melandri, B.A. (1994). Biothermokinetics, (ed.: Westerhoff, H.V.), Intercept Ltd., Andover, UK, 337-344.
- Volk, M., Ogorodnik, A. és Michel-Beyerle, M.E. (1995). Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (eds.: Blankenship, R.E., Madigan, M.T. és Bauer, C.E.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 596-626.
- Williams, J.C., Steiner, L.A., Feher, G. és Sinnen M.I. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7303-7307.
- Williams, J.C., Steiner, L.A. és Feher, G. (1986). Proteins, 1: 312-325.
- Woodbury, N.W. és Parson, W.W. (1984). Biochim. Biophys. Acta, 767: 345-361.
- Woodbury, N.W., Becker, M., Middendorf, D. és Parson, W.W. (1985). Biochemistry, 24: 7516-7521.
- Woodbury, N.W., Parson, W.W., Gunner, M.R., Prince, R.C. és Dutton, P.L. (1986). Biochim. Biophys. Acta, 851: 6-22.
- Woodbury, N.W., Peloquin, J.M., Alden, R.G., Lin, X., Lin, S., Taguchi, A.K.W., Williams, J.C. és Allen, J.P. (1994). Biochemistry, 33: 8101-8112.
- Woodbury, N.W. és Allen, J.P. (1995). Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (eds.: Blankenship, R.E., Madigan, M.T. és Bauer, C.E.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 527-557.
- Wraight, C.A. és Clayton, R.K. (1973). Biochim. Biophys. Acta, 333: 246-260.
- Wraight, C.A. (1979). Biochim. Biophys. Acta, 548: 309-327.
- Wraight, C.A. és Stein, R.R. (1983). The Oxygen Evolving System of Photosynthesis, (eds.: Inoue, Y., Crofts, A.R., Govindjee, Murata, N., Renger, G. és Satoh, K.). Academic Press Inc., Tokyo, Orlando, San Diego, 383-392.
- Wraight, C.A. (1998). Photosynthesis: Mechanisms and Effects, (ed.: Garab, G.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol.2: 693-698.
- Zankel, K.L., Reed, D.W. és Clayton, R.K. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61: 1243-1249.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Maróti Péter egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, amiért lehetővé tette számomra, hogy a JATE Biofizikai Tanszékén dolgozhassak, és bevezetett a bakteriális fotoszintézis érdekes tárgykörébe. Köszönöm a kutatási éveim alatt nyújtott szakmai segítségét és azt, hogy biztosította a késleltetett fluoreszcencia módszerének tanszéki meghonosításához szükséges anyagi háttérét.

Szeretném megköszönni tanszéki munkatársamnak, Dr. Kálmán Lászlónak mindazt, amit közös munkáink során tőle tanultam. Hálás vagyok Dr. Nagy Lászlónak, a reakciócentrum preparálása során nyújtott segítségével és Dr. Tandori Júliának első „kutató-lépéseim” során nyújtott támogatásáért. Köszönettel tartozom közvetlen munkatársamnak, Filus Zoltánnak, hogy a közösen végzett kísérletek során felmerülő bármely szakmai kérdést megbeszélhettem vele, Rinyu Lászlónak pedig a szerkezeti ábrákért. Köszönöm a Biofizikai Tanszék minden volt és jelenlegi dolgozójának, hogy kellemes légkörben dolgozhattam. Hálás vagyok Dunai Péternének, aki mindig készségesen segített adminisztrációs és egyéb ügyeim intézésében.

Köszönettel tartozom Dr. Pierre Sebbannak, hogy kutatásaim tárgyának körét kibővíthettem a *Rb. capsulatus* baktérium mutánsaival.

A legtöbbet férjemnek, Dr. Laczkó Gábornak köszönhetem, akitől nagyon sokat tanultam mind a kutatómunka, mind pedig az oktatás területén. Hálás vagyok a mérőberendezés felépítésében, és a kísérletek során felmerülő szakmai kérdések tisztázásában nyújtott önzetlen és hozzáértő segítségével. Munkám során mindvégig mellettem állt emberileg is, belém vetett bizalma nélkül talán nem lennék itt. Nem feledkezhetek meg arról sem, hogy sok esetben magára vállalta a család gondjainak megoldását, és ha kellett, átvette a családjának szerepét is.

Köszönöm fiaimnak, hogy megértéssel és türelemmel fogadták napi 8 óra alatt el nem végezhető munkámat és alkalmazkodtak a munkám jellegéből fakadó rapszódikus életformámhoz.

Végül, de nem utolsó sorban hálás vagyok Szüleimnek, hogy egész életem során támogatták a tanulásomat.