

Ph.D. disszertáció tézisei

A BAKTERIÁLIS REAKCIÓCENTRUM-FEHÉRJE
PROTONFELVÉTELE

Kálmán László

Témavezető: Dr. Maróti Péter, egyetemi tanár

József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszék

Szeged, 1997



A fotoszintetizáló organizmusok (baktériumok, algák, magasabb rendű zöld növények) fényenergiát alakítanak át kémiai energiává, amely közvetlenül alkalmas életfolyamataik energiaigényének fedezésére, illetve energia raktározására. A fotoszintetikus folyamatok legáltalánosabban két fő csoportra oszthatók: fényreakciókra és sötétreakciókra. A fényreakciókban a sötétreakciók energiaforrásai képződnek (ATP és redukált koenzimek), amelyek lehetővé teszik, hogy a különböző biokémiai anyagcsere-folyamatok (sötétreakciók) láncolatán keresztül a szén-dioxid asszimilálódjék. A fényreakciók a foton abszorpcióját követően fehérjébe ágyazott, speciálisan orientált pigmentek (redox centrumok) közreműködésével mennek végbe. A zöld növényekben, ahol a fotoszintézis az eddig ismert legmagasabb szinten valósul meg, a fényreakciók során NADPH és ATP termelődik. Ezen folyamatban két egymástól jól elkülöníthető fotokémiai rendszer (PSI és PSII) vesz részt. A PSII-höz kapcsolódó komplex egyedülálló módon képes a víz fényindukált elbontására protonokká és molekuláris oxigénné, miközben redukáló ekvivalensek láncolatán keresztül az energia egy része proton elektrokémiai potenciál formájában raktározódik. Ez a potenciál az ATP szintézisének energiaforrásául szolgál. Az energia másik hányada átkerül a PSI-re, ahol újabb foton abszorpciója révén válik a folyamat teljessé a NADP redukcióját eredményezve.

Baktériumokban a fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai lényegesen egyszerűbbek, mint zöld növényekben. Amíg a zöld növényekben két fotokémiai reakció működik, addig baktériumokban csak egy van. A zöld növények lineáris elektrontranszportláncával szemben a baktériumoké ciklikus, melynek során a reakciócentrumban keletkezett töltéspár rekombinálódik. A reakció szabadentalpia-változása proton gradienissé alakul át, amelyet felépítő vektoriális (a membrán citoplazmikus oldaláról a periplazmikus oldal felé mutató) protonelmozdulás a reakciócentrum protonfelvételének eredménye. A

protonpumpa-mechanizmust a reakciócentrumhoz kapcsolódó citokróm bc_1 komplex teszi teljessé (protonmozgató kinon ciklus). Mivel a protonfelvétel és az elektrontranszfer több helyen is csatlakoznak és csak kölcsönhatásuk biztosíthatja a reakciócentrum normális működését, a protonálódási folyamatok mindig is foglalkoztatták a kutatókat. Megfelelő vizsgálati módszer hiányában azonban, korábban a bakteriális reakciócentrum protonfelvételére csak az elektrontranszfer paramétereiből, indirekt módon következtethettek. Csak az elmúlt évtizedben kerültek a figyelem középpontjába a közvetlen (a protonkötés mérésén alapuló) protonálódási vizsgálatok. Teljesen érthető módon az érdeklődés a reakciócentrum másodlagos kinon(Q_B)-kötőhelyének (Q_B környéki aminosavak protonálódása, kinolképződés/leválás) tanulmányozására koncentrált. Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy az elektrontranszfer egymásutáni folyamatai közül az elsődleges kinon (Q_A) redukciója szolgáltatja a legnagyobb szabadentalpia-csökkenést, vagyis ez a lépés teszi visszafordíthatatlanná fiziológias körülmények között a töltésszétválasztást. A primer töltéspár stabilizálódásának fontos eleme a Q_A^- elektrosztatikus vonzáskörzetében található protonálható aminosavak protonfelvétele. A reakciócentrum-fehérje ugyanis nem passzív alanya a fénygerjesztés hatására előálló folyamatainak, hanem aktívan elősegíti azok lejátékosítását. Az elsődleges kinon redukciójához köthető protonálódás két további szempontból is kiemelt jelentőségű:

- A primer kinon az erősen hidrofób környezete révén nem képes kétszeresen redukálódni, így önmaga nem is protonálódik.
- A Q_A -tól viszonylag nagy (1,2 nm) távolságon belül nem található protonálható oldallánccal rendelkező aminosav. A megfigyelhető protonfelvétel tehát, nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások eredménye.

A nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások ellenére a Q_B redukciója sem eredményez lényegesen nagyobb protonfelvételt, holott annak környezete többszörösen gazdagabb protonálható aminosavakban. Felmerül a kérdés, hogy a fehérje fényindukált

protonfelvételében részt vevő csoportok száma kinetikai (a vizsgált időtartomány rövidege miatt) vagy hozzáférhetőségi (a fehérje hidrofób részébe eltemetett csoportok) okok miatt korlátozott.

CÉLKITŰZÉSEK

Célom az volt, hogy az elsődleges szemikinin létrejöttéhez kapcsolódó protonációt közvetett (a környező kofaktorok elektrokróm abszorpcióváltozásainak, a töltésrekombináció kinetikájának mérése) és közvetlen (a fénygerjesztés hatására, valamint sötétben bekövetkező protonkötés meghatározása) módszerekkel tanulmányozzam. A következő kérdések megválaszolását tekintettem feladatomnak:

Az elektrokróm abszorpcióváltozások detektálásakor:

- Hogyan hat a pH a kofaktorok közötti elektrosztatikus kölcsönhatás mértéke a fehérjekörnyezet megváltozott protonációs állapotán keresztül?

A primer szemikinin stabilitásának vizsgálatakor:

- Hogyan befolyásolja a natív kinont helyettesítő kinon szerkezete és középponti redoxpotenciálja a fényindukált protonkötés mértékét?
- Milyen kapcsolat van az elektrontranszfer és a protonkötés jellemzői között?
- Melyek lehetnek a szemikinnel kölcsönható protonálható aminosavak?
- Alacsony redoxpotenciálú kinon esetén befolyásolhatja-e a protonkötés a redukált bakteriofeofitin stabilizálódását?

A reakciócentrum sötétben végzett sav-bázis titrálásakor:

- A reakciócentrum 166 protonálódó csoportja közül mennyi vesz részt ténylegesen protonációs egyensúlyok kialakításában?

Baktériumtörzsek

Vizsgálataimat natív (*Rb. sphaeroides* és *Rb. capsulatus*) és az elsődleges kinon kötőhelyén különböző kinonokat tartalmazó (*Rb. sphaeroides*) reakciócentrumok felhasználásával végeztem. A natív kinon helyettesítésére a következő kinonszármazékokat használtam: durokinon (DQ), 1,4-naftokinon (1,4-NQ), 2-metil-1,4-naftokinon (menadion, MD), antrakinon (AQ) és 1-klór-antrakinon (1-Cl-AQ).

A fotoszintetikus reakciócentrum izolálása

Általánosan használt fehérjetisztítási módszerek: sejtek feltörése hidraulikus présrel (French press), ultracentrifugálás, membránfragmentum feltárása ionos detergenssel, kizózás (ammónium-szulfátos precipitálás), ioncserés kromatográfia, ultraszűrés.

Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Spektroszkópia és potenciometria. A fotoszintetikus reakciócentrumok fényfelvillanással létrehozott abszorpcióváltozását a vizsgált pigmentre jellemző hullámhosszakon házi építésű egysugaras kinetikai abszorpcióváltozás-mérővel mértem. A primer donor abszorpcióváltozásának 430 nm-nél történő mérése alkalmas a töltésrekombináció nyomonkövetésére. Külső donor jelenlétében 450 nm-nél a szemikinon redukciója figyelhető meg. A protonfelvételt pH-érzékeny festékek abszorpcióváltozásának 585 nm körüli detektálásával és/vagy potenciometrikusan pH elektród alkalmazásával határoztam meg. A sav-bázis titrálásokat automata titráló berendezéssel hajtottuk végre. A pufferkapacitásokat ($-dH^+/dpH$) vagy közvetlen méréssel, vagy a titrálási görbék pH szerinti differenciálásával határoztam meg.

A kromofórok elektrokróm abszorpcióváltozásai

A Q_A^-/Q_A különbségi abszorpciós spektrum lényegesen nagyobb elektrokróm jelet mutatott a Bfeo sávjában, mint a Q_B^-/Q_B , hiszen a Q_A a Bfeo_A közvetlen szomszédságában helyezkedik el (távolságuk 0,14 nm), míg a Q_B mintegy 0,3 nm távolságra van a Bfeo_A-tól. Így a Bfeo sáv lényegesen érzékenyebb indikátora a Q_A redoxállapotainak. A 748 nm környezetében megjelenő völgy pozícióját az oldat pH-jának változása (pH 6 → pH 11) jelentősen (mintegy 10 nm-rel) eltolta a spektrum vörös tartománya felé. Az eltolódásból Q_A^- -nak egy protonálható csoporttal ($pK = 9,4$) kialakított erős elektrosztatikus kölcsönhatását valószínűsítettem. A szintén 748 nm-nél a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció kezdeti fázisaként mért, mintegy 150 μs időállandóval jellemzett komponenst a fehérje protonációjának és/vagy a töltésszétválasztást követő, a fehérjében bekövetkező töltésátrendeződésnek tulajdonítottam. Ha az elektronátadást a Q_B -re inhibitorral gátoljuk, akkor a Q_B^- által létrehozott elektrokróm jelet kiküszöbölhetjük. Ekkor is megfigyeltem ezen komponens jelenlétét, ezért kizártam, hogy a kinonok közötti elektrontranszfer hozná létre. Ezt a feltételezést jól alátámasztják más szerzők eredményei is, amelyekben a Q_A^- által okozott protonfelvétel sebességét spektrofotometriás és konduktometriás módszerrel ugyancsak 100 μs körülire mérték, vagy a fény-indukált elektrogén jel detektálásával határoztak meg egy 200 μs élettartamú komponenst, amelyet a fehérje-relaxáció kinetikájának tulajdonítottak. A primer donor 865 nm-nél jelentkező sávja magas pH-n 4 nm-rel eltolódott a spektrum kisebb hullámhosszú tartománya felé, amelyből a környező magas pK-jú csoportok deprotonációjára következtettem. Az eltolódás csekély mértéke miatt nem vállalkoztam pK érték(ek) meghatározására, már csak azért sem, mert ezek a protonok nem feltétlenül hozhatók összefüggésbe az elektrontranszferrel. Inkább valószínű, hogy a csoportok sötétbeli deprotonációja kismértékben perturbálja a primer donor fehérjekörnyezetét és ez okozza a sáv eltolódását.

A Q_A^- stabilizálódása a fehérje protonfelvétele révén

Az aminosavak töltése a fehérjében többféleképpen is módosíthatja a Q_A^-/Q_A redox pár középponti redoxpotenciálját. A könnyen polarizálható és a pozitív töltésű aminosavak csökkenthetik a szemikinin energiaszintjét. A RC-ban azonban nincs ilyen csoport a Q_A gyűrűjének középpontjától számított 1,2 nm távolságon belül. A karboxil csoportokon megjelenő negatív töltés pedig megemelheti a Q_A^- energiaszintjét. Alacsony pH értékeknél azonban, ahol ezek a karboxilátok protonálódnak, stabilizálják a szemikinit. A savas karakterű aszparaginsav és glutaminsav molekulák száma igen magas a H alegységben (éppen annyi, mint az L és az M alegységben együttesen (29), ahonnan a protonok érkezhetnek a kinon környezetébe. A szerkezeti adatok alapján tehát a szemikinin stabilizálódását az aminosav oldalláncok elősegíthetik. A stabilizáció standard szabadentalpia-változását ennek megfelelően a protonkötés adatainak integrálásával határozhatjuk meg.

Alacsony redoxpotenciálú kinonok a Q_A kötőhelyen. Az antrakinnal helyreállított RC esetében a stabilizáció szabadentalpia-változását (ΔG_H°) két módszerrel is meghatározhattam, mivel a primer töltéspár rekombinációjának termikus aktiválást igénylő gyors fázisa is pH-függő módon változott. A protonkötés és a töltésrekombináció adatainak felhasználásával számított szabadentalpia-változásokat összevetve az erősen bázikus tartományban, ahol a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció főként az indirekt úton keresztül játszódik le jó egyezést kaptam a két módszerrel meghatározott értékekre. Alacsonyabb pH-n viszont, egyre nagyobb a direkt út részesedése, ezért a töltésrekombináció adataiból kisebb mértékű stabilizáció adódik.

Magas redoxpotenciálú kinonok a Q_A kötőhelyen. Ezeket a kinonokat tartalmazó RC-okban a stabilizáció szabadentalpia-változását a protonkötés adataiból határoztam meg. A pH = 5,0-nél (a szemikinnal kölcsönható csoportok döntő hányada protonált) meghatározott ΔG_H° értékek széles határok között változtak. A legstabilabbnak (-101 meV) a UQ_{10} -zel visszaállított Q_A aktivitású RC bizonyult, míg a legkevésbé stabilnak

a MD-t (-49 meV) tartalmazó RC-ot találtam. Valamennyi kinonra a görbék átlagos meredeksége mintegy -20 meV/pH-nak adódott, ami mintegy 0,33 H⁺/e⁻ sztöchiometriájú protonfelvételnek felel meg. A protonálódó csoportok, egy magas pK-jú aminosavat kivéve, valamennyi szemikinnal többé-kevésbé azonos elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki.

A protonkötés hatása a P⁺Bfe⁰- állapot energiaszintjére. Energetikai paraméterek felhasználásával kiszámítottam a pK_{Bfe⁰}-értékét (9,6), ami jól egyezik a magas pK-jú csoport sötétbeli pK-jával (9,65). Ez azt jelenti, hogy energetikai megfontolások alapján nem jöhet létre protonáció a Bfe⁰ és a magas pK-jú csoport közötti elhanyagolható elektrosztatikus kölcsönhatás miatt. A mért szabadentalpia-változás tehát kizárólag a Q_A⁻ energetikai stabilizálódásának tulajdonítható.

A szemikinin és környezete a RC-ban. Bár a Q_A eltávolítása érdekében a magas detergenskoncentráció alkalmazásával felnyitott RC az új kinon beépülésével reverzibilisen visszazáródik, az eltérő tégigényű, redoxpotenciálú és hirofóbb sajátságokkal rendelkező szemikinin megváltoztathatja a fehérje lokális szerkezetét. Ez a változás tükröződhet a szemikinin stabilitásában. A fehérjekörnyezetnek a kinonra gyakorolt hatását jól érzékelteti a kinonok középponti redoxpotenciáljainak *in situ* és szerves oldószerben (Dimetil-formamid) mért különbsége. A különbség bár jelentős (730 mV DQ-ra, 530-580 mV a többi kinonra), mégsem található összefüggés az eltolódás mértéke és a szemikinin fehérjebeli viselkedése között. A kinonok geometriai méretének (gyűrűinek száma) különbözősége kismértékű eltérést eredményezett a protonfelvétel mértékében, amely valószínűleg két ellentétes hatás kioltása miatt adódott: a növekvő gyűrűszám torzíthatja ugyan a struktúrát, ugyanakkor a protonálható csoportok és a szemikinin távolsága csökkenhet, éppen a nagyobb tégigény miatt fellépő "gyűrűdések" révén, erősebb elektrosztatikai kölcsönhatást kialakítva a szemikinin és a csoportok között. Az elektron delokalizációjának mértéke a kinoidális rendszerben jól tükröződik a szemikininok pK értékeiben. A szemikinin pK-ja szoros összefüggésben van a

szubsztituenseknek a telítetlen gyűrűre gyakorolt elektron küldő (+ mezomer hatás), vagy elektron szívó (– mezomer hatás) tulajdonságaival, vagyis a gyűrű elektron-sűrűségével. Minél alacsonyabb a pK, annál kisebb a gyűrű elektronsűrűsége. A legkisebb pK-val az 1,4-NQ rendelkezik (4,1), valamivel magasabbal a MD (4,5) a metil csoport + mezomer hatása miatt, míg a többi szemikinnak magasabb a pK-ja (5,1 - 5,9). Ezen utóbbi csoportban felfedezett kisebb különbségek csak a közelebbi csoportokkal való kölcsönhatásban tükröződnek, de nem hatnak specifikusan a távolabbi csoportokra. Ez a megfigyelés jól egyezik a magas pH-n megfigyelt protonkötés mértékével. MD és 1,4-NQ lényegesen gyengébb kölcsönhatást alakított ki a Q_A kötőhelyhez közeli elhelyezkedésű csoporttal, mint az összes többi kinon. A pH tartomány nagy részében viszont (5 < pH < 8,5), a távoli csoportok határozzák meg a protonkötés mértékét, ezek azonban nem érzékenyek a gyűrű elektronsűrűségére, így nem érzékenyek az alkalmazott kinonra.

Az alkalmazott kinonok hidrofób sajátsága és a protonkötés révén létrejött stabilizáció mértéke között is megfigyelhetők törvényszerűségek. A kinonok hidrofób jellege a következő sorrendben emelkedik: MD < 1,4-NQ ≈ DQ < 1-Cl-AQ < AQ < UQ₁₀. Ez a sorrend a DQ-t kivéve, éppen a protonáció szabadentalpia-változásával kifejezett stabilitási sorrendnek felel meg.

Protonálódási egyensúlyok micelláris rendszerekben

A membránfehérjék, így a RC is vízben oldhatatlanok. A legegyszerűbb rendszerek az oldatban tartásukra az amfilil sajátságú detergens micellák, amelyek kettős természetük miatt képesek a fehérjét is diszpergálni és vízben is oldódnak. Ezek alkalmazásával azonban többfázisú diszperz rendszer alakul ki (vizes, micelláris és fehérje fázisok).

A RC-hoz kötődő LDAO mennyisége. A RC sav-bázis titrálására ill. pufferkapacitására elvégzett szimuláció 25, a RC-hoz erősen kötődő LDAO molekula jelenlétét mutatta ki. Ez a megfigyelés összhangban van azokkal a röntgendiffrakciós vizsgálatokból származó

eredményekkel, melyek szerint még kristályos állapotban is kimutattak LDAO molekulákat a RC kristályhoz tapadva. További 175 lazán kötődő (más detergensre cserélhető) LDAO molekulát is megfigyeltem, amelyekkel együtt összesen a RC-hoz 200 LDAO molekula kapcsolódását tételeztem fel. Ez elfogadható egyezést mutat a RC diszpergálásához minimálisan szükséges, neutron diffrakcióval és detergens adszorbeáló gyöngyökkel meghatározott LDAO molekulák számával.

A protonálható csoportok hozzáférhetősége a RC-ban. A reakciócentrum két különböző módszerrel mért, pufferkapacitásának detergens függőségét a micelláris rendszerekben meghatározott közepes ionaktivitási együtthatókkal korrigálva megszüntettem és megállapítottam, hogy a RC kristály röntgendiffrakciós vizsgálata alapján a 166 protonálható csoport közül 155 részt vesz protonálódási egyensúlyok kialakításában. Néhány csoport protonálódása a szerkezeti adatok birtokában bizonyosan kizárható, mivel ezek ligandumai a kofaktoroknak.

1. A bakteriofeofitin pH-függő elektrokróm abszorpcióváltozásának mérésével a 750 nm körül jelentkező sáv 10 nm-es vöröseltolódását figyeltem meg és ebből meghatároztam egy $pK = 9,4$ értékkel protonálódó csoportot, amely erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakít ki az elsődleges szemikinonnal.(I)
2. A bakteriofeofitin elektrokróm abszorpcióváltozásának kinetikai elemzésével meghatároztam egy, a töltésrekombinációnál lényegesen gyorsabb komponenst ($\tau = 150 \mu s$), amelyet a fehérje protonációja következtében létrejövő töltésátrendeződésnek tulajdonítottam. (I)
3. A bakteriochlorofill dimer széles pH tartományban 865 nm-re centrált abszorpciós sávjának 4 nm-es kékeltolódását figyeltem meg magas pH értékeknél, amelyet a dimer környezetében elhelyezkedő magas pK-jú (Tyr, Lys, Arg) csoportok deprotonációjával magyaráztam.(I)
4. A kinonok eltávolítását követően, az eredetivel megegyező minőségű ($U_{Q_{10}}$) kinonnal nem csak az elsődleges (Q_A), hanem a másodlagos (Q_B) kötőhely aktivitását is sikerült az $5 < pH < 11$ tartományban 90 %-ban helyreállítanom.(II)
5. Míg a savas és az enyhén bázikus pH tartományban ($5,0 < pH < 8,0$) a reakciócentrum fehérje fényindukált protonfelvételét nem befolyásolta a kinon minősége, addig az alkalikus tartományban ($pH > 8,0$) jelentős különbségek mutatkoztak az eltérő szerkezetű és redoxpotenciálú kinonok jelenlétében mérhető protonkötésben. Ez utóbbi megfigyelést a mindenkori szemikinon és egy magas pK-val ($pK \approx 9,8$) protonálódó csoport közötti eltérő elektrosztatikus kölcsönhatással magyaráztam.(II)
6. Az antrakinont (AQ) tartalmazó reakciócentrumra a $P^+Q_A^-$ állapot indirekt töltésrekombinációjának paramétereiből, valamint a protonkötés pH szerinti integráljából is meghatároztam a fehérje fényindukált protonfelvételének pH-függő szabadentalpia-

változását. Magas pH értékeknél, ahol főként az indirekt rekombináció valósul meg, jó egyezést kaptam a két módszerrel meghatározott értékekre.(II)

7. A PQ_A^- redoxállapotban mérhető protonkötés integrálásával valamennyi kinonra meghatároztam a pH-függő stabilizációs energia értékeit. Megállapítottam, hogy a pH tartomány jelentős részében valamennyi kinonra a stabilizációs energiák pH-függése mintegy -20 meV/pH egység meredekségű, ami átlagosan $0,3 \text{ H}^+ / Q_A^-$ protonfelvételnek felel meg. A stabilizációs energiák között magas pH értékeknél jelentkező különbséget egy protonálódó csoporttal történő eltérő elektrosztatikus kölcsönhatásnak tulajdonítottam.(II)

8. A reakciócentrum diszpergálására leggyakrabban használt detergens rendszerekben, a pufferkapacitás mérésével meghatároztam a közepes ionaktivitási együtthatókat; $f_{\text{LDAO}} = 0,33$, $f_{\text{TX-100}} = 0,33$, $f_{\text{dod.-}\beta\text{-D-maltozid}} = 0,12$ (III, IV)

9. Meghatároztam a reakciócentrum diszpergálására leggyakrabban használt, protonálható csoporttal rendelkező LDAO detergens pK -ját szabad ($pK = 5,6$), és a reakciócentrumhoz kötött ($pK = 6,2$) állapotban. (IV)

10. A detergens rendszerek és a reakciócentrum pufferkapacitásának mérésével meghatároztam a reakciócentrumhoz erősen (25 LDAO/RC) és lazán (175 LDAO/RC) kötődő LDAO detergens molekulák mennyiségét, amelyek összege a reakciócentrum fehérje diszpergálásához minimálisan szükséges detergens mennyiségét adta.(IV)

11. A reakciócentrum és a stabil LM-komplex sav-bázis titrálásával, valamint pufferkapacitásaik közvetlen mérésével meghatároztam a protonálódási egyensúlyok kialakításában valójában részt vevő protonálható aminosavak számát. Ezt a szerkezeti adatokkal összevetve megállapítottam, hogy a vizsgált pH tartományban ($4 < \text{pH} < 11$) szinte valamennyi csoport (a kofaktorok ligandumait és azokkal hidrogén-hídkötést létesítőket kivéve) protonálódik. (III, IV)

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK:

I. Kálmán L., Turzó K and Maróti P.: Probing reaction centre protonation by electrochromic absorption changes of cofactors in *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthetica* 28 (2), 185-194. (1993).

II. Kálmán L. and Maróti P.: Stabilization of Reduced Primary Quinone by Proton Uptake in Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* (33), 9237-9244. (1994).

III. Kálmán L., Sebban P. and Maróti P.: Acid-base titration of isolated reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Ed. Mathis P.) Vol I, 799-802. (1995).

IV. Kálmán L., Gajda T., Sebban P. and Maróti P.: PH-Metric Study of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria in Micellular Solutions: Protonatable Groups Equilibrate with the Aqueous Bulk Phase. *Biochemistry* (36) 15:4489-4496 (1997)

V. Miksovská J., Kálmán L., Schiffer M., Maróti P., Sebban P. and Hanson D.K.: In Bacterial Reaction Centers Fast Delivery of the Second Proton to Q_B Can be Achieved Without L212Glu. (Biochemistry-hez beküldve).

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

A felsorolt publikációk társszerzői kijelentik, hogy ezen Ph.D. disszertációban ismertetett eredmények Kálmán László munkájához fűződnek.

Dr. Gajda Tamás, a kémia tudomány kandidátusa.....

Gajda Tamás

Dr. Maróti Péter, a biológia tudomány doktora.....

Maróti Péter

Turzó Kinga.....

Turzó Kinga

Szeged, 1997. április 10.

Ph.D. disszertáció tézisei

**A BAKTERIÁLIS REAKCIÓCENTRUM-FEHÉRJE
PROTONFELVÉTELE**

Kálmán László



Témavezető: Dr. Maróti Péter, egyetemi tanár
József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszék

Szeged, 1997

A fotoszintetizáló organizmusok (baktériumok, algák, magasabb rendű zöld növények) fényenergiát alakítanak át kémiai energiává, amely közvetlenül alkalmas életfolyamataik energiaigényének fedezésére, illetve energia raktározására. A fotoszintetikus folyamatok legáltalánosabban két fő csoportra oszthatók: fényreakciókra és sötétreakciókra. A fényreakciókban a sötétreakciók energiaforrásai képződnek (ATP és redukált koenzimek), amelyek lehetővé teszik, hogy a különböző biokémiai anyagcserefolyamatok (sötétreakciók) láncolatán keresztül a szén-dioxid asszimilálódjék. A fényreakciók a foton abszorpcióját követően fehérjébe ágyazott, speciálisan orientált pigmentek (redox centrumok) közreműködésével mennek végbe. A zöld növényekben, ahol a fotoszintézis az eddig ismert legmagasabb szinten valósul meg, a fényreakciók során NADPH és ATP termelődik. Ezen folyamatban két egymástól jól elkülöníthető fotokémiai rendszer (PSI és PSII) vesz részt. A PSII-höz kapcsolódó komplex egyedülálló módon képes a víz fényindukált elbontására protonokká és molekuláris oxigénné, miközben redukáló ekvivalensek láncolatán keresztül az energia egy része proton elektrokémiai potenciál formájában raktározódik. Ez a potenciál az ATP szintézisének energiaforrásául szolgál. Az energia másik hányada átkerül a PSI-re, ahol újabb foton abszorpciója révén válik a folyamat teljessé a NADP redukcióját eredményezve.

Baktériumokban a fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai lényegesen egyszerűbbek, mint zöld növényekben. Amíg a zöld növényekben két fotokémiai reakció működik, addig baktériumokban csak egy van. A zöld növények lineáris elektrontranszportláncával szemben a baktériumoké ciklikus, melynek során a reakciócentrumban keletkezett töltéspár rekombinálódik. A reakció szabadentalpia-változása proton gradienssé alakul át, amelyet felépítő vektoriális (a membrán citoplazmikus oldaláról a periplazmikus oldal felé mutató) protonelmozdulás a reakciócentrum protonfelvételének eredménye. A

protonpumpa-mechanizmust a reakciócentrumhoz kapcsolódó citokróm bc_1 komplex teszi teljessé (protonmozgató kinon ciklus). Mivel a protonfelvétel és az elektrontranszfer több helyen is csatlakoznak és csak kölcsönhatásuk biztosíthatja a reakciócentrum normális működését, a protonálódási folyamatok mindig is foglalkoztatták a kutatókat. Megfelelő vizsgálati módszer hiányában azonban, korábban a bakteriális reakciócentrum protonfelvételére csak az elektrontranszfer paramétereiből, indirekt módon következtethettek. Csak az elmúlt évtizedben kerültek a figyelem középpontjába a közvetlen (a protonkötés mérésén alapuló) protonálódási vizsgálatok. Teljesen érthető módon az érdeklődés a reakciócentrum másodlagos kinon(Q_B)-kötőhelyének (Q_B környéki aminosavak protonálódása, kinolképződés/leválás) tanulmányozására koncentrált. Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy az elektrontranszfer egymásutáni folyamatai közül az elsődleges kinon (Q_A) redukciója szolgáltatja a legnagyobb szabadentalpia-csökkenést, vagyis ez a lépés teszi visszafordíthatatlanná fiziológias körülmények között a töltésszétválasztást. A primer töltéspár stabilizálódásának fontos eleme a Q_A^- elektrosztatikus vonzásokörzetében található protonálható aminosavak protonfelvétele. A reakciócentrum-fehérje ugyanis nem passzív alanya a fénygerjesztés hatására előálló folyamatainak, hanem aktívan elősegíti azok lejárásait. Az elsődleges kinon redukciójához köthető protonálódás két további szempontból is kiemelt jelentőségű:

- A primer kinon az erősen hidrofób környezete révén nem képes kétszeresen redukálódni, így önmaga nem is protonálódik.
- A Q_A -tól viszonylag nagy (1,2 nm) távolságon belül nem található protonálható oldallánccal rendelkező aminosav. A megfigyelhető protonfelvétel tehát, nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások eredménye.

A nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások ellenére a Q_B redukciója sem eredményez lényegesen nagyobb protonfelvételt, holott annak környezete többszörösen gazdagabb protonálható aminosavakban. Felmerül a kérdés, hogy a fehérje fényindukált

protonfelvételében részt vevő csoportok száma kinetikai (a vizsgált időtartomány rövideje miatt) vagy hozzáférhetőségi (a fehérje hidrofób részébe eltemetett csoportok) okok miatt korlátozott.

CÉLKITŰZÉSEK

Célom az volt, hogy az elsődleges szemikinin létrejöttéhez kapcsolódó protonációt közvetett (a környező kofaktorok elektrokróm abszorpcióváltozásainak, a töltéskeresztmetszeti kinetikájának mérése) és közvetlen (a fénygerjesztés hatására, valamint sötétben bekövetkező protonkötés meghatározása) módszerekkel tanulmányozzam. A következő kérdések megválaszolását tekintettem feladatommá:

Az elektrokróm abszorpcióváltozások detektálásakor:

- Hogyan hat a pH a kofaktorok közötti elektrosztatikus kölcsönhatás mértéke a fehérjekörnyezet megváltozott protonációs állapotán keresztül?

A primer szemikinin stabilitásának vizsgálatakor:

- Hogyan befolyásolja a natív kinont helyettesítő kinon szerkezete és középponti redoxpotenciálja a fényindukált protonkötés mértékét?
- Milyen kapcsolat van az elektrontranszfer és a protonkötés jellemzői között?
- Melyek lehetnek a szemikinnel kölcsönható protonálható aminosavak?
- Alacsony redoxpotenciálú kinon esetén befolyásolhatja-e a protonkötés a redukált bakteriofeofitin stabilizálódását?

A reakciócentrum sötétben végzett sav-bázis titrálásakor:

- A reakciócentrum 166 protonálódó csoportja közül mennyi vesz részt ténylegesen protonációs egyensúlyok kialakításában?

Baktériumtörzsek

Vizsgálataimat natív (*Rb. sphaeroides* és *Rb. capsulatus*) és az elsődleges kinon kötőhelyén különböző kinonokat tartalmazó (*Rb. sphaeroides*) reakciócentrumok felhasználásával végeztem. A natív kinon helyettesítésére a következő kinonszármazékokat használtam: durokinon (DQ), 1,4-naftokinon (1,4-NQ), 2-metil-1,4-naftokinon (menadion, MD), antrakion (AQ) és 1-klór-antrakion (1-Cl-AQ).

A fotoszintetikus reakciócentrum izolálása

Általánosan használt fehérjetisztítási módszerek: sejtek feltörése hidraulikus présrel (French press), ultracentrifugálás, membránfragmentum feltárása ionos detergenssel, kizsázás (ammónium-szulfátos precipitálás), ioncserés kromatográfia, ultraszűrés.

Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Spektroszkópia és potenciometria. A fotoszintetikus reakciócentrumok fényfelvillanással létrehozott abszorpcióváltozását a vizsgált pigmentre jellemző hullámhosszokon házi építésű egysugaras kinetikai abszorpcióváltozás-mérővel mértem. A primer donor abszorpcióváltozásának 430 nm-nél történő mérése alkalmas a töltérekombináció nyomankövetésére. Külső donor jelenlétében 450 nm-nél a szemikinin redukciója figyelhető meg. A protonfelvételt pH-érzékeny festékek abszorpcióváltozásának 585 nm körüli detektálásával és/vagy potenciometrikusan pH elektród alkalmazásával határoztam meg. A sav-bázis titrálásokat automata titráló berendezéssel hajtottuk végre. A pufferkapacitásokat ($-dH^+/dpH$) vagy közvetlen méréssel, vagy a titrálási görbék pH szerinti differenciálásával határoztam meg.

A kromofórok elektrokróm abszorpcióváltozásai

A Q_A^-/Q_A különbségi abszorpciós spektrum lényegesen nagyobb elektrokróm jelet mutatott a Bfeo sávjában, mint a Q_B^-/Q_B , hiszen a Q_A a Bfeo_A közvetlen szomszédságában helyezkedik el (távolságuk 0,14 nm), míg a Q_B mintegy 0,3 nm távolságra van a Bfeo_A-tól. Így a Bfeo sáv lényegesen érzékenyebb indikátora a Q_A redoxállapotainak. A 748 nm környezetében megjelenő völgy pozícióját az oldat pH-jának változása (pH 6 → pH 11) jelentősen (mintegy 10 nm-rel) eltolta a spektrum vörös tartománya felé. Az eltolódásból Q_A^- -nak egy protonálható csoporttal (pK = 9,4) kialakított erős elektrosztatikus kölcsönhatását valószínűsítettem. A szintén 748 nm-nél a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltéskeresztmetszeti kezdeti fázisaként mért, mintegy 150 μs időállandóval jellemzett komponenst a fehérje protonációjának és/vagy a töltésváltozást követő, a fehérjében bekövetkező töltésátrendeződésnek tulajdonítottam. Ha az elektronátadást a Q_B -re inhibitorral gátoljuk, akkor a Q_B^- által létrehozott elektrokróm jelet kiküszöbölhetjük. Ekkor is megfigyeltem ezen komponens jelenlétét, ezért kizártam, hogy a kinonok közötti elektrontranszfer hozná létre. Ezt a feltételezést jól alátámasztják más szerzők eredményei is, amelyekben a Q_A^- által okozott protonfelvétel sebességét spektrofotometriás és konduktometriás módszerrel ugyancsak 100 μs körülinek mérték, vagy a fény-indukált elektrogén jel detektálásával határoztak meg egy 200 μs élettartamú komponenst, amelyet a fehérje-relaxáció kinetikájának tulajdonítottak. A primer donor 865 nm-nél jelentkező sávja magas pH-n 4 nm-rel eltolódott a spektrum kisebb hullámhosszú tartománya felé, amelyből a környező magas pK-jú csoportok deprotonációjára következtettem. Az eltolódás csekély mértéke miatt nem vállalkoztam pK érték(ek) meghatározására, már csak azért sem, mert ezek a protonok nem feltétlenül hozhatók összefüggésbe az elektrontranszferrel. Inkább valószínű, hogy a csoportok sötétbeli deprotonációja kismértékben perturbálja a primer donor fehérjekörnyezetét és ez okozza a sáv eltolódását.

A Q_A^- stabilizálódása a fehérje protonfelvétele révén

Az aminosavak töltése a fehérjében többféleképpen is módosíthatja a Q_A^-/Q_A redox pár középponti redoxpotenciálját. A könnyen polarizálható és a pozitív töltésű aminosavak csökkenthetik a szemikinon energiaszintjét. A RC-ban azonban nincs ilyen csoport a Q_A gyűrűjének középpontjától számított 1,2 nm távolságon belül. A karboxil csoportokon megjelenő negatív töltés pedig megemelheti a Q_A^- energiaszintjét. Alacsony pH értékeknél azonban, ahol ezek a karboxilátok protonálódnak, stabilizálják a szemikinont. A savas karakterű aszparaginsav és glutaminsav molekulák száma igen magas a H alegységben (éppen annyi, mint az L és az M alegységben együttesen (29), ahonnan a protonok érkezhetnek a kinon környezetébe. A szerkezeti adatok alapján tehát a szemikinon stabilizálódását az aminosav oldalláncok elősegíthetik. A stabilizáció standard szabadentalpia-változását ennek megfelelően a protonkötés adatainak integrálásával határozhatjuk meg.

Alacsony redoxpotenciálú kinonok a Q_A kötőhelyen. Az antrakinnal helyreállított RC esetében a stabilizáció szabadentalpia-változását (ΔG_H°) két módszerrel is meghatározhattam, mivel a primer töltéspár rekombinációjának termikus aktiválást igénylő gyors fázisa is pH-függő módon változott. A protonkötés és a töltésrekombináció adatainak felhasználásával számított szabadentalpia-változásokat összevetve az erősen bázikus tartományban, ahol a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltésrekombináció főként az indirekt úton keresztül játszódik le jó egyezést kaptam a két módszerrel meghatározott értékekre. Alacsonyabb pH-n viszont, egyre nagyobb a direkt út részesedése, ezért a töltésrekombináció adataiból kisebb mértékű stabilizáció adódik.

Magas redoxpotenciálú kinonok a Q_A kötőhelyen. Ezeket a kinonokat tartalmazó RC-okban a stabilizáció szabadentalpia-változását a protonkötés adataiból határoztam meg. A pH = 5,0-nél (a szemikinonnal kölcsönható csoportok döntő hányada protonált) meghatározott ΔG_H° értékek széles határok között változtak. A legstabilabbnak (-101 meV) a UQ_{10} -zel visszaállított Q_A aktivitású RC bizonyult, míg a legkevésbé stabilnak

a MD-t (-49 meV) tartalmazó RC-ot találtam. Valamennyi kinonra a görbék átlagos meredeksége mintegy -20 meV/pH-nak adódott, ami mintegy 0,33 H⁺/e⁻ sztöchiometriájú protonfelvételnek felel meg. A protonálódó csoportok, egy magas pK-jú aminosavat kivéve, valamennyi szemikinnal többé-kevésbé azonos elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki.

A protonkötés hatása a P⁺Bfeo⁻ állapot energiaszintjére. Energetikai paraméterek felhasználásával kiszámítottam a pK_{Bfeo⁻} értékét (9,6), ami jól egyezik a magas pK-jú csoport sötétbeli pK-jával (9,65). Ez azt jelenti, hogy energetikai megfontolások alapján nem jöhet létre protonáció a Bfeo⁻ és a magas pK-jú csoport közötti elhanyagolható elektrosztatikus kölcsönhatás miatt. A mért szabadentalpia-változás tehát kizárólag a Q_A⁻ energetikai stabilizálódásának tulajdonítható.

A szemikinnon és környezete a RC-ban. Bár a Q_A eltávolítása érdekében a magas detergenskoncentráció alkalmazásával felnyitott RC az új kinon beépülésével reverzibilisen visszazáródik, az eltérő térigényű, redoxpotenciálú és hirofóbb sajátságokkal rendelkező szemikinnon megváltoztathatja a fehérje lokális szerkezetét. Ez a változás tükröződhet a szemikinnon stabilitásában. A fehérjekörnyezetnek a kinonra gyakorolt hatását jól érzékelteti a kinonok középponti redoxpotenciáljainak *in situ* és szerves oldószerben (Dimetil-formamid) mért különbsége. A különbség bár jelentős (730 mV DQ-ra, 530-580 mV a többi kinonra), mégsem található összefüggés az eltolódás mértéke és a szemikinnon fehérjebeli viselkedése között. A kinonok geometriai méretének (gyűrűinek száma) különbözősége kismértékű eltérést eredményezett a protonfelvétel mértékében, amely valószínűleg két ellentétes hatás kioltása miatt adódott: a növekvő gyűrűszám torzíthatja ugyan a struktúrát, ugyanakkor a protonálható csoportok és a szemikinnon távolsága csökkenhet, éppen a nagyobb térigény miatt fellépő "gyűrűdés" révén, erősebb elektrosztatikai kölcsönhatást kialakítva a szemikinnon és a csoportok között. Az elektron delokalizációjának mértéke a kinoidális rendszerben jól tükröződik a szemikinnonok pK értékeiben. A szemikinnon pK-ja szoros összefüggésben van a

szubsztituenseknek a telítetlen gyűrűre gyakorolt elektron küldő (+ mezomer hatás), vagy elektron szívó (– mezomer hatás) tulajdonságaival, vagyis a gyűrű elektronsűrűségével. Minél alacsonyabb a pK, annál kisebb a gyűrű elektronsűrűsége. A legkisebb pK-val az 1,4-NQ rendelkezik (4,1), valamivel magasabbal a MD (4,5) a metil csoport +mezomer hatása miatt, míg a többi szemikinonnak magasabb a pK-ja (5,1 - 5,9). Ezen utóbbi csoportban felfedezett kisebb különbségek csak a közelebbi csoportokkal való kölcsönhatásban tükröződnek, de nem hatnak specifikusan a távolabbi csoportokra. Ez a megfigyelés jól egyezik a magas pH-n megfigyelt protonkötés mértékével. MD és 1,4-NQ lényegesen gyengébb kölcsönhatást alakított ki a Q_A kötőhelyhez közeli elhelyezkedésű csoporttal, mint az összes többi kinon. A pH tartomány nagy részében viszont (5 < pH < 8,5), a távoli csoportok határozzák meg a protonkötés mértékét, ezek azonban nem érzékenyek a gyűrű elektronsűrűségére, így nem érzékenyek az alkalmazott kinonra.

Az alkalmazott kinonok hidrofób sajátsága és a protonkötés révén létrejött stabilizáció mértéke között is megfigyelhetők törvényszerűségek. A kinonok hidrofób jellege a következő sorrendben emelkedik: MD < 1,4-NQ ≈ DQ < 1-Cl-AQ < AQ < UQ₁₀. Ez a sorrend a DQ-t kivéve, éppen a protonáció szabadentalpia-változásával kifejezett stabilitási sorrendnek felel meg.

Protonálódási egyensúlyok micelláris rendszerekben

A membránfehérjék, így a RC is vízben oldhatatlanok. A legegyszerűbb rendszerek az oldatban tartásukra az amfifil sajátságú detergens micellák, amelyek kettős természetük miatt képesek a fehérjét is diszpergálni és vízben is oldódnak. Ezek alkalmazásával azonban többfázisú diszperz rendszer alakul ki (vízes, micelláris és fehérje fázisok).

A RC-hoz kötődő LDAO mennyisége. A RC sav-bázis titrálására ill. pufferkapacitására elvégzett szimuláció 25, a RC-hoz erősen kötődő LDAO molekula jelenlétét mutatta ki. Ez a megfigyelés összhangban van azokkal a röntgendiffrakciós vizsgálatokból származó

eredményekkel, melyek szerint még kristályos állapotban is kimutattak LDAO molekulákat a RC kristályhoz tapadva. További 175 lazán kötődő (más detergensre cserélhető) LDAO molekulát is megfigyeltem, amelyekkel együtt összesen a RC-hoz 200 LDAO molekula kapcsolódását tételeztem fel. Ez elfogadható egyezést mutat a RC diszpergálásához minimálisan szükséges, neutron diffrakcióval és detergens adszorbeáló gyöngyökkel meghatározott LDAO molekulák számával.

A protonálható csoportok hozzáférhetősége a RC-ban. A reakciócentrum két különböző módszerrel mért, pufferkapacitásának detergens függőségét a micelláris rendszerekben meghatározott közepes ionaktivitási együtthatókkal korrigálva megszüntettem és megállapítottam, hogy a RC kristály röntgendiffrakciós vizsgálata alapján a 166 protonálható csoport közül 155 részt vesz protonálódási egyensúlyok kialakításában. Néhány csoport protonálódása a szerkezeti adatok birtokában bizonyosan kizárható, mivel ezek ligandumai a kofaktoroknak.

1. A bakteriofeofitin pH-függő elektrokróm abszorpcióváltozásának mérésével a 750 nm körül jelentkező sáv 10 nm-es vöröseltolódását figyeltem meg és ebből meghatároztam egy $pK = 9,4$ értékkel protonálódó csoportot, amely erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakít ki az elsődleges szemikinonnal.(I)
2. A bakteriofeofitin elektrokróm abszorpcióváltozásának kinetikai elemzésével meghatároztam egy, a töltésrekombinációnál lényegesen gyorsabb komponenst ($\tau = 150 \mu s$), amelyet a fehérje protonációja következtében létrejövő töltésátrendeződésnek tulajdonítottam. (I)
3. A bakterioklorofill dimer széles pH tartományban 865 nm-re centrált abszorpciós sávjának 4 nm-es kékeltolódását figyeltem meg magas pH értékeknél, amelyet a dimer környezetében elhelyezkedő magas pK-jú (Tyr, Lys, Arg) csoportok deprotonációjával magyaráztam.(I)
4. A kinonok eltávolítását követően, az eredetivel megegyező minőségű (UQ_{10}) kinonnal nem csak az elsődleges (Q_A), hanem a másodlagos (Q_B) kötőhely aktivitását is sikerült az $5 < pH < 11$ tartományban 90 %-ban helyreállítanom.(II)
5. Míg a savas és az enyhén bázikus pH tartományban ($5,0 < pH < 8,0$) a reakciócentrum fehérje fényindukált protonfelvételét nem befolyásolta a kinon minősége, addig az alkalikus tartományban ($pH > 8,0$) jelentős különbségek mutatkoztak az eltérő szerkezetű és redoxpotenciálú kinonok jelenlétében mérhető protonkötésben. Ez utóbbi megfigyelést a mindenkor szemikinin és egy magas pK-val ($pK \approx 9,8$) protonálódó csoport közötti eltérő elektrosztatikus kölcsönhatással magyaráztam.(II)
6. Az antrakinont (AQ) tartalmazó reakciócentrumra a $P^+Q_A^-$ állapot indirekt töltésrekombinációjának paramétereiből, valamint a protonkötés pH szerinti integráljából is meghatároztam a fehérje fényindukált protonfelvételének pH-függő szabadentalpia-

változását. Magas pH értékeknél, ahol főként az indirekt rekombináció valósul meg, jó egyezést kaptam a két módszerrel meghatározott értékekre. (II)

7. A PQ_A^- redoxállapotban mérhető protonkötés integrálásával valamennyi kinonra meghatároztam a pH-függő stabilizációs energia értékeit. Megállapítottam, hogy a pH tartomány jelentős részében valamennyi kinonra a stabilizációs energiák pH-függése mintegy -20 meV/pH egység meredekségű, ami átlagosan $0,3 H^+/Q_A^-$ protonfelvételnek felel meg. A stabilizációs energiák között magas pH értékeknél jelentkező különbséget egy protonálódó csoporttal történő eltérő elektrosztatikus kölcsönhatásnak tulajdonítottam. (II)

8. A reakciócentrum diszpergálására leggyakrabban használt detergens rendszerekben, a pufferkapacitás mérésével meghatároztam a közepes ionaktivitási együtthatókat; $f_{LDAO} = 0,33$, $f_{TX-100} = 0,33$, $f_{\text{dod.}-\beta\text{-D-maltozid}} = 0,12$ (III, IV)

9. Meghatároztam a reakciócentrum diszpergálására leggyakrabban használt, protonálható csoporttal rendelkező LDAO detergens pK-ját szabad ($pK = 5,6$), és a reakciócentrumhoz kötött ($pK = 6,2$) állapotban. (IV)

10. A detergens rendszerek és a reakciócentrum pufferkapacitásának mérésével meghatároztam a reakciócentrumhoz erősen (25 LDAO/RC) és lazán (175 LDAO/RC) kötődő LDAO detergens molekulák mennyiségét, amelyek összege a reakciócentrum fehérje diszpergálásához minimálisan szükséges detergens mennyiségét adta. (IV)

11. A reakciócentrum és a stabil LM-komplex sav-bázis titrálásával, valamint pufferkapacitásaik közvetlen mérésével meghatároztam a protonálódási egyensúlyok kialakításában valójában részt vevő protonálható aminosavak számát. Ezt a szerkezeti adatokkal összevetve megállapítottam, hogy a vizsgált pH tartományban ($4 < pH < 11$) szinte valamennyi csoport (a kofaktorok ligandumait és azokkal hidrogén-hídkötést létesítőket kivéve) protonálódik. (III, IV)

I. Kálmán L., Turzó K and Maróti P.: Probing reaction centre protonation by electrochromic absorption changes of cofactors in *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynthetica 28 (2), 185-194. (1993).

II. Kálmán L. and Maróti P.: Stabilization of Reduced Primary Quinone by Proton Uptake in Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry (33), 9237-9244. (1994).

III. Kálmán L., Sebban P. and Maróti P.: Acid-base titration of isolated reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynthesis: From Light to Biosphere (Ed. Mathis P.) Vol I, 799-802. (1995).

IV. Kálmán L., Gajda T., Sebban P. and Maróti P.: PH-Metric Study of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria in Micellular Solutions: Protonatable Groups Equilibrate with the Aqueous Bulk Phase. Biochemistry (36) 15:4489-4496 (1997)

V. Miksovská J., Kálmán L., Schiffer M., Maróti P., Sebban P. and Hanson D.K.: In Bacterial Reaction Centers Fast Delivery of the Second Proton to Q_B Can be Achieved Without L212Glu. (Biochemistry-hez beküldve).

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

A felsorolt publikációk társszerzői kijelentik, hogy ezen Ph.D. disszertációban ismertetett eredmények Kálmán László munkájához fűződnek.

Dr. Gajda Tamás, a kémia tudomány kandidátusa.....*Gajda Tamás*

Dr. Maróti Péter, a biológia tudomány doktora.....*Maróti Péter*

Turzó Kinga.....*Turzó Kinga*

Szeged, 1997. április 10.