

B 3473

Ph.D. disszertáció

TÉZISEK

**Töltésszétválasztás és fotociklus
fotoszintetikus reakciócentrumokban**

OSVÁTH SZABOLCS

Témavezető: Dr. Maróti Péter
egyetemi tanár

József Attila Tudományegyetem, Szeged

1997



IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A fotoszintézis olyan biológiai reakciólánc, amelyben a szintézishez szükséges energiát a fotokémiai reakciók során stabilizált fény-gerjesztési energia szolgáltatja. A fényből származó energia felvételét és elektrokémiai potenciálkülönbséggé alakítását membránhoz kötött pigment- fehérje komplexek együttese katalizálja. A fényenergia kémiai energiává való átalakításának első lépése a fotoszintetikus reakciócentrum fehérjékben (RC) megy végbe, ahol a gerjesztési energia ellentett előjelű töltések szétválasztására fordítódik.

A fényindukált töltésszétválasztás következtében a fotoszintetikus membrán két oldala között ≈ 100 mV elektromos potenciálkülönbség jön létre. A reakciócentrum a fotoszintetikus membránban irányítottan helyezkedik el. Zárt membránvezikulumokban a nemtelítési fényimpulzus aszimmetrikus töltésszétválasztást hoz létre, ami a minta makroszkópikus elektródákkal mérhető polarizációját eredményezi.

Michel, Deisenhofer és Huber röntgen diffrakcióval megállapították a bíorbakteriális reakciócentrum atomi feloldású szerkezetét, úttörő munkájukat 1988-ban a Nobel díjjal jutalmazták. A *Rhodobacter sphaeroides*ből és *Rhodobacter capsulatus*ból izolált reakciócentrum három fehérjeegységből és a hozzá kapcsolódó kofaktorokból áll. A kofaktorok: egy dimert alkotó bakterioklorofill-a pár (P), két bakterioklorofill-a monomer (Bkl), két bakteriofeofitin (Bfeo), két ubikinon-50 (UQ₁₀), egy nem-hem típusú magas spinű Fe²⁺ és baktériumtörzstől függően egy karotin. A pigment molekulák két, megközelítőleg tükörszimmetrikus A-vel illetve B-vel jelölt ágban nemkovalensen kötődnek a fehérjéhez.

Izolált bíorbaktériális reakciócentrum klorofill dimerjét gerjesztve, a közel egységnyi valószínűséggel töltésszétválasztás mellett veszteségi folyamatok is fellépnek. Egyik ilyen folyamat a dimer 910 nm körüli széles sávban megfigyelhető fluoreszcencia

emissziója. A fluoreszcencia kvantumhatásfoka igen alacsony ($\approx 4 \cdot 10^{-4}$) összevetve a kromatófóra antenna-pigmentjeinek fluoreszcencia hatásfokával ($2 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-1}$) és függ a reakciócentrum kofaktorainak redox állapotától.

A dimer az elsődleges elektrondonor a redox folyamatok láncolatában. A fényindukált elektrontranszfer a fehérje és a kofaktorok látszólagos szimmetriája ellenére csak az A ág mentén történik. A bakterioklorofill dimer pillanatszerű gerjesztése ($P \rightarrow P^*$) után az első tisztán elkülöníthető redox-pár a $P^*B_{feo}^-$ körülbelül 3 ps alatt képződik. A monomer bakterioklorofillnak a dimer és a bakteriofeofitin közti elektron átadás elősegítésében van fontos szerepe. Valószínű, hogy a monomer bakterioklorofill maga is részt vesz az elektrontranszferben és redukálódik, ez azonban még vitatott. A $B_{feo}^- Q_A \rightarrow B_{feo} Q_A^-$ elektrontranszfer félideje körülbelül 200 ps, és a $P^*B_{feo}^-$ keletkezéséhez hasonlóan nem igényel termikus gerjesztést. Habár a $Q_A B_{feo}^-$ általi redukációját további elektrontranszfer lépések követik, itt a legnagyobb a redox potenciál csökkenése, ami a töltésszétválasztást gyakorlatilag irreverzibilissé teszi. További stabilizációt eredményez az elektronnak 20–200 μs alatti átadása a Q_A -ról a másodlagos kinon akceptorra.

A fényindukált töltésszétválasztás során keletkező P^+ -t *in vivo* egy gyors citokróm c_2 donor redukálja. Izolált reakciócentrumon folytatott kísérleteknél a cit c_2 vízdékony citokróm c -vel pótolható. A P^+ -nak a citokróm c általi redukciója többfázisú. A reakciócentrum fehérjéhez kötődő redukált citokróm gyorsan ($\approx 1 \mu s$) visszaredukálja a P^+ egy részét. A következő lassabb fázisban azon reakciócentrumok oxidált dimerje redukálódik, amelyekhez korábban nem kapcsolódott citokróm. Ezekhez a citokróm c a két fehérje közötti elektrosztatikus kölcsönhatás által irányított módon diffundál $\approx 10^9 M^{-1}s^{-1}$ bimolekuláris sebességállandóval.

A reakciócentrum a citokrómról származó elektronokat egy membrán-oldott kinon raktár redukálására használja fel. Fénygerjesztés hatására a reakciócentrumban elektron továbbítódik a kinon akceptor komplex felé, és redukálja a kinon raktárból a

Q_B helyre bekötött kinon molekulákat. A Q_B zsebben keletkezett szemikinon körülbelül 10^5 -szer erősebben kötődik a fehérjéhez mint a kinon és a $PQ_A Q_B^-$ élettartama akár több perc is lehet. Ebben az állapotban a reakciócentrum újabb töltésváltoztatásra képes, és fénygerjesztés hatására a fotokémiai inaktív $P^+ Q_A^- Q_B^-$ állapotba kerül. A P^+ -t a citokróm c raktár redukálja, a két kinon közti második elektrontranszfer és a vele csatolt protontranszfer pedig a Q_B zsebben $(Q_B H)^-$ állapotú kétszeresen redukált kinont hoz létre. Ez a citoplazmikus vizes fázisból protont felvéve dihidrokinont képez. Az így keletkezett dihidrokinon kiválik a Q_B zsebből és helyét a kinon raktár más kinon molekulájának adja át. A reakciócentrum egy kinonredukációs fotociklus befutása után visszakerült a kiindulási állapotba.

A reakciócentrum a fotociklus alatt egy kinon molekula dihidrokinonra redukálása közben két citokróm molekulát oxidál. Kihasználva a citokróm c redukált (cit^{2+}) és oxidált (cit^{3+}) formáinak abszorpciója közti különbséget, a citokróm redox állapotjának változásai jól mérhetőek. A citokróm fotooxidációjának sebességéből a fotociklus lépéseinek sebességére lehet következtetni.

MÓDSZEREK

A reakciócentrum izolálása standard fehérjepreparálási és tisztítási eljárásokkal történt *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* bimbobaktériumokból.

A reakciócentrumban lejátszódó redox lépések láncolatát fluoreszcencia- és abszorpcióváltozás méréssel követtem nyomon. A dimerből származó alacsony hatásfokú infravörös fluoreszcencia tanulmányozására nagy érzékenységű spektrofluorimétert építettem. Az abszorpcióváltozás mérésére kinetikai spektrofotométert állítottam össze. A fotociklus sebességmeghatározó lépéseinek megállapítása érdekében intenzív lézerdioda gerjesztést alkalmaztam, amellyel sikerült elérni, hogy a fotokémiai reakció sebessége elérte, vagy (sok esetben) meghaladta a termikus aktiválású reakciók sebességét.

CÉLKITŰZÉS

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

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

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

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

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

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

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

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

EREDMÉNYEK

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

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

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

4 P^+ állapotban a reakciócentrum fluoreszcencia hatásfoka a kinon akceptor komplex redox állapotától függetlenül alacsony: *Rhodobacter sphaeroides* relatív

fluoreszcencia határfoka 0.2 ± 0.1 , míg *Rhodobacter capsulatus* esetén 1.7 ± 0.2 (alacsony kinon koncentráció) és 1.0 ± 0.2 ($40 \mu\text{M}$) UQ_6 értékek között változik a kinon koncentrációtól függően (4).

5 *Rhodobacter sphaeroides* és *Rhodobacter capsulatus* bíorbaktériumokból izolált reakciócentrum P^+ állapotában a fluoreszcencia gerjesztési spektruma a mintában még jelenlévő klorofillszármazékokra utalt, amelyek a fotoszintetikus folyamatokban nem vesznek részt. Ezekre a kívülről hozzáadott nagy mennyiségű ($40 \mu\text{M}$) UQ_6 fluoreszcencia kioltóként hat. A reakciócentrum redox állapotától függő (változó) fluoreszcencia gerjesztési spektruma jól megegyezik a reakciócentrum abszorpciós spektrumával (4).

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

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

8 *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reakciócentrumban folytonos gerjesztés alatt a citokróm c fotooxidáció erős pH függést mutat. Ebből megállapítható a fotociklus sebességmeghatározó lépéseinek pH függése. A citokróm c kicserélődés nagymértékű lassulása a $\text{pH} < 6$ tartományban ($k_c = 15 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, pH : 4.5; $k_c > 5000 \text{ s}^{-1}$, pH : 6.5) a citokróm átfordulás drasztikus csökkenését okozza. Semleges ($6 < \text{pH} < 8$) pH -kon

a sebességmeghatározó a fotokémiai lépés, valamint a dihidrokinon/kinon kicserélődés ($k_Q = 900 - 2000 \text{ s}^{-1}$, pH: 7.0). A lúgos tartományban (pH > 8) a sebességmeghatározó lépés a fehérjén belüli proton-csatolt második elektron transzfer (3, 5, 6).

9 A modell alapján az átfordulás stacionárius szakaszának pH. függéséből meghatároztam a dihidrokinon/kinon (k_Q) és citokróm³⁺/citokróm²⁺ (k_C) kicserélődés sebességi állandóit. Az így nyert paraméterekkel számolt kinetikák és a citokróm c fotooxidáció kezdeti tranziens fázisának pH függése jó egyezést mutatnak (5).

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

A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

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

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

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

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

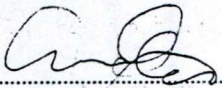
Osváth, Sz. és P. Maróti: Coupling of cytochrome and quinon' turnovers in photocycle of reaction center from photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* (közlésre elfogadva)

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

A TÁRSSZERZŐK NYILATKOZATA

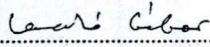
A publikációk társszerzői kijelentik, hogy a bemutatott Ph.D. tézisek Osváth Szabolcs munkájának eredményei.

Dr. Garab Győző a biol. tud. doktora



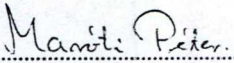
.....

Dr. Laczkó Gábor a fiz. tud. doktora



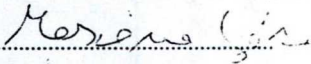
.....

Dr. Maróti Péter a biol. tud. doktora



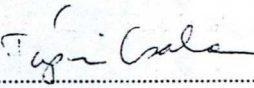
.....

Dr. Meszéna Géza a fiz. tud. kandidátusa



.....

Tápai Csaba Ph.D. hallgató



.....

Szeged, 1997 március 23