

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

Bakterioklorofill fluoreszcencia, mint a fotoszintetikus
baktériumok fiziológiai állapotának jelzőrendszere

Sipka Gábor

Témavezető: Dr. Maróti Péter
egyetemi tanár

Fizika Doktori Iskola

SZTE TTIK és ÁOK Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai
Intézet

Szeged

2017

Bevezetés

Az életet a Nap fénye táplálja. A fénynek az élet minden területén lényeges szerepe van, mert végsősorban az életfolyamatokhoz szükséges szabadenergiát szolgáltatja, és a látásnak, mint az egyik érzékelési formának a legfontosabb információhordozója. A mélytengeri kéregpedésekben a Föld hőenergiáját felhasználó mikroorganizmusoktól eltekintve a fotoszintézis az egyik legfontosabb biológiai folyamat a Földön, amelynek során az élőlények a Nap energiáját hasznosítják szabadenergia-forrásként az életműködésükhöz. Mivel lényegében minden földi élet által használt energia visszavezethető a napenergiának kémiai energiává való fotoszintetikus átalakítására, ezért túlzás nélkül állítható, hogy a fotoszintézis a földi élet motorja, és tanulmányozása napjainkban is a tudományos érdeklődés középpontjában áll (Govindjee és mtsai. 2005; Eaton-Rye és mtsai. 2012; Blankenship 2014; Niederman 2017).

A fotoszintetizáló baktériumokban a fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai lényegesen egyszerűbbek, mint zöld növényekben. Amíg a zöld növényekben két fotokémiai reakció működik, addig a baktériumokban csak egy. A zöld növények lineáris elektrontranszport-láncával szemben a baktériumoké ciklikus, melynek során a reakciócentrumban fénygerjesztéssel keletkezett töltéspár szabadenergiája a fotoszintetikus membránon keresztül (a membrán citoplazmikus oldaláról a periplazmikus oldal felé mutató) proton gradienssé alakul át. A vektoriális protonelmozdulást a reakciócentrum protonfelvétele és a citokróm bc_1 komplex protonmozgató kinon ciklusa valósítja meg.

A szerkezet-alapú fotoszintézis-kutatásban jelentős szerepe van a nemkén típusú bíborbaktériumoknak, mert reakciócentrumának atomi szintű térbeli meghatározásával (Deisenhofer és mtsai. 1984) lehetővé vált egy fotoszintetikus energia átalakító rendszer felépítésének és működésének megismerése és később modellként való alkalmazása. Bár az energia átalakításának részletei fajoként változhatnak, vannak szerkezeti és funkcionális hasonlóságok. A bakteriális reakciócentrumnak igen magas (~ 100 %) a fotokémiai kvantumhatásfoka, hiszen majdnem minden egyes elnyelt foton töltéspárt hoz létre (Wraight és Clayton 1974). A legnagyobb szabadenergia-veszteség a primér kinon (Q_A) redukálásához kapcsolódik, ami azt is jelenti, hogy fiziológiai körülmények között ez a lépés teszi visszafordíthatatlanná a töltésszétválasztást. Éppen ezért alapvető fontosságú az ilyen állapotban levő töltéspár energetikai viszonyainak feltérképezése, és annak megállapítása, hogy a fehérje mely aminosavaival és milyen kölcsönhatásban határozzák meg a töltéspár energiáját.

A fotoszintetizáló baktériumok kiemelkedően nagy hatékonysággal és gyorsasággal működtetik, és védik az energia átalakító rendszerüket. Ennek igen fontos része a fény intenzitásának növelésével arányos módon keletkező bakterioklorofil (Bkl) triplett állapotok megfelelő kezelése, amely elengedhetetlen a fotoszintetikus organizmusok túléléséhez. A Bkl triplett állapot energiája ugyanis (energetikai és térbeli okokból) könnyedén átadódik a triplett állapotú molekuláris oxigénnek (3O_2), és ezzel szingulett gerjesztett állapotú oxigént ($^1O_2^*$, erős

oxidálószer) állít elő. Ennek megakadályozására számos mechanizmus működhet, amelyekben kiemelt szerepet játszanak a karotinoid festékek.

A nagy fényintenzitás mellett a fotoszintetizáló baktériumoknak számos egyéb kihívással (stressz hatással) is (pl.: nehézfém ionok jelenlétével) kell szembesülniük. A disszertációmban arra az alapvető kérdésre keresem a választ, hogy mely tényezők teszik az intakt fotoszintetizáló baktériumot, illetve annak reakciócentrumát kellően robusztussá és mégis rugalmassá ahhoz, hogy hatékonyan tudjon különböző körülmények között is működni.

Az eredményeimhez elsősorban a fotoszintetizáló baktériumból (ill. reakciócentrumból) fénygerjesztés hatására kiváltott Bkl fluoreszcencia sokirányú mérésével jutottam. Ez magában foglalta a prompt és a késleltetett fluoreszcencia határfokának kinetikai mérését, valamint a prompt fluoreszcencia relaxációjának, anizotrópiájának és spektrumának vizsgálatát. Megmutattuk, hogy mindezek a Bkl fluoreszcencia megfigyelésére alapozott módszerek együttesen képesek a baktérium ill. egyes fehérje-komplexek (reakciócentrum, fénybegyűjtő rendszerek) állapotában bekövetkező fiziológiai változások nyomon követésére.

Célkitűzések

A fotoszintetizáló bíborbaktériumok kitűnő modellként szolgálnak a fényindukált szerkezeti változások, az elektron- és protontranszfer, az elektrosztatikai folyamatok valamint az olyan károsító hatások elleni védelem tanulmányozására, mint a magas fényintenzitás és a nehézfémion-szennyezés. Emiatt a vizsgálataimat intakt fotoszintetikus bíborbaktériumokkal és izolált reakciócentrum fehérjével végeztem.

1. A bakteriális RC-ban néhány kulcsfontosságú aminosav módosításával közelebbről feltárhatjuk a fehérjemátrixnak az elektrontranszferben játszott szerepét. Ezért munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:
 - 1.1. Milyen energetikai változásokat idéznek elő a RC donor oldalán a dimernek a P_A és a P_B 2-acetil- és 9-ketocsoportjaihoz közeli pontmutációi, amelyek a hidrogénhid-kötések módosulásával járnak?
 - 1.2. Hogyan befolyásolják az akceptor oldalon a Q_A termodinamikai tulajdonságait a közelben és a vas ligandumban létrehozott aminosav mutációk?
 - 1.3. Hogyan módosul a tripla mutánsban ($LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}$) a Bkl prompt fluoreszcenciájának határfoka, anizotrópiája és indukciója? Az erre adott válaszból a RC fehérjén belüli, a Bkl dimer és Bkl monomer közötti energiáttranszfer jobb megértését várjuk.

A fenti kérdések megválaszolására a bakterioklorofill szelektív gerjesztésével (kvázi) steady-state (fluoreszcencia anizotrópia) és kinetikai (fluoreszcencia indukció, késleltetett fluoreszcencia) spektroszkópiai méréseket végeztem. Ezek a módszerek bizonyítottan megfelelő és érzékeny eljárások a bakteriális fotoszintézis kinetikai és termodinamikai jellemzőinek tanulmányozásához.

2. A nehézfém-ionok és közülük is a két vegyértékű higany-ion különösen kártékonyak az élővilágra, és ezen belül a fotoszintetizáló baktériumokra. Az utóbbiak egyszerűségüknél és molekuláris részletességgel feltárt működésüknél fogva (mint modellek) elsődlegesen alkalmasak a roncsoló hatások tanulmányozására. Általános célként tűztem ki a bakteriális RC fehérjéhez kötött Hg^{2+} ion által kiváltott hatásmechanizmusok felderítését, ezért arra az általános kérdésre keresem a választ, hogy milyen szerkezeti és funkcionális változásokat idéz elő, és ha azonosítható ezen vizsgálatok alapján, melyek a specifikus támadási helyek?
 - 2.1. Maga után von-e energetikai változásokat, ha a RC donor oldalához Hg^{2+} ion kötődik? Befolyásolja-e ez a másodlagos elektron donornak, a redukált citokrómra a RC-hoz való kötődését és az elektronnak az oxidált donorhoz való átadását?
 - 2.2. Milyen hatásokat vált ki a Hg^{2+} ionnak a RC akceptor oldalához való kötődése? Hogyan módosul a kinon-akceptor rendszer energetikája, a kinonok közti elektrontranszfer kinetikája és a proton-felvétel? Ezek mindegyike alapvető fontosságú a RC alapműködéséhez.
3. A nehézfémion-szennyezés mellett az erős fényintenzitás is a gyakori környezeti (stressz)hatások közé tartozik. A mechanizmusuk megértése és az ellenük való védelem tanulmányozása és kidolgozása napjainkban központi jelentőségűvé vált.
 - 3.1 Ennek jegyében feladatul tűztem ki, hogy a Bkl fluoreszcencia mérésére alapozva érzékeny módszert dolgozzak ki a gerjesztett triplétt állapotú Kar-ok és/vagy Bkl-ok mérésére. Elsősorban a fény-indukált karotinoid triplétek (^3Kar) keletkezésére és élettartamának mérésére koncentráltam, hogy ezzel feltérképezhessem a környezetükkel kialakított dinamikus kölcsönhatásukat.
 - 3.2 Célnak tekintetem, hogy a fotoszintetizáló baktériumok minél szélesebb körét vizsgálhassam, és állapíthassak meg minél általánosabb összefüggéseket. Ennek érdekében a kísérleteinkbe az alábbi baktériumokat vontuk be: *Rubrivivax (Rvx.) gelatinosus* (anaerob és semianaerob), *Rhodospirillum (Rps.) rubrum*, *Thiocapsa (Thio.) roseopersicina*, *Rhodobacter (Rba) sphaeroides* 2.4.1 valamint karotinoid és citokróm módosított mutánsokat: *Rba. sphaeroides* Ga, R-26 és *cycA*.
 - 3.3 Mivel intakt sejtekben a ^3Kar fényvédő funkciója nem csak a RC-ra korlátozódik, ezért logikusan adódik a kérdés, hogy a ^3Kar fotoprotektív működése leírható-e egy olyan modellel, amelyben a karotinoidok nem csupán a RC-ban (vagy annak közvetlen közelében vannak), hanem kiterjednek a Bkl pigmentek által meghatározott pigment-rendszerre (antenna-rendszerre)?
 - 3.4 Az intenzív fénygerjesztés hatására keletkező ^3Kar követi-e a fotokémiát (töltésszétválasztást) vagy azzal párhuzamos és attól független folyamat eredménye?
 - 3.5 Meghatározható-e a bakteriális törzsből különböző számú konjugált kettős kötéssel előforduló karotinoidok ismeretében a megfigyelt ^3Kar élettartam?
 - 3.6 Megfigyeltük, hogy a fénygerjesztés alatt mért ^3Kar élettartama lényegesen rövidebb, mint a sötétben mért ^3Kar élettartama. Mi lehet ennek az oka?

Anyagok és módszerek

Baktériumtörzsek tenyésztése

A munkám során *Rba. sphaeroides* bíbor nemkén fotoszintetikus baktériumokat Siström-féle tápoldatban (Siström 1960) neveltünk. A fotoszintetikus növekedésre képes törzsek (*Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum*, *Rvx. gelatinosus*, *Thio. roseospicina*) tenyészeit teljesen feltöltött üvegedényekben tartottuk oxigén nélküli környezetben, 40 W-os wolframszálas izzók fénye mellett. A megvilágítás erősségét 13 W/m^2 -re állítottuk. Az *Rba. sphaeroides* R26 karotinoid mentes mutáns esetében az átoltást követően a megvilágítás előtt a sejteket 5-8 órán keresztül sötétben tartottuk (Maróti és Wraight 1988b). A *Rvx. gelatinosus* törzset André Verméglio (CEA Laboratoire de Bioenergetique Cellulaire, Saint-Paul-lezDurance, France), a *Thio. roseospicina* törzset pedig Bagyinka Csaba (MTA-SZBK, Biofizikai Intézet) laboratóriumából kaptuk (Bagyinka és mtsai. 1981). A fotoszintetikus növekedésre képtelen, citokróm c_2 mentes *Rba. sphaeroides* *cycA* törzset (Timothy J. Donohue -tól, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin USA) rázóasztalon (1 Hz), sötétben, Erlenmeyer lombikokban neveltük ugyanabban a tápoldatban kanamycin és spectinomycin antibiotikumokkal kiegészítve, szemianaerob környezetben.

Fluoreszcencia indukció

Bíborbaktériumok bakterioklorofill fluoreszcenciájának (fluoreszcencia indukciójának) méréséhez $804 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ hullámhosszú lézer diódát használtam (Roithner Laser Technik LD808-2-TO3, 2 W), hiszen ez a hullámhossz nagyon közel van a LH2 antenna 800 nm-es abszorpciós maximumához (B800), illetve a RC monomer bakterioklorofill abszorpciós maximumához, így optimális a gerjesztés. A mérésekhez használt gerjesztő lézerfény profiljának fel/lefutási ideje $\sim 100 \text{ ns}$ volt, maximális intenzitása: $2,1 \text{ einstein/m}^2/\text{s}$, mely intenzitást kalibrált szűrőkkel csökkentettem. A Bkl fluoreszcencia hatásfokának és kinetikájának meghatározásához IR-806 (Sigma) fluoreszkáló festéket alkalmaztam referenciaként. A detektálást a gerjesztés irányára merőlegesen elhelyezett lavina fotodiódával (APD; model 394-70-72-581; Advanced Photonix, Inc., USA), ill. vörös-érzékeny fotoelektron sokszorozóval (PMT) (Hamamatsu R3310-03) végeztem. Az APD detektort 850 nm felett áteresztő szűrővel (Schott RG-850) a PMT-t monokromátorral (Jobin-Yvon H-20) védtem a szóródó lézerfénytől. A méréseket intakt baktériumok esetében 3 mm x 3 mm-es kvarc küvettában, RC esetén 1 cm x 1 cm-es kvarc küvettában végeztem, amit hőmérséklet-szabályozott mintatartóba helyeztem.

Fényindukált abszorpcióváltozások

A fényindukált abszorpcióváltozást egy házilag épített spektrofotométerrel (Maróti és Wraight 1988a) illetve annak kissé módosított változatával mértem. Az optikai gerjesztés Xe villanólámpával (EG&G FX200, félélettartama $8,5 \mu\text{s}$) vagy szabályozott áramgenerátorról működtetett lézerdiódával (Roithner LaserTechnik LD808-2-TO3, 808 nm, 2 W) történt. A

villanólámpa fényét 1 cm átmérőjű fényvezető plexirúd segítségével vezettem a mintát tartalmazó 1 cm x 1 cm-es kvarc küvetta oldalához (RC esetben), hogy a telítési gerjesztést biztosítsam. A lézerdióda fényét kollimátor lencsével párhuzamosítottam, hogy a mintát tartalmazó 3 mm x 3 mm-es kvarc küvettaiban lévő mintát homogén módon gerjesszem (egész sejtek esetében). A membrán energetizált állapotára utaló fényindukált elektrokróm jelet 510-600 nm-es hullámhossztartományban vettem fel. A detektáláshoz Hamamtsu R928 típusú fotoelektron-sokszorozót használtam. A nem gerjesztő intenzitású mérőfényt egy stabilizált áramforrásról táplált halogén izzó szolgáltatotta (12 V, 100 W). Az izzólámpa fényét kondenzor lencsével egy monokromátor (Jobin-Yvon H20 VIS ill. VIS-IR) belépő részére fókuszáltam, míg a kilépő részt a mintatartóban elhelyezett küvetta keresztül egy másik monokromátor (Jobin-Yvon H20 VIS ill. VIS-IR) belépő részére képeztem, majd a kilépő részt a fotoelektron-sokszorozó fotokatódjára képeztem le. Izolált RC esetben a töltésrekombinációt a 430 nm-nél vagy 865 nm-nél, az első elektrontranszfert 402 nm-nél és a második elektrontranszfer kinetikáját 450 nm-es hullámhosszon fényindukált abszorpcióváltozással követtem nyomon, egy házilag épített spektrofotométerrel (Maróti és Wraight 1988a).

Spektrofotometria

A minták abszorpciós spektrumát Helios γ típusú spektrofotométerrel vettem fel. A méréseket 1 cm optikai úthosszú küvettaikkal végeztem. A spektrumok felvételekor referenciaként minden esetben a vizsgált anyagot (fehérjét, fluorofórt) nem tartalmazó puffert használtam. Intakt baktériumok esetén a sejtek által keltett fényszórásra korrigáltam a távoli vörös tartományban (ahol már nincs a pigmenteknek számottevő elnyelése) észlelt (látszólagos) abszorpció-csökkenés menetének felhasználásával.

Késleltetett fluoreszcencia

Izolált RC esetben, amennyiben gátlószer segítségével blokkoljuk a másodlagos kinon kötőhelyet, a RC által kibocsátott késleltetett és prompt fluoreszcencia integrált intenzitás viszonyai alapján meg tudjuk határozni a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbséget (Turzó és mtsai. 2000; Filus és mtsai. 2004; Maróti és Wraight 2008; Asztalos és Maróti 2009). Erre az ad lehetőséget, hogy a töltésszeparált $P^+Q_A^-$ és a P^* gerjesztett állapotok között mindig termikus egyensúly áll be, ezért a szintek populációit Boltzmann eloszlással lehet leírni. Ezt tartalmazza az Arata és munkatársai. által megadott összefüggés (Arata és Parson 1981):

$$\Delta G_{P^*Q_A}^0 = k_B T \cdot \ln \left(\frac{\int F_{DL}(t) dt}{\int F_{PF}(t) dt} \cdot \frac{k_{DL}}{k_{fl}} \cdot \frac{\eta_{fl}}{\eta_{ph}} \right) \quad (1)$$

ahol $\Delta G_{P^*Q_A}^0$ - két állapot közötti szabadenergia-különbség, $\int F_{DL}(t) dt$ és $\int F_{PF}(t) dt$ a késleltetett és prompt fluoreszcencia integrált intenzitása, ugyanabban a mintában mérve, k_B – Boltzmann állandó, T - hőmérséklet, η_{ph} – fotokémiai csapdázódás hatásfoka (≈ 1 , (Wraight és Clayton 1974)), η_{fl} – a gerjesztett dimer prompt fluoreszcenciájának hatásfoka RC-ban ($4,0 \cdot 10^{-4}$,

(Woodbury és mtsai. 1985)), k_{fl} a bakterioklorofill sugárzási sebességi állandója ($8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, a Strickler-Berg összefüggés alapján, (Arata és Parson 1981; McPherson és mtsai. 1990)), k_d – késleltetett fluoreszcencia sebességi állandója, késleltetett és prompt fluoreszcenciához tartozó A amplitúdó és τ élettartam (indexben D és P), $t_{szűrő}$ a prompt fluoreszcencia mérése során alkalmazott mikroszkóp tárgylemezek és szürke-szűrő transzmissziója.

Cirkuláris dikroizmus

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumokat 500 nm-től 900 nm-ig terjedő spektrális tartományon mértem JASCO 815 spektropolariméterrel. A RC-ot tartalmazó mintákat TL-pufferben (10 mM Tris, 0,03% LDAO, pH 8) oldottam fel. A RC koncentrációja minden esetben 3 μM volt (RC abszorpcióspektruma 802 nm-nél ~ 1 OD). A méréseket szobahőmérsékleten 1 cm-es optikai úthosszú kvarc küvettában végeztem.

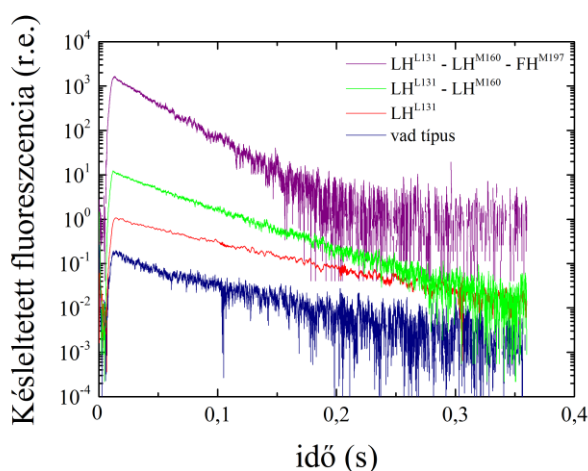
Elektrokémiai redox-titrálás.

A spektroelektrokémiai cella (SEC) egy háromelektrodos polimetil metakrilát anyagból házilag készült elektrokémiai cella (Mäntele 1993). A SEC feladata kettős: egyrészt biztosítja, hogy a minta redoxpotenciálja a potenciosztáton (PGSTAT10 - Metrohm-Autolab) beállított értéket vegye fel, másrészt, hogy a benne lévő oldat abszorpcióspektrumának változásait nyomon lehessen követni. A munkaelektroda egy hozzávetőlegesen 55 %-os transzmissziójú aranyfólia, mely a cella akril falára simul rá úgy, hogy elektromos kontaktusban van egy körben meghajlított platina szállal. Az optikai úthossz, vagyis a mintatér rétegvastagsága körülbelül 50 μm , térfogata 200 μL . A SEC-ban használt referencia elektróda egy Ag/AgCl elektróda, potenciálja 208 mV a standard hidrogén elektródhoz képest. A RC-ot tartalmazó oldat redox aktív molekulát (redox mediátort: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ kálium ferricianidot) tartalmazott 150 μM koncentrációban, valamint felületmódosítóként bipyridint (4,4'-Bipyridine) 1 mM koncentrációban. Az ellenelektrodot ugyanabba az oldatba merítettük, mint amibe a RC került.

Tézispontok

1. *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumában donor- és akceptor-oldali célzott aminosav mutációkkal a P^* és $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség szisztematikus megváltozását lehet előidézni [1].

Az abszorbeált fényenergia fotokémiai hasznosítását a RC-ban a $P^+Q_A^-$ primer stabil töltéspár szabadenergia-állapota szabályozza. A töltésszétválasztás szabadenergia szintje jelentősen módosul kulcsfontosságú helyeken lévő aminosavak mutációjával a RC donor és akceptor oldalán. Ennek bizonyítására a RC fehérje különböző helyein, célzottan alakítottunk ki aminosav mutációkat. A dimer késleltetett fluoreszcenciájának kinetikáját különböző mutáns reakciócentrumokon vizsgáltam.



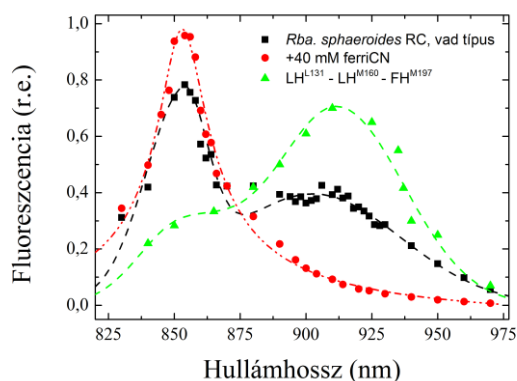
1. ábra. A donor oldali szimpla (LH^{L131}), dupla ($LH^{L131} - LH^{M160}$) és tripla ($LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}$) hisztidin mutáns késleltetett fluoreszcenciájának kinetikája logaritmusos ábrázolásban. A mutációk számának növekedésével a DL növekedése figyelhető meg a vad típusú RC-hoz képest. Feltételek: 2 μ M RC; 100 mM NaCl; 10 mM Tris; 0,03% LDAO, 120 μ M terbutrin, pH 8. A fluoreszcencia megfigyelési hullámhossza 915 ± 10 nm.

Megfigyeltem, hogy valamennyi kiválasztott mutáns esetében (LH^{L131} ; HL^{M202} ; $LH^{L131} - LH^{M160}$; $LH^{L131} - HL^{M202}$; $LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}$; IT^{M265} ; EH^{M234} ; EL^{M234} ; EA^{M234} ; ER^{M234}) nőtt a P^* és $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség a vad típusú RC-hoz képest. Az energia növekedés a donor oldali mutációk esetében – a hidrogén kötések növekedésével – lépcsőzetes: a tripla mutáns körülbelül kétszer akkora növekedést mutat a vad típusú RC-hoz képest, mint a dupla mutáns.

A kinon-oldali mutációk (Ile^{M265} és a Glu^{M234} helyen) látszólag módosítják a fényindukált protonfelvételt, mely protonfelvétel a Q_B közelében lévő savas klaszterből történik, melyben a protonálható csoportok közötti kapcsolat antikooperatív. A P^* és $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség pH-függő változását vizsgálva megfigyeltem, hogy az IT^{M265} mutáns RC nagyfokú analógiát mutat a vad típusú RC-hoz képest. Ez arra enged következtetni, hogy a Q_A környezetében lévő hidrogénhíd hálózat és a savas klaszter nem változik az IT^{M265} mutációval. Azonban az EX^{M234} (ahol X = H, L, A és R) mutánsok jelentős hatást gyakorolnak a vas ligandumra és a hidrogénhíd-kötések hálózatára, továbbá nem mutatnak stabilizálódást (helyette enyhe destabilizációt) a pH csökkentésével.

2. A *Rba. sphaeroides* reakciócentrumában az LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197} hármas mutáció a monomer bakterioklorofill fluoreszcencia hatásfokát nagymértékben csökkenti, és a dimerét kétszeresére növeli, ugyanakkor dimer prompt fluoreszcencia tulajdonságait – a spektrumot, az átmeneti dipólusok orientációját és erősségét, a Stokes-shift nagyságát –nem módosítja [2].

A *Rba. sphaeroides* bíbor fotoszintetikus baktérium reakciócentrumában a helyspecifikus mutáció módosítja a dimer energetikáját és destabilizálja a P⁺Q_A⁻ primer töltéspárt, mindezek következtében megváltozik a kölcsönhatás (csatlotság) a monomer (B) és a dimer (P) Bkl között.



2. ábra. *Rba. sphaeroides* vad típusú és tripla mutáns (LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}) RC fluoreszcencia indukció spektrális változásai 808 nm-es hullámhosszú lézerdioda gerjesztéssel. A vad típusú (fekete pontok) és a mutáns (zöld pontok) RC fluoreszcencia spektruma, ahol a dimer redukált állapotban van, valamint a RC fluoreszcencia spektruma a dimer kémiai oxidált állapotában (piros pontok).

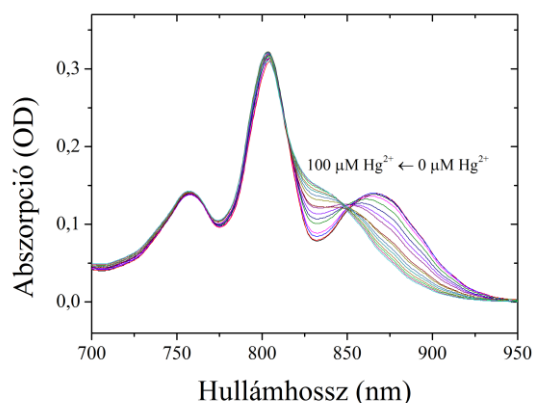
A 800 nm-es abszorpció sáv szelektív gerjesztésével két jól kivehető fluoreszcencia sáv jelenik meg 850 nm-nél és 910 nm-nél, amelyek a ¹P₂^{*} és ¹B^{*} állapotokról alapállapotra történő átmeneteinek tulajdoníthatóak. Ezeken a hullámhosszakon megfigyelt fluoreszcencia indukció kinetikája figyelemreméltó változásokat mutat. A 910 nm-nél és 850 nm-nél megfigyelhető fluoreszcencia kinetikák ellentétes alakja, de megegyező esési és emelkedési ideje egyértelmű bizonyítéka a ¹B^{*}-ről a dimérré történő elektrongerjesztési energia átadásának.

A 865 nm-es sáv direkt gerjesztésével elért dimer fluoreszcencia anizotrópiája mind a vad típusú, mind a mutáns RC-ban magas (~ 0,4) és nem mutat hullámhosszfüggést. A B és P₂ gerjesztése 808 nm-es lézerdiodával a megfigyelt hullámhossztartományon a fluoreszcencia hullámhosszfüggő depolarizációját eredményezi 0,35-ről 0,24-re a vad típus esetében és 0,3-ről 0,24-re a tripla mutáns esetében. A Bkl fluoreszcenciájának anizotrópiája keveredik a dimer direkt és nem direkt gerjesztésével kapottal. A ¹B^{*}-ről a ¹P₂-re történő gerjesztési energiáttranszfer depolarizálja a nem közvetlenül gerjesztett dimer fluoreszcenciát.

A dimer környezetében kialakított mutáció (LH^{L131} - LH^{M160} - FH^{M197}) nem változtatja meg a RC közeli infravörös abszorpciós spektrumát, de jelentősen módosítja a fluoreszcencia spektrumát és indukciós kinetikáját. Míg a 850 nm-nél levő Bkl fluoreszcencia hatásfoka drámaian csökken, addig a 910 nm-nél megfigyelhető dimer fluoreszcencia hatásfoka kétszeresére nő.

3. *Rhodobacter sphaeroides* izolált reakciócentrumához kötődő Hg^{2+} ion megváltoztatja a dimer körüli hidrogén kötések hálózatát, de ennek nincs hatása a citokróm dokkolására, valamint gátolja az elektrontranszfert és a protonfelvételt a RC akceptor oldalán [3].

Megfigyeltem, hogy a RC abszorpció spektrumának dimer sávja (865 nm) a Hg^{2+} kezelés hatására ($\sim 100 [\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$) 30 nm-rel eltolódik a kék tartomány felé (835 nm-re), az abszorpció maximumának csökkenése nélkül. Míg a monomer Bkl (802 nm) és a Bfeo (760 nm-en) abszorpció sávjainak pozíciói és amplitúdói változatlanok maradnak, a dimer sáv eltolódása jól felismerhető izoszbesztikus pontot mutat.



3. ábra. *Rba. sphaeroides* 2.4.1 RC dimer steady-state abszorpció sávjának kékeltolódása a Hg^{2+} koncentráció növelésének hatására. Feltételek: 1 μM RC TL-pufferben, HgCl_2 0-100 μM -ig titrálva.

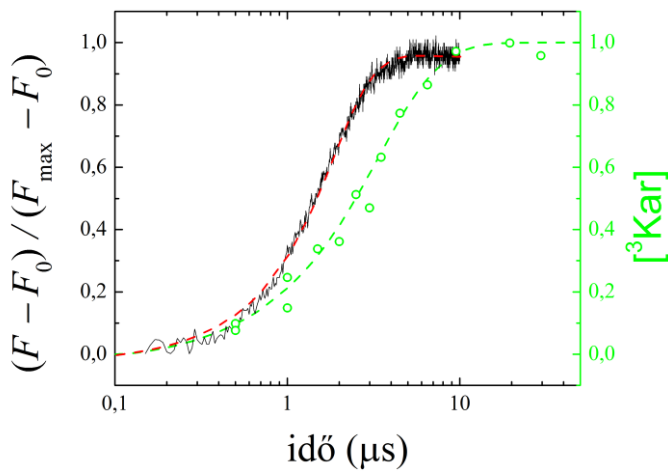
A RC 100 $[\text{Hg}^{2+}]/[\text{RC}]$ -mal való kezelése után a RC P/P^+ középponti redoxpotenciálja E_m ~ 545 mV-ra tolódott el. Azaz a vad típusú RC P/P^+ középponti redoxpotenciáljához képest (E_m ~ 500 mV) a dimerhez közel kötött Hg^{2+} ion elektrosztatikus hatása következtében E_m 47 ± 12 mV-tal emelkedett, mely a várakozásoknak megfelel, hiszen a P/P^+ és a P^*/P^+ energiaszintje közötti különbségnek körülbelül 49 meV-tal kell nőnie a megfigyelt 30 nm-es kékeltolódás miatt. Ez a donor oldali (elektrosztatikai) hatás nem módosítja a redukált cit c^{2+} kötési tulajdonságait, hiszen a különböző Hg^{2+} és cit c^{2+}/RC koncentrációk mellett megfigyelt kinetikák nagyon hasonló viselkedést mutattak a Hg^{2+} ion jelenlétében és hiányában.

Kísérleti eredmények alapján megállapítottam, hogy a Hg^{2+} ionnak a citoplazmikus oldalon a protonkapuhoz a legnagyobb affinitása ($K \sim 0,2 (\mu\text{M})^{-1}$), melynek eredményeképp gátolja a protonfelvételt. Megfigyeltem, hogy a másodlagos kinonhoz közeli kötőhelyhez kisebb affinitással ($K \sim 0,05 (\mu\text{M})^{-1}$) kötődik a Hg^{2+} ion, és a kinonok közti elektrontranszfert gátolja feltehetően a Q_B konformációs állapotának megváltoztatásával.

A Hg^{2+} ion által okozott, a primer akceptor kinon energetikájában bekövetkező változásokat a dimer által emittált késleltetett fluoreszcencia mérésekkel is nyomon követtem és megállapítottam, hogy a P^*/P^+ szabadenergia szintje sokkal enyhébb változást mutatott a dimer P/P^+ középponti redoxpotenciáljához képest. Továbbá a Q_A/Q_A^- energiaszintje sem mutatott nagyfokú érzékenységet a Hg^{2+} -ra. A független energetikai mérések egyértelműen mutatják, hogy a Hg^{2+} ion sokkal nagyobb energetikai változásokat idéz elő a RC donor oldalán, mint az akceptor oldalán.

4. Intakt fotoszintetizáló baktériumsejtekben a fényel kiváltott fotokémiai és karotinoid triplett kioltók nem egymást követően (nem soros módon), hanem egyidejűleg (párhuzamosan) keletkeznek [4,5].

Kísérleteimben a fény-indukált karotinoid tripletek (^3Kar) keletkezését és élettartamát a bakterioklorofill (Bkl) fluoreszcencia megfigyelésével vizsgáltam.

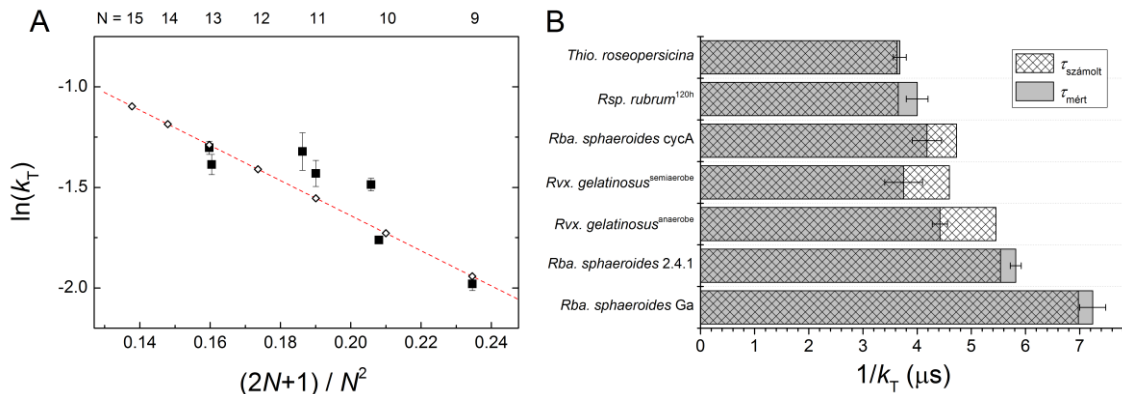


5. ábra. Fotokémiai és karotinoid triplett képződési folyamatok versengése. A normalizált Bkl fluoreszcencia (indukció) és a karotinoid triplett (^3Kar) képződésének (triplett kioltás) egyidejű keletkezése *Rba. sphaeroides* 2.4.1 egész sejtben. Mindkét kinetika telítésbe megy, valamint egymáshoz képest időbeli eltolódás figyelhető meg.

Vizsgálataim során megfigyeltem a Bkl fluoreszcencia intenzitás ^3Kar általi kioltását a fotokémiai emelkedés alatt és nem csak azt követően, mely arra enged következtetni, hogy a reakciócentrumban (RC) a töltésszétválasztás és a karotinoid triplett keletkezése nem egymást követő, hanem párhuzamos folyamat. Bkl fluoreszcencia mérésére alapozva érzékeny módszert dolgoztam ki a gerjesztett triplett állapotú Kar-ok és/vagy Bkl-ok mérésére. Elsősorban a fény-indukált karotinoid tripletek (^3Kar) keletkezésére és élettartamának mérésére koncentráltam, hogy ezzel feltérképezhessem a környezetükkel kialakított dinamikus kölcsönhatásokat. Mivel a sejtekben a ^3Kar fényvédő funkciója nem csak a RC-ra korlátozódik, ezért a ^3Kar fényvédő funkciójának leírására egy olyan modellt dolgoztunk ki, melyben a karotinoidok a Bkl pigmentek által meghatározott pigment-rendszerben (antenna-rendszerben) oszlanak el.

5. Különböző fotoszintetikus bíborbaktériumokban meghatároztam a különböző lánchosszúságú konjugált kettős kötésű karotinoidok gerjesztett tripllett állapotának lecsengési sebességét, és megfelelő reprezentációban lineáris összefüggést találtam közöttük [5].

A Bkl fluoreszcencia mérésére alapozott módszerrel különböző fotoszintetikus baktériumokban meghatároztam a fényindukált karotinoid triplettek (^3Kar) élettartamát, köztük *Rvx. gelatinosus* (anaerob és semianaerob), *Rsp. rubrum*, *Thio. roseopersicina*, *Rba. sphaeroides* 2.4.1 valamint karotinoid és citokróm módosított mutánsokkal: *Rba. sphaeroides* Ga, R-26 és *cycA*.



6. ábra. Különböző számú (N) konjugált kettős kötést tartalmazó karotinoidok tripllett relaxációs sebességi állandói (k_T) intakt fotoszintetikus baktériumban. (A) különböző lánchosszúságú karotinoid tripllett sebességi állandók természetes alapú logaritmusai (\diamond) (a B panelen felsorolt különböző törzsek ^3Kar relaxációs idejéből és Kar összetételéből alkotott lineáris egyenletrendszerből származtatva), valamint a ^3Kar sebességi állandóinak logaritmusai a különböző törzsekben található különböző lánchosszúságú Kar -ok súlyozott átlagának függvényében (\blacksquare). (B) A mért és számított ^3Kar relaxációs sebességi állandóinak összehasonlítása különböző törzsekben.

Mivel a baktériumok különféle karotinoidokat, és változó összetételben tartalmaznak, ezért a megfigyelt karotinoid tripllett relaxáció sebességi állandója a különböző törzsekben a megfelelő karotinoid frakcióval súlyozott sebességi állandók összege. Ezek alapján, figyelembe véve a különböző törzsek karotinoid tartalmát és a megfigyelt relaxációs sebességekre lineáris egyenletrendszert felírva, kiszámítottam a különböző lánchosszúságú karotinoidok tripllett élettidejét.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

[1] Onidas D., **Sipka G.**, Asztalos E., Maróti P. (2013) Mutational control of bioenergetics of bacterial reaction center probed by delayed fluorescence, *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics*, 1827 1191-1199. IF=4,932; Biophysics D1

[2] **Sipka G.**, Maróti P. (2016) Induction and anisotropy of fluorescence of reaction center from photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Photosynth. Res.*, 127 61-68. IF=3,864, Plant Science Q1

[3] **Sipka G.**, Kis M., Maróti P. (2017) Emergence of mercury(II)-induced inhibition of photochemistry in the reaction center of photosynthetic bacteria, *Photosynth. Res.*, IF(2016)= 3,864, Plant Science Q1, *submitted*

[4] **Sipka G.**, Kis M., Smart J., Maróti P. (2017) Fluorescence induction of photosynthetic bacteria, *Photosynthetica*. IF(2016)=1,507, Plant Science Q2, *in press*

[5] **Sipka G.**, Maróti P. (2017) Photoprotection in intact cells of photosynthetic bacteria: quenching of bacteriochlorophyll fluorescence by carotenoid triplets, *Photosynth. Res.*, IF(2016)= 3,864, Plant Science Q1, *in press*

Egyéb közlemények

1. Kis M., **Sipka G.**, Maróti P. (2017) Stoichiometry and kinetics of mercury uptake by photosynthetic bacteria, *Photosynthesis Research* 132:(2) pp. 197-209. Plant Science Q1
2. Kis M., **Sipka G.**, Ayaydin F., Maróti P., (2017) The biophysics of a critical phenomenon: colonization and sedimentation of the photosynthetic bacteria *Rubrivivax gelatinosus*. *European Biophysics Journal*. doi:10.1007/s00249-017-1236-4
3. Asztalos E., **Sipka G.**, Maróti P. (2015) Fluorescence relaxation in intact cells of photosynthetic bacteria: donor and acceptor side limitations of reopening of the reaction center, *Photosynthesis Research*, 124 31-44. IF=4,122; Plant Science Q1
4. Kis M., **Sipka G.**, Asztalos E., Rázga Zs., Maróti P. (2015) Purple non-sulfur photosynthetic bacteria monitor environmental stresses, *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 151 110-117. IF=3,035; Biophysics Q2
5. Kis M., Asztalos E., **Sipka G.**, Maróti P. (2014) Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells, *Photosynthesis Research*, 122 261-273. IF=3,502; Plant Science Q1
6. Maróti P., Asztalos E., **Sipka G.** (2013) Fluorescence Assays for Photosynthetic Capacity of Bacteria, *Biophysical Journal*, 104 545a-545a. IF=3,632; Biophysics Q1
7. Asztalos E., **Sipka G.**, Kis M., Trotta M., Maróti P. (2012) The reaction center is the sensitive target of the mercury(II) ion in intact cells of photosynthetic bacteria, *Photosynthesis Research*, 112 129-140. IF=4,122; Plant Science Q1

Tanulmányi utak

PicoQuant's Microscopy Course - 9th European Short Course on "Time-resolved Microscopy and Correlation Spectroscopy" 2017. 02. 28. – 03.02.

EBSA Biophysics Course on: "Membranes and Lipid-protein interactions" Montpellier, Franciaország, 2014. 09. 08-12.

LAMELIS Lasers in Medicine and Life Sciences Szeged, Magyarország, 2014. 07. 14-25.

COST Action on "Molecular machineries for ion translocation across biomembranes" Lisszabon, Portugália, 2013. 03. 15-19.

Előadások

P. Maróti, **G. Sipka**, P. Sebban, C.A. Wraight, Bioenergetics of bacterial reaction center protein, Szent-Györgyi Albert Konferencia, Molecular Biology & Genetics section, 2012. Szeged, Hungary.

Péter Maróti, Asztalos Emese, **Gábor Sipka**, Delphine Onidas, Light-induced proton uptake in reaction center of photosynthetic bacteria: Role of the bacteriopheophytine and donor side mutation. COST Action on "Molecular machineries for ion translocation across biomembranes" (CM0902). 2012. Bari, Italy.

Sipka Gábor, Maróti Péter. Bacterial reaction center as a model protein for the detection of heavy metal ion contamination. COST Action on "Molecular machineries for ion translocation across biomembranes" Lisszabon, Portugália, 2013. 03. 15-19.

Sipka Gábor, Maróti Péter. Bacterial reaction center as a model protein for the detection of heavy metal ion contamination. EBSA Biophysics Course on: "Membranes and Lipid-protein interactions" Montpellier, Franciaország, 2014. 09. 08-12.

Magyar Melinda, **Sipka Gábor**, Kovács László, Ughy Bettina, Qingjun Zhu, Guangye Han, Vladimír Špunda, Petar H. Lambrev, Jian-Ren Shen és Garab Győző. Fényindukált konformáció-változások igazolása a második fotokémiai rendszer reakciócentrumában klorofill fluoreszcencia tranziensek mérésével. MBFT XXVI. Kongresszusa. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2017. 07. 22-25.

Sipka Gábor, Kis Mariann, Maróti Péter. A fotoszintetizáló baktériumok fluoreszcenciájának kinetikai összetevői. MBFT XXVI. Kongresszusa. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2017. 07. 22-25.

Steinbach Gábor, **Sipka Gábor**, Garab Győző. Differenciálpolarizációs lézerpásztázó mikroszkóp (DP-LSM) biológiai alkalmazása anizotróp szerkezetek feltárásában. MBFT XXVI. Kongresszusa. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2017. 07. 22-25.

Poszterek

Maróti P, **Sipka G**, Asztalos E, Kis M- A higanyszennyezés támadási pontjai és mechanizmusai fotoszintetizáló baktériumokban. (Multiple effects of mercury (II) ion on bacterial reaction center: Biophysical study) A Magyar Anatómus Társaság, a Magyar Biofizikai Társaság, a Magyar Élettani Társaság, és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa. Debrecen, 2012. 06. 10-13

- Gábor Sipka**, Péter Maróti - Bacterial reaction center as a model protein for the detection of heavy metal ion contamination. COST Action CM0902 Training School - Molecular machinery in membranes, Lisbon, 2013. 03. 15-18.
- Sipka Gábor**, Maróti Péter - Interactions of protonatable groups and light-induced charges in photosynthetic reaction center. MBFT XXIV. Kongresszusa. Veszprém, 2013. 08. 27-30.
- Kis Mariann, Asztalos Emese, **Sipka Gábor**, Rázga Zsolt, Maróti Péter: Környezeti stressz hatásai fotoszintetizáló baktériumokra, Magyar Biofizikai Társaság XXV. Kongresszusa, 2015 aug. 26-28. Budapest
- Gábor Steinbach, **Gábor Sipka**, András Barta, István Pomozi, Győző Garab. 16th ELMF congress: Transform your Laser Scanning Microscope to Differential-Polarization Laser Scanning Microscope. Konferencia helye, ideje: Debrecen, Magyarország, 2016.05.24-27.
- Magyar Melinda, **Sipka Gábor**, Kovács László, Ughy Bettina, Qingjun Zhu, Guangye Han, Vladimír Špunda, Petar H. Lambrev, Jian-Ren Shen és Garab Győző. Light-induced conformational changes in photosystem II reaction centers – as revealed by chlorophyll fluorescence transients. Sfphi2017. Meeting of the French Photosynthesis Society. Paris (France) 2017. 06. 1-2.
- Kis Mariann, **Sipka Gábor**, Maróti Péter. Rubrivivax gelatinosus sejtek higanyfelvételének kinetikája és sztöchiometriája. MBFT XXVI. Kongresszusa. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2017. 07. 22-25.
- Sipka Gábor**, Maróti Péter. Erős fény elleni védelem intakt fotoszintetizáló baktériumokban: hogyan oltják ki a bakterioklorofill fluoreszcenciát a karotenoid tripletek? MBFT XXVI. Kongresszusa. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2017. 07. 22-25.

Irodalomjegyzék

- Arata H, Parson WW (1981) Delayed fluorescence from *Rhodospseudomonas sphaeroides* reaction centers - Enthalpy and free-energy changes accompanying electron-transfer from P870 to quinones. *Biochim Biophys Acta* 638 (2):201-209. [doi:10.1016/0005-2728\(81\)90228-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90228-0)
- Asztalos E, Maróti P (2009) Export or recombination of charges in reaction centers in intact cells of photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1787 (12):1444-1450. [doi:10.1016/j.bbabi.2009.06.007](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.007)
- Bagyinka C, Kovacs KL, Rak E (1981) Localization of hydrogenase in the photosynthetic membrane of *Thiocapsa roseopersicina*. *Acta Biochim Biophys* 16 (3-4):235-235
- Blankenship RE (2014) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 2nd edn. Wiley-Blackwell,
- Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H (1984) X-ray structure-analysis of a membrane-protein complex - electron-density map at 3Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* 180 (2):385-398. [doi:10.1016/S0022-2836\(84\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(84)80011-X)
- Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD (eds) (2012) *Photosynthesis - Plastid biology, energy conversion and carbon assimilation*. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 34. Springer, Netherlands. [doi:10.1007/978-94-007-1579-0](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1579-0)
- Filus Z, Laczkó G, Wraight CA, Maróti P (2004) Delayed fluorescence from the photosynthetic reaction center measured by electronic gating of the photomultiplier. *Biopolymers* 74 (1-2):92-95. [doi:10.1002/bip.20051](https://doi.org/10.1002/bip.20051)

- Govindjee, Beatty JT, Gest H, Allen JP (eds) (2005) Discoveries in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 20. Springer, Netherlands. [doi:10.1007/1-4020-3324-9](https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9)
- Mäntele W (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction-mechanisms. Trends Biochem Sci 18 (6):197-202. [doi:10.1016/0968-0004\(93\)90186-Q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90186-Q)
- Maróti P, Wraight CA (1988a) Flash-induced H⁺ binding by bacterial photosynthetic reaction centers - comparison of spectrophotometric and conductimetric methods. Biochim Biophys Acta 934 (3):314-328. [doi:10.1016/0005-2728\(88\)90091-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90091-6)
- Maróti P, Wraight CA (1988b) Flash-induced H⁺ binding by bacterial photosynthetic reaction centers - influences of the redox states of the acceptor quinones and primary donor. Biochim Biophys Acta 934 (3):329-347. [doi:10.1016/0005-2728\(88\)90092-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90092-8)
- Maróti P, Wraight CA (2008) The redox midpoint potential of the primary quinone of reaction centers in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides* is pH independent. European Biophysics Journal : EBJ 37 (7):1207-1217. [doi:10.1007/s00249-008-0301-4](https://doi.org/10.1007/s00249-008-0301-4)
- McPherson PH, Nagarajan V, Parson WW, Okamura MY, Feher G (1990) pH dependence of the free energy gap between DQ_A and D⁺Q_A⁻ determined from delayed fluorescence in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. Biochim Biophys Acta 1019 (1):91-94. [doi:10.1016/0005-2728\(90\)90128-Q](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90128-Q)
- Niedermaier RA (2017) Photosynthesis in the Purple Bacteria. In: Hallenbeck PC (ed) Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics. Springer International Publishing, Cham, pp 193-224. [doi:10.1007/978-3-319-51365-2_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51365-2_6)
- Siström WR (1960) A requirement for sodium in the growth of *Rhodospseudomonas spheroides*. J Gen Microbiol 22:778-785. [doi:10.1099/00221287-22-3-778](https://doi.org/10.1099/00221287-22-3-778)
- Turzó K, Laczkó G, Filus Z, Maróti P (2000) Quinone-dependent delayed fluorescence from the reaction center of photosynthetic bacteria. Biophys J 79 (1):14-25. [doi:10.1016/S0006-3495\(00\)76270-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76270-9)
- Woodbury NW, Becker M, Middendorf D, Parson WW (1985) Picosecond kinetics of the initial photochemical electron-transfer reaction in bacterial photosynthetic reaction centers. Biochem 24 (26):7516-7521. [doi:10.1021/Bi00347a002](https://doi.org/10.1021/Bi00347a002)
- Wraight CA, Clayton RK (1974) The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophyll photooxidation in reaction centres of *Rhodospseudomonas spheroides*. Biochim Biophys Acta 333 (2):246-260. [doi:10.1016/0005-2728\(74\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(74)90009-7)

