



Ph.D. disszertáció tézisei

**A KINON-AKCEPTOR KOMPLEX MŰKÖDÉSE
FOTOSZINTETIZÁLÓ BAKTÉRIUMOK
REAKCIÓCENTRUMAIBAN**

Tandori Júlia

Témavezető: Dr. Maróti Péter, egyetemi tanár

József Attila Tudományegyetem Biofizikai Tanszéke

Szeged, 1997

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

Az élőlények az élettevékenységükhöz felhasznált energiát közvetlenül vagy közvetett módon a fotoszintézis termékeiből szerzik. A fotoszintézis során a Nap fényenergiája redoxreakciókat követően kémiai energiává alakul át szénhidrátok képződése révén. Ez a bonyolult folyamat sok fehérje összehangolt működését feltételezi. Az elsődleges fényreakciók a reakciócentrumnak (RC) nevezett fehérjekomplexben játszódnak le. Ez a membránba ágyazódott parányi "napelemnek" fogható fel, amelyben közel egységnyi kvantumhatásfokkal fényindukált töltésszétválasztás megy végbe: az elsődleges elektrondonor (klorofill vagy bakterioklorofill dimer (P)) egy foton elnyelésével gerjesztődik, majd róla elektron válik le, ami közbülső akceptorokon keresztül a végső elektronakceptorra kerül. Ennek különböző típusai ismertek, ami szerint a RC-ok két osztályba sorolhatók:

- vas-kén centrumot tartalmazó (I. típusú),
 - a nem-oxigéntermelő kén zöldbaktériumok és a heliobaktériumok RC-ai;
 - az oxigéntermelő szervezetek első fotokémiai rendszere (PS1).
- a kinon-akceptor komplexben stabil szemikinonokat létrehozó (II. típusú):
 - a kén- és nem-kén bíborbaktériumok RC-ai;
 - a nem-kén zöldbaktériumok RC-ai;
 - az oxigéntermelő szervezetek második fotokémiai rendszere (PS2).

A II. típusú RC-okban mind a fehérjealegységek (L és M, ill. D1 és D2), mind a kofaktorok (kinonok és egyéb redoxaktív pigmentek) közötti hasonlóság már régóta ismert. A bíborbaktériumok RC-ának kikristályosítása lehetővé tette szimmetrikus szerkezetének atomi feloldású meghatározását. Ez a magasabbrendű növények fotoszintézisének megismerésében is nagy előrelépést jelentett, mivel a fent említett hasonlóságok alapján a bakteriális RC-ot a PS2 RC (szerkezeti) modelljeként használták fel.

A kinonok az elektrontranszport-lánc különleges "építőkövei". Viszonylagosan nagy koncentrációjuk, laterális és transzverzális mozgékonyaságuk a membránban lehetővé teszik, hogy kiemelt elektron- és protonhordozó szerepet játsszanak a membránhoz kötött elektrontranszfer komponensek között mind a légzési, mind a fotoszintetikus energia-átalakításban.

A kinonok azon tulajdonságai, amelyek különösen fontosak az elektrontranszfer

komponensekkel való kölcsönhatásokban, jól szemléltethetők a szerkezetükben azonos, de működésükben eltérő két kinon molekulával egyes bakteriális RC-okban. Az elsődleges kinon-akceptor (Q_A) helyhez kötött, míg a másodlagos kinon-akceptor (Q_B) a helyét elhagyva végzi a fehérjekomplexek közötti elektron- és protonszállítást. Az a tény, hogy a Q_B -kötőhelyhez a kinon lazán kötődik, egyes molekulák számára lehetővé teszi annak kiszorítását. Ezek közé tartozik számos gyomirtószer, pl. a triazin-, urea- és fenol-típusú PS2 herbicidek, amelyek a kinonnal versenyeznek a Q_B -kötőhelyért. A baktériumok elektrontranszferét mind a triazin (atrazin, terbutrin) mind az urea (diuron) típusú herbicidek gátolhatják.

A másodlagos kinon-akceptor működését redox, protonációs és kötési sajátosságok jellemzik. Ezeket egyrészt a Q_B -kötőhelyre beépült kinon kémiai természete, másrészt a Q_B -kötőhelyet kialakító aminosav-oldalláncok tulajdonságai határozzák meg, amit különböző RC-on belüli (fajra jellemző vagy mutáció következtében kialakult) vagy környezeti tényezők (pH, UV-sugárzás, lipidkörnyezet) befolyásolhatnak. A Q_B szerepe és jelentősége (beleértve a protonációt, a herbicid-, és kinonkötést) elsősorban a kötőhelye közelében található aminosavak mesterségesen kiváltott mutációjával vizsgálható, de kapcsolatba hozható makroszkópikus (környezeti) hatásokkal is.

A környezeti tényezők közül az utóbbi években előtérbe került az UV-B-sugárzás, mivel az ózonpajzs vastagságának csökkenése miatt egyre nagyobb intenzitással éri el a Föld felszínét. A megnövekedett intenzitású UV-sugárzás az összes élőlényre káros lehet, de különösen az a fotoszintetizáló szervezetekre (pl. algák, magasabbrendű növények), amelyek számára a napfény az egyetlen energiaforrás. Ezzel magyarázható a fotoszintézis-kutatók törekvése az UV-sugárzás növényekre gyakorolt hatásának tisztázására. Biofizikai és biokémiai vizsgálatokkal változásokat figyelhetünk meg a növény életműködésében: csökken a CO_2 -felvétel, az oxigénleadás, a száraz-tömeg, a keményítő és a teljes klorofill mennyiség, ATPáz- és Rubisco-inaktiváció következik be. A vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a PS2 elektrontranszportja az egyik legérzékenyebb pontja a növénynek, mivel az UV-abszorbeáló redoxkomponensek - a kinonok, a tirozinok és a vízbontó-komplex - valamilyen mértékben mind károsodnak. Az UV-B-sugárzás fő támadáspontjára úgy következtethetünk, hogy összehasonlítjuk a bakteriális és a PS2 RC-ok UV-sugárzással szembeni érzékenységét. Az esetleges különbség abból adódhat, hogy bár a II. típusú RC-ok akceptor oldalai hasonlóak, a donor oldalai nagyon különbözők.

CÉLKITŰZÉS

Célom az volt, hogy az elektrontranszfert, a proton- és kinonkötést magában foglaló többszörös egyensúlyi folyamatokat elemezzem olyan RC-okban, amelyekben a Q_B -kötőhely mutáció vagy UV-B besugárzás hatására jelentősebb változásokat szenvedett. Ezeket a változásokat a kinon-akceptor komplexben a kinonkötési állandók, a proton sztöchiometria és az elektron egyensúlyi állandók meghatározásával jellemeztem.

A részletes vizsgálatokat elindító alapkérdések:

A *Rb. sphaeroides* R-26 L229Ile $\rightarrow$ Met mutánsa esetén:

- Hogyan befolyásolja a mutáció a kinonkötést?
- Hogyan hat a szerkezetváltozás a fehérje aminosav-oldalláncaira valamint a kinon szubsztituenseinek és fejcsoportjának kölcsönhatására (induktív és mezomer hatások)?
- Mennyire változtatja meg az aminosavcsere a Q_B -vel (ill. Q_B^-) kölcsönható csoportok pK-ját?

A *Rb. capsulatus* L212Glu $\rightarrow$ Gln mutánsa esetén:

- Van-e a termikus energiától (25 meV) jól megkülönböztethető kölcsönhatás az L212Glu és a Q_A^- között a nagy távolság (1,7 nm) ellenére?

UV-B-besugárzás alkalmazásakor:

- Hogyan befolyásolja a Q_B jelenléte vagy hiánya, ill. redoxállapota az UV-B-sugárzás hatását az elektrontranszferre, a kinon- és herbicidkötődésre, valamint a RC fehérje összetételére?
- Mi az UV-B-sugárzás fő támadáspontja a RC-ban?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Baktériumtörzsek:

- *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* R-26
- *Rb. sphaeroides* L229Ile $\rightarrow$ Met (R/89) atrazinrezisztens mutáns
- *Rb. capsulatus* L212Glu $\rightarrow$ Gln mutáns

A fotoszintetikus RC izolálása

Az alkalmazott standard fehérjetisztítási módszerek: a sejtek feltörése French press-szel, ultracentrifugálás, a kromatofora feltárása LDAO-val, ammónium-szulfátos kicsapás, DEAE-Sephacell ioncserélő oszlopkromatográfia.

Az alkalmazott vizsgálati eljárások

Spektroszkópiai és elektromos módszerek. A fotoszintetikus RC-ok fényfelvillanás-indukált abszorpcióváltozását adott hullámhosszakon házálag összeállított egysugaras fotométerrel mértem (A) donor nélkül és (B) külsőleg hozzáadott donorról. (A) esetében töltérekombináció következik be (430 nm-nél mérhető), (B) esetén a RC többszöri átfordulását figyelhetjük meg a szemikinin redukciója (450 nm), ill. a citokróm oxidációja (550 nm) nyomkövetésével. A sorozatos fényfelvillanásokra megjelenő szemikinin jel csillapodó amplitudójú oszcillációt ad, amire az elektron és kinonkötési egyensúlyi állandókat figyelembevevő számítógépes modellt alkalmaztam. A proton-felvételt pH-indikátor festékek alkalmazásával és elektromos (pH elektród) módszerrel mértem.

UV-B-besugárzás

Az UV-B sugárforrás egy VL-215M (Vilbert Lourmat) lámpa volt (fényintenzitása 312 nm-nél $\approx 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Az UV-B-kezeléseket jégén, $20 \mu\text{M}$ *Rb. sphaeroides* R-26 RC koncentráció mellett végeztem.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A Q_B működése *Rb. sphaeroides* R-26 és R/89 RC-ban

A *Rb. sphaeroides* R-26 atrazinrezisztens mutánsában (R/89) az L-alegység 229-edik helyén levő izoleucin cserélődött ki metioninra (L229Ile $\rightarrow$ Met). Az L229Ile a Q_B -kötőhelyhez tartozó apoláros aminosav, de sem a Q_B -re irányuló közvetlen proton-transzfer folyamatokban nem vesz részt, sem a kinonkötésben nem játszik meghatározó szerepet, hanem van der Waals kötéssel stabilizálja a kinont a Q_B -kötőhely vasionhoz közeli oldalán.

Az L229Ile $\rightarrow$ Met aminosavcsere másképpen hat a kinonra mint a szemikininra. A kissé hosszabb és a kénhíd miatt sokkal merevebb Met jelenléte a mutánsban

különböző változásokat okozhat: elmozdulhat a kinon-gyűrű és/vagy módosulhat a fejcsoport szubsztituenseinek térbeli elrendeződése. Mivel a kinon semleges, a szemikinin pedig töltött (anionos) molekula, és a szerkezetük is eltérő (váltakozó egyszeres- és kettős-kötés rendszer, ill. aromás gyűrű), ezért a különbségek egyrészt az elektrosztatikus, másrészt a metoxi szubsztituensek mezomerikus hatásaiból eredhetnek.

A Q_B^- és környezete között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások

A Q_A-Q_B és a $Q_AQ_B^-$ állapotok közötti standard szabadenergia-változás azt mutatja, hogy a szemikinin a kinonhoz képest kevésbé stabil $R/89$, mint $R-26$ RC-ban. Ha ezt a változást kizárólag a Q_B^- és a vasion között fellépő Coulomb-kölcsönhatás csökkenésének tulajdonítjuk, akkor a kinon fejcsoportja $U_{Q_{10}}$ és U_{Q_0} esetén 0,13, ill. 0,03 nm-rel mozdulna el. Másik magyarázat lehet a Q_B^- és a kötőhelye közelében található negatív töltésű aminosavakból álló csoport közötti destabilizáló kölcsönhatás kialakulása.

Mindkét RC-ban a mért standard szabadenergia-változásban két pH-függő tartomány fedezhető fel, ami legalább két aminosavval való kölcsönhatást jelez: magas pH-n az L212Glu, alacsony pH-n az L213Asp (és L210Asp) a lehetséges jelöltek. A Q_B^- kötőhelyen $U_{Q_{10}}$ -et tartalmazó $R/89$ RC-ban a magas pK -jú csoport pK -ja 0,5 pH-egységgel eltolódott a magasabb pH-k felé (mind elektrontranszfer, mind protonfelvétel mérések eredménye), ami azt jelzi, hogy a Q_B^- és az L212Glu, ill. az L212Glu és közvetlen környezete között ható erők kissé módosultak. A Q_B^- és az L212Glu közötti 0,5 nm távolságból és a 329 meV kölcsönhatási energiából ezek 0,05 nm-es közeledése becsülhető.

Mezomerikus hatások

A kinon fejcsoportjának a Q_B -helyre kötődését elsősorban a hidrogénhidak kialakulása határozza meg, de fontos szerepet játszanak benne más nem-coulombi kölcsönhatások is, legfőképpen van der Waals erők. Az izopren lánc hidrofób kölcsönhatásokon keresztül hat a kinonkötésre.

Az L229Ile, ill. az L229Met eltérő geometriai elrendeződést kényszerít rá a kinonokra és a szemikininokra. A két egymás melletti metoxi-csoport (a kinon-gyűrű 2. és 3. szubsztituense) taszítja egymást a közöttük fellépő szterikus kölcsönhatás miatt. Torziós szögük változása jelentős eltéréseket okoz a kinon és a szemikinin

stabilizációjában. Tehát a mutáció következtében kialakult kedvezőtlen térbeli elrendeződés (a metoxi szubsztituensek egymáshoz viszonyított helyzetének torzulása) a karbonil-oxigének részleges negatív töltéseit eltávolítva csökkentheti a környezettel kialakított hidrogénhidak erősségét.

Az L212Glu szerepe *Rb. capsulatus* L212Glu → Gln mutáns RC-ban

Ha az L-alegység 212-edik aminosavja helyén nem glutaminsav van, akkor a PQ_A^- állapothoz tartozó protonkötés $pH > 8,5$ -nél rendkívül lecsökken a vadtypusban mérhető $\approx 0,2 H^+/P^+$ értékhez viszonyítva. A vadtypusban magas pH-n az L212Glu és a Q_A^- direkt vagy indirekt módon kölcsönhatásba kerülnek egymással legalább 30 ± 18 meV ($= 60 \text{ meV} \cdot (pK_{Q_A^-} - pK_{Q_A})$) kölcsönhatási energiával. A mutánsban a magas pK-jú csoport szinte teljesen eltűnik, tehát a glutaminsav kicserélése más aminosavra megszünteti ezt a kapcsolatot. A Q_A^- keletkezése a nagy távolság ($> 1,5$ nm) ellenére a Q_B -kötőhelyhez tartozó egyes aminosavak (pl. L212Glu) pK-jának eltolódását okozza, ami segíti az elektronátmenetet a Q_A -ról a Q_B -re.

Kettős mutánsokban (pl. L212Glu-L213Asp → Ala-Ala), ahol mind az L212Glu, mind az L213Asp változott, a protonkötés teljesen eltűnik, míg az L212Glu → Gln mutánsban még magas pH-n is $\approx 0,05 H^+/P^+$ értéket mértem. Ez azzal magyarázható, hogy bár károsodott az L212Glu körül kialakuló aminosav-hálózat (cluster), ami magas pH-n meghatározza a protonfelvételt, de az L213Asp-t tartalmazó aminosav-rendszeren keresztül azért bekövetkezik egy kisebb mértékű protonkötés.

Az UV-B-sugárzás hatása a *Rb. sphaeroides* R-26 RC-ra

Kinon- és herbicidkötés

Az UV-B-sugárzás jellegzetes hatást fejt ki az elektrontranszferre, amely a töltérekombináció gyorsulásában, a szemikinon oszcilláció csillapodásának növekedésében és kis mértékű o-fenantrolin rezisztenciában nyilvánult meg. Az UV-B-besugárzás károsíthatja magát a Q_B -kötőhelyet (ezt mutatja a kisebb Q_B -aktivitás), vagy csökkentheti az ú.n. Q_B -hozzáférhetőséget, ami magában foglalja a "folytonos üzem"-et (többszöri átfordulást) jellemző paraméterek változását: a kinon készlet szűkülését és/vagy a kinon be- és kikötődés gátlódását.

A kinonok mellett a herbicidek kötési tulajdonságai is megváltoznak. Mivel azonban az UV-B-sugárzás okozta változás nem terjedt ki a teljes Q_B -kötőhelyre, így

rezisztenciát csak az L190His-hez kapcsolódó o-fenantrolin esetén kaptam, míg a Q_B -kötőhely ellenkező oldalán az L223Ser és az L224Ile aminosavakhoz kapcsolódó terbutrin esetén nem.

A kinon jelenléte és redoxállapota befolyásolja az UV-B-károsodást

A különböző elektrontranszfer jellemzők UV-B-sugárzás okozta károsodása Q_B hiányában 5-15%-ot, Q_B -aktív RC esetén 10-20%-ot, míg Q_B^- jelenlétében 15-30%-ot tett ki, azaz Q_B hiányában kisebb, szemikinin jelenlétében pedig nagyobb a változás. Ezt a megfigyelést alátámasztja a különböző redoxállapotú kinonok abszorpciós spektruma: az UV-B-tartományban 306 nm-nél maximális a szemikinin abszorpciója, míg mind az ubikinon, mind a plasztokinon alap és kétszeresen redukált állapotai itt alig nyelnek el. Tehát a szemikininok sokkal hatásosabb célpontok lehetnek, mint a kinonok vagy a kinolok.

A PS2 RC érzékenyebb az UV-B-sugárzásra, mint a bakteriális

A RC szerkezetében és működésében UV-B-sugárzásra bekövetkező károsodásokat az inaktivációs hatáskeresztmetszet kiszámításával becsülhetjük meg. A bakteriális RC-ban a fotokémiai aktivitás csökkenéséhez és az L-alegység károsodásához tartozó inaktivációs hatáskeresztmetszet ($\approx 0,32 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) egy nagyságrenddel kisebb a PS2 D1-alegységének degradációjára, ill. az oxigénfejlesztés károsodására jellemző értékeknél ($3,7 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, ill. $11,2 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$).

A PS2 nagy UV-érzékenysége nem eredhet a kinonok közvetlen UV-B-elnyeléséből, mivel a PS2 és a bakteriális RC-ok kinon-elektronakceptorainak spektruma az UV-B-tartományban szinte egyforma. Egy másik lehetséges magyarázat a PS2 és a bakteriális RC Fe^{2+} -ionjának eltérő kötődési és redoxsajátságain alapul, de valószínűtlennek látszik, hogy a bikarbonát Fe^{2+} -ionhoz való kapcsolódása lenne a kulcsfaktor a PS2 nagyobb UV-B-károsodásában. Feltételezhetjük, hogy az UV-B-sugárzás hasonlóan hat a kinon-akceptor komplexre mind a bakteriális, mind a PS2 RC-ban, és a nagy különbség a kétféle RC donor oldalán megnyilvánuló eltérésekből ered. Ezt támasztják alá azok a vizsgálatok, amelyek szerint a PS2-ben az UV-B-sugárzásra legérzékenyebb a (bakteriális RC-ból hiányzó) vízbontó-komplex.

A DISSZERTÁCIÓ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

- ♦ Olyan modellt dolgoztam ki a szemikinin flash-szám függvényében megfigyelhető csillapított oszcillációjára, amely figyelembe veszi mind az elektron, mind a kinon egyensúlyi eloszlást a RC kinon-akceptor rendszerében (I.).
- ♦ Az L229Ile → Met mutáció a pH-tól függően különböző mértékben növeli meg a Q_B -nek és a Q_B^- -nak a másodlagos kinonkötőhelyre vonatkoztatott disszociációs állandóit (IV.).
- ♦ A fenti mutáció miatt a disszociációs állandókban bekövetkező eltérő változásokat a különböző redoxállapotú kinonok fejcsoportjainak és szubsztituenseinek kölcsönhatásával, induktív és mezomer hatásokkal magyaráztam (IV.).
- ♦ A mutánsban a legmagasabb pK-jú csoport pK-ja 0,5 pH-egységgel eltolódott a vadtypusban megfigyelthez képest, amit az L212Glu és a Q_B^- 0,05 nm-es közeledésével értelmeztem (IV., V.).
- ♦ A *Rb. capsulatus* L212Glu → Gln mutánsában a PQ_A^- állapothoz tartozó protonkötés magas pH-n ($pH > 8,5$) nagyon lecsökkent a vadtypushoz viszonyítva, amiből az L212Glu és a Q_A^- között fellépő ≈ 30 meV kölcsönhatási energiára következtethetünk (VI.).
- ♦ Az UV-B-besugárzás a bakteriális RC-ban kétféle hatást vált ki:
 - a RC-ok egy része a kiterjedt fehérje-károsodás miatt elveszti fotokémiai aktivitását,
 - a RC-ok másik részében a változás nem terjed ki a teljes Q_B -kötőhelyre, csak a kinon, ill. a herbicidek kötődési sajátságait módosítja (VII.).
- ♦ Q_B jelenlétében a felsorolt hatások felerősödnek (VII.).
- ♦ Q_B^- keletkezésekor, mivel a szemikinin forma maximális elnyelésű az UV-B-tartományban, a károsodás még kifejezettebb (VII.).
- ♦ Indirekt bizonyítékot szolgáltattam arra, hogy PS2 RC-ban az UV-B-sugárzással szemben a legérzékenyebb hely nem az akceptor oldal, hanem a donoroldali vízbontó-komplex (VII.).

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK:

- I. Tandori, J., Nagy, L. és Maróti, P. (1991) Semiquinone oscillation as a probe of quinone/herbicide binding in bacterial reaction centers. *Photosynthetica*, 25:159-166.
- II. Nagy, L., Puskás, Á., Tandori, J., Droppa, M. és Horváth, G. (1991) Effect of DCMU on photosynthetic purple bacteria. *Photosynthetica*, 25:167-171.
- III. Maróti P. és Tandori J. (1993) Nagytávolságú elektrontranszfer fehérjékben. *Fizikai Szemle*, 8:311-317.
- IV. Tandori, J., Nagy, L., Puskás, Á., Droppa, M., Horváth, G. és Maróti, P. (1995) The Ile^{L229} → Met mutation impairs the quinone binding to the Q_B-pocket in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth. Res.*, 45:125-146.
- V. Tandori, J., Nagy, L., Osváth, Sz. és Maróti, P. (1995) Proton uptake and free energy changes associated with reduction of Q_B in IleL229 → Met mutant reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*. In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere* (szerk.: Mathis, P.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, Vol. I., 539-542.
- VI. Miksovská, J., Maróti, P., Tandori, J., Schiffer, M., Hanson, D.K. és Sebban, P. (1996) Distant electrostatic interactions modulate the free energy level of Q_A⁻ in the photosynthetic reaction center. *Biochemistry*, 35:15411-15417.
- VII. Tandori, J., Máté, Z., Maróti, P. és Vass, I. (1997) Resistance of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* against UV-B radiation. Effects on protein structure and electron transport. *Photosynth. Res.*, nyomdában.

A TÁRSSZERZŐK NYILATKOZATA

A felsorolt publikációk (I.-VII.) társszerzői kijelentik, hogy ezen Ph.D. disszertációban ismertetett eredmények Tandori Júlia munkájához fűződnek.

Dr. Droppa Magdolna, a biol. tud. kandidátusa *Droppa Magdolna*

Dr. Horváth Gábor, a biol. tud. doktora *Horváth Gábor*

Dr. Maróti Péter, a biol. tud. doktora *Maróti Péter*

Máté Zoltán, Ph.D. hallgató *Máté Zoltán*

Dr. Nagy László, a biol. tud. kandidátusa *Nagy László*

Osváth Szabolcs, Ph.D. hallgató *Osváth Szabolcs*

Dr. Puskás Ágnes *Puskás Ágnes*

Dr. Vass Imre, a biol. tud. doktora *Vass Imre*

Szeged, 1997. január 15.