

Ph.D. disszertáció

**A BAKTERIÁLIS REAKCIÓCENTRUM FOTOCIKLUSÁNAK
KINETIKÁJA ÉS ENERGETIKÁJA**

Gerencsér László

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

Szeged, 2001

Köszönetemet fejezem ki a Soros Alapítványnak, amelynek támogatása nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. A bakteriális reakciócentrum szerkezete	10
2.2. Elektrontranszfer a bakteriális reakciócentrumban	13
2.3. A kinonok eltérő viselkedése	16
2.4. A kinon redukciós ciklusa	17
2.5. Protonálódási reakciók a reakciócentrumban	20
2.6. A citokróm és reakciócentrum kölcsönhatása	27
3. CÉLKITŰZÉSEK	35
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
4.1. A baktériumok tenyésztése	36
4.2. A reakciócentrum izolálása	36
4.3. A reakciócentrum tisztítása	37
4.4. Az LDAO lecserélése más detergensre	39
4.5. A citokróm c ₂ izolálása és redukálása	40
4.6. Optikai módszerek	43
4.6.1. Abszorpciómérő készülékek	43
4.6.2. Abszorpciós kinetikák	44
4.7. A protonfelvétel mérése	46
4.8. Modellek	48
4.8.1. A kinetikák illesztése	48
4.8.2. A disszociációs állandó meghatározása	49
4.8.3. A disszociációs állandó pH függésének modellje	49

5. EREDMÉNYEK	52
5.1. A citokrómozidáció kinetikája	52
5.2. A citokrómozidáció ionerősségfüggése	54
5.3. Kationok hatása	55
5.4. A citokrómozidáció koncentráció hatása	57
5.5. Vízviszkozitás-függés	59
5.6. A citokrómozidáció hőmérsékletfüggése	59
5.7. A pH hatása a citokrómozidációra	61
5.8. Átmeneti fémionok kötődése a reakciócentrumhoz	63
5.9. Proton felszabadulás fémion kötődés hatására	65
5.10. A citokrómozidáció átfordulás gátlása fémionnal	68
5.11. Proton és elektron transzfer kinetika, valamint proton sztöchiometria módosulása fémion jelenlétében	69
5.12. A Na-azid hatása	74
5.13. Reakciócentrum lassú átfordulása folytonos gerjesztésben	76
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	81
6.1. A donor oldal átfordulásának modellje	81
6.2. Elektrosztatikus kölcsönhatás szerepe a RC átfordulásában	85
6.3. Termékgátlás	93
6.4. A fémion és reakciócentrum komplexképződése	95
6.5. Az elektron és protonfelvétel sebességének egyezése	97
6.6. A protonálható csoportok p <i>K</i> -jának változása	98
6.7. Proton karrier a reakciócentrumban	101
7. ÖSSZEFOGLALÁS	102
8. SUMMARY	106

9. IRODALOMJEGYZÉK	111
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	125

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RC	-fotoszintetikus reakciócentrum
<i>Rb. shaeroides</i> R-26	- <i>Rhodobacter sphaeroides</i> R-26 karotinoidmentes mutánsa
PSI	- első fotokémiai rendszer
PSII	- második fotokémiai rendszer
L, M, és H	-a bakteriális reakciócentrum alegységei
SerL223, HisL190	- aminosavak az L alegységben
P	- bakterioklorofill dimer (elsődleges donor)
Bkl	- bakterioklorofill
Bfeo	- bakteriofeofitin
Q _A , Q _B	- elsődleges és másodlagos kinon-elektronakceptor
UQ ₆ , UQ ₁₀	- 2,3-dimetoxi-5-metil-6-(x)-1,4 benzokinon, x=6 ill. 10 tagból álló izopreionid-lánc
K _s	- elektron egyensúlyi állandó
LDAO	- laurildimetilamin-N-oxid
Triton X-100	- oktilfenol-polietylénglikol-éter
Tris	- 2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propándiol
MES	- 2-[N-morfolin]-etánszulfonsav
MOPS	- 3-[N-morfolin]-propánszulfonsav
BIS-TRIS-propán	- 1,3-bis(tris-(hidroximetil)metilamin)-propán
CHES	- 2-[N-ciklohexilamin]-etánszulfonsav
CAPS	- 3-(ciklohexilamin)-1-propánszulfonsav

1. BEVEZETÉS

A fotoszintetizáló organizmusok (baktériumok, algák, magasabb rendű zöld növények) fényenergiát alakítanak át redoxpotenciál illetve proton elektrokémiai potenciállá, amelyek közvetlenül alkalmasak a sejt életfolyamataihoz szükséges energia fedezésére, illetve raktározására. A fotoszintetikus folyamatok alapvetően 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 nagy energiaértékű szénhidrátok keletkezzenek. A fényreakciók a foton abszorpcióját követően fehérjébe ágyazott, speciálisan orientált pigmentek közreműködésével mennek végbe. A zöld növényekben, ahol a fotoszintézis az eddig ismert legnagyobb hatékonysággal 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 részben ciklikus elektrontranszport-láncával szemben a baktériumoké egyetlen ciklusból áll, melynek során a reakciócentrumban (RC) keletkezett töltéspár stabilizálódik. (kinon redukciós ciklus). A reakció szabadentalpia-változása proton gradienssé alakul át, amelyet vektoriális (a membrán citoplazmikus oldaláról

a periplazmikus oldal felé mutató) protonelmozdulás épít fel a reakciócentrum. A ciklikus protonáramlást a reakciócentrumhoz kapcsolódó citokróm bc_1 komplex valósítja meg. Mivel a protonfelvétel előfeltétele az elektrontranszfernek, és csak kölcsönhatásuk biztosíthatja a reakciócentrum normális működését, proton-aktivált elektrontranszferről beszélünk. A RC és a citokróm bc_1 redoxfolyamatait a lipidfázisban közlekedő kinon és a periplazmikus oldalon közlekedő vízdékony citokróm c_2 teszi teljessé. *In vivo* körülmények között a baktérium fotoszintetikus növekedését a fényintenzitás nagysága határozza meg, azaz a fotociklus többi lépése a fotokémiai reakciónál jóval gyorsabb. A RC izolálásával, megfelelő mennyiségű redoxekvivalensek (citokróm, kinon) biztosításával, valamint nagy intenzitású gerjesztő fény alkalmazásával elérhető, hogy a fotociklus egyes lépéseit a RC többszörös átfordulásával tanulmányozzuk. Fiziológias pH és ionerősség tartományban azt figyeltük meg, hogy a citokrómok kicserélődése határolja a folyamatot. A korábbi flash-indukált abszorpciómérések csak részleges választ tudtak adni a RC és citokróm kölcsönhatásának részleteire. A fenti problémakört megcélözva számos új eredményt sikerült elérnünk.

A citokróm átfordulás az akceptor oldali folyamatok követésére is alkalmas. Az elektrontranszfer sebessége lényegesen lecsökken a Q_B környezetében lévő protonálható aminosavak (GluL212, AspL213, SerL223) nem protonálhatóra való cseréjével. A közelmúlt egyik legfontosabb felfedezése a bakteriális reakciócentrum kutatásban, hogy átmeneti fémionok szintén képesek nagymértékben gátolni a protontranszfert (Paddock és mtsai. 1999) és az elektrontranszfert (Utschig és mtsai. 1998). Ez egyben a RC protonációs folyamatainak egy újabb vizsgálati technikáját alakította ki. Habár a fémion kötőhelyét pontosan meghatározták röntgen-diffrakciós vizsgálattal (Axelrod és mtsai. 2000a,b), a hatásmechanizmus még nem tisztázott. Egyes kutatók szerint fémiont koordináló protonálható aminosavak deprotonációjával a proton domináns belépési pontja megszűnik, és alternatív

utakon csak kisebb sebességgel közlekedhet (Paddock és mtsai. 2000; Ädelroth és mtsai. 2000). Vizsgálataink igazolják, hogy az elképzelés csak részben állja meg a helyét.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

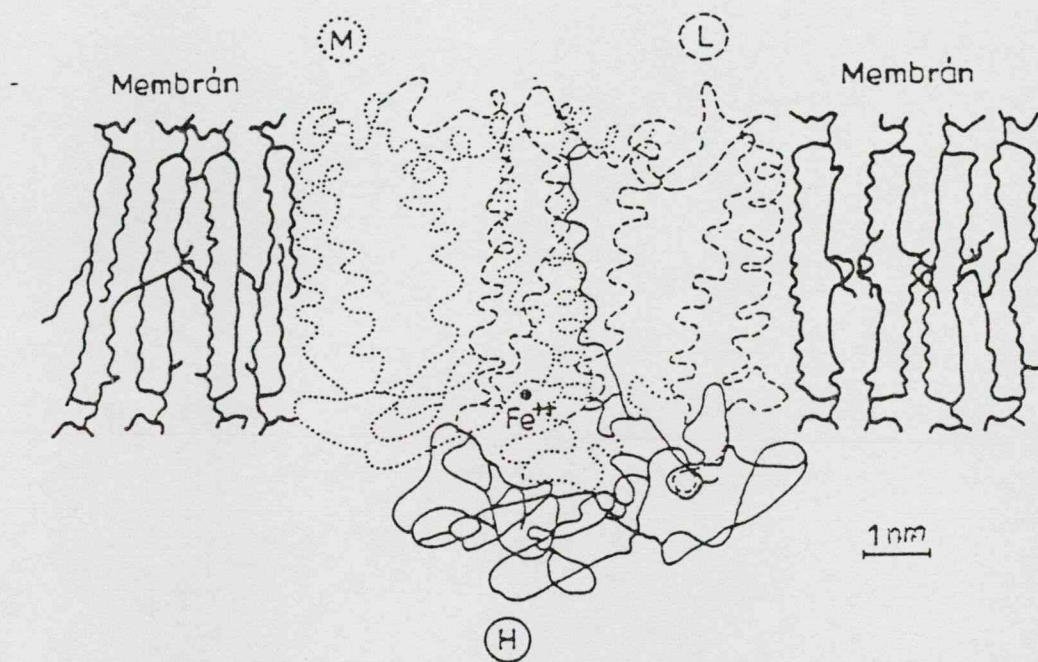
2.1 A bakteriális reakciócentrum szerkezete

A reakciócentrum a bakteriális fotoszintetikus apparátus azon izolálható fehérje egysége, amelyben az elsődleges töltésszétválasztás és az ahhoz társuló protonálódási folyamatok végbemennek. Az integrális membránfehérjék közül elsőként a *Rhodospseudomonas (Rps.) viridis* RC-át kristályosították ki amfifil oldószerből (heptán-1,2,3-triol) (Michel 1982). A kristályokon elvégzett röntgendiffrakciós vizsgálatok segítségével a *Rps. viridis* RC szerkezetét 0,3 nm-es (Deisenhofer és mtsai. 1985), majd később 0,23 nm-es (Deisenhofer és mtsai. 1995) atomi feloldásban határozták meg. A *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* RC rombos (Allen és mtsai. 1988; Chang és mtsai. 1991), trigonális (Ermler és mtsai. 1994) kristályait 0,28, ill. 0,26 nm-es és 0,22 ill. 0,26 nm-es (Stowell és mtsai. 1997) felbontással vizsgálták.

A *Rb. sphaeroides* bíborbaktérium RC-a három fehérjealegységből álló pigment-protein komplex. Az alegységeket elektroforetikus mobilitásuk alapján becsült, egymáshoz viszonyított molekulatömegeik angol elnevezésének kezdőbetűjével, L, M és H-val jelölik (light, middle és heavy). Ez az elnevezés azonban megtévesztő, mivel valójában a H alegység a legkisebb (27,4 kD), amelyre az RC aminosav sorrendjének meghatározásával derült fény (Williams és mtsai. 1984). A H alegység, mivel kevésbé hidrofób az SDS poliakrilamid gélen kisebb elektroforetikus mobilitást mutatott, így molekulatömegét nagyobbak vélték, mint az M és az L alegységét. Az utóbbiak molekulatömege 31,3 és 34,3 kD. A *Rps. viridis* törzsben egy 4 db citokróm c-t tartalmazó negyedik alegység kapcsolódik a RC-hoz a membrán periplazmikus oldalán.

Az L és az M polipeptid 180°-os forgási szimmetriát és nagyfokú homológiát mutatnak: mindkét polipeptid 5-5 transzmembrán hélixet tartalmaz, melyek közül 2-2 különösen szorosan kapcsolódik egymáshoz (Yeates és mtsai. 1988; Feher és mtsai. 1989). Az így

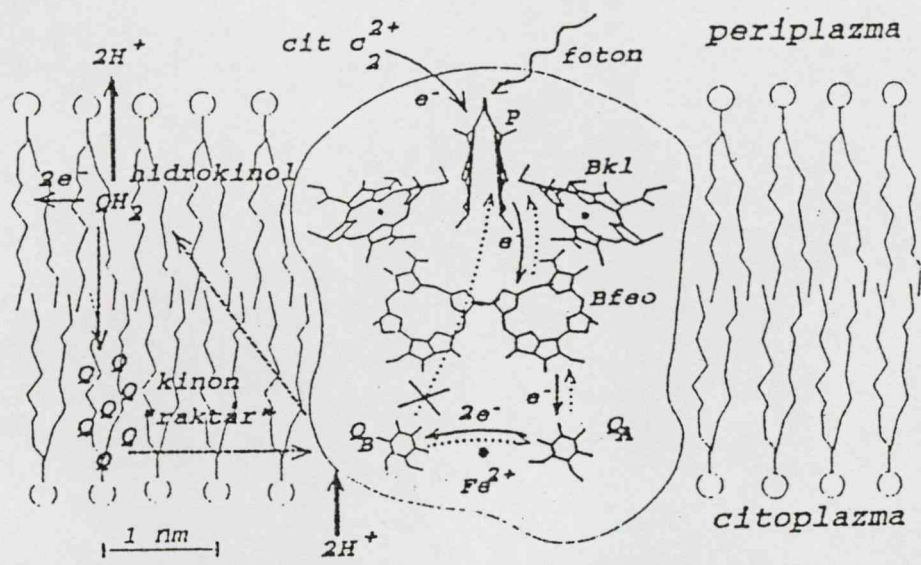
létrejött LM komplex stabilitását egy nem-hem típusú Fe^{2+} ionnak a négy hélix egy-egy hisztidinjével (L190, L230, M219 és M266), valamint az GluM232 aminosavval, mint kétfogú ligandummal képzett hat koordinációs kötése biztosítja (Allen és mtsai. 1988). A H alegységnek csak egy transzmembrán hélice van, globuláris szerkezetű, az LM komplex citoplazmikus oldalához kötődik, a két kinon kötőhelyet zárja le (2.1 ábra), így eltávolítása (Debus és mtsai. 1985) elsősorban a két kinon működésében okoz jelentős változásokat (Feher, 1992).



2.1 ábra. A bakteriális reakciócentrum-fehérje alegységeinek elhelyezkedése a membránban

A RC-ban az LM polipeptidhez kötődnek a prosztetikus csoportok: 4 bakterioklorofill, amelyek közül 2 dimert alkotva képezi a primer donort (P), míg a másik kettő a dimertől a mintegy 0.5 nm távolságban helyezkedik el majdnem tökéletesen szimmetrikusan (Bkl_A , Bkl_B), 2 bakteriofeofitin (Bfeo_A , Bfeo_B), 2 kinon (Q_A , Q_B), a közöttük elhelyezkedő nem-hem típusú vasion (Fe^{2+}) és esetlegesen baktériumtörzstől függően egy karotinoid molekula. A kofaktorok a dimeren és a vasion átmenő tengelyre közelítőleg tükörszimmetriát mutató, A-val

és B-vel jelzett ágat képeznek (2.2 ábra). A szimmetria azonban nem tökéletes, amelynek okai: a dimer aszimmetriája (a tetrapirrol gyűrűk egyike nem tökéletesen sík), a szomszédos kofaktorok elektronfelhőinek különböző mértékű átlapolása a két ágban (az A ágban közelebb van a Bkl a P-hez és a Bkl a Bfeo-hoz), a fitil (Bkl és Bfeo) és az izoprenoid (kinon) láncok aszimmetriája, valamint a poláros aminosavak különböző eloszlása a két ág mentén.



2.2 ábra. A kofaktorok elhelyezkedése *Rb. sphaeroides* karotinoidmentes törzsének (R-26) reakciócentrumában. Jelölések: P primer donor, Bkl bakterioklorofill, Bfeo bakteriofeofitin, Q kinon, A és B fotokémiaailag aktív és inaktív ág. Az előreirányuló elektrontranszfer irányát vékony a protontranszfer irányát vastag folytonos nyilak jelölik. A pontozott vékony nyilak az elektrontranszfer visszafelé irányuló reakcióit, a szaggatott vékony nyilak a lipidfázisban közlekedő kinonokat jelölik.

Mindezek a későbbiekben funkcionális aszimmetriához vezetnek. A négy Bkl közül két közeli alkotja a dimert, amely elsődleges elektrondonort szerepét tölti be, egy-egy pedig áthidalja a dimer és a bakteriofeofitin közötti igen jelentős (1,7 nm) távolságot, és ezzel megkönnyíti közöttük az elektronátadást (Gunner, 1991). Az elsődleges és a másodlagos elektron akceptorok (QA, QB) izoprenoid láncsal rendelkező kinon molekulák, amelyek kémiaailag lehetnek azonosak: ubikinon-50 (*Rb. sphaeroides*, *Rb. capsulatus*), vagy különbözőek: QA

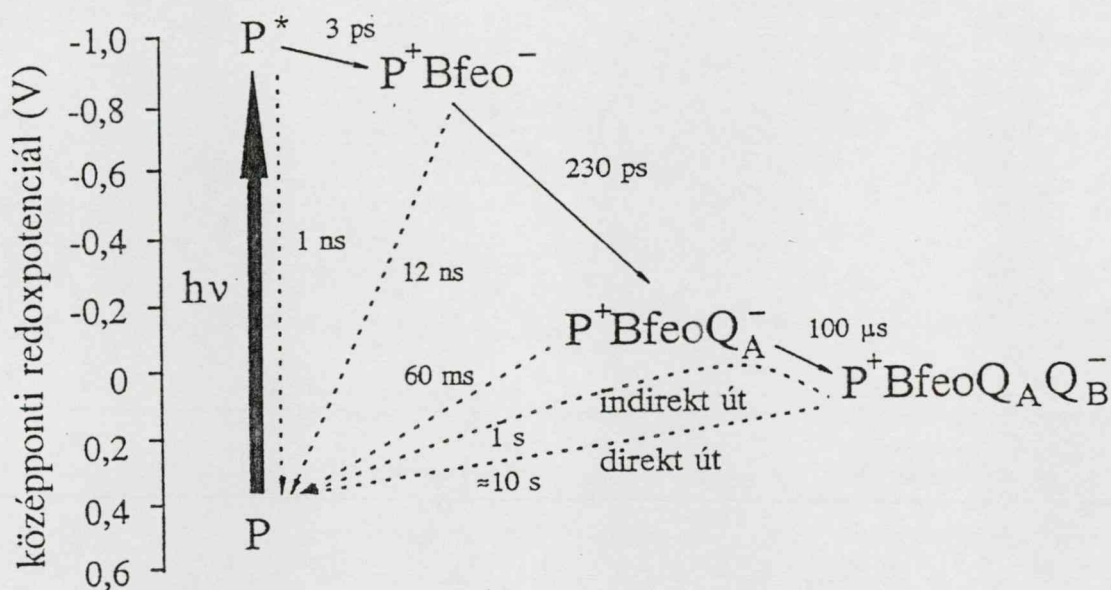
kötőhelyen menakinon, a Q_B kötőhelyen pedig ubikinon-50 (*Rps. viridis*) (Shopes és Wraight, 1985). A Fe²⁺ a fotokémiai aktivitás jelentősebb megváltozása nélkül helyettesíthető más kétértékű fémionokkal (Debus és mtsai. 1986; Utschig és mtsai. 2000).

2.2 Elektrontranszfer a bakteriális reakciócentrumban

A RC által elnyelt fény a dimert elektron-gerjesztett szingulett állapotba (P^{*}) hozza, amelyből az első jól elkülöníthető töltéspár (P⁺B⁻) közel 3 ps alatt képződik (2.3 ábra). Az elektronnak a primer donorról a bakteriofeofitinre juttatását a bakterioklorofill monomer segíti a primer donor és a bakteriofeofitin, mint akceptor elektronfelhőinek átlapolásával. Ezt a kvantummechanikai jelenséget szuperkicserélődésnek vagy alagúteffektusnak nevezik (Marcus és Sutin, 1985; Tanaka és Marcus, 1997). Ezt felhasználva a Nagarajan és mtsai. (1993) nem-adiabatikus, Woodbury és mtsai. (1994) adiabatikus közelítésben írták le a B_{kl} monomer szerepét. Bár az A és B ágban a RC prosztetikus csoportjainak tükörszimmetriája majdnem tökéletes, a fent vázolt aszimmetria elegendő ahhoz, hogy csak az A (aktív) ág mentén jöhessen létre elektronátadás. Itt fiziológias körülmények között 20-szor hatékonyabb az elektrontranszport, mint a B ágban. Ezt a B_{kl} nátrium-borohidriddel történő redukációjával támasztották alá, ami nem eredményezte a fotokémiai hatásfok csökkenését (Maróti és mtsai. 1985).

A kialakult töltéspár további (egyre lassuló) elektronátadási lépésekkel stabilizálódik: először az elsődleges kinon, majd ezt követően a másodlagos kinon redukálódik. A kialakult töltéspár stabilizálódásának legfontosabb lépése a primer kinon redukciója. Ez a folyamat szolgáltatja a legnagyobb szabadenergia csökkenést (ΔG), ami gyakorlatilag irreverzibilissé teszi a töltésszétválasztást. A reakciót a RC konformáció változása kíséri: Fénnyel megvilágított RC-ot 77 K-re hűtve az elektrontranszfer sokkal gyorsabb, mint sötétben hűtve (Kleinfeld és mtsai. 1984c). Mivel alacsony hőmérsékleten a konformációk közötti átmenet sebessége

erősen lecsökken, a $P^+Q_A^-$ (fényben hűtött) konformációja eltérő a PQ_A konformációjától. Az egymást követő redoxállapotok élettartamai drasztikusan növekednek: *Rb. sphaeroides* esetén a töltés-rekombináció élettartama a redukált bakteriofeofitinről csupán a 12 ns, a Q_A -ról már 60-100 ms, a Q_B -ről 1-1,3 s (Wraight és Stein, 1983; Kleinfeld és mtsai. 1984a; Xu és Gunner, 2000). A Q_A és Q_B közötti egyensúlyi elektronátadás nagyjából 100 μ s alatt játszódik le (Shinkarev és Wraight, 1993).



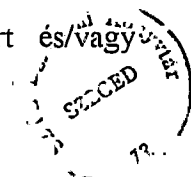
2.3 ábra. Az elektrontranszfer kinetikai és energetikai jellemzői a *Rb. sphaeroides* R-26 reakciócentrumában. Az előreirányuló folyamatokat folytonos, a töltés-rekombinációkat szaggatott nyilakkal jelöltük. A nyilak mellé feltüntettük a reakciók élettartamát is. A $P^+Q_AQ_B^- \rightarrow PQ_AQ_B$ töltés-rekombináció 95%-a a Q_A -n keresztül (indirekt út) megy végbe *Rb. sphaeroides* RC-okban.

A gyors előreirányuló folyamatok egyre behatóbb vizsgálata eredményeképp a monomer bakterioklorofill szerepét is sikerült tisztázni, ami hosszú időn át megosztotta a kutatókat. A legújabb vizsgálatok a monomer aktív részvételét mutatták ki az elektrontranszfer-láncban. Arlt és mtsai. (1993) a RC-ok domináns részében (77%) 2.3 ps, a kisebb hányadban (23%) 7 ps életidejű komponenset azonosítottak a P^+Bkl^- töltéspárral. Az elektron ezután mindkét

frakcióban 0.9 ps alatt jutott a bakteriofeofitinre. Kolbasov és Scherz (2000) az aktív és az inaktív ágban lévő bakterioklorofill monomer és dimer közötti kölcsönhatási vizsgálták, azt találták, hogy az aktív ágban 3 nagyságrenddel nagyobb volt a kölcsönhatási energia.

Tiede és mtsai. (1996) időfelbontott elektrokróm változások méréséből arra a következtetésre jutottak, hogy a korábban 10^4 s^{-1} körülnek mért kinonok közötti elektrontranszfer sebessége egy átlagos értéknek tekinthető. Szobahőmérsékleten két kinetikai komponens jelenlétét azonosították, amelyeket a heterogénnek feltételezett RC konformációs állapotaihoz rendeltek. Alacsony hőmérsékleten (-20°C -on) komponensek sorozatát figyelték meg, így a $Q_A^-Q_B^+ \leftrightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer kinetikáját eloszlásfüggvénnyel adták meg. Az első elektrontranszfer komponenseinek élettartamát illetően továbbra sem egységesek az álláspontok. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai (FTIR) vizsgálattal Hienerwadel és mtsai. (1995) 200 μs -os komponenst azonosítottak. A szemikininon 398 nm-nél megfigyelhető elektrokróm abszorpcióváltozása alapján Li. és mtsai. (1998) 80 μs -os gyors komponenst és egy meglehetősen variábilis 200-600 μs -os lassú komponenst észleltek. Utschig és mtsai. (1998) 757 nm-nél mérték a szemikininon elektrokróm abszorpcióváltozást, és egy kis amplitúdójú (25%) 37 μs -os illetve 10 μs -os (Utschig és mtsai. 2001), valamint egy nagy (75%) 230 μs -os komponenseket azonosítottak. Kromatofórán az elektrontranszfer még gyorsabb, egy 4 μs -os (60%) és egy 80 μs -os (40%) komponenst írtak le (Tiede és mtsai. 1998).

In vitro körülmények között a másodlagos elektrondonor hiányzik a RC-ból, így a töltés-rekombináció valószínűsége megnő. A $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltés-rekombináció a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ -hoz viszonyítva lényegesen lassúbb folyamat (1 s, pH = 8,0-nál; Wraight és Stein, 1983; Kleinfeld és mtsai. 1984a). Pusztán a kinonok elhelyezkedését tekintve meglepő ez az eltérés, hiszen mindkét kinon közel azonos távolságban (3 nm) van a dimertől a RC citoplazmikus oldalán. Valószínűleg a Q_B körüli nagyszámú poláros csoport és/vagy



töltésvezetésre alkalmas út hiánya gátolja meg a fehérje mátrixon keresztüli közvetlen rekombinációt, így a töltés-rekombináció 95%-ban Q_A -n keresztül az ún. indirekt úton következik be (Wraight és Stein, 1983; Kleinfeld és mtsai. 1984a; Labahn és mtsai. 1994).

2.3 A kinonok (Q_A és Q_B) eltérő viselkedése

A fotoszintetikus RC-ban és két kinon (Q_A és Q_B) számít olyan redox centrumoknak, amelyekhez redukált állapotban protonok kötődhetnek, és ezzel az irányított (vektoriális) protonmozgás részeseivé válnak. A fehérjekörnyezetük különbözősége miatt a két kinon redox- és kötési tulajdonságai gyökeresen eltérnek (Prince és mtsai. 1983). A Q_A erősen hidrofób környezetbe ékelődik, a legközelebbi poláros aminosav 0,5 nm-nél nagyobb távolságban van tőle. A H alegység úgy helyezkedik el, hogy a Q_A - kötőhelyet még jobban elszigeteli a vizes fázistól, ahonnan protonfelvétel történhetne. Fiziológias körülmények között a Q_A csak egyszeresen redukálható, csak extrém magas fényintenzitás és erősen redukáló körülmények között figyelhető meg kétszeresen redukált formája (Okamura és mtsai. 1979). Szemikinon alakja meglehetősen stabil: a redukció szabadentalpia-változása lényegesen pozitívabb a Q_A - kötőhelyen, mint apoláros szerves oldószerben (Crofts és Wraight, 1983; Woodbury és mtsai. 1986). Erősen kötődik a RC-hoz, onnan csak drasztikus eljárással (1-4 % LDAO és 1-10 mM o-fenantrolin) távolítható el (Okamura és mtsai. 1975). Az erős kötődésben néhány aminosav játszik szerepet: az AlaM260→Tyr mutáns röntgendiffrakciós vizsgálata alapján megállapították, hogy a Q_A nem kötődött a RC-hoz (McAuley és mtsai. 2000). Az oldatokban megfigyelhető viselkedéstől való eltérés oka a fehérjével való lokális (hidrogén-hidakkal) vagy nagy hatótávolságú (a transzmembrán hélixek dipólmomentumaival) való kölcsönhatás lehet. A másodlagos kinon ezzel szemben, noha kémiaiilag teljesen azonos, lazán kötődik a RC-hoz, könnyen leválasztható vagy inhibitorral helyettesíthető (Sinning, 1992). Szemikinon formája szintén nagyon stabil, 10^{12} -

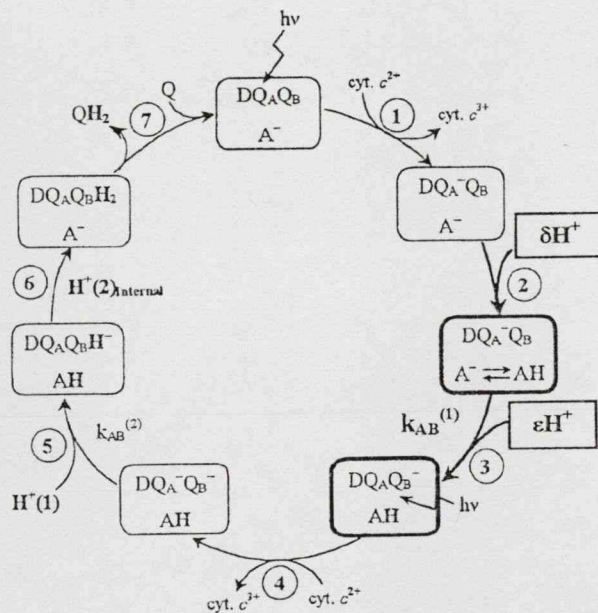
szer hosszabb élettartamú a RC-ban, mint oldatban (Crofts és Wraight, 1983). *In vivo* körülmények között a Q_B/Q_B^- pár középponti redoxpotenciálja 60 meV-tal pozitívabb, mint a Q_A/Q_A^- páré (pH=8.0). Közvetlen környezetében számos protonálható és poláros csoport helyezkedik el (GluL212, AspL213, AspL210, ArgL217 és SerL223), így teljes redukciója a RC-ban is végbemegy, amely két elektron és ehhez csatolva két proton felvételével történik. Az így képződött kinol könnyedén leválik, helyébe a membrán szabad kinonjainak egyike lép (Crofts és Wraight, 1983; McPherson és mtsai. 1990). A Q_A -hoz és a Q_B -hez irányuló elektrontranszfer sebességének eltérése is a különböző fehérjekörnyezettel magyarázható. A Q_A felé irányuló elektrontranszfernek gyorsnak kell lennie, hogy a töltésszétválasztás energiája csapdázódjon, ne következzen be töltés-rekombináció. A P^+ környezetében számos olyan aminosav mutálható, amelynek következtében a P^+/P középponti redoxpotenciálja és egyben a töltés-rekombinációs sebességállandók (k_{AP} , k_{BP}) megváltoznak, aminek következtében az elektrontranszfer reorganizációs energiája is lényegesen módosul (Allen és mtsai. 1998). A reakció szabadentalpia-változásának és a reorganizációs energiának az egyezése esetén várható maximális sebességű elektrontranszfer (Marcus és Sutin, 1985). A reorganizációs energiát viszont a poláros aminosavak jelenléte növeli, ami az optimumtól való eltávolodást, ezzel kisebb kinon redukciós sebességet hoz létre, tehát az optimális energiacsapdázódáshoz és protonszállításhoz különböző környezet szükséges. Valószínűleg ez a magyarázata a bakteriális (és a PSII) RC-okban található két, eltérő viselkedésű kinon jelenlétének (Okamura és Feher, 1992).

2.4 A kinon redukciós ciklusa

A foton abszorpcióját követően pillanatszerűen képződik a primer töltéspár ($P^+Q_A^-$). *In vivo* körülmények között az oxidált dimert a RC fehérjéhez kapcsolódó citokróm alegység (*Rps. viridis*) vagy diffúzió útján odakerülő és bekötődött vízóldékony citokróm c_2 (*Rb. sphaeroides*

és *Rb capsulatus*) gyorsan (1 μ s) képes redukálni (2.4. ábra (1) lépése). Ezzel a töltésrekombináció valószínűsége elhanyagolhatóvá válik fiziológias körülmények között. A $P^+Q_A^-$ töltéspár kialakulásával a citoplazmikus oldalon pH-tól függően a RC törtmennyiségű protont köt meg (Maróti és Wraight, 1988a,b; McPherson és mtsai. 1988; Kálmán és Maróti, 1997) (2. lépés). A $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer hatására a RC újabb kismennyiségű (0.1 H^+/RC) proton köt meg (3. lépés). A protont a Q_B környezetében elhelyezkedő GluL212-es veszi fel (Nabedryk és mtsai. 1998b; Ädelroth és mtsai. 2000). A Q_A oxidációja után a RC egy része újabb töltésszétválasztásra válik alkalmassá, miután funkcionális Q_B jelenlétében az elektron eljut a másodlagos kinonra. A RC-ok másik részében az elektron a Q_A -n marad. A Q_A és Q_B közötti elektronmegosztást az egyelektronos egyensúlyi állandó (K_e) adja meg, és mivel ez semleges pH-n igen nagy ($K_e = 10-15$; Shinkarev és Wraight, 1993), a RC-ok többségében a második fényfelvillanást követő citokróm oxidáció után két elektron kerül a kinon-akceptor rendszerbe ($Q_A^-Q_B^-$) (4. lépés). A második elektron csak a szemikinon protonálódása után megy végbe (Graige és mtsai. 1996), *in vivo* körülmények között a szemikinon nagyon gyors egyensúlyi protonációját követi a lassabb elektrontranszfer [proton-aktivált elektrontranszfer (Graige és mtsai. 1999; Di Donato és mtsai. 2000; Peluso és mtsai. 2000)]. A RC a protont a citoplazmikus tömbfázisból (bulk) veszi fel (5. lépés). A Q_B a második protonját viszont nem a tömbfázisból veszi fel, mint azt sokáig gondolták, hanem a GluL212 által a 2. és 3. lépés során megkötött proton jut a Q_B -re (Ädelroth és mtsai. 2000) (6. lépés). Ezzel a lépéssel a RC eredeti töltéseloszlása helyreáll. A reakció eredményeképpen kinol (Q_BH_2) keletkezik, amely lényegesen lazábban kötődik a RC-hoz, mint a szemikinon, leválik és helyét a kinon raktárból egy másik kinon tölti be (7. lépés) (McPherson és mtsai. 1990). A kinon fotokémiai redox ciklusának ideje igen rövid (1 ms), amelyet a mobilis kofaktorok (citokróm) pH-függő redox ciklusa jelentősen befolyásol (Osváth és Maróti, 1997; Larson és mtsai. 1998; Van Rotterdam és mtsai. 2001). A Q_B^- által felvett második elektron és

az ezzel csatolásban álló protonfelvétel részfolyamatai sokáig tisztázatlanok voltak. Korábban úgy vélték, hogy először $Q_A Q_B^{2-}$ állapot alakul ki, és ezután következik mindkét proton felvétele (Kleinfeld és mtsai. 1985). Későbbi eredmények már rámutatnak arra, hogy a $Q_A^- Q_B H$ állapot bizonyos körülmények között energetikailag stabilabb (Takahashi és Wraight, 1992). A kérdést végül Graige és mtsai. (1996) hibrid reakciócentrumok (Q_A helyen naftokinon származékok, Q_B helyen ubikinon) vizsgálatával (driving force assay) döntötték el, az utóbbi javára.



2.4 ábra. A kinon redukciós ciklusa *Rb. sphaeroides* reakciócentrumában (Ädelroth és mtsai. 2000). A cit c donor fénygerjesztést követően redukálja a bakterioklorofill dimert (D) (1. lépés). A 2. és 3. lépésben a RC redoxállapotától függően tört mennyiségű proton köt meg. Egy újabb gerjesztést követően (4. lépés) a Q_B citoplazmából felvesz egy protont, aminek hatására a 2. elektrontranszfer végbemegy (5. lépés). A Q_B második protonját a GluL212-től veszi el, ami a 2. és 3. lépésekben újra pótlódik (6. lépés). Végül a keletkező kinol leválik és egy új kinon köt be (7. lépés).

A felsorolt folyamatok egymást követő fényfelvillanásokra a szemikinon (Q_A^- vagy Q_B^-) felhalmozódását (páratlan fényfelvillanás), ill. eltűnését (páros felvillanás) okozzák.

Veszteségi tényezők miatt (egy-és két-elektronos egyensúlyi állandók, kinonkészlet nagysága, kinonbekötődés, kinolleválás, proton-hozzáférhetőség) az oszcilláló csillapított (Kleinfeld és mtsai. 1984b).

2.5 Protonálódási reakciók a bakteriális RC-ban

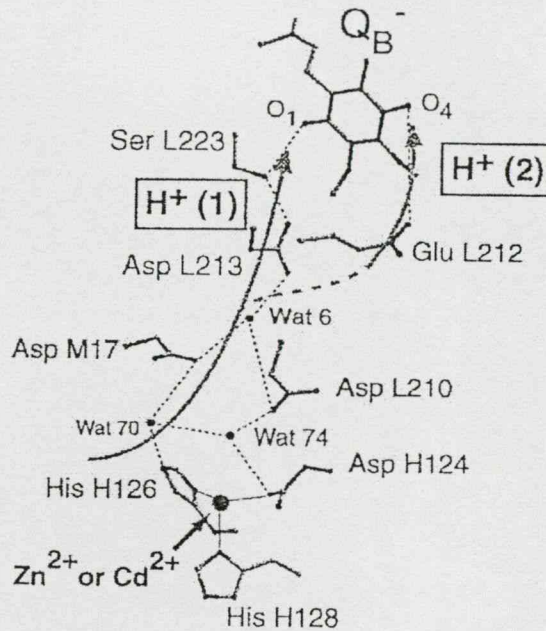
A RC-ban lejátszódó elektrontranszfer-folyamatokhoz protonációs reakciók is társulnak. A két kinon (Q_A és Q_B) számít olyan redoxcentrumnak, amelyek redukált állapotban protonmozgások aktív közreműködői vagy kiváltói lehetnek. A másodlagos kinon, ellentétben Q_A -val maga is képes protonálódni: két elektron és két proton felvételével hidrokinonná alakul, és ezzel az irányított (vektoriális) proton-transzlokáció részesévé válik (McPherson és mtsai. 1993). A RC-ban a Q_B -hez a protonok 3, vízmolekulából és protonálható aminosavakból álló csatornákon keresztül jutnak el (Abresch és mtsai. 1998). A vízmolekulák és protonálható aminosavak magszakítás nélkül, hidrogénhid-kötések láncolatán keresztül kötik össze a fehérje felszínét a Q_B -vel (Ermler és mtsai. 1994). Breton és mtsai. (1998) FTIR vizsgálattal nagymértékben polarizált hidrogén-kötésekről, valamint a kofaktorokat, protonálható aminosavakat és vízmolekulákat körülvevő poláros kötésekben álló hálózatról számoltak be. Azt feltételezték, hogy a proton a hálózaton képes közlekedni a fehérje felszíne és a Q_B között. A Q_A és Q_B környezetében három erősen kötött víz klasztert azonosítottak Fritsch és mtsai. (1998), amelyek szintén fontos szerepet játszhatnak a protonfelvételben. A lánc magszakadása csökkenti a protonfelvétel és a második elektrontranszfer sebességét (Baciou és Michel, 1995).

A RC protonálható csoportjai közül néhány a proton Q_B -hez történő továbbításában is fontos szerepet játszik. Ezek közül először a GluL212 került a figyelem középpontjába, elsősorban a Q_B -hez való közelsége (0,5 nm) miatt. Irányított mutációval (GluL212→Gln) megállapították, hogy részt vesz a második proton Q_B -hez szállításában (Paddock és mtsai. 1989, 1997;

Takahashi és Wraight, 1992; McPherson és mtsai. 1994; Valerio-Lepiniec és mtsai. 1997, 1999; Ädelroth és mtsai. 2000). Hasonló módon *Rhodospseudomonas viridis*-ben GluL212→Lys mutációval mutatták meg a GluL212 protontranszferben játszott szerepét (Albert és mtsai. 1994).

Az irányított mutánsokon végzett mérések tapasztalatai alapján *Rb. sphaeroides* RC-ban a Q_B-hez az első proton az AspL213 és SerL223 (Paddock és mtsai. 1990, 1995) aminosavakon keresztül (2.5 ábra), míg a második proton az AspL213 és GluL212 útvonalon jut el (Okamura és Feher 1992; Paddock és mtsai. 1997). Bár az AspL213 aminosavnak így központi szerepet tulajdonítanak, az AspL213→Asn aminosav-csere következtében a fotoszintetizáló képességét elvesztett mutánsban egy második mutáció (AsnM44→Asp) helyreállította a Q_B-hez irányuló proton-szállítást (Rongey és mtsai. 1993). Ha ez a második mutáció az ArgM233→Cys aminosav-csere, a fotoszintetikus aktivitás szintén visszaállt a vad típus szintjére (Okamura és Feher, 1992). Az ArgH177→His úgynevezett szupresszor mutációval hasonlóan helyreállítható a natív funkció, a második elektrontranszfer ($k_{AB}^{(2)}$) sebessége 1000-szeresére (pH 7,5), a töltés-rekombináció reakció sebessége 30-szorosára nő az AspL213→Asn mutánshoz képest (Paddock és mtsai. 1998). Nabedryk és mtsai. (1998a) megvizsgálták a szupresszor mutáció, okozta szerkezeti változást Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiával. Azt tapasztalták, hogy csak az ArgM233→Cys szupresszor mutánsnál csökkent az AspL213→Asn mutáció következtében megnövekedett 1728 cm⁻¹ sáv (ez a GluL212 protonációját jelző sáv) a natív RC-ra jellemző értékre. Ebből arra következtettek, hogy a GluL212 protonfelvétele és a protontranszfer felélédeése között nincs szoros összefüggés. Erős elektrosztatikus kölcsönhatás van az ArgM233, GluH230 és GluH122 aminosavak, ill. ez utóbbi és a proton-csatorna egy vízmolekulája között (Lancaster és mtsai. 1996; Lancaster és Michel, 1997), valamint az AspL213, AspL210, ArgL217, SerL223 és GluH173 ionos aminosavak között (Shinkarev és Wraight, 1993). A

GluH173→Gln mutáció (bár távolabb van a Q_B-től) az elektrosztatikus kölcsönhatás miatt nagyban gátolta az elektron- és protontranszfert (Takahashi és Wraight, 1996, Nabedryk és mtsai. 1998b).



2.5 ábra. A proton útja a citoplazmától a Q_B-hez. A folytonos vonal a már ismert, a szaggatott vonal a lehetséges protonutat jelöli. Az ábrán látható néhány fontosabb vízmolekula és a Cd²⁺, Zn²⁺ kötőhely is (Okamura és mtsai. 2000).

Átmeneti fémionok hatása a RC protonfelvételére: Az átmeneti fémionok korábban az elektronspin-rezonancia (ESR) vizsgálatoknál játszottak fontos szerepet, mivel a RC nem-hem típusú Fe²⁺ ionja az ESR spektrum nagy tartományát elfedte. A Fe²⁺ más fémionnal helyettesíthető (Zn²⁺, Cu²⁺), így az ESR mérések végzése az elfedett tartományban is lehetséges (Isaacson és mtsai. 1995; Utschig és mtsai. 2000). A vizsgálatok közben egy nem várt effektus jelentkezett:

Imidazol és más szerves komplexekhez fémionok kötődése a szerves kémia széleskörűen tanulmányozott és dokumentált területe. Számításokat is végeztek arra vonatkozóan, hogyan befolyásolja a fémion a protontranszfer sebességét imidazol és ecetsav között (Yazal és mtsai. 2000). Fehérjékben a fémionok támadáspontja elsősorban a His imidazolcsoportja és a savas

aminosavak (Asp, Glu) karboxilcsoportja. A bakteriális RC flash-indukált első elektrontranszfer ($k_{AB}^{(1)}$) sebességét a Zn^{2+} csökkentette: A gyors komponens időállandója 37 μs -ról 50 μs -ra, a lassú komponens 233 μs -ról 3.2 ms-ra növekedett pH 8,0-nál (Utschig és mtsai. 1998). A $k_{AB}^{(2)}$ sebessége (1000 s^{-1} , pH 8.0) még drasztikusabban csökkent: Zn^{2+} esetében 120 s^{-1} , Cd^{2+} esetében 60 s^{-1} (Paddock és mtsai. 1999). Időközben újabb protontranszfert gátló fémionokról számoltak be (Ni^{2+} : Paddock és mtsai. 2000; Beatty és mtsai. 2000, Co^{2+} : Paddock és mtsai. 2000, Cu^{2+} : Utschig és mtsai. 2001). Fémion-komplekek röntgenkristallográfiás vizsgálatával Axelrod és mtsai. (2000a,b) kiderítették, hogy a Cd^{2+} és a Zn^{2+} 3 vízmolekula, valamint három protonálható aminosav, két hisztidin (HisH124, HisH126) valamint egy aszparaginsav (AspH128) által koordinálódik. A Ni^{2+} 2 vízmolekulával és 2 protonálható aminosavval, egy aszparaginsav (AspM17) karboxil csoportjával és egy hisztidinnel (HisH124) koordinálódik tetraéder alakban a fémion körül (Axelrod és mtsai. 2000a,b). A fémion kötőhely és a Q_B környezetében lévő aminosavak között a proton az AspL210 vagy az AspM17 aminosavakon keresztül jut el. Az AspL210 \rightarrow Asn vagy AspM17 \rightarrow Asn egyedi mutánsok esetében a $k_{AB}^{(2)}$ sebessége nem csökkent jelentősen (500 s^{-1}) (Paddock és mtsai. 2000), viszont az AspL210-AspM17 \rightarrow Asn-Asn kettős mutáns esetén sebessége 4 s^{-1} -re csökkent (Paddock és mtsai. 2001). Ez azt jelenti, hogy a két aminosav közül legalább az egyik részt vesz a protontranszferben. Az izolált RC-hoz hasonlóan kromatofórán a protontranszfer erős gátlásáról számoltak be (Keller és mtsai. 2001). Számos más fehérjén tapasztalták az átmeneti fémionok gátló hatását a protontranszferre: Aagard és Brzezinski (2001) *Rb. sphaeroides* citokróm oxidáz, Kannt és mtsai. (2001) *Paracoccus denitrificans* citokróm oxidáz és Ahlbrink és mtsai. (2001) PSII estében.

Az aminosav oldalláncok fényindukált protonálódása. Spektroszkópiai mérések kimutatták, hogy a szemikininok (sem Q_A^- sem Q_B^-) nem protonálódnak közvetlenül, hiszen a 450 nm-nél

megjelenő redox-abszorpcióváltozás csak az anionikus szemikinonokra jellemző (Swallow, 1982). Ennek ellenére megfigyelhető protonfelvétel a RC-ban a Q_A^- vagy a Q_B^- keletkezését követően, amely a szemikinon és a környező ionizálható csoportokkal rendelkező aminosavak elektrosztatikus kölcsönhatásából származik (Wraight, 1979; Maróti és Wraight, 1988b; McPherson és mtsai. 1988, Kálmán és Maróti, 1994). A kölcsönhatás mértékétől függően a csoportok pK értékei megemelkednek, így a (törtmennyiségű) H^+ -iont ezek az aminosavak kötik meg a Q_A^- -val és/vagy Q_B^- -vel való kölcsönhatásukkal arányos mértékben. Foszfátidilkolin vezikulába csomagolt RC protonkötés sztöchiometria és kinetikai paraméterei megegyeznek a detergens oldatban diszpergált RC-on mért értékekkel (Maróti, 1991). Természetesen a donor oldalon a P^+ megjelenését követően (külső elektrondonor hiányában), ellentétes irányú elektrosztatikus kölcsönhatás eredményeként proton leadás történik. (Maróti és Wraight, 1988b; McPherson és mtsai. 1988). Mivel a Coulomb-kölcsönhatás a töltések távolságával fordítottan arányos, így a protonfelvétel főként a kinonok közvetlen környezetében található ionizálható aminosavak részvételével magyarázható (Sham és mtsai. 1999).

Az GluL212 ionizáló állapotának pH-függéséről megoszlanak a vélemények. Paddock és mtsai. (1989, 1997) *Rb. sphaeroides*, Maróti és mtsai. (1994) *Rb. capsulatus* törzsekben a protonfelvétel mérése során kapott magas pK -jú (9,8, ill. 10,1) csoportot azonosították az GluL212-vel. Hienerwadel és mtsai. (1995) *Rb. sphaeroides* GluL212→Gln mutáns elvégzett időfelbontott Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai mérések alapján valószínűsítik, hogy a GluL212 nem a szokásos módon, hanem elnyújtott, Henderson-Hasselbalch összefüggéssel le nem írható pH-függéssel ionizálódik. Ezt a feltevést elektrosztatikus számítások is alátámasztják (Beroza és mtsai. 1995; Alexov és Gunner, 1999; Rabenstein és mtsai. 1998, 2000). *Rb capsulatus* ugyanezen mutánsában a protonkötést közvetlenül mérve azonban nem tapasztaltak az alacsonyabb pH tartományban ($pH < 8.5$).

változást a vad típus protonfelvételéhez képest (Maróti és mtsai. 1995; Miksovska és mtsai. 1996), ami viszont ellentmond az GluL212 szokatlan protonálódásának. *Rb. capsulatus* mutáns törzseiből izolált RC-okban is kimutatták, hogy a közeli (0,5 nm) aminosavakon kívül a távolabbiak (1,5 nm) is szerepet játszanak a proton-szállításban nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatás révén (Maróti és mtsai. 1995). Pl. az GluL212-AspL213→Ala-Ala kettős mutáns nem képes fotoszintetikusán növekedni, mivel nagy valószínűséggel a Q_B^- -hoz vezető protonvezetésre alkalmas útvonala sérült meg (Maróti és mtsai. 1994). De ha további szupresszor mutációkkal (ArgM231→Leu vagy AsnM43→Asp) negatívabb elektrosztatikus környezetet alakítottak ki az adott RC régióban, a protonkötés helyreállt, azaz a hármas mutáns fotoszintetikusán növekedett. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a negatív és pozitív töltésű aminosavak egy hálózatot alkotnak, bármelyikük változása kihat az egész rendszerre (Sebban és mtsai, 1995).

A nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások megfigyelhetők a kevésbé tanulmányozott Q_A^- létrejöttét kísérő fehérje-protonfelvétel vizsgálata során is, mivel a legközelebbi protonálható aminosav Q_A^- -tól 1,2 nm-re helyezkedik el. *Rb. capsulatus* mutánsok (GluL212→Gln, GluL212→Ala, GluL212-AspL213→Ala-Ala, GluL212-AspL213-AsnM43→Ala-Ala-Asp) protonkötési sztöchiometriái a GluL212 kulcsfontosságú szerepét támasztják alá. Bár ez az aminosav a Q_A gyűrűjének középpontjától 1,65 nm-re helyezkedik el, mégis hiányában nem tapasztalható protonfelvétel a vad típus esetében 10,1 pK értékkel protonálódó csoport helyén (Maróti és mtsai. 1995; Miksovska és mtsai. 1996).

A protonálható csoportok hozzáférhetősége a RC fehérjében. A RC szerkezete alapján rendelkezésre álló 166 protonálható aminosav (Allen és mtsai, 1987) közül csak néhány csoport vesz részt a fehérje fényindukált protonfelvételében. A szerkezeten alapuló elektrosztatikai számítások további csoportok hozzájárulását is feltételezik (Beroza és mtsai. 1995; Lancaster és mtsai. 1996, Alexov és Gunner, 1997, 1999). Valamely csoport

fényindukált protonfelvételt a következők befolyásolják: 1.) a csoport távolsága a szemikinontól; 2.) a csoport környezetének dielektromos állandója, amelyet a fehérje lokális hidrofil/hidrofób tulajdonsága határoz meg és 3.) a csoport hozzáférhetősége a vizes fázis számára, amit a fehérjét diszpergáló detergens micella oldószerrel és a fehérjével kialakított kölcsönhatása befolyásol. A protonálható aminosavaknak mintegy 50 %-a a laza globuláris szerkezetű H alegységben helyezkedik el, a membrán citoplazmikus oldalán. Az LM komplex protonálható csoportjainak döntő hányada is a fehérje hidrofób régióján kívül található (Chang és mtsai, 1991), így elméletileg a vizes fázis számára, ahonnan a protonok érkeznek, hozzáférhetők.

A detergens micellák azonos elhelyezkedése ellenére számos folyamatban lényeges különbségek tapasztalhatók az alkalmazott diszpergáló detergens minőségétől függően: A második elektron átadása Q_A^- -ről Q_B^- -ra, ami erős csatolásban van a protonfelvétellel ötször gyorsabb deoxi-kolát (DOC) detergensben $pH = 7,5$ -nél, mint a LDAO-ban (McPherson és mtsai. 1993). A $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltés-rekombináció kinetikája $pH = 8$ -nál szintén eltérő LDAO-ban és TX-100-ban. A lassú komponens részaránya LDAO-ban kisebb, mint TX-100-ban. Ez kisebb másodlagos kinon aktivitást fejez ki. Tiede és mtsai. (1996) ugyanezt a folyamatot vizsgálták β -OG-ban diszpergált RC alkalmazásával, de a másodlagos kinon aktivitását más detergensekben (1 % LDAO, 10 % TX-100) diszpergált UQ_{10} -zel állították helyre. A töltés-rekombinációt $pH=7,8$ -nál mérve ugyancsak a detergenstől függő töltés-rekombinációt kaptak. A kinetikai paraméterek eltéréseinek a magyarázata valószínűleg a detergensnek a vizes fázis kiterjedt hidrogénhid hálózatára gyakorolt eltérő mértékű torzító hatása.

A proton valódi vizes oldatban 5-6-szor nagyobb moláris vezetőképességgel (mobilitással) rendelkezik, mint a többi kis mértékű egyértékű ion. A különlegesen magas proton-mozgékonyosság egy speciális vezetési mechanizmusnak (Grotthus mechanizmus) köszönhető. Az erősen hidratált proton (H_3O^+) a proton donortól az akceptorig nem hagyományos

diffúzióval jut el, hanem a vízmolekulák között kialakuló hidrogénhid-kötések átrendeződésével. A H^+ aktivitási együtthatója (f_H) szoros kapcsolatban van a proton-vezetőképességgel, amelyet azon folyamat sebessége határoz meg, amelynél az adott vízmolekula a proton donor vagy akceptor irányába képes fordulni, illetve a proton a hidrogénhid-kötés egyik végéből a másikig jut. A detergens behatol a vízmolekulák kiterjedt hálózatába és felszabdálja a hidrogénhid-kötéseket. A kialakuló struktúra az eltorzult hidrogén-kötés modellel írható le. Valamennyi vízmolekula továbbra is H-hidak kialakítására törekszik a környezetével, de ezek a kötések meghajlanak és megnyúlnak, míg végül el is szakadnak. Az így kialakuló vízhálózat rendezetlen és változó geometriájú lesz. Az ilyen rendszerben a proton-vezetés speciális mechanizmusa nem képes működni, így a proton a többi ionnal szemben mobilitási előnyét elveszti (Chen és mtsai. 2000).

2.7 A citokróm és a RC kölcsönhatása

A reakciócentrum akceptor oldali bonyolult konformációs, protonátrendeződési lépésekkel kísért protonfelvételi és elektrontranszfer reakciókhoz képest első pillantásra a donoroldal működése egyszerűnek tűnik. Egy vízdékony citokróm c_2 közlekedik a membrán periplazmikus oldalán a citokróm bc_1 és a RC között. A citokróm bc_1 komplex redukálja a citokróm c_2 -t, ami azután RC-hoz diffundál és fénygerjesztést követően keletkező oxidált dimer a citokrómot oxidálja. A RC izolálásával a citokróm bc_1 működését kiiktathatjuk, majd külsőleg hozzáadott citokróm és kinon készlettel elérhető, hogy a citokróm oxidációja a RC működését jellemezze. Az első vizsgálatokat viszonylag tömény (2%) LDAO detergensben szolubilizált RC-on végezték, flash gerjesztést követően 550 nm-nél figyelték meg a citokróm oxidációját. (Prince és mtsai. 1974). A kapott kinetikát monoexponenciálissal illesztették, és a reakciópartnerek közötti bimolekuláris ütközési reakcióként értelmezték. Megfigyelték, hogy a fotooxidáció sebessége az ionerősség négyzetgyökével és a citokróm koncentrációjával

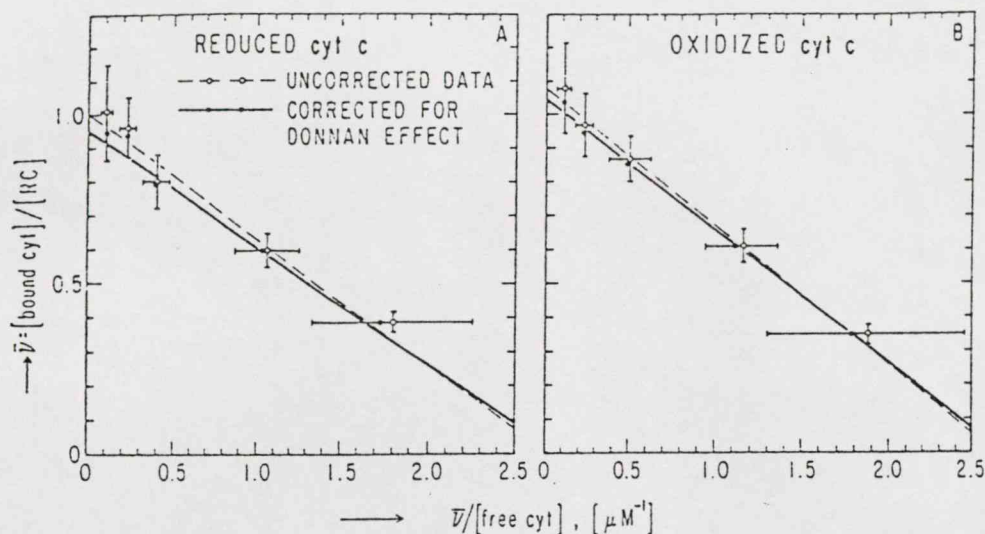
lineárisan változik, ami a bimolekuláris reakcióra jellemző. A RC flash-indukált redoxváltását 604 nm-nél követve szintén meghatározható a citokróm oxidáció sebessége: Nagy ionerősségnél (50 mM) a citokróm a P^+ -t $5\text{-}8\cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sebességgel redukálta (Zhu és mtsai. 1983). Alacsony ionerősségnél és nagy citokróm-koncentrációnál Overfield és mtsai. (1979) egy gyors komponens (2 μs) is azonosítottak, az ionerősség növelésével a komponens amplitúdója fokozatosan csökkent. Mivel kis citokróm koncentrációnál nem volt megfigyelhető, ezért azt feltételezték, hogy a RC-ok egy részéhez a citokróm már a gerjesztést megelőzően kötődik, és így a gyors komponensre mért reakcióidő a fehérjemátrixban végbemenő elektrontranszferre jellemző. A citokróm kötődésére $0.8\text{-}3\cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ látszólagos kötési állandó állapítottak meg a gyors komponens amplitúdójának változása alapján (Overfield és Wraight, 1980a). A citokróm koncentrációját növelve, a lassú komponens sebesség állandója egy határérték felett már nem nő tovább (pszeudo-elsőrendű határérték 200-400 μs). pH, ionerősség és detergens függéséből arra következtettek, hogy a komplexképződés a kölcsönható fehérjék csak egy kis felületének elektrosztatikus hatása által irányított (Rickle és Cusanovich, 1979). Foszfolipid vezikulába csomagolt RC-on a citokróm oxidáció kinetikája szintén egy gyors (10 μs) és egy lassú ($k=1.7\cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) komponensből állt. A gyors komponens amplitúdójának citokróm koncentrációfüggése alapján a citokróm látszólagos kötési állandója (10^5 M^{-1}) megegyezett az oldatban diszpergált RC-on mért értékkel. Mind a citokróm-RC komplexképződés, mind a bimolekuláris reakció érzékenyen függött az oldat ionerősségétől: 180 mM KCl esetén a gyors komponens nem volt megfigyelhető, a bimolekuláris sebességállandó pedig $k=7\cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értékre csökkent (Venturoli és mtsai. 1990). Az elsőrendű határoló reakciót, a komplexképződést követő konformációs, átrendeződési lépésnek gondolták, aminek alapján feltételezték, hogy a citokróm két különböző pozícióban is lehet a kötőhelyen (proximális, disztális pozíció) (Overfield és mtsai. 1979). Emellett egy másik elsőrendű reakciót is feltételeztek, amelyet az

elektrontranszfernek tulajdonítottak. Az elektrontranszfer sebessége és a redoxpartnerek (citokróm, flavin-mononukleotid) redoxpotenciálkülönbsége között Marcus exponenciális egyenlettel (Marcus, 1968) kifejezhető összefüggést találtak Meyer és mtsai. (1984). *Rhodopseudomonas viridis* natív RC-on az elektrontranszfer nagyon gyors komponense (190 ns) 190 K alatt eltűnt, a TyrL162→Thr mutáns esetében a sebesség független volt a hőmérséklettől (8 K-294 K). A különböző viselkedést a vízmolekulák hálózatának változása okozza, mutáns esetében a citokróm oxidációt követő átrendeződés alacsony hőmérsékleten sem gátolt (Mathis és mtsai. 1994; Dohse és mtsai. 1995; Van Rossum és mtsai. 1997; Ortega és mtsai. 1997, 1998, 1999).

Időközben felmerült a kérdés, hogy a RC egy adott citokróm kötőhellyel, vagy esetleg több különböző affinitású kötőhellyel rendelkezik. A korábbi vizsgálatokkal szemben, amelyek egészen eltérő citokróm/RC arányt határoztak meg, először Bowyer és mtsai. (1979) határoztak meg 1:1 sztöchiometriát. Méréseiket *Rhodopseudomonas sphaeroides*, és *Rhodopseudomonas capsulatus* törzsekből izolált kromatofórán végezték. A ciklikus elektrontranszfert antimicin vagy UHDBT hozzáadásával gátolták meg. Többször egymás után adott flash-gerjesztés hatására vizsgálták a keletkezett oxidált citokróm mennyiségét 550 nm-nél, valamint az oxidált dimer mennyiségét 870 nm-nél. A sokadik flash után a steady-state abszorpcióváltozások arányára 0,97 kaptak. Izolált RC-on vizsgálták a kérdést Rosen és mtsai. (1980). Egy olyan féligáteresztő membránt használtak, amely a RC-okra nézve nem a citokrómok számára viszont átjárható volt. A RC-ot tartalmazó oldattér-részben az egyensúly beállta után a citokróm disszociációs állandója (K_D) és n db független, homogén citokróm-kötőhely közötti összefüggést a 2.1 egyenlet írja le:

$$\frac{C_B}{R_T} = n - \frac{C_B}{R_T \cdot C_F} \cdot K_D \quad (2.1)$$

ahol C_B a kötött, C_F a szabad citokróm és R_T az összes RC koncentrációja. Ha C_B/R_T ábrázoljuk $C_B/(R_T * C_F)$ függvényében az n és K_D megkapható a tengelymetszet és a meredekségből (2.6 ábra).



2.6 ábra. A citokróm kötőhely számának meghatározása egyensúlyi dialízis módszerével. Az egyenesek meredeksége a disszociációs állandót (K_D), tengelymetszete a kötőhelyek számát (n) jellemzi. Az oxidált és redukált formák azonos paraméterekkel rendelkeznek (Rosen és mtsai. 1980).

Az ábráról jól leolvasható, hogy a citokrómok redoxállapottól függetlenül 1:1 arányban kötődnek a RC-hoz. A fenti eljárást egyensúlyi dialízisnek nevezik. Habár a fenti eredmények meggyőzően igazolták, hogy csak egy domináns kötőhely van, viszont nem tudták teljesen kizárni egy különböző affinitású második kötőhely létezését. Overfield és Wraight (1986) egy második nem-funkcionális erős kötőhelyet is azonosítottak egyensúlyi kizárási kromatográfiával. Azt feltételezték, hogy az erős kötőhelyről a citokróm leválása gyors elsőrendű reakcióval írható le, szemben a gyengébb kötőhelyről leváló citokróm és egy másik odadiffundáló RC másodrendű reakciójával. Wachtveitl és mtsai. (1993) azt tapasztalták, hogy a fotooxidáció sebessége nagy citokróm koncentráció esetén is tovább növekszik, az ekvimoláris koncentrációknál megfigyelt pseudo-elsőrendű határértéket is túllépi. Eredményüket különböző affinitású kötőhelyek bevezetésével próbálták értelmezni. Amint a

citokróm koncentrációja növekszik, a gyenge affinitású kötőhely telítődik, mivel utána a reakció tovább gyorsul a gyenge kötőhelyen kötött citokrómnak gyorsabban kell donálnia, mint az erős kötőhelyen lévőknek. Eredményeiket később mások nem erősítették meg, a második kötőhely létezése ma is kérdés. A legújabb vizsgálatok a flash-indukált elektrontranszfer redoxitrálása alapján az oxidált citokróm 4-szeresen erősebb kötési affinitását mutatták ki a redukált citokrómmal szemben (Larson és Wraight, 2000b).

További kísérletek a domináns kötőhelynek a RC felületén való lokalizációjára irányultak. Keresztkötő molekulákkal rögzítették a citokrómot a RC-hoz, majd a komplexet izolálták affinitás kromatográfiával és megmérték az elektrontranszfer sebességét. A cit c₂ esetében ugyanakkora sebességet kaptak, mint nem-keresztkötött citokróm esetén, azonban a mitokondriális c-nál 1 nagyságrenddel lassabb volt az elektrontranszfer (Rosen és mtsai, 1983). Mivel a citokróm c az LM komplexhez keresztkötéssel kapcsolódva is hasonló sebességgel donált, a kötőhely az L és M alegységen, legnagyobb valószínűséggel a két alegység által alkotott árokban van. Eredményeiket megerősítették az alegységekhez specifikusan kötődő és az elektrontranszfert gátló antitestek alkalmazásával. Foszfamidil-kolin vezikulába csomagolt RC-on végzett lineáris dikroizmus (LD) vizsgálatok alapján a citokróm két különböző orientációjú kötődéséről számoltak be (Tiede, 1987). Az LD spektrum kinetikája két komponenst tartalmazott: Míg a gyors komponenst erős, addig a lassú komponenst nem jellemezte dikroizmus. Mivel a gyors komponenst 320 µs-os pseudoelsőrendű reakció határolta, ami megegyezik a flash-kísérletek alapján azonosított proximális-disztális átmenettel, úgy vélték, hogy a gyors donálás a speciális orientációnak tulajdonítható. A reakciópartnerek közötti elektrostatikus kölcsönhatás vizsgálatában a következő lépés az volt, hogy ionizálható aminosavak lecserélésével a kölcsönható domént próbálták meghatározni. A citokróm felszínén lévő pozitív töltésű lizin aminosavakat negatív töltésű karboxi-dinitrofenil (CDNP) lizinekre cserélték, a reakciótermékeket ioncserélő-oszlopon

átfuttatva választották el frakciókra (Margoliash és Bosshard, 1983). Ha a frakción mért citokróm fotooxidáció sebessége kisebb, mint a natív citokrómé, akkor az adott lizin meghatározó a RC-cit kölcsönhatásban. A *Rhodobacter sphaeroides* RC és citokróm c_2 közötti kölcsönhatásban a citokróm c_2 35, 88, 95, 97 és 105-ös pozíciójú lizinjei, míg mitokondriális citokróm c esetén 8, 13, 27, 72, 79 és 87 pozíciójú lizinek vesznek részt a kölcsönhatásban (Hall és mtsai. 1987a). Érdekes módon ugyanezen aminosavak játszanak szerepet a citokróm bc_1 -el való kölcsönhatásban is (Hall és mtsai. 1987b). Később CDNP-citokróm c_2 és citokróm bc_1 komplex reakciójának Michaelis-Menten paramétereinek (V_{max}/K_m) változásából arra következtettek, hogy a 97 és 106-os pozíciók közötti lizinek hozzájárulása a legnagyobb (Hall és mtsai. 1989). Különböző fehérjékkel kialakított elektrosztatikus kölcsönhatásban a citokróm c konzervatív, ugyanazon lizinjei vesznek részt: Azt tapasztalták, hogy *Rhodospirillum rubrum* RC és citokróm bc_1 esetén a citokróm c 8, 13, 25, 27, 72, 79 és 87 pozíciójú lizinjei játszanak szerepet a kölcsönhatásokban (Hall és mtsai. 1987c,d). Rieder és mtsai. (1985) trícium (3H) savanhidrid kezeléssel jelölt citokróm c_2 kölcsönhatását vizsgálták *Rhodospirillum rubrum* citokróm bc_1 -en, és azt találták, hogy a Lys109, Lys112 és Glu1 aminosavak játszanak fontos szerepet a kötődésben. A különbséget részben magyarázza, hogy az utóbbi módszert kis ionerősségnél végezték, de egyben ez azt is jelenti, hogy az ionerősség változtatásával az egyedi aminosavak hozzájárulása is módosulhat a kölcsönhatásban. Long és mtsai. (1989) a *Rhodobacter sphaeroides* RC és citokróm c_2 kölcsönhatását vizsgálták, és azt figyelték meg, hogy alacsony ionerősségen a 10, 88, 97, 99, 105, és 106-os pozíciójú CDNP-citokrómok oxidációs kinetikája nem tartalmazott gyors komponenst, ami jelzi a redoxpartnerek közötti lecsökkent elektrosztatikus kölcsönhatást. Más kutatók *Rhodobacter capsulatus* citokróm c_2 12, 14 és 32 pozíciójú lizinjeit protonálható aminosavakra cserélték (Asp, Glu), és azt észlelték, hogy alacsony ionerősségen a megjelent negatív töltések az oxidált formát töltésenként 11-14 mV-al stabilizálták, ugyanakkor nagy

ionerősség esetén a töltések nagymértékű árnyékolása miatt csak a kettős mutánsnál (Lys14-Lys32→Glu-Glu) változott a redoxpotenciál (Caffrey és Cusanovich, 1991; Caffrey és mtsai. 1992). Egy másik megközelítés szerint a citokróm hidrogén kötés rendszere révén biztosítja a működéséhez megfelelő redoxpotenciált. A *Rhodobacter capsulatus* citokróm c₂ 75-ös pozíciójú Tyr hidroxil-csoportját távolították el, ill. cserélték le egy nagy hidrofób csoportra. Azt tapasztalták, hogy a citokróm standard középponti redoxpotenciálja (E₀) mindkét esetben lecsökkent a natívhoz képest (Caffrey és mtsai. 1991). A redoxpotenciál csökkenésével a fotooxidáció sebessége arányosan csökkent, ami egyértelműen jelzi a hidrogén kötések meghatározó szerepét a fehérje működésében.

A szerkezeti vizsgálatok is számos új információt szolgáltatottak. Benning és mtsai.-nak (1991) sikerült a *Rhodobacter capsulatus* citokróm c₂ szerkezetét 2.5 Å feloldással meghatározni. A fehérje 5 α-hélice a hemcsoport körül egy zsebet formál, úgy hogy, a hemcsoport egyik éle a bulk felé nyitva marad. *Rhodobacter sphaeroides* citokróm c₂ és RC komplex helyzetét próbálták meghatározni elektrosztatikus számításokkal: A legnagyobb pozitív potenciált a 95, 97, 99, 103 pozíciójú lizinek környezetében találták, amelyek a citokróm megközelítő forgástengelyével azonos irányú erős dipólust alkotnak (Tiede és mtsai. 1993). A *Rb. sphaeroides* citokróm c₂-RC komplexet sikerült kristályosítani és szerkezetének nagy részét (82 %) 3,5 Å atomi feloldással meghatározni (Adir és mtsai. 1996). Feldolgozás közben az adatok kis részénél (18 %) a feloldás romlott (4,5 Å). A citokróm a RC M alegysége periplazmikus oldalán helyezkedett el, nagymértékű egyezést mutatva a korábbi elektrosztatikus számítások által kijelölt pozícióval. A ko-kristályban a P⁺-t 0,9 μs alatt redukálta, ami megegyezik az oldatban mért kötött citokróm gyors komponensével. Feltételezhetjük, hogy oldatban a komplex szerkezete megegyezik a ko-kristály szerkezetével. A RC pariplazmikus oldalán az AspM184 és AspL155 aminosavak mutációjával a citokróm affinitása lecsökkent, a P⁺ lecsengés az AspM184→Lys mutáció esetén csak a bimolekuláris

rekciót jellemző lassú komponens tartalmazta (Adir és mtsai. 1996). A ko-kristály atomi feloldását később javították (Axelrod és mtsai. 1998; Axelrod és mtsai. 1999). Időközben a *Rb. sphaeroides* egy másik citokrómjának (citokróm c') kristályosítása is elkezdődött (Eldred és mtsai. 1997). Larson és Wraight (2000a,b) redoxállapottól függő kinetikai komponenseket különböztetett meg oldatban vizsgált *Rb. sphaeroides* RC-citokróm komplexen. Az oxidált citokróm erősebben kötődött a RC-hoz, és így a P⁺ kinetikáját módosította. Kinetikailag szétválasztható orintációjú komplexeket vizsgáltak kis szögű neutron-diffrakcióval Tiede és mtsai. (2000), azt találták, hogy a ko-kristályhoz hasonlóan a komplex 1:1 arányban tartalmazta a fehérjéket. Vizsgálataik megerősítik a korábbi eredményeket, hogy az oldatbeli komplex szerkezete megegyezik a ko-kristály szerkezetével. A RC periplazmikus felületén savas aminosavak lizinre cserélésével a komplex disszociációs állandóját határozták meg (Tetrault és mtsai. 2001). A mutánsok közül az AspM184→Lys mutáció esetében tapasztalták a legnagyobb növekedést ($K_D=0,5 \mu\text{M}$ -ról $K_D=250 \mu\text{M}$ -ra). Sikertült olyan mutánst is létrehozni, amely nagyobb affinitást mutatott a natív RC-nál (Tetrault és mtsai. 1998).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A RC működését vizsgáltam folytonos megvilágítás közben. Célom az volt, hogy a fotociklust határoló lépéseket azonosítsam, és azok kinetikai és energetikai jellemzését megadjam. Továbbá célom volt, hogy tisztázzam, vajon a fémion deprotonációs vagy elektrosztatikus hatása gátolja a RC működését. Az alábbi kérdések indították el a részletes vizsgálatokat:

a.) A citokróm átfordulásának ionerősség-függésének vizsgálatában:

Hogyan hat az ionerősség a citokróm átfordulásának sebességére?

Milyen hatást váltanak ki különböző kationok?

Hogyan befolyásolja a citokróm oxidáció sebességét, ha az ionerősség mellett más paramétereket (pH, viszkozitás, citokróm koncentráció) is változtatunk?

b) Átmeneti fémionok alkalmazásakor:

Mi a fémion hatás tényleges mechanizmusa?

Miért van különbség a különböző fémionok hatása között?

A disszociációs állandó pH titrálásával milyen aminosavak azonosíthatók a fémion kötésében?

Hogyan tudja gátolni egyszerre az első és második elektrontranszfert is, ha azok egészen különböző reakciók által határoltak?

Egyezik-e a citokróm átfordulás sebessége a második elektrontranszfer sebességével? Mi a fotociklus határoló lépése?

A protontranszfer gátlása megegyezik-e a fényindukált protonfelvétel gátlásával?

Kompenzálható-e a gátlás gyenge savak alkalmazásával?

Milyen hatása van a fényindukált protonkötés sztöchiometriájára?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkat *Rhodobacter sphaeroides* bíorbaktériumokból izolált reakciócentrumokon végeztük. A *Rb. sphaeroides* törzsből az *R-26*-os mutánst használtunk, amelyből hiányoznak a látható spektrumtartományban (500 nm körül) erősen abszorbeáló karotinoidok.

4.1 A baktériumok tenyésztése

A *Rb. sphaeroides* bíorbaktériumokat fotoheterotróf módon, levegőtől elzárva Siström-táplódatban neveltük. Az *R-26* mutáns esetében, az átoltást követően, a megvilágítás előtt a sejteket 5-8 órán keresztül sötétben tartottuk, hogy a táplódatban oldott oxigén a sejtlélegzés során felhasználódjon (Maróti és Wraight, 1988a). A bíorbaktériumok növekedéséhez szükséges megvilágítást wolfram szálás izzók szolgáltatták, amelyek emissziója a közeli infravörös színtartományba esik, ahol a baktériumok jól abszorbeálnak. A megvilágítás erősségét az alkalmazott izzók teljesítményének és geometriai elrendezésének megválasztásával $90-100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ értékre állítottuk be. A tenyésztést 1 liter űrtartalmú üveggömbökben végeztük. A szuszpenzió túlzott mértékű felmelegedését ventilátorok alkalmazásával gátoltuk meg. A tenyészet hőmérsékletét 29°C -on stabilizáltuk. A sejteket növekedésük késői logaritmikus fázisában 8000 g gyorsulással 10 percig centrifugáltuk, majd többszöri Tris pufferrel (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0) történő átmosás és újbóli centrifugálás után, további felhasználásig -20°C -on tároltuk.

4.2 A reakciócentrum izolálása

Mintegy 100 g lefagyasztott sejtet kiolvasztás után Tris-pufferrel 160 ml-re hígítottunk, majd hidraulikus dugattyús présben (French press) 140-150 MPa nyomáson a sejteket feltörtük. Sajtolás után azonnal proteázgátlót alkalmaztunk. Az EDTA (10 mM, pH 8) a jelenlévő



fémionokkal kelátokat képez, jelentősen lecsökkenti azoknak a proteázoknak az aktivitását, melynek működéséhez bivalens kationok szükségesek. A feltöretlen sejteket és a sejtfal darabjait centrifugálással (20000 g, 15 perc, 4°C) ülepitettük le. A felülúszót 200000 g gyorsulással 90 percig ultracentrifugában centrifugáltuk. Az üledéket, amely lényegében a számunkra értékes kromatofórát tartalmazta, óvatosan, minimális Tris pufferrel felfuszpendáltuk, elkerülve a szürke központi magot, amely szervetlen szennyezéseket és további sejtfalmaradványokat tartalmazott.

A fentiek szerint elkészített kromatofóra optikai denzitását 860 nm-nél, 1 cm-es küvettában mérve, pufferrel történő hígítással 50-re állítottuk be. Szobahőmérsékleten, gyenge fényben, állandó keverés mellett annyi 30 %-os LDAO oldatot csepegtettünk a kromatofórához, hogy az LDAO koncentrációja 0,45 % legyen. Mintegy 30 perces sötétben történő keverést követően ismételt ultracentrifugálás (240000 g, 90 perc, 4°C) következett. A reakciócentrumok mintegy 90 %-a a felülúszóban halmazódott fel. A feltárás hatékonyságát optikai úton ellenőrizhettük a monomer bakterioklorofill 802 nm-es csúcsánál ($\epsilon=318 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, McPherson és mtsai. 1994). Amennyiben a preparálás hatásfokát nem találtuk kielégítőnek, úgy az LDAO-val történő kezelést és az ultracentrifugálást megismételtük.

4.3 A reakciócentrum tisztítása

A *Rb. sphaeroides*-ből izolált reakciócentrumot több lépésből álló ammónium-szulfátos precipitálással tisztítottuk. Az LDAO koncentrációját 1 %-ra emeltük, mert így a kicsapódó pellet stabilabbnak bizonyult. Első lépésben az oldat pH-jának állandó értéken tartása mellett (pH 7.0), fokozatosan szilárd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot adtunk a reakciócentrumhoz (0,27 g/ml), majd 8000 g gyorsulással 15 percig centrifugáltuk. A pelletet az LDAO koncentráció csökkentése érdekében, LDAO nélküli pufferben (Tris) felfuszpendáltuk, majd egyenlő térfogatú AS pufferben (0.5 g/ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM Tris, 0.03 % LDAO, pH 8.0) ismételten kicsaptuk.

Centrifugálás után (8000 g, 10 perc) a RC ismét a felülúszóban található, amelyet a TL-pufferben (10 mM Tris, 0.03 % LDAO, 1 mM EDTA, pH 8,0) szuszpendáltuk fel. Ezt követően a só-koncentrációt alacsonyabbra állítottuk be (0,12 g/ml), így a RC oldatban maradt és különböző szürkészöld fehérjék csapódtak ki, amelyeket ismételt, az előző lépéssel megegyező paraméterű centrifugálással választottunk el. A reakciócentrum tisztaságát az egyes tisztítási fázisok után az abszorpciós spektrum két jellemző sávjának (280 és 800 nm) extinkció arányából határoztuk meg. A 280 nm-re centrált sáv az aromás aminosavakra (Trp, Tyr, Phe) jellemző, amelyek száma a RC szerkezetéből ismert. Az abszorpciós együtthatók felhasználásával meghatározható, hogy a tiszta fehérje esetében mekkora lehet ennek a csúcsnak az intenzitása a 800 nm-nél abszorbeáló monomerekus bakterioklorofill mennyiségéhez viszonyítva, amelyből 2 van a RC-ban (Bkl_A és Bkl_B). A fenti arány tökéletesen tiszta preparátum esetén 1,2 körül van. Meg kell említeni, hogy ezek az értékek a másodlagos kinon aktivitásának helyreállítása nélkül (a preparálás során a Q_B-nak mintegy 50 %-a elvész) mérhető arányok, hiszen a kinonoknak is van 280 nm körül abszorpciós sávjuk, amely ezt a viszonyszámot kb. 1,26-ra emeli. A kisózásos technikával elérhető tisztaság legfeljebb 2. Ha ezt az értéket az eddigi frakcionált kicsapásokkal nem sikerült elérni, akkor az első 3 lépést megismételtük. Ha kellően tisztának találtuk a preparátumot, akkor az ammónium-szulfát koncentrációját ismét 0,25 g/ml-re emeltük. A kicsapódott reakciócentrumot lecentrifugáltuk és minimális TL-pufferben felsuszpendáltuk. A tisztaságon kívül a másik lényeges preparálási paraméter a már említett másodlagos-kinin aktivitás (kinonkötő képesség). Ezt a sztöchiometrikus mennyiség 10-20-szoros értékével tudtuk 90-95 %-os valószínűséggel visszaállítani. Ennek egyik ellenőrzése lehet egyetlen telítési fényfelvillanást követő töltés-rekombináció komponensanalízise (ld. Abszorpciós kinetikák c. fejezetet), ahol a lassú komponensnek a teljes jel nagyságához viszonyított aránya jellemzi a másodlagos-kinon aktivitást (Wraight és Stein, 1983).

A különböző reakciócentrumokat anion-cserélő kromatográfiával tisztítottuk tovább. Ezt megelőzően a minta só-koncentrációjának csökkentése érdekében a 12 órás dialízist (Visking 5/32 dializáló membrán, Serva) alkalmaztunk, a dializáló fürdő (TL-puffer) gyakori cseréjével biztosítva a kellő hajtóerőt a folyamathoz. A kromatográfiához használt oszlopanyagot (DEAE Sephacel, Sigma) felhasználás előtt 1 M-os NaCl-oldattal aktiváltuk, majd kb. 2 liter TL pufferrel átmostuk. A TL puffer mennyiségét az határozza meg, mikor lesz az oszlopra felvitt oldat pH-ja megegyező az onnan lecsepegővel (pH 8,0). Ezt követően a dializált és hígított RC-ot felrétegeztük az oszlopra és a szennyeződések (elsősorban antenna maradványokat) 60 mM NaCl-ot tartalmazó TL-pufferrel az oszlop térfogatának többszörös mennyiségével kimostuk. Ekkor a RC is lassan halad az oszlopon lefelé. Az oszlop hosszának helyes megválasztásával elérhető, hogy a szennyeződések eltávolítása után a RC az oszlop alsó harmadában legyen. A fő sávot 150 mM NaCl tartalmú TL-pufferrel távolítottuk el az oszlopról, mintegy 20, egyenként 5 ml térfogatú frakciókat gyűjtve. Az egyes frakciók tisztaságát a korábban már említett abszorpciós sávok arányából határoztuk meg. *Rb. sphaeroides*-ből izolált reakciócentrumoknál pedig 1,2 –1,6 közötti tisztaságú preparátumokat tekintettük további felhasználásra alkalmasnak. Az oszlopon maradt erősen szennyezett reakciócentrumot 400 mM só-koncentrációval távolítottuk el. A tiszta frakciókat összegyűjtöttük, ultraszűréssel (Whatman 100 membrán, 0,16-0,2 MPa) töményítettük (általában 50 μ M koncentrációra), majd a másodlagos kinon fotokémiai aktivitását állítottuk vissza 2 ubikinon-50/RC hozzáadásával. Az így preparált RC-ot -20°C -on tároltuk.

4.4 Az LDAO lecserélése más detergensre

A protonfelvétel mérésekor zavaró lehet, hogy a preparálás során a membrán helyettesítésére, a reakciócentrum szerkezetének megtartására használt micellákat alkotó ionos sajátságú LDAO molekuláknak is van protonálható csoportja, így protonálódási/deprotonálódási

reakciókban vesznek részt. Más detergens alkalmazása a preparatív munkában jelentősen lecsökkentené a kinyerhető reakciócentrum mennyiségét, ha egyáltalán alkalmas lenne a membránból kioldani azt. Ezért a RC preparálását követően kellett a nem kívánt protonációs sajátosságú detergenst más, nem ionos detergensre cserélni. Ezt a folyamatot dialízissel vagy többszöri hígítást követő ismételt ultraszűréssel valósítottuk meg. Az előbbi módszer használatakor az LDAO micellába ágyazott RC-ot dializáló membránba helyeztük, és a másik detergens (0,03 % Triton X-100, Serva) micelláris oldatába, mint fürdőbe (detergens a fenti koncentrációban, 10 mM NaCl, pH 8,0) merítettük. A fürdő gyakori cseréjével 24, esetenként 48 órás dialízist követően elértük, hogy a RC-ot körülölelő LDAO micellák 95 %-ban kicserélődtek az új detergens micelláira. A dialízálás során az oldat ionerősségét 1 mM-ra állítottuk be, mivel a citokróm átfordulás sebessége érzékenyen függött az ionerősségtől. Az oldatban maradt EDTA koncentrációját többszöri dialízissel 0,1 μ M alá csökkentettük, hogy az átmeneti fémek vizsgálatát ne befolyásolja.

Ultraszűrésnél hasonlóan jártunk el, az új detergenssel való többszöri hígítás és ultraszűrés után átvittük a reakciócentrumot az új detergens micelláiba. A fent vázolt mindkét módszer alkalmas a RC puffer-mentesítésére is. A protonációs méréseknél zavaró pufferek (elsősorban az eredendően jelenlévő Tris) kis molekulatömegük révén, mindkét membrán pórusain átjutnak, így lecsökken a RC-ot tartalmazó minta puffer-kapacitása, lehetővé téve kicsiny protonjelek detektálását is.

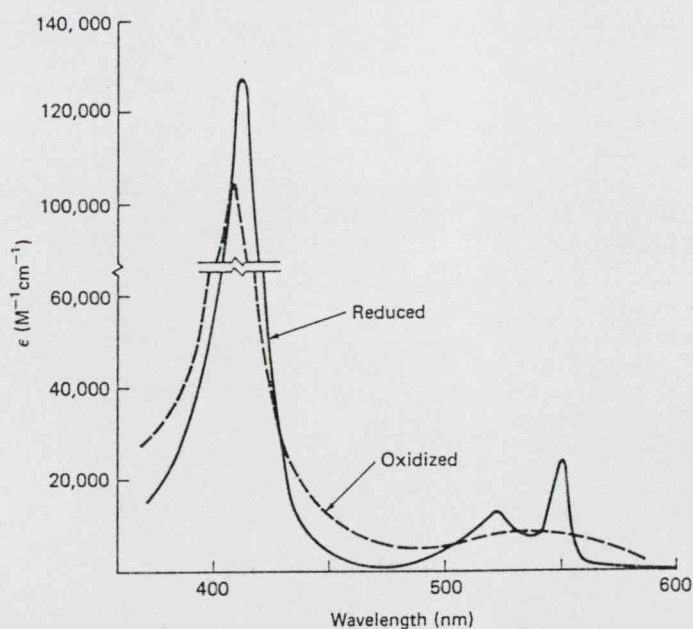
4.5 A citokróm c_2 izolálása és redukálása

A *Rb. sphaeroides* R-26-os mutánsa kis mennyiségű citokróm c_2 -t tartalmaz, ezért célszerű az izolálását az ATH 2.4.1.-es mutáns sejtjein végezni, amelyben egy mutáció következtében a citokróm c_2 fehérje expressziója sokkal erőteljesebb (Meyer és Cusanovich, 1985). A sejtek feltörése és centrifugálása után, a felülúszót 200000 g gyorsulással 90 percig

ultracentrifugában centrifugáljuk. Az üledék tartalmazza a kromatóforát, a felülúszó pedig a membrán periplazmikus oldalához lazán kötött citokrómok. A kromatóforát 1 l, 100 mM-os foszfát pufferrel (pH 7,0) átmoszuk, és a felülúszót az eredetihez öntjük. A nyert felülúszót DEAE- cellulóz-oszlopra rétegezzük fel, majd 200 mM-os foszfát pufferrel (200 mM NaCl 100 mM foszfát pufferben) eluáljuk. Az eluátumot, amely már nem tartalmazza a bakteriális ferredoxint, hozzáadjuk az oszlopon leszaladt oldathoz, majd Sephadex G-25 gélszűrő oszlopra tesszük, vagy speciális ultrafiltráló membránnal ultrafiltráljuk. A sótanított oldat pH-ját sósavval pH 5-re állítjuk, majd 30000 g gyorsulással 10 percig centrifugáljuk, hogy a maradék kromatóforát eltávolítsuk. A felülúszó pH-ját 1 mM Tris pufferrel pH 7,3-ra visszaállítjuk. A pH 5-ös csapadékot Tris pufferrel (pH 7,3) átmoszuk, és a felülúszóhoz öntjük. Majd ismételen DEAE-cellulóz oszlopra rétegezzük az oldatot. A citokróm c₂ 20 mM-os eluálást követően a 40 mM-os foszfát pufferrel (40 mM NaCl 100 mM foszfát pufferben) eluálható. A tisztasági fokot nagymértékben javíthatjuk, ha az eluálást 2mM-os lépésekkel végezzük. A tisztasági fokot a redukált citokróm Soret sávja és 280 nm-es abszorpció aránya adja meg (0,23). Más koncentrációtartományban a *Rb. sphaeroides* különböző citokrómjai eluálhatók: A c₂ mellett a c', az SHP (sphaeroides heme protein), a c-551.5 és c-554 már régóta ismertek (Bartsch, 1971; Meyer és Cusanovich, 1985). Névrégiben fedezték fel a c_γ-t (Jenney, Jr és Daldal, 1993; Jenney, Jr és mtsai. 1996; Myllykallio és mtsai. 1999; Daldal és mtsai. 2001), az oxigén-hem kötő fehérjét (Klarskov és mtsai. 1998) és egy alacsony redoxpotenciálú két hemcsoportot tartalmazó (dihem) fehérjét (Vandenberghe és mtsai. 1998). Más baktériumtörzsekben: (1) *Methylophilus methylotrophus*-ban a c''-t azonosították (Klarskov és mtsai. 1999), majd a szerkezetét is meghatározták (Brennan és mtsai. 2001). (2) *Rhodocyclus tenuis*-ban egy másik, a *sphaeroides* alacsony redoxpotenciálú citokrómjától különböző dihem fehérjét azonosították (Devreese és mtsai. 2000). (3)

Chlorobium tepidum-ban az oxidált P840-t két különböző citokróm redukálja (Oh-oka és mtsai. 1995).

Az izolált citokróm c₂-t vagy a mitokondriális citokróm c-t (Sigma) kétféle módon is redukálhatjuk. (1) Megfelelő koncentrációjú citokróm oldaton Pt korom jelenlétében 20 percig hidrogén gázt buborékoltatunk át. (2) Kis lépésekben, vízben feloldott Na-ditionitot adunk a citokróm oldathoz és spektrofotométerrel követjük a citokróm abszorpcióváltozását. Ha az 550 nm-es csúcs nem növekszik tovább, akkor az összes citokróm redukált állapotban van. Az esetleg feleslegben jelenlévő Na-ditionit kiredukálja a mintában lévő kinont, így azt el kell távolítani Sephadex G 25 oszloppal. A redukált citokróm -20 °C-on tárolva 2 hétig használható fel. Mérések előtt a citokrómot redoxküvetében, Ni atmoszféra alatt tartottam.



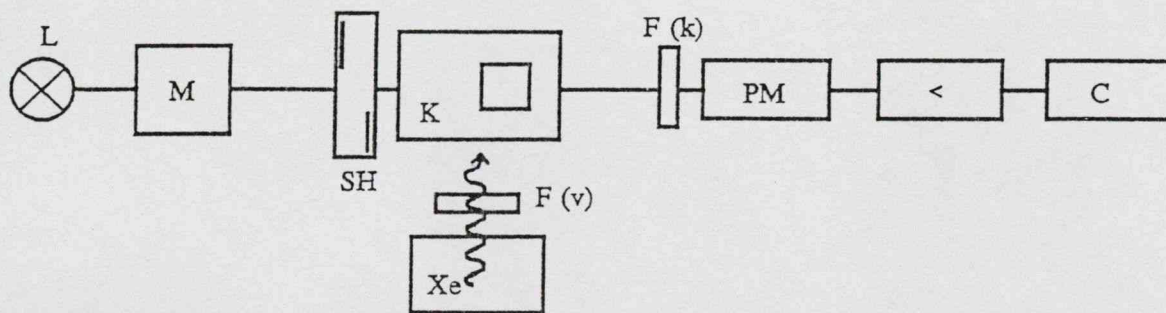
4.1 ábra. A mitokondriális lószív citokróm c oxidált és redukált formájának abszorpciós spektruma.

4.6 Optikai módszerek

4.6.1 Abszorpciómérő készülékek

Az abszorpciós és a különbségi abszorpciós színeképeket számítógép vezérelt spektrofotométerrel (ATI, Unicam) vettük fel.

A fényfelvillanás (flash) okozta abszorpcióváltozást házi készítésű egysugaras kinetikai fotométerrel vizsgáltuk (4.2 ábra) (Maróti és Wraight, 1988a). A nem gerjesztő intenzitású mérőfényt egy stabilizált áramforrásból táplált halogén izzó szolgáltatotta (12 V, 100 W). Az izzólámpa fényét kondenzor lencsével a monokromátor (Jobin-Yvon H20 VIS) belépő részére fókuszáltuk, míg a kilépő részt a mintatartóban elhelyezett küvettán keresztül a foto-elektronsokszorozó (Hamamatsu R-928) fotokatódjára képeztük le. A küvettában elhelyezett oldatot a mintatartó alá épített mágneses keverővel kevertük. Az optikai gerjesztés Xe villanólámpával (EG&G FX200, félidő 6 μ s) 1 kV töltőfeszültség és 4 μ F kapacitású kondenzátor használatával történt.



4.2 ábra. Egysugaras kinetikai spektrofotométer vázlata. Jelölések: L-mérőfényt szolgáltató fényforrás, M-monokromátor, SH-fényszár, K-mintatartó, F(k) és F(v)-kék és vörös optikai szűrők, PM-foto-elektronsokszorozó, <-erősítő, C-számítógép, Xe-villanólámpa.

A telítési gerjesztést fényvezető plexirúd alkalmazásával biztosítottuk. A foto-elektronsokszorozót keresztezett optikai szűrők védték: a Xe lámpa fényét 750 nm felett átengedő szűrőn (Kodak zselatin) vezettük keresztül (a megmaradó vörös sáv elegendő a telítési gerjesztéshez), míg a fotokatód elé széles sávú kék szűrőt (Corning 4-96) helyeztünk. A foto-elektronsokszorozó DC-szintjét 200 mV-ra állítottuk be, amit a mérőfény hatására a változtatható munkaellenálláson (10-100 k Ω) fellépő feszültséggel a fényfelvillanás előtt kiegyenlítettük. A detektor jelét egy Advantech PCL818 analóg/digitális átalakító közbeiktatásával egy IBM PC/386 AT számítógéppel dolgoztuk fel.

A RC átfordulását folytonos megvilágítás mellett a citokróm 550 nm-nél mért abszorpcióváltozásával mértem. A folytonos fényforrás egy 796 nm-nél emittáló száloptikás lézerciódája volt (Opto Power, OPC-A002-796-FC/150, 1,2 W, 3 nm-nél kisebb sáv szélesség), amelynek fényét egy 3*3 mm-es küvettára fókuszáltuk. A lézerciódája és a többi műszer (oszilloszkóp, számítógép) működését impulzusgenerátorral szinkronizáltuk (Híradástechnika, TR 0360). A mérőberendezés optikai része egyébként megegyezett a 4.2 ábrán bemutatott készülékkel. A méréseket szobahőmérsékleten (296 K) végeztük.

4.6.2 Abszorpciós kinetikák

Méréseink túlnyomó többségét abszorpciós vizsgálatok alkották: (1) Másodlagos elektrondonor (citokróm) hiányában mértük RC-on (1 μM) egyetlen telítési fényfelvillanást követő töltés-rekombinációt 430 nm-nél (Kleinfeld és mtsai. 1984a; Labahn és mtsai. 1994; Ortega és mtsai, 1996; Schmid és Labahn, 2000). A kinetika két jól elkülöníthető komponensből állt, amely natív, másodlagos-kinon aktivitással rendelkező RC-okban abból származik, hogy a Q_B kötőhelyek betöltöttsége nem teljes (a gyakorlatban maximálisan 95 %-os Q_B aktivitással számolhatunk). A maximális Q_B betöltöttség eléréséhez legalább 20 μM UQ₁₀ kellett használnunk. Így a RC populációja heterogén, léteznek csak Q_A -t tartalmazó RC-

ok is, melyek rekombinációja mintegy 10-szer gyorsabb ($k_{AP}=10 \text{ s}^{-1}$, pH 8,0), mint a tökéletes funkcionáló RC esetén megfigyelhető érték ($k_{BP}=1 \text{ s}^{-1}$, pH 8,0). Ha a detergens koncentrációját növeljük (a micellák kinonkészletét csökkentjük) a $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltés-rekombináció időállandója növekszik ($k_{BP}=1,2-1,5 \text{ s}^{-1}$), mivel a micellák közötti kinoncsere sebessége határoolja a töltés-rekombinációt (Shinkarev és Wraight, 1997). Az abszorpcióváltozás amplitúdója alapján határoztam meg a fotoaktív RC-ok koncentrációját ($\epsilon=26 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Folytonos gerjesztést használva a primér töltéspár ($P^+Q_A^-$) a fotokémiai sebességgel (k_p) keletkezik, amely egy exponenciálissal jól illeszthető. (2) A töltés-rekombináció még jobban detektálható 865 nm-nél ($\epsilon=120 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ahol az abszorpcióváltozás ellentett előjelű. Folytonos gerjesztés alatt a P^+ felhalmozódásának nyomon követése csak 865 nm-nél lehetséges, ahol a citokróm már nem abszorbeál. (3) Az első elektrontranszferet a szemikininon 398 nm-nél megfigyelt abszorpcióváltozásával követtük nyomon (Li és mtsai. 1998). A rendkívül kis jelet 64 vagy 128 átlagolás után, lehetőség szerint mono- vagy biexponenciálissal illesztettük. A jel/zaj viszony növelése érdekében nagy koncentrációban használtam a RC-ot (2-3 μM). (4) A szemikininok (Q_A^- és Q_B^-) második flash utáni élettartamait határoztuk meg 450 nm-nél (Kleinfeld és mtsai. 1985). A második flash 0,5 s múlva követte az elsőt. Ahhoz, hogy a második flash PQ_A állapotú RC-ot gerjeszthessen citokrómot (20 μM) kell hozzáadnunk, amelynek abszorpcióváltozása egy konstans része a kinetikának. A mérés előtt 10 percig sötétben kell tartani a mintát, hogy a gyenge fényen is kialakuló kinon heterogenitás megszűnjön. A kinetika szobahőmérsékleten jól illeszthető egy exponenciálissal. (5) A protonkötés sztöchiometriáját és kinetikáját a P^+/P különbségi szinképek izoszbesztikus pontjánál ($\lambda=586 \text{ nm}$) 40 μM pH-indikátor festék jelenlétében határoztam meg. (Maróti és Wraight, 1988a; ld. a következő fejezetet). A protonkötés sztöchiometriája és kinetikája eltérő a Q_B mentes (Q_B inaktív) RC-on. Terbutrin (100 μM) hozzáadásával elérhető, hogy a RC-ok kevesebb, mint 1-2 %-a tartalmazzon Q_B -t.

Az első flash után mért protonkötés kis abszorpcióváltozással jár, ezért 64 átlagolás szükséges. A kinetika Q_B aktív RC-on jól, Q_B inaktív RC-on kevésbé jól illeszthető monoexponenciálissal. A második flash után mért protonkötésnél, nem használhatunk citokrómot, mivel annak protonációja túlságosan elbonyolítaná a kiértékelést. A nem protonálódó, 586 nm-nél nem abszorbeáló ferrocén ideális donornak bizonyult. A donációs ideje viszont kisebb (1 ms), mint a citokrómé, ezért a nagyon gyors protonkinetikák bifáziskussá válnak, ahol a lassú komponens a ferrocén donálásának tulajdonítható. A mérést ebben az esetben is a minta 10 perces sötétadaptálása előzte meg. (6) A citokróm redox-abszorpcióváltozása legjobban 550 nm-nél figyelhető meg. Mivel a P^+ -nak 540 nm-nél izozbesztikus pontja van, ezért a tényleges citokróm abszorpcióváltozást az 550 nm-nél és az 540 nm-nél felvett különbségi kinetika szolgáltatja. Az oxidált citokróm koncentrációját a különbségi extinkciós együtthatóval ($\epsilon_{red}-\epsilon_{ox}=21.1\pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) számíthatjuk ki (Van Gelder és Slater, 1962). A keletkezett oxidált citokróm mennyiségét a RC koncentrációjára normáljuk. Ha folytonos gerjesztés alatt mérjük a RC átfordulását nagy mennyiségű citokróm ill. kinonkészletet kell biztosítani. Az UQ_{10} -et előzetesen 30 %-os Triton X-100 detergensben szonikáljuk, hogy a kinon a RC-ot övező detergensben kellő sebességgel közlekedhessen. Az UQ_6 alkoholban és lipidekben is jól oldódik, ezért nem szükséges előzetes szonikálása. A stacionárius citokróm átfordulásához a következő kinon koncentrációkat használtam: 25 μM UQ_6 vagy 500 μM UQ_{10} . A kapott kinetika egyenes, amelynek meredeksége a citokróm oxidáció sebességét eredményezi.

4.7 A protonfelvétel mérése

a) *pH-indikátor festékekkel*: A pH-indikátor festékek gyenge szerves savak, illetve bázisok lévén vizes oldatban az oldat pH-jától függően részlegesen disszociálnak. Mivel a protonált és deprotonált formák színe eltérő, így alkalmazásukkal a látható tartományban, az

elektrontranszfer folyamatok tanulmányozására használt egysugaras kinetikai spektrofotométerrel a fehérjékben lezajló protonációs folyamatok jó felbontással nyomon követhetők (Maróti és Wraight, 1988a,b). A festék kiválasztásánál körültekintően kell eljárni, mert bizonyos festékek eloszlása nem egyenletes, kötődhetnek a micellához, a fehérjéhez vagy a membránhoz, sőt adott esetben át is hatolhatnak a membránon. Ez a kalibrálást meglehetősen bonyolulttá teheti, mert a festék-micella, festék-fehérje vagy a festék-membrán kölcsönhatások megváltoztathatják a festék spektrális jellemzőit. Ionos detergens alkalmazásával a festékek pK -ja, a fellépő elektrosztatikus kölcsönhatás miatt eltolódik. További nehézségként jelentkezik a RC kromoförjainak redoxváltozásából származó elektrokróm hatás. Ennek fő oka lehet, hogy a protondetektor a RC hidrofób tartományaihoz adszorbeálódik. Ez az elektrokróm hatás az általunk használt nagy ionerősségeknél (100 mM) leárnyékolható (Maróti és Wraight, 1997). Mindezek figyelembevételével a nettó protonválaszt nem a \pm festék különbségi jel, hanem a + festék \pm puffer jel szolgáltatotta, tekintve, hogy a protonálódásból származó jel érzékeny az oldat pufferkapacitására.

A pH-indikátor festék válaszjelének kalibrálása két módszert használtam:

- *belső kalibráció*: Q_B aktivitással rendelkező RC-ok minden páros számú telítési fényfelvillanásra 2 protont vesznek fel környezetükből ($Q_B + 2H^+ \rightarrow Q_BH_2$).

- *külső kalibráció*: ismert mennyiségű savat (HCl) adtam a mintához állandó keverés mellett, úgy hogy a H^+ koncentrációjának változása 5, 10 és 20 μM legyen, majd a kapott válaszjelet a savval megegyező térfogatú desztillált víz hozzáadásával korigáltam a néhány ezrelékes hígításra. A spektroszkópiai mérések során kettős követelményt kellett teljesíteni: a kiválasztott hullámhosszon ne legyen zavaró a lényegesen nagyobb töltés-rekombinációból származó jel, valamint a festék válaszjele ezen a hullámhosszon még kellően nagy legyen. Az előbbi követelménynek a P/P^+ különbségi spektrum izobesztikus pontján ($\lambda=586$ nm) elvégzett méréssel tehetünk eleget. Az általam használt festékek alkalmazhatóságuk pH

tartományai: bróm-krezolbíbor (BKB, Reanal, $5.5 < \text{pH} < 7.5$), o-krezolvörös (OKV, Reanal, $7.0 < \text{pH} < 9.0$), o-krezolftalein (OKF, Reanal, $8.7 < \text{pH} < 10.1$). Az alkalmazott pufferek: MES (Sigma, $5.5 < \text{pH} < 6.7$), Bis-Tris (Sigma, $5.8 < \text{pH} < 7.2$), Hepes (Calbiochem-Behring, $7.0 < \text{pH} < 8.0$), Tris (Reanal, $7.8 < \text{pH} < 8.8$), Bis-tris-propán (BTP, Sigma $6.5 < \text{pH} < 9.5$) és CAPS (Sigma, $9.7 < \text{pH} < 11.1$).

b.) *pH-érzékeny üvegelektóddal* (McPherson és mtsai. 1988): Az elektród üvegmembránján átdiffundáló vagy ahhoz adszorbeálódó H^+ -ionok egyensúlyi, membránon keresztüli potenciált váltanak ki. Vizsgálatainkhoz Ag/AgCl referenciaelektóddal egybeépített szemimikro kombinált elektródot használtunk (Corning No. 476540, $d = 6 \text{ mm}$), amelyet az $1 \times 1 \text{ cm}$ -es küvettába meríthettünk. Az elektród érzékenységének növelésére (10^{-3} pH egység) és válaszidejének (2 s) csökkentésére az eredetileg telített KCl-dal feltöltött referenciaelektódban a KCl koncentrációját 500 mM -ra csökkentettük.

4.8 Modellek

4.8.1 A kinetikák illesztése

A vizsgált reakciók általában elsőrendű folyamatként kezelhető, így exponenciális függvénnyel írható le. A kinetikák több fázist is tartalmaznak (több exponenciális lineáris kombinációjaként kezelhető):

$$A_t = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad (4.1)$$

Ahol A_t a koncentrációja a t időpillanatban, A_i az adott komponens amplitúdója k_i pedig, a sebességi állandója. Az illesztést Marquardt nem lineáris legkisebb négyzetek módszerével végeztem, az esetek túlnyomó többségében két komponens figyelembevételével ($n = 2$).

4.8.2 A disszociációs állandó (K_D) meghatározása

Ha a RC-hoz egy másik molekula vagy ion kötődik, amelynek következtében valamilyen reakció sebességállandója lényegesen megváltozik, akkor a heterogén RC populációt kétfázisú kinetika jellemzi. A komponensek amplitúdójának analizisével a disszociációs állandó meghatározható. Mivel a szemikinin abszorpcióváltozása nagy és monoexponenciálissal illeszthető ideálisnak bizonyult. Tegyük fel hogy egy átmeneti fémion (M) kötődik a RC-hoz és a kötődés disszociációs állandóját akarjuk meghatározni. A mintában lévő teljes RC és a hozzáadott fémion koncentráció ($[RC]_t$ ill. $[M]_t$) kifejezhetjük a szabad ($[M]_f$, $[RC]_f$) és kötött ($[M-RC]$) formákkal:

$$[M]_t = [M]_f + [M-RC] \quad (4.2)$$

$$[RC]_t = [RC]_f + [M-RC] \quad (4.3)$$

A disszociációs állandó definíció szerint:

$$K_D = \frac{[RC]_f \cdot [M]_f}{[M-RC]} \quad (4.4)$$

Mivel $[M-RC]$ a lassú fázis amplitúdójával, $[RC]_t$ pedig a teljes amplitúdóval arányos, ezért a 4.2, 4.3, 4.4 egyenletek alapján:

$$\frac{A_{\text{slow}}}{A_t} = \frac{[M]_t + [RC]_t + K_D - \sqrt{([M]_t + [RC]_t + K_D)^2 - 4 \cdot [RC]_t \cdot [M]_t}}{2 \cdot [RC]_t} \quad (4.5)$$

4.8.3. A K_D pH függésének modellje

A RC 6 különböző állapotának bevezetésével próbáljuk a K_D pH függését meghatározni (séma). A proton disszociációs állandók:

$$K_{01} = \frac{[RC_0] \cdot [H^+]}{[RC_1]} \quad (4.6)$$

$$K_{12} = \frac{[RC_1] \cdot [H^+]}{[RC_2]} \quad (4.7)$$

$$K'_{01} = \frac{[M - RC_0] \cdot [H^+]}{[M - RC_1]} \quad (4.8)$$

$$K'_{12} = \frac{[M - RC_1] \cdot [H^+]}{[M - RC_2]} \quad (4.9)$$

A disszociációs állandó nagyon magas pH-n:

$$K_{D0} = \frac{[RC_0] \cdot [M]_f}{[M - RC_0]} \quad (4.10)$$

A RC 6 különböző állapotban lehet:

$$[RC]_t = [RC_0] + [RC_1] + [RC_2] + [M - RC_0] + [M - RC_1] + [M - RC_2] \quad (4.11)$$

A fémion vagy szabad, vagy a RC-hoz vagy az oldat OH⁻ csoportjához kötődik:

$$[M]_t = [M]_f + [M - RC_0] + [M - RC_1] + [M - RC_2] + \frac{[M]_f \cdot [OH^-]}{K_{M-OH}} \quad (4.12)$$

A disszociációs állandó tetszőleges pH-n definíció szerint:

$$K_D = \frac{([RC_0] + [RC_1] + [RC_2]) \cdot ([M]_t - ([M - RC_0] + [M - RC_1] + [M - RC_2]))}{[M - RC_0] + [M - RC_1] + [M - RC_2]} \quad (4.13)$$

A víz ionszorzatával [OH⁻]-t kifejezzük ($K_w = [H^+] \cdot [OH^-] = 1 \cdot 10^{-14}$), és a 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 egyenleteket a 4.13 egyenletbe helyettesítjük, a megfigyelt disszociációs állandó a pH függvényében:

$$K_D = K_{D0} \frac{(1 + 10^{pK_{01} - pH} + 10^{pK_{01} + pK_{12} - 2 \cdot pH}) \cdot (1 + 10^{pK_{M-OH} + pH - 14})}{1 + 10^{pK'_{01} - pH} + 10^{pK'_{01} + pK'_{12} - 2 \cdot pH}} \quad (4.14)$$

A komplexképződés következtében felszabaduló protonok a modell alapján a következőképpen számolható ki: A fémion hozzáadása után kialakult egyensúlyi állapot protonációs állapotainak protonszám szerinti súlyozott összegéből kivonjuk a megfelelő eredeti állapotot és osztjuk a RC-al.

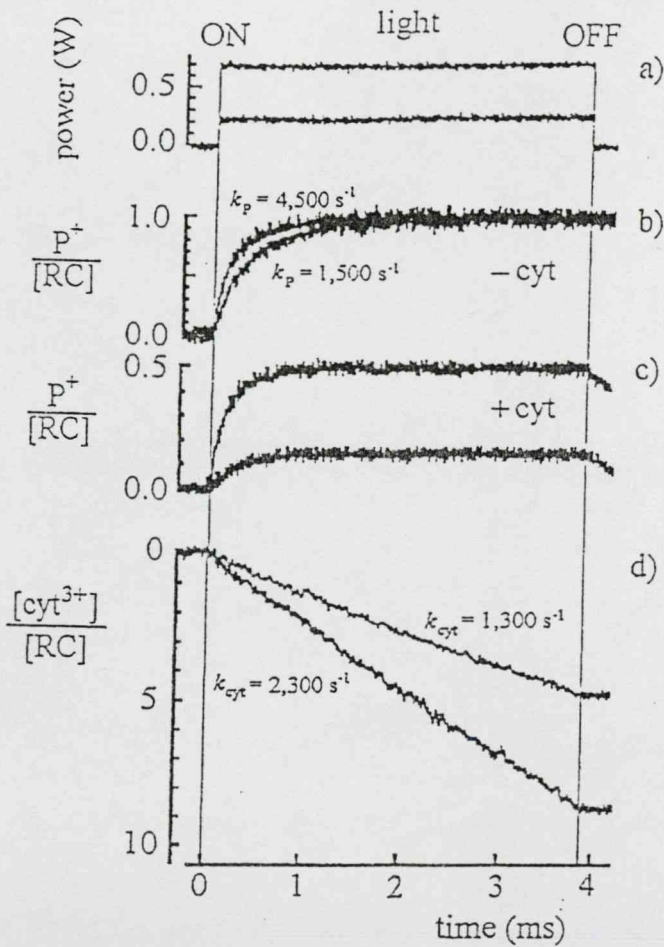
$$\frac{[H^+]}{[RC]_t} = \frac{([M - RC_1] + [RC_1] + 2 \cdot ([M - RC_2] + [RC_2])) - ([RC_1]_{M=0} + 2 \cdot [RC_2]_{M=0})}{[RC]_t} \quad (4.15)$$

Az adott állapotok koncentrációi a 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 egyenletek alapján kifejezhetők és a 4.15 egyenletbe helyettesíthetők.

5. EREDMÉNYEK

5.1 citokróm oxidáció kinetikája

A gerjesztő lézertény bekapcsolásakor a RC-ban töltésszétválasztás révén oxidált bakterioklorofill keletkezik. Az oxidált dimer a citokrómot oxidálja, amely azt követően leválik a kötőhelyről és egy redukált citokróm helyettesíti.



5.1 ábra. Összehasonlító kinetikai vizsgálatok két különböző gerjesztő fényintenzitásnál különböző: Szóróanyag jelenlétében a gerjesztő lézertény téglalap alakú abszorpcióváltozást idéz elő (a) Fotokémiai reakció monoexponenciális kinetikája gerjesztett RC-ban 865 nm-nél (b), külső donor (citokróm) hozzáadásával a keletkezett P^+ mennyisége lecsökken (c), az oxidált citokróm stacionárius felhalmozódását 550/540 nm-nél figyelhetjük meg. Feltételek: 1.0 μM RC, 25 μM UQ₆, 0.03 % Triton X-100, pH 5.7, 40 mM NaCl, 57 μM cit^{2+} (c, d).

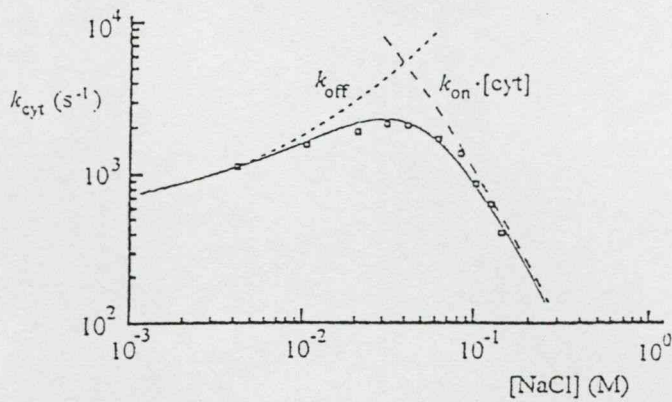
Így a citokróm és a dimer megfigyelt fotooxidációja a reakciópartnerek molekuláris kölcsönhatását tükrözik. Az 5.1 ábra összegzi az említett kinetikai folyamatokat. A gerjesztő lézerdíóda időbeli lefutása téglalap alakú, ami nagymértékben egyszerűsíti a kinetikák kiértékelését (5.1 ábra a). A minta kis felületen történő megvilágítása biztosítja a homogén gerjesztést, ugyanakkor a jel/zaj viszonyt kismértékben csökkenti. A lézerefény bekapcsolásának pillanatában megfigyelt 865 nm-es abszorpcióváltozás a redukált citokróm hiányában mért RC fotokémiai reakciójának ($PQ \rightarrow P^+Q^-$) kinetikáját mutatja (5.1 ábra, b). A reakció sebességi állandóját a kinetika monoexponenciális illesztésével kaphatjuk meg. A folyamat fotokémiai jellege a reakció sebességállandójának lineáris fényintenzitás függéséből nyilvánvalóan következik. A gerjesztőfény intenzitása folytonos megvilágításnál $0,8 \text{ W/cm}^2$, amely mellett a töltéspár $0,1 \text{ ms}$ időállandóval keletkezik. Flash gerjesztés esetén a fény intenzitása akkora, hogy a töltéspár kialakulását gyakorlatilag a flashlámpa kondenzátorának feltöltési ideje határolja ($1\text{-}5 \mu\text{s}$). Külső donor jelenlétében kevesebb oxidált dimer keletkezik, hiszen ekkor a citokróm visszaredukálja a dimert. A gerjesztőfény kikapcsolása után nyomon követhető a P^+ lecsengése, ami a citokróm-donáció következménye. A folyamat lényegesen gyorsabb (1000 s^{-1}), mint a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ töltés-rekombináció, így azt figyelmen kívül hagyhatjuk (5.1 ábra c). Nagy mennyiségű citokróm és kinonkészlet esetén a RC többszöri stacionárius átfordulása figyelhető meg (Osváth és Maróti, 1997; Larson, és mtsai. 1998) Az alkalmazott fényintenzitás nem mutat lineáris összefüggést a citokróm átfordulás sebességével (a fényintenzitás 3-szorosára $k_p=1500 \text{ s}^{-1}$ -ről $k_p=4500 \text{ s}^{-1}$ -ra történő növelésével az átfordulási sebesség csak 1,8-szorosára növekedett ($k_{cit}=1300 \text{ s}^{-1}$ -ről $k_{cit}=2300 \text{ s}^{-1}$ -ra.) (5.1 ábra d). Osváth és Maróti (1997) a fotooxidáció és fényintenzitás dupla-logaritmikus ábrázolásából, a citokróm átfordulás elméleti maximális sebességére 2000 s^{-1} értéket határozott meg. Méréseiket nagy citokróm készlet ($200 \mu\text{M}$) és alacsony ionerősség mellett végezték, a

paraméterek változtatásával viszont más elméleti maximumérték adódik. A későbbiekben külön megvizsgáljuk a paramétereknek a fotooxidációban játszott szerepét. A megfigyelt átfordulási sebesség független volt a kinon koncentrációjától (természetesen egy minimális érték felett), ami jelenti, hogy a kinoncsere sokkal gyorsabb, mint az átfordulási sebesség. A kinon típusa sem befolyásolta a sebességet: ugyanakkora sebességet mértünk UQ₆, mint UQ₁₀ jelenlétében. A kinon izoprenoid oldalláncának hosszúsága csak kismértékben, a fejcsoport változtatása viszont nagyobb mértékben befolyásolja a kinon kötési affinitását (McComb és mtsai, 1990). A kinonok viselkedésének vizsgálatánál figyelembe kell venni, hogy az UQ₁₀ alkoholban rosszul oldódik szemben az UQ₆-tal, ezért 30%-os Triton X-100 detergensben kellett szolubilizálnunk, amelyben viszont már könnyedén a RC-hoz diffundál.

5.2 A citokróm oxidáció ionerősségfüggése

Az. 5.2 ábra a citokróm átfordulásának sebességét mutatja a minta só-koncentrációjának (NaCl) függvényében. Megfigyelhetjük, hogy a só titrálásával a sebesség először növekedni kezd, majd egy maximumértéket elérve hirtelen lecsökken. A maximumnál (30 mM NaCl) a sebesség akár 2-3 szorosra nő a kezdeti értékhez képest, ami első pillantásra rendkívül meglepő. A korábbi flash-gerjesztéssel végzett mérések monoton csökkenő sebességről számoltak be (Prince és mtsai, 1974; Overfield és mtsai, 1979; Overfield és Wraight, 1980a; Van der Wal és mtsai, 1987; Witthuhn és mtsai, 1997). Nagy ionerősségen (100 mM körül) a sebesség hirtelen lecsökken, ami összhangban van a korábbi eredményekkel. A nagymértékű sebességcsökkenést a RC és citokróm közötti elektrosztatikus vonzás ionikus leárnyékolásával indokolták. Az ionerősség további növelésével az átfordulási sebesség az észlelhetőség határa alá esik. Ekkora só-koncentrációnál a citokróm már nem is kötődik a RC-hoz, ahogy ez a flash kísérleteknél jól megfigyelhető (Overfield és mtsai, 1979). Alacsony só-koncentrációnál

viszont egy másik folyamatot kell feltételeznünk, amely lassabb a bimolekuláris asszociációs reakciónál (k_{on}) és így a RC folytonos átfordulását határolja.

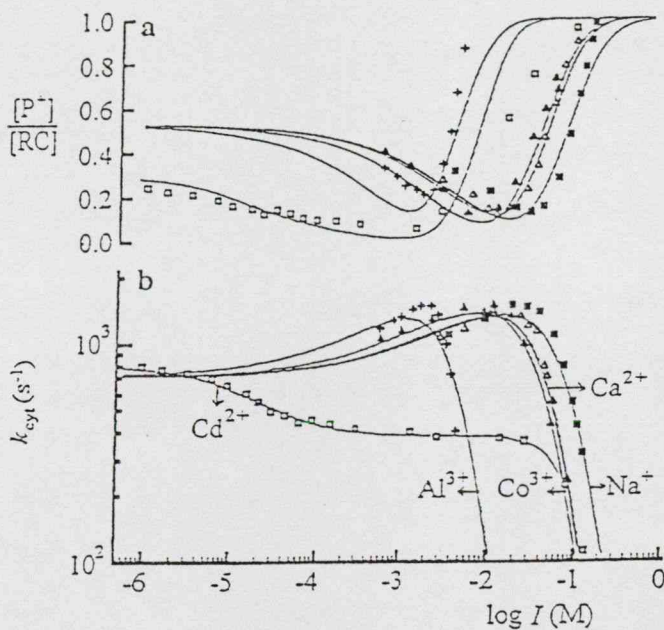


5.2 ábra. A citokróm átfordulás sebessége a minta NaCl koncentrációjának függvényében. A kötési (k_{on}) és leválási (k_{off}) sebességek (szaggatott vonalak), valamint a megfigyelt átfordulási sebesség (folytonos vonal) a 6.1 séma alapján illesztettük a következő paraméterekkel: $k_p=4500 \text{ s}^{-1}$, $k_{on}(I \rightarrow 0)=3.8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off}(I \rightarrow 0)=4.7 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$, $k_{on}(I \rightarrow \infty)=6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off}(I \rightarrow \infty)=5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, $k_{ox}=1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, $R_{RC}=0.3 \text{ nm}$ és $R_{cit}=0.23 \text{ nm}$.

5.3 Kationok hatása

Hasonló ionerősség-függés figyelhető meg két- illetve háromértékű kationok esetén (5.3 ábra b). A különböző kationoknál ugyanazt az aniont (Cl⁻) használtuk, elkerülve az anion esetleges speciális hatást. Ha az ionoknak a Debye-Hückel elméletnek megfelelően csak ionikus árnyékoló hatása lenne, akkor a kapott ionerősség-függések megfelelő reprezentációban (a vízszintes tengelyen az ionerősséget kell feltüntetni, hiszen két vagy többértékű ionok esetén ez különbözik a koncentrációtól) egymást fedő görbéket (pontseregeket) adnának. Mivel a mért pontseregek ettől eltérnek, más hatás jelenlétével is számolnunk kell. A Ca²⁺ és a kobalt-hexaamin komplex [Co(NH₃)₆] csak kismértékben különbözött a Na⁺-tól, ugyanakkor az Al³⁺ lényegesen kisebb ionerősségnél mutatott jelentős változást. A fenti fémionok ionerősség-függése bár különböző, mégis hasonlóan visszaadják a kezdeti növekvő és azt követő gyorsan eső fázist. A Cd²⁺ ezzel szemben teljesen máshogyan viselkedik, már kis ionerősség-értéken

(1-10 μM) csökkenést mutat, ami 100 μM -nál megáll, majd a többi fémionra jellemző 100 mM körül hirtelen lecsökken. Az eltérő viselkedés mögött a Cd^{2+} RC-hoz történő specifikus kötődése áll, amelynek következtében az akceptor oldalon az elektron és protontranszfer folyamatok lényegesen lelassulnak (Utschig és mtsai, 1998; Paddock és mtsai, 1999). A nagy ionerősségnél a többi fémionhoz hasonlóan az átfordulását a RC-citokróm közötti elektrosztatikus kölcsönhatás által irányított asszociációs folyamat dominál. A citokróm átfordulás mellett mértük az oxidált dimer stacionárius mennyiségét is (5.3 ábra a).



5.3 ábra. Az oxidált dimer stacionárius felhalmozódása (a) és a megfigyelt citokróm átfordulási sebesség (b) különböző kationok titrálása mellett: NaCl (■), CaCl_2 (Δ), $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (\blacktriangle), AlCl_3 (+) és CdCl_2 (\square). A feltételek ugyanazok mint, a 5.2 ábrán kivéve pH 6.5. A kationok típusától független illesztési paraméterek: $k_{\text{ox}}=1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{on}}(\text{I} \rightarrow 0)=3.8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}}(\text{I} \rightarrow 0)=8.5 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$, $R_{\text{cit}}=0.23$ és $k_p=4500 \text{ s}^{-1}$. A kation-függő illesztési paraméterek az 5.1 Táblázatban találhatóak.

Mivel a mért abszorpcióváltozásból meghatározott P^+ koncentrációt a RC koncentrációjára normaljuk, a P^+ értéke 0 és 1 között változhat. A gerjesztő fény elég intenzív volt, hogy

tetszőleges ionerősség-érték mellett is jól mérhető P^+ keletkezzen. Az oxidált dimer stacionárius felhalmozódása és a citokróm oxidáció stacionárius sebessége fordítottan viszonyul egymáshoz, gyors citokrómátfordulásnál kevés P^+ , lassú citokrómátfordulásnál sok P^+ keletkezik. Az ionerősség-függésben is látható az inverz viselkedés (5.3 ábra), ahol a citokróm átfordulás sebességének maximuma van, ott a P^+ -nak minimuma.

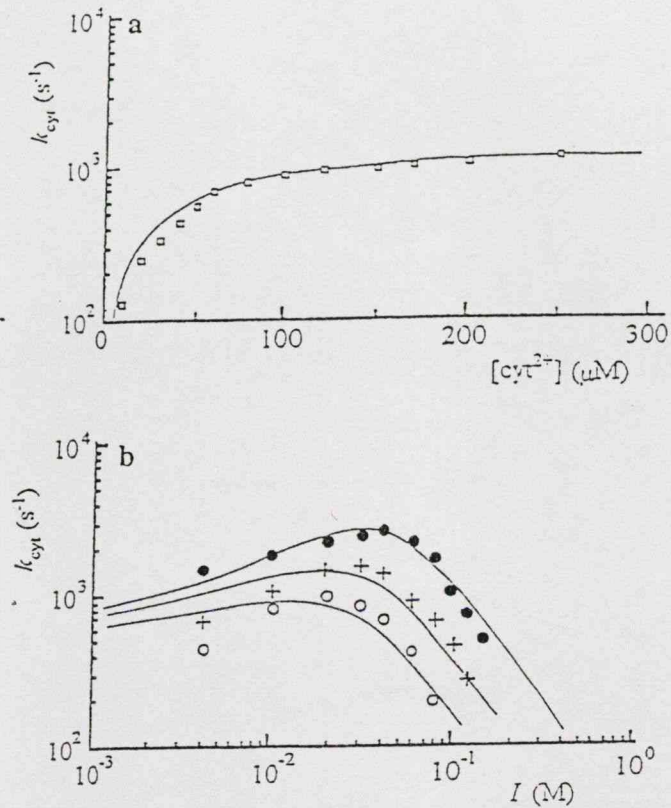
Só	$k_{on}(I \rightarrow \infty)(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(I \rightarrow \infty)(s^{-1})$	$R_{RC}(nm)$
NaCl	$1.5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^6$	0.38
CaCl ₂	$1 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^6$	0.38
[Co(NH ₃) ₆]Cl ₃	$5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^7$	0.53
AlCl ₃	$1 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^7$	1.22
CdCl ₂	$1 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^7$	1.22

5.1 Táblázat. Az 5.3 ábrán látható különböző kationok ionerősség-függésének illesztése a 6.1 séma alapján a fenti paraméterekkel.

5.4 A citokróm koncentráció hatása

Az 5.4 ábra felső fele a citokróm átfordulási sebességet mutatja a redukált citokróm koncentrációjának függvényében. A legkisebb citokróm koncentráció (8 μM) is elég nagy volt ahhoz, hogy a sebesség 0-tól különböző stacionárius értéket vegyen fel. A különböző nagyságú citokróm-készlet mellett mért só-titrálási görbék megőrizték kétfázisú jellegüket: növekvő ionerősséggel a sebesség lassan emelkedett, majd hirtelen lecsökkent 100 mM környékén. (5.4 ábra b). A sebesség maximuma a citokróm koncentrációjának csökkentésével alacsonyabb ionerősség felé tolódott: 30-40 mM-ról 20 mM-ra. Kis citokróm koncentráció esetén a megfigyelt átfordulási sebesség lineárisan arányos a citokróm koncentrációjával (pszeudo-elsőrendű reakció). A kezdeti meredekségből a bimolekuláris sebességállandóra

$k_{on}=1.1*10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ következtethetünk. Nagy ionerősség (100 mM) mellett a megfigyelt sebesség telítődött. A korábbi flash-kísérleteknél a citokróm titrálása nem mutatott telítést (Prince és mtsai, 1974; Overfield és Wraight, 1980a), bár meg kell jegyezni, hogy a méréseknél a titrálást csak 60 cit/RC-ig végezték.



5.4 ábra. Az átfordulási sebesség változása a citokróm koncentrációjának függvényében (a) és néhány rögzített citokróm koncentrációnál felvett ionerősség-függés. Az ionerősség az előbbi esetben 100 mM (a), a redukált citokróm kocentrációja az utóbbi esetben 57 (●), 18 (+), és 8 μM (○) volt. A feltételek ugyanazok, mint az 5.1 (d) ábrán. A mért adatokat a 6.1 séma alapján illesztettük a következő paraméterekkel, úgy hogy az oxidált citokróm visszakötődését is figyelembe vettük: $k_{on}(I \rightarrow 0)=3.8*10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{on}(I \rightarrow \infty)=6*10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off}(I \rightarrow 0)=470 \text{ s}^{-1}$, $k_{off}(I \rightarrow \infty)=2*10^5 \text{ s}^{-1}$, $k_{ox}=1*10^6 \text{ s}^{-1}$, $R_{RC}=0.3 \text{ nm}$, $R_{cit}=0.23 \text{ nm}$ és $k_p=1500 \text{ s}^{-1}$ (a) és 4500 s^{-1} (b).

Hasonló eredményt hozott *Rhodospseudomonas viridis* törzsből izolált RC-on végzett citokróm titrálás is (Knaff és mtsai, 1991). Ugyanakkor, ha a citokróm és RC koncentrációját ekvimolárisan növelték, a sebesség telítésbe ment (Overfield és mtsai, 1979). A kísérletet

később megismételték és kifejezetten a kis koncentráció-tartományban (0-0,5 μM) követték a citokrómoxidáció sebességét (Overfield és Wraight, 1986). Érdekes módon jóval gyengébb, lineáris függést tapasztaltak, amelynek egyenessel való közelítésével $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bimolekuláris sebességet határoztak meg. Eredményüket később mások is megerősítették (Witthuhn és mtsai. 1997).

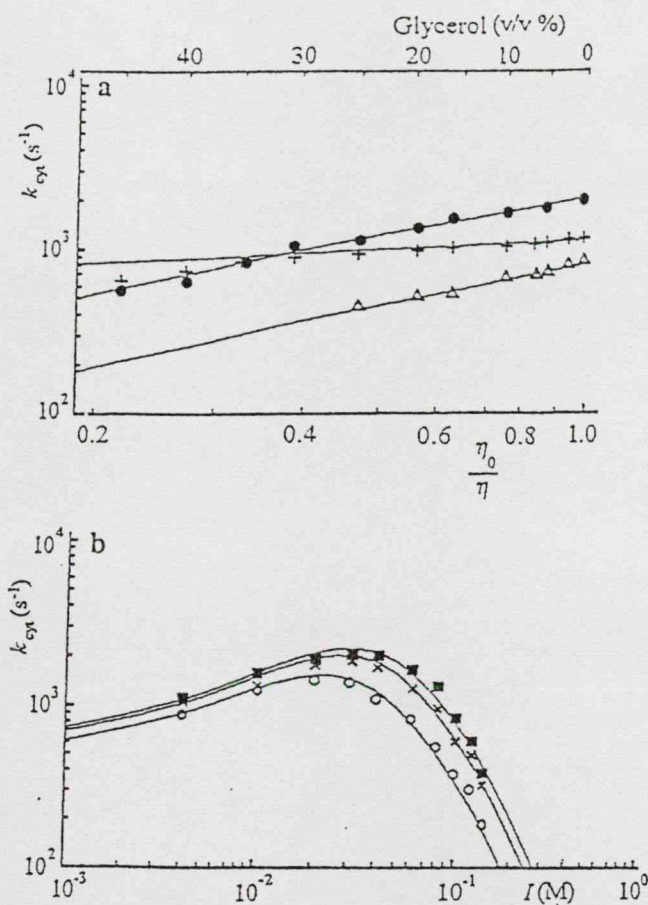
5.5 A viszkozitás-függés

A mérőoldat viszkozitását glicerol hozzáadásával változtattuk 0-tól 45%-ig (térfogatszázalék). Az ionerősség-függés reprezentációban a viszkozitás növelése a megfigyelt átfordulási sebesség csökkenésében (5.5 ábra a) valamint a maximális sebességérték alacsonyabb ionerősség felé tolódásban mutatkozott meg (5.5 ábra b). Ez jól tükrözi a RC-citokróm komplex képzésének diffúzió limitált, valamint bimolekuláris jellegét, amire jellemző a sebességnek az oldat viszkozitásától való fordított függése (Einstein-Smoluchowski egyenlet). A flash vizsgálatok szintén fordított arányú függéséről számoltak be (Moser és Dutton, 1988). Az átfordulási sebesség alacsony ionerősségnél kevésbé függött a viszkozitástól, mivel ebben ionerősség-tartományban határoló folyamat nem bimolekuláris jellegű. A különbség még jobban szembetűnik, ha a sebességet a viszkozitás reciprokanak függvényében ábrázoljuk dupla-logaritmikus léptékben. Alacsony (5 mM) illetve átlagos (40 mM) és nagy (100 mM) ionerősségnél az illesztett egyenesek meredekségének különbözik (0.2 illetve 1).

5.6 A citokróm átfordulás hőmérsékletfüggése

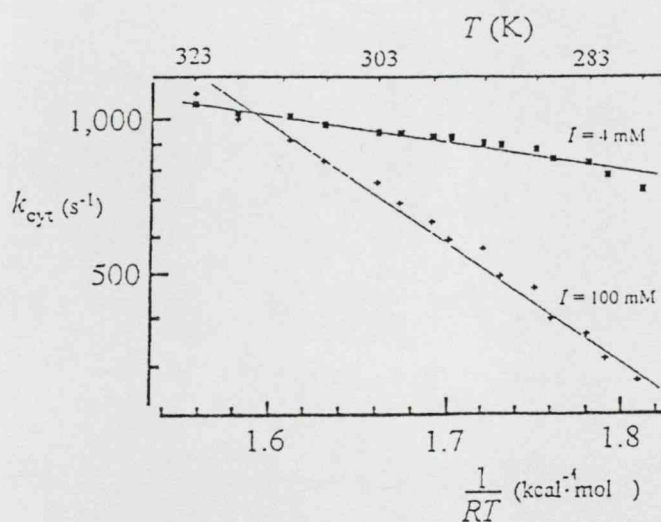
A különböző sebesség-határoló reakciók nagy valószínűséggel eltérő aktiválási energiával rendelkeznek. Alacsony illetve nagy ionerősség mellett megmértük az átfordulási sebesség hőmérsékletfüggését 275 –323 K tartományban. A teljes tartományban a változás egyetlen egy aktiválási energiával (5,7 kcal/mol 100 mM-nál és 1,5 kcal/mol 4 mM-nál) írható le. Az

alacsony ionerősségnél mért aktiválási energia egy viszonylag kis aktivációs gáttal rendelkező folyamatról tájékoztat, míg a nagy aktiválási energia nagy ionerősségnél a diffúzióra jellemző. Az 5.7 kcal/mol megfigyelt aktiválási energia a bekötés diffúzió kontrollált reakciójával hozható összefüggésbe.



5.5 ábra. A viszkozitás hatása a fotooxidáció sebességére. A sebességet a viszkozitás reciprokának függvényében ábrázoltuk dupla logaritmikus léptékben (a). Különböző ionerősség mellett mértük a viszkozitás hatását 4 mM (+), 40 mM (●) és 100 mM (Δ). Az ábra alsó felén 3 különböző glicerol koncentrációnál felvett só-titrálás látható: glicerol koncentráció 0% (■), 10% (×) és 30% (○) volt. Az oldat viszkozitását (η) a víz viszkozitására (η_0) vonatkoztattuk. A viszkozitás függést a 6.17 egyenlet alapján illesztettük, nagy ionerősségnél $n=1$, kis ionerősségnél $n=0.2$ paraméterekkel. A feltételek és az ionerősségfüggés illesztési paraméterei ugyanazok, mint az 5.3 ábrán.

Overfield és Wraight (1980a) 8 kcal/mol aktiválási energiát mért 0,1 % LDAO-ban szolubilizált RC-on. Venturoli és mtsai. (1993) a dimer visszaredukálásának kinetikáját követték 1283 nm-nél, és igazolták, hogy a kapott kinetika lassú komponense a citokróm c_2 és RC közötti ütközési reakciónak felel meg. A komponens aktiválási energiáját is meghatározták (6,7 kcal/mol). A jóval kisebb 1,5 kcal/mol aktiválási energia a bimolekuláris ütközési reakciótól gyökeresen eltérő folyamatra utal.

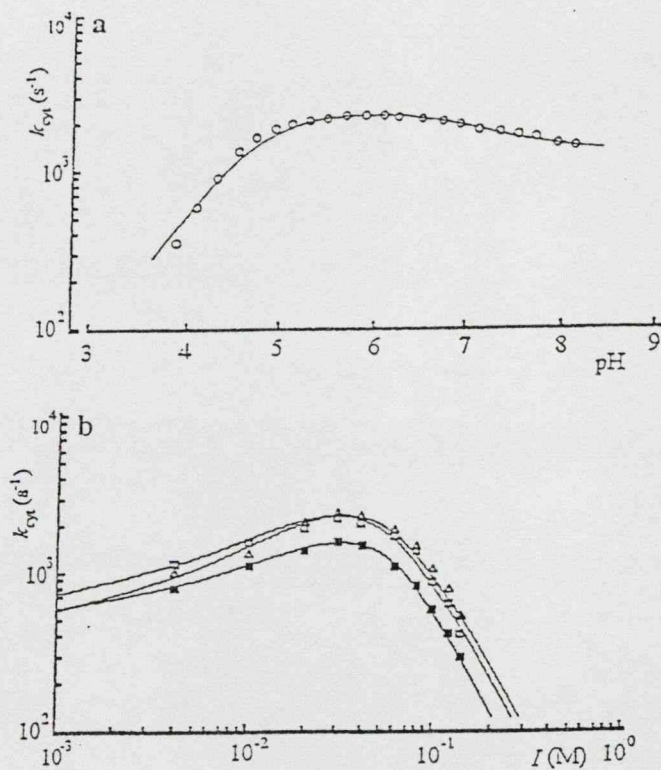


5.6 ábra. A citokróm stacionárius átfordulásának Arrhenius ábrázolása alacsony [4 mM (■)] és nagy [100 mM (+)] ionerősségnél. Az illesztés alapján 1.5 (■) ill. 5.7 (+) kcal/mol aktiválási energiát kaptunk. A feltételek ugyanazok, mint az 5.1 (d) ábrán.

5.7 A pH hatása a citokróm oxidáció sebességére

A citokróm és a RC közötti elektrosztatikus kölcsönhatás vizsgálatában a pH függés rutin jellegű vizsgálatnak számít. A só-titrálási görbék alakja eltérő pH értéken lényegesen nem változott (5.7 ábra b). Az egyezés alacsony és semleges pH tartományban különösen szembetűnő, alkalikus tartományban kissé eltérő. A sebesség értékekben szintén csak kis eltérést tapasztaltunk. Rögzített ionerősségnél (20 mM) felvett átfordulási sebesség pH függése csak alacsony és semleges pH tartományban mutatott változást (5.7 ábra a). pH 8

felett jelentkező (az ábrán nem látható) jelentős sebességesés nem a citokrómnak tulajdonítható, hanem a proton függő elektrontranszfer csökkenésével magyarázható (Kleinfeld és mtsai. 1985). Azonban pH 4 és pH 5 között látható esés a citokróm és a RC között lévő elektrosztatikus kölcsönhatás változásával indokolható. A korábbi flash vizsgálatok szintén beszámolnak a fenti pH tartományban megfigyelt jelentős sebességesésről (Prince és mtsai. 1974). A mitokondriális citokrómmal szemben a citokróm c_2 fotooxidációjának sebessége a teljes pH tartományban állandó volt (Prince és mtsai. 1974).



5.7 ábra. A stacionárius citokrómátfordulás sebességének pH függése 20 mM ionerősség mellett (a), és ionerősség-függése 3 különböző pH értéken (b): pH 5.7 (\square), pH 6.3 (Δ) és pH 7.4 (\blacksquare). A feltételek és az illesztési paraméterek ugyanazok a b ábrán, mint az 5.3 ábrán kivéve: $k_{\text{off}}(I \rightarrow 0) = 470 \text{ s}^{-1}$ (\square), $k_{\text{off}}(I \rightarrow 0) = 350 \text{ s}^{-1}$ (Δ) és $k_{\text{off}}(I \rightarrow 0) = 420 \text{ s}^{-1}$ (\blacksquare); $k_{\text{off}}(I \rightarrow \infty) = 5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ (\square), $k_{\text{off}}(I \rightarrow \infty) = 1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ (Δ), $k_{\text{off}}(I \rightarrow \infty) = 5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ (\blacksquare); $k_{\text{on}}(I \rightarrow \infty) = 6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (\square), $k_{\text{on}}(I \rightarrow \infty) = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Δ), $k_{\text{on}}(I \rightarrow \infty) = 2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (\blacksquare). Az a ábra adatait a Henderson-Hasselbalch egyenlet (6.18 és 6.19) alapján illesztettük a következő pK értékekkel: 4,9 [$k_{\text{on}}(\text{pH} \rightarrow \infty) = 1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{on}}(\text{pH} \rightarrow 0) = 0,0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$] és 6,6 [$k_{\text{off}}(\text{pH} \rightarrow \infty) = 2,2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{off}}(\text{pH} \rightarrow 0) = 9 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$].

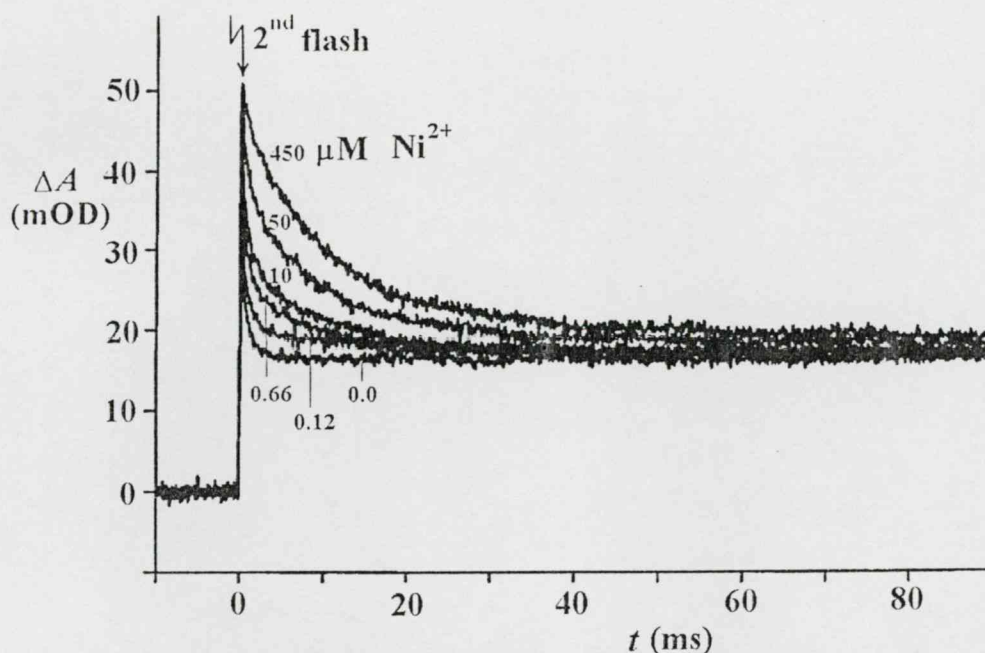
A RC felületén a citokróm kötőhely környékén lévő 7-8 karboxil csoport protonálódik pH 5 alatt, aminek következtében a RC a megszűnt negatív felületi töltései miatt kevésbé tudja vonzani a pozitív össztöltésű citokrómot. A pH függését figyelembe véve, ugyanakkor mégsem a RC össztöltése a meghatározó, mivel pH 6 körül nem láthatunk lényeges változást a sebességben, annak ellenére, hogy a RC izoelektromos pontja $pI=6,1$ (Prince és mtsai. 1974). Valószínűleg a citokróm protonálható aminosavai és RC-nak a citokróm kötőhely környezetében lévő protonálható csoportjai irányítják a kölcsönhatást.

5.8 Átmeneti fémionok kötődése a reakciócentrumhoz

Átmeneti fémionok (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) drasztikus hatást gyakorolnak a bakteriális RC redoxfolyamataira. A hatás mind az első elektrontranszfer (Utschig és mtsai. 1998, 2001; Paddock és mtsai. 1999; Ädelroth és mtsai. 2000) mind a protonfelvétellel kísért második elektrontranszfer (Paddock és mtsai. 1999, 2000; Ädelroth és mtsai. 2000) sebességének erőteljes csökkenésében jelentkezik. A $k_{AB}^{(2)}$ sebességét a szemikininon 450 nm-nél mért abszorpcióváltozás kinetikájából határozhatjuk meg. Ha az átmeneti fémion koncentrációja nem elég nagy ahhoz, hogy az összes RC-ot telítse, akkor a kétfázisú kinetikát kapunk. A kevert kinetika különböző fázisai a fémion-kötött illetve a fémiont nem kötött RC-oknak feleltethetők meg. A fázisok amplitúdóinak aránya az adott frakciók arányát tükrözik, a frakcióarányból pedig a fémion disszociációs állandója (K_D) meghatározható. (ld. 4.8.2 fejezetet). Paddock és mtsai. (1999) pH 8-nál határozták meg a fenti módszerrel a Cd^{2+} és Zn^{2+} disszociációs állandóját ($K_D=0.5 \mu M$). Az 5.8 ábrán a Ni^{2+} hatását láthatjuk a $k_{AB}^{(2)}$ kinetikájára. Az állandó, stacionárius abszorpcióváltozás a citokróm oxidációjának felel meg. A Ni^{2+} koncentráció növelésével a kinetika egyre jobban lelassul ($k_{AB}^{(2)}=3300 s^{-1}$ -ről $k_{AB}^{(2)}=90 s^{-1}$ -re). Az abszorpcióváltozás kinetikáját a fentieknek megfelelően két komponensre bonthatjuk:

$$\Delta A(t) = A_{gy} \cdot \exp(-k_{AB}^{(2)}(gy) \cdot t) + A_l \cdot \exp(-k_{AB}^{(2)}(l) \cdot t) \quad (5.1)$$

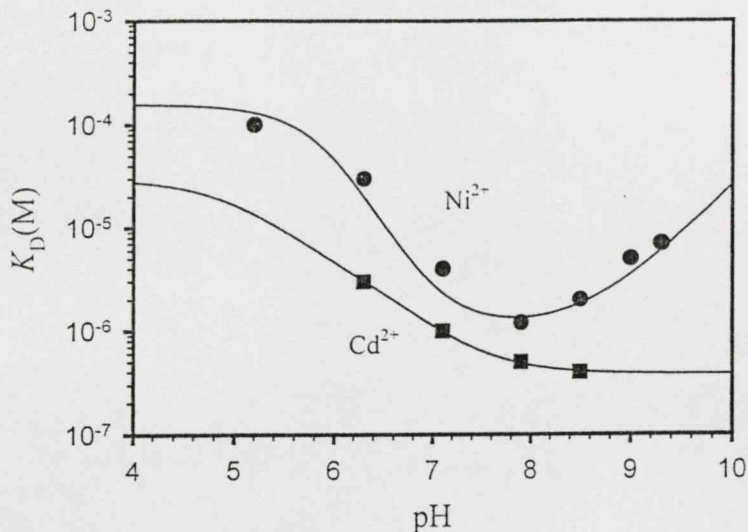
ahol, A_{gy} és $k_{AB}^{(2)}(gy)$ a gyors komponens, és A_l és $k_{AB}^{(2)}(l)$ a lassú komponens amplitúdója ill. sebességi állandója.



5.8 ábra. A szemikinin abszorpció változásának kinetikája 450 nm-nél a második flash után. Különböző Ni^{2+} koncentrációnál felvett kinetikák kétfázisúak: a gyors fázis a fémion nélküli RC-oknak, a lassú fázis a fémiont kötött RC-oknak tulajdonítható. Feltételek: 1.5 μM RC, 0.03 % Triton X-100, 20 μM cit c, 25 μM UQ₁₀, 20 mM MES, pH 6.3 és $K_D=30 \mu M$.

A különböző pH értékeken elvégzett fémion-titrálások a disszociációs állandó pH függését határozzák meg. Az 5.9 ábra a Cd^{2+} és a Ni^{2+} disszociációs állandójának pH függését mutatja. A titrálás pH tartományát a biexponenciális illesztés megbízhatósága jelöli ki, alacsony és magas pH-n már a komponensek hasonló élettartammal rendelkeznek. (ld. 5.1 egyenletet). A Ni^{2+} disszociációs állandója két nagyságrenddel növekedik, ha a pH-t 8-ról 5-re csökkentjük. Hasonló, de kisebb mértékű növekedés figyelhető meg alkalikus tartományban. A Cd^{2+} K_D változása kevésbé erőteljes, ezért a mérést szűkebb pH tartományban végeztük. Ugyanakkor

látható, hogy a Cd^{2+} kötési affinitása a teljes pH tartományban erősebb. A $k_{\text{AB}}^{(2)}$ sebességére gyakorolt hatás viszont fordított: ($k=90 \text{ s}^{-1}$ Ni^{2+} -re és $k=300 \text{ s}^{-1}$ a Cd^{2+} -ra, pH 6.3) (5.14 ábra).



5.9 ábra. A megfigyelt disszociációs állandó pH függése Cd^{2+} -ra (■) és Ni^{2+} -re (●). A disszociációs állandót a fémion titrálása alapján határoztuk meg (ld. 5.8 ábra). Feltételek megegyeznek az 5.8 ábra feltételeivel. A folytonos görbéket úgy kapjuk meg, hogy az 5.2 táblázatban lévő illesztési paramétereket a 4.14 egyenletbe helyettesítjük (Cd^{2+} esetében 4.14 egyenlet számlálójának 2. tényezője 1).

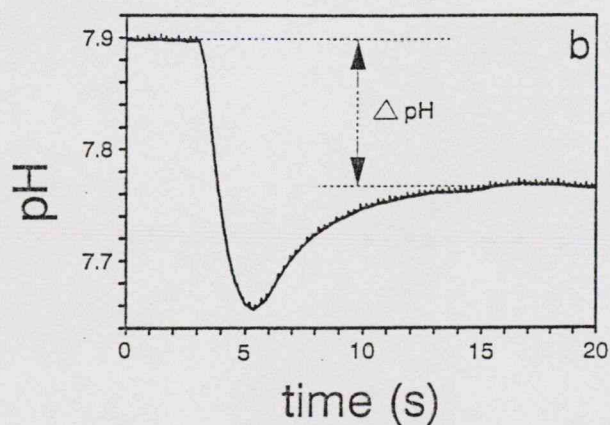
5.9 Proton felszabadulás fémion kötés hatására

A K_D szembevető pH függése a fémion-kötéssel kapcsolatos protonációs vagy deprotonációs lépéseket tételez fel. A protonfelvétel vagy leadás sztöchiometriáját mérhetjük pH indikátor festék abszorpció változásával (Maróti és Wright, 1988a,b) vagy érzékeny pH üveg elektródával (Kálmán és Maróti, 1997; Kálmán és mtsai. 1998). Az 5.10 ábra az utóbbi módszerrel mért protonjel kinetikát mutat, a proton egy átmeneti fázis után veszi fel a stacionárius értéket. A fenti módszerrel két különböző pH értéken meghatároztuk a Ni^{2+} hozzáadására felszabaduló proton sztöchiometriáját.

Átmeneti fémion	$K_{D0}(\mu\text{M})$	$K_{D1}(\mu\text{M})$	$K_{D2}(\mu\text{M})$	pK_{01}	pK_{12}	pK'_{01}	pK'_{12}	pK_{M-OH}
Cd^{2+}	0.38	3.8	30.2	7.4	5.9	6.4	5.0	N.M.*
Ni^{2+}	1.0	12.6	159	7.0	7.0	5.9	5.9	5.4

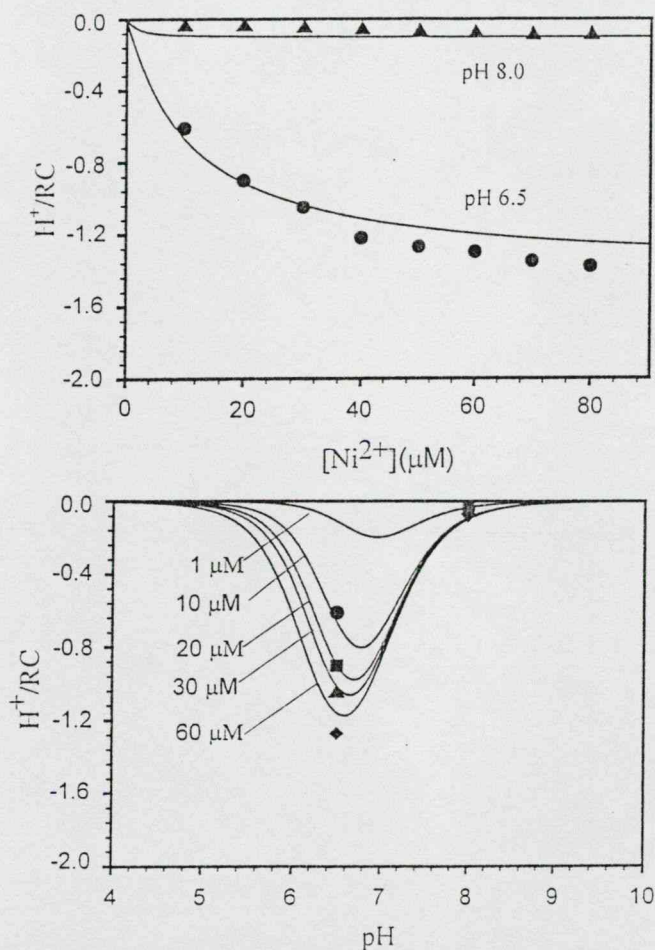
5.2 Táblázat. Átmeneti fémionok disszociációs állandói (K_{D0} , K_{D1} , K_{D2}), valamint a fémion-ligand és fémion- OH^- komplexképződést kísérő protonfelvételek disszociációs állandói (pK_{01} , pK_{12} , pK'_{01} , pK'_{12} , pK_{M-OH}). A paramétereket a 6.3 séma alapján 5.9 ábra mérési adatainak illesztésével nyertük. NM: nem meghatározható.

A Ni^{2+} koncentrációjának függvényében mért sztöchiometria látható az 5.11 (a) ábrán. A proton mennyiségét a RC koncentrációjára normaljuk. A sztöchiometriát ismert koncentrációjú sav (HCl) hozzáadása után mért abszorpcióváltozásból határozzuk meg. Az oldat ionerősségét előzetesen 50 mM-ra állítottuk be, hogy a pH-t egy stabil állandó értéken tarthassuk (minta puffert nem tartalmazhatott).



5.10 ábra. A megfigyelt pH változás kinetikája $5 \mu\text{M H}^+$ hozzáadására. Az oldatot a mérés alatt folyamatosan kevertetjük. Feltételek: $1 \mu\text{M RC}$, 0.03% Triton X-100, 100 mM NaCl (Kálmán, és mtsai. 1998).

A pH-tól, valamint az oldat pufferkapacitásától függően pH esést figyeltünk meg. A csökkenés a fémion kötés következtében a RC protonleadásának vagy/és a Ni^{2+} -nek az oldat hidroxil-ionjaihoz (OH^-) való kötődésével magyarázható. Az utóbbi úgynevezett oldathatás a Ni^{2+} koncentrációjától lineárisan függött.

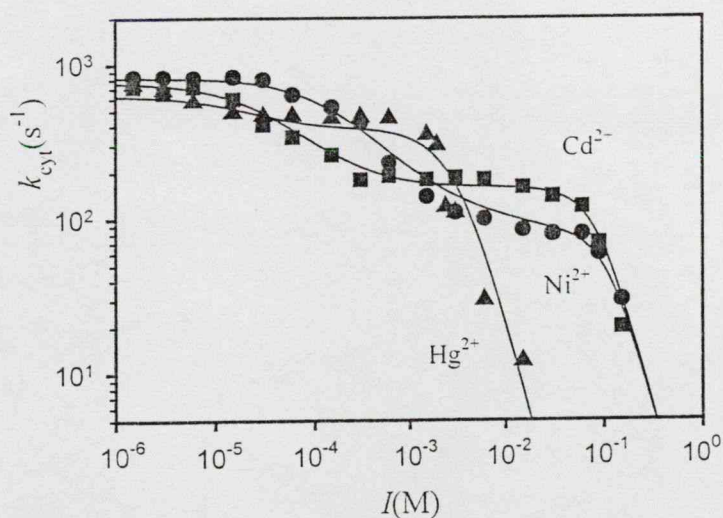


5.11 ábra. A Ni^{2+} és RC komplexképződése következtében felszabadult proton sztöchiometriája: két rögzített pH-nál a Ni^{2+} koncentrációjának függvényében (a), pH függése különböző Ni^{2+} koncentrációnál (b). A felső ábra mérési pontjait a 6.3 séma alapján felírt 4.14 egyenlet alapján illesztettük az 5.2 táblázatban lévő K_D és pK értékekkel. A kapott illesztési paraméterekkel kiszámítottuk a proton sztöchiometria pH függését. Az alsó ábrán ellenőriztük a számított görbék helyességét. Feltételek: 1.5 μM RC, 0.03 % Triton X-100, és 50 mM NaCl.

Az ábrázolt koncentráció-tartományban a titrálási görbe telítési jellegű, ami eltér az oldathatásnak tulajdonítható lineáris növekedéstől (5.11 ábra a). Az effektus a Ni^{2+} kötődésének tulajdonítható proton felszabadulás elképzelését támasztja alá. A valós proton sztöchiometria érték meghatározásához a mért görbéből az oldathatás Ni^{2+} koncentráció függését le kell vonnunk. A protonleadás mértéke erősen pH függő és a pH tartomány egy viszonylag szűk részére koncentrálódik. (5.11 ábra b) Telítési Ni^{2+} koncentrációnál ($100 \mu\text{M}$) a RC-onként $1,4 \text{ H}^+$ mértünk pH 6.5-nél, míg pH 8.0-nál kb. 10-szer kisebbet.

5.10 Citokróm átfordulás gátlása fémionnal

A fémionok gátló hatása, nemcsak az elektrontranszferen követhető nyomon. A citokróm átfordulás ionerősség-függését egyértékű illetve többértékű fémionokra már leírtuk (ld. 5.2 és 5.3 fejezeteket).



5.12 ábra. Átmeneti fémionok hatása a citokróm átfordulás sebességére [Cd^{2+} (■)], [Ni^{2+} (●)], [Hg^{2+} (▲)]. A hatást az oldat ionerősség-függésében ábrázoljuk. Alacsony ionerősségnél a fémion gátolja a protonfelvétel sebességét, míg nagy ionerősségnél az oldószer ionikus árnyékolása által a citokróm donáció sebessége csökken le. A mért adatokat 6.12 egyenlet alapján illesztettük a következő paraméterekkel: az összes fémionra $k_{\text{off}}(I \rightarrow \infty) = 1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{AB}}^{(2)}$ (nem gátolt, pH 6) = 6000 s^{-1} , és $k_p = 4500 \text{ s}^{-1}$. A fémion függő paraméterek az 5.3 táblázatban találhatóak.

Átmeneti fémionok jelenlétében az átfordulás ionerősség-függése lényegesen eltér a többi kationtól (5.12 ábra). Az eltérés elsősorban alacsony ionerősségnél számottevő, a növekedés helyett csökkenés figyelhető meg, ami nagy sebességnél telitődik, majd 100 mM körül egy jelentős csökkenést láthatunk. A Ni^{2+} és a Cd^{2+} hasonlóan viselkedik, de a Hg^{2+} ionerősség-függése minden szempontból rendhagyó, alacsony ionerősségen gyakorlatilag nem változik a fotooxidáció sebessége, viszont 10 mM körül drámaian lecsökken.

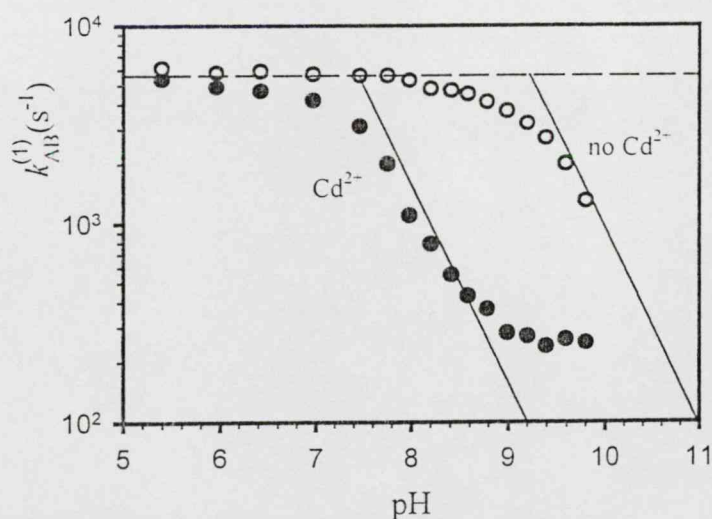
Átmeneti fémion	$k_{\text{on}}(\text{I} \rightarrow 0)$ (s^{-1})	$k_{\text{on}}(\text{I} \rightarrow \infty)$ (s^{-1})	$k_{\text{off}}(\text{I} \rightarrow 0)$ (s^{-1})	R_{RC} (nm)	R_{cit} (nm)	$k_{\text{AB}}^{(2)}(\text{i})$ (s^{-1}) (pH=6.0)	K_{D} (μM)
Ni^{2+}	$3.8 \cdot 10^9$	1,000	1080	0.51	0.23	90	50
Cd^{2+}	$3.8 \cdot 10^9$	1,000	990	0.51	0.23	170	10
Hg^{2+}	$5.0 \cdot 10^8$	100	850	1.61	0.43	560	5

5.3 Táblázat. A citokróm átfordulás ionerősség-függésének illesztési paraméterei. A $k_{\text{AB}}^{(2)}(\text{i})$ a fémion gátolt elektron transzfer sebessége, a R_{RC} és R_{cit} a RC és a citokróm ionkizárási sugara.

5.11 Proton és elektrontranszfer kinetika és proton sztöchiometria módosulása fémion jelenlétében

A fémion-hatásra vonatkozó első eredményeket az elektrontranszfer (Utschig és mtsai. 1998; 2001, Paddock és mtsai. 1999; Ädelroth és mtsai. 2000) és a protontranszfer (Paddock és mtsai. 1999, 2000; Ädelroth és mtsai. 2000) vizsgálatával érték el. A fenti eredmények kizárólagosan egy pH-n jellemezték a hatást. Az effektus tisztázása érdekében a fenti vizsgálatokat kiterjesztettük a teljes pH tartományra. Az összes kísérletben a fémion koncentrációját elég nagyra választottuk, hogy a különböző frakciók jelenlétével ne

bonyolítsuk a vizsgálatot. A 5.13 ábra az első elektrontranszferre gyakorolt fémion-hatás pH függését mutatja kontroll jelenlétében. Habár a $k_{AB}^{(1)}$ kinetikája többfázisú (Tiede és mtsai. 1996; Li és mtsai. 1998), mégis monoexponenciálissal illesztettük, a biexponenciális illesztés a nem megfelelő jel/zaj viszony miatt nem volt célszerű. Míg semleges és alacsony pH-n csak kismértékű, addig pH 8 felett drasztikus csökkenés figyelhető meg (5.13 ábra). Még magasabb pH-n (pH 9-pH 10) a sebesség nem csökken tovább (200 s^{-1}). Ädelroth és mtsai. (2000) a kinetikát két exponenciálisra bontották fel és vizsgálták azok pH függését. Azt találták, hogy a gyors komponens időállandója nem függ a fémiontól, viszont amplitúdója növekvő pH-val csökken. Ezzel szemben a lassú komponens csak pH 6,5 felett jelentkezik, időállandója, valamint amplitúdója növekszik a pH-val. Eredményeik alapvetően visszaadják az 5.13 ábrán látható, monoexponenciálissal illesztett kinetika pH függését.



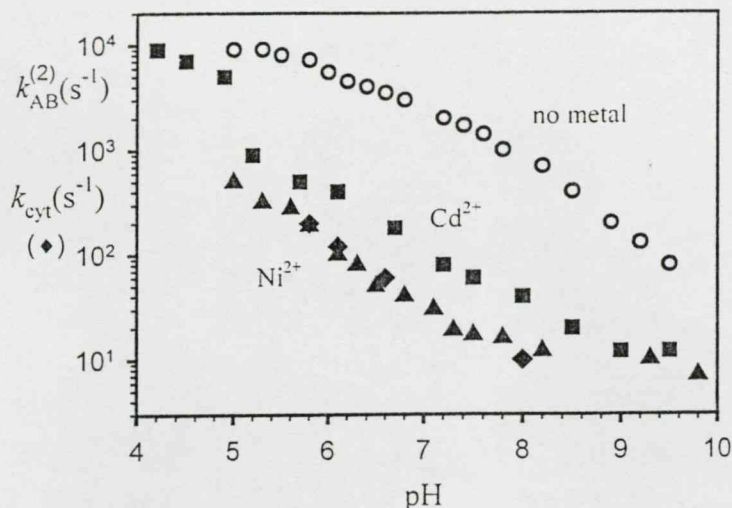
5.13 ábra. A Cd^{2+} hatása az első elektrontranszferre. Alacsony pH-n a kezelt minta (\bullet) nem nagyon különbözik a kezeletlentől (\circ). A Q_B körüli klaszter protonálódását leíró $pK=9,2$ érték fémion hatására 1.8 pH egységgel alacsonyabb pH felé tolódik (az egyenesek metszéspontja). A 398 nm-nél felvett kinetikákat 64 átlagolás után monoexponenciálissal illesztettük. Feltételek: $2.5 \mu\text{M}$ RC, 0.03 % Triton X-100, $20 \mu\text{M}$ UQ_{10} és $100 \mu\text{M}$ Cd.

Ha a görbe pH függő tartományára (-1)-es meredekségű egyenest illesztünk, akkor a Cd^{2+} kezelt RC kb. 1.8-2.0 pH egységű eltolódást mutat a kezeletlenhez képest. Még nagyobb azonos irányú eltolódást (4 pH egység) figyeltek meg a $k_{\text{AB}}^{(1)}$ pH függésében $\text{AspL213} \rightarrow \text{Asn}$ mutánsban (Takahashi és Wraight, 1992).

Hasonló tulajdonságokkal rendelkezik a második elektrontranszfer pH függése (5.14 ábra). Alacsony pH-n (pH 4-pH 5) csak kis különbség látható a kezelt és kezeletlen RC-ok között. Annak ellenére, hogy a Cd^{2+} a RC-hoz kötődik (komplekképződés pH függése alapján, 5.9 ábra), lényegesen nem gátolja proton-aktivált elektrontranszfert. A semleges pH tartományban (pH 5-pH 8) a különbség jelentőssé válik, ami magas pH ismét lecsökken. Habár a Ni^{2+} kisebb affinitással kötődik a RC-hoz, mint a Cd^{2+} , mégis erősebben gátolja a RC működését. Az ábrán az is látható, hogy a citokróm-átfordulás sebessége nem kisebb, mint a $k_{\text{AB}}^{(2)}$, ami azt jelenti, hogy a fémion annyira lecsökkentette a $k_{\text{AB}}^{(2)}$ -t hogy az, az átfordulás határoló lépésévé vált. A $k_{\text{AB}}^{(2)}$ pH profilja jóval összetettebb, mint a $k_{\text{AB}}^{(1)}$ -é, az elektrontranszfert a Q_B -hez irányuló protonálható aminosavak által kontrollált protonációs lépések kísérik. A protonálható, töltött csoportok elektrosztatikus hatásainak bonyolult eredője határozza meg a megfigyelt pH függést (Kleinfeld és mtsai. 1985; Graige és mtsai. 1999). Növekvő pH-val a sebesség csökkenése egyre kifejezettebb, pH 5-pH 8 között közelítőleg (-0.5)-ös, pH 8 felett (-1)-es meredekség jellemzi. A kezelt minta pH függése formálisan tekintve hasonló a kezeletlenhez, kb. 2.0 pH egységgel a kisebb pH tartomány felé való eltolással kapható meg (5.14 ábra).

A komplekképződésnél láttuk, hogy a fémion kötődése proton-felszabadulással jár. Mivel a mérést gerjesztés nélkül végeztük a RC redoxállapota nem változott. Ugyanakkor tudjuk, hogy a fényindukált redoxváltozást protonfelvétel kíséri (Maróti és Wraight, 1988a,b, McPherson és mtsai. 1988). A fényindukált protonkötés különbségi jel (ld. 4.7 fejezetet), ezért a mért proton a komplekképződéstől függetlenül kizárólagosan a redoxállapot változására

jellemző. Az 5.15 ábra felső fele a kezelt és kezeletlen minta $PQ_A \rightarrow P^+Q_A^-$ átmenethez, az alsó fele pedig $PQ_B \rightarrow P^+Q_B^-$ átmenethez tartozó protonkötés sztöchiometriájának pH függését mutatja.

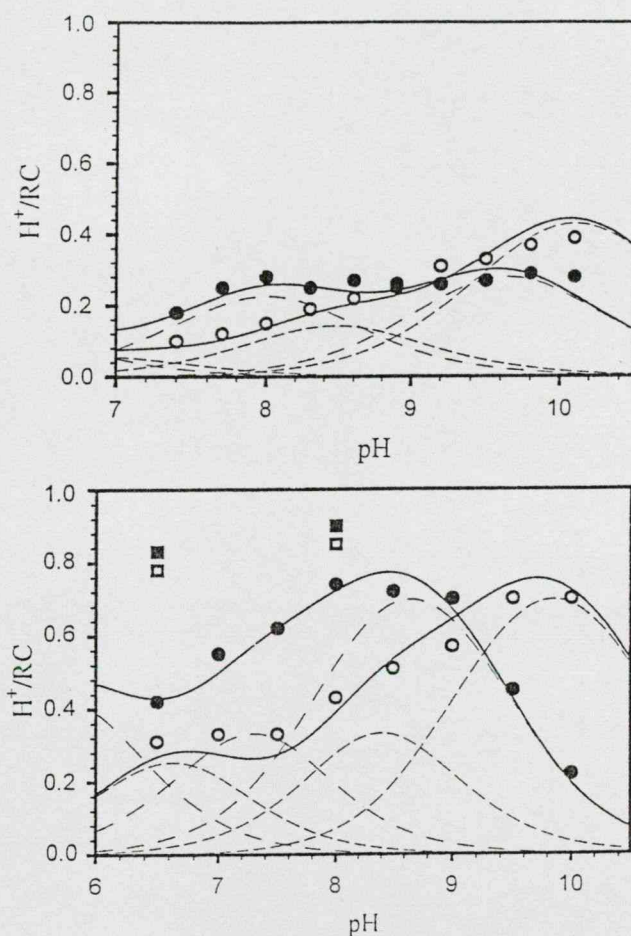


5.14 ábra. A Cd^{2+} és Ni^{2+} hatása a proton-aktivált második elektrontranszferre és a citokróm átfordulására. Alacsony és magas pH-n a különbség kisebb, míg semleges pH-n kifejezetten nagy (2 nagyságrend). A citokróm átfordulását a $k_{AB}^{(2)}$ határoolja, az ábrán Ni^{2+} esetében tüntettük fel (♦). Feltételek: 1.5 μM RC, 0.03 % Triton X-100, 20 μM cit c, 20 μM UQ₁₀, 100 μM Cd²⁺ (■) és 800 μM Ni²⁺ (▲ és ♦).

Az elektrontranszferben tapasztalt nagyon jelentős sebességcsökkenéshez képest a sztöchiometriára a fémion kisebb hatást gyakorol: Cd²⁺ hatására pH 8-nál kb. 0,1 H⁺/RC-mal nagyobb sztöchiometriát láthatunk Q_B inaktív RC-on, és 0,2-0,3 H⁺/RC-mal nagyobbat Q_B aktív RC-on. Pontosan ugyanennyivel kisebb a sztöchiometria értéke Cd²⁺ estén pH 10 körül. A változás még kisebb, ha külső donort (ferrocént) is használunk (■, □). A fémion hatás formális pH eltolódással való leírása minden eddigienél látványosabban látszik a Q_B aktív RC protonkötés sztöchiometriájában: 1,5 pH egység eltolással kaphatjuk meg a fémion-kezelt görbét (5.15 ábra b).

A fényindukált protonkötést sztöchiometriája mellett kinetikája jellemzi (Maróti és Wright, 1997). A protonfelvétel kinetikája nagymértékben hasonló az elektrontranszferre. Az

első flash után mért kinetika Q_B aktív RC-on kétfázisú (Miksovská és mtsai. 1997, 1999), hasonlóan az első elektrontranszfer kinetikájához, míg a Q_B inaktív RC-on a kinetika monoexponenciális (Maróti és Wraight, 1997). A második flash utáni protonkötés kinetikája némileg lassabb, mint a második elektrontranszfer (Maróti és Wraight, 1988; McPherson és mtsai. 1993), de hasonlóan jól illeszthető monoexponenciálissal.



5.15 ábra. A fényindukált protonkötés sztöchiometriájának pH függése. A Cd^{2+} hatására a sztöchiometria értéke 0,1 H^+/RC -mal csökken a kezeltlen mintához képest pH 8-nál Q_B inaktív reakciócentrumon (a). A Q_B aktív RC-on 0,2-0,3 H^+/RC változás látható pH 8-nál (b). Donor (ferrocén) jelenlétében (■) a különbség rendkívül kicsivé válik. A pH függést Henderson-Hasselbalch összefüggés alapján 3 nem-kölcsönható protonálható csoport fény/sötét pK-jával illesztettük (5.4 Táblázat). A szaggatott vonal az egyedi csoportok hozzájárulása az erdő görbéhez (folytonos vonal). A protonkötést sztöchiometriáját a kinon betöltöttségre is korrigáltuk (b). Feltételek: 1.5 μM RC, 0.03 % Triton X-100, 50 mM NaCl, 40 μM pH indikátor festék, 10 mM puffer (pH-tól függően, ld. 4.7 fejezetet), 100 μM terbutrin (a) és 30 μM UQ₁₀ (b).



Az elektrogén protonmérések alapján az elektrontranszferhez hasonló időállandójú kinetikákról számoltak be (Brzezinski és mtsai. 1997). Az első protonfelvétel kinetikáját 64 átlagolás után, monoexponenciálissal illesztettük. Az 5.16 ábrán első (felső rész) és második (alsó rész) flasht követő protonfelvétel sebességének pH függése látható Cd^{2+} kezelés hatására. A vizsgált pH tartományt a pH indikátor festék érzékenysége, valamint a sztöchiometria nagysága jelölte ki.

Protonálható aminosav	PQ_A	$\text{PQ}_A + \text{Cd}^{2+}$	P^+Q_A^-	$\text{P}^+\text{Q}_A^- + \text{Cd}^{2+}$	PQ_B	$\text{PQ}_B + \text{Cd}^{2+}$	P^+Q_B^-	$\text{P}^+\text{Q}_B^- + \text{Cd}^{2+}$
1	9.7	9.4	10.5	9.9	9.1	7.9	10.6	9.4
2	8.35	7.8	8.6	8.2	8.1	7.0	8.7	7.6
3	6.8	5.8	6.9	6.1	6.4	5.3	6.85	6.1

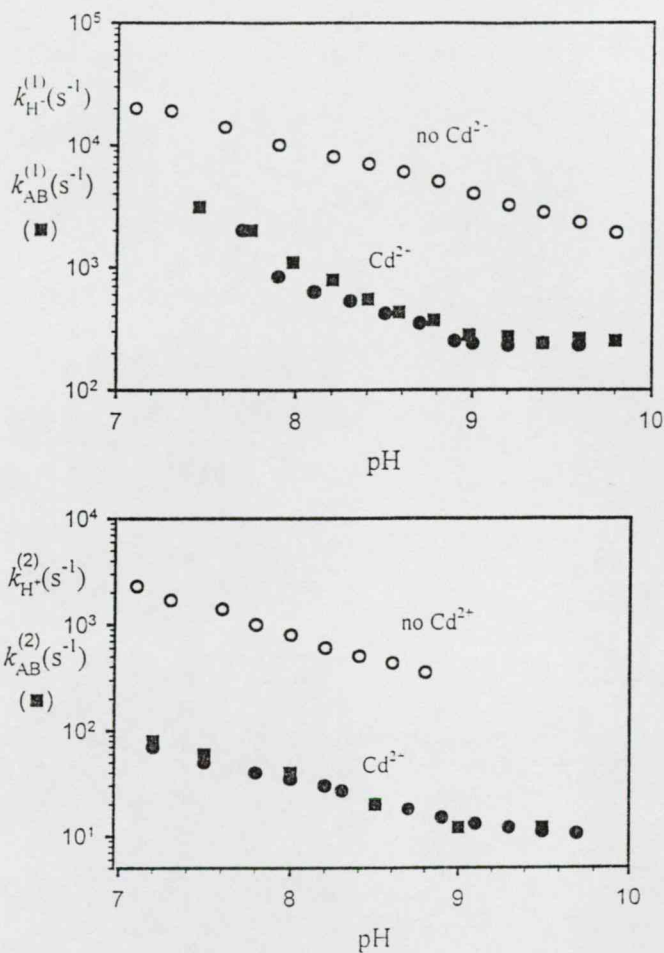
5.4 Táblázat. A RC protonkötés sztöchiometriájának pH függését 3 nem kölcsönható protonálható aminosav pK -inak változásával illesztettük a Henderson-Hasselbalch egyenlet alapján. A sötét állapotra (PQ_A , PQ_B) jellemző pK értékek gerjesztés hatására (P^+Q_A^- , P^+Q_B^-) alacsonyabb pH felé tolódtak. Cd^{2+} hatására mind a sötét, mind a fény állapot pK -i alacsonyabb pH-felé tolódtak el.

A Cd^{2+} és RC komplex képződés hatására az első és második protonkötés annyira lelassul, hogy a proton aktivált elektrontranszfer sebesség-meghatározó lépésévé válik.

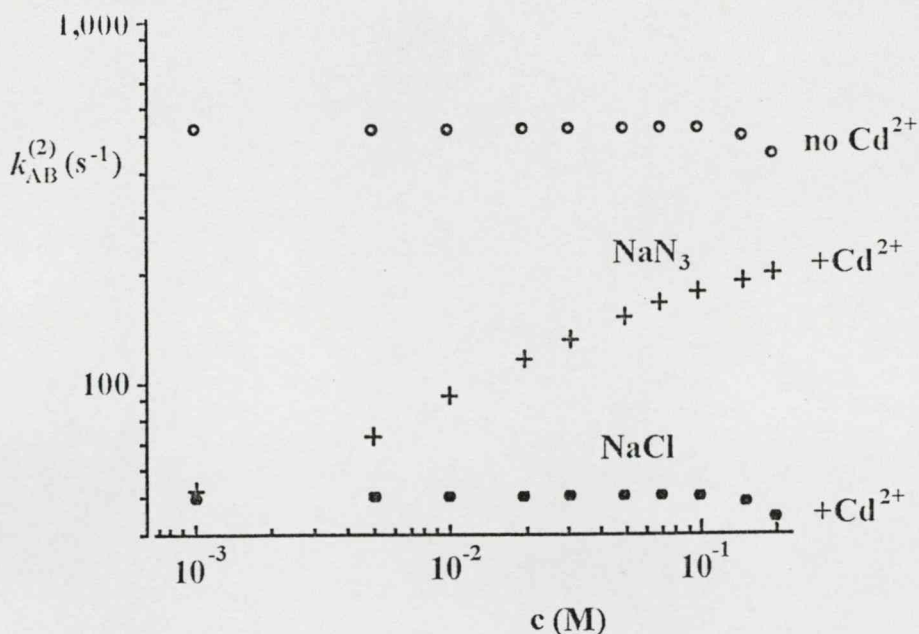
5.12 A Na-azid hatása

A fémion gátló hatását némileg csökkenteni lehet nátrium-azid ($\text{NaN}_3/\text{NaHN}_3$) hozzáadásával. Az 5.17 ábra jól mutatja, az azid növekvő koncentrációval mennyire gyorsítja a $k_{AB}^{(2)}$. A Cd^{2+} kiváltott 10-szeres sebességcsökkenés 200 mM azid hozzáadásával 2-szeresre csökkenthető. Az azonos ionerősségű NaCl titrálása 100 mM-ig semmilyen hatást nem váltott ki, azaz az azid gyorsítása független a só-hatástól. A $k_{AB}^{(2)}$ kinetikája 100 mM só-koncentráció felett

Cd^{2+} -tól függetlenül lassul, mivel a RC negatív felületi töltéseinek erős ionikus árnyékolásával a lokális pH növekszik (Tandori és mtsai. 1999).



5.16 ábra. A fény indukált proton kötés kinetikájának pH függése. Az első flash után mért kinetika $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ jelenlétében lényegesen lassabb (\bullet), és megegyezik az első elektrontranszfer pH függésével (\blacksquare) (a). A második flash után mért proton kötés sebességének pH függése szintén lényegesen lecsökken (\bullet), és megegyezik a proton-aktivált elektrontranszfer sebességének pH függésével (\blacksquare). A proton kinetikáját pH-tól függően bróm-krezolbíbor, o-krezolvörös és o-krezolfalein indikátorfestékek 586 nm-nél megfigyelt abszorpció változásával követtük nyomon. Feltételek: $2.0 \mu\text{M RC}$, $30 \mu\text{M pH}$ indikátor festék, 10 mM puffer, $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$, 0.03% Triton X-100, 50 mM NaCl , $100 \mu\text{M}$ terbutrin (a), és $200 \mu\text{M}$ ferrocén (b).



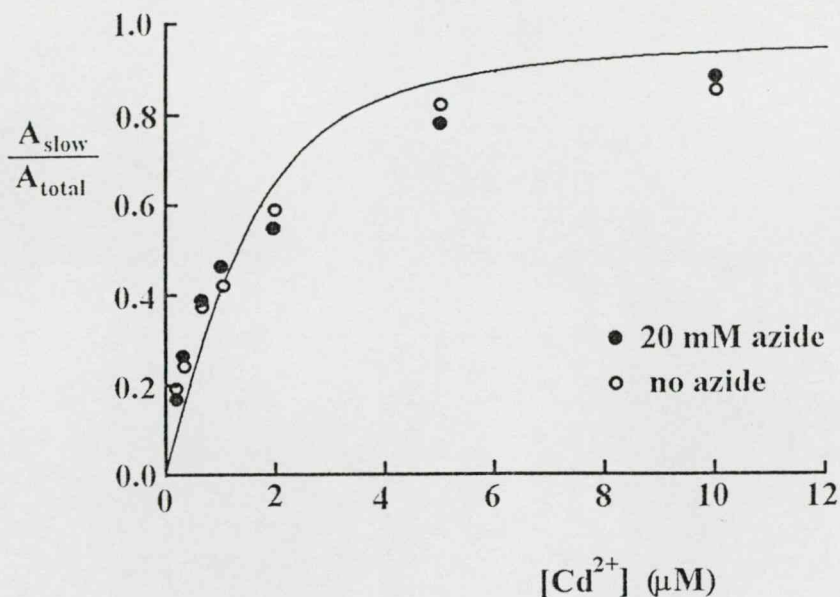
5.17 ábra. Az azid proton-aktivált elektrontranszferre gyakorolt gyorsító hatása. Jól látható, hogy azid titrálásával a sebesség (+) akár a nem Cd $^{2+}$ kezelt RC (\circ) $k_{AB}^{(2)}$ sebességének kb. feléig is növelhető. A kontrollként alkalmazott NaCl-nak (\bullet) semmilyen hatása sincs. Feltételek: pH 8.0, 1.5 μ M RC, 20 μ M cit, 20 μ M UQ $_{10}$, 20 mM Tris, és 0.03 % Triton X-100.

A megfigyelt részleges gyorsítás nem magyarázható az azid Cd $^{2+}$ -RC komplexre gyakorolt hatásával, mivel a kinetikák tetszőleges azid koncentrációnál monoexponenciálisak voltak. A felmerült kérdés megnyugtató tisztázása végett, azid jelenlétében megismételtük a Cd $^{2+}$ titrálást. Az 5.18 ábra egyértelműen mutatja, hogy 20 mM azid jelenlétében elvégzett titrálás teljesen megegyezik az azid nélkül végzett titrálással, azaz az azid nem gyakorol hatást a komplexképződési folyamatra.

5.13 RC lassú átfordulása folytonos gerjesztésben

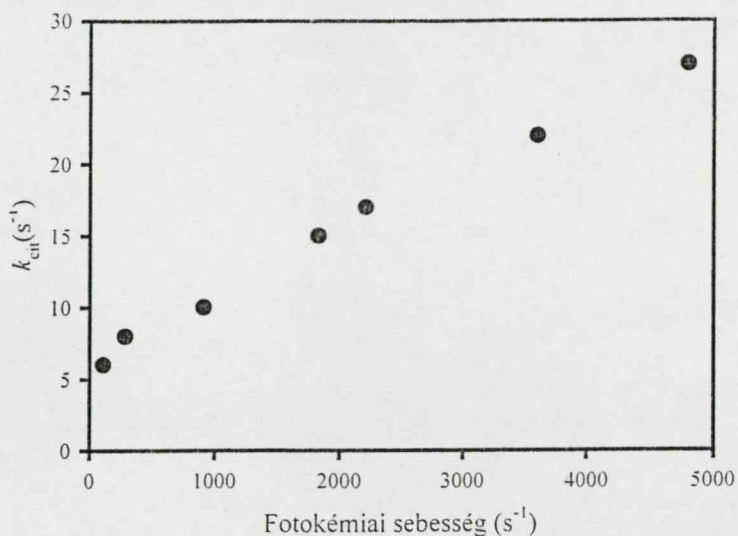
Korábban láttuk, hogy a citokróm átfordulás sebessége Ni $^{2+}$ jelenlétében nem kisebb, mint a $k_{AB}^{(2)}$ sebessége, ami azt jelenti, hogy a $k_{AB}^{(2)}$ a sebességmeghatározó lépés a fotociklusban. Alaposabb vizsgálat után, azt figyeltem meg, hogy az átfordulás sebessége kissé nagyobb, mint a $k_{AB}^{(2)}$ -é. Az első látásra képtelenségnek tűnő megfigyelést, gondosan ellenőriztem. Az

átfordulási sebességértékek és a 430 nm-nél abszorpcióváltozással meghatározott RC koncentráció értékek rendkívül kis szórást mutattak és jól reprodukálhatók voltak.

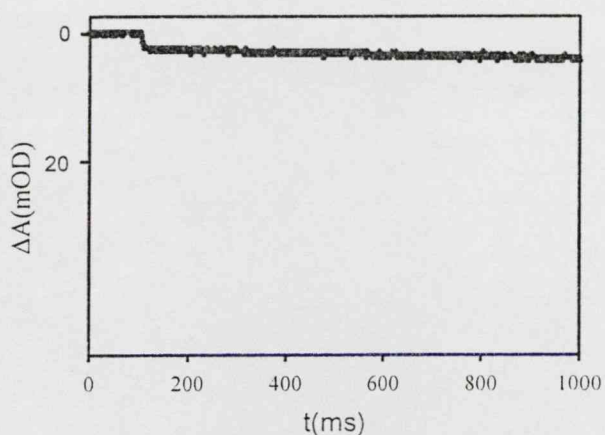


5.18 ábra. A második elektrontranszfer lassú komponensének amplitúdóhányada a Cd²⁺ koncentrációnak függvényében. Jól látható, hogy 20 mM azid (●) hozzáadásával a titrálási görbe nem változik (○). A titrálási görbét a 4.5 egyenlet alapján $K_D=0.5 \mu\text{M}$ paraméterrel illesztettük. A feltételek ugyanazok, mint az 5.17 ábrán.

Az átfordulási sebesség mellett jelentős fényintenzitás-függést mutatott (5.19 ábra): növekvő fényintenzitással a sebesség lineárisan növekedett. (a fényintenzitást a fotokémiai sebességértékben adtam meg). Kis fényintenzitásnál a k_{cit} és $k_{\text{AB}}^{(2)}$ értéke megegyezett, de növekvő fényintenzitással a különbség egyre nőtt. A lineáris függés azért különösen meglepő, mert az eredő átfordulási sebessége rendkívül kicsi (7 s^{-1}) a fotokémiai reakció sebességéhez (4500 s^{-1}) képest. Hasonló fényintenzitás-függés figyelhető meg a fotoinhibíció lineáris tartományában, ahol a növekvő fényintenzitás mellett a fotokémiai aktivitás lineárisan növekedik. A fotoinhibíció elképzelését viszont kizárhatjuk, mivel kinon készlet hiányában nem láthatunk extra átfordulást (citokrómozidációt) (5.20 ábra).



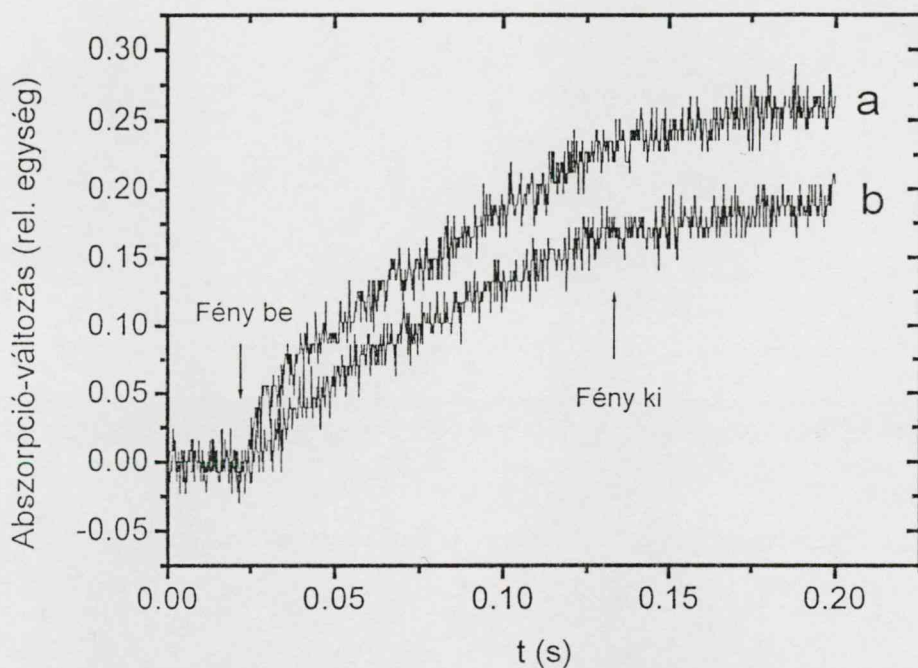
5.19 ábra. A citokróm átfordulási sebessége a gerjesztő fény intenzitásának függvényében. Mivel a fényintenzitás a fotokémiai reakcióval egyenesen arányos a vízszintes tengelyen az utóbbit tüntettem fel. Feltételek: 1.0 μM RC, 0.03% Triton X-100, 25 μM UQ₆, 60 μM cit, 500 μM Ni²⁺ és pH 8.4.



5.20 ábra. A citokróm-oxidáció kinetikája folytonos gerjesztés alatt. Feltételek: 1.0 μM RC, 0.03% Triton X-100, 60 μM cit, 500 μM Ni²⁺ és pH 8.4

A következő lépésben megvizsgáltam, hogyan változik a szemikín kinetikája folytonos gerjesztés alatt és kikapcsolása után. A gerjesztő fény kikapcsolása után a szemikín 7 s^{-1} időállandójú monoexponenciálissal csengett le, amiből az következik, hogy a változás

kialakulása vagy eltűnése rendkívül gyors folyamatokra utal. Mivel a fémion gátló hatása a protonfelvétel sebességében látványosan jelentkezik és az esetleges más folyamatoknak tulajdonítható abszorpcióváltozást kiszűrhetjük a puffertelt jel kivonásával, a folytonos fényben mért protonkötés mérése ígéretesnek mutatkozott. Az 5.21 ábrán láthatjuk, hogy a gerjesztő fény intenzitásának növelésével a protonkötés sebessége növekszik, még hozzá hasonló arányban, mint a citokróm átfordulás sebessége. Ez az eredmény egyértelműen mutatja, hogy a citokrómátfordulás kiértékelésében nem vétettünk kalibrációs vagy mérési hibát.



5.21 ábra A protonkötés kinetikája folytonos megvilágítás alatt. Jól látható, hogy növekvő fényintenzitásnál a sebesség (meredekség) megvilágítás alatt növekszik, de a gerjesztés kikapcsolása után állandó értékre csökken. Az a görbét 4500 s^{-1} , a b görbét 1200 s^{-1} fotokémiai sebesség mellett mértük. Feltételek: pH 8.4, $2.0 \text{ }\mu\text{M}$ RC, 0.03 % Triton X-100, $25 \text{ }\mu\text{M}$ UQ₆, $100 \text{ }\mu\text{M}$ ferrocén és $40 \text{ }\mu\text{M}$ OKV.

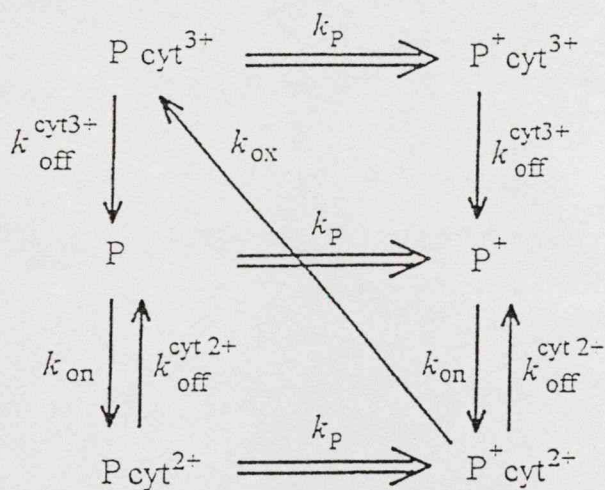
Az effektus értelmezését még nem sikerült megadnunk, de kizártunk számos szöbajöhető lehetőséget. (1) Nagy intenzitású gerjesztőfény fotonjai a fémiongátlás következtében zárt állapotú RC-okat érnek. Az elnyelt fotonok így nem tudnak töltésszétválasztást létrehozni,

hanem a fényenergia hő formájában távozik. A hőleadás sebességére vonatkozó számításaink azonban kizárják a lokális felmelegedés következtében felgyorsuló protontranszfer lehetőségét. Az elnyelt energia 10-100 ns alatt hőleadás formájában távozik, így jelentős felmelegedéssel nem számolhatunk. (2) Triviális lehetőségként merült fel, hogy a fémion a kötőhelyről egyensúlyi folyamatnak megfelelően leválik ill. bekötődik, és folytonos gerjesztés közben előfordulhatnak nem gátolt RC-ok. A fémion titrálási görbáját a korábbi flash kísérletekből meghatározott leválási és bekötési sebességállandók viszonylag széles tartományú változtatásával sem lehetett illeszteni. (3) Elképzelhető, hogy az átfordulás közben keletkezik, vagy az oldat eleve tartalmaz valamilyen oxidálószeret, amely a lassú elektrontranszferrel párhuzamosan képes oxidálni a Q_A^- -t. *Rhodospseudomonas viridis* RC-ban a fényindukált Q_A^- ferricianid jelenlétében oxidálódott (Shopes és Wraight, 1985). Mivel az oldat redoxpotenciáljától az átfordulási sebesség nem függött az oxidáció lehetősége is kizárt. (4) Fotoinhibíció lehetőségét protonfelvétel mérése és kinonmentes RC átfordulási mérése egyértelműen kizárják.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1 A donor oldal átfordulásának modellje

A citokróm oxidációval nyomon követett stacionárius RC átfordulást az előző részben kísérletek széles spektrumával vizsgáltuk. A kapott eredményeket a RC donor oldali folyamatait figyelembe vevő egyszerű modellel próbáljuk meg leírni. A modellben csak azon reakciókat szerepeltetjük, amelyeknek számottevő hatása van a citokrómátfordulás stacionárius sebességére. A modell alap gondolata, hogy a reverzibilis komplex-képződési lépéseket egy nagyon gyors elektrontranszfer követi. Természetesen a valódi reakcióséma jóval bonyolultabb.



6.1 séma A RC donor oldali átfordulásának modellje. A dimer k_p fotokémiai sebességgel keletkezik, amelyet csak a kötött redukált citokróm tud visszaredukálni k_{ox} sebességgel. A citokróm c bimolekuláris sebesség állandóval (k_{on}) a RC-hoz kötődik, amelyről k_{off} disszociációs sebesség állandóval válik le. Az oxidált citokróm leválásának sebességét azonosnak választottuk. A kötési és leválási sebességállandók nem függenek a dimer oxidációs állapotától. Nagy mennyiségű citokróm készlet esetén az oxidált citokróm bekötése elhanyagolható, ezért a sémából elhagytuk, alacsony citokróm koncentráció mellett természetesen figyelembe kell venni.

Az elektrontranszfer időállandója (1-2 μs) már régóta jól ismert (Overfield és mtsai, 1979). A citokróom bekötését és a cit- P^+ elektrontranszfert a flash kísérletek alapján már jól dokumentálták (ld. 2.6 fejezetet). Mivel az oxidált citokróom leválása csak a RC átfordulása után figyelhető meg, az egy-flash kísérletek elől rejtve maradt, a több-flash kísérletek pedig csak nagyon korlátozott választ adtak a disszociáció részleteire (ld. 2.6 fejezetet). Kézenfekvő a folytonos gerjesztés használata a RC átfordulásának vizsgálatában. Azt gondoljuk, hogy az alacsony ionerősségnél megfigyelt határoló folyamat a citokróom leválása a RC-ról.

A modellben nem vesszük figyelembe a citokróom dokkolását követő orientációs reakciókat, amelyek révén a citokróom a disztális pozícióból proximális pozícióba kerül, amelyből már képes P^+ -t redukálni. Mivel a fenti folyamatok sebességi állandója 10^4 s^{-1} (Long és mtsai. 1989; Tiede és mtsai. 1993; Wachtveitl és mtsai. 1993), azaz legalább egy nagyságrenddel nagyobb, mint az általunk vizsgált lépéseké, a citokróom folytonos átfordulásában nem figyelhetjük meg. Ennek alapján a kétállapotú modellt (a citokróom oxidált vagy redukált állapotban van kötve) fogjuk használni a 3 állapotú (disztális ill. proximális pozíciók) helyett. Későbbiekben látni fogjuk, ez az egyszerűsítés a vizsgált effektust leíró modellre nincs kihatással. A következő alapvető feltevésekkel élünk:

- (i) Citokróom a RC-hoz kötött, vagy szabad állapotban van. Nem különböztetünk meg proximálisan és disztálisan kötött citokróomot.
- (ii) A citokróomnak egyetlen kötőhelye van a RC felületén, összhangban a korábbi egyensúlyi dialízis (Rosen és mtsai. 1980) és (citokróom c_2)-RC kokristály képzési vizsgálatokkal (Adir és mtsai. 1996). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy néhányan egy második kötőhelyről is beszámoltak. Wachtveitl és mtsai. (1993) a citokróom-oxidáció sebességének citokróom koncentráció függését próbálták modellezni. A reakciósémájuk csak ekvimoláris koncentrációkra adta vissza a mért adatokat. Nagy túlsúlyban alkalmazott citokróom esetén eredményeik csak különböző affinitású

citokróm kötőhelyekkel voltak csak magyarázhatóak. Overfield és Wraight (1986) szintén leirt egy második nagyon erős kötőhelyet ($K_D < 10^{-8}$ M), a már jól ismert kötőhely mellett ($K_D = 4 \cdot 10^{-7}$ M) (Rosen és mtsai. 1980).

- (iii) A minimális reakcióséma magába foglalja az asszociáció másodrendű ütközési folyamatát, az elsőrendű elektron transzfert és az elsőrendű disszociációt. Az elektrontranszfer sebességi állandója $k = 1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Overfield és mtsai. 1979; Wang és mtsai. 1994). Az asszociáció és disszociáció sebességi állandója az ionerősségtől, a viszkozitástól, a hőmérséklettől, valamint az oldat pH-jától is függ. Külön vizsgáltuk ezen függéseket, amelyeket explicit formában később adunk meg. A határoló bimolekuláris sebességi állandó 0 ionerősségnél $3.8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ami egészen jól egyezik Overfield és Wraight (1980a) $6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ valamint Moser és Dutton (1988) által megadott $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sebességi állandóval. A bekötés és leválás folyamatainak sebességállandóját a reagens fehérjék közötti elektrosztatikus kölcsönhatási energia szabja meg:

$$k_{\text{on}}(I) = k_{\text{on}}(I \rightarrow \infty) \cdot \exp\left(-\frac{V}{k_B \cdot T}\right) \quad (6.1)$$

$$k_{\text{off}}(I) = k_{\text{off}}(I \rightarrow \infty) \cdot \exp\left(+\frac{V}{k_B \cdot T}\right) \quad (6.2)$$

I az oldat ionerőssége, k_B a Boltzmann állandó, és T a hőmérséklet. Ha ponttöltéseket tételezünk fel a kölcsönhatási energia Wherland és Gray (1976) szerint:

$$V = 2.1175 \cdot \left[\frac{e^{-\kappa \cdot R_{\text{RC}}}}{1 + \kappa \cdot R_{\text{cyt}}} + \frac{e^{-\kappa \cdot R_{\text{cyt}}}}{1 + \kappa \cdot R_{\text{RC}}} \right] \cdot \left[\frac{Z_{\text{RC}} \cdot Z_{\text{cyt}}}{R_{\text{RC}} + R_{\text{cyt}}} \right] \quad (6.3)$$

ahol $\kappa = 3.29/\text{nm}$ a Debye inverz távolság, R_{RC} és R_{cyt} a RC és citokróm ionkizárási sugara és Z_{RC} és Z_{cyt} a megfelelő töltésszámok. A töltésszámok kifejezhetők az asszociációt jellemző határoló ionerősségnél vett sebességi állandókkal:

$$\left. \frac{Z_{RC} \cdot Z_{cyt}}{R_{RC} + R_{cyt}} \right|_{on} = \frac{\ln \frac{k_{on}(I \rightarrow \infty)}{k_{on}(I \rightarrow 0)}}{7.152} \quad (6.4)$$

$$\left. \frac{Z_{RC} \cdot Z_{cyt}}{R_{RC} + R_{cyt}} \right|_{off} = \frac{\ln \frac{k_{off}(I \rightarrow \infty)}{k_{off}(I \rightarrow 0)}}{7.152} \quad (6.5)$$

Modellünk jól visszaadja az összes kísérleti megfigyelést, a citokróm-oxidáció ionerősség, pH, viszkozitás, hőmérséklet és citokróm koncentráció függését. A sémára felírt differenciál-egyenletekbe az egyensúlyi kötési mérések alapján meghatározott közelítő sebességállandókat írjuk be. A citokróm stacionárius átfordulási sebessége és a P^+ felhalmozódás stacionárius mennyisége a modell alapján kiszámíthatók és az illesztéseket az 5.2 és 5.3 ábrákon folytonos görbével jelöljük. Az adott mérésre vonatkozó illesztési paraméterek az ábra-aláírásban találhatóak. Meg kell jegyeznünk, hogy a paraméterek empirikus jellegűek, külön folyamatokat nem jellemeznek. A modell teljes mértékben leírja a citokróm oxidáció többfázisú kinetikáját, amit alacsony ionerősségnél és nagy citokróm koncentrációnál figyelhetünk meg. Az átfordulás kezdeti sebessége jóval nagyobb, mint a stacionárius sebesség. A kezdeti fázis a gerjesztést megelőzően a kötőhelyre kötött citokrómokra jellemző, amit alátámaszt a növekvő ionerősségeknél jelentkező csökkenő amplitúdó érték. A fenti vizsgálatok összhangban vannak a korábbi flash-kísérleteknél kapott kétfázisú kinetikával. (Overfield és mtsai. 1979).

A redukált citokróm kötési affinitását alacsony ionerősségnél határoztuk meg. A kapott ($K_D=0,23 \mu M$) érték jó egyezést mutat az egyensúlyi dialízisből kapott értékkel $K_D=0,4 \mu M$ (Rosen és mtsai. 1980), annak ellenére, hogy a detergens koncentrációja némileg eltért (0,1 % Triton X-100). Mások a detergens koncentrációjának függvényében a (0-2%, LDAO) is vizsgálták a K_D -t, és enyhe (0,3-10 μM) függést tapasztaltak (Overfield és Wraight, 1980a; Moser és Dutton, 1988). A kísérletek döntő többségében nagy redukált citokróm

koncentrációt állítottunk be, hogy megakadályozzuk az oxidált citokróm visszakötődését a RC-hoz. Az oxidált citokrómra ugyanazt a disszociációs állandóját választottuk. A leválási sebesség állandókat szintén azonosnak választottuk. A feltevést több korábbi kísérlet is indokolja, az egyensúlyi dialízis kísérletekből az adódott, hogy az oxidált és a redukált citokróm ugyanakkora affinitással kötődik a RC-hoz (Rosen és mtsai. 1980). Ugyanakkor, mások azt tapasztalták a citokróm redoxtitrálása alapján (a kötött citokróm középponti redoxpotenciálja 40 mV-al volt kisebb, mint a szabad citokrómé), hogy az oxidált citokróm 5-ször erősebben kötődik a RC-hoz, mint a redukált. (Moser és Dutton, 1988)

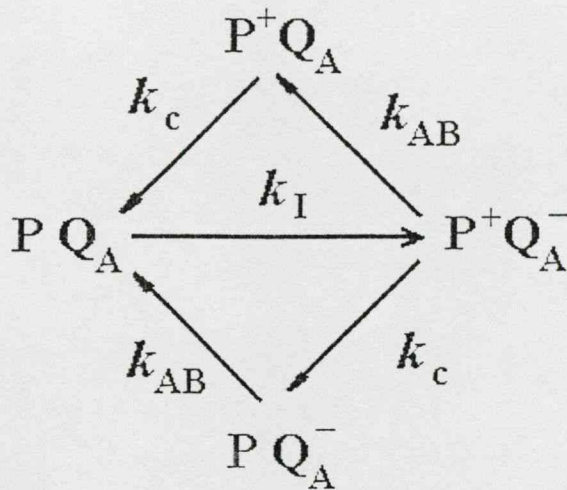
6.2 Elektrosztatikus kölcsönhatás szerepe a RC átfordulásában

A stacionárius átfordulás ionerősség-függése két jól elkülöníthető fázist mutat, ami két különböző sebesség-meghatározó lépéshez rendelhető hozzá (5.2 ábra). Érdekességként jegyezzük meg, hogy a bimolekuláris sebességállandó hasonló ionerősség-függését figyelték meg Overfield és Wraight (1980b) negatívan töltött foszfatidil-szerin vezikulába csomagolt RC-citokróm komplexen. Neutrális membránban vagy detergens oldatban viszont nem tapasztalták az effektust (Overfield és Wraight, 1980a). Az ionerősség-függést máshogyan értelmezték: az alacsony ionerősségen kapott kisebb fotooxidációs sebesség a pozitív citokróm és a negatív membrán közötti elektrosztatikus kölcsönhatásnak tulajdonítható, aminek következtében a citokróm RC-hoz való diffúziója jelentősen gátolt. A hatás magasabb ionerősségnél már az ionok árnyékoló hatása miatt nem számottevő (Overfield és Wraight, 1980b). Mások később az értelmezést megkérdőjelezték: Riegler és mtsai.-nak (1984) sikerült olyan feltételeket (pl. nagy citokróm/lipid arány, de alacsony citokróm koncentráció) beállítani, amikor a citokróm a lipidmembrán felületéhez kötve nagyobb oxidációs sebességet adott, mint az oldatbeli 3 dimenziós diffúzió esetén. Modellünkben citokrómoxidáció ionerősség-függését a Stern elektromos kettősréteg paramétereinek, a RC és citokróm

ionkizárási sugarainak változásával vettük figyelembe. A kisebb távolság (sugár) azt modellezi, hogy dokkolóhely közelebb található a hemcsoport fehérjefelülethez legközelebbi pontjához. Az aktivált komplex képződése során, a citokróm hemcsoportjának orientációja és a RC kötőhelyhez való hozzáférhetősége különböző lehet különböző ionerősségnél. A só-titrálási görbét töltések következő ionkizárási sugaraival 1,22 nm (Al^{3+}) és 0,38 nm (Na^+) tudtuk illeszteni. A különböző méretű, töltésszámú ionok valamint szerves komplexek felületi tulajdonságainak függvényében vizsgálta a citokróm c oxidációját Wherland és Gray (1976). A (citokróm c_2)-RC keresztkötésű komplexen két konformációt is azonosítottak, amelyek jelentősen különböztek a nem keresztkötött RC-citokróm komplextől (Drepper és Mathis, 1997). A konformációkban a P és a hemcsoport közötti távolság különbsége 3 \AA volt, ami az elektrontranszfer sebességében 80-szoros változást eredményezett.

A különböző ionokra meglehetősen eltérő ionerősség-függést figyelhetünk meg 5.3 ábrán. A protontranszferre gyakorolt ionhatás már régóta ismert és tanulmányozott (Maróti és Wraight, 1997). Kétértékű és háromértékű ionok semleges pH-n jóval nagyobb hatást gyakorolnak a kromatofórán mért transzmembrán potenciálkülönbség úgynevezett B2 fázisára, mint az egyértékű ionok (Shinkarev és mtsai. 1993, Gupta és mtsai. 1997, 1998, 1999, 2001). A különböző kationok ionerősség-függései folytonos átfordulásban jelentősen eltérnek, a hatás nem írható le kizárólagosan az oldószer ionikus árnyékolásával, hanem mobilis ionok RC felületéhez történő kötésével, felületi töltések változásával is számolnunk kell. A Cd^{2+} átmeneti fémion különösen nagy affinitással kötődött a RC-hoz. A citokróm-átfordulással kapott mérésekből a disszociációs állandóra $10 \mu\text{M}$ kaptunk, ami egy nagyságrenddel nagyobb, mint a flash-kinetikai vizsgálatból származó érték (Paddock és mtsai. 1999). A különbség egyrészt a pH különbséggel, másrészt az 5.13 fejezetben kifejtett hatásból származik. Az átfordulás sebességese jóval kisebb volt (2-szeres), mint a flash vizsgálatoknál (10-szeres), a különbség elsősorban annak tudható be, hogy

citokrómatfordulást pH 5,7-nél a disszociáció határolja alacsony ionerősségnél, ami kb. 10-szer lassabb, mint a $k_{AB}^{(2)}$ (10^4 s^{-1}) (Kleinfeld és mtsai. 1985). Átmenti fémek esetén az átfordulás ionerősség-függését a fémion-hatás, valamint az ionikus árnyékolás figyelembe vételével írtuk le.



6.2 séma. A RC folytonos átfordulását leíró modell, amely a donor oldali modell (6.1 séma) és a $k_{AB}^{(2)}$ elektrontranszfer folyamat kombinált modellje. A folytonos gerjesztés k_p sebességgel a töltéspár kialakulásához vezet, ami vagy a citokróm donációval (k_c) vagy elektrontranszferrel ($k_{AB}^{(2)}$) szűnhet meg. Az akceptor oldalt a $k_{AB}^{(2)}$ -vel vettük figyelembe, ami reális közelítés, mivel a többi folyamata messze gyorsabb.

A növekvő fémion koncentráció a fotooxidáció sebességét a $k_{AB}^{(2)}$ sebességére csökkentette. Mivel a $k_{AB}^{(2)}$ a leglassabb lépés a kinon redukciós ciklusban, ezért az első protontranszfer követő második protontranszfernek gyorsabbnak kell lennie. Az átfordulás ionerősség-függésének modellezéséhez elégséges a fotokémiai sebesség (k_p), a proton-aktivált elektrontranszfer ($k_{AB}^{(2)}$) és a donor oldal korábbi modelljének kombinálása. Az oxidált citokróm keletkezésének sebessége a 3 folyamat sebességével fejezhető ki:

$$\frac{1}{k_{\text{cvt}}} = \frac{1}{k_I} + \frac{1}{k_{AB}} + \frac{1}{k_c} \quad (6.6)$$

A k_c , a citokróm cserélődésének sebessége, ami ionerősségtől függően a disszociáció vagy az asszociáció által határolt:

$$\frac{1}{k_c} = \frac{1}{k_{on} \cdot [cyt]} + \frac{1}{k_{off}} \quad (6.7)$$

$$k_{on} = k_{on}(I \rightarrow \infty) \cdot \left(\frac{k_{on}(I \rightarrow 0)}{k_{on}(I \rightarrow \infty)} \right)^\alpha \quad (6.8)$$

$$k_{off} = k_{off}(I \rightarrow \infty) \cdot \left(\frac{k_{off}(I \rightarrow 0)}{k_{off}(I \rightarrow \infty)} \right)^\alpha, \quad (6.9)$$

ahol az α tényező a citokróm és RC közötti kölcsönhatás energiát fejezi ki (Wherland és Gray, 1976):

$$\alpha = \frac{1}{2} \left(\frac{e^{-3.25 \cdot \sqrt{I} \cdot R_{RC}}}{1 + 3.25 \cdot \sqrt{I} \cdot R_{cyt}} + \frac{e^{-3.25 \cdot \sqrt{I} \cdot R_{cyt}}}{1 + 3.25 \cdot \sqrt{I} \cdot R_{RC}} \right). \quad (6.10)$$

Ha a RC-hoz átmeneti fémion kötődik, akkor az elektrontranszfer $[k_{AB}^{(2)}(i)]$ és ezzel a citokróm oxidáció $[k_{cit}(i)]$ sebessége lényegesen lecsökken:

$$\frac{1}{k_{cyt}(i)} = \frac{1}{k_l} + \frac{1}{k_{AB}(i)} + \frac{1}{k_c}. \quad (6.11)$$

A fémion koncentrációjától függően a RC-ok két frakcióban lehetnek (fémiont kötött, ill. fémiont nem kötött), és ekkor a citokróm oxidáció sebessége az adott átfordulási sebességek frakciók szerinti súlyozott összege:

$$k_{cyt} = k_{cyt}(n) \cdot \frac{[RC]_t - [M-RC]}{[RC]_t} + k_{cyt}(i) \cdot \frac{[M-RC]}{[RC]_t}. \quad (6.12)$$

A frakciók kifejezhetők a K_D disszociációs állandóval, valamint az aktuális RC koncentrációval és az oldat ionerősségével (I) (ld. 4.8.2 alatt):

$$\frac{[M-RC]}{[RC]_t} = \frac{\frac{I}{3} + [RC]_t + K_D - \sqrt{\left(\frac{I}{3} + [RC]_t + K_D\right)^2 - \frac{4}{3} \cdot [RC]_t \cdot I}}{2 \cdot [RC]_t}. \quad (6.13)$$



A fiziológias hőmérséklet tartományban (275-323 K) a disszociáció és asszociáció hőmérséklet függését az ionerősség-függő aktiválási energiák ($E_{a,on}$, $E_{a,off}$) bevezetésével a következőképpen tudjuk kifejezni:

$$k_{on}(T) = k_{on}(T \rightarrow \infty) \cdot \exp\left(-\frac{E_{a,on}}{RT}\right) \quad (6.14)$$

$$k_{off}(T) = k_{off}(T \rightarrow \infty) \cdot \exp\left(-\frac{E_{a,off}}{RT}\right) \quad (6.15)$$

ahol, R az egyetemes gázállandó, T a hőmérséklet, $k_{on}(T \rightarrow \infty)$ és $k_{off}(T \rightarrow \infty)$ végtelen nagy hőmérsékleten vett bekötési és leválási sebesség-állandó. Nagy ionerősségen mért aktiválási energia 5,7 kcal/mol viszonylag jó egyezést mutat a P^+ visszaredukálásának lassú komponensének aktiválási energiájával (6,7 kcal/mol) (Venturoli és mtsai. 1993). Az alacsony ionerősségnél megfigyelt aktiválási energia 1,5 kcal/mol a kereszt kötött RC-citokróm komplex aktiválási energiájához van közel (2,8 kcal/mol a gyors, és 1,9 kcal/mol a lassú komponensé) (Drepper és mtsai. 1997). Habár a fenti komponensek a kereszt kötött komplex elektrontranszfer komponensei (1 μ s, 60 μ s), az aktivációs paraméterek nem feltétlenül az elektrontranszfert, hanem azt megelőző orientációs mozgásokat jellemzik. Az elképzelést alátámasztja a komponensek első pillantásra rendkívül meglepő fordított viszkozitás-függése (viszkozitás növelésével a komponensek sebesség-állandója kis mértékben nő) (Drepper és mtsai. 1997). Hasonlóan kis aktiválási energiát (1,6-2,1 kcal/mol) mértek az elektrontranszferre *Rhodospseudomonas Viridis*-ből izolált RC-on, ahol a négy alegységből szerveződő citokróm szorosan kötődik a RC-hoz (Ortega és Mathis, 1992, 1993). A citokróm átfordulás számos lépésből áll, amelyeket termodinamikai szempontból nem tudunk megkülönböztetni. A megfigyelt látszólagos aktiválási energia magába foglalja a diffúzió-limitált asszociációt, a disztális-proximális átrendeződést, az elektronátadást és a komplex disszociációját. Az alacsony és magas ionerősségnél mért aktiválási energiák lényegesen különböztek (5.6 ábra). Az ionerősség változása nem okozhat drámai hatást sem a diffúzió,

sem a Marcus típusú (intrinsic) elektrontranszfer aktiválási energiájára. A disztális pozícióból a proximálisba való átmenet vagy a RC-citokróm komplex disszociációjához szükséges termikus aktiválás érzékeny paramétere lehet az ionerősségnek. A lépések szétválasztása termodinamikai paraméterek alapján nem teljesen egyértelmű.

A citokróm fotooxidáció határoló folyamatait viszkozitás-függés vizsgálattal szétválaszthatjuk. Míg a diffúzió kontrollált asszociáció az Einstein-Smoluchowski összefüggés alapján írható le:

$$k_{\text{on}}(\eta) = k_{\text{on}}(\eta_0) \cdot \frac{\eta_0}{\eta} \quad (6.16)$$

az oxidált citokróm leválása kevésbé függ a minta viszkozitásától:

$$k_{\text{off}}(\eta) = k_{\text{off}}(\eta_0) \cdot \left(\frac{\eta_0}{\eta}\right)^n \quad (6.17)$$

, ahol η_0 a víz viszkozitása. Alacsony ionerősségnél (4 mM) $n=0,2$ meredekségű, nagy ionerősségnél (40 és 100 mM) $n=1$ meredekségű egyenest kaptunk (5.5 ábra). A RC-citokróm komplex belső orientációs mozgásainak viszkozitás-függése eltért a diffúzió kontrollált reakciókétől (Moser és Dutton, 1988). A proximális disztális átmenetnek mérsékelt viszkozitás függését figyelték meg, ugyanakkor fordított irányban nem tapasztaltak viszkozitás függést. A furcsa viszkozitás viselkedés a citokróm-RC 3 állapotú modelljével teljes összhangban volt, annak egyik legfontosabb kísérleti bizonyítéka lett. Venturoli és mtsai. (1993) a cit-P elektrontranszfer rendhagyó, fordított viszkozitás-függését figyelték meg. Következésképpen próbálták interpretálni eredményüket: A kötött citokróm két különböző konformációban lehet, amelyek közötti átmenet orientációs mozgást igényel. A konformációkban az elektrontranszfer sebessége különböző. Ha a konformációk között gyors az átmenet, akkor az határolja az elektrontranszfert. Ha viszont a viszkozitás növelésével lelassul az átmenet, a kinetikában megjelenik egy gyors komponens, ami az optimális konformációban lévő citokróm elektrontranszferére jellemző. Drepper és mtsai. (1997)

keresztkötött cit-RC komplexen figyelték meg az elektron transzfer fordított viszkozitás-függését. Azonban megfigyelésüket nem indokolhatták a fenti módon, mivel a kereszt-kötött komplexnél az átmenet sebességét nem befolyásolta a viszkozitás (a gyors fázis amplitúdója nem csökkent). Úgy gondolták, hogy a viszkozitás növelése a citokróm redoxpotenciálját változtatja meg.

Alacsony ionerősségnél a citokróm átfordulás viszkozitás-függése lényegesen eltért az Einstein-Smoluchowski összefüggéstől (6.16 egyenlet). A disszociáció megfigyelt gyenge viszkozitás függése valamint a közepes aktivációs barrierje az oxidált citokróm orientációs mozgásaira utalhat a leválást megelőzően. Vizsgálataink során a viszkozitást glicerol hozzáadásával változtattuk. Az asszociáció lecsökkent sebessége a disszociációs állandó növekedését jelenti. A K_D növekedését figyelték meg 60% glicerolban (Mathis, 1994; Drepper és mtsai. 1997). A növekedés mértékét az asszociációs sebesség csökkenéséből nem határozhatjuk meg egyértelműen, mivel a viszkozitás változása a disszociáció sebességére is lehet hatással.

Alacsony ionerősség és alacsony detergens koncentráció mellett a citokróm és RC elektrosztatikus asszociációját már jól ismerjük (Tiede és mtsai. 1993). A RC és citokróm felületén ellentétes töltésű csoportok hatnak kölcsön egymással: negatív töltésűek a RC periplazmikus oldalán: (L72E, L155D, L257D, L2661D, M88D, M95E, M100E, M173E, M184D és M292D) és pozitív töltésű lizinek a citokróm c-n (10, 35, 95, 97, és 103) pozíciókban. (Brookhaven fehérje adatbank). A citokróm tömb (bulk) fázisnak kitett hem csoportja pozitívan töltött lizinekkal van körülvéve, amelyek a RC felületén lévő negatív aminosavak felé irányítják. A citokróm felszínén aszimmetrikusan elhelyezkedő lizinek egy erős dipólust (300 D) alakítanak ki, ami a citokrómot a kötés előtt orientálja. A bekötött citokróm először a disztális pozícióban van, ahonnan az energetikailag kedvezőbb proximálisba rendeződik át, amelyből az elektrontranszfer végbemehet. A nagy ionerősségnél

tapasztalt drámai átfordulási sebességés a redoxpartnernek ösztöltésének változását tükrözi. Az elektrosztatikus kölcsönhatásban a fehérjék kötőhelyeinek környezetében lévő töltések a meghatározók, szemben fehérje ösztöltésével (Prince és mtsai. 1974; Adir és mtsai. 1996). A fehérjék lósziv citokróm c izoelektromos pontja régóta ismert $pI=10,7$ (Bartsch, 1971), míg a *Rb. sphaeroides* citokróm c_2 izoelektromos pontja $pI=6,1$ (Prince és mtsai. 1974). Az átfordulási sebességben pH 6 körül nem figyelhető meg lényeges változás, annak ellenére, hogy a RC ösztöltése előjelet vált. A citokróm kötődését a lokális elektrosztatikus kölcsönhatás (Allen és mtsai. 1987; Caffrey és mtsai. 1992, Battistuzzi és mtsai. 1996, 1997a,b; Osyczka és mtsai. 1998, 1999, Wang és mtsai. 1999) mellett számos nem-elektrosztatikus kölcsönhatás (Wachtveitl és mtsai. 1993; Farchaus és mtsai. 1993; Wang és mtsai. 1994; Nitschke és Rutherford, 1994; Othman és mtsai. 1996) is alakítja, ezért a pH függés pontos leírására a citokróm és a RC felszínén elhelyezkedő ionizálható aminosavak elektrosztatikus kölcsönhatása nem elégséges. Ráadásul a pH növelésével a citokróm megváltoztatja a konformációját: FTIR vizsgálattal igazolták, hogy míg neutrális pH-n (pH 7,0) a citokróm redoxváltozása következtében a β -lemezek pozíciója módosul, addig alkalikus pH-n (pH 9,0) az α -hélixek helyzete is változik (Schlereth és Mäntele, 1993). A megfigyelt pH függésben a citokróm átfordulás sebességében pH 8 alatt enyhe növekedést, pH 5 alatt viszont erős esést láthatunk (5.7 ábra b). A mért értékeket az asszociáció és disszociáció pH függő paramétereivel ($pK_{on}=4.9$ és $pK_{off}=6.6$) illesztettük:

$$k_{on}(pH) = \frac{k_{on}(pH \rightarrow \infty) \cdot 10^{pH-pK_{on}} + k_{on}(pH = 0)}{1 + 10^{pH-pK_{on}}} \quad (6.18)$$

$$k_{off}(pH) = \frac{k_{off}(pH \rightarrow \infty) \cdot 10^{pH-pK_{off}} + k_{off}(pH = 0)}{1 + 10^{pH-pK_{off}}} \quad (6.19)$$

A pK_{on} pH=0 és pH= ∞ közötti nagymértékű változása jól tükrözi a kötőhelyek környezetében található glutaminsavak és aszparaginsavak deprotonációját, ami lényegeses gyengíti a RC és citokróm közötti elektrosztatikus kölcsönhatást.

6.3 Termékgátlás

A kis citokróm koncentráció mellett mért egyetlen egy flash utáni P^+ visszaredukálás kinetikájának lassú komponense a citokróm és a RC bimolekuláris asszociációját tükrözi (Overfield és mtsai. 1979). Magas citokróm koncentráció mellett többen figyelték meg a másodrendű reakció egy elsőrendű 55-75 μ s féléletidejű reakció általi határolását (Overfield és mtsai. 1979; Tiede és mtsai. 1993; Wachtveitl és mtsai. 1993), míg mások nem tapasztaltak telítést (Venturoli és mtsai. 1993). A folytonos gerjesztéssel vizsgálva a citokróm fotooxidációját a sebesség telítésbe jutott a citokróm koncentráció növelésével (5.4 ábra a). Az oxidált a citokróm leválása után, egy redukált citokróm bekötése válik lehetővé. Nagy citokróm koncentrációnál a másodrendű kötési reakció nem határolja a proximális disztális átrendeződést, ezért a látszólagos elsőrendű reakció a komplex disszociációját követi. Flash kinetikai mérésekből arra következtettek, hogy a disztális cit c_2 leválásának féléletideje közel van a lassú komponens megfigyelt elsőrendű határolásának maximumához (60 μ s) (Drepper és Mathis, 1997). A méréstartomány időintervallumának nagysága miatt nem tudtuk megkülönböztetni az oxidált citokrómnak az aktív komplexről (P oxidált) való leválását a redukált citokrómnak az inaktív komplexről (P redukált) való leválásától. A megfigyelt átfordulási sebesség csak a leglassabb lépéstől függ, ami így alacsony ionerősségnél az oxidált citokróm leválása.

A citokróm koncentráció-függés legmeglepőbb tulajdonsága, hogy kis ionerősségnél a sebesség jelentősen függ a citokróm koncentrációtól (5.4 ábra b). Ez látszólag ellentmond annak, hogy ebben a tartományban az unimolekuláris disszociáció a határoló reakció. Azt gondoljuk, hogy a fotooxidáció során keletkező termék mennyisége összemérhető a kis citokróm készlettel, így elképzelhető az oxidált citokróm visszakötése a kötőhelyre. Nagy redukált citokróm/RC koncentrációarány esetén ez elhanyagolható (5.4 ábra). A fenti

termékgátlást a modellbe beépítettük és az illesztés az 5.4(b) ábrán látható. Jól látható, hogy alacsony ionerősségnél a megfigyelt citokróm átfordulási sebesség még mindig kisebb, mint nagy citokróm koncentráció esetén. Az eltérést több tényező magyarázhatja, egyrészt a modellben az oxidált ill. redukált citokrómok bekötési és leválási sebessége ugyanakkora volt, valamint a különböző redoxformák térbeli eloszlásának időfüggését sem vettük figyelembe. A citokróm átfordulásban tapasztalt termékgátláshoz hasonló jelenségeket már mások is észleltek. Moser és Dutton (1988) egy-flash vizsgálattal követték nyomon a citokróm oxidációját kis citokróm koncentráció mellett. A mért kinetika nem egyezett a 3 állapotú modell által megjósolt kinetikával. Az eltérést azzal magyarázták, hogy a RC-ról leváló oxidált citokróm egy olyan RC-hoz tud kötődni, amelyhez még nem kötődött redukált citokróm. Modelljüket a következő kísérlettel igazolták:

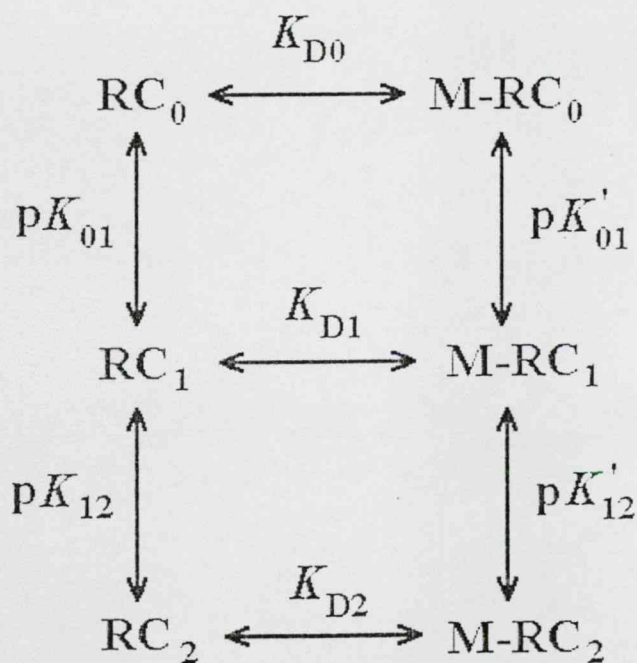
A redoxpotenciál változtatásával elérték, hogy az adott koncentrációjú citokróm különböző hányada oxidált ill. redukált állapotba került. A redukált hányad növelésével a citokróm oxidáció sebessége nőtt. Ezzel párhuzamosan a redukált hányadnak megfelelő koncentrációt állítottak be, redukált citokróm külső hozzáadásával rögzített redoxpotenciál mellett (ebben az esetben a flash előtt nem volt jelen oxidált citokróm). Azt figyelték meg, hogy az utóbbi esetben a fotooxidáció sebessége rendre nagyobb volt, ami egyértelműen az oxidált citokróm jelenlétének köszönhető. A kísérlet egyben azt is mutatta, hogy az oxidált és redukált citokróm hasonló affinitással kötődik a RC-hoz. A többszöri átfordulás esetében a termékgátlás lehetősége még inkább fennáll, hiszen gerjesztett állapotú RC-ok folyamatosan keletkeznek. A termékgátlás másik oka a kis koncentrációnál megnövekedő diffúziós távolság, a keletkező termék a kötőhely közvetlen környezetében marad, míg a redukált citokróm előzetesen egyenletesen kitölti az oldatteret. A diffúzió nem lineáris távolság idő függését figyelembe véve $x^2=4*D*T$, ahol D a diffúziós állandó, az oldatban a diffúzió rendkívül gyors kis távolságon, de jelentősen lelassul a távolság növekedésével. Az

elektrosztatika segít a redukált citokróm bekötésében, de gátolja az oxidált citokróm gyors disszociációját.

6.4 Fémion és RC komplexképződése

Közelmúltban vált ismertté a fémionok kötésében szerepet játszó csoportok helyzete. Fémion-komplexek röntgenkristallográfiás vizsgálatával Axelrod és mtsai. (2000a,b) kiderítették, hogy a Cd^{2+} és a Zn^{2+} 3 vízmolekula, valamint három protonálható aminosav, két hisztidin (HisH124, HisH126) valamint egy aszparaginsav (AspH128) által koordinálódik. A Ni^{2+} 2 vízmolekulával és 2 protonálható aminosavval, egy aszparaginsav (AspM17) karboxil csoportjával és egy hisztidinnel (HisH124) koordinálódik tetraéder alakban a fémion körül (Axelrod és mtsai. 2000a,b). Mivel a kristályosítást pH 8-nál végezték, a pH tartomány egészére vonatkozóan nem állnak rendelkezésre szerkezeti adatok. A kötési affinitás pH függésének leírására az alábbi termodinamikai modellt állítottuk fel: A pH és a kötési affinitás közötti kapcsolat molekuláris alapja a fémionkötés következtében a koordináló protonálható aminosavak pK-jának változása. A hisztidin és aszparagin aminosavak, valamint a Cd^{2+} közötti koordináló kötés csökkenő pH-val egyre kevésbé stabil, a csoport protonálódásával a kötés felszakad. Alacsony pH tartományban a K_D látványos növekedése a fenti mechanizmus eredménye (5.9 ábra). A komplexképződést leíró modell, a RC 3 különböző protonációs állapotát, (deprotonált, valamint egyszeresen és kétszeresen protonált), valamint ezek fémion-kötött és nem fémion-kötött változatát tartalmazza. A továbbiakban még figyelembe vesszük a fémionnak az oldat OH^- ionjához való kötődését, ami magas pH-n Ni^{2+} esetében jelentős. A 6.3 séma egy termodinamikai ciklust ad meg a ligandképzésre és a protonációs lépésekre. A komplex különböző protonációs állapotai különböző disszociációs állandókkal, a megfigyelt disszociációs állandó pH függése, pedig ezek pH függő kombinációjával írható le (4.14 egyenlet). A mért K_D pH függését leíró modell paraméterei az 5.2 táblázatban találhatóak meg.

A fémion kötés egyik fontos következménye a modell alapján megjósolható: A fémion hatására proton felszabadulás mérhető. A protonleadást sztöchiometriáját pH és a Ni^{2+} koncentrációjának függvényében vizsgáltuk. A K_D pH függését és a protonleadás Ni^{2+} koncentráció függését a modelltől származtatott 4.14 egyenlet alapján illesztettük az 5.2 táblázat paramétereivel. A legjobb illesztésből származó paraméterek segítségével a protonleadás sztöchiometriájának pH függése kiszámítható. A mért proton sztöchiometria értékek jó egyezést mutatnak, a modell alapján számított értékekkel.



6.3 séma. A fémion-RC komplex pH és fémion koncentráció függését leíró modell. A RC-nak pH-tól függően deprotonált, valamint egyszeresen és kétszeresen protonált állapota lehet. A fémion kötődhet a RC-hoz és az oldat OH^- ionjához. A RC különböző protonációs állapotait jellemző proton disszociációs állandókat (pK), és a fémion-kötést leíró disszociációs állandókat (K_D , K_{M-OH}) a K_D pH függésének illesztésével kaptuk meg, és az 5.2 táblázatban tüntettük fel.

Wyman és Gill féle összefüggés (6.20 egyenlet) azt mutatja, hogy a komplexképződés hatására felszabaduló protonok száma megegyezik a K_D pH függésének meredekségével (Wyman és Gill, 1990).

$$\frac{[H^+]}{[RC]_i} = \frac{d(\log K_D)}{d(\text{pH})} \quad (6.20)$$

Valóban a legnagyobb mennyiségű proton-felszabadulást pH 6 és pH 7 között láthatunk (5.11 ábra b), ahol a disszociációs állandó meredeksége is egyben a legnagyobb (5.9 ábra). A Ni^{2+} és a Cd^{2+} egészen eltérő kötési affinitásának pH függését részben magyarázhatja, hogy a fémionokat különböző aminosavak koordinálják. Az 5.2 táblázat alapján a Cd^{2+} koordinálásában mind a His ($\text{p}K=7.0$), mind az Asp ($\text{p}K=5.9$) szerepet játszik. A Ni^{2+} koordinálásában a His ($\text{p}K=7.0$) a meghatározó. Természetesen a kapott $\text{p}K$ értékeket nem rendelhetjük közvetlenül egy aminosavhoz, hanem a környezetben lévő töltött csoportok hatását is figyelembe kell venni. Beatty és mtsai. (2000) egy olyan kettősmutánszt konstruáltak (HisH126-HisH128 \rightarrow Ala-Ala), ahol a hisztidinek komplex képződésében játszott szerepét lehetett vizsgálni. Ekvimoláris koncentrációban alkalmazott fémion a kettősmutánsban nem csökkentette a $k_{AB}^{(2)}$ sebességét. Azonban nagy koncentrációban (1 mM) hozzáadva jelentősen lecsökkent a $k_{AB}^{(2)}$, amit a hisztidin mutánsok lecsökkent Cd^{2+} affinitásával magyaráztak. A ligandképzés pH függésére irányuló vizsgálataink megerősítik, hogy a K_D legnagyobb változása abban a pH tartományban megy végbe, ahol a hisztidinek protonációja várható (5.9 ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a fémionok komplexképződésében hisztidinek játsszák a kulcsszerepet.

6.5 Az elektron- és protontranszfer sebességének egyezése

A fémion kötés hatására mind az elektrontranszfer, mind a protontranszfer lényegesen lelassul, és sebességük lényegében azonos (5.16 ábra). Az első elektrontranszfer már régóta vizsgálatok keresztútjében áll. Az elektrontranszfer szabadenergia különbségét különböző

redoxpotenciálú kinonok beültetésével (Okamura és mtsai. 1975) változtathatjuk, és így sebesség ΔG -függését vizsgálhatjuk (Graige és mtsai. 1996, Li és mtsai. 2000). Mivel fenti módszerrel Graige és mtsai. (1998) a $k_{AB}^{(1)}$ sebességét függetlennek találta a szabadenergia különbségtől, $k_{AB}^{(1)}$ nem Marcus típusú elektrontranszfer, hanem egy konformációs lépés által határolt folyamat. A mechanizmust ma sem ismerjük pontosan, fehérjedynamika és protonátrendeződés is elképzelhető (McMahon és mtsai. 1998; Mulikjanian 1999; Alexov és Gunner, 1999; Alexov és mtsai. 2000; Cherepanov és mtsai. 2001). Korábban Stowell és mtsai. (1997) és Utschig és mtsai. (1998) a kinon kötőhelyi mozgásával próbálták összefüggésbe hozni, de Kuglstatler és mtsai. (2001) az elképzelést röntgenkristallográfiás vizsgálattal kizárták. Az elektrosztatikus számítások viszont azt jelezték, hogy Q_A redukciója a Q_B környezetében is változást okoz (Zachariae és Lancaster, 2001). Emellett pH 9 felett egy protonációs lépés is határolja a $k_{AB}^{(1)}$ -t, amit Takahashi és Wraight (1992) meggyőzően igazolt a GluL212→Gln mutáns vizsgálatával.

A különböző elektron és protontranszfer folyamatok hasonló viselkedése közös mechanizmust kell, hogy feltételezzon. A lehetséges mechanizmus az elektrosztatikus hatás vagy a protonátrendeződés. Az első protonfelvétel és elektrontranszfer közötti kinetikai korreláció azt jelzi, hogy a protonátrendeződés erőteljesen gátolt és $k_{AB}^{(1)}$ sebesség-meghatározó lépésévé vált. Hasonló kinetikai kapcsolatot figyelhetünk meg, a második elektrontranszfer és proton felvétel között. Fémion hatására a $k_{AB}^{(2)}$ sebessége lecsökken, mivel a lelassult protonátrendeződés sebesség-meghatározóvá válik. A protonátrendeződés csökkenése a RC folytonos átfordulásában is megfigyelhető (5.12 ábra).

6.6 Protonálható csoportok pK -jának változása

A fémion protonfelvételre gyakorolt gátló hatására több különböző mechanizmus is elképzelhető: a His és Asp ligandok protondonációs képességének megváltozása, szterikus

gátló hatás, a Q_B és a tömb (bulk) közötti proton csatorna szerveződésének és dinamikájának megváltozása. Hasonló pH függést mutató méréseink azt sugallják, hogy a reakciókat kontrolláló csoportok protonációjában okoz változást a fémion. Egy pozitív töltés elektrosztatikus hatásának eredményeként a Q_B -hez irányuló proton-csatorna aminosavainak pK -i eltolódnak. A fémiont és protont egymástól 10 \AA távolságban lévő ponttöltésnek feltételezve, a kölcsönhatás energiájára 100 meV adódik, ha a közeg dielektromos állandóját 15 -nek választva. Az utóbbi választását elektrosztatikus kölcsönhatásokra vonatkozó számítások is alátámasztják (Graige és mtsai. 1999; Rabenstein és mtsai. 2000). Ekkora kölcsönhatási energia egy protonálható aminosav pK -ját $1,6 \text{ pH}$ egységgel tolja el. A méréseinkben megfigyelt pK eltolódások hasonló nagyságúak voltak. A pK eltolódás mérésében elsősorban a protonkötési sztöchiometria a meghatározó, mivel a RC mind fény, mind sötét állapota szerepet játszik a fémion elektrosztatikus hatásában. A protonálható aminosavak azonosítása nem teljesen triviális, a kérdés mélyrehatóbb vizsgálatát mutánsokon végzett mérések segíthetik. Az elektron és protontranszfer pH függése alapján számos protonálható csoport feltételezése indokolt. Az aminosavak valószínűleg egy klasztert alkotnak, amelyben egymás között jelentős elektrosztatikus kölcsönhatásokat alakítanak ki. Ennél fogva, a protonkötés sztöchiometria pH függését sem jellemezhetjük néhány nem kölcsönható aminosavval (5.15 ábra). A GluL212 és az AspL213 összetett elektrosztatikus kölcsönhatásoknak tulajdonítható nem klasszikus titrálási jellegét már többen is leírták (Paddock és mtsai. 1994; Navedryk és mtsai. 1995, 2000; Miksovská és mtsai. 1997, 1998). A protonvezetésben számos aminosav játszik kulcsfontosságú szerepet: SerL223, AspL213, AspL210, AspM17, GluL212 és GluH173. A konformációs változásokat valamint az aminosav oldalláncok ionizációját figyelembe vevő számítások a protonfelvételtől azt tételezték fel, hogy az AspL210 belső protondonorként funkcionál a SerL223, az AspL213 és GluL212 által alkotott protoncsatornában (Alexov és Gunner, 1999). Mutációs vizsgálatok azt

mutatták ki, hogy az AspL210 kulcsszerepe van a protonfelvételben (Paddock és mtsai. 2000). Eredményeink alapján azt valószínűsítjük, hogy a fémion kötése következtében a protonvezetési láncban szereplő aminosavak pK -i csökkennek és ennek következményeként a protontranszfer és elektrontranszfer pH eltérése jelentkezik a nem kezelt mintához képest. A feltevést alátámasztja, hogy alacsony és magas pH-n nem látunk nagy különbséget (5.14 ábra). Ebben a pH tartományban a fémion nem okoz változást az aminosavak protonációs állapotában.

A töltés-rekombináció a Q_B közvetlen környezetében bekövetkező elektrosztatikus változásokról tájékoztat. Mivel azt tapasztaltuk, hogy $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$ töltés rekombinációs kinetikára a fémion nem gyakorol hatást (ábrán nem látható), ami azt jelenti, hogy a fémion hatása legfeljebb a protonálható aminosavak savas klaszteréig terjedhet. A némileg meglepő eredmény többféleképpen is magyarázható. Elképzelhető, hogy a röntgen-diffrakciós kép alapján azonosított a Q_B és a fémion-kötőhely közötti 20 \AA -os távolság túl nagy az elektrosztatikus kölcsönhatáshoz. Habár a Q_B és GluL212 között figyeltek meg már nagy távolságú kölcsönhatást (Sebban és mtsai. 1995; Maróti és mtsai. 1995), de a távolság is és a közeg dielektromos állandója is kisebb volt. Fémionnal kölcsönható aminosavaknak a Q_B és a fémion kötőhely között kell elhelyezkednie, és kellőképpen árnyékolniuk kell a csoport körüli teret. Ha a Q_B a fémion hatás következtében nagyobb szabadenergia változással rendelkezne, akkor sem feltétlenül láthatnánk változást a töltés rekombinációs kinetikában. Az elektrontranszfer Marcus elmélete alapján a szabadenergia kis változását a reorganizációs energia kompenzálhatja. A fehérje felszínén kötődő fémion a töltött csoportok kis mértékű átrendeződését okozhatja, ami perturbáló hatás gyakorolhat az elektrontranszfer reorganizációs energiájára. Függetlenül, attól hogy a kulcsfontosságú aminosavak azonosítása még nem sikerült, Paddock. és mtsai. (2000) által vallott domináns protonvezetési út felülvizsgálatra szorul. Úgy gondoljuk, hogy az aminosavakon áthaladó protonvezetési út a

fémion által elektrosztatikus hatás következtében gátolt. Szerkezeti adatok alapján számos proton belépési kaput azonosítottak (Stowell és mtsai. 1997, Abresch és mtsai. 1998), amelyek a Q_B környezetében egyesülnek (Abresch és mtsai. 1998). Mivel az elektrosztatikus kölcsönhatás a protonvezetési utak találkozásánál lévő aminosavra hat, ezért a megfigyelt protontranszfer sebessége független attól, hogy hol történt a protonkötés.

6.7 Proton karrierok a reakciócentrumban

A fémionok gátló hatása gyenge savak (Na-azid) alkalmazásával némileg kompenzálható. Eredetileg, mint belső protonvezető molekulaként tekintették, amely kis méretéből adódóan könnyen behatol a fehérje belsejébe (Takahashi és Wraight, 1991; Maróti és mtsai. 1994). Később a GluH173→Gln mutáns esetében tapasztalt negatív eredmény miatt, az eredeti elképzelés megkérdőjeleződött. (Takahashi és Wraight, 1996) Közben a fehérje elektrosztatikájára gyakorolt hatását is felismerték (Paddock és mtsai. 1994). Mindkét hatás hozzájárulhat protontranszfer gyorsításához. Az azid elektrosztatikus hatására a protonálható aminosavak pK -i megváltozhatnak. Valószínűleg a fémion komplexképződése során elveszített negatív töltés elektrosztatikus hatását helyettesíti. A komplexképződést befolyásoló hatását kizárhatjuk, mivel a fémion disszociációs állandója az azid titrálása közben nem változott (5.18 ábra). Ebből persze az is következik, hogy nem az elektrosztatikus hatás a domináns, hanem a proton-karrier tulajdonság: a vízmolekulákhoz hasonlóan protonvezetési láncot alkot a fehérje belsejében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

1. A folytonos gerjesztés közben 550 nm-nél megfigyelt citokróm átfordulás ionerősség-függése eltért a korábbi flash kísérletekétől. A só titrálásával a fotooxidáció sebessége növekedést mutatott. A megfigyelést azzal magyaráztam, hogy alacsony ionerősségen (az oldószer ionikus árnyékolása kicsi) a különböző összetöltésű citokróm és RC fehérjék közötti elektrosztatikus vonzás kellően nagy ahhoz, hogy a komplex disszociációjának sebességét úgy lecsökkentse, hogy az a fotociklus sebesség-meghatározó lépése legyen (I).
2. Különböző kationok használatával, az ionerősség-függés lényegesen eltért. A kétértékű (Ca^{2+}) és különösen a háromértékű (Al^{3+}) ionok esetében, kisebb ionerősségnél tapasztaltam a citokróm oxidáció sebességének erőteljes esését, mint az egyértékű Na^+ ionnál. Mivel a Debye-Hückel elmélet alapján az ionerősség-függéseknek meg kellene egyeznie, azt gondolom, hogy az ionikus árnyékoló hatás mellett figyelembe kell venni, a kationok kötődését a RC felületén lévő negatív töltésekhez (I).
3. Átmeneti fémionok (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+}) alkalmazásával az ionerősség-függés alakja is megváltozott. Alacsony ionerősségnél a citokróm-oxidáció sebességének kismértékű csökkenését figyeltem meg, ami egy átmeneti tartományban megszűnt, majd 100 mM környékén meredeken tovább csökkent. A két csökkenés teljesen különböző hatásnak tulajdonítható: alacsony ionerősségnél a fémion specifikusan kötődik a RC-hoz, amelynek következtében, a proton-aktivált elektrontranszfer sebessége lényegesen lecsökken, és a RC átfordulását határoolja, nagy ionerősségnél a citokróm és RC közötti elektrosztatikus kölcsönhatás az oldószer ionjai által nagymértékben árnyékolt (I, IV).
4. A különböző ionerősség tartományokban megfigyelt fotooxidáció sebessége különböző viszkozitás és hőmérséklet-függést mutat: Alacsony ionerősségnél enyhe viszkozitás és

enyhe hőmérséklet-függést, míg nagy ionerősségnél 1-es meredekségű viszkozitás függést és erős hőmérsékletfüggést figyeltem meg. Az utóbbi a RC és citokróm bimolekuláris ütközési folyamatát jellemzi, míg az előbbi azt mutatja, hogy a komplex disszociációját kisebb mértékű orientációs mozgások előzik meg (I).

5. A citokróm koncentráció növelésével a fotooxidáció sebessége nagy ionerősség esetén telítődött, míg alacsony ionerősségnél jelentős függést mutatott. A telítés, azt mutatja, hogy a bimolekuláris folyamatot egy elsőrendű reakció (a korábban már leírt proximális-disztális átrendeződés) határolja. Kis citokróm koncentráció esetén a keletkező termék visszakötődik a RC-ra és gátolja annak átfordulását. A citokróm koncentráció növelésével a visszakötés egyre kevésbé jelentős, ezért a fotooxidáció sebessége növekszik (I).
6. Habár a RC izoelektromos pontja ($pI=6,1$), a citokróm-oxidáció sebességének pH függésében pH 6 körül nem tapasztaltam lényeges változást, míg pH 4 és pH 5 között erőteljes csökkenést figyeltem meg. A fehérjék közötti kölcsönhatást nem a fehérjék ösztötlése, hanem a citokróm kötőhely környezetében és a citokróm felszínén lévő protonálható Asp és Glu aminosavak szabályozzák (I).
7. Az átmeneti fémionok (különösen a Ni^{2+}) disszociációs állandója pH 5 és pH 8 között erős pH függést mutatott, amelyet Henderson-Hasselbalch összefüggés alapján illesztettem $pK=7,0$ (Ni^{2+}) és $pK=7,0$ és $pK=5,9$ (Cd^{2+}) értékekkel. Összhangban a röntgen-diffrakciós vizsgálatokkal a fémionok koordinálásában His és Asp aminosavak vesznek részt. A komplexképződés következményeként a ligandok deprotonálódnak, amelynek következtében felszabaduló protonokat érzékeny pH elektróddal megmértem. A proton felszabadulás sztöchiometriája pH 6,5 körül mutatott maximumot (III, IV).
8. Az első elektrontranszfer sebessége magas pH-n a GluL212 deprotonációja miatt erőteljesen lecsökken. Azt figyeltem meg, hogy fémion hatására a csökkenés 1,5-2,0 pH egységgel alacsonyabb pH felé tolódik. Habár kézenfekvőnek tűnik, hogy a fémion a

GluL212 pK -ját tolja el, mégis azt gondoljuk a töltés-rekombinációs vizsgálatok alapján, hogy a fémion a protonfelvételben szerepet játszó aminosavak által alkotott klaszterre gyakorol elektrosztatikus hatást (IV).

9. A proton-aktivált elektrontranszfer pH függését habár sok csoport szabályozza, mégis hasonló pH eltolódást (1,5 pH egység) figyeltem meg fémion hatására. Ennek alapján azt gondolom, hogy a hatás egy olyan csoportra (csoportokra, klaszterre) terjed ki, amelyek mindkét elektrontranszférnél szerepet játszik. Mivel a Q_B -hez irányuló protonvezetési utak az AspL213-nál csatlakoznak, a hatás valószínűleg érinti az aminosavat is. A Ni^{2+} jóval hatékonyabban gátolta az elektrontranszfert, mint a Cd^{2+} , amit a különböző kötőhelyekkel magyarázhatunk (II, IV).
10. Mind az első mind a második flash után mért fény indukált proton kötés sebességének pH függése teljesen megegyezett a megfelelő elektrontranszferével. Mivel mindkét elektrontranszfert a szemikinon keletkezését követő protontranszfer előzi meg és a protonfelvétel is a szemikinon-képződés után megy végbe, a szemikinon képződését követő protonátrendeződési lépések sebességének nagymértékű gátlása, mind az elektrontranszfer mind a protonfelvétel sebességét ugyanúgy lecsökkenti. Mivel citokrómátfordulás sebessége nem volt kisebb, mint a proton-aktivált elektrontranszfer sebessége, a második protontranszfernek így gyorsabbnak kell lennie és a fotociklust az előbbi limitálja (IV).
11. A fény indukált protonkötés sztöchiometriájának pH függésében megfigyelhető csúcsok fémion hatására kisebb pH felé tolódnak, ami különösen Q_B aktív RC-on látható jól. Mivel csúcsok jelentősen megváltoznak a Q_B környezetében lévő protonálható csoportok nem-protonálható csoporttal való helyettesítésével, a megfigyelés a fémion Q_B körüli protonálható aminosavakra gyakorolt hatását támasztja alá (IV).

12. A gyenge savak (Na-azid) hatására a fémion gátolt elektrontranszfer sebessége növekszik. Mivel NaCl kontrollnak nem volt hatása, az ionerősségtől független effektust tapasztaltam. A komplexképződést sem befolyásolta az azid jelenléte. Úgy gondolom, hogy mobilis proton karrier lévén a fehérje belsejében a gátolt protonvezetési utak mellett alternatív utakat hoz létre (IV).

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

I. Gerencsér, L., Laczkó, G. és Maróti, P. (1999) Unbinding of oxidized cytochrome c from photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* is the bottleneck of fast turnover. *Biochemistry*, 38:16866-16875.

II. Gerencsér, L., Jánosi, T., Laczkó, G. és Maróti, P. (2000) Kinetic limitations in turnover of photosynthetic bacterial reaction center protein. *Acta, Biol. Szeged.* 44:45-52.

III. Gerencsér, L. és Maróti, P. (2000) pH-dependent retardation of proton transfer to Q_B by transient metal ions in bacterial reaction center. *Eur. Biophys. J.* 29:4B-3. (konferencia kiadvány)

IV. Gerencsér, L. és Maróti, P. (2001) Retardation of proton transfer caused by binding of transition metal ion to bacterial reaction center is due to pK_a shifts of key residues. *Biochemistry*, 40:1850-1860.

Egyéb közlemények:

Maróti, P. és Gerencsér, L. (1997) Fehérjék szerkezetváltozásainak energetikai és spektroszkópiai jellemzői. *Lumineszcencia kutatások aktuális kérdései XX.* (szerk. Marek, N.) 188-206.

8. SUMMARY

The reaction center (RC) of photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* is a membrane-bound pigment-protein complex that converts light into chemical energy through a series of electron donor and acceptor molecules. The protein consists of three polypeptide subunits (L, M and H), and nine prosthetic groups: 4 bacteriochlorophyll, 2 bacteriopheophytins, 1 non-heme iron, and 2 ubiquinones (Q_A and Q_B). Its three dimensional atomic structure has been determined using X-ray diffraction, and the details of protein-chromophore interaction have been determined to 2.65 Å resolution (Ermler et al. 1994) that was further improved to 2.2 Å resolution (Stowell et al. 1997). The L and M subunits each have 5 transmembrane helices. The H subunits caps the RC on the cytoplasmic side of the membrane and is more hydrophilic than L and M. The cofactors are all non-covalently bound to the L and M subunits. The primary electron donor (P) is a dimer of bacteriochlorophyll and is located towards the periplasmic side of the membrane. The two quinones of the acceptor complex on the cytoplasmic side of the membrane are chemically identical but functionally very different due to their highly different protein environment. The primary quinone (Q_A) functions only as one-electron carrier under physiological conditions. The secondary quinone (Q_B) is reversibly bound in a more polar region of the L subunit and function as a two-electron acceptor. The Fe atom is hexacoordinated by five aminoacids, is symmetrically positioned between the quinones. The charge separation is initiated by flash excitation of the bacteriochlorophyll dimer, followed by sequential electron transfer reaction to monomer bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, primary and secondary quinone. If the external electron donor (cytochrome) is available on the donor side, then it can re-reduce the oxidized dimer, and similarly electron transfer can be initiated by additional flash excitation. The electron transfer reactions on the acceptor side are coupled to changes in conformational and in protonational

states of the RC. The first electron transfer can occur only after conformational gating, and the second electron transfer is coupled to direct protonation of Q_B . After the uptake of the second proton the quinol (Q_BH_2) dissociates from the RC and is replaced by an oxidized quinone from the pool. During the quinone reduction cycle two electrons and protons transferred to Q_B . Wide range of structural, mutational and computational studies have identified possible proton pathways controlled by several key residues in the vicinity of Q_B . The protonation pathways connect the cytoplasmic surface of the RC to these key residues. They consist of a connected network of proton donor and acceptor groups of suitable pK_a -s linked by hydrogen bonds. Three pathways with different lengths and entry points for the protons were identified. A new method, reversible binding of metal ions to RC was introduced (Utschig et al. 1998; Paddock et al. 1999) that was proved very successful in identification of the dominant proton delivery pathway to Q_B . Upon binding of metal ion (Zn^{2+} and Cd^{2+}) to the surface of the RC, dramatic decrease of proton and electron transfer rate was observed, and was attributed to severe blockage of the main proton transfer route (Paddock et al. 1999, 2000). On the basis of X-ray diffraction data, the locations of the binding sites were identified as a cluster of the histidines (HisH126, HisH128) and one aspartic acid (AspH124) (Axelrod et al. 2000).

All available reports on inhibition of proton transfer by binding transition metal ions have been referred to a single pH. We extended the study of the inhibitory effect to a wide pH range and investigated the complexation of metal ions with RC.

(i) *complexation of metal ion and RC*: The second electron transfer rate was used to measure the dissociation constant of transition metal ion binding to the RC. The kinetic can be decomposed into two components. The slow and fast component was attributed to RCs that bind and do not bind metal ion, respectively. Following this method at different pH values, we obtained the pH dependence of the dissociation constant. In case of Ni^{2+} ion the binding affinity was decreased by two orders, if the pH is dropped from 8 to 5. We observed at this pH

range large proton release due to complexation of Ni^{2+} and RC. The molecular basis for linkage between ligand affinity and pH stems from alteration of pK values of protonatable residues concomitant with binding. The coordination bonds between His and Asp side chains and Ni^{2+} become less stable and finally split upon decrease of pH where the residues become protonated.

(ii) *Kinetic correlation between electron and proton transfer*: Upon binding of transition metal ions, both electron transfer and flash-induced proton uptake became slow and kinetically correlated. The flash-induced uptake and redistribution of protons stabilize the semiquinone and these processes are kinetically severely hindered by binding of transition metal ions. As the first electron transfer follows the protonation of aminoacids nearby Q_B , proton rearrangement slows down and becomes rate limiting in transfer of the first electron. Similar kinetic coupling was observed between the transfer of the first proton and second electron. As observed earlier (Paddock et al. 1999), the transfer of the first proton became rate limiting in the presence of transition metal ions. The similar behavior of the different electron and proton transfer kinetics upon binding of transition metal ions calls for common mechanism, that we can signify as electrostatic perturbation of uptake and/or rearrangement of protons after light excitation.

(iii) *pK changes of key protonatable groups due to bound metal ion*: The pH profile of first and second electron transfer and proton uptake were similar: At low and high pH only small, but at neutral pH large drop was observed in the rate of reaction due to the metal ion bonding. The pH dependent part of curves of reaction of treated RC can be derived that of the untreated RC by a 1.5-2.0 pH unit shift toward the acidic pH range. Similarly, the pH profile of stoichiometry of proton uptake of treated RC overlap that of the untreated RC upon a pH shift of about 1.5 units. The electrostatic interaction with cationic metal ion induces pK -shifts of nearby amino acids that control the proton transfer to Q_B . Assuming elementary charges on

the metal ion and the ionized residue at a distance of 10 Å and a dielectric constant of 15, the interaction energy is estimated to be 100 meV. This interaction energy lowers the pK of the protonatable residue by 1.6 units. The pH-dependence of proton uptake and electron transfer rates indicates the contribution of several groups in key position. They are arranged in clusters with possibly complex titration behavior that makes difficult to attribute the observed pK values to any one amino acid. The residues interacting with the bound metal ion should locate between the metal binding site and Q_B . We believe that the bound metal ion lowers the pK values of these residues and results in acidic pH-shifts in electron and proton transfer properties compared to those of the native RC.

(iv) *The complex behaviour of cytochrome turnover in presence of different cations:* In contrast of earlier flash-studies the cytochrome turnover rate increased with increasing bulk ionic strength in the range of 0-40 mM NaCl and then decreased at high ionic strength under excess cytochrome and ubiquinone. In accordance of earlier experiments, the cytochrome photo-oxidation at high ionic strength reflects a second-order process, and a large drop is due to the ionic screening of electrostatic interaction of RC and cytochrome protein. This interaction energy can be significant therefore the rate of dissociation of the complex is highly reduced at low ionic strength. Thus, the dissociation became the rate-limiting step in the cytochrome turnover. Similar behaviour was obtained by variety of mono-, di-, and trivalent cations. If the ions had the only effect of ionic screening according to the Debye-Hückel theory, then the curves for different cations would coincide in the ionic strength representation. But we observed obvious deviation from a general tendency, which is the indication of presence of the other effect. The Ca^{2+} is a bit more effective than the monovalent Na^+ ion, but the Al^{3+} cation is much more effective: The descending phase of the ionic strength dependence of ions shift toward a lower ionic strength. We think that the salt effect is not via ionic strength only but through changes in the mobile charge at the protein surface.

But they show however, similar shape with increasing and decreasing phase. Transition metal ions (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+}) have a completely different effect in the range of very low ionic strength as it directly bounds to the RC.

(v) *Product inhibition of turnover of cytochrome*: Although cytochrome turnover monitors the dissociation of complex at low ionic strength, we obtained large change in the rate, if we increase the concentration of cytochrome. As the effect was disappeared at larger cytochrome pool size, we believe that the oxidized cytochrome (product) can rebind and inhibit the creation a new product. At larger pool size we can neglect this effect.

(vi) *Differentiation of the limiting process based on viscosity and temperature*: Strong viscosity (slopes 1) and temperature ($E_a=5.7$ kcal/mol) dependence of the cytochrome photo-oxidation was observed at high ionic strength (100 mM). The photo-oxidation rate was inversely proportional to the viscosity of the solution, which is good agreement with diffusion limited and bimolecular reaction. The observed activation energy of 5.7 kcal/mol can be expected for diffusion-controlled reaction of binding.

Mild viscosity (slopes 0.2) and temperature ($E_a=1.5$ kcal/mol) dependence was observed at low ionic strength (4 mM). The results were interpreted that the dissociation may involve orientational movement of cytochrome.

9. IRODALOM

Aagaard, A. és Brzezinski, P. (2001) Zinc ions inhibit oxidation of cytochrome c oxidase by oxygen. *FEBS Letters*, 24733:1-4.

Abresch, E. C., Paddock, M. L., Stowell, M. H. B., McPhillips, T. M., Axelrod, H. L., Soltis, S. M., Rees, D. C., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1998) Identification of proton transfer pathways in the X-ray crystal structure of the bacterial reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth. Res.* 55:119-125.

Ädelroth, P., Paddock, M. L., Sagle, L. B., Feher, G. és Okamura, M. Y. (2000) Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Both protons associated with reduction of Q_B to Q_BH_2 share a common entry point. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:13086-13091.

Adir, N., Axelrod, H. L., Beroza, P., Isaacson, R. A., Rongey, S. H., Okumara, M. Y. és Feher, G. (1996) Co-crystallization and characterization of the photosynthetic reaction center-cytochrome c_2 complex from *Rhodobacter sphaeroides* *Biochemistry*, 35: 2535-2547.

Ahlbrink, A., Semin, B. K., Mulkidjanian, A. Y. és Junge, W. (2001) Photosystem II of peas: effects of added divalent cations of Mn, Fe, Mg, and Ca on two kinetic components of P_{680}^+ reduction in Mn-depleted core particles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1506:117-126.

Albert, I., Leibl, W., Ewald, G., Michel, H. és Rutherford, A. W. (1994) Structural and functional consequences of Glu L212→Lys mutation in the Q_B binding site of the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochemistry*, 33:11355-11363.

Alexov, E. G. és Gunner, M. R. (1997) Incorporating protein conformational flexibility into the calculation of pH-dependent protein properties. *Biophys. J.*, 74:2075-2093.

Alexov, E. G. és Gunner, M. R. (1999) Calculated protein and proton motions coupled to electron transfer: Electron transfer from Q_A^- to Q_B in bacterial photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, 38:8253-8270.

Alexov, E., Miksovska, J., Baciou, L., Schiffer, M., Hanson, D. K., Sebban, P. és Gunner, M. R. (2000) Modeling the effects of mutations on the free energy of the first electron transfer from Q_A^- to Q_B in photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, 39:5940-5952.

Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiyama, H. és Rees, D. C. (1987) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6162-6166.

Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiyama, H. és Rees, D.C. (1988) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: Protein-cofactor (quinones and Fe^{2+}) interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8487-8491.

Allen, J. P., Williams, J. C., Graige, M. S., Paddock, M. L., Labahn, A., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1998) Free energy dependence of the direct charge recombination from the primary and secondary quinones in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth. Res.* 55:227-233.

Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H. és Zinth, W. (1993) The accessory bacteriochlorophyll: A real electron carrier in primary photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11757-11761.

Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Isaacson, R., Tetreault, M., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1998) Co-crystals of the RC cyt c_2 complex from *Rhodobacter sphaeroides*. With an improved cyt c_2 RC ratio. *Biophys. J.* 74:A146-A146 Part 2.

Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Okamura, M. Y., Feher, G., Yeh, A. P. és Rees, D. C. (1999) X-ray structure determination of the RC-cyt c_2 complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 76:A20-A20 Part 2.

- Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Paddock, M. L., Okamura, M. Y. és Feher, G. (2000a) Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd^{2+} and Zn^{2+} in bacterial reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1542-1547.
- Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Paddock, M. L., Okamura, M. Y. és Feher, G. (2000b) X-ray crystal structure determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} . *Biophys. J.* 78, A337.
- Baciou, L. és Michel, H. (1995) Interruption of the water chain in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* reduces the rates of the proton uptake and of the second electron transfer to Q_B . *Biochemistry*, 34:7967-7972.
- Bartsch, R. G. (1971) *Cytochromes: Bacterial Methods in Enzymology* (Szerk. A. San Pietro) Academic Press, New York. 23A:344-363.
- Battistuzzi, G., Borsari, M., Dallari, D., Lancellotti, I. és Sola, M. (1996) Anion binding to mitochondrial cytochromes c studied through electrochemistry: Effects of the neutralization of surface charges on the redox potential. *Eur. J. Biochem.* 241:208-214.
- Battistuzzi, G., Borsari, M. és Sola, M. (1997a) Anion binding to cytochrome c_2 : Implications on protein-ion interactions in class I cytochromes c. *Arch. Biochem. Biophys.* 339:283-290.
- Battistuzzi, G., Borsari, M. Sola, M. és Francia, F. (1997b) Redox thermodynamics of the native and alkaline forms of eukaryotic and bacterial class I cytochromes c. *Biochemistry*, 36:16247-16258.
- Beatty, J. T., Paddock, M. L., Feher, G. és Okamura, M. Y. (2000) Simultaneous replacement of His-H126 and His-H118 with Ala drastically reduces the binding of Cd^{2+} & Ni^{2+} to bacterial RCs of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 78: 2002Pos Part 2.
- Benning, M. M., Wesenberg, G., Caffrey, M. S., Bartsch, R. G., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Rayment, I. és Holden, H. M. (1991) Molecular structure of cytochrome c_2 isolated from *Rhodobacter capsulatus* determined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 220:673-685.
- Beroza, P., Fredkin, D. R., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1995) Electrostatic calculation of amino acid titration and electron transfer, $\text{Q}_A\text{Q}_B \rightarrow \text{Q}_A\text{Q}_B^-$, in the reaction center. *Biophys. J.*, 68:2233-2250.
- Bowyer, J. R., Tierney, G. V. és Crofts, A. R. (1979) Cytochrome c_2 -reaction centre coupling in chromatophores of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Rhodospseudomonas capsulata*. *FEBS Letters*, 101:207-212.
- Brennan, L., Turner, D. L., Fareleira, P. és Santos, H. (2001) Solution structure of *Methylophilus methylotrophus* cytochrome c⁺: Insights into the structural basis of haem-ligand detachment. *J. Mol. Biol.* 308: 353-365.
- Breton, J. és Navedryk, E. (1998) Proton uptake upon quinone reduction in bacterial reaction centers: IR signature and possible participation of a highly polarizable hydrogen bond network. *Photosynth. Res.* 55:301-307.
- Brzezinski, P., Paddock, M. L., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1997) Light-induced electrogenic events associated with proton uptake upon forming Q_B^- in bacterial wild-type and mutant reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1321:149-156.
- Caffrey M. S., Daldal, F., Holden, H. M. és Cusanovich, M. A. (1991a) Importance of a conserved hydrogen-bonding network in cytochromes c to their redox potentials and stabilities. *Biochemistry*, 30:4119-4125.
- Caffrey, M. S. és Cusanovich, M. A. (1991b) The effects of surface charges on the redox potential of cytochrome c_2 from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 285:227-230.
- Caffrey, M. S., Bartsch, R. G. és Cusanovich, M. A. (1992) Study of cytochrome c_2 -reaction center interaction by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 267:6317-6321.

Chang, C. H., El-Kabbani, O., Tiede, D. M., Norris, J. és Schiffer, M. (1991) Structure of the membrane-bound protein photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 30:5352-5360.

Chen, K. S., Hirst, J., Camba, R., Bonagura, C. A., Stout, C. D., Burgess, B. K. és Armstrong, F. A. (2000) Atomically defined mechanism for proton transfer to a buried redox centre in a protein. *Nature*, 405 (6788): 814-817.

Cherepanov, D. A., Bibikov, S. I., Bibikova, M. V., Bloch, D. A., Drachev, L. A., Gupta, O. A., Österhelt, D., Semenov, A.Y. és Mulikidjanian, A. Y. (2000) Reduction and protonation of the secondary quinone acceptor of *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center: kinetic model based on a comparison of wild-type chromatophores with mutants carrying Arg→Ile substitution at sites 207 and 217 in the L-subunit. *Biochim. Biophys. Acta*, 1459: 10-34.

Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I. és Mulikidjanian, A. Y. (2001) Photosynthetic electron transfer controlled by protein relaxation: Analysis by Langevin stochastic approach. *Biophys. J.* 80:1033-1049.

Crofts, A. R. és Wraight, C. A. (1983) The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 726:149-185.

Daldal, F., Mandaci, S., Winterstein, C., Myllykallio, H., Duyck, K. és Zannoni, D. (2001) Mobile cytochrome c_2 and membrane-anchored cytochrome c_7 are both efficient electron donors to the cbb_3 - and aa_3 -type cytochrome c oxidases during respiratory growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 183:2013-2024.

Debus, R. J. Feher, G. és Okamura, M. Y. (1985) LM complex of the reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides* R-26: Characterization and reconstitution with the H subunit. *Biochemistry*, 24:2488-2500.

Debus, R. J., Feher, G. és Okamura, M.Y. (1986) Fe-depleted reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides* R-26. 1. Characterization and reconstitution with Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+} . *Biochemistry*, 25:2276-2287.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. és Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 318:618-624.

Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I. és Michel, H. (1995) Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centers from *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.*, 246:429-457.

Devreese, B., Brige, A., Backers, K., Van Driessche, G., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. és Van Beeumen, J. J. (2000) Primary structure characterization of a *Rhodocycclus tenuis* diheme cytochrome c reveals the existence of two different classes of low-potential diheme cytochromes c in purple phototropic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 381:53-60.

Di Donato, M., Borrelli, R., Capobianco, A., Monaco, G., Improta, R., Bralimi, M. és Peluso, A. (2000) Proton assisted electron transfer. *Adv. Quantum. Chem.* 36:301-322.

Dohse, B., Mathis, P., Wachtveitl, J., Laussermair, E., Iwata, S., Michel, H. és Österhelt, D. (1995) Electron transfer from the tetraheme cytochrome to the special pair in the *Rhodospseudomonas viridis* reaction center: Effect of mutations of tyrosine L162. *Biochemistry*, 34:11335-11343.

Drepper, F., Dorlet, P. és Mathis, P. (1997) Cross-linked electron transfer complex between cytochrome c_2 and the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 36:1418-1427.

Drepper, F. és Mathis, P. (1997) Structure and function of cytochrome c_2 in electron transfer complexes with the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*: Optical linear dichroism and EPR. *Biochemistry*, 36:1428-1440.

Eldred, C., Rodriguez, D., Schick, B., Axelrod, H. és Kantardjieff, K. (1997) Crystallographic studies on cytochrome c' from *Rhodobacter sphaeroides*. *Abstr. Pap. Am. Chem. S 214*: 160-CHED Part 1.

- Ermiler, U., Fritzsich, G., Buchanan, S. K. és Michel, H. (1994) Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactor interactions. *Structure*, 2:925-936.
- Farchaus, J. W., Wachtveitl, J., Mathis, P. és Österhelt, D. (1993) Tyrosine 162 of the photosynthetic reaction center L-subunit plays a critical role in the cytochrome c_2 mediated rereduction of the photooxidized bacteriochlorophyll dimer in *Rhodobacter sphaeroides*. 1. Site-directed mutagenesis and initial characterization. *Biochemistry*, 32:10885-10893.
- Feher, G., Allen, J. P., Okamura, M. Y. és Rees, D. C. (1989) Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centers. *Nature* 339: 111-116.
- Feher, G. (1992) Primary events in photosynthesis: Problems, Speculations, Controversies, and future trends. (szerk. Bixon, M.) *Isr. J. Chem.* 32:369-440.
- Fritzsich, G., Kampmann, L., Kapaun, G. és Michel, H. (1998) Water clusters in the reaction centre of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth. Res.* 55:127-132.
- Gopta, O. A., Bloch, D. A., Cherepanov, D. A. és Mulikidjanian, A. Y. (1997) Temperature dependence of the electrogenic reaction in the Q_B site of the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center: the $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ transition. *FEBS Letters*, 412:490-494.
- Gopta, O. A., Cherepanov, D. A., Mulikidjanian, A. Y., Semenov, A. Y. és Bloch, D. A. (1998) Effect of temperature and surface potential on the electrogenic proton uptake in the Q_B site of the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center: $Q_A^- Q_B^- \rightarrow Q_A Q_B H_2$ transition. *Photosynth. Res.*, 55:309-316.
- Gopta, O. A., Cherepanov, D. A., Junge, W. és Mulikidjanian, A. Y. (1999) Proton transfer from the bulk to the bound ubiquinone Q_B of the reaction center in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides*: Retarded conveyance by neutral water. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:13159-13164.
- Gopta, O. A., Semenov, A. Y. és Bloch, D. A. (2001) Electrogenic proton transfer in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers: effect of coenzyme Q_{10} substitution by decylubiquinone in the Q_B binding site. *FEBS Letters*, 499 (1-2): 116-120.
- Graige, M. S., Paddock, M. L., Bruce, J. M., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1996) Mechanism of proton-coupled electron transfer for quinone (Q_B) reduction in reaction centers of *Rb. sphaeroides*. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:9005-9016.
- Graige, M. S., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1998) Conformational gating of the electron transfer reaction $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ in bacterial reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* determined by driving force assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:11679-11684.
- Graige, M. S., Paddock, M. L., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1999) Observation of the protonated semiquinone intermediate in isolated reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: Implications for the mechanism of electron and proton transfer in proteins. *Biochemistry*, 38:11465-11473.
- Gunner, M. (1991) The reaction center protein from purple bacteria: Structure and function. *Curr. Top. Bioenerg.* 16:319-367.
- Hall, J. Zha, X., Durnham, B., O'Brien, P., Vieira, B., Davis, D., Okamura, M. Y. és Millett, F. (1987a) Reaction of cytochromes c and c_2 with the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center involves the heme crevice domain. *Biochemistry*, 26:4494-4500.
- Hall, J. Zha, X., Yu, L., Yu, C. A. és Millett, F. (1987b) The binding domain on horse cytochrome c and *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c_2 for the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry*, 26:4501-4505.

- Hall, J., Ayres, M., Zha, X., O'Brien, P., Durham, B., Knaff, D. és Millett, F. (1987c) The reaction of cytochromes c and c₂ with the *Rhodospirillum rubrum* reaction center involves the heme crevice domain. *J. Biol. Chem.*, 23:11046-11051.
- Hall, J., Kriaucionas, A., Knaff, D. és Millett, F. (1987d) The reaction domain on *Rhodospirillum rubrum* cytochrome c₂ and horse heart cytochrome c for the *Rhodospirillum rubrum* cytochrome bc₁ complex. *J. Biol. Chem.*, 29:14005-14009.
- Hall, J., Zha, X., Yu, L., Yu, C. A. és Millett, F. (1989) Role of specific lysine residues in the reaction of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c₂ with the cytochrome bc₁ complex. *Biochemistry*, 28:2568-2571.
- Hienerwadel, R., Grzybek, S., Fogel, C., Kreutz, W., Okamura, M. Y., Paddock, M. L., Breton, J., Nabedryk, E. és Mántele, W. (1995) Protonation of GluL212 following Q_B⁻ formation in the photosynthetic reaction of *Rhodobacter sphaeroides*: Evidence from time-resolved infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 34:2832-2843.
- Isaacson, R. A., Lendzian, F., Abresch, E. C., Lubitz, W. és Feher, G. (1995) Electronic structure of Q_A⁻ in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. I. Electron paramagnetic resonance in single crystals. *Biophys. J.* 69:311-312.
- Jenney, Jr, F. E. és Daldal, F. (1993) A novel membrane-associated c-type cytochrome cyt c_y, can mediate the photosynthetic growth of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J.*, 12:1283-1292.
- Jenney, Jr, F. E., Prince R. C. és Daldal, F. (1996) The membrane-bound cytochrome c_y of *Rhodobacter capsulatus* can serve as an electron donor to the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta* 1273:159-164.
- Kálmán, L. és Maróti P. (1994) Stabilization of reduced primary quinone by proton uptake in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 33:9237-9244.
- Kálmán, L. és Maróti, P. (1997) Conformation-activated protonation in reaction centers of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 36:15269-15276.
- Kálmán, L., Sebban, P., Hanson, D. K., Schiffer, M. és Maróti, P. (1998) Flash-induced changes in buffering capacity of reaction centers from photosynthetic bacteria reveal complex interaction between quinone pockets. *Biochim. Biophys. Acta*, 1365:513-521.
- Kannt, A., Ostermann, T., Muller, H. és Ruitenber, M. (2001) Zn²⁺ binding to the cytoplasmic side of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase selectively uncouples electron transfer and proton translocation. *FEBS Letters*, 503:142-146.
- Keller, S., Beatty, J. T., Paddock, M. L., Breton, J. és Leibl, W. (2001) Effect of metal binding on electrogenic proton transfer associated with reduction of the secondary electron acceptor (Q_B) in *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores. *Biochemistry*, 40:429-439.
- Klarskov, K., Van Driessche, G., Backers, K., Dumortier, C., Meyer, T. E., Tollin, G., Cusanovich, M. A. és Van Beeumen, J. J. (1998) Ligand binding and covalent structure of an oxygen-binding heme protein from *Rhodobacter sphaeroides*, a representative of a new structural family of c-type cytochromes. *Biochemistry*, 37:5995-6002.
- Klarskov, K., Leys, D., Backers, K., Costa, H. S., Santos, H., Guisez, Y. és Van Beeumen, J. J. (1999) Cytochrome c " from the obligate methylotroph *Methylophilus methylotrophus*, an unexpected homolog of sphaeroides heme protein from the phototroph *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1412:47-55.
- Kleinfeld, D., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1984a) Electron transfer in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Determination of the charge recombination pathway of D⁺Q_AQ_B⁻ and free energy and kinetic relations between Q_A⁻Q_B and Q_AQ_B⁻. *Biochim. Biophys. Acta*, 766:126-140.

- Kleinfeld, D., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1984b) Damping of oscillations in the semiquinone absorption in reaction centers after successive flashes. Determination of the equilibrium between $Q_A^-Q_B$ and $Q_AQ_B^-$. *Biochim. Biophys. Acta*, 756:406-409.
- Kleinfeld, D., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1984c) Electron-transfer kinetics in photosynthetic reaction centers cooled to cryogenic temperatures in the charge-separated state: Evidence for light-induced structural changes. *Biochemistry*, 23:5780-5786.
- Kleinfeld, D., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1985) Electron transfer in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. II Free energy and kinetic relations between the acceptor states $Q_A^-Q_B^-$ and $Q_AQ_B^{2-}$. *Biochim. Biophys. Acta*, 890:291-310.
- Knaff, D. B., Willie, A., Long, J. E., Kriauciunas, A., Durnham, B. és Millett, F. (1991) Reaction of cytochrome c_2 with photosynthetic reaction centers from *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochemistry*, 30:1303-1310.
- Kolbasov, D. és Scherz, A. (2000) Asymmetric electron transfer in reaction centers of purple bacteria strongly depends on different electron matrix elements in the active and inactive branches. *J. Phys. Chem. B* 104:1802-1809.
- Kuglstatter, A., Ermler, U., Michel, H., Baciou, L. és Fritzsche, G. (2001) X-ray structure analyses of photosynthetic reaction center variants from *Rhodobacter sphaeroides*: Structural changes induced by point mutations at position L209 modulate electron and proton transfer. *Biochemistry*, 40:4253-4260.
- Labahn, A., Paddock, M. L., McPherson, Okamura M. Y. és Feher, G. (1994) Direct charge recombination from $D^+Q_AQ_B$ to DQ_AQ_B in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem.* 98:3417-3423.
- Lancaster, C. R. D., Michel, H., Honig, B. és Gunner, M. R. (1996) Calculated coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*. *Biophys. J.* 70:2469-2492.
- Lancaster, C. R. D. és Michel, H. (1997) The coupling of light-induced electron transfer and proton uptake as derived from crystal structures of reaction centres from *Rhodospseudomonas viridis* modified at the binding site of the secondary quinone, Q_B . *Structure*, 5:1339-1359.
- Larson, J. W., Wells, T. A. és Wraight, C. A. (1998) Product inhibition of the bacterial photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* by steady-state continuous cytochrome oxidation. *Biophys. J.* 74(2) A76.
- Larson, J. W. és Wraight, C. A. (2000a) Multiple binding configurations of C-type cytochromes to the bacterial photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 78:1999Pos Part 2.
- Larson, J. W. és Wraight, C. A. (2000b) Preferential binding of equine ferricytochrome c to the bacterial photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 39:14822-14830.
- Li, J., Gilroy, D., Tiede, D. M. és Gunner, M. R. (1998) Kinetic phases in the electron transfer from $P^+Q_A^-Q_B$ to $P^+Q_AQ_B^-$ and the associated processes in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers. *Biochemistry*, 37:2818-2829.
- Li, J., Takahashi, E. és Gunner, M. R. (2000) $-\Delta G_{AB}^{\circ}$ and pH dependence of the electron transfer from $P^+Q_A^-Q_B$ to $P^+Q_AQ_B^-$ in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochemistry*, 39:7445-7454.
- Lin, X., Williams, J. C., Allen, J. P. és Mathis P. (1994) Relationship between rate and free energy difference for electron transfer from cytochrome c_2 to the reaction center *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 33:13517-13523.
- Long, J. E., Durnham, B., Okamura, M. Y. és Millett, F. (1989) Role of specific lysine residues in binding cytochrome c_2 to the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center in optimal orientation for rapid electron transfer. *Biochemistry*, 28:6970-6974.
- Marcus, R. A. (1968) Theoretical relations among rate constants, barriers, and Brønsted slopes of chemical reactions. *J. Phys. Chem.* 72:891-899.

- Marcus, R. A. és Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta*, 811:265-322.
- Margoliash, E. és Bosshard, H. R. (1983) Guided by electrostatics, a textbook protein comes of age, *TIBS* 8:316-320.
- Maróti, P., Kirmaier, C., Wraight, C. A., Holten, D. és Pearlstein, R. M. (1985) Photochemistry and electron transfer in borohydride-treated photosynthetic reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta*, 810:132-139.
- Maróti, P. és Wraight, C. A. (1988a) Flash-induced H^+ binding by bacterial photosynthetic reaction centers: comparison of spectrophotometric and conductometric methods. *Biochim. Biophys. Acta*, 934:314-328.
- Maróti, P. és Wraight, C. A. (1988b) Flash-induced H^+ binding by bacterial reaction centers: Influences of the redox states of the acceptor quinones and primary donor. *Biochim. Biophys. Acta*, 934:329-347.
- Maróti, P. (1991) Electron transfer and proton uptake of photosynthetic bacterial reaction centres reconstituted in phospholipid vesicles. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 8:263-277.
- Maróti, P., Hanson, D. K., Baciou, L., Schiffer, M. és Sebban, P. (1994) Proton conduction within the reaction centers of *Rhodobacter capsulatus*: The electrostatic role of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5617-5621.
- Maróti, P., Hanson, D. K., Schiffer, M. és Sebban, P. (1995) Long-range electrostatic interaction in the bacterial photosynthetic reaction center. *Nature Struct. Biol.* 2:1057-1059.
- Maróti, P. és Wraight, C. A. (1997) Kinetics of H^+ ion binding by the $P^+Q_A^-$ state of bacterial photosynthetic reaction centers: Rate limitation within the protein. *Biophys. J.*, 73:367-381.
- Mathis, P. (1994) Electron transfer between cytochrome c_2 and isolated reaction center of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1187:177-180.
- Mathis, P., Ortega, J. M. és Venturoli, G. (1994) Interaction between cytochrome c and photosynthetic reaction center of purple bacteria: Behaviour at low temperature. *Biochimie*, 76:569-579.
- McAuley, K. E., Fyfe, P. K., Ridge, J. P., Cogdell, R. J., Isaacs, N. W. és Jones, M. R. (2000) Ubiquinone binding, ubiquinone exclusion, and detailed cofactor conformation in a mutant bacterial reaction center. *Biochemistry*, 39:15032-15043.
- McComb, J. C., Stein, R. R. és Wraight, C. A. (1990) Investigation on the influence of headgroup substitution and isoprene side-chain length in the function of primary and secondary quinones of bacterial reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1015:156:171.
- McMahon, B. H., Müller, J. D., Wraight, C. A. és Nienhaus, G. U. (1998) Electron transfer and protein dynamics in the photosynthetic reaction center. *Biophys. J.*, 74:2567-2587.
- McPherson, P. H., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1988) Light-induced proton uptake by photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. I. Protonation of the one electron states $D^+Q_A^-$, DQ_A^- , $D^+Q_AQ_B^-$ and $DQ_AQ_B^-$. *Biochim. Biophys. Acta*, 934:348-368.
- McPherson, P. H., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1990) Electron transfer from the reaction center of *Rb. sphaeroides* to the quinone pool: doubly reduced Q_B leaves the reaction center. *Biochim. Biophys. Acta*, 1016:289-292.
- McPherson, P. H., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1993) Light-induced proton uptake by photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. II. Protonation of the state $DQ_AQ_B^{2-}$. *Biochim. Biophys. Acta*, 1144:309-324.

- McPherson, P. H., Schönfeld, M., Paddock, M. L., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1994) Protonation and free energy changes associated with formation of Q_BH_2 in native and Glu212→Gln mutant reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 33:1181-1193.
- Meyer, T. E., Watkins, J. A., Przysiecki, C. T., Tollin, G. és Cusanovich, M. A. (1984) Electron-transfer reactions of photoreduced flavin analogues with c-type cytochromes: Quantitation of steric and electrostatic factors. *Biochemistry*, 23:4761-4767.
- Meyer, T. E. és Cusanovich, M. A. (1985) Soluble cytochrome composition of the purple phototropic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* ATCC 17023. *Biochim. Biophys. Acta*, 807:308-319.
- 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.
- Miksovská, J., Kálmán, L., Schiffer, M., Maróti, P., Sebban, P. és Hanson, D. K. (1997) In bacterial reaction centers rapid delivery of the second proton to Q_B can be achieved in the absence of L212Glu. *Biochemistry*, 36:12216-12226.
- Miksovská, J., Valerio-Lepiniec, M., Schiffer, M., Hanson, D. K. és Sebban, P. (1998) In bacterial reaction centers, a key residue suppresses mutational blockage of two different proton transfer steps. *Biochemistry*, 37:2077-2083.
- Miksovská, J., Schiffer, M., Hanson, D. K. és Sebban, P. (1999) Proton uptake by bacterial reaction centers: The protein complex responds in a similar manner to the reduction of either quinone acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:14348-14353.
- Moser, C. C. és Dutton, L. (1988) Cytochrome c and c_2 binding dynamics and electron transfer with photosynthetic reaction center protein and other integral membrane redox proteins. *Biochemistry*, 27:2450-2461.
- Mulkidjanian, A. Y. (1999) Conformationally controlled pK-switching in membrane proteins: One more mechanism specific to the enzyme catalysis? *FEBS Letters*, 463:199-204.
- Myllykallio, H., Zannoni, D. és Daldal, F. (1999) The membrane-attached electron carrier cytochrome c_y from *Rhodobacter sphaeroides* is functional in respiratory but not in photosynthetic electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:4348-4353.
- Nabedryk, E., Breton, J., Hienerwadel, R., Fogel, C., Mantele, W., Paddock, M. L. és Okamura, M. Y. (1995) Fourier transform infrared difference spectroscopy of secondary quinone acceptor photoreduction in proton transfer mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 34:14722-14732.
- Nabedryk, E., Breton, J., Okamura, M. Y. és Paddock, M. L. (1998a) Direct evidence of structural changes in reaction centers of *Rb. sphaeroides* containing suppressor mutations for AspL213→Asn: A FTIR study of Q_B photoreduction. *Photosynth. Res.* 55: 293-299.
- Nabedryk, E., Breton, J., Okamura, M. Y. és Paddock, M. L. (1998b) Proton uptake by carboxylic acid groups upon photoreduction of the secondary quinone (Q_B) in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: FTIR studies on the effects of replacing GluH173. *Biochemistry*, 37:14457-14462.
- Nabedryk, E., Breton, J., Joshi, H. M. és Hanson, D. K. (2000) Fourier transform infrared evidence of proton uptake by glutamate L212 upon reduction of the secondary quinone Q_B in the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*, 39:14654-14663.
- Nagarajan, V., Parson, W. W., Davis, D. és Schenck, C. C. (1993) Kinetics and free energy gaps of electron-transfer reactions in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Biochemistry*, 32:12324-12336.
- Nitschke, W. és Rutherford, A. W. (1994) The tetrahaem cytochromes associated with photosynthetic reaction centres: a model system for intraprotein redox centre interactions. *Biochem. Soc. Trans.*, 22:694-699.

Oh-oka H., Kamei, S. és Matsubara, H. (1995) Two molecules of cytochrome c function as the electron donors to P840 in the reaction center complex isolated from a green bacterium, *Chlorobium tepidum*. FEBS Letters, 365:30-34.

Okamura M. Y., Isaacson, R. A. és Feher, G. (1975) Primary acceptor in bacterial photosynthesis: Obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3491-3495.

Okamura, M. Y., Isaacson, R. A. és Feher, G. (1979) Spectroscopic and kinetic properties of the transient intermediate acceptor in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta, 546:394-417.

Okamura, M. Y. és Feher, G. (1992) Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria. Annu. Rev. Biochem. 61:861-896.

Okamura, M. Y., Paddock, M. L., Graige, M. S. és Feher, G. (2000) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. Biochim. Biophys. Acta, 1458:148-163.

Ortega, J. M. és Mathis, P. (1992) Effect of temperature on the kinetics of electron transfer from the tetraheme cytochrome to the primary donor in *Rhodospseudomonas viridis*. FEBS Letters, 301:45-48.

Ortega, J. M. és Mathis, P. (1993) Electron transfer from the tetraheme cytochrome to the special pair in isolated reaction centers of *Rhodospseudomonas viridis*. Biochemistry, 32:1141-1151.

Ortega, J. M., Mathis, P., Williams, J. C. és Allen, J. P. (1996) Temperature dependence of the reorganization energy for charge recombination in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry, 35:3354-3361.

Ortega, J. M., Dohse, B., Österhelt, D. és Mathis, P. (1997) Very fast electron transfer from cytochrome to the bacterial photosynthetic reaction center at low temperature. FEBS Letters, 40:153-157.

Ortega, J. M., Dohse, B., Österhelt, D. és Mathis, P. (1998) Low-temperature electron transfer from cytochrome to the special pair in *Rhodospseudomonas viridis*: Role of the L162 residue. Biophys. J. 74:1135-1148.

Ortega, J. M., Drepper, F. és Mathis, P. (1999) Electron transfer between cytochrome c_2 and the tetraheme cytochrome c in *Rhodospseudomonas viridis*. Photosynth. Res. 59:147-157.

Osváth, S. és Maróti, P. (1997) Coupling of cytochrome and quinone turnovers in the photocycle of reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. Biophys. J., 73:972-982.

Osyczka, A., Nagashima, K. V. P., Sogabe, S., Miki, K., Yoshida, M., Shimada, K. és Matsuura, K. (1998) Interaction site for soluble cytochromes on the tetraheme cytochrome subunit bound to the bacterial photosynthetic reaction center mapped by site-directed mutagenesis. Biochemistry, 37:11732-11744.

Osyczka, A., Nagashima, K. V. P., Sogabe, S., Miki, K., Shimada, K. és Matsuura, K. (1999) Comparison of the binding sites for high-potential iron-sulfur protein and cytochrome c on the tetraheme cytochrome subunit bound to the bacterial photosynthetic reaction center. Biochemistry, 38:15779-15790.

Othman, S., Richaud, P., Verméglio, A. és Desbois, A. (1996) Evidence for a proximal histidine interaction in the structure of cytochromes c' in solution: A resonance Raman study. Biochemistry, 35:9224-9234.

Overfield, R. E. és Wraight, C. A. és Devault, D. (1979) Microsecond photooxidation kinetics of cytochrome c_2 from *Rhodospseudomonas sphaeroides*: In vivo and solution studies. FEBS Letters, 105:137-142.

Overfield, R. E. és Wraight, C. A. (1980a) Oxidation of cytochromes c and c_2 by bacterial photosynthetic reaction centers in phospholipid vesicles. 1. Studies with neutral membranes. Biochemistry, 19:3322-3327.

Overfield, R. E. és Wraight, C. A. (1980b) Oxidation of cytochromes c and c_2 by bacterial photosynthetic reaction centers in phospholipid vesicles. 2. Studies with negative membranes. Biochemistry, 19:3328-3334.

- Overfield, R. E. és Wright, C. A. (1986) Photooxidation of mitochondrial cytochrome c by isolated bacterial reaction centers: Evidence for tight-binding and diffusional pathways. *Photosynth. Res.* 9:167-179.
- Paddock, M. L., Rongey, S. H., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1989) Pathway of proton transfer in bacterial reaction center centers: Replacement of glutamin acid 212 in the L subunit by glutamine inhibits quinone (secondary acceptor) turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6602-6606.
- Paddock, M. L., McPherson, P. H., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1990) Pathway of proton transfer in bacterial reaction centers: Replacement of serine-L223 by alanine inhibits electron and proton transfers associated with reduction of quinone to dihydroquinone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6803-6807.
- Paddock, M. L., Rongey, S. H., McPherson, P. H., Juth, A., Feher G. és Okamura, M. Y. (1994) Pathway of proton transfer in bacterial reaction centers: Role of aspartate-L213 in proton transfers associated with reduction of quinone to dihydroquinone. *Biochemistry.* 33:734-745.
- Paddock, M. L., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1995) Pathway of proton transfer in bacterial reaction centers: Further investigations on the role of Ser-L223 studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry,* 34:15742-15750.
- Paddock, M. L., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1997) Proton and electron transfer to the secondary quinone (Q_B) in bacterial reaction centers: The effect of changing the electrostatics in the vicinity of Q_B by interchanging Asp and Glu at the L212 and L213 sites. *Biochemistry,* 36:14238-14249.
- Paddock, M. L., Senft, M. E., Graige, M. S., Rongey, S. H., Turanchik, T., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1998) Characterization of second site mutations show that fast proton transfer to Q_B^- is restored in bacterial reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* containing the Asp-L213→Asn lesion. *Photosynth. Res.,* 55:281-291.
- Paddock, M. L., Graige, M. S., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1999) Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Inhibition of proton transfer by binding of Zn^{2+} or Cd^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 96:6183-6188.
- Paddock, M. L., Feher, G. és Okamura, M. Y. (2000) Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Replacement of Asp-M17 and Asp-L210 with Asn reduces the proton transfer rate in the presence of Cd^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 97:1548-1553.
- Paddock, M. L., Ädelroth, P., Chang, C., Abresch, E. C., Feher, G. és Okamura, M. Y. (2001) Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Cooperation between Asp-M17 and Asp-L210 facilitates proton transfer to the secondary quinone (Q_B). *Biochemistry,* 40:6893-6902.
- Peluso, A., Di Donato, M. és Saracino, G. A. A. (2000) An alternative way of thinking about electron transfer in proteins: Proton assisted electron transfer between the primary and the secondary quinones in photosynthetic reaction centers. *J. Chem. Phys.* 113:3212-3218.
- Prince, R. C., Cogdell, R. J. és Crofts, A. R. (1974) The photo-oxidation of horse heart cytochrome c and native cytochrome c_2 by reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides* R-26. *Biochim. Biophys. Acta,* 347:1-13.
- Prince, R. C., Dutton, P. L. és Bruce, J. M. (1983) Electrochemistry of ubiquinones. *FEBS Letters,* 160:273-276.
- Rabenstein, B., Ullmann, G. M. és Knapp, E. W. (1998) Energetics of electron-transfer and protonation reactions of the quinones in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochemistry,* 37:2488-2495.
- Rabenstein, B., Ullmann, G. M. és Knapp, E. W. (2000) Electron transfer between the quinones in the photosynthetic reaction center and its coupling to conformational changes. *Biochemistry,* 39:10487-10496.
- Rickle, G. K. és Cusanovich, M. A. (1979) The kinetics of photooxidation of c-type cytochromes by *Rhodospirillum rubrum* reaction centers. *Arch. Biochem. Biophys.,* 197:589-598.

- Rieder R., Wiemken, V., Bachofen, R., és Bosshard, H. R. (1985) Binding of cytochrome c_2 to the isolated reaction center of *Rhodospirillum rubrum* involves the backside of cytochrome c_2 . *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 128:120-126.
- Riegler, J., Peschke, J. és Möhwald, H. (1984) Two-dimensional electron transfer from cytochrome c to photosynthetic reaction centers. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 125:592-599.
- Rios-Velazquez C., Cox, R. L. és Donohue, T. J. (2001) Characterization of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c_2 proteins with altered heme attachment sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 389 (2): 234-244.
- Rongey, S. H., Paddock, M. L., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1993) Pathway of proton transfer in bacterial reaction centers: Second-site mutation Asn-M44→Asp restores electron and proton transfer in reaction centers from the photosynthetically deficient Asp-L213→Asn mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1325:1329.
- Rosen, D., Okamura, M. Y. és Feher, G. (1980) Interaction of cytochrome c with reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26: Determination of number of binding sites and dissociation constants by equilibrium dialysis. *Biochemistry*, 19:5687-5692.
- Rosen, D., Okamura, M. Y., Abresch, E. C., Valkirs, G. E. és Feher, G. (1983) Interaction of cytochrome c with reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26: Localization of the binding site by chemical cross-linking and immunochemical studies. *Biochemistry*, 22:335-341.
- Schlereth, D. D. és Mäntele, W. (1993) Electrochemically induced conformational changes in cytochrome c monitored by Fourier infrared difference spectroscopy: Influence of temperature, pH and electrode surfaces. *Biochemistry*, 32:1118-1126.
- Schmid, R. és Labahn, A. (2000) Temperature and free energy dependence of the direct charge recombination rate from the secondary quinone in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem. B.*, 104:2928-2936.
- Sebban, P., Maróti, P., Schiffer, M. és Hanson, D. K. (1995) Electrostatic dominoes: Long distance propagation of mutational effects in Photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*, 34:8390-8397.
- Sham, Y. Y., Muegge, I. és Warshel, A. (1999) Simulating proton translocations in proteins: Probing proton transfer pathways in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center. *Proteins*, 36:484-500.
- Shinkarev, V. P., Drachev, L. A., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. J., Semenov, A. Y. és Verkhovsky, M. I. (1993) Effect of pH and surface potential on the rate of electric potential generation due to proton uptake by secondary quinone acceptor of reaction centers in *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta*, 1144:285-294.
- Shinkarev, V. P. és Wraight, C. A. (1993) Electron and proton transfer in the acceptor quinone complex of reaction centers of phototropic bacteria. (szerk. Deisenhofer, J. és Norris, J.) Academic Press, San Diego, I:193-255.
- Shinkarev, V. P. és Wraight, C. A. (1997) The interaction of quinone and detergent with reaction centers of purple bacteria. I. Slow quinone exchange between reaction center micelles and pure detergent micelles. *Biophys. J.* 72:2304-2319.
- Shopes, R. J. és Wraight, C. A. (1985) The acceptor quinone complex of *Rhodopseudomonas viridis* reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta*, 806:348-356.
- Shopes, R. J. és Wraight, C. A. (1986) Primary donor recovery kinetics in reaction centers from *Rhodopseudomonas viridis*. The influence of ferricyanide as a rapid oxidant of the acceptor quinones. *Biochim. Biophys. Acta*, 848:364-371.

- Sinning, I. (1992) Herbicide binding in the bacterial photosynthetic reaction center. *Trends in Biol. Sci.* 17:150-154.
- Stowell, M. H. B., McPhillips, T. M., Rees, D. C., Soltis, S. M., Abresch, E. C. és Feher, G. (1997) Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: Implications for mechanism of electron-proton transfer. *Science*, 276:812-816.
- Swallow, A. J. (1982) Physical chemistry of semiquinones. In: *Functions of quinones in Energy Conserving Systems* (szerk.: Trumpower, B. C.), Academic Press, New York, 59-72.
- Takahashi, E. és Wraight, C. A. (1991) Small weak acids stimulate proton transfer events in site-directed mutants of the two ionizable residues, Glu^{L212} and Asp^{L213}, in the Q_B-binding site of *Rhodobacter sphaeroides* reaction center. *FEBS Letters*, 283:140-144.
- Takahashi, E. és Wraight, C. A. (1992) Proton and electron transfer in the acceptor quinone complex of *Rhodobacter sphaeroides*: Characterization of site-directed mutants of two ionizable residues, Glu^{L212} and Asp^{L213}, in the Q_B binding site. *Biochemistry*, 31:855-866.
- Takahashi, E. és Wraight, C. A. (1996) Potentiation of proton transfer function by electrostatic interactions in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: First results from site-directed mutation of the H subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:2640-2645.
- Tanaka, S. és Marcus, R. A. (1997) Electron transfer model for the electric field effect on quantum yield of charge separation in bacterial photosynthetic reaction centers. *J. Phys. Chem. B* 101:5031-5045.
- Tandori, J., Sebban, P., Michel, H. és Baciou, L. (1999) In *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, mutation of proline L209 to aromatic residues in the vicinity of a water channel alters the dynamic coupling between electron and proton transfer processes. *Biochemistry*, 38:13719-13187.
- Tetreault, M., Turanchick, T., Paddock, M. L., Feher, G. és Okamura, M. Y. (1998) A stronger binding cytochrome c₂: Reaction center complex in mutant RCs from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 74:A75-A75 Part 2.
- Tetraault M., Rongey, S. H., Feher, G. és Okamura, M. Y. (2001) Interaction between cytochrome c₂ and photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*: Effect of charge-modifying mutations on binding and electron transfer. *Biochemistry*, 40:8452-8462.
- Tiede, D. M. (1987) Cytochrome c orientation in electron-transfer complexes with photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* and when bound to the surface of negatively charged membranes: Characterization by optical linear dichroism. *Biochemistry*, 26:397-410.
- Tiede, D. M., Vashishta, A. C. és Gunner, M. R. (1993) Electron-transfer kinetics and electrostatic properties of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center and soluble c-cytochromes. *Biochemistry*, 32:4515-4531.
- Tiede, D. M., Vázquez, J., Córdova, J. és Marone, P. A. (1996) Time-resolved electrochromism associated with the formation of quinone anions in the *Rhodobacter sphaeroides* R26 reaction center. *Biochemistry*, 35:10763-10775.
- Tiede, D. M., Utschig, L. M., Hanson, D. K. és Gallo, D. M. (1998) Resolution of electron and proton transfer events in the electrochromism associated with quinone reduction in bacterial reaction centers. *Photosynth. Res.* 55:267-273.
- Tiede, D. M., Littrell, K., Marone, P. A., Zhang, R. és Thiyagarajan, P. (2000) Solution structure of a biological bimolecular electron transfer complex: characterization of the photosynthetic reaction center-cytochrome c₂ protein complex by small angle neutron scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 33:560-564 Part 3.
- Ueno, T., Hara, M., Kamo, N., Fujii, T. és Miyake, J. (1998) Control of the unidirectional topological orientation of a cross-linked complex composed of the bacterial photosynthetic reaction center and horse heart cytochrome c reconstituted into proteoliposomes. *J. Biochem.-Tokyo* 124:485-490.

Utschig, L. M., Ohigashi, Y., Thurnauer, M. C. és Tiede, D. M. (1998) A new metal-binding site in photosynthetic bacterial reaction centers that modulates Q_A to Q_B electron transfer. *Biochemistry*, 37:8278-8281.

Utschig, L. M., Poluektov, O., Tiede, D. M. és Thurnauer, M. C. (2000) EPR investigation of Cu^{2+} -substituted photosynthetic bacterial reaction centers: Evidence for histidine ligation at the surface metal site. *Biochemistry*, 39:2961-2969.

Utschig, L. M., Poluektov, O., Schlesselman, S. L., Thurnauer, M. C. és Tiede, D. M. (2001) Cu^{2+} site in photosynthetic bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, and *Rhodopseudomonas viridis*. *Biochemistry*, 40:6132-6141.

Valerio-Lepiniec, M., Delacroix, J. D., Schiffer, M., Hanson, D. K. és Sebban, P. (1997) A native electrostatic environment near Q_B is not sufficient to ensure rapid proton delivery in photosynthetic reaction centers. *FEBS Letters*, 407:159-163.

Valerio-Lepiniec, M., Miksovská, J., Schiffer, M., Hanson, D. K. és Sebban, P. (1999) Mutations in the environment of the primary quinone facilitate proton delivery to the secondary quinone in bacterial photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, 38:390-398.

Vandenbergh, I., Leys, D., Demol, H., Van Driessche, G., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. és Van Beeumen, J. (1998) The primary structures of the low-redox potential diheme cytochromes c from the phototrophic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter adriaticus* reveal a new structural family of c-type cytochromes. *Biochemistry*, 37:13075-13081.

Van der Wal, H. N., Van Grondelle, R., Millett, F. és Knaff, D. B. (1987) Oxidation of cytochrome c_2 and of cytochrome c by reaction centers of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides*. The effect of ionic strength and of lysine modification on oxidation rates. *Biochim. Biophys. Acta*, 893:490-498.

Van Gelder, B. F. és Slater, E. C. (1962) The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, 58:593-595.

Van Rossum, B. J., Wachtveitl, J., Raap, J., vanderHoef, K., Gast, P., Lugtenburg, J., Österheld, D. és deGroot, H. J. M. (1997) C-13 MAS NMR evidence for structural similarity of L162YL mutant and *Rhodobacter sphaeroides* R-26 RC, despite widely different cytochrome c_2 -mediated re-reduction kinetics of the oxidized primary donor. *Spectrochim. Acta, A* 53:2201-2208.

Van Rotterdam, B. J., Westerhoff, H. V., Visschers, R. W., Bloch, D. A., Hellingwerf, K. J., Jones, M. R. és Crielaard, W. (2001) Pumping capacity of bacterial reaction centers and backpressure regulation of energy transduction. *Eur. J. Biochem.* 268:958-970.

Venturoli, G., Melandri, B. A., Gabellini, N. és Österheld, D. (1990) Kinetics of photosynthetic electron transfer in artificial vesicles reconstituted with purified complexes from *Rhodobacter capsulatus* I. The interaction of cytochrome c_2 with the reaction center. *Eur. J. Biochem.* 189:105-112.

Venturoli, G., Mallardi, A. és Mathis, P. (1993) Electron transfer from cytochrome c_2 to the primary donor of *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. A temperature dependence study. *Biochemistry*, 32:13245-13253.

Venturoli, G., Drepper, F., Williams, J. C., Allen, J. P., Lin, X. és Mathis, P. (1998) Effects of temperature and ΔG° degrees on electron transfer from cytochrome c_2 to the photosynthetic reaction center of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 74:3226-3240.

Wachtveitl, J., Farchaus, J. W., Mathis, P. és Österheld, D. (1993) Tyrosine 162 of the photosynthetic reaction center L-subunit plays a critical role in the cytochrome c_2 mediated rereduction of the photooxidized bacteriochlorophyll dimer in *Rhodobacter sphaeroides*: 2. Quantitative kinetic analysis. *Biochemistry*, 32:10894-10904.

Wang, S., Li, X., Williams, J. C., Allen, J. P. és Mathis, P. (1994) Interaction between cytochrome c_2 and reaction centers from purple bacteria. *Biochemistry*, 33:8306-8312.

Wang, K. F., Zhen, Y. J., Sadoski, R., Grinnell, S., Geren, L., Ferguson-Miller, S., Durham, B. és Millett, F. (1999) Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase - II. Rapid kinetic analysis of electron transfer from cytochrome c to *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome oxidase surface mutants. *J. Biol. Chem.* 274:38042-38050.

Wherland, S. és Gray, H. B. (1976) Metalloprotein electron transfer reactions: Analysis of reactivity of horse heart cytochrome c with inorganic complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:2950-2954.

Williams, J. C., Steiner, L. A., Feher, G. és Simon, M. I. (1984) Primary structure of the L subunit of the reaction center from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:7303-7307.

Witthuhn, Jr., V. C., Gao, J., Hong, S., Halls, S., Rott, M. A., Wraight, C. A., Crofts, A. R. és Donohue, T. J. (1997) Reactions of isocytochrome c_2 in the photosynthetic electron transfer chain of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 36:903-911.

Woodbury, N. W., Parson, W. W., Gunner, M. R., Prince, R. C. és Dutton, P. L. (1986) Radical-pair energetics and decay mechanisms in reaction centers containing anthraquinones, naphthoquinones or benzoquinones in place of ubiquinone. *Biochim. Biophys. Acta*, 851:6-22.

Woodbury, N. W., Peloquin, J. M., Alden, R. G., Lin, X., Lin, S., Taguchi, A. K. W., Williams, J. C. és Allen, J. P. (1994) Relationship between thermodynamics and mechanism during photoinduced charge separation in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 33:8101-8112.

Wraight, C. A. (1979) Electron acceptors of bacterial photosynthetic reaction centers. II H^+ binding coupled to secondary electron transfer in the quinone acceptor complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 548:309-327.

Wraight, C. A. és Stein, R. R. (1983) Bacterial reaction centers as a model for photosystem II. Turnover of the secondary acceptor quinone. (szerk. Inoue, Y., Crofts, A. R., Govindjee, Murata, N., Renger, G. és Satoh, K.) Academic Press, Tokyo, 383-392.

Wyman, J. és Gill, S. J. (1990) Binding and Linkage: Functional chemistry of biological macromolecules, University Science Books, Mill Valley, CA.

Xu, Q. és Gunner, M. R. (2000) Temperature dependence of the free energy, enthalpy, and entropy of $P^+Q_A^-$ charge recombination in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers. *J. Phys. Chem. B* 104:8035-8043.

Yazal, J. E., Roe, R. R. és Pang, Y. P. (2000) Zinc's affect on proton transfer between imidazole and acetate predicted by ab initio calculations. *J. Phys. Chem. B*. 104:6662-6667.

Yeates, T. O., Komiya, H., Chirino, A., Rees, D. C., Allen, J. P. és Feher, G. (1988) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1.: Protein-cofactor (bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and carotenoid) interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7993-7997.

Zachariae, U. és Lancaster C. R. D. (2001) Proton uptake associated with reduction of the primary quinone Q_A influences the binding site of the secondary quinone Q_B in *Rhodospseudomonas viridis* photosynthetic reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1505:280-290.

Zhu, Q. S., Van der Wal, H. N., Van Grondelle, R. és Berden, J. A. (1983) Kinetics of flash-induced electron transfer between bacterial reaction centres, mitochondrial ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase and cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, 725:121-130.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás vagyok Maróti Péter egyetemi tanárnak, az SZTE Biofizikai Tanszék vezetőjének, témavezetőmnek munkám iránti folyamatos érdeklődésért és a rengeteg tartalmas és tanulságos beszélgetésért.

Köszönettel tartozom Laczkó Gábor egyetemi docensnek, aki a mérőberendezés építésében segítségemre volt, abban kimagasló munkát nyújtott. Kálmán László és Tandori Júlia egyetemi adjunktusoknak köszönöm a sok tanácsot és szakmai útmutatást, amelyek a munkám során rendkívül hasznosnak bizonyultak. Nagy László egyetemi docensnek és Tandori Júlia adjunktusnak a fehérjetisztítási eljárások elsajátításában nyújtott segítségét köszönöm meg.

Továbbá, tanszéki munkatársaim közül ki kell emelnem Dunai Péterné segítőkész hozzáállását, akár őt második anyámnak is nevezhetem, annyira mellettem volt jóban-rosszban. Köszönöm Molnár Eszter és Laskayné Tóth Judit laboránsoknak, hogy laboránsi munkakörük lelkiismeretes és odaadó ellátásával gördülékennyé tették a munkát számomra. A tanszék többi munkatársának is köszönöm a segítségét.

Végezetül szeretném kifejezni köszönetemet Szüleimnek, akiknek segítségével nem juthattam volna el idáig.