

B 3770

TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ÖSSZEGZŐ TÉZISEI

A BAKTERIÁLIS REAKCIÓCENTRUM FOTOCIKLUSÁNAK  
KINETIKÁJA ÉS ENERGETIKÁJA

írta:

Gerencsér László



SZTE Biofizikai Tanszék

Szeged

2001

## Bevezetés

A fotoszintetikus bakteriális reakciócentrum (RC) egy pigment-fehérje komplex, amely az elnyelt fényenergiát kémiai energiává alakítja át. A fehérje 3 alegységből (L, M és H) áll, amelyhez 9 proszтетikus csoport kötődik: 4 bakterioklorofill, 2 bakteriofeofitin, 2 ubikinon és egy nem-hem típusú vas. Három-dimenziós szerkezetét röntgendiffrakciós vizsgálattal meghatározták, különös tekintettel a kromoförök környezetére, amelyet atomi szintű feloldással határoztak meg [2.65 Å° (Ermler és mtsai. 1994); 2.2 Å° (Stowell és mtsai. 1997)]. Míg az L és M alegység 5 transzmembrán hélixet tartalmaz, a H alegység kevésbé hidrofób, a membrán citoplazmikus oldalán az L és M alegység közti árkot fedi le. Az elsődleges elektron donor [bakterioklorofill dimer (P)] a membrán periplazmikus oldalán helyezkedik el. Habár a membrán citoplazmikus oldalán az akceptor komplex kinonjai kémiaiilag azonosak, funkciójukban mégis jelentős különbség van, ami az eltérő fehérje környezetnek tulajdonítható. Az elsődleges kinon ( $Q_A$ ) fiziológiás körülmények között egyszeresen redukálódik, szemben a másodlagos kinonnal ( $Q_B$ ), ami lazán kötődik a RC-hoz és kétszeresen redukálható. A Fe atom a két kintól egyenlő távolságra található, amelyet 5 aminosav koordinál. Fényerjesztés hatására a RC-ban töltéspár alakul ki, amely egymást követő elektrontranszfer lépések során stabilizálódik. A keletkezett oxidált dimert a periplazmikus oldalon a citokrom visszaredukálja, így újabb fényerjesztést követően egy második elektrontranszfer mehet végbe. Míg az első elektrontranszfer a fehérje konformációs változásához kötött, addig a második elektrontranszfer a  $Q_B$  protonálódása után megy végbe. Egy második proton felvételét követően a kétszeresen redukált és protonált kinon a kötőhelyről leválik, és a lipidfázis kinonkészletéből egy új kinon kötődik be. A RC a protont a citoplazmából veszi fel. Széleskörű szerkezeti, irányított mutagenézis és számítási vizsgálatok 3 a fehérje belsejében, a  $Q_B$ -hez irányuló proton csatornát azonosítottak. A csatornát



hidrogénkötésekkel összekapcsolt protonálható aminosavak, valamint vízmolekulák alkotják. A közelmúltban egy új vizsgálati módszernek köszönhetően egy domináns protoncsatornát is kijelöltek (Paddock és mtsai. 2000; Ädelroth és mtsai. 2000): Átmeneti fémionok ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) reverzibilis kötődése következtében az elektrontranszfer és protonfelvétel reakciók lényegesen lelassulnak. Habár a fémion kötőhelyét röntgendiffrakciós módszerrel azonosították (Axelrod és mtsai. 2000), a mechanizmus 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).

Mivel a RC a fotoszintetikus apparátus azon legkisebb egysége, amely képes a fényenergia átalakítására, vizsgálatainkat membránból izolált RC-on végeztük. Az *in vivo* körülmények jól modellezhetők, ha a RC-ot nem villanófényvel, hanem folytonos fényvel gerjesztjük. A megfelelő mennyiségű redoxekvivalensek biztosításával elérhető, hogy (redukált citokróm, oxidált kinon) a RC folytonos átfordulását a keletkező oxidált citokróm felhalmozódásával vizsgáljuk, ami abszorpcióváltozás mérésével követhető. Az átfordulás sebessége a fotociklus leglassabb lépésének sebességével egyezik meg, ami alapján olyan egyedi lépések sebessége is mérhető, amelyek külön nem határozhatók meg más módszerrel. 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. A következő kérdések indították el a részletes vizsgálatokat:

Hogyan hat az ionerősség a citokróm átfordulás sebességére?

Milyen hatást váltanak ki különböző kationok?

Mi az átmeneti fémion hatás tényleges mechanizmusa?

Miért van különbség a különböző átmeneti fémionok hatása között?

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

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

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?

Van-e hatása a fényindukált protonkötés sztöchiometriájára?

### Új tudományos eredmények

1. A folytonos gerjesztés közben 550 nm-nél megfigyelt citokróm átfordulás ionerősség-függése eltért a korábbi villanófény (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 sebesség-meghatározóvá váljék (I).
2. Különböző kationok használatával az ionerősség-függés lényegesen eltért. A kétértékű ( $\text{Ca}^{2+}$ ) és különösen a háromértékű ( $\text{Al}^{3+}$ ) esetében, kisebb ionerősségnél tapasztaltam a citokróm oxidáció sebességének erőteljes esését, mint az egyértékű ( $\text{Na}^+$ )-nál. 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 direkt kötődését RC felületén lévő negatív töltésekhez (I).



3. Átmeneti fémionok ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) 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 határolja, 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 jelenti, hogy a bimolekuláris folyamatot egy elsődrendű 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 ( $\text{pI}=6.1$ ), a citokrómoxidáció 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  $\text{Ni}^{2+}$ ) disszociációs állandója pH 5 és pH 8 között erős pH függést mutatott, amelyet Henderson-Hasselbalch összefüggés alapján illesztettem  $\text{pK}=7.0$  ( $\text{Ni}^{2+}$ ) és  $\text{pK}=7.0$  és  $\text{pK}=5.9$  ( $\text{Cd}^{2+}$ ) értékekkel. Összhangban a röntgendiffrakciós 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 töltésrekombinációs 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 elektrontranszfernél szerepet játszik. Mivel a  $\text{Q}_B$ -hez irányuló protonvezetési utak az AspL213-nál csatlakoznak, a hatás valószínűleg érinti az aminosavat is. A  $\text{Ni}^{2+}$  jóval hatékonyabban gátolta az elektrontranszfert, mint a  $\text{Cd}^{2+}$ , 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 szemikinin keletkezését követő protontranszfer előzi meg, és a protonfelvétel is a szemikinin-képződés hatására megy végbe, a szemikinin 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, így a második protontranszfernek gyorsabbnak kell lennie mint, a fotociklust határoló elektrontranszfer (IV).

11. A fény indukált protonkötés sztöchiometriájának pH függésében megfigyelhető csúcsok fémion hatására kisebb pH felé tolódnak, ami különösen  $Q_B$  aktiv 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.



Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Dátum ..2001.. november ..27.....

Maróti Péter.

János Tibor

László Csaba