

Fotoszintetizáló baktériumok vizsgálata spektroszkópai módszerekkel

KIS MARIANN

A *Rhodobacter sphaeroides* fakultatív heterotróf bíbor baktérium, amely a Proteobaktériumok törzsébe tartozik. Igen érdekes metabolikus tulajdonságokat mutat. Oxigéndús és oxigénmentes környezetben egyaránt növekszik, fotoszintézisre, nitrogén fixációra, valamint különböző nehézfémionok ártalmatlanítására is képes. Ideális célpont egy baktériumtörzs öregedésének, valamint a fotoszintetikus membrán biogenezisének és összeszerelődésének vizsgálatára.¹ Ebben a tanulmányban a *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 baktérium fotoszintetikus membránjának kialakulását és visszarendeződését, érését vizsgáljuk, szinkronizált és aszinkron tenyészeteken, állandósult és kinetikus optikai spektroszkópiát használva, beleértve az állandósult és kinetikai abszorpció és a bakterioklorofillok gyors fluoreszcencia indukció és relaxáció mérését. Az intracitoplazmikus membrán (ICM) tartalmazza a fotoszintetikus apparátust. Ez a membrán a citoplazmamembrán (CM) betűrődésével jön létre akkor, amikor alacsony az oxigén koncentrációja (3%).² A magas oxigén-koncentráció gátolja az ICM-ok kialakulását. A fotoszintetikus apparátus (*I. ábra*) egy feofitin-kinon típusú reakciócentrumot (RC) tartalmaz, amit a belső fénybegyűjtő antenna pigmentek (light harvesting complex 1, LH1) vesznek körbe, továbbá a PufX fehérje is kapcsolódik hozzá. Ezt a pigment-fehérje komplexet mag komplexnek is nevezzük. Egy kiegészítő, ún. periférikus fénybegyűjtő rendszer (light harvesting complex 2, LH2) a mag komplex környezetében, azt körülölelve helyezkedik el. A RC-LH1-PufX mag komplex dimér formában fordul elő³ és részt vesz a fény indukálta ciklikus elektron transzferben.⁴ A fotoszintetikus egységek összeszerelése jól meghatározott sorrendben, szekvenciálisan történik: elsőként az inaktív reakciócentrumot körülfogja az LH1, majd hozzákapcsolódik egy PufX fehérje. Ezt követően az elektron transzfer aktiválódik, és kialakul a funkcionális reakciócentrum, majd végezetül a perifériás LH2 felhalmozódik a mag komplex körül. A fénybegyűjtő rendszerek mennyisége és egymáshoz való viszonya nem állandó, hanem változik az egyedfejlődés során, továbbá a külső körülmények hatására. Az LH2 mennyisége az LH1-hez képest a fényintenzitástól függően változik az egyébként állandó anaerob körülmények mellett. Minél kisebb a gerjesztő fényintenzitás, annál nagyobb lesz az LH2 mennyisége a sejtekben. A fotoszintetikus apparátus ilyen módon alkalmazkodik a csökkent külső fényerőhöz, hogy emelje a fénybegyűjtés és a

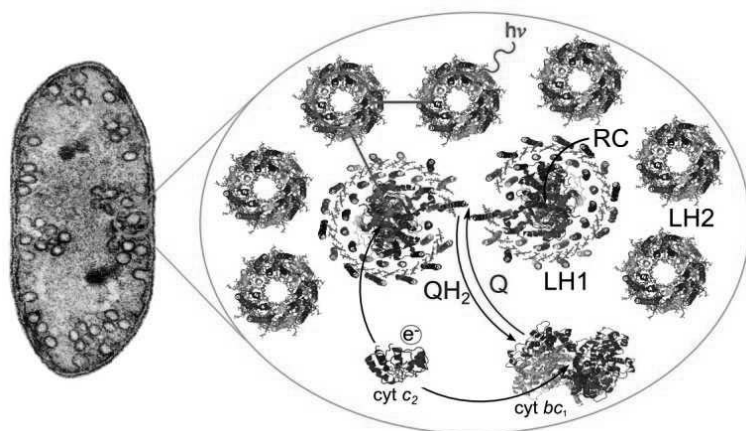
¹ KOBLIZEK ET AL. 2005.

² KILEY – KAPLAN 1988.

³ QIAN ET – BULLOUGH – HUNTER 2008.

⁴ ASZTALOS – MARÓTI 2009.

fotokémiai hasznosítás mértékét. A fényintenzitás mellett más tényezők is befolyásolják az antenna kiterjedését, spektrális tulajdonságait és a pigmentek közötti excitonikus kölcsönhatását. Ezért célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogyan változik a LH2/LH1 arány, ha oxigéndús környezetben neveljük a baktérium tenyészeteket.



1.ábra: A Rhodospirillum rubrum fotoszintetikus apparátusának hierarchikus szerveződése

A bal oldalon az ép sejt, jobb oldalon a komplex alkotóinak atomi felbontású modellje. RC: reakció centrum dimér; LH1: első számú fénybegyűjtő antenna; LH2: kettőszámú fénybegyűjtő antenna. Ezek mellett még az elektrontranszportlánc elemei vannak feltüntetve: citokróm c2, citokróm bc1 komplex, kinonok, kinolok.

Az oxigén és a fény két olyan alapvető környezeti tényező, amely befolyásolja a baktérium fotoszintetikus apparátusának képződését, összerendeződését és (ha a körülmények úgy alakulnak) visszaalakulását. Kísérleteinkben kinetikai optikai spektroszkópiát használtunk. Különös figyelmet fordítottunk a gyors fluoreszcencia indukció és relaxáció vizsgálatára, ami széleskörűen alkalmazott módszer a magasabb rendű növényeknél és a cianobaktériumoknál,⁵ de kevésbé elterjedt a fotoszintetizáló baktériumok tanulmányozásánál.⁶ A gyors fluoreszcencia indukció mérése nagyon érzékeny technika, ami sikerrel alkalmazható arra, hogy képet kapjunk a baktériumok fotoszintetikus apparátusának aktuális állapotáról.

Anyagok és módszerek

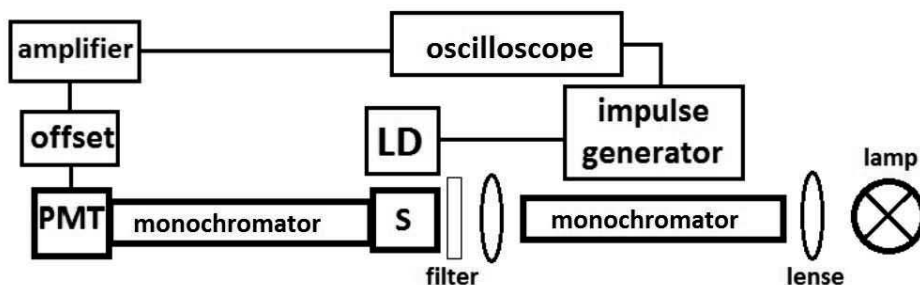
A baktérium tenyészeteket (*Rba. sphaeroides* 2.4.1) Siström-féle tápoldatban neveltük, egyrészt oxigénmentesen teljesen feltöltött üvegben (fotoheterotróf növekedés), másrészt pedig félig töltött Erlenmeyer lombikban folyamatos

⁵ LAZAR 1999; PAPAGEORGIOU – GOVINDJEE 2004; VREDENBERG – DURCHAN – PRASIL 2009.

⁶ KOCSIS ET AL. 2010; ASZTALOS ET AL. 2010; ASZTALOS – KIS – MARÓTI 2010; BÍNA – LITVIN – VÁCHA 2010.

levegő-buborékoltatás mellett (aerob növekedés). Mindkét esetben folyamatos volt a tenyészetek megvilágítása ($13 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$). A sejtszámot (sejtkoncentrációt) Bürker-kamrával határoztuk meg fénymikroszkóp alatt. A szinkrontenyészeteket a fény és sötét periódusok (3,5–3,5 óra) váltakoztatásával értük el.⁷

Abszorpció mérése: a tenyészet növekedése során bizonyos időközönként állandósult (steady-state) közeli infravörös abszorpciós spektrumokat vettünk fel szobahőmérsékleten egysugaras spektrofotométer segítségével. A felvett spektrumokból hiperbola háttérrel vontunk le, majd három Gauss-görbével három komponensre bontottuk fel.⁸



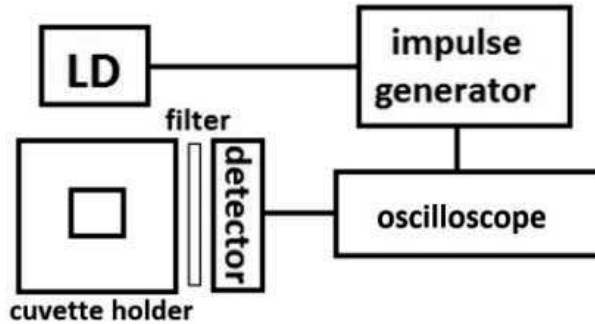
2. ábra: Abszorpcióváltozás mérő berendezés blokk diagramja (PMT: fotoelektronsokszorozó; LD: lézertióda; S: mintatartó)

Flash-indukálta abszorpciós kinetika: az egész sejteket vagy Xe- flash lámpával vagy pedig lézertiódával diode (Roithner Lasertechnik LD808-2-TO3, 808 nm hullámhossz, 2 W teljesítmény) gerjesztettük 798 és 525 nm-nél. Detektálás fotoelektronsokszorozóval történt (2. ábra).

Fluoreszcencia indukció és relaxáció mérése (3. ábra): A bakterioklorofill *a* fluoreszcencia indukció mérése sejteken egy házilag készített fluoriméterrel történt. A fényforrásként 808 ± 5 nm hullámhosszú és 2 W fénytelsítményű lézertiódát használtunk, ami téglalap alakú gerjesztést ad a mintára. Az emittált fény hullámhossza a LH2 perifériás antenna 800 nm-es abszorpciós sávjába esik. A bakterioklorofill *a* fluoreszcenciáját (>850 nm) egy közeli infravörösre érzékeny fotodióda érzékeli, amit egy 850 nm alatt vágó szűrővel védünk a lézer szórt fényétől.

⁷ LUEKING – CAMPBELL – BURGHARDT 1981.

⁸ ASZTALOS – KIS – MARÓTI 2010.



3. ábra: Fluoriméter blokk diagramja

A mért különböző fluoreszcencia indukciós görbékből megállapítható paraméterek: F_0 (sötét- vagy holt fluoreszcencia, ekkor a reakciócentrumok nyitva vannak, és készen állnak a fotokémiára), F_{\max} (a fluoreszcencia maximális szintje, ilyenkor a reakciócentrumok zárva vannak, és átmenetileg nincs funkcionális fotokémia) és $F_v (=F_{\max}-F_0$; változó fluoreszcencia, amelynek F_{\max} -hoz viszonyított értéke a fotonoknak fotokémiai folyamatokban való hasznosulását fejezi ki).

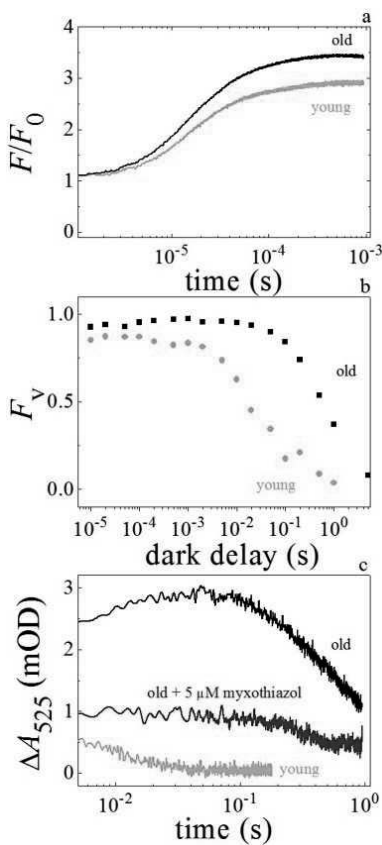
Eredmények és diszkusszió

Membránfejlődés a sejtek „öregedése” során (4. ábra). A fluoreszcencia indukció és relaxáció valamint az 525 nm-nél mérhető abszorpció változás (elektrokróm shift) mérhető változás mindegyike érzékeny paraméter, amely kifejezi a membrán fejlettségét, érettségét, összeszereltségi állapotát a növekedés során a fiatal és öregedő tenyészeteknél.

Sejtciklus-függő változások (5. ábra). A sejtek szinkronizált növekedését több helyen és több különböző törzsnél is említi az irodalom, amelynek előállításához többféle módszer is a rendelkezésünkre áll. Egy fotoszintetizáló baktérium esetében a fény paramétereinek a használata a legideálisabb. A *Rhodobakter sphaeroides*-nél sejtciklusfüggő változást a sejtszám, az 525 nm-nél mért elektrokróm shift amplitúdója valamint a sejtekből kivont összes anorganikus foszfát mennyiség mutatott.

Az antennapigmentek a reakciócentrum, valamint a karotenoidok termelődése folytonos, ezért ezeknek a beépülése a membránba állandó, így ez nem mutat sejtciklus-függő változást, mert beépülésük nem szakaszos, hanem folyamatos. A növekedési görbék módosított Gomperzt-függvénnyel lettek megillesztve.

$$\ln \frac{N}{N_0} = N_{\max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{e \cdot \mu_{\max}}{N_{\max}} (t_0 - t) + 1 \right] \right\}$$

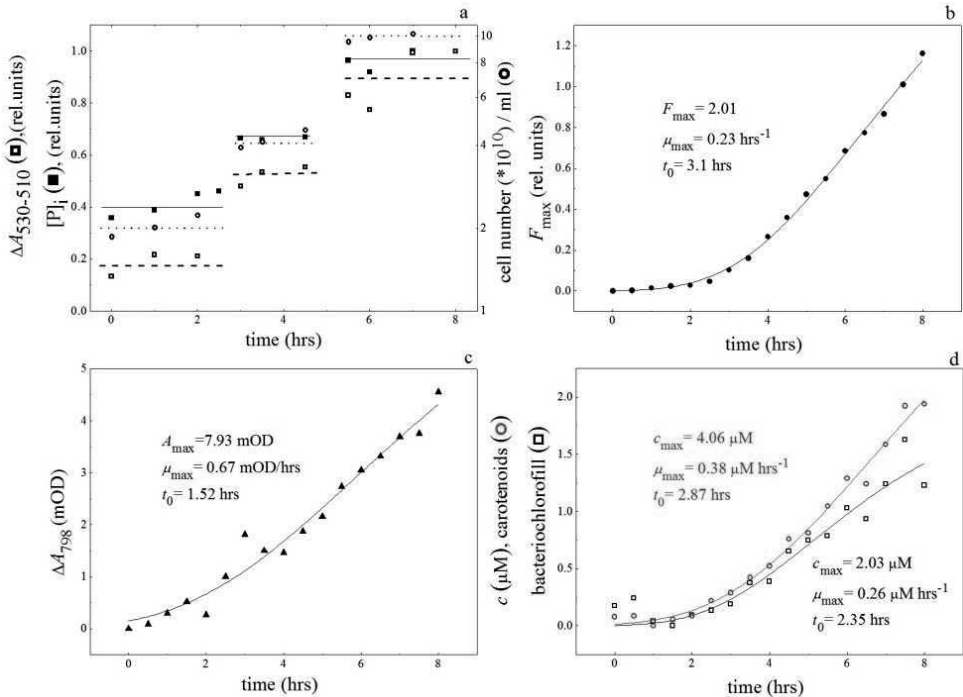


4. ábra: Gyors bakterioklorofill indukció lézerdióda gerjesztés hatására (a), sötét relaxáció (b) és 525 nm-nél mért abszorpció változás (elektrokróm eltolás) (c) a fiatal (1 óra) és öreg sejteknél (28 óra). A relaxáció változó fluoreszcenciája: $F_v = (F - F_{max}) / (F_{max} - F_0)$. 5 μ M myxothiazol, mint cyt bc1 complex inhibitor.

paramétereit összefüggésbe hozhatók az antennáknak részlegesen elvesztett fénybegyűjtő kapacitásával. A változó fluoreszcencia szemlélteti a fotoszintetikus apparátusnak az abszorbeált fényenergia fotokémiai hasznosítását. Ha kisebb a változó fluoreszcencia mértéke, akkor a fotokémiai energiaátalakítás is kisebb.

Aerob növekedés („fakulás”). Az átoltás után, amelynek során a sejtek szemiaerob környezetből aerob környezetbe jutottak, a sejtszám exponenciális növekedésnek indult. A sejtek szaporodásának duplázódási ideje kb. 4 óra volt. A sejtosztódásokat azonban nem követte új pigmentek keletkezése, mint ahogy erre utal az OD_{850} és az F_{max} nagyon mérsékelt változása is. Ennek alapján kijelenthetjük, hogy mind a pigmentszintézis, mind az ICM-ok formálódása erősen gátolt az aerob tenyésztés alatt. Nem csupán új pigmentek nem keletkeznek, hanem a már meglévők is részben roncsolódnak, kifakulnak. Ezek mellett még a membrán is visszarendeződik, és ezáltal a fényenergia fotokémiai hasznosításának határfoka is csökken. Míg a perifériális antenna (LH2) mérete kisebb lesz a belső antennához viszonyítva (LH1) aerob tenyésztés alatt, a 800/850 arány állandó marad. Az aerobizálás nincs hatással a LH2 pigment-fehérje komplex belső szerkezetére, csak csökkenti az LH1-hez viszonyított arányát. A

fluoreszcencia indukciós kinetikák rendkívül érzékenyek az aerobizálásra. A normált változó fluoreszcencia (F_v/F_{max}) és a fotokémiai sebességkonstans (k_I) is csökkenni kezd, miközben a sejteket szemiaerob környezetből aerob környezetbe oltjuk át. Az F_v/F_{max} arány 0,7-ről 0,4-re esik vissza, míg a k_I $5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ -ről $3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ -re csökken a sejtpopuláció exponenciális növekedése alatt. A fluoreszcenciának ezen



5. ábra: Sejtciklus-függő paraméterek: sejtszám, 525 nm-nél mért elektrokróm eltolás amplitúdó maximuma, anorganikus foszfát mennyiség koncentrációja (a), F_{\max} : fluoreszcencia maximális szintje (b), 798 nm-nél mért abszorpció változás, amely a működő reakciócentrumok viselkedését írja le (c), pigmentek: bakterioklorofill és karotenoid koncentráció(d). Az illesztéseket módosított Gompertz függvényvel végeztük el.

A fotokémiai sebességállandó, k_1 , a megkötött fény intenzitásától és az antennák abszorpciós keresztmetszetétől függ. A fényelnyelés (abszorpció) mértéke közel állandó maradt a mintavételezés alatt, ezáltal a k_1 változásának oka az antennapigmentek elrendezésében és tagoltságában bekövetkező változásban keresendő (6. ábra).

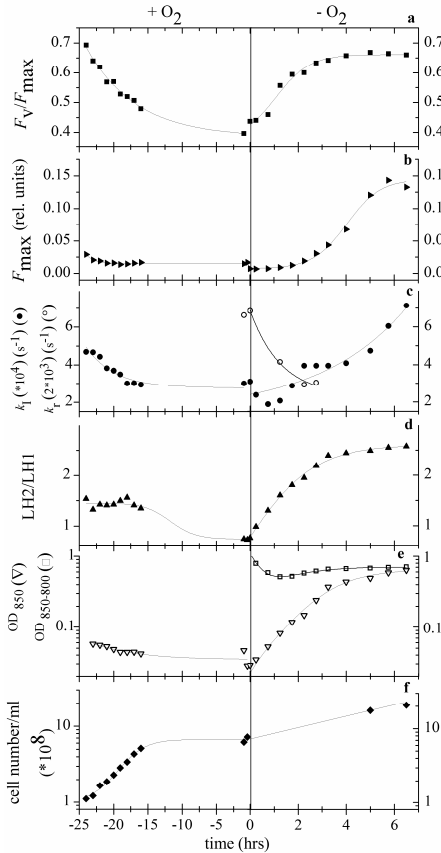
Anaerob növekedés („zöldülés”). Az aerob körülményekből anaerobbá történő átváltás minden mért paraméterben gyors és jelentős változást okozott. A sejtek duplázódási ideje ebben az esetben is körülbelül 4 óra volt. A növekedési görbékben több különbség is látható: a stacionáris fázis sokkal hosszabb idő után következik be anaerob körülmények között, illetve az exponenciális fázis is hosszabb ideig tart. A zöldülési folyamat alatt az abszorpció gyors növekedésnek indul, ennek hátterében az újonnan képződő antenna pigmentek állnak. A 850 nm-es sáv (LH2) növekedése sokkal gyorsabb, mint a 875 nm-es sáv (LH1), mert a sejtek több LH2 antennapigmentet gyártanak. Ez megnyilvánul az LH2/LH1 arányban is, ugyanis az 5–6 óra alatt 0,6-ról 2,6-ra emelkedik. Az új pigmentek képződése

sokkal gyorsabban megtörténik, mint a már meglévők szétbontása. A kísérletek azt mutatják, hogy a baktériumok elsőként az LH1-mag komplexet állítják össze, és majd csak ezután az LH2-öt, ezt is akkor, ha a körülmények ennek megfelelnek (azaz anaerob viszonyok uralkodnak). Tehát a *Rhodobacter sphaeroides* a fotoszintetikus apparátusát nem párhuzamosan, hanem

szekvenciális, esetleg az is elképzelhető, hogy még szerteágazóbb módon állítja össze. A szekvenciális folyamat a következőképpen történik: elsőként az inaktív reakciócentrumot körül fogja az LH1 és hozzákapcsolódik egy PufX fehérje, majd az elektron transzfer fehérje, és kialakul a működőképes, azaz elektronokat átvenni képes reakciócentrum. Végezetül a perifériális LH2 szintetizálódik, és felhalmozódik az antenna-mag komplex körül.

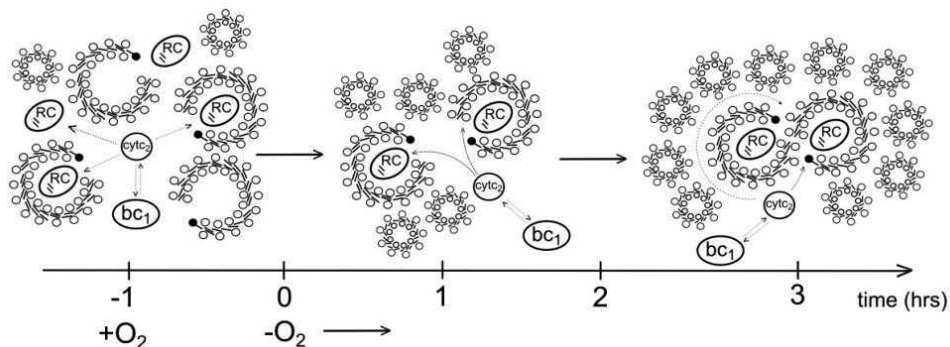
A fluoreszcencia indukciós kinetikák azt mutatják, hogy anaerob körülmények közé kerülve visszaáll a sejtek fotoszintetikus aktivitása. Új pigmenteket termelnek, és a membrán struktúrája is visszarendeződik, a citoplazmamembrán betűródik, újra kialakítva az intracitoplazmikus membránt. Az F_v/F_{max} értéke gyorsan, mintegy 4 óra (azaz egy sejtciklus, duplázódási idő) alatt megemelkedik 0,4-ről 0,7-re. A fotokémiai sebességkonstans (k_1) is nagyobb emelkedést mutat.

A változások háttérben a nagyobb antennaméret és a fotoszintetikus egységek erősebb csatolása áll, ami azt eredményezi, hogy a fényenergia megkötése gyorsabb és nagyobb hatásfokú. Az F_v és a k_1 követi a pigmentek abszorpciójának azonnali növekedését, de az LH2/LH1 és a F_v/F_{max} csak bizonyos késéssel. Az anaerobizálás, az új pigmentek



6. ábra: Rba. sphaeroides egész sejtek abszorpció és fluoreszcencia változásai állandó megvilágítás mellett 30 oC-on aerob és anaerob körülmények között (az időskálák eltérőek!). A $t = -25$ óra időpontban történt az első átoltás szemiaeroból aerob körülmények közé, $t = 0$ időpontban pedig a második átoltás aeroból anaerobá. Az OD850 és az Fmax növekedése tükrözi az új pigmentek termelését. Az F_v/F_{max} , k_1 és a LH2/LH1 pedig a kialakuló fotoszintetikus apparátus funkcionális viselkedését jellemzi.

szintézise és a funkcionális fotoszintetikus egységek felelősek a kinetikákban tapasztalt változásokért (7. ábra).



7. ábra: Rajzos illusztráció a membrán összeszerelődéséről a „zöldülés” során

Következtetésképpen elmondhatjuk, hogy az oxigén megléte és hiánya felelős a fotoszintetikus egységekben bekövetkező reverzibilis változásokért. Az oxigén (reverzibilis módon) meggátolja, hogy a citoplazmamembránban létrejöhessenek azok a betűródések, amelyek az intracitoplazmikus (fotoszintetikus) membránt alakítják ki.

Irodalom

- ASZTALOS – MARÓTI 2009 = Asztalos, E. – Maróti, P.: Export or recombination of charges in reaction centers in intact cells of photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (2009) 1444–1450.
- ASZTALOS ET AL. 2010 = Asztalos, E. – Italiano, F. – Milano, F. – Maróti, P. – Trotta, M.: Early detection of mercury contamination by fluorescence induction of photosynthetic bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences* 9 (2010) 1218–1223.
- ASZTALOS – KIS – MARÓTI 2010 = Asztalos, E. – Kis, M. – Maróti, P.: Aging of photosynthetic bacteria monitored by absorption and fluorescence changes. *Acta Biologica Szegediensis* (Megjelenés előtt).
- BÍNA – LITVIN – VÁCHA 2010 = Bína, D. – Litvin, R. – Vácha, F.: Absorption changes accompanying the fast fluorescence induction in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis Research* 105 (2010) 115–121.

- KILEY – KAPLAN 1988 = Kiley, P. J. – Kaplan, S.: Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological Reviews* 52 (1988) 50–69.
- KOBLÍZEK ET AL. 2005 = Koblížek, M. – Shih, J. D. – Breitbart, S. I. – Ratcliffe, E. C. – Kolber, Z. S. – Hunter, C. N. – Niederman, R. A.: Sequential assembly of photosynthetic units in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by fast repetition rate analysis of variable bacteriochlorophyll *a* fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706 (2005) 220–231.
- LAZAR 1999 = Lazar, D.: Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412 (1999) 1–28.
- LUEKING – CAMPBELL – BURGHARDT 1981 = Lueking, D. R. – Campbell, T. B. – Burghardt, R. C.: Light- induced division and genomic synchrony in phototrophically growing cultures of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* Vol. 146 No. 2 (1981) 790–797.
- KOCSIS ET AL. 2010 = Kocsis P. – Asztalos E. – Gingl Z. – Maróti P.: Kinetic bacteriochlorophyll fluorometer. *Photosynthesis Research* 105 (2010) 73–82.
- PAPAGEORGIOU – GOVINDJEE 2004 = Papageorgiou, G. C. – Govindjee (Eds.): *Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis*. *Advances in photosynthesis and respiration*. Dordrecht: Springer, 2004.
- QUIAN – BULLOUGH – HUNTER 2008 = Qian, P. – Bullough, P. A. – Hunter, C. N.: Three-dimensional reconstruction of a membrane-bending complex: The RC-LH1-PufX core dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 14002–14011.
- VREDENBERG – DURCHAN – PRASIL 2009 = Vredenberg, W. J. – Durchan, M. – Prasil, O.: Photochemical and photoelectrochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (2009) 1468–1478.

Photosynthetic bacteria tracked by absorption and fluorescence kinetics

MARIANN KIS

The development of photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides* was studied by absorption spectroscopy and fast induction of bacteriochlorophyll fluorescence in different phases of the growth, under various growing conditions (oxygen content, light intensity etc.) and in synchronous cell population. The results are: 1) The newly synthesized components of the membranes were imbedded immediately into the proteinous scaffold independently on the age of the cell (no „transient” membranes were observed). 2) Under aerobic conditions, the pigments were bleached and under anaerobic conditions the pigment systems showed greening. The relative variable fluorescence (F_v/F_{max}) had small age-dependent (but not cell-cycle-related) changes. The fluorescence induction kinetics was sensitive marker of the aerobiosis: the F_v/F_{max} ratio dropped from 0.7 to 0.4 and the photochemical rate constant from $5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ to $3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ with an apparent halftime of about 4-5 hours after change from anaerobic to aerobic atmosphere. 3) The electrogenic signal (absorption change at 525 nm) reflected the energetization of the membrane which showed cell-cycle dependent changes. That included periodic production and arrangement of protein-lipid components of the membrane synchronized to the cell division.