

CITOKRÓMOK SZEREPE FOTOSZINTETIZÁLÓ BÍBORBAKTÉRIUMOKBAN

¹Kis Mariann, ²James Smart és ¹Maróti Péter

¹Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

²University of Tennessee at Martin, Department of Biological Sciences

DOI: <https://doi.org/10.14232/kvantumelektronika.9.18>

1. Bevezetés

A fotoszintézis során a napfényből érkező fotonok energiája stabil kémiai energiává alakul a gerjesztés, energiaátadás, elektronátadás és enzimikus lépések során. Ezek a folyamatok a membránfehérje komplexekben mennek végbe, és gyakran a fehérjékben található fématomhoz kapcsolódnak. Az elektronszállításban a metalloproteinek egyik fő osztályába tartozó hem tartalmú citokróm fehérjék redox-reakciókon keresztül vesznek részt.

A fotoszintetizáló bíborbaktériumokban a citokrómok akár a membránban, fehérjekomplexekhez kapcsolódnak, akár szabadon, a periplazmában vízdoldékony fehérjéként is előfordulnak. A *Rhodospseudomonas (Rps.) viridis* és a *Rubrivia (Rvx.) gelatinosus* törzsek a reakciócentrum (RC) membránfehérjéhez kapcsolt citokróm alegységet is tartalmaznak, míg a *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* vagy a *Rhodospirillum (Rsp.) rubrum* csak vízdoldékony citokrómokkal rendelkezik [1]. A fotoszintézis elsődleges reakcióit egy foton abszorpciója váltja ki, majd egy membránon keresztüli töltésszétválasztás következik az elsődleges elektrondonor (P , bakterioklorofill dimer), valamint az elsődleges és másodlagos kinon akceptorok (Q_A és Q_B) között. Az oxidált elsődleges donor, a P^+ , másodlagos elektrondonorja lehet RC-hoz kötött citokróm alegység (pl: citokróm c) vagy egy vízdoldékony periplazmikus elektrondonor (citokróm c_2) [2]. Ez a periplazmikus elektrondonor biztosítja a kapcsolatot a citokróm bc_1 komplex és a RC között, hogy teljes legyen a fény által kiváltott ciklikus elektrontranszfer. Hasonlóképpen hozza létre a kapcsolatot az RC-hoz kötött citokróm alegység és a citokróm bc_1 komplex között a vízdoldékony elektrondonor a periplazmában.

Az optimális fotokémiai hatékonyság érdekében a P^+ -nak a citokrómok általi redukciójának gyorsabbnak kell lennie, mint a P^+ és Q_A^- közötti töltésszétválasztás. Ez a követelmény minden olyan törzs esetében megvalósul, amelyek rendelkeznek RC-hoz kötött citokróm alegységgel, mint például a *Rps. viridis* vagy a *Rvx. gelatinosus* [3], és olyan fajok esetében is, amelyekből hiányzik a citokróm alegység, például a *Rba. sphaeroides*, ahol a P^+ -t közvetlenül a vízdoldékony citokróm c_2 redukálja [4]. A mesterségesen előállított *Rba. sphaeroides* $cycA$ citokróm mentes mutáns törzsnél [5] fiziológiás elektrondonor nem áll rendelkezésre a fényindukált P^+ redukálására, az elektron $P^+Q_B^-$ rekombinációján keresztül kerül vissza alapállapotba.

A citokrómok fény-indukált redox változásait többnyire jól nyomon lehet követni optikailag izolált rendszerekben (reakciócentrumban, kromatofórában), de intakt sejtekben ez a megfigyelés nagyon megnehezül az optikai szórás, és más sejtalkotók átlapoló abszorpciója miatt. Ebben a munkában bemutatjuk élő (feltöretlen) sejt citokróm alegységének optikai abszorpcióváltozását, és célul tűztük ki, hogy fényindukált abszorpcióváltozás és fluoreszcencia mérésével a különböző típusú citokrómokat tartalmazó, illetve citokróm mentes törzsekben az elektronátadási lépéseket összehasonlítsuk.

2. Anyagok és módszerek

Sejttenyésztések: A fotoszintetizáló bíborbaktériumok *Rba. sphaeroides* 2.4.1, $cycA$, $cyt\ c_4$ double KO és a *Rvx. gelatinosus* Siström médiumban növekednek. Egyrészt teljesen teletöltött üvegekben oxigén nélkül (fotoheterotróf és anaerob növekedés) másrészt pedig félig töltött Erlenmeyer lombikokban (fotoheterotróf és aerob növekedés). A megvilágításhoz (fotoszintetikus növekedés) 40 wattos

wolfrám szálás izzókat használunk. Ezekből körülbelül 13 W/m^2 fényerősség érkezik az üvegek felszínére.

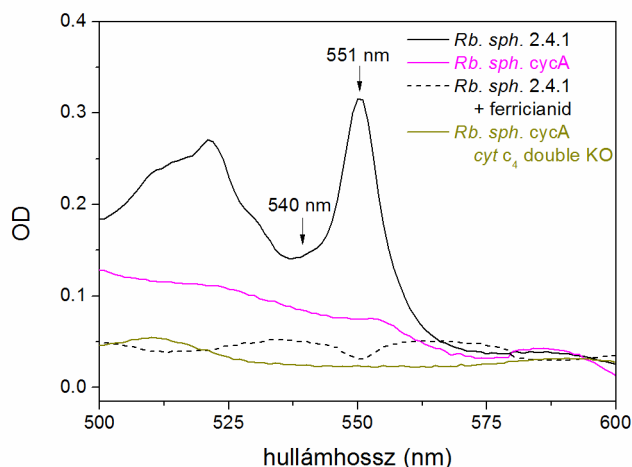
Steady-state abszorpciós spektrofotometria: A sejtek abszorpciós spektrumait a látható tartományban (500-600 nm) Unicam UV4 (kétsugaras) vagy Helios γ (egysugaras) spektrofotométerrel mértük. A spektrumot a sejtek által keltett fényszórásra korrigáltuk.

Fényindukált abszorpcióváltozás: Fényindukált abszorpcióváltozás méréséhez házilag épített spektrofotométert (Maróti és Wraight 1988), gerjesztéséhez Xe flash lámpát vagy lézerdiódát ((450 nm és 802 nm, 2 W), detektáláshoz Hamamtsu R928 típusú fotoelektron sokszorozót használtunk. A mérőfény wolfrám szálás izzó. A megfelelő hullámhosszakat monokromátorokkal és szűrőkkel állítjuk be. Az oxidált bakterioklorofill dimert (P^+) 798 nm-nél, a citokróm oxidációt 551 nm-nél (referencia 540 nm) detektáljuk. Méréskor a sejtek optikai denzitását alacsonyan kell tartani (OD (808 nm) < 0.1).

Fluoreszcencia indukció: A fluoreszcencia indukció gerjesztéséhez 802 nm hullámhosszú lézer diódát használtunk, ez a hullámhossz megfelel a LH2 antenna 800 nm-es abszorpciós sávjának, így optimális a megvilágítás. A detektálást a gerjesztés irányára merőlegesen elhelyezett lavina fotodiódával végeztük. A lézerfény szórásától a detektort 850 nm felett áteresztő szűrővel védtük.

3. Eredmények és megvitatásuk

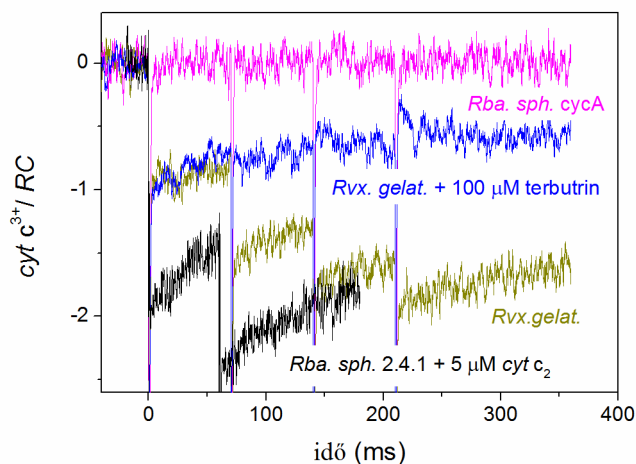
A steady-state abszorpciós spektrumokat (1. ábra) a növekedés exponenciális fázisában lévő sejtekből készült kromatofórákon vettük fel. A kromatofóra előnye, hogy a sejtfalet eltávolítjuk a preparálás során, így csak a belső membránrendszert (fotoszintetikus apparátust) használjuk fel, ezért a sejtek alakjából fakadó szórással nem kell számolni. A citokrómok abszorpciós maximumát 550 nm körül mérjük. Az 1. ábrán látható *Rba. sphaeroides* 2.4.1 redukált állapotú citokróm sávja 551 nm-es maximummal, amelyet ferricianid hozzáadásával oxidálunk, ennek hatására a csúcs jóval kisebb lesz, és átfordul. A vad típusú törzsből készült citokróm mentes mutánsok spektrumai nem tartalmazzák az 551 nm-es sávot.



1. ábra: Steady-state abszorpciós spektrumok *Rhodospirillum rubrum* (*Rba. sph.*) *sphaeroides* 2.4.1 vad típusú és citokróm mentes mutáns (*cycA* és *cyt c4* double KO) törzseiből preparált kromatofórák citokróm sávjairól. (—) redukált citokróm spektrum, nyilakkal jelölve az 551 nm-es citokróm csúcs és az 540 nm-nél lévő P^+ izoszbesztikus pontja, (---) ferricianiddal oxidált citokróm spektruma, (—) és (—) citokróm mentes sávok.

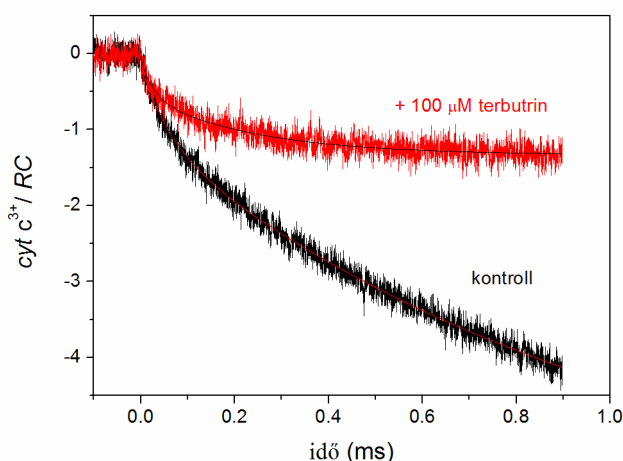
Az egyes telítési fényfelvillanások által kiváltott citokróm ($cit\ c^{3+}/cit\ c^{2+}$) abszorpcióváltozását 551 nm-es hullámhosszon folytonosan követni tudjuk (2. ábra). Mivel a P^+ -nak 540 nm-nél izoszbesztikus pontja van (1. ábra), ezért a tényleges citokróm abszorpcióváltozást az 551 nm-nél és 540 nm-nél felvett különbségi kinetika adja. Az oxidált citokróm lépcsőket kromatofórákon, négy, 60 ms-onként egymást követő flash gerjesztéssel vettük fel. A szinteket ($cit\ c^{3+} / RC$) a terbutrinnal kezelt minta maximumához viszonyítottuk. A terbutrin egy Q_B helyre bekötődő interkinon elektrontranszfer gátló ($Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$), amely a rendszernek csak egyszeri átfordulását engedi meg.

A citokróm alegységet is tartalmazó *Rvx. gelatinosus* a négy flash hatására kétféle szintet emelkedett ($2 \text{ cyt } c^{3+} / \text{RC}$). Ehhez a mintához $100 \mu\text{M}$ adtunk, ezért a szintje nem emelkedett egyenél magasabbra a flashek hatására. A vízdékony mobilis citokróm c_2 -öt tartalmazó *Rba. sphaeroides* 2.4.1 mintához $5 \mu\text{M}$ vízdékony lószívből izolált citokrómot adtunk, amely hatására két flash alatt elérte azt a szintet, amit a citokróm alegységet is tartalmazó *Rvx. gelatinosus* adott. A citokróm mentes mutáns törzsnél nem kaptunk jelet.



2. ábra: Különböző törzseken mért. flash-indukált abszorpcióváltozás, citokróm oxidáció (551 nm (ref. 540 nm)). A flash-eket 60 ms-onként ismételve. (—) *Rba. sphaeroides* + $5 \mu\text{M}$ lószív citokróm c_2 , (—) *Rba. sphaeroides* *cycA* mutáns törzs, (—) *Rvx. gelatinosus*, (—) *Rvx. gelatinosus* + $100 \mu\text{M}$ terbutrin.

3. ábra). Ebben az esetben lefókuszált 802 nm -es, 2W teljesítményű lézerdíódat használtunk. A mintához itt is $100 \mu\text{M}$ terbutrint adtunk. A kinetika két jól elkülöníthető exponenciális komponenre bontható, a kontroll esetében $50 \mu\text{s}$ és 1 ms félemelkedési időekkel, a terbutrinnal kezelt mintánál pedig $25 \mu\text{s}$ és 200 ms értékekkel. A kezelt minta oxidált citokróm jele 1 ms alatt telítésbe ment, a kontroll mintáé még többszöri átfordulás után sem telítődött. A szinteket ($\text{cyt } c^{3+} / \text{RC}$) a kezelt mintára illesztett két egyenes metszéspontjából határoztuk meg (nincs ábrázolva).



3. ábra: *Rubrivivax gelatinosus* egész sejteken mért citokróm oxidáció (551 nm (ref. 540 nm)). Gerjesztés lefókuszált 2 W -os (802 nm) lézerdíóval. (—) kontroll minta, (—) terbutrinnal kezelt minta. Illesztés biexponenciális közelítéssel.

Az elektrontranszfert nem csupán a kérdéses pigmentek (itt citokrómok) abszorpció-változásaiból, hanem az antenna bakterioklorofillek fluoreszcencia-változásából is nyomon lehet követni, mert az antenna

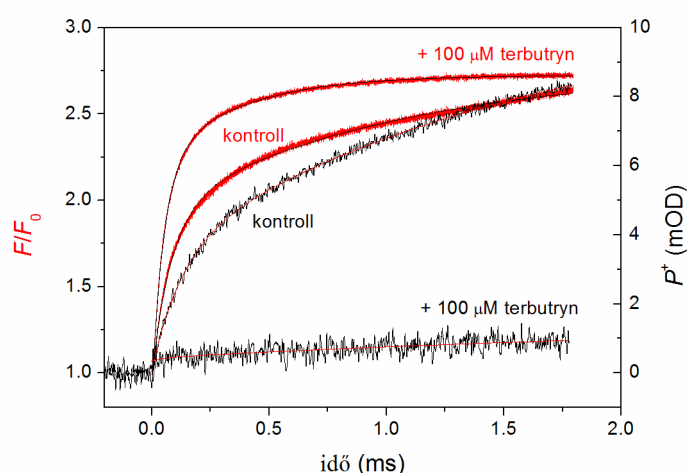
bakterioklorofill pigmentek fluoreszcencia hatásfokát a RC redox állapota és a fotoszintetikus egységek szerveződése határozza meg. A nyitott vagy zárt állapotú RC a bakterioklorofill fluoreszcencia hatásfok alacsony ill. magas értékével jellemezhető, és az átmenetük a változó fluoreszcencia megfigyelésével követhető.

Rvx. gelatinosus sejteken folyamatos lézerdíó gerjesztéssel a citokróm oxidációjával párhuzamosan mértük az oxidált dimer abszorpcióváltozását (azaz az oxidált P, $[\text{P}^+]$ mennyiségét) és a fluoreszcencia relatív hatásfokát (4. ábra). A mérési körülmények mindhárom esetben azonosak voltak. A két exponenciális emelkedés ezeken a görbéken is megfigyelhető.

A fluoreszcencia esetében a kontroll mintánál 90 μ s és 1 ms félemelkedési időket kaptunk megegyező amplitúdókkal, a terbutrinnal kezelés hatására az értékek 50 μ s és 0,4 ms-ra változtak, illetve az első fázis amplitúdója 50 %-ról 70 %-ra nőtt. Vagyis a kezelés hatására az első, fotokémiai fázis ($P^+Q_A^-$) sebessége és amplitúdója is emelkedett, a második, lassabb fázis részeseése viszont csökkent.

A lassú fázis többszörös töltésszétválasztás eredménye lehet, mert a terbutrin számottevően csökkentette a lassú fázis amplitúdóját.

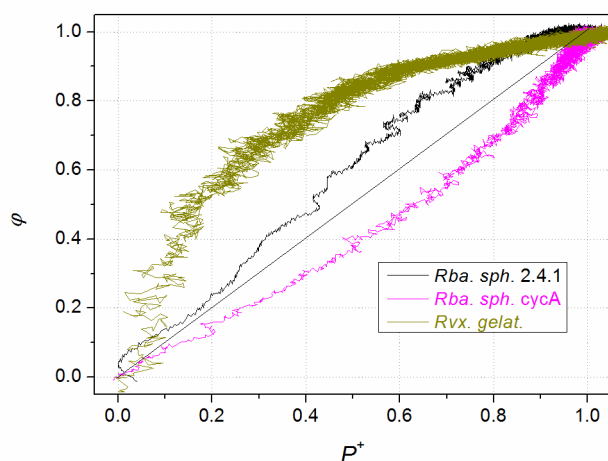
A P^+ abszorpcióváltozásánál egy 130 μ s és szintén egy 1 ms-os lassabb komponenst kaptunk. Összehasonlítva a fluoreszcenciával, a *Rvx. gelatinosus* sejteknél a fluoreszcencia kezdeti emelkedése gyorsabb volt, mint a P^+ kialakulása. Terbutrin hozzáadásával pedig szinte megszűnt a P^+ emelkedése, ugyanis a terbutrin blokkolja az elektrontranszportot a RC akceptor oldalán és a RC zárva ($P^+Q_A^-$) marad.



4. ábra: *Rubrivivax gelatinosus* egész sejteken mért bakterioklorofill fluoreszcencia indukció és 798 nm-nél mért oxidált dimer (P^+) abszorpcióváltozás. A fluoreszcencia (F/F_0) a kezdeti F_0 szintre normált. Illesztés biexponenciális közelítéssel.

A kinetikai különbségek a fluoreszcenciában és a P^+ abszorpcióváltozásában jól megfigyelhetők a különböző törzseknél. Ha a változó fluoreszcenciát (φ) ábrázoljuk a P^+ függvényében az idő

(mint változó paraméter) megszüntetésével, ezek az eltérések még inkább kiemelkednek a különböző törzsek tekintetében. A fentebb már említett *Rvx. gelatinosus* törzsnél a fluoreszcencia felfutása jóval gyorsabb, mint az oxidált diméré (4. ábra), ezért ebben az ábrázolásban (5. ábra) egy, alulról nézve domború görbét kapunk. A vad típusú *Rba. sphaeroides* 2.4.1 sejteknél is még domború, de itt már nincsen akkora különbség a kinetikák felfutása között. Ezekkel ellentétben a citokróm c_2 mentes mutáns törzsnél homorú görbét látunk, mert itt a P^+ kinetikailag megelőzi a fluoreszcencia változását [6].



5. ábra: Különböző törzsek változó fluoreszcenciája (φ) az oxidált dimer (P^+) függvényében az idő eliminálásával. A φ és a P^+ is a maximális értékükre normált. (—) *Rba. sphaeroides* 2.4.1, (—) *Rba. sphaeroides* cycA, (—) *Rvx. gelatinosus*.

A kísérleteinkhez olyan törzseket választottunk ki, amelyek donor oldalai lényegesen eltérők: *Rba. sphaeroides* sejteknél nincs a RC-hoz

kötött citokróm alegység, és a fotokémiaailag oxidált dimért egy tőle különböző távolságra (közelre vagy távolra) elhelyezkedő vízdékony citokróm c_2 fogja eltérő (nagyobb vagy kisebb) sebességgel

redukálni. A *cycA* törzsben genetikai konstrukcióval eltávolítottuk a citokróm *c2*-t, így az oxidált dimérnek nincs közvetlen elektron donorja, és emiatt hosszú élettartamú lesz. A *Rvx. gelatinosus* törzs RC fehérjében egy külön citokróm alegység szolgálja azt a feladatot, hogy az oxidált dimért az alegység valamelyik citokrómja gyorsan visszaredukálhassa.

Ezek a szerkezeti és redox-kinetikai különbségek tükröződnek a megfigyelt abszorpciós és fluoreszcencia tulajdonságokban. Mivel ezeket intakt körülmények között is megfigyelhettük, ezért ezeknek a fluoreszcencia jellemzőknek a mérésével közvetlenül is nyomon követhetjük élő sejtekben ezeket a fotofizikai-fotokémiai lépéseket, és direkt módon következtethetünk a baktériumok fotoszintetikus aktivitásra.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az EFOP-3.6.2-16-2017-0005 támogatásával készült. Köszönjük dr. Szatmári Sándor egyetemi tanárnak a mérések elvégzésére alkalmas laborhelyiség kialakításáért.

Hivatkozások

- [1] Terrance E. Meyer and Michael A. Cusanovich, Discovery and characterization of electron transfer proteins in the photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research* **76**: 111–126, 2003.
<https://doi.org/10.1023/A:1024910323089>
- [2] Schoepp B, Parot P, Menin L, Gaillard J, Richaud P and Verméglio A In vivo participation of a high potential iron–sulfur protein as electron donor to the photochemical reaction center of *Rubrivivax gelatinosus*. *Biochemistry* **34**: 11736–11742, 1995.
<https://doi.org/10.1021/bi00037a010>
- [3] Menin L, Yoshida M, Jaquinod M, Nagashima KVP, Matsuura K, Parot P and Verméglio A Dark aerobic growth conditions induce synthesis of a high midpoint potential cytochrome *c8* in the photosynthetic bacterium *Rubrivivax gelatinosus*. *Biochemistry* **38**: 15238–15244, 1999.
<https://doi.org/10.1021/bi991146h>
- [4] Tetreault M, Rongey SH, Feher G and Okamura MY, Interaction between cytochrome *c2* and the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*: effects of charge modification mutants on binding and electron transfer. *Biochemistry* **40**: 8452–8462, 2001.
<https://doi.org/10.1021/bi010222p>
- [5] Donohue TJ, McEwan AG, Van Doren S, Crofts AR and Kaplan S, Phenotypic and genetic characterization of cytochrome *c2* deficient mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **27**: 1918–1925, 1988.
<https://doi.org/10.1021/bi00406a018>
- [6] Maróti P, Kovács IA, Kis M, Smart JL, Iglói F, Correlated clusters of closed reaction centers during induction of intact cells of photosynthetic bacteria. *Scientific Reports* **10**:14012, 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70966-3>